



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**ARI SÜTÜ VE ROSMARİNİK ASİTİN YARA İYİLEŞTİRME
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yunus AKSÜT

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA**

Ocak, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 20.12.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL
Koç Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Betül KARADEMİR YILMAZ
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2020-35357 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, YÖK 100/2000 projesi ile Doktora Bursu Doğal ve Bitkisel ürünler/ Kozmetik ürünler kapsamında desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Akademik eğitimim süresince bana her konuda yardımcı olan, her zaman beni dinleyip fikirlerime değer veren, tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, doktora çalışmalarım boyunca her türlü imkânı sağlayan, güler yüzlü ve anlayışlı olmasıyla örnek aldığım ve bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim çok sevgili danışmanım **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Tezim sırasında tecrübe ve bilgilerinden faydalandığım, tez izleme komitemin değerli üyeleri **Prof. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR**'a ve **Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL**'e teşekkürlerimi sunarım.

Lisans döneminden bu yana kendisi ile bilimsel konularla birlikte hayata dair tüm konularda yaptığımız sohbetlerden büyük bir keyif aldığım sevgili hocam **Doç. Dr. Murat PEKMEZ**'e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın dönüm noktası olan, güzel sesi ile her daim bana enerji veren, bu akademik yoldaki zorlukları beraber aştığımız yol arkadaşına; her düştüğümde beni kaldıran meleğime; beni asla yarı yolda bırakmayan, beni benden iyi tanıyan, karanlıkta yol gösteren ay ışığıma; yedi yirmi dört her şeyi konuşabileceğim hayat arkadaşına; benimle beraber bu bilim yolunda ilerleyen sevgili meslektaşım **Dr. Aslıhan ŞENGEL**'e sonsuza kadar teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca manevi desteğiyle her an yanımda olan, çok değerli dostum **Araş. Gör. Dr. Burcu ARIKAN**'a ve laboratuvar çalışmalarımda her zaman içtenlikle yardımcı olan proteomik ailesinin sevgili üyelerinden **İrem ÖGÜTCÜ** ve **Ceren GENÇEL**'e destekleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak tüm hayatım boyunca ve eğitimimin her aşamasında daima arkamda olan, bana her konuda maddi-manevi her türlü desteği sağlayan sevgili annem **Emine AKSÜT**'e, babam **Veynel AKSÜT**'e, kardeşlerim **Yusuf AKSÜT**, **Ramazan AKSÜT** ve **Mehmet Sinan AKSÜT**'e sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

*Miskin Yunus söyler sözün
Yaş doldurmuş iki gözün
Bizi bilmeyen ne bilsin
Bilenlere selam olsun*

(Yunus Emre, 13/14. yy)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. DERİ	6
2.1.1. Epidermis.....	6
2.1.2. Dermis.....	7
2.1.3. Hipodermis	7
2.2. YARA ve YARA İYİLEŞME SÜRECİ	7
2.2.1. Yara İyileşmesinin Basamakları	8
2.3. YARA İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER	12
2.3.1. UVB Hasarı	13
2.3.2. Hiperglisemi	15
2.4. ROSMARİNİK ASİT	18
2.4.1. Rosmarinik Asitin Yara İyileşmesindeki Rolü	19
2.5. ARI SÜTÜ	20
2.5.1. Arı Sütünün Yara İyileşmesindeki Rolü	21
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	24
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	24
3.1.1. Hücre Hatları ve Besiyerleri	24
3.1.2. Hücrelerin Büyüme Kinetiğinin Analizi.....	24
3.1.3. Altıkültürleme ve Hücre Stoklama İşlemleri	25
3.2. HÜCRE CANLILIK TESTİ	26
3.3. <i>In vitro</i> yara modellerinin oluşturulması	27
3.3.1. <i>In vitro</i> Çizik Deneyi	27

3.3.2. UVB Uygulaması.....	27
3.3.3. Yüksek Glukoz Uygulaması	28
3.4. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜ UYGULAMALARI	29
3.4.1. Rosmarinik asit ve Arı Sütünün Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	29
3.4.2. Rosmarinik asit ve Arı Sütünün Kombine Dozlarının Belirlenmesi	29
3.5. ANJİYOGENİK ETKİ ANALİZİ	31
3.6. HÜCRE İÇİ ROS ANALİZİ	31
3.6.1. Spektrofluorometrik Yöntem.....	31
3.6.2. Floresan Mikroskop Analizi	32
3.7. HOECHST ve PROPİDYUM İYODÜR (HO/PI) BOYAMAYLA APOPTOZ ANALİZİ.....	32
3.8. İMMÜNOFLORESAN İŞARETLEME.....	33
3.9. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ.....	34
3.9.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini	34
3.9.2. cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	35
3.9.3. qRT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizi	35
3.10. PROTEİN ANLATIMI ANALİZLERİ.....	37
3.10.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	37
3.10.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	38
3.10.3. Elektrotransfer ve Western Blotlama.....	39
3.11. PROTEİN KARBONİLLERİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	42
3.11.1. Spektrofotometrik Yöntem	42
3.11.2. OxyBlot Protein Oksidasyon Tespiti	42
3.12. LİPİT PEROKSİDASYONU	43
3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. HFF ve HACAT HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ	44
4.2. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN UYGULAMA DOZLARININ BELİRLENMESİ.....	44
4.2.1. Rosmarinik Asit ve Arı Sütünün Sitotoksik/Proliferatif Etkileri.....	45
4.2.2. Rosmarinik Asit ve Arı Sütünün Kombine Dozlarının Seçimi	48
4.3. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN ANJİYOGENİK ÖZELLİKLERİ.....	50
4.4. UVB UYGULAMASI ve OPTİMİZASYONU	50
4.5. YÜKSEK GLUKOZ UYGULAMASI ve OPTİMİZASYONU	53

4.6. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN UVB UYGULANMIŞ HÜCRELERDE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ.....	55
4.6.1. Hücre Proliferasyonu ve Yara Kapanmasına Etkileri.....	55
4.6.2. İntraselüler ROS Seviyelerine ve İnflamasyona Etkileri.....	57
4.6.3. Protein Karbonilleri ve AGE Miktarına Etkileri	58
4.6.4. Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri.....	59
4.6.5. Apoptoz Üzerine Etkileri.....	60
4.6.6. ER Stresi Üzerine Etkileri	62
4.6.7. Hücre Sinyal Yollarında Görevli Moleküller Üzerine Etkileri.....	63
4.6.8. Kök Hücre ve EMT Marker Proteinleri Üzerine Etkileri	65
4.7. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN YÜKSEK GLUKOZ UYGULANMIŞ HÜCRELERDE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ.....	67
4.7.1. Hücre Proliferasyonu ve Yara Kapanmasına Etkileri.....	67
4.7.2. İntraselüler ROS Seviyelerine ve İnflamasyona Etkileri.....	69
4.7.3. Protein Karbonilleri ve AGE Miktarına Etkileri	71
4.7.4. Lipid Peroksidasyonu Üzerinde Etkileri.....	72
4.7.5. Apoptoz Üzerine Etkileri.....	73
4.7.6. ER Stresi Üzerine Etkileri	75
4.7.7. Hücre Sinyal Yollarında Görevli Moleküller Üzerine Etkileri.....	75
4.7.8. Kök Hücre ve EMT Marker Proteinleri Üzerine Etkileri	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
KAYNAKLAR.....	89
EKLER	102
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Cildin epidermis, dermis ve hipodermis tabakaları (Yousef ve diğ., 2022).	6
Şekil 2.2: Yara iyileşmesinin basamakları (Wilkinson ve Hardman, 2020).	12
Şekil 2.3: UVB ışınlarının deride hasara yol açan ROS-aracılı etkileri (Cavinato ve diğ., 2017).	15
Şekil 2.4: Deriyi etkileyen hiperglisemi ile ilişkili komplikasyonun bir özeti (de Jesus ve Ramakrishnan, 2015).	17
Şekil 2.5: Rosmarinik asitin yapısı (Hitl ve diğ., 2021).	18
Şekil 2.6: Rosmarinik asit ve potansiyel biyolojik aktiviteleri (Nadeem ve diğ., 2019).	18
Şekil 2.7: Arı sütünün içeriğindeki temel biyolojik maddeler ve biyolojik aktiviteleri (Ahmad ve diğ., 2020).	21
Şekil 3.1: UVB uygulamasının yapıldığı dolap ve UVB lambası.	28
Şekil 3.2: Çalışma kapsamında oluşturulan UVB ve yüksek glukoz gruplarına rosmarinik asit (RA) ve/veya arı sütü (RJ) maddelerinin uygulanış zamanları.	30
Şekil 4.1: Başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 hücre/mL ve 1×10^5 hücre/mL olan (A) insan fibroblast HFF hücre hattı ve (B) insan keratinosit HaCaT hücre hattının çoğalma eğrileri.	44
Şekil 4.2: Rosmarinik asitin 1-1000 μ M aralığındaki konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik ve proliferatif etkilerini gösteren MTT analizi sonuçları. (A) HFF insan fibroblast hücre hattında ve (B) HaCaT insan keratinosit hücre hattında yapılan uygulamalar. (*kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).	46
Şekil 4.3: Arı sütünün 1-500 μ g/mL aralığındaki konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik ve proliferatif etkilerini gösteren MTT analizi sonuçları. (A) HFF insan fibroblast hücre hattında ve (B) HaCaT insan keratinosit hücre hattında yapılan uygulamalar. (*kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).	47
Şekil 4.4: Yara iyileştirme deneylerinde rosmarinik asit (RA) ve arı sütünün (RJ) kombinasyon dozunun seçimi. (A) RA ve RJ'nin farklı dozlarının kombine uygulamalarının MTT sonuçları (ortalama $\pm$ SD) ve 10 μ M RA ile 100 μ g/mL RJ konsantrasyonunun tek ve kombine uygulamalarının hücre canlılığına etkisi. (B) RA ve RJ uygulamalarının çizik alanının kapanması üzerine etkileri. (C) Çizik ile yara oluşturma sonrası RA ve RJ uygulamalarının p-ERK, p-AKT, NF- κ B p65	

proteinlerinin anlatımına etkileri (*Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK2*). (ns – “not significant”, $P>0.05$. *kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ### $P<0.001$).49

Şekil 4.5: Rosmarinik asit (RA) ve arı sütünün (RJ) endotel tüm oluşumu üzerine etkisi, HUVEC insan umbilikal ven endotel hücrelerinde gerçekleştirilen in vitro endotel tüp oluşumu deneyi sonuçları. (*Kontrolle göre, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; ### $P<0.001$).50

Şekil 4.6: HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanacak UVB dozunun optimizasyonu. Farklı dozlarda (50, 100, 200 ve 300 mJ/cm²) UVB maruziyetinin (A) hücre canlılığı, (B) oksidatif stres (intraselüler ROS seviyesi, spektrofotometrik olarak DCF floresan ışıması ölçüm sonucu), (C) proliferasyon marker proteini Ki67 seviyeleri (Western blot analizi) ve (D) apoptoz indüksiyonu (Western blot analizi) üzerindeki etkileri. *kontrolle göre kıyaslamayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Cas: kaspaz.52

Şekil 4.7: HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde hiperglisemi-benzeri koşulları yaratmak için uygulanacak glukoz dozunun optimizasyonu. Yüksek (25, 50, 100 ve 200 mM) glukoz maruziyetinin (A) hücre canlılığı, (B) AGE miktarı, (C) oksidatif stres (intraselüler ROS seviyesi, spektrofotometrik olarak DCF floresan ışıması ölçüm sonucu) ve (D) apoptoz indüksiyonu (Western blot analizi, *kantifikasyon değerleri için bkz. EK3*) üzerindeki etkileri. AGE: “advanced glycation end products” Cas: kaspaz.54

Şekil 4.8: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ’nin (A) hücre canlılığına (MTT testi), (B) proliferasyon markeri Ki67’nin hücresel lokalizasyonuna ve seviyesine (immünofloresan işaretleme) ve (C) yara alanı kapanmasına etkisi (*Kontrolle (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; & $P<0.01$, && $P<0.05$, &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).56

Şekil 4.9: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ’nin (A) intraselüler ROS seviyelerine (spektrofotometrik ve floresan mikroskopik olarak analizlenen DCF floresan ışıması sonucu) ve (B-C) oksidatif stres ve inflamasyon belirteçlerine etkisi (sırasıyla, western blot ve qRT-PCR analizi; *Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK4*). *Kontrolle (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir * $P<0.05$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).57

Şekil 4.10: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ’nin (A) protein karbonil hasarına (*Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK5*) ve (B) AGE miktarına etkisi (spektrofotometrik ölçüm sonucu). (*Kontrolle (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).59

- Şekil 4.11:** UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin lipid peroksidasyonuna etkisi. (A) Western blot yöntemi ile malondialdehit (MDA) bakiyeli protein tespiti (*kantifikasyon değerleri için bkz. EK6*). (B) Spektrofotometrik ölçüm ile belirlenen TBARS miktarlarının (µM MDA eşdeğeri/mg protein) bağlı değerlendirilmesi. Kontrole (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ***P<0.001; &&&P<0.001; ##P<0.01, ###P<0.001).60
- Şekil 4.12:** UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin apoptoza etkisi. (A) Apoptozun HO/PI floresan boyaması ile analizi, (B) Apoptozun western blot ile analizi (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. **P<0.01, ***P<0.001; &&P<0.01, &&&P<0.001; ##P<0.01, ###P<0.001). Cas: Kaspaz.61
- Şekil 4.13:** UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin ER stresine etkisi (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. **P<0.01, ***P<0.001; &&&P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001).62
- Şekil 4.14:** UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) büyüme faktörleri (B) hücre içi sinyal yolları ve (C) NF-κB nükleer lokasyonu üzerine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; &&&P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001).64
- Şekil 4.15:** UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin matriks metalloproteinaz (MMP) -2 ve -9 ile kolajen I (Col I) anlatımı üzerine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; &&&P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001).65
- Şekil 4.16:** UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) üzerine etkileri. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; &&P<0.01, &&&P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001).66
- Şekil 4.17:** UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin kök hücre belirteçlerinin anlatımına etkileri. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; &P<0.05, &&P<0.01, &&&P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001).67
- Şekil 4.18:** Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) hücre

canlılığına (MTT testi), (B) proliferasyon markeri Ki67'nin hücrel lokalizasyonuna ve seviyesine (immünofloresan işaretleme) ve (C) yara alanı kapanmasına etkisi (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).68

Şekil 4.19: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) intraselüler ROS seviyelerine (spektroflorometrik ve floresan mikroskopik olarak analizlenen DCF floresan ışıması sonucu) ve (B ve C) oksidatif stres ve inflamasyon belirteci seviyelerine etkisi (Western blot ve qRT-PCR analizi; *Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK7*). *Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir * $P<0.05$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).70

Şekil 4.20: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) protein karbonil (*Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK8*) ve (B) AGE miktarına etkisi (spektrofotometrik ölçüm sonucu). (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).72

Şekil 4.21: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin lipid peroksidasyon hasarına etkisi (A) Western blot yöntemi ile malondialdehit (MDA) bakiyeli protein tespiti (*kantifikasyon değerleri için bkz. EK9*). (B) Spektrofotometrik ölçüm ile belirlenen TBARS miktarlarının (μM MDA eşdeğeri/mg protein) bağıl değerlendirilmesi. Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).73

Şekil 4.22: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin apoptoza etkisi. (A) Apoptozun HO/PI floresan boyaması ile analizi, (B) Apoptozun western blot ile analizi (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$). *Cas: Kaspaz.*74

Şekil 4.23: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin ER stresine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).75

Şekil 4.24: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) büyüme faktörleri (B) hücre içi sinyal yolları ve (C) NF- κ B nükleer lokasyonu üzerine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).77

- Şekil 4.25:** Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin matriks metalloproteinaz (MMP) -2 ve -9 ile kolajen I (Col I) anlatımı üzerine etkisi. (*Kontrolle (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).78
- Şekil 4.26:** Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) üzerine etkileri. (*Kontrolle (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).79
- Şekil 4.27:** Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin kök hücre belirteçleri üzerine etkileri. (*Kontrolle (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).80

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Rosmarinik asitin (RA) yara iyileştirme potansiyeli hakkında yapılan çalışmalar ve bulguları.	20
Tablo 2.2: Arı sütünün (RJ) yara iyileştirme potansiyeli hakkında yapılan çalışmalar ve bulguları.....	23
Tablo 3.1: İmmünofloresan işaretleme deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.....	34
Tablo 3.2: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri.	35
Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyonu koşulları.....	35
Tablo 3.4: qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	36
Tablo 3.5: qRT-PCR reaksiyon koşulları.	36
Tablo 3.6: qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerler.	37
Tablo 3.7: SDS-PAGE çözeltileri ve içerikleri.	39
Tablo 3.8: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler).....	39
Tablo 3.9: Elektrotansfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	40
Tablo 3.10: Western blotlamada kullanılan primer ve sekonder antikorlar.	41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
<	: Küçük
>	: Büyük
≤	: Küçük veya eşit
≥	: Büyük veya eşit
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
cm ²	: Santimetrekare
g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
°C	: Derece Santigrat
v	: Hacim (“Volume”)
V	: Volt
w	: Ağırlık (“Weight”)
α	: Alfa
β	: Beta
κ	: Kappa

Kısaltmalar	Açıklama
10-HDA	: “10-Hydroxy-2-Decenoic Acid”, 10-Hidroksi-2-Dekenoik Asit
4HNE	: 4-Hidroksinonenal
AGE	: “Advanced Glycation End Products”, İleri Glikasyon Son Ürünleri
AKT	: “Protein Kinase B, PKB”, Protein Kinaz B

Bcl-2	: “B-Cell Lymphoma 2”, B Hücreli Lenfoma 2
CAT	: “Catalase”, Katalaz
CD	: “Cluster of Differentiation”, Farklılaşma Kümesi
CHOP	: “C/EBP homologous protein”, C/EBP homolog proteini
COX-2	: “Cyclooxygenase-2”, Siklooksijenaz-2
DAMPs	: “Damage-Associated Molecular Patterns”, Hasarla İlişkili Moleküler Örüntüler
DCFH2-DA	: 2,7-Dikloroflorosein Diasetat
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
D-PBS	: “Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”, Dulbecco’nun Fosfat Tamponlu Salini
ECM	: “Extracellular Matrix”, Ekstrasülüler Matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGF	: “Epidermal Growth Factor”, Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	: “Epithelial-Mesenchymal Transition”), Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
eNOS	: “Endothelial Nitric Oxide Synthase”, Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK 1/2	: “Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase 1/2”, Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Protein Kinaz 1/2
FBS	: “Fetal Bovine Serum”, Fetal Sığır Serumu
FGF2	: “Fibroblast Growth Factor 2”, Fibroblast Büyüme Faktörü 2
GPX1	: Glutasyon Peroksidaz 1
HaCaT	: “Human, Adult, Low Calcium, High Temperature”, Yetişkin İnsan Derisinden Farklılaşmış Ölümsüz Bir Keratinosit Hücre Hattı
HFF	: “Human Foreskin Fibroblasts”, İnsan Sünnet Derisi Fibroblastları
HIF	: “Hypoxia-Inducible Factor”, hipoksi ile indüklenebilir faktör
HUVEC	: “Human Umbilical Vein Endothelial Cells”, İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri
IFN-γ	: “Interferon gamma”, Interferon Gama
IGF-1	: “Insulin-like Growth Factor”, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL	: “Interleukin”, İnterlökin
iNOS	: “Inducible Nitric Oxide Synthase”, İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KGF	: “Keratinocyte Growth Factor”, Keratinosit Büyüme Faktörü
LPS	: “Lipopolysaccharide”, Lipopolisakkarit
MAPK	: “Mitogen-Activated Protein Kinase”, Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MDA	: Malondialdehit

MMP	: “Matrix Metalloproteinase”, Matriks Metalloproteinaz
MRJP	: Major Royal Jelly Protein”), Majör Arı Sütü Proteini
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NEAA	: “Non-Essential Amino Acids”, Esansiyel Olmayan Amino Asitler
NF-κB	: “Nuclear Factor-Kappa B”, Nükleer Faktör-Kappa B
NUDT6	: “Nudix Hydrolase 6”, Nudix Hidrolaz 6
PAMPs	: “Pathogen-Associated Molecular Patterns”, Patojenle İlişkili Moleküler Örüntüler
PARP1	: “Poly (ADP-ribose) polymerase 1”, Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PDGF	: “Platelet-Derived Growth Factors”, Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE2	: Prostaglandin E2
PI3K	: “Phosphatidylinositol 3-Kinase”, Fosfatidilinositol 3-Kinaz
qRT-PCR	: “Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction”), Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RA	: Rosmarinik Asit
RAGE	: “Receptor for Advanced Glycation Endproducts”, AGE Reseptörü
RJ	: “Royal Jelly” Arı Sütü
ROS	: “Reactive Oxygen Species” Reaktif Oksijen Türleri
RTK	: Reseptör Tirozin Kinazlar
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TGF-α	: “Transforming Growth Factor-Alpha”, Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Alfa
TGF-β	: “Transforming Growth Factor-Beta”, Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TNF-α	: “Tumor Necrosis Factor-Alpha”, Tümör Nekroz Faktör-Alfa
UV	: Ultraviyole
VEGF	: “Vascular Endothelial Growth Factor” Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ARI SÜTÜ VE ROSMARİNİK ASİTİN YARA İYİLEŞTİRME POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Yunus AKSÜT

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Yara iyileşmesi, hasarlı/yaralı dokuların onarıldığı, oldukça karmaşık bir mekanizmaya sahip, dinamik ve çok aşamalı bir süreçtir. Bazı sistemik ve lokal faktörler yara iyileşmesinde gecikmelere veya bozulmalara yol açabilmektedir. Diyabet başta olmak üzere çeşitli hastalıklar ya da dışsal etmenler sebebiyle bozulmuş yara iyileşmesi süreci hastanın yaşam kalitesini düşürmekte, hatta amputasyon veya ölümle sonuçlanabilmektedir. Glukoz homeostazisinin düzenlenmesindeki hatalarla gelişen hiperglisemi (yüksek kan şekeri) yara iyileşmesi sürecini olumsuz etkileyen önemli sistemik faktörlerden biridir. Ultraviyole (UV) ışınları ise insan derisini etkileyen en önemli çevresel lokal faktörlerden biridir.

Farklı yara türlerinde iyileşme sürecini desteklemek için birçok araştırma yapılmış ve çeşitli ürünler geliştirilmiş olsa da, daha etkili yenilikçi ürünlere hâlâ ihtiyaç vardır. Doğal bileşikler geniş terapötik etkinlikleri ve hafif yan etkileriyle yara iyileşmesinde umut vericidir. Bitki özleri ya da bunların aktif bileşenlerinin yanı sıra bal arısı ürünleri de yara iyileştirme potansiyeli yüksek alternatiflerdir.

Bu tez çalışmasında, doğal bir bileşik olan rosmarinik asitin (RA), biyoaktif peptidlerce zengin bir bal arısı ürünü olan arı sütünün (RJ) ve bu maddeleri içeren yeni bir kombine ürünün (RA+RJ) yara iyileştirme potansiyelleri, UVB ışınlarına ve hiperglisemi-benzeri yüksek glukoz maruz bırakılan hücresel sistemlerde araştırıldı. Bu kapsamda çalışma, yara iyileşmesinin en önemli hücrelerinden fibroblastlar (HFF hücre hattı) ve keratinositler (HaCaT hücre hattı)

üzerinde yürütüldü. Maddelerin anjiyogenez üzerine etkisini belirlemek için insan umbilikal ven endotel hücre hattı (HUVEC) kullanıldı.

RA ve RJ'nin yara iyileştirici etkilerini incelemeyi önce, örneklerin deri hücreleri üzerindeki sitotoksik veya proliferatif etkileri MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi ile araştırıldı. Ardından en uygun kombine ürün bileşimini ve uygulama dozunu belirlemek için farklı kombinasyonlarla hücre canlılık testleri (MTT) yürütüldü. Örneklerin artan hücre göçü ile karakterize akut yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, çizik yara deneyi ile araştırıldı. Ayrıca, bu deneyden sonra toplanan hücrelerde proliferasyon göstergesi protein anlatımları Western blot yöntemiyle analiz edildi. İleri deneyler için en uygun konsantrasyonların RA için 10 µM ve RJ için 100 µg/mL olduğu belirlendi ve bu maddeler tek tek ve kombine halde UVB- ve yüksek glukoz-hasarlı hücrelere uygulandı. Örneklerin yara iyileştirme potansiyelleri canlılık testi ve çizik yara deneyi gibi hücresel yöntemlerle ve qRT-PCR, Western blotlama, immünoloresan işaretleme, spektrofotometri, spektrofotometri gibi moleküler analizlerle değerlendirildi. UVB ve yüksek glukoz uygulamaları için yürütülen doz ve zaman optimizasyonu çalışmalarında hücre canlılık testlerinin yanı sıra, hücre içi artan oksidasyon ve apoptoz bulguları dikkate alındı ve hücrelere UVB hasarı için 100 mJ/cm² UVB uygulanmasına, hiperglisemi-benzeri koşul içinse 50 mM glukoz uygulanmasına karar verildi. RA, RJ ve RA+RJ'nin UVB ve yüksek glukozla bağlı hasarları ortadan kaldırma kapasitesi, hücrelerin proliferasyon ve migrasyon yeteneğinin yanı sıra, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, protein hasarları, lipit peroksidasyonu, inflamasyon, apoptoz, hücre sinyalleşmesi, ER stresi, kök hücre farklılaşması gibi anahtar metabolik süreçler üzerinden değerlendirildi. Ek olarak, uygulamaların anjiyogenik potansiyeli *in vitro* endotel tüp oluşumu deneyi ile analiz edildi.

Deneysel verilere göre, UVB ve yüksek glukoz uygulamaları, HFF ve HaCaT hücrelerinde oksidatif stresi, inflamasyonu ve hücre ölümünü artırdı. Üç örneğin (RA, RJ ve RA+RJ) de UVB ve yüksek glukoz uygulamalarından sonra azalan proliferasyon ve migrasyonu artırdığı; artan oksidatif hasarı, inflamasyonu ve apoptozu düşürdüğü belirlendi. En etkin test materyalinin 10 µM RA ve 100 µg/mL RJ içeren kombine ürün olduğu belirlendi.

Test edilen tüm maddeler, büyüme faktörlerinden FGF2 ve VEGFA ile proliferasyon göstergesi Ki67'nin anlatımlarını arttırdı. Ayrıca AKT fosforilasyonunu ve NF-κB anlatımını azaltırken ERK1/2 fosforilasyonunun artmasına da yol açtılar. UVB ve yüksek glukoz maruziyetine bağlı olarak artan ROS üretimi, oksidatif protein hasarları ve lipit peroksidasyonunun, doğal maddelerle işlem sonrasında önemli ölçüde azaldığı tespit edildi. Doğal madde uygulamaları sonucu azalan inflamasyon, IL-1β, IL-6 ve TNF-α mRNA düzeylerindeki düşüş ve IL-10 mRNA düzeyindeki artış ile gösterildi. İnflamasyondaki düşüşün, aşağı regüle NUDT6/AKT/NF-κB yolu ile ilgili olabileceğine dair dikkat çekici veriler elde edildi. Doğal maddeler NF-κB p65'in anlatımı yanında nükleer translokasyonunu da azalttı. Test materyalleri ile işlem görmüş hücrelerde inflamasyondaki düşüşe paralel olarak matriks metalloproteazların (MMP2 ve MMP9) anlatımları da azaldı ve kollajen I düzeyi yükseldi. Hasarlı hücrelerdeki artmış apoptozun (Bax/Bcl2 oranı, kaspaz-3 ve PARP1 protein düzeylerinin) doğal maddelerle azaltılabildiği saptandı. Bu bulgu ölü, apoptotik ve canlı hücreleri belirlemeyi sağlayan HO/PI ikili boyaması ile de doğrulandı. Benzer şekilde, hasarlı hücrelerde artan ER stresi ile ilişkili Grp78, PERK ve IRE1α protein düzeyleri de doğal maddelerle işlem sonucunda düşüş gösterdi. Test maddeleri E-kaderin/N-kaderin oranını, Twist1, Snail1 ve TGF-β protein düzeylerini artırdı, dolayısıyla epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) hızlandırdı. Ayrıca uygulamalar kök hücre göstergelerinin (CD44, CD133 ve Nanog) anlatımında artışa yol açtı.

Sonuç olarak, RA ve/veya RJ uygulamaları, NUDT6/AKT/NF-κB yolunun aşağı regülasyonunu ve FGF2/ERK/EMT yolunun yukarı regülasyonunu sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Böylece, oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozu azaltmakta, proliferasyonu ve migrasyonu artırmaktadır. Test maddeleri arasında en umut verici ürün RA+RJ kombinasyonudur.

Bu tezde elde edilen veriler, rosmarinik asit ve arı sütünün tek başlarına veya kombine halde, akut ve kronik yara tedavisinde kullanılma potansiyellerinin yüksek olduğunu vurgulamaktadır. Bununla birlikte, *in vitro* çalışmalara dayanan bu veriler *in vivo* deneylerle de desteklenmelidir. Özellikle RA+RJ kombinasyonu, gelecekte yürütülebilecek preklinik ve klinik çalışmalardan sonra yara iyileştirici topikal ilaçların bileşimine girebilir. Genel sonuçların, yara iyileşmesine yönelik yenilikçi doğal ürünlerin ve/veya araştırma stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir. Dahası, bu çalışma, inflamasyon ve oksidatif stresin eşlik ettiği diğer sağlık sorunlarının tedavisine yönelik yeni ürünlerin ve yaklaşımların geliştirilmesine rehberlik edebilir.

Ocak 2024, 129 sayfa.

Anahtar kelimeler: UVB hasarı, hiperglisemi, yara iyileşmesi, rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ).

SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF WOUND HEALING POTENTIAL OF ROYAL JELLY AND ROSMARINIC ACID

Yunus AKSÜT

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Wound healing is a dynamic and multi-stage process with a highly complex mechanism in which damaged/injured tissues are repaired. Some systemic and local factors may cause delays or deterioration in wound healing. Due to various diseases or external factors, especially diabetes, an impaired wound-healing process reduces the patient's quality of life and may even result in amputation or death. Hyperglycemia (high blood sugar), which develops due to errors in regulating glucose homeostasis, is one of the important systemic factors that adversely affect the wound-healing process. Ultraviolet (UV) rays are one of the most crucial environmental and local factors affecting human skin.

Although much research has been conducted and various products have been developed to support the healing process in different wound types, more effective innovative products are still needed. Natural compounds are promising in wound healing with their wide scale of therapeutic efficacy and mild side effects. In addition to plant extracts or their active ingredients, honey bee products are also alternatives with high wound-healing potential.

In this thesis study, the wound-healing potential of rosmarinic acid (RA), which is a natural compound, and royal jelly (RJ), which is a honey bee product rich in bioactive peptides, and a new combined product containing these substances was investigated in the cellular systems subjected to UVB and hyperglycemia-like high glucose. In this context, the study was

conducted on fibroblasts (HFF cell line) and keratinocytes (HaCaT cell line), the most crucial cells in wound healing. To determine the effect of substances on angiogenesis, the human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC) was used.

Before examining the wound-healing effects of RA and RJ, cytotoxic or proliferative effects of the samples on skin cells were investigated by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) test. Then, a cell viability test (MTT) was conducted with different combinations to determine the most appropriate combined product composition and application dose. The effects of the samples on acute wound healing, characterized by increased cell migration, were investigated by scratch-wound assay. In addition, proliferation indicator protein expressions in the cells collected after this experiment were analyzed by the Western blotting method. The most convenient concentrations for further experiments were determined as 10 μ M for RA and 100 μ g/mL for RJ, and these substances, individually and in combination, were applied to UVB- and high glucose-damaged cells. Wound healing potentials of the samples were evaluated using cellular methods such as viability test and scratch-wound assay and molecular analyses such as qRT-PCR, Western blotting, immunofluorescent labeling, spectrofluorometry, and spectrophotometry. In addition to cell viability tests in the dose and time optimization studies for UVB and high glucose applications, the increased intracellular oxidation and apoptosis findings were taken into consideration, and it was decided to apply 100 mJ/cm² UVB for UVB damage and 50 mM glucose for hyperglycemia-like condition. The capacity of RA, RJ, and RA+RJ to eliminate UVB and high glucose damage was evaluated by examining the proliferation and migration ability of the cells as well as key metabolic processes, such as production of reactive oxygen species (ROS), formation of protein, lipid peroxidation, inflammation, apoptosis, cell signaling, ER stress, and stem cell differentiation. In addition, the angiogenic potential of the samples was analyzed by the *in vitro* endothelial tube formation test.

According to experimental data, UVB and high glucose manipulations increased oxidative stress, inflammation, and cell death in HFF and HaCaT cells. All three samples (RA, RJ, and RA+RJ) were determined to increase proliferation and migration, which decreased after UVB and high glucose applications and reduced excess oxidative damage, inflammation, and apoptosis. It was determined that the most effective test material was the combined product containing 10 μ M RA and 100 μ g/mL RJ.

All tested substances increased the expression of the growth factors FGF2 and VEGFA and the proliferation indicator Ki67. These also led to increased ERK1/2 phosphorylation while decreasing AKT phosphorylation and NF- κ B expression. It was detected that ROS production, oxidative protein damage, and lipid peroxidation, which increased due to UVB and high glucose exposure, decreased significantly after the treatment with natural substances. The reduced inflammation resulting from natural substance applications was demonstrated by the decrease in IL-1 β , IL-6, and TNF- α mRNA levels and the increase in IL-10 mRNA level. Remarkable data were obtained that the decrease in inflammation may be related to the down-regulated NUDT6/AKT/NF- κ B pathway. Natural substances decreased the expression as well as nuclear translocation of NF- κ B p65. In parallel with the decrease in inflammation in cells treated with test materials, the expression of matrix metalloproteases (MMP2 and MMP9) also decreased, and the level of collagen I increased. It was determined that increased apoptosis (Bax/Bcl2 ratio, caspase-3, and PARP1 protein levels) in damaged cells could be reduced with natural substances. This finding was further confirmed by HO/PI dual staining, which allowed the identification of dead, apoptotic, and living cells. Similarly, Grp78, PERK, and IRE1 α protein levels, associated with increased ER stress in damaged cells, decreased due to natural substances' treatment. The test substances increased the E-cadherin/N-cadherin ratio, Twist1,

Snail1, and TGF- β protein levels, thus accelerating the epithelial-mesenchymal transition (EMT). The applications also led to an increase in the expression of stem cell indicators (CD44, CD133 and Nanog).

In conclusion, RA and/or RJ treatments accelerate wound healing by down-regulating the NUDT6/AKT/NF- κ B pathway and up-regulating the FGF2/ERK/EMT pathway. Thus, it reduces oxidative stress, inflammation, and apoptosis and increases proliferation and migration. The most promising product among the test substances is the RA+RJ combination.

The data obtained in this thesis emphasize that rosmarinic acid and royal jelly, alone or in combination, have a high potential to be used in acute and chronic wound treatment. However, these data based on *in vitro* studies should also be supported by *in vivo* experiments. In particular, the combination of RA+RJ may be included in the composition of wound-healing topical drugs after future preclinical and clinical studies. The overall results are expected to contribute to developing innovative natural products and/or research strategies for wound healing. Furthermore, this study may guide the development of new products and approaches for treating other health problems accompanied by inflammation and oxidative stress.

January 2024, 129 pages.

Keywords: UVB damage, hyperglycemia, wound healing, rosmarinic acid (RA), royal jelly (RJ).

1. GİRİŞ

Yara, çeşitli iç ve dış etmenlerle, derinin veya mukoza zarının yırtıldığı, delindiği, kesildiği veya başka bir nedenle bütünlüğünün bozulduğu fiziksel bir yaralanma olarak tanımlanır. Yara iyileşmesi, inflamatuvar, vasküler, bağ doku ve epitel hücrelerinin birlikte görev aldığı oldukça karmaşık bir süreçtir. Yara iyileşme mekanizmasında olası bir hata normal onarımın yapılmasını engeller ve skar adı verilen deride yara izi oluşumuna yol açar. Skarlar enfeksiyonlara daha duyarlıdır ve ileride kronikleşen bir yara oluşumuna sebebiyet verebilir. Akut yaralarda iyileşmedeki gecikmeler ya da iyileşme sürecinde yaşanabilecek olumsuzluklar sonucunda onarımın tam olarak yapılamaması, yoğun tedavi gerektiren kronik yara gelişimi ile sonuçlanabilmektedir. Bu durumda, kronikleşen bir yara hem hastanın yaşam kalitesini düşürmekte hem de sağlık sistemlerinde büyük bir mali yüke yol açmaktadır (Kolimi ve diğ., 2022). Tüm klinik süreç düşünüldüğünde, klinik değerlendirme, tedavi, enfeksiyon yönetimi, pansuman ve takip, ülke ekonomisine önemli bir yük getirmektedir (Sen, 2021). Örneğin, ABD’de 2018 yılında yapılan retrospektif bir analiz, yaklaşık 8.2 milyon kişinin iyileşmesi zor yaralardan muzdarip olduğunu, yara maliyetinin 30 ila 100 milyar dolar arasında değiştiğini ve tedavi maliyeti en yüksek yaraların cerrahi yaralar ve diyabetik ülserler olduğunu ortaya koymuştur (Nussbaum ve diğ., 2018). Dünya çapında devam eden diyabet ve obezite tehdidi ve süregelen enfeksiyon sorunu göz önüne alındığında, ilerleyen yıllarda da özellikle kronik yaraların önemli bir klinik, sosyal ve ekonomik sorun olmaya devam etmesi beklenmektedir (Sen, 2021).

İyileşmeyen yaralar tedavi edilmezse veya yanlış tedavi uygulanırsa enfeksiyona, sepsise, uzuv amputasyonuna ve hatta ölüme yol açabilmektedir. Bu durum, dünya çapında, bu karmaşık yara iyileşme mekanizmasını hedefleyen çok çeşitli terapötik maddelerin ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Sen, 2021; Kolimi ve diğ., 2022). Farklı yara türlerinde yara iyileşmesi sürecini desteklemek için büyüme faktörü kullanımı, yara pansumanları ve deri greftleri gibi geleneksel yaklaşımlar uygulanmaktadır. Son on yılda, nanoterapötikler, kök hücre tedavisi, deri organoidleri ve 3D biyobaskı gibi yeni tedavi stratejileri ve yaklaşımlarının geliştirilmesinde büyük bir ivme yaşanmaktadır (Kolimi ve diğ., 2022). Bu konularda araştırmalar devam etmekle birlikte, ekonomik ve bol bulunabilen doğal

bileşiklerin de yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri, yüzyıllardır yapılan çalışmalar ve medikal uygulamaların sonuçlarına göre ümit vadetmektedir.

Hem yan etkilerinin az olması hem de geniş terapötik etki spektrumu, antioksidan etkiye sahip doğal bileşikler yara iyileşmesinde ön plana çıkarmaktadır. Anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve hücre uyarıcı özellikleri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle doğal bileşikler uzun yıllardır yara bakımında kullanılmaya devam etmektedir. Bu bileşiklerin yara iyileştirme üzerine etkinlikleri çeşitli *in vitro* testlerle ve klinik etkinlikleri ise hem hayvan modelleri hem de insanlar üzerinde yapılan *in vivo* deneylerle araştırılmıştır (Comino-Sanz ve diğ., 2021; Vitale ve diğ., 2022). Doğal bir polifenolik bileşik olan rosmarinik asitin (α -O-kafeoil-3,4-dihidroksifenillaktik asit, RA), antioksidan, anti-inflamatuar, anti-mutagenik, anti-metastatik, anti-anjiyogenik, anti-tümöral, nöroprotektif, anti-mikrobiyal, immün modülatör ve anti-venom aktivitelerine sahip olduğu *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Amoah ve diğ., 2016; Noor ve diğ., 2022). RA'nın yara iyileştirme potansiyelini araştıran çalışmaların büyük çoğunluğu, farklı bitkilerden elde edilen ekstraktların RA içeriğinden dolayı yara iyileştirme potansiyelinin olduğunu rapor etmiştir (Huang ve diğ., 2009; Geller ve diğ., 2010; Süntar ve diğ., 2011). Bununla birlikte, saf RA'nın yara iyileştirme potansiyeline ilişkin az sayıda çalışmaya da literatürde rastlanmıştır (Chhabra ve diğ., 2020; Küba ve diğ., 2021; Liu ve diğ., 2023). *In vitro* hücre kültüründe yapılmış az sayıda çalışma ise ultraviyole (UV) hasarına karşı RA'nın protektif ve tedavi edici etkisini, oksidatif dengesizliği ve apoptozu önleyerek gösterdiğini bildirmiştir (Vostalova ve diğ., 2010; Lembo ve diğ., 2014; Fernando ve diğ., 2016; Rodríguez-Luna ve diğ., 2019; Gupta ve diğ., 2022). Yara iyileştirme potansiyeli *in vitro* kültür çalışmaları ve *in vivo* hayvan deneyleri ile gösterilmiş olmasına rağmen RA'nın bu etkisini hangi moleküler yollar üzerinden ve nasıl gerçekleştirdiği tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bitki özleri ya da bunların aktif bileşenlerinin yara iyileştirici etkisi kadar arı ürünleri de yara iyileştirme potansiyeli yüksek doğal bileşiklerdir (Oryan ve Alemzadeh, 2017; Weis ve diğ., 2022). Apiterapi ürünleri içerisinde önemli bir yere sahip olan ve içeriğinde çok sayıda biyoaktif peptid bulunan arı sütünün (RJ, "royal jelly"), antimikrobiyal (Bărnău ve diğ., 2011; Tseng ve diğ., 2011), antiinflatuvar (Karaca ve diğ., 2012), anti-tümöral (Kimura, 2008), antioksidan (El-Nekeety ve diğ., 2007), immünomodülatör (Mihajlovic ve diğ., 2014) ve büyümeyi teşvik edici (Kamakura ve diğ., 2001) etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Dahası yaranın iyileşmesini kolaylaştırmak için antik çağlardan beri kullanıldığı rapor edilmiştir

(Bucekova ve diğ., 2017). RJ ile topikal tedavinin, hayvan modellerinde ve hatta diyabetik ayak ülserlerinde enfekte olmuş veya olmamış yaraların iyileşme süresini kısaltabileceği gösterilmiş olmasına rağmen (Temamogullari ve diğ., 2007; Abdelatif ve diğ., 2008; El-Gayar ve diğ., 2016), yara iyileşmesi ile ilgili moleküllerin ve moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar sınırlı kalmıştır.

Son yıllarda RJ'nin akut yaralardaki inflamasyonun azalmasında ve anjiyogenezin artışında rol oynadığı, fibroblast proliferasyonunu ve hücre göçünü arttırarak yara kapanmasını hızlandırdığı bildirilmiştir (Ramírez ve diğ., 2020; Álvarez ve diğ., 2023; Tan ve diğ., 2023). RJ'nin insan fibroblast hücrelerinde çizik yara modelinde göçü arttırarak yara kapanmasını hızlandırdığı ve hücrelerdeki lipid içeriğinde artış sağladığı gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2010). Belirgin hiperglisemisi olan diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, RJ'nin yara iyileşmesini önemli derecede hızlandırdığı belirlenmiş, fakat hiçbir moleküler yolak hakkında bilgi ortaya konmamıştır (Rashidi ve diğ., 2016). Başka bir makalede RJ'nin LPS lipopolisakkarit-indüklü inflamasyonu azalttığını ve *in vivo* hayvan yara modelinde de yara bölgesinin kapanmasını hızlandırdığını ortaya koymuştur (Lin ve diğ., 2020). Ayrıca, UVB hasarı üzerinde yapılan çalışmalar, RJ'nin inflamasyonu azalttığını (Fatmawati ve diğ., 2019), oksidatif stresi ve DNA hasarını azalttığını (Seo ve diğ., 2010), MMP düzeylerini düşürdüğünü (Kim ve diğ., 2020) ve fibroblastların proliferasyonunu artırdığını (Park H.M ve diğ., 2011) ortaya koymuştur. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonuçları ele alındığında, RJ'nin yara kapanmasındaki moleküler etki mekanizmasının belirsizliğini koruduğu görülmektedir.

Akut ve kronik yaraların tedavisi için mevcut terapötik ajanların genellikle düşük etkinliği ve ciddi yan etkilerinin olması nedeniyle bitkisel bileşikler ve biyoaktif peptidler ile yapılacak terapiler, yara tedavisinde alternatif bir strateji olabilir. Bu doktora tezinde yeni bir yara iyileştirici doğal ürün geliştirmek amacıyla bitkisel bir sekonder metabolit olan rosmarinik asit (RA) ile biyoaktif peptidlerce zengin olan arı sütünün (RJ) tek ve kombine uygulamalarının yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu iki maddenin birlikte yara iyileşmesi üzerine etkileri daha önce araştırılmamış olup ilk kez bu doktora tezinde incelenmiştir. Akut yarayı temsilen deri hücrelerinde gerçekleştirilen “*in vitro* çizik yara” deneyinin yanı sıra, UVB hasarlı veya hiperglisemi-benzeri yüksek glukoz ortamında çoğaltılmış hücreler üzerindeki terapötik etkileri çeşitli moleküler tekniklerle araştırılmıştır.

Deneysel çalışmalarda, deri hücreleri olarak insan sünnet derisi fibroblast hücre hattı (HFF) ile insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) kullanılmıştır. Ayrıca, yara iyileşmesinde önemli bir süreç olan anjiyogenez hakkında bilgi edinmek için insan umbilikal ven endotel hücre hattında (HUVEC) “*in vitro* endotel tüp oluşumu” deneyi gerçekleştirilmiştir.

HFF ve HaCaT hücrelerinde yara modellemesi için 2 etken kullanılmıştır: UVB ve yüksek glukoz. Hücrelerde hasar oluşturacak bu uygulamaların dozu ve süresi, optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenmiştir. Bu değerlendirmede hücre içi oksidasyon, proliferasyon ve apoptoz verileri baz alınmıştır.

RA ve RJ’nin UVB- ve yüksek glukoz-hasarlı deri hücreleri üzerindeki terapötik etkilerini araştırmak için ilk olarak sitotoksik ve proliferatif aktivitelerine bakılmıştır. Ardından RA ve RJ içeren en uygun kombine uygulama dozunun belirlenmesi için, farklı kombinasyonlarla hem hücre canlılık testleri (MTT), hem de akut yaradaki etkinliği görmek için çizik deneyi gerçekleştirilmiş, yara iyileştirme potansiyelleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca, çizik deneyi sonrası toplanan hücrelerde hücre proliferasyonunda iş gören marker proteinlerin anlatım analizleri yapılmıştır. Ön denemeler en etkin konsantrasyonların RA için 10 μ M ve RJ için 100 μ g/mL olduğunu ortaya koyduğundan, ileri deneyler bu dozlarla yürütülmüştür. Bu dozların UVB ve yüksek glukoz maruz kalmış hücreler üzerindeki etkileri moleküler analizlerle belirlenmiştir.

RA, RJ ve RA+RJ’nin UVB- ve yüksek glukoz-indüklü hasarlar üzerindeki iyileştirici etkisi, hem hücre migrasyonu göstergesi çizik yara deneyi ile hem de çeşitli hücresel süreçler hakkında bilgi veren moleküler yöntemlerle değerlendirilmiştir. Ayrıca RA, RJ ve RA+RJ uygulamalarının anjiyogeneze olası katkısı HUVEC hücrelerinde *in vitro* endotel tüp oluşumu deneyi ile analiz edilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda, UVB ve yüksek glukoz maruz kalan HFF ve HaCaT hücrelerinde artan apoptoz ve oksidatif hasarın RA, RJ ve RA+RJ uygulamaları içerisinde en fazla kombine uygulamada azaldığı belirlenmiştir. Doğal madde uygulamalarının bu hücrelerde büyüme faktörleri FGF2 ve VEGFA’nın anlatımını ve hücre proliferasyonunu önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuç proliferasyon göstergesi olan Ki67 seviyelerindeki artış ile de doğrulanmıştır. Ayrıca, RA, RJ ve RA+RJ’nin anjiyogenezi önemli derecede hızlandırma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Hücre sinyalizasyonunda önemli göreve sahip olan

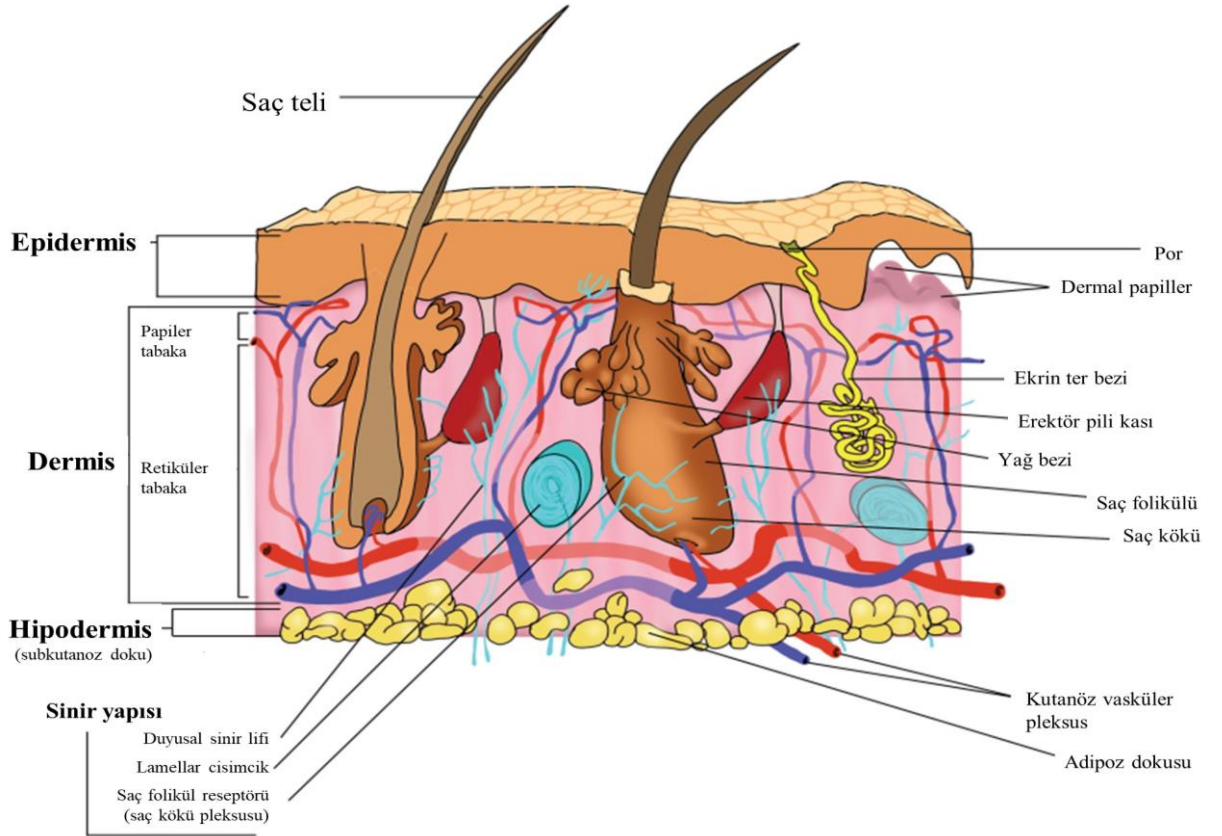
ERK1/2 proteininin fosforilasyonunda artış saptanmıştır. Dikkat çekici olarak hücre proliferasyonunda rolü kadar inflamasyonun yönetimindeki işlevi ile bilinen AKT/NF- κ B yolunun aşağı regüle edildiği belirlenmiştir. İnflamasyonun yönetiminde temel proteinlerden olan NF- κ B p65'in nükleer translokasyonundaki gerilemeyle birlikte hücredeki anlatımı da azalmıştır. Dikkat çekici olarak RA ve RJ uygulamaları sonrasında, FGF2 anlatımını düzenleyen ve FGF2'nin doğal "antisense" transkripti olan NUDT6 seviyesindeki düşüş, inflamasyonun azaldığını desteklemektedir. Uygulamalar sonucunda gerileyen inflamasyon, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerindeki düşüş ve IL-10 seviyesinde artış ile de gösterilmiştir. Hasara bağlı artan ER stresi, uygulamalar sonucunda azalmaktadır. Hasara bağlı artan apoptozun RA, RJ ve RA+RJ uygulamaları sonucunda azalışı, Bax/Bcl2 oranı ile kesilmiş kaspaz-3 ve PARP1 seviyelerinin düşüşü ve ek olarak Hoechst ve propidium iyodür floresan boyaması ile gösterilmiştir. Uygulamaların, UVB ve yüksek glukoz maruziyetine bağlı artan protein hasarını (karbonillenme) ve lipid peroksidasyonunu (MDA) anlamlı düzeyde düşürdüğü saptanmıştır. Uygulamaların epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) hızlandığı, azalan E-kaderin/N-kaderin oranı, Twist1, Snail1 ve TGF- β seviyeleri ile gösterilmiştir. Ayrıca kök hücre belirteçleri olan CD44, CD133 ve Nanog seviyelerindeki artış, yara iyileşmesi sürecinde rosmarinik asit ve arı sütü kombine uygulamalarının indüklediği moleküler mekanizmalardan biri olduğunu göstermiştir. Bu doğal maddelerin hücre göçünü artırdığı çizik yara testiyle gösterilmiş, bu veri MMP-2 ve MMP-9 protein anlatımlarında alınan yanıtlarla desteklenmiştir.

Özetle, UVB hasarında ve hiperglisemi koşulunda artan hücre ölümü ve inflamasyon ile azalan hücre proliferasyonun, RA ve RJ uygulamaları sonucunda aşağı regüle olan NUDT6/AKT/NF- κ B yolu ve yukarı regüle olan FGF2/ERK/EMT yolu ile tersine çevrildiği ve yara iyileşme sürecinin inflamatuvar faktörlerin azalması, hücre çoğalmasının ve göçünün artması ile hızlandığı ortaya koyulmuştur. Elde edilen veriler, rosmarinik asitin ve arı sütünün tek başlarına uygulanmasından ziyade birlikte uygulanmasının akut ve kronik yaraların tedavisinde daha yararlı olacağını göstermektedir. Şüphesiz, bu karışımın yara tedavisinde kullanılan topikal preparatların bileşiminde yer alabilmesi için daha ileri farmakokinetik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Doktora tezinden elde edilen çıktıların, yara iyileşmesinde yeni tedavi ürünlerinin ve/veya stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. DERİ

Deri, vücudun dış katmanını oluşturarak çevreden gelecek radyolojik veya kimyasal etkilere, mikroorganizmaların ve dış antijenlerin penetrasyonuna karşı koruyan, ilk bariyer noktası olarak işlev gören en büyük organdır (Proksch ve diğ., 2008). İnsan cildinin yapısı karmaşıktır. Epidermis, dermis ve hipodermis veya derialtı dokusu olmak üzere üç ana tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Cildin epidermis, dermis ve hipodermis tabakaları (Yousef ve diğ., 2022).

2.1.1. Epidermis

Epidermis, birkaç hücre tabakasından oluşan ve en dış katmanda bulunan deri tabakasıdır. Dört tip hücre içerir: (1) Keratinositler (başlıca deri hücreleri), (2) Melanositler (pigment üreten hücreler), (3) Langerhans hücreleri (bağışıklık hücreleri) ve (4) Merkel hücreleri (özel nöroendokrin hücreleri). En dış katmanda bulunan ve epiderminin en baskın hücre tipi olan

keratinositler bol miktarda keratin ve lipit salgılayarak su bariyeri olarak işlev görürler. Epidermis, stratum korneum, stratum lusidum (sadece ayak tabanları ve nazal planumdaki ölü keratinosit tabakası), stratum granülozum, stratum spinosum ve stratum bazale (bazal tabaka) olmak üzere beş katmandan oluşur (Denda ve Nakanishi, 2022; Yousef ve diğ., 2022).

Bazal tabakada bulunan melanositler UV ışınlarına karşı koruyucu olan cilt pigmenti melanini üretirler (Brenner ve Hearing, 2008). Deride bulunan bağışıklık hücreleri (Langerhans hücreleri, dendritik hücreler) antijen sunumunda önemli bir yere sahiptir. MHC-I ve MHC-II anlatımı yapar ve ciltte bulunan antijenleri lenf sistemine taşırlar (Clayton ve diğ., 2017). Mekanoreseptör görevi gören Merkel hücreleri desmozom ile keratinositlere bağlanır ve ayrıca deride bulunan serbest sinir uçlarıyla da etkileşim kurarlar (Abraham ve Mathew, 2019).

2.1.2. Dermis

Dermis, derinin epidermis ve hipodermis arasındaki tabakasıdır. İçerisinde fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar ile sinir ve damar ağlarını bulunduran kompleks bir yapıdır. İçeriği sayesinde deriye esneklik, gerilme ve dayanıklılık sağlamaktadır. Bu tabaka, deride oluşabilecek yaralanmalardan korur, suyu tutar ve ısı dengesini sağlar. Oluşan yaraların iyileşmesine içerdiği hücrelerle büyük katkı verir. Fibroblastlardan üretilen kolajenler deriye sağlamlık katarken elastinler esnekliği sağlar. Dermis yapısı ve içeriği ile derinin yenilenmesinde ve yeniden şekillenmesinde görev alır (Kolarsick ve diğ., 2011; Yousef ve diğ., 2022).

2.1.3. Hipodermis

Dermis altında bulunan deri katmanıdır. Hipodermis bol miktarda yağ dokusu içerir. Kasları ve kemikleri bu katman deriye bağlar. Isı yalıtımı, kemik ve kasların darbelere karşı korunması, enerji depolanması, kemik ve kasların deri ile bağlantı kurmasında görev alır. Ayrıca bağ dokusu, kan damarları, lenfatik damarlar, saç kökleri ve ter bezleri bu katmanın bir parçasıdır (Gilaberte ve diğ., 2016; Yousef ve diğ., 2022).

2.2. YARA ve YARA İYİLEŞME SÜRECİ

Yara, çeşitli travmatik dış etkenlere (mekanik, termal, kimyasal, biyolojik gibi) veya sağlık sorunlarına (diyabet, kronik venöz/arteriyel yetmezlik, immünolojik ve dermatolojik hastalıklar

gibi) bağılı olarak deri, mukoza veya organ bütünlüğünün bozulmasıdır (Herman ve Bordoni, 2023). İnsan vücudunun en büyük organı olan deri iç organları fiziksel ve kimyasal etkenlerin yanı sıra patojenlere karşı koruyan bir katmandır. Sağlıklı bir yaşam için bu organın bütünlüğünün korunması gerekmekte ve yara iyileşmesi sürecinde güçlü bir sağlık sistemine ihtiyaç duyulmaktadır (Almadani ve diğ., 2021).

Yaranın iyileşmesi senkronize gerçekleşen bir süreç olmakla birlikte oldukça karmaşıktır. Doğal yara iyileşmesi sürecindeki hatalar veya yanlışlıklar yara iyileşmesini geciktirir ve yaranın kronik yaraya dönüşmesine alt yapı hazırlar. Bu durum yaşam kalitesini düşürdüğü gibi daha ileri sağlık sorunlarına yol açabilir. Kronik yara tedavisi, ekonomik açıdan da önemli kayıplara neden olmaktadır (Sen, 2021). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2018 yılında yapılan retrospektif bir analizde kronik yaralardan yaklaşık olarak 8.2 milyon kişinin kronik yaralardan muhterip olduğı ve tedavi masraflarının yaklaşık 28.1 ila 96.8 milyar dolar arasında değıştiğı rapor edilmiştir (Nussbaum ve diğ., 2018). Hem ciddi sağlık sorunlarına hem de maddi kayıplara neden olan bu tip yaraların hızlı ve doğru bir şekilde tedavi edilebilmesi için yara iyileşmesi sürecinin iyi bilinmesi ve farklı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

2.2.1. Yara İyileşmesinin Basamakları

Yara iyileşmesi sürecine deri hücreleri, periferik kan mononükleer hücreleri, hücre dışı matriks, büyüme faktörleri, sitokinler, düzenleyici moleküller ve kemokinler katılır. Bu karmaşık ve senkronize süreç dört basamakta gerçekleşir (Şekil 2.2) (Cañedo-Dorantes ve Cañedo-Ayala, 2019).

Basamak 1- Hemostaz (“hemostasis”): Yara iyileşmesi sürecinin ilk basamağıdır ve meydana gelen yarada kan kaybının durdurulmasındaki süreçleri içerir. Kan hücreleri, aktif olmamış trombositler ve fibrinler bu aşamada görev alarak pıhtı oluşumuna büyük katkı sağlarlar. Yaralanma sonrasında, damar düz kas hücrelerinin sitoplazmasındaki kalsiyum artışı endoteli etkileyerek vazokonstriksiyon (damarda büzülme) gerçekleşir. Yara bölgesindeki trombositler aktive olurken yüzeye yapışmaya ve agregat oluşturmaya başlar. Trombositler kollajen ile aktive olduktan sonra büyüme faktörleri, siklik AMP gibi mediyatörler ile adeziv (yapışkan) glikoproteinleri salgırlarlar. Bu sayede daha fazla agregat oluşturlar. Agregasyon ilerledikçe ortama salınan pıhtılaşıma faktörleri, fibrin agregatlarının pıhtı oluşturmalarını sağlar. Oluşan bu

fibrin ağı trombositleri sıkıştırarak trombosit tıkaçını oluşturur (Velnar ve diğ., 2009; Reinke ve Sorg, 2012).

Trombositlerin alfa granüllerinde platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF, “platelet-derived growth factors”), dönüştürücü büyüme faktörü-alfa (TGF- α , “transforming growth factor-alpha”), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β , “transforming growth factor-beta”), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF, “vascular endothelial growth factor”), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1, “insulin-like growth factor”) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF2, “fibroblast growth factor 2”, “basic” (b)FGF olarak da bilinir) salgılanır. Yaranın bir sonraki basamağa geçmesi için PDGF ve TGF- β , nötrofillerin ve monositlerin yara bölgesine gelmesini sağlayarak inflamatuvar yanıtın oluşturulmasına katkıda bulunur. VEGF, TGF- α ve FGF2 endotel hücrelerini uyarak anjiyogenezi başlatır. Ayrıca PDGF, fibroblastların yara bölgesine gelmesini sağlar. Yara bölgesine gelen fibroblastlar yara matrisini destekleyen kollajen ve glikozaminoglikan üretimini gerçekleştirirler. Kısaca hemostaz süreci içerisinde trombosit tıkaçının oluşması, hücre dışı proteinlerin üretilmesi ve büyüme faktörlerinin salınması ile yara iyileşmesinin ikinci basamağı olan inflamasyon için zemin hazırlanır (Eming ve diğ., 2014).

Basamak 2- İnflamasyon (“inflammatory”): İnflamasyon basamağı, akut yaralarda yaklaşık iki hafta kadar sürerken kronik yaralarda daha uzundur. Yara iyileşmesinin bu basamağının temel amacı patojenlere karşı savunma oluşturmaktır. Yara bölgesinde bulunan nekrotik hücreler ve hasarlı doku tarafından salgılanan hasarla ilişkili moleküler örüntüler (DAMPs, “damage-associated molecular patterns”) ve patojen bileşenleri olan patojenle ilişkili moleküler örüntüler (PAMPs, “pathogen-associated molecular patterns”) inflamatuvar yolağı başlatmak için mast hücreleri, Langerhans hücreleri, T hücreleri ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin reseptörlerine bağlanarak onları aktive ederler (Wilkinson ve Hardman, 2020).

Yara bölgesine gelen mast hücrelerinin salgıladıkları histamin, enzim ve diğer aktif aminler inflamasyon göstergesi olan şişlik, ısı, ağrı ve kızarıklığa neden olurlar. Bu basamağın kilit hücreleri nötrofiller, monositler ve makrofajlardır. Hasarlı bölgede toplanan nötrofiller ortamda bulunan bakterileri ve nekrotik hücreleri ortadan kaldırmak (fagositoz) için, reaktif oksijen türleri (ROS, “reactive oxygen species”) ve proteaz salgılama özelliklerini kullanırlar. Ayrıca nötrofiller yara iyileşmesinde güçlü yanıt oluşturmak için kendi sitokinlerini (TNF- α , IL-1 β ve IL-6 vb.) salgılayarak VEGF ile IL-8’in salınmasını uyarırlar (Reinke ve Sorg, 2012).

Dolaşımda bulunan monositler yara bölgesine geldiklerinde ortamdaki uyaran ile makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar hasarlı dokudaki patojen ve nekrotik hücre bileşenlerini fagositozla ortadan kaldırmanın yanı sıra sitokinleri, kemokinleri ve büyüme faktörlerini salgılayarak inflamasyon sürecine katkı verirler (Profyris ve diğ., 2012). LPS (“lipopolysaccharide”) ve interferon-gama (IFN- γ) gibi pro-inflamatuarlar tarafından aktive edilen makrofajlar ROS, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinleri ve PDGF, TGF- β , TGF- α , FGF2 ve IGF-1 gibi büyüme faktörlerini salgılayarak sürecin devamlılığını sağlar. Salgılanan büyüme faktörleri sayesinde; anjiyogenez, yeniden epitelizeasyon ve fibroplazi teşvik edilir (Mahdavian Delavary ve diğ., 2011; Jetten ve diğ., 2014). Ayrıca makrofajlar apoptotik nötrofilleri fagosite ederek inflamasyon aşamasının ana inflamatuvar aracı olurlar (Mahdavian Delavary ve diğ., 2011).

İnflamasyon basamağı içsel ve dışsal birçok faktöre bağlıdır. Bu süreçte yaşanan sorunlar nedeniyle gerçekleşecek kontrolsüz ve aşırı inflamasyon doku hasarını artırır ve iyileşme sürecini geciktirir (Wilkinson ve Hardman, 2020).

Basamak 3- Proliferasyon (“proliferative”): Yara iyileşmesinin bu basamağında ekstraselüler matriks (“extracellular matrix”, ECM) proteinlerinin birikimi, yara kapanması ve anjiyogenez gibi süreçleri fibroblastlar, keratinositler ve endotel hücreleri düzenler. Keratinositler yara bölgesindeki epidermal büyüme faktörü (EGF, “epidermal growth factor”), keratinosit büyüme faktörü (KGF, “keratinocyte growth factor”) ve TGF- α gibi büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer dış etmenler tarafından aktif hale getirilir (Li ve diğ., 2007). Yara bölgesi kenarında aktif hale gelmiş keratinositler epitelyal-mezenkimal geçişe (“epithelial-mesenchymal transition”, EMT) ve istilacı bir profil sergilerler. Ayrıca büyüme faktörleri, desmozomların ve hemidesmozomların bozulmasını sağlayarak hücreleri göçe hazırlar. Neo-epidermisteki keratinositler, bazal membranı yeniden oluşturmak için hücre göçüne yardımcı olacak matriks metalloproteinazları (MMP) salarlar (Rousselle ve diğ., 2019).

Bu basamakta, dokunun hem canlılığını hem de iyileşme sürecini hızlandırmak için hasarlı damarların yerine anjiyogenez ile yeni kan damarları üretilir. Anjiyogenezi tetikleyen en büyük etmen hipoksidir. Hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF), siklooksijenaz-2 ve VEGF gibi faktörlerin anlatımını artırır (Huang ve diğ., 2005). Bu değişimlere bağlı olarak endotel hücrelerinin proliferasyonu artar ve yara bölgesine göçleri hızlanır. Stabil haldeki endotel hücreler ile birleşerek yeni tübüller ağ oluşumu ile yeni damarlar ortaya çıkar (Honnegowda ve diğ., 2015).

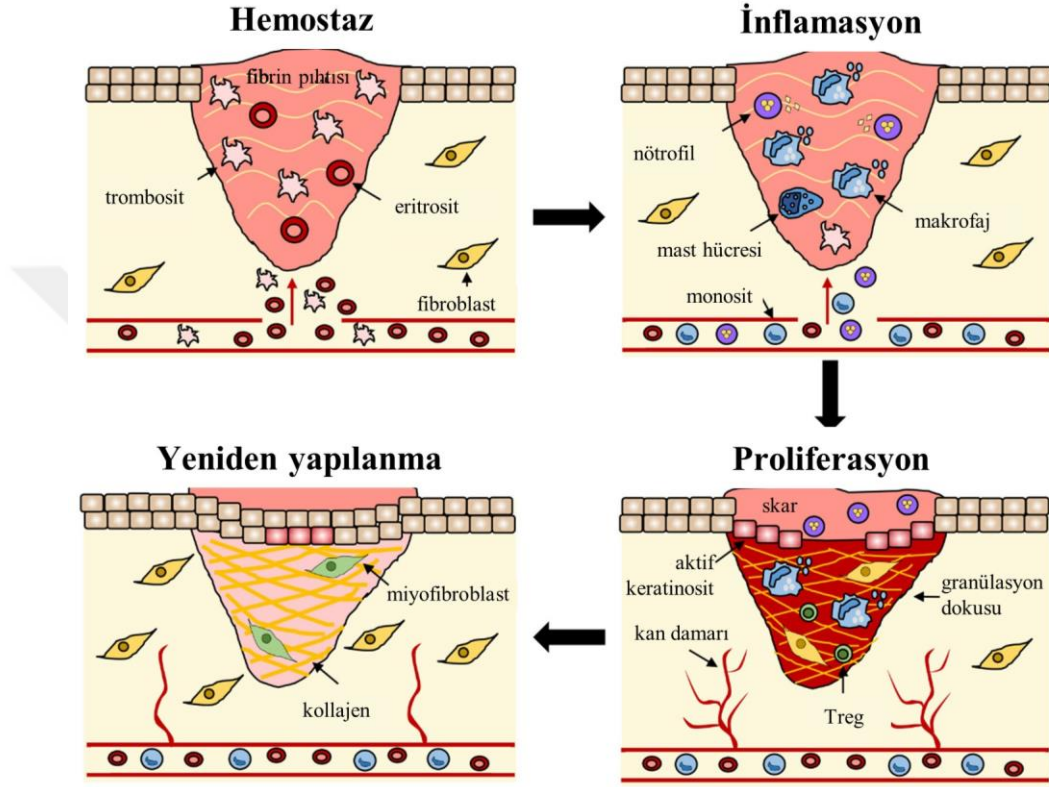
Yara bölgesindeki fibrince zengin geçici matriksin yerine granülasyon dokusunun oluşmasında fibroblastlar ana görevli hücre rolünü üstlenirler. Bu hücreler trombositlerin ve makrofajların salgıladığı moleküllerin uyarımıyla hasarlı dokuya göç ederler. Normal süreçte dermisde bulunan fibroblastlar az sayıda ve hareketsizken yara bölgesinde oluşan geçici matrikste oldukça fazla sayıda ve aktif haldedirler. Fibroblastlar yara bölgesine ulaşmak üzere ECM'den geçmek için, proteazlar üretilip salgılayarak yol açarlar. Fibroblastlar göç işlemlerini tamamladıktan sonra farklılaşır, çoğalır ve kollajen, elastin ve proteoglikanlar gibi granülasyon dokusunun ana moleküllerini sentezlerler. Şu ana kadar 20 tip kolajen türü tanımlanmıştır (Fitridge ve Thompson, 2011).

Basamak 4- Yeniden yapılanma (“remodeling”): Yara iyileşmesinin son basamağı olan yeniden yapılanma, dokunun yeniden düzenlenme süreçlerini içerir; yara oluşumundan iki veya üç hafta sonra başlar ve bir yıla kadar uzayabilir. Proliferasyon basamağında başlayan ECM sentezi ve granülasyon dokusu gelişimi eş zamanlı olarak bu aşamada da devam eder. Yeniden yapılanma basamağının kilit hücreleri olan fibroblast ve makrofajlar, ECM'nin yeniden şekillenmesinde kollajenlerin sentezinde ve çapraz bağlanmasında, hücre ölümünün yönetiminde ve hücre olgunlaşmasında (“cell maturation”) rol oynarlar (Wilkinson ve Hardman, 2020).

ECM'deki kollajen yıkımı ve sentezi arasındaki hassas denge, MMP enzimleri tarafından düzenlenir. Yara onarımı boyunca, doğal sarmal yapıdaki kollajenlerin yıkımında görevli MMP'leri fibroblastlar ve keratinositler sentezler (Darby ve diğ. 2014). Ayrıca ECM'de bulunan elastinlerin deriye esneklik kazandırması için, elastinler tekrar yapılandırılır. Elastinler yara iyileşmesinin erken aşamasında çok yoğun düzenlenme geçirmelerine rağmen olgun elastin lifleri sadece skar dokusunda aylar sonra görülür (Amadeu ve diğ., 2004).

Fibroblastlar yaranın iyileşme sürecinde, yara dokusunda oluşturulan fibronektinleri, fibrin agregatlarını ve proteoglikanları, kollajen fibrilleri ile değiştirir ve yaranın iyileşmesine katkı sağlar. Hasarlı deri dokusunda genelde %80 kollajen tip-3 ve %10 kollajen tip-1 bulunurken, iyileşme süreci ilerledikçe skar yapısındaki kollajen tip-3 yerini kollajen tip-1'e bırakır. Bu da skarın gerilme kuvvetini artırır (Diegelmann ve Evans, 2004). Skarda oluşan ECM'deki kollajen fibrillerinin normal derideki kollajen fibrillere göre farklı yapıda bağlanması, iyileşen yara bölgesinin dayanıklılığını normal deri dokusuna göre %20 azaltır (Witte ve Barbul, 1997; Young ve McNaught, 2011). Onarım sürecinin sonlarına doğru ortamda yoğun şekilde bulunan

makrofajların, keratinositlerin ve fibroblastların yoğunlukları apoptoz ile azaltılır. Bu süreç ilk olarak keratinositlerle başlar (Clark, 1995; Iocono, 1998). Yara bölgesindeki makrofajlar, keratinositler, endotel hücreleri ve fibroblastlar azaldığında veya ayrılarak bir yara izi bıraktığında yara iyileşme yanıtı etkinliğini kaybeder (Larouche ve diğ., 2018).



Şekil 2.2: Yara iyileşmesinin basamakları (Wilkinson ve Hardman, 2020).

2.3. YARA İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Birçok etmen ve faktör yara iyileşmesinde gecikmelere veya bozulmalara sebep olabilir. Yaranın onarımını etkileyen faktörler, sistemik ve yerel (lokal) faktörler olarak iki gruba ayrılabilir. Sistemik faktörler yaranın konumuyla doğrudan ilişkisi olmayan veya çok az ilişkisi olan faktörlerdir. Yerel faktörler yaranın özelliklerini doğrudan etkileyen faktörlerdir (Guo ve Dipietro, 2010).

Sistemik faktörler; yaş, cinsiyet, genetik ve sistemik hastalıkları (diyabet, damar yetersizliği, arteriyel yetmezlik, kronik akciğer hastalıkları vb.) kapsar. Yaş ilerledikçe yaranın

iyileşmesinde önemli süreçler olan anjiyogenez, yeniden epitelizasyon ve makrofaj fonksiyonlarında bozulmalar veya gecikmeler iyileşmeyi olumsuz yönde etkiler (Gosain ve DiPietro, 2004). Cinsiyet hormonlarından östrojenin hem yaşlı hem de yetişkin bireylerde yara iyileşme oranını artırdığı gösterilmiştir (Hardman ve Ashcroft, 2008). Kronik yaralardaki mikrobiyomlar incelediğinde, insanların genotiplerine bağlı olarak belirli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı duyarlı olma eğiliminde oldukları bildirilmiştir (Tipton ve diğ., 2020). Yara iyileşmesini etkileyen hastalıklara bakıldığında, damar yetersizliğinde kalıcı ödem oluşması ile yara iyileşme süreçlerinde işlev kaybı gerçekleşir. Arteriyel yetmezlikte ise gerekli olan oksijen ve besin maddelerinin hücrelere dağıtımı azalır ve yara iyileşmesinde gecikmelere neden olur (Hess, 2011). Hiperglisemiye bağlı gelişen diyabet de yara iyileşmesini etkileyen en önemli ve en sık görülen faktördür. Hiperglisemi durumunda, ROS üretimi antioksidan kapasitesini aştığından oksidatif strese de artış olur. Ayrıca ileri glikasyon son ürünlerinin (“advanced glycation end products”, AGEs) ve MMP seviyelerinin artmasına neden olarak yaraların kronik yaraya dönüşmesine sebebiyet verir (Brem ve Tomic-Canic, 2007).

Lokal faktörler; oksijenasyon, enfeksiyon, travma-ödemler ve solar ultraviyole (UV) ışınlarını içerir. Oksijenasyon yara iyileşmesinin tüm aşamalarında kritik öneme sahiptir. Diyabet ve yaşlanma gibi sistemik faktörlerden kaynaklanan düşük doku oksijenasyonu (hipoksi), vasküler akışın azalmasına neden olarak yara iyileşmesini bozabilir (Rodriguez ve diğ. 2008). Cilt yaralandığında normalde cilt yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar alttaki dokulara erişim sağlar. Yarada oluşan enfeksiyon aşırı inflamatuvar reaksiyona neden olarak yara iyileşmesini geciktirir (Edwards ve Harding, 2004). Yaralar, sürekli olarak travmaya maruz kaldıklarında veya ödem nedeniyle lokal kan desteğinden yoksun bir ortamda yavaş iyileşir veya hiç iyileşmeyebilir (Hess, 2011). UV ışınları, keratinosit ve fibroblast hücrelerinin canlılığının azalmasına ve hücre göçünün bozulmasına, dolayısıyla yara iyileşme süreçlerindeki basamaklara zarar vererek iyileşmenin yavaşlamasına neden olur (Liu ve diğ., 2015).

2.3.1. UVB Hasarı

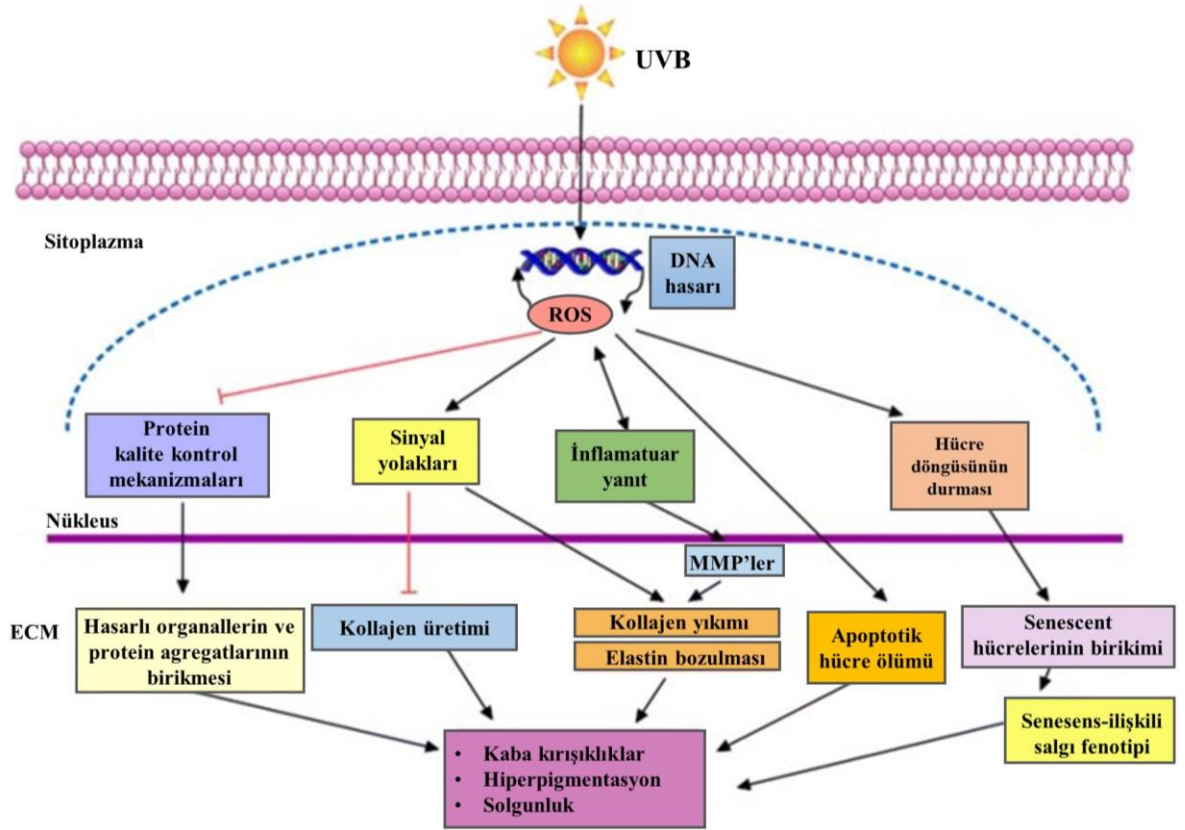
Solar ultraviyole (UV) ışınları insan derisini etkileyen çevresel faktörlerden en önemlilerinden biridir. Çocukluktan beri güneş ışınlarına maruz kalmak ciltte önemli hasarlara neden olabilir. Özellikle 280-320 nm aralığındaki UVB ışınlarının en zararlı etkisi kötü huylu (malign) kanser (melanom) gelişimine yol açmasıdır. UVB ışınları derinin üst katmanları dahil dermise kadar nüfuz edebilir. Deri katmanlarında bulunan keratinosit ve fibroblastlar üzerinde ciddi hasarlara

neden olur. UVB maruziyetinin özellikle ciltte bulunan hücrelerde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Svobodova ve diğ., 2006).

Dünyada her yıl bir milyondan fazla kişide non-melanom cilt kanseri görülmektedir. Bu kanser türünün gelişiminde büyük ölçüde UV ışınlarına aşırı maruziyet etkilidir. UVB, hücrelerin protein, lipid ve DNA'sında oluşturdukları hasar ile tümör başlatıcı ve teşvik edici ajan olarak iş görmektedir (Abu-Yousif ve diğ., 2008). Yoğun UVB'ye maruz kalmış deri hücreleri hasar onarım mekanizmalarıyla ya da onarımı başarısız olan hücreleri apoptozla ortadan kaldırarak zararlı etkilerden kurtulur (Schuch ve diğ., 2017). Hasar onarım mekanizmasında aksaklıklar veya apoptoz yolağındaki hatalardan dolayı onarım gerçekleşmezse UVB ışınlarının etkisiyle oluşan mutasyonlar tümör oluşumunu indükler. Son yıllarda UVB ışınlarının zararlı etkileri hakkında toplumlar bilinçlendirildiyse de deri kanseri vakalarındaki artış devam etmektedir. UVB ışınlarının oluşturduğu hasarların veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırması için yeni ajan ve stratejilere ihtiyaç vardır (Cleaver ve Crowle, 2002; Wu ve diğ., 2023).

UVB ışınlarının deride yaptığı hasarların bazıları akut iken bazıları ileri süreçlerde ortaya çıkar. Cilt etkili bir antioksidan sistemine sahip olmasına rağmen UVB kaynaklı oluşan ROS'lar bu sistemden kaçarak derinin savunma sistemine fazla yük bindirir ve önemli derecede hasar oluşturabilir (Stone ve diğ., 2003). UVB kaynaklı oluşan oksidatif strese cildin verdiği tepkilerden bazıları; hücre içi lipid peroksidasyonun artması, hücre içi ve hücreler arası antioksidanların tükenmesi, immünsüpresif, inflamatuvar veya apoptotik süreçleri düzenleyen spesifik sinyal yollarının indüklenmesidir (Levites ve diğ., 2001; Luchetti ve diğ., 2009). UVB-kaynaklı DNA hasarı ve ROS birikiminin yol açtığı etkiler Şekil 2.3'te gösterilmiştir. UVB ışınlarının en belirgin etkisi inflamasyonun tetiklenmesidir. Keratinositlerde IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın artmasına neden olur (Suh ve diğ., 2002). UVB ışınlarının keratinositlerde yol açtığı hasar eşik değerini aştığında kaspaz-9 aktivasyonu ile apoptoz indüklenir. Ayrıca UVB-indüklü apoptozda anti-apoptotik Mcl-1 ve Bcl-2 ailesinden birkaç proteinin görev aldığı gösterilmiştir. Bunun dışında, UVB-kaynaklı DNA hasarı ve ROS birikimi; protein kalite kontrol mekanizmalarını blok eder ve hasarlı proteinlerin birikimine yol açar. Bu durum, hücrelerde endoplazmik retikulum (ER) stresine neden olur. UVB maruziyeti sonucunda, ER stresinde rol oynayan transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteininin (CHOP)'un anlatımındaki artışa bağlı olarak keratinositlerin apoptozu gittiği gösterilmiştir. Bu ER stresinin UVB kaynaklı apoptozda rol oynadığını göstermektedir (El Darzi ve diğ., 2017). Derinin

dermis tabakasında bulunan kollajen fibriller ve elastinler cilde dayanıklılık ve esneklik kazandırmaktadır. UVB ışınlarının oluşturduğu hasar ile bu iki proteinin dermisteki düzenlerinin bozulması deride foto-yaşlanmaya neden olur. Ayrıca, UVB'ye bağlı hücre döngüsündeki tutuklanmalar yaşlı ("senescent") hücrelerin birikimine ve senesens-ilişkili salgı fenotipinin oluşmasına, yani pro-inflamatuvar faktörlerin miktarında artışa da yol açmaktadır (Cavinato ve diğ., 2017). UVB kaynaklı ROS'a karşı dengeyi kurmak için güvenli antioksidanlar veya stratejilere ihtiyaç vardır (Ramachandran diğ., 2010).



Şekil 2.3: UVB ışınlarının deride hasara yol açan ROS-aracılı etkileri (Cavinato ve diğ., 2017).

2.3.2. Hiperglisemi

Anormal glukoz metabolizmasının merkezi bir rol oynadığı diyabet yaklaşık 340 milyondan fazla bireyi etkileyen metabolik bir hastalıktır. Dünyada tip 2 diyabet görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır (Patel ve diğ., 2019). Ülkemizde 2013 yılında yapılan bir çalışmada diyabet görülme oranının %14 olduğu gösterilmiştir (THSK, 2014).

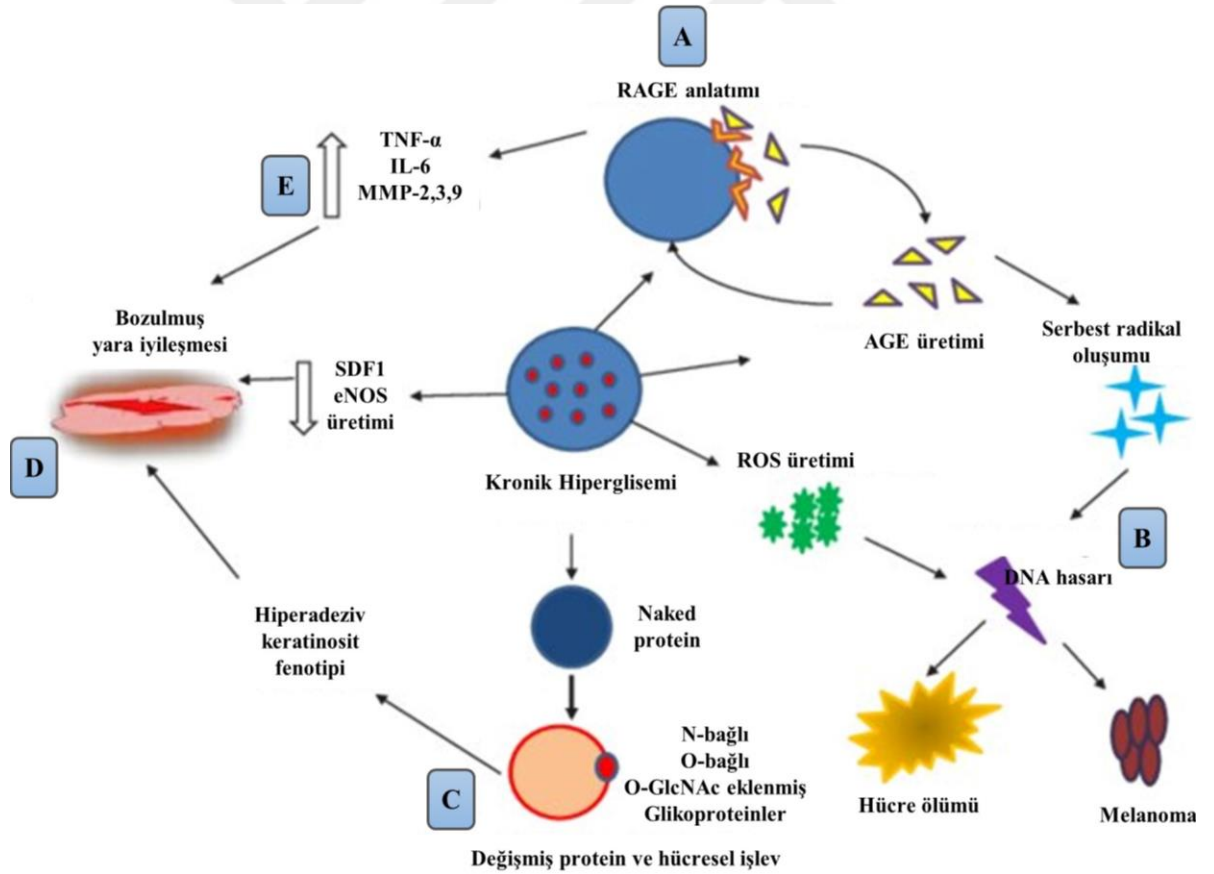
Diyabet hastalarında oluşan ayak veya bacak ülserleri, hastaların sakatlık ve mortalite oranlarını artırmaktadır (Deng ve diğ., 2021). Bunun en büyük nedeni diyabetik hastalarda yara iyileşmesini etkileyen mekanizmaların yeterli düzeyde anlaşılmamış olması ve iyileşme sürecinde sitokin ve kemokinlerin anlatımlarındaki dengenin bozularak iyileşmenin gecikmesidir (Loots ve diğ., 2002). Mevcut bakım sistemlerinin ve ilaçların yetersiz kalmasından dolayı diyabetik yaraların %70'inden fazlasında iyileşme sağlanamamakta, standart tedaviler amputasyonla sonuçlanmaktadır (Wolf ve diğ., 2021). Diyabet kaynaklı yaraların tedavisinde daha detaylı çalışmalara, yeni tedavi ajanlarına ve stratejilerine ihtiyaç vardır.

Hiperglisemi, diyabet hastalarında yara kapanma süreçlerinde bozulmalara, ateroskleroz yoluyla ayak veya bacak ülserlerinin gelişmesine ve deri hücrelerinin fonksiyonlarında kayıplara neden olur (Hanefeld ve diğ., 2013). Hiperglisemi ateroskleroz oluşumunda etkin rol oynayarak, dolaşımda bulunan besinlerin yara bölgesine ulaşmasını geciktirir ve bu da yara iyileşmesi aşamalarında yavaşlamalara veya bozulmalara yol açar (Beckman ve diğ., 2002). Ayrıca hiperglisemi endotel hücrelerinde fonksiyonel bozukluklara sebebiyet vererek yaraların iyileşmesini geciktirir (Kořtka ve diğ., 2004).

Hiperglisemi endotel hücreleri dışında yara bölgesindeki ECM proteinlerinin sentezini, hücrelerin göçünü, fibroblast ve keratinosit hücrelerinin çoğalmasını da yavaşlatır (Park H.Y., ve diğ., 2011; Lima ve diğ., 2017; Kim ve diğ., 2018). Yeniden epitelizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan keratinosit farklılaşmasında, hücre iskeletinde bulunan çeşitli keratin proteinlerinin ve epitel hücrelerin bazal membrana yapışmasını sağlayan laminin-5 $\alpha 3$ zincir öncü proteininin (LM-3A32) anlatımındaki azalma hiperglisemi ile ilişkilidir (Blakyttny ve Jude, 2009). LM-3A32 proteinin anlatımındaki bozukluklar doğrudan keratinositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkilediği için yeniden epitelizasyonda önemli bir yer tutar (Ryan ve diğ., 1999; Usui ve diğ., 2008).

Hiperglisemi, yara iyileşmesinde önemli bir mekanizma olan antioksidan savunma sistemine de zarar verir. Hiperglisemiye bağlı glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutazın aktivitelerindeki azalmalar ROS artışına neden olur (Dworzański ve diğ., 2020). Yara aşamalarının ilk evrelerinde ROS her ne kadar yararlı olsa da dengesiz bir şekilde üretimi yara iyileşmesinin diğer aşamalarında önemli hasarlara neden olmaktadır (Rodriguez ve diğ., 2008). Uzun süreli ve kontrolsüz bir şekilde ilerleyen hiperglisemi ROS-aracılı ileri glikasyon

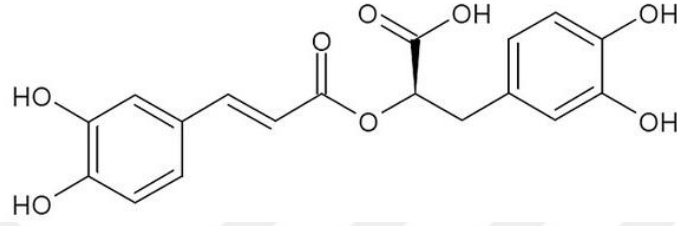
son ürünlerinin (AGE's), protein kinaz C'nin, heksozaminin ve poliol'ün artışına yol açar (Deng ve diğ., 2021). AGE'leri bağlayabilen çok ligandlı bir reseptör olan RAGE anlatımında artış meydana gelir. Artan ROS DNA hasarına yol açar ve hücre ölümüne ya da melanomaya neden olabilir. Bunun dışında, RAGE anlatımındaki artış inflamatuvar faktörlerin miktarında artışa yol açar. Dahası, kronik hipergliseminin stromal hücre-kökenli faktör 1 (SDF-1, "stromal cell-derived factor 1") ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS, "endothelial nitric oxide synthase") seviyelerinde düşüşe yol açmaktadır. Bu da inflamasyonun artışına ve yara iyileşmesinin gecikmesine neden olur. Ayrıca, hücredeki proteinlerin N-bağlı, O-bağlı ve O-GlcNAc glikozidik modifikasyonu bu proteinlerin fonksiyonunda değişimlere yol açarak hiperadeziv keratinosit fenotipi oluşumuna neden olur ve yara iyileşmesini geciktirir (de Jesus ve Ramakrishnan, 2015). Kandaki düzeyi kontrolsüz bir şekilde artan şekerin neden olduğu bütün bu değişimler, deride oluşan yaralanmalara veya enfeksiyonlara karşı derinin daha hassas olmasına neden olarak yara iyileşme süreçlerinde bozulmaları tetikler (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Deriyi etkileyen hiperglisemi ile ilişkili komplikasyonun bir özeti (de Jesus ve Ramakrishnan, 2015).

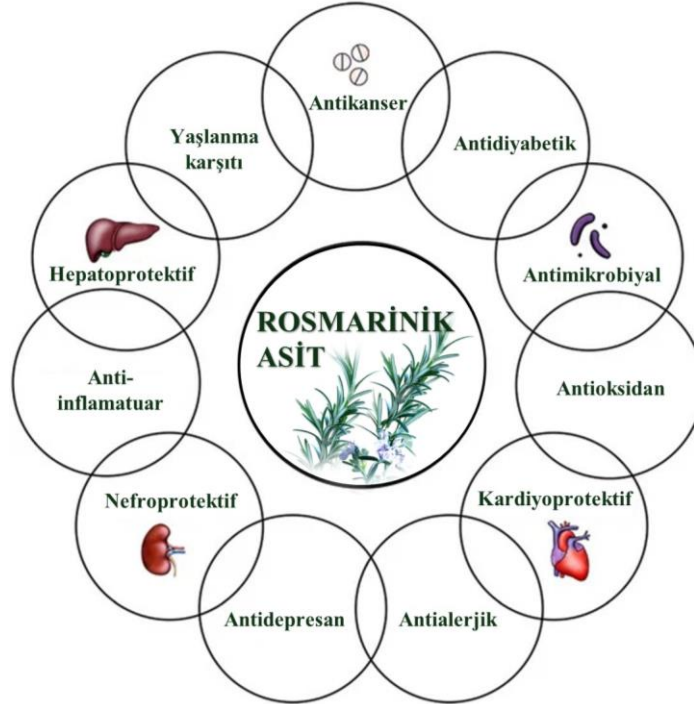
2.4. ROSMARİNİK ASİT

Rosmarinik asit (RA) birçok bitkide bulunan, kafeik asidin 3,4-dihidroksifenillaktik asitle (Şekil 2.5) esterleşmesi sonucunda oluşan doğal bir bileşiktir. İsmini ilk defa izole edildiği biberiyeden (*Rosmarinus officinalis*) almıştır. RA'nın ana kaynağı Oraginaceae familyasının Nepetoideae alt familyasına ait bitkilerdir (Gordo ve diğ., 2012).



Şekil 2.5: Rosmarinik asitin yapısı (Hitl ve diğ., 2021).

RA sahip olduğu antikanser, antidiyabetik, antidepresan, anti-inflamatuar, antiviral, antibakteriyel, antialerjik ve antioksidan aktivitelerle kardiyoprotektif, hepatoprotektif ve nefroprotektif etkiler gösterir. RA'nın terapötik spektrumu Şekil 2.6'da özetlenmiştir (Nadeem ve diğ., 2019).



Şekil 2.6: Rosmarinik asit ve potansiyel biyolojik aktiviteleri (Nadeem ve diğ., 2019).

2.4.1. Rosmarinik Asitin Yara İyileşmesindeki Rolü

Hem yan etkilerinin az olması hem de geniş terapötik etki spektrumu, yüksek antioksidan özellikli doğal bileşikler yara iyileşmesinde ön plana çıkarmaktadır (Comino-Sanz ve diğ., 2021; Vitale ve diğ., 2022). Özellikle, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri nedeniyle doğal bileşikler uzun yıllardır yara bakımında kullanılmış ve kullanılmaya da devam etmektedir (Amoah ve diğ., 2016; Noor ve diğ., 2022). Bunlar içerisinde yüksek antioksidan özelliğe sahip olan doğal polifenolik bileşik rosmarinik asitin *in vitro* ve *in vivo* deneylerle yara iyileştirme özelliği çeşitli çalışmalarla ortaya koyulmuş olsa da (Tablo 2.1) RA'nın bu etkisini hangi moleküler yollar üzerinden ve nasıl gerçekleştirdiği tam olarak aydınlatılamamıştır.

Ağırlıklı olarak son yıllarda yapılan çalışmalar RA'nın yara iyileştirme özelliği hakkında daha ayrıntılı bilgi sahibi olunmasını sağlamıştır. *In vitro* ve *in vivo* olarak yürütülen ve akut yaralarda RA uygulamasının etkilerini bildiren raporlar, RA'nın yara bölgesinde epitelizasyonu artırdığını (Küba ve diğ., 2021), fibroblast hücrelerinin çoğalmasını indüklediğini (Psotová ve diğ., 2003; Zhong ve diğ., 2023), fibroblast (Geller ve diğ., 2010) ve keratinosit (Lambrechts ve diğ., 2022) göçünü arttırarak yara bölgesinin daha hızlı kapanmasına katkı sağladığını göstermiştir. RA'nın yara bölgesinde antibakteriyel özelliği de rapor edilmiştir (Psotová ve diğ., 2003; Lambrechts ve diğ., 2022; Liu ve diğ., 2023). Yara oluşumu sonrası, RA uygulaması COX-2 (siklooksijenaz-2), PGE2 (Prostaglandin E2) anlatımı (Huang ve diğ., 2009) ve 5-LO (5-Lipoksijenaz) miktarını azaltmıştır (Psotová ve diğ., 2003). Enfekte yaralarda, RA'nın hidroksiprolin miktarını artırdığı, enfeksiyonu azalttığı ve yara kapanmasını hızlandırdığı gösterilmiştir (Chhabra ve diğ., 2020). UVB hasarına karşı RA'nın keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu artırdığı, apoptozu ve oksidatif stresi azalttığı ve Mrf-1 (mitofusin-1), Mrf-2 ve Drp-1 (dinamin-ilişkili protein 1) seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Gupta ve diğ., 2022). Diğer bir *in vitro* çalışma, RA'nın katalaz (CAT) ile süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinde artış sağlayarak antioksidan savunmayı güçlendirdiğini ve UVB hasarının oluşturduğu protein karbonillenme hasarını ve DNA hasarını azaltarak canlılığı artırdığını rapor etmiştir (Fernando ve diğ., 2016). UVB-ilişkili inflamasyonu azalttığı (Lembo ve diğ., 2014) ve ROS seviyelerini düşürdüğü ve apoptozu engellediği ortaya koyulmuştur (Vostalova ve diğ., 2010; Rodríguez-Luna ve diğ., 2019).

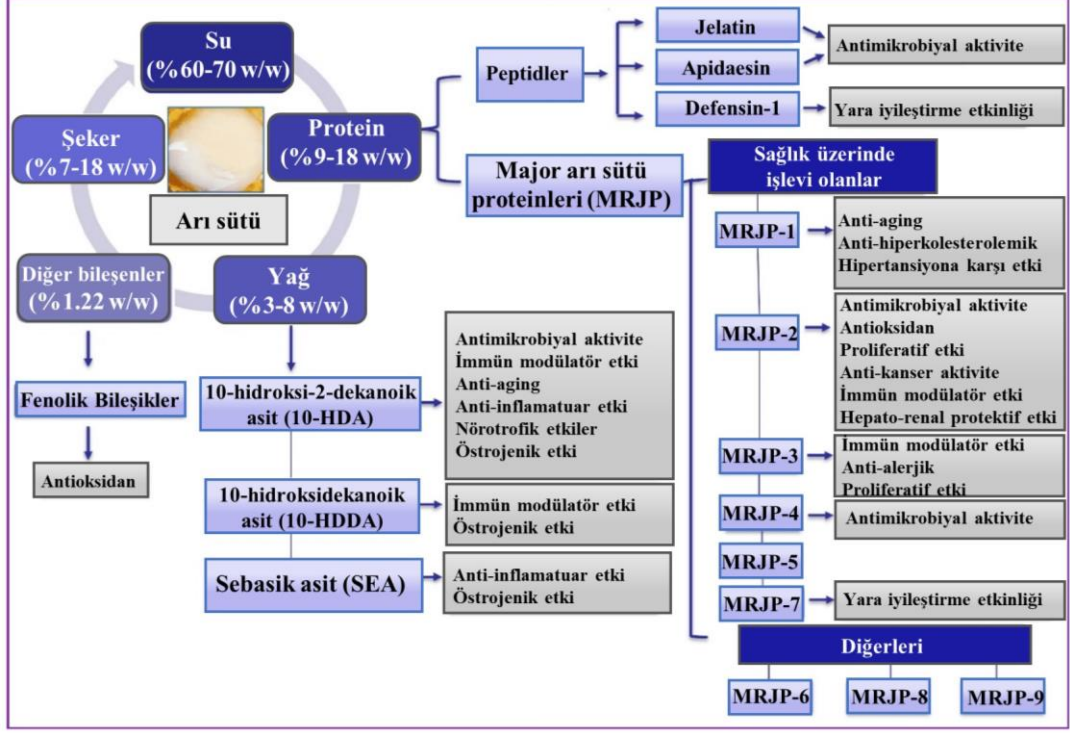
Tablo 2.1: Rosmarinik asitin (RA) yara iyileştirme potansiyeli hakkında yapılan çalışmalar ve bulguları.

Yara Tipi	Model	RA uygulaması sonucunda elde edilen bulgular	Kaynak
Akut yara	<i>in vivo</i>	Yara kapanması↑, Epitelizasyon↑	Küba ve diğ., 2021
Akut yara	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Fibroblast proliferasyonu↑, Yara kapanması↑, Epidermis ve granülasyon doksunun kalınlığı↑, MPO ⁺ ↑	Zhong ve diğ., 2023
Akut yara	<i>in vitro</i>	Fibroblast göçü↑	Geller ve diğ., 2010
Akut yara	<i>in vitro</i>	COX-2↓, PGE2↓, NO↓	Huang ve diğ., 2009
Akut yara	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	5-LO↓, Keratinosit ve Fibroblast proliferasyonu↑, LDL↓, TBARS↓, Antibakteriyel aktivite↑	Psotová ve diğ., 2003
Akut yara	<i>in vivo</i>	Yara kapanması↑, Antibakteriyel aktivite↑	Liu ve diğ., 2023
Akut yara	<i>in vitro</i>	Keratinosit göçü↑, Antibakteriyel aktivite↑	Lambrechts ve diğ., 2022
Enfekte yara	<i>in vivo</i>	Yara kapanması↑, Hidroksiprolin↑, Antibakteriyel aktivite↑	Chhabra ve diğ., 2020
UVB hasarı	<i>in vitro</i>	LDH↓, Canlılık↑, Cas3↓, DNA hasarı↓, Cas9 ↓, ROS↓, IL-6↓	Vostalova ve diğ., 2010
UVB hasarı	<i>in vitro</i>	IL-6↓, IL-8↓, MCP-1↓, TNF-α↓, IL-10↑	Lembo ve diğ., 2014
UVB hasarı	<i>in vitro</i>	Keratinosit ve Fibroblast proliferasyonu↑, Mfn-1↑, Mfn-2↑, Drp-1↓, ROS↓, Bcl2/BAX↑	Gupta ve diğ., 2022
UVB hasarı	<i>in vitro</i>	Protein karbonilme↓, DNA hasarı↓, Canlılık↑, Apoptotik hücre↓, CAT↑ SOD↑, Nrf2↑	Fernando ve diğ., 2016
UVB hasarı	<i>in vitro</i>	Canlılık↑, ROS↓, Apoptotik hücre↓, NLRP3↓, Cas1↓, IL-1β↓, ASC↓, Nrf2↑, HO-1↑	Rodríguez-Luna ve diğ., 2019

2.5. ARI SÜTÜ

Arı sütü (“Royal jelly”, RJ), genç işçi bal arılarının tüm genç larvaları üç gün, kraliçe arıyı ise yaşam boyu beslemek için ürettikleri kremi, sarımtırak bir arı ürünüdür (Knecht ve Kaatz, 1990; Liu ve diğ., 2008). RJ, en önemli özelliği, bal arısı larvalarının hızlı gelişmesini, iyi beslenmesini ve korunmasını sağlamasıdır (Scarselli ve diğ., 2005). Kraliçe arının doğurganlığı, yaşam süresi ve yumurtlama verimi de RJ alım miktarına ve süresine bağlıdır (Evans ve Wheeler, 1999). RJ içerdiği serbest amino asitler, bol miktarda protein, lipitler, vitaminler ve şekerler ile yüksek besin değerine sahiptir (Şekil 2.7) (Schmitzová ve diğ., 1988; Ahmad ve diğ., 2020). RJ’nin içerdiği protein ve lipit kompozisyonu biyolojik aktivitesinde etkili olan en önemli faktörlerdir. RJ’de bulunan en önemli lipit olan 10-HDA (10-Hidroksi-2-Dekenoik asit); antimikrobiyal, immünomodülatör ve anti-inflamatuar gibi aktiviteleri ile yara iyileştirme potansiyeli yüksek bir doğal bileşiktir. Yara iyileştirme özelliği gösterilmiş defensin-1 de RJ içerisinde bulunan çok önemli bir peptiddir. RJ’ye özgü proteinler olan MRJP

(“Major Royal Jelly Protein”)’ler, bugüne kadar tanımlanmış biyolojik aktiviteleri ile RJ’nin yara iyileştirme potansiyelini artırmaktadır (Tablo 2.7) (Ahmad ve diğ., 2020).



Şekil 2.7: Arı sütünün içeriğindeki temel biyolojik maddeler ve biyolojik aktiviteleri (Ahmad ve diğ., 2020).

Eski çağlardan beri arı ürünleri farmakolojik etkileri nedeniyle tamamlayıcı ilaç olarak kullanılmıştır (Pasupuleti ve diğ., 2017). RJ’nin insan sağlığı üzerinde terapötik bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için ilk olarak 1939 yılında antibakteriyel etkisine bakılmıştır (McCleskey ve Melampy, 1939). RJ, son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarla birlikte ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde önemli bir ticari ürün haline gelmiştir (Sabatini ve diğ., 2009). Yapılan çalışmalarda RJ’nin antimikrobiyal, anti-inflamatuar, immün modülatör, antioksidan, anti-aging, anti-alerjik, yara iyileştirici, anti-kanser gibi etkileri gösterilmiştir (Ramanathan ve diğ., 2018; Ahmad ve diğ., 2020; Collazo ve diğ., 2021).

2.5.1. Arı Sütünün Yara İyileşmesindeki Rolü

Bitki özleri ya da bunların aktif bileşenlerinin yara iyileşmesindeki etkisi kadar arı ürünleri de yara iyileştirme potansiyeli yüksek doğal alternatiflerdir (Oryan ve Alemzadeh, 2017; Weis ve diğ., 2022). Apiterapi ürünleri içerisinde önemli bir yere sahip olan ve içeriğinde çok sayıda

biyoaktif peptid bulunan arı sütü, antik çağlardan beri, çeşitli cilt yaralanmalarının tedavisinde tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır (Bucekova ve diğ., 2017). RJ'nin antimikrobiyal (Bărnăușiu ve diğ., 2011; Tseng ve diğ., 2011; Klaudiny ve diğ., 2012), antioksidatif (Nagai ve diğ., 2006; El-Nekeety ve diğ., 2007) anti-inflamatuar (Karaca ve diğ., 2012; Sugiyama ve diğ., 2012) ve büyümeyi teşvik edici (Kamakura ve diğ., 2001) özelliklere sahip bir immün modülatör (Mihajlovic ve diğ., 2014) olarak görev yapması yara iyileştirmede önemli bir potansiyel taşıdığını göstermektedir.

RJ ile topikal tedavinin, hayvan modellerinde ve hatta diyabetik ayak ülserlerinde enfekte olmuş veya olmamış yaraların iyileşme süresini kısaltabileceği gösterilmiş olmasına rağmen (Temamogullari ve diğ., 2007; Abdelatif ve diğ., 2008; El-Gayar ve diğ., 2016), yara iyileşmesi ile ilgili moleküllerin ve moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar sınırlı kalmıştır. RJ'nin insan fibroblast hücrelerinde çizik yara modelinde göçü artırarak yara kapanmasını hızlandırdığı ve hücrelerdeki lipid içeriğinde artış sağladığı gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2010). Belirgin hiperglisemisi olan diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, RJ'nin yara iyileşmesini önemli derecede hızlandırdığı bildirilmiş, fakat etki ettiği moleküler yollar hakkında bilgi rapor edilmemiştir (Rashidi ve diğ., 2016). RJ fraksiyonlarının yara iyileştirici etkisini araştıran bir grup, insan epidermal keratinosit hücrelerinde başlıca arı sütü proteinlerinin (MRJP2, MRJP3 ve/veya MRJP7) potansiyel yara iyileştirici biyoaktiviteye sahip olduğunu vurgulamış ve arı sütü kökenli bu proteinlerin indüklediği hücreyel çoğalma ve göç yoluyla RJ'nin yara kapanması üzerindeki iyileştirici etkisini raporlamışlardır (Lin ve diğ., 2019). Aynı grup bir sonraki yıl çıkardıkları makalede ise RJ'nin LPS (lipopolisakkarit)-indüklü inflamasyonu azalttığını ve *in vivo* hayvan yara modelinde de yara bölgesinin kapanmasını hızlandırdığını ortaya koymuştur (Lin ve diğ., 2020). Literatürde RJ'nin akut yaralarda inflamasyonun azalmasında ve anjiyogenezin artışında rol oynadığına ve fibroblast proliferasyonu ile göçünü artırarak yara kapanmasını hızlandırdığına dair güncel yayınlara rastlanmıştır (Ramírez ve diğ., 2020; Álvarez ve diğ., 2023; Tan ve diğ., 2023). Enfekte yaralarda da RJ'nin antimikrobiyal aktivitesi ile inflamasyonun azalmasında işlev gördüğü ve anjiyogenezi artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (Lin ve diğ., 2021; Álvarez ve diğ., 2023). *In vivo* mide ülseri (Sofiabadi ve Samiee-Rad, 2020) ve klinik diyabetik ayak ülserinde (Siavash ve diğ., 2011) yapılan çalışmalar, RJ'nin yara bölgesinin iyileşmesinde terapötik etkiye sahip olduğunu belirtmektedir. UVB hasarı üzerinde yapılan çalışmalar ise, RJ'nin inflamasyonu azalttığı (Fatmawati ve diğ., 2019), oksidatif stresi ve DNA hasarını

engellediği (Seo ve diğ., 2010), MMP seviyelerinde azalmaya yol açtığı (Kim ve diğ., 2020) ve fibroblastların proliferasyonunu artırdığı (Park H.M. ve diğ., 2011) yönündedir. RJ'nin yara iyileşmesi üzerine etkilerini ortaya koyan bu çalışmalar ve sonuçları Tablo 2.2'de özetlenmiştir. Literatürdeki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara rağmen RJ'nin yara kapanmasındaki moleküler etki mekanizmasının belirsizliğini koruduğu görülmektedir.

Tablo 2.2: Arı sütünün (RJ) yara iyileştirme potansiyeli hakkında yapılan çalışmalar ve bulguları.

Yara Tipi	Model	RJ uygulaması sonucunda elde edilen bulgular	Kaynak
Akut yara	<i>in vivo</i>	Yara kapanması↑, Epitelizasyon↑	Temamogullari ve diğ., 2007
Akut yara	<i>in vitro</i>	Fibroblast göçü ve proliferasyonu↑, Kolesterol↓ Sfinganin↑	Kim ve diğ., 2010
Akut yara	<i>in vitro</i>	Keratinosit göçü ve proliferasyonu↑	Lin ve diğ., 2019
Akut yara	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Keratinosit göçü ve proliferasyonu↑, AQP3↑, İnflamasyon↓, TNF-α↓	Lin ve diğ., 2020
Akut yara	<i>in vitro</i>	Fibroblast göçü ve proliferasyonu↑, Antibakteriyel aktivite↑	Ramírez ve diğ., 2020
Akut yara	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Fibroblast göçü ve proliferasyonu↑, IL-10↑, TGF-β↑, IL-6↓, TNF-α↓, α-SMA↑ Yara kapanması↑, Anjiyogenez↑, VEGF↑,	Tan ve diğ., 2023
Akut yara / Enfekte yara	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	IGF↑, FGF↑, VEGF↑, HGF↑, IL-1↓, IL-6↓, TNF-α↓, Antibakteriyel aktivite ↑, Yara kapanması↑, Epitelizasyon↑, İnflamatuvar hücre sayısı↓	Álvarez ve diğ., 2023
MRSA ile enfekte yara	<i>in vivo</i>	Yara kapanması↑, Antibakteriyel aktivite↑	El-Gayar ve diğ., 2016
Kutanöz yara	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Keratinosit göçü ve proliferasyonu↑, AQP3↑, İnflamasyon↓	Lin ve diğ., 2021
Diyabetik yara	<i>in vivo</i>	Yara kapanması↑	Rashidi ve diğ., 2016
Diyabetik ayak ülseri	klirik çalışma	Yara kapanması↑	Abdelatif ve diğ., 2008
Diyabetik ayak ülseri	klirik çalışma	Yara kapanması↑	Siavash ve diğ., 2011
Mide ülseri	<i>in vivo</i>	Ülser derinliği↓, Epitelizasyon↑, Fibroblast sayısı↑, Anjiyogenez↑	Sofiabadi ve Samiee-Rad, 2020
UVB hasarı	<i>in vitro</i>	Fibroblast proliferasyonu↑, TGF-β↑	Park H.M. ve diğ., 2011
UVB hasarı	<i>in vivo</i>	SOD aktivitesi↑, GSH-Px aktivitesi↑, CAT aktivitesi↑, DNA hasarı↓	Seo ve diğ., 2010
UVB hasarı	<i>in vivo</i>	Nrf2↑, NF-κB↓, TNF-α↓	Fatmawati ve diğ., 2019
UVB hasarı	<i>in vitro</i>	MMP-1↓, MMP-3↓	Kim ve diğ., 2020

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü çalışmaları ultraviyole (UV) lambalarla aseptik koşulların sağlandığı özel hücre kültürü laboratuvarında bulunan laminar hava akımlı, UV ile steril edilmiş kabinde (MGK120 Class II, Microtest) gerçekleştirildi. Hücreler, %90'dan yüksek bağıl neme sahip ve %5 CO₂ sağlayan 37°C'deki etüvlerde çoğaltıldı. Tüm kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri steril edilerek kullanıldı.

3.1.1. Hücre Hatları ve Besiyerleri

Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hatları İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültürü Koleksiyonundan alındı. Yara çalışmaları için insan sünnet derisi fibroblast hücre hattı (HFF), insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ve anjiyogenez çalışmaları için insan umbilikal ven endotel hücre hattı (HUVEC) kullanıldı.

Hücreler RPMI ("Roswell Park Memorial Institute") 1640 (Gibco 51800)" besiyerinde kültürlendi. Toz haldeki besiyeri (10.43 g/L) dH₂O kullanılarak çözündürüldü ve içerisine sodyum bikarbonat (2 g/L, Sigma S5761) eklendi ve steril kabinde, por çapı 0.22 µm olan mikrofiltre (Meck Millipore Millex-GS) ile steril edildi. İçeriğinde 2 g/L D-glukoz ve L-Glutamin bulunan besiyerine kullanımdan önce son konsantrasyonu %1 (v/v) olacak şekilde antibiyotik-antimikotik solüsyonu [penisilin (100 U/mL), streptomisin (100 µg/mL), amfoterisin B (0.25 µg/mL), Sigma-Aldrich A5955)] ve %10 (v/v) olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş FBS ("Fetal Bovine Serum", Gibco 10500) eklendi. Soğukta (4°C) saklanan hazırlanmış besiyeri kullanımdan önce 37°C'lik su banyosunda bekletilerek ısıtıldı.

3.1.2. Hücrelerin Büyüme Kinetiğinin Analizi

HFF ve HaCaT hücreleri için jenerasyon süresini hesaplamak ve lag, log (logaritmik büyüme), durağan ve ölüm fazlarının belirlenmesi amacıyla büyüme kinetiği analizi yapıldı. RPMI 1640 besiyerindeki hücreler (sırasıyla, 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL) 24-kuyucuklu kültür kaplarına ekilip, %5 CO₂ içeren 37°C'lik hücre etüvünde 10 gün boyunca inkübe edildi ve her gün sayıldı. Hücre sayımları Neubauer lamı hemositometresi ile, aşağıda anlatıldığı şekilde yapıldı.

Hücre büyüme kinetiğinin belirlenmesi için ekim sonrası, her gün 24-kuyucuklu kültür kabının 3'er kuyusundaki hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve besiyeri eklendi. Elde edilen hücre süspansiyonundaki hücre sayısı belirlendi. Bunun için 20 µL hücre süspansiyonu 20 µL tripan mavisi [Merck 111732, %0.5 (w/v) D-PBS içinde hazırlandı] ile karıştırıldıktan sonra, hemositometrenin her iki sayım alanına da 10 µL bu karışımdan eklendi ve ışık mikroskobu altında canlı hücreler (renksiz) sayıldı. Ölü hücrelerin maviye boyandığı gözlemlendi. Sayım işlemi her gün aynı saatte tekrarlandı (Freshney, 2010). Hücre büyüme grafiği GraphPad Prism® v7 programı yardımıyla çizildi ve hücrelerin lag, log, durağan ve ölüm fazları belirlendi. Jenarasyon sayısı (n) ve süresi (Gt) aşağıda verilen Denklem 3.1 ve 3.2 ile hesaplandı (Moat, 2002).

$$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2 \quad (3.1)$$

$$Gt = (T_2 - T_1) / n \quad (3.2)$$

N_1 : Logaritmik bölünme evresinin başlangıcındaki hücre sayısı

N_2 : Logaritmik bölünme evresinin sonundaki hücre sayısı

T_1 : Logaritmik bölünme evresinin başlangıç zamanı

T_2 : Logaritmik bölünme evresinin bitiş zamanı

3.1.3. Altkültürleme ve Hücre Stoklama İşlemleri

Hücreler yapılacak deney ve uygulamalara göre 25 cm² (T25) ya da 75 cm²'lik (T75) hücre kültür kaplarında kültürlendi. Altkültürleme işlemi için, ilk önce hücre üzerinde bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyi, otoklavda (Nüve OT 012 Masa Üstü Buharlı Sterilizatör, 121°C, 1.2 atmosfer basınç, 15 dk) steril edilmiş D-PBS ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline", pH 7.2, Gibco 21600) (0.2 mL/cm²) ile yıkandı. Ardından, hücreleri yüzeyden kaldırmak için D-PBS içerisinde tripsin [%0.2 (w/v), Sigma T-4799] ve EDTA'nın [etilendiamintetraasetik asit, %0.04 (w/v), Invitrogen 15576] çözündürülmesi ve 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilmesiyle hazırlanan Tripsin/EDTA çözeltisi (T25 için 1 mL) eklendi ve hücreler etüve kaldırıldı. Altkültürleme işlemi yapılan hücreye bağlı olarak 1-5 dk inkübasyondan sonra ayrılan hücrelerin üzerine besiyeri (0.2 mL/cm²) eklendi (Tripsin/EDTA çözeltisinin aktivitesini ortadan kaldırmak için) ve hücre süspansiyonu hemositometre (Neubauer lamı) yardımıyla sayıldı. İstenen sayıda hücre, kültür kabına koyularak altkültürleme işlemi tamamlandı. Daha sonra hücreler %90'dan yüksek bağıl neme sahip ve %5 CO₂ sağlayan

37°C'lik etüve kaldırıldı. Yaklaşık 3-4 günde bir bu altkültürleme işlemi tekrarlandı. Deneylerde hücrelerin 3-15 numaralı pasajları kullanıldı.

Hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla belirli sürelerde hücreler dondurma işlemi yapılarak saklandı ve gerektiğinde kültür, bu stokların açılması ile yeniden başlatıldı. Hücre dondurma işlemi için, hücreler tripsinize edildi ve hücre süspansiyonu 15 mL'lik tüpe alınarak santrifüjde (Nüve NF400) döndürüldü (3000 rpm, 5 dk). Üst faz uzaklaştırıldı ve hücre pelleti, hücre dondurma solüsyonunda [%45 (v/v) FBS, %45 (v/v) besiyeri ve %10 (v/v) DMSO (dimetil sülfoksit, Sigma D8418)] çözündürüldü. Elde edilen hücre süspansiyonu steril kriyotüp içine konuldu ve kademeli dondurma işlemi yapıldı. Önce -20°C'de dondurulan hücreler ardından -156°C'de uzun süreli saklandı. Yeni hücre açmak için, çözölen dondurulmuş hücreler 15 mL'lik tüpe aktarıldı. Üzerine 5 mL besiyeri eklenip pipetajlandı ve santrifüjlendi (3000 rpm, 5 dk). Üst faz atıldı ve tüpe 8 mL taze besiyeri eklenip yavaşça pipetajlandı. Hücre süspansiyonu steril bir kültür kabına (T25) aktarıldı. Hücreler 37°C'lik etüve kaldırıldı.

3.2. HÜCRE CANLILIK TESTİ

Deney ve kontrol gruplarındaki hücrelere yapılan uygulamaların sitotoksik ve proliferatif etkileri MTT kolorimetrik yöntemi ile değerlendirildi. MTT yöntemi, sarı renkli MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)'nin hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz tarafından suda çözünmeyen mor renkteki formazan kristallerine çevrilmesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında MTT yöntemi, Mosmann (1983) tarafından geliştirilmiş yöntemde bazı modifikasyonlarla uygulandı. Hücrelerin (1×10^4 hücre/kuyucuk) 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekiminden bir gün sonra UVB, yüksek glukoz, rosmarinik asit ve arı sütünü uygulamalarına başlandı. Uygulamaların bitiminde, hücre üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 30 µL MTT (5 mg/mL, D-PBS içinde hazırlandı, neoFroxx 1334) çözeltisi eklenip 3 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için 150 µL DMSO (dimetilsülfoksit, Merck 8414) eklendi ve oda sıcaklığında bir çalkalayıcı (150 devir/dk, Heidolph Unimax 1010) çalkalandı. Çözünme işlemi bittikten sonra renkli ürünün 540 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometre (EON mikropilaka okuyucu, BioTek Instruments Inc.) yardımıyla belirlendi. Hücre canlılığı Denklem 3.3 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ canlılık} = \left(\frac{\text{Deney grubuna ait absorbans}}{\text{Kontrol grubuna ait absorbans}} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

3.3. *In vitro* YARA MODELLERİNİN OLUŞTURULMASI

3.3.1. *In vitro* Çizik Deneyi

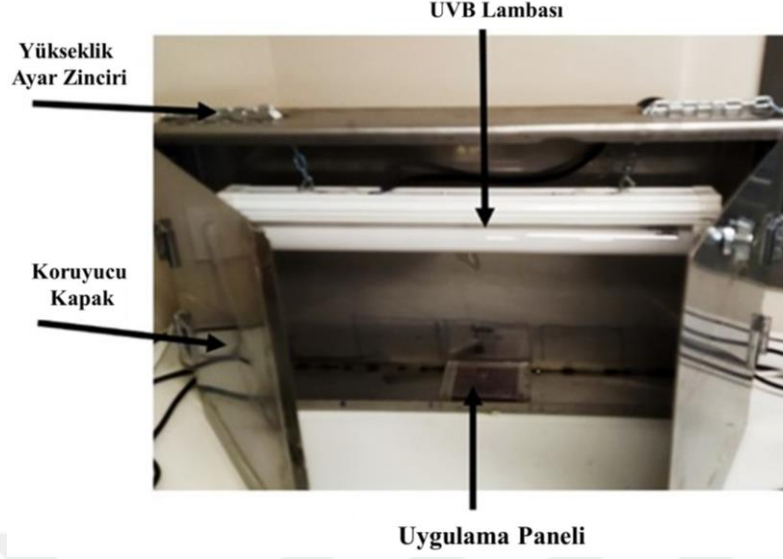
Deri hücrelerinde oluşturulan yaraları *in vitro*'da analiz etmek için çizik yara deneyi ("*in vitro* scratch wound assay") yapıldı. Hücreler, 24-kuyucuklu kültür kabına 6×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 37°C 'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücre yüzeyine p1000 pipet ucu yardımı ile yatay ve dikey olacak şekilde iki adet çizik atıldı. Kalan hücreleri uzaklaştırmak için D-PBS ile bir kere yıkama yapıldı. Daha sonra hızlı bir şekilde yüzeyde oluşan artı şeklinin bir kolu dijital kamera-ataçmanlı (ToupTek Photonics XP1080HD) invert mikroskop (OLYMPUS® CKX31) kullanılarak fotoğraflandı ve bu görüntü 0. saat verisi olarak kaydedildi. Kontrol grubuna yalnızca besiyeri konulurken, deney gruplarına ilgili uygulama yapıldıktan sonra hücreler 37°C 'lik etüve kaldırıldı. Çizik alanının 24 ve 48 saat sonraki görüntüleri de aynı şekilde kaydedildi. Elde edilen görüntülerdeki çizik alanları ImageJ yazılımı ile kantitatif olarak değerlendirildi. Oluşturulan çizik (yara) alanının kapanma düzeyi aşağıda verilen Denklem 3.4'e göre hücre migrasyonu (%) cinsinden hesaplandı.

$$\text{Hücre migrasyonu (\%)} = \left(\frac{0. \text{ saat çizik alanı} - 24 \text{ veya } 48. \text{ saatt çizik alanı}}{0. \text{ saat çizik alanı}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

3.3.2. UVB Uygulaması

UVB uygulamaları deri hücrelerinin UVB hasarı sonrası gelişimleri ile bu hasar üzerinde rosmarinik asit ve arı sütünün etkilerini araştırmak için gerçekleştirildi. UVB uygulaması için $10 \times 70 \times 40$ cm ölçülerinde 304 kalite paslanmaz çelikten özel bir dolap geliştirildi (Şekil 3.1). Dolabın üst kısmına lambayı bağlamak ve yüksekliğini ayarlamak için bir zincir monte edildi. UVB kaynağı olarak Philips marka "TL 20W/01 UVB Darbant Floresan Ampul" kullanıldı. UVB lambanın uygulama paneline verdiği ışık yoğunluğu UV ışık ölçer (UV light meter Extech SDL470) ile 0.35 mW/cm^2 olarak ölçüldü. Hücrelere 50, 100, 200 ve 300 mJ/cm^2 enerji vermek için kullanılacak süre Denklem 3.5 ile hesaplandı. Buna göre, belirtilen UVB dozlarına maruz bırakmak için hücreler 2 dk 37 sn, 5 dk 13 sn, 10 dk 26 sn ve 15 dk 39 sn boyunca UVB dolabı içinde tutuldu.

$$\text{Süre (saniye)} = \frac{\text{mJ/cm}^2}{\text{mW/cm}^2} \quad (3.5)$$



Şekil 3.1: UVB uygulamasının yapıldığı dolap ve UVB lambası.

UVB uygulaması için hücreler 96-kuyucuklu kültür kaplarına ve 6-kuyucuklu kültür kaplarına sırasıyla 1×10^4 hücre/kuyucuk ve 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edildi. Daha sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 96-kuyucuklu kültür kaplarına 50 μL D-PBS, 6-kuyucuklu kültür kaplarına ise 500 μL D-PBS eklendi ve kaplar UVB cihazına yerleştirildi. UVB optimizasyonu için 50, 100, 200 ve 300 mJ/cm^2 UVB uygulaması yapıldı ve işlem sonunda hücrelerin üzerindeki D-PBS uzaklaştırılıp besiyeri eklendi. Kontrol grubu hücreleri ise UVB uygulama süresi kadar D-PBS'te bekletildi. Hücrelere uygulanacak UVB dozunu seçmek için UVB'nin hücre canlılığına, hücre içindeki ROS miktarına ve apoptotik yanıtlara etkisi incelendi. Doz belirlemesi yapıldıktan sonra, seçilen doz ($100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) hücrelere uygulandı ve deney grubu hücreleri, UVB hasarına karşı terapötik etkileri araştırılacak olan rosmarinik asit ve arı sütü içeren besiyerlerine aktarıldı.

3.3.3. Yüksek Glukoz Uygulaması

Yüksek glukoz uygulaması, deri hücrelerinin yüksek glukoz ortamındaki gelişimleri sırasında meydana gelen hasarlar üzerine rosmarinik asit ve arı sütünün etkilerini araştırmak için gerçekleştirildi. Bu kapsamda önce glukoz dozunu belirlemek için hücrelere 25, 50, 100 ve 200 mM glukoz uygulaması yapıldı. Bu işlem için, hücreler 6-kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak 11 mM glukoz içeren RPMI 1640 besiyerine ekildi ve 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı ve

25, 50, 100 ve 200 mM glukoz içeren RPMI 1640 besiyeri eklendi ve hücreler 24, 48 ve 72 saat 37°C’de inkübe edildi. Hiperglisemi-benzeri yüksek glukoz ortamı yaratmak için en uygun dozu ve uygulama süresini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlardaki glukoz ile farklı sürelerde işlem görmüş hücrelerde hücre canlılığı, hücre içindeki ROS miktarı, apoptotik yanıt ve protein karbonillenme durumları değerlendirildi. Yapılan analizler sonucunda, 24 saat boyunca 50 mM glukoz uygulanan hücrelerde yeterince hasar olduğu gözlemlendiğinden deneylere bu uygulama ile devam edildi. Bu işlem tamamlandıktan sonra deney grubu hücreleri, terapötik etkileri araştırılacak olan rosmarinik asit ve arı sütünü içeren besiyerlerine aktarıldı.

3.4. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜ UYGULAMALARI

3.4.1. Rosmarinik asit ve Arı Sütünün Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Rosmarinik asit (RA) ve arı sütü (RJ) maddelerinin deri üzerindeki terapötik etkilerini belirlemek için ilk olarak sitotoksik ve proliferatif etkileri incelendi. Rosmarinik asit (Sigma, 536954) 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözündürüldü. Çalışmada kullanılmak üzere Altıparmak Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Balparmak) tarafından hediye edilen liyofilize RJ ise 50 mg/mL olacak şekilde DMSO içerisinde çözündürüldü. RJ’nin tedarikçi firma tarafından yapılan içerik analizi sonuçları EK 1’de verildi.

RA ve RJ’nin sitotoksik ve proliferatif etkilerini değerlendirmek için hücreler 96-kuyucuklu kültür kaplarına (1×10^4 hücre/kuyucuk) ekildi ve 24 saat boyunca 37°C’lik hücre etüvünde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelere belirli dozlarda RA (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M) ve RJ (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ g/mL) uygulandı ve 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C’de hücre etüvünde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek için MTT testi yapıldı. Düşük konsantrasyonda ve kısa sürede proliferatif etki gösteren RA ve RJ dozları ile kombine örnekler hazırlandı.

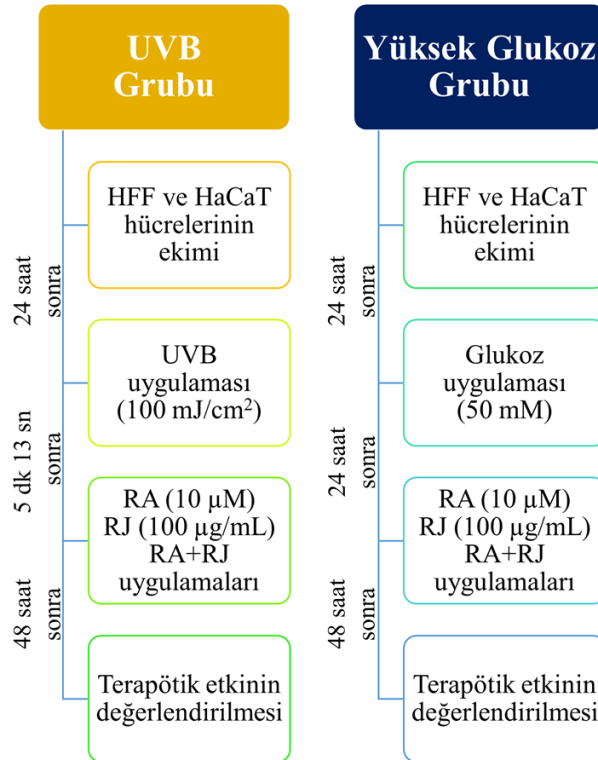
3.4.2. Rosmarinik asit ve Arı Sütünün Kombine Dozlarının Belirlenmesi

RA ve RJ’nin tekli uygulamalarıyla gerçekleştirilen MTT testlerinin sonuçlarına göre, RA (5 μ M ve 10 μ M) ve RJ (100 μ g/mL ve 250 μ g/mL) içeren 4 farklı kombinasyon için 48 saatlik uygulama yapılmasına karar verildi. Daha sonra bu karışımlar arasında en etkili olanını bulmak için önce sitotoksiteleri MTT testi ile, ardından akut yaradaki etkinlikleri çizik yara deneyi ile

kontrol edildi. Ayrıca, çizik deneyi sonrası toplanan hücrelerde hücre proliferasyonunda işlev gören marker proteinlerin anlatım analizleri yapıldı.

Ön çalışmalardan elde edilen veriler, test edilen örnekler arasında en etkin konsantrasyonların RA için 10 μM ve RJ için 100 $\mu\text{g/mL}$ olduğu belirlendiğinden ileri deneyler bu dozlarla gerçekleştirildi. Bu dozların UVB ve yüksek glukoz uygulaması sonrasındaki etkileri moleküler yöntemlerle analiz edildi. 100 mJ/cm^2 UVB uygulandıktan sonra, UVB grubuna sadece besiyeri eklenirken, maddelerin etkilerinin analiz edileceği deney gruplarına ise besiyerleri içerisinde RA ve RJ'nin seçilen tek ve kombine uygulama dozları eklendi. Hücreler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bittikten sonra hücrelere yapılacak diğer analizlere geçildi. Yüksek glukoz grubunda ise, 24 saat boyunca 50 mM glukoz uygulanmış hücrelere, 50 mM glukoz içeren besiyerinde hazırlanan RA ve RJ'nin tek ve kombine dozları uygulandı ve hücreler 48 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler toplanarak ileri moleküler analizlere geçildi.

Tez kapsamında gerçekleştirilen UVB ve yüksek glukoz uygulamaları ile RA ve RJ uygulamalarının yapıldığı zamanları gösteren deney akış şeması Şekil 3.2'de verildi.



Şekil 3.2: Çalışma kapsamında oluşturulan UVB ve yüksek glukoz gruplarına rosmarinik asit (RA) ve/veya arı sütü (RJ) maddelerinin uygulanış zamanları.

3.5. ANJİYOGENİK ETKİ ANALİZİ

Seçilen RA ve/veya RJ dozlarının anjiyogenezi nasıl etkileyeceği “*in vitro* endotel tüp oluşumu deneyi” ile değerlendirildi. Bu deney için HUVEC hücre hattı (insan umbilikal ven endotel hücreleri) kullanıldı. Bu deneyin amacı, yara iyileşmesinde önemli bir paya sahip olan damarlaşma hakkında bilgi toplamaktır. Endotel hücreleri ekstraselüler matriks (ECM) üzerinde farklılaşarak tüp oluşturma özelliği gösterdiğinden bu amaca çok uygundur (DeCicco-Skinner ve diğ., 2014). Bu analiz için, 4°C’de sıvı formunda olan Matrigel (50 µL) 96-kuyucuklu kültür kabının kuyusuna dikkatlice (hava kabarcığı oluşturmada) konuldu ve 37°C’de 30 dk bekletildi. Hücre sayımı, serumsuz-besiyerindeki HUVEC hücre süspansiyonunun 1×10^5 hücre içeren hacmi alındı ve 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Her kuyuya 50 µL içerisinde 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekildi. Ekim işleminin hemen ardından 50 µL içerisinde RA (10 µM) ve/veya RJ (100 µg/mL) bulunan besiyeri eklendi. Kontrol grubu üzerine sadece besiyeri eklendi. Hücreler 37°C’lik etüve kaldırıldı ve belirli aralıklarla HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma durumu dijital kamera-ataçmanlı invert mikroskopla kontrol edildi ve 12 saat sonra alınan fotoğraflar ImageJ (NIH) yazılımı ile değerlendirilerek örneklerin anjiyogenik potansiyeli hakkında bilgi edinildi.

3.6. HÜCRE İÇİ ROS ANALİZİ

3.6.1. Spektroflorometrik Yöntem

Kontrol ve deney gruplarındaki hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini analiz etmek için membran geçirgen olan ancak floresan olmayan bir prob olan 2,7-dikloroflorosein diasetat (DCFH₂-DA) kullanıldı. DCFH₂-DA hücre içine girince hücrede bulunan esterase tarafından kesilir. Oluşan DCF-H₂ (2,7-dikloroflorosein) hücre içi ROS’lar tarafından oksitlenerek floresan ışımaya yapabilen oksitlenmiş formuna (DCF) dönüşür. Yayılan floresan ışımının ölçülmesiyle hücre içinde bulunan ROS miktarı saptanır (Reiniers ve diğ., 2017). ROS analizi için, hücreler 96-kuyucuklu siyah kültür kabına 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, UVB ve hiperglisemi uygulamaları yapıldı. Ardından RA ile RJ uygulamaları gerçekleştirildi. Hücrelerin üzerindeki besiyerleri inkübasyon süreleri bittikten sonra uzaklaştırıldı ve D-PBS ile bir kere yıkandı. Hanks dengeli tuz çözeltisi (“Hanks’ Balanced Salt Solution” HBSS, Sigma H6648) içerisinde 10 µM olacak şekilde hazırlanan DCFH₂-DA (Sigma D6883)’dan kuyu başına 100 µL eklendi ve 37°C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon

süresi bittikten sonra hücreler HBSS ile bir kez yıkandı. Her kuyuya 100 µL HBSS ekledi ve DCF ışımasının ölçümü için spektrofloreometrede (FLx800, BioTek) 495 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında kinetik ölçümler alınarak floresan ışımanın yoğunluğu belirlendi. Sonuçlar, hücre sayısı ile normalize edildi.

3.6.2. Floresan Mikroskop Analizi

Deney ve kontrol gruplarındaki hücrelerde oksidasyon seviyeleri DCFH₂-DA kullanılarak floresan mikroskopta belirlendi. Hücreler 8-kuyucuklu kültür lamalarına (Nunc™ Lab-Tek™ II, Thermo) kuyu başına 2×10⁴ hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler UVB ve yüksek glukoz maruz bırakıldıktan sonra D-PBS ile yıkandı. Hücreler daha sonra 10 µM DCFH₂-DA (100 µL/kuyucuk) ile 37°C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası D-PBS ile 2 kez yıkama yapıldı ve hücrelerin nükleuslarını floresan mikroskopta görünür hale getirmek için Hoechst-33342 boyası (Invitrogen H-1399, 5 µg/mL) ile boyama işlemi uygulandı. Hücreler 2 defa D-PBS ile yıkandı ve ardından üretici firmanın ayıraç aparatı yardımı ile odacıklar lam üzerinden çıkarıldı. Daha sonra % 87’lik gliserol (AppliChem) kullanılarak bir lamel yardımıyla lam kapatıldı. DCF ışıması ve Hoechst boyaması konfokal floresan mikroskopta (Leica SPE2, Germany) uygun filtreler kullanılarak gözlemlendi. DCF için kullanılan eksitasyon ve emisyon dalga boyları, sırasıyla 495 ve 525 nm iken, Hoechst için 350 ve 461 nm olarak seçildi. Konfokal mikroskop kullanılarak fotoğrafı çekilen hücrelerin içerisindeki DCF floresan ışımasının seviyeleri ImageJ (NIH) yazılımı ile analiz edildi.

3.7. HOECHST ve PROPİDYUM İYODÜR (HO/PI) BOYAMAYLA APOPTOZ ANALİZİ

Deney ve kontrol gruplarında meydana gelen apoptozu görüntülemek için Hoechst ve propidyum iyodür (HO/PI) boyaması yapıldı ve hücreler konfokal floresan mikroskopta incelendi. Hoechst-33342 (HO, Invitrogen H-1399) membran geçirgenliği yüksek olan, DNA’ya bağlanan ve mavi floresan ışıma yapan bir boyadır. Propidyum iyodür (PI, Invitrogen P1304MP) ise membran bütünlüğü kaybolmuş hücrelere geçiş yapabilen ve DNA’ya bağlanabilen kırmızı bir floresan boyadır. Bu iki boya kullanılarak deney gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre oranları belirlendi. İlk önce hücreler kuyu başına 2×10⁴ hücre olacak şekilde 8-kuyucuklu kültür lamalarına (Nunc™ Lab-Tek™ II, Thermo) ekildi. UVB, yüksek glukoz, RA ve/veya RJ uygulamalarından sonra, hücreler D-PBS ile yıkandı ve ardından son

konsantrasyonları 5 µg/mL olacak şekilde besiyerinde hazırlanmış HO ve PI boyları ile 37°C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon işlemi bitiminden sonra hücreler iki defa D-PBS ile yıkandı ve lamın üstünde bulunan odacıklar üretici firmanın ayıraç aparatı kullanılarak çıkarıldı. Lamın üzerindeki bütün sıvı uzaklaştırıldıktan sonra %87’lik gliserol (AppliChem) yardımıyla lamel kapatıldı. Konfokal floresan mikroskobu (Leica SPE2 confocal microscope, Germany) ile HO/PI boyama gözlemlendi ve görüntüler fotoğraflandı. HO için kullanılan eksitasyon/emisyon dalga boyları 350/461 nm, PI için ise 535/617 nm olarak ayarlandı. Fotoğraflardaki toplam hücre sayısı ImageJ yazılımı kullanılarak, apoptotik ve ölü hücreler ise manuel olarak sayılarak belirlendi.

3.8. İMMÜNOFLORESAN İŞARETLEME

Deney ve kontrol grubu hücrelerde hedef proteinlerin hücre içi lokasyonları ve miktarlarındaki değişimleri tespit etmek için immünofloresan (IF) işaretleme yapıldı. Hücreler 8-kuyucuklu kültür lamalarına (Nunc™ Lab-Tek™ II, Thermo) kuyu başına 2×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Tüm uygulamaların (UVB, yüksek glukoz, RA ve/veya RJ uygulamaları) ardından hücreler D-PBS ile yıkandı. Hücreler %4 (w/v) paraformaldehit ile 20 dk 37°C’de inkübasyona bırakılarak fikse edildi. Daha sonra D-PBS ile iki defa yıkanan hücreler, bloklama-permeabilizasyon işlemi için, %1 (w/v) BSA (Sigma A3294) ve %0.5 (v/v) TritonX-100 (Sigma T8787) içeren D-PBS’te hazırlanmış bloklama-permeabilizasyon tamponu (100 µL/kuyucuk) ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından bloklama-permeabilizasyon tamponunda hazırlanmış primer antikor ile 4°C’de hafif hızda bir çalkalayıcı üzerinde gece boyu bekletildi. Floresan ışımaya özelliği bulunan uygun sekonder antikor ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilen hücreler iki defa D-PBS ile yıkandı ve lamın üzerindeki odacıklar üretici firmanın ayıraç aparatı kullanılarak çıkarıldı. Lamın üzerindeki bütün sıvı uzaklaştırıldıktan sonra lamın üzeri %87’lik gliserol (AppliChem) yardımıyla bir lamelle kapatıldı. Uygun filtreler kullanılarak konfokal floresan mikroskopta (Leica SPE2 confocal microscope, Germany) fotoğrafları çekildi. Fotoğrafların analizi ImageJ yazılımı ile gerçekleştirildi. IF uygulaması için kullanılan primer ve sekonder antikorların bilgileri Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1: İmmüno Floresan işaretleme deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikolar.

Antikor	Konak	Dilüsyon	Kod	Marka
Anti-NF- κ B p65	Tavşan	1:400	10745-1-AP	Proteintech
Anti-Ki67	Tavşan	1:400	MA5-14520	Invitrogen
Anti-Tavşan IgG DL633	Keçi	1:400	35562	Invitrogen

3.9. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

3.9.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Gen anlatımı analizlerinin ilk aşamasında, 6-kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen ve UVB ve yüksek glukoz uygulamalarının ardından RA ve/veya RJ ile işleme sokularak toplanan hücrelerden RNA izole edildi. RNA izolasyonu ticari bir kit olan TRIzol (Invitrogen, 15596026) ile üretici firmanın önerdiği prosedüre göre gerçekleştirildi. Toplanan hücreler 2 defa D-PBS ile yıkandı ve 1.5 mL’lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücre pelletlerinin üzerine 500 μ L TRIzol reaktif sıvısı eklendi ve iyice karıştırıldı. Ardından, 200 μ L kloroform eklendi, iyice karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 4°C ’de, 15000xg’de, 20 dk boyunca santrifüjlendi. Oluşan renksiz üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve 500 μ L izopropanol eklenip iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 4°C ’de, 15000xg’de, 10 dk boyunca santrifüjlendi. Üst faz atıldı ve pellet kısa bir süre kurumaya bırakıldı. Pellet 30 μ L dH₂O (“RNase-DNase free”) ile çözündürüldü. İzole edilmiş total RNA’nın konsantrasyon ve saflığını kontrol etmek için Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi kullanıldı. RNA’nın 260 ve 280 dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü ve RNA konsantrasyonu Denklem 3.6’ya göre hesaplandı.

$$RNA (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{sulandırma kat sayısı} \times 40 \quad (3.6)$$

Elde edilen total RNA’ların bütünlükleri agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildi. Agaroz (Tip II, Sigma A9918) son konsantrasyonu %1 (w/v) olacak şekilde, 1X TAE [40 mM Tris (Sigma T1503), 20 mM asetik asit (Merck), 1 mM EDTA (pH 8.0, Invitrogen 15576)] tamponuna eklendi ve mikrodalga fırında çözündürüldü. Daha sonra soğumaya ($\sim 50^\circ\text{C}$ ’ye kadar) bırakılan agaroz çözeltisinin içerisine 10 mg/mL stok etidyum bromür (EtBr, Sigma-Aldrich E1510) çözeltisinden 2 μ L eklendi. Agaroz çözeltisi polimerleşmesi için yatay jel elektroforez

sistemine (Sub-Cell® GT, Bio-Rad, 170-4406) döküldü. Tank sistemine yürütme tamponu olarak 1X TAE eklendi ve agaroz jel tankın içerisine yerleştirildi. RNA örnekleri 6X yükleme tamponu (Thermo R0611) ile karıştırılıp jel kuyucuklarına aktarıldı. Örnekler 65 V’da 1 saat yürütüldü ve sonrasında jel UV transillüminatör (Avegene-Xlite 30R) ile görüntülendi.

3.9.2. cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Anlatım analizinin ikinci adımında, elde edilmiş total RNA’lardan tamamlayıcı DNA (“complementary DNA”, cDNA) kütüphanesi oluşturuldu. cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında ticari bir kit olan “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™ 4368814)” kullanıldı ve işlemler üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Total RNA son konsantrasyonu 1 µg/µL olacak şekilde sulandırıldı ve her grup için 2 µg RNA’dan cDNA sentezi için tasarlanmış reaksiyon ortamına eklendi. Sentez reaksiyonu bileşenleri Tablo 3.2’de ve koşulları ise Tablo 3.3’te verildi.

Tablo 3.2: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Son Konsantrasyon	Hacim
RT Tamponu (10X)	1X	2 µL
dNTP Mix (100 mM)	4 mM	0.8 µL
RT Random Primer (10X)	1X	2 µL
MultiScribe™ Ters Transkriptaz (50 U/µL)	50 U	1 µL
RNA (1 µg/µL)	100 ng/µL	2 µL
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	-	12.2 µL
	Son hacim	20 µL

Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyonu koşulları.

Reaksiyon Koşulu	1. adım	2. adım	3. adım
Sıcaklık (°C)	25	37	85
Süre (dk)	10	120	5

3.9.3. qRT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizi

Deney ve kontrol grubu hücrelerde UVB ve yüksek glukoz uygulamasını takiben RA ve/veya RJ ile işlemin hedeflenen genlerin mRNA düzeyindeki anlatımlarına etkisini belirlemek için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (“quantitative real-time-polymerase

chain reaction” qRT-PCR) gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.4’te, koşulları ise Tablo 3.5’te verildi.

Tablo 3.4: qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Son Konsantrasyon	Hacim
SYBR Green Master Mix (2X)	1X	10 µL
Forward (ileri) primer (10 µM)	500 nM	1 µL
Reverse (geri) primer (10 µM)	500 nM	1 µL
cDNA		0.5 µL
Nükleaz içermeyen dH₂O		7.5 µL
	Son hacim	20 µL

Tablo 3.5: qRT-PCR reaksiyon koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	2 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	40
Bağlanma	60°C	30 sn	
Uzama	72°C	30 sn	
Son Uzama	72°C	5 dk	1

Hedeflenen genlerin mRNA anlatım seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primerler (Tablo 3.6) IDT OligoAnalizer 3.1 ve NCBI Primer Blast Tool programları yardımıyla tasarlandı. Tasarlanan primerler ticari bir firma (Ant Teknik) tarafından sentezlendi. Primerler 100 µM ana stok olacak şekilde nükleaz içermeyen dH₂O’da hazırlandı ve qRT-PCR’da kullanmak için 10 µM olacak şekilde ara stokları yapıldı. qRT-PCR reaksiyonu, “PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo)” ticari kiti kullanılarak termal döngü cihazında (Bio-rad CFX96) gerçekleştirildi. İnternal kontrol olarak *ACTB* (β-aktin) geni kullanıldı. Deney ve kontrol grupları arasında hedef genlerdeki kat değişimleri elde edilen Ct (“cycle threshold”) verileri kullanılarak, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından önerilen yöntemle göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplandı.

Tablo 3.6: qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerler.

Hedef gen	Forward (ileri) primer dizisi (5' -3')	Reverse (geri) primer dizisi (5' -3')
IL-1β	ATGGACAAGCTGAGGAAGATG	CCCATGTGTCTGAAGAAGATAGG
IL-6	GGAGACTTGCCTGGTGAAA	CTGGCTTGTTCTCACTACTC
IL-10	GCTGGAGGACTTTAAGGGTTAC	GATGTCTGGGTCTTGGTTCTC
TNF-α	CCAGGGACCTCTCTCTAATCA	TCAGCTTGAGGGTTTGCTAC
β-Aktin	GACCTGACTGACTACCTCAT	ATGTCACGCACGATTTC

3.10. PROTEİN ANLATIMI ANALİZLERİ

3.10.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Kontrol ve deney gruplarında protein anlatım analizleri için 6-kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücreler kullanıldı. UVB ve yüksek glukoz uygulamalarını takiben yapılan RA ve/veya RJ uygulamalarının protein anlatım düzeyine etkilerini analiz etmek için, bu maddelerle inkübasyondan sonra hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplandı ve protein izolasyonu gerçekleştirildi. Toplanan hücre pelletleri iki defa soğuk D-PBS ile yıkandı. Ardından santrifüjlendi (3000xg, 5 dk) ve çöken hücreler kullanılacakları zamana kadar -80°C 'de saklandı.

Hücrelerden total protein izolasyonu için soğuk RIPA tamponu kullanıldı. Bu tampon 25 mM Tris (Sigma T1503)-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl (Merck 106400), %1 (v/v) NP-40 (AppliChem A1694), %1 (w/v) sodyum deoksikolat (Sigma D6750) ve %0.1 (w/v) SDS (AppliChem A2263) içerecek şekilde hazırlandı ve proteaz inhibitörü (1 tablet/50 mL, Roche 11873580) ile fosfataz inhibitörü (1 tablet/10 mL, Roche 4906837001) eklendi. Kullanımdan hemen önce tampona 1 mM PMSF (AppliChem A0999) eklendi. Hazırlanan lizis tamponu hücre pelletinin üzerine eklendi ve 5 dk boyunca buzda bekletildi. Hücreler seri olarak pipetajlandı ve buzda bekletilme işlemi yapıldı. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. Örnekler en son ultrasonik su banyosuna (WiseClean-Daihan WUC-D10H) konuldu ve 1 dk bekletildi. Total protein homojenatı 4°C , 20000xg, 20 dk koşulunda santrifüjlendi (Sigma 3-30K) ve proteinleri içeren üst sıvı yeni bir tüpe alındı.

Elde edilen total protein homojenatlarının konsantrasyonları bisinkoninik asit (BCA) yöntemiyle belirlendi (Smith ve diğ. 1985, Walker, 2002a). Bu yöntem, alkali çözeltide

proteindeki peptit bağlarının Cu(II) sülfatı Cu(I) iyonlarına indirgemesine ve Cu(I) iyonlarının sodyum tuzu ile oluşturduğu koyu mor renkli kompleksin 562 nm’de spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Protein konsantrasyonu tayini “SMART™ BCA Protein Assay Kit” (iNtRON Biotech) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. İlk olarak kit içeriğindeki BSA’nın (“Bovine Serum Albumin”) seri sulandırımı yapıldı ve son konsantrasyonları 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL olan BSA standartları elde edildi. Hücrelere ait total protein homojenatları 10 kat sulandırıldı ve 50:1 (v/v) oranında A:B karışımından oluşan BCA reaktifıyla işleme sokuldu. 96-kuyucuklu bir mikrolakaya örnekten 25 µL konulurken BCA reaktifinden 200 µL eklendi ve bileşenlerin iyice karışması için çalkalandı (Heidolph Unimax 1010). Otuz dk 37°C’de inkübasyona bırakılan mikrolakadaki örneklerin (renkli ürün) absorbansı 562 nm’de ölçüldü. BSA standart denklemi kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonu (µg/mL) hesaplandı.

3.10.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Elde edilen total protein homojenatlarında hedef proteinlerin anlatım farklarını belirlemek için protein örnekleri denatüre jel elektrofrez (SDS-PAGE, “sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis”) ile molekül ağırlıklarına (kDa) göre ayrıştırıldı (Walker, 2002b). Ayırma jeli %10 akrilamid solüsyonu, yükleme jeli ise %5 akrilamid solüsyonu içerecek şekilde hazırlandı. Kuyucukların oluşması için üst jele 1 mm kalınlığında tarak yerleştirildi. Jel hazırlığında kullanılan çözeltiler Tablo 3.7’de, bir jel için kullanılan çözeltilerin miktarları ise Tablo 3.8’de verildi. SDS-PAGE işlemi için Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) sistemi kullanıldı.

Total protein karışımından 30 µg protein olacak şekilde örnek alındı ve 4X Laemmli buffer ile karıştırıldı ve kaynatıldı. Örnekler SDS-PAGE jeline yüklendi. Elektrofrezde proteinlerin kDa takibi, protein marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo 26619) ile sağlandı. Elektrofrez 100V’ta başlatıldı, örnekler yürütme jeline geçtikten sonra işlem 200V’ta sürdürüldü (40-60 dk).

Tablo 3.7: SDS-PAGE çözeltileri ve içerikleri.

Çözeltiler	Bileşenler
%30 Akrilamid stok solüsyonu	Akrilamid (Sigma A3553) 30 g Bis-Akrilamid (Sigma M2022) 0.8 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz (Sigma T1503) 45.43 g 3N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz 14.54 g 3N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	SDS (AppliChem A2263) 10 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
%10 Amonyum persülfat (APS)	APS (AppliChem A2941) 0.1 g dH ₂ O ile son hacim 1 mL'ye tamamlandı. Jel döküleceği zaman taze hazırlandı.
1X Yürütme tamponu (pH 8.3)	Trizma-Baz (25 mM) 3.03 g Glisin (192 mM) (AppliChem A1067) 14.4 g SDS (%0.1) 1 g dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
4X Örnek yükleme tamponu (Laemmli buffer)	Trizma-Baz (250 mM, HCl ile pH 6.8 olarak ayarlandı) 0.76 g SDS (%4) 1 g Gliserol (%40) 10 mL Bromo-fenol mavisi (%0.02, Merck 108122) 5 mg dH ₂ O ile son hacim 25 mL'ye tamamlandı. 900 µL alikot olarak -20°C'ta saklandı β-merkaptoetanol (AppliChem A1108) 900 µL tampona 100 µL eklendi

Tablo 3.8: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler).

Jel İçerikleri	Ayırma Jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (%5 Akrilamid)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	1 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	250 µL
dH₂O	2.262 mL	1.875 mL
%30 Stok Akrilamid Çözeltisi	1.662 mL	337.5 µL
%10 SDS	50 µL	25 µL
%10 APS	25 µL	12.5 µL
Karışımın havası alındı.		
TEMED	1.75 µL	3.5 µL

3.10.3. Elektrotransfer ve Western Blotlama

Bu tez kapsamında yapılan elektrotransfer, Western blotlama ve membran “stripping” işlemleri için kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo 3.9’da verildi.

Tablo 3.9: Elektrotansfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözeltiler	Bileşenler
Transfer Tamponu	Trizma-Baz (25mM, Sigma T1503)..... 3.03 g Glisin (192 mM, AppliChem A1067) 14.4 g Metanol200 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
%5'lik Bloklama Tamponu	Yağsız süt tozu (Sigma 70166) 5 g Son hacim yıkama solüsyonu ile 100 mL'ye tamamlandı.
Yıkama Tamponu (TBST “Tris-buffered saline with Tween-20” tamponu)	Trizma-Baz (20 mM, pH: 7.5) 2.42 g NaCl (150 mM, Merck 106400) 8.77 g Tween-20 (%0.1) 1 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
“Stripping” Tamponu	%10'luk SDS çözeltisi20 mL 0.6 M Tris-HCl (pH:6.8) tamponu10 mL Ultra saf su70 mL β-merkaptetanol0.8 mL

SDS-PAGE yürütme işlemi bittikten sonra jel sistemden çıkartıldı ve üzerine transfer tamponu eklendi. Jeldeki proteinlerin elektrotansferle PVDF membrana aktarımı sağlandı. Bu işlem için “Trans-Blot Turbo (Bio-Rad)” cihazı kullanıldı. Sırasıyla anottan katota doğru; transfer kâğıdı (Bio-Rad 1704156), metanolde bekletilmiş PVDF membranı (0.22 µm, Bio-Rad), jel ve tekrar transfer kâğıdı üst üste konuldu. Turbo transfer 25 V'ta 10-15 dk süreyle gerçekleştirildi. Transfer işlemi bittikten sonra membranda bulunan boşlukları kapatmak için membran %5 (w/v)'lik bloklama tamponunda, oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Hedef proteine özgü primer antikor, bloklama tamponu ile yıkama tamponunun 1:1 karıştırılması ile elde edilen %2.5'luk bloklama tamponu içinde hazırlandı ve membran, primer antikorla gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. İnternal kontrol olarak β-aktin kullanıldı.

Antikorla işlemiden sonra membran TBST ile 5 kez 5'er dk yıkandı. Daha sonra membran HRP-işaretli sekonder antikor ile muamele edildi. İmmünoblot işleminde kullanılan primer ve sekonder antikorlara ait bilgiler Tablo 3.10'da verildi. Sekonder antikor ile muameleden sonra 5 kez TBST ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak protein bandlarının belirlenmesi için, sekonder antikora bağlı enzim yaban turpu peroksidazının (HRP) substratı olarak “SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo 34580)” kemilüminesan substratı kullanıldı. Oluşturulan immünoblotlar ChemiDoc XRS sistemi/ImageLab 6.0.1 yazılımı (Bio-Rad) ile görüntülendi ve analiz edildi.

Tablo 3.10: Western blotlamada kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Antikor	Konak	Dilüsyon	Kod	Marka
Anti-Ki67	Tavşan	1:500	MA5-14520	Thermo
Anti-FGF2	Tavşan	1:1000	NB600-1536	Novus
Anti-NUDT6	Tavşan	1:1000	11181-1-AP	Proteintech
Anti-VEGFA	Tavşan	1:1000	19003-1-AP	Proteintech
Anti-Kolajen1	Tavşan	1:1000	NB600-408	Novus
Anti-AKT	Fare	1:1000	60203-2-Ig	Proteintech
Anti-p-AKT (Ser473)	Fare	1:1000	66444-1-Ig	Proteintech
Anti-ERK1/2	Tavşan	1:1000	11257-1-AP	Proteintech
Anti-p-ERK1/2 (Thr202, Tyr204)	Tavşan	1:1000	28733-1-AP	Proteintech
Anti-NF- κ B p65	Tavşan	1:1000	10745-1-AP	Proteintech
Anti-TNF- α	Tavşan	1:500	NB600-587	Novus
Anti-MMP2	Tavşan	1:500	10373-2-AP	Proteintech
Anti-MMP9	Tavşan	1:500	10375-2-AP	Proteintech
Anti-TGF- β	Tavşan	1:500	MA5-15065	Thermo
Anti-Twist1	Fare	1:500	MA5-17195	Thermo
Anti-Snail	Tavşan	1:500	MA5-14801	Thermo
Anti-E-kaderin	Tavşan	1:1000	PA5-32178	Thermo
Anti-N-kaderin	Fare	1:1000	MA1-91128	Thermo
Anti-Nanog	Tavşan	1:1000	14295-1-AP	Proteintech
Anti-CD44	Tavşan	1:1000	15675-1-AP	Proteintech
Anti-CD133	Tavşan	1:1000	18470-1-AP	Proteintech
Anti-Grp78	Tavşan	1:1000	NBP2-16749	Novus
Anti-IRE1 α	Tavşan	1:1000	NB100-2324	Novus
Anti-PERK	Fare	1:1000	NBP1-51661	Novus
Anti-SOD1	Tavşan	1:2500	10269-1-AP	Proteintech
Anti-GPX1	Tavşan	1:2500	29329-1-AP	Proteintech
Anti-MDA	Fare	1:500	NBP2-59367	Novus
Anti-AGE	Tavşan	1:1000	Ab176173	Abcam
Anti-4HNE	Fare	1:1000	Ab46545	Abcam
Anti-MDA	Tavşan	1:1000	Ab27642	Abcam
Anti-Bax	Tavşan	1:1000	50599-2-Ig	Proteintech
Anti-Bcl2	Tavşan	1:1000	12789-1-AP	Proteintech
Anti-Cas3 (pro ve p17/p19)	Tavşan	1:1000	19677-1-AP	Proteintech
Anti-PARP1 (pro ve p89)	Tavşan	1:1000	13371-1-AP	Proteintech
Anti- β -aktin	Fare	1:5000	NB600-501	Novus
Anti-Fare IgG	Keçi	1:5000	31430	Thermo
Anti-Tavşan IgG	Keçi	1:5000	31460	Thermo

Elde edilen membranlar üzerinde birden fazla hedef proteinin anlatımının sonucunun alınması gerektiğinde “stripping” işlemi yapıldı. Bu işlem için hazırlanan tampon 50°C’de ısıtıldı ve membranın üzerini kaplayacak kadar döküldü. İşlem 50°C’de 30 dk bekletilerek gerçekleştirildi. Daha sonra membran ultra saf su ile 5-10 dk arayla, 6-7 kez yıkandı. Ultra saf su ile yıkamalar tampon içeriğindeki β -merkaptetanolün kokusu kalmayana kadar sürdürüldü. Ardından TBST ile 5 dk arayla 5 kez yıkama yapıldı ve membran üzerine bloklama tamponu eklendi. Hedeflenen proteine özgü primer antikor ile muamele edilerek yukarıda anlatılan işlemler tekrarlandı.

3.11. PROTEİN KARBONİLLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Bu deney, rosmarinik asit ve/veya arı sütü uygulamalarının, UVB- ve yüksek glukoz-indüklü oksidatif stres sonucu protein yan zincirlerinde oluşan karboniller üzerindeki etkisini tespit etmek için tasarlandı. Protein karbonil ölçümünde spektrofotometrik ve immünolojik yöntemler kullanıldı. Uygulamalar sonunda tripsinizasyonla toplanan hücrelerin protein izolatlarıyla aşağıda anlatılan işlemler gerçekleştirildi.

3.11.1. Spektrofotometrik Yöntem

Bu yöntem, yan zincirlerdeki karbonil grupları ile dinitrofenil hidrazin arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan dinitrofenil hidrazonun ölçülmesine dayanmaktadır. Dinitrofenil hidrazon, 370 nm’de UV ışığı absorplar ve molar ekstinksiyon katsayısı $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ’dir. Hücrelerden elde edilen protein izolatları her biri 100 μL olacak şekilde iki farklı santrifüj tüpüne aktarıldı. Bunlardan birine 2.5 M HCl içinde hazırlanmış 10 mM dinitrofenilhidrazin (DNPH, Sigma)’den 400 μL eklenirken, diğerine sadece 400 μL 2.5 M HCl eklendi. Her iki tüp de vortekste 10 dk ara ile etkin şekilde karıştırılarak 1 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda her iki tüpe de 200 μL %30 (w/v) trikloroasetik asit (TCA, Merck) eklenerek, buz üzerinde 5 dk bekletildi. Bu süre sonunda örnekler santrifüj ($10000 \times g$, 4°C , 10 dk) edildi. Üst faz uzaklaştırıldı ve pellet 500 μL %10’luk TCA içinde yeniden süspanse edildi. Buz üzerinde 10 dk bekletmenin ardından yeniden santrifüjlendi. Son santrifüj işlemi sonunda elde edilen çökteller, fazla DNPH’nin uzaklaştırılması amacıyla, 500 μL etanol-etil asetat [(1:1), (v/v)] ile iki kez yıkandı. Santrifüjleme sonunda ele geçen protein çöktelleri 500 μL 6 M guanidin-HCl (Sigma, 20 mM potasyum fosfat içinde hazırlandı) içinde yeniden süspanse edildi. Spektrofotometrede, 360, ve 370 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve örneklerin karbonil içerikleri DNPH’nin bu dalga boylarındaki yaklaşık absorpsiyon katsayısı ($\epsilon=22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dikkate alınarak hesaplandı (Fagan ve diğ., 1999).

3.11.2. OxyBlot Protein Oksidasyon Tespiti

Protein karbonil tayini immünolojik yöntem ile de yapıldı. Bu işlem için ticari bir kit olan “OxyBlot Protein Detection Kit (Merck)”in önerdiği protokol takip edildi. Örneklerden 15 μg protein alındı. Alınan proteinin hacmi kadar % 12 SDS ve protein hacminin iki katı kadar 1X DNPH solüsyonu eklenip karışımlar 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası örneklerin üzerine protein hacminin bir buçuk katı kadar nötralizasyon çözeltisi ve 1.5

μL β -merkaptoetanol eklendi. Daha sonra oluşan karışım SDS-PAGE sisteminde yürütüldü. Jellerdeki proteinler Transblot turbo transfer sistemiyle PVDF membrana aktarıldı. Membran iki saat boyunca % 5'lik süt tozunda bloklandıktan sonra gece boyu $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kitle bulunan DNP antikoru (dilüsyon: 1:150, konak: tavşan) ile inkübasyona bırakıldı. Primer antikor uzaklaştırıldıktan sonra 5 defa TBST tamponu ile yıkandı ve ardından 1:300 oranında hazırlanan sekonder antikor (keçi-anti-tavşan) ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorla işlem tamamlandıktan sonra membran tekrar TBST ile yıkandı ve immüno blotlar "SuperSignal™ West Pico PLUS" görüntüleme ECL substratı kullanılarak ChemiDoc XRS sistemi/ImageLab 6.0.1 yazılımında (Bio-Rad) görüntülendi ve analiz edildi.

3.12. LİPİT PEROKSİDASYONU

UVB ve yüksek glukoza maruziyet sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonu ve RA ve/veya RJ uygulamalarının bu oluşuma etkisini değerlendirmek için Draper ve Hadley (1990) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu işlem, lipid peroksitlerin tiyobarbitürik asitle oluşturdukları kompleksi (TBARS) spektrofotometrik olarak ölçen bir yöntemdir. Uygulamalar sonrası toplanan hücrelerin üzerine 1 mL %0.8 (w/v) tiyobarbitürik asit (TBA, Merck) içeren %20'lik (w/v) TCA (Merck) eklendi ve iyice karıştırıldı. Elde edilen karışımlar 45 dk boyunca kaynatıldı ve daha sonra soğuması için oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler 5 dk boyunca 3000xg'de santrifüjlendi. Süpernatantın 535 nm'deki absorbansı spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. Ölçüm sonucunun değerlendirilmesi için standart grafik oluşturuldu. Bunun için, TBA ile reaksiyona girerek kompleks oluşturan malondialdehit (MDA) kullanıldı. Örneklerin TBARS düzeyleri μM MDA eşdeğeri/mg protein olarak hesaplandı.

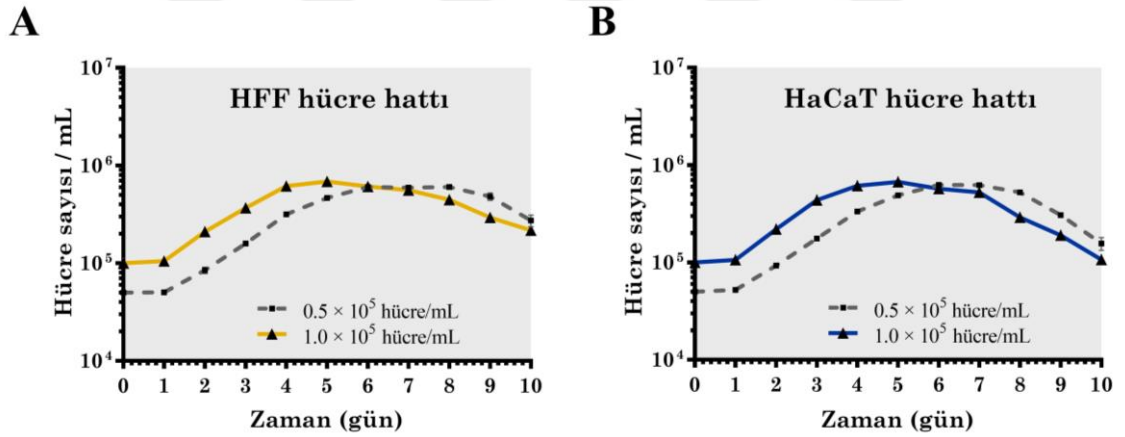
3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm kantitatif sonuçlar en az üç bağımsız deneyden elde edildi. Bulgular aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism v7 programı kullanılarak yapıldı ve verilerin değerlendirilmesinde tek/iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Tukey post-hoc testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık kriteri $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HFF ve HaCaT HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ

Yara iyileştirme çalışmalarında kullanılan HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinin monolayer kültür ortamında büyüme kinetiklerinin belirlenmesi için 10 gün boyunca hücre sayımı yapılarak çoğalma eğrileri oluşturuldu. Bunun için 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde başlatılan iki kültürden elde edilen hücre sayısı bilgisi kullanılarak GraphPad Prism programında çizilen büyüme kinetiği grafikleri Şekil 4.1’de verildi. Çoğalma kinetiği grafikleri jenerasyon süresinin HFF hücreleri için 24 saat, HaCaT hücreleri içinse 25 saat olduğunu gösterdi. İki hücre hattının da ekimi takiben 24 saat içinde lag fazından çıkıp logaritmik faza girdikleri belirlendi. Hücreler bu fazda en az 72 saat boyunca kaldılar. Daha az hücre sayısı ile (5×10^4 hücre/mL) başlatılan kültürler durağan faza 6. günde girerken, başlangıç hücre sayısı fazla (1×10^5 hücre/mL) olan kültürdeki hücreler 5. gün proliferasyonda duraklamaya geçtiler.



Şekil 4.1: Başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 hücre/mL ve 1×10^5 hücre/mL olan (A) insan fibroblast HFF hücre hattı ve (B) insan keratinosit HaCaT hücre hattının çoğalma eğrileri.

4.2. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN UYGULAMA DOZLARININ BELİRLENMESİ

Bu doktora tezi kapsamında *in vitro* yara iyileştirme potansiyelleri araştırılan rosmarinik asit (RA) ve arı sütünün (RJ) hücrelere uygulanacak dozlarını belirlemek için bir dizi analiz

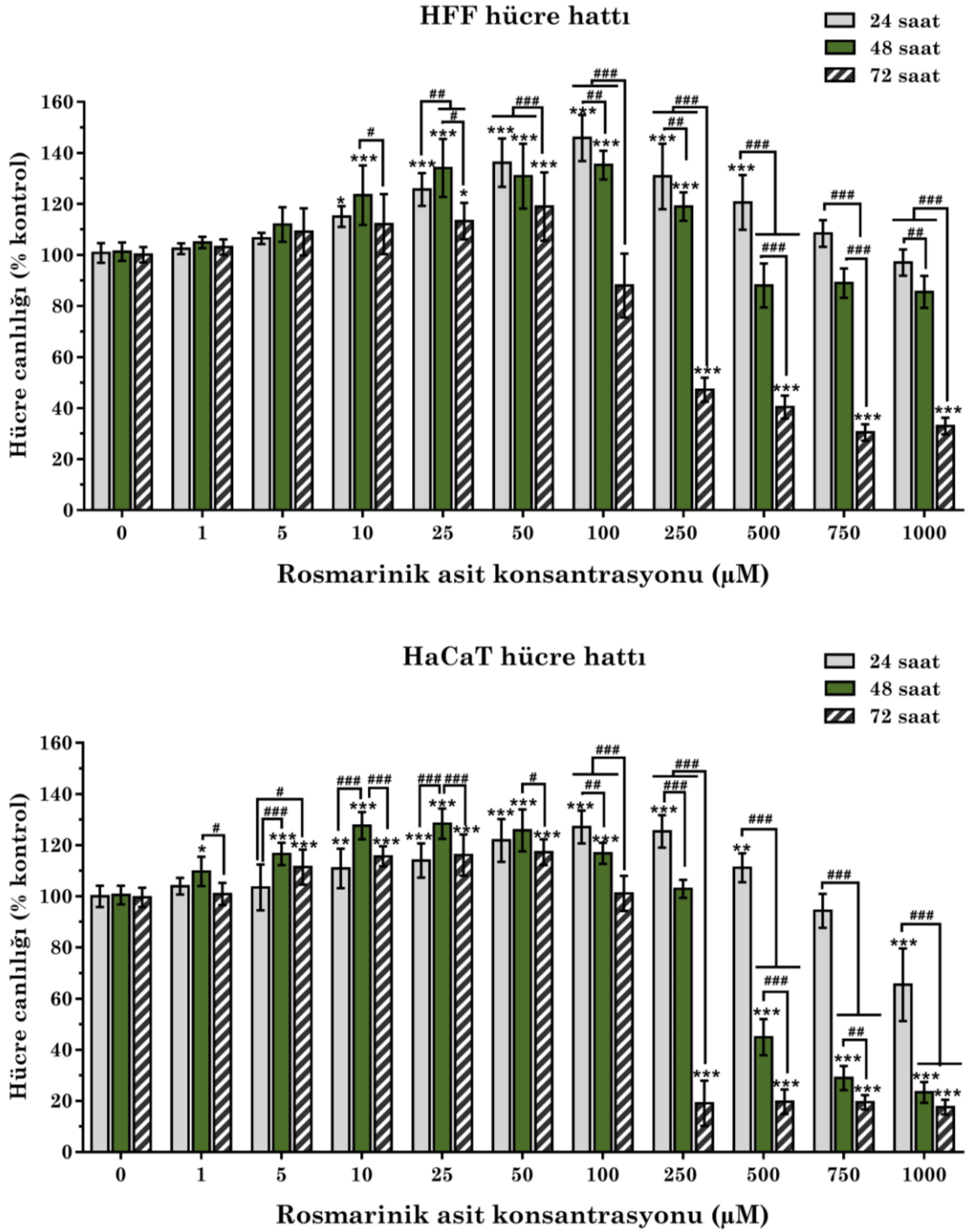
gerçekleştirildi. Önce bu maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik/proliferatif etkileri MTT yöntemiyle test edildi. Kombine örnek dozlarının belirlenmesinde hem MTT test sonuçları hem de çizik yara deneyindeki yara kapanma verileri dikkate alındı. Bunlara ek olarak, çizik deneyi sonrası toplanan hücrelerde, hücre proliferasyonu ile yakından ilişkili olduğu bilinen bazı proteinlerin anlatım analizleri gerçekleştirildi. Yapılan analizlere ait sonuçlar iki alt başlıkta sunuldu.

4.2.1. Rosmarinik Asit ve Arı Sütünün Sitotoksik/Proliferatif Etkileri

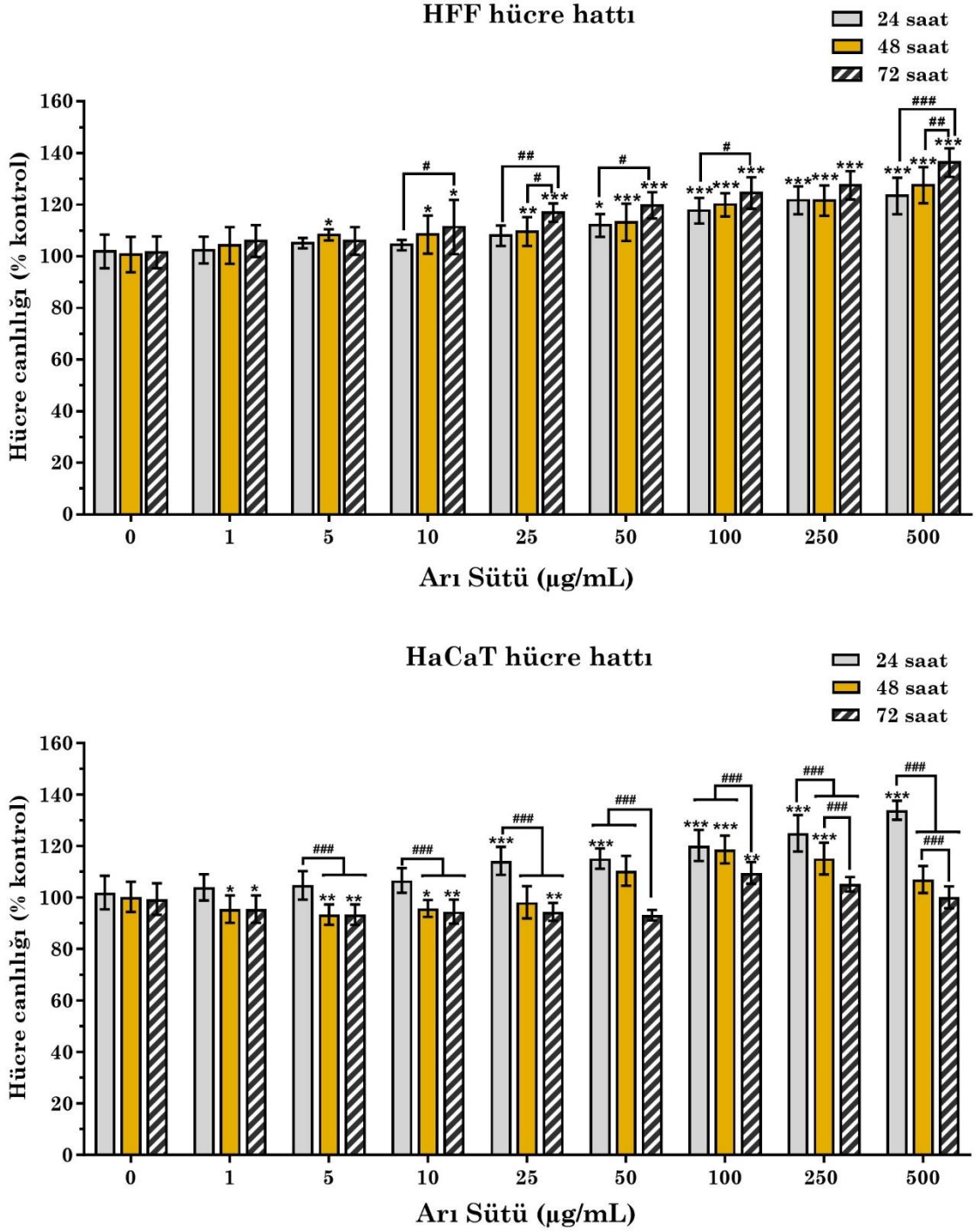
Farklı konsantrasyonlarda uygulanan rosmarinik asit (RA) ve arı sütünün (RJ) HFF ve HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri MTT testi ile değerlendirildi. RA'nın 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM 'lık dozları, RJ'nin ise 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozları 24, 48 ve 72 saat süreyle hücrelere uygulandı. RA'ya ait MTT analiz sonuçları Şekil 4.2'de ve RJ'ye ait sonuçlar ise Şekil 4.3'te verildi.

Rosmarinik asitin en yüksek uygulama dozu (1000 μM) ile 24 saat maruziyet sonrasında HFF ve HaCaT hücre hatlarında hücre canlılığı, sırasıyla %97 ve %65 olarak belirlendi. Bu doz HFF hücre hattında 48 saat sonunda %85 canlılık ile sonuçlanırken, ancak 72 saat maruziyet önemli bir sitotoksik etki gösterdi ve canlılığı %32'ye düşürdüğü belirlendi. HaCaT hücrelerinde yüksek RA dozlarının sitotoksik etkileri 48. saatten itibaren 500 μM 'lık dozla görülmeye başlanırken 250 μM RA dozuna 72 saat maruziyet hücre canlılığında önemli derecede azalmaya yol açtı. Çalışma amacına uygun olarak hedeflenen proliferatif etkilerin, tüm uygulama sürelerinde düşük RA dozlarıyla elde edildiği belirlendi. HFF hücrelerinde 1 ve 5 μM RA istatistiksel olarak hücre proliferasyonunda önemli bir değişime yol açmazken, HaCaT hücrelerinde 48 saatlik 1 μM RA uygulaması %10 canlılık artışıyla sonuçlandı. 24 ve 48 saatlik RA uygulamasının hem HFF hem de HaCaT hücrelerinde proliferasyona yol açan doz aralığının (10-100 μM) aynı olduğu saptandı.

Arı sütü, en uzun süre (72 saat) uygulanan en yüksek dozda (500 $\mu\text{g/mL}$) bile iki hücre hattında da önemli bir sitotoksik bir etki oluşturmadi. HFF hücrelerinde, RJ maruziyeti sonrasında ilk proliferatif yanıtlar 24 saat/50 $\mu\text{g/mL}$, 48 saat/5 $\mu\text{g/mL}$, 72 saat/10 $\mu\text{g/mL}$ uygulamalarında görüldü. Bu yanıtlar HaCaT hücrelerinde 24 saat/25 $\mu\text{g/mL}$ ve 48 ve 72 saat/100 $\mu\text{g/mL}$ uygulamalarında gözlemlendi. RJ uygulamasının hem HFF hem de HaCaT hücrelerinde proliferasyona yol açan doz aralığının ortak (10 ile 250 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında) olduğu saptandı.



Şekil 4.2: Rosmarinik asitin 1-1000 µM aralığındaki konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik ve proliferatif etkilerini gösteren MTT analizi sonuçları. **(A)** HFF insan fibroblast hücre hattında ve **(B)** HaCaT insan keratinosit hücre hattında yapılan uygulamalar. (*kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

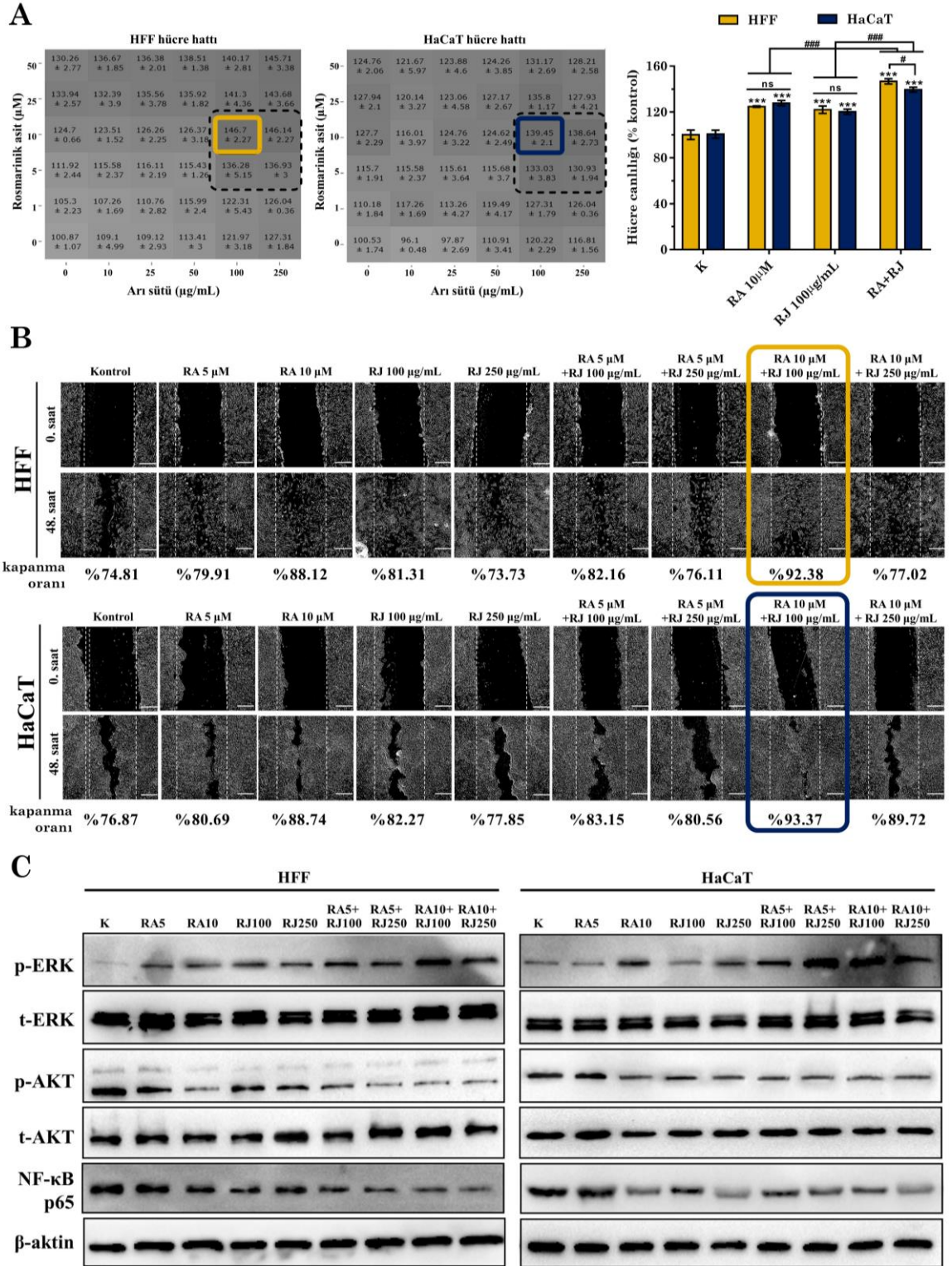


Şekil 4.3: Arı sütünün 1-500 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik ve proliferatif etkilerini gösteren MTT analizi sonuçları. (A) HFF insan fibroblast hücre hattında ve (B) HaCaT insan keratinosit hücre hattında yapılan uygulamalar. (*kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

4.2.2. Rosmarinik Asit ve Arı Sütünün Kombine Dozlarının Seçimi

Rosmarinik asit ve arı sütünün tekli uygulamaları sonucunda her iki maddenin de 48 saatlik uygulamalarında hem HFF hem de HaCaT hücrelerinde hücre canlılığını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artıran 5'er dozu seçildi. RA'nın 1, 5, 10, 25 ve 50 μM 'lık konsantrasyonları, RJ'nin ise 10, 25, 50, 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları kombinasyon çalışmalarına dahil edildi. Belirlenen dozlar kombinlendi ve bu uygulamaların proliferatif yanıtları araştırıldı. MTT test sonuçları Şekil 4.4A'da ortalama $\pm$ SD değerlerini gösteren bir matriks şeklinde sunuldu. Şekilde kesikli çizgiler içine alınan kombinasyon dozları (RA'nın 5 ve 10 μM dozları ile RJ'nin 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ dozlarının kombinasyonu) hücre canlılığını tekli uygulamalara göre önemli derecede artırdı. Kombine dozun seçimi için yapılan çizik testi sonuçları Şekil 4.4B'de verildi. Herhangi bir madde uygulaması yapılmayan kontrol grubu HFF ve HaCaT hücrelerinde çizik alanında 48 saat sonunda $\sim$ %75 kapanma görülürken, her iki maddenin de 2'şer dozunun tekli uygulamaları ve bunların kombinasyonları (4 farklı kombinasyon) yara bölgesinin kapanma oranında artışa yol açtı. Ancak, 5 μM RA ve 250 $\mu\text{g/mL}$ RJ tek başına uygulandıklarında yara kapanma oranındaki artış önemli değildi. 10 μM RA ve 100 $\mu\text{g/mL}$ RJ'nin tek başına ve kombine uygulamaları yara kapanmasında ciddi anlamda artış sağladı. Bu dozların proliferatif etkisi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Tekli uygulamalar HFF ve HaCaT hücrelerinde benzer sonuçlar oluştururken kombine uygulama HaCaT hücrelerinde canlılığı HFF hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdı (Şekil 4.4A).

Yalnızca hücre proliferasyonu ve göçü ile doz seçimine karar vermemek için, bu dozların hücre sinyalleşmesinde, proliferasyonunda ve inflamasyon yanıtında önemli rollere sahip olduğu bilinen ERK1/2, AKT, NF- κ B proteinlerinin anlatımına etkileri de çizik yara oluşturma sonrası madde uygulanmış hücrelerde değerlendirildi (Şekil 4.4C). Bu değerlendirme sonunda, tek tek veya kombine halde hücrelere uygulanan 10 μM RA ve 100 $\mu\text{g/mL}$ RJ'nin AKT fosforilasyonunda ve NF- κ B seviyesinde azalmaya yol açtığı, ERK1/2'nin ise fosforilasyonunda artış sağladığı belirlendi. RA ile RJ'nin uygulanan 4 farklı kombinasyonu bu proteinlerin seviyelerinde benzer etkiler ortaya koyarken yara iyileşmesi sinyalizasyonunda kilit proteinlerden olan p-ERK1/2 seviyesinde en fazla artışa yol açan örneğin 10 μM RA ile 100 $\mu\text{g/mL}$ RJ'den oluşan kombinasyon olduğu saptandı. Tüm analizler sonucunda, en etkin dozlar olarak RA'nın 10 μM ve RJ'nin 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu seçildi.

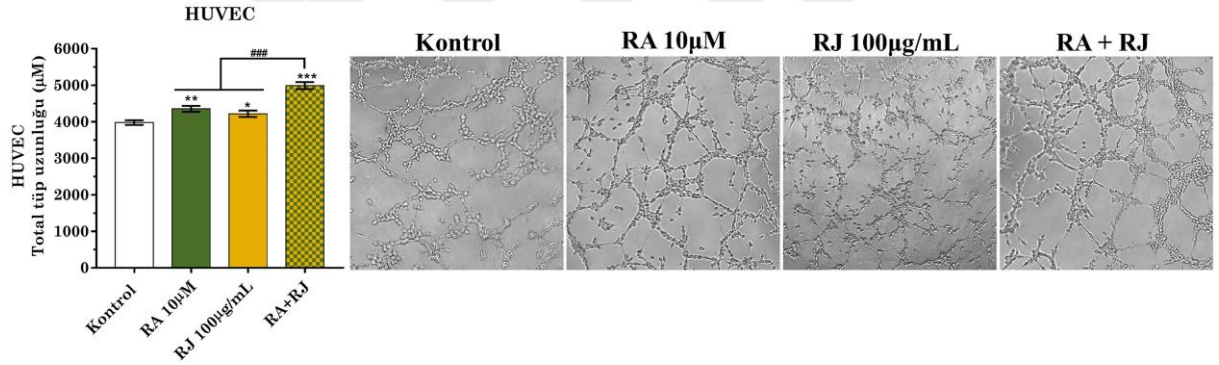


Şekil 4.4: Yara iyileştirme deneylerinde rosmarinik asit (RA) ve arı sütünün (RJ) kombinasyon dozunun seçimi. (A) RA ve RJ'nin farklı dozlarının kombine uygulamalarının MTT sonuçları (ortalama±SD) ve 10 µM RA ile 100 µg/mL RJ konsantrasyonunun tek ve kombine uygulamalarının hücre canlılığına etkisi. (B) RA ve RJ uygulamalarının çizik alanının kapanması üzerine etkileri. (C) Çizik ile yara oluşturma sonrası RA ve RJ uygulamalarının p-ERK, p-AKT, NF-κB p65 proteinlerinin anlatımına etkileri (Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK2). (ns – “not significant”, $P>0.05$. *kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ### $P<0.001$).

4.3. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN ANJİYOGENİK ÖZELLİKLERİ

Uygulama dozları ön çalışmalarla belirlenen (10 μ M RA ve/veya 100 μ g/mL RJ'nin *in vitro* endotel tüp oluşumu üzerindeki etkileri incelenerek, yara iyileştirmede önemli bir aşama olan anjiyogenezi (DeCicco-Skinner ve diğ., 2014) destekleme durumları araştırıldı. Bu deney için, HUVEC insan umbilikal ven endotel hücreleri kullanıldı. Matrigel ile kaplanmış 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekilen HUVEC hücrelerine RA, RJ ve RA+RJ uygulaması yapıldı. Uygulamadan sonra mikroskop altında belli aralıklarla tüp oluşumu takip edildi ve 12 saat sonra alınan fotoğraflar ImageJ (NIH) yazılımı ile değerlendirildi

Yapılan analiz sonuçlarına göre, RA ($P<0.01$) ve RJ'nin ($P<0.05$) tekli uygulamaları kontrol grubuna göre endotel tüp oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtı. RA+RJ'nin etkisi tekli uygulamalara göre daha etkiliydi ($P<0.001$). Sonuçlar Şekil 4.5'te verildi.



Şekil 4.5: Rosmarinik asit (RA) ve arı sütünü (RJ) endotel tüm oluşumu üzerine etkisi, HUVEC insan umbilikal ven endotel hücrelerinde gerçekleştirilen *in vitro* endotel tüp oluşumu deneyi sonuçları. (*Kontrolle göre, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$; $###P<0.001$).

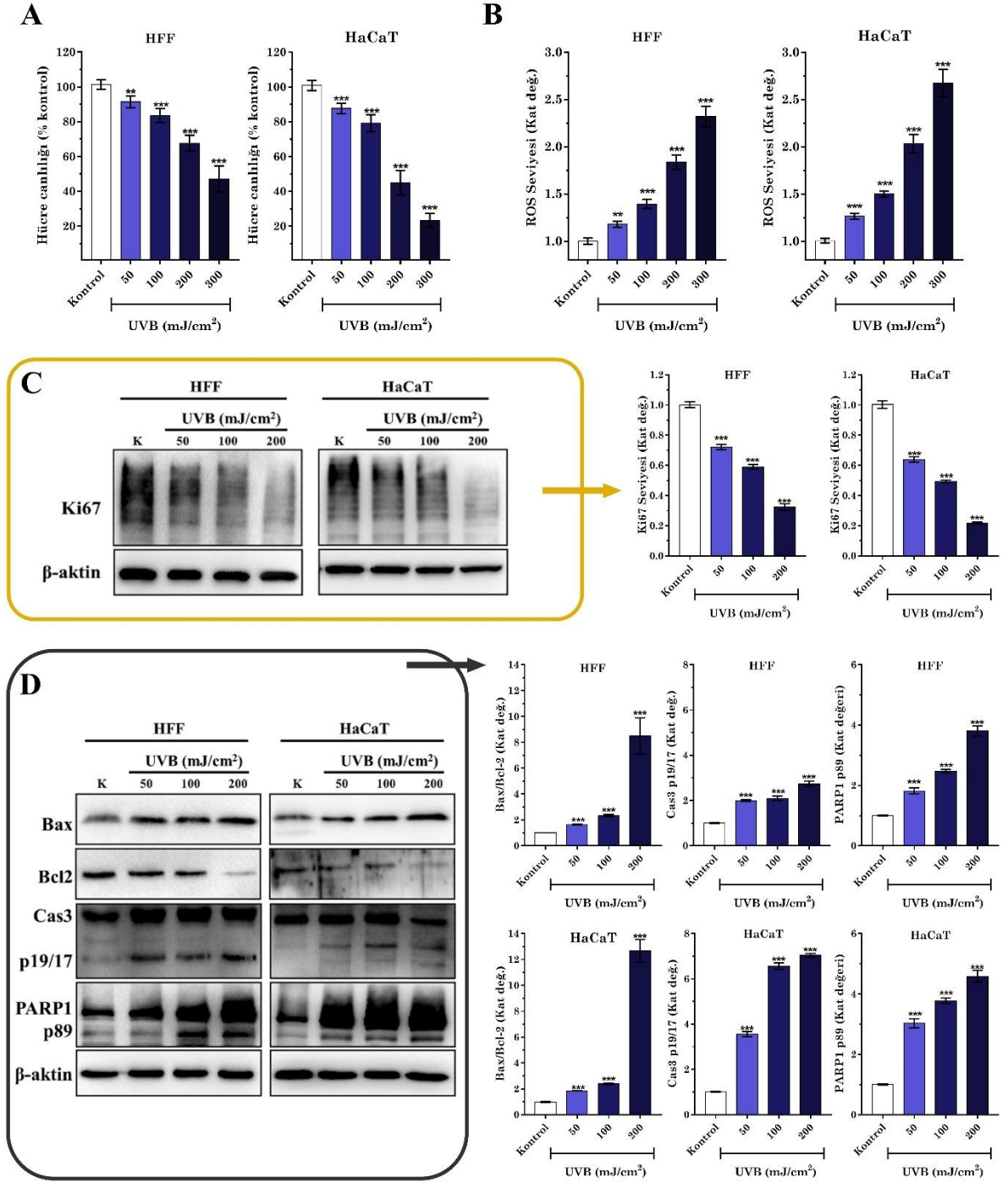
4.4. UVB UYGULAMASI ve OPTİMİZASYONU

HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde UVB ile yara-benzeri hücresel/moleküler hasarlar oluşturmak amacıyla önce UVB uygulama dozu ve süresi optimize edildi. Hücrelere 50, 100, 200 ve 300 mJ/cm^2 enerji vermek için sırasıyla 2 dk 37 sn, 5 dk 13 sn, 10 dk 26 sn ve 15 dk 39 sn boyunca UVB uygulaması yapıldı. Optimizasyon sonuçları Şekil 4.6'da sunuldu.

UVB uygulamalarının hücre canlılığına etkilerinin (Şekil 4.6A) incelendiği MTT testi sonuçlarına göre, HFF ve HaCaT hücrelerinde tüm UVB uygulamaları 48 saat sonunda hücre canlılığında azalmaya yol açtı. 50 mJ/cm² UVB maruziyeti hücre canlılığını %10-15 oranında azaltırken ($P<0.01$, $P<0.001$), 100 mJ/cm² UVB maruziyetinde bu oran %17-20 oranındaydı ($P<0.001$). 200 ve 300 mJ/cm² UVB maruziyetlerinin hücre canlılığındaki etkisi çok daha ciddi boyuttaydı; özellikle HaCaT hücrelerinde her iki uygulama da kontrole göre %50'den fazla sitotoksik etki gösterdi ($P<0.001$).

UVB uygulamasının oksidatif stres üzerindeki etkileri intraselüler ROS seviyelerinin ölçüldüğü spektrofotometrik yöntemle, DCF ışımaya göre değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 4.6B'de sunuldu. Buna göre 50, 100, 200 ve 300 mJ/cm² UVB maruziyetlerinin, HFF hücrelerinde intraselüler ROS seviyesini sırasıyla 1.17- ($P<0.01$), 1.39- ($P<0.001$), 1.84- ($P<0.001$) ve 2.32-kat ($P<0.001$) artırırken, HaCaT hücrelerinde sırasıyla 1.26- ($P<0.001$), 1.5 ($P<0.001$), 2.03- ($P<0.001$) ve 2.68-kat ($P<0.001$) artışa sebep olduğu belirlendi.

UVB doz seçiminde son olarak, proliferasyon göstergesi Ki67 proteininin anlatımı üzerinden canlılık, Bax, Bcl2, kaspaz- ve PARP1 protein anlatımları üzerinden apoptoz değerlendirmeleri yapıldı. 300 mJ/cm² UVB uygulaması HaCaT hücrelerinin canlılığını %75 azalttığından protein analizleri için yeterli hücre elde edilemedi; bu nedenle 48 saat 50, 100 ve 200 mJ/cm² UVB uygulamaları sonrasında toplanan hücrelerden protein izolasyonu yapıldı ve ilgili proteinlerin anlatımı Western blot yöntemiyle belirlendi. Şekil 4.6C'de gösterildiği gibi UVB maruziyeti sonucunda HFF ve HaCaT hücrelerinde proliferasyon marker proteini Ki67 seviyelerinde önemli derecede azalmalar görüldü ($P<0.001$). Bu sonuç hücre canlılığı sonuçlarını destekler nitelikteydi. Şekil 4.6D'de ise apoptotik yanıtlar Bax/Bcl2 oranı ile kaspaz-3 ve PARP1'in kesilmiş fragmentlerinin değerlendirilmesiyle belirlendi. Sonuçta, tüm UVB uygulamalarının apoptozu indüklediği, 100 ve 200 mJ/cm² UVB maruziyetlerinin ise HFF ve HaCaT hücrelerinde istatistiksel olarak oldukça anlamlı derecede apoptotik yanıtlar oluşturduğu saptandı ($P<0.001$).

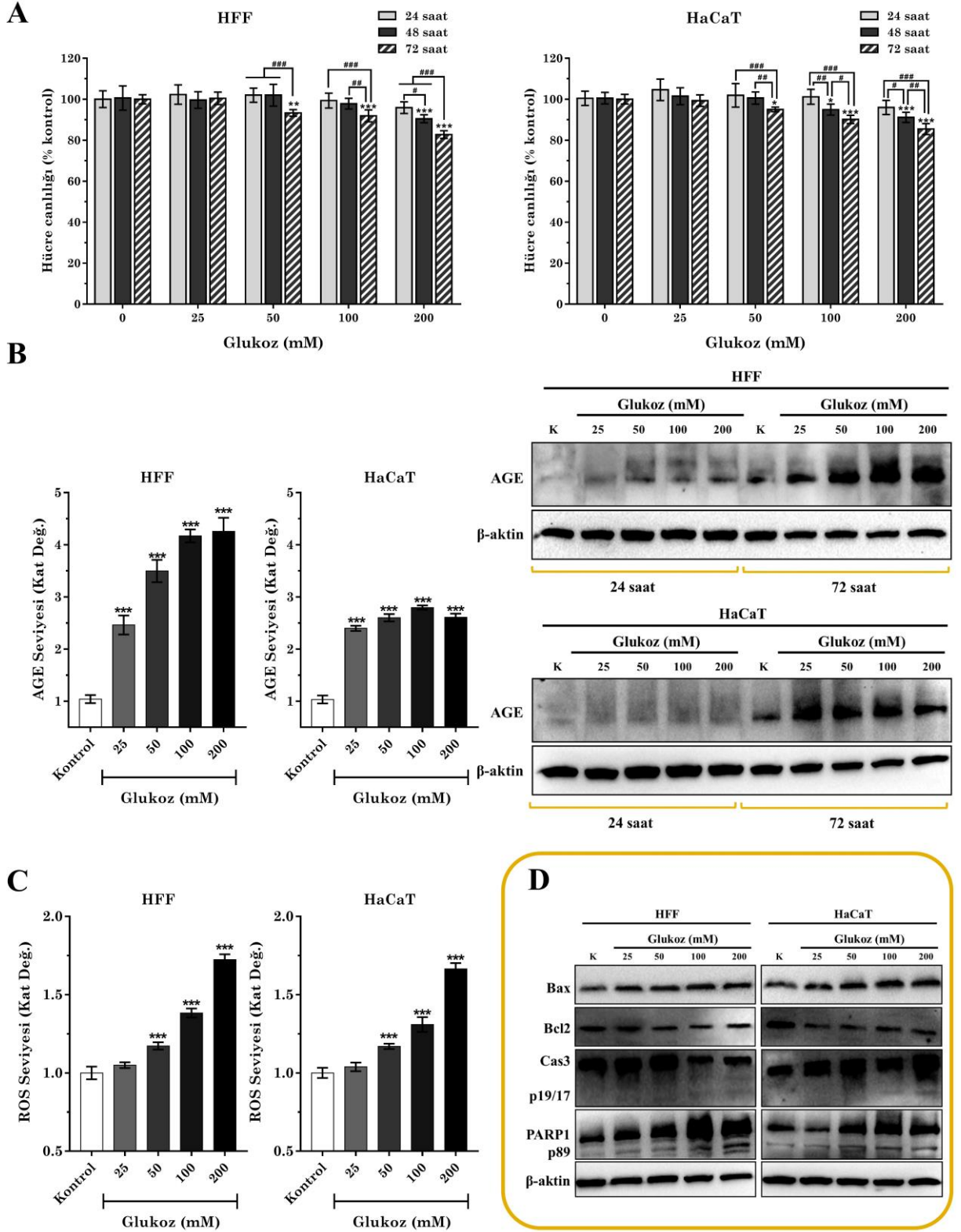


Şekil 4.6: HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanacak UVB dozunun optimizasyonu. Farklı dozlarda (50, 100, 200 ve 300 mJ/cm²) UVB maruziyetinin **(A)** hücre canlılığı, **(B)** oksidatif stres (intraselüler ROS seviyesi, spektrofotometrik olarak DCF floresan ışıması ölçüm sonucu), **(C)** proliferasyon marker proteini Ki67 seviyeleri (Western blot analizi) ve **(D)** apoptoz indüksiyonu (Western blot analizi) üzerindeki etkileri. *kontrolle göre kıyaslamayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Cas: kaspaz.

4.5. YÜKSEK GLUKOZ UYGULAMASI ve OPTİMİZASYONU

HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde yara gelişme/iyileşme sürecini yüksek glukozlu (hiperglisemi-benzeri) bir ortamda izleyebilmek için, hücreler önce farklı dozlarda glukozla işleme sokularak doz-süre optimizasyonu yapıldı. Hücreler 25, 50, 100 ve 200 mM glukozla 24, 48 ve 72 saat işleme sokuldu ve bu uygulamaların yara üzerindeki etkilerine bakıldı. Optimizasyon sonuçları Şekil 4.7’de sunuldu.

Farklı glukoz konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkilerinin (Şekil 4.7A) incelendiği MTT testi sonuçlarına göre, her iki hücre hattında da 24 saat süreyle daha yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerin canlılığında kontrole göre önemli bir değişim gözlenmezken, 48 ve 72 saatlik uygulamalar hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ancak az miktarda azalttı. HFF ve HaCaT hücrelerinde ilk etki 50 mM glukoz uygulanmış grupta gözlemlendi; 72 saat sonunda hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $P<0.01$, $P<0.05$). En yüksek (200 mM) glukoz dozu hücre canlılığını HFF hücrelerinde ~%18 azaltırken ($P<0.001$), HaCaT hücrelerinde ~%15 azalmaya neden oldu ($P<0.001$). Yüksek glukoz maruziyetinin yol açabileceği ileri glikasyon son ürünleri (AGE, “advanced glycation end products”) western blot ile analiz edildi (Şekil 4.7B). Yüksek glukozla 24 saat maruz kalan hücrelerde AGE miktarındaki artış düşük bulunurken, AGE seviyeleri 72. saatte oldukça anlamlı bir yükseliş gösterdi. 50 mM glukoz maruziyeti HFF ve HaCaT hücrelerinde, AGE miktarında sırasıyla 3.5- ve 2.6-kat artışına yol açtı ($P<0.001$). Farklı glukoz konsantrasyonları HaCaT hücrelerinde benzer sonuçlar ortaya koyarken, HFF hücrelerinde en yüksek AGE miktarı 200 mM glukoz grubunda saptandı (4.3-kat, $P<0.001$). Şekil 4.7C’de gösterildiği gibi, 72 saat sonunda ROS seviyelerinin ise her iki hücre hattında da arttığı ve en yüksek dozda kontrole göre ~1.7-kat artış olduğu belirlenirken, istatistiksel olarak anlamlı fark 50, 100 ve 200 mM glukoz uygulamalarında elde edildi ($P<0.001$). Son olarak, yüksek glukoz koşullarında HFF ve HaCaT hücrelerindeki apoptotik yanıtlar Bax/Bcl2 oranı ile kaspaz-3 ve PARP1’in kesilmiş fragmentlerinin western blot analizleriyle değerlendirildi (Şekil 4.7D). Her iki hücre hattında da 50, 100 ve 200 mM glukoz uygulamalarının apoptoz indüksiyonuna neden olduğu tespit edildi. Tüm analizler sonucunda, yüksek glukoz koşulu için 72 saat 50 mM glukoz uygulaması seçildi ve ilk 24 saat bu glukoz dozuna maruz kalan hücrelere 48 saat RA ve RJ uygulaması yapılmasına karar verildi.



Şekil 4.7: HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde hiperglisemi-benzeri koşulları yaratmak için uygulanacak glukoz dozunun optimizasyonu. Yüksek (25, 50, 100 ve 200 mM) glukoz maruziyetinin (A) hücre canlılığı, (B) AGE miktarı, (C) oksidatif stres (intraselüler ROS seviyesi, spektrofotometrik olarak DCF floresan ışıması ölçüm sonucu) ve (D) apoptoz indüksiyonu (Western blot analizi, kantifikasyon değerleri için bkz. EK3) üzerindeki etkileri. AGE: “advanced glycation end products” Cas: kaspaz.

4.6. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN UVB UYGULANMIŞ HÜCRELERDE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ

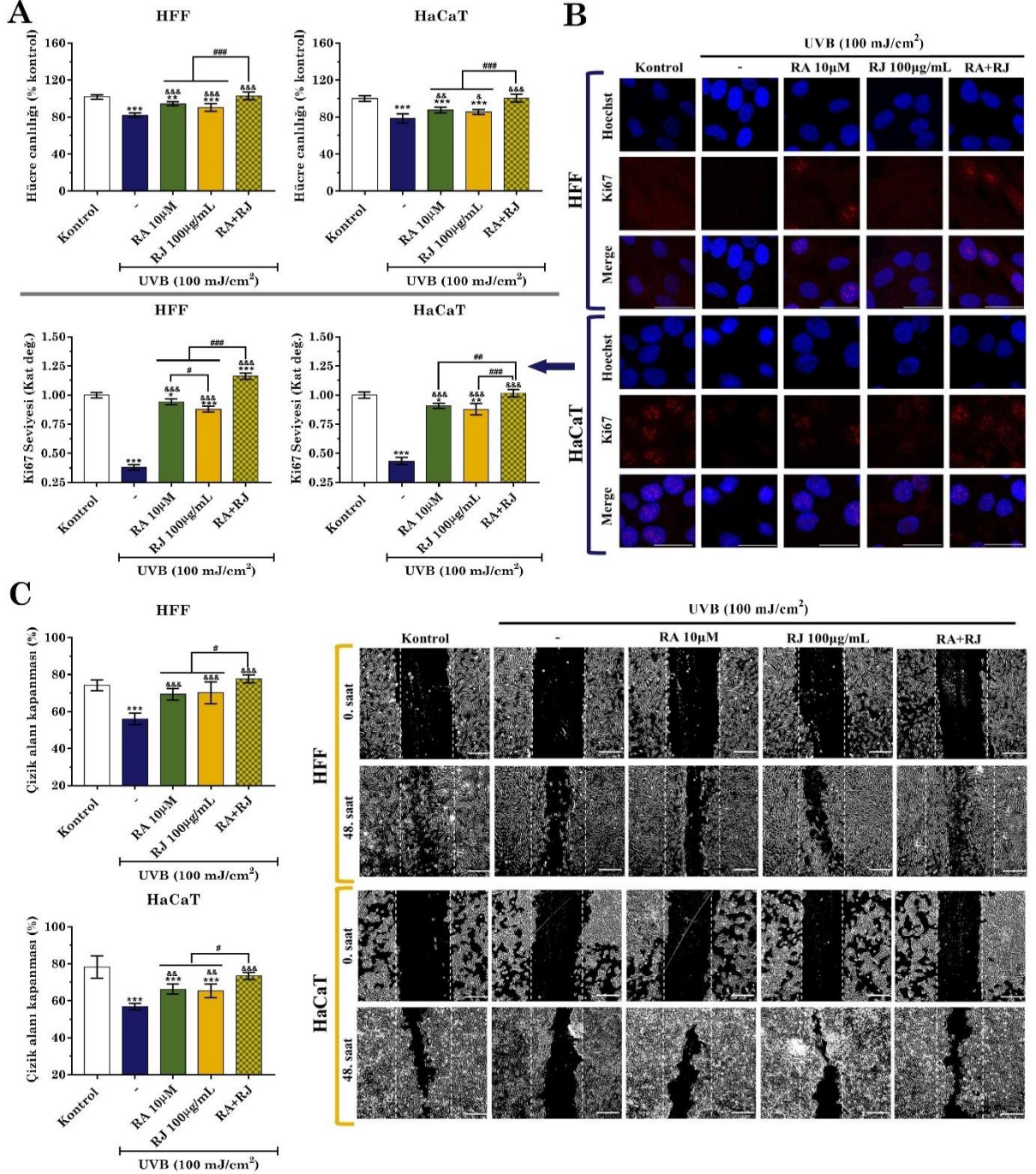
Rosmarinik asit (RA) ve/veya arı sütünün (RJ) yara iyileştirme potansiyelleri UVB hasarlı hücrelerdeki (1) hücre proliferasyonu ve yara kapanması, (2) hücre içi ROS seviyeleri ve inflamasyon, (3) protein karbonil ve AGE miktarı, (4) lipid peroksidasyonu, (5) apoptoz, (6) ER stresi, (7) hücre sinyal yollarında görevli moleküllerin anlatım düzeyleri ve (8) kök hücre ve EMT sinyalleşmesinde görevli proteinlerin anlatımı değerlendirilerek ortaya koyuldu.

4.6.1. Hücre Proliferasyonu ve Yara Kapanmasına Etkileri

HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinin 100 mJ/cm² UVB'ye maruziyetiyle azalan proliferasyonu ve buna karşı RA, RJ ve RA+RJ uygulamalarının etkisi MTT testinin yanı sıra Ki67 proliferasyon marker proteininin anlatım analizi (immünofloresan işaretleme) ile değerlendirildi. UVB'nin ve uygulamaların hücresel hasarlar ve moleküler göstergelere etkileri *in vitro* çizik yara testi ile ortaya koyuldu (Şekil 4.8). Grafiklerde belirtilen Kontrol grubu hücrelere UVB ve doğal madde uygulamaları yapılmadı; sadece UVB ile hasar verilen, doğal maddelerle işleme sokulmayan hücreler (UVB grubu) ise “–” işareti belirtildi.

UVB'nin etkisi ile ~%50 azalan hücre canlılığının 48 saatlik doğal madde uygulamaları sonucunda arttığı ve en etkili sonucun kombine uygulama grubundan elde edildiği belirlendi. Tekli uygulamalar, UVB hasarının neden olduğu HFF ve HaCaT hücre canlılığındaki azalmayı hafifletti; ancak HaCaT hücrelerindeki hasarı tam olarak düzeltmeye yetmedi. Hem HFF ve hem de HaCaT hücre canlılığı RA+RJ uygulanan gruplarda UVB'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksekti; sırasıyla %102 ve %100 canlılık tespit edildi (Şekil 4.8A). Bu sonuç, proliferasyon göstergesi Ki67'nin immünofloresan işaretleme ile elde edilen sonuçlarıyla da uyumluydu; Ki67 seviyelerinde UVB grubuna göre anlamlı derecede yükseliş vardı. UVB uygulaması sonrasında ~2.5-kat azalan Ki67 seviyeleri ($P<0.001$), hem tekli uygulamalarda hem de kombine uygulamalarda yükseldi ve kontrol grubu hücrelerindeki seviyeye geldi ($P<0.001$) (Şekil 4.8B). UVB uygulamasının HFF ve HaCaT hücrelerinde çizik bölgesinin kapanmasında %44 azalmaya yol açtığı ($P<0.001$) ve özellikle kombine uygulamanın yara iyileşmesini hücrelerin göçünü hızlandırarak sağladığı belirlendi. HFF hücrelerinde 48 saat içinde kontrol grubu hücrelerinde çizik alanı %74 oranında kapanırken, UVB hasarı sonrası RA, RJ ve RA+RJ uygulaması yapılan hücrelerde çizik alanı kapanması sırasıyla %69, %70 ve

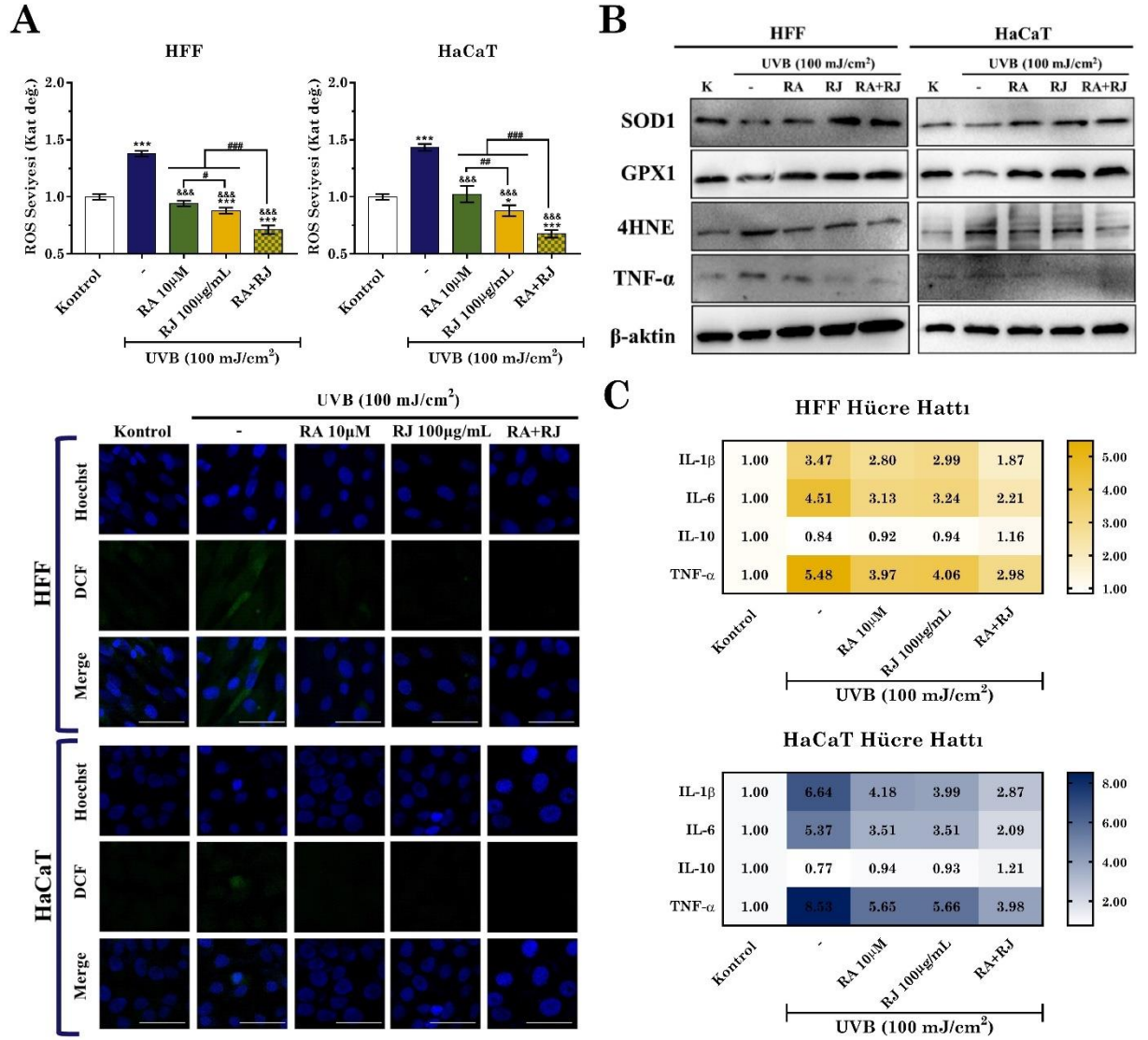
%77'ydi. HaCaT hücrelerinde 48 saat içinde kontrol grubunda yara bölgesi %80 oranında kapanırken, UVB hasarı sonrası RA, RJ ve RA+RJ uygulaması alan hücrelerde çizik alanı kapanması sırasıyla %66, %65 ve %73 olarak belirlendi (Şekil 4.8C).



Şekil 4.8: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) hücre canlılığına (MTT testi), (B) proliferasyon markeri Ki67'nin hücrel lokalizasyonuna ve seviyesine (immüno Floresan işaretleme) ve (C) yara alanı kapanmasına etkisi (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; & $P < 0.01$, && $P < 0.05$, &&& $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

4.6.2. İntraselüler ROS Seviyelerine ve İnflamasyona Etkileri

UVB maruziyetiyle, HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde artan oksidatif stres üzerine RA, RJ ve RA+RJ uygulamalarının etkisi, intraselüler ROS oluşumu (spektroflorometrik ve floresan mikroskopik) ve stresle ilişkili bazı proteinlerin düzeyi (Western blot) üzerinden değerlendirildi. Hücrelerdeki inflamasyon yanıtı IL-1 β , IL-6, IL-10 (qRT-PCR) ile TNF- α (qRT-PCR ve Western blot) üzerinden değerlendirildi (Şekil 4.9).



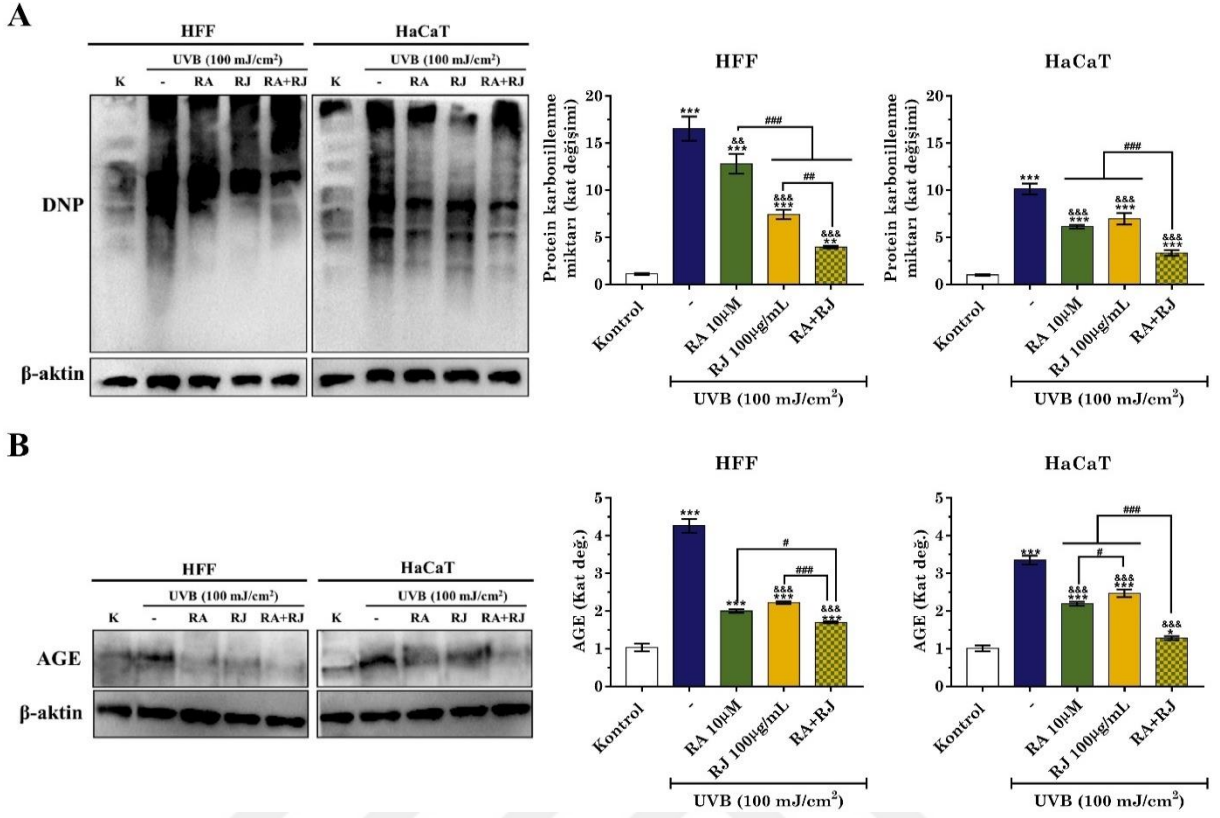
Şekil 4.9: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin **(A)** intraselüler ROS seviyelerine (spektroflorometrik ve floresan mikroskopik olarak analizlenen DCF floresan ışıması sonucu) ve **(B-C)** oksidatif stres ve inflamasyon belirteçlerine etkisi (sırasıyla, western blot ve qRT-PCR analizi; *Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK4*). *Kontrole (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; &&& $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$).

UVB'nin etkisi ile ~1.4-kat ($P<0.001$) artan ROS seviyelerinin uygulamalar sonucunda azaldığı ve en etkili sonucun kombine uygulama grubundan elde edildiği belirlendi. UVB maruziyeti sonrasında hem HFF hem de HaCaT hücrelerinde tek RA ya da RJ uygulamasının ROS'u süpürdüğü ve UVB almamış kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiği belirlendi. UVB grubundaki ROS seviyesi, RA+RJ uygulanan gruplardan ~2-kat yüksekti ($P<0.001$) (Şekil 4.9A). UVB-indüklü oksidatif strese, antioksidan enzimlerin (SOD1 ve GPX1) seviyelerindeki düşüşün ve 4HNE eklentili protein seviyesindeki artışın da eşlik ettiği görüldü RA ve/veya RJ uygulamaları SOD1 ve GPX1 anlatımını artırırken 4HNE eklentili proteinlerde düşüşe yol açtı (Şekil 4.9B). Ayrıca UVB uygulaması, erken evre inflamasyon belirteci TNF- α ile proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve IL-6) anlatımında artışa ve anti-inflamatuvar sitokin IL-10'un anlatımında azalışa yol açtı. RA, RJ ve RA+RJ uygulamaları UVB ilişkili inflamasyonu zayıflattı (Şekil 4.9B ve Şekil 4.9C). ROS ve inflamasyonu en etkili şekilde azaltan örneğin RA+RJ olduğu gözlemlendi.

4.6.3. Protein Karbonilleri ve AGE Miktarına Etkileri

UVB maruziyetinin HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde yol açtığı oksidatif protein hasarlarından biri olan protein karbonil miktarını belirlemek için spektrofotometrik ve immünolojik yöntemler kullanıldı. Protein karbonil miktarı, protein yan zincirlerindeki karbonil grupları ile dinitrofenil hidrazin arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan dinitrofenil hidrazonun spektrofotometrik ölçümü ve Oxyblot ticari kiti kullanılarak immünolojik olarak saptanmasıyla belirlendi. İki yöntemin sonuçları birbiriyle uyumluydu (Şekil 4.10).

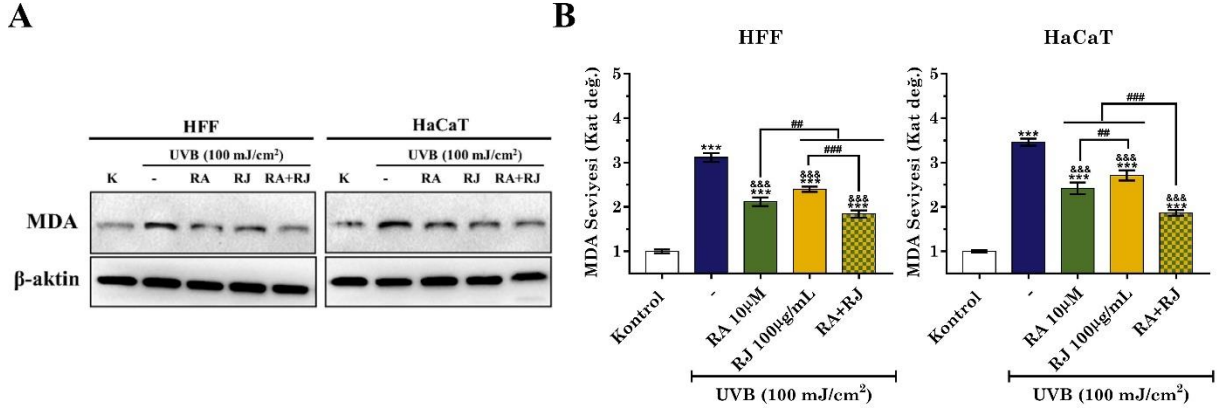
UVB maruziyeti, karbonillenmiş protein miktarında kontrole göre HFF hücrelerinde ~16-kat, HaCaT hücrelerinde ise ~10-kat artışla sonuçlandı. Tek olarak RA ve RJ uygulaması karbonillenme hasarında azalmaya yol açarken kombine uygulama en etkili sonucu ortaya koydu ($P<0.001$). HFF ve HaCaT hücrelerinde UVB uygulamasına bağlı artan karbonillenme hasarı, sırasıyla ~4-kat ve ~3.4-kat geriledi. Bu da RA+RJ kombine uygulamasının her iki hücrede de artan karbonillenmiş protein miktarında %75 azalma sağladığını gösterdi (Şekil 4.10A). UVB uygulamasıyla HFF ve HaCaT hücrelerinde, sırasıyla 4.2- ve 3.4-kat artan protein AGE seviyesi RA ve/veya RJ uygulamalarıyla, en çok da RA+RJ kombine uygulamasıyla (~2.5-kat) düştü (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin **(A)** protein karbonil hasarına (Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK5) ve **(B)** AGE miktarına etkisi (spektrofotometrik ölçüm sonucu). (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ### $P<0.01$, ### $P<0.001$).

4.6.4. Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

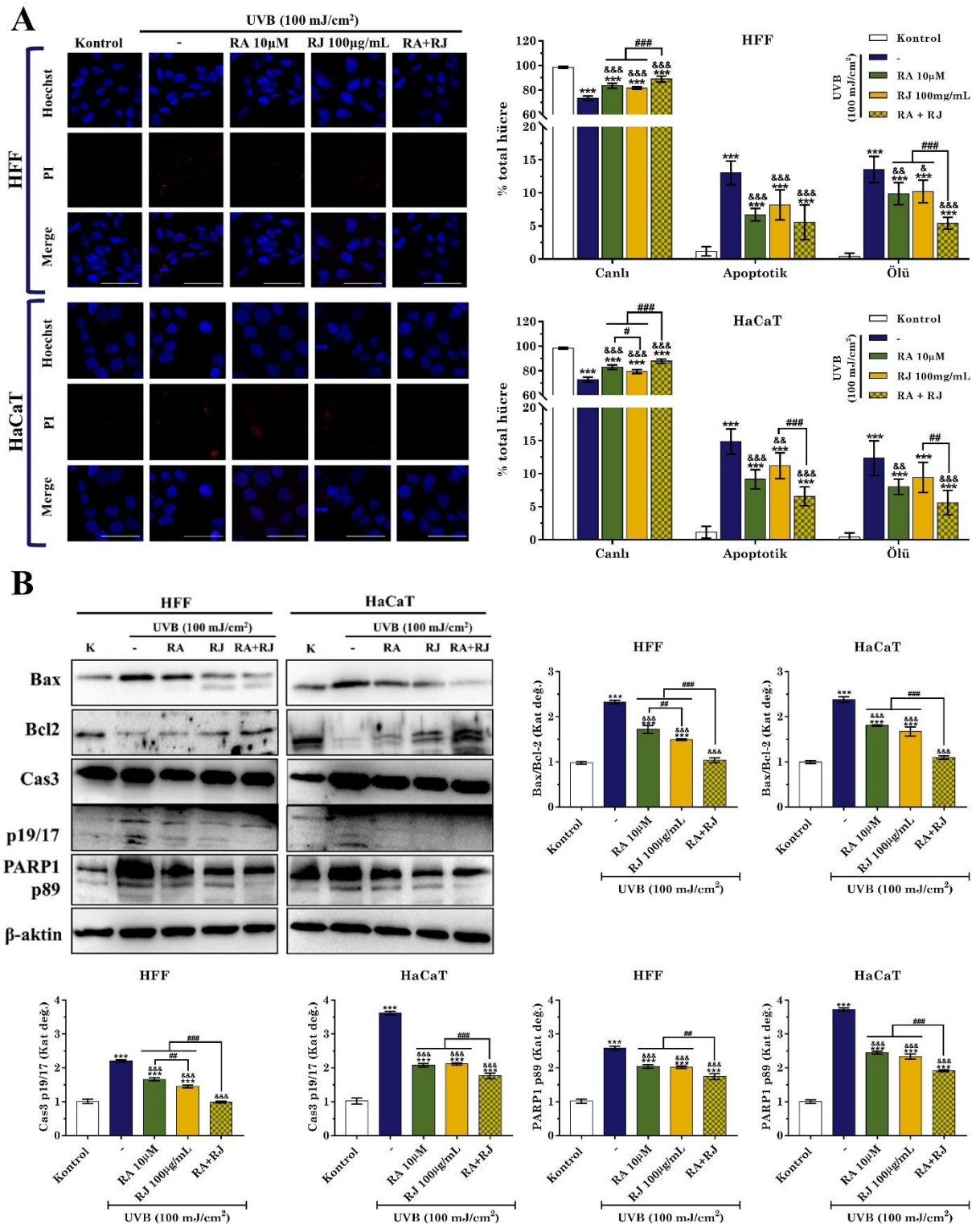
UVB maruziyetinin HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde yol açtığı lipid peroksidasyonu ve doğal maddelerin bu sürece etkisi (Şekil 4.11), malondialdehit (MDA) ile konjuge protein düzeyinin western blot analizine (Şekil 4.11A) ek olarak spektrofotometrik TBARS sonuçları üzerinden değerlendirildi (Şekil 4.11B). UVB maruziyeti HFF ve HaCaT hücrelerinde, lipid peroksidasyonunu kontrole göre sırasıyla 3.1-kat ve 3.5-kat artırdı ($P<0.001$). RA ve/veya RJ uygulamaları TBARS ve MDA eklenti seviyelerinde anlamlı düşüşler sağladı. En belirgin düşüş (~2-kat) RA+RJ kombine uygulamasıyla elde edildi.



Şekil 4.11: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin lipid peroksidasyonuna etkisi. **(A)** Western blot yöntemi ile malondialdehit (MDA) bakiyeli protein tespiti (*kantifikasyon değerleri için bkz. EK6*). **(B)** Spektrofotometrik ölçüm ile belirlenen TBARS miktarlarının (µM MDA eşdeğeri/mg protein) bağlı değerlendirilmesi. Kontrole (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P < 0.001$; &&& $P < 0.001$; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

4.6.5. Apoptoz Üzerine Etkileri

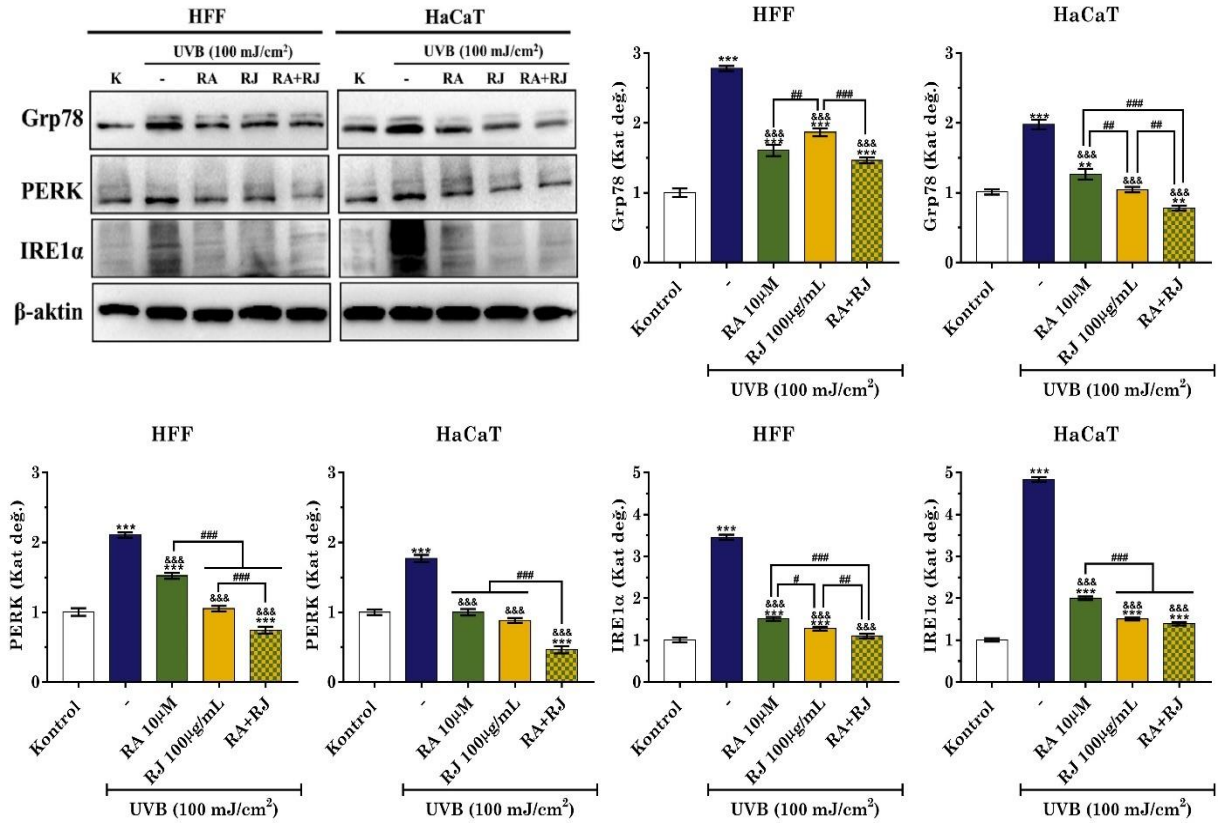
Hücrelerde UVB' maruziyetiyle indüklenen apoptoz ve uygulamaların apoptoz üzerine etkisi, ölü, apoptotik ve canlı hücrelerin belirlendiği floresans HO/PI ikili boyama yöntemi ve Bax/Bcl2 oranı, kaspaz-3 ve PARP1 kesilmiş fragmentinin analiz edildiği western blot yöntemiyle incelendi (Şekil 4.12). UVB, her iki hücre grubunda (HFF ve HaCaT) kontrole kıyasla istatistiksel olarak oldukça anlamlı apoptoz artışına neden oldu ($P < 0.001$). RA ve/veya RJ uygulamaları apoptotik hücre oranında (Şekil 4.12A) ve apoptotik proteinlerin seviyelerinde (Şekil 4.12B) belirgin düşüş sağladı. UVB maruziyeti sonucunda apoptotik ve ölü hücre oranları, HFF hücrelerinde, sırasıyla %13 ve %13.5; HaCaT hücrelerinde, sırasıyla %14.8 ve %12.3 olarak belirlendi ($P < 0.001$). RA+RJ uygulaması sonucunda apoptotik hücre oranı ~%6 ve ölü hücre oranı ~%5 olarak belirlendi ($P < 0.001$) (Şekil 4.12A). UVB uygulaması sonucunda HFF ve HaCaT hücrelerinde apoptozun önemli bir göstergesi olan Bax/Bcl2 oranının 2.3-kat arttığı belirlendi ($P < 0.001$). Kesilmiş kaspaz-3 ile PARP1 fragmentleri seviyelerinin HFF hücrelerinde sırasıyla 2.2- ve 2.6-kat arttığı, HaCaT hücrelerinde ise 3.6- ve 3.7-kat yükseldiği belirlendi ($P < 0.001$). RA, RJ ve özellikle en iyi sonuçları ortaya koyan RA+RJ uygulamaları sonucunda UVB grubuna göre oldukça anlamlı seviyelerde azalan apoptotik marker seviyeleri ($P < 0.001$) tespit edilerek uygulamaların UVB- indüklü apoptozu hafiflettiği gösterildi (Şekil 4.12B).



Şekil 4.12: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin apoptoza etkisi. **(A)** Apoptozun HO/PI floresan boyaması ile analizi, **(B)** Apoptozun western blot ile analizi (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$). Cas: Kaspaz.

4.6.6. ER Stresi Üzerine Etkileri

UVB maruziyetinin HFF ve HaCaT hücrelerinde yol açtığı ER stresi ve doğal maddelerin bu stres üzerine etkisi, Grp78, PERK ve IRE1 α proteinlerinin anlatımına göre değerlendirildi (Şekil 4.13). UVB uygulaması ER stresinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan oldukça anlamlı artışlara yol açtı ($P<0.001$). RA ile RJ tekli uygulamalarının sonucunda ER stresi belirteçlerinde azalma saptanırken, en iyi sonucun RA+RJ grubunda olduğu ve UVB hasarına bağlı oluşan ER stresinin önemli derecede hafiflediği belirlendi. HFF ve HaCaT hücrelerinde UVB maruziyeti sonrasında Grp78 seviyeleri sırasıyla ~3- ve 2-kat artarken, PERK seviyeleri ~2-kat, IRE1 α seviyeleri ise sırasıyla ~3- ve 5-kat artış gösterdi ($P<0.001$). RA ve RJ tekli uygulamaları ER stresini hafifletmede tek başlarına etkili olsalar da RA+RJ uygulamasının ER stresini ve dolayısıyla protein homeostazını korumada daha etkili olduğu anlaşıldı.



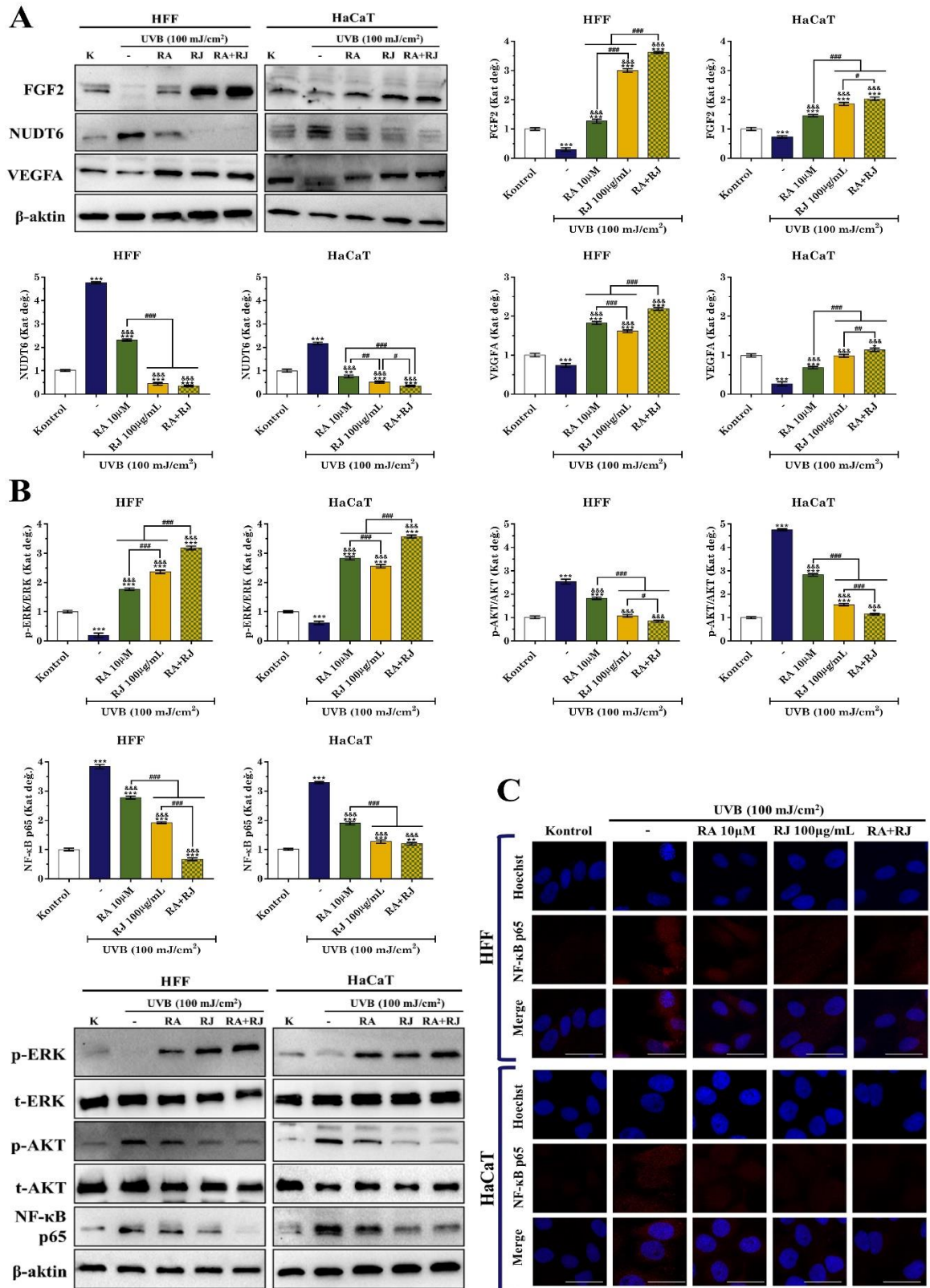
Şekil 4.13: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerine uygulanan rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin ER stresine etkisi (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).

4.6.7. Hücre Sinyal Yollarında Görevli Moleküller Üzerine Etkileri

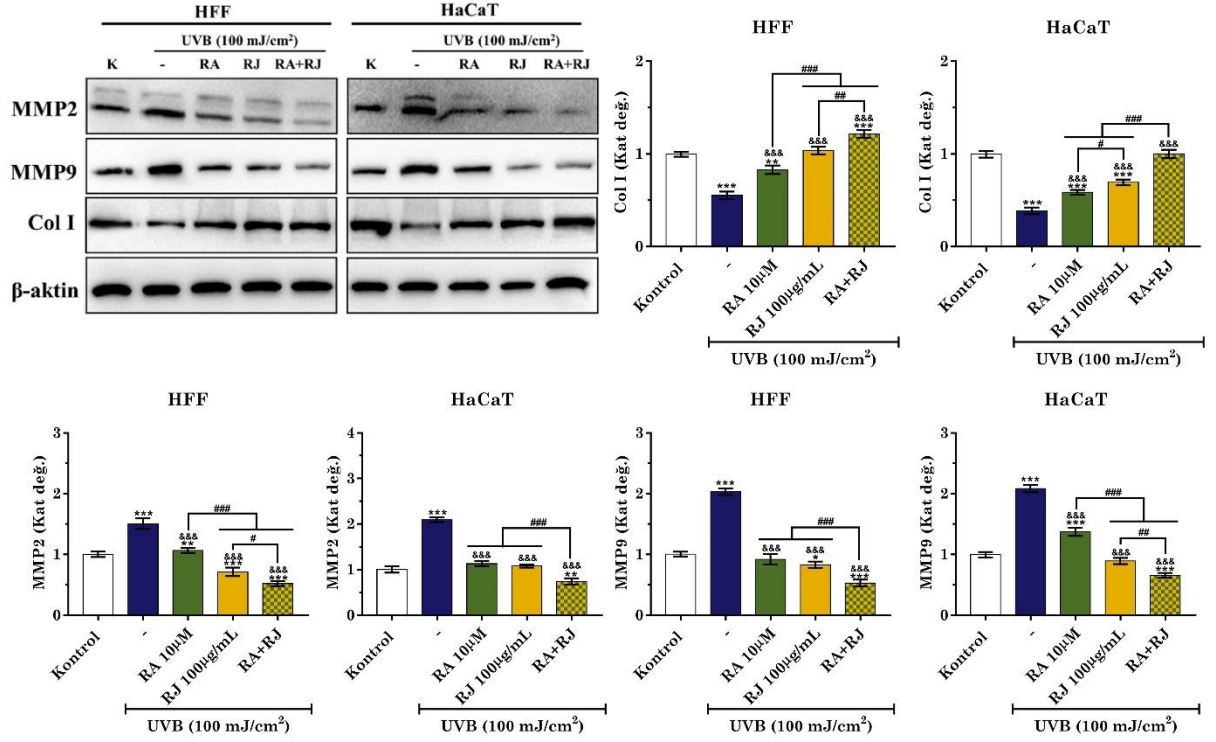
UVB ve doğal madde uygulamalarının HFF ve HaCaT hücrelerinde sinyal moleküllerinin anlatım seviyelerine etkisinin incelendiği western blot deneyi sonuçları Şekil 4.14'te sunuldu. UVB maruziyeti, hücre büyüme faktörlerinden FGF2 ve VEGFA seviyelerini düşürürken (sırasıyla HFF hücrelerinde, 3- ve 1.4-kat, $P<0.001$; HaCaT hücrelerinde ise 1.4- ve 3.85-kat, $P<0.001$), FGF2'nin antisensi olan NUDT6 seviyelerinde önemli bir artış saptandı (HFF hücrelerinde 4.8-kat, $P<0.001$; HaCaT hücrelerinde 2.2-kat, $P<0.001$). RA, RJ ve RA+RJ uygulamalarının bu yanıtları tersine çevirdiği ve NUDT6 anlatımında azalmaya, FGF2 ve VEGFA anlatımında artışa yol açtığı belirlendi (Şekil 4.14A).

Hücre sinyalizasyonunda oldukça önemli bir yeri olan p-ERK/ERK oranının UVB uygulaması sonucunda HFF hücrelerinde 5.3-kat ($P<0.001$) ve HaCaT hücrelerinde 1.6-kat azaldığı ($P<0.001$), aksine RA+RJ uygulamasının ise bu yanıtı tersine çevirdiği western blot sonucu ile ortaya koyuldu. Dikkat çekici olarak, HFF hücrelerinde p-ERK/ERK seviyelerindeki bu artış kontrol grubuna göre 3.2-kat iken ($P<0.001$), UVB grubuna göre ise 16.7-kat idi. HaCaT hücrelerindeki artışlar kontrole göre 3.5-kat, UVB grubuna göre 5.8-kat olarak belirlendi. İnflamasyonda önemli bir hücre içi sinyal yolağı olan AKT/NF- κ B'nin UVB maruziyeti sonrasında yukarı regüle olduğu (p-AKT seviyelerinde HFF hücrelerinde 2.5-kat artış, $P<0.001$; HaCaT hücrelerinde ise 4.8-kat artış, $P<0.001$), RA+RJ uygulaması sonucunda ise p-AKT/AKT seviyelerinde ve NF- κ B p65 seviyelerinde önemli bir düşüş olduğu belirlendi. UVB'ye bağlı olarak ~3.5 kat artan p65 seviyelerinin HFF ve HaCaT hücrelerinde kontrole göre, sırasıyla, 0.67- ve 1.2-kata kadar indiği belirlendi (Şekil 4.14B). Bu sonucu bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin nükleer lokasyonundaki azalış da destekledi (Şekil 4.14C).

Yara iyileşmesinde önemli rollere sahip olan MMP2 ve MMP9 seviyelerinde önemli bir artışa (iki hücre hattında da ~2-kat artış) ve beraberinde kolajen I seviyesinde ~2-katlık bir azalma (kolajen seviyelerinin kontrole göre yarıya indiği belirlendi) ile önemli bir hasara neden olan UVB maruziyetine karşı RA+RJ'nin iyileştirici etkisi MMP2 ile MMP9 seviyelerindeki azalma ve kolajen I seviyelerindeki artışla gösterildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.14: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin **(A)** büyüme faktörleri **(B)** hücre içi sinyal yolları ve **(C)** NF-κB nükleer lokasyonu üzerine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001; &&&*P*<0.001; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.001).

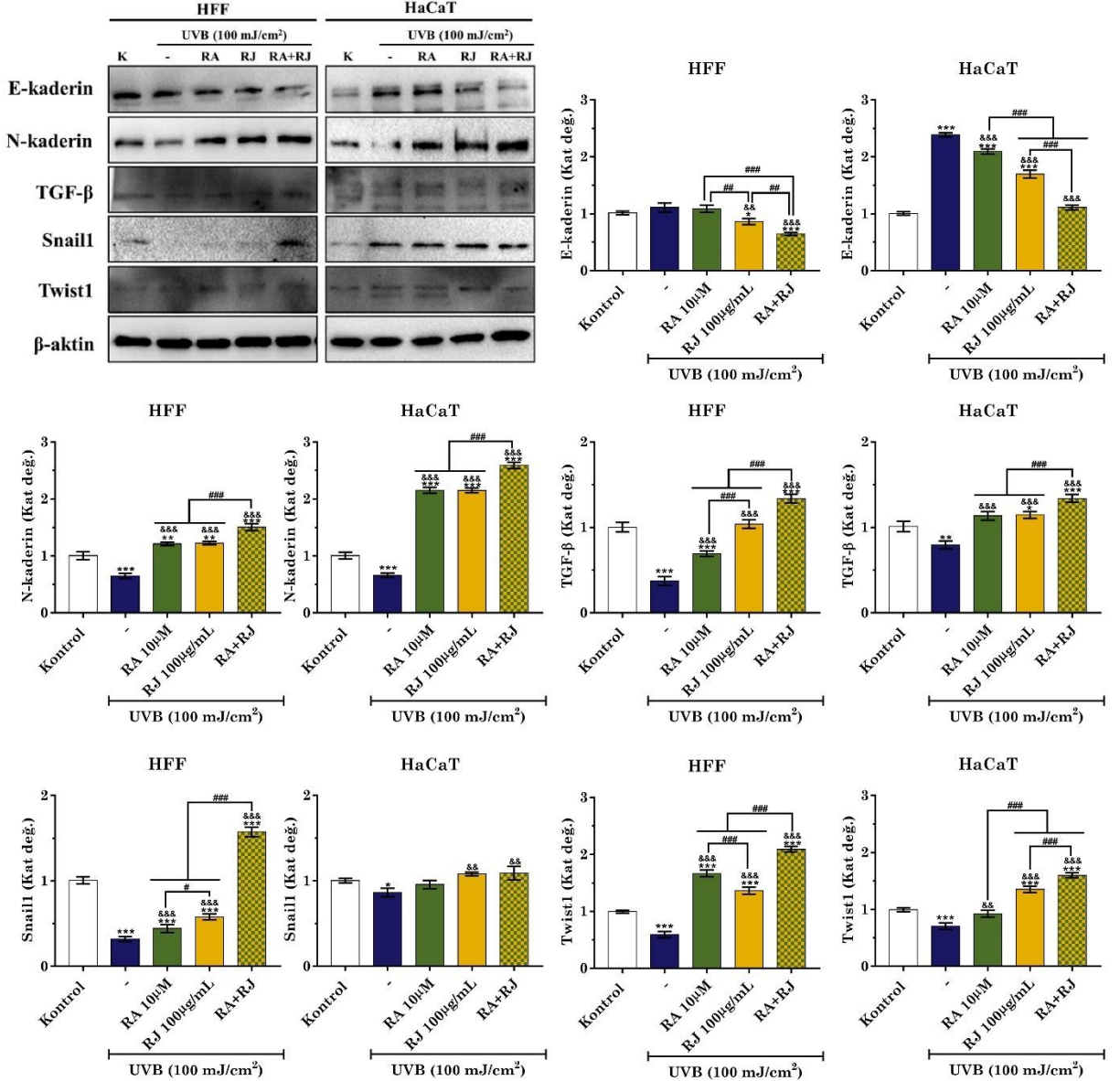


Şekil 4.15: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin matris metalloproteinaz (MMP) -2 ve -9 ile kolajen I (Col I) anlatımı üzerine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001; &&&*P*<0.001; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.001).

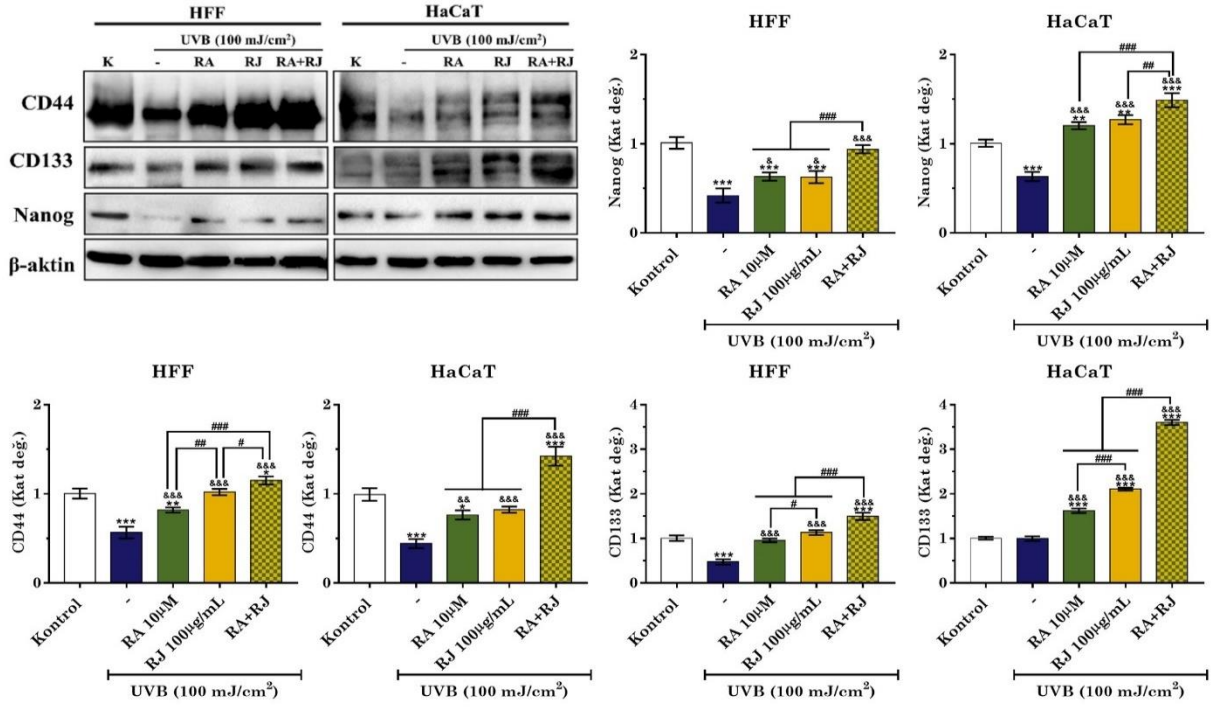
4.6.8. Kök Hücre ve EMT Marker Proteinleri Üzerine Etkileri

UVB ve doğal madde uygulamalarının HFF ve HaCaT hücrelerinde kök hücre farklılaşması ve EMT sinyalleşmesi üzerindeki etkisi western blot yöntemiyle marker proteinlerin analizi yapılarak araştırıldı. EMT belirteci olarak Twist1, Snail1, TGF-β, E-kaderin ve N-kaderin protein anlatımları incelenirken, kök hücre belirteci olarak CD44, CD133 ve Nanog değerlendirildi. UVB hasarına bağlı olarak azalan kök hücre ve EMT marker seviyeleri doğal madde uygulamaları sonucunda artışa geçti. EMT sonuçları Şekil 4.16'da kök hücre markerlarına ilişkin sonuçlar ise Şekil 4.17'de verildi. RA ve RJ'nin EMT sürecini tetikleyerek de yara iyileştirme yeteneklerini sergiledikleri ortaya koyuldu. Doğal madde uygulamaları sonucunda EMT için önemli bir işaret olan E-kaderindeki düşüş ve N-kaderindeki artış önemli orandaydı. Örneğin, HaCaT hücrelerinde UVB hasarıyla 2.4-kat artan E-kaderinin RA+RJ uygulaması sonucunda tekrar 1.1-kata düştüğü (*P*<0.001), N-kaderin seviyelerinin ise UVB grubunda 0.66-kata düştüğü ancak RA+RJ grubunda bu değer 2.6-katlık bir artış gösterdiği

ortaya koyuldu ($P<0.001$) (Şekil 4.16). RA+RJ uygulaması EMT sürecinin diğer önemli proteinlerinde de artışa yol açtı. RA+RJ uygulamasının HFF ve HaCaT hücrelerinde UVB grubuna göre CD44 seviyelerinde sırasıyla 2- ve 3.22-kat artış, CD133 seviyelerinde sırasıyla 3.2- ve 3.6-kat artış ve son olarak ise Nanog seviyelerinde sırasıyla 2.2- ve 2.4- artış sağladığı tespit edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.16: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) üzerine etkileri. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).



Şekil 4.17: UVB (100 mJ/cm²) hasarlı HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin kök hücre belirteçlerinin anlatımına etkileri. (*Kontrol (K) göre, & UVB uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001; &*P*<0.05, &&*P*<0.01, &&&*P*<0.001; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.001).

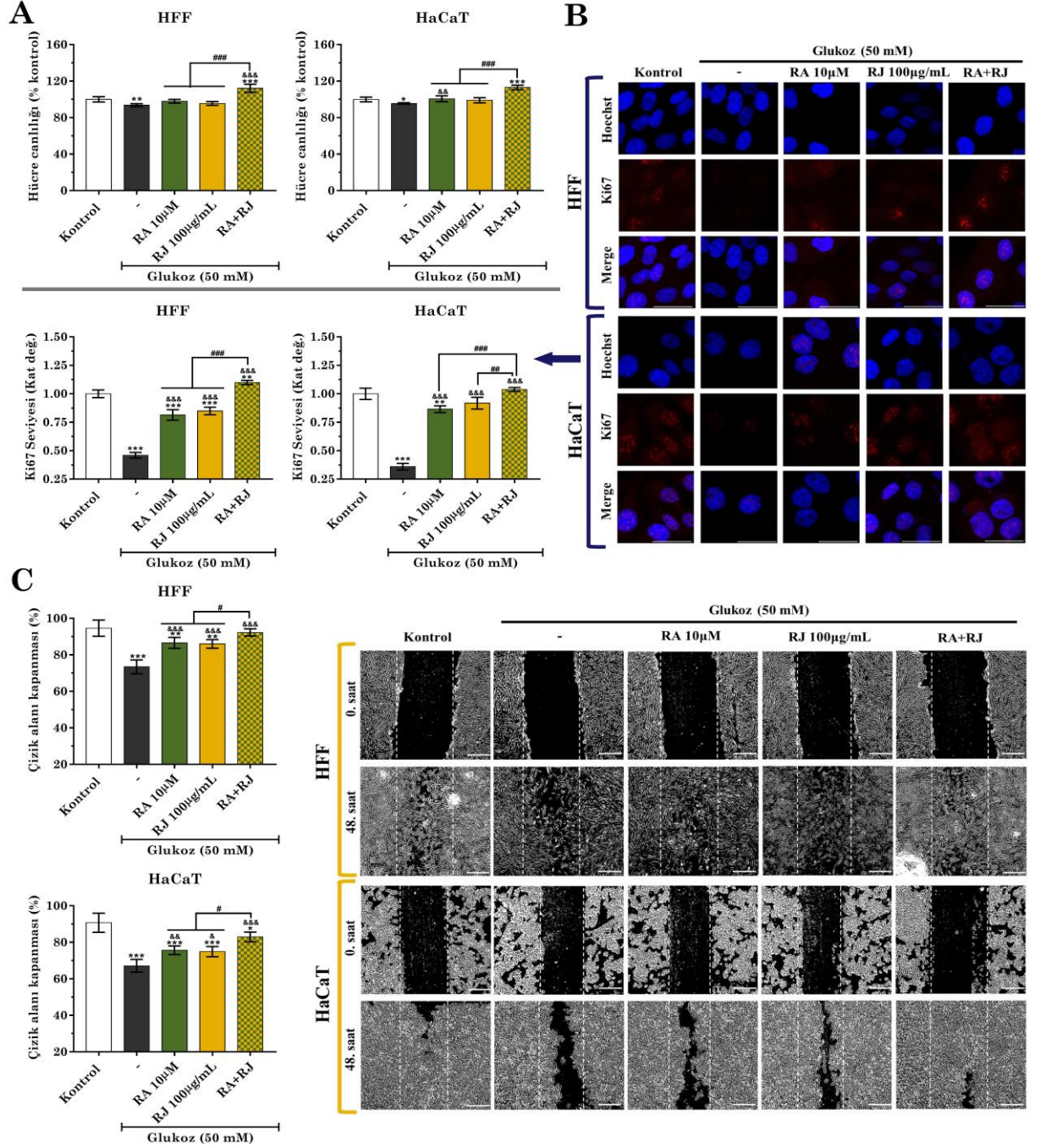
4.7. ROSMARİNİK ASİT ve ARI SÜTÜNÜN YÜKSEK GLUKOZ UYGULANMIŞ HÜCRELERDE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ

Rosmarinik asit (RA) ve/veya arı sütünün (RJ) hiperglisemi-benzeri yüksek glukoz varlığında yara iyileştirme potansiyelleri (1) hücre proliferasyonu ve yara kapanması, (2) intraselüler ROS seviyeleri ve inflamasyon, (3) protein karbonil ve AGE miktarı, (4) lipid peroksidasyonu, (5) apoptoz, (6) ER stresi, (7) hücre sinyal yollarında görevli bazı proteinlerin anlatımı ve (8) kök hücre ve EMT sinyalleşmesinde görevli proteinlerin anlatımı değerlendirilerek ortaya koyuldu.

4.7.1. Hücre Proliferasyonu ve Yara Kapanmasına Etkileri

HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinin yüksek (50 mM) glukoz maruziyetle azalan proliferasyonu ve buna karşı RA, RJ ve RA+RJ uygulamalarının etkisi MTT testi ve immüno Floresan işaretleme yöntemiyle belirlenen proliferasyon göstergesi Ki67 marker proteininin anlatım analizi ile değerlendirildi. Hiperglisemi-benzeri koşulların ve uygulamaların hücresel hasarlar ve moleküler göstergeler üzerine etkileri *in vitro* çizik testi ile

ortaya koyuldu (Şekil 4.18). Grafiklerde belirtilen Kontrol grubu hücrelere yüksek glukoz ve doğal madde uygulamaları yapılmadı; sadece yüksek glukoz uygulanan, doğal maddelerle işleme sokulmayan hücreler (glukoz grubu) ise “-” işareti ile belirtildi.

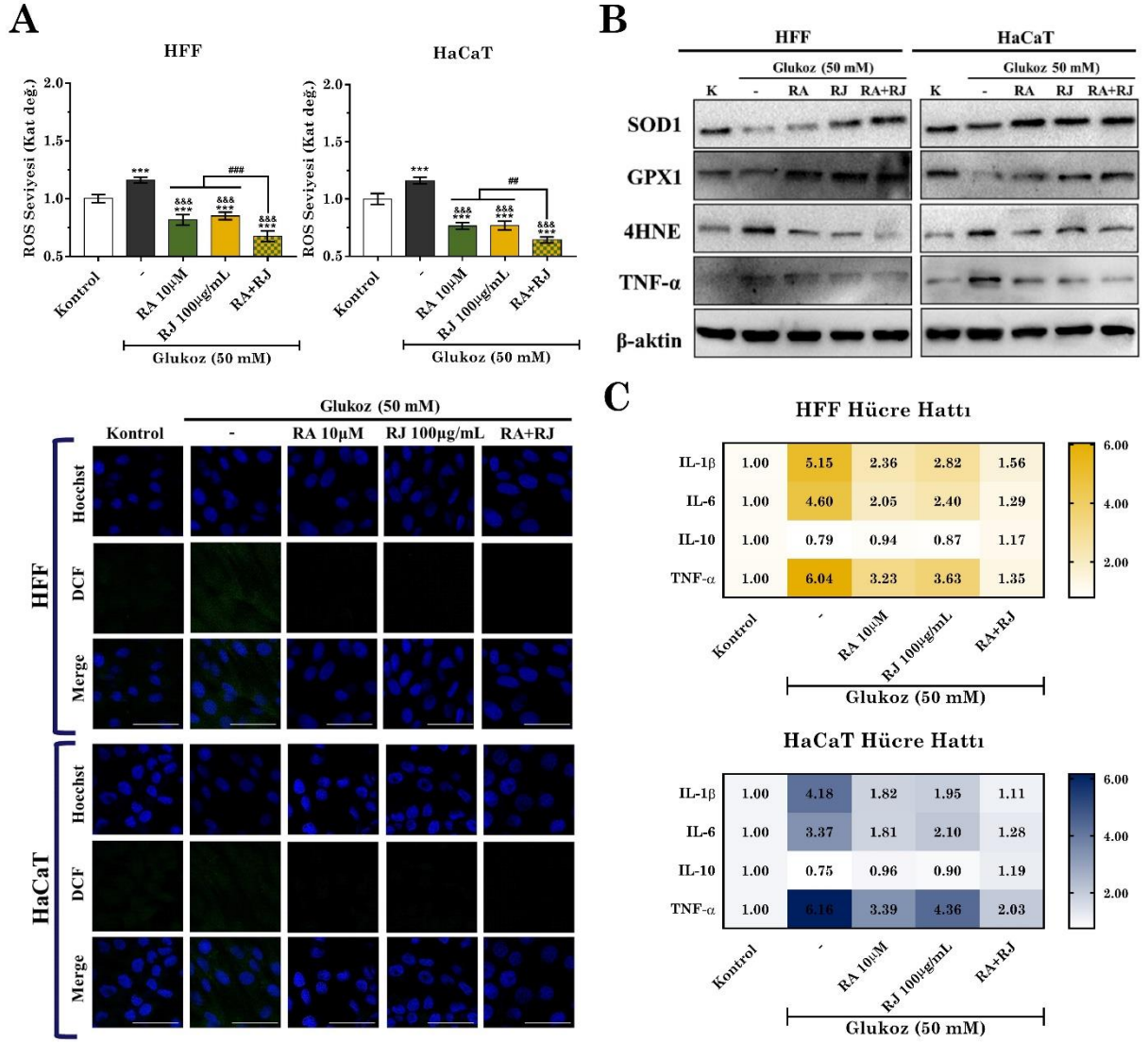


Şekil 4.18: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) hücre canlılığına (MTT testi), (B) proliferasyon markeri Ki67'nin hücrel lokalizasyonuna ve seviyesine (immüno Floresan işaretleme) ve (C) yara alanı kapanmasına etkisi (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

Yüksek glukoz maruziyet, hücre canlılığında önemli bir azalmaya yol açmadı; ancak RA+RJ uygulaması proliferasyonu hem kontrole göre hem de glukoz grubuna göre anlamlı düzeyde arttırdı ($P<0.001$) (Şekil 4.18A). Bu sonucu proliferasyon markeri olan Ki67'nin immüno floresan işaretleme ile elde edilen sonuçları destekledi. Yüksek glukoz maruziyetinin hücre canlılığını azaltmadığı, ancak hücrelerin çoğalmasını engellediği Ki67'nin nükleer seviyelerindeki azalma ile ortaya koyuldu. Yüksek glukoz maruz kalan HFF ve HaCaT hücrelerinde Ki67 marker proteini, sırasıyla 2.5- ve 2.7-kat azaldı. RA ve/veya RJ uygulamaları Ki67 seviyelerinde glukoz grubuna göre anlamlı derecede artış sağladı ($P<0.001$); Bu durum doğal madde uygulamalarının, en çok da kombine uygulamanın hücre proliferasyonunu nasıl tetiklediğini işaret etti (Şekil 4.18B). Uygulamaların, özellikle kombine uygulamanın, yara iyileşmesini, hücrelerin göçünü hızlandırarak sağladığı belirlendi. Yüksek glukoz maruz kalan HFF ve HaCaT hücrelerinde hücre göçü kontrole göre ~%30 azalırken, RA ve/veya RJ uygulamaları çizik alanının daha hızlı kapanmasını sağladı. RA+RJ uygulanan HFF ve HaCaT hücrelerinde çizik alanı kapanma oranı, sırasıyla, %93 ve %82 olarak belirlendi ($P<0.001$) (Şekil 4.18C).

4.7.2. İntraselüler ROS Seviyelerine ve İnflamasyona Etkileri

Yüksek (50 mM) glukoz uygulamasıyla HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde artan intraselüler ROS seviyeleri üzerine RA, RJ ve RA+RJ uygulamalarının etkisi, intraselüler ROS oluşumu (spektroflorometrik ve floresan mikroskopik veriler) ve stresle ilişkili bazı proteinlerin düzeyi (Western blot sonuçları) üzerinden değerlendirildi. İnflamasyon IL-1 β , IL-6 ve IL-10 ile TNF- α (qRT-PCR ve/veya Western blot sonuçları) üzerinden yorumlandı (Şekil 4.19). Yüksek glukozun etkisi ile ~1.15-kat ($P<0.001$) artan ROS seviyelerinin uygulamalar sonucunda azaldığı ve en etkili sonucun kombine uygulama ile elde edildiği belirlendi. Yüksek glukoz koşulunda kültürlenmiş hem HFF hem de HaCaT hücrelerinde RA ve/veya RJ uygulamalarının ROS'u süpürdüğü ve normal glukoz koşulunda kültürlenmiş kontrol grubundan bile daha az ROS oluştuğu belirlendi. RA+RJ uygulaması sonucunda HFF ve HaCaT hücrelerindeki ROS düşüşü yüksek glukoz uygulaması yapılan gruba göre sırasıyla 1.72- ve 1.81-kat olarak tespit edildi ($P<0.001$) (Şekil 4.19A).



Şekil 4.19: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) intraselüler ROS seviyelerine (spektroflorometrik ve floresan mikroskopik olarak analizlenen DCF floresan ışınması sonucu) ve (B ve C) oksidatif stres ve inflamasyon belirteci seviyelerine etkisi (Western blot ve qRT-PCR analizi; *Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK7*). *Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; &&& $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

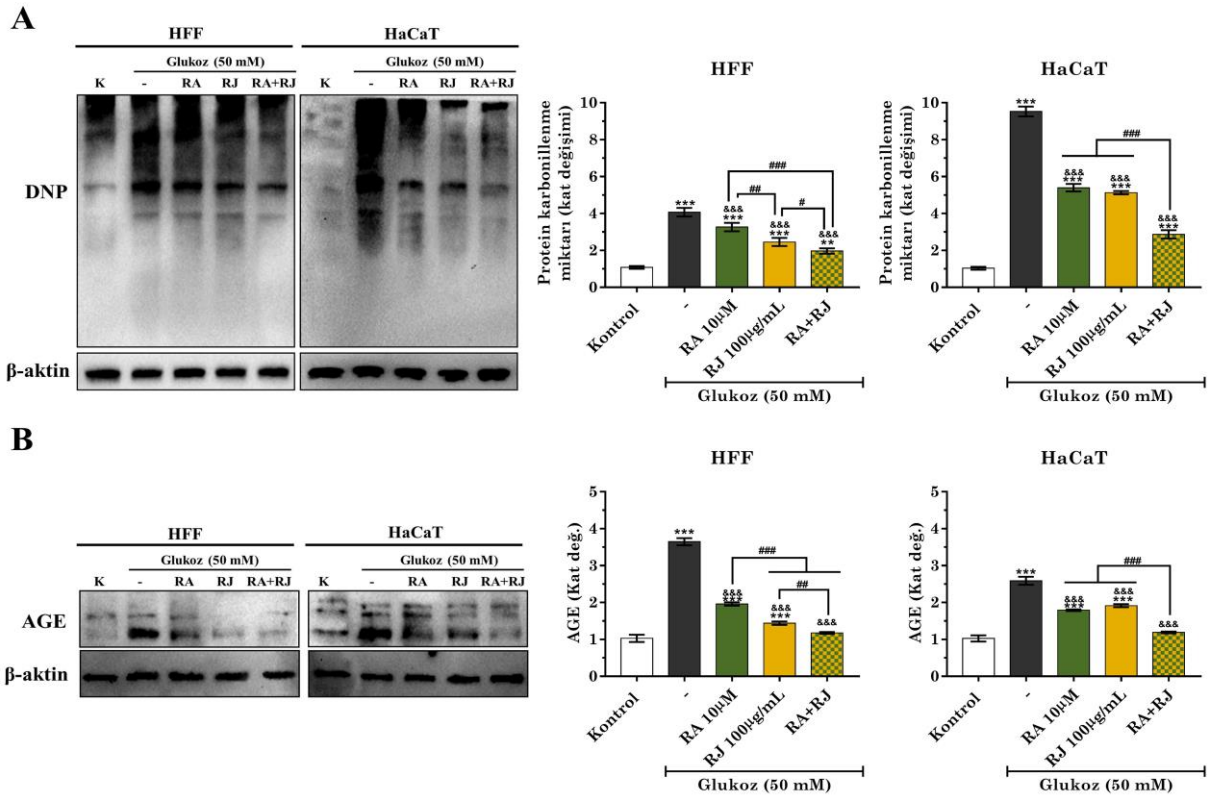
Yüksek glukozla bağlı oksidatif strese, antioksidan enzimlerin (SOD1 ve GPX1) seviyelerinde düşüş ve 4HNE bakiyeli protein seviyesinde artış eşlik etti. Buna karşılık, RA ve/veya RJ uygulamaları SOD1 ve GPX1 seviyelerinde artışa, 4HNE eklentili proteinlerde azalışa yol açtı (Şekil 4.19B). Erken evre inflamasyon belirteci TNF- α 'nın hem protein (Şekil 4.91B) hem de mRNA seviyeleri yüksek glukozla bağlı olarak arttı. Buna, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve IL-6) mRNA seviyelerindeki artış ile anti-inflamatuvar sitokin IL-10'daki azalışı eşlik etti.

RA, RJ ve RA+RJ yüksek glukoza bağı inflamasyonu zayıflattı (Şekil 4.19C). Yüksek glukoza bağı ROS ve inflamasyon artışını en etkili şekilde azaltan örneğin RA+RJ olduğu gözlemlendi.

4.7.3. Protein Karbonilleri ve AGE Miktarına Etkileri

Yüksek (50 mM) glukoza maruziyetin, HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde yol açtığı oksidatif protein hasarlarından biri olan protein karbonilleri spektrofotometrik ve immünolojik yöntemlerle belirlendi. Protein karbonil miktarı, protein yan zincirlerindeki karbonil grupları ile dinitrofenil hidrazin arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan dinitrofenil hidrazonun spektrofotometrik ölçümü ve Oxyblot ticari kiti kullanılarak immünolojik olarak saptanmasıyla belirlendi. İki yöntemin sonuçları birbirini destekler nitelikteydi (Şekil 4.20).

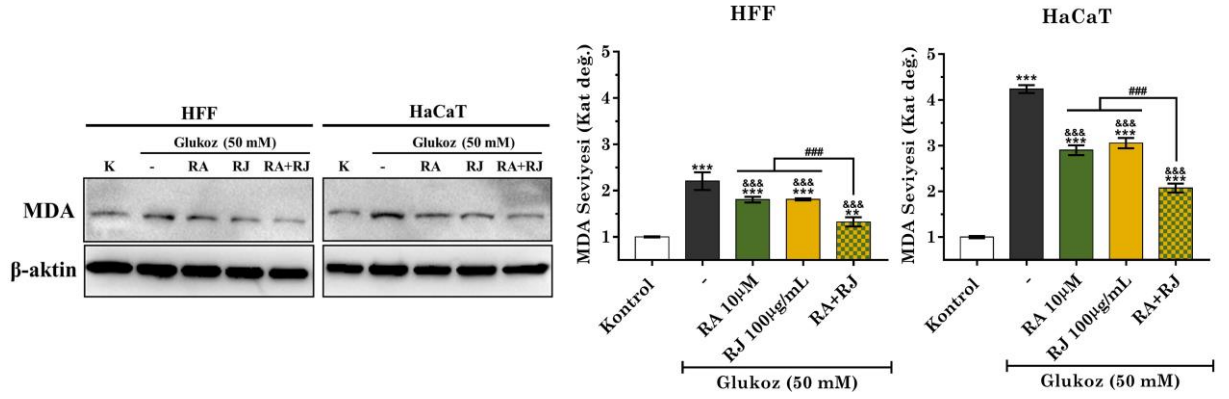
Yüksek glukoz ortamında kültürlenmiş HFF hücrelerinde ~4-kat, HaCaT hücrelerinde ise ~9-kat karbonillenmiş protein artışı (kontrole göre) vardı. Tek olarak RA ve RJ uygulaması karbonillenme hasarında azalmaya yol açarken kombine uygulama en etkili sonucu ortaya koydu ($P<0.001$). HFF ve HaCaT hücrelerinde 50 mM glukoz maruziyetine bağı artan karbonillenme hasarı, RA+RJ doğal madde uygulamalarıyla, sırasıyla <2-kat ve <3-kat değişimine geriledi. RA+RJ kombine uygulamasının artan karbonillenmiş protein miktarında, HFF hücrelerinde %50 azalmaya, HaCaT hücrelerinde ise %65 azalmaya yol açtığını ortaya koydu (Şekil 4.20A). AGE bakiyeli protein seviyesinde ise HFF ve HaCaT hücrelerinde, sırasıyla, ~3.6 ve 2.9- kat artışa neden yüksek glukoz uygulamasına karşı RA+RJ kombine uygulamasının HFF ve HaCaT hücrelerinde, sırasıyla ~3.1 ve 2.19-kat azalış sağlayarak terapötik etki gösterdiği belirlendi (Şekil 4.20B).



Şekil 4.20: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin **(A)** protein karbonil (*Western blot kantifikasyon değerleri için bkz. EK8*) ve **(B)** AGE miktarına etkisi (spektrofotometrik ölçüm sonucu). (*Kontrolle (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).

4.7.4. Lipid Peroksidasyonu Üzerinde Etkileri

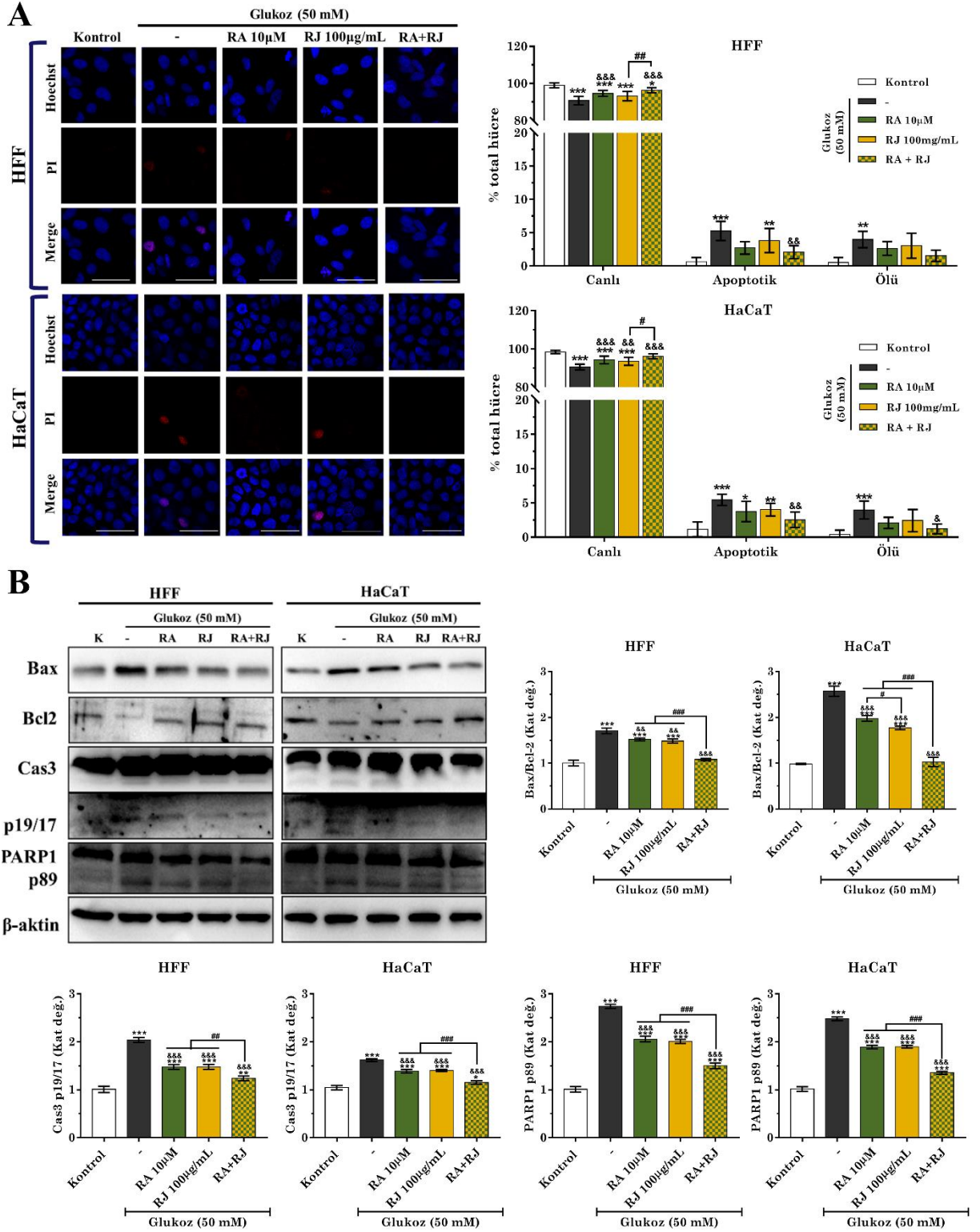
Yüksek (50 mM) glukoz maruziyetinin HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde yol açtığı lipid peroksidasyonu ve doğal maddelerin bu sürece etkisi (Şekil 4.21) malondialdehit (MDA) ile konjuge protein düzeyinin western blot analizine (Şekil 4.21A) ek olarak spektrofotometrik TBARS sonuçları üzerinden değerlendirildi (Şekil 4.21B). Yüksek glukoz maruziyet, HFF ve HaCaT hücrelerinde lipid peroksidasyonunu sırasıyla 2.2 ve 4.2-kat artırdı. Bu artış, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak oldukça anlamlıydı ($P<0.001$). RA ve/veya RJ uygulamaları TBARS ve MDA seviyelerinde anlamlı düşüşler sağladı ($P<0.001$). En belirgin düşüş (~2-kat) RA+RJ kombine uygulamasıyla elde edildi.



Şekil 4.21: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin lipid peroksidasyon hasarına etkisi **(A)** Western blot yöntemi ile malondialdehit (MDA) bakiyeli protein tespiti (*kantifikasyon değerleri için bkz. EK9*). **(B)** Spektrofotometrik ölçüm ile belirlenen TBARS miktarlarının (μM MDA eşdeğeri/mg protein) bağıl değerlendirilmesi. Kontrole (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; ### $P<0.01$, ### $P<0.001$).

4.7.5. Apoptoz Üzerine Etkileri

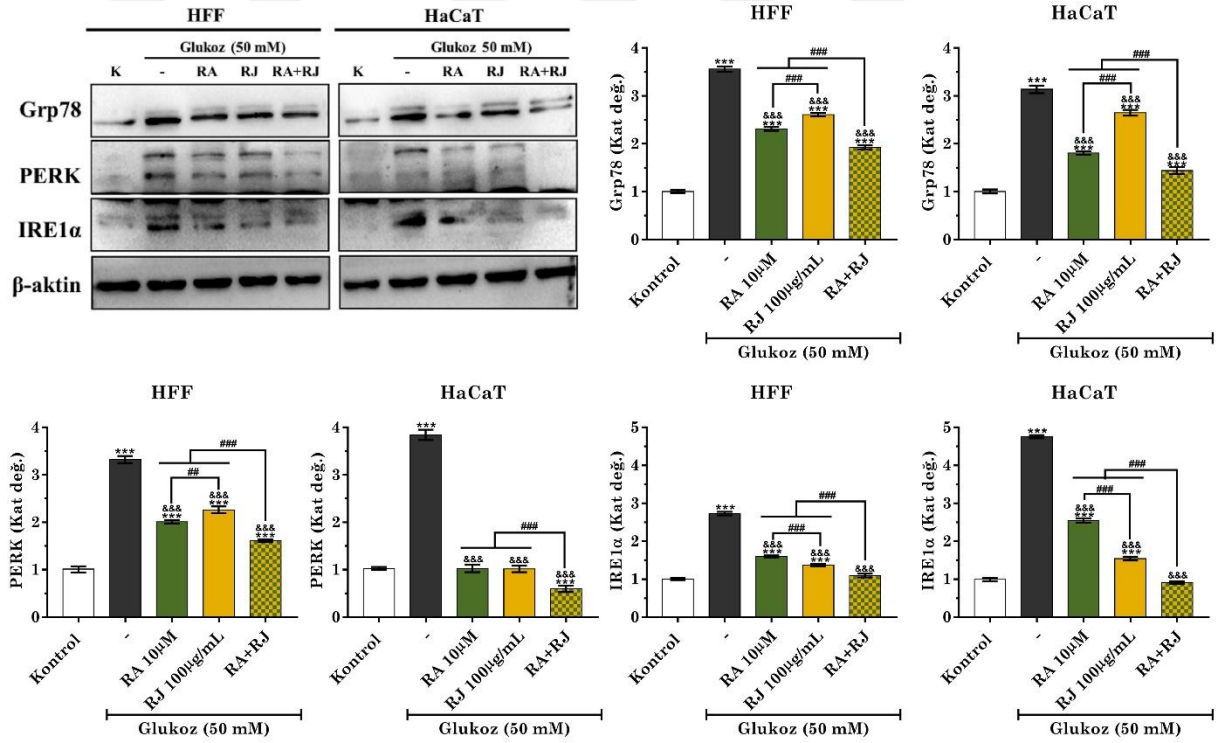
Hücrelerde yüksek glukozun yol açtığı apoptoz ve uygulamaların apoptoz üzerine etkisi, ölü, apoptotik ve canlı hücrelerin belirlendiği floresans HO/PI ikili boyama yöntemi ve Bax/Bcl2 oranı, kaspaz-3 ve PARP1 kesilmiş fragmentinin analiz edildiği western blot yöntemiyle incelendi (Şekil 4.22). Yüksek glukoz her iki hücre grubunda (HFF ve HaCaT) kontrole kıyasla istatistiksel olarak oldukça anlamlı apoptoz artışına neden oldu ($P<0.001$). RA ve/veya RJ uygulamaları apoptotik hücre oranında (Şekil 4.22A) ve apoptotik proteinlerin seviyelerinde (Şekil 4.22B) belirgin düşüş sağladı. Yüksek glukoz maruziyet sonucunda HFF hücrelerinde %5.2 apoptotik, %3.9 ölü hücre saptanırken bu değerler HaCaT hücrelerinde sırasıyla %5.4 ve %3.9 olarak belirlendi ($P<0.001$). RA+RJ uygulaması sonucunda apoptotik hücre oranı ~%2 ve ölü hücre oranı ~%1.5 olarak belirlendi ($P<0.05$) (Şekil 4.22A). Yüksek glukoz ortamında HFF ve HaCaT hücrelerinde apoptozun önemli bir göstergesi olan Bax/Bcl2 oranının sırasıyla 1.7- ve 2.5-kat arttığı belirlendi ($P<0.001$). Kesilmiş kaspaz-3 ile PARP1 fragmentleri seviyelerinin HFF hücrelerinde sırasıyla 2.0- ve 2.7-kat arttığı, HaCaT hücrelerinde ise 1.6- ve 2.5-kat yükseldiği belirlendi ($P<0.001$). RA, RJ ve özellikle en iyi sonuçları ortaya koyan RA+RJ uygulamaları sonucunda, glukoz grubuna göre oldukça anlamlı seviyelerde azalan apoptotik marker seviyeleri ($P<0.001$) tespit edilerek uygulamaların yüksek glukoz bağlı apoptozu hafiflettiği gösterildi (Şekil 4.22B).



Şekil 4.22: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin apoptoza etkisi. **(A)** Apoptozun HO/PI floresan boyaması ile analizi, **(B)** Apoptozun western blot ile analizi (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$). Cas: Kaspaz.

4.7.6. ER Stresi Üzerine Etkileri

Yüksek (50 mM) glukoz uygulamasının HFF ve HaCaT hücrelerinde yol açtığı ER stresi ve doğal maddelerin bu stres üzerine etkisi, Grp78, PERK ve IRE1 α proteinlerinin anlatımı üzerinden değerlendirildi (Şekil 4.23). Yüksek glukoz, ER stresi belirteçlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan oldukça anlamlı artışa yol açtı ($P<0.001$). HFF ve HaCaT hücrelerinde yüksek glukoz maruziyet sonrasında Grp78 seviyeleri iki hücrede ~3-kat artarken, PERK seviyeleri ~3.5-kat, IRE1 α seviyeleri ise sırasıyla ~3- ve 5-kat artış gösterdi ($P<0.001$). RA ve/veya RJ uygulamalarıyla bu belirteçlerin anlatımında düşüş saptanırken, en iyi sonucun RA+RJ uygulanan grupta olduğu ve yüksek glukoz koşuluna bağlı oluşan ER stresinin önemli derecede hafiflediği belirlendi.



Şekil 4.23: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin ER stresine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).

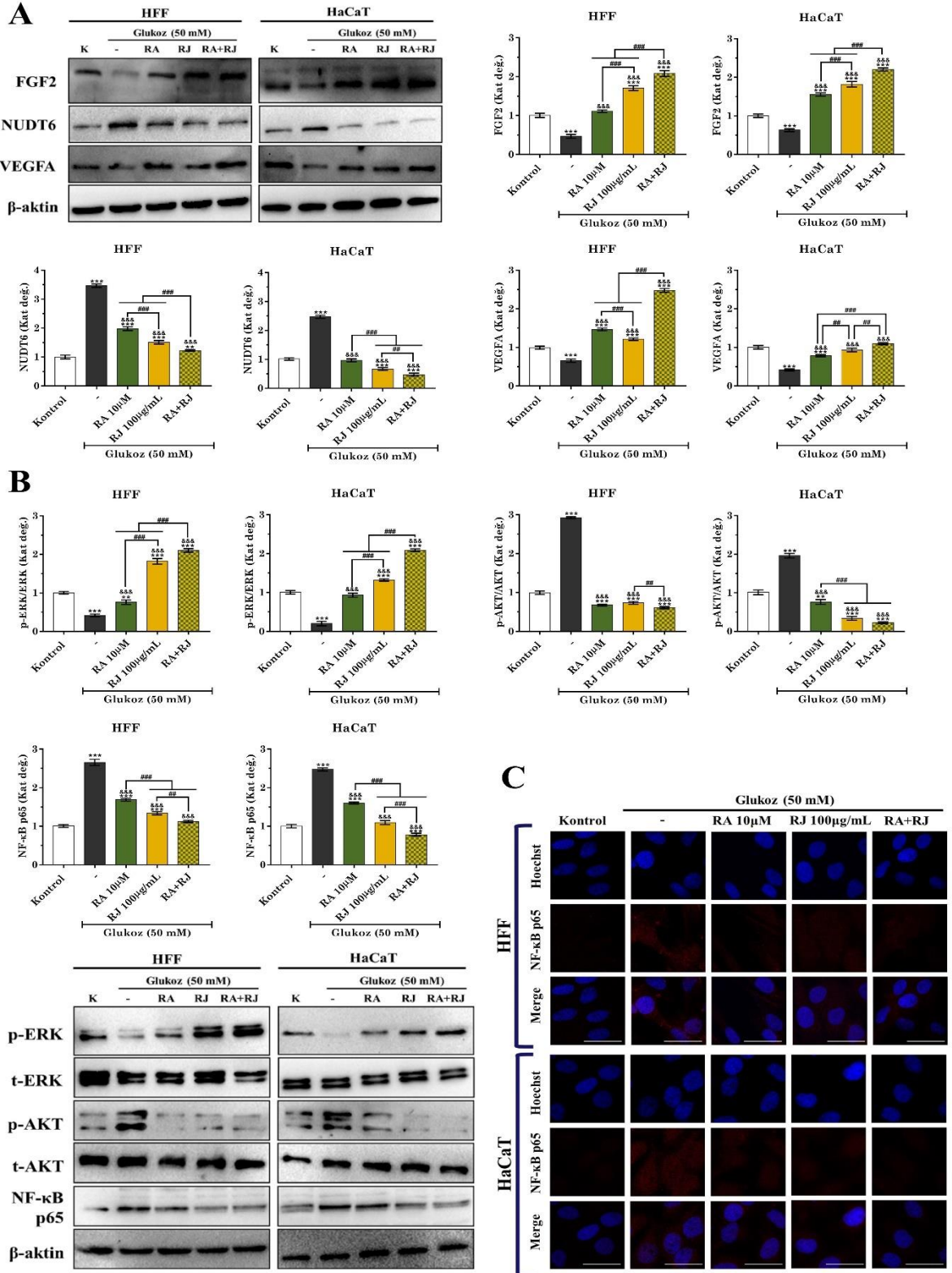
4.7.7. Hücre Sinyal Yollarında Görevli Moleküller Üzerine Etkileri

Yüksek glukoz ve doğal madde uygulamalarının HFF ve HaCaT hücrelerinde sinyal moleküllerinin anlatım seviyelerine etkisinin incelendiği western blot deneyi sonuçları Şekil

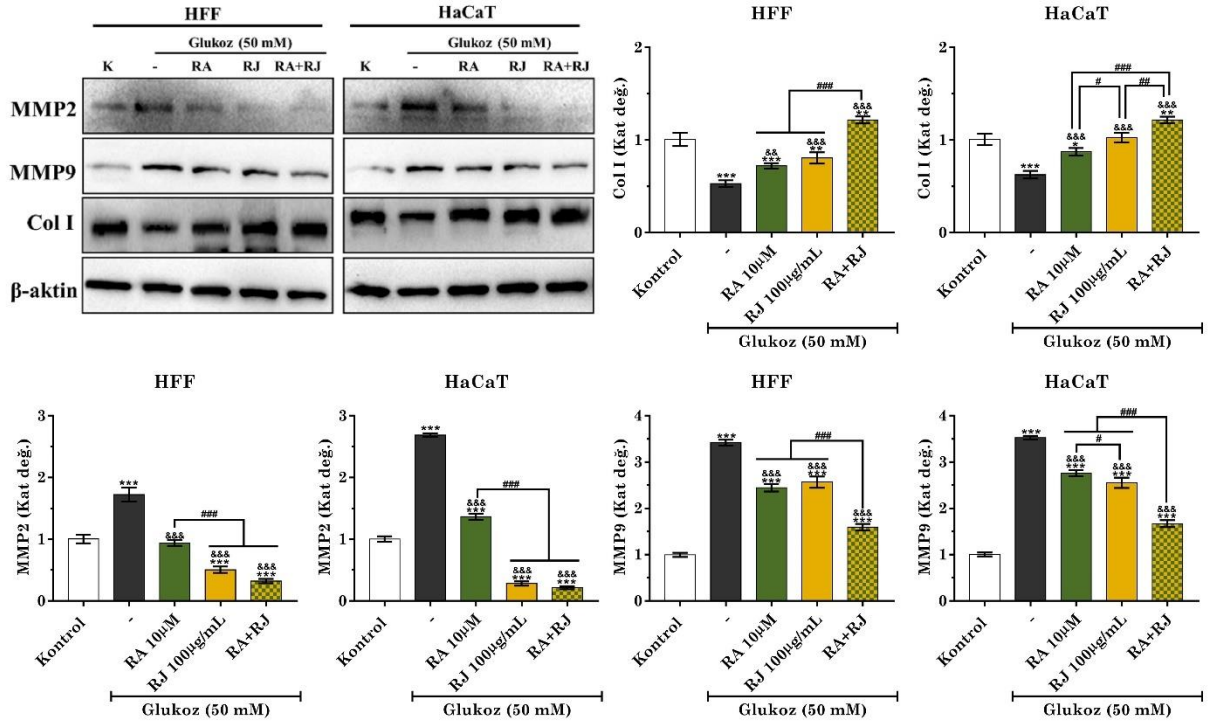
4.24'te gösterildi. Yüksek glukoz uygulaması hücre büyüme faktörleri olan FGF2 ve VEGFA seviyelerini düşürürken (sırasıyla HFF hücrelerinde, 2.2- ve 1.6-kat $P<0.001$; HaCaT hücrelerinde ise 1.5- ve 2.4-kat, $P<0.001$), FGF2'nin antisensi olan NUDT6 seviyelerinde önemli bir artış saptandı (HFF hücrelerinde 3.4-kat, $P<0.001$; HaCaT hücrelerinde 2.5-kat, $P<0.001$). RA, RJ ve RA+RJ uygulamaları bu yanıtları tersine çevirdi; NUDT6 seviyelerini düşürürken FGF2 ve VEGFA anlatımında artışa yol açtı. RA+RJ terapisinin yara iyileştirme potansiyelleri için önemli bir kanıt oluşturdu (Şekil 4.24A).

Yüksek glukoz, p-ERK/ERK oranını da etkiledi; kontrollerine göre bu oran HFF hücrelerinde 2.4-kat ($P<0.001$) ve HaCaT hücrelerinde 4.9-kat düşüktü ($P<0.001$). RA+RJ uygulamasının yanıtı etkin bir şekilde tersine çevirdiği western blot sonucu ile ortaya koyuldu. Dikkat çekici olarak, HFF hücrelerinde p-ERK/ERK seviyelerindeki bu artış kontrol grubuna göre 2.1-kat iken ($P<0.001$), glukoz grubuna göre ise 5.1-kat idi. HaCaT hücrelerinde artış ise kontrole göre 2-kat, glukoz grubuna göre ~8-kat olarak belirlendi. İnflamasyonda önemli bir hücre içi sinyal yolağı olan AKT/NF- κ B'nin hiperglisemi-benzeri koşulda yukarı regüle olduğu (p-AKT seviyelerinde HFF hücrelerinde 2.9-kat artış, $P<0.001$; HaCaT hücrelerinde ise 1.9-kat artış, $P<0.001$), RA+RJ uygulaması sonucunda ise p-AKT/AKT seviyelerinde ve NF- κ B p65 seviyelerinde önemli bir düşüş olduğu belirlendi. Yüksek glukoz maruziyetine bağlı olarak ~2.5 kat artan p65 seviyelerinin HFF ve HaCaT hücrelerinde kontrole göre, sırasıyla, 1.13- ve 0.78-kata kadar indiği belirlendi (Şekil 4.24B). Bu sonucu bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin nükleer lokasyonundaki azalış da destekledi (Şekil 4.24C).

Yüksek glukoz maruziyet matriks metalloproteinazların (MMP2 ve MMP9) seviyelerinde önemli bir artışa (iki hücre hattında da MMP2 için ~2-kat artış, MMP9 için ~3.5-kat artış) ve beraberinde kollajen I seviyesinde ~2-katlık bir düşüşe (kollajen seviyelerinin kontrole göre yarıya indiği belirlendi) yol açtı. RA+RJ'nin iyileştirici etkisi, MMP2 ile MMP9 seviyelerindeki azalma ve kollajen I seviyelerindeki artışla gösterildi (Şekil 4.25).



Şekil 4.24: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin (A) büyüme faktörleri (B) hücre içi sinyal yolları ve (C) NF- κ B nükleer lokasyonu üzerine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; &&& $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

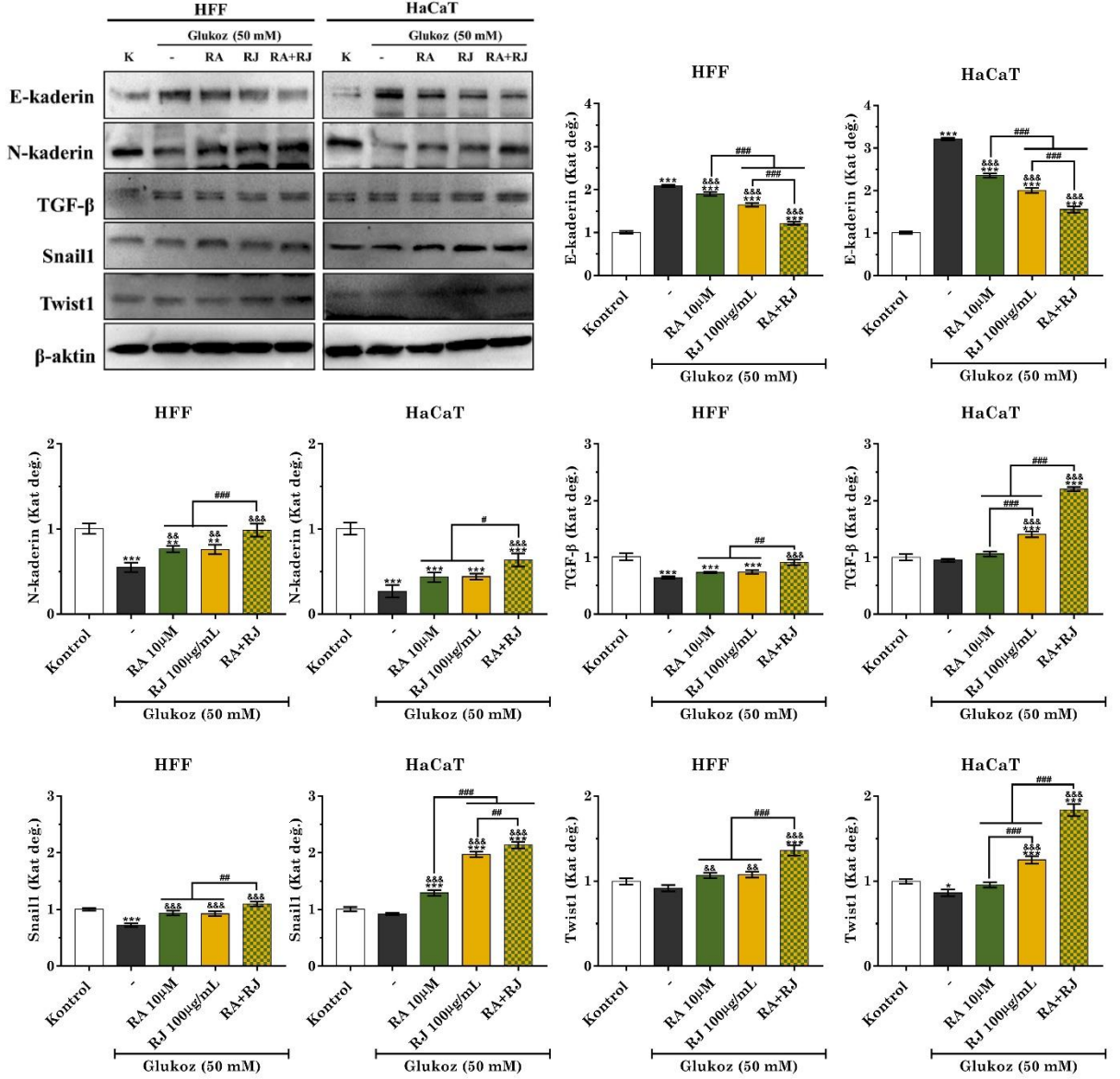


Şekil 4.25: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin matris metalloproteinaz (MMP)-2 ve -9 ile kolajen I (Col I) anlatımı üzerine etkisi. (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; &&& $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

4.7.8. Kök Hücre ve EMT Marker Proteinleri Üzerine Etkileri

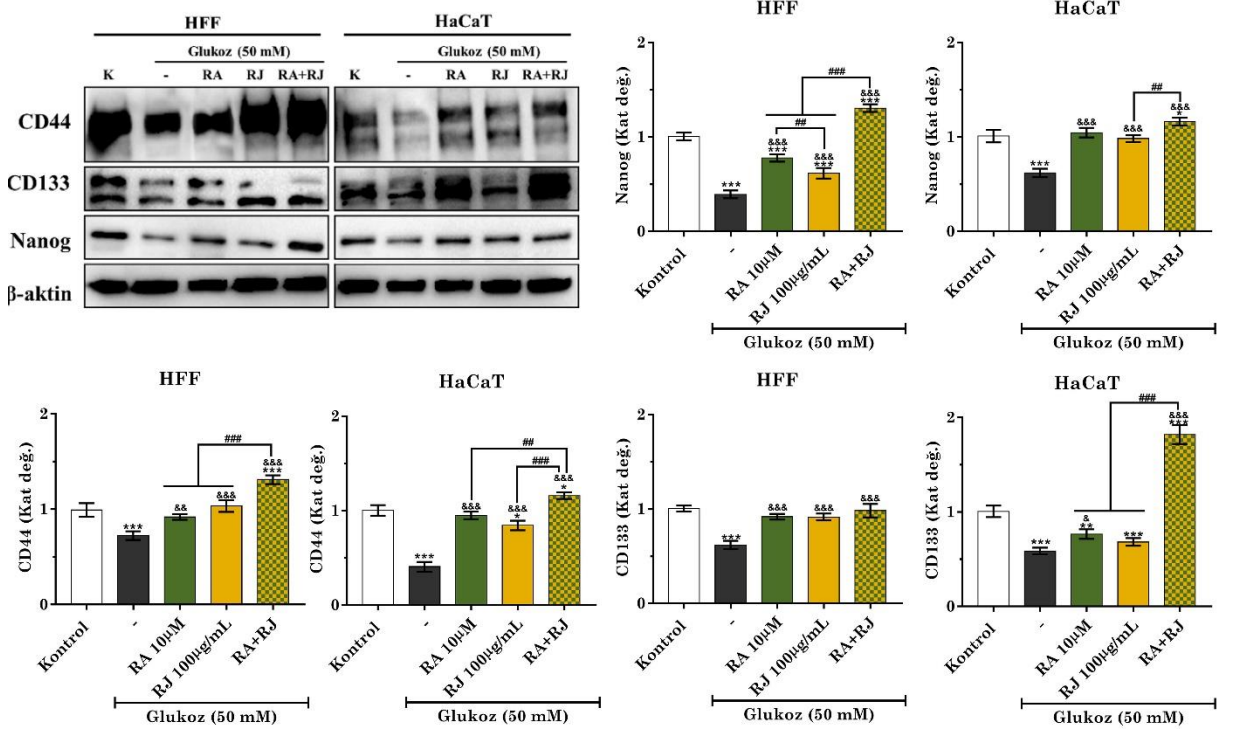
Yüksek glukoz ve doğal madde uygulamalarının HFF ve HaCaT hücrelerinde kök hücre farklılaşması ve EMT sinyalleşmesi üzerindeki etkisi, western blot yöntemiyle marker proteinlerin analizi yapılarak incelendi. EMT belirteci olarak Twist1, Snail1, TGF- β , E-kaderin ve N-kaderin protein anlatımları araştırılırken, kök hücre belirteci olarak CD44, CD133 ve Nanog değerlendirildi. Yüksek glukoz koşulunda azalan kök hücre ve EMT marker seviyeleri doğal madde uygulamaları sonucunda artışa geçti. EMT sonuçları Şekil 4.26'da, kök hücre belirteçlerine ilişkin sonuçlar ise Şekil 4.27'de verildi. Yüksek glukoz karşı, RA ve/veya RJ uygulamalarının yara iyileştirme yeteneklerini EMT sürecini tetikleyerek de sergiledikleri ortaya koyuldu. Uygulamalar sonucunda meydana gelen E-kaderindeki azalma ve N-kaderindeki artış önemli orandaydı. Örneğin, HaCaT hücrelerinde yüksek glukozla bağlı olarak kontrole göre 3.2-kat artan E-kaderinin RA+RJ uygulaması sonucunda tekrar 1.5-kata düştüğü ($P < 0.001$), N-kaderin seviyelerinin ise glukoz grubunda kontrole göre 0.27-kata düştüğü ancak

RA+RJ grubunda bu değerin 2.3-kata ulaştığı gözlemlendi ($P<0.001$) (Şekil 4.26). RA+RJ uygulaması, EMT sürecinin diğer önemli proteinlerinde de artışa yol açtı.



Şekil 4.26: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) üzerine etkileri. (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$).

RA+RJ uygulamasının HFF ve HaCaT hücrelerinde glukoz grubuna göre CD44 seviyelerinde sırasıyla 2- ve 2.2-kat artış, CD133 seviyelerinde sırasıyla 2.2- ve 4.2-kat artış ve son olarak ise Nanog seviyelerinde sırasıyla 2.6- ve 2.5- artış sağladığı tespit edildi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27: Yüksek (50 mM) glukoz ortamındaki HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücrelerinde rosmarinik asit (RA), arı sütü (RJ) ve RA+RJ'nin kök hücre belirteçleri üzerine etkileri. (*Kontrol (K) göre, & Glukoz uygulamasına göre kıyaslamayı, # Gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; &&& $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deri, iç organlarımızı dış ortamdaki etmenlere karşı koruyan, dehidrasyonu ve mikroorganizmaların girişini önleyen bir bariyer olarak çok katmanlı bir organdır (Proksch ve diğ., 2008). Deride dış bir etmen tarafından (fiziksel, kimyasal ve patojenik faktörler) bütünlüğün bozulması yara oluşumuna neden olur (Almadani ve diğ., 2021). Yaranın iyileşme süreci, oldukça karmaşık ve çok aşamalı bir mekanizmaya sahiptir. Yara iyileşme aşamalarında meydana gelecek aksaklıklar veya hatalar sürecin uzamasına neden olabilir. İyileşmeyen yaralar daha fazla tedavi süresi ve ileri komplikasyonlara neden olur. Bu da hem hastanın yaşam kalitesini düşürmekte hem de uzun süreli tedaviler ile sağlık sisteminde büyük bir mali yüke yol açmaktadır (Kolimi ve diğ., 2022). 2018 yılında yapılan bir araştırmada, iyileşmesi zor olan yaralara sahip 8.2 milyon kişi olduğu ve bu yaraların tedavi maliyetlerinin 30 ila 100 milyar dolar arasında değiştiği ortaya konmuştur (Nussbaum ve diğ., 2018). Bu nedenle iyileşmesi zor olan yaraların tedavisinde yeni çözüm yollarına, geliştirilecek yeni terapötik ajan ve stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Yara iyileşmesi sürecinde, geleneksel tedavi yollarının kullanılması hem maliyet açısından hem de taşıdıkları yüksek potansiyel ile önemli bir alternatif stratejiyi oluşturmaktadır. Fakat tedavi sürecinde kullanılabilecek ajanların yara iyileştirmedeki etki mekanizmalarının ortaya konulması tedavinin etkinliği açısından önemli bir noktadır.

Yaraların iyileşmesini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar sistemik ve yerel (lokal) faktörler olarak ikiye ayrılır. Sistemik faktörler, yara bölgesinden bağımsız olarak yarayı etkileyen faktörlerdir. Lokal faktörler ise yarayı doğrudan etkileyen faktörlerdir (Guo ve Dipietro, 2010). Sistemik faktörler; yaş, cinsiyet, genetik ve sistematik hastalıkları (diyabet, damar yetersizliği, arteriyel yetmezlik, kronik akciğer hastalıkları vb.) kapsar. İçlerinde en önemlilerinden biri diyabettir. Diyabet dünya çapında yüz milyonlarca bireyi etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. Diyabetten muzdarip kişilerde akut yaraların iyileşmesinde önemli bozuklukların olduğu görülmüştür. Diyabetik kişilerin yaklaşık olarak %15'inde yara iyileşmesinin geciktiği ve en çok da kronik iyileşmeyen diyabetik ayak ülserlerinin geliştiği rapor edilmiştir (Brem ve Tomic-Canic, 2007). Kronik diyabetik yaralarda sıklıkla hem yetersiz perfüzyondan hem de yetersiz anjiyogenezden kaynaklanan uzun süreli hipoksi durumu görülür. Hipoksi oluşan inflamatuvar yanıtın düzeyini yükseltir ve ROS seviyesini artırarak yara iyileşme sürecini uzatır (Tandara ve Mustoe, 2004; Woo ve diğ., 2007). Diyabetle ilişkili hiperglisemi durumu, ROS üretimi, AGE oluşumu ve MMP seviyelerinin artmasına neden olarak yara iyileşmesinin

bozulmasına sebebiyet verir (Woo ve diğ., 2007; Huijberts ve diğ., 2008). Ayrıca lokal bir faktör olan UV ışınları son yıllarda birçok kişinin deri hücrelerine önemli hasara neden olmaktadır. UVB'nin hücrelerde DNA hasarına, ROS artışına, inflamasyon artışına ve proteinlerde yapısal veya fonksiyonel bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (Suh ve diğ., 2002; Stone ve diğ., 2003; El Darzi ve diğ., 2017). Bu negatif etkiler yaraların kronikleşmesine neden olmaktadır. Kronik yaraların tedavi edilmemesi, tedavinin yetersizliği veya yanlış tedavi uygulanması enfeksiyona, sepsise, uzuv amputasyonuna ve hatta ölüme yol açabilmektedir. Dünya çapında yaşanan bu durumu çözmek için karmaşık yara iyileşme mekanizmasını hedefleyen çok çeşitli terapötik maddelerin ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir (Sen, 2021; Kolimi ve diğ., 2022). Yara iyileştirmesinde kullanmak için yaralara özgün büyüme faktörünün verilmesi, yara pansumanları, deri greftleri, nanoterapötikler, kök hücre terapisi, deri organoidleri ve 3D biyobaskı gibi yeni tedavi stratejileri ve yaklaşımlarının geliştirilmesi ivme kazanmıştır (Kolimi ve diğ., 2022). Fakat bu araştırmalar devam ederken, yanında ucuz maliyetli ve bol bulunabilen doğal bileşiklerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırılması önemli bir strateji olacaktır. Yüzyıllardır yapılan çalışmalar ve medikaldeki uygulamalar sonucunda, doğal ürünlere karşı oluşan güven ve daha çok kişiye ekonomik olarak rahatlıkla ulaşılabilirlik, bu ürünlerin araştırılmasını öne çıkarmıştır.

Bu tez çalışmasında doğal bir bileşik olan rosmarinik asit (RA) ile içeriğinde bol miktarda biyoaktif peptid ve protein bulunan arı sütünün (RJ), yüksek glukoz ve UVB'nin hasar oluşturduğu hücrelerdeki yara iyileştirme etkinlikleri çeşitli hücresel ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. RA ve/veya RJ'nin yara iyileşmesi üzerine etkileri HFF insan fibroblast ve HaCaT insan keratinosit hücre hatlarında, hücre canlılığı, proliferasyon, migrasyon, , apoptoz, oksidatif stres (ROS oluşumu, protein karbonillenmesi ve glikasyonu, lipid peroksidasyonu), EMT ve hücresel sinyal yollarında görevli moleküllerin anlatım analizleriyle belirlenmiştir.

RA biyoaktif bir bitkisel sekonder metabolit olup anti-inflamatuar (Lembo ve diğ., 2014), antibakteriyel (Liu ve diğ., 2023), antiviral (Panchal ve diğ., 2022), anti-oksidatif ve anti-apoptotik (Fernando ve diğ., 2016) özellikleri gösterilmiştir. RA'nın yara iyileştirme etkinliği üzerine literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu doktora tezinde, ilk olarak RA'nın HFF ve HaCaT hücrelerindeki proliferatif ve sitotoksik dozlarını belirlemek ve ayrıca RJ ile kombin yapılacak dozları seçmek için MTT testi yapılmıştır. Kombine uygulamalar için en uygun dozu belirlemek amacıyla 48 saat uygulandığında proliferatif etki gösteren en düşük dozlar (1, 5, 10,

25 ve 50 μM) test edilmiştir. HaCaT hücre hattında yapılan iki çalışmada, RA için kullanılan dozlar 2.5, 12.5, 25, ve 50 μM (Psotová ve diğ., 2006; Vostalova ve diğ., 2010) iken farklı bir çalışmada fibroblast ve keratinosit hücrelerinde 5, 10, 25, 50 ve 100 μM 'lık RA dozlarının proliferatif olduğu gösterilmiştir (Gupta ve diğ., 2022). Tez kapsamında seçilen RA dozlarının literatürdeki verilerle benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Bir arı ürünü olan RJ geniş farmakolojik etkileri nedeniyle eski çağlardan beri destekleyici bir gıda ürünü olarak kullanılmaktadır. Birçok çalışmada RJ'nin antidiyabetik (Münstedt ve diğ., 2009), antitümör (Kimura, 2008), immünomodülatör (Mihajlovic ve diğ., 2014), anti-oksidan (Seo ve diğ., 2010), anti-inflamatuar (Tan ve diğ., 2023) ve antimikrobiyal (Bărnăușiu ve diğ., 2011; Tseng ve diğ., 2011; Klaudiny ve diğ., 2012; Álvarez ve diğ., 2023) özellikleri rapor edilmiştir. Yara iyileştirme aktivitesi üzerine yapılan az sayıda *in vitro* çalışma da bulunmakta, fakat ilgili yayınlarda detaylı moleküler mekanizmalara yer verilmemektedir. Bu nedenle, RJ'nin yara iyileştirme mekanizmasının anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. RJ'nin HFF ve HaCaT hücreleri üzerinde proliferatif ve sitotoksik dozlarını belirlemek için MTT deneyi yapılmıştır. İki hücre hattında da kullanılan tüm RJ dozlarının hiçbirisinde sitotoksik etki görülmemiştir. Kombine uygulamada kullanılacak dozu belirlemek için 48 saatte proliferatif etkili en düşük dozlar (10, 25, 50, 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$) test edilmiştir. Literatürde geçen dozlar (1-100 $\mu\text{g/mL}$) ile tez kapsamında seçilen dozlar arasında az da olsa farklılık görülmektedir (Kim ve diğ., 2010; Park H.M. ve diğ., 2011; Kim ve diğ., 2020). Etkin dozlar arasındaki bu farklılık RJ üreticisi arı türünden ve flora çeşitliliğinden kaynaklanmış olabilir.

Literatürde daha önce RA ve RJ'nin kombine halde hücrelere uygulandığı ve moleküler süreçleri nasıl etkilediğine dair bir çalışma bulunmamaktadır. RA ve RJ'nin beraber yarattığı etkiyi anlamak için uygun dozu seçerken hücre proliferasyonuna, migrasyonuna ve hücre içi sinyal yollarındaki protein anlatım farklarına bakılmıştır (bkz. Şekil 4.4). Bu parametrelere göre en uygun dozların RA için 10 μM , RJ için 100 $\mu\text{g/mL}$ olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında bu iki dozun hem tek başlarına hem de beraber olarak, hücrelerde UVB uygulaması ve hiperglisemi-benzeri yüksek glukoz ortamında meydana gelen hasarlara karşı tedavi edici moleküler mekanizmaları araştırılmıştır.

Yara bölgesinin beslenmesinde ve yeterli miktarda oksijen sağlanmasında, anjiyogenez önemli bir süreçtir. RA'nın anjiyogenezi artırdığı ve bunun VEGFA anlatımındaki artışa bağlı

olabileceğini gösteren hem *in vivo* (Değer ve Çavuş, 2020) hem de *in vitro* (Sen ve Kasıkcı, 2023) çalışmalar literatürde bulunmaktadır. RJ'nin içeriğinde bulunan 10-HDA ile yapılan bir çalışmada ise, bu maddenin VEGFA aracılı anti-anjiyogenez etki gösterdiği rapor edilmiştir (Izuta ve diğ., 2007). Aksine, son yıllarda yapılan *in vivo* çalışmalarda RJ'nin anjiyogenezi artırdığı bildirilmiştir (Sofiabadi ve Samiee-Rad, 2020; Tan ve diğ., 2023). Bu tez çalışmasında, RA ve/veya RJ'nin HUVEC hücrelerinde endotel tüp oluşumunu artırdığı gibi HFF ve HaCaT hücrelerinde VEGFA anlatımının yükselmesini sağladığı görülmüştür. Kombine dozun anjiyogenik etkiyi tek başına uygulanan dozlara göre anlamlı bir şekilde artırması, anti-fıtoterapötik potansiyeline işaret etmektedir. Ancak, RJ içinde bulunan anti-anjiyogenik etkili 10-HDA ile biyoaktif peptid ve proteinlerin bu sürece etkilerini belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

UVB ve yüksek glukozla yapılan yara çalışmalarının çoğunda, hücre canlılığının, çoğalmasının ve migrasyonunun azaldığı rapor edilmiştir (Siavash ve diğ., 2011; Park H.M. ve diğ., 2011; Rodríguez-Luna ve diğ., 2019; Lin ve diğ., 2021; Gupta ve diğ., 2022). Bu doktora tez çalışmasında, UVB uygulamasından sonra hücre canlılığı, çoğalması ve migrasyonu azalırken, yüksek glukoz uygulamasının hücre canlılığını çok fazla azaltmadığı belirlenmiştir. Mitotik hücrelerde anlatımı yüksek olan Ki67'nin yüksek glukoz koşulunda azalması ve migrasyonun kontrole göre daha az gerçekleşmesi (bkz. Şekil 4.18), hücre çoğalmasının durduğunu göstermiştir. RA ve RJ'nin hücre çoğalması ve migrasyonu üzerinde pozitif etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (Geller ve diğ., 2010; Kim ve diğ., 2010; Ramírez ve diğ., 2020; Lambrechts ve diğ., 2022; Gupta ve diğ., 2022). Bu çalışmada UVB- ve yüksek glukoz-indüklü hasar sonrası RA ve RJ'nin beraber uygulandığı grupta hücrelerin canlılığı ve migrasyonu, tekli uygulamalara göre anlamlı bir artış göstermiştir. Buna göre, RA ve RJ'nin kombine kullanımı diyabetik yaraların tedavisi için önemli bir strateji olabilir.

Yara iyileşmesinde reaktif oksijen türleri (ROS), inflamasyon, hücre büyümesi, anjiyogenez, granülasyon ve hücre dışı matris oluşumu dahil çeşitli süreçlerde rol oynar. ROS miktarındaki aşırı artış yarayı daha kötü duruma sürüklemesine karşın, dengeli bir ROS miktarı, yara iyileştirici yolları harekete geçirir (Dong ve Wang, 2023). UVB, hücrelere en büyük hasarı ROS seviyelerini aşırı artırarak vermektedir (Stone ve diğ., 2003). Hiperglisemide antioksidan enzimler glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutazın aktivitelerindeki düşüş ROS artışına neden olmaktadır (Dworzański ve diğ., 2020). Bu çalışmada, HFF ve HaCaT hücrelerine

uygulanan UVB ve yüksek glukoz dozunun hem ROS artışına hem de antioksidan enzimlerin anlatımlarında azalmalara neden olduğu gösterilmiştir. RA'nın antioksidan özelliği daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi (Vostalova ve diğ., 2010; Fernando ve diğ., 2016; Rodríguez-Luna ve diğ., 2019; Gupta ve diğ., 2022), bu çalışmada da UVB ve yüksek glukozun verdiği hasarlar sonrası oksidatif stresi anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür ve ayrıca RJ'nin de benzer bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Kombine doz (RA+RJ) bu etkileri bakımından daha da üstündür; yara iyileşmesindeki diğer parametrelerle de birlikte değerlendirildiğinde, bu örneğin yara iyileşmesine önemli bir katkısının olabileceği düşünülmektedir.

Diğer taraftan, hiperglisemi ROS dengesini bozup lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak hücrelerde çeşitli hasarlara sebebiyet verebilmektedir (Dham ve diğ., 2021). Aşırı ROS üretimini tetikleyen UVB de lipid peroksitlerin artmasına ve membran geçirgenliğinde buna bağlı değişikliklere yol açarak hücreye zarar vermektedir (Chen ve diğ. 2012). Literatürde, RA'nın lipid peroksidasyonu üzerindeki etkinliğini gösteren çalışmalar oldukça azdır. Diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada RA'nın lipid peroksitleri azalttığı gösterilmiştir (Govindaraj ve diğ. 2015). RJ ile yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar dikkati çekmektedir. RJ'nin kanserli hücrelerde lipid peroksidasyonunu arttığı görülürken (Filipiç ve diğ., 2015), prostatı hasarlı farelerde MDA seviyesini azaltarak koruyucu etki sağladığı rapor edilmiştir (Abdel-Hafez ve diğ., 2017). Bu doktora tezinde, HFF ve HaCaT hücrelerinde UVB ve yüksek glukozla bağlı hasar sonrası oluşan yüksek MDA seviyelerinin RA ve/veya RJ uygulandıktan sonra azaldığı görülmüştür. Hem spektrofotometrik yöntemle hem de immunoblot yöntemiyle ölçülen MDA seviyesini en çok azaltan örneğin RA+RJ kombinasyonu olduğu belirlenmiştir.

Hiperglisemide en çok hasar gören moleküller proteinlerdir. Proteinlerin karbonilasyonu ve AGE oluşumu, proteinlerde işlev kaybına neden olmaktadır (Deng ve diğ., 2021). Ayrıca bu durum, geri dönüşü olmayan katlanmamış protein tepkisine (UPR) neden olarak endoplazmik retikulum (ER) stresi yaratmaktadır (Mustapha ve diğ., 2021). UVB deri hücrelerinde proteinlerin karbonillenmesini ve özellikle AGE oluşumunu tetikleyerek cildin hızlı yaşlanmasına neden olur (Gu ve diğ., 2023). Literatürde RA'nın UVB'ye maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinde protein karbonillenmesini azalttığını gösteren tek bir çalışma vardır (Fernando ve diğ., 2016). RA'nın deri hücrelerinde AGE ve ER stresi üzerine etkisini inceleyen bir yayına rastlanmamıştır. RJ'nin oksidatif strese bağlı protein karbonillenmesini azalttığı yaşlanma ile ilgili bir çalışmada rapor edilmiştir (Qiu ve diğ., 2020). Alzheimer tavan

modelinde RJ kullanımının AGE'lerin ana reseptörü olan RAGE'nin aktivitesini düşürdüğü rapor edilmiştir (Pan ve diğ., 2018). Görüldüğü gibi, RA ve RJ'nin protein hasarları üzerindeki etkisine ilişkin çalışmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Bu doktora tezindeki kombine uygulamanın, UVB ve yüksek glukoz maruziyetle oluşan protein karbonil ve AGE miktarını belirgin şekilde azalttığı görülmüştür. Ayrıca, RA+RJ'nin hücrelerdeki ER stres göstergesi proteinlerin anlatım düzeylerini de aşağı regüle ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar RA ve/veya RJ'nin proteinlerde oluşan hasarların azaltılmasında ve ER stresinin düzenlenmesinde önemli ajanlar olabileceklerini göstermektedir.

İnflamasyon, yara iyileşmesinde kritik bir süreç olan patojenlerden koruma ve nekrotik dokuyu ortadan kaldırma sürecidir. Fakat aşırı inflamatuvar yanıt, yaranın bir sonraki iyileşme basamağına geçmesini engeller ve yaranın kronikleşmesine yol açar (Wang ve diğ., 2022). Çeşitli çalışmalarda UVB'nin (Suh ve diğ., 2002) ve hipergliseminin (Dasari ve diğ., 2021) deri hücrelerinde uzun süreli ve aşırı inflamatuvar yanıtı neden olduğu rapor edilmiştir. Literatürde RA ve RJ'nin aşırı inflamatuvar yanıtı azalttığına ilişkin bilgilere rastlanmaktadır (Vostalova ve diğ., 2010; Lembo ve diğ., 2014; Rodríguez-Luna ve diğ., 2019; Álvarez ve diğ., 2023; Tan ve diğ., 2023). Bu çalışmadaki UVB ve yüksek glukoz koşullarının HFF ve HaCaT hücrelerinde inflamasyon belirteci sitokinlerin artışına neden olduğu gösterilmiştir. RA ve/veya RJ uygulamalarının bu sitokin artışını azalttığı, böylece inflamatuvar yanıtı anlamlı şekilde baskıladığı ve en etkin örneğin RA+RJ olduğu görülmüştür.

UVB deri hücrelerinin DNA'sına hasar vererek hücreleri apoptoza sürüklemektedir (Schuch ve diğ., 2017). RA ve RJ ile yapılan birçok yara iyileştirme çalışmasında apoptotik belirteçlerin aşağı regüle olduğu rapor edilmiştir (Seo ve diğ., 2010; Vostalova ve diğ., 2010; Gupta ve diğ., 2022). Bu çalışmada, UVB maruziyetinin apoptotik hücre ve ölü hücre sayısını yüksek glukoz koşuluna göre daha çok artırdığı saptanmıştır. RA ve/veya RJ uygulamalarıyla, apoptotik hücre ve ölü hücre sayısının düştüğü HO/PI boyama yöntemiyle gösterilmiş ve bu etki apoptotik belirteçlerin seviyelerindeki azalma ile doğrulanmıştır. Anti-apoptotik etkisi en yüksek örneğin RA+RJ olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler yukarıda belirtilen literatürlerle de uyumludur.

Yara iyileşmesi sürecinde proliferasyon ve yeniden yapılanma basamaklarında, kollajenlerin düzenlenmesinde matriks metalloproteinazların (MMP'lerin) çok önemli bir yeri vardır. Her ne kadar yara iyileşmesinde etkin yapıcı rolleri olsa da MMP'lerin aşırı artışı yaranın

kronikleşmesine ve kollajen yıkımına yol açmaktadır. Keratinosit hücrelerinde yapılan çalışmalarda UVB'nin MMP'lerin artışı indüklediği gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2012; Kim ve diğ., 2020). Yüksek glukoz varlığında aşırı MMP artışı düşürmeye yönelik stratejiler birçok çalışmada denenmiştir (Sun ve diğ., 2015; Hyun ve diğ. 2018; Chen ve diğ., 2020). Bu doktora tezinde, UVB ve yüksek glukoz maruziyetinin HFF ve HaCaT hücrelerinde MMP2 ve MMP9 artışı indüklediği ve kollajen üretimini aşağı yönde regüle ettiği görülmüştür. RA+RJ uygulaması tekli uygulamalara göre MMP seviyelerini daha etkin şekilde azaltmış ve kollajen üretimini artırmıştır. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada RA'nın MMP anlatımını azalttığı gösterilmiştir (Eo ve Kim; 2017). Kim ve diğ. (2020) ise, yaptıkları çalışmada UVB hasarına bağlı olarak artan MMP'lerin RJ uygulaması sonrasında azaldığını rapor etmişlerdir. Literatürdeki bu bulgular sonuçlarımızı desteklemektedir.

Fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2), çok çeşitli hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını, göçünü ve hayatta kalmasını modüle eder, akut yara kapanmasını hızlandırır ve yara iyileşmesi sürecinde doku rejenerasyonunu ve anjiyogenezi destekler (Kasuya ve Tokura; 2014). Literatürdeki bir çalışmada hiperglisemi koşulunun FGF2 anlatımını baskıladığı rapor edilmektedir (Vasko ve diğ., 2009). Bu tez çalışmasında da, yüksek glukoz maruz bırakılan hücrelerde FGF2 anlatımının düşük olduğu görülmüştür. Tam tersine, düşük (50 mJ/cm^2) UVB maruziyetinin deri kanseri hücrelerinde FGF2'nin anlatımında aşırı artışa yol açarak kanserleşmeye indüklediği rapor edilmiştir (Khandelwal ve diğ., 2016). Ancak bu tez çalışmasında kullanılan daha yüksek (100 mJ/cm^2) UVB dozunun FGF2 anlatımını azalttığı görülmüştür. Daha da dikkat çekici olarak, UVB ve yüksek glukoz maruz kalmış hücrelerde FGF2'nin antisensi olan NUDT6 anlatımının arttığı görülmüştür. Literatürdeki bilgiye göre, NUDT6'nın aşırı anlatımı hücrelerin migrasyonunu yavaşlattığı ve çoğalmasını durdurduğu gibi apoptozu da indüklemektedir (Winter ve diğ., 2023). Hipokampüste artan NUDT6 seviyesinin NF- κ B yolu üzerinden inflamasyonu tetikleyebileceği bildirilmektedir (Uzay ve diğ., 2022). Bu tezde, HFF ve HaCaT hücrelerinde UVB- ve yüksek glukoz-indüklü NUDT6 artışının yanı sıra, proliferasyon ve inflamasyonun kontrolünde rol oynadığı bilinen AKT/NF- κ B yolunun da yukarı regüle olduğu ve inflamasyonda rol oynayan temel proteinlerden biri olan NF- κ B p65'nin hem anlatımında hem de nükleer lokasyonunda artış olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler, NUDT6'nın bu yolu indükleyerek yaranın kronikleşmesine neden olabileceğini düşündürmektedir. Hücrelerin UVB ve yüksek glukoz maruziyeti sonucunda düşüşe geçen bir diğer sinyal molekülü fosforile ERK1/2'dir. RA, RJ ve RA+RJ'nin uygulandığı hücrelerde,

yukarıda adı geçen tüm sinyal moleküllerinin anlatımı tersine dönmüş, UVB ve yüksek glukozla artan proteinler azalmaya; azalanlar ise artmaya başlamıştır. Bu etkiler RA+RJ uygulanan hücrelerde çok daha belirgin olarak bulunmuştur. RA ve/veya RJ uygulanarak iyileştirilmeye çalışılan hücrelerde FGF2 artışına paralel olarak epitelyal-mezenkimal geçişin hızlandığı, E-kaderin/N-kaderin oranı, Twist1, Snail1 ve TGF- β protein anlatımları üzerinden gösterilmiştir. Ayrıca, kök hücre belirteçleri olan CD44, CD133 ve Nanog seviyelerinde RA ve/veya RJ uygulamalarına bağlı olarak kaydedilen artış, bu sinyalleşmenin de yara iyileştirici mekanizmanın bir parçası olduğunu düşündürmüştür.

Sonuç olarak, UVB ve yüksek glukoz maruziyetiyle artan hücre ölümü ve inflamasyon ile azalan hücre proliferasyonun, RA ve/veya RJ uygulamaları sonucunda aşağı regüle olan NUDT6/AKT/NF- κ B yolu ve yukarı regüle olan FGF2/ERK/EMT yolu ile tersine çevrildiği ve yara iyileşme sürecinin inflamatuvar faktörlerin azalması, hücre çoğalması ve göçünün artışı ile hızlandığı ortaya koyulmuştur. Elde edilen veriler, yara iyileştirme potansiyelleri yüksek rosmarinik asitin ve arı sütünün birlikte daha etkin olduklarını ve rosmarinik asit-arı sütü karışımının özellikle kronik yaraların tedavisinde kullanılabilecek yeni bir api-fitoterapötik ürün olarak geliştirilebileceğini göstermektedir. Bu doğal karışımın tedavi amaçlı kullanımı için farmakokinetik analizlerin, hayvan deneylerinin ve klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Doktora tezinden elde edilen çıktıların, yara iyileşmesinde yeni tedavi ürünlerinin ve/veya stratejilerinin oluşturulmasına katkıda bulunması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelatif, M., Yakoot, M., Etmaan, M., 2008, Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study. *Journal of Wound Care*, 17 (3), 108-110.
- Abdel-Hafez, S.M.N., Rifaai, R.A., & Abdelzaher, W.Y., 2017, Possible protective effect of royal jelly against cyclophosphamide induced prostatic damage in male albino rats; a biochemical, histological and immuno-histo-chemical study, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 90, 15-23.
- Abraham, J., and Mathew, S., 2019, Merkel Cells: A Collective Review of Current Concepts, *International Journal of Applied & Basic Medical Research*, 9 (1), 9-13.
- Abu-Yousif, A.O., Smith, K.A., Getsios, S., Green, K.J., Van Dross, R.T., and Pelling, J.C., 2008, Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures, *Cancer Research*, 68 (8), 3057-3065.
- Ahmad, S., Campos, M.G., Fratini, F., Altaye, S.Z., and Li, J., 2020, New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2), 382.
- Almadani, Y.H., Vorstenbosch, J., Davison, P.G., and Murphy, A.M., 2021, Wound Healing: A Comprehensive Review, *Seminars in Plastic Surgery*, 35 (3), 141-144.
- Álvarez, S., Contreras-Kallens, P., Aguayo, S., Ramírez, O., Vallejos, C., Ruiz, J., Carrasco-Gallardo, E., Troncoso-Vera, S., Morales, B., and Schuh, C.M.A.P., 2023, Royal jelly extracellular vesicles promote wound healing by modulating underlying cellular responses, *Molecular Therapy, Nucleic Acids*, 31, 541-552.
- Amadeu T.P., Braune A.S., Porto L.C., Desmoulière A., Costa A.M., 2004, Fibrillin-1 and elastin are differentially expressed in hypertrophic scars and keloids, *Wound Repair Regen*, 12 (2):169-74.
- Amoah, S.K., Sandjo, L.P., Kratz, J.M., and Biavatti, M.W., 2016, Rosmarinic acid—pharmaceutical and clinical aspects, *Planta Medica*, 82 (5), 388-406.
- Bărnăuțiu, L.I., Mărghitaș, L.A., Dezmirean, D.S., Mihai, C.M., Bobiș, O., 2011, Chemical composition and antimicrobial activity of Royal Jelly-REVIEW, *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44 (2), 67-72.
- Beckman, J.A., Creager, M.A., and Libby, P., 2002, Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management, *JAMA*, 287 (19), 2570-2581.
- Blakytyn, R., and Jude, E.B., 2009, Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers, *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 8 (2), 95-104.
- Brem, H., and Tomic-Canic, M., 2007, Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*, 117 (5), 1219-1222.
- Brenner, M., and Hearing, V.J., 2008, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochemistry and Photobiology*, 84 (3), 539-549.
- Bucekova, M., Sojka, M., Valachova, I., Martinotti, S., Ranzato, E., Szep, Z., and Majtan, J., 2017, Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation in vitro and in vivo, *Scientific Reports*, 7 (1), 7340.

- Cañedo-Dorantes, L., and Cañedo-Ayala, M., 2019, Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review, *International Journal of Inflammation*, 2019, 3706315.
- Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C.V.C., Stuppner, H., and Jansen-Dürr, P., 2017, Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging, *Biogerontology*, 18 (4), 499-516.
- Chen, L., Hu, J.Y., & Wang, S.Q., 2012, The role of antioxidants in photoprotection: a critical review, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(5), 1013-1024.
- Chen, L.Y., Huang, C.N., Liao, C.K., Chang, H.M., Kuan, Y.H., Tseng, T.J., Yen, K.J., Yang, K. L., & Lin, H.C., 2020, Effects of Rutin on Wound Healing in Hyperglycemic Rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1122.
- Chhabra, P., Chauhan, G., and Kumar, A., 2020, Augmented healing of full thickness chronic excision wound by rosmarinic acid loaded chitosan encapsulated graphene nanopockets, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46 (6), 878-888.
- Clark, R.A., 1996, Wound repair: overview and general considerations, *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 3-50.
- Clayton, K., Vallejo, A.F., Davies, J., Sirvent, S., and Polak, M.E., 2017, Langerhans Cells-Programmed by the Epidermis, *Frontiers in immunology*, 8, 1676.
- Cleaver, J.E., and Crowley, E., 2002, UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis, *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 7, d1024-d1043.
- Collazo, N., Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Otero, P., Simal-Gandara, J., and Prieto, M.A., 2021, Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens, *Nutrients*, 13 (2), 543.
- Comino-Sanz, I.M., López-Franco, M.D., Castro, B., and Pancorbo-Hidalgo, P.L., 2021, The role of antioxidants on wound healing: A review of the current evidence, *Journal of Clinical Medicine*, 10 (16), 3558.
- Darby I.A., Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A., 2014, Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6 (7), 301-311.
- Dasari, N., Jiang, A., Skochdopole, A., Chung, J., Reece, E.M., Vorstenbosch, J., & Winocour, S., 2021, Updates in Diabetic Wound Healing, Inflammation, and Scarring, *Seminars in Plastic Surgery*, 35(3), 153-158.
- de Jesus, T.J., and Ramakrishnan, P., 2015, Sugar-Coating the Skin, *Austin Journal of Clinical Pathology*, 2 (3), 1035.
- DeCicco-Skinner, K.L., Henry, G.H., Cataisson, C., Tabib, T., Gwilliam, J.C., Watson, N.J., Bullwinkle, E.M., Falkenburg, L., O'Neill, R.C., Morin, A., Wiest, J.S., 2014, Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis, *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (91), e51312.
- Değer, U., & Çavuş, Y., 2020, Investigation of the role of rosmarinic acid treatment in regulating inflammation, cell damage, and angiogenesis in rat ovarian torsion and detorsion models, *Acta Cirurgica Brasileira*, 35(3), e202000304.
- Denda, M., and Nakanishi, S., 2022, Do epidermal keratinocytes have sensory and information processing systems?, *Experimental Dermatology*, 31 (4), 459-474.

- Deng, L., Du, C., Song, P., Chen, T., Rui, S., Armstrong, D.G., and Deng, W., 2021, The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 8852759.
- Dham, D., Roy, B., Gowda, A., Pan, G., Sridhar, A., Zeng, X., Thandavarayan, R.A., & Palaniyandi, S.S., 2021, 4-Hydroxy-2-nonenal, a lipid peroxidation product, as a biomarker in diabetes and its complications: challenges and opportunities, *Free Radical Research*, 55(5), 547-561.
- Diegelmann R.F., Evans M.C., 2004, Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing, *Frontiers in Bioscience*, 1 (9), 283-289.
- Dong, Y., & Wang, Z., 2023, ROS-Scavenging Materials for Skin Wound Healing: Advancements and Applications, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1304835.
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 186, 421-431.
- Dworzański, J., Strycharz-Dudziak, M., Kliszczewska, E., Kielczykowska, M., Dworzańska, A., Drop, B., and Polz-Dacewicz, M., 2020, Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activity in patients with diabetes mellitus type 2 infected with Epstein-Barr virus, *PloS One*, 15 (3), e0230374.
- Edwards, R., and Harding, K.G., 2004, Bacteria and wound healing, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17 (2), 91-96.
- El Darzi, E., Bazzi, S., Daoud, S., Ehtay, K.S., and Bahr, G.M., 2017, Differential regulation of surface receptor expression, proliferation, and apoptosis in HaCaT cells stimulated with interferon- γ , interleukin-4, tumor necrosis factor- α , or muramyl dipeptide, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 30 (2), 130-145.
- El-Gayar, M.H., Aboshanab, K.M., Aboulwafa, M.M., and Hassouna, N.A., 2016, Antivirulence and wound healing effects of royal jelly and garlic extract for the control of MRSA skin infections, *Wound Medicine*, 13, 18-27.
- El-Nekeety, A.A., El-Kholy, W., Abbas, N.F., Ebaid, A., Amra, H.A., Abdel-Wahhab, M.A., 2007, Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats, *Toxicon*, 50 (2), 256-269.
- Eming, S.A., Martin, P., and Tomic-Canic, M., 2014, Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation, *Science Translational Medicine*, 6 (265), 265sr6.
- Eo, S.H., & Kim, S.J., 2017, Rosmarinic acid induces rabbit articular chondrocyte differentiation by decreases matrix metalloproteinase-13 and inflammation by upregulating cyclooxygenase-2 expression, *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 75.
- Evans, J.D., and Wheeler, D.E., 1999, Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (10), 5575-5580.
- Fagan, J.M., Slecicka, B.G., Sohar, I., 1999, Quantitation of oxidative damage to tissue proteins, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31 (7), 751-757.

- Fatmawati, F., Erizka, E., and Hidayat, R., 2019, Royal Jelly (Bee Product) Decreases Inflammatory Response in Wistar Rats Induced with Ultraviolet Radiation, *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7 (17), 2723-2727.
- Fernando, P.M., Piao, M.J., Kang, K.A., Ryu, Y.S., Hewage, S.R., Chae, S.W., and Hyun, J.W., 2016, Rosmarinic Acid Attenuates Cell Damage against UVB Radiation-Induced Oxidative Stress via Enhancing Antioxidant Effects in Human HaCaT Cells, *Biomolecules and Therapeutics*, 24 (1), 75-84.
- Filipič, B., Gradišnik, L., Rihar, K., Šooš, E., Pereyra, A., & Potokar, J. 2015, The influence of royal jelly and human interferon-alpha (HuIFN- α N3) on proliferation, glutathione level and lipid peroxidation in human colorectal adenocarcinoma cells in vitro, *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 66 (4), 269-274.
- Fitridge, R., and Thompson, M., 2011, *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*, In: Fitridge, R., and Thompson, M. (eds.), University of Adelaide Press.
- Freshney, R.I., 2010, *Subculture and Cell Lines*, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, In: Freshney, R.I. (ed.), Chapter 12, Wiley-Liss Press, 187-206.
- Geller, F., Schmidt, C., Göttert, M., Fronza, M., Schattel, V., Heinzmann, B., Laufer, S., 2010, Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*, *Journal of Ethnopharmacology*, 128 (3), 561-566.
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., and Juarranz, Á., 2016, *Anatomy and Function of the Skin*, Nanoscience in dermatology, In: Hamblin, M.R., Avci, P. and Prow T.W. (ed.), Chapter 1, Academic Press, 1-14.
- Gordo, J., Máximo, P., Cabrita, E., Lourenço, A., Oliva, A., Almeida, J., Filipe, M., Cruz, P., Barcia, R., Santos, M., and Cruz, H., 2012, Thymus mastichina: chemical constituents and their anti-cancer activity, *Natural Product Communications*, 7 (11), 1491-1494.
- Gosain, A., and DiPietro, L.A., 2004, Aging and wound healing, *World Journal of Surgery*, 28 (3), 321-326.
- Govindaraj, J., & Sorimuthu Pillai, S., 2015, Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 404(1-2), 143-159.
- Gu, M.J., Lee, H.W., Yoo, G., Kim, D., Choi, I.W., Kim, Y., & Ha, S.K., 2023, Protective effect of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. ethanolic extract against UVB-induced skin aging and photodamage in hairless mice, *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1176073.
- Guo, S., and DiPietro, L.A., 2010, Factors affecting wound healing, *Journal of Dental Research*, 89 (3), 219-229.
- Gupta, D., Archoo, S., Naikoo, S.H., and Abdullah, S.T., 2022, Rosmarinic Acid: A Naturally Occurring Plant Based Agent Prevents Impaired Mitochondrial Dynamics and Apoptosis in Ultraviolet-B-Irradiated Human Skin Cells, *Photochemistry and Photobiology*, 98 (4), 925-934.

- Hanefeld, M., Duetting, E., and Bramlage, P., 2013, Cardiac implications of hypoglycaemia in patients with diabetes - a systematic review, *Cardiovascular Diabetology*, 12, 135.
- Hardman, M.J., and Ashcroft, G.S., 2008, Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly, *Genome Biology*, 9 (5), R80.
- Hess, C.T., 2011, Checklist for factors affecting wound healing, *Advances in Skin and Wound Care*, 24 (4), 192.
- Hitl, M., Kladar, N., Gavarić, N., and Božin, B., 2021, Rosmarinic Acid-Human Pharmacokinetics and Health Benefits, *Planta Medica*, 87 (4), 273-282.
- Honnegowda, T.M., Kumar, P., Udupa, E.G.P., Kumar, S., Kumar, U., and Rao, P., 2015, Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing, *Plastic and Aesthetic Research*, 2, 243-249.
- Huang, N., Hauck, C., Yum, M.Y., Rizshsky, L., Widrlechner, M.P., McCoy, J.A., Birt, D.F., 2009, Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 and nitric oxide in RAW 264.7 mouse macrophages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (22), 10579-10589.
- Huang, S.P., Wu, M.S., Shun, C.T., Wang, H.P., Hsieh, C.Y., Kuo, M.L., and Lin, J.T., 2005, Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma, *Journal of Biomedical Science*, 12 (1), 229-241.
- Huijberts, M.S., Schaper, N.C., & Schalkwijk, C.G., 2008, Advanced glycation end products and diabetic foot disease, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 24(1), S19–S24.
- Hyun, S.W., Kim, J., Jo, K., Kim, J.S., & Kim, C.S., 2018, *Aster koraiensis* extract improves impaired skin wound healing during hyperglycemia, *Integrative Medicine Research*, 7(4), 351-357.
- Iocono, J.A., 1998, The biology of healing, *Wound Biology and Management*, 10-14.
- Izuta, H., Chikaraishi, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., & Hara, H., 2009, 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 6(4), 489-494.
- Jetten, N., Roumans, N., Gijbels, M.J., Romano, A., Post, M.J., de Winther, M.P., van der Hulst, R.R., and Xanthoulea, S., 2014, Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses, *PloS One*, 9 (7), e102994.
- Kamakura, M., Suenobu, N., Fukushima, M., 2001, Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282 (4), 865-874.
- Karaca, T., Şimşek, N., Uslu, S., Kalkan, Y., Can, I., Kara, A., Yörük, M., 2012, The effect of royal jelly on CD3+, CD5+, CD45+ T-cell and CD68+ cell distribution in the colon of rats with acetic acid-induced colitis, *Allergologia et Immunopathologia*, 40 (6), 357-361.
- Kasuya, A., & Tokura, Y., 2014, Attempts to accelerate wound healing, *Journal of Dermatological Science*, 76(3), 169-172.

- Khandelwal, A.R., Rong, X., Moore-Medlin, T., Ekshyyan, O., Abreo, F., Gu, X., & Nathan, C. A., 2016, Photopreventive Effect and Mechanism of AZD4547 and Curcumin C3 Complex on UVB-Induced Epidermal Hyperplasia, *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 9(4), 296-304.
- Kim, D.J., Iwasaki, A., Chien, A.L., & Kang, S., 2022, UVB-mediated DNA damage induces matrix metalloproteinases to promote photoaging in an AhR- and SP1-dependent manner, *The Journal of Clinical Investigation Insight*, 7(9), e156344.
- Kim, H.S., Song, J.H., Youn, U.J., Hyun, J.W., Jeong, W.S., Lee, M.Y., Choi, H.J., Lee, H.K., & Chae, S., 2012, Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, *European Journal of Pharmacology*, 689(1-3), 38-44.
- Kim, H.Y., Choi, H.M., Kim, S.G., Woo, S.O., Moon, H.J., Han, S.M., et. al., 2020, Skin health improving effects of Korean freeze-dried royal jelly in human keratinocytes, *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 18 (3), 413-422.
- Kim, J. H., Yoon, N.Y., Kim, D.H., Jung, M., Jun, M., Park, H.Y., Chung, C.H., Lee, K., Kim, S., Park, C.S., Liu, K.H., and Choi, E.H., 2018, Impaired permeability and antimicrobial barriers in type 2 diabetes skin are linked to increased serum levels of advanced glycation end-product, *Experimental Dermatology*, 27 (8), 815-823.
- Kim, J., Kim, Y., Yun, H., Park, H., Kim, S.Y., Lee, K.G., Han, S.M., and Cho, Y., 2010, Royal jelly enhances migration of human dermal fibroblasts and alters the levels of cholesterol and sphinganine in an in vitro wound healing model, *Nutrition Research and Practice*, 4 (5), 362-368.
- Kimura, Y., 2008, Antitumor and antimetastatic actions of various natural products, *Studies in Natural Products Chemistry*, 34, 35-76.
- Klaudiny, J., Bachanová, K., Kohútová, L., Dzúrová, M., Kopernický, J., and Majtán, J., 2012, Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies, *Biologia*, 67, 200-211.
- Knecht, D., and Kaatz, H.H., 1990, Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees, *Apidologie*, 21 (5), 457-468.
- Koïtka, A., Abraham, P., Bouhanick, B., Sigaucho-Roussel, D., Demiot, C., and Saumet, J.L., 2004, Impaired pressure-induced vasodilation at the foot in young adults with type 1 diabetes, *Diabetes*, 53 (3), 721-725.
- Kolarsick, P.A., Kolarsick, M.A., and Goodwin, C., 2011, Anatomy and physiology of the skin, *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3 (4), 203-213.
- Kolimi, P., Narala, S., Nyavanandi, D., Youssef, A.A.A., and Dudhipala, N., 2022, Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements, *Cells*, 11 (15), 2439.
- Küba, M.C., Türkoğlu, A., Oğuz, A., Tuncer, M.C., Kaya, Ş., Başol, Ö., and Tatlı, F., 2021, Comparison of local rosmarinic acid and topical dexpanthenol applications on wound healing in a rat experimental wound model, *Folia Morphologica*, 80 (3), 618-624.

- Lambrechts, I.A., Thipe, V.C., Katti, K.V., Mandiwana, V., Kalombo, M.L., Ray, S.S., Rikhotso, R., Janse van Vuuren, A., Esmear, T., and Lall, N., 2022, Targeting Acne Bacteria and Wound Healing In Vitro Using *Plectranthus aliciae*, Rosmarinic Acid, and Tetracycline Gold Nanoparticles, *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15 (8), 933.
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., and Martino, M.M., 2018, Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets, *Advances in Wound Care*, 7 (7), 209-231.
- Lembo, S., Balato, A., Di Caprio, R., Cirillo, T., Giannini, V., Gasparri, F., and Monfrecola, G., 2014, The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine/chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) cells, *BioMed Research International*, 346793.
- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M.B., and Mandel, S., 2001, Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration, *Journal of Neurochemistry*, 78 (5), 1073-1082.
- Li, J., Chen, J., and Kirsner, R., 2007, Pathophysiology of Acute Wound Healing, *Clinics in Dermatology*, 25 (1), 9-18.
- Lima, A.L., Illing, T., Schliemann, S., and Elsner, P., 2017, Cutaneous manifestations of diabetes mellitus: a review, *American Journal of Clinical Dermatology*, 18, 541-553.
- Lin, Y., Shao, Q., Zhang, M., Lu, C., Fleming, J., and Su, S., 2019, Royal jelly-derived proteins enhance proliferation and migration of human epidermal keratinocytes in an in vitro scratch wound model, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19 (1), 175.
- Lin, Y., Zhang, M., Lin, T., Wang, L., Wang, G., Chen, T., and Su, S., 2021, Royal jelly from different floral sources possesses distinct wound-healing mechanisms and ingredient profiles, *Food & Function*, 12 (23), 12059-12076.
- Lin, Y., Zhang, M., Wang, L., Lin, T., Wang, G., Peng, J., and Su, S., 2020, The in vitro and in vivo wound-healing effects of royal jelly derived from *Apis mellifera* L. during blossom seasons of *Castanea mollissima* Bl. and *Brassica napus* L. in South China exhibited distinct patterns, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20 (1), 357.
- Liu, C., Du, G., Guo, Q., Li, R., Li, C., and He, H., 2023, Fabrication and Characterization of Polylactic Acid Electrospun Wound Dressing Modified with Polyethylene Glycol, Rosmarinic Acid and Graphite Oxide, *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13 (13), 2000.
- Liu, H., Yue, J., Lei, Q., Gou, X., Chen, S.Y., He, Y.Y., and Wu, X., 2015, Ultraviolet B Inhibits Skin Wound Healing by Affecting Focal Adhesion Dynamics, *Photochemistry and Photobiology*, 91 (4), 909-916.
- Liu, J.R., Yang, Y.C., Shi, L.S., and Peng, C.C., 2008, Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (23), 11447-11452.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods (San Diego, Calif.)*, 25 (4), 402-408.

- Loots, M.A., Kenter, S.B., Au, F.L., Van Galen, W.J.M., Middelkoop, E., Bos, J.D., and Mekkes, J.R., 2002, Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls, *European Journal of Cell Biology*, 81 (3), 153-160.
- Luchetti, F., Betti, M., Canonico, B., Arcangeletti, M., Ferri, P., Galli, F., and Papa, S., 2009, ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells, *Free Radical Biology & Medicine*, 46 (3), 339-351.
- Mahdavian Delavary, B., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., and Beelen, R.H., 2011, Macrophages in skin injury and repair, *Immunobiology*, 216 (7), 753-762.
- McCleskey, C.S., and Melampy, R.M., 1939, Bactericidal properties of royal jelly of the honeybee, *Journal of Economic Entomology*, 32 (4), 581-587.
- Mihajlovic, D., Vucevic, D., Chinou, I., and Colic, M., 2014, Royal jelly fatty acids modulate proliferation and cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells, *European Food Research and Technology*, 238 (5), 881-887.
- Moat, A.G., 2002, *Introduction to Microbial Physiology, Microbial Physiology*, In: Moat, A.G., Foster, J.W., Spector, M.P. (ed.), Chapter 1, John Wiley & Sons, New York, 1-26.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Münstedt, K., Bargello, M., & Hauenschild, A., 2009, Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects, *Journal of Medicinal Food*, 12(5), 1170-1172.
- Mustapha, S., Mohammed, M., Azemi, A.K., Jatau, A.I., Shehu, A., Mustapha, L., Aliyu, I.M., Danraka, R.N., Amin, A., Bala, A.A., Ahmad, W.A.N.W., Rasool, A.H.G., Mustafa, M.R., & Mokhtar, S.S., 2021, Current Status of Endoplasmic Reticulum Stress in Type II Diabetes, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(14), 4362.
- Nadeem, M., Imran, M., Aslam Gondal, T., Imran, A., Shahbaz, M., Muhammad Amir, et. al., 2019, Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review, *Applied Sciences*, 9 (15), 3139.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., and Nagashima, T., 2006, Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly, *Journal of Medicinal Food*, 9 (3), 363-367.
- Noor, S., Mohammad, T., Rub, M.A., Raza, A., Azum, N., Yadav, D.K., Hassan, M.I., Asiri, A.M., 2022, Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid, *Archives of Pharmacal Research*, 45 (4), 205-228.
- Nussbaum, S.R., Carter, M.J., Fife, C.E., DaVanzo, J., Haught, R., Nusgart, M., and Cartwright, D., 2018, An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds, *Value in health : the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research*, 21 (1), 27-32.
- Oryan, A., Alemzadeh, E., 2017, *Potential Mechanisms and Application of Honeybee Products in Wound Management: Wound Healing by Apitherapy*, In: Shiffman, M., Low, M. (eds.), Burns, Infections and Wound Management, Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds, vol 2, Springer, Cham.

- Pan, Y., Xu, J., Chen, C., Chen, F., Jin, P., Zhu, K., Hu, C. W., You, M., Chen, M., & Hu, F., 2018, Royal Jelly Reduces Cholesterol Levels, Ameliorates A β Pathology and Enhances Neuronal Metabolic Activities in a Rabbit Model of Alzheimer's Disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 50.
- Panchal, R., Ghosh, S., Mehla, R., Ramalingam, J., Gairola, S., Mukherjee, S., & Chowdhary, A., 2022, Antiviral Activity of Rosmarinic Acid Against Four Serotypes of Dengue Virus, *Current Microbiology*, 79(7), 203.
- Park, H.M., Hwang, E., Lee, K.G., Han, S.M., Cho, Y., and Kim, S.Y., 2011, Royal jelly protects against ultraviolet B-induced photoaging in human skin fibroblasts via enhancing collagen production, *Journal of Medicinal Food*, 14 (9), 899-906.
- Park, H.Y., Kim, J.H., Jung, M., Chung, C.H., Hasham, R., Park, C.S., and Choi, E.H., 2011, A long-standing hyperglycaemic condition impairs skin barrier by accelerating skin ageing process, *Experimental Dermatology*, 20 (12), 969-974.
- Pasupuleti, V.R., Sammugam, L., Ramesh, N., and Gan, S.H., 2017, Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1259510.
- Patel, S., Srivastava, S., Singh, M.R., and Singh, D., 2019, Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 112, 108615.
- Profyris, C., Tziotzios, C., and Do Vale, I., 2012, Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I, The molecular basis of scar formation, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66 (1), 1-12.
- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.M., 2008, The skin: an indispensable barrier, *Experimental Dermatology*, 17 (12), 1063-1072.
- Psotová, J., Kolár, M., Soušek, J., Svagera, Z., Vicar, J., and Ulrichová, J., 2003, Biological activities of *Prunella vulgaris* extract, *Phytotherapy Research : PTR*, 17 (9), 1082-1087.
- Psotova, J., Svobodova, A., Kolarova, H., and Walterova, D., 2006, Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes, *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 84 (3), 167-174.
- Qiu, W., Chen, X., Tian, Y., Wu, D., Du, M., & Wang, S., 2020, Protection against oxidative stress and anti-aging effect in *Drosophila* of royal jelly-collagen peptide, *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110881.
- Ramachandran, S., Rajendra Prasad, N., and Karthikeyan, S., 2010, Sesamol inhibits UVB-induced ROS generation and subsequent oxidative damage in cultured human skin dermal fibroblasts, *Archives of Dermatological Research*, 302 (10), 733-744.
- Ramanathan, A.N.K.G., Nair, A.J., and Sugunan, V.S., 2018, A review on Royal Jelly proteins and peptides, *Journal of Functional Foods*, 44, 255-264.
- Ramírez, O.J., Alvarez, S., Contreras-Kallens, P., Barrera, N.P., Aguayo, S., and Schuh, C.M. A.P., 2020, Type I collagen hydrogels as a delivery matrix for royal jelly derived extracellular vesicles, *Drug Delivery*, 27 (1), 1308-1318.

- Rashidi, M.K., Mirazi, N., and Hosseini, A., 2016, Effect of topical mixture of honey, royal jelly and olive oil-propolis extract on skin wound healing in diabetic rats, *Wound Medicine*, 12, 6-9.
- Reiniers, M.J., van Golen, R.F., Bonnet, S., Broekgaarden, M., van Gulik, T.M., Egmond, M.R., and Heger, M., 2017, Preparation and Practical Applications of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays, *Analytical Chemistry*, 89 (7), 3853-3857.
- Reinke, J.M., and Sorg, H., 2012, Wound repair and regeneration, *European surgical research. Europäische Chirurgische Forschung, Recherches Chirurgicales Europeennes*, 49 (1), 35-43.
- Rodriguez, P.G., Felix, F.N., Woodley, D.T., and Shim, E.K., 2008, The role of oxygen in wound healing: a review of the literature, *Dermatologic Surgery*, 34 (9), 1159-1169.
- Rodríguez-Luna, A., Ávila-Román, J., Oliveira, H., Motilva, V., and Talero, E., 2019, Fucoxanthin and Rosmarinic Acid Combination Has Anti-Inflammatory Effects through Regulation of NLRP3 Inflammasome in UVB-Exposed HaCaT Keratinocytes, *Marine Drugs*, 17 (8), 451.
- Rousselle, P., Braye, F., and Dayan, G., 2019, Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 344-365.
- Ryan, M.C., Lee, K., Miyashita, Y., and Carter, W.G., 1999, Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 145 (6), 1309-1323.
- Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., Caboni, M.F., Bogdanov, S., and Almeida-Muradian, L.B.D., 2009, Quality and standardisation of royal jelly, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1 (1), 1-6.
- Scarselli, R., Donadio, E., Giuffrida, M.G., Fortunato, D., Conti, A., Balestreri, E., Felicioli, R., Pinzauti, M., Sabatini, A.G., and Felicioli, A., 2005, Towards royal jelly proteome, *Proteomics*, 5 (3), 769-776.
- Schmitzová, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J., and Simúth, J., 1998, A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L, *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 54 (9), 1020-1030.
- Schuch, A.P., Moreno, N.C., Schuch, N.J., Menck, C.F.M., and Garcia, C.C.M., 2017, Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions, *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 110-124.
- Sen C.K., 2021, Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates, *Advances in Wound Care*, 10 (5), 281-292.
- Sen, S., & Kasikci, M., 2023, Low-dose rosmarinic acid and thymoquinone accelerate wound healing in retinal pigment epithelial cells, *International Ophthalmology*, 43(10), 3811-3821.
- Seo, B.Y., Park, E., Lee, K.G., Han, S.M., Choi, Y.Y., Cho, Y., and Park, Y.K., 2010, Effect of Royal Jelly Intake on Antioxidant Activity in the Skin of Mice after UV Irradiation, *Cancer Prevention Research*, 2010, 217-224.

- Siavash, M., Shokri, S., Haghighi, S., Mohammadi, M., Shahtalebi, M.A., and Farajzadehgan, Z., 2011, The efficacy of topical Royal Jelly on diabetic foot ulcers healing: A case series, *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 16 (7), 904-909.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.
- Sofiabadi, M., and Samiee-Rad, F., 2020, Royal jelly accelerates healing of acetate induced gastric ulcers in male rats, *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 13 (1), 14-22.
- Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., and McBride, W.H., 2003, Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms, *The Lancet. Oncology*, 4 (9), 529-536.
- Sugiyama, T., Takahashi, K., Tokoro, S., Gotou, T., Neri, P., and Mori, H., 2012, Inhibitory effect of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid on LPS-induced IL-6 production via reducing I κ B- ζ expression, *Innate Immunity*, 18 (3), 429-437.
- Suh, D.H., Kwon, T.E., and Youn, J.I., 2002, Changes of comedonal cytokines and sebum secretion after UV irradiation in acne patients, *European Journal of Dermatology*, 12 (2), 139-44.
- Sun, H., Mi, X., Gao, N., Yan, C., & Yu, F.S., 2015, Hyperglycemia-suppressed expression of Serpine1 contributes to delayed epithelial wound healing in diabetic mouse corneas, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(5), 3383-3392.
- Süntar, İ., Akkol, E.K., Şenol, F.S., Keles, H., Orhan, I.E., 2011, Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using in vivo and in vitro experimental models, *Journal of Ethnopharmacology*, 135 (1), 71-77.
- Svobodova, A., Walterova, D., and Vostalova, J., 2006, Ultraviolet light induced alteration to the skin, *Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc*, 150 (1), 25.
- Tan, D., Zhu, W., Liu, L., Pan, Y., Xu, Y., Huang, Q., Li, L., and Rao, L., 2023, In situ formed scaffold with royal jelly-derived extracellular vesicles for wound healing, *Theranostics*, 13 (9), 2811-2824.
- Tandara, A.A., & Mustoe, T.A., 2004, Oxygen in wound healing--more than a nutrient, *World Journal of Surgery*, 28(3), 294-300.
- Temamogullari F.K., Hayat, A., Baba, F., 2007, Comparison of the royal jelly and povidone iodine on wound healing in rabbits, *Journal of Animal and Veterinary Advances*.
- THSK, 2014, Türkiye ve dünyada mevcut durum, Türkiye Diyabet Programı, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kuban Matbaacılık Yayıncılık, 9-16. ISBN: 978-975-590-346-0.
- Tipton, C.D., Wolcott, R.D., Sanford, N.E., Miller, C., Pathak, G., Silzer, T.K., Sun, J., Fleming, D., Rumbaugh, K.P., Little, T.D., Phillips, N., and Phillips, C.D., 2020, Patient genetics is linked to chronic wound microbiome composition and healing, *PLoS Pathogens*, 16 (6), e1008511.

- Tseng, J.M., Huang, J.R., Huang, H.C., Tzen, J.T., Chou, W.M., Peng, C.C., 2011, Facilitative production of an antimicrobial peptide royalisin and its antibody via an artificial oil-body system, *Biotechnology Progress*, 27 (1), 153-161.
- Usui, M.L., Mansbridge, J.N., Carter, W.G., Fujita, M., and Olerud, J.E., 2008, Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56 (7), 687-696.
- Uzay, B., Hökelekli, F.Ö., Yılmaz, M., Esen, E.C., Başar, K., Bahadır-Varol, A., et al., 2022, NUDT6, the Antisense Protein of FGF2 Gene, Plays a Depressogenic Role by Promoting Inflammation and Suppressing Neurogenesis without Altering FGF2 Signaling, *BioRxiv*, 2022-09.
- Vasko, R., Koziolk, M., Ikehata, M., Rastaldi, M.P., Jung, K., Schmid, H., Kretzler, M., Müller, G.A., & Strutz, F., 2009, Role of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in diabetic nephropathy and mechanisms of its induction by hyperglycemia in human renal fibroblasts. *American journal of physiology, Renal Physiology*, 296(6), F1452-F1463.
- Velnar, T., Bailey, T., and Smrkolj, V., 2009, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms, *The Journal of International Medical Research*, 37 (5), 1528-1542.
- Vitale, S., Colanero, S., Placidi, M., Di Emidio, G., Tatone, C., Amicarelli, F., and D'Alessandro, A.M., 2022, Phytochemistry and Biological Activity of Medicinal Plants in Wound Healing: An Overview of Current Research, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27 (11), 3566.
- Vostálová, J., Zdarilová, A., and Svobodová, A., 2010, Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes, *Archives of Dermatological Research*, 302 (3), 171-181.
- Walker, J.M., 2002, *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M. (ed.), Chapter 11, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 61-68.
- Walker, J.M., 2002, *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation*, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M. (ed.), Chapter 3, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 11-14.
- Wang, Z., Qi, F., Luo, H., Xu, G., & Wang, D., 2022, Inflammatory Microenvironment of Skin Wounds, *Frontiers in Immunology*, 13, 789274.
- Weis, W.A., Ripari, N., Conte, F.L., da Silva Honorio, M., Sartori, A.A., Matucci, R.H., and Sforcin, J.M., 2022, An overview about apitherapy and its clinical applications, *Phytomedicine Plus*, 2 (2), 100239.
- Wilkinson, H.N., and Hardman, M.J., 2020, Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes, *Open Biology*, 10 (9), 200223.
- Winter, H., Winski, G., Busch, A., Chernogubova, E., Fasolo, F., Wu, Z., Bäcklund, A., Khomtchouk, B.B., Van Booven, D.J., Sachs, N., Eckstein, H.H., Wittig, I., Boon, R.A., Jin, H., & Maegdefessel, L., 2023, Targeting long non-coding RNA NUDT6 enhances smooth muscle cell survival and limits vascular disease progression, *Molecular Therapy*, 31(6), 1775-1790.

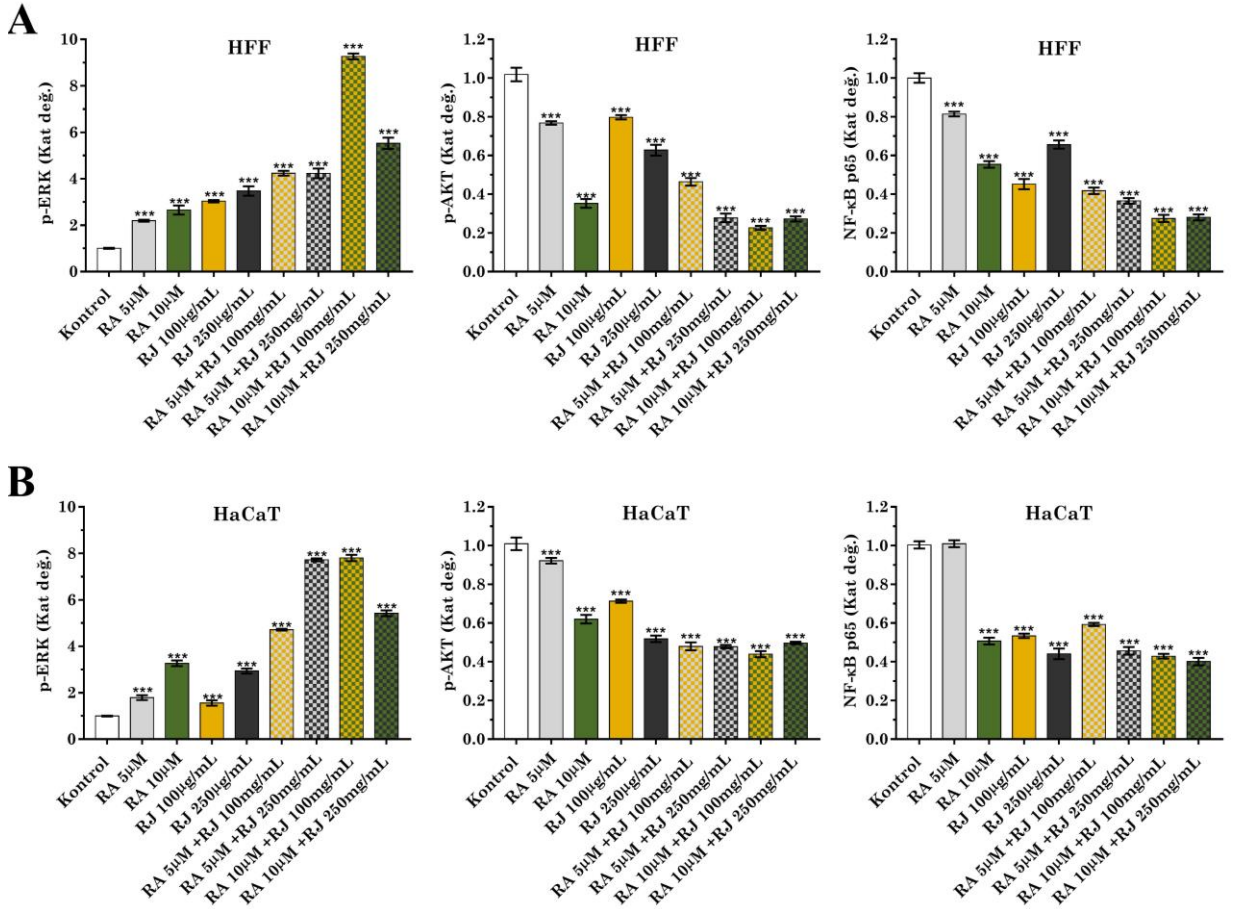
- Witte M.B., Barbul A., 1997, General principles of wound healing, *Surgical Clinics of North America*, 77 (3), 509-528.
- Wolf, S.J., Melvin, W.J., and Gallagher, K., 2021, Macrophage-mediated inflammation in diabetic wound repair, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 119, 111-118.
- Woo, K., Ayello, E.A., & Sibbald, R.G., 2007, The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge, *Advances in Skin & Wound Care*, 20(2), 99-119.
- Wu, Y.L., Zhang, Y.Y., He, Y., Lyu, Q., Li, L.M., and Jiang, M.J., 2023, The Relationship Between Ultraviolet B and DNA Methylation in Skin Cancers, *International Journal of Dermatology and Venereology*, 6 (3), 157-162.
- Young, A., and McNaught, C.E., 2011, The physiology of wound healing, *Surgery (Oxford)*, 29 (10), 475-479.
- Yousef, H., Alhadj, M., and Sharma, S., 2022, Anatomy, Skin (Integument), Epidermis, In StatPearls, StatPearls Publishing.
- Zhong, G., Qiu, M., Zhang, J., Jiang, F., Yue, X., Huang, C., and Qu, Y., 2023, Fabrication and characterization of PVA@ PLA electrospinning nanofibers embedded with Bletilla striata polysaccharide and Rosmarinic acid to promote wound healing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 234, 123693.

EKLER

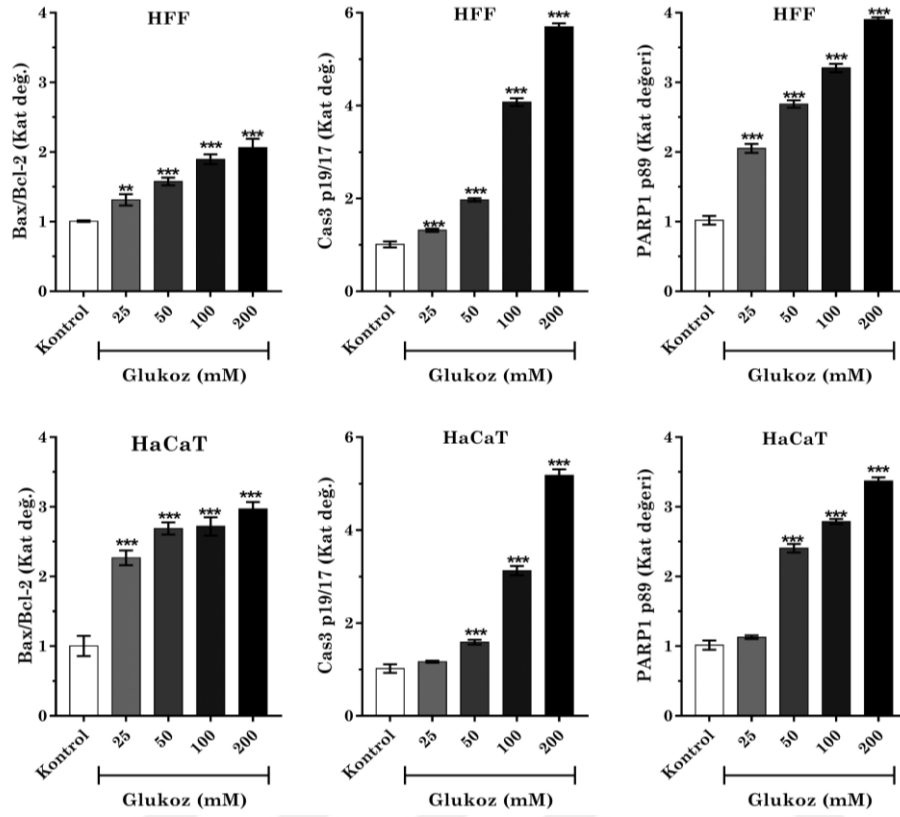
EK1. Arı sütünün içerik analizi.

Balparmak Apitera Plus Arısütü İçeriği	Miktar/Değer
Nem ve Uçucular	%2.2
10-HDA	%1.64
Yağ İçeriği	%1.7
Protein İçeriği	%7.1
Protein Profili MRJP1 Oligomer 2+3	%3.3
Protein Profili MRJP1 Oligomer 1	%38.7
Protein Profili MRJP1 Oligomer PTM Variantı	%10.3
Protein Profili MRJP3 monomer	%17.2
Protein Profili MRJP2+1 Monomer	%30.5
Toplam Fenolik Madde	56.53 mg GAE/kg
Antimikrobiyal Aktivite <i>S.aureus</i> İnhibisyon Zon Çapı	10.7 mm
Antimikrobiyal Aktivite <i>S.pyogenes</i> İnhibisyon Zon Çapı	10.2 mm
Asitlik	31.2 meq/100g
pH	4.2
Glikoz	%5.2
Fruktoz	%4.0
Sakkaroz	0.0
Turanoz	0.0
Maltoz	0.0

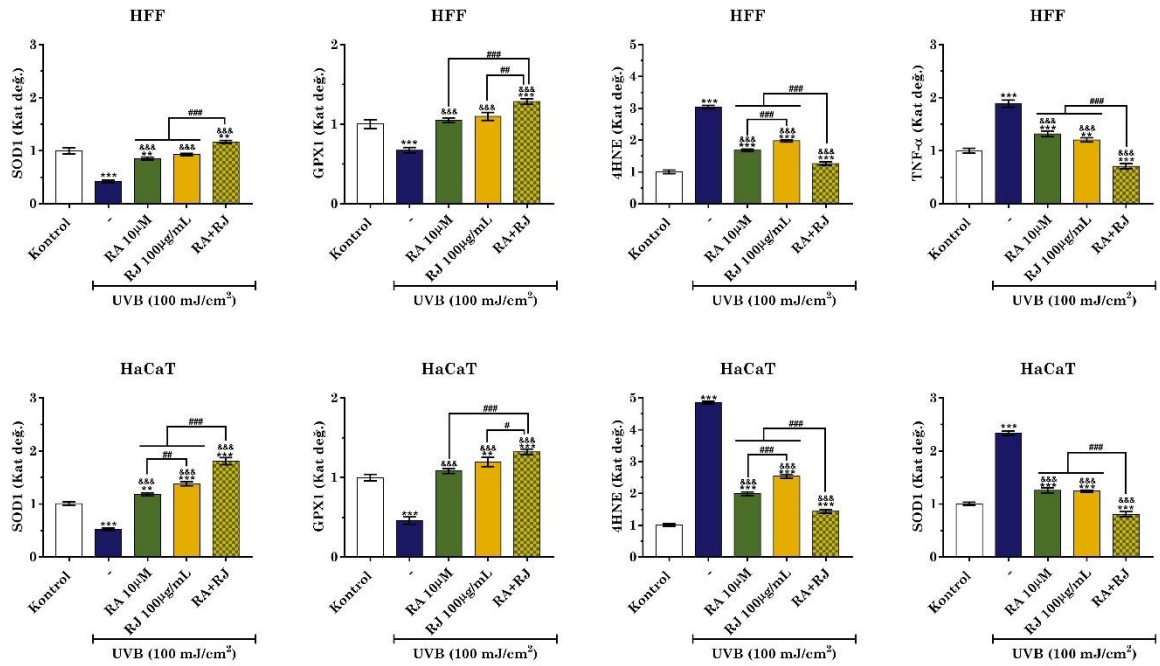
EK2. Şekil 4.4'e ait Western blot kantifikasyon değerleri.



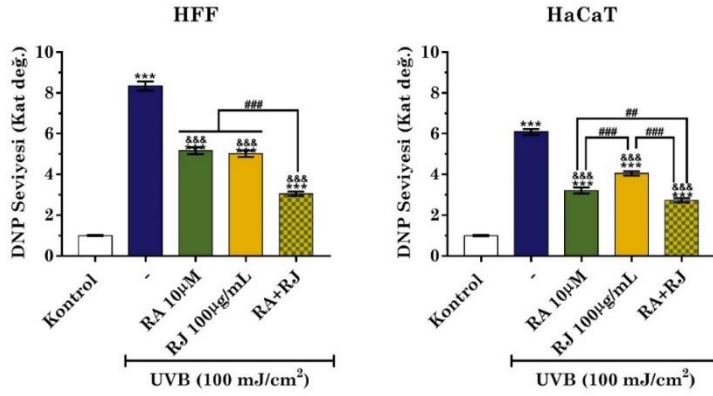
EK3. Şekil 4.7'ye ait Western blot kantifikasyon değerleri.



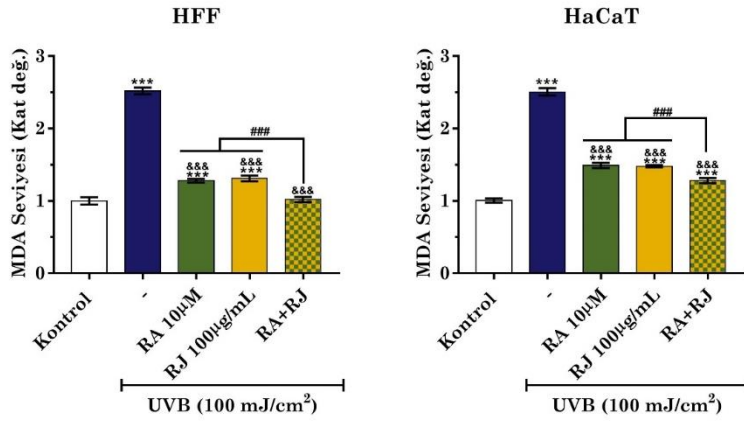
EK4. Şekil 4.9'a ait Western blot kantifikasyon değerleri.



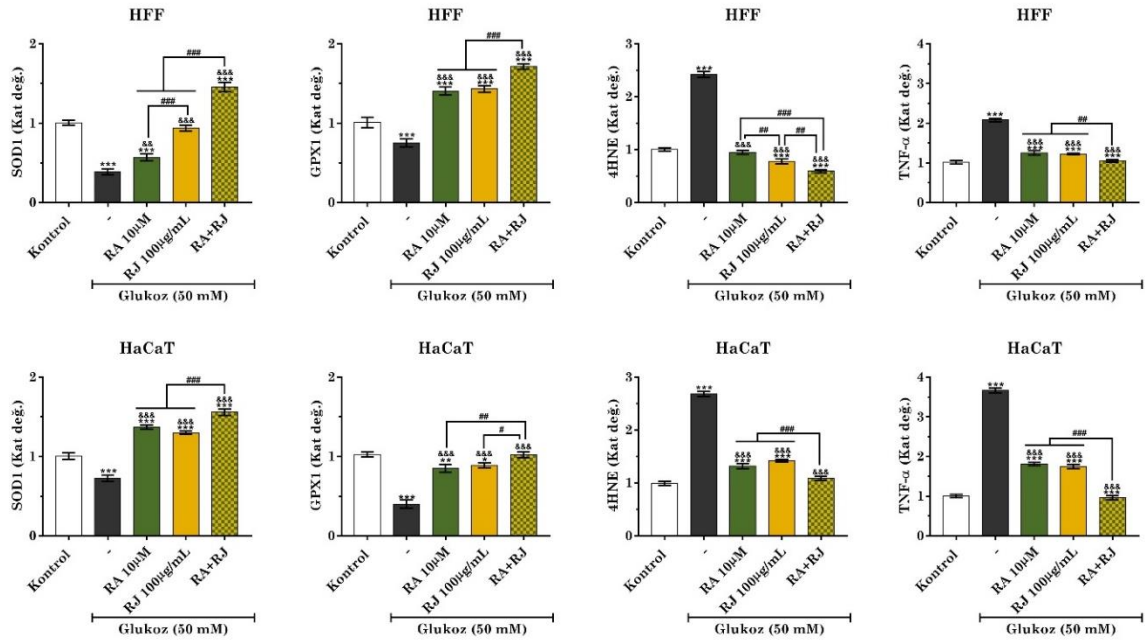
EK5. Şekil 4.10'a ait Western blot kantifikasyon değerleri.



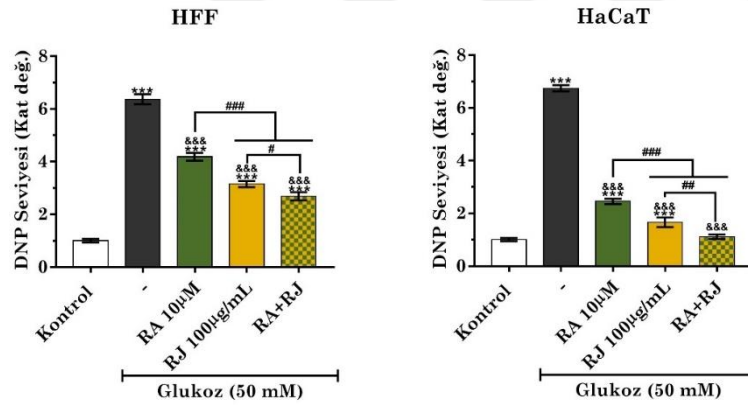
EK6. Şekil 4.11'e ait Western blot kantifikasyon değerleri.



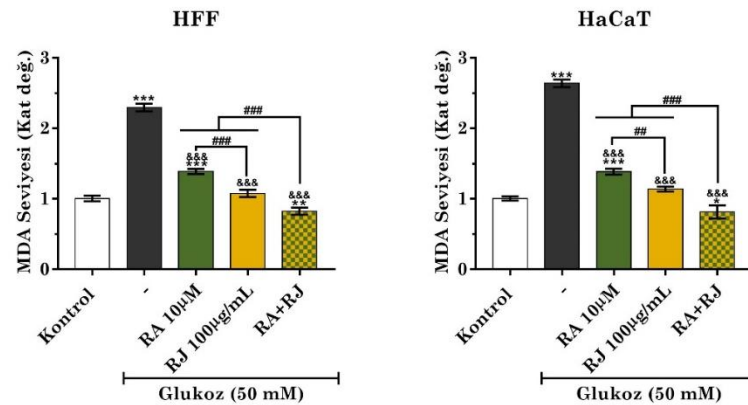
EK7. Şekil 4.19'a ait Western blot kantifikasyon değerleri.



EK8. Şekil 4.20'ye ait Western blot kantifikasyon değerleri.



EK9. Şekil 4.21'e ait Western blot kantifikasyon değerleri.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yunus AKSÜT
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	18.07.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
<u>Makaleler</u>	
Kılıç, Ö., Belivermiş, M., Sıkdokur, E., Sezer, N., Aksüt, Y. , Pekmez, M., Kösesakal, T., & Gerçek, Y.C., 2023, The combined effects of polyethylene microplastics and benzoanthracene on Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>Chemosphere</i> , 329, 138664.	
Aksüt, Y. , Pekmez, M., Uzuner, S. K., Gelincik, A., Büyüköztürk, S., & Arda, N., 2021, Molecular cloning, expression, purification and in silico epitope prediction of cobalamin-independent methionine synthase (Mor a 2), as a novel allergen from <i>Morus alba</i> pollen, <i>Archives of Medical Science</i> , [Epub], 1-13.	
Said, O., Aksüt, Y. , Yardımcı, R. E., Steinum, S. K., Yiğit, H., Tel, A. Z., Arda, N., 2022, Antioxidant and Antibacterial Activities of Methanol Extracts from	

Various Plant Parts of Pomegranate and Anatolian Black Pine, *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants*, 5(1), 50-62.

Kitap Bölümleri

Şengelen, A., Demirgan, S., **Aksüt, Y.**, Pekmez, M., Arda, N. Önay, Uçar E., 2022, *What We Know About the Role of Heat Shock Proteins in Coronavirus Infection: A Remarkable Prognostic Factor or a Therapeutic Strategy?*, Heat Shock Proteins (HSP) and Coronavirus, In: Asea A., Kaur P. (eds) vol 25, chapter 3. Scientific Scholar, USA, pp 36-65.

Bildiriler

Aghalarova, N., Mirzamammadli, N., **Aksüt, Y.**, Arda, N., 2019, Biotechnological production of an allergenic lipid transfer protein from *Morus alba* pollen, *Turkish Journal of Biology* 43 (5), 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MolBiyoKon19), ITU Ayazaga Campus Suleyman Demirel Cultural Center – İstanbul, Turkey. 27-29 September 2019. Poster Presentation.

Mirzamammadli, N., Aghalarova, N., **Aksüt, Y.**, Arda, N., 2019, Recombinant production of allergenic pectate lyase from cypress pollens, *Turkish Journal of Biology* 43 (5). 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MolBiyoKon19), ITU Ayazaga Campus Suleyman Demirel Cultural Center – İstanbul, Turkey. 27-29 September 2019. Poster Presentation.

Aksüt, Y., Arda, N., 2018, Recombinant Production Of Potential Allergen Methionin Synthase, *1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus o Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018)*, İstanbul Üni. Kongre ve Kültür Merkezi – İstanbul, Türkiye. 4-6 Ekim 2018. Sözlü Sunum.

Aksüt, Y., Arda, N., 2017, Potansiyel Alerjen Metiyonin Sentazın Fisyon Mayasında Rekombinant Olarak Üretimi, *2. Ulusal Proteomik Kongresi*, TUPA, Acıbadem Üni. İstanbul – Türkiye. 24-25 Kasım 2017. Sözlü Sunum.

Aksüt, Y., Arda, N., 2017, Potansiyel Alerjen Metiyonin Sentazın *S. pombe*'de Rekombinant Olarak Üretimi, *VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Çukurova Üni – Adana, Türkiye. 5-7 Ekim 2017. Poster Sunumu.