

T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**ASPROSİN HORMONUNUN YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Dr. Merve DURMUŞ KAYGISIZ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ

ERZURUM-2021

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın, 13.05.2019 tarih ve 1900146829 sayılı yazısı ile "Asprosin Hormonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin İn Vitro Olarak Araştırılması" konulu tezin Araştırma görevlisi Dr. Merve DURMUŞ KAYGISIZ tarafından çalışılması uygun görülmüştür. Çalışma, Temel Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı'nın 13.05.2019 tarih ve 6 no'lu kararı ile tez çalışması olarak kabul edilmiştir. Seçilen konu incelenmek üzere Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Başkanlığı'na görüşülmüş ve 26.09.2019 tarih ve 6 sayılı oturumun 31 no'lu kararı ile etik kurallara uygun görülmüştür.

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
TEŞEKKÜR	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Deri.....	3
2.1.1. Epidermis.....	4
2.1.1.1. Epidermisin Katmanları.....	4
2.1.1.2. Epidermisin Hücreleri.....	6
2.1.2. Dermis	8
2.1.3. Epidermal Deri Ekleri.....	9
2.1.3.1. Kıl ve Kıl Folikülleri	9
2.1.3.2. Yağ Bezleri	10
2.1.3.3. Ter Bezleri	10
2.1.3.3.1. Ekrin (Merokrin) Ter Bezleri.....	10
2.1.3.3.2. Apokrin Ter Bezleri	11
2.1.3.4. Tırnaklar	11
2.1.4. Derinin Embriyolojik Gelişimi.....	11
2.1.4.1. Epidermis'in Embriyolojik Gelişimi	11
2.1.4.2. Dermisin Embriyolojik Gelişimi	12
2.2. Yara	13
2.2.1. Yara Çeşitleri.....	13
2.2.2. Yara İyileşmesi.....	14
2.2.3. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	18

2.2.4. Yara İyileşmesinde Görevli Büyüme Faktörleri, Kemokin ve Sitokinler ..	19
2.2.4.1. Yara İyileşmesinde Görevli Büyüme Faktörleri.....	19
2.2.4.2. Yara İyileşmesinde Görevli Kemokinler	19
2.2.4.3. Yara İyileşmesinde Görevli Sitokinler	19
2.2.5. Yara İyileşmesinde Ekstrasellüler Matriksin Rolü ve Proteinleri	22
2.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Protokolleri.....	26
2.4. Adipokinler ve Yara İyileşmesi.....	27
2.5. Oreksijenik ve Anoreksijenik Peptitler ve Yara İyileşmesi	28
2.5.1. Oreksijenik Nöropeptiler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri	29
2.5.2. Anoreksijenik Nöropeptitler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri	30
2.6. Asprosin Hormonu ve Genel Özellikleri.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.2. Malzemeler ve Ekipmanlar	35
3.2.1. Kimyasal Malzemeler.....	35
3.2.2. Cam ve Plastik Malzemeler.....	36
3.2.3. Antikorlar	36
3.2.4. PCR kitleri	36
3.2.5. Hücre Hattı	37
3.2.6. Asprosin Hormonu	37
3.3. Yöntem	37
3.3.1. Hücre Kültürü Prosedürü.....	37
3.3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Medyumunun Hazırlanması.....	37
3.3.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	37
3.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	38
3.3.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	38
3.3.2. Uygulanan Asprosin Dozlarının Belirlenmesi ile Asprosin Stok ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	39
3.3.3. Hücre Proliferasyon Analizi (MTT Testi).....	39
3.3.4. Yara İyileşme Testi	41
3.3.5. İmmunositokimyasal Prosedür	42
3.3.6. Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama	45
3.3.7. Real Time-PCR Prosedürü (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	45

3.3.7.1. Real Time-PCR Öncesi Hücre Kültürü	45
3.3.7.2. Total RNA İzolasyonu.....	46
3.3.7.3. cDNA (komplementer-tamamlayıcı DNA) Sentezi	47
3.3.7.4. Kantitatif Real Time-PCR	48
3.3.8. Real Time- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	50
3.3.9. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Asprosin Hormonunun Hücre Viabilitesi Üzerine Etkisi.....	51
4.2. Yara İyileşme Hızının Değerlendirilmesi	52
4.3. Image J analiziyle Yara İyileşme Hızının Belirlenmesi.....	55
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	56
4.4.1. Fibroblast Hücrelerinde IL-1 İmmünreaktivitesi	56
4.4.2. Fibroblast Hücrelerinde IL-10 İmmünreaktivitesi	61
4.4.3. Fibroblast Hücrelerinde Fibronektin İmmünreaktivitesi	66
4.5. Real Time-PCR Gen Ekspresyonu Bulguları.....	76
5. TARTIŞMA	80
KAYNAKLAR	90
EKLER.....	117
EK-1. Etik Kurul Kararı	117

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Pro-İnflamatuar ve Anti-inflamatuar Sitokinler	22
Tablo 2.2. Oreksijenik ve Anoreksijenik Peptitler	29
Tablo 3.1. İmmünreaktif Skor (IRS) Tablosu	45
Tablo 3.2. 2xRT Master Mix Bileşenleri ve Miktarları	48
Tablo 3.3. cDNA Eldesi İçin Thermal Cycler’da Kullanılan Program	48
Tablo 3.4. PCR Reaksiyon Mix’in Hazırlanması.....	49
Tablo 3.5. Applied Biosystems Real -Time Real Time-PCR İçin Kullanılan Program	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ratlardan alınmış kalın deri dokusunun mikroskopik görüntüsü	4
Şekil 2.2. Embriyolojik dönemde epiderminin 4-5. Haftada (A), 7. Haftada (B), 4. Ayda (C), doğumdaki (D) oluşum safhaları	12
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin fazları	15
Şekil 2.4. Asprosin hormonunun genetik formu	33
Şekil 3.1. MTT testi sonrasında 96'lık plate'de meydana gelen renk değişimi.....	41
Şekil 3.2. Kontrol grubuna ait IL-1 immünohistokimyasal boyama ile hazırlanan preparat	44
Şekil 3.3. Nanodrop Cihazı'nda ölçülecek genetik materyalin damla görüntüsü.....	47
Şekil 3.4. "Rotor Gene Q" PCR cihazı fotoğrafı	49
Şekil 4.1. Yara çizik deneyi sonrası 24. saatte kontrol ve asprosin hormonu uygulanan gruplarda hücre viabilite değerlerini gösteren grafik.....	51
Şekil 4.2. Yara çizik deneyi sonrası 48. saatte kontrol ve asprosin hormonu uygulanan gruplarda hücre viabilite değerlerini gösteren grafik.....	52
Şekil 4.3. Kontrol ve asprosin hormonunu uygulanan HDF hücrelerinin çizik sonrası 0.saatteki invert mikroskop görüntüleri	53
Şekil 4.4. Kontrol ve asprosin hormonunu uygulanan HDF hücrelerinin çizik sonrası 24. ve 48.saatteki invert mikroskop görüntüleri.....	54
Şekil 4.5. Yara mesafesinin dozlara göre 0. ve 24. saatte Image J analizi ile kapanma oranını gösteren grafik	55
Şekil 4.6. Yara çizik deneyi sonrası 24. saatte yara bölgesine gelen fibroblast hücrelerinin göç etme yüzdeleri	56
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	57
Şekil 4.8. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	57
Şekil 4.9. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	58
Şekil 4.10. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	58

Şekil 4.11. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	58
Şekil 4.12. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda IL-1'in IRS değerlerini gösteren grafik.....	59
Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	59
Şekil 4.14. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	60
Şekil 4.15. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	60
Şekil 4.16. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	60
Şekil 4.17. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	61
Şekil 4.18. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda IL-1'in IRS değerlerini gösteren grafik.....	61
Şekil 4.19. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	62
Şekil 4.20. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	62
Şekil 4.21. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	62
Şekil 4.22. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	63
Şekil 4.23. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	63
Şekil 4.24. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda IL-10'un IRS değerlerini gösteren grafik.....	63
Şekil 4.25. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	64
Şekil 4.26. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	64

Şekil 4.27. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	65
Şekil 4.28. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	65
Şekil 4.29. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	65
Şekil 4.30. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda IL-10'un IRS değerlerini gösteren grafik.....	66
Şekil 4.31. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda fibronectinin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	67
Şekil 4.32. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	67
Şekil 4.33. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	67
Şekil 4.34. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	68
Şekil 4.35. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	68
Şekil 4.36. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda fibronectinin IRS değerlerini gösteren grafik.....	68
Şekil 4.37. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü.....	69
Şekil 4.38. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	69
Şekil 4.39. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	70
Şekil 4.40. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	70
Şekil 4.41. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	70
Şekil 4.42. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda fibronectinin IRS değerlerini gösteren grafik.....	71

Şekil 4.43. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	71
Şekil 4.44. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	72
Şekil 4.45. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	72
Şekil 4.46. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	72
Şekil 4.47. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	73
Şekil 4.48. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda kollajenin IRS değerlerini gösteren grafik.....	73
Şekil 4.49. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda kollajenin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	74
Şekil 4.50. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	74
Şekil 4.51. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	75
Şekil 4.52. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	75
Şekil 4.53. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü	75
Şekil 4.54. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda kollajenin IRS değerlerini gösteren grafik.....	76
Şekil 4.55. Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde IL-1'in gen ekspresyon düzeyleri	77
Şekil 4.56. Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde IL-10'un gen ekspresyon düzeyleri	77
Şekil 4.57. Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde fibronektinin gen ekspresyon düzeyleri.....	78
Şekil 4.58. Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde kollajen 1'in gen ekspresyon düzeyleri	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat (Cyclic Adenosine Monophosphate)
cDNA	: Komplamenter DNA (Complementary DNA)
CO ₂	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri (Dulbecco's Modified Essential Medium)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulphoxide)
ESM	: Ekstra Sellüler Matriks (Extra Celluler Matrix)
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBN 1	: Fibrillin 1
FBS	: Fetal Bovin Serum
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit (Hydrogen Peroxide)
HDF	: Human Dermal Fibroblast
HRP	: Horseradish Peroksidaz (Horseradish Peroxidase)
IL-1	: İnterlökin-1
IL-10	: İnterlökin-10
IL-6	: İnterlökin-6
MTK	: Massaon Trikrom
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, 1 sarı tetrazol (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, a yellow tetrazole)
PBS	: Fosfat Tamponlu Solüsyon (Phosphate Buffered Saline)
PKA	: Protein Kinaz A
PSA	: Penisilin Streptomisin Amfoterisin B
Rpm	: Revolutions Per Minute

RT-PCR	:	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time – Polimerase Chain Reaction)
TGF	:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
TNF- α	:	Tümör Nekroz Faktör Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha)



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp her türlü yardımını, emeğini ve desteğini esirgemeyen, yaşadığım bu zorlu süreçte her anımda yanımda olan ve anlayışla karşılayan, beceri ve her türlü bilimsel gelişimime katkı sağlayan, tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ'ye,

Asistanlığım süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden faydalandığımız sağladığı hoşgörü ve destekleri için Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ'e,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığımız kıymetli hocamız Doç. Dr. Jale SELLİ'ye,

Tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında katkılarını esirgemeyen, laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Hacımuftuoğlu'na ve tez deneylerimin yürütülmesini sağlayan Dr. Öğretim Üyesi Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ'ye, tez aşamalarımdayanımda bulunan Dr. Öğretim Üyesi Kemal Alp NALCI'ya,

Laboratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Mahmut TANRISEVEN'e ve asistanlık eğitimim süresince bana her türlü konuda destek olan arkadaşlarım Uzm. Dr. Raziye ALACA'ya, Dr. Öğretim Üyesi Erdem TOKTAY'a, Dr. Muhammet Ali GÜRBÜZ'e, Dr. Tuğba BAL TAŞTAN'a, Dr. Öğretim Üyesi Özlem ABUÇ'a ve Arş. Gör. Dr. Aslı SOLAK'a,

Tez çalışmamı TTU-2020-7526 proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimine,

Eğitimimin her aşamasında ve hayatımın her alanında desteklerini benden esirgemeyen aileme, her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili eşim Cemal KAYGISIZ'a ve göz aydınlıklarım A. Tuna, S. Hüma ve G. Hifa'ya,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Merve Durmuş KAYGISIZ

ÖZET

Asprosin Hormonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin İn Vitro Olarak Araştırılması

Amaç: Önemli bir sağlık sorunu olan kutanöz yaraların tedavisi amacıyla, çeşitli maddeler yüzyıllardır araştırılmış olup yenileri de her geçen gün eklenmekte ve elde edilen bilgiler bilim ışığında güncellenmektedir. Bu çalışmada, yeni keşfedilen ve pek çok sistemi birden etkileyebilen bir adipokin olan asprosin hormonunun yara iyileşmesi üzerindeki olası etkilerinin in vitro olarak araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Asprosin dozları 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml olarak belirlendikten sonra HDF hücre hattından elde edilen fibroblast hücreleri platelere ekilerek konfluenti sağlandı. Daha sonra plateler kontrol, 24 ve 48 saatlik gruplar şeklinde ayrıldı. Platelerde, ‘Yara Çizik Deneyi’ ile yara modeli oluşturuldu ve belirlenen dozlarda asprosin hormonu uygulandı. Bütün gruplarda hücre canlılıkları MTT yöntemi ile hücrelerdeki IL-1, IL-10, fibronektin ve kollajenin immünreaktiviteleri immünositokimyasal yöntemle ve bu proteinlere ait gen ekspresyonları Real Time-PCR yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular: Yara çizik deneyi sonrası asprosin verilen bütün gruplarda yara alanları kontrol grubundan önce kapandı, ancak en erken kapanma asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda gözlemlendi. Hücre canlılığı; bütün gruplarda kontrole göre ileri seviyede ve 200 ng/ml dozunda en yüksek seviyede tespit edildi. Hem immünositokimyasal hem de moleküler analizlerde, IL-1’in gen ekspresyonu kontrol ve diğer gruplar arasında farklılık göstermedi. IL-10 ekspresyonunda, asprosin hormonunun 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında 48 saatlik gruplarda anlamlı artış tespit edildi. Asprosinin 200 ng/ml dozunda uygulandığı 48 saatlik gruplarda daha belirgin olmakla birlikte, 24. ve 48. saatlerde 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında fibronektinin yüksek ekspresyon sergilediği tespit edildi. Kollajen ekspresyonunun ise 48 saatlik gruplarda 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlendi.

Sonuç: Çalışmamızda, asprosin hormonunun; hücre proliferasyonunu artırdığı, anti-inflamatuar etki gösterdiği, fibronektin ile kollajen oluşumunu artırarak yara iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu varıldı. Böylelikle asprosin hormonunun gelecekte yaraların tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: HDF Hücre Hattı, Yara İyileşmesi, Asprosin, İmmünositokimya, Real Time-PCR

ABSTRACT

In Vitro Investigation of the Effect of Asprosin Hormone on Wound Healing

Objective: Various substances have been studied for centuries for the treatment of cutaneous wounds, which are an important health problem, and new ones are being added every day, and the information obtained is being updated in the light of science. In this study, it was aimed to investigate the possible effects of the asprosin hormone, an adipokine that is newly discovered and affects many systems, on wound healing in vitro.

Material and Methods: After the asprosin doses were determined as 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, and 200 ng/ml, the fibroblast cells obtained from the HDF cell line were seeded in the plates, and their confluence were provided. Then, the plates were divided into control, 24-and 48-hour groups. A wound model was ensured with the "Wound Scratch Assay," and the asprosin hormone was administered at the determined doses in the plates. Cell viabilities were analyzed by the MTT method, the immunoreactivities of IL-1, IL-10, fibronectin, and collagen by the immunocytochemical method, and the gene expressions of these proteins with the Real Time-PCR method, in all groups.

Results: After the wound scratch assay, wound areas were closed in all groups given the asprosin hormone before the control group, but the earliest closure was observed at a 200 ng/ml dose. Cell viability was observed at higher levels in all groups compared to the control, and it was the highest at the dose of 200 ng/ml. In both immunocytochemical and molecular assays, gene expression of IL-1 did not differ between control and other groups. A significant increase was detected in IL-10 expression at 150 ng/ml and 200 ng/ml doses of asprosin hormone in the 48-hour groups. Although it was more pronounced in 48-hour groups administered asprosin at a dose of 200 ng/ml, it was determined that fibronectin exhibited high expression at 100 ng/ml, 150 ng/ml, and 200 ng/ml doses at 24th and 48th hours. It was detected that collagen expression was higher in the 48-hour groups at 100 ng/ml, 150 ng/ml, and 200 ng/ml doses compared to the control group.

Conclusion: Our study concluded that the asprosin hormone increases cell proliferation, exhibits an anti-inflammatory effect, and has positive effects on wound healing by increasing collagen and fibronectin formation. Therefore, it was thought that asprosin hormone could be an agent that can be used for treatment of wounds in the future.

Keywords: HDF Cell Line, Wound Healing, Asprosin, Immunocytochemistry, Real Time-PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hayatımızın belirli dönemlerinde karşılaştığımız ve çeşitli nedenlere bağlı meydana gelen kutanöz yaralar, hastaları psikolojik, sosyal ve ekonomik yönden olumsuz etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Hem basit kesilerde hem de yaygın kutanöz yaralarda, deriyi oluşturan dokuların histolojik olarak bütünlüklerinin bozulması söz konusudur. Kutanöz yaralar, kesi yarası, insizyon yarası, yanık, diyabetik yara ve bası yarası gibi yaralar şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

Yara çeşitleri, büyüklükleri, akut, kronik, temiz ya da enfekte olmaları, yara tedavisinde dikkat edilmesi gereken noktalar. Kesiler ve insizyon yaraları gibi yaralar uygun tedaviyle kısa sürede iyileşirken, yanıklar, diyabetik yaralar ve bası yaraları gibi komplike yaraların tedavisi uzun zaman ve özen gerektirmektedir. Yaraların iyileştirilmesi amacıyla kullanılan birçok tedavi yöntemi olmasına rağmen, bazı yaraların iyileşmesinin uzun sürmesi ve iyileşirken skar dokusu bırakması estetiksel kaygının yanında maddi kayıplar gibi pek çok sorunu da beraberinde getirmektedir. Komplike yaraların tedavisinde, yara örtüleri, biyomekanik yara bakımı (hiperbarik oksijen, ozon vb), GETAT (geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları) ve PRP (trombositten zengin plazma) gibi farklı tedavi protokolleri kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerin bazılarının yüksek maliyetli olması bazılarının ise neden olduğu yan etkiler ve tedavilerinde gidilmesi gereken merkezlere ulaşımın zorluğu gibi nedenlerle kullanımları kısıtlı kalmaktadır. Bu durum yara iyileşmesinde yeni tedavi protokollerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Son zamanlarda yara tedavisinde hormonların ve adipokinlerin kullanıldığı görülmektedir. 2016 yılında keşfedilen asprosin hormonu, oreksijenik yeni bir adipokindir. Daha önce yağ otogrefti gibi güncel tedavi yöntemlerinin de yara iyileşmesinde olumlu etkilerinin gösterilmiş olması, subkutan beyaz yağ dokusundan sentezlendiği gösterilen asprosin hormonunun da yara iyileşmesi üzerine etkisinin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Asprosin hormonu, karaciğerde glikoz salınımını artırarak pankreasın β hücrelerinden insülin sentezini indüklemekte ve beyinde cAMP bağımlı yolakla doğrudan AgRP + nöronlarını uyarak iştahı artırıcı etkiler göstermektedir. Pek çok

sistemi birden etkilediği gösterilen asprosin hormonunun, kan glikozunu artırdığının gösterilmesi ile glukoneogenezele bağlantı kurulmuş ve monoklonal antikorlar kullanılarak inhibisyon yoluyla, diyabetli hastalarda umut kaynağı olabileceğinden bahsedilmiştir. Diyabetli hastalarda inflamasyonun artması gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişen diyabetik yaraların iyileştirilmesi için bu tip yeni araştırmalar gelecekte de yerini alacaktır.

Literatürde, asprosin hormonunun, pankreas hücrelerinde disfonksiyon ve inflamasyona yol açtığını gösteren çalışmalara rastlanmakla birlikte, yanık sonrası iyileşme sürecinde olumlu etkili olabileceğini düşündüren çalışmalar da mevcuttur. Ancak, yeni keşfedilen bir hormon olan asprosin hormonunun yara iyileşmesinde ne tür bir rol oynayabileceğini deneysel düzeyde araştıran bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır.

Yaptığımız tez çalışmasında, oreksijenik bir adipokin olan asprosin hormonunun, yara iyileşmesi üzerinde gösterdiği etkinin, yara çizik deneyi sonrasında HDF hücre hattında hücre viabilitesi ile değerlendirilmesi, ardından IL-1, IL-10, kollajen ve fibronektin protein ekspresyonlarının immünositokimyasal yöntemler ve Real Time-PCR ile karşılaştırılarak araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

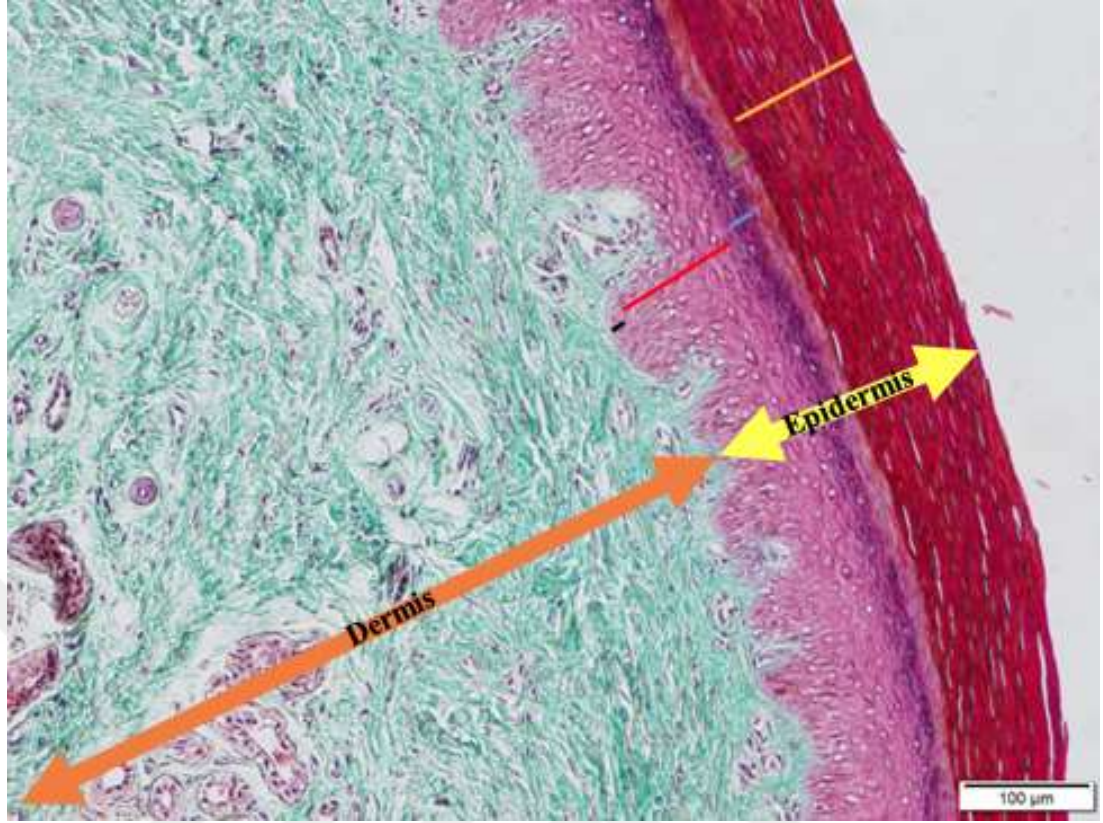
2.1. Deri

Deri vücudun dışını kaplayan tabakayı oluşturmaktadır ve vücudun toplam kütlelerinin % 15-20'sini meydana getiren en büyük organdır [1]. Deri, dış çevredeki ajanlara karşı bariyer olmakla birlikte, immünolojik bilgiyi uygun efektör hücrelere iletme, vücut sıcaklığını ve su kaybını düzenleyerek homeostazı sağlamak, duyu bilgisi sinir sistemine aktarmak, ekzokrin salgı yoluyla boşaltımda fonksiyon görmek ve D vitamini aktif formuna dönüştürmek gibi hayati fonksiyonlar gerçekleştirmektedir [1-3]. Deri, epidermis ve dermis olarak adlandırılan iki tabakadan oluşmaktadır. Epidermis ektodermden köken alırken, dermis ise mezodermden gelişmektedir [1, 2].

Epidermis keratinize çok katlı yassı (skuamöz) epitelden oluşmaktadır, dermis ise yoğun bir bağ dokusundan oluşmaktadır ve bu bağ dokusu deriye mekanik destek, dayanıklılık ve kalınlık kazandırmaktadır (Şekil 2.1) [1, 2]. Dermisin derinlerinde olan hipodermis; bağ dokusu yapısındaki septumlar ile birbirinden ayrılmış lobüller halinde düzenlenmiş, değişken miktarda adipoz doku içermektedir. Hipodermis deriyi çevre dokulara gevşekçe bağlar [4].

Derinin kalın ve ince deri olmak üzere 2 tipi vardır [1]. Kalın deri el ayası ve ayak tabanında bulunur [5] ve 5 mm'den daha kalındır ve kılsız yapıdadır. Kalın bir epidermise sahiptir. Vücudun kalan diğer kısımlarını örten deri ince deridir ve 1-2 mm kalınlığındadır ve kıl folikülleri bulundurmaz. Buradaki deride epidermis ince yapıdadır [1].

Histologların kullanmış olduğu kalın ve ince deri tabiri epidermal tabakanın değerlendirilmesine dayanmaktadır. Anatomik olarak ise, sırt derisi aşırı dermis tabakası içermesinden dolayı kalın deri tabirini almakla birlikte histolog gözüyle buradaki deri ince derinin epidermisine benzemektedir. Yine anatomik olarak, göz kapağının derisi aşırı derecede incedir [1].



Şekil 2.1. Ratlardan alınmış kalın deri dokusunun mikroskopik görüntüsü. **Sarı çizgi:** stratum corneum, **Yeşil çizgi:** stratum lusidum, **Mavi çizgi:** stratum granulosum, **Kırmızı çizgi:** stratum spinosum, **Siyah çizgi:** stratum bazale. **Sarı ok:** epidermis, **Turuncu ok:** dermis. **Boya:** MTK. **Büyütme objektifi:** x10.

2.1.1. Epidermis

Ektodermden köken alan epidermis, çok katlı yassı (skuamöz) epitelden oluşmaktadır. Bu tabaka sürekli olarak büyümesine rağmen deskuamasyon sayesinde kalınlığı korunmaktadır. Epidermis; baskın olarak keratinosit hücresi, pigment üreten melanosit hücresi, immün sistem ile ilişkili langerhans hücresi ile duysal sinir sonlanmalarında görevli merkel hücresi olmak üzere dört hücre grubunu içermektedir. Epiderminin tabaka sayısı da dördttür. Kalın deride ise beş tabaka halinde gözlenmektedir [1, 3].

2.1.1.1. Epiderminin Katmanları

Stratum bazale, diğer ismiyle stratum germinatum, derminin hemen üstünde bulunan ve tek katlı hücre tabakası (kübik ya da alçak prizmatik) olup kök hücreleri içermektedir. Bu kök hücrelerin mitotik bölünmesiyle keratinositler meydana

gelmektedir. Keratinositlerin yukarıya doğru ilerlemesi ve keratinize hücrelere dönüşmesi sonrasında deri yüzeyinden bu hücreler dökülmektedir. Melanositler de bu tabakada yer almaktadır [6]. Stratum bazaledeki hücreler birbirlerine ve stratum spinozumdaki hücrelere desmozomlar aracılığıyla bağlanırken, alttaki bazal laminaya ise hemidesmozomlar aracılığıyla bağlanmaktadır [1].

Stratum spinozum, birçok sitoplazmik uzantıyla beraber karakteristik dikensi (spinöz) yapısından dolayı bu şekilde isimlendirilmiştir. Bu uzantılar komşu hücrelere desmozomlarla bağlanmıştır [6]. Buradaki keratinositler birkaç hücre kalınlığındadır ve bazal tabakadaki keratinositlerden daha büyüktürler [1]. Stratum bazale ve stratum spinozum tabakaları birlikte Malpighi tabakasını meydana getirirler.

Stratum granülozum, bu katmandaki keratinositlerin keratohiyalin granülleri içermesinden dolayı bu şekilde isimlendirilmiştir. Bu granüller histidin ve sistin adlı proteinleri içerirler ve filagrin adı verilen stratum korneumdaki keratin filamentlerini oluşturan proteinin prekürsörleridirler [7]. Stratum granülozum katmanı, bu proteinlerin yoğun bazofilik boyanması sayesinde histolojik kesitlerde kolayca ayırt edilebilmektedir [1]. Kök hücrelerin bulunduğu stratum bazaleden, stratum korneuma ilerleyen keratinositler, çekirdeklerini kaybetmeye başlarlar ve bu tabakada keratinositlerin içleri keratohiyalin granülleri ile doludur [6].

Stratum lusidum, bazı histologlar bu tabakayı stratum korneumun alt tabakası kabul etmekle birlikte sadece kalın deride belirgindir [6]. Işık mikroskopunda açık renkte boyanır [1]. Stratum lusidum, keratohyalinin bir transformasyon ürünü olan ve yağlı veya mumsu şekildeki eleidin maddesini içerir [5, 8]. Eleidin el içi, ayak tabanı ve dudakta bulunur [9].

Stratum korneum, keratinositler nükleuslarını ve sitoplazmik organellerini kaybederek neredeyse tamamen keratin filamentleriyle dolu hale gelirler [10]. Bu tabakanın derin kısımları ekstrasellüler lipid tabakasıyla kaplanır ve bu lipid tabakası epidermisteki su bariyerinin temelini oluşturur [1, 6].

2.1.1.2. Epidermisin Hücreleri

Epidermis dört farklı hücre tipini içermektedir;

1) Keratinositler

Bu hücreler, ileri düzeyde özelleşen epitel hücreleri olmakla birlikte, canlıların dış dünyadan korunmasını sağlamak gibi pek çok işlevi yerine getirmekle görevlidir [11]. Epidermisin tabakalarından olan stratum bazaleden köken alırlar. Bu tabakadan ayrılan keratinositler, keratin (sitokeratin) oluşumunu sağlamanın yanı sıra epidermal su bariyerini de meydana getirirler. Oluşan keratin granülleri, daha sonra bir araya gelerek ara filamentleri (keratin filamentleri) şekillendirirler [1].

Stratum spinosum'a ilerleyen keratinositler, sitoplazmalarında bulunan serbest ribozomlar sayesinde keratohiyalin granüllerini sentezlerler. Keratohiyalin granülleri, ara filament-ilişkili proteinler ve glikolipid içeren lamellar cisimcikleri bulundurur. Bu granüller çoğaldıkça, granülün içeriği keratinosit sitoplazmasına bırakılır [11].

Nükleus ile diğer organellerin parçalanması ve plazma membranının kalınlaşması yoluyla granüler hücrelerin, keratinize hücrelere dönüşümü gerçekleşmektedir. Stratum granulozum tabakasında, granüler tabaka hücrelerinin boynuzsu hücrelere dönüşümü başlar. Bu süreç keratinizasyon olarak tanımlanmaktadır ve 2-6 saat içinde gerçekleşmektedir. Bu süreçte oluşan keratin fibriline yumuşak keratin denilirken, kıl ve tırnaklarda bulunan keratin fibriline ise sert keratin denilmektedir [1].

2) Melanositler

Melanositler nöral krestten köken alırlar [12]. Epidermiste melanin sentezleyerek pigment oluşumunda görevli hücrelerdir [13]. Sentezledikleri melanini keratinositlere dağıtırlar. Lokalizasyon olarak, stratum bazalenin bazal hücreleri arasında serpilmiş halde bulunurlar [12] ve keratinositlere göre çok daha yavaş bir hızla sayılarını artırırlar [4].

Melanositin yuvarlak şekilli hücre gövdesi, bazal tabakada bulunur. Stratum spinosumdaki keratinositlerin arasına kadar uzanan uzantıları sebebiyle dendritik hücre olarak adlandırılırlar. Bir melanosit yaklaşık 36 keratinosit ile ilişkilidir [14]. Melanositin hücre gövdesi ve uzantıları komşu keratinositlere desmozomal bağlantı gerçekleştirmezken, bazal lamina yakınındaki melanositler ise hemidesmozomlara benzeyen yapılar bulundurur [1].

Melanositler, tirozinaz enzimi aracılığıyla melanin üretirler. Tirozinaz aktivitesi tirozini 3,4-dihidroksifenilalanine (DOPA) dönüştürür, daha sonra DOPA melanine dönüşür. Melanin pigmenti, melanositlerin dendritik uzantılarında bulunan melanozomlarda birikir ve daha sonra keratinositlere aktarılır. Böylece cilt ve saç pigmentasyonu sağlanır. Bazal tabakada bulunan melanositlerin keratinosit gibi hücrelere oranı vücudun farklı bölgelerinde 1/4 ila 1/10 oranları arasında farklılık göstermekle birlikte tüm ırklarda sabittir [1].

3) Langerhans hücreleri

Langerhans hücreleri, dendritik uzantılı olup, epidermiste antijen sunan hücrelerdir. Kemik iliğinde bulunan ortak lenfoid progenitör hücrelerden köken alırlar ve kan dolaşımına geçip farklılaşarak epidermise göç ederler. Langerhans hücresi, epidermisten bölgesel lenf düğümüne göç ederek burada bulunan T lenfosit ile etkileşime girer [1].

Melanositlerde olduğu gibi Langerhans hücreleri de keratinositler arasına sitoplazmik uzantılar göndermesine rağmen melanositlerdeki gibi komşu keratinositlerle desmozomal bağlantı oluşturmazlar. Desmozomal bağlantı yerine, keratinositler arasında bulunan E-cadherin sayesinde birbirleriyle temas kurarlar [4].

4) Merkel hücreleri

Merkel hücreleri, stratum bazalede yer alan, epidermisteki epidermal hücrelerden köken alan dendritik hücrelerdir [1]. Parmak uçları gibi duyuşal uyarının çok olduğu deri kesimlerinde sayıları daha fazladır [4].

Merkel hücreleri, komşu keratinosit hücrelerine desmozomlar aracılığı ile bağlanmakta ve sitoplazmalarında ara (keratin) filament içermektedirler [1].

Merkel hücreleri, afferent miyelinli sinir liflerinin genişlemiş uç kısımlarıyla ilişkilidirler. Nöron terminali, merkel hücrelerinin tabanına yakın bir yerde disk ya da plak şeklinde sonlanma oluşturarak genişler [1, 4]. Nöron ve epidermal hücrenin birlikteliği, *merkel korpusküllü* olarak adlandırılır ve bu bir mekanoreseptördür [4].

2.1.2. Dermis

Dermisin, cildi ve daha derin katmanları desteklemek ve korumak, esneklik ve gerilme kuvveti sağlamak, termoregülasyona ve duyuya yardımcı olmak gibi görevleri bulunmaktadır [15, 16]. Epidermin dermise tutunması; epidermisten dermise uzanan epidermal çıkıntılar ve dermisten epidermise uzanan dermal papillalar vasıtasıyla iki doku arasındaki arayüz genişlemeleri sağlanarak arttırılmaktadır [1]. Kalın deride bu ikisine ek olarak dermal çıkıntı da bulunmaktadır. Bu da dermatoglifiks denen parmak ve ayak izinin oluşmasını sağlamaktadır [17].

Epidermin dermisteki hücrelere bağlanması, hemidesmozom denilen hücre iskeletinin ara filamentleri ile bazal laminaya tutunması yoluyla sağlanmaktadır [1, 18]. Ayrıca aktin filamentleri de bazal laminada fokal adezyonlar sayesinde bağlantı kurmaktadır [1, 18]. Dermis, kan damarlarını, sinir uçlarını, saç köklerini ve bezleri barındırır [15] ve papiller ve retiküler tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır [2].

Papiller tabaka, epidermin hemen altında bulunan ve epidermise dermal papillalar şeklinde girintiler yapan tabakadır. Gevşek bağ dokusundan oluşan bu tabaka, fibroblastlar, mukavemeti sağlayan tip 1 ve tip 3 kollajen lifler ve de elastikiyeti sağlayan elastik lifler içeren retiküler tabakaya göre, daha ince ve düzensiz şekilli bir ağdan oluşmaktadır [3]. Bu tabakada bulunan ve bağ dokusunun esas hücreleri olan fibroblastlar, ara madde içeriğini oluşturan; kollajen, elastik ve retiküler lifler ve kompleks karbonhidratlar gibi molekülleri sentezlerler [3].

Papiller tabakada; epidermisi destekleyen ve içine girmeyen kan damarları, bazal laminaya penetre sinir uzantıları ile duyuşal sinir sonlanmaları bulunmaktadır [1]. Arterlerden gelişen küçük damar ağları, retiküler dermisten papiller dermise kadar yüzeysel pleksusları meydana getirirler. Dermal papillalarda bulunan meissner korpüskülleri, dokunma duyusunu sağlayan mekanoreseptörlerdir.

Retiküler tabaka, papiller tabakanın hemen altında bulunur ve vücudun farklı kesimlerinde değışkenlik gösterebilmektedir. Papiller tabaya göre daha kalın olan ve az hücre içeren bu tabaka kalın ve düzensiz tip 1 kollajen demetleri ve elastik liflerden oluşmaktadır [3]. Retiküler tabakanın altında adipoz doku tabakası (hipodermis), düz kas tabakası ve bazı bölgelerde çizgili kas tabakası bulunabilmektedir [1].

Retiküler tabakada da, kan damarları, sinirsel uzantılar ve duyuşal sinir sonlanmaları bulunmaktadır. Arterlerden gelişen küçük damar ağları, retiküler dermiste derin pleksuslar halinde gözlemlenir.

Dermisin derinlerinde bulunan retiküler tabakada, pasini korpüskülü sayesinde basınç algılanması sağlanmaktadır.

2.1.3. Epidermal Deri Ekleri

Deri ekleri, embriyonik gelişim döneminde epidermal epitelin aşağıya doğru büyümesiyle meydana gelirler. Bunlar; kıl ve kıl foliküllerinden, yağ bezlerinden, apokrin ve ekrin ter bezlerinden ve tırnaklardan oluşmaktadır.

2.1.3.1. Kıl ve Kıl Folikülleri

Kıllar, kıl foliküllerinde oluşan uzamış keratinize yapılardır. Avuç içleri, ayak tabanları, dudaklar ve ürogenital açıklıklar dışında tüm vücutta bulunurlar. Sert, keratinize epitel hücrelerinden oluşmuşlardır. Kılın rengi, melanositler tarafından üretilen melanin içeriğine bağlıdır. Bazal epidermisteki keratinositler dermise doğru büyümeye devam ederler ve dermal papillayı sararlar. Bu hücreler kıl kökünün matriksini oluştururlar. Kılın deri üzerindeki görünür kısmı ise kıl gövdesidir [1].

Dermiste, kıl foliküllerinin orta kısmına bağlanan ve dermisin papiller tabakasına uzanan, erektör pili kası olarak adlandırılan düz kas yapısı bulunmaktadır. Bu kasların kasılmaları kıl gövdesini yukarı kaldırır ve cildin yüzeyinde kılları dik olarak çeker. Bu durum, kişi üşüdüğünde veya aniden korktuğu zaman ortaya çıkar [1, 19, 20].

2.1.3.2. Yağ Bezleri

Yağ bezleri dallı asiner holokrin bezlerdir. Lobüler bir görünüm sergilerler. Vücudun büyük bir kısmında ve dermiste bulunurlar. Avuç içlerinde ve ayak tabanlarında yağ bezleri yoktur. Bir yağ bezinin tüm asinusları, sebumlarını tek bir kısa kanala boşaltırlar. Sebum kıl folikülünün boyun kısmına boşaltılır. Sebum, yağlı bir sekresyon ve dejenere olan epitelyal hücrelerden oluşur ve lubrikasyonda rol oynar ayrıca bakterisidal etkileri de bulunmaktadır [1, 4, 21].

2.1.3.3. Ter Bezleri

Dermisin daha derin kısımlarında bulunurlar. Ter bezleri, ekrin ve apokrin ter bezleri olmak üzere iki tipe ayrılırlar [1, 4, 19].

2.1.3.3.1. Ekrin (Merokrin) Ter Bezleri

Basit kıvrımlı tübüler bezlerdir. Termoregülasyonda önemli rol oynarlar. Kıl kökleri ile bağlantılı değildirler. Kanalı epidermise ulaşır ve salgıyı cilt yüzeyine boşaltır. Dudaklar ve dış genital bölgelerin bazı bölgeleri dışında vücudun çoğu kısmında bulunurlar. Sulu kıvamda salgı üretirler [1]. Ekrin ter bezleri, ısı regülasyonunda önemli görev üstlenirler. Bunu, terin buharlaşması neticesinde derinin soğuması yoluyla gerçekleştirirler. Hipotonik tarzda salgılanan bu sıvı, ter kanallarından sodyum ve suyun bir kısmının geri emilmesi nedeniyle kan ultrafiltratına benzemektedir. Bu sıvı değişken miktarda sodyum klorür, üre, ürik asit ve amonyak içermektedir. Ter bezlerinin boşaltım kanalları, salgılanmış Cl⁻'un geri alınmasında görevli bir kanal proteini olan, kistik fibroz transmembran iletim regülatörü (CFTR) içeren epitel hücreleriyle sarılmıştır [1, 4, 19].

2.1.3.3.2. Apokrin Ter Bezleri

Büyük lümenlere sahip tübüler bezlerdir. Puberteden sonra aktif olmaya başlarlar ve hormonal değişiklikler, duygusal ve duyuşsal uyarılardan etkilenirler. Visköz sekresyon yaparlar ve içinde feromonlar vardır. Kıl folikülleri ile ilişkilidirler ve salgılarını onlara boşaltırlar. Aksilla, meme ucunun areolası, perianal bölge ve dış kulak yolunda bulunurlar [4, 19, 21].

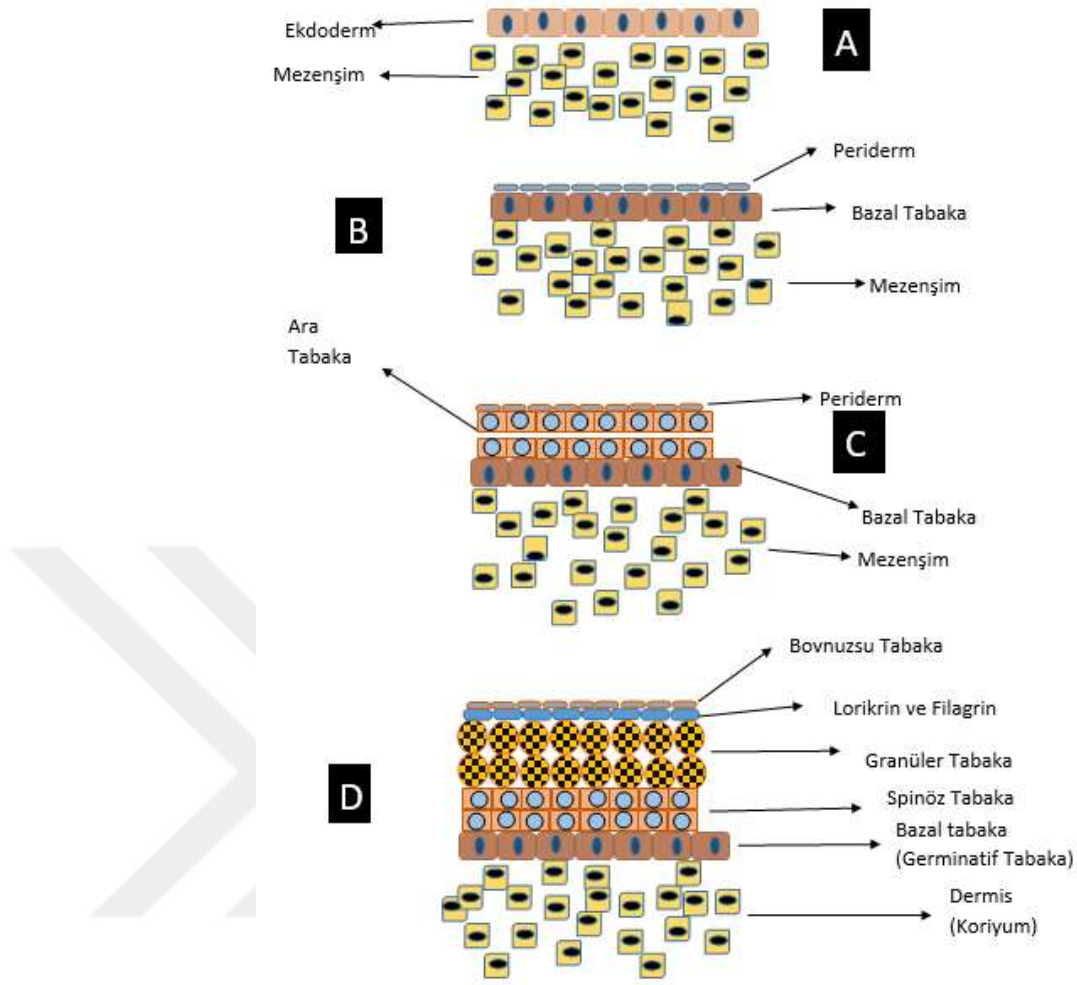
2.3.1.4. Tırnaklar

Tırnaklar, keratinize hücrelerden oluşan sert keratin plaklardır. Tırnak yatağının üzerini örterler. El ve ayak parmaklarının dorsal yüzeylerinde bulunurlar. Tırnak yatağı, epidermisin malpighi tabakasından ve altında bulunan dermisten oluşur [1, 19, 21].

2.1.4. Derinin Embriyolojik Gelişimi

2.1.4.1. Epidermis'in Embriyolojik Gelişimi

Deri iki orijinden gelişmektedir. Yüzeydeki katman olan epidermis ektodermden köken alırken, daha derindeki katman olan dermis ise mezenşimden gelişir. Başlangıçta embriyo yüzeyi önceleri ektodermal tek katmanla kaplıyken, ikinci ayın başlarında bu tabakayı oluşturan hücrelerde çoğalma ve farklılaşma başlar. Yedinci haftanın sonunda periderm hücreleri oluşur ve altında bazal tabaka bulunur (Şekil 2.2/B). Altta kalan bazal hücrelerin proliferasyonu ile oluşan hücreler ara tabakayı oluşturur. Periderm hücreleri, sürekli şekilde keratinizasyona uğrayıp boynuzsu tabakayı meydana getirir. Bu tabaka keratin içeren, ölü hücrelerden ibarettir. Ara tabakadaki hücreler ince tonofibrilleri içeren büyük polihedral hücreler haline gelir ve böylece spinöz tabaka oluşur. Spinöz tabakanın üzerinde yer alan ve keratohiyalin granülleri ile dolu hücreler ise granüler tabakayı oluşturur. Dördüncü ayın sonunda epidermis düzenlenmesini tamamlar ve 4 katman ayırt edilir hale gelir. Deskuamasyonla dökülen periderm hücreleri ise fetüsü dıştan saran verniks kazeozayı meydana getirir (Şekil 2.2)[22-25].



Şekil 2.2. Embriyolojik dönemde epiderminin 4-5. Haftada (A), 7. Haftada (B), 4. Ayda (C), doğumdaki (D) oluşum safhaları

2.1.4.2. Dermisin Embriyolojik Gelişimi

Dermis, yüzey ektoderminin altında yer alan mezenşimden gelişir [10, 26, 27]. Çoğu mezenşim kökenli olan dermisin bağ dokusundaki farklılaşmalar, lateral mezodermin somatik tabakasından kaynaklanmaktadır. Yaklaşık 11. haftada mezenşimal hücreler bağ dokusundaki kollajen ve elastik lifleri üretmeye başlar. Dermis çıkıntılar halinde epidermise doğru yönelim gösterir. Burada gelişen kapillerlerle epiderminin beslenmesi sağlanmaktadır [28]. Yine bu kısımlarda duyu sinir uçları gelişir. Dermisteki kan damarları da mezenkimden kaynaklanmaktadır. İlk üç ayın sonunda fetal dermisin kan akımı iyi biçimde yerleşmiştir [26].

Dermisteki kıl folikülleri, epitelyal invajinasyonlardan gelişirler. Dermise doğru büyüyen invajinasyon kıl tomurcuğunu oluşturur. Daha sonra kıl tomurcuğu genişleyerek germinal matriks ile dolu kıl bulbusuna dönüşür. Mezenkim dokusu bulbusa doğru invajinasyon yaparak kıl papillasını oluşturur. Bulbus içindeki germinal matriks hücreleri keratinize olur ve kılı oluşturur. Periferik hücreler de epidermal kök kılıfını oluştururlar [23, 24].

Dermiste bulunan ekrin ve apokrin ter bezleri, epidermisten hücresel tomurcuklar şeklinde mezenşime doğru gelişirler [29]. Bu tomurcuklar uzadıkça kıvrılır, epidermise doğru bağlanarak ter kanalının primordiyumunu oluştururlar [26, 30]. Primordiyal kanalın merkezindeki hücreler dejenere olarak lümen oluştururlar [26]. Bezin salgı kısmında bulunan periferdeki hücreler ise miyoepitelyal ve salgı hücrelerine dönüşmektedir. Miyoepitelyal hücreler terin dışarıya atılmasından sorumlu özel düz kas hücreleridir [10]. Ekrin ter bezleri doğumdan kısa süre sonra faaliyet göstermektedir [10]. Apokrin ter bezleri kıl foliküllerini oluşturan epidermisin bazal tabakasından kaynaklanırlar. Bu nedenle yağ bezleri ve kıl folikülleri ile yakın ilişkilidirler. Doğumda apokrin ter bezleri bulunmasına rağmen aktif değildirler ancak puberte döneminde aktifleşerek salgı üretirler [10, 26].

2.2. Yara

Yara; biyolojik, fiziksel ya da kimyasal travmalar sonucunda normal deri bütünlüğünün tahribata uğramasıdır [31, 32]. Kutanöz yaralar, çeşitli zedeleyici nedenlere bağlı gelişen derinin epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarındaki hasar sonucu meydana gelir.

2.2.1. Yara Çeşitleri

Kutanöz yaralar, nedene ve sonuçta ortaya çıkan hasara bağlı olarak birkaç şekilde kategoriye ayrılırlar. Oluş zamanına göre, akut ve kronik yara, derinin bütünlüğünün bozulmasına göre, kapalı ve açık yara, yaranın kontaminasyon durumuna göre ise temiz ve enfekte yara şeklinde ifade edilmektedir.

Akut yara; geçici bir nedene bağlı, keskin nesneler ya da darbelerle travma sonrasında oluşan ve kısa sürede iyileşen yaralardır [33, 34].

Kronik yara; iyileşmeyi engelleyen ve iyileşme süresini uzatan birçok faktör (damarsal, sinirsel, hücrel vb) olmasının yanında, genellikle sistemik nedenlere bağlı olarak gelişen ve genelde uygun yara bakımı sonrası üç ay içinde iyileşmeyen [35] ve tekrar eden yaralardır [33, 34].

Kapalı yara; deri bütünlüğü bozulmadan; künt travma sonucu sızan kanın pıhtılaşmasına bağlı peteşi, purpura ekimoz şeklinde görünüm veren kontüzyon yaraları, doku ya da organ boşlukları arasına sızıntıyla gelişen hematoma yaraları, ezilme yaraları ile kemik kırığı yaraları deri altındaki dokuların hasar gördüğü yaralardır [36].

Açık yara; derinin kesilmesi, yırtılması, sıyrılması, yanması gibi deri bütünlüğü kaybolduğunda oluşan yaralardır. Bu tür yaralarda mikroorganizmalar yara içine kolayca giriş yolu bulabilmektedir [36].

Temiz yara; inflamasyonun görülmediği, enfekte olmamış, sindirim yolu ve ürogenital yoldan uzak yerlerde bulunan yaralardır [36].

Enfekte yara; inflamasyonun gözlemlendiği, yara yerinde mikroorganizmaların, ölü dokunun, yabancı cismin ya da fekal kontaminasyonun bulunabildiği, geç kalınmış tedavi sonrasında gelişen yaralardır [36].

2.2.2. Yara İyileşmesi

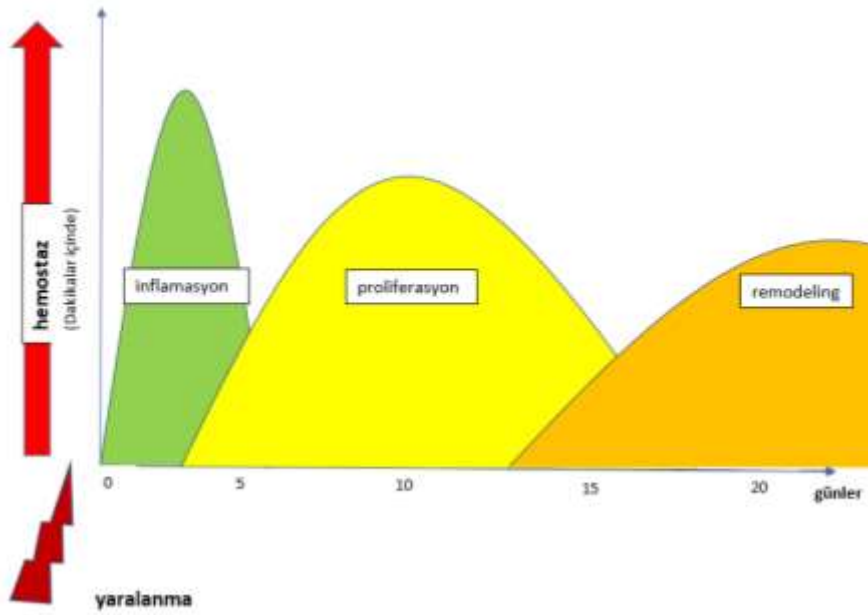
Yara iyileşmesi, derideki hasarın, yara oluşması sonrasında meydana gelen moleküler olaylar sonucunda üretilen sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve çeşitli mediyatörler aracılığı ile gerçekleşen onarım sürecidir. Kutanöz yara iyileşmesi iki şekilde gerçekleşmektedir;

- 1) Primer yara iyileşmesi; az sayıda epitel ve bağ doku hücrelerinin yıkıldığı,

dar insizyon alanı içeren, az komplike, cerrahi sutureler ile bir araya getirilen, enfekte olmamış cerrahi insizyon birleşmesi durumunda gerçekleşen iyileşme tipidir [37].

- 2) Sekonder yara iyileşmesi; inflamatuvar ülserasyon, abse oluşumu, geniş doku defektinin bulunduğu, büyük defektler sonrası geniş hücre ve doku kaybının gözlemlendiği, komplike, kenarları ayrılmış, çok miktarda granülasyon dokusu içeren yaralarda gerçekleşen iyileşme biçimidir [37].

Kutanöz yaranın iyileşme süreci, iç içe geçmiş hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodeling (yeniden şekillenme) fazlarından oluşan karmaşık bir süreçtir (Şekil 2.3)[1, 31, 38, 39].



Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin fazları

Hemostaz fazı: Yarananmadan sonra dakikalar içinde gelişen ilk fazdır [40]. Travma sonrasında gelişen ilk yanıt pıhtı oluşumudur. Trombositler, travma oluşur oluşmaz görev almaya başlarlar. Yaranın kanamasıyla trombositler damardaki trombojenik subendotele temas ederler [41] ve damarda gelişen vazokonstriksiyon ile birlikte tıkaç oluşturarak kanamayı azaltırlar [31]. Trombositler sadece hemostazı sağlamakla kalmazlar. İyileşmeye yardımcı olmak için; PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), TGF-

β (transforming growth factor beta), IGF-1 (insulin like growth faktör-1), koagülasyon oluşumu, fibrinojen, fibronektin, histamin, serotonin, bradikinin ve prostaglandin gibi inflamatuvar mediyatörleri salıp inflamasyona yardım ederler. Trombositlerin, kemostatik etkisi sayesinde nötrofil, makrofaj ve lenfosit gibi inflamatuvar hücreler olay yerine gelirler [1]. Yaralı alana gelen makrofaj ve nötrofiller; fagositoz yoluyla debris, nekrotik doku ve bakteriyel unsurları ortadan kaldırarak faaliyet gösterirler. Faktör 12 (hageman faktör), endotel hasarına bağlı olarak meydana gelen subendotelyal kollajenin dolaşımdaki trombositlerle teması sonucunda aktive olur, koagülasyon kaskadını uyarır. Bu faktör, kompleman, kinin ve koagülasyon sistemlerini uyarır [42]. İntrensek ve ekstrensek koagülasyon aşamalarında faaliyet göstererek protrombinden trombin oluşumunu destekler, oluşan trombin ise fibrinojenden fibrine geçişte görev alır. Fibrin, ani vazokonstriksiyon sağlar, yara alanında hemostazı ve hücre proliferasyonunu gerçekleştirir [43-46].

İnflamasyon fazı: Nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin yara bölgesine gelmesiyle başlayan fazdır [40]. Trombositler, nötrofiller ve diğer lökositler IL-1, IL-6, TNF- α (tumor necrosis factor-alfa) gibi sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımını sağlayarak inflamatuvar süreci uyarırlar [47]. Olay yerine ilk gelen hücre nötrofildir [48]. Nötrofiller 24 saatte toplu halde inflamasyon alanına gelirler ve enfeksiyon olmaması halinde 2-5 gün kadar bulunurlar [38, 47]. Nötrofillerden kısa süre sonra makrofajlar da olaya iştirak ederler [40]. Makrofajlar yaralanmadan 48 saat sonra yaraya sızıp, inflamatuvar fazın sonuna dek ortamda varlığını sürdürürler [49]. Makrofajlar, yara iyileşmesinin en önemli fazları için gereklidir [38] ve yara alanındaki bakteriyel ajanların ve nekrotik dokunun uzaklaştırılmasında önemli rol oynarlar [50]. Fagositik faaliyetlerinin yanında, iyileşmenin inflamatuvar fazından proliferatif fazına geçişinde de rol alırlar. PDGF, TGF β , TGF- α (transforming growth factor alfa), IGF-1, PAF (platelet activating factor), TNF α , FGF, EGF, VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-1 ve IL-6 gibi birçok sitokin ve büyüme faktörünün salınımını gerçekleştirirler [51]. Böylelikle, keratinositlerin ve yeni doku matriksinin sentezini sağlayan fibroblastların çoğalmasını ve de anjiyogenezin gelişimini sağlarlar [51]. Makrofajlar hasarlı alanda baskın şekilde gözlemlendiğinde, iyileşme aşamalarındaki inflamatuvar sürecin sonlandığı ve proliferatif evreye geçiş

zamanının geldiği anlaşılır [52]. İnflamatuvar faz erken (1-2 gün) ve geç (3-4 gün) inflamatuvar faz olarak iki aşamada incelenir [53]. Erken fazda kompleman nötrofilleri aktif forma getirirken, geç fazda ise monositlerden makrofajlara dönüşüm gerçekleşir [54]. Erken fazda nötrofillerden TNF- α salınırken, geç fazda ise makrofajlardan TGF- β salınır [54, 55].

Proliferatif evre: Yaranın onarıldığı evredir [40]. Trombosit ile aktive olmuş makrofajlardan gelen PDGF ve TGF- β gibi mediatörler sayesinde, fibroblastlarla birlikte endotel hücrelerinin yara boşluklarına doğru kemotaksisi gerçekleşir [50]. Yara boşluklarını doldurmak için kılcal damar gelişimi, hücre dışı matriks üretimi ve granülasyon dokusu gelişimi olur [38, 47]. Bu dokuyu, oluşan fibrin ile fibroblastların göçü, yara kenarlarının reepitelizasyonu, neovaskülarizasyon ile anjiyogenezin gerçekleşmesi olayları sağlamaktadır [47, 56-60]. Eitelizasyon, yara kenarına yakın keratinositlerin ve endotel hücrelerinin çoğalması ile bu hücrelerin yara boşluklarına göç etmeleriyle gerçekleşir [50]. Reepitelizasyon süreci, keratinositler ile kıl köklerinden veya ter bezlerinden gelen epitel kök hücreleri tarafından sağlanır [47, 61-64]. Sonrasında, yeni keratinosit sırası, boşluğu doldurmak üzere yeni gelen epitel hücrelerinin üzerini sarar. Bu reepitelizasyon, yarayı enfeksiyondan ve kurumadan uzak tutmak için gereklidir [38]. Yara iyileşme süreci devam ederken ESM'deki yapılar da düzenlenmeye devam eder. İyileşen yaralar granülasyon dokusuyla kaplanır. Granülasyon dokusunda fibroblast, tip 3 kollajen, hiyaluronik asit, fibronektin, makrofajlar ve yeni oluşan damarlar bulunur. Vasküler endotelial growth faktör etkisiyle, yara alanına yakın sağlam venüllerden çoğalan endotelial hücreler bölgeye gelerek anjiogenezi gerçekleştirir [50]. Anjiogenezi yeni oluşan damarların filizlenmesini sağlar [38, 55]. Gelişen fibrin pıhtı ile geçici ekstrasellüler matriksi oluşur ve bol miktarda hiyaluronik asit ve fibronektin içerir. Ayrıca bu pıhtı, granülasyon dokusunda iskelet dokuyu geliştirir ve böylelikle migrasyon ve anjiogeneze yardım eder. Burada bulunan fibronektin, hücre göçünü artırmasının yanı sıra, fibroblastların ESM'ye bağlanmasını sağlar ve yara kontraksiyonunda görev alır. Hücre göçü ve proliferasyon gerçekleştiği sırada, fibroblastlar kollajen ve elastin gibi proteinleri de TGF- β , IGF, PDGF ve FGF etkisi ile sentezlerler [45]. Proliferasyon evresinin sonraki aşamalarında, makrofajların uyarması ile yara kenarından veya

kemik iliğinden gelen fibroblastların bazıları miyofibroblastlara dönüşürler. Erken dönemde yara kontraksiyonu miyofibroblastlarca sağlanır. Bu kontraksiyon ile yara bölgesi daraltılmış olur [65]. Yedinci günden sonra, MMP'lerin etkisi ile granülasyon dokusu çözünür ve miyofibroblastlar apoptoz ile ortadan kaldırılır [45].

Remodeling (matürasyon) evresi: Yara iyileşmesinin sekizinci gününde başlar ve yaranın durumuna göre yıllarca sürebilen, en uzun yara iyileşmesi aşamasıdır [38, 45]. Bu evrede; fibroblastlar, kollajen 3 ve fibronektin gibi ESM proteinleri ortama verilir [55, 66]. Ekstrasellüler matriks; kollajen I, kollajen III ve fibronektin dahil olmak üzere yara iyileşmesi için gerekli bileşenleri içerir [67]. Bu evre, geçici olarak ESM ile başlar, daha sonra tip 3 kollajen, yaranın gerilme kuvvetini artıran tip 1 kollajene dönüşür [38]. Bu evrede, kollajen lifleri arasındaki kovalent bağlar daha da pekişerek sağlamlaşır [45]. Yara yerindeki kollajen ve çapraz bağ miktarları, ek olarak sentez ve yıkım arasındaki denge yaranın gerilim kuvvetini meydana getirir. Yara gerilim kuvveti, matürasyon döneminde son haline ulaşır ancak normal dokudaki gerilim kuvvetinin %80'ini geçemez [45, 68].

Bu fazda keratinositlerden epidermisin olgunlaşması gerçekleşirken, vasküler endotel hücrelerinde apoptoz ve olgunlaşma devam eder. Miyofibroblastlar ise yaraya kontraksiyon sağlarken apoptoz ve matürasyonu da gerçekleştirir [54]. İlk günlerde pembe kırmızı renkte izlenen yara iyileşme dokusunun yerini matürasyon döneminde skar dokusu alır. Skar dokusu, soluk pembe ya da beyaz renktedir ve daha az hücre ile damarlanma içermektedir. Bu dokuda, inaktif fibroblastlar iğsi şekildedir ve hücrel metabolik aktivite azalmıştır [45].

2.2.3. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Beslenme, metabolik durumlar (diyabet hastalarındaki mikroangiopati gibi), dolaşım durumu (arterioskleroz, variköz venler gibi), glukokortikoidler, yaş, anemi, ilaçlar, malnütrisyon, obezite gibi faktörler yara iyileşmesini; sistemik olarak etkileyen faktörlerdir [69].

Kanlanma miktarı, denervasyon, lokal infeksiyon, yabancı cisim, hematoma,

mekanik stres, nekrotik doku, cerrahi teknikler, doku tipi faktörler ise yara iyileşmesini *lokal* olarak etkileyen faktörlerdir [69].

2.2.4. Yara İyileşmesinde Görevli Büyüme Faktörleri, Kemokin ve Sitokinler

Yara iyileşmesinde birçok büyüme faktörü, kemokin ve sitokin rol oynar [70].

2.2.4.1. Yara İyileşmesinde Görevli Büyüme Faktörleri

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi, TGF- β ailesi, FGF ailesi ve VEGF yara iyileşmesinde etkileri bulunan başlıca büyüme faktörlerinin başında gelmektedir [71]. Bununla birlikte, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), PDGF, CTGF (connective tissue growth factor) ve TNF- α ailesi gibi büyüme faktörlerinin yara iyileşmesinde etkileri olduğu rapor edilmiştir [71]. Bu büyüme faktörleri, yaralanmanın bütün fazlarında ilgili bazı hücreleri uyararak yara dudaklarının kapanmasında fonksiyon görürler.

2.2.4.2. Yara İyileşmesinde Görevli Kemokinler

Kemokinler, yara iyileşmesi için gerekli uyarıları çeşitli hücrelere bildirip hücre göçünü sağlarken, doku anjiyogenezi, reepitelizasyonu, doku yeniden şekillenmesini (remodeling) sağlayarak farklı fonksiyonları da yerine getirirler [71, 72]. Kemokinler, endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, nötrofiller ve makrofajlar yara çevresindeki pek çok hücre tarafından salgılanırlar. Kemokinlerin yara iyileşmesinin farklı fazlarında farklı seviyelerdeki etkileri bildirilmiştir. CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 (IL-8), CXCL9, CXCL10, CXCL11 ve CXCL12 gibi kemokinlerin yara iyileşmesinde etkileri bulunmaktadır [73].

2.2.4.3. Yara İyileşmesinde Görevli Sitokinler

Yara iyileşmesi esnasında pek çok sitokin faaliyet göstermektedir. Bunlardan;

IL-1, yara çevresindeki hücreleri, hasara karşı uyaran ilk sinyaldir [71]. Güçlü bir proinflatuar sitokin [74, 75] olan IL-1'in IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki ligandı vardır ve her ikisi de IL-1R reseptörlerine bağlanır [75]. İyileşen dokuda, IL-1'in esas olarak epitel hücreleri tarafından üretildiği ve ekzojen olarak dokuya verildiğinde epidermal iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir [76, 77]. Bununla birlikte, zayıf iyileşen yaralarda IL-1'in aşırı ekspresyonu, bu sitokinin iyileşme sürecindeki olumlu rolüne şüphe düşürmüştür [78, 79]. Başka bir çalışmada, kurkumin maddesinin TNF- α ve IL-1 gibi proinflatuar sitokinlerin ekspresyonunu azaltmasıyla yara iyileşmesinde koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir [80, 81]. Çeşitli çalışmalarda, düşük sitokin ekspresyonu sergileyen farelerde yara iyileşmesinin arttığı ve yaralanma sonrası normal sitokin ekspresyonunun yara iyileşmesini azaltıcı etki gösterdiği bildirilmiştir [82]. IL-1, keratinosit aktivasyonunun en yaygın başlatıcısı olup aynı zamanda keratinositler için otokrin sinyal görevi görmektedir [83]. Dermal fibroblastlar için bir aktivatör olan IL-1, lenfositler için de bir kemoatraktandır. IL-1 ayrıca, keratinositlerin çoğalması, göç etmesi ve aktive olmasında da görevlidir [83]. IL-1 keratinositler üzerine proliferatif etki gösterir [84, 85]. IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi pro-inflatuar sitokinler hem akut yaralanmalarda hem kronik yaralanmalarda artar [70].

TNF- α , yara iyileşmesinin inflammatuar fazı sırasında eksprese edilen güçlü bir inflammatuar sitokin olmakla birlikte [86], yara iyileşme aşamalarında fibroblast ve keratinositlerin uyarımı, büyüme faktörlerinin ekspresyonu ve antimikrobiyal savunma gibi mekanizmalarda rol almaktadır [87, 88]. Yapılan çalışmalarda, inflammatuar hücreler tarafından salgılanan TNF- α 'nın, hem ESM sentezini inhibe ederek hem de matriks metalloproteinazlarını (MMP 1, MMP3 ve MMP 9) aktive ederek yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etkisi olduğu rapor edilmiştir [86, 89].

IL-2, pro-inflatuar ve otokrin bir sitokindir [90, 91] ve yardımcı T hücreleri, sitotoksik T lenfositler, makrofajlar ve keratinositler gibi yara iyileşmesinde rol oynayan birçok hücre tarafından salgılanır [92]. IL-2'nin yaralanma sonrasında epitel bütünlüğünün korunmasında görev aldığı düşünülmektedir [93]. Ayrıca yara iyileşme çalışmalarında IL-2'nin ESM sentezini desteklediği de bildirilmiştir [94].

IL-6, yara iyileşmesinin erken fazında faaliyet gösteren bir sitokindir [95]. IL-6; nötrofiller, monositler ve monositlerin makrofaja dönüşümü sonrasında makrofajlar tarafından üretilmektedir. IL-6'nın iyileşme yanıtını başlatmada önemli etkileri bulunmaktadır [71]. Yara iyileşmesi ile ilgili olarak, IL-6, hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar sitokin olarak hareket edebilen ve keratinositler üzerine mitojenik [96] ve proliferatif etki gösteren [97] bir kemoatraktandır [71, 84]. Yaralanma sonrasında, IL-6'nın ekspresyonu artmakla birlikte eski yaralarda kalıcı seyir gösterebilmektedir [71].

IL-8 (CXCL8), CXC ailesinin bir üyesi olup sitokin olarak isimlendirilen tek kemokindir [71, 72, 98]. Yapılan çalışmalarda, akut yaralarda ekspresyonunun arttığı [99] ve keratinosit migrasyon ve proliferasyonunu da artırarak reepitelizasyonda görev aldığı bildirilmiştir [71, 100, 101]. IL-8, lökositlerde MMP'lerin ekspresyonunu indüklemekte ve böylelikle doku yeniden şekillenmesini sağlamaktadır [71, 99]. IL-8, nötrofiller için güçlü bir kemoatraktan olması nedeniyle inflammatuar yanıtı da katılmaktadır [71, 102]. Yapılan çalışmalarda, bu kemokinin iyileşmeyen yaralarda yüksek seviyelerde bulunduğu rapor edilmiştir [71]. Bununla birlikte, IL-8'in yüksek seviyelerinin, keratinosit proliferasyonu ve fibroblast aracılı kollajen kontraksiyonunu azalttığı da gösterilmiştir [71, 103].

IFN-gama, yara iyileşme sürecinde iki önemli adım olan anjiyogenez ve kollajen birikiminde potansiyel rolü bulunan bir sitokindir [104]. IFN-gama'nın fibroblastların kasılma kapasitesini artırdığı [105] ve makrofaj aktivitesini uyardığı bildirilmektedir [106]. Bu sitokin, pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu indükleyerek [106] ve epitelyal restorasyonu sağlayarak yara iyileşmesini artırmaktadır [107].

Yara iyileşmesinde pro-inflamatuar sitokinler kadar anti inflammatuar sitokinler de önemli rol oynar (Tablo: 2.1).

IL-4, yara iyileşme sürecinde erken fibroblast proliferasyonunu uyarak ve sonrasında sitokin ekspresyonunu azaltarak faaliyet göstermektedir [108]. Ayrıca IL-4'ün, epitel yara onarımını desteklediği, sitokin kaynaklı epitelyal bariyer kusurlarını

azalttığı ve anti-inflamatuar yetenek sergilediği gösterilmiştir [109]. IL-4, kollajen ile ESM makromoleküllerinin sentezini, fibroblast kemotaksisini ve proliferasyonunu artırırken miyofibroblastların farklılaşmasına da katılmaktadır [110]. Ayrıca, tip I kollajen ve TGF- β gibi profibrotik moleküllerin promotor aktivitesini ve transkripsiyonunu artırmak gibi işlevler de gerçekleştirmektedir [110].

IL-10, inflammatuar yanıtın sınırlandırılmasında ve skar oluşumunun önlenmesinde görevli önemli bir anti-inflamatuar sitokindir [84]. IL-10'un aşırı ekspresyonu sayesinde doğum sonrası yaralarda skarsız yara iyileşmesinin sağlandığı bildirilmiştir [111]. Bir çalışmada, IL-10'un aşırı ekspresyonunun, proinflammatuar ve profibrotik mediatörlerin ekspresyonunu azaltarak yara iyileşmesini etkilediği ve inflammatuar hücrelerin yaraya geçişini azalttığı tespit edilmiştir [112]. Yara onarımında miyofibroblastların dönüşümlerini engelleyerek fibrozisi azalttığına dair yayınlar da bulunmaktadır [113]. Güçlü anti-fibrotik etkileri bulunan ve birçok hastalıkta etkileri gösterilmiş olan IL-10'un fibroblastlarda STAT3 sinyal yolu ile hyaluronan metabolizmasını etkileyerek yara onarımında rol oynadığı bildirilmiştir [114].

Tablo 2.1. Pro-İnflamatuar ve Anti-inflamatuar Sitokinler

Pro-İnflamatuar Sitokinler	Anti-İnflamatuar Sitokinler
IL-1	IL-6
TNF- α	IL-4
IL-2	IL-10
IL-6	
IL-8	
IFN-gama	

2.2.5. Yara İyileşmesinde Ekstrasellüler Matriksin Rolü ve Proteinleri

Dermisin önemli bir kısmını oluşturan ESM, hücrelere ve dokulara yapı, organizasyon ve yönlendirme sağlamaktadır. Ayrıca, hücre göçü, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma ve yapışma (adezyon) için bir şablon olarak hareket etmenin yanı sıra morfogenezi ve hücrel metabolizmayı kontrol etme gibi fonksiyonları da vardır.

Ekstrasellüler matriks, integrinlere ve diğer hücre yüzeyi reseptörlerine doğrudan bağlanarak hücre aktivitesini ve fonksiyonunu düzenlemesinin yanı sıra, büyüme faktörleri için bir rezervuar görevi görür ve biyoyararlanımlarını düzenler [115]. Ekstrasellüler matriks; esas madde (amorf kısım), bağ dokusu lifleri (fibröz kısım) ve doku sıvısından oluşur [1]. Bunlardan esas madde, glikozaminoglikanlar (GAG'lar), proteoglikanlar ve çoklu yapışkan glikoproteinlerden oluşur. Esas maddenin su içeriği yüksektir. Rutin histolojik takip sırasında eridiğinden ışık mikroskopik olarak gösterilememektedir. İçerdiği glikojenden dolayı ise PAS (+) boyanır. Ayrıca PAS metodu ile boyanmış ya da frozen kesitlerde amorf bir madde halinde gözlemlenir [1, 116].

Glikozaminoglikanlar (asit mukopolisakkaridler, GAG'lar) ise; ara maddede en fazla bulunan heteropolisakkarit komponentidir. Her molekülü hidrofiliktir, suyu çeker ve hidrate bir jel oluşturur. Ayrıca bu jel yapı suda çözünen moleküllerin kolay difüzyonuna da olanak sağlamakta ve içinden besin maddeleri ve metabolitler geçmektedir. PAS (+)'tir ve açık bazofilik boyanır. GAG'lar, sülfatsız GAG'lar ve sülfatlı GAG'lar olmak üzere 2'ye ayrılır. Sülfatsız GAG'lar hiyaluronik asit (hyaluronan)'den oluşurken sülfatlı GAG'lar; dermatan sülfat, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve heparinden oluşmaktadır. Heparin hariç diğer GAG'lar fibroblastlardan salgılanırken heparin mast hücrelerinden salınmaktadır [1, 116].

Proteoglikanlar, GAG'ların merkezi proteinlere kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşur. GAG'lar merkezi proteine fırça şeklinde yapı oluşturacak şekilde dikey olarak bağlanırlar. Bağlanan GAG sayısı, 1 (dekorin) ile 200'den fazla GAG arasında değişir (agrekan). Çoklu yapışkan glikoproteinler, ekstrasellüler matriksi stabilize etmede ve hücre yüzeylerine bağlanmada önemli rol oynarlar. Fibronektin, kondronektin, osteonektin, laminin, entaktin, trombospondin, tenasin ve osteopontin glikoproteinlerdendir [1, 116].

Çalışmamızda sonuçlarını değerlendirdiğimiz; fibronektinin 2 formu bulunmaktadır. Bunlardan plazma fibronektini, hepatositler tarafından üretilip kanda çözünebilir halde bulunurken, hücre ya da doku fibronektini olan formu ise endotel hücreleri, keratinositler, fibroblastlar gibi çeşitli hücreler tarafından salınır. Plazma

fibronektini, trombosit ve fibrinin bağlandığı yer olması ile yara iyileşmesinin erken fazında önemliyken, daha sonra oluşan ve granülasyon evresinde önemli form olan ise hücresel fibronektindir. Fibronektin, yara iyileşmesini destekleyen heparin sülfat, hiyalüronik asit gibi glikozaminoglikanlara diğer ESM proteinlerinden kollajen 1 ve elastine bağlanarak yarada iskelet görevi yapar. Yara iyileşmesinin bütün fazlarına katkısı vardır [117]. Fibronektin, ESM'deki integrin reseptörlerine bağlanarak hücre iskeletinin düzenlenmesini sağlayan, hücre hareketini kolaylaştıran ve hücreleri kollajen lifleriyle birleştiren bir glikoproteindir [118].

Ekstrasellüler matriksin fibröz kısmındaki bağ dokusu liflerini, fibroblastlarda salgılanan proteinlerden kaynaklanan kollajen lifler, retiküler lifler ve elastik lifler oluşturur. Kollajen ve retiküler lifler, tropokollajenden yapılır. Uzun, düz ve beyaz renkli yapıda olan kollajen, gerilme ve çekilmelere karşı oldukça dayanıklı olup kıkırdak ve kemik dokusunda bulunur. Bu lifler, bağ dokusunda fibroblastlar, kıkırdak dokusunda kondroblastlar, kemik dokusunda osteoblastlar ve dişte odontoblastlar tarafından sentezlenirler. Kaynatıldığında eriyerek yapışkan bir madde olan jelatine dönüşürler. Kollajenin, Tip I kollajen, Tip II kollajen, Tip III kollajen, Tip IV kollajen ve Tip V kollajen gibi pek çok tipi bulunmaktadır [1, 4, 119, 120].

Çalışmamızda sonuçlarını değerlendirdiğimiz; kollajen, ESM'nin önemli bir bileşenidir ve vücut proteininin 1/3'ünü oluşturan ve insanda en bol bulunan proteindir [121]. Yara tedavisi çalışmalarında kollajenin bağışıklık hücrelerini ve fibroblastları uyardığı ve yara bölgesinde toplanmalarını sağladığı gösterilmiştir. Kollajen, doğal ESM yapısının korunmasını ve iyileşmesini destekleyen, cildin temel bir yapı taşıdır. Yara iyileşmesinin bütün fazlarında [121, 122], trombosit birikimi, inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, hücre kasılması, anjiyogenez ve yeniden epitelizasyon gibi çeşitli fonksiyonları yerine getirir [123]. Kollajen, yara iyileşmesinin fazlarının düzenlenmesinde ya fibriler ağların dönüşümlerinde ya da yara ortamında çözünür bileşenler halinde bulunmasıyla kritik rol oynar [122]. Bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulan açık yaralanma sonrasında lokal olarak gümüş nanopartikülleri uygulanmış ve kollajen rejenerasyonunu yüksek derecede artırarak yara iyileşmesini olumlu etkilediği bildirilmiştir [124]. Deri yaralarının tedavisinde, in vitro ve in vivo gerçekleştirilen deneysel cilt yarası modelleri kullanarak yapılan başka bir çalışmada

da deniz organizmalarından elde edilen kollajenin, iyileşmeyi uyarıcı yönde etki gösterdiği rapor edilmiştir [125] .

Retiküler lifler, Tip III kollajenden yapılmışlardır. 0.5-2 mikron çapında, ince yapıdadırlar. Bu lifler, özellikle dalak, kemik iliği ve lenf düğümü gibi lenforetiküler organların stromasında anastomozlaşarak ağ oluştururlar. Organ duvarlarındaki düz kaslar etrafında ve bazal membranlarda da bol miktarda bulunurlar. Yara iyileşmesi sırasında bağ dokusu bol miktarda retiküler lif ihtiva eder, daha sonra bunların yerini Tip I kollajen alır. Retiküler lifler, gümüş boyaları ile iyi boyandıkları için arjirofil lifler (gümüş seven lifler) olarak da isimlendirilirler. Elastik lifler ise elastan adı verilen bir proteinden yapılırlar. Ortada (elastin) amorf ve etrafı mikrofibril (fibrilin) yapısında bulunan iki kısımdan oluşurlar. En az bulunan lif tipi olmakla birlikte esnek yapıdadırlar. Bu lifler, epiglottis, kulak kepçesi gibi elastik kıkırdakta, elastik arterler, ses tellerinde, mide, mesane ve akciğerlerde bol bulunurlar. Bu liflerin çapları 1-4 mikron kadar olup sarımsı renkte gözükürler [1, 116].

Ekstrasellüler matriksin diğer bir komponenti olan doku sıvısı, amorf madde içinde bulunan bir sıvıdır. Bu sıvının içinde; besin maddeleri, hormonlar ve iyonlar gibi moleküller bulunur. Doku sıvısı, hücrelerin ve dokuların beslenmesine yardım eder. Dokuda oluşan metabolik artıkları ortamdan uzaklaştırır, devamlı olarak yenilenir ve burada bir artış olursa ödem gelişir [1, 116].

Ekstrasellüler matriksin majör yapıştırıcı proteini fibronektindir [2]. Ekstrasellüler matrikste en bol bulunan glikoprotein olmasıyla, ESM oluşumu ve agregasyonunda önemli görevler üstlenir [126]. Fibronektin, esas olarak ESM yapımında ve reepitelizasyonda görevli olmasının yanında tromboz ve embriyogenez aşamalarında da gereklidir [126].

Fibroblastlarda endoplazmik retikulumda (ER) preprokollajen adı verilen öncü protein prokürsörü sentezlenir [127]. Endoplazmik retikulumdaki preprokollajenden sinyal peptidinin çıkarılması sonrasında kalan proteine prokollajen (tropokollajen) denilmektedir. Prokollajen üzerindeki modifikasyonlar, hidroksilasyon ve karbonhidrat ilaveleri ile gerçekleştirilir [127, 128]. Glikolizasyonlar, golgi kompleksi

sayesinde meydana gelmektedir. Endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinde 3'lü sarmal yapı oluşturulur ve kollajen proteinin işleminin tamamlanmasının ardından, prokollajen proteinleri hücre dışı boşluğa verilir [128, 129]. Hücre dışı bölmede prokollajen proteininde oksidasyon gibi çeşitli reaksiyonlar meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucunda çeşitli kollajen tipleri ortaya çıkar [129].

Ekstrasellüler matriksin diğer molekülleri gibi elastik liflerin oluşumunda da fibroblastlar görev alır. Elastik lif, elastin ve mikrofibrillerden meydana gelir [130]. Elastin esneme özelliğine sahip benzersiz bir molekül olan tropoelastin olarak salgılandıktan sonra hücre dışı alanda işlenir ve çapraz bağlanmalar kurularak stabilize edilir [130-132]. Elastik lifi oluşturan diğer yapı olan mikrofibriller ise, büyük bir glikoprotein olan fibrillinlerden oluşan lifli bir ağ yapısındadır. Diğer ESM molekülleri, fibrilline bağlanarak mikrofibrillerle birleşebilir [131].

2.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Protokolleri

Güncel olarak uygulanan tedavilerden, ciddi yanık yaraları gibi derin yaralarda antimikrobiyal merhemler ile opioidler topikal olarak uygulanırken [133], yüzeysel tarzda gelişen emziren annelerdeki göğüs ucu yaralarında, gümüş içerikli kalkanlar popülerdir [134, 135].

Son zamanlarda kullanımları yaygınlaşan lazer fototerapisi [136], trombositten zengin plazma (PRP) tedavisi [137], çeşitli yara örtü ürünleri [138-141], yağ otogrefti uygulaması [142, 143], geniş yüzeyli kronik ve zor iyileşen yaraların iyileşmesinde cilt oto ve allogreft uygulaması [144, 145], liposuction ve lipom eksizyonları sonrası yağın uzaklaştırılmasıyla ESM elde edilmesi [146] yöntemleri ile yıllardır kullanımda olan apiterapi [147, 148], bitki ekstraktı [149, 150] kullanımlarını içeren GETAT (Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp) uygulamaları gibi çeşitli yöntemler yara iyileşmesinde kullanılmakta olup yaranın ciddiyeti, oluş nedeni, şekli ve de yeri uygulanacak tedavilerin biçimini değiştirmektedir.

2.4. Adipokinler ve Yara İyileşmesi

Bir endokrin organ olarak kabul edilen adipoz dokudan [151], pek çok faktör salgılanmaktadır [152]. Bugüne kadar, çok çeşitli proteinlere ek olarak birçok yağ asidi ve prostaglandini de içine alan 100'ü aşkın molekülün yağ dokusu tarafından salgılandığı bildirilmiştir [153]. Adipoz dokuda, adipokinlerin adipogenezi, adipoz dokuya immün hücre göçü ve adiposit metabolizması gibi işlevlerin gerçekleştiği gösterilmiştir [152].

Adipokinler iştah ve tokluk, yağ dağılımı, insülin sekresyonu ve duyarlılığı, enerji harcaması, endotelial fonksiyon, inflamasyon, kan basıncı ve hemostazın düzenlenmesi gibi önemli lokal ve sistemik olaylarda rol almaktadırlar [152]. Bu kadar önemli işlevlerde görev alabilmeleri, her geçen gün artan yeni adipokinlerin araştırılmasının gerekliliğini ortaya koymakla birlikte keşfedilen birçok adipokinin işlevi, moleküler hedefleri ve potansiyel klinik önemleri ise hala bilinmemektedir.

Obez hastalarda yağ dokusunun fazla olması, üretilen adipokin miktarlarını nasıl değiştirebileceği, bu hastalığın tedavisinde adipokinlerin nasıl rol alabileceği bilimsel araştırmalar açısından her zaman merak uyandırmaktadır [154].

Adipoz doku, organizmada pek çok yerde ve genellikle subkutan olarak bulunmaktadır. Kutanöz yaraların, altındaki adipoz doku ile olan yakın komşuluğu, adipoz dokunun yara iyileşmesine katkı sağlayabileceğini düşündürür. Nitekim yapılan bilimsel araştırmalar da bunu destekler biçimdedir. Adipoz doku otogreftleri, liposuction veya lipom eksizyonları sonrası yağın uzaklaştırılması yöntemiyle ESM tabakalarının elde edilmesi gibi metotlarla yağın yara iyileşmesindeki etkileri bildirilmiştir [146, 155].

Leptin hormonunun TNF- α , MCP-1 ve IL-6'yı artırdığı bildirilmiş ve keratinosit hücre göçünü artırması yoluyla yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri birçok yerde gösterilmiştir [156-160]. Visfatin'in ERK1/2 ve JNK1/2 yolu aktivasyonu ile yara iyileşmesini olumlu etkilediği bildirilmiştir [161]. Adiponektinin keratinosit proliferasyonu ve ERK sinyal yoluyla keratinosit migrasyonunu teşvik

ettiği bulunmuştur [162]. Ayrıca yapılan bir çalışmada, OCCM-30 (sementoblast) hücre hattında, hücrelere adiponektin uygulanmış ve 24 saatte artmış mitojenik aktivite ve yara alanının büyük ölçüde kapandığı izlenmiştir [163]. Progranülin adipokini, ERK1/3 ve PI3K bağımlı yollar aracılığıyla yaralı dokuda artmış mitoz ve hücre göçünü sağlayarak ve de Akt MAPK yollarının aktivasyonu yoluyla etki etmektedir [164, 165]. İn vivo ve in vitro deneylerin birlikte yapıldığı bir çalışmada, yeni tanımlanan başka bir adipokin olan chemerinin, hem deneysel hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda otofajinin aktivasyonunu sağladığı hem de insan aort düz kas hücrelerinin göç ve çoğalmasını artırarak yara iyileşmesinde etkili olduğu rapor edilmiştir [166].

Adipokinlerden leptin, visfatin, adiponektin, progranülin ve chemerin'in yara iyileşmesindeki etkileri daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiş olup bu konudaki araştırmalar yeni adipokinlerin bulunmasıyla devam edecektir [161, 166-168].

2.5. Oreksijenik ve Anoreksijenik Peptitler ve Yara İyileşmesi

Hipotalamusta, besin alımını teşvik edici yönde iştahı açan uyarılar (nörotransmitter, hormon, nöronal ve kimyasal sinyaller vs) oreksijenik madde, tersi yönde etki gösterenler ise anoreksijenik madde olarak nitelendirilmektedir (Tablo 2.2).

Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde, beyinde bulunan bazı merkezler ve nöropeptit aracılı sinyal yolları görev alırlar. İştahı etkileyen, tokluk merkezi ve açlık merkezi olarak isimlendirilen en önemli sinirsel merkezler hipotalamusta bulunur. Tokluk merkezi, hipotalamusun ventromedial hipotalamus (VMH, ventromedial nükleus) bölgesinde yer alırken, açlık merkezi ise lateral hipotalamus (LH, lateral nükleus) bölgesinde bulunmaktadır. Diğer paraventriküler ve dorsomedial nükleusların lezyonlarında da yeme bozuklukları gözlenmektedir. Hipotalamusta bulunan diğer bir nükleus olan arcuat nucleus, gastrointestinal ve adipoz doku kaynaklı hormonların bağlanacağı bölgeyi oluşturur [169]. Hipotalamusun arkuat çekirdeği iştahın düzenlenmesinde önemli bir bölgedir [170]. Bu bölge kan beyin bariyeri ile tam olarak çevrelenmemiştir. Bu sayede çevresel birçok sinyalin iletimi sağlanmaktadır. Arkuat çekirdek 2 nöron grubu tarafından bir denge halinde

düzenlenmektedir. Bu nöron gruplarından arkuat çekirdeğin daha medialinde lokalize olan nöron grubu iştahın artırılmasında görevlidirler ve NPY (nöropeptid Y) ve AgRP (agouti related protein) birlikte eksprese ederler. Daha lateralde lokalize olan nöron grubu ise, iştahın azaltılmasında görevlidir ve CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) ve POMC (pro-opiomelanokortini) birlikte eksprese ederler. Bu iki nöron grubu daha sonra PVN, DMN ve LHA gibi iştah düzenlemesinde yer alan diğer hipotalamik alanlarla iletişim halinde bulunurlar. Böylelikle oluşan nöronal devre ağı, leptin ve insülin gibi çevresel sinyallerle de uyarlanabilmektedir [171].

Besin alımını düzenleyen peptidler, kaynaklandığı bölgeye göre, merkezi sinir sisteminde sentezlenen peptidler (α -MSH, NPY, AGRP vs) ve sindirim kanalında sentezlenen periferik peptidler (CCK, GLP 1, Ghrelin vs) olarak sınıflandırılır [170].

Oreksijenik ve anoreksijenik hormonların yara iyileşmesindeki etkilerinin son zamanlardaki araştırmalarda daha çok araştırılmasından ötürü, bu konuda gelecekte daha kapsamlı çalışmalarla karşılaşmamız muhtemeldir.

Tablo 2.2. Oreksijenik ve Anoreksijenik Peptitler

Oreksijenik Peptitler	Anoreksijenik Peptitler
Asprosin	Leptin
NPY	Bombesin
Galanin	Serotonin
Ghrelin	Nesfatin 1
AgRP	GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1)
MCH (Melanin Concentrating Hormone)	CCK (Cholecystokinin)
Oreksin	α MSH (Melanocyte Stimulating Hormone)

2.5.1. Oreksijenik Nöropeptiler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Oreksijenik nörotransmitterlerden, NPY birçok sistemi birden etkileyebilen fizyolojik ve patofizyolojik sürecin düzenlenmesine katkı sağlayan bir nöropeptittir [172]. NPY'nin çeşitli tipleri üzerine yapılan çalışmalarında, NPY 2'nin yara

iyileşmesine azalmış neovaskülarizasyon ile olumsuz yönde etki gösterdiği ve NPY 1, 4 ve 5'in ise anjiyogenez esnasında ortama verildiği böylelikle doku onarımının düzenlenmesinde önemli bir rol alabilecekleri bildirilmiştir [173].

Galanin, nöronal ve nöronal olmayan birçok etkileri bulunan 30 yıllık geçmişe sahip bir sinyal peptididir [174]. Yapılan bir araştırmada galaninin yara iyileşmesi üzerindeki etkisi ratlarda araştırılmış ve aşıl tendonunda oluşturulan rüptürde yeni lif oluşumu ve azalmış nosisepsiyon (ağrı) gösterilerek galaninin etkileri olduğu rapor edilmiştir [175].

Ghrelın, oreksijenik nörotransmitterlerden biridir ve mideden salgılanır. Büyüme hormonunu salgılama, insülin sekresyonunu inhibe etme, glukoneogenezi düzenleme ve de termojenezi azaltma gibi pek çok işlevi gerçekleştiren peptit bir hormondur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ghrelın'ın yara tedavilerinde birçok yönden olumlu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. ghrelın, hücre canlılığını ve hidroksiprolin seviyelerini artırarak yara etrafındaki adezyonu sağlar, ayrıca kollajen birikimini ve neovaskülarizasyonu da artırır. İlâveten, IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri inhibe etme, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırma gibi etkileri de mevcuttur [176-179].

Ratlarda ve in vitro olarak CCD-18Co hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, MCH'nin IGF-1 ve TGF- β 'nın proliferasyonunu ve kollajen üretimini güçlendirerek profibrotik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bu durum, MCH'nin anti-inflamatuvar ve anti-fibrotik etkileri sayesinde miyofibroblastlar üzerinde doğrudan etkileri olabileceğini düşündürmüştür. Aynı çalışmada, MCH'nin dekstran sodyum sülfat tedavisi ile yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir [180].

2.5.2. Anoreksijenik Nöropeptitler ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Aynı zamanda bir adipokin olan leptin hormonunun anoreksijenik etkisi de mevcut olup, keratinositler üzerinde proinflamatuvar yanıtı düzenleyerek iyileştirici özellikler sergilediği belirtilmiştir [181].

Anoreksijenik nöropeptit olan bombesin, fizyolojik ve psikolojik işlevlerin gerçekleşmesinde; beslenme, öğrenme, hafıza, motivasyon, gastrointestinal sistem aktivitesi, tat modülasyonu gibi farklı fonksiyonlarda görev almaktadır [182]. Yara çizik deneyi yapılan bir çalışmada, bombesinin keratinositler üzerindeki etkisi araştırılmış ve Bombesin'in hücrelerin proliferasyonunu artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir [183].

Serotonin anoreksijenik nörotransmitterlerden olup, birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde yer almaktadır [184]. Öğrenme, hafıza, yaşlanma fizyolojisinde ve Alzheimer hastalığının gelişiminde serotonin hormonu sorumlu tutulmaktadır [184]. Yanık travmalarında, yaralanmanın ilk fazlarında doku serotonin konsantrasyonu önemli ölçüde artar. İn vitro ve in vivo olarak yapılan bir çalışmada, serotoninin, termal yaralanma sonrası keratinosit ve fibroblastların aktivitesi ile hücre göçünü artırarak iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir [185].

Nesfatin 1, literatüre yeni girmiş anoreksijenik bir peptittir ve besin alımının düzenlenmesinin yanında, su alımı, enerji homeostazının düzenlenmesi gibi rolleri mevcuttur [186]. Nesfatin 1'in, cerrahi yaraların neden olduğu oksidatif cilt hasarını nötrofil alımı, apoptoz ve VEGF aktivasyonunun baskılanması yoluyla iyileştirdiği gösterilmiştir [187].

Yapılan bir çalışmada, anoreksijenik nöropeptitlerden olan GLP-1'in, keratinositlere eklenmesiyle bu molekülün keratinosit proliferasyonunu düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu etkisine zıt yönde GLP-1'in, p42/44 MAPK'nın EGF ile indüklenen fosforilasyonunda azalmaya da neden olduğu bildirilmiştir [188].

Ratlardan alınan, duodenum ve midede oluşturulan sitotoksik hasar sonrasında CCK hormonu verilmiş ve iyileşme kinetiği, genetik veriler doğrultusunda bu hormonun etkisindeki duodenumda anlamlı seviyelerde bulunmuştur [189].

Bir çalışmada, güçlü anti-inflamatuar aktiviteye sahip anoreksijenik peptitlerden α MSH'in, cilt gibi diğer vücut bölgelerine yayıldığı belirtilmiştir. Aynı

çalışmada farelerde, yara oluşturulmadan önce intraperitoneal α MSH enjekte edilmiştir. Bu molekülün, yaralanma sonrasında lökosit, mast hücresi ve fibroblast sayısını azalttığı, daha ilerleyen günlerde ise kollajen liflerinin organizasyonunu iyileştirdiği ve skar alanını daralttığı bildirilmiştir [190].

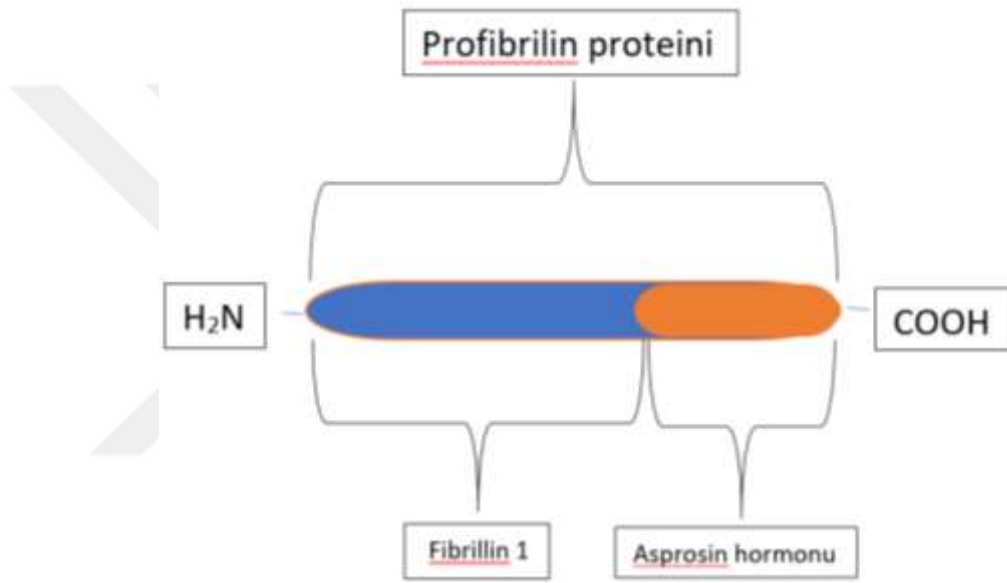
2.6. Asprosin Hormonu ve Genel Özellikleri

Asprosin hormonu, FBN 1 (Fibrillin 1) geni ile kodlanmış profibrillin proteinin C terminal bölünme ürünüdür (Şekil 2.4). Chopra ve arkadaşları asprosin adını, yağ dokusunun plazma asprosin kaynağı olması nedeniyle, Yunanca beyaz kelimesinden esinlenerek 2016 yılında vermişlerdir [191, 192]. Asprosin hormonu, yeni doğan progeroid sendromlu hastalarda deri altı beyaz yağ dokusundaki azalma ve bu hormonun yokluğu neticesinde keşfedilmiştir. Yeni doğan progeroid sendromu, kendilerine has fenotipik görünümüleriyle fark edilen, hipofaji görülen nadir bir genetik bozukluktur. Bu hastalarda Laminin A (LMNA) geninde, de novo nokta mutasyonlar saptanmıştır [193]. Bu hastalarda hem lipodistrofi gözlenmesine, hem de FBN 1 genindeki mutasyona bağlı olarak asprosin hormonunun bulunmaması gözlenmektedir [194].

Asprosin hormonu oreksijenik etkisini, kan beyin bariyerini geçerek cAMP bağımlı yolakla AgRP⁺ nöronlarını uyararak ve POMC⁺ (Proopiomelanocortin) nöronlarının %85'ini inhibe ederek sağlamaktadır [191, 192]. Adipoz dokudan salgılanan asprosin hormonu, dolaşıma geçerek ve karaciğere gelerek burada G proteini aracılı cAMP PKA yolağını aktive eder ve kana glikoz salınımı gerçekleşir. Artan glikoz seviyeleri; pankreasın β hücrelerinden insülin salınmasına neden olmaktadır [191, 192]. Açlık durumunda, dolaşımdaki asprosin hormonu yükselir ve beslenme sonrasında akut bir şekilde düşüş gösterir [191].

Asprosin hormonu ile yapılan çalışmalarda ve tekrarlanan laboratuvar deneylerinde asprosin hormonunun inflamasyon üzerine olan etkisi araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir [195]. Asprosinin inflamasyondaki rollerini araştıran çalışmalarda; çizgili kaslarda, merkezi sinir sisteminde, pankreas ve karaciğerde birbirinden farklı sonuçlar elde edilmesi, asprosinin farklı organlarda farklı etki

gösterebileceğini düşündürmüştür [195]. Örneğin, bir çalışmada asprosin düzeyleri metabolik ilişkili hastalıkları olan kişilerle karşılaştırılmış ve kardiyovasküler hastalıklarda, asprosin hormonunun özellikle kardiyomiyositleri apoptoz yoluyla ve ROS oluşumunu önleyerek koruyucu etkilerinin olabileceği rapor edilmiştir [195]. Polikistik overli hastalarda asprosin düzeyleri bazı çalışmalarda yüksek bulunmakla birlikte [196, 197], bazı çalışmalarda sağlıklı gruplarla aralarında anlamlı fark tespit edilmemiştir [198]. Bu birçok organı etkileyen asprosin hormonunun, diğer sistemler üzerindeki etkileri de gelecekteki araştırmalarla gün yüzüne çıkacaktır.



Şekil 2.4. Asprosin hormonunun genetik formu

Asprosin hormonunun yağ dokusundan salınmasına açlık ve iştah durumları neden olmaktadır. Asprosin hormonu yağ dokusundan sentezlendikten sonra seruma geçerek beyini iştah artırıcı yönde etkiler. Bu etkisine ilave olarak, yağ dokusundan sentezlendikten sonra, karaciğerde yeni bulunan özel reseptörüne (OLFR734) bağlanır ve cAMP-PKA bağımlı yolak sayesinde glikoz kana salıverilir. Artan glikoz seviyeleri de pankreasın β hüclerinden insülin hormonunun salınmasını indükler. Asprosin hormonunun bloke edilmesiyle, hem iştahın azaltılması, hem de kana glikoz geçişinin önlenmesi gerçekleşir. Böylelikle, pankreastan salınan insülin dolaylı olarak azalır. Asprosin hormonunun bu etkileri, diyabetli hastalar için umut kaynağı olarak öngörülmektedir [191, 199].

Donma ve ark.'ları, asprosin hormonunun, oreksijenik etki gösteren ghrelin hormonuna benzer şekilde inflamasyonu azaltarak etki göstereceğini öngörmüşlerdir [179]. Taeseung ve ark.'ları ise yaptıkları çalışmada, asprosin hormonunun, pankreas β hücrelerinde palmitatla indüklenmesi sonucu TLR4/JNK yolağını aktiveştirerek bu hücrelerde inflamasyon ve disfonksiyona neden olduğunu, böylelikle de inflamasyonu artırdığını rapor etmişlerdir [200].

Biz de tez çalışmamızda, önemli bir sağlık sorunu olan kutanöz yaraların tedavisinde yeni terapotik tedavi yöntemlerinin bulunması ümidiyle, yeni keşfedilmiş ve pek çok sistemi etkilediği bildirilmiş bir adipokin olan asprosin hormonunun, yara iyileşmesi üzerindeki olası etkisini HDF fibroblast hücre hattında immünohistokimyasal ve moleküler olarak araştırmayı amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

“Asprosin Hormonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin İn Vitro Olarak Araştırılması” adlı Tıpta Uzmanlık Tez çalışmasının etik kurallara uygun olduğuna, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun, 26.09.2019 tarihli 6. toplantısının B.30.2.ATA.0.001.00/44 sayılı, 31 no’lu kararı ile onay verilmiştir.

Bu çalışma, Temel Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığının 13.05.2019 tarih ve 6 no’lu kararı ile tez çalışması olarak onaylanmıştır. Ayrıca, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü tarafından TTU-2020-7526 protokol no’lu bilimsel araştırma projeleri kapsamında sağlanan finansal destekle yürütülmüştür.

3.2. Malzemeler ve Ekipmanlar

3.2.1. Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızda aşağıdaki kimyasal malzemeler kullanıldı:

- 1) Fetal Bovine Serum (South America)(FBS), Heat Inactivated – 500 ml BIOWEST®
- 2) Dmem high glucose w/o l- glutamine w/ sodium pyruvate 500 ml BIOWEST®
- 3) Thiazolyl blue tetrazolium bromide 98% 1 gr ROTH®
- 4) Hank’s Balanced Salt solution (HBSS) w/ calcium w/ magnesium w/ sodium bicarbonate w/ phen BIOWEST®
- 5) 25% trypsin-edta solution SIGMA®
- 6) Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Stabilized 100 ml EUROCLONE®
- 7) Antibody dilüent 125 ml ABCAM®

- 8) Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit 150 test ABCAM®
- 9) Dimethyl sulfoxide ACS reagent 99.9% SIGMA®
- 10) DPBS, no calcium, no magnesium THERMO®
- 11) Etil alkol MERCK®
- 12) PAP Pen Super-Liquid Blocker Mini COSMO BIO®

3.2.2. Cam ve Plastik Malzemeler

- 1) Tube, 15 ml, pp, 17/120 mm, conical bottom, cellstar®, blu greiner
- 2) Tube, 50 ml, pp, 30/115 mm, conical bottom, cellstar® pk\50 greiner
- 3) Pipet ucu 10 ul /20 ul eppendorf uzun 1000 lik tarsons
- 4) Pipet ucu - şeffaf - 200 ul - paket 1000 adet / paket ISOLAB
- 5) Pipet ucu - şeffaf - 1000 ul - paket 1000 adet / paket ISOLAB
- 6) Cryo tüp 2 ml dıştan vidalı ayaklı 50/pk BIOSİGMA
- 7) Cover Glass (yuvarlak lamel, 10 mm) SUPERIOR®
- 8) Petri Kutusu 100x20 mm 18/Pk ISOLAB
- 9) 96 kuyucuklu plate CORNING® COSTAR®
- 10) 24 kuyucuklu plate CORNING® COSTAR®
- 11) 6 kuyucuklu plate CORNING® COSTAR®
- 12) 75 cm² Flask CORNING® COSTAR®
- 13) 25 cm² Flask CORNING® COSTAR®

3.2.3. Antikorlar

- 1) IL-1 alfa Antibody (B-7) SANTACRUZ®
- 2) IL-10 Antibody (E-10) SANTACRUZ®
- 3) Fibronectin Antibody (EP5) SANTACRUZ®
- 4) COL1A Antibody (COL-1) SANTACRUZ®

3.2.4. PCR kitleri

- 1) Mnreasy mini kit for 50 preps QIAGEN®

- 2) HotStarTaq DNA Polymerase (250 U) QIAGEN®
- 3) IL-1 Alfa 50 reak. THERMO®
- 4) IL-10 50 reak. THERMO®
- 5) Fibronectin 50 reak. THERMO®
- 6) Collagene 1 50 reak. THERMO®
- 7) Master Mix QIAGEN®
- 8) İnternal control gene GADPH primer prob THERMO®

3.2.5. Hücre Hattı

- 1) HDF (ATCC® PCS-201-012™) Human Dermal Fibroblast

3.2.6. Asprosin Hormonu

- 1) Recombinant Human Asprosin (carrier-free) 10 µg BIOLEGEND®

3.3. Yöntem

3.3.1. Hücre Kültürü Prosedürü

3.3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Medyumunun Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılmak üzere, 50 cc DMEM besiyerini hazırlamak için; 5 ml FBS (% 10 FBS), 500 µl antibiyotik-antimikotik solüsyon (100 µl/ml) ve 45 ml DMEM karıştırılarak full medyum elde edildi.

3.3.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

Nitrojen içinde -196°C’de bulunan hücreler, çözündürmek üzere 37°C’deki su banyosuna alındı. Çözünen hücreler, 15 ml’lik falkon tüpüne konuldu ve üzerine 2 ml full medyumdan eklenerek 5 dakika 1200 rpm de santrifüj edildi, santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine 2 ml full medyumdan konularak pipetaj yapıp medyum miktarı flaska göre artırılarak pipet yardımıyla 25’lik flasklara ekim yapıldı.

3.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Yukarıda anlatıldığı şekilde ekimi yapılan hücreler, 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde 2-3 gün inkübe edildikten sonra flask içindeki hücrelerin konfluent değeri değerlendirildi. Hücreler yaklaşık %80 konflüente ulaştıklarında, flask içindeki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler 3 ml HBSS (Hank's Balanced Salt solution) ile 3 kez yıkandı. Son yıkamanın ardından, flaskın içine 2 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 3-5 dakika kadar inkübatörde bekletilerek hücrelerin flaskın tabanından ayrılması sağlandı. İnvert mikroskop altında hücrelerin tabandan ayrıldığı kontrol edildi ve ayrılan hücreler, tripsin-EDTA solüsyonu ile birlikte 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Flask içinde kalan hücrelerin üzerine 2 ml full medyum ilave edilerek tripsin inaktive edildi ve aktarılamayan hücreler 15 ml'lik falkon tüpündeki ilk kaldırılan hücrelerin üzerine nakledildi. 5 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilerek tüpün dip kısmında hücre pelleti oluşması sağlandı. Oluşan pellet dikkatli bir şekilde alınıp üzerindeki süpernatant atıldı. Dipte kalan hücrelere 15 ml full medyum eklendi ve 75'lik flaslara ekilerek pasajlama yapıldı.

3.3.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere aşağıdaki işlemlere tabi tutularak donduruldu. Pasajlama prosedüründe olduğu gibi, hücreler, tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldıktan sonra 15'lik falkon tüpüne alındı ve 5 dakika 1200 rpm de santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atılarak, pellet üzerine, dondurulacak her bir dondurma tüpü için 1 cc full medyum eklendi ve pipetaj yapıldı. Sonra hücre süspansiyonundan 1 ml alınarak dondurma tüpüne bırakıldı. Ardından 800 µl full medyum ve 200 µl DMSO üzerine eklendi. Tüpler -20°C de 1 saat bekletildikten sonra -80°C'de derin dondurucuya alındı. Sonrasında -196°C de sıvı azot içerisinde muhafaza edildi.

3.3.2. Uygulanan Asprosin Dozlarının Belirlenmesi ile Asprosin Stok ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

Adipokinlerin hücre kültürü çalışmalarında bilhassa yara iyileşmesi araştırmalarında; yara çizik deneyi, hücre viabilite testleri ile hücre göçü analizlerinde kullanılan dozlar incelendi ve daha önceden yaptığımız ön çalışmalar sonucunda asprosin hormonunun 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozları belirlendi [201-205].

Sıvı halde ve 10 µg'lık ambalajda bulunan asprosin hormonu, çalışmamızda kullanılmak üzere -20°C'den çıkarılarak çözöldü. Deneyimizin gerçekleşmesi için asprosin hormonu stok solüsyonu, aşağıdaki şekilde hazırlandı:

10 µg (50 µl) asprosin alındı ve 950 µl DMEM içinde çözöndüröldü. Böylece, toplam 1000 µl %5'lik başlangıç solüsyonu elde edildi.

1 cc başlangıç solüsyonu üzerine 9 cc DMEM eklendi ve %0.5'lik 10 cc stok solüsyonu (1000 ng/ml) elde edildi. Hazırlanan stok solüsyonu alikodlanarak -20°C'de saklandı.

Belirlenen dozlarda asprosin solüsyonları aşağıda belirttiğı şekilde hazırlandı:

200 µl stok solüsyonu + 800 µl DMEM = 200 ng/ml dozu

150 µl stok solüsyonu + 850 µl DMEM = 150 ng/ml dozu

100 µl stok solüsyonu + 900 µl DMEM = 100 ng/ml dozu

50 µl stok solüsyonu + 950 µl DMEM = 50 ng/ml dozu

3.3.3. Hücre Proliferasyon Analizi (MTT Testi)

Çeşitli tetrazolyum tuzları ve bunların formazan ürünleri, histokimyada ve hücre canlılığının tespitinde önemli rol oynamaktadır [206]. Bu analiz, hücre canlılığını; ER gibi organellerde bulunan indirgeyici madde ve enzimlerle, sarı renkli tetrazolyum bileşimini, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki

dehidrojenazlar ile suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgenmesiyle kolorimetrik olarak ölçer [206-209].

Bileşiklerin metabolik aktivitesi absorbans değerini etkilemektedir. Uygulanan terapötik ajanın, hücrelerdeki proliferasyon ya da sitotoksiste üzerine etkilerinin değerlendirilmesi bu yöntemle sağlanabilmektedir.

Çalışma solüsyonu, MTT bileşiği firmanın verdiği talimatlar doğrultusunda, PBS solüsyonunda çözülerek, 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Tozun PBS solüsyonuyla çözünmesiyle sarı yeşil renkli solüsyon elde edildi. Elde ettiğimiz solüsyon 5 ml'lik ependorf tüplerine alındı ve alüminyum folyo ile ışık geçirmeyecek şekilde sarıldı. Sonrasında, kullanılmayan hazırlanmış çalışma solüsyonları alikodlanarak buzdolabında -20°C'de saklandı.

Her bir 96 kuyucuklu plate'e, asprosinin belirlenen konsantrasyonları, 5×10^3 hücre olacak şekilde eşit miktardaki hücreler üzerine uygulandı. 24 saat inkübe edildikten sonra MTT analiz yöntemi ile hücre viabilitesi değerlendirildi.

Asprosin hormonunun viabilite değerlendirilmesi yapılırken MTT testi kullanarak aşağıdaki basamaklar izlendi:

- 1) 96 Kuyucuklu Plate'lerdeki kuyucuklara 5000 hücre/100 µl hücre ekimi yapıldı.
- 2) Hücre ekiminin ardından 96 kuyucuklu plate'ler 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde konfluent olması beklendi.
- 3) Her bir kuyucuk konfluent olarak gözlendikten sonra yara çizik deneyi gerçekleştirildi.
- 4) Yara oluşturulmasının ardından belirlenen kuyucuklara 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında, asprosin hormonu eklendi.
- 5) Deney gruplarımızın süresi olan 24. ve 48. saatlerde, her bir kuyucuğa MTT testi uygulandı.
- 6) 96 kuyucuklu plate'in Mikro Quant spectrum cihazında 570 nm'de ölçümü yapıldı (Şekil 3.1).

- 7) Uygulanan doz ve % hücre viabilite ilişkisi ile ilgili elde edilen veriler, Microsoft Excel programı yardımı ile hesaplandı ve bu programda grafik haline getirilerek değerlendirildi.



Şekil 3.1. MTT testi sonrasında 96'lık plate'de meydana gelen renk değişimi

3.3.4. Yara İyileşme Testi

İn vitro ortamda bulunan hücreler çizildiklerinde hücreler arasındaki bağlantılar hasara uğrar. Oluşturulan bu hasar, hücre göçü değerlendirilmesinde etkin, ucuz, pratik ve birçok araştırmacı tarafından tercih edilen yaygın bir modeldir [210].

'In vitro scratch assay' tekniği olarak isimlendirilen bu yöntem, tek hücre tabakasında doğrusal ince bir çizik "yarası" (bir boşluk yaparak) oluşturmayı ve ardından düzenli zaman aralıklarında boşluğu dolduran hücrelerin görüntülerini yakalamayı içerir [211, 212]. Biz de çalışmamızda, asprosin hormonunun yara iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, HDF hücre hattında belirlediğimiz doz aralıklarında yara iyileştirme testini uyguladık. Testin yapılması için aşağıdaki basamakları izledik:

- 1) HDF hücreleri, 6 kuyucuklu plate'lerde her kuyucukta 300 000 hücre olacak şekilde ekildi.
- 2) Plate'ler, 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde konfluent oluşuncaya kadar bekletilerek hücrelerin yüzeye tutunmaları sağlandı.

- 3) Tek tabaka halindeki hücreler, üzerinde steril pipet ucu kullanılarak çizik oluşturuldu.
- 4) Kontrol gruplarına asprosin hormonu uygulaması yapılmadı.
- 5) Hemen ardından, diğer kuyucuklara 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında asprosin hormonu eklendi.
- 6) Hücreler ve oluşturulan çizik 0., 24. ve 48. saatlerde olmak üzere invert mikroskop (Nikon Eclipse TE200:Nikon, Tokyo, Japan) altında incelendi ve fotoğraflandı.
- 7) Çekilen fotoğraflar daha sonra Image-J software kullanılarak çizikin farklı zaman aralıklarındaki boyutlarını ölçmek için analiz edildi.

3.3.5. İmmünotokimyasal Prosedür

- 1) Cover glass camları, class II tip biyogüvenlik kabini içinde, ultraviyole ışık altında 3 saat süreyle steril edildikten sonra 24 kuyucuklu plate'lere yerleştirildi.
- 2) Fibroblast hücreleri, her kuyucukta 50 000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin ekiminin ardından full medyum ile gerekli besi yeri oluşturuldu.
- 3) Plate'ler, 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde konfluent oluşuncaya kadar bekletildi.
- 4) Her bir kuyucukta konfluent olduktan sonra pipet yardımıyla çizik oluşturuldu.
- 5) Kontrol gruplarına asprosin hormonu uygulaması yapılmadı.
- 6) Hemen ardından, diğer kuyucuklara belirlenen dozlarda asprosin hormonu eklendi.
- 7) 24. ve 48. saat sonunda bütün gruplar fiksasyon aşamasına alındı.

24 ve 48 saatlik gruplar içerisinde; IL-1, IL-10, fibronectin ve kollajen immünreaktivite değerlendirmesi için asprosin hormonunun 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozları kullanıldı ve kontrol grupları dahil olmak üzere toplamda 40 ayrı grup oluşturuldu.

Fiksasyon;

1. Plate'lerdeki hücre ekimi tamamlandı ve bütün gruplara %4'lük paraformaldehit fiksatif yüzeyi kaplayacak şekilde eklendi ve hücreler 5 dakika boyunca tespit edildi.
2. Plate'ler içinde tespit edilen camlar PBS ile bir kez yıkandı.

İmmünperoksidaz Yöntemi;

- 1) Plate içindeki camlar tekrar PBS ile yıkandı.
- 2) Camlar üzerine, endojen peroksidlerin bloklanması için %3'lük H₂O₂ solüsyonundan yaklaşık 5 damla kadar damlatıldı ve 5 dakika beklendi.
- 3) Camlar, PBS ile 5'er dakika 3 kez yıkandı.
- 4) Permeabilizasyon (geçirgenlik) için (intraseküller protein tespiti için önem arz eder); Plate içerisindeki camlar, 5 dakika süreyle % 0,1 Triton X-100-PBS solüsyonunda bekletildi. (1 ml Triton X 100 ml distile su içerisinde 30-50°C'de karıştırılarak 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.)
- 5) PBS ile 5'er dakika 3 kez yıkandı.
- 6) Üzerine, yaklaşık 5 damla kadar %1 BSA-PBS (bloklama) solüsyonu damlatıldı ve 15 dakika bekletilerek non-spesifik bağlanmalar önleildi.
- 7) Daha sonra her bir primer antikor, datasheet verileri doğrultusunda antibody diluent ile belirli dilüsyonlarda IL-1 alfa Antibody (1/250), IL-10 Antibody (1/250), Fibronectin Antibody (1/250), COL1A Antibody (1/1000) sulandırıldıktan sonra, plate içerisindeki camlara uygulandı ve +4°C'de 24 saat bekletildi.
- 8) Daha sonra camların üzerindeki primer antikor solüsyonu döküldü.
- 9) PBS ile 5'er dakika 3 kez yıkandı.
- 10) Sekonder antikor (komplement) solüsyonu yaklaşık 5 damla olacak şekilde damlatıldı.
- 11) Plate 15 dakika boyunca inkübatör içerisinde bekletildi.
- 12) Sekonder antikor (komplement) plate'lerden uzaklaştırıldı.
- 13) Plate içindeki camlar, PBS ile 5'er dakika 3 kez yıkandı.

- 14) Camlara, 5 damla kadar Horseradish peroksidaz (HRP) konjugeli streptovidin biotin damlatıldı ve 15 dakika boyunca inkübatör içerisinde bekletildi.
- 15) Streptovidin biotin solüsyonu plate'lerdeki camlardan uzaklaştırıldı.
- 16) PBS ile 5'er dakika 3 kez yıkandı.
- 17) Taze DAB solüsyonu hazırlanıp (50 damla DAB substrat üzerine 1 damla DAB kromojen eklenerek hazırlandı) plate'deki camların üzerine 100 µl damlatılarak 3 dakika süre ile karanlıkta beklendi.
- 18) DAB solüsyonu camlardan uzaklaştırıldı ve PBS ile 5'er dakika 3 kez yıkandı.
- 19) Hücre çekirdeklerinin boyanması için Mayer's Hematoksilen solüsyonu damaltılarak 5 dakika beklendi.
- 20) Plate'ler içerisinde, dereceli alkol serilerinin her birinde yaklaşık 1 dakika kadar beklendi.
- 21) Plate'in içindeki camlar bu aşamada çıkarılarak, bir penset yardımıyla tutulup dereceli ksilol serilerinin her birinde yaklaşık 15 saniye kadar beklendi.
- 22) Cover glass camlarının üzerine yaklaşık 10 µl kadar entellan damlatıldı ve ters çevirilerek lamlara yapıştırıldı.

HDF hücrelerinde, asprosin hormonu verilmeyen kontrol grupları ile 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında asprosin verilen gruplara ait 24 ve 48 saatlik olmak üzere 4 antikorun (IL-1, IL-10, fibronectin ve kollajen) uygulandığı toplam 40 slayt hazırlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kontrol grubuna ait IL-1 immünohistokimyasal boyama ile hazırlanan preparat

3.3.6. Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama

İmmünotokimyasal boyama işlemi sonucunda hazırlanan preparatlar, Nikon Eclipse E600 (Japan) marka bilgisayar destekli ve kamera eklentili mikroskop ile incelenerek fotoğraflandı.

Her bir slaytta rastgele 10 alan incelenerek immünotokimyasal boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma yoğunluğu değerlendirildi. Çalışmamızın immünotokimyasal değerlendirilmesinde immünotokimyasal skorlama (IRS) işlemi yapıldı [213, 214]. Her grup için IRS ortalamaları hesaplandı ve ayrı ayrı kaydedildi. İmmünotokimyasal skor, pozitif boyanan hücre yüzdesi ile boyanma yoğunluğunun çarpımı sonucu elde edildi. IRS skorlama Tablo 3.1'e göre yapıldı.

Tablo 3.1. İmmünotokimyasal Skor (IRS) Tablosu

A (Pozitif hücre yüzdesi)	B (Boyanma yoğunluğu)	IRS (Her iki ifade çarpımı)
0 (Pozitif hücre yok)	0 (Boyanma yok)	0-1 (Negatif)
1 (Pozitif hücre %10'un altında)	1 (Hafif Boyanma)	2-3 (Hafif)
2 (Pozitif hücre %10-50 arasında)	2 (Orta Dereceli Boyanma)	4-8 (Orta)
3 (Pozitif hücre %51-80 arasında)	3 (Şiddetli Boyanma)	9-12 (Şiddetli Pozitif)
4 (Pozitif hücre %80'in üzerinde)	IRS (A X B): 0-12	

3.3.7. Real Time-PCR Prosedürü (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

3.3.7.1. Real Time-PCR Öncesi Hücre Kültürü

Hücre pasajlaması esnasında elde edilen hücrelerin, 6'lı plate'deki her bir kuyucuk için 5000 hücre/100 µl olacak şekilde ekimi yapıldı. 24 ve 48 saatlik 2 grup için, hücre ekiminin ardından plate'ler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi. Çoğalan hücreler, kuyucukların yüzeyini kapladığında; kontrol ve asprosinin 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozları uygulanmak üzere, toplam 5 grup oluşturuldu. Yara iyileştirme deneyi uygulandıktan sonra asprosin hormonu,

belirlenen konsantrasyonlarda uygulandı. 24 ve 48. saatlerde, her bir kuyucuğa 1 ml tripsin eklenerek 5 dakika beklendi. Böylelikle, kuyucuk zeminine yapışık halde bulunan fibroblast hücrelerinin kaldırılması sağlandı. Kaldırılan hücreler, 1.5 ml'lik ependorf tüplerine pipet yardımıyla aktarıldı ve 5 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.

3.3.7.2. Total RNA İzolasyonu

- 1) 24 ve 48 saatlik kontrol ve asprosin verilen gruplara ait ependorf tüplerindeki hücre solüsyonlarında oluşan süpernatant atıldıktan sonra 400 EcoPURE Lysis/Binding Buffer eklendi ve pellet çözülene kadar 10 saniye vortekslendi.
- 2) Elde ettiğimiz lizata 400 µl absolu etanol eklendi ve 10 dakika vortekslenerek karıştırıldı.
- 3) Hazırladığımız örnekten 700 µl alınarak gruplarını yazmış olduğumuz toplama tüplerine aktarıldı.
- 4) Toplama tüplerindeki örneklerimiz 800 rpm de 5 dakika santrifüjlendi.
- 5) Santifüjleme sonrası toplama tüpünün dibinde kalan sıvı atıldı ve toplama tüpünün üst kısmında bulunan filtrede genomik materyal kaldı.
- 6) Toplama tüpünün üzerine 400 µl EcoPURE Wash Buffer 1 eklendi.
- 7) 800 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- 8) Santifüjleme sonrası toplama tüpünün dibinde kalan sıvı atıldı.
- 9) Toplama tüpünün üzerine 500 µl EcoPURE Wash Buffer 2 eklendi.
- 10) 800 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- 11) Santrifüjleme sonrası toplama tüpünün dibinde kalan sıvı atıldı.
- 12) Toplama tüpünün üzerine 200 µl EcoPURE Wash Buffer 2 eklendi.
- 13) 800 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- 14) 1.5 ml'lik ependorf tüplerine altta kalan sıvı aktarıldı.
- 15) İçinde sıvı bulunan ependorf tüplerine 100 µL EcoPURE Elution Buffer eklendi.
- 16) 800 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- 17) Elde edilen solüsyon cDNA elde edilinceye kadar -80°C'de saklandı.

3.3.7.3. cDNA (komplementer-tamamlayıcı DNA) Sentezi

Tek zincirli mRNA molekülünün revers transkriptaz enzimi ile çift zincirli hale getirilmesi sayesinde cDNA sentezi yapılabilmektedir.

- 1) Total RNA eldesinde, RNA miktarının yeterli olup olmadığını değerlendirme amacıyla Nanodrop Cihazı kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Nanodrop Cihazı'nda ölçülecek genetik materyalin damla görüntüsü

- 2) Yeterli bulunan RNA miktarının gözlenmesinin ardından, numaralandırılması yapılan yeni tüplerde değişen hacimlerde Nuclease Free Water eklendi ve örneklerimizde RNA eşitlemesi yapıldı. Elimizdeki RNA örneklerinden cDNA elde edebilmek için Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti kullanıldı.
- 3) Revers transkripsiyon (RT) kit bileşenleri çözündürüldükten sonra RT master mix'i hazırlandı (Tablo 3.2).
- 4) cDNA revers transkripsiyon reaksiyonunu hazırlamak için 2xRT master mix'ten 10'ar μ l PCR tüplerine aktarıldı ve her tüpe pipetaj yapılarak 10 μ l RNA ilave edildi. Böylelikle her bir tüpte toplam hacim 20 μ l'ye tamamlandı.

- 5) Numaralandırılan PCR tüpleri Thermal Rotor Gene Q cihazına yerleştirildi ve cDNA reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için Tablo 3.3'te belirtilen program kullanıldı.

Tablo 3.2. 2xRT Master Mix Bileşenleri ve Miktarları

Mix'in İçeriği	Kullanılma Oranı	Kullandığımız Miktar (X 10)
10X RT Buffer	2.0 µL	20 µL
25X dNTP mix	0.8 µL	8 µL
10X RT Random Primer	2.0 µL	20 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µL	10 µL
Nükleaz içermeyen Su	3.2 µL	32 µL
Her bir reaksiyon için toplam hacim	10.0 µL	100 µL

Tablo 3.3. cDNA Eldesi İçin Thermal Cycler'da Kullanılan Program

	1. adım	2. adım	3. adım	4. adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	2 saat	5 dakika	∞

Reaksiyon sonrası elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.3.7.4. Kantitatif Real Time-PCR

Floresan bazlı kinetik gerçek zamanlı PCR, uygulanan işlemlerin kolay, güvenilir ve hızlı olması ve de sınırlı miktarda genetik materyal içeren örneklerde başarılı sonuç vermesi nedeniyle, en fazla tercih edilen yöntemlerdendir [215, 216]. Floresans, Real Time-PCR sırasında lazer ışığını optik fiber dizisine spektrofik kamera vasıtasıyla dağıtarak indüklenir [216]. Bakılmak istenilen genlerin mRNA düzeyinin belirlenmesinde örnek normalizasyonu için GADPH ve B-aktin en yaygın kullanılan iki referans gendir [217]. Bizim deneyimizde de ilgili genlerin normalizasyonu için GADPH kullanıldı. IL-1, IL-10, kollajen ve fibronektin proteinlerini kodlayan mRNA'ların ölçümü, Applied Biosystems TaqMan Universal Master Mix II with UNG kiti kullanılarak üretici firmanın belirttiği protokole uygun şekilde "Rotor Gene Q" PCR cihazında gerçekleştirildi (Tablo 3.4-3.5).



Şekil 3.4. “Rotor Gene Q” PCR cihazı fotoğrafı

Tablo 3.4. PCR Reaksiyon Mix'in Hazırlanması

Reaksiyon bileşenleri	Her bir örneklem hacmi için (µl)
Tagman Universal Master Mix II	10.0 µl
TaqMan Gene Expression Master Mix	2.0 µl
cDNA Örneği	2.0 µl
Nükleaz içermeyen Su	6.0 µl

Tablo 3.5. Applied Biosystems Real -Time Real Time-PCR İçin Kullanılan Program

İşlem	Enzim inkübasyonu	Enzim aktivasyonu	PCR	
	HOLD	HOLD	Sikluslar (40 siklus)	
			Denatürasyon	DNA primerlerinin bağlanması ve uzaması
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2:00	10:00	00:15	1:00
Hacim (µl)	20 ya da 50 µl			

3.3.8. Real Time- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genlerin ekspresyon düzeylerini belirlemek için Threshold Cycle (CT) veya crossing points (Cp) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülür [218]. Eşik döngüsü (Threshold Cycle = CT) değeri bize; üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir [218]. CT; sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır diğer bir deyişle ise haberci boyanın floresan sinyalinin seçilmiş eşiği geçtiği PCR döngüsü olarak tanımlanır [219].

IL-1, IL-10, kollajen ve fibronektin genlerinin ekspresyon düzeylerini belirlemek için ΔC_p yöntemi kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirildi:

$$\Delta C_p = C_p \text{ hedef gen} - C_p \text{ referans gen}$$

$$\Delta \Delta C_p = \Delta C_p (\text{muamele edilen}) - \Delta C_p (\text{kontrol})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_p}$$

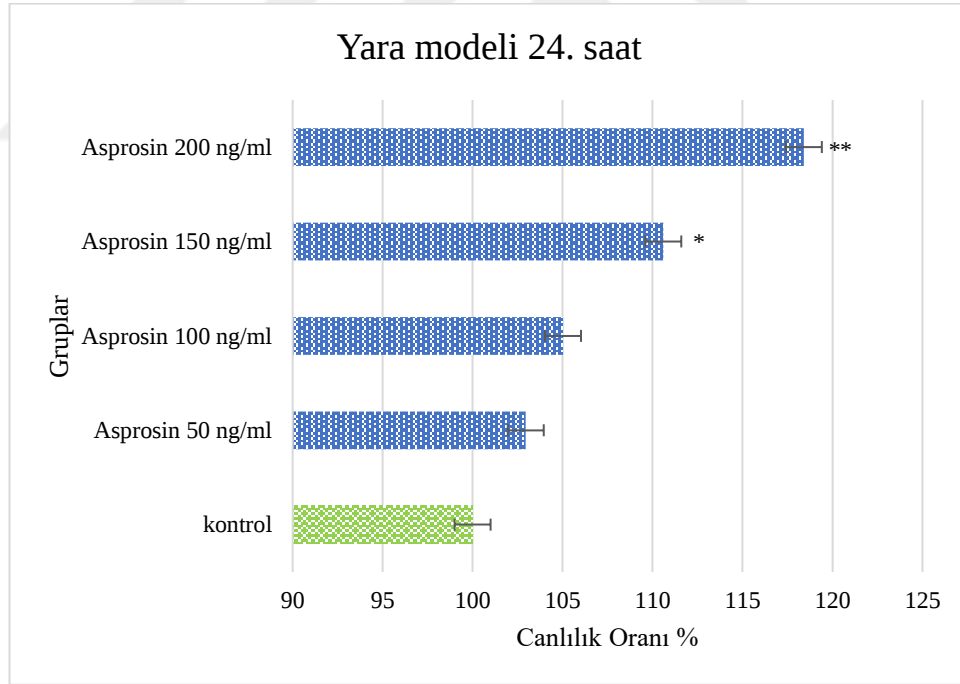
3.3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS 21.0 (SPSS Inc. , Chicago, IL) programı ile yapıldı. Elde edilen veriler, ortalama±standart sapma (Ort.±S.D.) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar, One-way ANOVA testi uygulanarak analiz edildi. Post hoc test olarak LSD testi kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde, $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Anlamlılık değeri, $p < 0,05$ için *, $p < 0,01$ için ** şeklinde ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Asprosin Hormonunun Hücre Viabilitesi Üzerine Etkisi

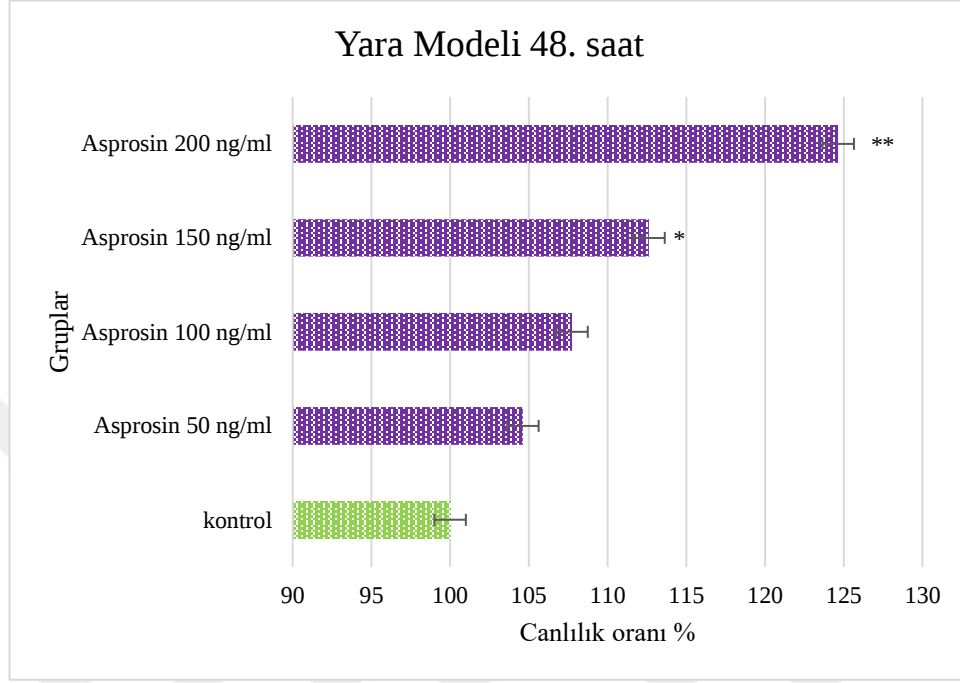
Human Dermal Fibroblast hücre hattında, asprosin hormonunun hücre viabilitesi üzerine etkisinin araştırılması ve etkin dozunun belirlenmesi amacıyla oluşturulan yara çizik deneyinde farklı dozlarda asprosin hücrelere uygulandı. Daha sonra, MTT testi ile asprosin dozlarına bağlı olarak hücre proliferasyonu değerlendirildi. Asprosinin 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml olarak uygulandığı bütün gruplarda, yara çizik deneyi sonrası, 24. saatte hücre proliferasyonu gözlemlendi ve kontrole kıyasla kapanmanın daha önce gerçekleştiği belirlendi. Özellikle, asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda en yüksek düzeyde olmak üzere ($p<0,01$), 150 ng/ml dozunda da kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artmış canlılık oranı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Yara çizik deneyi sonrası 24. saatte kontrol ve asprosin hormonu uygulanan gruplarda hücre viabilite değerlerini gösteren grafik

Yara çizik deneyi sonrası, 48. saatte asprosin uygulanan gruplarda kontrole kıyasla hücre proliferasyonunun daha fazla olduğu ve yara kapanma hızlarının da 24 saatlik gruptakine benzer şekilde gerçekleştiği gözlemlendi. Özellikle, asprosin

hormonunun 200 ng/ml dozunda en yüksek düzeyde olmak üzere ($p<0,01$), 150 ng/ml dozunda da kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artmış canlılık oranı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.2).

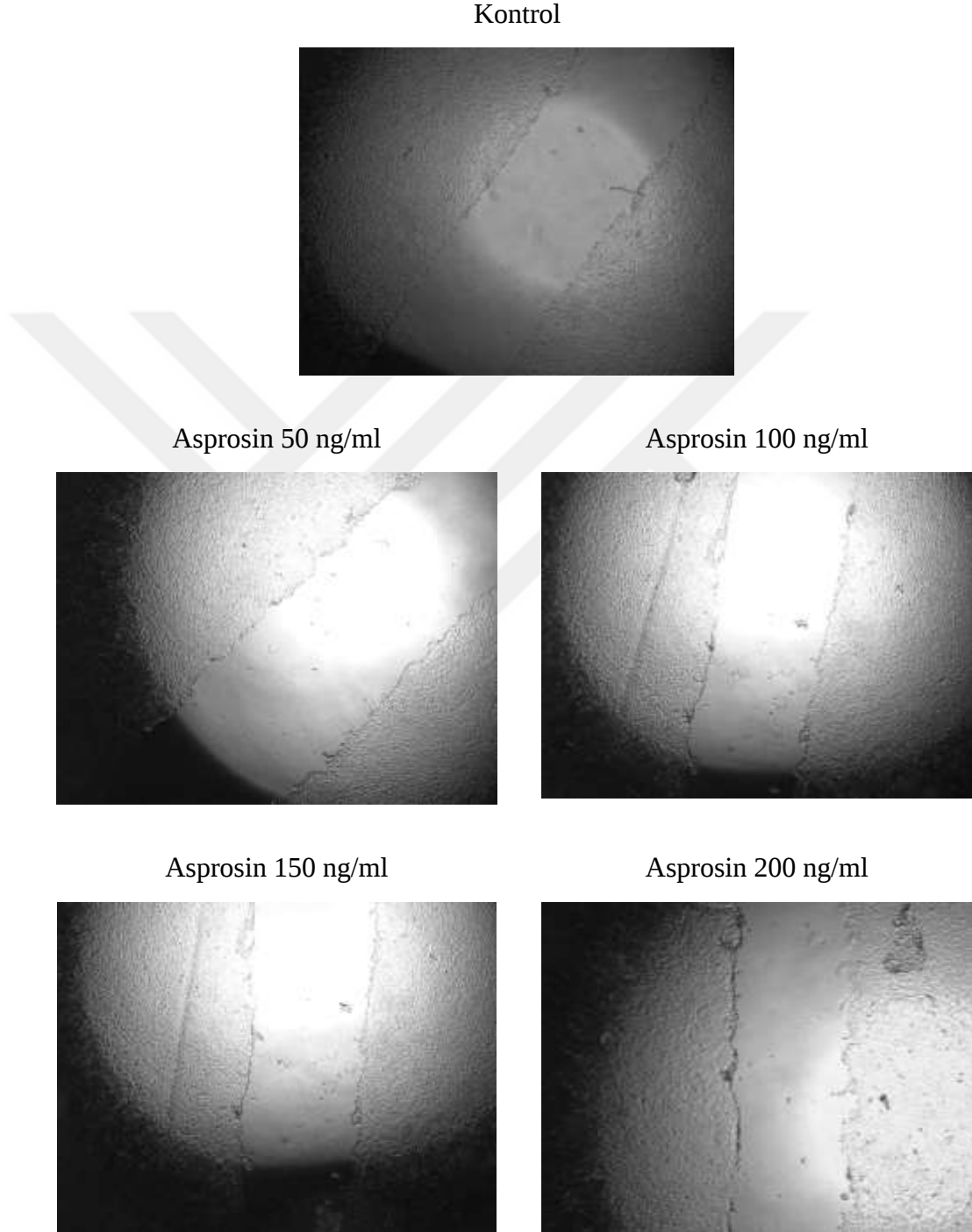


Şekil 4.2. Yara çizik deneyi sonrası 48. saatte kontrol ve asprosin hormonu uygulanan gruplarda hücre viabilite değerlerini gösteren grafik

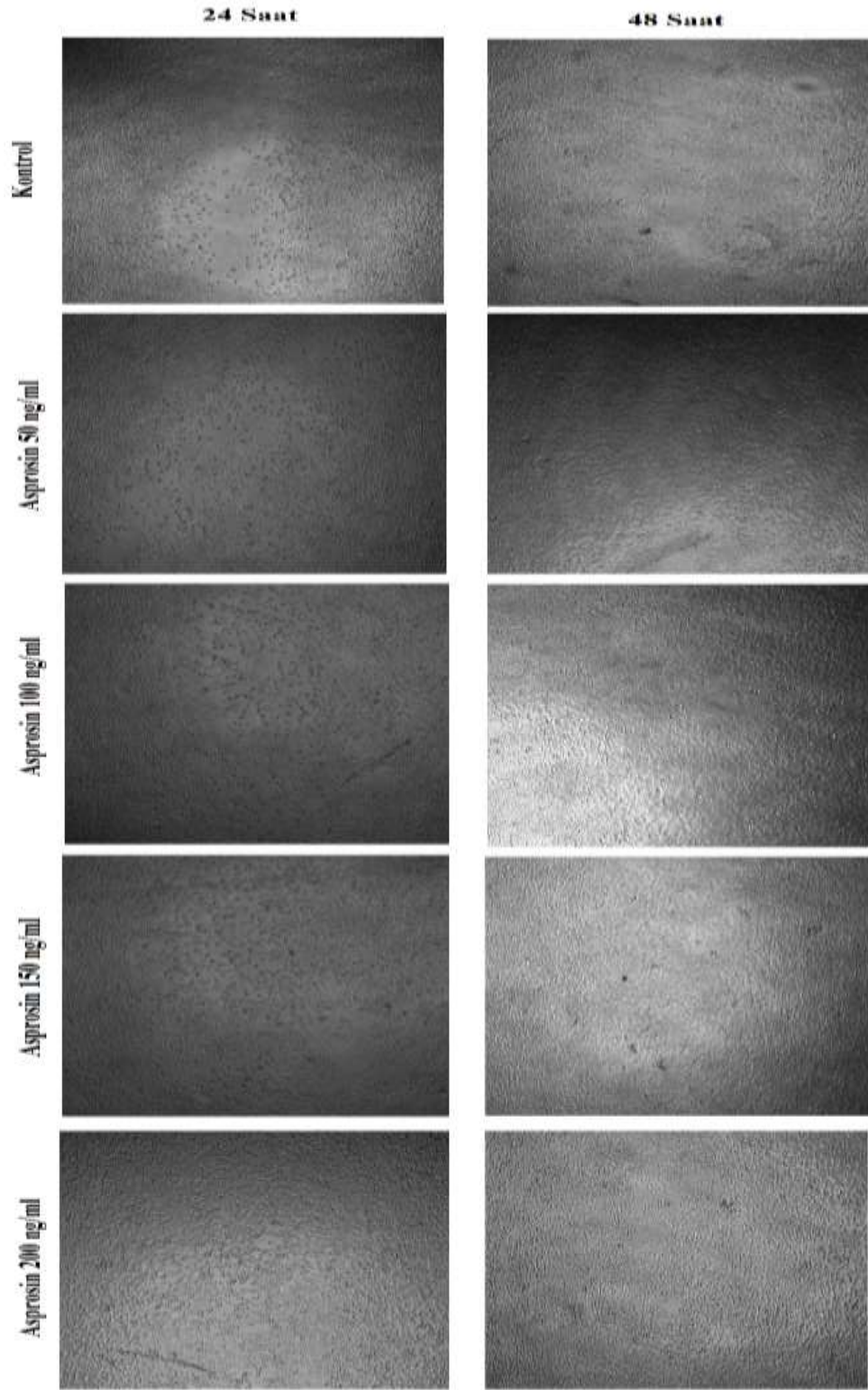
4.2. Yara İyileşme Hızının Değerlendirilmesi

MTT testi sonucunda proliferatif etkileri bulunan 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ile 200 ng/ml asprosin hormonu dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi in vitro scratch assay kullanılarak değerlendirildi. Çizik ile yara oluştuğunda, ciltteki hücreler çoğalarak yarayı kapatmak için yara yerine göç ederler [220]. Çalışmamızda, çizik oluşturulduktan sonra 0, 24 ile 48. saatlerdeki yara alanının kapanması invert mikroskopta değerlendirilerek fotoğraflandı (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Yirmi dört saatlik grupta, kontrol grubu yara alanının kısmen kapandığı ve yara alanına gelen hücreler arasında köprüleşmelerin varlığı izlendi. Asprosinin 50 ng/ml dozunda uygulandığı grupta kapanma derecesi kontrol grubundakine benzerlik gösterirken, 100 ng/ml dozunda, 50 ng/ml dozuna göre daha çok hücrenin yara alanına göç ettiği tespit edildi. Asprosin hormonunun 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında uygulandığı gruplarda ise hücre göçünün maksimum olduğu izlendi ve yara alanının tamamen kapanmış olduğu

belirlendi. Kırk sekiz saatlik grupta ise kontrol grubunda yara iyileşmesinin büyük oranda tamamlandığı gözlenirken, asprosin hormonu uygulanan gruplarda ise yara yerinde tam kapanma mevcuttu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kontrol ve asprosin hormonunu uygulanan HDF hücrelerinin çizik sonrası 0.saatteki invert mikroskop görüntüleri (**Büyütme objektifi: x4**)



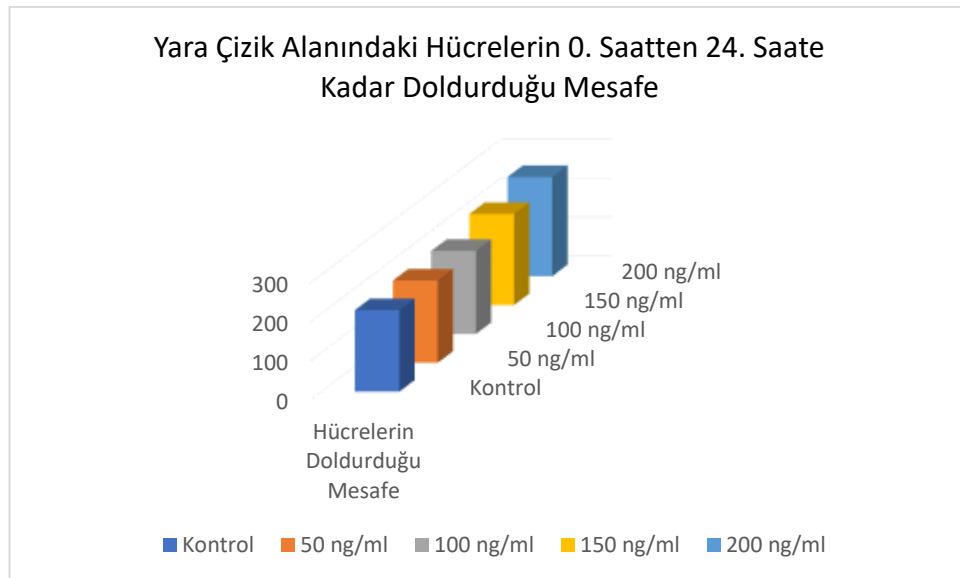
Şekil 4.4. Kontrol ve asprosin hormonunu uygulanan HDF hücrelerinin çizik sonrası 24. ve 48.saatteki invert mikroskop görüntüleri (**Büyütme objektifi:** x4)

4.3. Image J analiziyle Yara İyileşme Hızının Belirlenmesi

Çalışmamızda, yara çizik deneyi ile oluşturulan yara modellerinde farklı dozlarda asprosin hormonu uygulandıktan sonra 24 ve 48. saatlerde yara kapanma dereceleri invert mikroskop altında incelendi. Kontrol dahil 48 saatlik bütün gruplarda yara kapanması mevcut olduğundan yara iyileşme hızı sadece 24 saatlik gruplarda değerlendirildi. Bu amaçla Image J (1.53e Wayne Rasband and contributors, NIH, USA) bilgisayar programı kullanıldı. Oluşturduğumuz yara bölgesinin belirli saatlerdeki mesafesi ile hücrelerin göç yüzdesi Image J programında ölçülerek aşağıdaki formül [221] ile hesaplanıp grafik haline getirildi;

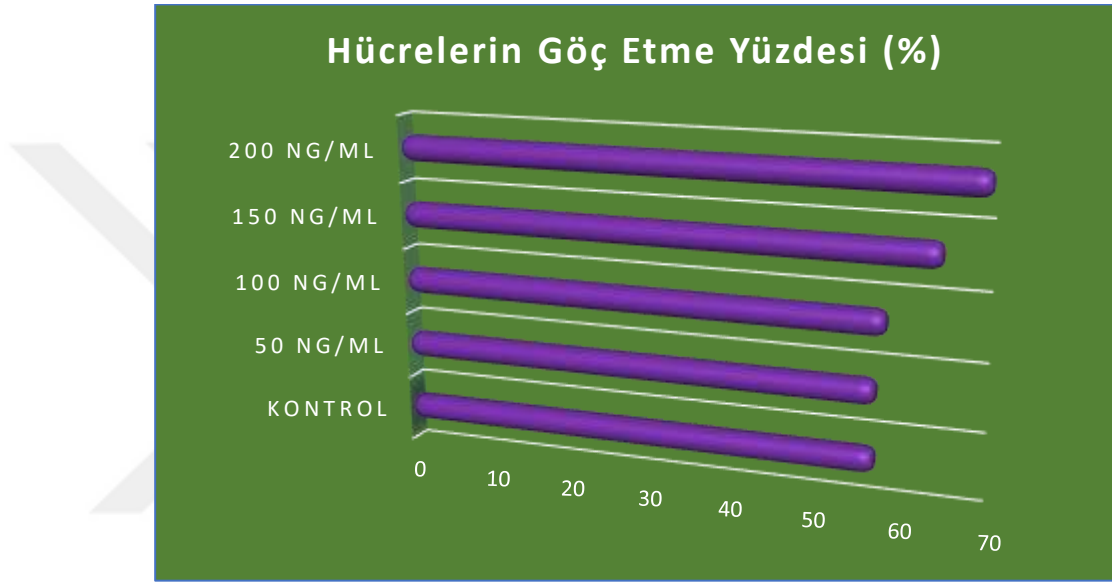
$$\% \text{ göç oranı} = \frac{\text{0. saat hücreler arası mesafe} - \text{istenilen saat hücreler arası mesafe}}{\text{0. saat hücreler arası mesafe}} \times 100$$

Elde edilen sayısal veriler karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edildi ve Şekil 4.5'te grafik olarak verildi. İn vitro yara çizik deneyi sonrası 0. saatten 24. saate kadar 200 ng/ml dozunun diğer gruplara göre daha fazla mesafe kapattığı izlendi. Böylelikle yara çizik alanını, en önde 200 ng/ml dozu kapatırken ($p < 0,01$), onu 150 ng/ml ($p < 0,05$), 100 ng/ml ($p < 0,05$) ve 50 ng/ml ($p > 0,05$) dozu ile kontrol gruplarının takip ettiği gözlemlendi.



Şekil 4.5. Yara mesafesinin dozlara göre 0. ve 24. saatte Image J analizi ile kapanma oranını gösteren grafik

Çalışmamızda, asprosin verilen bütün gruplarda kontrol grubuna göre daha fazla hücre göçünün gerçekleştiği görüldü. Hücre göçü, diğer gruplarla kıyaslandığında, 200 ng/ml dozunda asprosin hormonu verilen fibroblastların daha önce yara bölgesine ulaştığı gözlemlendi ($p<0,01$). Fibroblast hücrelerinin göç hızı, kontrol ve 50 ng/ml ($p>0,05$) asprosin hormonu uygulanan grupta benzer ve en az seviyede iken, onları sırasıyla 100 ng/ml ($p<0,05$) ve 150 ng/ml ($p<0,01$), asprosin hormonu verilen hücrelerin takip ettiği izlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Yara çizik deneyi sonrası 24. saatte yara bölgesine gelen fibroblast hücrelerinin göç etme yüzdeleri

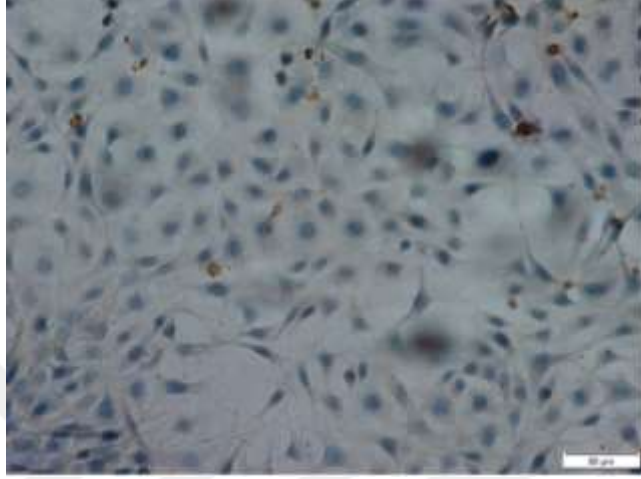
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Human dermal fibroblast (HDF) hücrelerinde, IL-1, IL-10, fibronektin ve kollajen proteinlerinin immünohistokimyasal boyama sonucunda immünopozitifliğinin değerlendirilmesi immünreaktivite skoru hesaplanarak gerçekleştirildi.

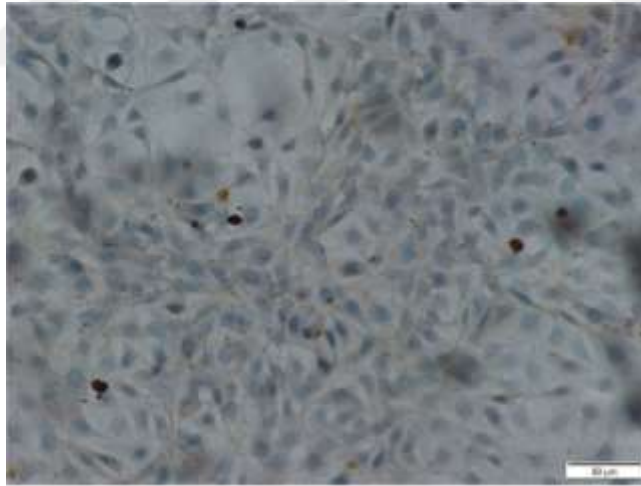
4.4.1. Fibroblast Hücrelerinde IL-1 İmmünreaktivitesi

Bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-1'in 24 saatlik gruplardaki immünohistokimyasal boyanma sonuçlarına göre, immünopozitif boyanmanın kontrol grubunda ve asprosin hormonu uygulanan gruplarda benzer olduğu izlendi (Şekil 4.7-10). IL-1'in fibroblast hücrelerindeki immünreaktif skor grafiği Şekil 12'de verildi. Asprosinin 50 ng/ml olarak verildiği grupta IL-1 IRS değerinin kontrole kıyasla düşük,

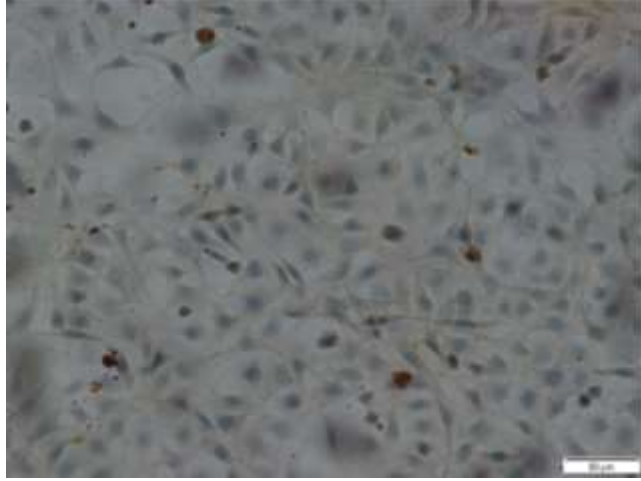
200 ng/ml olarak verildiği grupta ise yüksek olduğu gözlenmekle birlikte, asprosin hormonu verilmeyen ve verilen gruplarda IL-1 ekspresyonunu gösteren IRS değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).



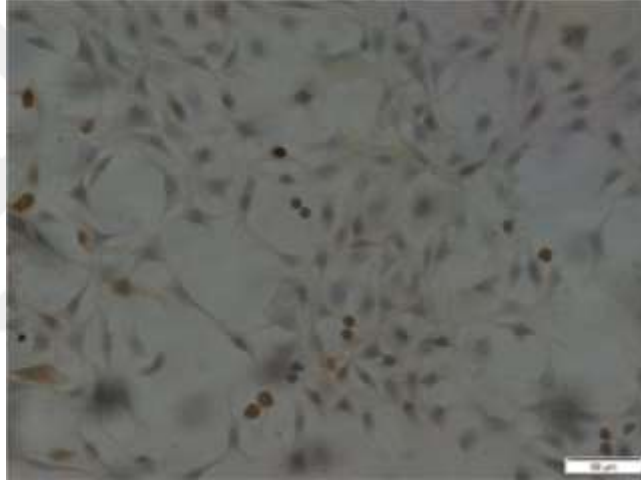
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.8. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20



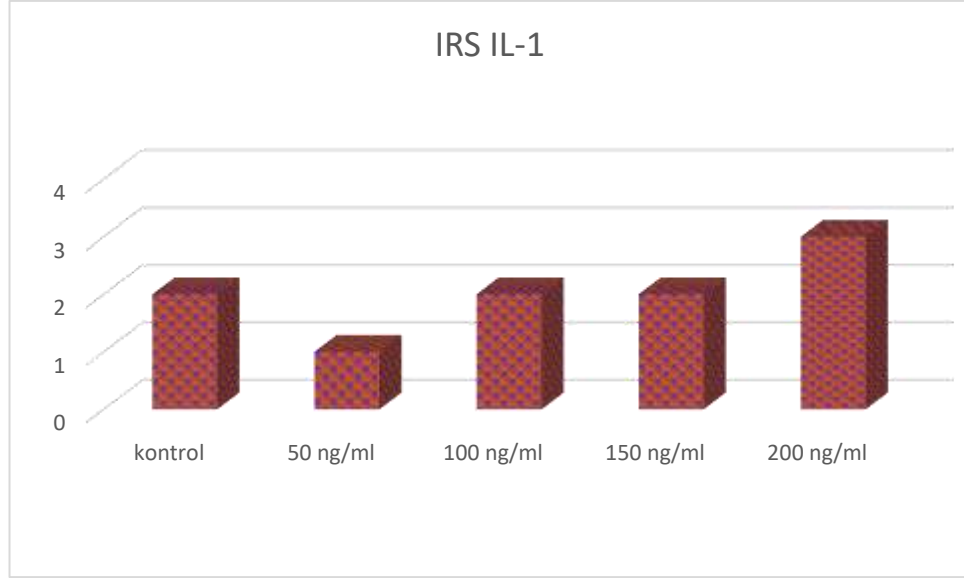
Şekil 4.9. Aspirin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.10. Aspirin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20

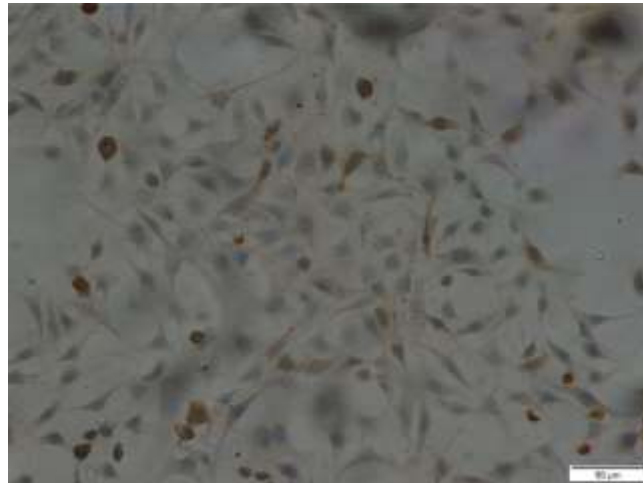


Şekil 4.11. Aspirin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20

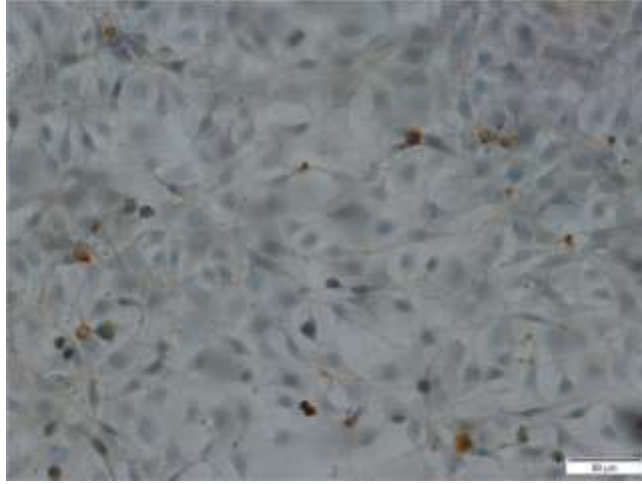


Şekil 4.12. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda IL-1'in IRS değerlerini gösteren grafik

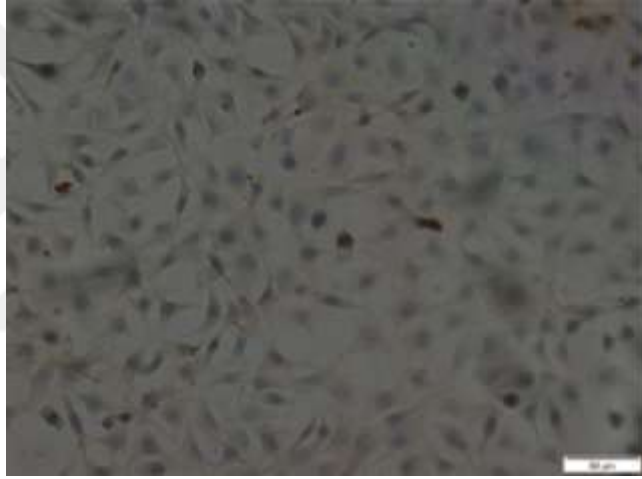
Kırk sekiz saatlik gruplarda da, fibroblastlarda IL-1 proteinine ait immünpozitif boyanmanın ve IRS skorlarının 24 saatlik gruplardakine benzer şekilde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13-17). IL-1'in fibroblast hücrelerindeki immünreaktif skor grafiği Şekil 4.18'de verildi. Asprosinin 50 ng/ml olarak verildiği grupta IL-1 IRS değerinin kontrole kıyasla düşük, 200 ng/ml olarak verildiği grupta ise yüksek olduğu bulundu. Ancak, gruplar arasında karşılaştırıldığında, IL-1 ekspresyonunu gösteren IRS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).



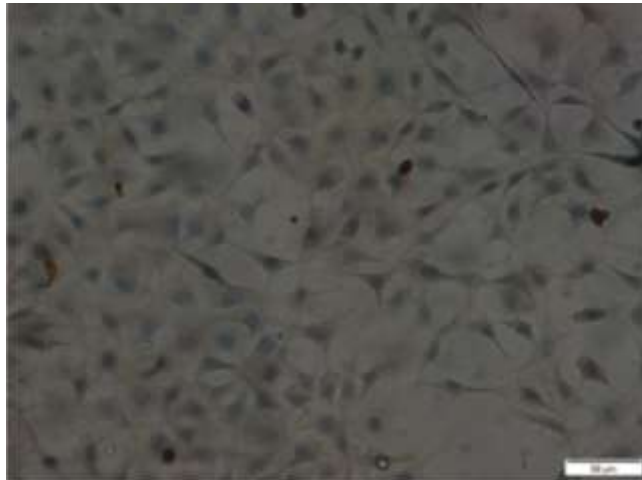
Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



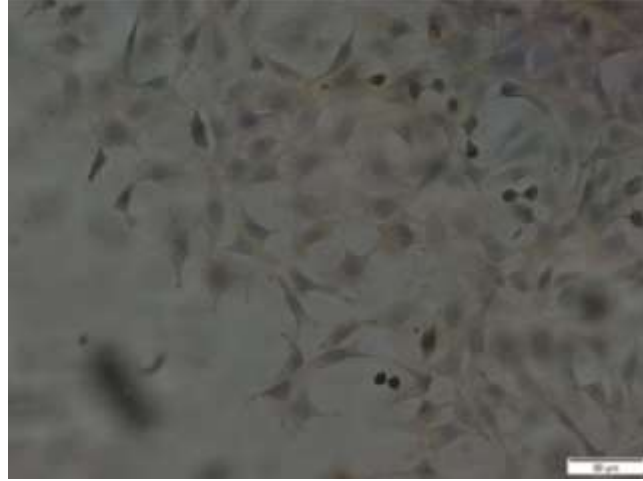
Şekil 4.14. Aspirin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20



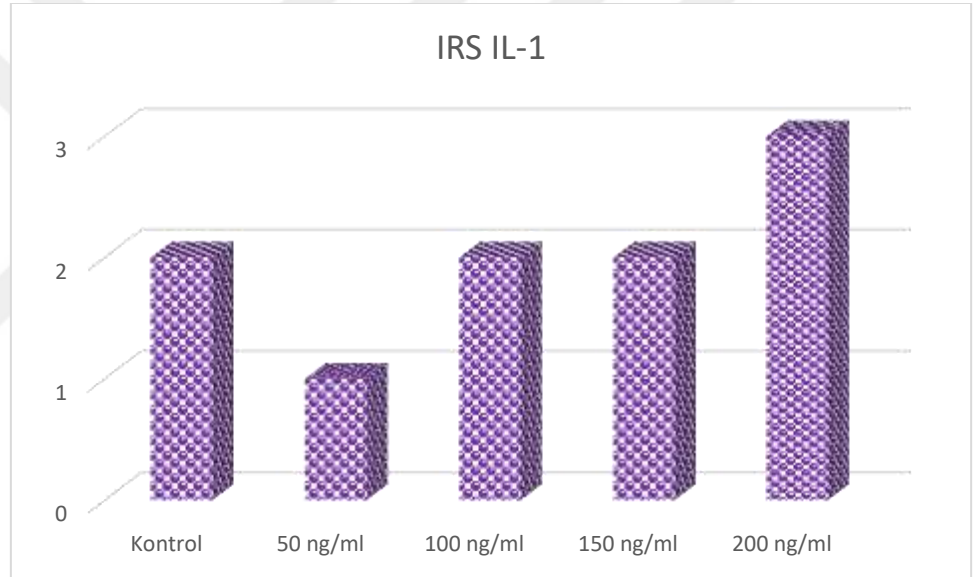
Şekil 4.15. Aspirin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.16. Aspirin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20



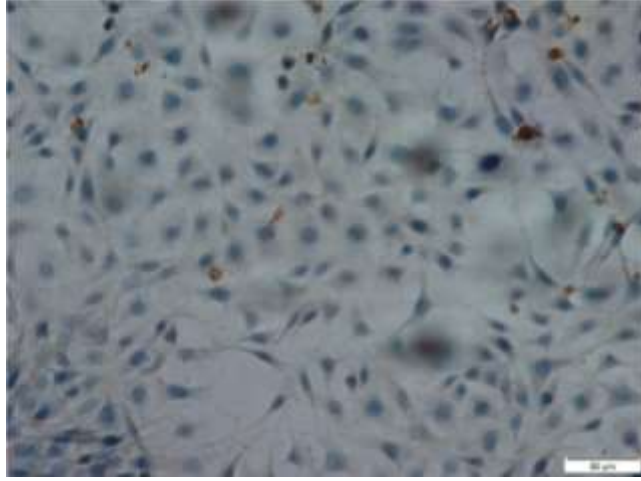
Şekil 4.17. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-1 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. **Büyütme objektifi:** x20



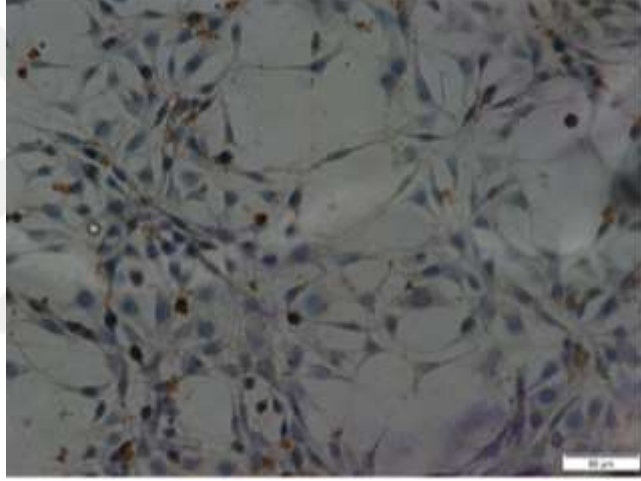
Şekil 4.18. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda IL-1'in IRS değerlerini gösteren grafik

4.4.2. Fibroblast Hücrelerinde IL-10 İmmünreaktivitesi

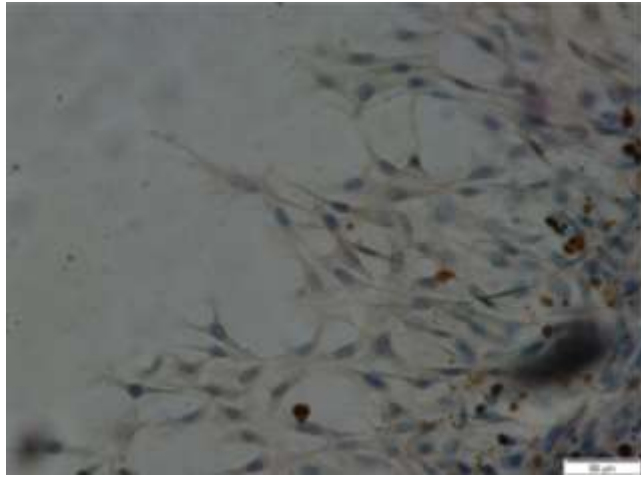
Bir anti-inflamatuar protein olan IL-10'un, HDF hücre hattında yapılan immünohistokimyasal boyama bulgularına göre; asprosin hormonu verilmeyen kontrol grubunda ve asprosin hormonu verilen diğer gruplarda, fibroblastlarda immünopozitif boyanma benzer şekilde gözlemlendi (Şekil 4.19-23). IL-10'un fibroblast hücrelerindeki immünreaktif skor grafiği Şekil 4.24'de verildi. Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda, IL-10 ekspresyonunu gösteren IRS değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmedi ($p>0,05$).



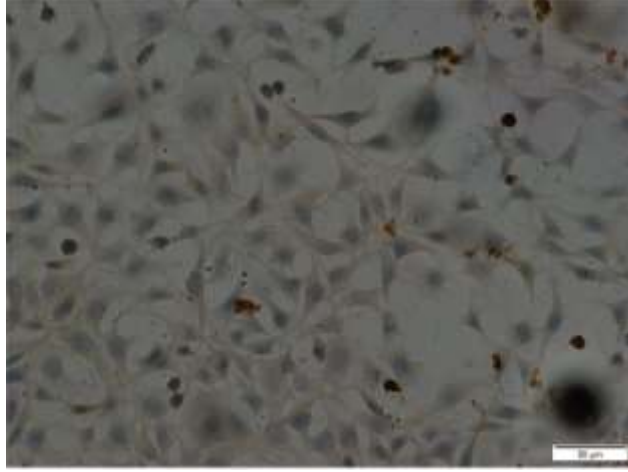
Şekil 4.19. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



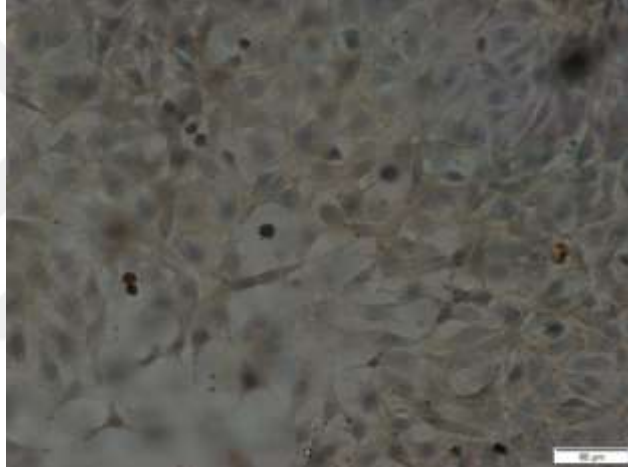
Şekil 4.20. Aspirin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



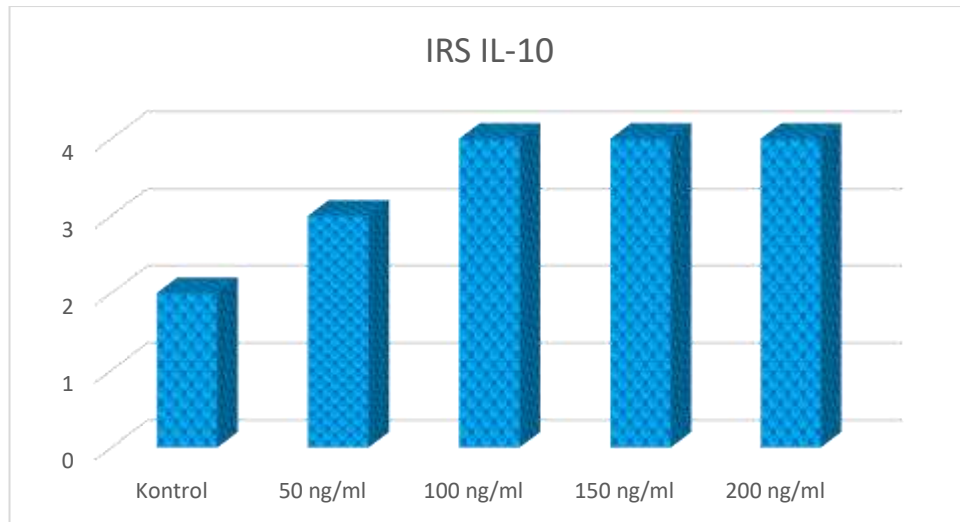
Şekil 4.21. Aspirin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.22. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20

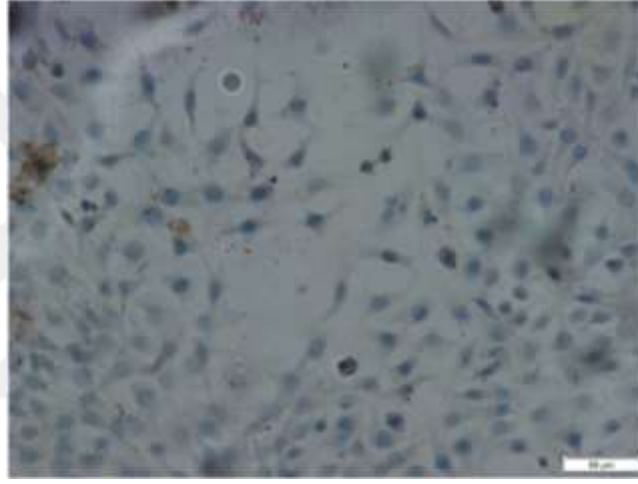


Şekil 4.23. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20

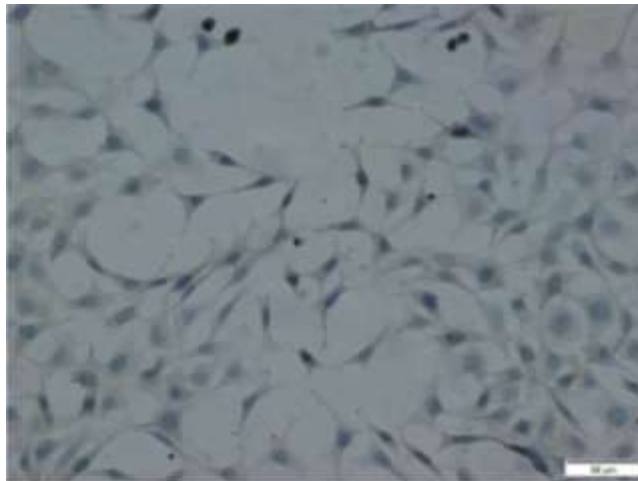


Şekil 4.24. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda IL-10'un IRS değerlerini gösteren grafik

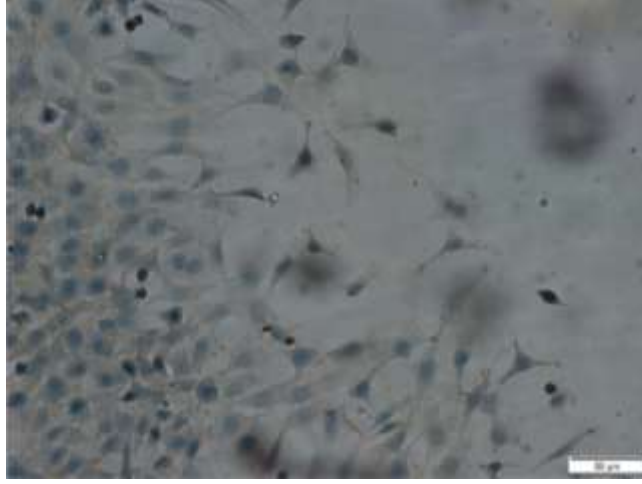
Kırk sekiz saat sonunda ise, IL-10 proteininin fibroblastlardaki immünpozitif boyanma özelliklerinin gruplar arasında farklılık gösterdiği izlendi. Kontrol grubunda daha az sayı ve yoğunlukta immünpozitiflik izlenirken (Şekil 4.25), asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda verildiği grupta daha belirgin olmak üzere, asprosin hormonu verilen bütün gruplarda daha güçlü immünpozitif boyanan hücreler görüldü (Şekil 4.26-29). Asprosin hormonu verilmeyen ve verilen diğer gruplarda IL-10 ekspresyonunu gösteren IRS değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, HDF hücre hattında 200 ng/ml ($p<0,05$) ve 150 ng/ml ($p<0,05$) dozlarında kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılık gözlemlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.25. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.26. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



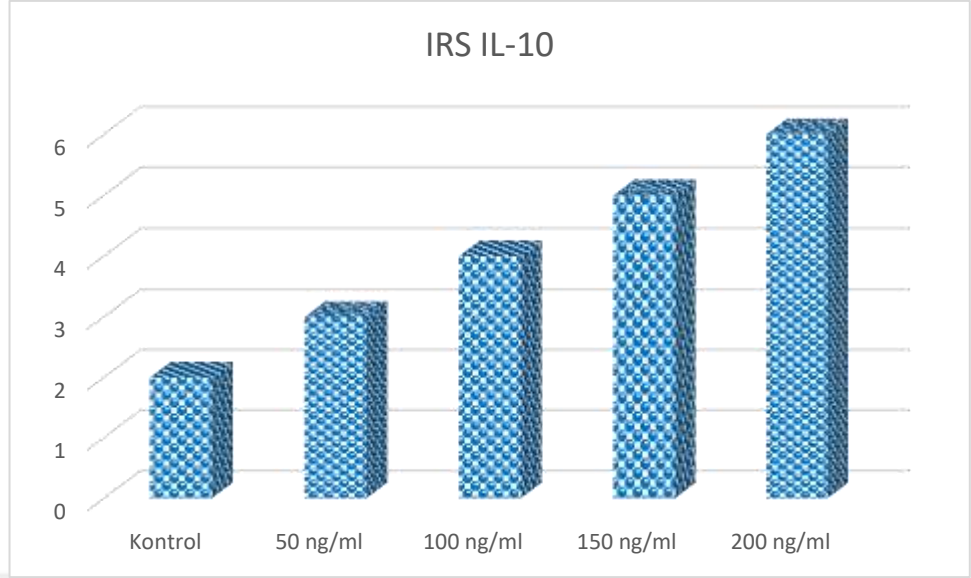
Şekil 4.27. Aspirin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.28. Aspirin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



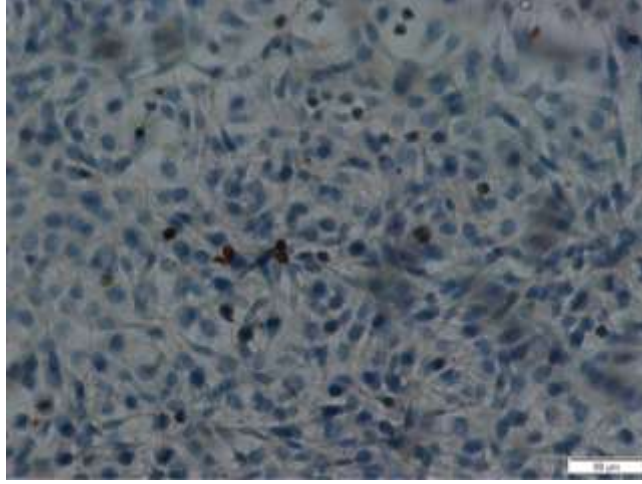
Şekil 4.29. Aspirin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda IL-10 immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



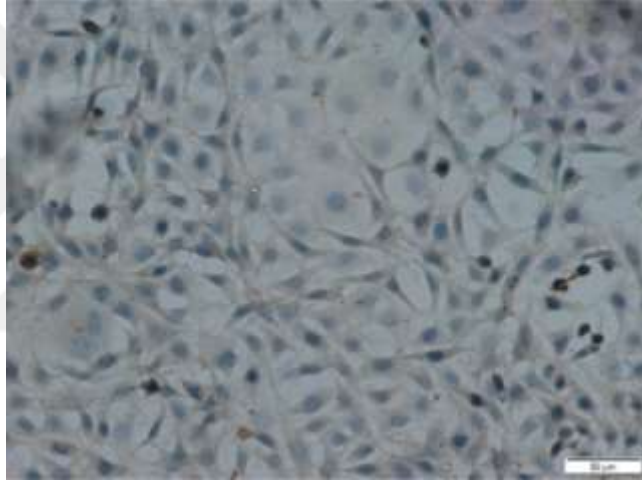
Şekil 4.30. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda IL-10'un IRS değerlerini gösteren grafik

4.4.3. Fibroblast Hücrelerinde Fibronektin İmmünreaktivitesi

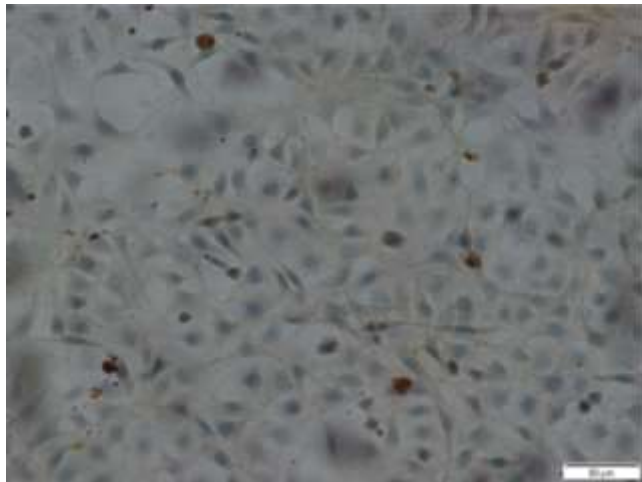
Ekstraselüler matriksin bir komponenti olan fibronektin'in HDF hücre hattındaki 24 saatlik immünohistokimyasal boyama bulgularına göre; kontrol grubunda daha az sayı ve yoğunlukta immünpozitiflik gözlemlendi (Şekil 4.31). Asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda verildiği hücrelerde daha belirgin olmak üzere, bütün dozlarında daha güçlü boyanan immünpozitif hücreler görüldü (Şekil 4.32-35). Fibronektinin fibroblast hücrelerindeki immünreaktif skor grafiği Şekil 4.36'da verildi. Asprosin hormonu verilen gruplarda fibronektin ekspresyonunu gösteren IRS değerleri kontrole kıyasla yüksekti ve istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, 100 ng/ml ($p<0,05$), 150 ng/ml ($p<0,05$) ve 200 ng/ml ($p<0,05$) dozlarında asprosin hormonu verilen gruplarda bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı.



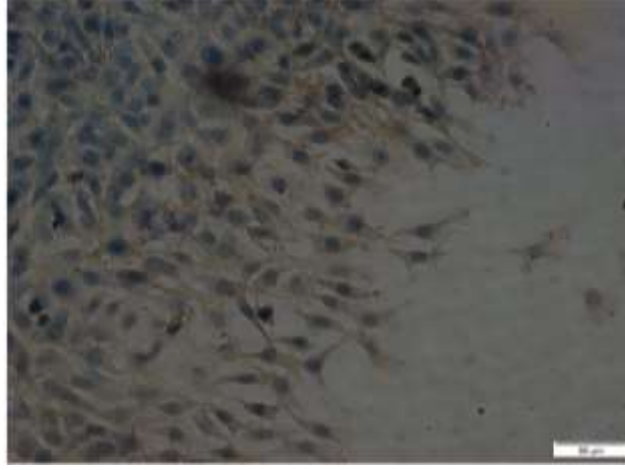
Şekil 4.31. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda fibronektinin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi: x20**



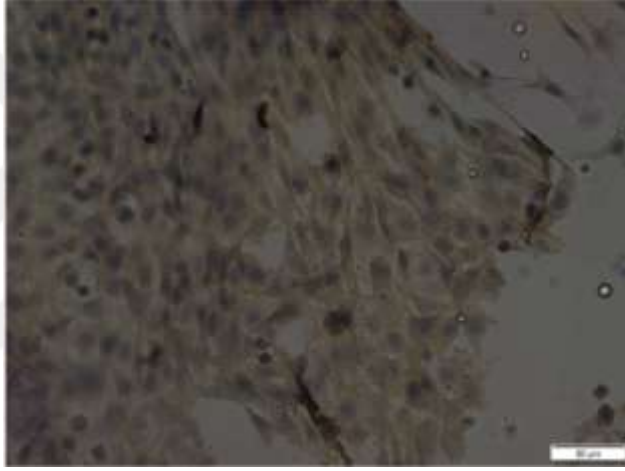
Şekil 4.32. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronektin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi: x20**



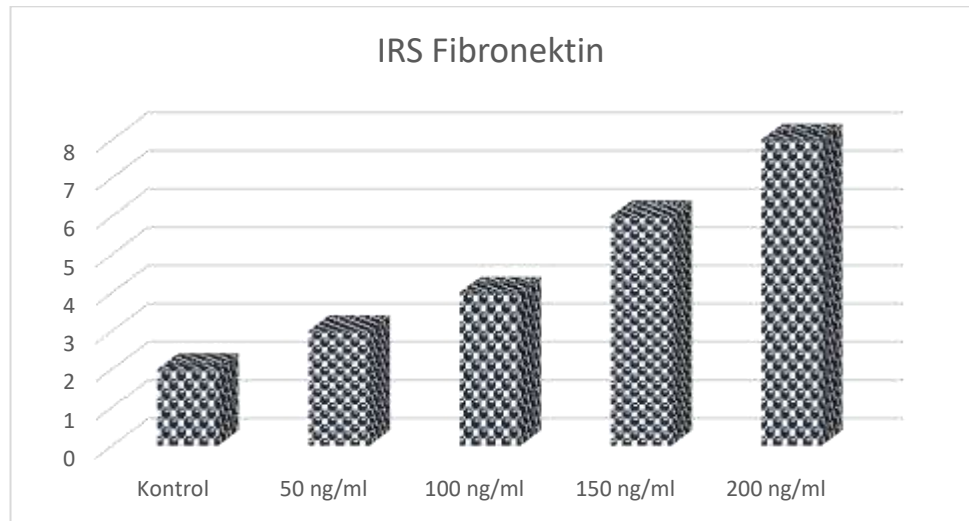
Şekil 4.33. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronektin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi: x20**



Şekil 4.34. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronektin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20

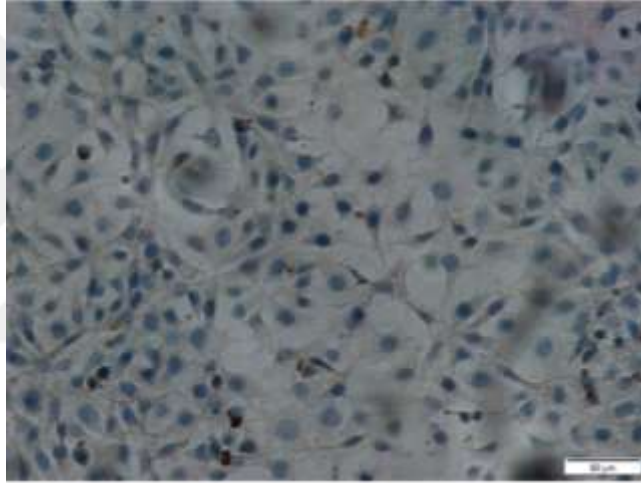


Şekil 4.35. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronektin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20

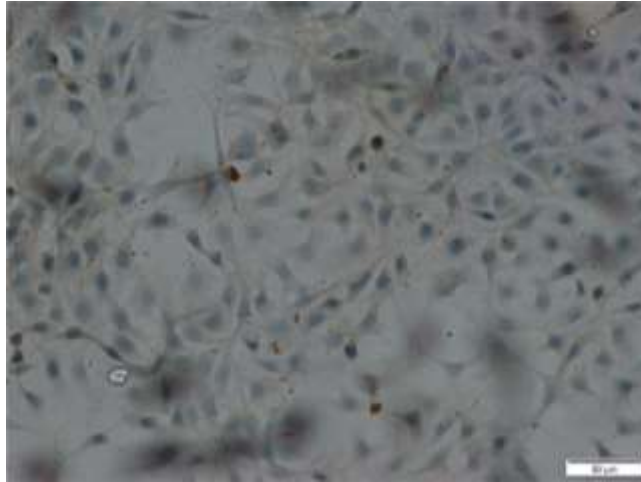


Şekil 4.36. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda fibronektinin IRS değerlerini gösteren grafik

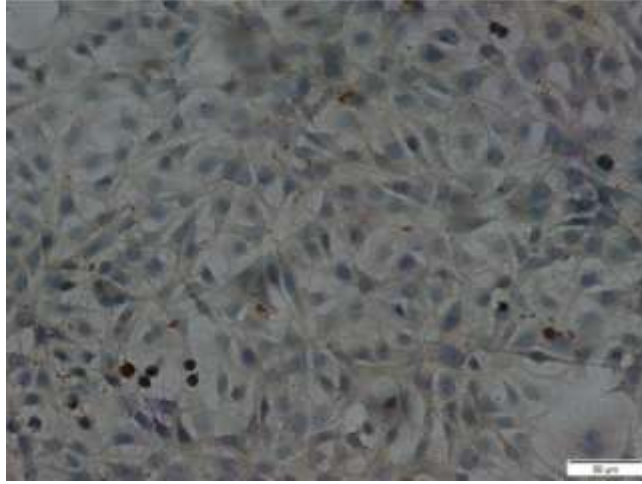
Fibronectinin 48 saatlik gruplardaki immünohistokimyasal boyama bulgularına göre; asprosin hormonu verilmeyen kontrol grubunda daha az sayı ve yoğunlukta immüno pozitiflik gözlemlendi (Şekil 4.37). Asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda verildiği grupta daha belirgin olmak üzere, bütün dozlarında daha şiddetli şekilde boyanmış immüno pozitif hücreler görüldü (Şekil 4.38-41). Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda fibronectin ekspresyonunu gösteren IRS değerleri (Şekil 4.42). 24 saatlik gruptakilere benzer bir durum sergiliyordu. Sırasıyla, 100 ng/ml ($p<0,05$), 150 ng/ml ($p<0,05$) ve 200 ng/ml ($p<0,05$) dozlarında asprosin hormonu verilen grupların IRS skorları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlılık olduğu belirlendi.



Şekil 4.37. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



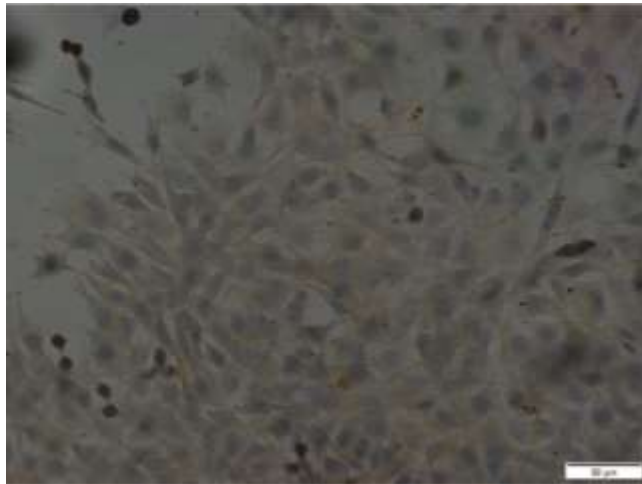
Şekil 4.38. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronectin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



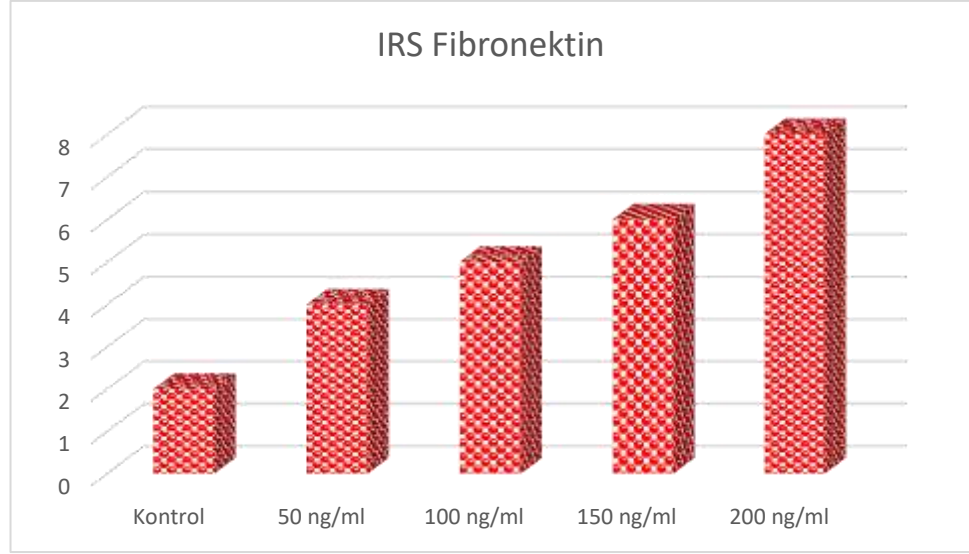
Şekil 4.39. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronektin immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.40. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronektin immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



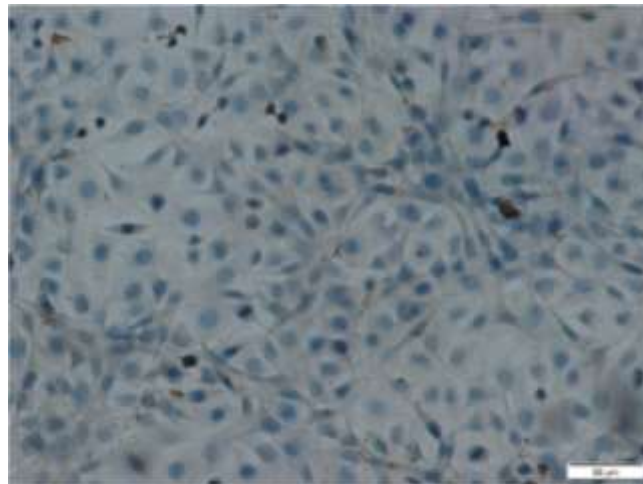
Şekil 4.41. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda fibronektin immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



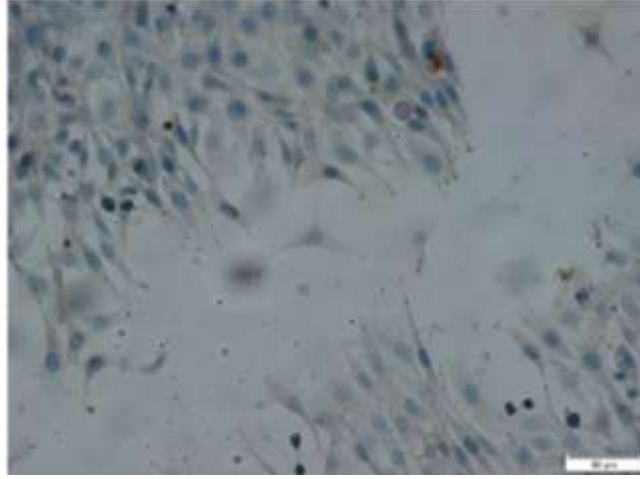
Şekil 4.42. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda fibronektinin IRS değerlerini gösteren grafik

4.4.4. Fibroblast Hücrelerinde Kollajen İmmünreaktivitesi

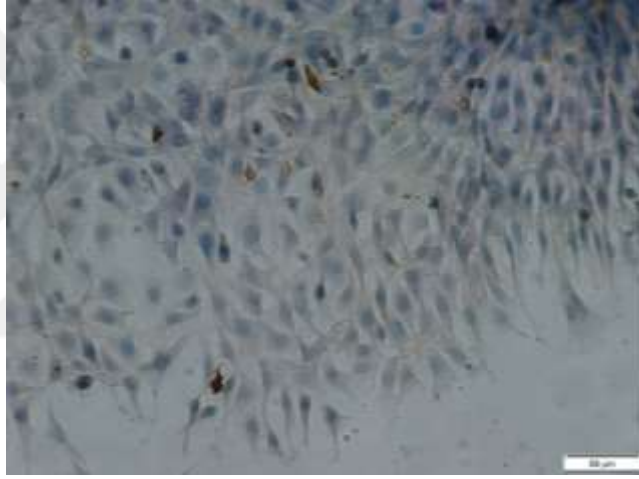
Kollajenin HDF fibroblast hücre hattında 24 saatlik gruplarda immünohistokimyasal boyama bulgularına göre; asprosin hormonu verilmeyen kontrol grubu ve asprosin hormonu verilen diğer bütün gruplarda immün boyanma farklılığı izlenmedi (Şekil 4.43-47). Asprosin hormonu verilen ve verilmeyen gruplarda 24. saatte kollajen ekspresyonunu gösteren IRS değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.48) ($p>0,05$).



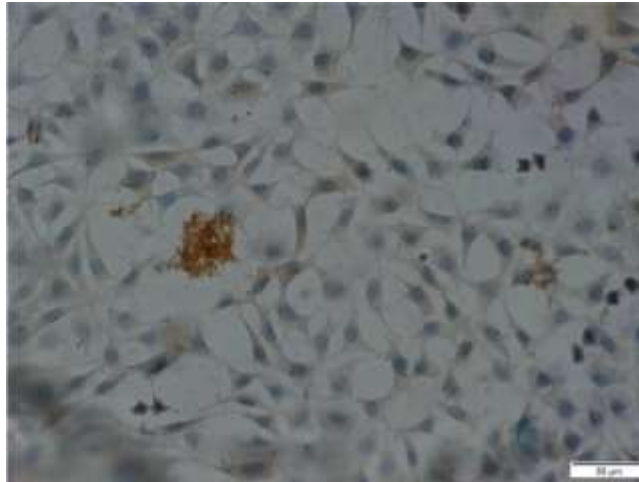
Şekil 4.43. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



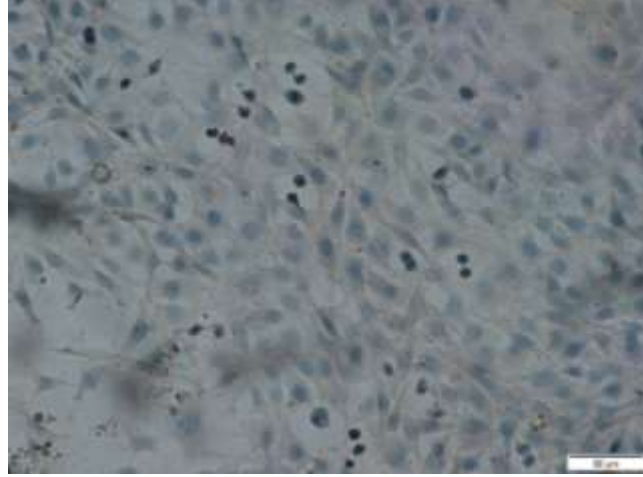
Şekil 4.44. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



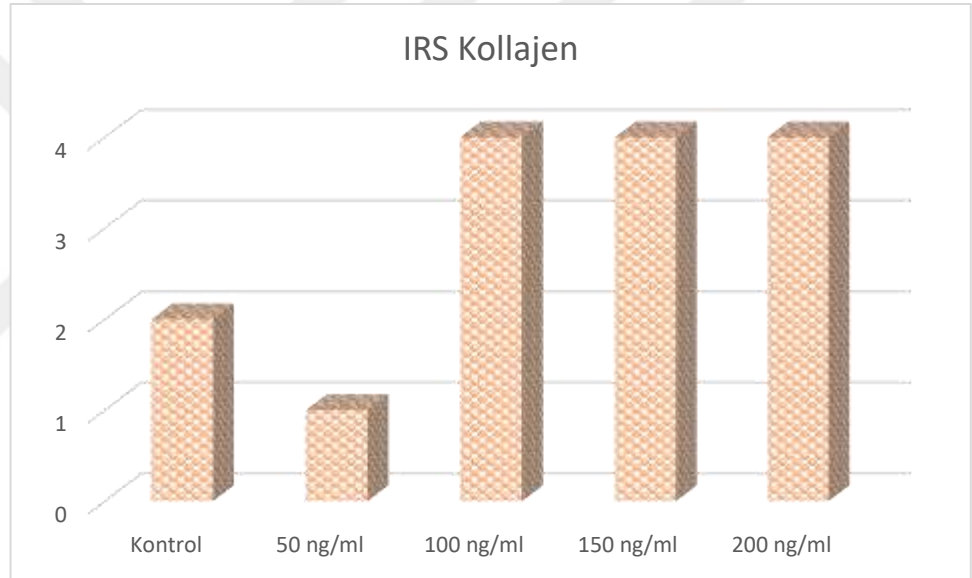
Şekil 4.45. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.46. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



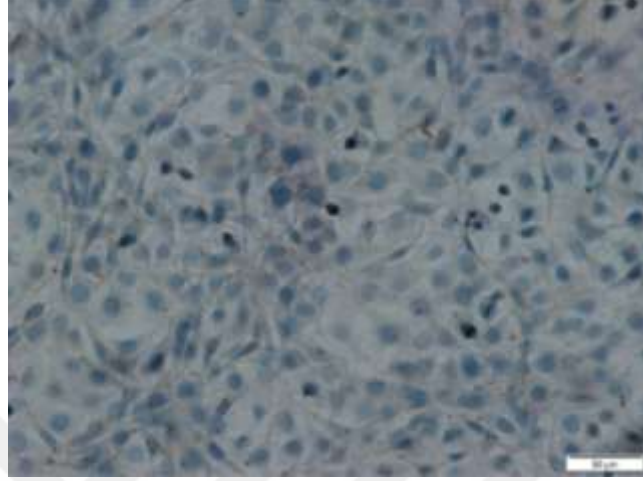
Şekil 4.47. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünositokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi: x20**



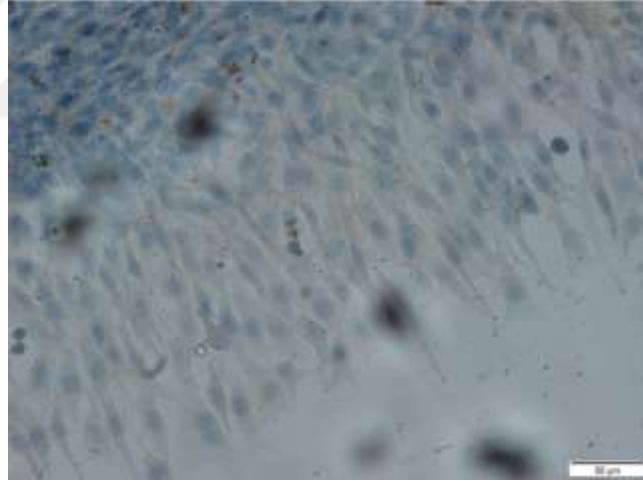
Şekil 4.48. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 24 saatlik gruplarda kollajenin IRS değerlerini gösteren grafik

Human dermal fibroblast hücrelerinde asprosin uygulandıktan sonra 48. saatte gerçekleştirilen, kollajenin immünositokimyasal boyama bulgularına göre ise; kontrol grubundaki hücrelerde immünpozitif boyanmanın daha az sayı ve yoğunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil 4.49). Asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda verildiği fibroblastlarda daha belirgin olmak üzere, bütün dozlarında daha güçlü boyanan immünpozitif hücreler görüldü (Şekil 4.50-53). Kollajen'in fibroblast hücrelerindeki 48. saatteki immünreaktif skor grafiği Şekil 4.54'de verildi. Bütün gruplarda 48. saatte kollajen ekspresyonunu gösteren IRS değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında,

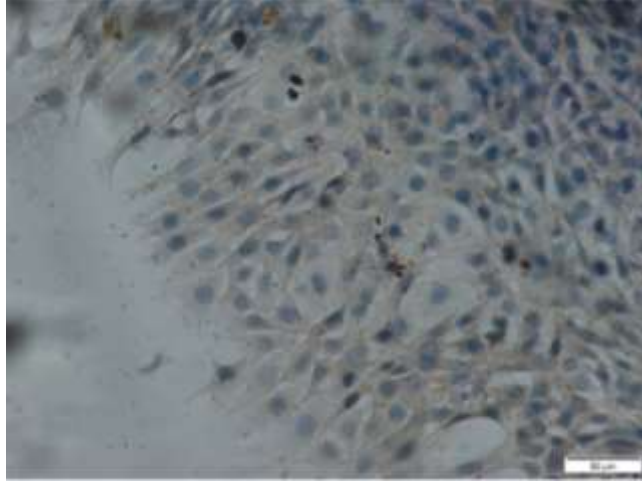
100 ng/ml ($p<0,05$), 150 ng/ml ($p<0,05$) ve 200 ng/ml ($p<0,05$) dozlarında asprosin hormonu verilen hücrelerde skorun belirgin bir şekilde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği tespit edildi.



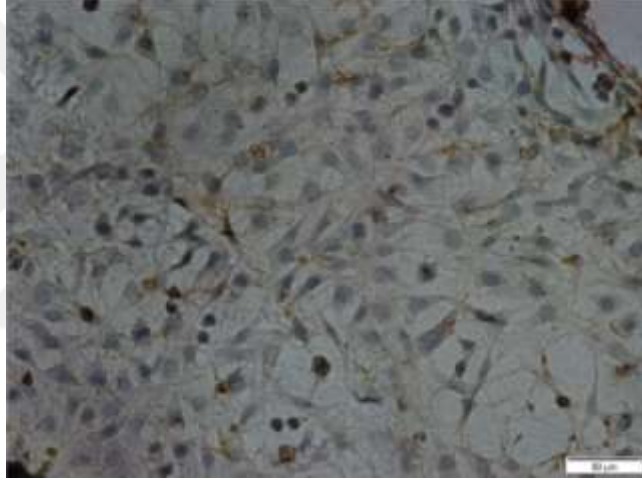
Şekil 4.49. Kontrol grubuna ait fibroblastlarda kollajenin immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



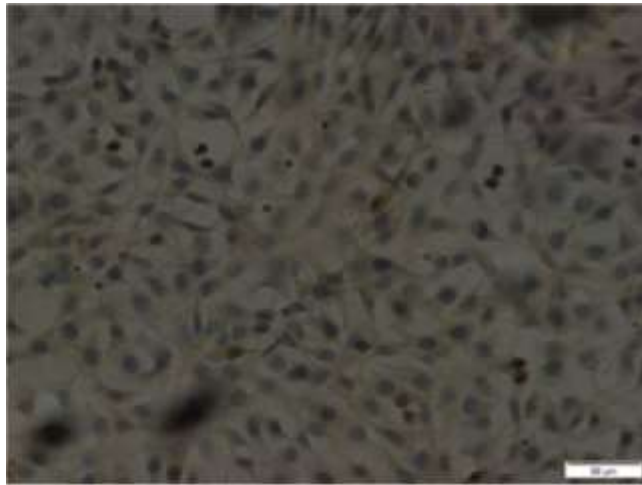
Şekil 4.50. Asprosin 50 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



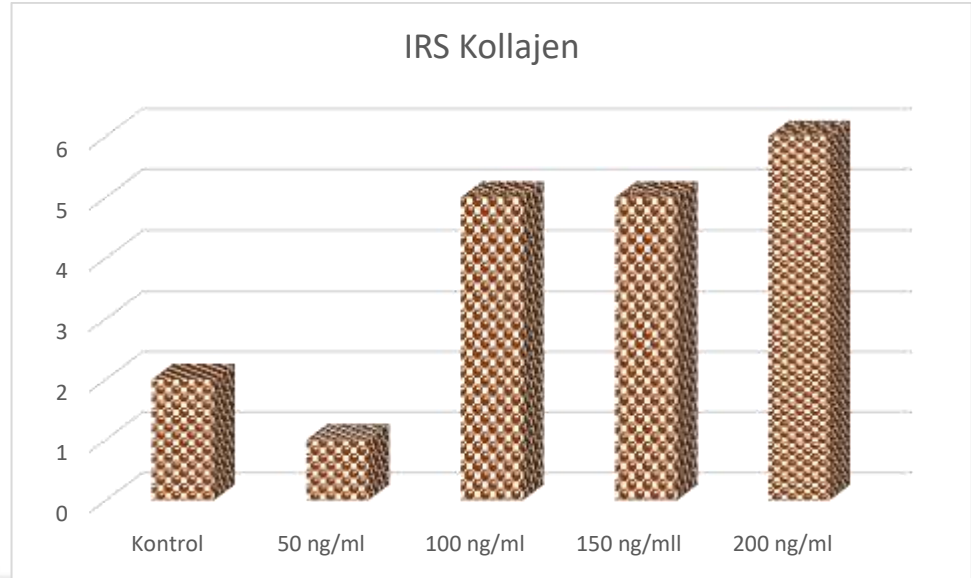
Şekil 4.51. Asprosin 100 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.52. Asprosin 150 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20



Şekil 4.53. Asprosin 200 ng/ml grubuna ait fibroblastlarda kollajen immünohistokimyasal boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü **Büyütme objektifi:** x20

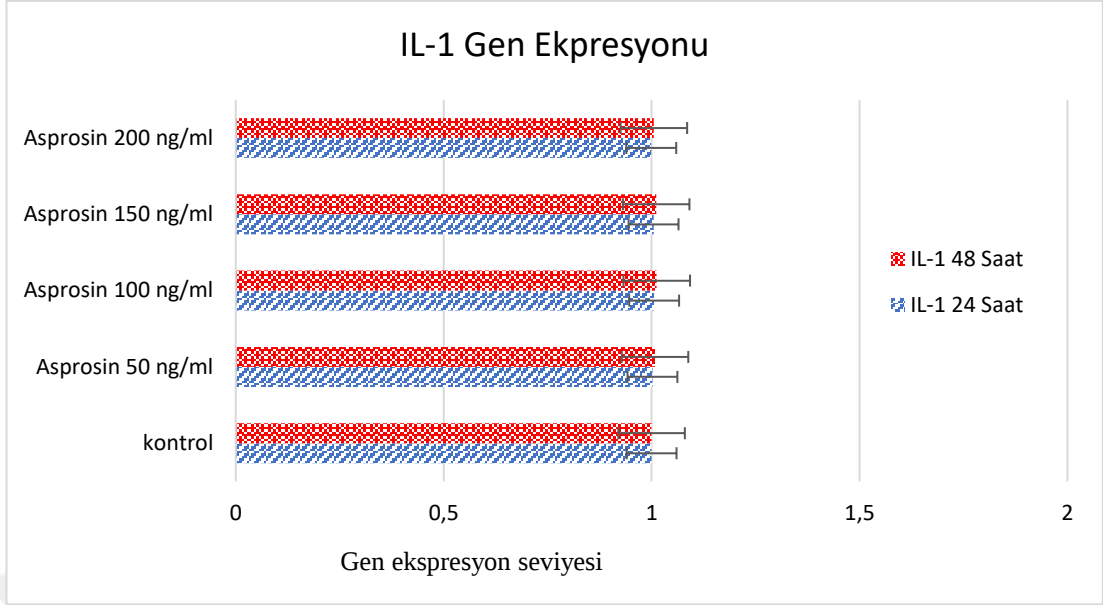


Şekil 4.54. Kontrol ve asprosin hormonu verilen 48 saatlik gruplarda kollajenin IRS değerlerini gösteren grafik

4.5. Real Time-PCR Gen Ekspresyonu Bulguları

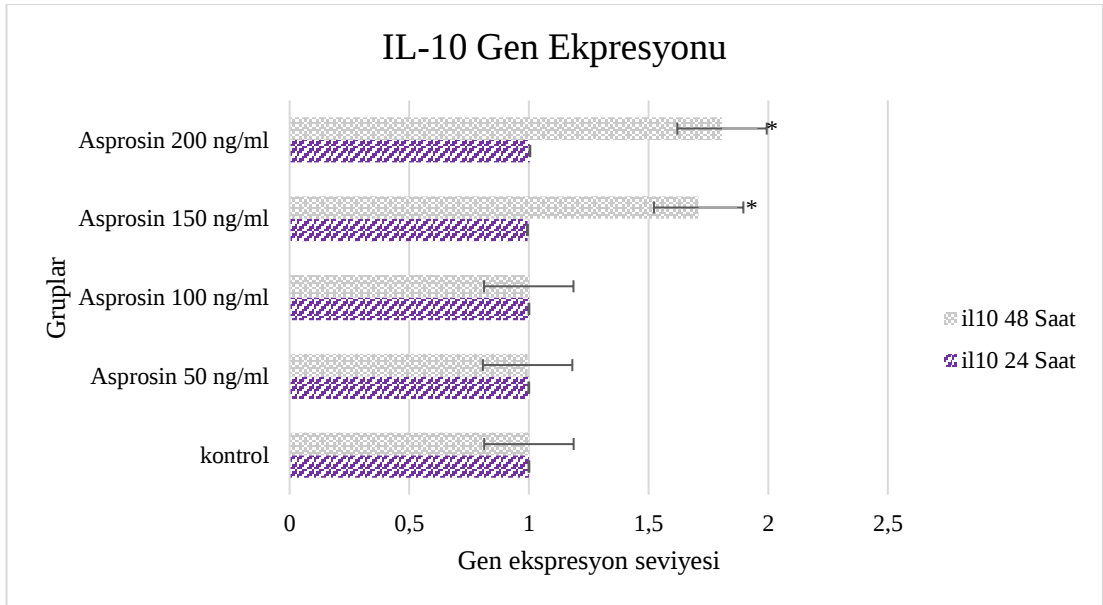
HDF hücre hattındaki fibroblast hücrelerinde, Real Time-PCR ile IL-1, IL-10, fibronectin ve kollajen proteinlerine ait gen ekspresyon analizlerini gerçekleştirmek amacıyla öncelikle hücrelerin hücre kültürü ile çoğaltılması sağlandı. Gerekli besiyeri hazırlanarak 6 kuyucuklu plate'lere hücrelerin ekimleri gerçekleştirildi. Yeterli konfluent sağlandıktan sonra yara çizik deneyi ile bütün gruplarda yara modeli oluşturuldu. Asprosin hormonu verilmeyen kontrol grubu ve belirlenen dozlarda asprosin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde IL-1, IL-10, fibronectin ve kollajen moleküllerine ait gen ekspresyon düzeyleri ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Real Time-PCR ile değerlendirilen, IL-1 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, hem kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplar açısından hem de karşılaştırılan süreler açısından anlamlı bir farklılığa rastlanmadı ($p>0,05$)(Şekil 4.55).



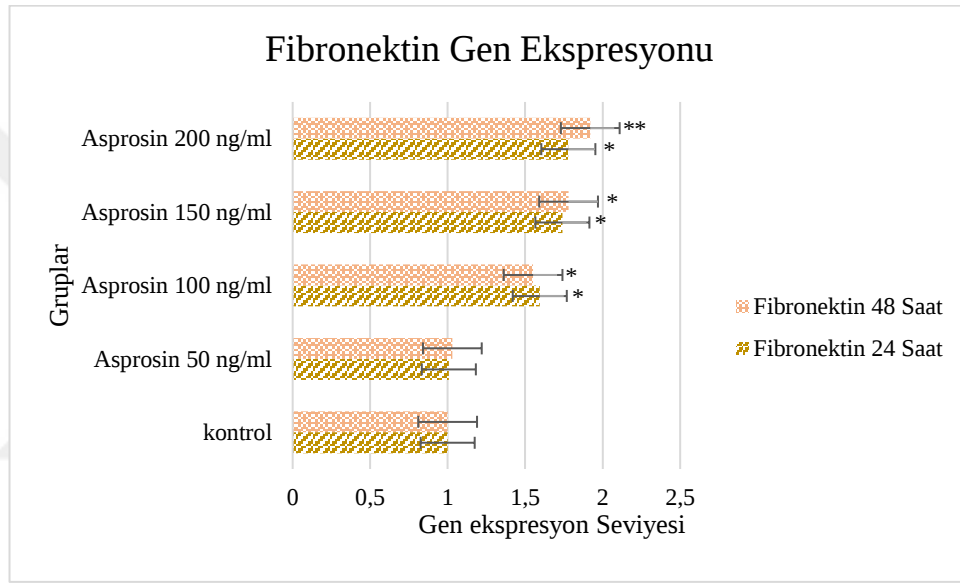
Şekil 4.55. Kontrol ve aspirin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde IL-1'in gen ekspresyon düzeyleri

IL-10 gen ekspresyon düzeyinin 24. saatte aspirin hormonu uygulanan bütün gruplarda kontrol grubu ile benzer olduğu tespit edildi ($p>0,05$). Ancak 48. saatte 150 ng/ml ve 200 ng/ml aspirin hormonu uygulanan gruplarda IL-10 ekspresyonunun belirgin derecede arttığı belirlendi ($p<0,05$)(Şekil 4.56). Ancak iki doz arasında IL-10 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$).



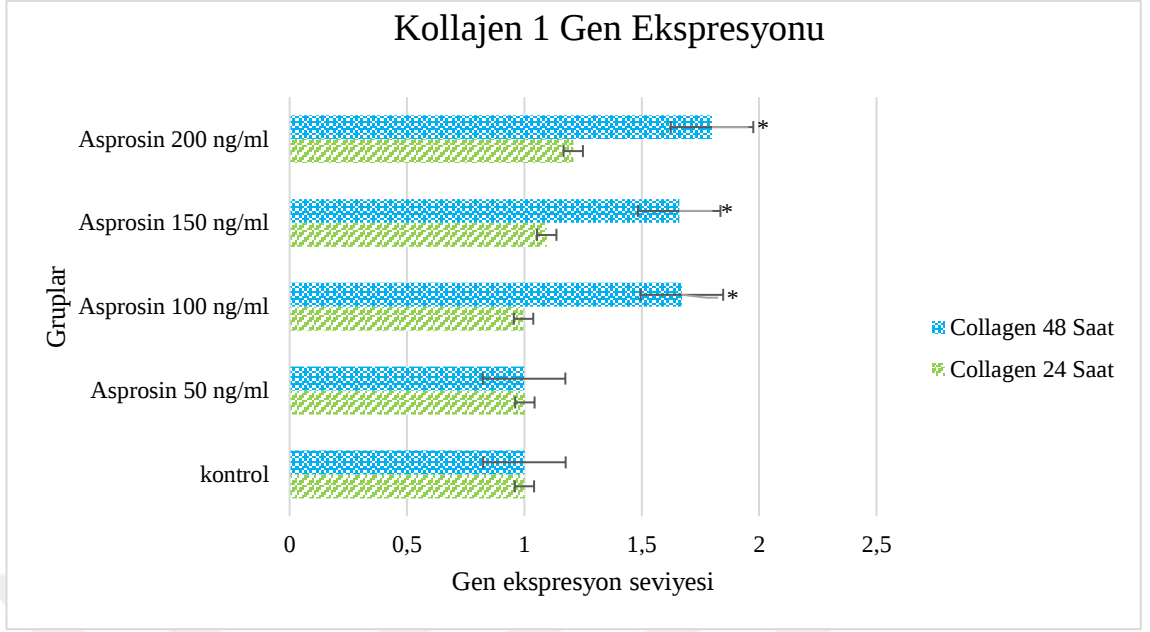
Şekil 4.56. Kontrol ve aspirin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde IL-10'un gen ekspresyon düzeyleri

Hem 24. hem de 48. saatlerde belirlenen fibronektin gen ekspresyon düzeyleri, asprosin hormonunun 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında uygulandığı gruplarda, kontrol grubu ve asprosin hormonunun 50 ng/ml dozunda verildiği gruba kıyasla anlamlı derecede yüksekti ($p<0,05$). Asprosin hormonunun 200 ng/ml grubunda, fibronektin ekspresyonu, diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$)(Şekil 4.57). Asprosinin 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında uygulandığı gruplar, kendi aralarında kıyaslandığında ise aralarında anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$).



Şekil 4.57. Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde fibronektinin gen ekspresyon düzeyleri

Asprosin hormonu verilen bütün gruplarda 24. saatteki kollajen 1 ekspresyonu, kontrol grubu ile benzer düzeyde bulundu ($p>0,05$). Asprosin hormonunun 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında uygulandığı gruplarda, 48. saatteki kollajen 1 ekspresyonu, kontrol ve asprosin hormonunun 50 ng/ml grubuna kıyasla belirgin şekilde artmış olarak tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.58).



Şekil 4.58. Kontrol ve asprosin hormonu verilen gruplarda 24. ve 48. saatlerde kollajen 1'in gen ekspresyon düzeyleri

5. TARTIŞMA

Kesi yaraları, cerrahi suture yaraları, dekübitüs yaraları, diyabetik yaralar ve yanık yaraları gibi kutanöz yaralar, derinin bariyer işlevini kaybetmesi neticesinde bütünlüğünün bozulmasıyla sonuçlanan önemli bir sağlık sorunudur. Bu tarz geç iyileşen yaralar, hem hastanelerde kalma hem de evde bakım sürelerinin uzaması da düşünüldüğünde, birçok insan için maddi, psikolojik ve estetik olarak sorun teşkil etmektedir. Akut ve kronik yaraların tedavisinde sıklıkla tercih edilen topikal ajanların kullanımında [222] hem tedavi süresi uzamakta hem de bazen tam bir iyileşme sağlanamamaktadır. Bu yaraların tedavisinde; yara örtüleri [223] ve biyomekanik yara bakımı [224] ile geleneksel ve tamamlayıcı tıp ‘GETAT’ uygulamaları [34, 225, 226] ve trombositten zengin plazma (PRP) [227] gibi farklı tedavi protokolleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin bazılarının yüksek maliyetli olması, bazılarının da neden olduğu yan etkiler ve de tedavilerinde gidilmesi gereken merkezlere ulaşımın zorluğu gibi nedenlerle kullanımları kısıtlı kalmaktadır. Güncel cilt yenilenmesi ve güneş yanıkları tedavilerinde topikal kullanılan insülin hormonu [228, 229] gibi hormonların, popüler kozmetik markaların içeriklerinde bile bulunuyor olması, bilimsel açıdan asprosin gibi hormonların da bu konuda araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda yara iyileşme deneylerinde adipokinlerin ve hormonların yer alması yara tedavilerine farklı bir yaklaşım getirmektedir [230-233]. Yağ dokusundan salınan bu adipokinlerin bazılarının anti-inflamatuar, bazılarının ise pro-inflamatuar etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [230, 234-238]. Ayrıca adipokinlerin kutanöz inflammatuar süreçlerde etki göstererek aktif düzenleyici faaliyetlerde bulunabileceklerinden bahsedilmektedir [230, 239]. Birçok kutanöz hastalıkla ilişkilendirilen adipokinlerin, inflammatuar sürece etkileriyle yara iyileşmesinde rolü olabilmektedir [240-243]. Yine yapılan bazı çalışmalar, yaranın 24 saat içinde adipositlerin yara yerini doldurduğunu, büyüme faktörlerini salgıladığını ve ESM proteinlerinin de yara bölgesine toplanmasını sağladığını göstermişlerdir [244, 245]. Bunlarla birlikte birçok klinisyen, yara izini azaltmak ve yara iyileşmesini hızlandırmak adına yağ otogreftlerinin kullanılması taraftarıdır [246-250]. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, liposuction (yağ aldırma) veya lipom eksizyonu yapılarak, daha

sonra yağın çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılmasıyla insan ESM tabakası elde edilmiş, biyoaktif bu tabakanın yara üzerinde kullanılması iyileştirici etkiler göstermiştir [146]. Bu bilgiler doğrultusunda, asprosin hormonunun da deri altı yağ dokusundan salgılandığı düşünüldüğünde, mevcut çalışmada asprosin hormonunun yara iyileşmesindeki muhtemel iyileştirici etkisini HDF hücre hattında, hem immünohistokimyasal olarak hem de moleküler düzeyde araştırmayı amaçladık.

Asprosin hormonu, FBN 1 geni ile kodlanmış profibrillin proteinin C terminal bölünme ürünüdür [199]. Açlık durumunda yağ dokusundan salgılanan bir adipokin olan asprosin hormonu, zayıf ve lipodistrofiye bağlı kendilerine has fenotipleriyle tanınan, yeni doğan progeroid sendromlu hastalarda, deri altı beyaz yağ dokusundaki azalma ile araştırılmış ve bu yağ dokusunun plazma asprosin kaynağı olmasıyla bu ismi almıştır [199]. Asprosin hormonu, karaciğerde OLFR734 adı verilen ve rodopsin ailesinden olan bir G proteini aracılığı ile cAMP-PKA yolağını aktifleştirerek kan glukoz seviyesini artırmakta, takiben de pankreasın β hücrelerinden insülin salınımına yol açmaktadır [251]. Beyinde ise henüz keşfedilememiş bir reseptörü ile cAMP bağımlı bir yolakla, kan beyin bariyerini geçerek doğrudan AgRP + nöronlarını uyatarak iştahı artırmaktadır [191].

Adipokinlerden visfatin, ERK1/2 ve JNK1/2 yolağının aktivasyonu ile yara iyileşmesi üzerine olumlu etki göstermektedir [161]. Adiponektin ise keratinosit proliferasyonu ve ERK sinyal yoluyla keratinosit migrasyonunu teşvik etmektedir [162]. Ayrıca, yapılan bir çalışmada adiponektinin, OCCM-30 (sementoblast) hücre hattındaki hücrelerde, 24 saatte mitojenik aktiviteyi artırdığı ve yara alanını büyük ölçüde kapattığı gösterilmiştir [163]. Progranülin adipokini ise, ERK1/3 ile PI3K bağımlı yollar aracılığıyla, yaralı dokuda mitotik aktiviteyi ve hücre göçünü artırmasının yanı sıra Akt ile MAPK yollarının aktivasyonu ile da etki göstermektedir. [164, 165]. Bu bilgiler, adipokinlerin yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu, yeni bulunmuş bir oreksijenik adipokin olan asprosin hormonunun da etkisinin araştırılması gerektiğini göstermektedir.

İştahı etkileyen hormonlar ve yara iyileşmesindeki bilinen etkileri incelendiğinde, oreksijenik ve anoreksijenik hormonların yara iyileşmesi üzerindeki

etkinlikleri de araştırılmıştır. Mide kaynaklı oreksijenik bir hormon olan ghrelinin pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını baskılayarak yanığın neden olduğu organ hasarını iyileştirdiği belirtilmiştir [179]. Anoreksijenik bir adipokin hormon olan leptinin, yara bölgesinde bulunan keratinositler üzerindeki mitojenik etkisinden dolayı yara onarımını hızlandırdığı belirtilmektedir [252, 253]. Oreksijenik nöropeptit hormonlardan MCH (melanin konsantre edici hormon)'nin ise kollajen üretimini artırdığının gösterilmesi ile miyofibroblastlar üzerine olan etkilerinden ötürü profibrotik bir modülatör olabileceğinden bahsedilmiştir [180]. Yine bu bilgiler ışığında oreksijenik bir adipokin olan asprosin hormonu, yara iyileşmesinde birçok önemli role sahip olmaktadır.

Obezitede adipositler sayı ve hacim olarak artmıştır, böylelikle karmaşık ve aktif bir metabolik endokrin organ olarak ifade edilen yağ dokusu artışı da gözlenmektedir [238, 254]. Yağ dokusu enerji depolaması ve açlık esnasında da yağ asidi salınımını sağlarken aynı zamanda adipokinler olarak adlandırılan visfatin, leptin, resistin ve adiponektin gibi çeşitli molekülleri de ihtiva etmektedir [238, 254]. Birçok adipokin proinflamatuar etki göstermektedir. Obezite proinflamatuar adipokinlerin salınımını artırırken, az sayıda bulunan anti-inflamatuar adipokinlerin ise azalmasına neden olur [238, 255]. Asprosin hormonun gösterdiği anti-inflamatuar etkisiyle obezitedeki rolü ilerideki zamanlarda daha çok tartışılacaktır [179, 256].

Asprosin hormonu, yağ dokusundan salgılanıp glikozu artırması ve iştahı tetiklemesi gibi nedenlerden dolayı, obez, diyabetli ve metabolik sendromlu kişilerde yüksek seviyelerde bulunmaktadır [257-259]. Tip 2 diyabetli hastalarda, yüksek seyir gösteren kan glikozunun ve insülin hormonunun fazla olmasına rağmen, reseptörler aracılığıyla glikozun hücrelere alınmasında bozukluk yaşanmaktadır [260, 261]. Asprosin hormonu, karaciğerdeki ilgili reseptörüne bağlanarak kan glikoz seviyesini artırmasını takiben pankreastan insülin hormonunun salınımını artırır [199]. Araştırmalar göstermiştir ki, asprosin hormonu kanda yüksek seviyelerde iken, kan glikoz ve insülin miktarı da artış gösterir ve periferik organlar artmış insüline rağmen glikozu hücre içine almazlar [199]. Asprosin hormonun bu etkileri doğrultusunda, birçok araştırmacı bu hormonun inhibe edilmesi ile hastalıkların olumlu seyredeceklerini düşünmüşlerdir. Ancak, yağ dokusu [191] ve tükürük bezleri gibi

birçok yerden de sentezlendiği gösterilen [256] asprosin hormonunun, kendi çalışmamız ve diğer çalışmalarda da gösterildiği gibi, anti-inflamatuar etki göstermesi, bu hormonun inhibe edilmesi düşüncesini her zaman desteklememektedir [257, 262]. Diyabetli hastalarda, mikro ve makrovaskülerizasyon bozukluğuna bağlı çeşitli komplikasyonlar tanımlanmıştır [263, 264]. Mikroanjiyopati gelişimiyle; yara iyileşmesinde gecikme ile diyabetik ayak gibi çeşitli istenmeyen sonuçlarla karşı karşıya kalınmaktadır [265, 266]. Asprosin hormonu, iştahı artırması, yağ dokusundan salınması ve glukoneogenezle bağlantıları nedeniyle, obezite ve diyabetle yakın ilişki içerisinde. Obez ve diyabetli kişilerdeki yaraların iyileşme gücünün düşünülmesinde [267-269], asprosin hormonunun etkileri bu konuda araştırılmaya her zaman adaydır. Çalışmamızda, kutanöz yaralarda yeni terapötik tedavi yöntemlerinin bulunması açısından önemli olan asprosin hormonunun, yara iyileşmesindeki rolü, hücre viabilitesi ve proliferasyonu, inflamasyon ve ESM komponentleri araştırılarak değerlendirildi. Bu amaçla da, fibroblast hücre hattında in vitro olarak yara çizik deneyi oluşturuldu. Çoğalan hücrelerde, pro ve anti-inflamatuar ajanlar (IL-1 ve IL-10) ile ESM komponentlerinden olan fibronektin ve kollajenin ekspresyonu immünohistokimyasal boyanma ve gen ekspresyon düzeylerine bakılarak araştırıldı.

Yaptığımız tez çalışmasında, asprosin hormonunun yara iyileşmesi üzerine etkisi HDF hücre hattında 'In vitro scratch assay' tekniği ile değerlendirildi [211, 212, 270]. Daha önce gerçekleştirilen bir scratch assay araştırmasında; farklı yağ dokularından izole edilen leptin, visfatin gibi adipokinler ile insülin hormonunun fibroblast hücrelerindeki yara iyileştirme etkilerine bakılmış ve olumlu etkiler sergiledikleri gösterilmiştir [271]. Yeni tanımlanan başka bir adipokin olan chemerinin, en yüksek doz olan 100 ug/l ile hücre göçünü artırdığı rapor edilmiştir [166]. Başka bir adipokin olan adiponektinin ise scratch assay tekniğinde fibroblast göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir [272]. Çalışmamızda, 200 ng/ml dozunda verilen asprosin hormonunun diğer bütün gruplara göre, hücre göçünü daha fazla artırdığını ve yara hattını kapattığını gözlemledik. Bu durum, asprosin hormonunun, fibroblastların hem proliferasyonunu ve hem de göçünü indükleyerek yara alanını daha hızlı kapattığını ve yara iyileşmesini artırdığını göstermektedir. Yaptığımız çalışmada ayrıca, asprosin hormonuyla muamele edilen fibroblast hücre hattında, yara iyileşme

aktivitesi 24. ve 48. saatlerde 200 ng/ml dozunda en yüksek seviyede bulundu. Diğer gruplarda da kontrolden daha ileri seviyede gerçekleşen hücre proliferasyonunun aynı zamanda yara iyileşmesi deneyinden elde edilen sonuçlar ile de uyumluluk gösterdiği belirlendi.

Asprosin hormonunun, cAMP PKA'yı aktive ederek kronik inflamasyonda iyileştirici etkilerinin olabileceği bildirilmiştir [179, 257]. Pankreas β hücrelerinde ise palmitatla indüklenmesi sonucu TLR4/JNK yoluyla aracılığıyla inflamasyon ve hücre disfonksiyona neden olduğunu gösteren çalışma mevcuttur [200]. Bu bilgilere ek olarak cAMP yolunun inflamatuvar sitokinleri PKA üzerinden baskıladığı bilinmektedir [273]. Asprosin üzerine yapılan çalışmalarda, asprosinin inflamatuvar ve anti-inflamatuvar etkilerinin ikisinin de var olduğu gösterilmiştir [179]. İnflamasyon üzerine etkili olan IL-1 α , genellikle IL-1 α sentezleyen hücrenin plazma zarı ile ilişkilidir ve bu nedenle lokal olarak hareket eder, dolaşıma geçerek sistemik hareket etmez [274-277]. Buna ek olarak, IL-1 α hücre çekirdeğinden sentezlendikten sonra hücre dışına kendi reseptörleriyle salınır [278]. Bu bilgiler bize IL-1 α 'nin hem çekirdekte hem de ESM'de bulunabileceğini göstermekle birlikte hücrelerde yapılan immünfloresan boyama metodunda intrasellüler bölgede olduğu gösterilmiştir [279]. Yapılan in vivo ve ex vivo çalışmalarda da, IL-1'nin cildin fibroblast bulunduran dermis kısımlarında, hem intrasellüler alanda hem de ESM'de immunpozitiflik gösterdiği rapor edilmiştir [280, 281]. Ayrıca, IL-1'in fibroblastlardan salgılanıp keratinositlerin göçünü indüklediği de gösterilmiştir [282-286]. Keratinositlerden yaralanma sonrası IL-1 sentezlenir. IL-1 de otokrin etkiyle fibroblast proliferasyonu ve keratinosit büyümesini tetikleyip, fibroblastlardan da kollajen sentezini ve keratinositlerin kemotaksisini uyarır [282, 287-290]. IL-1 ayrıca, TGF β ve IL-6 gibi profibrotik sitokinlerin üretimini de sağlar [282, 291, 292]. Yüksek proinflamatuvar sitokin ekspresyonu, sistemik otoimmün ve metabolik bozukluklarda iyileşmeyen cilt yaralarında gözlenmekle beraber, bu faktörlerin düşük üretimi de deri yaralarının enfeksiyonu ve normal iyileşmenin önlenmesiyle sonuçlanmaktadır [293]. Bununla birlikte, inflamasyonun orta düzeyde indüklenmesinin yara iyileşmesini desteklediği de bildirilmiştir [293]. Bunlara ek olarak, proinflamatuvar sitokinlerin azalmasının iyileşmeyi artırdığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Biz de, pro-

inflatuar sitokinlerden olan IL-1'in imm npozitifliğini özellikle 200 ng/ml asprosin verilen grupta artmış olarak gözlemlemekle birlikte IRS değerlendirmesi yapıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını belirledik. Ayrıca, Real Time-PCR ile gerçekleştirdiğimiz gen ekspresyonu sonuçlarımızda da farklı dozlarda vermiş olduğumuz asprosin hormonunun, IL-1 gen ekspresyon seviyeleri üzerinde anlamlı bir değerikliğe neden olmadığını tespit ettik. Çalışmamızda, immünositokimyasal bulgularımız Real Time-PCR sonuçlarımızla uyum göstermekte ve asprosin hormonunun IL-1 aracılı inflamasyon üzerine etkisi olmadığını düşündürmektedir.

IL-10'un inflamatuvar yanıtın baskılanmasında ana düzenleyici faktör olduğu bilinmektedir [112]. İnflatuar etkileri dindirmek için fibroblastlardan da salınabilen bu sitokin yara iyileşmesi çalışmalarında değerlendirilen önemli markerlardandır [294, 295]. Hücre düzeyindeki uyarılar, çeşitli sinyal yolaklarının aktive olmasını ve IL-10'un hücre dışına salınımını tetiklemek gibi mekanizmalar oluşturur [296]. Bunlarla birlikte, daha önce dermal fibroblast hücre hattında immünfloresan boyalar ile IL-10'un çekirdek düzeyinde tutulumunun olduğu da yayınlanmıştır [297]. Yine in vivo ve ex vivo çalışmalarda, dermiste IL-10'un hücreye özgü boyandığını gösteren yayınlar mevcuttur [298]. Yaptığımız çalışmada, asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda verildiği grupta 48. saatte IL-10'un imm npozitifliği ve IRS değerleri diğer bütün gruplardan yüksek bulundu. Bununla birlikte 150 ng/ml dozunda asprosin verilen grupta da 48. saatte kontrol grubundan daha iyi immünpozitiflik elde edildi ve IRS değerleri de yüksek gözlendi. IL-10'un aşırı ekspresyonuyla yaraların iz kalmadan iyileştiği rapor edilmiştir [112, 114, 298, 299]. Adipokinler  zerine yapılan bir çalışmada, kolorektal hücreleri üzerinde yara iyileştirme deneyi gerçekleştirilmiş ve IL-10'un azalmasının hücre göçünü azaltığına dair kanıtlar sunulmuştur [300]. Tendon yırtıkları üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, anti-inflatuar sitokin olan IL-10 tedavisi sonrası, yara iyileştirme deneyi uygulanmış, tendon türevli kök hücrelerinin proliferasyonunun ve göçünün arttığı bildirilmiştir [301, 302]. Başka bir tendon yaralanması çalışmasında da IL-10'un mRNA ekspresyonlarında, yara iyileşmesinin geç inflamatuvar fazında önemli ölçüde artış gösterdiği rapor edilmiştir [303]. Çalışmamızda, asprosinin yüksek dozlarda IL-10'un ekspresyon seviyelerini artırdığı bu durumun da immünositokimyasal bulgularımızı destekler biçimde olduğu gözlendi.

IL-10 seviyelerinin 48. saatte artmış olması ve yara çizik deneyimizde yara alanının kapanması asprosin hormonunun anti-inflamatuar etki ile yaraları iyileşmede fonksiyon görebileceğini düşündürür niteliktedir.

Fibroblastlar, tüm organlarda ESM'yi baskın olarak üreten hücrelerdir [304]. Yara iyileşmesinin ilk aşamalarında aktif olarak çoğalır ve yara bölgesine göç ederek yeni ESM ve miyofibroblastların sentezini indüklerler [305]. Ekstrasellüler matriksi oluşturan proteoglikanlar ve fibröz proteinlerin içinde ESM'yi oluşturan majör yapıştırıcı protein fibronektindir [1]. Yapılan çalışmalarda, fibronektinin yaralanma sonrası ilk olarak sitoplazmik bölgede biriktiği, ilerleyen zamanlarda sitoplazmanın dışına çıkarak perisellüler bölgede izlendiği immünfloresan boyalar ile gösterilmiştir [306]. Yapılan bir ex vivo yara iyileşmesi çalışmasında, dermiste fibronektinin yoğun fibriller halinde ve ESM'yi doldurur biçimde immünpozitiflik gösterdiği raporlanmıştır [307]. Bizim çalışmamızda, asprosin verilen 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarındaki gruplarda 24. ve 48. saatlerde fibronektin IRS değerleri kontrol grubundan daha yüksek bulundu. Bu etki asprosin hormonunun en yüksek dozu olan 200 ng/ml'de daha da belirgin şekilde saptandı. Fibronektinin yüksek olarak belirlendiği gruplarda, özellikle 48. saatte yaranın tamamen kapanmış olması literatürle uyumlu bir şekilde fibronektinin yara iyileşmesini artırdığını gösterdi. Fibronektin HDF hücre hattında bir kemoatraktan olarak bilinmektedir. Li ve ark. yaptıkları çalışmalarında fibronektinin HaCaT olarak da bilinen keratinosit hücre hattını uyardığını göstermişlerdir [308]. Bunlara ek olarak fibronektin, keratinositlerin çoğalmasını da düzenlemektedir [309]. Başka bir yara iyileşme deneyi araştırmasında, bitkilerden elde edilen bileşiklerden olan DK223 ([1 E, 2 E -1,2-bis(6-methoxy- 2H)-kromen-3-il)metilen]hidrazin)) maddesinin HDF hücre hattında fibronektini artırdığı gösterilmiştir [67]. Bu araştırmalara benzer şekilde çalışmamızda da; fibronektinin, 24. ve 48. saatlerde belirlenen gen ekspresyon düzeyleri, asprosin verilen 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarındaki gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, immünositokimyasal bulgularımızı destekler şekilde yüksek bulundu. Yani çoğalan fibroblastlar, hem göç ederek yara yerini kapatmış, hem de fibronektin sentez ve salınmasını artırarak ESM oluşumunu artırmıştır. Başka bir ifade ile asprosin

hormonu, fibroblastlardan fibronektin ekspresyonunu uyararak yara iyileşmesini artırmaktadır.

Ekstrasellüler matriksin temel bileşenlerinden olan kollajen, sentezlenirken, endoplazmik retikulumda sert makromolekül yapıdaki pro-kollajenden üretilir. Sonrasında bu molekül, golgi organelinde büyük bir veziküle alınarak transmembran proteinleri aracılığı ile hücrelerden dışarıya salınır ve hücre dışı alanda enzimler vasıtasıyla kollajen halini alır [310, 311]. Kollajen, vücutta en çok bulunan protein olmakla birlikte [312] ESM'yi oluşturan fibröz proteinlerin baskın olan yapısal komponentidir [313]. Deriye mukavemet sağlayan ve yapıştırıcı özellikte olan bir moleküldür. Hücre göçünde de önemli görevler üstlenmektedir [313, 314]. Kollajen 1 hemen tüm dokularda bulunmakla beraber, deri ve tendonda en çok bulunan kollajen formudur [313]. Yara iyileşmesi için önemli faktör olan yara kontraksiyonu, kollajen sentezi ve granülasyon dokusu oluşumu sayesinde gerçekleşebilmektedir [313, 315]. Çağdaş yara iyileşmesi araştırmaları, kollajen üreten fibroblastların aktivasyonunu gerçekleştirecek yeni terapötik ajanların tanımlanmasına odaklanmıştır [315, 316]. Kollajen tip 1, yara iyileşmesi ve anjiogenez esnasında ve hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesi gibi büyük hücresel olayları indüklemek için ihtiyaç duyulan çok önemli bir faktördür [118, 313, 316, 317]. Ayrıca kollajen 1 keratinosit hücre göçünü de artırmaktadır [318]. Anoreksijenik adipokinlerden olan leptin hormonunun ve 2020 yılında keşfi yapılan dermatopontin isimli adipokininin, kollajen seviyesini artırarak yara iyileşmesini teşvik ettiği rapor edilmiştir [202]. Fibroblastlarda yapılan bir yara iyileşmesi çalışmasında, kollajen 1'in immünfloresan boyanmasında intrasellüler boyanma gösterdiği belirtilmiştir [319, 320]. İn vivo ve ex vivo olarak gerçekleştirilen başka bir araştırmada, kollajen 1'in dermiste fibriller halinde yoğun immünpozitiflik gösterdiği bildirilmiştir [321]. Mevcut çalışmada, asprosin hormonunun 200 ng/ml dozunda uygulandığı grupta, 48. saatte yara alanı tamamen kapandı ve kollajen 1'in immünpozitifliğini gösteren IRS değerleri diğer bütün gruplardan daha yüksek seviyede gözlemlendi. 100 ng/ml ve 150 ng/ml dozlarında asprosin verilen gruplarda da 48. saatte kontrol grubundan daha yüksek IRS değerleri tespit edildi. Bulgularımız, asprosinin özellikle yüksek dozlarda uygulandığı gruplarda, kollajen 1 ekspresyonunun artarak HDF hücre hattında hücre proliferasyonu ve göçünü

uyardığını böylece yara hattının tam olarak kapandığını göstermektedir. Yine yaptığımız moleküler analizlerde de, asprosin hormonunun 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml dozlarında verilen gruplarda, özellikle 48. saatte kollajen 1 ekspresyonunun artması, immünohistokimyasal olarak elde ettiğimiz sonuçları destekleyici niteliktedir.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular, bize asprosin hormonunun pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-1 aracılığıyla etki etmediğini, IL-10 molekülünü artırarak anti-inflamatuar etki ile yara iyileşmesinde skar oluşumunu azaltarak etkili olabileceğini düşündürmektedir [112]. Ayrıca, asprosin hormonunun, ESM'yi oluşturan majör yapıştırıcı protein olan fibronektin seviyelerini artırması sayesinde, hem fibroblast göçünü hem de ESM'nin oluşumunu desteklediğini, böylelikle de yara iyileşmesinde önemli rol oynadığını görmekteyiz. Benzer şekilde, asprosin hormonu kollajen 1 seviyelerini artırmakta, bu da deriye mukavemet sağlayarak ve ESM içindeki diğer komponentlerin birbirine bağlanmasını kolaylaştırarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Kollajen 1'in hücre göçünü sağlaması da yine yara iyileşmesinde olumlu sonuçlara yol açmaktadır. Sonuç olarak, asprosin hormonunun anti-inflamatuar etki göstererek ve ESM komponentlerinden fibronektin ve kollajen 1'in ekspresyonunu artırarak yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olabileceği kanaatindeyiz.

Elde edilen bulgular sonucunda, daha önceden kuramsal düzeyde belirtilmiş olmasına rağmen, asprosin hormonun yara iyileştirici etkisini deneysel olarak ilk kez açıklayarak bilime katkı sağladığımızı düşünmekteyiz. Asprosin hormonunun inflamasyon üzerindeki etkilerinin tekrar değerlendirildiği tez çalışmamızın, gelecekteki birçok araştırmacı için yol gösterici olacağını ümit etmekteyiz.

Asprosin hormonunun yalnızca yara iyileşmesinde değil, bu konuda yapılan araştırmaların seyrine bakıldığında, kozmetik amaçlı da kullanılabileceğini ön görmekteyiz. Gelişen teknoloji, yeni bulunan teknikler ve moleküller ile asprosin hormonunun yara iyileşmesi konusundaki ilişkisi daha iyi değerlendirilecektir. Bu araştırma, terapötik ajanlar içinde asprosinin de yer alması gerektiğini göstermekle birlikte, yara iyileşmesinde, güncel tedavi protokollerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalara kılavuzluk edecektir. Asprosin hormonunun bu etkiyi nasıl ve hangi

sinyal yolları üzerinden gerçekleştirdiği gelecekteki araştırmacıların hedefleri arasında olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Seventh edition. ed. 2016, Philadelphia: Wolters Kluwer Health. xv, 984 pages.
2. Khavkin, J. and D.A. Ellis, *Aging skin: histology, physiology, and pathology*. Facial Plastic Surgery Clinics, 2011. **19**(2): p. 229-234.
3. Urmacher, C., *Histology of normal skin*. The American journal of surgical pathology, 1990. **14**(7): p. 671-686.
4. Kierszenbaum, A.L. and L. Tres, *Histology and cell biology: an introduction to pathology E-book*. 2015: Elsevier Health Sciences.
5. Yousef, H., M. Alhajj, and S. Sharma, *Anatomy, skin (integument), epidermis*. 2017.
6. Agarwal, S. and K. Krishnamurthy, *Histology, skin*. 2019.
7. Smith, S.A. and B.A. Dale, *Immunologic localization of filaggrin in human oral epithelia and correlation with keratinization*. Journal of investigative dermatology, 1986. **86**(2): p. 168-172.
8. Weinmann, J., *The keratinization of the human oral mucosa*. Journal of Dental Research, 1940. **19**(1): p. 57-71.
9. Phillips, L.P., E.S. Caruso, and L.L. Paine, *Comprehensive dermatologic assessment*. Journal of nurse-midwifery, 1995. **40**(2): p. 172-186.
10. Kolarsick, P.A., M.A. Kolarsick, and C. Goodwin, *Anatomy and physiology of the skin*. Journal of the Dermatology Nurses' Association, 2011. **3**(4): p. 203-213.
11. Eckert, R.L., *Structure, function, and differentiation of the keratinocyte*. Physiological reviews, 1989. **69**(4): p. 1316-1346.
12. Lambert, M.W., et al., *The physiology of melanin deposition in health and disease*. Clinics in dermatology, 2019. **37**(5): p. 402-417.
13. Lin, J.Y. and D.E. Fisher, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 843-850.
14. Braun-Falco, O., et al., *Disorders of melanin pigmentation*, in *Dermatology*. 2000, Springer. p. 1013-1042.

15. Brown, T.M. and K. Krishnamurthy, *Histology, dermis*. StatPearls [Internet], 2020.
16. Ovalle, W.K. and P.C. Nahirney, *Netter's Essential Histology: with Student Consult Access*. 2013: Elsevier Health Sciences.
17. Costa, H.S., et al. *Towards biometric identification using 3D epidermal and dermal fingerprints*. in *2016 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*. 2016. IEEE.
18. Biggs, L.C., et al., *Mechanical forces in the skin: Roles in tissue architecture, stability, and function*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2020. **140**(2): p. 284-290.
19. Gartner, L.P., *BRS cell biology and histology*. 2018: Lippincott Williams & Wilkins.
20. Anthony, L.M., *Junqueira's basic histology: text and atlas*. 2013, LANGE Series, McGraw-Hill Medical.
21. Mescher, A.L., *Junqueira's basic histology: text and atlas*. Vol. 12. 2013: McGraw-Hill Medical 13th ed. New York.
22. Sadler, T.W., *Langman's medical embryology*. Vol. 333. 2006: Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
23. Moore, K.L., T. Persaud, and M.G. Torchia, *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects (with Student Consult Online Access)*. 2007: Elsevier Health Sciences.
24. Carachi, R. and S.H.E. Doss, *Clinical embryology: an atlas of congenital malformations*. 2019: Springer.
25. McGrath, J., R. Eady, and F. Pope, *Anatomy and organization of human skin*. *Rook's textbook of dermatology*, 2004. **1**: p. 3.2-3.80.
26. Moore, K.L., T.V.N. Persaud, and M.G. Torchia, *Before We are Born E-Book: Essentials of Embryology and Birth Defects with STUDENT CONSULT Online Access*. 2015: Elsevier Health Sciences.
27. Sheng, G., *The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs)*. *BMC Developmental Biology*, 2015. **15**(1): p. 1-8.
28. Sharma, A., S.N. Dogiparthi, and R. Dhurat, *Structure and Function of Skin*. *IADVL's Concise Textbook of Dermatology*, 2019: p. 5.

29. ur Rehman, F. and N. Nasir, *Micro-morphometric study of skin in developing human fetuses and its clinical relevance*. Int J Anat Res, 2017. 5(1): p. 3496-500.
30. Loomis, C.A., T. Koss, and D. Chu, *Fetal skin development*. Eichenfield LF, Frieden IJ, Esterly NB. Neonatal dermatology, Saunders Elsevier health sciences, 2007. 2: p. 1-17.
31. Witte, M.B. and A. Barbul, *General principles of wound healing*. Surg Clin North Am, 1997. 77(3): p. 509-28.
32. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. 453(7193): p. 314-21.
33. Altıparmak, M., in *Tıp Fakültesi* 2012, Erciyes Kayseri. p. 82.
34. Yanar, S., *Olea Europaea, Nigella Sativa ve Rosemarinus Officinalis Bitkilerinden Hazırlanan Yağ Kombinasyonunun Antiviral ve Yara İyileşmesine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması* in *Histoloji ve Embriyoloji* 2015, Sakarya Üniversitesi: Sakarya.
35. Choi, Y., et al., *Co-occurrence of Anaerobes in Human Chronic Wounds*. Microb Ecol, 2019. 77(3): p. 808-820.
36. Bilginer, E.Ş.G., et al., *Cerrahi Alan Enfeksiyonları Ve Post-Op Yara Bakımında Hemşirenin Bilgi Düzeyinin Belirlenmesi*. II. Uluslararası Battalgazi Multidisipliner Çalışmalar Kongresi 15-16-17 Mart 2019: p. 168.
37. Singh, S., A. Young, and C.-E. McNaught, *The physiology of wound healing*. Surgery (Oxford), 2017. 35(9): p. 473-477.
38. Gantwerker, E.A. and D.B. Hom, *Skin: histology and physiology of wound healing*. Facial Plast Surg Clin North Am, 2011. 19(3): p. 441-53.
39. Rousselle, P., M. Montmasson, and C. Garnier, *Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization*. Matrix Biol, 2019. 75-76: p. 12-26.
40. Ellis, S., E.J. Lin, and D. Tartar, *Immunology of wound healing*. Current dermatology reports, 2018. 7(4): p. 350-358.
41. Clemetson, K.J., *Platelets and primary haemostasis*. Thrombosis research, 2012. 129(3): p. 220-224.

42. Aktan, B., *Deneyisel yanık modeli oluşturulan ratlarda deksmedetomidinin antiinflamatuar etkisinin araştırılması*. 2017.
43. Park, H., et al., *Complex wounds and their management*. The Surgical Clinics of North America, 2010. **90**(6): p. 1181-1194.
44. George Broughton, I., J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plastic and reconstructive surgery, 2006. **117**(7S): p. 12S-34S.
45. Eroğlu, F.P., *Adipoz doku kökenli erişkin kök hücre uygulamasının D-galaktoz ile yaşlanma modeli oluşturulmuş deride yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde gösterilmesi*. 2014, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi.
46. Goldberg, S.R. and R.F. Diegelmann, *Wound healing primer*. Surgical Clinics, 2010. **90**(6): p. 1133-1146.
47. Reinke, J.M. and H. Sorg, *Wound repair and regeneration*. Eur Surg Res, 2012. **49**(1): p. 35-43.
48. Yoo, S.K. and A. Huttenlocher, *Spatiotemporal photolabeling of neutrophil trafficking during inflammation in live zebrafish*. Journal of leukocyte biology, 2011. **89**(5): p. 661-667.
49. Schwacha, M.G., et al., *Impact of thermal injury on wound infiltration and the dermal inflammatory response*. Journal of Surgical Research, 2010. **158**(1): p. 112-120.
50. Çelik, O., *Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş boyun cerrahisi*. 2007: Asya Tıp Kitabevi.
51. Gosain, A. and L.A. DiPietro, *Aging and wound healing*. World journal of surgery, 2004. **28**(3): p. 321-326.
52. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nature reviews immunology, 2008. **8**(12): p. 958-969.
53. Enoch, S. and D.J. Leaper, *Basic science of wound healing*. Surgery (Oxford), 2008. **26**(2): p. 31-37.
54. Ambrozova, N., J. Ulrichova, and A. Galandakova, *Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF-kappaB*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2017. **161**(1): p. 1-13.

55. USLU, F.M., *Cytotoxicity And Genotoxicity Studies Of Silver Ions And Various Silver Nanoparticles On Multiple Cell Types In Vitro On The Basis Of Wound Healing*, in *Biotechnology 2012*, Yeditepe University: istanbul. p. 105.
56. Robson, M.C., D.L. Steed, and M.G. Franz, *Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories*. *Curr Probl Surg*, 2001. **38**(2): p. 72-140.
57. Bauer, S.M., R.J. Bauer, and O.C. Velazquez, *Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds*. *Vasc Endovascular Surg*, 2005. **39**(4): p. 293-306.
58. Arnold, F. and D.C. West, *Angiogenesis in wound healing*. *Pharmacol Ther*, 1991. **52**(3): p. 407-22.
59. Endrich, B. and M.D. Menger, *[Regeneration of the microcirculation during wound healing?]*. *Unfallchirurg*, 2000. **103**(11): p. 1006-8.
60. Strodbeck, F., *Physiology of wound healing*. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 2001. **1**: p. 43–52.
61. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 75-81.
62. Lau, K., et al., *Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing*. *Exp Dermatol*, 2009. **18**(11): p. 921-33.
63. Miller, S.J., et al., *Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus*. *J Invest Dermatol*, 1998. **110**(1): p. 13-9.
64. Roh, C. and S. Lyle, *Cutaneous stem cells and wound healing*. *Pediatr Res*, 2006. **59**(4 Pt 2): p. 100R-3R.
65. Amadeu, T.P., et al., *Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models*. *The international journal of lower extremity wounds*, 2003. **2**(2): p. 60-68.
66. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 24): p. 4195-200.
67. Ho, M.T., et al., *Effects of the novel compound DK223 ([1E,2E-1,2-Bis(6-methoxy-2H-chromen-3-yl)methylene]hydrazine) on migration and proliferation of human keratinocytes and primary dermal fibroblasts*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(7): p. 13091-110.

68. Monaco, J.L. and W.T. Lawrence, *Acute wound healing: an overview*. Clinics in plastic surgery, 2003. **30**(1): p. 1-12.
69. Guo, S.a. and L.A. DiPietro, *Factors affecting wound healing*. Journal of dental research, 2010. **89**(3): p. 219-229.
70. Behm, B., et al., *Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012. **26**(7): p. 812-20.
71. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound repair and regeneration, 2008. **16**(5): p. 585-601.
72. Raja, S.K., M.S. Garcia, and R.R. Isseroff, *Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing*. Front Biosci, 2007. **12**(3): p. 2849-2868.
73. Ridiandries, A., J. Tan, and C.A. Bursill, *The role of chemokines in wound healing*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(10): p. 3217.
74. Alheim, K. and T. Bartfai, *Interleukin-1 System: Receptors, Ligands, and ICE in the Brain and Their Involvement in the Fever Response*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998. **840**(1): p. 51-58.
75. Graves, D.T., et al., *IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(9): p. 5316-5320.
76. Matsumoto, K., et al., *The expression of cytokines, growth factors and ICAM-1 in the healing of human cutaneous xenografts on nude mice*. Experimental dermatology, 1997. **6**(1): p. 13-21.
77. Sauder, D., et al., *Interleukin-1 enhances epidermal wound healing*. Lymphokine research, 1990. **9**(4): p. 465-473.
78. Trengove, N.J., H. Bielefeldt-Ohmann, and M.C. Stacey, *Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers*. Wound Repair and Regeneration, 2000. **8**(1): p. 13-25.
79. Angele, M.K., et al., *Trauma-hemorrhage delays wound healing potentially by increasing pro-inflammatory cytokines at the wound site*. Surgery, 1999. **126**(2): p. 279-285.
80. Wu, N.-C. and J.-J. Wang. *Curcumin Attenuates Liver Warm Ischemia and Reperfusion-Induced Combined Restrictive and Obstructive Lung Disease by*

- Reducing Matrix Metalloprotease 9 Activity.* in *Transplantation proceedings*. 2014. Elsevier.
81. Barchitta, M., et al., *Nutrition and wound healing: an overview focusing on the beneficial effects of curcumin.* International journal of molecular sciences, 2019. **20**(5): p. 1119.
 82. Bettinger, D.A., et al., *The role of inflammatory cytokines in wound healing: accelerated healing in endotoxin-resistant mice.* The Journal of trauma, 1994. **36**(6): p. 810-3; discussion 813.
 83. Freedberg, I.M., et al., *Keratins and the keratinocyte activation cycle.* J Invest Dermatol, 2001. **116**(5): p. 633-40.
 84. Wojtowicz, A.M., et al., *The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing.* Wound Repair Regen, 2014. **22**(2): p. 246-55.
 85. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.* Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 835-70.
 86. Goldberg, M.T., et al., *TNF- α suppresses α -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing.* Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(11): p. 2645-2655.
 87. Xu, F., C. Zhang, and D.T. Graves, *Abnormal cell responses and role of TNF-in impaired diabetic wound healing.* BioMed research international, 2013. **2013**.
 88. Hübner, G., et al., *Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice.* Cytokine, 1996. **8**(7): p. 548-556.
 89. Steenport, M., et al., *Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF- α and cyclooxygenase-2.* The Journal of Immunology, 2009. **183**(12): p. 8119-8127.
 90. Ren, J., et al., *Acceleration of wound healing activity with syringic acid in streptozotocin induced diabetic rats.* Life sciences, 2019. **233**: p. 116728.
 91. Zimmermann-Klemd, A.M., et al., *Influence of traditionally used Nepalese plants on wound healing and immunological properties using primary human cells in vitro.* Journal of ethnopharmacology, 2019. **235**: p. 415-423.

92. Doersch, K.M., D.J. DelloStritto, and M.K. Newell-Rogers, *The contribution of interleukin-2 to effective wound healing*. Experimental Biology and Medicine, 2017. **242**(4): p. 384-396.
93. Bryan, D., et al., *Cytokine gene expression in a murine wound healing model*. Cytokine, 2005. **31**(6): p. 429-438.
94. Jing, R., et al., *Interleukin-2 induces extracellular matrix synthesis and TGF- β 2 expression in retinal pigment epithelial cells*. Development, growth & differentiation, 2019. **61**(7-8): p. 410-418.
95. Nishida, K., et al., *Mast cells play role in wound healing through the ZnT2/GPR39/IL-6 axis*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1-14.
96. Gallucci, R.M., et al., *Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration*. Journal of investigative dermatology, 2004. **122**(3): p. 764-772.
97. Sato, M., et al., *In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form*. Archives of dermatological research, 1999. **291**(7): p. 400-404.
98. Strieter, R.M., *Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2002. **283**(4): p. L688-L689.
99. Engelhardt, E., et al., *Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing*. The American journal of pathology, 1998. **153**(6): p. 1849-1860.
100. Michel, G., et al., *Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells*. FEBS letters, 1992. **305**(3): p. 241-243.
101. Tuschil, A., et al., *Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation*. Journal of investigative dermatology, 1992. **99**(3): p. 294-298.
102. Rennekampff, H.-O., et al., *Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing*. Journal of Surgical Research, 2000. **93**(1): p. 41-54.
103. Iocono, J.A., et al., *Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds*. Wound Repair and Regeneration, 2000. **8**(3): p. 216-225.

104. Ishida, Y., et al., *The essential involvement of cross-talk between IFN- γ and TGF- β in the skin wound-healing process*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(3): p. 1848-1855.
105. Moulin, V., et al., *Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts*. Experimental cell research, 1998. **238**(1): p. 283-293.
106. Menzies, F., et al., *Sequential expression of macrophage anti-microbial/inflammatory and wound healing markers following innate, alternative and classical activation*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **160**(3): p. 369-379.
107. Ahdieh, M., T. Vandenbos, and A. Youakim, *Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN- γ* . American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001. **281**(6): p. C2029-C2038.
108. Bootun, R., *Effects of immunosuppressive therapy on wound healing*. International wound journal, 2013. **10**(1): p. 98-104.
109. Jayme, T.S., et al., *Human interleukin-4-treated regulatory macrophages promote epithelial wound healing and reduce colitis in a mouse model*. Science advances, 2020. **6**(23): p. eaba4376.
110. Nguyen, J.K., et al., *The IL-4/IL-13 axis in skin fibrosis and scarring: mechanistic concepts and therapeutic targets*. Archives of dermatological research, 2020. **312**(2): p. 81-92.
111. Balaji, S., et al., *Comparison of interleukin 10 homologs on dermal wound healing using a novel human skin ex vivo organ culture model*. journal of surgical research, 2014. **190**(1): p. 358-366.
112. Peranteau, W.H., et al., *IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation*. Journal of Investigative Dermatology, 2008. **128**(7): p. 1852-1860.
113. Sziksz, E., et al., *Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family*. Mediators of inflammation, 2015. **2015**.

114. Balaji, S., et al., *Interleukin-10-mediated regenerative postnatal tissue repair is dependent on regulation of hyaluronan metabolism via fibroblast-specific STAT3 signaling*. The FASEB Journal, 2017. **31**(3): p. 868-881.
115. Xue, M. and C.J. Jackson, *Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2015. **4**(3): p. 119-136.
116. Gartner, L.P. and J.L. Hiatt, *Color atlas and text of histology*. 2012: Lippincott Williams & Wilkins.
117. Lenselink, E.A., *Role of fibronectin in normal wound healing*. Int Wound J, 2015. **12**(3): p. 313-6.
118. Xue, M. and C.J. Jackson, *Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring*. Advances in wound care, 2015. **4**(3): p. 119-136.
119. Ayad, S., *Collagen type I, Collagen type II, Collagen type III, Collagen type IV, Collagen type V, Collagen type VI, Collagen type VII, Collagen type VIII, Collagen type IX, Collagen type X, Collagen type XI, Collagen type XII, Collagen type XIII, Collagen type XIV. Collagen type XV, Collagen type XVI*. The Extracellular Matrix: Factsbook, 1994: p. 29-85.
120. Gartner, L.P., *Textbook of Histology E-Book*. 2020: Elsevier Health Sciences.
121. Kallis, P.J. and A.J. Friedman, *Collagen Powder in Wound Healing*. Journal of drugs in dermatology: JDD, 2018. **17**(4): p. 403-408.
122. Mathew-Steiner, S.S., S. Roy, and C.K. Sen, *Collagen in Wound Healing*. Bioengineering, 2021. **8**(5): p. 63.
123. Hochstein, A. and A. Bhatia, *Collagen: its role in wound healing*. Wound Manage, 2014. **4**(1): p. 104-109.
124. Kwan, K.H., et al., *Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011. **7**(4): p. 497-504.
125. Cruz, M.A., et al., *Collagen from Marine Sources and Skin Wound Healing in Animal Experimental Studies: A Systematic Review*. Marine Biotechnology, 2021: p. 1-11.

126. Hirschi, S.D., S.D. Gray, and S.L. Thibeault, *Fibronectin: an interesting vocal fold protein*. Journal of Voice, 2002. **16**(3): p. 310-316.
127. Puri, D., *Textbook of Medical Biochemistry E-BK*. 2018: Elsevier Health Sciences.
128. Kaushal, G.P., A. Elbein, and W.E. Carver, *Medical Biochemistry*. 2014.
129. Baynes, J. and M.H. Dominiczak, *Medical biochemistry*. 2009: Elsevier Health Sciences.
130. Wise, S.G. and A.S. Weiss, *Tropoelastin*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2009. **41**(3): p. 494-497.
131. Nemoto, T., et al., *Viscoelastic Properties of the Human Dermis and Other Connective Tissues and Its Relevance to Tissue Aging and Aging-Related Disease*. Viscoelasticity-from theory to biological applications, 2012: p. 157-170.
132. Vrhovski, B. and A.S. Weiss, *Biochemistry of tropoelastin*. European Journal of Biochemistry, 1998. **258**(1): p. 1-18.
133. Rowan, M.P., et al., *Burn wound healing and treatment: review and advancements*. Critical care, 2015. **19**(1): p. 1-12.
134. Atiyeh, B.S., et al., *Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature*. burns, 2007. **33**(2): p. 139-148.
135. Marrazzu, A., et al., *Evaluation of the effectiveness of a silver-impregnated medical cap for topical treatment of nipple fissure of breastfeeding mothers*. Breastfeeding Medicine, 2015. **10**(5): p. 232-238.
136. Al-Watban, F.A. and B.L. Andres, *Laser photons and pharmacological treatments in wound healing*. Laser therapy, 2000. **12**(1): p. 3-11.
137. Oneto, P. and J. Etulain, *PRP in wound healing applications*. Platelets, 2020: p. 1-11.
138. Fan, Z., et al., *A novel wound dressing based on Ag/graphene polymer hydrogel: effectively kill bacteria and accelerate wound healing*. Advanced Functional Materials, 2014. **24**(25): p. 3933-3943.
139. Zhao, X., et al., *Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing*. Biomaterials, 2017. **122**: p. 34-47.

140. Liu, H., et al., *A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing*. RSC advances, 2018. **8**(14): p. 7533-7549.
141. Archana, D., J. Dutta, and P. Dutta, *Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies*. International journal of biological macromolecules, 2013. **57**: p. 193-203.
142. Loder, S., et al., *Wound healing after thermal injury is improved by fat and adipose-derived stem cell isografts*. Journal of Burn Care & Research, 2015. **36**(1): p. 70-76.
143. Dufresne, C.R. and M.I. Poling, *Free Dermal Fat Autografting for Complex Craniofacial Wounds*. Journal of Craniofacial Surgery, 2020. **31**(6): p. 1563-1567.
144. Hamant, L.G., et al., *Comparison of autograft versus allograft in the surgical repair of pediatric obstetrical brachial plexus injuries*. Journal of Neurosurgery: Pediatrics, 2020. **26**(3): p. 318-326.
145. Brockmann, I., et al., *Skin-derived stem cells for wound treatment using cultured epidermal autografts: clinical applications and challenges*. Stem cells international, 2018. **2018**.
146. Lee, Y.J., et al., *Wound-healing effect of adipose stem cell-derived extracellular matrix sheet on full-thickness skin defect rat model: Histological and immunohistochemical study*. International wound journal, 2019. **16**(1): p. 286-296.
147. Nouri, D., et al. *Colour and multispectral imaging for wound healing evaluation in the context of a comparative preclinical study*. in *Medical Imaging 2013: Image Processing*. 2013. International Society for Optics and Photonics.
148. Olczyk, P., et al., *Propolis modifies collagen types I and III accumulation in the matrix of burnt tissue*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. **2013**.
149. zadeh Gharaboghaz, M.N., M.R. Farahpour, and S. Saghaie, *Topical co-administration of Teucrium polium hydroethanolic extract and Aloe vera gel triggered wound healing by accelerating cell proliferation in diabetic mouse model*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020. **127**: p. 110189.

150. Saleem, U., et al., *Phytochemical analysis and wound healing studies on ethnomedicinally important plant Malva neglecta Wallr.* Journal of ethnopharmacology, 2020. **249**: p. 112401.
151. Klöting, N. and M. Blüher, *Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome.* Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2014. **15**(4): p. 277-287.
152. Fasshauer, M. and M. Blüher, *Adipokines in health and disease.* Trends in pharmacological sciences, 2015. **36**(7): p. 461-470.
153. Hauner, H., *Secretory factors from human adipose tissue and their functional role.* Proceedings of the Nutrition Society, 2005. **64**(2): p. 163-169.
154. Ahima, R.S. and S.Y. Osei, *Adipokines in obesity.* Obesity and Metabolism, 2008. **36**: p. 182-197.
155. Luo, Y., et al., *Autograft microskin combined with adipose-derived stem cell enhances wound healing in a full-thickness skin defect mouse model.* Stem cell research & therapy, 2019. **10**(1): p. 1-15.
156. Tadokoro, S., et al., *Leptin promotes wound healing in the skin.* PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121242.
157. Murad, A., et al., *Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing.* The FASEB journal, 2003. **17**(13): p. 1-15.
158. Ring, B.D., et al., *Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice.* Endocrinology, 2000. **141**(1): p. 446-449.
159. Lin, J. and G. Yan, *Roles of leptin-mediated intracellular signaling pathways on wound healing.* Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi= Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi= Chinese journal of reparative and reconstructive surgery, 2007. **21**(11): p. 1254-1258.
160. Wen, H., et al., *Topical application of leptin promotes burn wound healing in rats.* Journal of Southern Medical University, 2012. **32**(5): p. 703-706.
161. Lee, B.-C., et al., *Visfatin promotes wound healing through the activation of ERK1/2 and JNK1/2 pathway.* International journal of molecular sciences, 2018. **19**(11): p. 3642.

162. Shibata, S., et al., *Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(6): p. 3231-3241.
163. Yong, J., et al., *Adiponectin Interacts In-Vitro With Cementoblasts Influencing Cell Migration, Proliferation and Cementogenesis Partly Through the MAPK Signaling Pathway*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**.
164. Xu, S.-Q., et al., *Analysis of Progranulin-Mediated Akt and MAPK Activation, in Progranulin*. 2018, Springer. p. 121-130.
165. Toh, H., et al., *Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond*. Journal of Molecular Neuroscience, 2011. **45**(3): p. 538-548.
166. Wen, J., et al., *Chemerin stimulates aortic smooth muscle cell proliferation and migration via activation of autophagy in VSMCs of metabolic hypertension rats*. American journal of translational research, 2019. **11**(3): p. 1327.
167. Umeki, H., et al., *Leptin promotes wound healing in the oral mucosa*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101984.
168. Kawai, K., et al., *Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes—implication of impaired wound healing in diabetes*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **374**(2): p. 269-273.
169. Valjevac, A., *Neuropeptides and Adipokines in The Control of Food Intake. Meta-Inflammation and Obesity*, 2020: p. 44.
170. Hizli, H., *Yüksek Yağlı Diyetin Açlık-Tokluk Metabolizmasında Görevli Hormonlar Ve Nöropeptidler Üzerine Etkileri*. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2018. **27**(3): p. 239-344.
171. Simpson, K.A., N.M. Martin, and S.R. Bloom, *Hypothalamic regulation of appetite*. Expert review of endocrinology & metabolism, 2008. **3**(5): p. 577-592.
172. Groneberg, D.A., et al., *Neuropeptide y (npy)*. Pulmonary pharmacology & therapeutics, 2004. **17**(4): p. 173-180.
173. Ekstrand, A.J., et al., *Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(10): p. 6033-6038.

174. Lang, R., et al., *Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity*. Pharmacological reviews, 2015. **67**(1): p. 118-175.
175. Ackermann, P.W., et al., *Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat achilles tendon*. Journal of Orthopaedic Research, 2003. **21**(3): p. 432-441.
176. Liu, C., et al., *Ghrelin accelerates wound healing in combined radiation and wound injury in mice*. Experimental dermatology, 2017. **26**(2): p. 186-193.
177. Liu, C., et al., *Ghrelin accelerates wound healing through GHS-R1a-mediated MAPK-NF- κ B/GR signaling pathways in combined radiation and burn injury in rats*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-11.
178. Ceran, C., et al., *The effects of ghrelin on colonic anastomosis healing in rats*. Clinics, 2013. **68**(2): p. 239-244.
179. Donma, M.M. and O. Donma, *Asprosin: possible target in connection with ghrelin and cytokine network expression in the post-burn treatment*. Medical hypotheses, 2018. **118**: p. 163-168.
180. Ziogas, D.C., et al., *Anti-melanin-concentrating hormone treatment attenuates chronic experimental colitis and fibrosis*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2013. **304**(10): p. G876-G884.
181. Lee, M., et al., *Leptin regulates the pro-inflammatory response in human epidermal keratinocytes*. Archives of dermatological research, 2018. **310**(4): p. 351-362.
182. McCoy, J.G. and D.D. Avery, *Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety*. Peptides, 1990. **11**(3): p. 595-607.
183. Baroni, A., et al., *Bombesin: a possible role in wound repair*. Peptides, 2008. **29**(7): p. 1157-1166.
184. Seyedabadi, M., et al., *The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling*. Experimental brain research, 2014. **232**(3): p. 723-738.
185. Sadiq, A., et al., *The role of serotonin during skin healing in post-thermal injury*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(4): p. 1034.

186. Ayada, C., Ü. Toru, and Y. Korkut, *Nesfatin-1 and its effects on different systems*. Hippokratia, 2015. **19**(1): p. 4.
187. Solmaz, A., et al. *Nesfatin-1 improves oxidative skin injury in normoglycemic or hyperglycemic rats*. Peptides 2016 [cited 78; 1-10].
188. Salazar, J.J., W.J. Ennis, and T.J. Koh, *Diabetes medications: impact on inflammation and wound healing*. Journal of Diabetes and its Complications, 2016. **30**(4): p. 746-752.
189. Greenstein, R., et al., *Cholecystokinin upregulation during intestinal repair*. Journal of Surgical Research, 1992. **53**(1): p. 12-16.
190. de Souza, K.S., et al., *Improved cutaneous wound healing after intraperitoneal injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone*. Experimental dermatology, 2015. **24**(3): p. 198-203.
191. Duerschmid, C., et al., *Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone*. Nature medicine, 2017. **23**(12): p. 1444-1453.
192. Romere, C., et al., *Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone*. Cell, 2016. **165**(3): p. 566-79.
193. Koçak, N., F. ÖZEN, and İ. Sezgin, *Progeria Sendromu Olgu Sunumu*.
194. Hoffmann, J.G., W. Xie, and A.R. Chopra, *Energy regulation mechanism and therapeutic potential of asprosin*. Diabetes, 2020. **69**(4): p. 559-566.
195. Yuan, M., et al., *Asprosin: a novel player in metabolic diseases*. Frontiers in endocrinology, 2020. **11**: p. 64.
196. Alan, M., et al., *Asprosin: a novel peptide hormone related to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome*. Gynecological Endocrinology, 2019. **35**(3): p. 220-223.
197. Li, X., et al., *Plasma asprosin levels are associated with glucose metabolism, lipid, and sex hormone profiles in females with metabolic-related diseases*. Mediators of inflammation, 2018. **2018**.
198. Chang, C.L., et al., *The serum level of irisin, but not asprosin, is abnormal in polycystic ovary syndrome patients*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1-11.
199. Romere, C., et al., *Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone*. Cell, 2016. **165**(3): p. 566-579.

200. Lee, T., et al., *Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation*. Molecular and cellular endocrinology, 2019. **486**: p. 96-104.
201. Ghasemi, A., et al., *RhoA/ROCK pathway mediates leptin-induced uPA expression to promote cell invasion in ovarian cancer cells*. Cellular signalling, 2017. **32**: p. 104-114.
202. Li, P., et al., *Study on the effect of leptin on fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro in rats*. Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi= Zhongguo xiufu chongjian waikexue zazhi= Chinese journal of reparative and reconstructive surgery, 2005. **19**(1): p. 20-22.
203. Liang, N.L., et al., *Visfatin: An adipokine activator of rat hepatic stellate cells*. Molecular medicine reports, 2015. **11**(2): p. 1073-1078.
204. Teliewubai, J., et al., *SFRP5 serves a beneficial role in arterial aging by inhibiting the proliferation, migration and inflammation of smooth muscle cells*. Molecular medicine reports, 2018. **18**(5): p. 4682-4690.
205. Zhou, J., et al., *Primary study of leptin and human hepatocellular carcinoma in vitro*. World journal of gastroenterology: WJG, 2008. **14**(18): p. 2900.
206. Stockert, J.C., et al., *Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives*. Acta Histochem, 2018. **120**(3): p. 159-167.
207. van Tonder, A., A.M. Joubert, and A.D. Cromarty, *Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays*. BMC Res Notes, 2015. **8**: p. 47.
208. Lu, L., et al., *Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(4): p. 636-44.
209. Stockert, J.C., et al., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. Acta Histochem, 2012. **114**(8): p. 785-96.
210. Pinto, B.I., et al., *A Bench-Top In Vitro Wound Assay to Demonstrate the Effects of Platelet-Rich Plasma and Depleted Uranium on Dermal Fibroblast Migration*. Appl In Vitro Toxicol, 2016. **2**(3): p. 151-156.

211. Grada, A., et al., *Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(2): p. e11-e16.
212. Cory, G., *Cell Migration*. Methods in Molecular Biology, Scratch-Wound Assay, 2011. **769**: p. 25-30.
213. Fedchenko, N. and J. Reifenrath, *Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review*. Diagnostic pathology, 2014. **9**(1): p. 1-12.
214. Demirci, T., et al., *The Protective Effect of N-acetylcysteine Against Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Rat*. Eurasian Journal of Medical Investigation, 2019. **3**(3): p. 219-226.
215. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
216. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
217. Sun, Y., et al., *Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41659.
218. Cömertpay, G., et al., *Investigation of the effects of nicotine and resveratrol on expression levels of Sox2 and Sox4 genes in human amniotic cell culture by real time PCR*. Cukurova Medical Journal, 2018. **43**(1): p. 7-12.
219. Rizzacasa, B., et al. *Comparative Ct method quantification (2-ΔCt method)*[Internet]. 2019 [cited 2021 06.22.2021]; Available from: <https://www.protocols.io/view/comparative-ct-method-quantification-2-ct-method-zp7f5rn/metadata>.
220. Vang Mouritzen, M. and H. Jenssen, *Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera*. J Vis Exp, 2018(138).
221. Yanar, S., *Olea Europaea, nigella sativa ve rosemarinus officinalis bitkilerinden hazırlanan yağ kombinasyonunun antiviral ve yara iyileşmesine etkilerinin in vitro araştırılması*. 2015, Sakarya Üniversitesi.

222. Fatih, Z., et al., *Birinci basamak yanık tedavisinde altın standartlar*. Dicle Tıp Dergisi, 2009. **36**(3): p. 219-225.
223. KURTOĞLU, A.H. and A. KARATAŞ, *Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: modern yara örtüleri*. 2009.
224. Kılıçoğlu, Ö., *Diyabetik ayak biyomekaniği ve yükten kurtarma*.
225. ÖZKORKMAZ, E.G. and Ö. Yusuf, *Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler*. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 2009. **2**(2): p. 63-67.
226. SÖNMEZ, M. and M. SEVAL, *Fitoterapik Yara Bakımında Sarı Kantaron Yağının Etkisi*. Academic Studies on Natural and Health Sciences, 2019: p. 201.
227. Akhundov, K., et al., *Development of a cost-effective method for platelet-rich plasma (PRP) preparation for topical wound healing*. Annals of burns and fire disasters, 2012. **25**(4): p. 207.
228. Hrynyk, M. and R.J. Neufeld, *Insulin and wound healing*. Burns, 2014. **40**(8): p. 1433-1446.
229. Gorouhi, F. and H. Maibach, *Role of topical peptides in preventing or treating aged skin*. International journal of cosmetic science, 2009. **31**(5): p. 327-345.
230. Kovács, D., et al., *Adipokines in the Skin and in Dermatological Diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(23): p. 9048.
231. Uemura, Y., et al., *Adipose-derived protein omentin prevents neointimal formation after arterial injury*. The FASEB Journal, 2015. **29**(1): p. 141-151.
232. Jin, C., et al., *Role of adiponectin in adipose tissue wound healing*. Genet Mol Res, 2015. **14**(3): p. 8883-8891.
233. Frank, S., et al., *Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair*. The Journal of clinical investigation, 2000. **106**(4): p. 501-509.
234. Burhans, M.S., et al., *Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus*. Comprehensive Physiology, 2011. **9**(1): p. 1-58.
235. Giralt, M., R. Cereijo, and F. Villarroya, *Adipokines and the endocrine role of adipose tissues*. Metabolic control, 2015: p. 265-282.
236. Raucchi, R., et al., *Functional and structural features of adipokine family*. Cytokine, 2013. **61**(1): p. 1-14.

237. Mancuso, P., *The role of adipokines in chronic inflammation*. ImmunoTargets and therapy, 2016. **5**: p. 47.
238. Deschner, J., et al., *The role of adipokines in periodontal infection and healing*. Molecular oral microbiology, 2014. **29**(6): p. 258-269.
239. Francisco, V., et al., *Adipokines and inflammation: is it a question of weight?* British journal of pharmacology, 2018. **175**(10): p. 1569-1579.
240. Berta, J., et al., *Apelin promotes blood and lymph vessel formation and the growth of melanoma lung metastasis*. Scientific reports, 2021. **11**(1): p. 1-12.
241. Pachynski, R.K., et al., *The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses*. Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(8): p. 1427-1435.
242. Demirbaş, A., et al., *The role of cystatin-C and fetuin-A in the determination of early atherosclerotic risk in psoriasis patients*. Dermatologic Therapy, 2020. **33**(6): p. e13898.
243. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. Journal of interferon & cytokine research, 2009. **29**(6): p. 313-326.
244. El-Hattab, M.Y., et al., *Human Adipocyte Conditioned Medium Promotes In Vitro Fibroblast Conversion to Myofibroblasts*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-11.
245. Schmidt, B.A. and V. Horsley, *Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing*. Development, 2013. **140**(7): p. 1517-1527.
246. Sultan, S.M., et al., *Fat grafting accelerates revascularisation and decreases fibrosis following thermal injury*. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery, 2012. **65**(2): p. 219-227.
247. Viard, R., et al. *Fat grafting in facial burns sequelae*. in *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2011.
248. Klinger, M., et al., *Autologous fat graft in scar treatment*. Journal of Craniofacial Surgery, 2013. **24**(5): p. 1610-1615.
249. Strong, A.L., et al., *The current state of fat grafting: a review of harvesting, processing, and injection techniques*. Plastic and reconstructive surgery, 2015. **136**(4): p. 897.

250. Sultan, S.M., et al., *Human fat grafting alleviates radiation skin damage in a murine model*. Plastic and reconstructive surgery, 2011. **128**(2): p. 363-372.
251. Li, E., et al., *OLFR734 mediates glucose metabolism as a receptor of asprosin*. Cell metabolism, 2019. **30**(2): p. 319-328. e8.
252. Frank, S., et al., *Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 501-9.
253. Stallmeyer, B., et al., *A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 98-105.
254. de Oliveira Leal, V. and D. Mafra, *Adipokines in obesity*. Clinica Chimica Acta, 2013. **419**: p. 87-94.
255. Ohashi, K., et al., *Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases*. Trends in endocrinology & metabolism, 2014. **25**(7): p. 348-355.
256. Ugur, K. and S. Aydin, *Saliva and blood asprosin hormone concentration associated with obesity*. International journal of endocrinology, 2019. **2019**.
257. Wang, Y., et al., *Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with insulin resistance and first-phase insulin secretion*. Mediators of inflammation, 2018. **2018**.
258. Zhang, L., et al., *Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride*. Clinica chimica acta, 2019. **489**: p. 183-188.
259. Hong, T., et al., *High Serum Asprosin Levels Are Associated with Presence of Metabolic Syndrome*. 2020.
260. Zhang, H., et al., *Berberine lowers blood glucose in type 2 diabetes mellitus patients through increasing insulin receptor expression*. Metabolism, 2010. **59**(2): p. 285-292.
261. Sesti, G., et al., *Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2001. **17**(5): p. 363-373.
262. Ju, X., et al., *IL-6 Regulates Extracellular Matrix Remodeling Associated With Aortic Dilation in a Fibrillin-1 Hypomorphic mgR/mgR Mouse Model of Severe Marfan Syndrome*. Journal of the American Heart Association, 2014. **3**(1): p. e000476.

263. Mustakin, M., et al., *Analysis of Mean Platelet Volume In Type Ii Diabetic Patients With Vascular Complication (Analisis Mean Platelet Volume Pasien Diabetes Melitus Tipe II dengan Komplikasi Vaskuler)*. *INDONESIAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL LABORATORY*, 2018. **22**(3): p. 227-231.
264. Malandrino, N., et al., *Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes*. *Diabetologia*, 2012. **55**(1): p. 226-235.
265. Fowler, M.J., *Microvascular and macrovascular complications of diabetes*. *Clinical diabetes*, 2011. **29**(3): p. 116-122.
266. Olgun, M.E., et al., *Anemia in patients with diabetic foot ulcer: effects on diabetic microvascular complications and related conditions*. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 2019. **19**(7): p. 985-990.
267. Grada, A., J. Mervis, and V. Falanga, *Research techniques made simple: animal models of wound healing*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2018. **138**(10): p. 2095-2105. e1.
268. Hirt, P.A., et al., *Skin changes in the obese patient*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2019. **81**(5): p. 1037-1057.
269. Baltzis, D., I. Eleftheriadou, and A. Veves, *Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights*. *Advances in therapy*, 2014. **31**(8): p. 817-836.
270. Martinotti, S. and E. Ranzato, *Scratch wound healing assay*, in *Epidermal Cells*. 2019, Springer. p. 225-229.
271. Dittfeld, C., et al., *Characterization of thoracal fat depots—expression of adipokines and remodeling factors and impact of adipocyte conditioned media in fibroblast scratch assays*. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2018. **70**(3): p. 267-280.
272. Cai, X.-j., et al., *Adiponectin inhibits lipopolysaccharide-induced adventitial fibroblast migration and transition to myofibroblasts via AdipoR1-AMPK-iNOS pathway*. *Molecular endocrinology*, 2010. **24**(1): p. 218-228.

273. Saha, A., et al., *Prostaglandin E2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis*. J Immunol, 2014. **193**(5): p. 2330-9.
274. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(2): p. 89-102.
275. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annual review of immunology, 2009. **27**: p. 519-550.
276. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. 1996.
277. Kurt-Jones, E.A., et al., *Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(4): p. 1204-1208.
278. Gabay, C., C. Lamacchia, and G. Palmer, *IL-1 pathways in inflammation and human diseases*. Nature Reviews Rheumatology, 2010. **6**(4): p. 232.
279. Wähämaa, H., et al., *High mobility group box protein 1 in complex with lipopolysaccharide or IL-1 promotes an increased inflammatory phenotype in synovial fibroblasts*. Arthritis research & therapy, 2011. **13**(4): p. 1-12.
280. Kondo, T., T. Ohshima, and W. Eisenmenger, *Immunohistochemical and morphometrical study on the temporal expression of interleukin-1 α (IL-1 α) in human skin wounds for forensic wound age determination*. International journal of legal medicine, 1999. **112**(4): p. 249-252.
281. Okano, Y., et al., *Biological effects of glycolic acid on dermal matrix metabolism mediated by dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes*. Experimental dermatology, 2003. **12**: p. 57-63.
282. Thomay, A.A., et al., *Disruption of interleukin-1 signaling improves the quality of wound healing*. The American journal of pathology, 2009. **174**(6): p. 2129-2136.
283. Granstein, R.D., et al., *In vivo inflammatory activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor and recombinant interleukin 1 in the mouse*. The Journal of clinical investigation, 1986. **77**(3): p. 1020-1027.
284. Beck, G., et al., *Interleukin 1: a common endogenous mediator of inflammation and the local Shwartzman reaction*. The Journal of Immunology, 1986. **136**(8): p. 3025-3031.

285. Sauder, D.N., et al., *Human interleukin-1 α is chemotactic for normal human keratinocytes*. Immunology letters, 1989. **22**(2): p. 123-127.
286. Qwarnström, E., S. MacFarlane, and R. Page, *Effects of interleukin-1 on fibroblast extracellular matrix, using a 3-dimensional culture system*. Journal of cellular physiology, 1989. **139**(3): p. 501-508.
287. Sauder, D., et al., *Interleukin-1 enhances epidermal wound healing*. Lymphokine research, 1990. **9**(4): p. 465-473.
288. Havemose-Poulsen, A. and P. Holmstrup, *Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature*. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 1997. **8**(2): p. 217-236.
289. Postlethwaite, A.E., L.B. Lachman, and A.H. Kang, *Induction of fibroblast proliferation by interleukin-1 derived from human monocytic leukemia cells*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 1984. **27**(9): p. 995-1001.
290. Matsushima, K., et al., *Interleukin 1 increases collagen type IV production by murine mammary epithelial cells*. The Journal of Immunology, 1985. **134**(2): p. 904-909.
291. Aoki, H., et al., *Autocrine loop between TGF- β 1 and IL-1 β through Smad3-and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2006. **290**(4): p. C1100-C1108.
292. Lassig, A.A.D., et al., *Excessive inflammation portends complications: wound cytokines and head and neck surgery outcomes*. The Laryngoscope, 2019. **129**(7): p. E238-E246.
293. Nosenko, M., S. Ambaryan, and M. Drutskaya, *Proinflammatory cytokines and skin wound healing in mice*. Molecular Biology, 2019. **53**(5): p. 653-664.
294. Guo, H., et al., *Toll-like receptor 2 mediates the induction of IL-10 in corneal fibroblasts in response to Fusarium solu*. Immunology and cell biology, 2008. **86**(3): p. 271-276.
295. Saraiva, M., P. Vieira, and A. O'garra, *Biology and therapeutic potential of interleukin-10*. The Journal of experimental medicine, 2020. **217**(1).

296. Chen, J. and X.S. Liu, *Development and function of IL-10 IFN- γ -secreting CD4⁺ T cells*. Journal of leukocyte biology, 2009. **86**(6): p. 1305-1310.
297. Shamskhov, E.A., et al., *Hydrogel-based delivery of Il-10 improves treatment of bleomycin-induced lung fibrosis in mice*. Biomaterials, 2019. **203**: p. 52-62.
298. Gordon, A., et al., *Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation*. Wound repair and regeneration, 2008. **16**(1): p. 70-79.
299. Kieran, I., et al., *Interleukin-10 reduces scar formation in both animal and human cutaneous wounds: Results of two preclinical and phase II randomized control studies*. Wound repair and regeneration, 2013. **21**(3): p. 428-436.
300. Nigro, E., et al., *Adiponectin and colon cancer: evidence for inhibitory effects on viability and migration of human colorectal cell lines*. Molecular and cellular biochemistry, 2018. **448**(1): p. 125-135.
301. Deng, G., et al., *Interleukin-10 promotes proliferation and migration, and inhibits tendon differentiation via the JAK/Stat3 pathway in tendon-derived stem cells in vitro*. Molecular medicine reports, 2018. **18**(6): p. 5044-5052.
302. Borish, L., *IL-10: evolving concepts*. Journal of allergy and clinical immunology, 1998. **101**(3): p. 293-297.
303. Ackermann, P.W., et al., *Anti-inflammatory cytokine profile in early human tendon repair*. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, 2013. **21**(8): p. 1801-1806.
304. DeLeon-Pennell, K.Y., T.H. Barker, and M.L. Lindsey, *Fibroblasts: The arbiters of extracellular matrix remodeling*. Matrix Biology, 2020.
305. Li, W., et al., *Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(1): p. 294-309.
306. Fayet, C., M.P. Bendeck, and A.I. Gotlieb, *Cardiac valve interstitial cells secrete fibronectin and form fibrillar adhesions in response to injury*. Cardiovascular Pathology, 2007. **16**(4): p. 203-211.

307. Glim, J.E., et al., *Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of foetal skin*. Archives of oral biology, 2014. **59**(10): p. 1048-1055.
308. Li, X., et al., *Human dermal fibroblast migration induced by fibronectin in autocrine and paracrine manners*. Experimental dermatology, 2014. **23**(9): p. 682-684.
309. Bata-Csorgo, Z., et al., *Fibronectin and alpha5 integrin regulate keratinocyte cell cycling. A mechanism for increased fibronectin potentiation of T cell lymphokine-driven keratinocyte hyperproliferation in psoriasis*. The Journal of clinical investigation, 1998. **101**(7): p. 1509-1518.
310. Reilly, D.M. and J. Lozano, *Skin collagen through the lifestages: Importance for skin health and beauty*. Plastic and Aesthetic Research, 2021. **8**.
311. Stephens, D.J., *Collagen secretion explained*. Nature, 2012. **482**(7386): p. 474-475.
312. Tanzer, M.L., *Current concepts of extracellular matrix*. Journal of Orthopaedic Science, 2006. **11**(3): p. 326-331.
313. Kular, J.K., S. Basu, and R.I. Sharma, *The extracellular matrix: structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering*. Journal of tissue engineering, 2014. **5**: p. 2041731414557112.
314. Rozario, T. and D.W. DeSimone, *The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view*. Developmental biology, 2010. **341**(1): p. 126-140.
315. Ehrlich, H.P. and T.K. Hunt, *Collagen organization critical role in wound contraction*. Advances in wound care, 2012. **1**(1): p. 3-9.
316. Bolla, S.R., et al., *In vitro wound healing potency of methanolic leaf extract of Aristolochia saccata is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression*. Heliyon, 2019. **5**(5): p. e01648.
317. Schreier, T., E. Degen, and W. Baschong, *Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing*. Research in experimental medicine, 1993. **193**(1): p. 195-205.

318. O'toole, E., *Extracellular matrix and keratinocyte migration*. Clinical and experimental dermatology, 2001. **26**(6): p. 525-530.
319. Moroguchi, A., et al., *Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts*. European surgical research, 2004. **36**(1): p. 39-44.
320. Lindblad, W.J., *Collagen expression by novel cell populations in the dermal wound environment*. Wound Repair and Regeneration, 1998. **6**(3): p. 186-193.
321. Shi, J.-H., et al., *Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring*. Archives of dermatological research, 2013. **305**(4): p. 341-352.

