

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ALLANTOİNİN CİLT ONARIMINDAKİ ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLGÜN GÖKÇE

2000007400

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ezgi AVŞAR ABDİK

HAZİRAN 2023

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ALLANTOİNİN CİLT ONARIMINDAKİ ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLGÜN GÖKÇE

2000007400

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ezgi AVŞAR ABDİK

Jüri Üyeleri: Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin ABDİK
Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

HAZİRAN 2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans yolculuğumdaki tüm destekleri, ilgi ve alakası, güler yüzü ve güldüren mizacı ile Tez Danışmanım kıymetli Dr.Öğr. Ezgi Avşar ABDİK'e sonsuz teşekkür ediyorum. Sevgili aileme her zaman bana olan destekleri için teşekkür ediyorum. Golden Goddess Organizasyon ortaklarım Gökçe Türker ve Sueda Başar'a bu yolda bana vermiş oldukları destekler için teşekkür ediyorum. qPCR deneylerindeki yardımı ve desteği için Melis YILDIRIM'a teşekkür ediyorum. Çalışmamızda kullanılmak üzere allantoini bize temin eden İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Doç. Dr. Hüseyin Abdik'e ayrıca teşekkür ediyorum. Değerli okulum, bölüm hocalarım ve bölüm arkadaşlarıma bana kattıkları her şey için çok teşekkür ediyorum.

ÖZET

Deri vücuttaki en büyük organdır ve vücudun tüm dış yüzeyini kaplar. Anatomi ve işlev bakımından önemli ölçüde farklılık gösteren epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç katmandan oluşur. Cildin yapısı, vücudun patojenlere, UV ışığına, kimyasallara ve mekanik yaralanmaya karşı ilk bariyeri olarak hizmet eden karmaşık bir sistemden oluşur. Aynı zamanda sıcaklığı ve çevreye salınan su miktarını da düzenler. Yaralanmalarda ilk hasarı deri alır ve aşamalı olarak yara iyileştirme süreci başlar. Yara iyileştirme, travma ile tetiklenen hücresel ve biyokimyasal olayların etkileşimi ile birlikte hasarlanan dokunun yeniden onarılmasıdır. Yara iyileşmesi birçok hücre tipini, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin birbiriyle uyum içinde rol aldığı biyolojik, komplike, dinamik bir süreçtir. Yara iyileşmesi, dört aşamadan oluşur: hemostaz, iltihaplanma, proliferasyon ve yeniden şekillenme. Yapılan çalışmalarda doğal bileşiklerin yara iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Allantoin genellikle Karakafes bitkisinden elde edilen toz halinde temin edilip çalışmalarda kullanılan bir pürin türevidir. Doğal bir bileşik olan allantoin; antioksidan, antiinflamatuvar, yara iyileşmesi ve hipoglisemik etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikler sergiler. Aynı zamanda yenilikçi olarak yara iyileştirme basamaklarında kullanılmaktadır. MTT analizi, Apoptoz analizi, Yara Kapanma deneyi, Hücre döngüsü analizi, DIOC6 boyası, ve kantitatif PCR analizi yardımıyla allantoinin HaCaT hücre hattı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 200 µM allantoin dozunun hücre canlılığını ve yara iyileşmesini anlamlı oranda arttırdığı görülmüştür. Allantoin uygulaması apoptotik hücre sayısında bir artışa sebep olmamıştır. 200 µM allantoin uygulanan hücrelerin S vs G2/M fazında toplandığı görülmüş ve elde edilen sonuçlar MTT sonuçlarını desteklemiştir. Bunlara ek olarak, 200 µM Allantoin uygulamasının Akt, Colla ve Fibronektin seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, allantoinin yara iyileşmesinde etkili olduğunu ve tedavide kullanım için uygun bir doğal bileşik olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: allantoin, yara iyileşmesi, proliferasyon

ABSTRACT

The skin is the largest organ in the body and covers the entire outer surface of the body. It consists of three layers, the epidermis, dermis, and hypodermis, all three of which differ significantly in anatomy and function. The structure of the skin consists of a complex system that serves as the body's first barrier to pathogens, UV light and chemicals, and mechanical injury. It also regulates the temperature and the amount of water released into the environment. In injuries, the skin takes the first damage and the wound healing process begins gradually. Wound healing is the re-repair of the damaged tissue with the interaction of cellular and biochemical events triggered by trauma. Wound healing is a biological, complex, dynamic process in which many cell types, various cytokines, and growth factors act in harmony with each other. Wound healing consists of four stages: hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling. Studies have shown that natural compounds are effective in wound healing. Allantoin which is a natural compound, is a purine derivative that is generally supplied as a powder obtained from the Black Cage plant and used in studies. It exhibits various pharmacological properties including antioxidant, anti-inflammatory, wound healing and hypoglycemic effects. At the same time, wound healing steps are used innovatively. This study aims to investigate the effects of allantoin on the HaCaT cell line by MTT assay, Apoptosis analysis, Wound Closure assay, Cell cycle analysis, DIOC6 dye, and quantitative PCR analysis. General benefits of allantoin: moisturizing and soothing, cell regeneration, anti-inflammatory effect, wound healing, antioxidant protection. According to the results, it was observed that 200 μ M allantoin dose significantly increased cell viability and wound healing. Allantoin treatment did not cause an increase in the number of apoptotic cells. It was observed that cells treated with 200 μ M allantoin accumulated in the S vs G2/M phase and the results were supported the MTT results. In addition, 200 μ M Allantoin treatment has been shown to increase Akt, Col1a and Fibronectin expression levels. The results show that allantoin is effective in wound healing and is a suitable natural compound for use in therapy.

Key Words: allantoin, wound healing , proliferation

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Deri.....	1
1.1.1. Epidermis	3
1.1.2. Dermis.....	6
1.1.3. Hipodermis.....	7
1.2.Yara İyileşmesi	7
1.2.1. Homeostaz	9
1.2.2. İnflamasyon	10
1.2.3. Proliferasyon.....	11
1.2.3.1. Epitelizasyon.....	12
1.2.3.2. Anjiyogenez.....	13
1.2.3.3. Granülasyon.....	13
1.2.4. Remodelling (Yeniden Şekillenme)	14
1.3.Yara iyileşme tipleri.....	15
1.4.Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	15
1.4.1. Yara İyileşmesini Etkileyen Lokal Faktörler	16
1.4.1.1. Oksijenizasyon.....	16
1.4.1.2. Enfeksiyon.....	17
1.4.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Sistemik Faktörler	18
1.4.2.1. Yaş	18

1.4.2.2.	Kronik Hastalıklar.....	19
1.4.2.3.	Yeme Alışkanlıkları	19
1.4.2.4	Cinsiyet.....	20
1.5.	Yara İyileşmesinde Kullanılan İlaçlar Ve Doğal Ürünler.....	20
1.5.1.	Yara Pansumanları ve İskeleler	21
1.5.2.	Deri İmzaları.....	22
1.5.3.	Büyüme Faktörleri ve Diğer Moleküller	22
1.5.4.	Kök Hücreler	24
1.6.	Yara İyileştirmede Allantoinin Rolü1.6.1.Allantoin.....	25
1.7.	Çalışmanın Amacı.....	27
2.	MATERYAL-METOD	28
2.1.	Hücre Kültürü	28
2.1.1.	İlaç Hazırlama	28
2.2.	Hücre Açma ve Dondurma	28
2.3.	Hücre Pasajlama Protokolü	29
2.4.	Hücre Canlılık Testi (MTT Analizi).....	29
2.5.	Yara Kapanma Deneyi (Scratch Assay)	29
2.6.	Apoptoz Analizi (ANNEXIN V/PI Assay)	30
2.7.	Hücre Döngüsü Analizi	30
2.8	3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DIOC6) Boyaması	30
2.9.	Gen Ekspresyon Analizi	31
2.9.1.	RNA İzolasyonu	31
2.9.2.	c-DNA Sentezi.....	31
2.9.3.	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	32
2.10.	İstatistiksel Analiz	33
3.	SONUÇLAR	34
3.1.	Hücre Canlılık Analizi.....	34

3.2.Yara Kapanma Deneyi Analizi	36
3.3.Apoptoz Analizi	37
3.4.Hücre Döngüsü Analizi	41
3.5.DIOC6 Boyama	42
3.6.GEN EKSPRESYON ANALİZİ (qPCR)	43
4. TARTIŞMA	45
KAYNAKÇALAR	49



KISALTMALAR

ADSC	Adipozdan türetilmiş kök hücreler
AECR	Karakafes Otunun Sulu Özü
AL	Allantoin
ALN	Alantoinaz
AKT	Protein kinaz B
Cd	Kadmiyum
Col1A	Kolajen 1A
CXCL-8	C-X-C Motifli kemokin ligand 8
CXCL-4	C-X-C Motifli kemokin ligand 4
DFU	Diyabetik Ayak Ülseri
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	Hücre dışı matris
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ESC	Embriyonik Kök Hücreler
FBS	Fetal Sığır Serumı
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGF 2	Fibroblast Büyüme Faktörü 2
FGF 7	Fibroblast Büyüme Faktörü 7
FGF 10	Fibroblast Büyüme Faktörü 10
FGF 22	Fibroblast Büyüme Faktörü 22
FGF1	Fibroblast Büyüme Faktörü 1
GAG	Glikozaminoglikan
GI	Gastrointestinal
HA	Hyalüronik Asit
IL-1	İnterlökin 1
IL-4	İnterlökin 4
IL-8	İnterlökin 8
IL-10	İnterlökin 10
IL-1 α	İnterlökin 1 alfa

iPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
KC	Keratinosit
L929	Fibroblastik
M1	Proinflamatuvar Makrofajlar
M2	Antiinflamatuvar Makrofajlar
MAPK	Mitojen Aktive Edilmiş Kinaz
MC	Melanosit
MDCK	Hücre Canlılığı ve Epitel Proliferasyonu
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz 9
MSC	Mezenkimal Kök Hücreler
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NET	Netrofil Hücre Dışı Tuzaklar
OU	Ürikaz
PA	Saf Allantoin
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PSA	Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
P53	Tümör Baskılayıcı Gen
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SSG	Split Deri Greftleme
TGFβ	Transformatik Büyüme Faktörü Beta
TIMP	Metalloproteinazların Doku İnhibitörü
TNFα	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

TABLÖLAR LİSTESİ

TABLO 1. qPCR Sentezinde Kullanılan Primerler	32
TABLO 2 qPCR Kullanım Koşulları.....	33



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Derinin Katmanları	3
Şekil 2. Epidermis katmanları ve epidermis hücreleri.....	5
Şekil 3. Epidermisteki fibroblast hücrelerinin mikroskop görüntüsü	7
Şekil 4. Yara iyileşmesi fazları	9
Şekil 5. Hidrojel	21
Şekil 6. Embriyonik kök hücreler.....	25
Şekil 7. Mezenkimal kök hücreler	25
Şekil 8 : Allantoinin yapısı	27
Şekil 9. Farklı Allantoin konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri. *P<0.05 vs kontrol.....	35
Şekil 10: 50 ve 200 µM Allantoin dozları uygulanan HaCaT hücre hattında 24 ve 48 saat sonundaki yara kapanma oranlarının ışık mikroskopu altında fotoğraflanması. Ölçek çubuğu: 200 µm	36
Şekil 11: 50 ve 200 µM Allantoin dozları uygulanan HaCaT hücre hattında 24 ve 48 saat sonundaki yara kapanma oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol.....	37
Şekil 12. 24 saat allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının Annexin V-FITC/PI deneyi ile gösterilmesi.....	38
Şekil 13: 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda canlı hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol	38
Şekil 14. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda erken apoptotik hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol.....	39
Şekil 15. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda geç apoptotik hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol.....	39
Şekil 16. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda nekrotik hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol.....	40
Şekil 17. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonunda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının Annexin V-FITC/PI deneyi sonucunda grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol.....	40
Şekil 18. 50 ve 200 µM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki hücre döngüsü faz dağılımının gösterimi	41

Şekil 19. 50 ve 200 µM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki hücre döngüsü faz dağılımında toplam hücre yüzdelерinin gösterilmesi. *P<0.05 vs kontrol.....	42
Şekil 20. 50 ve 200 µM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki DIOC6 boyası sonucunda elde edilen floresan mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu: 200 µm.....	42
Şekil 21. 200 µM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki Akt, Col1A, Fibronectin ve Laminin gen ekspresyon seviyelerinin grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol.....	44



1.GİRİŞ

1.1. Deri

Deri, çok çeşitli mikroorganizmaları barındıran, çok sayıda kıvrım, girinti ve özel bölümlere sahip 1,8 m²'lik çeşitli habitatlardan oluşan bir ekosistemdir. Derinin birincil rolü, vücudumuzu yabancı mikroorganizmalara ve toksik maddelerin potansiyel saldırılarına karşı koruyan fiziksel bir bariyer görevi görmektir. Deri üç ana tabakadan oluşmaktadır. En dıştan içe doğru olacak şekilde epidermis, dermis ve hipodermistir (Şekil 1) [1].

Epidermis, vücudun koruyucu tabakasını oluşturarak [2] derinin esnekliğinde ve sertliğinde rol oynar. Ayrıca derinin su dengesi epidermis tarafından kontrol edilir. Keratinositler bu tabakadaki majör hücre tipi olmasına rağmen, epidermiste melanositler, Merkel ve Langerhans hücreleri gibi farklı tipte hücreler de bulunur. Melanositler, sağlıklı deri hücrelerini UV radyasyonundan koruyan melanin pigmenti üretirken; Merkel hücreleri, nöronal sinyal kaskadı için reseptör görevi görür. Langerhans hücreleri ise bağışıklık hücrelerinin dendritik kökenine aittir ve makrofaj görevi görür [3].

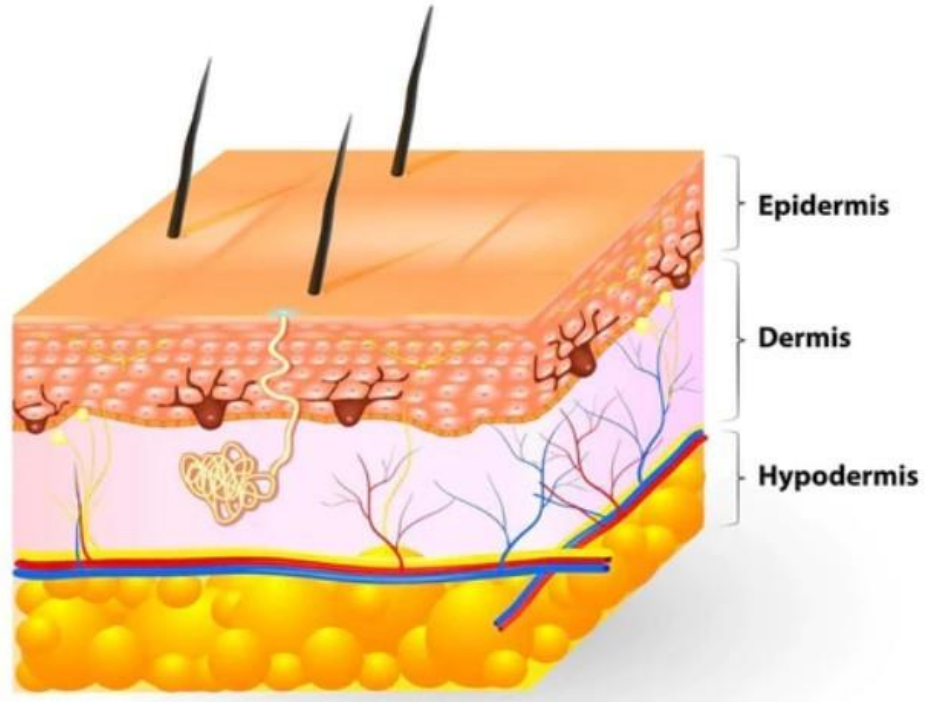
İnsanın vücudunun neredeyse tamamını kaplayan en büyük organı olan deri, iç doku ve organları dış hasarlara karşı korur. Deri yaralanmalarda genellikle termal, fiziksel, mikrobiyal ve kimyasal bir takım zararlılarla karşılaşır. Bu potansiyel olarak zararlı faktörlerden herhangi biri derinin normal yapısını ve işlevini bozar ise, yara oluşur. İlgili deri katmanlarına göre yaralar üç kategoriye ayrılır. Derinin sadece ilk tabakası olan epiderminin hasar gördüğü yüzeysel yaralar, kısmi- hem epiderminin hem de derminin bozulduğu yaralar ve epidermise ve dermise ek olarak hipodermisinin de hasar gördüğü tam kalınlıkta yaralar.

Epidermis, tırnak, ter, saç ve yağ bezlerinin mukoza zarları gibi uzantıları ile beraber daimi örtü sistemini meydana getirir. Ayrıca, yanıtların düzenlenmesi için özelleşmiş sinir reseptörleri gibi çeşitli yardımcı yapılar da mevcuttur. Hem dış hem de iç uyaranlar (ısı, ağrı, dokunma ve basınç gibi) cildin önemli işlevlerini yerine getirmesine yardım eder. Her tabakadaki hücrelerin tipleri ve belirli bir anatomik konumdaki kalınlıkları birbirinden oldukça farklıdır. Örneğin, epidermis en ince göz kapaklarında 0,1 mm iken, en kalın değerine avuç içi ve ayak tabanlarında 1,5 mm'ye ulaşır [4].

Pigmentli derinin (ten renginin) tanımlanması, çeşitli ırkların ve etnik grupların araştırılmasını gerektirir. Deri rengi ve derinin güneş ışığı gibi çevresel faktörlere verdiği tepkinin yanı sıra diğer fenotipik belirtiler, ilk insanlığın başlangıcında sınıflandırmıştır. Daha yakın zamanlarda, moleküler analiz, ırklar ve etnik gruplar arasındaki genetik farklılıklar tanımlanmıştır. Çoğu antropolog, irksal çeşitliliğin doğal seçim süreçleriyle geliştiğine inanmaktadır; yani ırklarda farklı biyolojik özellikler gelişmiştir. Çünkü bu özellikler belirli bir ortama uyum sağlamayı kolaylaştırmıştır. Örneğin, koyu pigmentli derinin ekvatora yakın yaşayan insanları ultraviyole (UV) ışınlarından korumak için evrimleştiğine inanılmaktadır. Öte yandan, ekvatorun kuzeyinde yaşayan insanlar, epidermisin bazal tabakasında D vitamini oluşumunu teşvik etmek için UV ışınlarının yeterli emilimini sağlamak için daha soluk bir deriye sahiptir. Yapılan araştırmalara göre ise farklı ırktan insanlarda koyu renkli derilerin yaraya ve tahrişe daha duyarlı olduğu doğrulanmıştır [5].

Dermis, insan derisinin ikinci tabakasıdır ve epidermisin altında bulunur. Epidermise destek sağlar ve dış etkilere karşı koruma sağlar. Deri dokusunun en kalın ve en güçlü kısmını oluşturur. Dermis çeşitli yapı ve hücreleri içerir. Derinin elastikiyet, dayanıklılık ve esneklik gibi önemli işlevlerini yerine getirir. Dermis, içerdiği elastin lifleri sayesinde derinin esnemesini sağlar. Kılcal damarlar ve kan damarları yoluyla deriye kan ve oksijen sağlar. Ter bezleri aracılığıyla terleme yoluyla vücut sıcaklığının düzenlenmesine yardımcı olur. Sinir uçları dokunma, basınç, ağrı ve sıcaklık gibi duyu uyaranları algılar ve beyne iletir. Ek olarak, yara iyileşmesi sırasında yeni deri hücrelerinin oluşumunu destekler. Dermis, iki ana katmandan oluşur: papiller dermis ve retiküler dermis. Papiller dermis, dermisin en üstteki ince tabakasıdır ve epidermisi destekler. Retiküler dermis, papiller dermisten daha kalın ve yoğundur. Dermisin büyük kısmını oluşturur ve kollajen, elastin lifleri ve diğer yapısal bileşenleri içerir.

Hipodermis derinin en alt tabakasıdır ve deri ile altındaki dokular arasında bulunur. Deri altı veya yağ tabakası olarak da bilinir. Hipodermis deriyi destekler, yalıtımı sağlar ve enerji depolamasında önemli bir rol oynar. Hipodermis, bağ dokusu ve yağ hücrelerinden oluşur. Bağ dokusu, kollajen ve elastin lifleri içeren bir ağ yapısıdır. Bu lifler, hipodermisin gücünü ve elastikiyetini sağlar. Yağ hücreleri (adipositler) hipodermiste baskındır ve yağ depolanmasından sorumludur. Yağ hücreleri ayrıca kan damarlarını, sinir uçlarını ve lenfatik damarları içerir.



Şekil 1. Derinin Katmanları

1.1.1. Epidermis

Epidermis tabakası, yaşlanmayla birlikte kinetiğin yavaşlamasına rağmen, yaşam boyunca sürekli olarak hücre (deri hücreleri) devri olarak bilinen doğal bir süreçte yenilenir. Epiderminin bazal tabakasında oluşan bu doğal döngüde, hücreler apoptoz geçirdikten sonra döküldükleri deri yüzeyine ulaşana kadar sürekli olarak şekil değiştirir [3].

Normal epidermis, sürekli yenilenen çok katlı yassı bir epiteldir. Epidermisteki anahücre, epidermal hücrelerin yaklaşık %95'ini oluşturan ektodermal olarak türetilmiş keratinositlerdir. Keratinosit, bazal membrana tutunma noktasından deri yüzeyine kademeli olarak hareket ettikçe, morfolojik olarak farklı birkaç epidermal katman oluşturur. Bunlar Bazal Tabaka, Dikenli Tabaka, Taneli Tabaka ve Keratinleşmiş Tabakadır. Bazal tabaka en derin ve deriye rengini veren kısımdır. Epidermisde bulunan en kalın katmandır ve birbiriyle sanki dikensi uzantılar aracılığı ile bağlanmış gibi gözükür, en fazla 10 kata kadar dizilmiş, düzensiz ve kenarlı keratinosit hücrelerinden oluşmaktadır. Epiderminin içindeki en kalın katmandır ve birbiriyle sanki dikensi yapılar aracılığıyla bağlanmış gibi gözükür, birkaçkattan 10 kata kadar dizilmiş, düzensiz ve kenarlı keratinosit hücrelerinden oluşmaktadır. Taneli tabaka, hücrelerin üst göç için hazırlandığı ince bir tabakadır. Bu katmanda hücreler organellerini, çekirdeklerini kaybederler ve derinin bariyer işlevine katkıda bulunan lipid zarfı

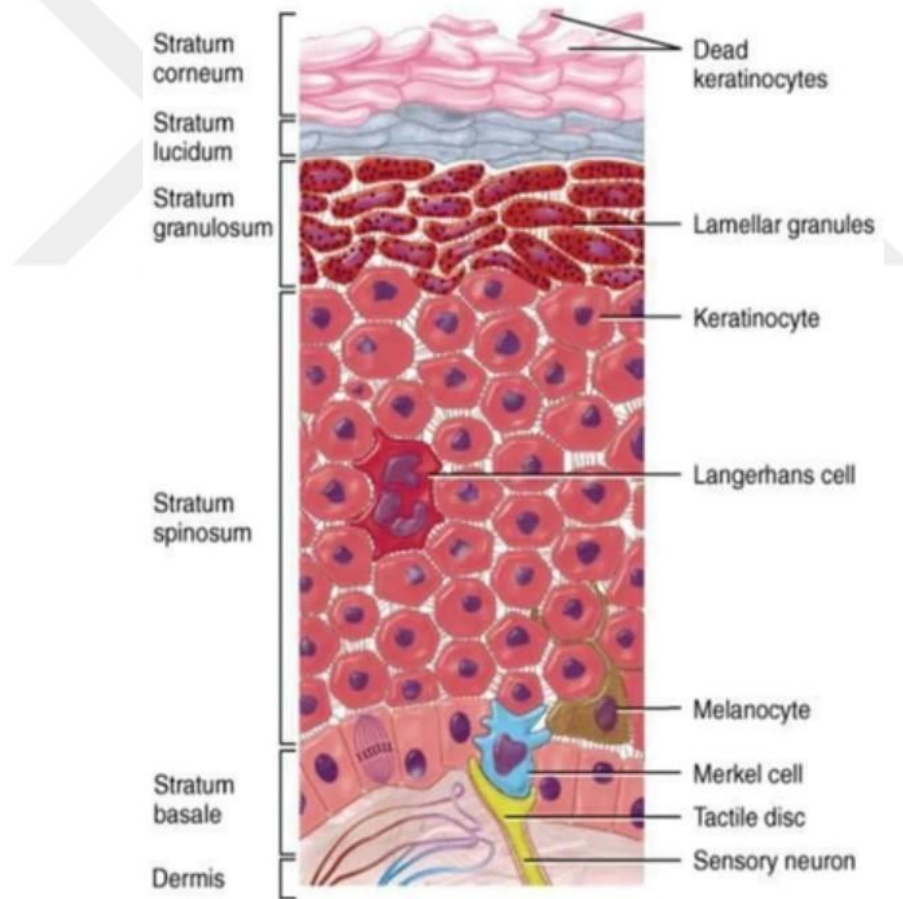
adı verilen bir zarfı alırlar. Ayrıca, hücre ölümü nedeniyle hücre zarı kalınlaşır. Üretilen keratin ve keratohyalin, tırnak ve saç yapısında yer alır. En yüzeysel katman Keratinleşmiş tabaka olarak adlandırılır. Keratinleşmiş tabaka 20-25 kat ölü keratinositlerden oluşur. Bu yoğun tabaka, vücudu çevresel faktörlerden, bakterilerden ve diğer mikroorganizmalardan korur. Keratinleşmiş tabaka soyulur ve periyodik olarak değiştirilir. Ancak keratinleşmiş tabakanın sert ve kuru yapısı aynı kalır. Avuç içlerinde ve ayak tabanlarında, keratinleşmiş tabaka ile taneli tabaka arasında ek bir katman olan ışıldak tabaka tanımlanabilir. Epidermiste bulunan diğer hücre türleri arasında melanositler, langerhans hücreleri ve merkel hücreleri bulunur [6].

Melanositler deri, saç, iris ve diğer bazı dokularda bulunan özelleşmiş hücrelerdir. Deri pigmentasyonunu sağlayan melanin adı verilen pigmenti üretirler. Melanositlerin görevleri deri rengini belirlemek ve UV ışınlarına karşı koruma sağlamak gibi önemli rollere sahiptir. Epidermisin bazal tabakasında, özellikle stratum bazalda bulunurlar. Her melanosit, dendritik yapıya sahip bir hücre gövdesi ve dendritler boyunca yayılan melanozom adı verilen pigment granülleri içerir. Dendritler, melanositlerin melanini çevreleyen keratinositlere transfer etmesini sağlar. Melanositler, melanin pigmentini tirozin adı verilen bir amino asitten sentezler. Melanozomlar, melanositlerde üretilen ve içerdikleri melanin pigmentini depolayan yapılardır. Melanozomlar melanositlerde olgunlaşır ve melanini keratinositlere aktarmak için dendritler boyunca taşınır. Melanin, deri, saç ve gözlerin rengini belirleyen pigmenttir[3].

Langerhans hücreleri, dikensi tabakaya yerleşmiş, yıldız şeklini alan, özel bir tür beyaz kan hücresidir. Langerhans hücreleri, epidermis hücrelerin %2-8'ini kaplayacak kadar geniş ölçüde bulunarak, enfeksiyonları önlemek için çalışır ve T hücreleri ile etkileşerek, bağışıklık reaksiyonlarını tetiklemeye de yardımcı olur. O açıdan langerhans hücreleri deri ve tüm vücut bağışıklık sisteminin önemli bir unsurudur. Langerhans hücreleri, dendritik hücreler adı verilen özel bir hücre tipine aittir. Dendritik hücreler, bağışıklık sistemi üzerinde önemli bir rol oynar ve vücudun savunmasında yer alırlar. Langerhans hücreleri de bağışıklık sisteminin bir parçası olarak enfeksiyonlara, alerjenlere ve diğer zararlı maddelere karşı savunma mekanizmalarında yer alırlar. Langerhans hücreleri, uzantıları olan dendritleri sayesinde çevredeki patojenleri ve yabancı maddeleri algılayabilir. Bu hücreler, antijen adı verilen yabancı molekülleri tanır ve bu antijenleri özelleşmiş bağışıklık hücrelerine sunarak bağışıklık tepkisini başlatırlar. Langerhans hücreleri, alerjik reaksiyonlarda, cilt enfeksiyonlarında ve deri kanserlerinde önemli rol oynarlar. Ayrıca, bağışıklık sistemi hücreleri arasında iletişimi sağlayarak bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesine katkıda bulunurlar. Langerhans hücreleri, deriye has özellikler taşıyan bir hücre popülasyonudur ve deri biyopsilerinde veya doku

analizlerinde tanımlanabilirler. Araştırmalar, Langerhans hücrelerinin işlevlerini daha iyi anlayarak cilt hastalıklarının tedavisinde potansiyel bir hedef olarak kullanılabileceklerini ortaya koymaktadır (Şekil 2).

Merkel hücreleri, aynı zamanda Merkel-Ranvier hücreleri ya da taktıl epitel hücreleri olarak adlandırılan omurgalıların derilerinde bulunan ve hafif temas hissi için gerekli, oval biçimli mekanoreseptörlerdir. İnsanların parmak uçları gibi oldukça hassas deride yoğun olarak bulunurlar ve somatosensoryel getirici sinirlerle sinaptik bağlantı kurarlar. Yaygın olmasa da bu hücreler habis hâle dönüşerek agresif ve tedavisi zor bir deri kanseri türü olan Merkel hücre karsinoması oluşturabilirler. Her ne kadar nöral krest kökenli oldukları kaydedilmiş olsa da son zamanlarda memeliler üzerinde yapılmış olan deneyler aslında epitel kökenli olduklarını göstermiştir [75,76]. Aynı zamanda Merkel hücreleri, bazal epidermis tabakasında melanositlerle de temas halindedir.

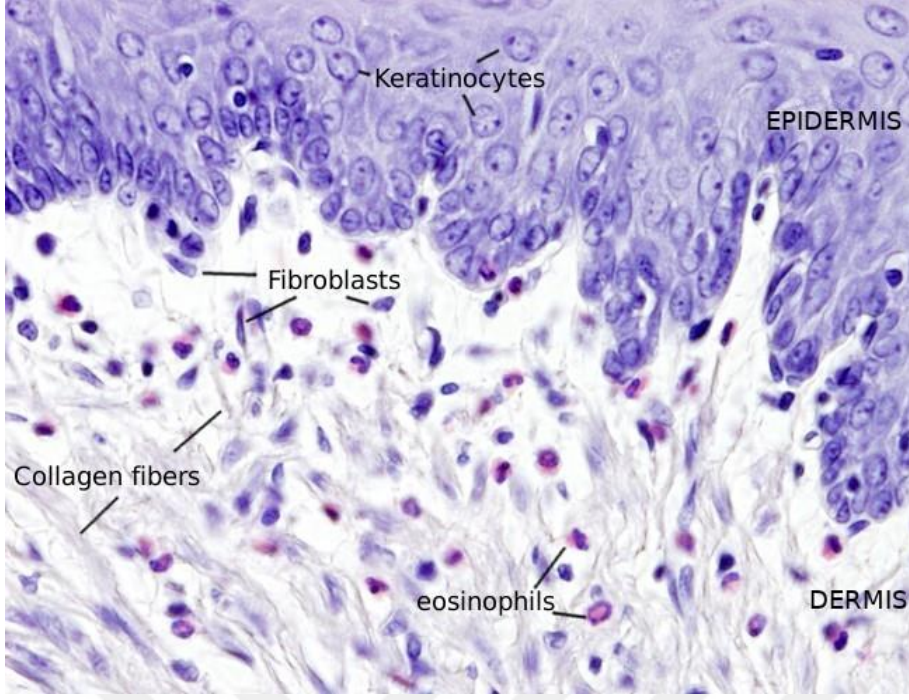


Şekil 2. Epidermis katmanları ve epidermis hücreleri

1.1.2. Dermis

"Gerçek deri" olarak da bilinen dermis, ağırlıklı olarak kolajen (deriye rengini veren protein) içeren lifli, şekilsiz ve elastik dokudan oluşan kalın bir tabakadır. Bu tabaka serttir, retiküler lifler ve elastini barındırır [7]. Dermis, derinin hidrasyonunu ve sıkılığını korumaya yardımcı olan biyo bileşikler (hyaluronik asit, kollajen ve elastin gibi) çeşitli soylardan fibroblastlar tarafından üretilir (Şekil 3) [8]. Epidermis koruyucu bir bariyer görevi görerek hücre döngüsüne ev sahipliği yaparken, dermisin ana işlevi derinin sıkılığını ve elastikiyetini korumaktır. Dermis, derinin kalınlığının %90'ını oluşturur ve yaklaşık 2 mm'dir [9]. Derinin sıkılığını sağlayan kolajen, elastikiyet sağlayan elastin ve hidrasyonu sağlayan hyaluronik asit dermisin yaklaşık %70'ini oluşturur. Dermis, derinin sıkılığı ve elastikiyeti üzerinde epidermise göre daha büyük bir rol oynar çünkü deri hasar gördüğünde tersine çevrilmesi daha zor olan kırışıklıklara ve sarkmaya daha yatkın hale gelir [9,10].

Dermis tabakası sinirleri, kıl köklerini, ter bezlerini, lenf ve kan damarlarını içerir. Ek olarak bu tabakada fibroblast hücreleri bulunur. Fibroblastlar vücutta bulunan bağ dokusunun önemli hücreleridir. Bağ dokusu vücutta destek, koruma ve yapısal bütünlüğün sağlanmasındakritik bir rol oynar. Fibroblastlar, bağ dokusunun yapısını ve işlevini oluşturan proteinlerin sentezinden sorumludur. Tipik olarak, geniş bir hücre gövdesine ve uzun, dallanmış uzantılasahiptirler. Bu uzantılar çevre dokularla iletişim ve etkileşimi sağlar. Fibroblastlar aktif hücrelerdir ve genellikle çoğalma ve yeni proteinleri sentezleme yeteneğine sahiptirler. Dermis tabakası iki iç tabakaya ayrılır; papiller dermis ve retiküler dermis. Papiller dermis tabakası kan damarları ve fibrositler içerirken, retiküler dermis tabakası yoğun kolajen içerir [3]. Deri yüzeyine daha yakın yerleşimli olan papiller tabaka yaşa ve yerleşim yerine bağlı olarak 300-400 mikron genişliğe ulaşır. Üst kısımda, beslenme ve innervasyon için gerekli olan sinir uçlarını ve mikrovasküler damarları içeren dermal papilla adı verilen kordonlar halinde düzenlenmiştir. Papiller dermis, daha yüksek bir hücre yoğunluğu, daha yüksek bir proteoglikan içeriği ve daha zayıf bir kollajen lifleri dizilimi ile retiküler dermisten farklıdır. Papiller dermisin düzensiz bir polar yapısı vardır; yoğunluğu bazal membrandan retiküler dermise doğru azalır [12].



Şekil 3. Epidermisteki fibroblast hücrelerinin mikroskop görüntüsü

1.1.3. Hipodermis

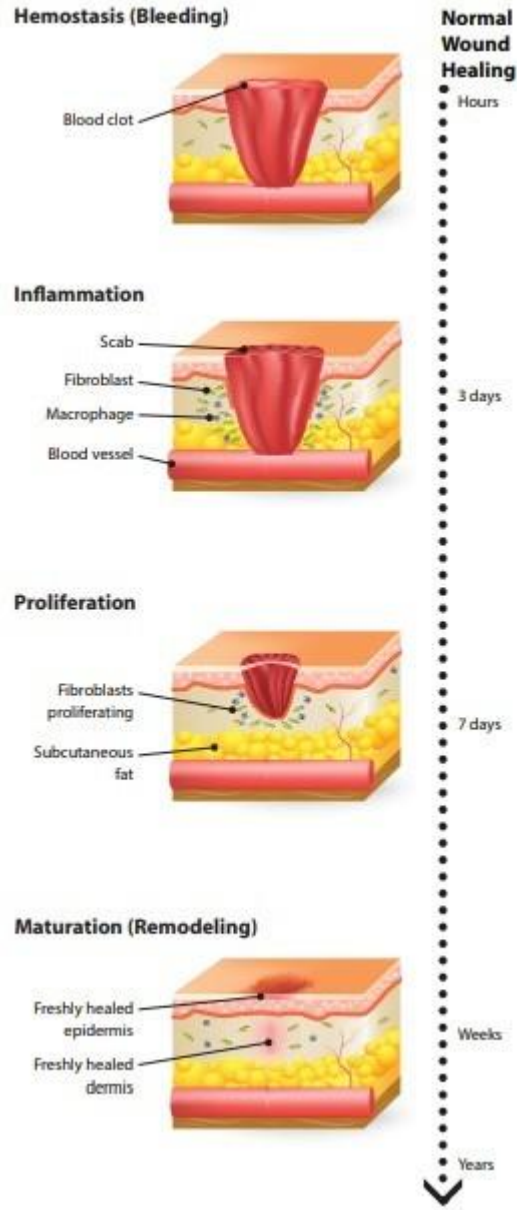
Deri histolojisi deri altı doku veya hipodermis adı verilen başka bir katman daha vardır. Hipodermis, gevşek bağ dokusu ile beyaz yağ dokusu içerir [3]. Hipodermis, vücuttaki derinin alt tabakasıdır. Yastık görevi görerek iç organları darbelere karşı korur. Enerji depolamak, vücudun ısı dengesini sağlamak ve vücudu zarar görmekten korumak gibi birçok önemli işlevi vardır. Yaşlandıkça hipodermisin boyutu küçülür ve deri sarkmaya başlar. Hipodermis, vücut ısısı değişikliklerine karşı koruyucu bir yalıtım tabakasıdır. Yağ hücrelerinin dış kısımlarında, vücut ısısının etkisinde ve soğuk hava koşullarında vücut ısısının korunmasına yardımcı olur. Hipodermis, enerji için yağ depolayan büyük miktarda yağ deposu içerir. Bu depolanan yağ, vücut enerji tüketimi telafisi için kullanılabilir. Vücut şeklini ve konturunu yönlendiren önemli bir katmandır.

1.2. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, travma ile tetiklenen hücresel ve biyokimyasal olayların etkileşimi ile birlikte hasarlanan dokunun yeniden onarılmasıdır. Yara iyileşmesi birçok hücre tipinin, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin birbiriyle uyum içinde rol aldığı biyolojik, komplike ve dinamik bir süreçtir.

Yara iyileşmesi, homeostaz, iltihaplanma, çoğalma ve yeniden şekillenme (olgunlaşma) aşamalarından oluşur (Şekil 4). Yara iyileşmesi, hücre proliferasyonu, neovaskülarizasyon ve artan hücre dışı matris (ECM) oluşumunu içeren çok yönlü bir prosedürdür. Deri farklı hücre katmanlarına sahiptir, ancak bir darbe ile karşılaştığında kolayca zarar görür. Yara çabuk iyileşmezse enfeksiyon kapma riski yüksektir. Bu nedenle vücut yarayı olabildiğince çabuk iyileştirmeye başlar. Vücudun doğal yara iyileşme süreci küçük yaraları iyileştirebilir; ancak kısmi veya tam kalınlıkta olan yaralarda bu iyileşme süreci sınırlıdır ve işlevsel deri dokusunun yenilenmesinde başarılı olmayabilir. Bu tür ciddi vakaları tedavi etmek için ilk kural, debridman içeren split-deri greftlemedir (SSG). Bununla birlikte, bu yöntemin greft reddi, hastanın donör bölgesinde ağrı, morbidite ve enfeksiyon gibisınırlamaları olması nedeniyle, rejeneratif tıbbın çok dikkat çektiği başka yöntemler de ortaya çıkmıştır [2].





Şekil 4. Yara iyileşmesi fazları

1.2.1. Homeostaz

Homeostaz çevresel değişikliklere yanıt olarak bir organizmada iç stabiliteyi sürdürme yeteneğidir. Akciğer, beyin, kalp gibi organların fonksiyonlarının koordinasyonu ile organizmanın fizyolojik dengesinin sürdürülmesidir. Bu denge iç çevredeki sabitliğin korunmasını ve dış çevredeki adaptasyonu sağlamaktadır. Homeostazdan sonra, kasılmış damarlar genişleyerek lökositlerin, büyüme faktörlerinin, besinlerin ve sitokinlerin yaralı bölgeye ulaşmasına izin verir. Trombositler ve lökositler, iltihabı başlatmak için sitokinlerin salınımını hızlandırır. Bu fazın başlıca hücre tipleri makrofajlar, nötrofiller ve lenfositlerdir.

İnflamasyon fazı, monositlerin ve nötrofillerin yaralı bölgeye göçü ile karakterize edilir. Bu hücrelerin varlığında yaralı bölge bakteri ve yabancı partiküllerden arındırılır. Endotel hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller kemotaksis ile bölgeye gelir ve fibrin pıhtısının oluşumunu destekler. Nötrofiller, ilk yanıtta sorumlu olan inflamatuvar hücrelerdir. Yaralı bölgedeki nötrofiller ayrıca CXCL-8 gibi kemoatraktan salgırlar. CXCL-8, inflamasyon, kontaminasyon veya doku hasarı gibi aşınma ve yıpranmadan kaynaklanan hasarların kapatılmasında önemli bir rol oynar. CXCL-8, enfeksiyonun yayılmasını önlemek ve yaralanma veya enfeksiyonun neden olduğu doku hasarını onarmak için bağışıklık sistemi hücrelerini hedef bölgeye çeker. Nötrofiller, enfeksiyonla mücadelede ve yaralı doku hücrelerinin temizlenmesinde önemli rol oynayan beyaz kan hücreleridir. CXCL-8, enfeksiyona veya hasarlı bölgeye doğru hareket etmek için nötrofilleri damarlardan uzaklaştırır. Böylece bağışıklık sistemi hücreleri, enfeksiyonla mücadele veya doku hasarını onarma sürecine katılabilir.

1.2.2. İnflamasyon

İnflamasyon bağışıklık sisteminin vücudu çeşitli hastalık ve yaralanmalara karşı korumak için verdiği bir tepkidir. İnflamasyon ile bağışıklık sistemi patojenlerle savaşır ve bu durum yara iyileşmesi sürecinde oldukça önemlidir. Homeostazdan sonra, kasılmış damarlar genişleyerek lökositlerin, büyüme faktörlerinin, besinlerin ve sitokinlerin yaralı bölgeye ulaşmasına izin verir. Trombositler ve lökositler, inflamasyonu başlatmak için sitokinlerin salınımını hızlandırır. Matris metalloproteinazlar (MMP) birçok doku ve hücre tipinde bulunan enzimlerdir. Bu enzimler, hücreleri dıştan çevreleyen hücre dışı matrisin parçalanmasında ve yeniden yapılandırılmasında önemli bir rol oynar. Bir çeşit sitokin olan MMP'ler ihtiyaç olmadığı hallerde çok düşük oranlarda bulunurlar, ancak iltihaplanma, aşınma, yara iyileşmesi, yeniden doku oluşumu ve kanser gibi durumlarda çok yüksek oranda salınırlar ve aktivasyonları yüksektir. MMP'ler, hücre göçünü, doku yeniden şekillenmesini, hücre çoğalmasını ve inflamasyonu düzenler. MMP'ler ciltte bol miktarda bulunan kesilmiş kolajen tip I'in salınımını yapar. Bu ailenin başlıca üyesi- MMP-9'dur. MMP-9, bazal lamina proteinlerini keser ve keratinositlerin bazal laminadan yaralı bölgeye göçünü artırır.

Ayrıca nötrofiller, makrofajları bölgeye çekmek için interlökin-1 (IL-1), interlökin-4 (IL-4), tümör nekroz faktörü alfa (TNFa) ve interlökin-8 (IL-8) gibi birçok sitokin salgırlar. Bu bölgedeki makrofajların aktivitesi, yaralanmadan 48-72 saat sonra zirve yapar. İltihaplanma

evresinin asıl amacı yaralanan bölgeyi olası enfeksiyondan korumaktır. Nötrofiller, birikintileri ve bakterileri üç farklı mekanizma ile uzaklaştırır. Birincisi fagositoz yoluyla yabancı partiküllerin yok edilmesidir. Nötrofiller, hücre kalıntıları uzaklaştırmak ve yara yatağını mikroorganizmalardan arındırmak için fagositozu başlatır. [13]. İkincisi, nötrofil degranülasyonu yoluyla ölü dokuları ve bakterileri yok etmek için toksinlerin salgılanmasıdır [14]. Son olarak, nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET'ler) mikroorganizmaları ve farklı patojenleri yakalayıp ortadan kaldırması ve bunların yayılmasını önlemek için salgılanmasıdır [15]. Diğer bir destekleyici olay da trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) salgılanmasıdır. PDGF'ler, fibroblast proliferasyonunu kolaylaştıracak bir matris sağlamak için kollajen miktarını artırır [16]. PDGF, makrofajlar için bir kemoatraktan görevi görür ve fibroblast proliferasyonunu hızlandırır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinositlerin bazal laminadan canlılığını ve göçünü artırmak için özel olarak salınır. Ayrıca, hem TGF β hem de CXCL 4, yeni matrisin sentezini, keratinositlerin yeniden şekillenmesini ve çoğalmasını da indükler [17].

Makrofajlar fenotipik etkilerine göre iki çekirdek gruba ayrılır. M1 (proinflamatuvar) makrofajlar, konakçıyı enfeksiyona karşı korur ve iltihaplanma sürecini destekler. M2 (antiinflamatuvar) makrofajlar iltihabı baskılar ve yarayı iyileştirmek için büyüme faktörünü salgılar. İltihabın ilk aşamasında; M1 makrofajları iyileşme sürecine dahil olur. İyileşme sürecinde, M1 makrofajları apoptozu indükler ve nötrofillerin yıkımını gerçekleştirir. Bu süreç bir dizi olayı başlatır ve sitokin salınımını durdurarak M2 makrofajlarını indükler. İnflamasyon aşamasının çok uzun sürmesinin konakçıya zarar verdiği ve kronik yara oluşumunu arttırdığı ise bilinen bir gerçektir.

1.2.3. Proliferasyon

Proliferasyon hücrelerin uygun koşullarda hızlı bir şekilde hücre döngüsünü tamamlayarak çoğalması durumudur. Yeniden şekillenme (remodeling) proliferasyon safhasından sonra başlar ve yıllarca sürer. Bu kollajen liflerinin yeniden şekillenmesidir. Bu aşamada yumuşak ve jelatinöz yapıdaki tip III kollajen zamanla daha sıkı olan tip I kollajene dönüşür. Kontraksiyonun bir kısmı bu aşamada gerçekleşir. Yara yaklaşık 6 hafta sonra başlangıçtaki hasarının % 95'ini düzelterek iyileşir. Bakterilerden, birikintilerden ve yabancı partiküllerden arındırılmış olan yara bölgesi iltihaplanma aşamasından proliferasyon aşamasına geçmeye hazırdır. Hatta inflamasyon proliferasyon fazının erken evrelerinde devam edebilir. Proliferasyon fazı 3 alt gruba ayrılır. Bunlar temel olarak epitelizasyon, anjiyogenez ve

granülasyondur. İnflamasyon fazının sonunda, M2 makrofajları geçişi desteklemek için büyüme faktörlerini serbest bırakır. Epitelizasyon fazının temel amacı, yeni oluşan dokuya besinleri ve gazları taşımak için yeni damarları oluşturmaktır. Makrofajlar PDGF, FGF, VEGF ve TGF β gibi bazı büyüme faktörlerini serbest bırakarak granülasyon fazına geçiş sağlar [18]. VEGF ve FGF, endotel hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezini indükler. Bu süreç temeldir ve yeni ECM kompozisyonu oluşturmak için gereklidir [19].

1.2.3.1. Epitelizasyon

Epitelizasyon, yara iyileşmesinin ilk aşamasında oluşur ve yara yatağı kapanana kadar devam eder. Yaralanma derecesine göre epitel hücreleri yukarı ve aşağı doğru hareket eder. Bazal lamina sağlam kalırsa, epitel hücreleri sağlıklı dokular gibi daha yüksek bir yere doğru göç eder [17]. Öte yandan, bazal lamina hasar görürse, epitel hücreleri koruyucu bir bariyerin restorasyonunu başlatmak için yaralı bölgeye göç eder [20]. Yaranın kenarında yer alan epitel hücreleri proliferasyon fazının ilk göçmen hücreleridir. Hücrelerin göçü karşı tarafa ulaşana veya karşı taraftaki göçmen hücrelerle karşılaşana kadar devam eder. Bu olay; Epitelial-mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılan süreçte meydana gelir [14]. Keratinositler devreye girdikten sonra migrasyon ve mitoz süreci durur ve hücreler kendilerini farklılaştırarak yeni oluşturulan bazal membran üzerine çok katlı epitel oluştururlar [21]. Keratinositlerin göçü derinin tüm bölümlerinde gerçekleşir. Bu süreç yaralanmadan sonraki 50 saat içinde başlar ve 15. güne kadar devam eder [18].

Keratinositler, fibrin ağının bir tarafından diğer tarafına göç eder. Bunu yapmak için olgunlaşmamış keratinositler, bazal laminadan ayrılmak ve yara yatağından geçişini kolaylaştırmak için plazmin ve MMP'ler salgılar. Bu sitokinler ve büyüme faktörleri, keratinositleri bazal laminaya bağlayan hemidesmozomları etkiler. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK'ler) gibi kinazlar, IL-1a'nın salgılanmasıyla bazal keratinositlerde aktive edilir [22]. Bazal keratinositler, TNF- α , keratinosit büyüme faktörü (FGF-7) ve/veya EGF gibi büyüme faktörlerinin yukarı regülasyonu ile çoğalır. Özellikle FGF 7, keratinosit migrasyonu ve proliferasyonu için sadece epitelizasyon sırasında değil normal yaşamda da en önemli büyüme faktörüdür. Migrasyon sona erdiğinde keratinositler substrata yeniden bağlanır ve temasın neden olduğu inhibisyon sonucu bazal membranı yeniden oluşturur [17]. PAR1 ve PAR2 neonatal keratinositlerden salgılanır ve keratinositlerin proliferasyonunda farklı özelliklere sahiptir. PAR1 proliferasyonu indüklerken, PAR2 keratinositlerin proliferasyonunu inhibe eder ve endotel hücrelerinin çoğalmasını uyarır [23].

1.2.3.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez, genel yara iyileşme sürecinin çok önemli bir aşamasıdır. Yeni damarların oluşumu, gazların, bağışıklık hücrelerinin ve besinlerin yeni oluşan dokulara taşınması için gereklidir. İnflamatuvar faz boyunca, nötrofiller ve makrofajlar, anjiyogenezi teşvik etmek için anjiyojenik büyüme faktörleri salgılar. Endotel yüzey integrinleri, neovaskülarizasyonu hızlandırarak iyileşme sürecine dahil olurlar [24]. Endotel yüzey integrinleri α_v ve β_3 inhibe edildiğinde, anjiyogenez fazı durur. Böylece normal iyileşme süreci gelişmez. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), FGF'ler ve hipoksi de yeni damarların oluşumunu uyarır [25]. Falanga ve arkadaşları, VEGF ve VEGF reseptörü 1'i (VEGF R1) indüklediği için bFGF'nin anjiyogenez için önemli olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir deyişle; öncelikle trombositler tarafından daha sonra yaralı bölgedeki yerleşik hücreler tarafından salgılanan bFGF, VEGF ve PDGF'ler, yaranamaya bağlı anjiyojenik oluşumun ana araçlarıdır. Endotel hücre göçü ve kılcal damar gelişimi de TNF- α ile karakterize edilir. Endotelyal progenitör hücreler kemik iliğinde bulunur ve yaranamaya yanıt olarak kan dolaşımına katılır [22].

1.2.3.3. Granülasyon

Yara oluşumundan 4 gün sonra granülasyon fazı başlar [18]. İnflamasyon fazında mast hücreleri ve makrofajlardan salgılanan büyüme faktörleri dermiste yer alan fibroblastların yara bölgesine göçüne neden olur. Bu göç, dermisteki hücrelerin bağlarını proteazlar yardımıyla kırarak gerçekleşir. Aslında granülasyon ve anjiyogenez fazı birlikte başlar [26]. Ayrıca fibroblastların, yaranamamış bölgenin dermal fibroblast kök hücrelerinden ve kan dolaşımına katılan yetişkin mezenkimal öncüllerinden kaynaklandığı da bildirilmiştir. Fibroblastlar, anjiyogenez fazında üretilen yeni damarlar aracılığıyla yaralı bölgeye hareket eder ve önce fibrin pıhtı liflerine tutunarak göç etmeye başlar, sonra fibronektine bağlanmaya devam eder. Göç eden fibroblastlar, matris bileşimini desteklemek için büyük miktarlarda kollajen sentezler [27]. ECM oluşumu, yaranın eski şekle en yakın şekline katkıda bulunur. Granülasyon fazının başlangıcında kollajen normalden daha az üretilir ve birbirine paralel olarak yerleşir. Bir süre sonra fibriller kalınlaşmaya ve yara bölgesi boyunca sıralanmaya başlar. Böylece gerilme mukavemeti artmaya başlar ve yara dokusu iyileşmeye başlar [28].

ECM oluşumuna katkıda bulunan bazı önemli büyüme faktörleri vardır. TGF β ve PDGF, proliferasyonu ve kollajen birikimini artırmak için trombositlerden, makrofajlardan ve çevreleyen fibroblastlardan salgılanır. Fibrin pıhtı hücresinden salgılanan TGF- β inaktiftir. Yara bölgesindeki yerleşik hücreler proteinazlar salgılayarak TGF- β 'yı aktive eder. Aktif

TGF- β , fibroblastları daha fazla ECM proteini üretmesi için uyarır [29]. TGF- β 'nın inhibisyonu fazın inhibisyonuna yol açar, bu da granülasyon dokusunun yokluğu ile sonuçlanır. PDGF tarafından aktive edilen fibroblastlar daha fazla proteoglikan ve glikozaminoglikan (GAG) üreterek kolajenlerin birbirine bağlanmasına ve daha esnek hale gelmesine olanak tanır. Granülasyon aşaması, matris dokusu için çok önemlidir ve hücre göçünü hızlandırarak ve dokunun sağlam bir iskelet üzerine inşa edilmesini sağlayarak yara iyileşmesini olumlu yönde etkiler. Bu aşamada kollajen salınımı çok önemlidir ve yara bölgesine iyileştirici bir etkisi vardır [30]. Kollajenin yanı sıra; fibronektin, elastin, laminin ve proteoglikanların üretimi ve birikimi de bu aşamada çoğalır. Fibronektin kollajenin birbirine ve çevre hücrelere tutunmasını kolaylaştırır. Granülasyon dokusunda oluşan fibronektin, elastin, laminin, ve proteoglikan migrasyonu artırır ve ayrıca yeni oluşan matriksin nemli kalmasını sağlar [31].

1.2.4. Remodelling (Yeniden Şekillenme)

Yeniden şekillenme iyileşme sürecinin son aşamasıdır ve yaralanmadan sonraki 7. günde yani yara kapandıktan sonra başlar ve 2 yıl devam eder [33]. Granülasyon aşamasında oluşan doku, yeniden şekillenme aşamasında daha karmaşık hale gelir ve yarayı kapatır. Granülasyon fazında oluşan kollajen düzensiz bir şekilde yerleşir ve bu da yaranın kalınlaşmasına neden olur [34]. Yeniden şekillenme aşamasında, kollajen yara hattı boyunca yerleşir ve su emilimini artırarak nemli bir ortam oluşturur. Kollajen lifleri birbirine yaklaşır ve kendiaralarında bir çapraz bağ oluşturur. Yapıştırılmış kollajen, yaranın kalınlığını azaltır ve yara bölgesini daha sağlam hale getirerek gerilme mukavemetini artırır [34]. Yara tamamen kapansa bile çekme mukavemeti aynı olamaz. Çekme mukavemeti bir malzemenin gerilime maruz kaldığında çekme yönünde ne kadar dayanabileceğini ifade eder. Bu, bir malzemenin gerilmeye karşı direncinin bir ölçüsüdür. Broughton ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yaralanma öncesi gerilme kuvveti yüzde 100 kabul edilirse bu oran 3 hafta sonra yüzde 30'a, 3 ay sonra ise yüzde 80'e çıktığı gösterilmiştir [20,22].

Fibroblastlar, granülasyon aşamasında tip 1'den daha fazla tip 3 kollajen üretir. Bununla birlikte, tip 3 kollajen yeniden yapılanma aşamasında tip 1 ile değiştirilir. Çünkü tip 3 kollajen jelimsi ve yumuşak bir yapıya sahiptir ve parçalanarak daha sert ve sağlam olan tip 1 kollajeni üretir. Normal sağlam deride en fazla bulunan kollajen formu tip 1'dir. Tip 1 kollajen miktarındaki artış gerilme mukavemetini de artırır. [35]. Yara bölgesinin derinliği, bölgedeki hücre gruplarının yenilenip yenilenmediğini belirler. Yüzeysel bir yaralanmada ter bezleri, kıl

kökleri, parmak izleri ve dokunma duyusu düzelir. Derin yaralarda bu gruplar parmak izi dışında geri gelmez, sonsuza dek kaybolurlar. Bu aşamada; artık gerekli olmayan makrofajlar, nötrofiller, miyofibroblastlar ve vasküler hücreler apoptoza uğrar [36]. Böylece daha önce damar oluşumu nedeniyle kırmızı olan yara dokusu açık pembe olur [37].

1.3. Yara iyileşme tipleri

Yara iyileşme tipleri; primer, sekonder ve tersiyer yara iyileşmesi (gecikmiş tersiyer) olarak üç gruba ayrılır. Primer yara iyileşmesi bütünlüğü bozulan dokunun yara dokusu uçlarının karşılıklı cerrahi dikiş, stapler veya yapışan bantlar (strip) ile kapatılma esasına dayanır. Kollajenin ve matris proteinlerinin sentezi, depolanması ve kollajen lifleri arasındaki bağların oluşumu dengeli bir şekilde devam eder. İyileşme minimal ödem, çok ince bir iz ve enfeksiyon olmadan tamamlanır. İyileşme sonrası yara, yaralanma olmadan önceki gücünün % 85-90'nını geri kazanır. Sekonder iyileşmede yara, özellikle doku defekti olan vakalarda açık bırakılarak, granülasyon dokusu ve takiben yara kontraksiyonu ve epitelizasyonu ile kapatılmadan iyileşmesi sağlanır. Sekonder iyileşmede epitelizasyon bütünlüğünün korunarak sağlanması önemlidir. Epitelizasyonlar skar dokusunun gerilme kuvvetini oluşturmada önemlidir. Sekonder iyileşme yavaş gelişen bir süreçtir ve epitelizasyonun gelişmesi 4-8 haftayı alabilir. Sekonder iyileşme de skar daha geniştir. Tersiyer iyileşmede ise geniş doku yaralanmalarında, yabancı cisimle olan hasarlarda, ciddi bakteri kontaminasyonu olan yaralarda, yara enfeksiyonunu engellemek amacı ile yara hemen değil birkaç gün sonrakapattılır. Bu süreçte yara açık bırakılıp steril serum fizyolojikli petlerle kapatılır. Yara birkaç gün açık bırakılarak enfeksiyon riski azaltılmış olur. İyileşmenin sonunda primer kapamada ulaşılan gerilme kuvvetine eşit değerler elde edilir.

Sonuç itibariyle; yara iyileşmesi; biyokimyasal ve fizyolojik olayları içeren ve doku tamirinin etkin şekilde olması için birbiriyle uyumlu aşamaların ardışık devam ettiği dinamik bir süreçtir.

1.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara iyileşme süreci birbiriyle bağlantılı pek çok aşamadan oluştuğu için birçok sistemik ve lokal faktörle de kesişebilir. Lokal komplikasyonlar doğrudan yaranın kendisiyle ilgili olsa da, sistematik durumlar kişinin genel sağlık durumuyla bağlantılıdır. Buna rağmen, yara

iyileşmesini etkileyen yerel değişkenler, kronik yaraların patolojisine yol açan sistemik değişkenler tarafından yönetilir.

1.4.1. Yara İyileşmesini Etkileyen Lokal Faktörler

1.4.1.1. Oksijenizasyon

Doğal bir iyileşme sürecinde, hemen hemen tüm yara iyileşme aşamalarında yer aldığı için oksijenizasyon önemli bir husustur. Oksijenizasyon evresi; enfeksiyonun önlenmesi, yara hücrelerinin aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve migrasyonu, yaraların kasılması ve yeniden şekillenmesi için gereklidir [38]. Yara iyileşme süreci sırasında hücrelerin metabolizması ve sürekli ATP üretimi yoluyla hücresel enerji düzeylerinin korunması, oksijenizasyona güçlü bir şekilde bağlıdır. Bu nedenle, patojenlerin başarılı bir şekilde çıkarılması, yara iyileşmesi sırasında önemli ölçüde yeterli oksijen seviyesine bağlıdır [38]. Oksijenizasyon ayrıca neovaskülarizasyonu teşvik ederek yara iyileşme süreci için gerekli hücreleri uyarır ve hücrelerin yara bölgesine gerekli göçünü sağlar.

Hipoksi, yaralanma sırasında vasküler sistemin tehlikeye girdiği düşünüldüğünde, yakındaki metabolik olarak aktif hücrelerin yüksek düzeyde oksijene ihtiyaç duyduğu bir zamanda yaralarda daha çok beklenir. Aslında, vaskülarizasyondaki bozulma nedeniyle, yaş veya diyabetik bir durum gibi birçok sistemik durum, iyileşme sırasında kronik yaraların oluşumuna katkıda bulunan bir faktör olarak kabul edilen uygunsuz oksijen akışına yol açabilir. Hem yara oluşumu hem de kötü tanımlanmış kan akışı nedeniyle indüklenen oldukça hipoksik ortamlar, yaranın derecesini kronik hale getirir. Hipoksik yaralar, yara ve bitişikteki hasarsız dokular arasında bir oksijen gradyanı oluşturur. Bu gradyan, oksijenin hipoksik dokudan difüzyonunu kolaylaştırır. Oksijen gradyanı, hipoksinin en yoğun olduğu yara merkezinden başlar ve yaranın kenarına doğru giderek azalır [38]. Sitokin üretimi ve büyüme faktörleri de hipoksi yoluyla tetiklenir. VEGF, TNFalfa, PDGF ve TGF- β hipoksiye yanıt olarak oluşur ve kemotaksisi, hücre proliferasyonunu ve göçünü destekler. Yara iyileşmesinin erken evrelerinde, yara hücreleri metabolik fonksiyonlar için glikoliz yoluyla ATP üretir. Ancak daha sonraki aşamalarda, protein sentezi, hücre çoğalması ve göçü için çok daha fazla ATP gerekir. Aslında, tahmin edildiği gibi, ROS üretimi için inflamatuvar süreç sırasında oksijen gereklidir. ROS indüksiyonu sadece hiperoksiden değil aynı zamanda hipoksiden de etkilenir [39].

Sonuç olarak, sistemik koşulların neden olduğu uzun süreli hipoksi, yara iyileşmesinde gecikmelere yol açarken, geçici hipoksi; anjiyogenezi, sitokin sekresyonunu ve hücre çoğalmasını ve göçünü uyararak yara iyileşmesini uyarır. Derideki kılcal damar yoğunluğu, periferik vasküler bozukluklar, anemi, ateroskleroz, kalp yetmezliği gibi yara iyileşmesindeki sistemik faktörler iskemik yaraların başlıca sorumlularıdır. Sistemik sorunların yanı sıra sürekli basınç, yatalak hastalarda olduğu gibi basınç altındaki bölgede kan akımının azalmasına neden olabilir. Bu durum hasarlı doku çevresinde oksijen ve yetersizliğine neden olur ve sonuç olarak iskemik dokuya ve kronik yaraya yol açar [39].

1.4.1.2. Enfeksiyon

Cilt bütünlüğünün bozulması ile deri altı mikroorganizmalara karşı savunmasız hale gelir. Yara iyileşmesi inflamasyon süreci, yara bölgesinden artık istilacıları uzaklaştırırsa da, bu aşama bazen başarısız olur ve mikroorganizmalar çoğalarak yara içinde enfeksiyonu tetikleyebilir [34]. İnvaziv enfeksiyonlar sırasında, enfeksiyon kontamine olmayan diğer dokulara yayılabilir. İnflamatuar süreç; genellikle nötrofiller, makrofajlar ve bunların proteazlar ve ROS gibi yardımcı maddeleri tarafından yara iyileşme koşulları altında mikrobiyal enfeksiyonu giderir. Kontaminasyon, kolonizasyon, kritik kolonizasyon/lokal kontaminasyon ve invaziv enfeksiyon yaralı dokuda mikroorganizma kontaminasyonu olarak tanımlanır [40]. Yaradaki mikrobiyal aktivite, mikroorganizmanın konak reaksiyonuna, inflammatuar hücre davranışına ve sayısına, virülans ve patojeniteye bağlıdır. Bir derideki bakteri yükü dokuda gram başına yaklaşık 10⁵ CFU/gr ise bu bir yara enfeksiyonu miktarının daha fazlasını oluşturur [41]. Bununla birlikte, β -hemolitik Streptococci spp. gibi çeşitli hastalıklara neden olabilen potansiyel olarak patojenik organizmalarda sadece birkaç mikrobiyal tür yüksek virülans faktörüne sahip olur ve deriyi 10⁵ CFU/gr doku üzerine çıkararak zararlı yara enfeksiyonlarını meydana getirir. Bu nedenle, enfeksiyonu teşhis etmenin iyi bir yolu her zaman yara bölgesindeki mikrobiyal sayıları değerlendirmek değildir. Pseudomonas ve Staphylococcus türleri, β -hemolitik Streptococci türleri dışında hem kronik hem de akut yara dokularında yaygındır. Pseudomonas spp birbirleri ile etkileşime girerek ekstrapolimerik maddeler içeren proteinler, nükleik asit, polisakkaritler ve hücresel artıklardan oluşan biyofilm tabakaları oluşturur. Bu biyofilm mevcut tedavileri önler ve bakteri bariyeri görevi görür. Artan proteaz ve endotoksin salınımı, yara yatağında uzun süreli mikrobiyal hayatta kalmanın neden olduğu çoğalan hücre ve ECM proteinlerinin bozulmasına katkıda bulunur [41]. Ayrıca yerleşik hücreler, kronik iltihaplanma sürecini uyararak TNF-a ve IL-1 gibi büyüme faktörleri ve sitokinleri üretmek için çoğalan mikroorganizmalar tarafından

uyarılır. Bu yüksek yanıt genellikle MMP'lerin sürekli olarak ifade edilmesine ve TIMP'lerin beklenmedik bir şekilde azalmasına neden olarak çevre dokuda sürekli bozulmaya neden olur [39]. Enfeksiyonlardan ve aşırı inflamatuvar yanıtlardan kaynaklanan kronik yaraların gelişiminin önlenmesi önemlidir. Bu nedenle, ya antibiyotikler kullanılarak ya da katkı maddeleri içeren gümüş kullanımı gibi diğer terapötik stratejiler kullanılarak, yara bölgesinden mikrobiyal kontaminasyon ortadan kaldırılabilir. Yanık yaralarında bakteriyel enfeksiyona ek olarak mantar enfeksiyonlarının neden olduğu başka kontaminasyonlar da bulunabilir [47].

1.4.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Sistemik Faktörler

Yara iyileşmesini etkileyen sistemik faktörler temelde yaş, kronik hastalıklar, yeme alışkanlıkları ve cinsiyettir. Buradaki yara iyileşmesini etkileyen sebepler genellikle yaralanma gibi fiziksel bir duruma bağlı değildir.

1.4.2.1. Yaş

Hücresele düzeyde yaşa bağlı değişiklikler yara iyileşmesinde gecikmelere neden olduğundan, ileri yaş gecikmeli iyileşme için önemli bir risktir. Bu gecikmeler aslında yalnızca zamana bağlıdır, bu nedenle iyileşmenin etkinliğini etkilemezler. Ana baskılayıcı faktörün inflamatuvar yanıt olduğu bilinmektedir, çünkü T hücrelerinin yara bölgesine penetrasyonunun baskılanmasına, makrofaj fonksiyonunun azalmasına ve yaşla birlikte kemokin gelişiminin artmasına neden olur. Literatüre göre, artan yaş ayrıca kollajen sentezini, anjiyogenezi ve yeniden epitelizasyonu engeller [42]. Yara iyileşmesinin her aşaması yaşla birlikte büyük ölçüde değişirken, iltihaplanma aşaması için çelişkili bulgular yayınlanmıştır. Çalışmaya göre, yaşla birlikte nitrik oksit sentezi salınımı ve vazodilatör kolaylaştırıcı miktarları azaldıkça TNF- α , TGF- β ve PDGF dahil alfa granüllerinin salınımı artmaktadır[43]. Bu alfa granüllerin endotele yapışması ve agregasyonu yaşla birlikte artar. Yaş arttıkça lökositlerden daha fazla inflamatuvar mediatör salgılanırken, aynı parametreye sahip lökositlerin proliferasyonu azalmaktadır [42].

1.4.2.2. Kronik Hastalıklar

Diyabet, obezite, kalp hastalıkları, damar problemleri ve kanser gibi kronik hastalıklar yara iyileşmesini etkilemektedir. Diyabetli kişiler akut yara iyileşme bozuklukları ile mücadele eder ve bu tür hastaların yaklaşık yüzde 15'i kronik diyabetik ayak ülserlerine (DFU'lar) karşı savunmasızdır. Ağrı, inflamasyon, nöropati, travma, nasır oluşumu ve vaskülopati gibi çok sayıda dışsal faktör DFU'ların gelişimine katkıda bulunur. Ek olarak, hiperglisemi ve ardından hipoksik koşullardan kaynaklanan ROS gelişimi sıklıkla hücrelerde ve dokularda önemli hasara yol açar [44]. Diyabetik ülser fibroblastların, akut yaralara kıyasla proliferasyon ve migrasyon özelliklerini azaltmaktadır. DFU'larda keratinositlerde ve endotel hücrelerinde VEGF sekresyonu, PDGF, IL-10 ve IL8, IL-10 seviyeleri önemli ölçüde baskılanır. Venöz yetmezlik, bozulmuş yara iyileşmesine katkıda bulunan önemli bir sistemik faktördür. Kan basıncı ve akış yönündeki kusurlar, damarların etkinliğini azaltır ve bu da alt bacakta kan tutulmasına neden olur. Derin damarlardaki aşırı kan, bölgedeki kasları olumsuz yönde etkiler ve bunun sonucunda kronik hipertansiyon oluşur ki bu da venöz ülser oluşumuna yol açar [45]. Son birkaç yılda, obezite artan bir sağlık sorunu olmuştur. Obezite; diyabet, kalp hastalığı, inme, kanser ve hipertansiyon gibi hastalıkların gelişme riskini de artırır. Birçok enfeksiyon, ülser ve hematoma gibi komplikasyonlar obez hastalarda görülür. Artan ağırlık ile deri kendi üzerine katlanmaya başlar ve bu kıvrımlar arasındaki sürtünme mikroorganizmalar için mükemmel bir ortam oluşturarak deriye zarar verir. Obez hastalarda sitokin salınımı nedeniyle enfeksiyon insidansı çok yüksektir. İskemi ve vaskülarizasyon sorunları nedeniyle obezlerde önemli sayıda basınca bağlı ülser ve yaralanmalar mevcuttur.

1.4.2.3. Yeme Alışkanlıkları

İyi beslenme, yara iyileşme sürecinde önemli bir rol oynar ve hızlı ve etkili iyileşme için gereklidir. Protein, yara iyileşmesinde gerekli bir besindir. Yeterince protein almak, doku onarımı ve yeniden şekillenmesi için önemlidir. Et, tavuk, balık, yumurta, süt ürünleri, baklagiller ve tofu gibi protein yönünden zengin besinler tüketmek faydalı olacaktır. C vitamini kollajen üretimi için önemlidir ve yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Turunçgiller, çilek, kivi ve yeşil yapraklı sebzeler gibi C vitamini yönünden zengin besinlerin tüketilmesi yara iyileşmesini destekler. A vitamini, hücre yenilenmesi ve bağışıklık sistemi fonksiyonları için gereklidir. Havuç, ıspanak, tatlı patates, kavun ve kayısı gibi sarı ve turuncu meyve ve sebzeler A vitamini açısından zengindir. Çinko, bağışıklık sistemi fonksiyonlarını destekleyerek yara iyileşmesine yardımcı olur. Deniz ürünleri, kırmızı et, kabak çekirdeği,

yoğurt ve fasulye gibi çinkodan zengin besinlerin tüketilmesi önemlidir. Ayrıca yeterli sıvı alımı vücut hidrasyonunu ve yara iyileşmesini destekler. Su, bitki çayları ve taze sıkılmış meyve suları gibi sağlıklı içeceklerin tercih edilmesi önemlidir. Antioksidanlar, hücrel hasarı azaltarak yara iyileşmesini destekler. Renkli meyve ve sebzeler, yeşil çay, ceviz ve fındık gibi antioksidan yönünden zengin besinlerin tüketilmesi yara iyileştirme süreçleri için oldukça önemlidir. Yüksek şeker ve rafine karbonhidrat içeren bir diyet iltihabı artırabilir ve yara iyileşmesini geciktirebilir. Bunun yerine tam tahıllar, sebzeler ve düşük glisemik indeksli gıdalar gibi karmaşık karbonhidratlara odaklanmak önemlidir.

1.4.2.4 Cinsiyet

Cinsiyetin yara iyileşmesi üzerinde birtakım etkileri mevcuttur. Yapılan çalışmalarda cinsiyetin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve hormonal farklılıkların yara iyileşmesini etkilediği tespit edilmiştir. Östrojen hormonunun özellikle kadınlarda yara iyileştirici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Östrojen, kollajen sentezini artırabilir ve bağışıklık tepkisini düzenleyebilir. Bu nedenle kadınların genellikle erkeklere göre yaraları daha hızlı iyileştirdiği gözlemlenir. Bazı durumlarda hormonal ayarlamalar yara iyileşmesini etkileyebilir. Örneğin menopoz sonrası kadınlarda östrojen seviyeleri düşer ve bu da yara iyileşmesini yavaşlatabilir. Ayrıca hormon replasman tedavisi alan kadınlarda veya androjen antagonistleri (örneğin prostat kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar) alan erkeklerde yara iyileşmesinin etkilendiği gözlemlenmiştir. Cinsiyetin ayrıca inflamasyon ve bağışıklık tepkisi üzerinde etkisi vardır. Araştırmalar, kadınların genellikle erkeklerden daha güçlü bir bağışıklık tepkisine sahip olduğunu göstermektedir. Bu, kadınların enfeksiyonlara daha hızlı yanıt verme eğiliminde olabileceği ve yara iyileşmesinde bir avantaja sahip olduğu anlamına gelmektedir. [3]

1.5.Yara İyileşmesinde Kullanılan İlaçlar Ve Doğal Ürünler

İyileşmeyen yaralar veya gecikmiş yara iyileşmesi önemli bir sağlık ve yaşam riskine neden olduğundan, yara iyileştirme stratejileri ile ilgili kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Yara iyileşme basamaklarındaki son moleküler ve hücrel bulgular, yeni klinik uygulama teknolojilerine ve stratejilerine yol açan daha iyi bir anlayış sağlamıştır [42].

1.5.1.Yara Pansumanları ve İskeleler

Çoğunlukla benzer yaklaşımlar olarak yaraların bakımında pamuk, plastik bandaj, gazlı bez gibi birçok teknik kullanılmıştır. Bu işlemlerin temel amacı enfeksiyondan kaçınmak ve yara bölgesini nemli tutmaktır. Teknik gelişmelerin de yardımıyla, yenilikçi pansuman teknikleri, yara bölgesi için oksijen, antimikrobiyal yüzey ve nem sirkülasyonu için ideal parametreler sunmaktadır [45].

İskeletler, deri hücreleriyle son derece uyumlu oldukları için çok popüler hale gelmiştir. İskele için birçok biyouyumlu sistem türü vardır. Kitosan, hyaluronik asit, kolajen ve silikon bazlı pansumanlar ticari olarak mevcuttur ve jelatin, selüloz ve hidrokolloid pansumanlar gibi diğer potansiyel biyomazemeler olası uygulama için test edilmektedir [46]. Yara örtülerindeki gelişmeler, taşıyıcı olarak kullanıldıkları ve sıklıkla yara bölgesinde ülserleşmeyi, kasılmayı ve yara izini kolaylaştırdıkları için deri nakilleri sırasında karşılaşılan sorunlara yol açmıştır.

Temel bir pansuman şekli olarak hidrojeller (Şekil 5), su ve hidrofilik polimerlerden oluşur. Ayrıca yara iyileşme sürecinin farklı süreçlerini aktive edebilirler. Amorf jel formunda veya filmde elastik özellikler veya katılık sağlamak için hidrojeller eklenir. Her iki tarafta da, yaralar üzerindeki hidrojel formülasyonları etkilidir ve hem nem hem de su geçirgenliğine sahiptir. Hidrojellerin, tüm yara fazları için etkili uyarıcılar ve enfekte yaralar dışında her tür yara için etkili pansuman olduğu belirtilmiştir [45]. Klinikte yaygın olarak kullanılan pansuman ürünleri steril ve sağlıklı olduğundan ve yara bölgesinden kaynaklanan atıkları en aza indirdiğinden, bu konudaki çalışmalar ve ürün geliştirmeleri daima güncel ve geliştirilebilir olmaktadır.



Şekil 5. Hidrojel

1.5.2. Deri İmzaları

Doku mühendisliği, yara bakımı terapötik stratejilerinde umut verici bir yaklaşımdır. Doku mühendisliği araştırmalarında, iyileşmeyi sağlamak için ilk evre deri naklidir. Ancak bazı önemli sakıncaları vardır ki, toplam deri yüzeyinde kayıp olan hastalarda sadece %2'ye kadar tam kat deri transferi uygulanabilmektedir. Toplam deri yüzey alanının yaklaşık yüzde 50'si veya daha büyük olan derin yanıkları olan hastalar için de yeterli değildir. Bunun dışında kısmi veya tam kat deri greftleme uygulamalarında bazı anormal iyileşme sorunları tespit edilmiştir. Deri alternatifleriyle ilgili başka bir sorun, donörün derisi hastanın yaşı ve hücre büyüme hızı ile dengesiz olduğunda ortaya çıkar. Çoğunlukla altın standart olarak bilinen bölünmüş kalınlıkta deri grefti, bir donörün tam kalınlıktaki dokusunun alınmasını içerir. Bu konuda bildirilen deneylere göre iyileşme süresi, otogreft kısmi kalınlık hazırlığı için gerekli olan 4 hafta dışında toplam 6 haftadır. Bölünmüş deri imzalarının yarattığı sorunları ortadan kaldırmak için kültürlü otolog greftler geliştirilmiştir. Keratinositler, bu işlev için önemli bir yardımcı gibi görünmektedir çünkü hem kendi büyüme faktörlerine hem de diğer sinyal ve ortaya çıkan sitokinlere tepki verirler ve salgılarlar [48]. Kültürlenmiş otolog keratinositlerden oluşan otogreftler, ilk kez 1981 yılında kronik yaraların tedavi aracı olarak klinik olarak kullanılmıştır. Ortalama yara iyileşme süresi yaklaşık 3 ila 4 haftadır ve bu tasarlanmış otolog greftler, hem akut hem de kronik yaraların iyileşmesi için reddedilme dahil herhangi başka bir sorun olmadan kullanılabilir [48]. Bununla birlikte, greftlerin etkinliği, eksojen keratinositlerin hücre dışı matrisine bağlanmasına bağlıdır, çünkü bağlanmamış greftler çoğalamaz ve farklılaşamaz. Sonuç olarak, doku mühendisliği bu nedenle, her tür yarada fonksiyonel iyileşme yeteneğini mantıklı bir şekilde artırabilecek yapılar gibi deri inşa etmeyi amaçlamaktadır.

1.5.3. Büyüme Faktörleri ve Diğer Moleküller

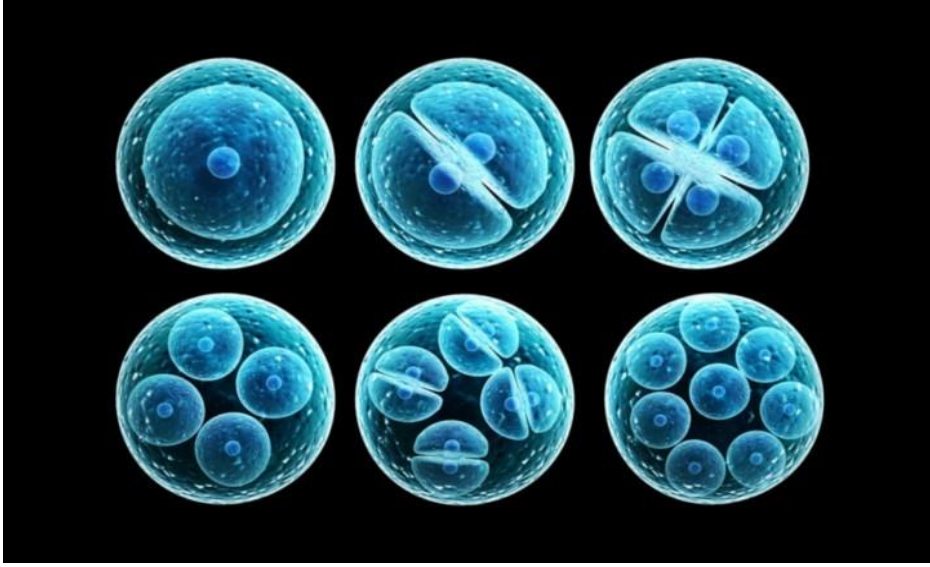
Büyüme faktörleri, yara iyileşmesinin önemli molekülleridir. Her iyileşme sürecinde çeşitli büyüme faktörleri çeşitli roller üstlenir. Sıkıca düzenlenmiş ve organize bir şekilde hücreleri ve birbirlerini uyarırlar. Yetersiz oluşum veya önemli bozulma nedeniyle büyüme faktöründeki herhangi bir eksiklik kaskadı etkiler ve anormal doku onarımına veya kronik yaralara yol açar. Bu nedenle birçok süreçte rol oynayan eksik büyüme faktörlerinin

kullanılması bilim adamları arasında oldukça yaygın bir araştırma alanıdır [39]. Trombositler ve bunların büyüme faktörü salgılaması, yaralanma bölgesine makrofaj ve nötrofil mobilizasyonu ile düzenlenir. Trombositler, ECM'ye bağlandıklarında makrofajlara dönüşürler ve interlökinler, FGF-2, TNF- α , IGF-1, PDGF, VEGF ve TGF- β gibi molekülleri salgılamaya başlarlar. En fazla üç PDGF (trombosit kökenli büyüme faktörü) dozu içeren jeller, DFU tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. PDGF jelinin kullanımı, tartışmalı bulgularına rağmen, büyüme faktörü ile zenginleştirilmiş pansuman/yapı iskelelerine olan ilgiyi tetiklemiştir. Yara iyileşmesinde, dahil olan birkaç farklı büyüme faktörü vardır [49]. Örneğin, FGF ailesinin yirmi üç farklı üyesi vardır ve FGF1, FGF2, FGF7, FGF10 ve FGF22, Ras/MAPK, PI3K/Akt yollarını tetikleyerek yara iyileşme sürecinde buna bağlanır. Yapılan bir çalışmada, kronik travmatik ülserler için, FGF gömülü kollajen süngerlerin iyileşme süresini yüzde yirmi dört oranında artırdığı ve 21 gün içinde yara kapanma süresini yüzde altmış sekiz artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca başka bir çalışma, FGF-2'nin kitosan film içine gömüldüğünü ve reepitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşumu gibi yara iyileşme aşamalarında etkili olduğunu göstermiştir [49]. Öte yandan, TGF- β ailesinin yaklaşık 30 üyesivardır. Yara iyileşme kaskadında, TGF- β 1, TGF-2 ve TGF- β 3'ün dahil olduğu ve aynı zamanda olumlu skar dokusu sonuçları gösterdiği gösterilmiştir [49]. Kronik yaralarda büyüme faktörlerine ek olarak inflamatuvar mediatörler de düzenlenmektedir.

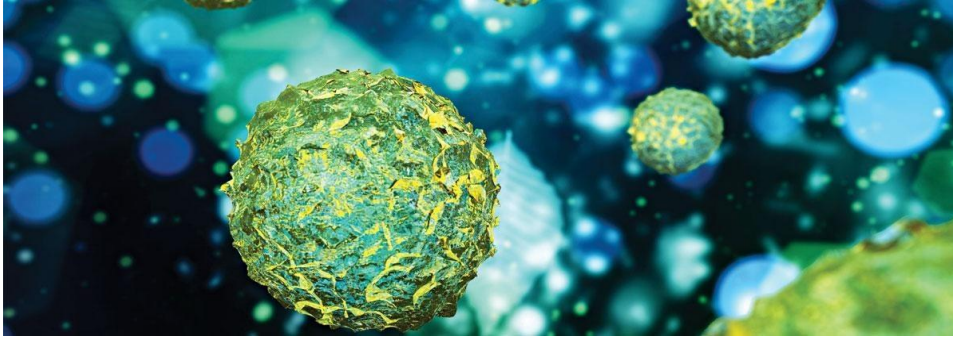
Gen aktarımı daha etkili bir seçimdir, çünkü yıkım ve metabolik baskı nedeniyle büyüme faktörlerinin iletimi etkilenir. Gen aktarımı, ya viral olmayan vektörler olan epizomal vektör ile geçici ekspresyon yoluyla ya da hedef genin daha kararlı konak kromozomuna dahil edilmesiyle gerçekleştirilir. Viral vektörlerle yürütüldüğünde, karsinogenez ve mutajenezin uyarılması ve teşvik edilmesi dahil olmak üzere gen aktarımına yönelik bazı tehditler vardır ve ayrıca bağışıklık tepkileriyle sonuçlanır. Bununla birlikte, klinik çalışmaların aksine yaygın olarak kullanılan viral olmayan vektörler, viral vektörlere göre daha fazla bulaşıcılık oranlarına sahiptir. siRNA dizisine özgü gen verme modellerinin kullanılmasıyla, inflamatuvar sitokinlerin düzenlenmesi sağlanabilir. Örneğin, iyileşmeyi kolaylaştırmak için, bir tümör baskılama geni olan P53 ve bir proinflamatuvar gen olan SMAD3, yara bölgesi çevresinde baskılanabilir. Bunun yanı sıra, potansiyel bir terapötik olarak, mikroRNA tabanlı hedefleme şu anda araştırılmaktadır [50]. Yara iyileşmesinde gen aktarım teknolojisinin hala optimizasyona ihtiyacı vardır ve klinik kullanım için güvenlik seviyelerinin artması gerekmektedir.

1.5.4. Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileme ve çoğalma yeteneğine sahiptir ve birçok hücre grubuna farklılaşabilir. Teorik olarak, kök hücreler, parakrin sinyalleşme yoluyla, hücresel süreçleri desteklemekle birlikte eksik veya hasarlı dokuyu değiştirebildikleri için yara iyileşmesi için iyi adaylardır [52]. Kemik iliği kök hücreleri, göbek kordonu kanından türetilmiş kök hücreler, sünnnet derisinden türetilmiş kök hücreler ve periferik kandan türetilmiş kök hücreler gibi birçok kök hücre türü, doku rejenerasyonunu uyardıkları için yara iyileşmesinin tedavisinde ideal adaylar olduğu belirtilmektedir. Kök hücrelerin, anjiyogenez ve granülasyondokusu oluşumu gibi yara iyileşme aşamalarını desteklediği bilinmektedir [52]. Yapılan çalışmalar, kök hücrelerin doğrudan yara bölgesine uygulandığını ve kök hücreli yapı iskelelerinin yara iyileşme sürecinde çok daha verimli bir rejenerasyon oranına sahip olduğunu göstermektedir. Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) (Şekil 6), embriyonik kök hücreler (ESC'ler) (Şekil 7) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) gibi çeşitli kökhücre türlerinin yara iyileşmesi ve deri rejenerasyonu için olası alternatifler olduğu bildirilmiştir [51]. Teratoma neden olma ve karsinojenezi tetikleme potansiyelleri nedeniyle ESC'lerin (embriyonik kök hücreler) klinikte kullanılmasına ilişkin bazı sınırlamalar vardır. Ayrıca ESC'lerin klinikte kullanımına ilişkin yasal ve etik tartışmalar da mevcuttur. Bununla birlikte, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden (iPSC'ler), yara iyileşmesinde ve dokurejenerasyonunda kullanılan alternatif umut verici bir kök hücre türü olarak bahsedilmektedir. Yetişkin dokusundan elde edilen MSC'ler, doku kurtarma uygulamalarında en güvenli yardımcılarıdır. İzolasyonlarının ve kullanımlarının kolaylığı nedeniyle, adipozdan türetilmiş kök hücreler (ADSC'ler) mezenkimal kök hücreler içinde çok yaygındır. Çalışmalar, ADSC'lerin yara iyileşmesini tetiklediğini ve yara izini azalttığını göstermektedir. Ayrıca, göbek kordonu kaynaklı kök hücreler (UCSC'ler) başka bir alternatif kök hücre türüdür. Çalışmalar, UCSC'lerin dermal hücreler üzerinde incelendiğini ve etkili bir şekildekeratinositlere farklılaştığının gösterildiğini göstermiştir [53]. Kök hücrelerin izole edilmesi, karakterize edilmesi ve yara bölgesine iletilmesi için ileri çalışmalar yapılmaktadır.



Şekil 6. Embriyonik kök hücreler



Şekil 7. Mezenkimal kök hücreler

1.6.Yara İyileştirmede Allantoinin Rolü

1.6.1.Allantoin

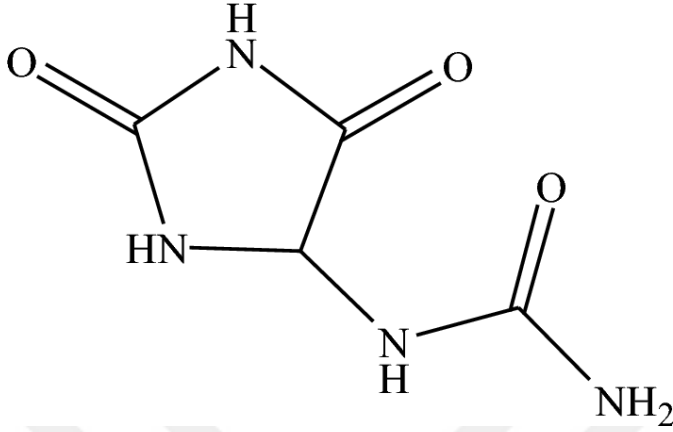
Allantoin $C_4H_6N_4O_3$ formüllü kimyasal bir bileşiktir. Aynı zamanda 5- üreidohidantoin veya glisoksidiüreid olarak da adlandırılır (Şekil 8) [54]. Allantoin, yara iyileştirme, tahriş önleyici, nemlendirici, nekrotik doku giderici ve hücre mitozunu uyaran çok yönlü hafif sarıya da beyaz renk toz halinde kullanılan bir bileşendir. [55]. Allantoinin ana kaynağı Karakafes olarak da bilinen Symphytum türleri, Boraginaceae familyasına ait otlardandır. Bu cins yaklaşık olarak 40 türden oluşup, içerisindeki 14 türün İtalya’da, [56-57] 18 türünün ise Türkiye’de olduğu bilinmektedir [58]. Avrupa ve Asya’dan [59] gelen bu tür nemli ve serin yerlerde, akarsularda oldukça fazla büyüme, gelişme ve çoğalma göstermektedir. Genellikle ılıman ve subtropikal bölgelerde yetişen bu bitki derin kök sistemi sayesinde iyi bir su

toleransına sahiptir [60]. Karakafes bitkisinin kök ve yaprakları, antik ve ortaçağda kırıklar, çıkıklar, şişkin eklem tedavilerinin yanı sıra hazımsızlık ve gastrointestinal (GI) kanal ülserasyonlarını gidermek amacıyla kullanılmıştır [61]. Yine eski zamanlardaki çiftçiler merhem ve tentür karışımlarında karakafes köklerini kullanmışlardır [62, 63, 64, 65]. Karakafes özlerinden oluşan, merhem ya da macun halindeki karakafes otu içeriğindeki allantoin sayesinde deri üzerinde uygulanarak ya da doğrudan ham bitki parçaları (yaprak, bitki veya kök) deri üzerine uygulanarak yüzyıllardır geleneksel tedavi amacıyla kas ve iskelet sistemi rahatsızlıkları, yaralar, hematomlar ve yüzeysel deri hastalıklarında kullanılmaktadır [63,65,66].

Ayrıca allantoin, ürik asit oksidasyon ürünlerinin metabolik bir bileşiğidir. Doğal olan allantoin daha güvenilir ve toksik etki göstermeyen bir bileşiktir. Aynı zamanda deriyi yatıştırıcı, yumuşatıcı ve iyileştirici etkisiyle kozmetik hammaddeleri ile oldukça uyumludur [70].

Allantoinin hücre bölünmesini, bağ dokularını, kemikleri ve kırıkta büyümesini teşvik ederek yaraların iyileşmesine katkı sağladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [73]. Allantoin; antioksidan, antiinflamatuvar, yara iyileşmesi ve hipoglisemik etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikler sergilemektedir. Şu anda piyasada bulunan antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan yaygın bir kozmetik bileşendir [74]. Allantoinin genel faydaları arasında nemlendirme ve yatıştırma vardır. Derinin nem dengesini korumaya yardımcı olur ve kuru, tahriş olmuş veya hassas derileri rahatlatır. Bu özellikleri nedeniyle allantoin, özellikle kış aylarında derinin kurummasını önlemek için kullanılan ürünlerde sıkça tercih edilir. Ayrıca, allantoin, deri hücrelerinin yenilenme sürecini hızlandırmaktadır. Derinin doğal olarak kendini yenilemesine yardımcı olur ve hasarlı veya yaşlanmış hücrelerin yerine yenilerinin gelmesini teşvik eder. Bu sayede deri tonunu eşitler ve daha sağlıklı bir görünüm kazanmasını sağlar. Allantoinin anti-inflamatuvar özellikleri de vardır. Allantoin derideki iltihaplanmayı azaltmaya yardımcı olabilir. Akne, sivilce ve deri tahrişi gibi deri sorunlarıyla mücadele etmek için kullanılan ürünlerde sıkça kullanılır. Allantoin, derideki kızarıklık, şişlik ve tahrişi azaltarak daha sakin bir deri sağlar. Allantoin, antioksidan özelliklere sahip bir bileşiktir. Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak deriyi serbest radikal hasarınakarşı korur. Bu sayede derinin yaşlanma belirtilerini geciktirmeye ve genç görünümünü korumaya yardımcı olur.

Allantoin, yara iyileşmesini teşvik edici özelliklere sahiptir. Derideki küçük kesikler, yanıklar veya sıyrıkların daha hızlı iyileşmesine yardımcı olur. Allantoin, derideki doku yenilenmesini teşvik ederek yara izlerinin azalmasına katkıda bulunur.



Şekil 8 : Allantoinin yapısı

1.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, allantoinin insan immortal keratinosit hücre hattı HaCaT’da yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini proliferasyon, apoptoz ve gen seviyeleri açısından değerlendirmektir.

2. MATERYAL-METOD

2.1. Hücre Kültürü

Çalışmalar Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden temin edilen insan immortal keratinosit hücre hattı HaCaT ile yapılmıştır. HaCaT hücre hattı; %1 penisilin/streptomisin/amfoterisin (PSA) ve %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle's besiyerinde (DMEM, Gibco, UK) %5 CO₂ ve 37°C koşullarında inkübatörde büyütülmüştür. DMEM besiyeri stoğu +4°C'de saklanmıştır. Hücreleri pasajlamak için %0.25 Trypsin/EDTA (Gibco, UK) kullanılmıştır. Allantoin, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edilmiştir. Allantoin stokları oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Kullanılmadan önce besiyeri ile seyreltilerek taze olarak hazırlanmıştır.

2.1.1. İlaç Hazırlama

Toz halinde bulunan Allantoin belirli bir miktarda tartıldıktan sonra stok konsantrasyonu 20.000 µM olacak şekilde hesaplanmış ve tartılan toz allantoin vorteks yardımı ile besiyeri içerisinde çözülmüştür. Ardından steril hale gelebilmesi için 0.2µm'lik milipor filtreden geçirilmiştir. Steril hale gelen stoktan uygulamada kullanılacak ilaç dozları taze olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır.

2.2. Hücre Açma ve Dondurma

-80°C stoklanan HaCaT hücre hattı gerekli laboratuvar koşulları sağlandıktan sonra çıkartılıp hızlıca eritme işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak yüksek glikozlu DMEM besiyerine % 10 FBS ve % 1 PSA eklenerek tamamlanmış besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 5 ml olacak şekilde 15ml'lik falkon tüp içerisine serolojik pipet yardımı ile eklenmiştir. Daha sonra eritilen hücre doğrudan falkon tüp içerisine alınıp 1500 rpm'de 5 dk olacak şekilde santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra dibe çöken pellete zarar vermeden süpernatant atılmıştır. Pellet 1 ml taze besiyeri içerisinde çözündürülüp içerisine 15 ml besiyeri eklenen T75 flaska aktarılmış ve 37 °C'de inkübatörde büyümeye bırakılmıştır.

Hücrelerin yeni araştırmalarda kullanılması, aynı araştırmada ek deneylerin yapılabilmesi gibi çeşitli sebeplerden dolayı hücreler dondurularak saklanmaktadır. Bunun için hücreler %0.25'lik tripsin yardımı ile kaldırılıp santrifüjlendikten sonra pellete dondurma

besiyeri (%10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve %90 FBS) eklenerek kriyoviyal tüpe aktarılmıştır. Tüpler, Mr.Frosty kabı içerisine konularak yavaş yavaş donmasını sağlayacak şekilde -80 °C'ye kaldırılmıştır.

2.3. Hücre Pasajlama Protokolü

Hücre açıldıktan sonra inkübatörde büyümeye bırakılan T75 içerisindeki hücreler ~%70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır. Hücre pasajlama adımlarında ilk olarak T75 içerisindeki 15 ml besiyeri serolojik pipet yardımı ile aspire edilmiştir. Ardından flask içerisine 3 ml 1X PBS (1X fosfat tamponlu tuz) eklenerek tüm yüzeye nüfuz etmesi sağlandıktan sonra uzaklaştırılarak aynı miktarda %0.25'lik tripsin eklenmiştir. Hücrelerin kalkması için flask 5 dk beklemek üzere inkübatöre bırakılmıştır. Ardından mikroskop yardımı ile hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir. Eğer bir kısmı yüzüyor bir kısmı hala sabit ise hafifçe vurularak tamamının kalkması sağlanmıştır. 3 ml tripsinbulunun T75 flask içerisine aynı oranda taze besiyeri eklenerek hücreler serolojik pipetyardımları ile toplanmış ve 15 ml'lik falkon tüpe aktarılmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant atılmış ve pellet üzerine 1 ml besiyeri eklenerek çözülmüştür. Ardından yeterli miktarda hücre yeni bir T75 flaska aktararak inkübatörde büyümeye bırakılmıştır.

2.4. Hücre Canlılık Testi (MTT Analizi)

Allantoinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için hücre canlılık testi yapılmıştır. İlk olarak 96 kuyucuklu tabak içerisine her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde HaCaT hücre hattı ekimi yapılmış ve ardından 37 °C inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saat sonunda hücreler inkübatörden çıkartılarak ilaç eklenmiş ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar için tekrar inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saat sonra her kuyucuktaki 100 µL olan besiyerinin içine 10 µL MTT (3-(4,5- dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) eklenmiş ve alüminyum folyo ile kapatılarak hiç ışık görmemesi sağlanacak şekilde inkübatöre kaldırılmıştır. 4 saat belettikten sonra kuyucuk içerisindeki besiyeri aspire edilerek her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde DMSO eklenmiş ve 5 dakika beklemeye bırakılmıştır. Ardından ölçümler 570 nm absorbansta, iMark tm mikroparka okuyucusu (Bio- Rad) kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.5. Yara Kapanma Deneyi (Scratch Assay)

Allantoinin yara kapanması üzerindeki etkisini belirlemek için yara kapanma deneyi yapılmıştır. İlk olarak 6 kuyucuklu tabak içerisine her bir kuyucukta 100.000 hücre olacak

şekilde HaCaT hücre hattı ekimi yapılmış ve ardından 37 °C inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saat sonunda hücreler inkübatörden çıkartılarak 200 µl'lik steril pipet ucu ile yara oluşturulmuştur. Ardından hücreler bir defa 1X PBS ile yıkanarak kalkan hücreler uzaklaştırılmış ve kontrol grubu dışındaki hücrelere MTT deneyi sonucunda seçilen dozlar olan 50 µg/mL ve 200 µg/mL Allantoin içeren taze besiyerleri eklenmiştir. Yara kapanmasını gözlemlemek için her 24 saatte bir ölçüm alınmıştır. Yara kapanması, DP Controller yazılımı kullanılarak ölçüldü.

2.6. Apoptoz Analizi (ANNEXIN V/PI Assay)

Annexin V/ PI (Propidyum iyodür) analizi, Allantoin uygulanan hücrelerde apoptoz olup olmadığını değerlendirmek için yapılmıştır. İlk olarak 6 kuyucuklu tabak içerisine her bir kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde HaCaT hücre hattı ekimi yapılmış ve ardından 37 °C inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saatin sonunda kontrol grubu dışındaki hücreler 50 µM ve 200 µM allantoin maruz bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücreler toplanarak santrifüjlenmiş ve pellet 1X PBS ile yıkanarak tekrar santrifüje konulmuştur. Daha sonra süpernatant aspire edilmiş ve pelletler 200 µL 1X bağlama tamponu ile çözülmüştür. Kontrol grubu, bir boyalı ve bir boyasız olacak şekilde ikiye bölünmüştür. Boyalı olmayan kontrol grubu dışında her bir gruba 5 µL olacak şekilde Annexin V-FITC boyası eklenerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra boyalı olmayan kontrol grubu dışında her gruba 5µL PI eklenmiştir. Daha sonra BD Accuri akış sitometre sistemi kullanılarak sonuçlar analiz edilmiştir (BD Accuri™ C6).

2.7. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi, allantoin uygulanan hücrelerin hangi fazlarda olduğunu belirlemek için kullanılmıştır. İlk olarak 6 kuyucuklu tabak içerisine her bir kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde HaCaT hücre hattı ekimi yapılmış ve ardından 37 °C inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saatin sonunda kontrol grubu dışındaki hücreler 50 µM ve 200 µM allantoin maruz bırakılmıştır. 24 saatin sonunda hücreler toplanarak 1XPBS ile yıkanmış ve hücre pelleti 1ml %70 Etanol eklenerek fikse edilmiştir. Fikse edilen hücreler -20 °C de 2 saat olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra etanolün uzaklaştırılması için hücreler tekrar santrifüjlenmiştir. Sonrasında 1XPBS ile yıkanmış ve tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılıp 460 µL 1X PBS, 20 µL RNaz (2 mg/ml), 20 µL PI içeren bir solüsyon eklenmiş ve 30 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Ardından sonuçlar akış sitometre sistemi kullanılarak ölçülmüştür (BD Accuri™ C6).

2.8. 3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DIOC6) Boyaması

DIOC6 boyaması, Allantoin uygulanan hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelindeki

değişiklikleri değerlendirmek için yapılmıştır. İlk olarak 6 kuyucuklu tabak içerisine her bir kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde HaCaT hücre hattı ekimi yapılmış ve ardından 37 °C inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saatin sonunda kontrol grubu dışındaki hücreler 50 µM ve 200 µM allantoin maruz bırakılmıştır. İlaç dozları eklendikten sonra 37 °C inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri aspire edilerek yerine 1ml taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler üzerine 8 ul DIOC6 boyası (1:9) eklenerek 37 °C inkübatöre kaldırılıp 15 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler floresan mikroskop yardımı ile gözlemlenerek fotoğraflanmıştır.

2.9. Gen Ekspresyon Analizi

Allantoinin gen ekspresyonlarında değişiklik yapıp yapmadığını değerlendirmek için kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu yapılmıştır. İlk olarak 6 kuyucuklu tabak içerisine her bir kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde HaCaT hücre hattı ekimi yapılmış ve ardından 37 °C inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saatin sonunda kontrol grubu dışındaki hücreler 50 µM ve 200 µM allantoin maruz bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

2.9.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyon kiti (#05081955001 Roche, ABD) kullanılarak total RNA izole edilmiştir. Bu kite göre, hücre pelleti üzerine 200 ul 1XPBS eklenerek çözülmüş, arkasından Lysis/Binding Buffer 400 µL olacak şekilde eklenmiş ve vortekslenmiştir. Vorteksledikten sonra filtreli tüplere aktarılıp santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından filtre tüpüne DNaz Tamponu eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yıkama tamponuyla 3 defa yıkanıp santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernant atılmış ve elüsyon tamponu eklenip santrifüjlenmiştir. Ardından RNA içeren kısım Nanodrop 2000 ile ölçülmüştür.

2.9.2. c-DNA Sentezi

Total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra High Fidelity cDNA sentezi kiti (#05081955001, Roche, ABD) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. PCR tüpüne 11 µl dH₂O ve örnek eklenmiştir. Aynı bir PCR tüpüne 2 µL random hexamer primeri eklenmiş ve 65 °C'de 10 dakika bir termal cycle cihazına bırakılmıştır. Daha sonra 4 ul reaksiyon tamponu, 0.5 ul RNase inhibitörü, 2 ul dNTP ve 0.5 ul ters transkriptazdan oluşan karışım hazırlanmıştır. 10 dakika sonrasında karışım solüsyonundan 7 µL alınarak her örneğe eklenmiş ve PCR şartları altında termocycle da döndürülmüştür. Reaksiyon bittikten sonra örneğe 80 µL dH₂O eklenmiştir.

2.9.3. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

qPCR, moleküler düzeyde gen ekspresyonunu tespit etmeyi sağlar. Kullanılan primerler; 18S, Akt, laminin, fibronektin ve Col1A ‘dır (Tablo 1). 5 ul SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems TM), 0.5 ul forward dizisi ve 0.5 ul reverse dizi içeren ilgili genler için spesifik primerler ve 2 ul distile sudan oluşan bir karıştırma solüsyonu hazırlanarak qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Karıştırma solüsyonu her primer için ayrı hazırlanmıştır. qPCR plakasına 8 µL karışım ve 2 µL örnek (cDNA) eklenmiştir. Ardından plakayı qPCR koşulları altında iCycler qPCR Sistemine (CFX96 RT-qPCR Sistemi, Bio-Rad, Hercules, CA) yerleştirilmiştir (Tablo 2). 18S housekeeping gen olarak kullanılmıştır.

Tablo 1: qPCR Analizinde Kullanılan Primerler

GEN	DİZİ
18S	F5’GTAACCCGTTGAACCCCATT3’ R5’CCATCCAATCGGTAGTAGCG3’
AKT	F 5’ GAAGCTGCTGGGCAAGGGGCA 3’ R 5’ GTGGGCCACCTCGTCCTTGG 3’
FİBRONEKTİN	F 5’ AGCCTGGGAGCTCTATTCCA3’ R 5’ CTTGGTCGTACACCCAGCTT3’
LAMİNİN	F 5’ CACATGTCCGTCACAGTGGA 3’ R 5’ TAGAGGCTGACCACCTCCTC3’
COL1A	F 5’ AGCCAGGCTGCCTTGTTTG3’ R 5’ GCCAACCTCCCCTTTGCACT3’

Tablo 2: qPCR koşulları

Basamak Adı	Sıcaklık(°C)	Süre	Tekrar Sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	5dk	1
Denatürasyon	95°C	0:15 sn	36
Bağlanma	59°C	0:30 sn	
Uzama	72°C	0:30 sn	
Son uzama	72°C	10dk	1
Erime Eğrisi	-0.5°C/ döngü	12sn	110

2.10. İstatiksel Analiz

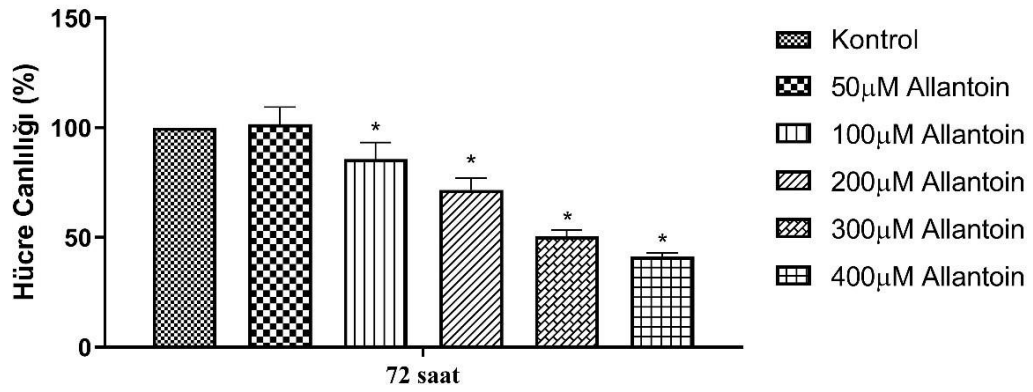
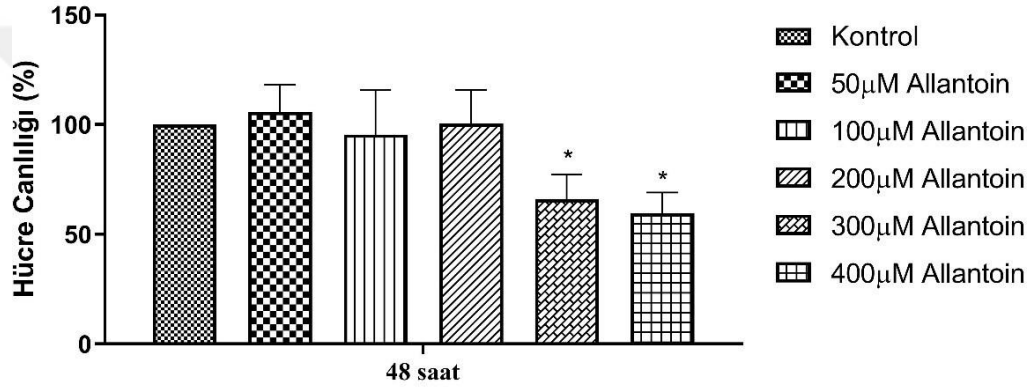
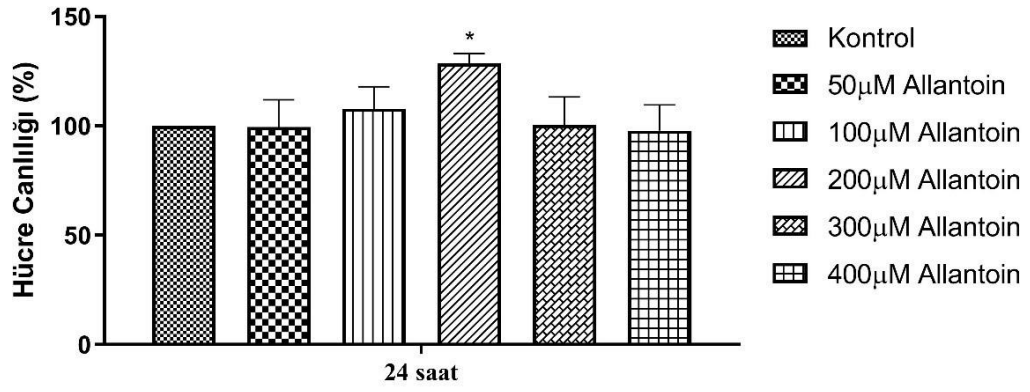
İstatistiksel analiz tek yönlü varyans ve Tukey post hoc testleri uygulanarak yapılmıştır.

*P<0.05 değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

3.SONUÇLAR

3.1. Hücre Canlılık Analizi

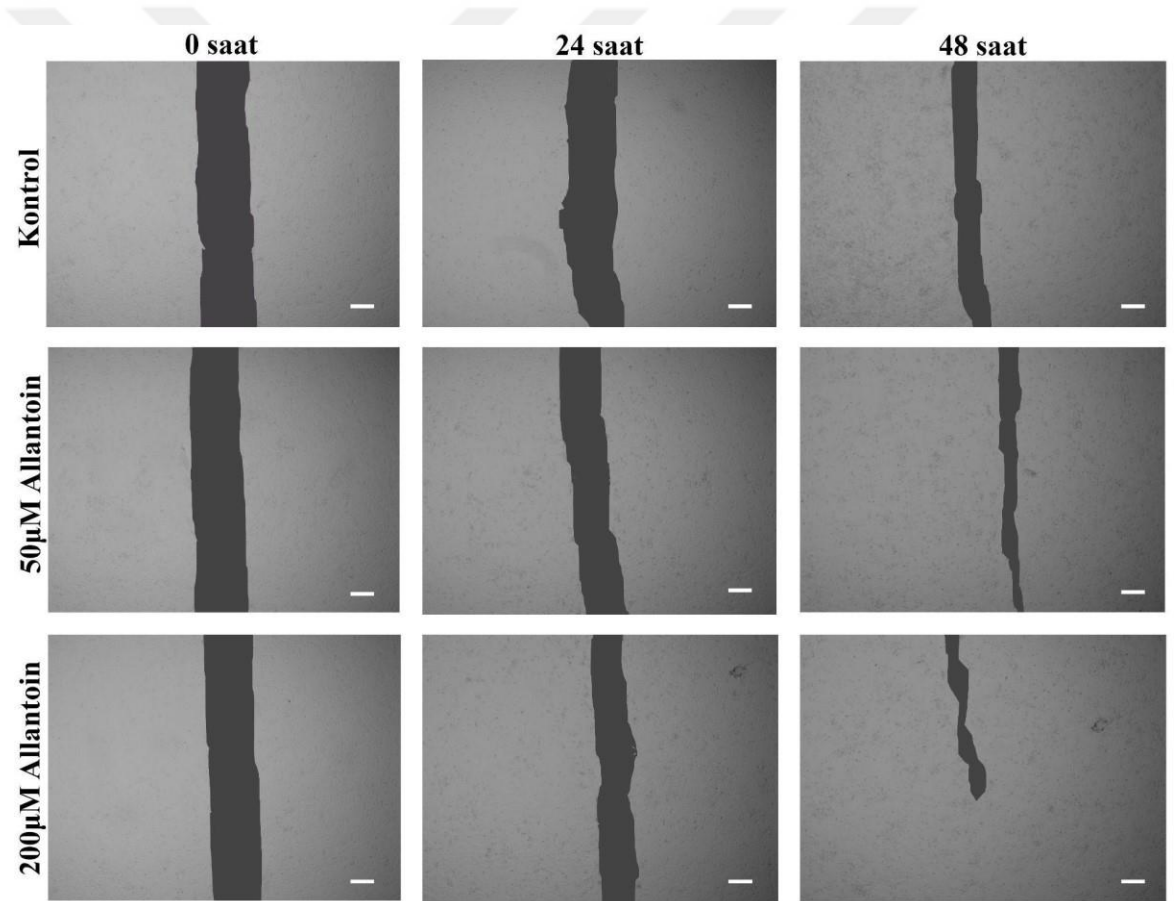
Allantoinin HaCaT hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 24,48 ve 72 saat süre ile MTT testi yapılmıştır. Allantoinin konsantrasyonları (50, 100, 200, 300, 400 μ M) uygulandığında, 24 saatlik sonuçlara göre sırası ile canlılık oranının %99.4, %107.8, %128.5, %100.6 ve %97.8 olduğu gösterilmiştir. 48 saatlik sonuçlara göre ise sırası ile canlılık oranı %105.7, %95.4, %100.5, %66, ve % 59.6 olarak ölçülmüştür. 72 saatlik sonuçlara göre ise sırası ile canlılık oranının %101.6, %85.6, %71.6, %50.5 ve % 41.1 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre 24 saatin sonunda 200 μ M allantoin verilen grupta hücre canlılığı anlamlı oranda artarken diğer dozlarda herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. 48 saatin sonunda 300 ve 400 μ M allantoin verilen gruplarda hücre canlılığı anlamlı oranda azalırken, allantoin uygulanan diğer tedavi gruplarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır. 72 saatin sonunda ise 50 μ M allantoin uygulanan grup dışındaki diğer tedavi gruplarında hücre canlılığı anlamlı oranda azalmıştır. Elde edilen sonuçlar zamana bağlı olarak yüksek dozların hücre canlılığını azalttığını göstermektedir. Çalışmanın devamında allantoin uygulaması için inkübasyon süresi olarak 24 saat seçilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılmak üzere allantoinin en düşük dozu olan 50 μ M ile 24 saatte proliferasyonu arttıran 200 μ M dozları seçilerek dozlar arasında da karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 9).



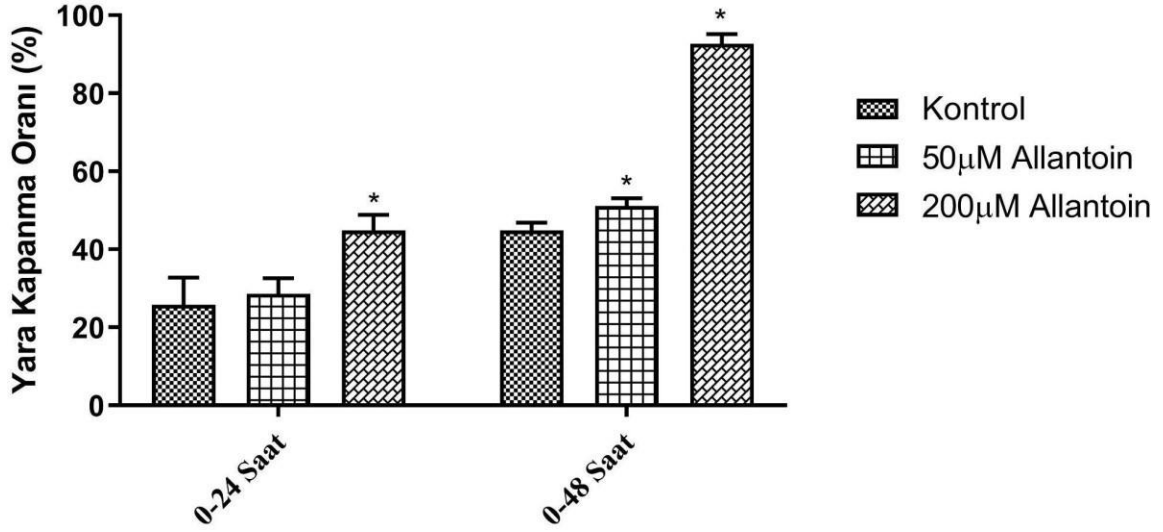
Şekil 9. Farklı Allantoin konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatte HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri. *P<0.05 vs kontrol

3.2. Yara Kapanma Deneyi Analizi

50 ve 200 μ M Allantoin uygulanan hücrelerdeki yara kapanma oranları 0, 24 ve 48 saat olacak şekilde ışık mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir (Şekil 10). 24 saat sonunda yara kapanma oranlarının sırası ile kontrol grubunda %25.81, 50 μ M allantoin uygulanan grupta %28.60 ve 200 μ M allantoin uygulanan grupta ise % 44.90 olduğu gösterilmiştir. 48 saat sonunda ise kontrol grubunda %44.85, 50 μ M allantoin uygulanan grupta %51.10 ve 200 μ M allantoin uygulanan grupta ise % 92.70 oranında yara kapanması gözlemlenmiştir (Şekil 11). 200 μ M allantoin uygulanan gruptaki yara kapanma oranında kontrol ve 50 μ M allantoin uygulanan gruba göre anlamlı oranda artış olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre 200 μ M allantoinin yara kapanma üzerindeki etkisi oldukça yüksektir.



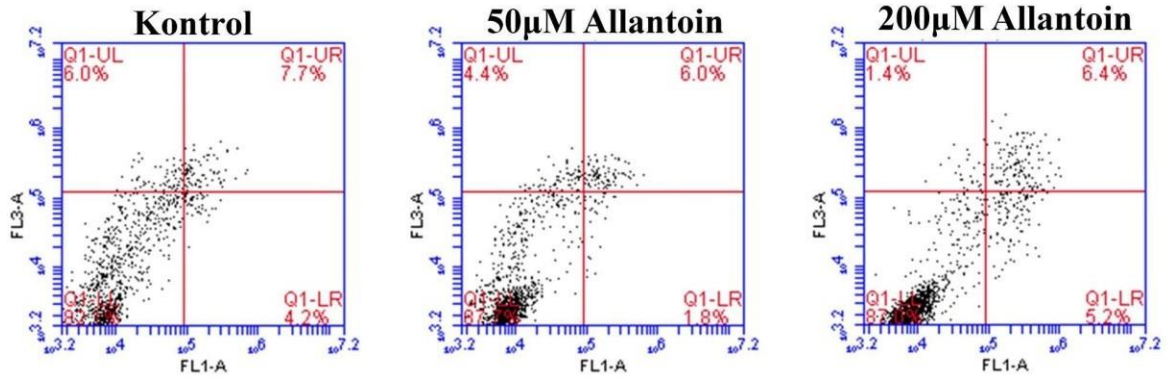
Şekil 10: 50 ve 200 μ M Allantoin dozları uygulanan HaCaT hücre hattında 24 ve 48 saat sonundaki yara kapanma oranlarının ışık mikroskobu altında fotoğraflanması. Ölçek çubuğu: 200 μ m.



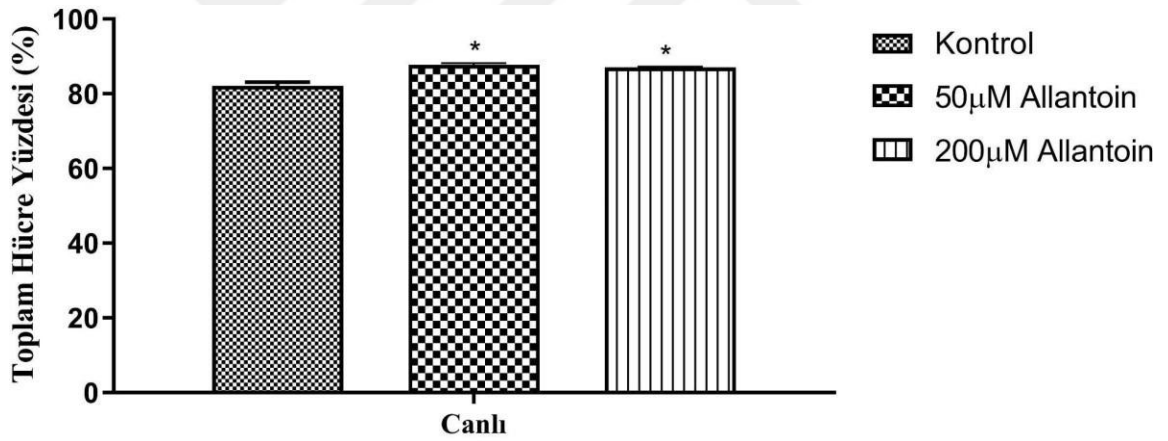
Şekil 11: 50 ve 200 µM Allantoin dozları uygulanan HaCaT hücre hattında 24 ve 48 saat sonundaki yara kapanma oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol

3.3. Apoptoz Analizi

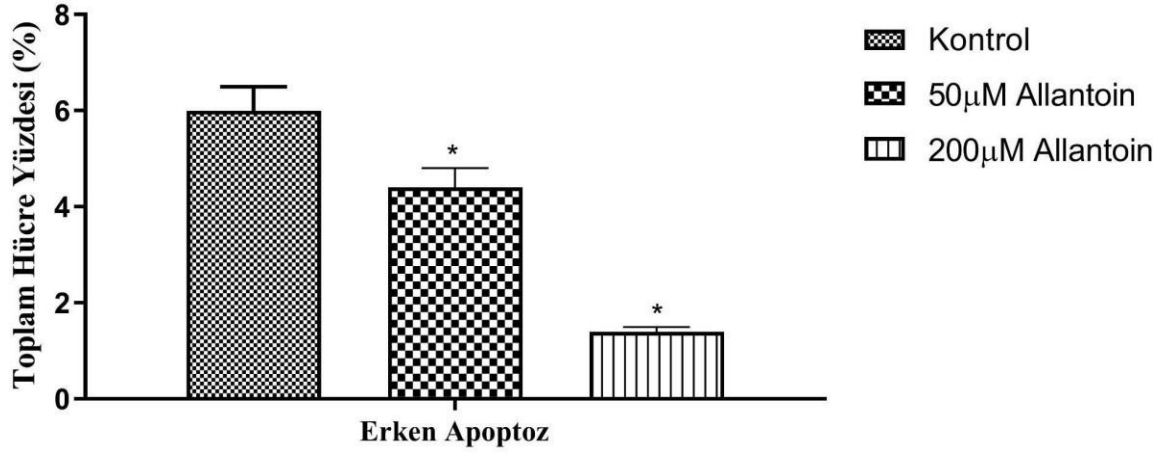
50 ve 200 µM Allantoin uygulanan hücrelerin 24 saat sonunda apoptoza gidip gitmediğini belirlemek için Annexin V-PI analizi yapılmıştır (Şekil 12). Elde edilen sonuçlara göre; kontrol, 50 µM ve 200 µM Allantoin uygulanan gruptaki canlı hücre yüzdeleri sırası ile %82.09, %87.73 ve %87 olarak ölçülmüştür (Şekil 13). Kontrol, 50 µM ve 200 µM Allantoin uygulanan gruptaki erken apoptotik hücre yüzdeleri sırası ile %6, %4.40 ve %1.4 olarak belirlenmiştir (Şekil 14). Kontrol, 50 µM ve 200 µM Allantoin uygulanan gruptaki geç apoptotik hücre yüzdeleri sırası ile %4.18, %1.84 ve %0.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Kontrol, 50 µM ve 200 µM Allantoin uygulanan gruptaki nekrotik hücre yüzdeleri sırası ile %7.73, %6.04 ve % 6.3 olarak belirlenmiştir (Şekil 16). Sonuçlar Allantoin uygulaması sonucunda hücrelerin apoptoza gitmediğini göstermektedir. Apoptotik analiz sonuçlarının MTT sonuçlarını desteklediği görülmektedir (Şekil 17).



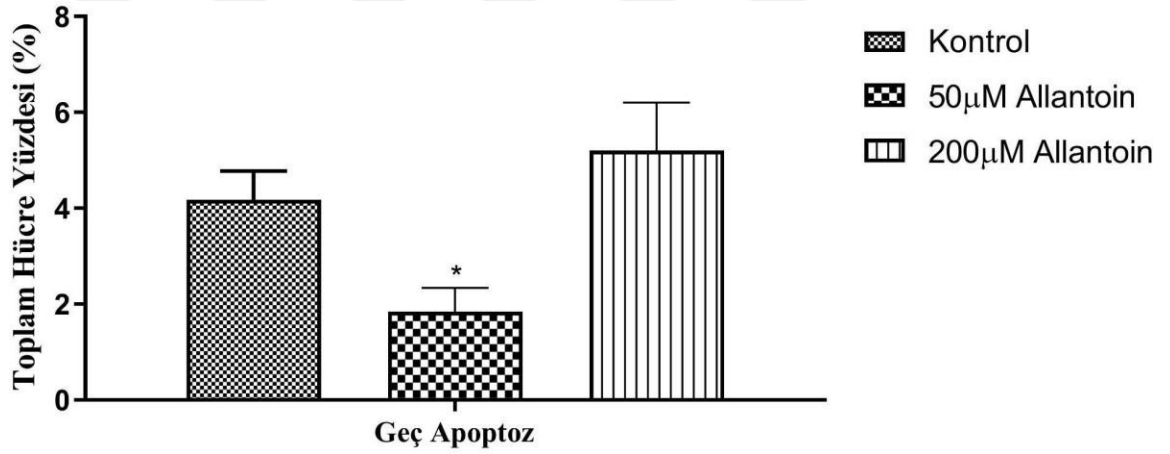
Şekil 12. 24 saat allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının Annexin V-FITC/PI deneyi ile gösterilmesi



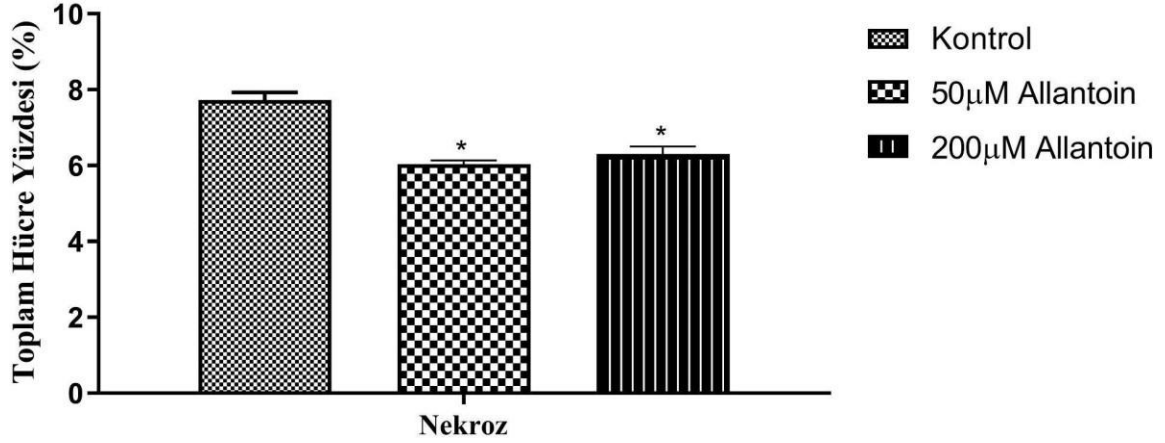
Şekil 13: 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda canlı hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol



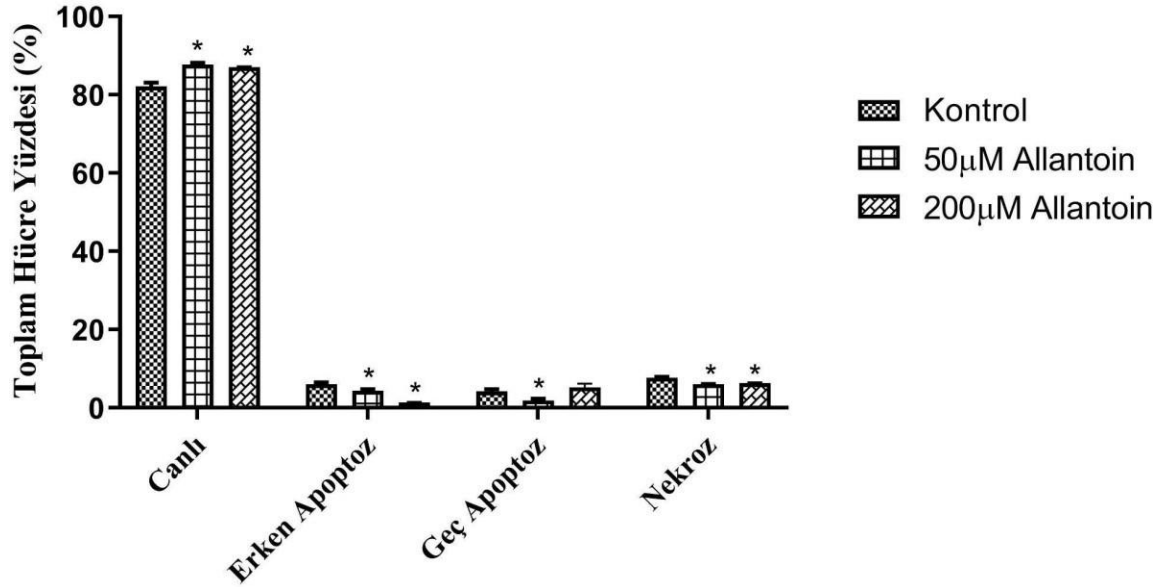
Şekil 14. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda erken apoptotik hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol



Şekil 15. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda geç apoptotik hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol



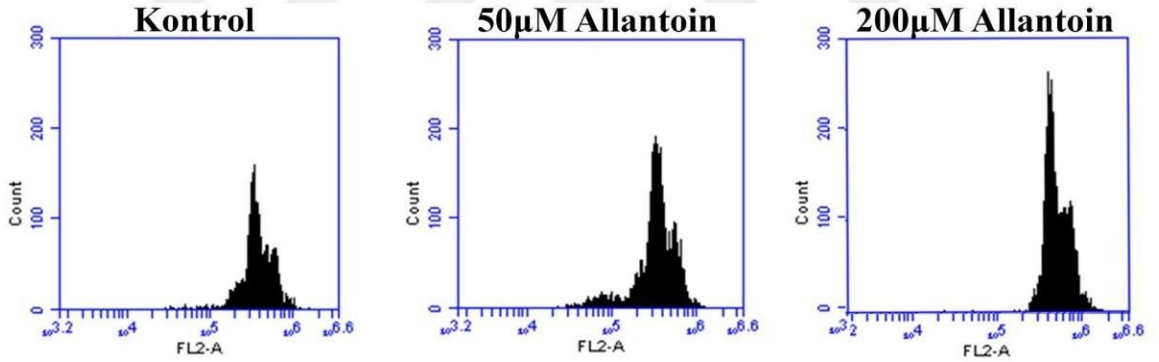
Şekil 16. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattındaki 24 saat sonunda nekrotik hücre oranlarının grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol



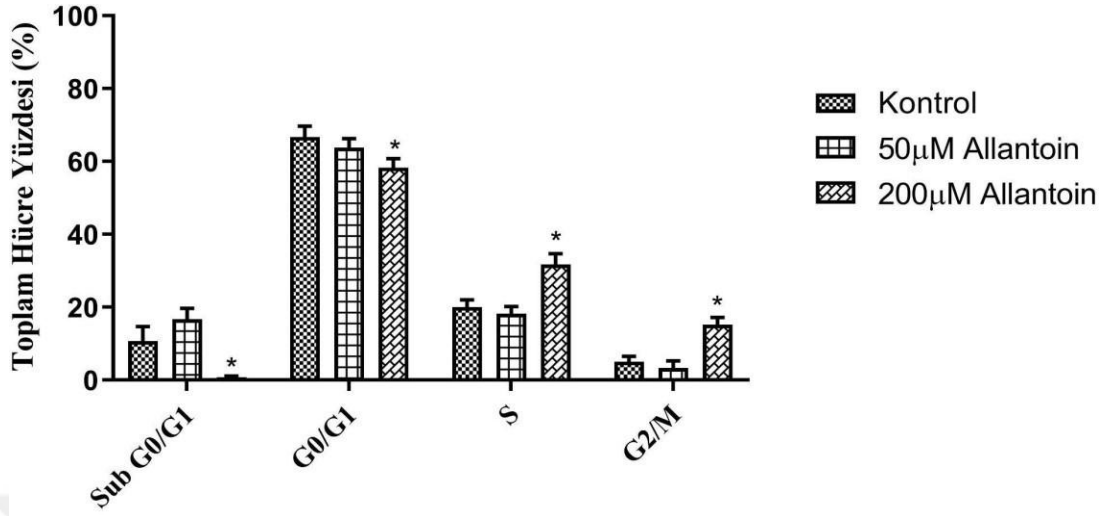
Şekil 17. 50 ve 200 µM allantoin tedavisi uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonunda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının Annexin V-FITC/PI deneyi sonucunda grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol

3.4.Hücre Döngüsü Analizi

50 ve 200 μ M Allantoin uygulanan hücrelerin 24 saatin sonunda hangi fazda olduklarını belirlemek için hücre döngüsü analizi yapılmıştır (Şekil 18). Kontrol grubunda, apoptotik hücre popülasyonunu gösteren sub-G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %10.70, G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %66.70, S fazındaki hücrelerin oranı %20 ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı %5 olarak belirlenmiştir. 50 μ M allantoin uygulamasının ardından, sub-G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %16.70, G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %63.80, S fazındaki hücrelerin oranı %18.20, G2/M fazındaki hücrelerin oranı %3.30 olarak belirlenmiştir. 200 μ M allantoin uygulamasından sonra ise sub-G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %0.8, G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %58.30, S fazındaki hücrelerin oranı %31.70, G2/M fazındaki hücrelerin oranı %15.20 olarak belirlenmiştir (Şekil 19). 200 μ M Allantoin uygulanan hücrelerde S ve G2/M fazlarında artış olduğunun görülmesi hücre canlılığı ve yara kapanması deneylerini doğrular niteliktedir.



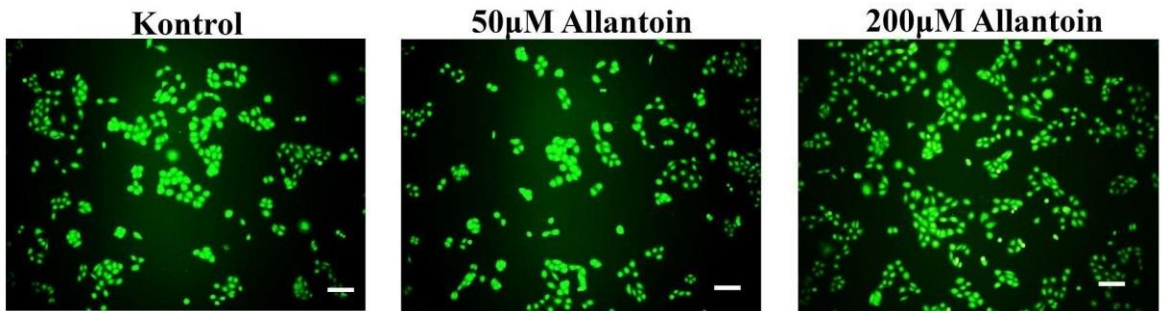
Şekil 18. 50 ve 200 μ M Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki hücre döngüsü faz dağılımının gösterimi



Şekil 19. 50 ve 200 µM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki hücre döngüsü faz dağılımında toplam hücre yüzdelерinin gösterilmesi. *P<0.05 vs kontrol

3.5. DIOC6 Boyama

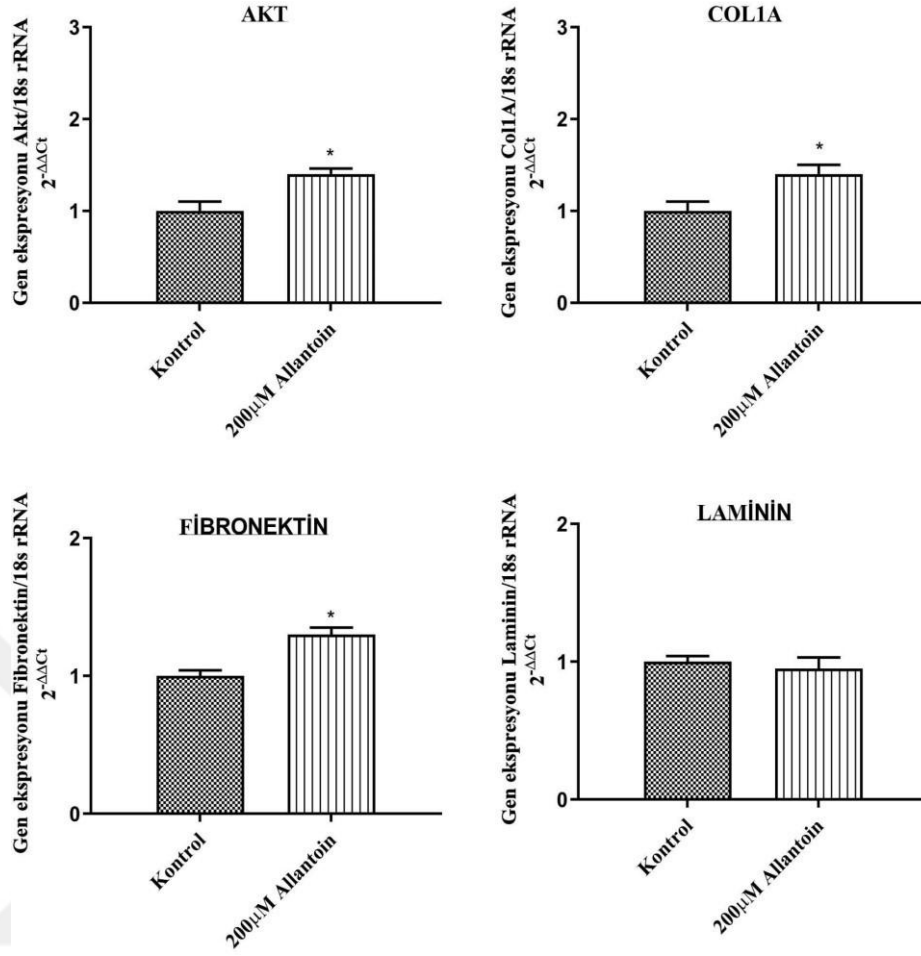
50 ve 200 µM Allantoin uygulanan hücrelerin 24 saatin sonunda mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkileri DIOC6 boyaması yapılarak gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 50 µM allantoin uygulanan grubun floresan yoğunluğunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer olduğu 200 µM allantoin uygulanan grubun ise floresan yoğunluğunda gözle görülür bir artış saptanmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. 50 ve 200 µM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki DIOC6 boyası sonucunda elde edilen floresan mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu: 200 µm

3.6. GEN EKSPRESYON ANALİZİ (qPCR)

200 μ M Allantoin uygulanan hücrelerdeki Akt, Laminin, Fibronectin ve Kolajen ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikleri incelemek için qPCR analizi yapılmıştır. Akt, hücre büyümesi, hücre hayatta kalması, hücre çoğalması ve hücre hareketi gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynayan bir protein kinazdır. 200 μ M Allantoin uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre Akt'nin ekspresyon seviyesinde artış görülmüştür. Laminin, hücre dışı matriksin önemli bir bileşenidir. Laminin, hücrelerin bir arada tutulmasına ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunmasına yardımcı olurlar. Fibronectin, hücre dışı matriksin bir başka önemli bileşenidir. Fibronectin, hücrelerin matrikse yapışmasını ve hareket etmesini sağlar. Aynı zamanda hücreler arası iletişimi düzenleyerek hücreler arasında sinyal iletimini kolaylaştırır. Colla, kolajen ailesinin bir üyesidir ve özellikle tip I kolajenin yapısını kodlar. Tip I kolajen, kemik, deri, tendonlar ve diğer bağ dokularının ana bileşenidir. Colla geni, bağ doku hücrelerinde kolajen üretimini düzenler ve bağ dokusunun sağlamlığını ve elastikiyetini sağlar. Elde edilen sonuçlara göre; 200 μ M Allantoin uygulamasının Colla ve Fibronectin seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ancak Laminin seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 21).



Şekil 21. 200 μM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki Akt, Col1A, Fibronectin ve Laminin gen ekspresyon seviyelerinin grafiksel gösterimi. *P<0.05 vs kontrol

4.TARTIŞMA

Deri, vücudu saran ve onu yabancı partiküllere ve çevresel koşullara karşı koruyan bir tabakadır. Deri, vücudun yalnızca en büyük organı değil, aynı zamanda yapısına katkıda bulunan en az beş farklı hücre türü ve deri ile ilişkili olan dolaşım ve bağışıklık sistemlerinden gelen diğer hücre türleri ile beraber belki de en karmaşık organdır. Gerçekleştirilen işlevlerin sayısı açısından, deri diğer organlara göre daha fazla işleve sahiptir: birincil işlevi fiziksel, kimyasal, bağışıklık, patojen, UV radyasyonu ve serbest radikal savunmalarını kapsayan korumadır. Deri termoregülasyonda önemli bir katılımcıdır, duyu organı olarak işlev görür, endokrin işlevleri yerine getirir (D vitamini sentezi, periferik dönüşümü). Aynı zamanda üremede önemlidir (ikincil cinsel özellikler, feromon üretimi) ve türün devamlılığını yerine getirir.

Deri, yoğun yüzeyi ve kornea tabakası nedeniyle vücudun en büyük organı ve dış çevreye karşı ilk temas hattıdır [77,78]. Bu nedenle yaralanmalarda hasarı ilk deri alır. Vücutta bir yara meydana geldiğinde derinin bütünlüğü bozulur ve vücudu mikroorganizmalara açık hale getirir. Enfekte yara, vücut homeostazını bozar ve çeşitli sorunlara neden olur [81]. Kronik ve akut yaralar dünya çapında birçok insanın hayatını etkiler. İyileşme süreci hem yaşam kalitesini düşürebilir hem de maliyetli olabilir. Maliyet açısından dünya genelinde kanser hastalığı kadar harcama yapılmaktadır. Ayrıca satılan birçok ürünün birbirine eşdeğer olduğu ve etkilerinin yetersiz kaldığı görülmektedir. Satılan ilaçların çoğu yara iyileştirme amaçlı olmasına rağmen yan ürün istenerek kombine tedavi yapılmaktadır.

Yaralı derinin iyileşmesi, vücudun iç organlarını dış patojenik ajanların girişinden korumak için esastır. Yara iyileşmesi, çeşitli büyüme faktörleri ve hormonların salgılanmasıyla birlikte çok sayıda hücre tipinin göçü ve çoğalması dahil olmak üzere iyileşme sürecinin biyolojik ve fizyolojik aşamalarını içerir [77,79]. Yaraların enfeksiyondan korunması ve iyileşme sürecinin hızlandırılması için yara örtüleri kullanılmaktadır [80]. Yarayı enfeksiyondan korumak, yara iyileşmesinde önemli bir husustur. Bir yara örtüsünün antimikrobiyal aktivitesi, yara bölgesinde bakteri üremesini azaltmasından dolayı bir avantaj sağlamaktadır. Yaralanma durumunda ise çeşitli fazlar ile yara iyileştirme süreci başlar. Yara iyileşmesinde çeşitli doğal bileşikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada da doğal bir bileşik olan allantoinin yara iyileştirici etkileri değerlendirilmiştir.

Yanık ve yara bakımında, Allantoinin yara bölgesine olan faydası kanıtlanmıştır. Allantoin pürin katabolizması içinde ürik asit oksidasyonu sonucu oluşan bir üründür [55]. Literatürde

allantoin (5-ureidohydantoin) yara iyileştirici [54,56,57], antiirritan, nemlendirici ve nekrotik doku giderici [59], hücre mitozunu arttırıcı, analjezi ve keratolitik efekt gibi birçok etkiye sahiptir. Tüm bu etkilerden dolayı allantoin, özellikle yara iyileştirme olmak üzere 70 yılı aşkın süredir kozmetik ve ilaç endüstrisinde yer almaktadır.

Bu çalışmada allantoinin hücre canlılığına etkisi MTT (Metiltiyazolildifenil-tetrazolyum bromür) testi ile ölçülmüştür. Bu testte hücrelerin metabolik aktiviteleri ve hücre canlılığı MTT adı verilen bir bileşiğin hücre içindeki enzimler tarafından indirgenmesiyle ölçülür. Hücre canlılığını yansıtan MTT'nin indirgenmesi sonucunda mor renkli bir formazan üretilir. Bu da canlı hücre sayısını belirlemeyi sağlar. MTT testi sonuçlarına göre allantoinin hücre canlılığını arttırıcı etkisi görülmüştür. 24 saat boyunca 200 µM allantoin dozunun hücre canlılığını anlamlı oranda arttırdığı görülmüştür. Bu yüzden 200 µM allantoin dozu seçilmiştir. En düşük allantoin dozu olan 50 µM allantoin de seçilerek karşılaştırma yapılması amaçlanmıştır. VL Savić ve arkadaşları saf allantoinin, her iki hücre hattının hücre canlılığı üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını araştırmışlardır. Yapılan çoğalma (MTT) deneyinde PA (saf allantoin), her iki hücre hattının hücre büyümesi üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda (40 µg/ml ve 100 µg/ml) hafif inhibe edici etki göstermiştir ve MDCK (Hücre canlılığı ve epitel proliferasyonu) hücre hattı üzerinde daha belirgin bir etki göstermiştir. Karakafes kökünün sulu özü, MDCK hücreleri üzerinde etki göstermezken, L929 (fibroblastik) hücrelerinin yaşayabilirliği üzerinde istatistiksel anlamlılık olmaksızın hafif uyarıcı etki göstermiştir. Çoğalma deneyinde AEGR(karakafes otunun sulu özü), 40 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda L929 fibroblastlarının çoğalmasını istatistiksel olarak önemli ölçüde uyarmıştır ve MDCK hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmiştir. [82].

Yara kapanma testi, hücre migrasyonu üzerinde etkili olan çeşitli faktörleri ve potansiyel ilaçlarının etkilerini araştırmak için kullanılır. Yara oluşturulduktan sonra, hücrelerin migrasyon süreci izlenir. Belirli bir süre boyunca hücrelerin yara bölgesine doğru göç etmesi ve boşluğu kapatması beklenir. Bu çalışmada 200 µM allantoin uygulanan gruptaki yara kapanma oranında kontrol ve 50 µM allantoin uygulanan gruba göre anlamlı oranda artış olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre 200 µM allantoinin yara kapanma üzerindeki etkisi oldukça yüksektir. Bu çalışma ilişkili diğer çalışmalar ile tutarlı sonuçlara sahiptir. JG Kim ve arkadaşları trakelositin keratinosit proliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için, HaCaT hücrelerini tedavi etmek için çeşitli konsantrasyonlarda trakelosid kullanılmıştır. Trakelosid, pozitif kontrol olarak kontrol veya allantoin ile karşılaştırıldığında doza bağlı bir şekilde HaCaT hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Trachelosid, 24 saatlik

tedaviden sonra 1, 5 ve 10 ug/ml'de hücre çoğalma oranını sırasıyla %13.98, %18.82 ve %17.94 artırmıştır. Bu bulgular sonucunda kontrole göre sırasıyla %38.14, %106.13 ve %72.83 oranında iyileşme aktivitesinde artış gözlemlemişlerdir. [83].

Annexin V/PI analizi, hücre apoptozunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Annexin V, hücrelerin dış zarında bulunan ve apoptotik hücrelerin yüzeyinde giderek artan bir proteindir. Bu çalışmada 24 saat boyunca 200 µM allantoin uygulanan HaCat hücre hattının apoptoz oranını belirlemek için Annexin V / PI testi uygulanmış ve hücrelerin apoptoza uğramadığı görülmüştür. Bu sonuçlar diğer allantoin dozlarıyla denenmiş Annexin V / PI testlerinin sonuçları ile tutarlıdır. M Amitani ve arkadaşları, Annexin V/PI analizinde allantoin, hücre popülasyonunun apoptotik hücre yüzdesini %32.7'ye düşürdüğünü göstermişlerdir[84].

Hücre döngüsü analizi, hücrelerin hangi evrede olduğunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 fazı hücre büyümesinin gerçekleştiği evredir. Bu fazda hücre, proteinlerin ve organellerin sentezini yapar. G1 fazı, hücre döngüsünün en uzun süren evresidir S fazında DNA replikasyonu gerçekleşir. Hücre, DNA'nın tam bir kopyasını oluşturur ve kromozomlarının sayısı iki katına çıkar. G2 fazı hücrenin bölünmeye hazırlandığı son evredir. Hücre büyümesi devam eder, proteinsentezlenir. Hücre, mitoz fazına hazırlık yapar. M fazı ise hücre bölünmesinin gerçekleştiği evredir. Bu çalışmada 200 µM allantoin uygulanan hücrelerde S ve G2/M fazlarında artış olduğunun görülmesi hücre canlılığı ve yara kapanması deneylerini doğrular niteliktedir. Bu sonuçlar ilintili çalışmalar ile tutarlıdır. GS Paz ve arkadaşları sispaltin etkinliğinin allantoin tarafından azaltılmasını incelemek için yaptıkları çalışmada; allantoin, alt G1 hücrelerinin yüzdesini azaltmıştır ve hücre döngüsünün G1 ve G2 fazlarındaki hücre popülasyonunu, ek olarak 33 µM sispaltin ile işleme tabi tutularak artırmıştır. 16.5 µM sispaltin ile kombine tedaviyi takiben G2 fazında hücre döngüsünün durdurulmasını indükleyerek, allantoinin CML hücre hattında sispaltinin etkinliğini azalttığını göstermişlerdir[85].

DiOC6 boyası, hücrelerin mitokondriyal zar potansiyelini (MMP) ölçmek için kullanılan bir floresan boya türüdür. DiOC6, hücre içine girdiğinde mitokondriyal zar potansiyelinebağlı olarak floresan yayma özelliği gösterir. Bu nedenle, DiOC6 testi, mitokondriyal fonksiyonların değerlendirilmesi ve hücrelerdeki mitokondriyal zar potansiyelindeki değişikliklerin belirlenmesi için kullanılır. Bu çalışmada, HaCaT hücre hattına 200 µM allantoin uygulanan grubun floresan yoğunluğunda gözle görülür bir artış saptanmıştır.

qPCR analizi, moleküler düzeyde gen ekspresyonunu tespit etmeyi sağlar. 200 µM Allantoin uygulanan HaCaT hücre hattında 24 saat sonundaki Akt, CollA ve Fibronektin gen ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği, Laminin de ise bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu çalışma diğer ilgili çalışmalar ile tutarlıdır. M. Nourimand ve CD Todd çalışmalarında, Cd'nin üreid metabolizması üzerindeki etkisi, stresin neden olduğu oksidatif hasarı hafifletmede üreidlerin, özellikle allantoinin rolü hakkında bilgi sağlamak için fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yaklaşımlar kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar, allantoinin, artan Cd konsantrasyonuna yanıt olarak vahşi tip Arabidopsis'te yüksek oranda biriken ana üreid bileşiği olduğunu göstermektedir. Moleküler sonuçlar, allantoin birikiminin UO'daki artıştan ve ALN gen ekspresyonundaki azalmadan kaynaklandığını göstermektedir[86].

Sonuç olarak allantoinin HaCaT hücre hattındaki yara iyileşme sürecine etkisi yüksektir. İlaç sektöründe kullanıma uygun, aynı zamanda yaralar için büyük ölçüde iyileşme sağladığından sağlık sektöründe daha fazla kullanılmalıdır.

KAYNAKÇALAR

1. Deniz, A. A. H., Abdik, E. A., Abdik, H., Aydın, S., Şahin, F., & Taşlı, P. N. (2020). Zooming in across the skin: A macro-to-molecular panorama. *Cell Biology and Translational Medicine*, Volume 8: Stem Cells in Regenerative Medicine, 157-200.
2. Nokoorani YD, Shamloo A, Bahadoran M, Moravvej H. Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering. *Sci Rep*. 2021 Aug 9;11(1):16164. doi: 10.1038/s41598-021-95763-4. PMID: 34373593; PMCID: PMC8352935.
3. The effect of exosomes isolated from human foreskin stem cells on wound healing , Derya Sağraç 2019 Yüksek Lisans Tezi
4. Kolarsick PA, Kolarsick MA, Goodwin C (2011) Anatomy and physiology of the skin. *J Derm Nurses Assoc* 3(4):203–213
5. Jablonski NG. The evolution of human skin pigmentation involved the interactions of genetic, environmental, and cultural variables. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021 Jul;34(4):707-729. doi: 10.1111/pcmr.12976. Epub 2021 May 4. PMID: 33825328; PMCID: PMC8359960.
6. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011 May;19(2):229-34. doi: 10.1016/j.fsc.2011.04.003. PMID: 21763983.
7. McCarthy ME, Brown TA, Bukowska J, Bunnell BA, Frazier T, Wu X, et al. Therapeutic applications for adipose-derived stem cells in wound healing and tissue engineering. *Current Stem Cell Reports*. 2018;4(2):127–37.
8. Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 308-319.

9. Yousef, H., Czupalla, C. J., Lee, D., Chen, M. B., Burke, A. N., Zera, K. A., ... & Wyss-Coray, T. (2019). Aged blood impairs hippocampal neural precursor activity and activates microglia via brain endothelial cell VCAM1. *Nature medicine*, 25(6), 988-1000.
10. Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. *Cell transplantation*, 27(5), 729-738.
11. Phillip, J. M., Aifuwa, I., Walston, J., & Wirtz, D. (2015). The mechanobiology of aging. *Annual review of biomedical engineering*, 17, 113-141.
12. Ripa, A. L., Kalabusheva, E. P., & Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of dermis: scarring and cells involved. *Cells*, 8(6), 607.
13. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019;112(108615):1–15.
14. Singh S, Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery*. 2017;35(9):473–7.
15. de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cellular and Molecular Immunology*. 2019;16(1):19–27.
16. Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. *Wound Healing Phases*. Treasure Island (FL)
17. Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thrombosis Research*. 2019;179(5):56–63.
18. Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2016;91(5):614–20.
19. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585–601.
20. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006;117(7):1–32.

21. Cytokines in Wound Healing: R&D Systems; [cited 2019 28 Oct]. Available from: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/cytokines-woundhealing#inflammation>
22. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736–43.
23. Derian CK, Eckardt AJ, Andrade-Gordon P. Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth and Differentiation*. 1997;8(7):743–9.
24. Shrivastav A, Mishra AK, Ali SS, Ahmad A, Abuzinadah MF, Khan NA. In vivo models for assesment of wound healing potential. *Wound Medicine*. 2018;20(12):43–53.
25. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American Journal of Surgery*. 1998;176(2):26–38.
26. Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of wound healing. *Current Dermatology Reports*. 2018;7(4):350–8.
27. Sclafani AP, Romo T, Ukrainsky G, McCormick SA, Litner J, Kevy S V., et al. Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. *Archives of Facial Plastic Surgery*. 2005;7(3):163–9.
28. Childs DR, Murthy AS. Overview of wound healing and management. *Surgical Clinics of North America*. 2017;97(1):189–207.
29. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 1997;77(3):509–28.
30. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*. 1999;79(4):1283–316.
31. Brown RL, Ormsby I, Doetschman TC, Greenhalgh DG. Wound healing in the 76 transforming growth factor- β 1—deficient mouse. *Wound Repair and Regeneration*. 1995;3(1):25–36
32. Lin Z-Q, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(6):713–21.

33. Yang X, Wang J, Guo SL, Fan KJ, Li J, Wang YL. MiR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing. *International Journal of Biological Sciences*. 2011;7(5):685–90.
34. Editors W. The Four Stages of Wound Healing. 2016 [cited 2019 20 Oct]. Available from: <https://www.woundsource.com/print/blog/four-stages-wound-healing>
35. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2011;19(3):441–53.
36. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314–21.
37. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1998;30(9):1019–30.
38. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care*. 2008;17(9):399–402.
39. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835–70.
40. Zhuang X, Deng Z-B, Mu J, Zhang L, Yan J, Miller D, et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(1):28713.
41. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37(5):1528–42.
42. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest*. 1999;79(12):1479–87
43. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958–69.
44. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med*. 2008;25(4):419–26.
45. Margolis DJ, Gross EA, Wood CR, Lazarus GS. Planimetric rate of healing in venous ulcers of the leg treated with pressure bandage and hydrocolloid dressing. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28(3):418–21

46. Robson MC, Hill DP, Woodske ME, Steed DL. Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. *Arch Surg.* 2000;135(7):773– 7.
47. Tao S-C, Guo S-C, Li M, Ke Q-F, Guo Y-P, Zhang C-Q. Chitosan wound dressings incorporating exosomes derived from MicroRNA-126- overexpressing synovium mesenchymal stem cells provide sustained release of exosomes and heal full-thickness skin defects in a diabetic rat model. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(3):736–47.
48. Inoue M, Kratz G, Haegerstrand A, Ståhle-Bäckdahl M. Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization. *J Invest Dermatol.* 1995;104(4):479–83
49. Brissett AE, Hom DB. The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;11(4):245–50.
50. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009;17(2):153–62.
51. Burrello J, Monticone S, Gai C, Gomez Y, Kholia S, Camussi G. Stem cell-derived extracellular vesicles and immune-modulation. *Front Cell Dev Biol.* 2016;(4):83.
52. Otero-Viñas M, Falanga V. Mesenchymal stem cells in chronic wounds: The spectrum from basic to advanced therapy. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(4):149–63.
53. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther.* 2015;23(5):812–23.
54. Güler, D. R. A. Vestiboloplastilerde Liyofilize Amniyotik Membranın Graft Materyali Olarak Kullanılabilirliğinin Klinik ve Deneysel Olarak İncelenmesi.
55. Araújo, L. U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V. C. F., Carneiro, C. M., & Silva-Barcellos, N. M. (2010). Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cirurgica Brasileira*, 25, 460-461.
56. Peruzzi, L., Garbari, F., & Bottega, S. (2001). *Symphytum tanaicense* (Boraginaceae) new for the Italian flora. *Willdenowia*, 33-41.
57. Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. (1972). *Flora Europaea*. Article. 3, 237--237

58. Tarıkahya, B. (2010). The Revision of Turkish *Symphytum* L. (Boraginaceae) Genus. PhD tez, Hacettepe University, Ankara, Turkey.
59. Hacıoğlu, B.T., Erik, S. (2011). Phylogeny of *Symphytum* L. (Boraginaceae) with special emphasis on Turkish species. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 15483–15493.
60. Teynor, T.M., Putnam, D.H., Doll, J.D., Kelling, K.A., Oelke, E.A., Undersander, D.J., Oplinger, E.S. (1992). *Comfrey - Alternative Field Crops Manual*. Minnesota Extension Service. 692
61. Kucera, M., Kálal, J., Polesna, Z. (2000). Effects of *Symphytum* ointment on muscular symptoms and functional locomotor disturbances. *Adv. Ther.* 17, 204–211.
62. Schmid, K., Ivemeyer, S., Vogl, C., Klarer, F., Meier, B., Hamburger, M., Walkenhorst, M. (2012). Traditional use of herbal remedies in livestock by farmers in 3 Swiss cantons (Aargau, Zurich, Schaffhausen). *Forschende Komplementarmed.* 19, 125–36.
63. Frost, R., MacPherson, H., O'Meara, S.M. (2013). A critical scoping review of external uses of comfrey (*Symphytum* spp.). *Complementary Ther. Med.* 21, 724–745.
64. Alkan, F.U., Anlas, C., Ustuner, O., Bakırel, T., Sari, A.B. (2014). Antioxidant and proliferative effects of aqueous and ethanolic extracts of *Symphytum officinale* on 3T3 Swiss albino mouse fibroblast cell line. *Asian. J. Plant. Sci. Res.* 4, 62–68.
65. Staiger, C. (2013). *Comfrey root: from tradition to modern clinical trials*. Wien. *Med. Wochenschr.* 163, 58–64.
66. Riet-Correa, F., Medeiros, R., Tokarnia, C., Dobereiner, J. (2007). Toxic plants for livestock in Brazil: Economic impact, toxic species, control measures and public health implications. In *Poisonous Plants: Global Research and Solutions*, 2–14.
67. Dresler, S., Szymczak, G., Wojcik, M. (2017). Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae family. *Pharm. Biol.* 55, 691–695.

68. Neagu, E., Paun, G., Radu, L.G. (2011). Phytochemical study of some *Symphytum officinalis* extracts concentrated by membranous procedures. *Sci. Bull. -Univ. Politeh.* 73, 3- 7
69. Savic, V.L., Nikolic, V.D., Arsic, I.A., Stanojevic, L.P., Najman, S.J., Stojanovic, S., Mladenovic-Ranisavljevic, I. (2015). Comparative study of the biological activity of allantoin and aqueous extract of the comfrey root. *Phytother. Res.* 29, 1117–1122.
70. Becker, L.C., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Klaassen, C.D., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A. (2010). Final report of the safety assessment of allantoin and its related complexes. *Int. J. Toxicol.* 29, 84–97.
71. MacKay, D., Miller, A.L. (2003). Nutritional support for wound healing. *Altern. Med. Rev.* 8, 359–377.
72. Neagu, E., Paun, G., Radu, G. (2010). Antioxidant capacity of some *Symphytum officinalis* extracts processed by ultrafiltration. *Rom. Biotechnol. Lett.* 15, 5505–5511.
73. Çakmen, A. B. (2019). Allantoin içeren antibakteriyel özellikte oliüretan/polikaprolakton temelli yara örtü malzemelerinin elektrospraying yöntemi ile hazırlanması ve uygulanması (Master's thesis, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
74. Tzeng, C. Y., Lee, W. S., Liu, K. F., Tsou, H. K., Chen, C. J., Peng, W. H., & Tsai, J. C. (2022). Allantoin ameliorates amyloid β -peptide-induced memory impairment by regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113389.
75. Rotondo, JC; Bononi, I.; Puozzo, A.; Govoni, M.; Foschi, V.; Lanza, G.; Gafà, R; Gaboriaud, P.; Touzé, FA.; Selvatici, R.; Martini, F; Tognon, M. (2017). "Merkel Cell Carcinomas Arising in Autoimmune Disease Affected Patients Treated with Biologic Drugs, Including Anti-TNF". *Clin Cancer Res.* 23 (14). ss. 3929-3934. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2899.PMID 28174236.
76. Munde, Prashant (17 Ocak 2014). "Pathophysiology of merkel cell". *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.* 17 (3). ss. 408-412. doi:10.4103/0973-029x.125208. PMC 3927344 \$2. PMID 24574661.

77. Shamloo A., Sarmadi M., Aghababaie Z., Vossoughi M. Accelerated full-thickness wound healing via sustained bFGF delivery based on a PVA/chitosan/gelatin hydrogel incorporating PCL microspheres. *Int. J. Pharm.* 2018;537:278. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.12.045.
78. Fan L., Yang H., Yang J., Peng M., Hu J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydr. Polym.* 2016;146:427
79. Zahedi P., Rezaeian I., Ranaei-Siadat S.O., Jafari S.H., Supaphol P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym. Adv. Technol.* 2010;21:77.
80. Kamoun E.A., Chen X., Eldin M.S.M., Kenawy E.-R.S. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arab. J. Chem.* 2015;8:1. doi: 10.1016/j.arabjc.2014.07.005.
81. The Secretory Granular Cell: The Outermost Granular Cell as a Specialized Secretory Cell
82. Savić, V. L., Nikolić, V. D., Arsić, I. A., Stanojević, L. P., Najman, S. J., Stojanović, S., & Mladenović-Ranisavljević, I. I. (2015). Comparative study of the biological activity of allantoin and aqueous extract of the comfrey root. *Phytotherapy Research*, 29(8), 1117-1122.
83. Kim, J., Shin, Y. K., & Kim, K. Y. (2018). Promotion of keratinocyte proliferation by tracheloside through ERK1/2 stimulation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
84. Amitani, M., Cheng, K. C., Asakawa, A., Amitani, H., Kairupan, T. S., Sameshima, N., ... & Inui, A. (2015). Allantoin ameliorates chemically-induced pancreatic β -cell damage through activation of the imidazoline I3 receptors. *PeerJ*, 3, e1105.
85. Paz, G. S., De Amorim, G. C., & Fernandes, J. (2021). Metformin restores cisplatin cytotoxicity reduced by allantoin in CML in vitro. *World Academy of Sciences Journal*, 3(5), 1-10.
86. Nourimand, M., & Todd, C. D. (2016). Allantoin increases cadmium tolerance in *Arabidopsis* via activation of antioxidant mechanisms. *Plant and Cell Physiology*, 57(12), 2485-2496.