

**HELENALİN'İN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ
ANTIENFLAMATUVAR ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Sevda Nur YÜKSEL

ESKİŞEHİR 2019

**HELENALİ’NİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ANTİENFLAMATUVAR
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevda Nur YÜKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

(İkinci Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sevda Nur YÜKSEL'in "Helenalin'in Yara İyileşmesi Üzerindeki Antienflamatuvar Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi 09/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK	
Üye	: Doç. Dr. Emel ERGENE	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN
Enstitü Müdürü

ÖZET

HELENALİN'İN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ANTİENFLAMATUVAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevda Nur YÜKSEL

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. Miriş Dikmen

(İkinci Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK)

Arnica montana travma, çürükler veya doku yaralanmalarından sonra antienflamatuvar ve doku iyileştirici özelliklerinden dolayı kullanılmakta olup hücrel ve moleküler mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir. *A. montana*'nın temel aktif bileşiklerinden biri Asteraceae familyasındaki çeşitli bitkilerde de bulunabilen bir seskiterpen laktonu olan helenalindir. Bu çalışmada, helenalinin LPS ile uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileşme aktivitesi değerlendirilmiştir. THP-1 hücreleri, LPS içeren besiyeri ile uyarılmıştır. İlk olarak HaCaT ve THP-1 hücreleri, WST-1 yöntemi kullanılarak toksik veya toksik olmayan konsantrasyonları belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (50-0,095 μ M) helenalin ile muamele edilmiştir. Ardından, sitotoksik olmayan helenalin konsantrasyonlarının (0,02, 0,2 ve 2 μ M) HaCaT hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkileri Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence) kullanılarak belirlenmiştir. Yara kapanması ile ilişkili olarak çizik deneyi yapılmıştır. Helenalinin enflamasyonlu ve enflamasyon olmayan durumlarda 48. saatteki sitokin düzeyleri ölçülmüştür.

Sonuç olarak 1,56 μ M'den yüksek konsantrasyonlarda Helenalin, HaCaT ve THP-1 hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkiler göstermiştir. Bu nedenle 0,02, 0,2 ve 2 μ M konsantrasyonlarda helenalin yara iyileşme aktivitesi araştırılmıştır. Gerçek zamanlı hücre çoğalması, migrasyon, çizik ve sitokin analizlerinin sonuçlarına göre LPS ile uyarılmış besiyerinde 0,02 ve 0,2 μ M helenalin ile muamele edilmiş HaCaT hücrelerinin hücre çoğalması, çizik kapanması ve antienflamatuvar etkileri önemli ölçüde artmıştır. Özellikle, HaCaT hücreleri üzerindeki en yüksek yara iyileşme aktivitesi, LPS ile uyarılmış ortamda 0,02 μ M Helenalin konsantrasyonunda belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Helenalin, Yara İyileşmesi, Antienflamatuvar Etki, Sitokin.

ABSTRACT

INVESTIGATING THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF HELENALIN ON WOUND HEALING

Sevda Nur YÜKSEL

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2019

Supervisor: Prof. Dr. Miriş Dikmen

(Co-Supervisor: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK)

Arnica montana is used for its anti-inflammatory and tissue healing properties after trauma, bruises, or tissue injuries, but its cellular and molecular mechanisms are completely unknown yet. One of the main active compounds of *A. montana* is helenalin, a sesquiterpene lactone that can be found in various plants in Asteraceae. In this study, wound healing activity of helenalin in LPS-stimulated and non-stimulated medium conditions on HaCaT cells was evaluated. THP-1 cells were stimulated by LPS containing medium. Firstly, HaCaT and THP-1 cells were treated with different concentrations (between 50 to 0,095 μ M) of helenalin for determining the toxic or non-toxic concentrations by using WST-1 method. Then the effects of non-cytotoxic concentrations (0,02, 0,2 and 2 μ M) of helenalin on HaCaT cell proliferation and cell migration were determined using Real Time Cell Analysis System (xCELLigence). Scratch assay was performed in relation to wound closure. Cytokine levels of helenalin were measured at inflammatory and non-inflammatory conditions at 48h.

As a result, high concentrations (higher than 1,56 μ M) of helenalin showed significant cytotoxic effects on HaCaT and THP-1 cells. Therefore, wound healing activity at 0,02, 0,2 and 2 μ M concentrations of helenalin were investigated. According to the results of real time cell proliferation, migration, scratch and cytokine analyses, HaCaT cells treated with 0,02 and 0,2 μ M helenalin in LPS-stimulated medium have significantly increased cell proliferation, scratch closure and antiinflammatory effects. In particular, the highest wound healing activity on HaCaT cells was determined with 0.02 μ M helenalin concentration in LPS-stimulated medium.

Keywords: Helenalin, Wound Healing, Anti-Inflammatory Effect, Cytokine.

TEŞEKKÜR

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimimde ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, her zaman örnek alacağım hocam Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Araştırmamın bütün aşamalarında desteğini esirgemeyen yardımcı danışmanım Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Eczacılık Fakültesi lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli bilgilerini paylaşan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerine,

Tez çalışmam sırasında yardımları ile yanımda olan Selin ENGÜR ve Elif KAYA TİLKİ'ye,

Sevgi ve desteklerini hayatım boyunca benden esirgemeyen Anneme, Babama, Eşime ve Oğluma,

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünler Dairesi çalışanlarına ve Sağlık Uzmanları'na,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Selda Nur Yüksel

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GENEL BİLGİ	1
1.1. Derinin Histolojik Yapısı ve Fonksiyonları	1
1.1.1. Epidermis	2
1.1.1.1. Keratinositler	2
1.1.1.1.1. <i>Stratum bazale (germinativum)</i>	3
1.1.1.1.2. <i>Stratum spinosum</i>	3
1.1.1.1.3. <i>Stratum granulosum</i>	4
1.1.1.1.4. <i>Stratum lucidum</i>	4
1.1.1.1.5. <i>Stratum corneum</i>	4
1.1.1.2. Melanositler	5
1.1.1.3. Langerhans hücreleri.....	5
1.1.1.4. Merkel hücreleri.....	6
1.1.2. Dermis	6
1.1.2.1. Papiller dermis	6
1.1.2.2. Retiküler dermis.....	7
1.1.2.3. Bağ doku hücreleri.....	7
1.1.2.4. Lifler	8
1.1.2.5. Temel madde.....	8
1.1.3. Hipodermis	8
1.1.4. Deri ekleri	8
1.2. Yara ve Yara İyileşmesi.....	9

1.2.1. Primer yara iyileşmesi	10
1.2.2. Sekonder yara iyileşmesi	11
1.2.3. Tersiyer yara iyileşmesi	11
1.3. Yara İyileşmesinin Evreleri.....	12
1.3.1. Hemostaz ve enflamasyon evresi	12
1.3.1.1. Hemostaz	12
1.3.1.2. Enflamasyon.....	13
1.3.2. Proliferasyon evresi.....	17
1.3.2.1. Granülasyon dokusu oluşumu	17
1.3.2.2. Reepitelizasyon	18
1.3.2.3. Fibroplazi	19
1.3.2.4. Kolajen sentezi	20
1.3.2.5. Anjiogenez	20
1.3.2.6. Yara kontraksiyonu.....	21
1.3.3. Yeniden yapılanma ve olgunlaşma evresi	21
1.4. Yara İyileşmesinde Önemli Bazı Sitokinler ve Büyüme Faktörleri	23
1.4.1. PDGF	26
1.4.2. FGF	26
1.4.3. KGF	27
1.4.4. EGF	27
1.4.5. TGF- β	28
1.4.6. IL-1	29
1.4.7. IL-6	29
1.4.8. IL-8	30
1.4.9. IL-10	31
1.4.10. IL-12	31
1.4.11. TNF- α	31
1.4.12. VEGF	32
1.5. <i>Arnica montana</i> ve Helenalin.....	32
1.5.1. <i>Arnica montana</i>	32
1.5.2. Seskiterpen laktonları.....	37
1.5.3. Helenalin	37
1.5.4. NF- κ B	38

2. GEREÇLER	39
2.1. Kullanılan Maddeler ve Malzemeler	39
2.2. Kullanılan Cihazlar	40
3. YÖNTEMLER	41
3.1. Deneylerde Kullanılan THP-1 Hücre Hattı ve Özellikleri	41
3.2. Deneylerde Kullanılan HaCaT Hücre Hattı ve Özellikleri	41
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	42
3.3.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu	42
3.3.2. Helenalin konsantrasyonlarının hazırlanması	42
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	42
3.4.1. Hücre sayımları	43
3.4.1.1. HaCaT hücrelerinin sayımı	43
3.4.1.2. THP-1 hücrelerinin sayımı	43
3.5. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksitenin Belirlenmesi	43
3.6. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Proliferasyonu ve Migrasyon Analizi	46
3.6.1. Proliferasyon analizi	46
3.6.2. Migrasyon analizi	47
3.6.3. Proliferasyon ve migrasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hücre hatlarının ve maddelerin hazırlanması	48
3.6.4. Hücre proliferasyonun gerçek zamanlı olarak belirlenmesi	49
3.6.5. Hücre migrasyonun belirlenmesi	50
3.7. Çizik Deneyi ile Helenalinin Yara İyileşmesi ve Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	50
3.8. Akış Sitometri Cihazı İle Sitokinlerin Ölçümü	53
3.9. İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
4.1. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksitenin Belirlenmesi	55
4.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Proliferasyon Analizi	60
4.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Migrasyon Analizi	62
4.4. Çizik Deneyi İle Helenalinin Yara İyileşmesi ve Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	63

4.5. Akış Sitometri Cihazı ile Sitokinlerin Ölçümü	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKÇA	78
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. WST-1 Sonuçlarına Göre Helenalinin HaCaT Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri	55
Tablo 4.2. WST-1 Sonuçlarına Göre Helenalinin THP-1 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Derinin tabakaları	1
Şekil 1.2. Epidermisin tabakaları	3
Şekil 1.3. Derinin tabakaları	7
Şekil 1.4. Primer ve sekonder yara iyileşmesi aşamaları	11
Şekil 1.5. Yara iyileşmesinde enflamasyon evresi	14
Şekil 1.6. Yara iyileşmesinde makrofajların rolü	16
Şekil 1.7. Yara iyileşmesinde proliferasyon evresi	17
Şekil 1.8. Yara iyileşmesinde yeniden yapılanma ve olgunlaşma evresi	22
Şekil 1.9. Yara iyileşmesinin dönemleri ve fizyopatolojisi	23
Şekil 1.10. Yara iyileşmesi süresince bazı sitokin seviyelerinin zamana göre değişimi	26
Şekil 1.11. <i>Arnica montana</i> L.	33
Şekil 1.12. <i>A. montana</i> çiçekleri	33
Şekil 1.13. <i>A. montana</i> 'nın etki mekanizmaları	35
Şekil 1.14. Helenalin ve 11- α , 13- dihidrohelenalin'in kimyasal yapıları	36
Şekil 3.1. WST-1'in formazana dönüşümü (EC: Elektron eşleme reaktifi, RS: Mitokondriyel süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi, NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid).	44
Şekil 3.2. xCELLigence RTCA-DP sisteminde kullanılan 16 kuyucukulu E-plaka	46
Şekil 3.3. RTCA DP Cihazında E-plakalardaki hücre sayısının artışına bağlı olarak hücre indeks (CI) değerlerinin gösterilmesi	47
Şekil 3.4. Migrasyon Çalışmalarında Kullanılan CIM Plakalar	48
Şekil 4.1. Helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 24 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$	55
Şekil 4.2. Helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 48 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$	56

Şekil 4.3. Helenalin konsantrasyonlarının THP-1 hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 24 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$	58
Şekil 4.4. Helenalin konsantrasyonlarının THP-1 hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 48 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p<0.0001^{****}$	58
Şekil 4.5. Helenalin ve LPS’li medyumda helenalin konsantrasyonlarının 24 saatte HaCaT hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisinin RTCA DP’de İzlenmesi (n=6; ort $\pm$ st.sapma)	60
Şekil 4.6. Helenalin ve LPS’li helenalin konsantrasyonlarının 48 saatte HaCaT hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisinin RTCA DP’de İzlenmesi (n=6; ort $\pm$ st.sapma)	61
Şekil 4.7. RTCA DP sisteminde HaCaT hücrelerinde helenalin konsantrasyonlarının 24 saat sonraki slope değerleri (n=6; ort $\pm$ st.sapma)(Kontrole göre $p<0.1^{*}$, $p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$).....	62
Şekil 4.8. RTCA DP sisteminden elde edilen LPS’li helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücrelerindeki migrasyon verileri	62
Şekil 4.9. RTCA DP sisteminde HaCaT hücrelerinde LPS’li Helenalin konsantrasyonlarının 24 saat sonraki migrasyon değerlerine ait slope değerleri (n=6; ort $\pm$ st.sapma)(Kontrole göre $p<0.0001^{****}$).....	63
Şekil 4.10. HaCaT keratinosit hücre kültürü çizik deneyinde helenalin konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerde yara genişlikleri (Mikroskop büyütmesi:100X, Fotoğraf skalası: 500 μ m)	64
Şekil 4.11. HaCaT keratinosit hücre kültürü çizik deneyinde LPS’li helenalin konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerde yara genişlikleri (Mikroskop büyütmesi:100X, Fotoğraf skalası: 500 μ m)	65
Şekil 4.12. HaCaT keratinosit hücre kültüründe çizik deneyinde 24. ve 48. saatlerde yara açıklık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=3), $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$..	66
Şekil 4.13. Helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücrelerinde sitokin düzeylerine etkileri	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMP	: Adenozin mono fosfat
ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
CBA	: Cytometric Bead Array (Sitometrik Boncuk Dizisi)
CI	: Cell İndeks (Hücre İndeksi)
DMEM	: Doublecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC	: Elektron eşleme reaktifi
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Deneyi)
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumı)
HaCaT	: Human adult low-calcium high-temperature keranitosit hücre hattı
IC50	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan konsantrasyon
IL	: İnterlökin
kD	: Kilodalton
KGF	: Keratinosit Growth Factor (Keratinosit Büyüme Faktörü)
LPS	: Lipopolisakkarit
MAP	: Mitogen Activated Protein (Mitojen ile Aktifleşen Protein)
MCP	: Monosit kemoatraktan protein
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NAD	: Nikotinamit adenin dinükleotit

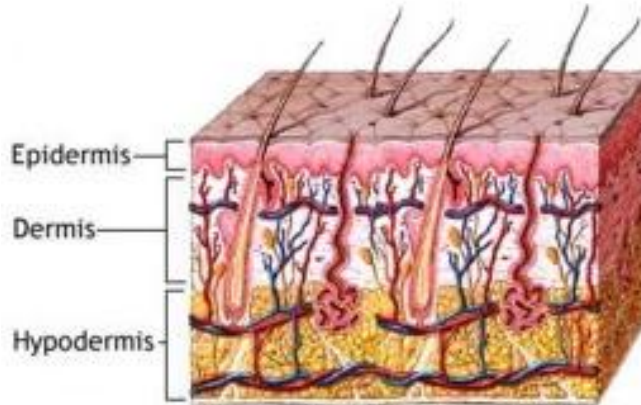
NADP	: Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
NADPH	: Dihidronikotinamit adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör κB
NK	: Natural Killer (Doğal Öldürücü)
Ort.	: Ortalama
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz)
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü)
PI3K	: Fosfoinositid-3-Kinaz
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
rpm	: Rounds per minute (Dakikadaki dönüş sayısı)
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RS	: Mitokondriyel süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi
SFM	: Serumsuz medyum
SM	: Serumlu medyum
St.	: Standart
THP-1	: İnsan lösemi monosit hücre hattı
TLR	: Toll Like Receptor (Toll Benzeri Reseptör)
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
vWf	: von Willebrand Faktör
WST-1	: Formazan test yöntemi

1. GENEL BİLGİ

1.1. Derinin Histolojik Yapısı ve Fonksiyonları

Deri vücudun iç ortamının bütünlüğünü ve dış ortam ile iletişimini sağlayan en büyük organdır. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını ve toplam vücut alanının yaklaşık 1,8 m²'sini oluşturur (Kasap, 2013, s.16; Ötün, 2015, s.3). Organizmanın çevre ile sınırlarını oluşturur (Cheng vd., 2008, s. 160). Sürekli kendini yenileyen skuamöz epitel hücrelerden oluşan keratinize bir yapıdır (Ünver ve Emre, 2008, s. 70). Vücudu dış etkenlerden, patojenlerden ve fiziksel hasardan koruyan bir bariyer görevi görür (Fredriksson, 2008, s.7; Acartürk vd., 2009, s. 338). Mekanik sarsılmalara karşı diğer organları korurken aynı zamanda su ve ısı kaybını da önler (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2002, s. 34; Acartürk vd., 2009, s. 338). Vücudu ultraviyole ışıklardan korumak, su ve elektrolit dengesini sağlamak, vücut ısısını kontrol etmek, immünoregülasyon gibi görevleri sebebiyle deri bütünlüğü hayati önem taşımaktadır (Fredriksson, 2008, s.7).

Derinin yapısı vücudun anatomik bölgelerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin gövde ve baş derisinde ısı kaybını ve ultraviyole ışınların hasarını en aza indirmek üzere kıl kökleri bulunurken el ve ayak içlerinde kıl kökleri bulunmaz, fakat dokunma duyusunun en üst düzeyde olabilmesi için sinir ağı ile kaplanmıştır (Evans, 2013, s. 398). Şekil 1.1'de de görüleceği üzere epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç tabakadan oluşur.



Şekil 1.1. Derinin tabakaları (<http-1>)

1.1.1. Epidermis

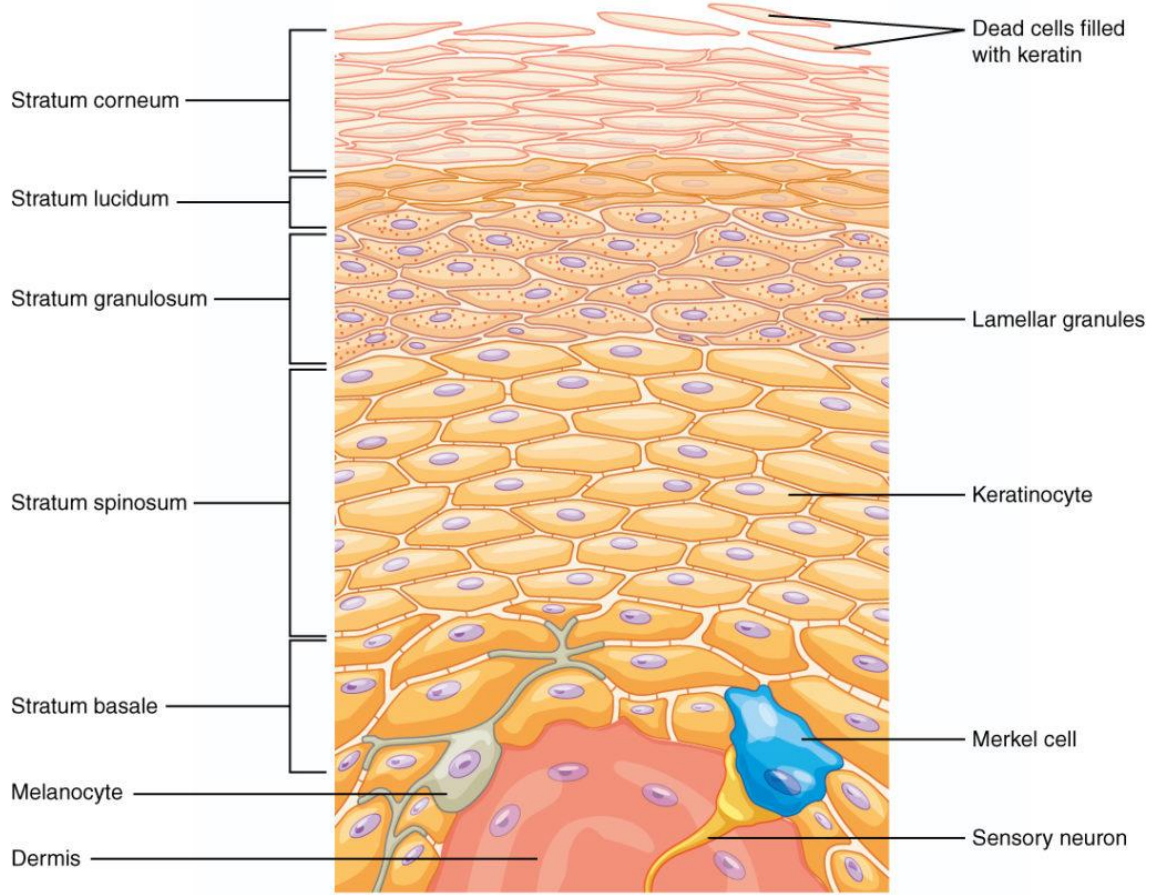
Memelilerde deri temel olarak epidermis ve dermis adı verilen, ekstraselüler matriks proteinlerinden oluşan bazal membran ile hem birbirinden ayrılan hem de birbirine bağlanan iki tabakadan oluşur (Evans, 2013, s. 398).

Derinin en dış tabakası olan epidermis, temel olarak keratinize olmuş çok katlı yassı epitel hücrelerden oluşur (Peşin, 2007, s. 99; Türköz-Uluer, 2009, s. 27). Embriyonun ektoderm tabakasından köken alır (Fredriksson, 2008, s.7). Kan damarları ve lenfatik sistem bu tabakada bulunmaz, oksijen ve besin ihtiyacını dermisten difüzyon yolu ile karşılar. Ağrı algılanmasında görevli bazı sinir sonlanmaları bulunur (Fredriksson, 2008, s.7; Acartürk vd., 2009, s. 339). Kalınlığı vücudun çeşitli bölgelerinde değişken olan bu tabaka belirli periyotlarla en üstte bulunan ölü hücreleri atarak kendini yeniler. Epidermiste hâkim olan hücre tipi %95 kadar yüksek oranla keratinositlerdir (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2002, s. 34). Epidermiste keratinositlerden başka melanositler, langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri de bulunur (Türköz-Uluer, 2009, s. 29-33; http-1). Çok katlı yapısı sayesinde derinin temel bariyer fonksiyonunun yerine getirilmesinde büyük rol oynar (Cheng vd., 2008, s. 160).

1.1.1.1. Keratinositler

Bu hücrelerin temel ürünü ara filaman proteini keratindir (Kasap, 2013, s. 17). Keratinositler bazal tabakadan üst yüzeye doğru farklılaşarak oluşturdukları 5 tabaka ile epidermise Şekil 1.2’de görülen üç boyutlu yapıyı kazandırır (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2002, s. 34; Ünver ve Emre, 2008, s. 70). Yara iyileşmesinde epidermal cevaptan sorumlu hücrelerdir (Kasap, 2013, s. 19).

Keratinositler epidermisin temel hücre grubu olarak fiziksel ve immünolojik koruma görevini üstlenmiştir. Endojen ve eksojen uyaranlara karşı enflamatuvar ve metabolik yanıtı düzenleyen ve sitokinler, kemokinler, eikozanoidler gibi enflamatuvar medyatörler salıveren dinamik bir bariyer olarak görev yapar. LPS gibi eksojen uyarı sonucunda yüksek miktarlarda IL-1 β , IL-6, TNF- α ve interferonlar gibi sitokinleri üretebilir (Cheng vd., 2008, s. 161, 164).



Şekil 1.2. Epiderminin tabakaları (http-2)

1.1.1.1.1. *Stratum bazale (germinativum)*

Epiderminin en derin tabakasıdır. Tek sıralı kübik ve silindirik hücrelerden oluşur (Peşin, 2007, s. 100; Acartürk vd., 2009, s. 340). Bu tabakadaki hücrelerin nükleusları üst kısma yakın, büyük ve bazofiliktir (http-4). Bölünme hızı yüksek olan hücrelerin bir kısmı *stratum bazale*'nin kök hücrelerini oluştururken diğerleri *stratum corneum*'a kadar giden farklılaşma sürecine katılır (Türköz-Uluer, 2009, s. 28-29). Üst tabakalara doğru hareket eden bu hücreler zamanla yassılaşır ve nükleuslarını kaybeder (http-4). Bu tabakada yer alan keratinositlerin sitoplazmalarında bulunan ara filamanlar desmozomlar ile birbirlerine ve hemidesmozomlar ile bazal membrana ve dermise bağlanırlar (Kasap, 2013, s. 20). *Stratum bazale*'de bulunan hücrelerin *stratum corneum*'a ulaşması 14 gün sürer. *Stratum corneum* hücreleri ile yer değiştirmesi de bir 14 gün daha sürer (Kolarsick vd., 2011, s. 2).

1.1.1.1.2. *Stratum spinosum*

Bazal tabakadaki keratinositlerin bölünmesi ile oluşan yeni hücreler bu tabakayı oluşturur (http-4). *Stratum spinosum*'a çıkan hücrelerin çekirdekleri yuvarlaklaşmıştır,

bazofilik olup merkezi konumlanmıştır. Hücreler yassı poligonal şekillidir (Peşin, 2007, s. 100; Kasap, 2013, s. 20). *Stratum spinosum* epiderminin en kalın tabakasıdır. Desmozomlar ve tonofibriller açısından zengin bir tabakadır (Peşin, 2007, s. 100). Aynı zamanda epidermiste lipidler bakımından da en zengin tabakadır (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2002, s. 36). Hücre sitoplazmalarında lipidlerden oluşan lamelli yapıdaki küçük granüller görülür ve bu granüllere membran kaplı granül veya lamelli cisimcik denir (Kasap, 2013, s. 20).

1.1.1.1.3. *Stratum granulosum*

Epiderminin canlı hücreler için son katmanı olan bu tabaka birkaç sıra yassı çekirdekli keratinositlerden oluşur (Kolarsick vd., 2011, s. 3; Kasap, 2013, s. 20). Yassılaştıran hücreler keratinizasyonun ilk bulgularıdır. Çekirdek dağılması başlamış olsa da genel olarak hücrelerde çekirdek bulunmaktadır (Acartürk vd. 2009, s. 340). Bu tabakadaki keratinositlerin sitoplazmalarında keratohyalin granülleri ve tonofilamanlar görülür (Kasap, 2013, s. 20; http-4). Keratohyalin granülleri ve tonofilamanlar içeren hücreler keratinizasyonla ilişki proteinlerin sentezi ve düzenlenmesinden sorumludur (Kolarsick vd., 2011, s. 3). *Stratum spinosum*'da görülmeye başlanan lamelli cisimciklerin sayıları bu tabakada artar ve granüllerin içinde bulunan seramid yapılı maddeler hücreler arası boşluğa salınır. Bu maddeler *stratum lucidum*'da keratinositlerin yüzeyini kaplayarak su bariyeri işlevi görür (Kasap, 2013, s. 20).

1.1.1.1.4. *Stratum lucidum*

Avuç içi ve ayak tabanı gibi derinin kalınlaştığı bölgelerde görülen oldukça yassı eozinofilik hücrelerden oluşan soluk pembe renkli tabakadır (Acartürk vd., 2009, s. 340; Kasap, 2013, s. 20; http-4). Organeller ve çekirdekler bütünlüğünü kaybetmiştir. Sitoplazma matriks içine gömülmüş olarak paketlenmiş filamanlardan oluşur. Komşu hücreler ile bağlantı sağlayan desmozomlar halen belirgindir (Türköz-Uluer, 2009, s. 30).

1.1.1.1.5. *Stratum corneum*

Epiderminin en dış tabakası olup 15-20 kat yassılaştıran, canlılığını kaybetmiş ve tamamen keratinize olmuş keratinositlerden (korneosit) oluşur. Temel olarak 6-15 µm kalınlıktadır (Acartürk vd., 2009, s. 340).

Stratum corneum'un %80'i korneositlerden oluşmaktadır (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2002, s. 35). Hücrelerin bir arada tutulması lamelli cisimciklerden salınan lipidler

sayesinde olmaktadır. Bu lipitler hücre kapsüllerini birbirine bağlayarak bileşik hücre kapsülü yapısını oluşturur (Türköz-Uluer, 2009, s. 30; http-4).

Stratum bazale'deki canlı hücrelerin bölünmesi ile oluşan yeni hücreler üst tabakalara doğru hareket eder ve zamanla yassılaşıp nükleuslarını kaybeder. *Stratum corneum*'da ise bu hücreler canlılığını tamamen kaybederek keratin ile dolar. Bu sürece keratinizasyon denir (http-4). Yeni hücreler deri yüzeyine geldiğinde eskimiş hücreler arasındaki desmozomlar proteolitik yıkıma uğrar ve deskuamasyon gerçekleşir, hücreler pul pul dökülür (Acartürk vd., 2009, s. 340; Kolarsick vd., 2011, s. 3).

Stratum corneum'un %40'ını oluşturan protein yapının %80'i fibröz yapıda olan keratindir (Acartürk vd., 2009, s. 340). *Stratum corneum*'da keratinositler yüksek miktarda α -keratin filamentleri içeren bir matrikste gömülü durumdadır. Bu matriks çift katlı lipit tabaka şeklinde olup hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikler için bariyer görevi görür. Derinin gerginliğine bağlı olarak geçirgenlik özellikleri değişmektedir (Bediz-Ölçer ve Gönül, 2002, s. 35).

1.1.1.2. Melanositler

Melanositler epidermin pigment sentezleyen nöral krista kökenli hücreler olup *stratum bazale*'de bulunurlar (Peşin, 2007, s. 101; Kolarsick vd., 2001, s. 4; http-4). Epidermis içinde dendritik yapılar oluştururlar. Keratinositler ile herhangi bir desmozom bağlantısı kurmazlar. Dendritleri epidermis içinde uzak mesafelere uzanarak çok sayıda keratinosit ile bağlantı kurar. Keratinositler, melanositlerin dendritik uçlarını kendilerine bağlayarak melanin içeren granülleri kendi sitoplazmalarına alır (Türköz-Uluer, 2009, s. 31; http-4). Melanosit granülleri keratinosit nükleusu üzerinde konumlanarak genetik materyali ultraviyole ışıklardan korur (http-1)

1.1.1.3. Langerhans hücreleri

Epidermin *stratum spinosum* tabakasında bulunan yıldız şekilli, kemik iliği kökenli makrofajlardır. Derinin bağışıklık yanıtında önemli role sahiptir (Peşin, 2007, s. 100). *Stratum spinosum*'daki keratinositler arasında dendritik uzantıları vardır. Fakat komşu hücreler ile selüler bağlantıları yoktur (Türköz-Uluer, 2009, s. 32; Kolarsick vd., 2011, s. 5). Temel görevi antijenlerin tanınması, yakalanıp işlenmesi ve T lenfositlere sunulmasıdır (http-4). Antijen sunumundan sonra epidermisten lenf düğümlerine

geçerek burada T lenfositleri uyaran aktif hücelere dönüşürler (Türköz-Uluer, 2009, s. 32).

1.1.1.4. Merkel hücreleri

Stratum bazale'de bulunan oval şekilli, mekanik basıncı algılayan hücrelerdir (http-1). Bazal keratinositlerle desmozomal bağlantıları bulunan ve dermisten epidermise uzanmış miyelinli afferent sinir lifleriyle bağlantılı, yavaş adapte olan, yüksek duyarlılıkta mekanoreseptör yapılardır. (Türköz-Uluer, 2009, s. 33; Kolarsick vd., 2011, s. 4). Sitoplazmalarında çok sayıda nörotransmitter içeren bu hücreler parmak uçları gibi dokunma duyusuyla ilişkili bölgelerde daha fazla bulunur (Türköz-Uluer, 2009, s. 33; http-4). Merkel hücreleri ile bağlantıda olan keratinositlerde küçük deformasyonların olması bile komşu afferent nöronda aksiyon potansiyelini başlatacak kimyasal medyatörlerin salgılanmasına sebep olur ve sinyaller beyine iletilir (Kolarsick vd., 2011, s. 4).

1.1.2. Dermis

Derinin elastikiyetini ve dayanıklılığını sağlayan tabakadır (Varol, 2008, s. 5). Genellikle epidermisten daha kalındır. Epidermise kıyasla daha az hücre fakat daha çok lif içerir. Temel olarak ekstraselüler matriks proteinleri, tip I kolajen ve elastin gibi mekanik güç sağlayan lifler içerir (Evans, 2013, s. 398; http-1). Mezenkimal kökenli olup deri kalınlığının yaklaşık %90'ını oluşturur (Fredriksson, 2008, s. 7). Bağ doku hücreleri, lifler (kolajen, elastin) ve temel maddeden (hyaluronik asit, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat) oluşur (Varol, 2008, s. 5; Kasap, 2013, s. 21). Dermis içinde dağılmış halde bulunan fibroblastlar dermal matriksin oluşumunu sağlar (Evans, 2013, s. 398).

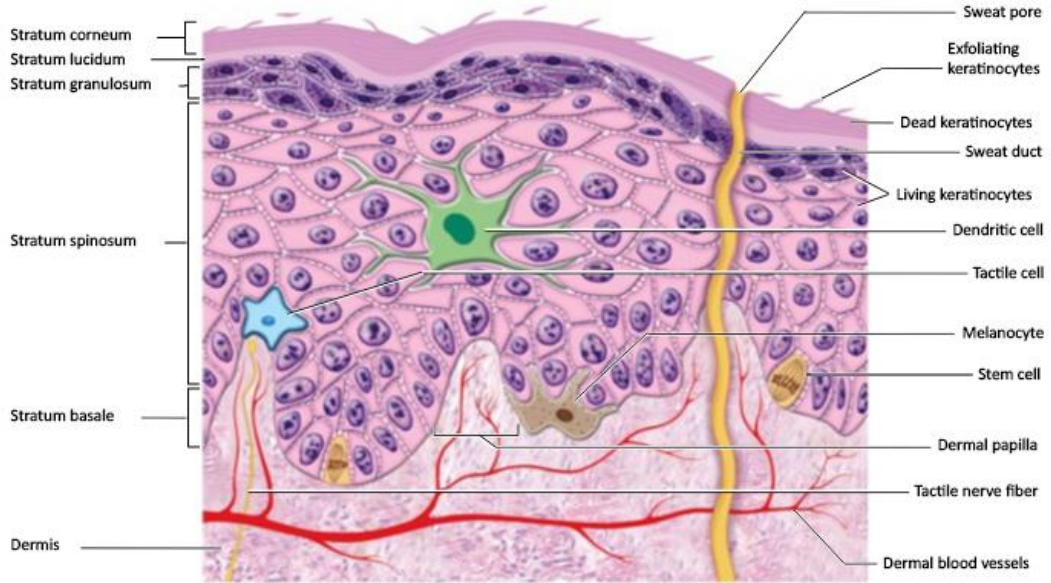
1.1.2.1. Papiller dermis

Epiderminin hemen altında yer alan *papiller dermis* girintili yapısıyla epidermisle bağlantılıdır (Varol, 2008, s. 5). Gevşek yapıda düzenlemiş kolajen lifler içerir (Kolarsick vd., 2011, s. 8). Gevşek bağ dokudan oluşan bu tabaka fibroblast, makrofaj, mast hücreleri, plazma hücreleri, sinir lifleri ve kılcal damarlar içermektedir. Meissner cisimcikleri de bu tabakada yer alır (Varol, 2008, s. 5; http-1).

1.1.2.2. Retiküler dermis

Dermisin alt tabakası olan *retiküler dermis* daha yoğun ve kalın bir lif ağına sahip olup daha az sinir ve kılcal damar yapısı içerir (http-1). Kolajen lifleri deri yüzeyine paralel olarak kalın demetler halinde yer alır (Varol, 2008, s. 5; http-5). Bu tabakada fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, lenfositler ve yağ hücrelerine ilaveten ter bezleri, kıl folikülleri ve yağ bezleri içerir. Mekanoreseptörler olan Paccini ve Ruffini cisimcikleri de *retiküler dermiste* yer alır (Peşin, 2007, s. 101).

Dermis, damarlanmanın zengin olduğu bir bölgedir. Papiller dermis ile retiküler dermis sınırında subkutis arterin dalları olan bir yüzeysel arter ağı bulunmaktadır. Bu ağ dermis papillasında bir arter ve bir venden oluşan kapiller damarları oluşturur (http-5). Epidermiste damar bulunmadığından oksijen ve besin ihtiyacını bu ağdan karşılar. Dermis ile hipodermis sınırında ise Şekil 1.3'te de görüleceği üzere daha büyük bir damar ağı bulunur (http-4).



Şekil 1.3. Derinin tabakaları (http-3)

1.1.2.3. Bağ doku hücreleri

Fibroblastlar hücreler arası matriksin depolanmasını ve yenilenmesini sağlar, büyüme faktörlerini salgılar (Kasap, 2013, s. 21). Temel görevi dermisin devamlılığını sağlamak üzere kolajen üretmektir. Fibroblastlar kolajen ile birlikte esnekliği sağlayan elastin ile fibronektin gibi bağlantı proteinlerini ve yapısal proteoglikanları da salgılar (Fredriksson, 2008, s. 8; http-5).

Mast hücreleri doğuştan gelen yerleşik immün popülasyona ait hücrelerdir (Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 28). Temel olarak kan damarları yakınlarında yerleşik histamin ve heparin salgılayan, derinin alerjik reaksiyonlarında görevli hücrelerdir (http-1, http-4). Herhangi bir hasar oluşumunda degranüle olarak daha önce granüllerinde depoladıkları çeşitli medyatörleri salıverirler. Doku bütünlüğünün sağlanmasında önemli görevleri vardır (Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 28).

1.1.2.4. Lifler

Dermisin temel yapısını fibröz bir protein olan, fibroblastlar tarafından sentezlenen kolajen oluşturur (http-4, http-5). Kolajen lifler dermisin %70'ini oluştururken insan vücudunda kuru ağırlığın yaklaşık %30'unu oluşturur. Sağlam ve yaralanmış dokuda en fazla bulunan tip I ve tip III kolajendir (Kasap, 2013, s. 22). Dermiste proteoglikanlar hidrasyonu ve viskoziteyi sağlarken elastin esnekliğin sürdürülmesini sağlar (http-5).

1.1.2.5. Temel madde

Dermiste bağ doku hücreleri ve liflerin yanında bulunan fibronektin, glikozaminoglikan, hyaluronik asit, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat gibi bileşikler temel maddeyi oluşturur (Kasap, 2013, s. 22).

1.1.3. Hipodermis

Gevşek bağ doku ve yağdan oluşan hipodermisin kalınlığı karın bölgesinde 3cm'e kadar çıkabilir (http-5). Damar ve sinir yönünden çok zengindir. Bu tabaka darbelere karşı iç organları korur, ısı kaybını engeller, yedek besin deposu işlevi görür (Kasap, 2013, s. 22).

1.1.4. Deri ekleri

Kıllar, tırnaklar, yağ bezleri ve ter bezleri deri eklerini oluşturan yapılardır. Kıllar el ayası, ayak tabanı, el ve ayak parmaklarının yan tarafları, meme uçları, glans penis ve klitoris hariç olmak üzere vücudun neredeyse tamamında bulunur. Kıl folikülü ve kıl kökü olmak üzere iki bölümden oluşur. Daima sebace bezler ile birlikte bulunduklarından pilosebace ünite olarak anılır. Epidermiste yer alan pilosebace ünite

epitelizasyonda görev alan bazal keratinositlere dönüşebilen kök hücrelere sahiptir (Türköz-Uluer, 2009, s. 34-35; Kasap, 2013, s. 22).

Yağ bezleri-sebase bezler özellikle yüzde ve saçlı deride yoğun olarak bulunur. Buna karşın göz kapaklarının kirpiklere yakın kısmında, dudaklarda, peniste sünnet derisinde, göğüs ucunda bulunmaz. Skualen, balmumu esterleri, kolesterol esterleri, trigliseritler ve serbest kolesterolden oluşan sebum salgılamakla görevlidir. Bu salgı derinin bariyer fonksiyonunu gerçekleştirir ve deriden su kaybını engeller. Salınımı gün içerisinde değişmekle birlikte androjenlerin etkisiyle artırmakta ve östrojenlerin etkisiyle azaltmaktadır. Sebase bezlerden salgılanan lipidler deri bütünlüğünün sağlanmasından ve deri yüzeyinin üç boyutlu organizasyonundan sorumludur (Zhou vd., 2013, s. 1; http-6).

Ter bezleri vücudun büyük bir kısmında bulunan ekrin bezlerdir. Vücut ısısının düzenlenmesinden sorumludur. Vücutta 2-3 milyon kadar ekrin ter bezi bulunmaktadır. Genellikle el ayası ve ayak tabanında olmakla birlikte sırtta da yoğun bulunurlar. Apokrin ter bezleri ise terlemenin haricinde esas olarak vücut kokusunun oluşmasında görevlidir. Koltuk altı, kasık ve göbek deliği çevresinde daha çok bulunur (Uysal vd., 2016, s. 6; http-6).

Tırnaklar el ve ayak parmaklarının uçlarında bulunan sert keratin plaklardır. Hem koruyucu hem de kavrama işlevinde ve dokunma ile derin duyuyu algılamada rol oynarlar. Tırnak ünitesi; tırnak matriksi, tırnak plağı, tırnak yatağı ve periungual deriden oluşur. Tırnak plağı sert ve saydam yapıdadır, matriks keratinositlerinin keratinleşmesi ile oluşur. (Türköz-Uluer, 2009, s. 40; Aksakal, 2010, s. 21; http-4).

1.2. Yara ve Yara İyileşmesi

Derinin epitelyal bütünlüğünün travma veya cerrahi insizyon ile bozulmasına yara denir. Deride meydana gelen hasar daha derin dokulara, dermise, hipodermise, kaslara ve hatta kemiğe kadar ulaşabilir (Fredriksson, 2008, s. 9; Deniz, 2010, s. 7).

Yara iyileşmesi ise bütünlüğü bozulmuş olan derinin anatomik ve fizyolojik özelliklerinin yeniden kazandırılması amacıyla başlatılan hemostaz, enflamasyon, proliferasyon, yeniden yapılanma ve olgunlaşma süreçlerini kapsayan bir süreçtir (Deniz, 2010, s. 7; Berk vd., 2015, s. 185). Bu süreçler temel olarak ortamı istila etmiş olan organizmalar ile hasarlı doku ve hücre artıklarının uzaklaştırılmasını takiben cilt bariyerinin yeniden oluşturulmasını amaçlar (Rajan ve Murray, 2008, s. 122).

Kısmi kalınlıklı yaralar sadece epitelizasyon ile iyileşebilirken tam kalınlıklı yaralarda skar oluşumu görülür (Çetinkaya, 2010, s. 3). Skar oluşumunun görülmediği durumlar dövmele, yüzeysel çizikler ve fetal yara iyileşmesi ile sınırlıdır. Ağız içi gibi mukozal bölgelerde de yara iyileşme süreci çok hızlı olup skar oluşumu minimum düzeydedir (Rajan ve Murray, 2008, s. 122).

Yara iyileşmesi sadece hasar gören hücreleri değil komşu hücreleri, fibroblastları, kan damarlarını, enflamatuvar hücreleri, ortama çağırılan lökositler gibi diğer pek çok hücreyi de ilgilendiren kompleks bir süreçtir. Ortamda yabancı maddeler, bakteriler ve kirlilik bulunması gibi durumlar yara iyileşmesini olumsuz etkileyebilir (Battaglia vd., 2005, s. 7017; Dikmen ve Er, 2017, s. 902).

Yara iyileşmesinin sağlık açısından önemi Hammurabi zamanından beri bilinmektedir. Sümerlere ait M.Ö. 2150 tarihli kil tabletlerde yara bölgesinin sıcak su veya bira ile yıkanması, şarap tortusu veya kertenkele dışkısı ile lapa yapılması ve yaranın bandajlanması gibi yara bakımına ait bilgilere rastlanılmıştır. Hipokrat yaradan iltihap drenajını açıklamış, Galen ise yara iyileşmesinin ilkelerini açıklamıştır. Yara iyileşmesi konusundaki gelişmeler oldukça yavaş ilerlese de 19. yy'da enfeksiyon, hemostaz ve nekrotik doku kontrolünün öneminin anlaşılmasıyla önemli gelişmeler yaşanmıştır. 1950'lerde sitokinler ve büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki öneminin ortaya çıkması pek çok çalışmanın önünü açmıştır (Eming vd., 2007, s. 514).

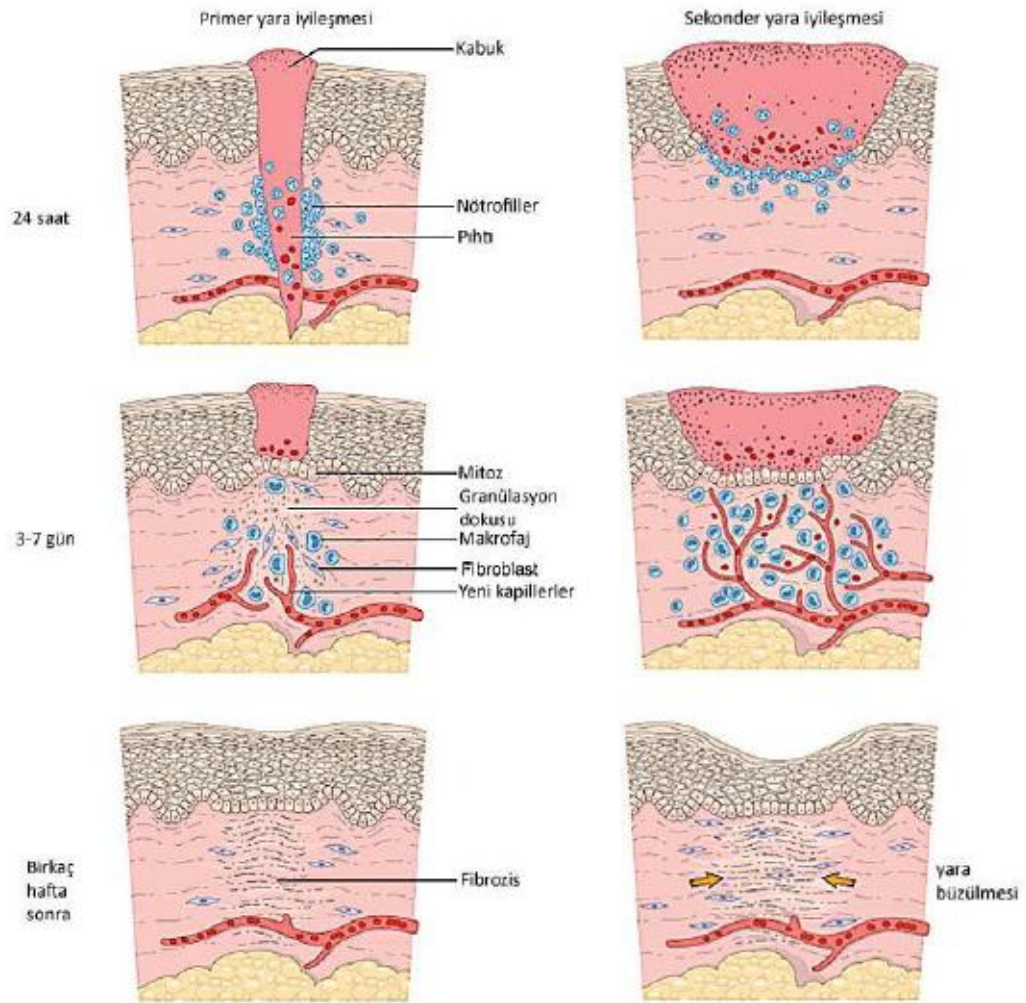
1.2.1. Primer yara iyileşmesi

Cerrahi insizyon alanları gibi doku kaybının minimum olduğu, yara kenarlarının cerrahi yöntemler ile birleştiği durumlarda görülen (Şekil 1.4) en basit yara iyileşmesi tipidir (Peşin, 2007, s. 106; Türköz-Uluer, 2009, s. 40; Kasap, 2013, s. 33).

Yara alanı saniyeler içinde fibrin ve kan hücreleri ile dolar ve yara kabuğu oluşur (Türköz-Uluer, 2009, s. 40). Açığa çıkmış olan ekstraselüler matriks elemanları ve çözünmüş olan faktörler epitel tarafından algılanır (Klarlund ve Block, 2011, s. 106). Yara bölgesinde nötrofil ve monosit infiltrasyonu görülür (Peşin, 2007, s. 106-107). İnsizyon alanına komşu epidermin bazal tabakasından proliferen olan keratinositler kesi yeri boyunca fibrin kabuğun altında devamlı bir tabaka oluşturur. Makrofajların bölgeye gelmesiyle kolajen sentezi başlar ve zamanla epitel tabaka olgunlaşır (Kasap, 2013, s. 33-34).

1.2.2. Sekonder yara iyileşmesi

Doku kaybının daha fazla olduğu enfekte olmuş yaralar görülür (Deniz, 2010, s. 32; Kasap, 2013, s. 34). Yara kontraksiyonu ve granülasyon dokusu oluşumu ile karakterizedir (Peşin, 2007, s. 107; Deniz, 2010, s. 32). Primer yara iyileşmesinden farklı olarak ortamda bulunan nekrotik dokular ve eksudanın uzaklaştırılabilmesi için daha şiddetli enflamatuvar yanıt görülür (Türköz-Uluer, 2009, s. 42; Kasap, 2013, s. 34). İyileşmenin ileri dönemlerinde granülasyon dokusu yerini skar dokusuna bırakır (Şekil 1.4) (Peşin, 2007, s. 34).



Şekil 1.4. Primer ve sekonder yara iyileşmesi aşamaları (Ötün, 2015, s. 7)

1.2.3. Tersiyer yara iyileşmesi

Başlangıçta ileri derece enfekte olması sebebiyle kapatılamayan ve sekonder iyileşmeye bırakılan yaraların kapatılmaya engel olan durumu ortadan kalktıktan sonra

primer iyileşmede olduğu gibi cerrahi olarak kapatıldığı durumlarda görülür (Arab vd., 1994, s. 162; Kasap, 2013, s. 34).

1.3. Yara İyileşmesinin Evreleri

Deride oluşan hasar onarılmadığında dokular mikrobiyolojik kontaminasyona ve mekanik hasara açık hale geleceğinden dokunun hızla onarılması önemlidir (Walter vd., 2010, s. 1271). Derinin yaralanması erken enflamasyon, yeni doku oluşumu, ekstraselüler matriksin yeniden yapılanması gibi yaralı dokunun rekonstrüksiyonu ile sonuçlanan kompleks bir reaksiyon zincirini başlatır (Korkina vd., 2007, s. 87).

Yara iyileşme süreci birbiri ile ilişkili, zamansal olarak çakışan, iyi organize olmuş 3 evreden oluşur (Fredriksson, 2008, s. 9; Berk vd. 2015, s. 185). Bu kompleks evreler dermal ve epidermal hücreler, ekstraselüler matriks, hasarlı doku ve çevre dokunun sinirsel ve damarsal bileşenleri arasında sıkı bir etkileşim gerektirir. Temel olaylar pıhtılaşma, lökosit infiltrasyonu, matriks depozisyonu, epitelizasyon, enflamatuvar yanıt gelişmesi, enflamasyonun ortadan kalkması ve olgunlaşmış skar dokusu oluşumu olarak sıralanabilir. Sitokinler, büyüme faktörleri ve proteazlar gibi pek çok faktörün yara iyileşme sürecinde önemli görevleri vardır (Walter vd., 2010, s. 1271; Kılınç, 2012, s. 1; Ashcroft vd., 2012, s. 38). Bütün yaralanma şekillerinde bu evreler aynı sırayı takip eder (Varol, 2008, s. 9).

1.3.1. Hemostaz ve enflamasyon evresi

Koagülasyon ve hemostaz ile başlayan bu evre lökosit infiltrasyonu ve sitokin salınımı ile devam eder (Erfan-Türker, 2009, s. 4-5).

1.3.1.1. Hemostaz

Yaralanma esnasında damar hasarına bağlı olarak kanama oluşur, yara bölgesi kan kaybını ve patojenlerin kontaminasyonunu önlemek amacıyla hızlı bir şekilde pıhtı ile kapatılmaya çalışılır (Erfan-Türker, 2009, s. 5; Evans vd., 2013, s. 398).

Kanamaya ilk tepki olarak hasarlanmış damardan katekolamin salınımı gerçekleşir ve vazokonstriksiyon oluşur (Kasap, 2013, s. 25; Berk vd. 2015, s. 185). Damar bütünlüğünün bozulmasıyla endotelyum içindeki von-Willebrand faktörü (vWF) ve doku tromboplastini açığa çıkar. vWF, trombositlerin subendotelyal tabakadaki tip IV ve tip V kolajenlere yapışmasını ve adenosin difosfat ile tromboksan A₂

aktifleşmesini sağlar. Böylelikle trombosit agregasyonu başlar (Werner ve Grose, 2003, s. 836-837; Çetinkaya, 2010, s. 4; Kasap, 2013, s. 25). Yara bölgesi pıhtılaşma faktörlerinin aktifleşmesine yanıt olarak, kanamayı durdurmak üzere hızla trombositler, çapraz bağlı fibrin ve fibronektinden oluşan pıhtı ile dolar (Fredriksson, 2008, s. 9-10; Rajan ve Murray, 2008, s. 122; Kılınç, 2012, s. 2). Trombositler için aktivasyon, adezyon ve agregasyon süreci başlamış olur. Degranüle olan trombositlerin α granüllerinden tromboksanlar, prostaglandinler, serotonin, fibrinojen, fibronektin, trombosit kökenli büyüme faktörleri (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), tranforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) gibi enflamatuvar hücreler için kemotaktik faktörler salınır (Arıkan vd., 2007, s. 86; Erfan-Türker, 2009, s. 6; Deniz, 2010, s. 12; Yılmaz ve Kesikburun, 2013, s. 339). Trombositler ile pek çok faktörün etkileşimiyle oluşan bu pıhtı hücrelerin göç etmesine imkan sağlayan geçici fibrin matriksi oluşturur (Fredriksson, 2008, s. 10). Fibrin olgunlaştıkça yaralanan bölgede pıhtı sayesinde elektrolit ve su kaybı ile kontaminasyon önlenmiş olur (Er, 2010, s. 4).

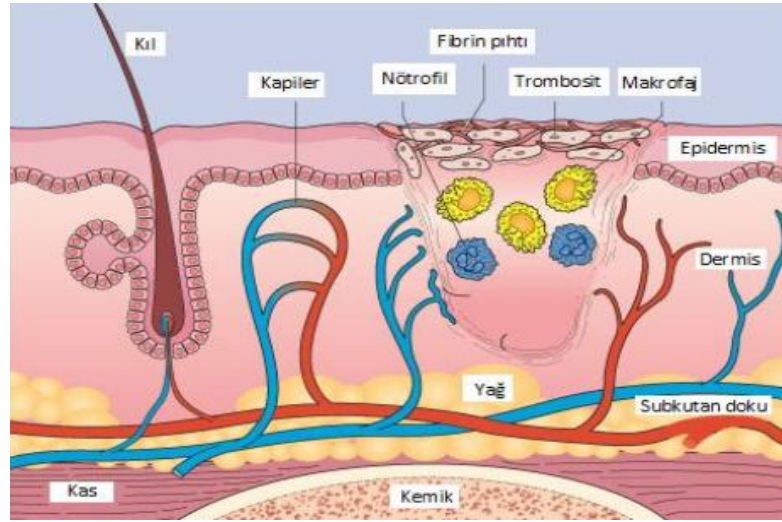
Beş-on dakika süren vazokonstriksiyondan sonra hipoksi ve endotel hücrelerinden salınan histamin, prostaglandin E_2 (PGE_2), prostasiklin ve endotelyal büyüme faktörü (EGF) etkisiyle vazodilatasyon gelişir ve damar geçirgenliği artar. PGE_2 monositlerin, tromboksan B_2 ise lökositlerin ortama gelmesinde önemli rol oynar (Deniz, 2010, s. 12-13; Er, 2010, s. 4; Kasap, 2013, s. 25-26).

1.3.1.2. Enflamasyon

Enflamasyon temel olarak vücudu çeşitli etkenlerden koruyan bir yanıttır (Magcweveva, 2012, s. 2). Yaralanmayı takip eden 24-48 saat içinde başlar. Platelet agregasyonunu takiben yara bölgesine granülosit ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ile karakterizedir (Fredriksson, 2008, s. 10; Evans vd., 2017, s. 514-515). Bu hücrelerin yarada toplanması bakterilere karşı savunmada ve hasarlı dokunun degradasyonunda önemli rol oynar. Proteazlar, reaktif oksijen ve nitrojen molekülleri tarafından savunma desteklenir (Korkina vd., 2007, s. 87).

Vazodilatasyon ile kapiller geçirgenlikteki ve kan akımındaki artma çok miktarda sıvının interstisyel aralığa çıkması sebep olur. Bu sıvının fibrinojen ve diğer proteinlerin etkisiyle pıhtılaşması, enflamatuvar hücrelerin ortama gelmesi ve doku hücrelerinin şişmesi ile birlikte enflamasyonun karakteristik göstergeleri açığa çıkar. Bunlar sıcaklık, kızarıklık, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybıdır (Er, 2010, s. 5).

Kandaki hücre topluluğu içinde bol miktarda bulunan nötrofiller damar zedelenmesi ile pasif olarak yara bölgesine toplanır (Gillitzer ve Goebeler, 2001, s. 514). Nötrofillerin pasif göçünü takiben ortamdaki PDGF gibi faktörlerin etkisiyle daha fazla nötrofil yara yerine göç etmeye başlar ve enflamasyon başlamış olur (Deniz, 2010, s. 14-15; Kılınç, 2012, s. 2). Yara bölgesinde bulunan mast hücreleri salgıladıkları aktif aminler sayesinde nötrofiller ve diğer enflamatuvar hücrelerin damar yatağından yara alanına göç etmesini kolaylaştırır (Beyhan, 2008, s. 4; Kasap, 2013, s. 25).



Şekil 1.5. Yara iyileşmesinde enflamasyon evresi (Erfan-Türker, 2009, s. 8)

Nötrofiller artmış vazodilatasyon sonucu interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktör (TNF) ve TGF gibi faktörler yardımıyla olay yerine ilk gelen hücrelerdir (Besler, 2007, s. 25; Kasap, 2013, s. 26). Nötrofillerin temel görevi yara bölgesindeki hücresel yıkım maddelerini, yabancı cisimleri ve bakterileri fagosit ederek dekontaminasyonu sağlamaktır. Bu amaçla MMP'ler gibi çeşitli degrade edici enzimler ile reaktif oksijen molekülleri, katyonik peptidleri, eikozanoitler gibi antimikrobiyal maddeleri ortama salarlar (Beyhan, 2008, s. 4; Fredriksson, 2008, s. 10; Rajan ve Murray, 2008, s. 122; Eming vd., 2007, s. 515). Nötrofiller tarafından salgılanan enzimler sadece yara bölgesinde etkilidir, sağlam doku proteaz inhibitörleri tarafından korunduğu için etkilenmez (Besler, 2007, s. 25). Yara kontaminasyonu kontrol altına alındığında nötrofiller apoptoza uğrayarak ve/veya makrofajlar tarafından fagosit edilerek yerini monosit ve makrofajlara bırakırlar (Er, 2010, s. 5).

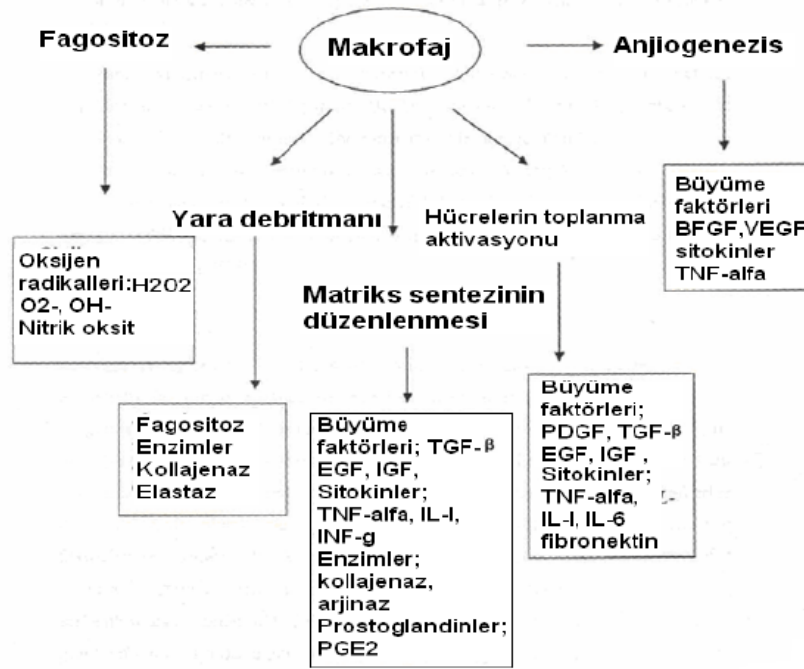
Monositlerin ortama gelmesi yara oluşumundan 48 saat sonra keratinositler, nötrofiller, trombositler ve fibroblastlardan salınan çeşitli medyatörlerin etkisiyle

gerçekleşir. Monositler için en güçlü kemotaktik faktör trombositlerden ve nötrofillerden salınan TGF- β 'dır (Rajan ve Murray, 2008, s. 124; Ötün, 2015, s. 10).

Ortamda bulunan bakteriyel ürünler, kompleman yıkım ürünleri, trombin, fibronektin, kolajen, TGF- β ve PDGF monositlerin göçünü kolaylaştırır (Çetinkaya, 2010, s. 6). Kanda dolaşan monositler yara yerine göç ettiklerinde aktifleşerek doku makrofajlarına dönüşürler (Beyhan, 2008, s. 4; Ötün, 2015, s. 10; Eming vd., 2007, s. 516). Makrofajlar erken evrede hasarlı dokunun temizlenmesini sağlayarak doku onarımına zemin hazırlarken geç enflamatuvar evrede (48-72 saat) iyileşmenin esas düzenleyicileri olarak en önemli hücrelerdir ve skar oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (Fredriksson, 2008, s. 10; Rajan ve Murray, 2008, s. 124; Mirza vd., 2013, s. 2586). Temel görevi yara bölgesini bakterilerden ve yara artıklarından temizlemek, matriks sentezini düzenlemek ve anjiogenezi başlatmak olan makrofajlar aynı zamanda salgıladıkları ve salınmasını düzenledikleri pek çok büyüme faktörü ile yara iyileşmesinde kilit rol oynar (Fredriksson, 2008, s. 10; Deniz, 2010, s. 14-15; Kasap, 2013, s. 26). TGF- β tarafından uyarılan makrofajlar PDGF, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), TNF- α , fibroblast büyüme faktörü (FGF), IL-1 ve diğer pek çok sitokin salgılar (Kılınç, 2012, s. 2; Eming vd., 2007, s. 516). Fibroblast proliferasyonu, anjiogenez, enflamatuvar evrenin sonlanması, kolajen depozisyonu gibi çeşitli olayları organize ederler. Enflamatuvar evrenin sonlanmasındaki mekanizmaları tam anlaşılamamış olmakla birlikte IL-10 gibi antienflamatuvar sitokinler üreterek proenflamatuvar molekülleri baskılayarak gerçekleştirdikleri düşünülmektedir (Rajan ve Murray, 2008, s. 124; Mirza vd., 2013, s. 2579).

Makrofajların M₁ ve M₂ olmak üzere iki fenotipi tanımlanmış olup granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör ve bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmasıyla proenflamatuvar sitokinler (IL-1 β , TNF- α , IL-6 gibi), nitrik oksit (NO), proteazlar ve reaktif oksijen moleküllerinin üretimi gerçekleşir. M₁ hücrelerin kemik iliği kökenli olduğu belirtilmiştir. M₂ ise IL-10 gibi antienflamatuvar sitokinler, ornitin ve poliaminlerin üretimi ile karakterize olup enflamasyonun sonlanmasında ve yeniden yapılanmada görevlidir. Genellikle daha fazla miktarda IL-10 üretimi ile karakterizedir (Rodero ve Khosrotehrani, 2010, s. 644; Zheng vd., 2013, s. 1; Wang vd., 2018, s. 398).

Monosit ve makrofajların yara ortamından uzaklaştırılması yara iyileşmesini önemli ölçüde yavaşlatır, fibroblast proliferasyonunu geciktirir ve anjiogenezde bozukluğa yol açar (Er, 2010, s. 5).



Şekil 1.6. Yara iyileşmesinde makrofajların rolü (Deniz, 2010, s.15)

Keratinositler bazal tabakadan ayrılarak yara sınırlarına göç eder, lezyonu kaplar ve derinin bariyer fonksiyonunu yerine koyar (Walter vd., 2010, s. 1279). Nötrofiller ve makrofajlar yara yüzeyinin hemen altında çok miktarda IL-8 salgılayarak yara kenarındaki keratinositlerin çoğalmasını ve proliferasyonunu başlatır. IL-8 salınımı IL-1, TNF- α ve bakteri ürünleri tarafından stimüle edilir (Türköz-Uluer, 2009, s. 46; Kasap, 2013, s. 26). Keratinositler mekanik uyarılara duyarlı hücreler olduğundan yara iyileşmesi ile doğal olarak ilişkilidir (Evans vd., 2013, s. 403).

Aktif makrofajlar tarafından ortama çağırılan lenfositler, lenfokinleri salgılayarak ekstraselüler matriks sentezi ve kolajen yapılanmasında görev alır (Kasap, 2013, s. 27; Berk vd., 2015, s. 186). Aynı zamanda interferon, TNF- α , IL-1 gibi lenfokinleri de salgılar (Deniz, 2010, s. 15-16).

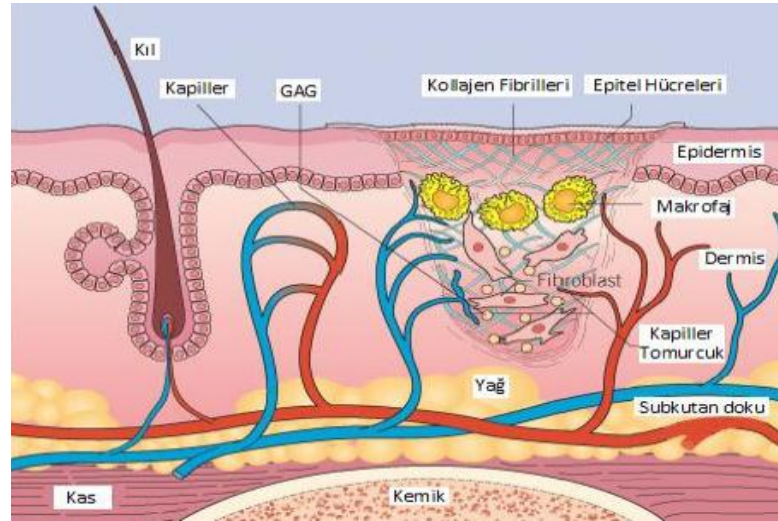
Makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanan faktörler enflamatuvar yanıtı artırır, düz kas hücreleri ile fibroblastların göçünü kontrol eder, kolajen ve kolajenaz sentezini düzenler (Kılınç, 2012, s. 2).

Keratinositler, makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından salgılanan monosit kemoatraktan protein (MCP-1) ortama mast hücre göçünü artırır. Sayıları 5 kat artan mast hücreleri salgıladıkları IL-4 ile IL-8 salınımını sınırlayarak enflamasyonu azaltırken fibroblast proliferasyonunu artırır (Kasap, 2013, s. 27). Mast hücreleri aynı

zamanda enzim, histamin ve diğer aktif aminleri içeren granülleri ortama salarak enflamasyonun karakteristik göstergelerinin oluşumuna katkı sağlar (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 284). Yara oluşumunu takip eden birkaç saat içinde degranüle olan mast hücrelerinin sayısı 48. saatte normale döner. Mast hücrelerinin temel olarak nötrofil göçü, kolajen depozisyonu ve yeniden yapılanmada görevli olduğu belirtilmiştir (Eming vd., 2007, s. 517).

1.3.2. Proliferasyon evresi

Yara bölgesi fagositoz yoluyla temizlendikten sonra ortama gelen fibroblastlar proliferasyon evresini başlatır (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 285). Proliferasyon evresi temelde granülasyon dokusu oluşumu, fibroplazi, reepitelizasyon ve anjiogenez aşamalarından oluşur (Pushparani, 2015, s. 2472). Fibroblastlar tarafından kolajen sentezi ve yeni kapiller oluşumuyla karakterize olan bu evrede temel hedef yaranın yeni epitel doku ile kaplanmasıdır (Varol, 2008, s. 10). Bu dönemde yaranın gerilme kuvvetinde belirgin bir artış görülür (Deniz, 2010, s. 17). Proliferasyon evresinde fibroblastlar, endotel hücreleri ve monosit sayısı artar. Bu hücreler kalıcı ekstraselüler matriksi oluşturmak üzere geçici fibrin matriks içine ilerler (Ötün, 2015, s. 10-11).



Şekil 1.7. Yara iyileşmesinde proliferasyon evresi (Erfan-Türker, 2009, s. 8)

1.3.2.1. Granülasyon dokusu oluşumu

Granülasyon dokusu, hasar sonucu azalan damarlanmayı yerine koymak üzere fibrin-fibronektin kompleksinin yerine oluşan vasküler bağ dokudur (Fredriksson, 2008, s. 11; Kılınç, 2012, s. 2). Fibroblastlar yara bölgesinde kolajen bakımından zengin ekstraselüler matriks (granülasyon dokusu) sentezlemek üzere yara bölgesine göç

ederler (Evans vd., 2013, s. 398). Granülasyon dokusunun temel bileşenleri fibronektin, hyaluronik asit ve kolajenden oluşan gevşek bir matrikste bulunan makrofajlar, fibroblastlar ve granüllü görünümdeki yeni kan damarlarıdır. Fibronektin ve hyaluronik asit makrofaj ve fibroblastların göçü için zemin oluşturur (Werner ve Grose, 2003, s. 837; Deniz, 2010, s. 17). Ortama göç etmiş olan fibroblastlar, makrofajlar ile birlikte VEGF, ve TGF- β gibi büyüme faktörlerini salgılayarak anjiogenezi başlatır (Kılınç, 2012, s. 2-3).

Enflamatuvar evrede artmış olan vasküler permeabilite albümin ve fibrinojen gibi büyük molekül ağırlıklı maddelerin yara bölgesine çıkmasına ve ödeme sebep olur. Oluşan ödem fibrositlerin fibroblastlara dönüşümünü başlatır (Deniz, 2010, s. 17). Yeni oluşan fibroblastlar makrofajlar tarafından ortama çağırılan diğer fibroblastlar ile birlikte yeni dokunun devamlılığını sağlayan kolajen sentezini başlatır (Varol, 2008, s. 10). Makrofajlar tarafından salgılanan büyüme faktörleri ve sitokinler de fibroblastların proliferasyonunu ve kolajen sentezini stimüle eder (Deniz, 2010, s. 18). Granülasyon dokusu, yara iyileşme sürecinin sonunda yerini skar dokusuna bırakır (Evans vd., 2013, s. 398).

1.3.2.2. Reepitelizasyon

Derinin bariyer fonksiyonunun yerine koyulabilmesi adına reepitelizasyon yara iyileşmesinin en önemli kısmıdır (Safferling vd., 2013, s.681). Yaralanmayı takiben keratinositler, migrasyona izin verebilmek amacıyla birbirinden ayrılır ve bazal laminadaki bağlantıları kopar (Büth vd., 2017, s. 748). Tam kat epidermis oluşumunu sağlamak üzere ortama gelen keratinositlerin proliferasyonu ile bazal membranın yeniden oluşturulması amaçlanır. Yara kenarındaki bazal tabaka keratinositleri yara oluşumunu takip eden günlerde aşırı proliferasyon gösterir (Erfan-Türker, 2009, s. 8). Keratinositlerin büyüme ve bölünme yeteneklerinde meydana gelen artış ekstra selüler matriks ile etkileşim ve bağlanma özelliklerine bağlıdır (Evans vd., 2013, s. 403).

Reepitelizasyon için gerekli olan keratinositler deri eklerindeki kök hücrelerden ve yara çevresindeki sağlam dokudan kaynaklanır (Gillitzer ve Goebeler, 2001, s. 517). Aktif yara makrofajları, trombositler, fibroblastlar ve keratinositlerden salgılanan keratinosit büyüme faktörü (KGF), EGF, TGF- α ve FGF epitelizasyonu stimüle eder (Türköz-Uluer, 2009, s. 48; Tokgün, 2011, s. 21-22). Keratinosit migrasyonunda matriks metalloproteinazları (MMP), büyüme faktörleri ve ekstraselüler matriks görev

alır. MMP'ler ekstraselüler matrikste keratinositlerin göçüne engel olan yapıları yıkarak keratinosit migrasyonunu kolaylaştırır (Erfan-Türker, 2009, s. 9). MMP-2 ve MMP-9 bazal tabakadaki keratinositlerin bazal membrandan ayrılmasını ve hareketlerini kolaylaştırır (Han vd., 2001, s. 22341). Reepitelizasyon aşamasında ortamda bulunan fibroblastların çoğu apoptoza uğrarken diğerleri farklılaşma sürecine girer (Evans vd., 2013, s. 398).

Prolifere olan keratinositlerde göç etmek üzere bazı fenotipik değişiklikler meydana gelir. Hücre şekilleri değişir, hücre içi tonofilamanlar kısalır, hücreler arası desmozomlar çözülür, epidermis ile dermis arasındaki bağlantı bozulur. Keratinositler ameboid hareketlerle yara alanına göç eder. Hücreler burada bölünme faaliyetinin yanı sıra bazal membran bileşenleri olan tip IV kolajen ve heparin sülfat sentezleyerek bazal membranı aşamalı olarak tamir eder ve keratinositler normal şekillerine dönerek birbirlerine ve bazal membrana bağlanır (Deniz, 2010, s. 19). Yara keratinositler tarafından tamamen örtüldükten sonra yara kabuğunun tabanındaki bağlantıları koparacak enzimler salgılanır (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 286). Keratinositler bölünerek ve farklılaşarak epiderminin tabakalarını oluşturur ve yeni oluşan epiderminin bazal membran ve dermis ile bağlanmasını sağlar (Öz, 2011, s. 9; Ötün, 2015, s. 11).

1.3.2.3. Fibroplazi

Fibroplazi sürecinde fibroblast proliferasyonu, migrasyonu ve yeni kolajen ile birlikte diğer ekstraselüler matriks proteinlerinin üretimi ile granülasyon dokusu şekillenmektedir. Bu dönemde görevli olan esas hücreler fibroblastlardır (Erfan-Türker, 2009; Deniz, 2010, s. 19). TGF- α , EGF ve PDGF dermis kaynaklı fibroblastların kolajen sentezini uyarır (Kasap, 2013, s. 28). Burada amaç kalıcı ekstraselüler matriks oluşturmaktır. Aktifleşen fibroblastlarda protein sentezi artar, bölünmeye hazırlık başlar. Hücre bölünmesi ve proliferasyonun ardından fibroblastlar kalıcı ekstraselüler matriks proteinlerini (kolajen, proteoglikan, glikozaminoglikan gibi) sentezleyip salgılamaya başlar. Geçici fibrin matriks, hyaluronan ve fibronektin ile yer değiştirir (Er, 2010, s. 7; Öz, 2011, s. 9).

Fibroblastlar proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar da sentezleyerek kolajen fibrillerin kümeleşme esnasındaki kalınlığını etkileyerek bağ dokunun fiziksel özelliklerini belirler (Deniz, 2010, s. 19).

1.3.2.4. Kolajen sentezi

Vücutta sentezlendiği bilinen 19 tipi bulunan kolajen insan vücudundaki proteinlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 283; Deniz, 2010, s. 26). Yara bölgesinde kolajen üretimi yaralanmadan 3-5 gün sonra başlar ve EGF, PDGF, TGF- β , IGF-1, FGF-2 ve sfingosin-1 tarafından stimüle edilir (Er, 2010, s. 7). Fibroblastlar geçici fibrin matriks üzerine tutunarak kolajen sentezlemeye başlar (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 286). Kolajen sentezinde ilk aşama prokolajen sentezidir. Prokolajen- α zincirleri granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir ve golgi cisimciğinde sarmal yapıları oluşturulur. Salgı vezikülü içinde ekstraselüler alana çıktığında bağlantı peptidleri koparılarak kolajen fibrilleri haline gelir (Er, 2010, s. 7). 1400 aminoasitten oluşan prokolajen molekülünün yapısında yaklaşık %35 glisin, %21 prolin ve hidroksiprolin ile %11 alanin bulunur. Lizil ve hidroksilizin kalıntıları arasında çapraz bağlar oluşarak sarmal yapı kurulurken, prolin ve hidroksiprolin rotasyonu sınırlayarak stabiliteyi artırır (Deniz, 2010, s. 25).

Anaerobik koşullar veya vitamin C yetersizliği gibi durumlarda üretilen kolajende olduğu gibi hidroksiprolin bulunmadığında da kolajen farklı bir yapıda olur ve düşük sıcaklıklarda bile denatüre olabilir hale gelir. Ekstraselüler alanda prokolajenin N ve C terminal peptidleri ayrılır. Bu alanda stabil çapraz bağların oluşumunda en önemli enzim lizil oksidazdır. Kolajen olgunlaştıkça intermoleküler ve intramoleküler çapraz bağ sayısı artar ve kolajen güç ve stabilite kazanır (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 286). Normal koşullarda kolajen sentezi ile birlikte kolajen yıkımı da fibroblastlardan sentezlenen kolajenaz enzimi ile gerçekleşir. Kolajen yapım ve yıkımı arasındaki denge kolajen kalitesini belirler. Olgun kolajen normal vücut sıcaklığı, pH ve iyonik konsantrasyonlarda proteolitik enzimlere karşı dayanıklıdır (Deniz, 2010, s. 26).

1.3.2.5. Anjiogenez

Onarım alanında bulunan aktif makrofajlar tarafından salınan anjiogenik faktörlerin etkisiyle endotelial hücrelerin tomurcuklanarak yeni damarlar oluşturduğu süreçtir (Deniz, 2010, s. 20; Kasap, 2013, s. 28). Yara bölgesindeki düşük pH, azalmış oksijen miktarı ve laktat artışı gibi faktörler yeni kan takviyesini gerekli kılar (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 286). Endotelial hücreler proteolitik enzimler salgılayarak vasküler bazal membranı parçalar ve perivasküler alana çıkar (Erfan-

Türker, 2009, s. 11). Endotelial hücreler, ekstraselüler matriks üzerinde fibroblastlara paralel hareket ederek yeni damar yapılarını oluşturur. Bölünüp farklılaşan endotel hücreleri tübüler lümen oluşturarak damar ağının yeni dallarını oluşturur. Yeni oluşan damarlar, yüksek basınçtan alçak basınca doğru kan akışı başlarken kolajen salgılayarak kendilerini korumaya alır. Aynı zamanda hareket halinde iken de kolajenaz salgılayarak kendilerine yol açar (Beyhan, 2008, s. 7; Deniz, 2010, s. 20). Anjiogenez için tetikleyici özellikte olan VEGF, TGF- β ve FGF salınımı için temel etken yara bölgesindeki oksijen azlığıdır. Hipoksinin yanında endotel hücrelerinde üretilen NO da VEGF üretimi üzerinde uyarıcı etkilidir (Besler, 2007, s. 27; Erfan-Türker, 2009, s. 11).

1.3.2.6. Yara kontraksiyonu

Granülasyon dokusu oluşumu ile eş zamanlı olarak epitelizasyonu tamamlanmamış yaralarda aktin filamentlerince zengin myofibroblastlar tarafından yara kontraksiyonu başlatılır. Myofibroblastlar migrasyon ve proliferasyon esnasında fenotipik değişikliklere uğrayarak kontraktıl kapasite kazanmış fibroblastlardır (Deniz, 2010, s. 20; Kasap, 2013, s. 29). Aktin filaman içeriği ile yara kontraksiyonunu sağlarlar (Erfan-Türker, 2009, s. 10). Yara kontraksiyonunun altında yatan mekanizma bilinmemekle birlikte myofibroblastlar ile matriks bileşenleri arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 286). Burada amaç yara alanını küçülterek onarımı hızlandırmak ve daha az skar oluşumu sağlamaktır. Vücudun farklı bölgelerinde yara kasılması da farklılık gösterir (Öz, 2011, s. 7). Yara kontraksiyonu doku kalınlığını azaltmak ve düzensiz skar oluşumunu önlemek için oldukça önemlidir (Çetinkaya, 2010, s. 10).

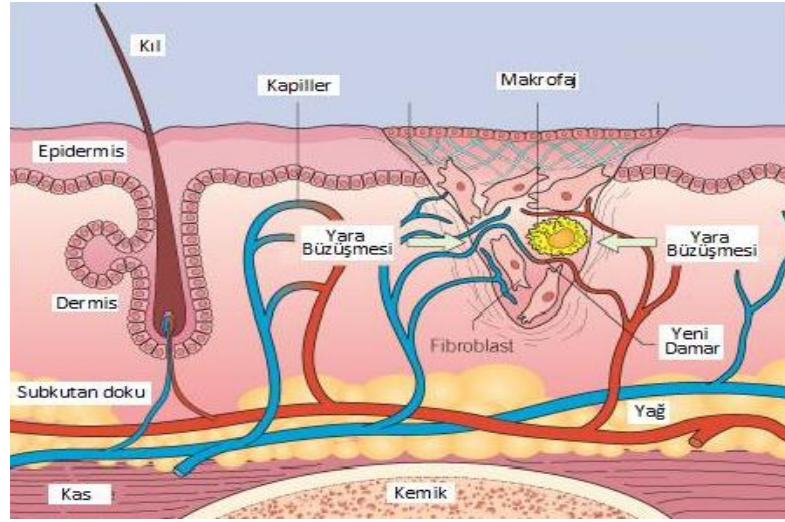
Yara iyileşmesi ilerledikçe myofibroblastlar apoptoz ile ölmeye başlar ve yerini yeni ekstraselüler matriks üretmek üzere ikinci bir dermal fibroblast dalgası alır (Walter vd., 2010, s. 1279).

1.3.3. Yeniden yapılanma ve olgunlaşma evresi

Bu evre yaranın granülasyon dokusu ile dolup proliferasyon, reepitelizasyon ve anjiogenezin tamamlanmasından sonra başlar ve ömür boyu sürer (Arab vd., 1994, s. 161; Beyhan, 2010, s. 7). Burada temel amaç kolajen depozisyonu ve organizasyonu ile kaliteli bir skar dokusu oluşturmak ve yara gerilme kuvvetinin maksimum düzeye ulaşması ile hasarlanmış dokuya yara öncesi fonksiyonunu kazandırabilmektir (Erfan-

Türker, 2009, s. 11-12; Kasap, 2013, s. 31). Yara iyileşme süreci ilerledikçe yeni damarların yoğunluğu, nötrofil, makrofaj, fibroblast ve diğer enflamatuvar hücrelerin sayısı azalır (Deniz, 2010, s. 22-23). Kolajen yıkımı ile karakterize olan bu süreçte geçici matrikste bulunan fibronektinin yerini tip III kolajen alır. Tip III kolajen daha sonra aşamalı olarak daha dayanıklı olan tip I kolajene degrade olur (Fredriksson, 2008, s. 11; Erfan-Türker, 2009, s. 12; Çetinkaya, 2010, s. 12). Yara iyileşme sürecinin ilk evrelerinde görülen amorf kolajenler zamanla düzenli, küçük fibrilli kolajen ağlarına dönüşür, lifler arasındaki kovalent bağların artmasıyla stabilizasyon sağlanır (Arab vd. 1994, s. 161; Ötün, 2015, s. 13). Tip I kolajen lifleri sağlam dokuda longitudinal yerleşmiş iken skar bölgesinde adeta bir basket potası şeklinde konumlanır (Evans vd., 2013, s. 398).

Kolajen yapım ve yıkımının dengeye ulaşması fibroblastlar, epitel hücreleri, nötrofiller ve makrofajlar tarafından salınan kolajenazlar ve MMP'ler sayesinde olmaktadır (Fredriksson, 2008, s. 12; Erfan-Türker, 2009, s. 9; Kasap, 2013, s. 31). Yeniden yapılanma süreci granülasyon dokusunun yerine kolajen bakımından zengin olan skar dokusu oluşumu ile sonuçlanır (Kılınç, 2012, s. 3). Kolajenazın çinko içeren bir MMP olması nedeniyle çinko yara iyileşmesinde önemlidir (Ötün, 2015, s. 13).

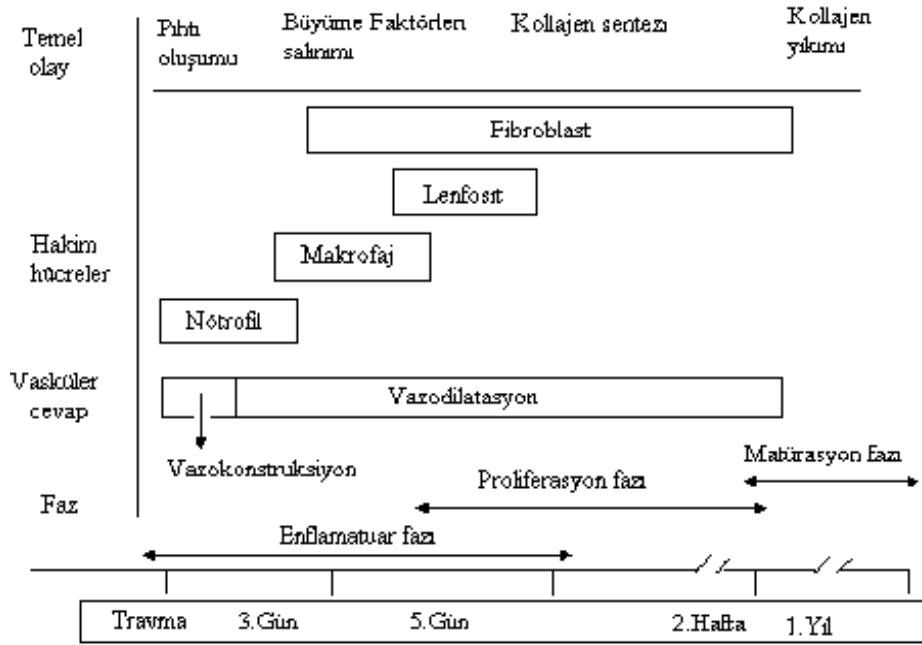


Şekil 1.8. Yara iyileşmesinde yeniden yapılanma ve olgunlaşma evresi (Erfan-Türker, 2009, s. 12)

Yara iyileşme sürecinde gerçekleşen tüm olayların sonucunda yara gerilim kuvveti maksimuma ulaşır. Başlangıçta fibroblastlar, endotel hücreleri ile fibrin-fibronektin kompleksi arasında adezyonu ile sağlanan gerilme kuvveti ileriki aşamalarda kolajen lifleri ile sağlanır (Türköz-Uluer, 2009, s. 50). Yaklaşık bir yıl veya daha uzun süren bu evrenin sonunda yara gerilim kuvveti normal deridekinin en fazla

%80'ine ulaşabilir (Erfan-Türker, 2009, s. 11; Kasap, 2013, s. 32; Berk vd., 2015, s. 187). Skar dokusunda kıl folikülleri, ter bezleri gibi deri ekleri bulunmaz (Evans vd., 2013, s. 398).

Özet olarak hemostaz ve fibrin depozisyonu ile başlayan yara iyileşme süreci enflamasyon ile devam eder. Kolajen sentezi, depozisyonu ve yeniden yapılandırılmasını takiben skar oluşumu ile sonuçlanır. Bu normal yara iyileşme süreçlerinde bir aksaklık olduğunda fibrozis veya kronik ülser gibi patolojik durumlar oluşabilir (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 287).



Şekil 1.9. Yara iyileşmesinin dönemleri ve fizyopatolojisi (Er, 2010, s. 9)

1.4. Yara İyileşmesinde Önemli Bazı Sitokinler ve Büyüme Faktörleri

Sitokinler ve büyüme faktörleri yara iyileşmesinde önemli görevleri olan biyolojik medyatörlerdir. Sitokin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel incinmeler ve çeşitli enflamatuvar olaylarla uyarılabilirler (Park ve Barbul, 2004, s. 11). Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin fonksiyonları üzerinde etkili olabilir. Bazı dokularda birbirleriyle sinerjistik etkili olabilen sitokinler, başka dokularda antagonist etki de gösterebilmekte ve birbirlerini inhibe de edebilmektedirler. Sitokinler, hücrelerin çevresel koşullarına göre farklı etkiler gösterebilmektedir. Bir sitokin değişik tip hücreler tarafından yapılabilir ve değişik tip hücreler üzerine etki gösterebilir (pleiotropizm), başka sitokinlerin sentezlenmesini uyarabilir ya da engelleyebilir. Bir

sitokinin aynı hedef hücre üzerinde farklı etkileri olabilir. Bazı etkiler aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler farklı zaman aralıklarıyla oluşabilir (dakikalar, saatler, günler). Birden fazla sitokin aynı etkiyi gösterebilir (Onat vd., 2002, s. 557-559). Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar. Bu reseptörler transmembran proteinler olup, ekstrasellüler domainleri vardır ve özel olarak sitokinleri ve büyüme faktörlerini tanır ve bağlarlar. Sitokin reseptörleri, ligandlarına karşı aşırı affinite gösterirler. Biyolojik etki oluşturabilmek için çok küçük miktarlarda sitokin yeterlidir. Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu özel sinyaller tarafından üretilir. Sitokinlere verilen hücresel yanıtların çoğu yeni mRNA ve protein sentezini gerektirmektedir. Birçok hedef hücre için sitokinler hücre bölünmesini düzenlerler yani büyüme faktörü gibi etki ederler (Güner vd., 1997, s. 65).

Sitokinler hedef hücrelerdeki kendilerine ait spesifik ligandlara bağlanarak etki gösterirler. Bağlanma ile başlayan sinyal transdüksiyonu ve ikincil habercilerin iletimi, gen aktivasyonu, mitotik bölünme, büyüme ve farklılaşma, migrasyon veya apoptoza yol açar (Bekalp vd., 2014, s. 36). Sitokin sekresyonu bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel incinmeler ve çeşitli enflamatuvar olaylarla indüklenebilir (Kuralay ve Çavdar, 2006, s. 146).

Doğal immünitede rol alan sitokinler genel olarak aktive olmuş makrofajlarda ve NK hücrelerinde salgılanan sitokinler mikropalara karşı erken enflamatuvar reaksiyonları düzenler ve mikropların eliminasyonunu kolaylaştırır. Bu sitokinlerin etkileri sayesinde nötrofil ve monositlerin enfeksiyon bölgesine göç etmeleri ve mikroplar ortadan kaldırmak amacıyla uyarılmaları gerçekleşmektedir. Başlıca sitokinler; TNF, Tip I interferonlar (IFN- α , IFN- β), kemokinler. IL-1, IL-12, IL-10, IL-6, IL-15, IL-18 (Abbas ve Lichtman, 2003, s. 243-275).

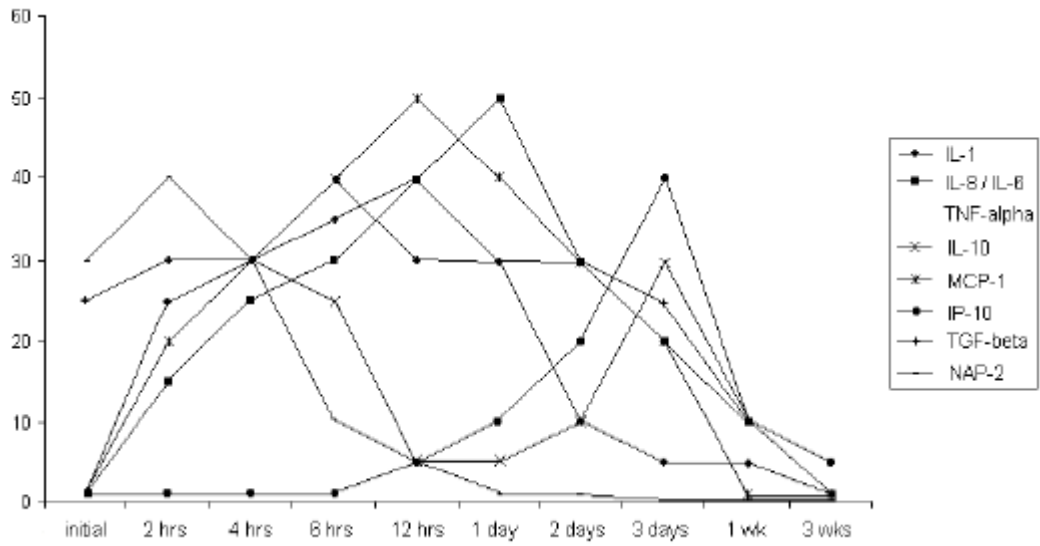
Edinsel bağışıklıkta rol oynayan sitokinler; özellikle lenfositlerin antijeni tanımalarından sonra gelişen farklılaşma ve çoğalmasını uyarırlar ve makrofajlar gibi özel efektör hücreleri aktive ederler. Başlıca sitokinler; IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 TGF- β , IFN- γ , lenfotoksin (Abbas ve Lichtman, 2003, s. 243-275).

Sitokinler akut ve kronik enflamasyonda rol oynayan önemli potansiyel araçlardır ve otoimmünitenin önemli bir parçasıdır ([http-8](http://8)).

a) Akut İnflamasyonda Sitokinler:

Sitokinler akut enflamasyonun her aşamasında immün cevabın oluşmasını sağlarlar. Nötrofiller, doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar, mast hücreleri, eozinofiller doku hasarı gibi durumlarda sitokin üretmeye ve salgılamaya başlarlar. Sitokinler de lökositleri ve endotel hücrelerini, mikroorganizmalara veya kimyasal uyarana karşı harekete geçirerek, ortama reaktif oksijen mediatörleri, nitrik oksit, vazoaktif aminler, nöropeptidler, kinin, prostaglandinler ve lökotrienlerin salınmasını sağlarlar. Akut enflamasyona katılan başlıca sitokinler TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-11 ve diğer kemokinler, granülosit koloni uyarıcı faktör ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktördür (http-8).

Yapılan çalışmalar pek çok sitokinin özellikle enflamatuvar yanıtta anahtar rol oynadığını göstermiştir. Özellikle IL-1, IL-6 ve TNF- α akut enflamatuvar evre için oldukça önemlidir (Kondo ve Ohshimo, 1996, s. 233). Sitokinler proenflamatuvar veya antienflamatuvar olarak nitelendirilirken, büyüme faktörleri iyileşme tetikleyiciler olarak değerlendirilir (Zubaidi vd., 2018, s. 412). Sitokinler ve büyüme faktörleri yara bölgesindeki hedef hücrelerine endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin yolla ulaşırlar ve hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak sessiz durumda bekleyen genleri aktiveleştirirler. Sinyal yolları çoğunlukla tirozin kinaz reseptörler aracılığıyla çalışır (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 284; Quing, 2017, s. 189). Özellikle IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α önemli proenflamatuvar sitokinlerdir (Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 30). Yara iyileşme sürecinde sitokin seviyelerindeki değişiklikler bozulmuş yara iyileşmesi veya hipertrofik skar oluşumu gibi patolojik sonuçlara sebep olabilir (Cornelissen, 2004, s. 9-10).



Şekil 1.10. Yara iyileşmesi süresince bazı sitokin seviyelerinin zamana göre değişimi (Cornelissen, 2004, s. 15).

1.4.1. PDGF

PDGF'ler homo veya hetero dimerik büyüme faktörlerinden oluşan bir ailedir (Werner ve Grose, 2003, s. 838). Trombositlerin α granüllerinde bulunan PDGF, disülfid köprüleri ile bağlı A ve B zincirlerinden oluşan dimerik bir proteindir (Slavin, 1996, s. 5; http-7). Yara oluşumunun hemen ardından plateletlerden salıverilir. Ayrıca makrofajlar, fibroblastlar ve endotelial hücrelerde de salgılanır (Cornelissen, 2004, s. 9). Etkinliklerini transmembranal tirozin kinaz reseptörler üzerinden gösterirler. PDGF yara iyileşmesinde nötrofil, monosit ve fibroblastların yara bölgesine gelmesini sağladığı gösterilen ilk büyüme faktörüdür. Aynı zamanda fibroblast proliferasyonunu, ekstraselüler matriks sentezini, angiogenezi ve kolajen ile kolajenaz sentezini de artırır. Bu sebeple yara iyileşmesinde etkili majör faktör olduğu düşünülmüş ve terapötik olarak ülserler üzerinde uygulanmıştır (Werner ve Grose, 2003, s. 838; Quing, 2017, s. 189). Monositlerin makrofajlara dönüşmek üzere olgunlaşmasını sağlar. Monosit ve makrofajlardan TGF- β gibi diğer büyüme faktörlerinin salınmasını da sağlar. Ayrıca fibroblastların myofibroblastlara dönüşmek üzere hazırlığını stimüle eder (Slavin, 1996, s. 5; Cornelissen, 2004, s. 9).

1.4.2. FGF

FGF familyasının üyeleri tirozin kinaz reseptörler üzerinden etki gösteren polipeptid yapılı büyüme faktörleridir. FGF'nin karakteristik özelliği kendilerini termal

denatürasyondan ve proteolizden koruyan heparin veya heparan sülfat protoglikanlarıyla olan ilişkileridir (Werner ve Grose, 2003, s. 839). Yara oluşumundan sonra keratinositler, makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastlarda FGF sentezi artar (Cornelissen, 2004, s. 9). Fibroblastlar gibi mezenkimal ve nöroektodermal kökenli hücreler için mitojenik etkili olan FGF aynı zamanda endotelial hücreler için de potansiyel mitojendir (Slavin, 1996, s. 6). Mitojenik etkilerinin yanında FGF, hücre migrasyonu ve diferansiyasyonunu düzenler ve stres koşullarında sitoprotektif etkilidir (Werner ve Grose, 2003, s. 839). Yeni damar oluşumu için gerekli olan kapiller bazal membranının açılması, endotelial hücrelerin göçü ve bölünmesi, kapiller yapıların yeniden oluşumu gibi olayları stimüle eder. Yapılan çalışmalarda FGF antikorlarının yara bölgesinde granülasyon dokusu depozisyonunu bozduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkılarak FGF'nin yeni damar oluşumunda ve granülasyon dokusu depozisyonunda önemli role sahip olduğu düşünülmektedir (Slavin, 1996, s. 6).

1.4.3. KGF

FGF familyasının bir üyesi olan KGF'nin (FGF-7 olarak da bilinir) etki alanı çok geniş olmamakla birlikte keratinositler için kemoatraktan ve mitojen olarak tanımlanmıştır. FGF familyasının diğer üyelerinden farklı olarak mezoderm kökenli hücreler üzerine etkili değildir. Reepitelizasyonu stimüle eden dermal/epidermal uyarıları oluşturur. Keratinositlerin proliferasyon ve migrasyonunun uyarılmasının yanı sıra farklılaşmasına da katkı sağlar. En yüksek KGF ekspresyonu yara çevresinde dermiste ve hipodermiste görülür (Slavin, 1996, s. 6; Cornelissen, 2004, s. 10). Yara oluşumundan sonra bütün FGF familyası üyelerinin ekspresyonunda artış görülse de KGF, 24 saat içinde 100 kat artmaktadır (Werner ve Grose, 2003, s. 839-840). KGF sentezinin en önemli uyarıcısı PDGF olmakla birlikte IL-1 β , IL-6 ve TNF- α da KGF indükleyicidir (Cornelissen, 2004, s. 10).

1.4.4. EGF

EGF familyası, EGF ve TGF- α gibi pek çok üyesi bulunan bir ailedir (Werner ve Grose, 2003, s. 841). EGF, trombosit degranülasyonu sırasında epitelyal hücreler ve lenfositlerden salınan bir büyüme faktörüdür. Fibroblastlar, düz kas hücreleri ve endotelial hücrelerde de EGF ile uyarılan reseptör bulunmakla birlikte EGF'ye en duyarlı hücreler epitel hücrelerdir. EGF fibroblastlar, endotelial hücreler ve epitel

hücreler için kemotaktiktir. Anjiogenez ve kolajenaz aktivitesi üzerinde uyarıcı etkilidir. TGF- α da bu familyanın bir üyesi olup keratinositlerin ve fibroblastların bölünmesini uyarak reepitelizasyonda görev alır (Cornelissen, 2004, s. 11; [http-7](#)).

1.4.5. TGF- β

Homodimerik bir peptid olan TGF- β 'nin önemli sekans homolojisi ve benzer biyolojik aktivite gösteren üç tipi tanımlanmıştır. Proliferasyon evresinde trombositler, fibroblastlar, makrofajlar ve T lenfositlerden salınan TGF- β , bir propeptid ile bağlı olarak inaktif şekilde salgılanır ve proteoliz veya yara bölgesindeki asidik ortam etkisiyle aktifleşir (Slavin, 1996, s. 5; Kılınç, 2012, s. 6). TGF- β 'nin fibroblast fonksiyonları üzerinde etkili temel faktör olduğu düşünülmektedir. Matriks depozisyonunda da etkili olan TGF- β kolajen, proteoglikan ve fibronektin sentezini artırır ve matriks yıkımından sorumlu olan proteazların sentezini azaltır (Diegelmann ve Evans, 2004, s. 286). Çok düşük konsantrasyonlarda bile hem makrofajlar hem de fibroblastlar için kemotaktiktir. Kolajen sentezinin en kuvvetli uyarıcısı olarak bilinir, kolajenazı aktive eden diğer faktörlerin uyarıcı etkisini de azaltır ([http-7](#)).

Yara oluşumundan hemen sonra temel olarak trombositlerden salınan TGF- β nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar için kemotaktik olmakla birlikte bu hücreler TGF- β 'nin diğer hücrelerdeki düzeylerini de artırır. TGF- β 'nin yara bölgesinde anjiogenezi, fibroblast proliferasyonunu, myofibroblast farklılaşmasını ve matriks depozisyonunu yönettiği bilinmektedir (Werner ve Grose, 2003, s. 848).

TGF- β 'nin fibroblastlar üzerindeki etkisi EGF ile birlikteyken inhibitör, PDGF ile birlikte stimülatör niteliktedir (Cornelissen, 2004, s. 11). Düşük konsantrasyonlarda fibroblast bölünmesini stimüle ederken yüksek konsantrasyonlarda farklılaşmayı stimüle eder. TGF- β hücreleri yara bölgesine çağırması, kolajen ve matriks depozisyonunu tetiklemesi, MMP sentezini modüle etmesi ve yara kontraksiyonunda görev alması sebebiyle onarım için önemli bir proteindir. “Yara Hormonu” olarak adlandırılacak molekül TGF- β olabilir (Slavin, 1996, s. 5; Kılınç, 2012, s. 7-8; [http-7](#)). TGF- β miktarının normalden daha yüksek olmasının hipertrofik skar ve fibrozis ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Han vd., 2001, s. 22341).

TGF- β_1 yara iyileşmesinin bütün aşamalarında aktif olup immün hücrelerin ortama gelmesini uyarır, matriks proteinlerinin sentezini artırır ve degradasyonunu azaltır, reepitelizasyonu stimüle eder, yara kontraksiyonu gibi olaylarda görev alır.

Dermal fibroblastlarda ve keratinositlerde migrasyonu stimüle eder. Hipertrofik skar ve keloid oluşumuyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. TGF- β_3 monosit ve makrofaj infiltrasyonunu ile fibronektin, tip I kolajen ve tip III kolajen miktarını azaltarak skar oluşumunu azaltır (Rajan ve Murray, 2008, s. 127; Walter vd., 2010, s. 1279; Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 31).

1.4.6. IL-1

Sağlam epidermiste yüksek miktarlarda üretilip depolanmaktadır. Yara oluşumu anında keratinositler tarafından biriktirilmiş olan IL-1 salıverilerek bariyer hasarının onarılması için nötrofillerin yara bölgesine toplanmasını sağlar (Cornelissen, 2004, s. 13; Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 30). Makrofajlar, monositler, fibroblastlar, keratinositler ve nötrofiller tarafından üretilen bir polipeptittir. Enfeksiyon, yaralanma veya antijenik invaziv olaylara yanıt olarak üretilir. IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki alt tipi vardır. Yara iyileşmesinin enflamatuvar evresinde üretimi oldukça artar (Kondo ve Ohshimo, 1996, s. 233-234; Turabelidze ve Dipietro, 2012, s.30). Nötrofil ve makrofajların aktivasyonu ile keratinositler ve fibroblastların proliferasyonunda, anjiogenezde, matriks sentezinde ve kolajen üretiminde etkilidir. Makrofajlardan kendisinin ve diğer sitokinlerin üretimini uyarır (Cornelissen, 2004, s. 13; Safferling vd., 2013, s. 684; Rozlomiy ve Markov, 2010, s. 280). Keratinositlerin proliferasyonu ve migrasyonu için hem parakrin hem de otokrin etkilidir (Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 30).

IL-1 ile TNF- α birlikte diğer sitokin, kemokin, büyüme faktörleri gibi sekonder medyatörlerin üretimini sağlamak üzere sinyal kaskadını başlatır, ikisi birlikte karşılıklı olarak birbirinin üretimini artırır. IL-1 α biyolojik olarak aktif prekürsör olarak üretilirken IL-1 β inaktif prekürsör formda bulunur (Chan vd., 1995, s. 1552; Magcwebaba, 2012, s. 2). IL-1, NF- κ B'yi aktive etmesi nedeniyle enflamatuvar dermatozlar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Cheng vd., 2008, s. 161)

1.4.7. IL-6

Keratinositler üzerindeki mitojenik ve nötrofiller için kemoatraktan aktivitesi sayesinde yara iyileşmesi yanıtının başlayabilmesi için kritik öneme sahiptir (Lin vd., 2003, s. 713; Cornelissen, 2004, s. 13). Polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, fibroblastlar, lenfositler ve aktif keratinositler tarafından üretilir. Lökosit infiltrasyonu,

B hücreleri, T hücreleri ve makrofajların stimülasyonu ile keratinosit büyümesi ve çoğalması üzerinde, anjiogenez ve kolajen akümülyasyonunda etkilidir. Fibroblastlarda KGF reseptör ekspresyonunu indükler. Salınımı IL-1 ve TNF- α tarafından indüklenir ve ikisi birlikte T hücrelerinin aktivasyonu ile akut faz proteinlerinin salgılanmasını sağlar. IL-6'nın makrofajlar üzerindeki etkisinin NF- κ B sinyal yolağı üzerinden olduğu tahmin edilmektedir. TNF- α üretimini azalttığı rapor edilmiş ve bu özellikleri ile hem proenflamatuvar hem de antienflamatuvar olduğu belirtilmiştir. Epitelizasyona katkı sağladığı IL-6 üretiminin baskılanmış olduğu wild-type farelerde yara iyileşmesinin retardasyona uğraması ile gösterilmiştir (Kondo ve Ohshimo, 1996, s. 234; Tonks vd., 2003, s. 243-245; Choi vd., 2014, s. 210). IL-6 normal kütanöz yara iyileşmesinde dermal fibroblast migrasyonunu etkilemesi sebebiyle temel bileşenlerden biri olarak kabul edilir. Keratinosit migrasyonu ve proliferasyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (Walter vd., 2010, s. 1279).

Yara bölgesinde IL-6 düzeylerinin yüksek olmasının skar oluşumu ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Rajan ve Murray, 2008, s. 126). Ayrıca IL-6 endojen pirojen olup B hücrelerinin büyümesi, farklılaşması ve immünoglobulin sentezlemesini uyarır (Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 30).

1.4.8. IL-8

IL-8 nötrofiller için potansiyel kemoatraktan olup keratinositler dahil pek çok hücre tipi tarafından üretilebilen aktivatör faktördür. Temel olarak nötrofiller ve yara bölgesinin hemen altındaki makrofajlardan salgılanarak daha fazla nötrofilin toplanmasını sağlar. Yara bölgesinde IL-8'in güçlü şekilde ekspresyonu başta TNF- α olmak üzere IL-1, LPS ve hipoksi gibi çeşitli faktörler tarafından indüklenir (Gillitzer ve Goebeler, 2001, s. 514; Hong ve Lyu, 2011, s. 43, 44, 47). Keratinositlerin migrasyon ve proliferasyonunu arttırarak reepitelizasyonu stimüle eder (Walter vd., 2010, s. 1279). Fibroblastlar tarafından oluşturulan kolajen kafesin kasılmasını inhibe eder. Nötrofiller gibi polimorfonükleer lökositler için en güçlü kemoatraktan olduğu belirtilmiştir (Cornelissen, 2004, s. 13). Nötrofillerden lizozomal enzimlerin salınmasını uyarır, fibroblastlardan kolajen üretimini azaltır (Wedler vd., 2014, s. 1679).

IL-8 ekspresyonunun cilt hastalıklarının patogeneğinde T hücreler ile nötrofillerin kemotaksisinde ve aktivasyonunda, keratinosit proliferasyonunda yüksek seviyelerde bulunduğu gösterilmiştir. LPS ile stimüle edilmiş keratinositler üzerinde yapılan

çalıřmalarda IL-8 seviyelerinin dūřūrılmasının deri enflamasyonunu önlemeye katkı saęlayacaęı ön görūlmüřtür (Hong ve Lyu, 2011, s. 47).

1.4.9. IL-10

IL-10 35 kD molekül ağırlığına sahip homodimerik bir sitokindir (King vd., 2014, s. 317). Makrofajlar ve bir miktar da lenfositler tarafından sentezlenen antienflamatuvar bir sitokindir. Makrofajları deaktive ederek proenflamatuvar sitokin salınımını azaltır (Rajan ve Murray, 2008, s. 126; Bermudez vd., 2011, s. 235). *In vitro* immünospresör etkileri olduğu gösterilmiştir (Kieran, 2013, s. 428). Dimerize olarak monositler üzerindeki tetramerik reseptör kompleksine bağlanır ve fosforilasyon ile etki gösterir (King vd., 2014, s. 317). Enflamatuvar sürecin sınırlandırılması ve sonlandırılmasında majör düzenleyici faktör olarak bilinir. Keratinositler, endotelial hücreler ve immün hücrelerin büyümesi ve/veya farklılaşmasını uyarırken nötrofillerin infiltrasyonu ile birlikte çeşitli enflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe eder. Aynı zamanda monositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi enflamatuvar hücrelerin göçünü de inhibe eder. IL-10'un fazla miktarda üretilmesinin skarsız yara kapanması ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Cornelissen, 2004, s. 14; Peranteau vd., 2008, s. 1853; Balaji vd., 2014, s. 359). Temel antienflamatuvar etkilerinin yanında yeniden yapılanma aşamasında etkili olan TGF- β gibi fibrojenik sitokinleri de düzenler (King vd., 2014, s. 317).

1.4.10. IL-12

IL-12 sitokin ailesinin enflamasyon sürecindeki kaynağı monositler, makrofajlar, keratinositler, langerhans hücreleri ve nötrofillerdir. IL-12; IL-12p40 ve IL-12p35 olmak üzere iki protein alt ünitesinden oluşan heterodimerik bir sitokindir. THP-1 hücrelerin uyarılmasında etkilidir, ilaveten NK hücreler ile T hücrelerin büyümesinde etkilidir (Çetinkaya, 2009, s. 20; Zheng vd., 2013, s. 2).

1.4.11. TNF- α

Enflamasyon patogenezinde önemli bir medyatör olan TNF- α , 157 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlığı 17 kD'dir. Yara bölgesinde başlangıçta makrofajlar, monositler, endotelial hücreler ve T hücreler tarafından üretilen bu medyatör ortamdaki konsantrasyonuna bağlı olarak enflamasyondan, doku yeniden yapılanmasına ve

sitotoksositeye kadar değişik etkiler gösterir. Enflamatuvar hücrelerin yara bölgesine göç etmesini sağlar. Keratinositlerden integrinlerin salınmasını uyarak ekstraselüler matriks proteinleri arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde rol oynar. Enflamatuvar evrede TNF- α 'nın temel kaynağı nötrofiller ve makrofajlardır. Fibroblastlar, keratinositler ve vasküler endotelial hücrelerin aktivasyonu ile ekstra selüler matriks proteinleri ile MMP inhibitörlerinin üretilmesini azaltırken MMP'lerin üretilmesini artırır. Makrofajların anjiogenik etkilerinin TNF- α kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Frank vd., 2003, s. 209-210; Turabelidze ve Dipietro, 2012, s. 31; Ritsu vd., 2017, s. 15). Makrofajlar tarafından kendisinin sentezini stimüle eder ve yine makrofajlardan diğer sitokinlerin salınmasını uyarır (Cornelissen, 2004, s. 13).

Yara iyileşmesinin erken evrelerinde doku degradasyonunda ve hücre göçünü kolaylaştıracak geçici ekstraselüler matriks oluşumunda etkilidir. PGE₂'yi stimüle ederek makrofajlarda kolajen üretimini uyarır. Anjiogenez ve epitelizasyonda görevli MMP'lerin sentezini artırır (Frank vd., 2003, s. 218). IL-1 üretimini stimüle eder ve IL-1 ile sinerjistik çalışır (Kondo ve Ohshimo, 1996, s. 234). Deride pro-MMP-9 üretimini uyarır (Han vd., 2001, s. 22349).

İyileşmeyen yaralarda ve hipertrofik skar oluşumu durumlarında TNF- α miktarının yüksek olduğu ve yara iyileşmeye başladığında TNF- α seviyesinin IL-1 ile birlikte azaldığı belirtilmiştir (Han vd., 2001, s. 22341; Battaglia vd., 2005, s. 7017).

1.4.12. VEGF

VEGF familyası üç farklı transmembranal tirozin kinaz reseptör üzerinden etki gösteren altı üyeli bir familyadır. Yara iyileşmesinde en sık görülen VEGF-A olup temel olarak keratinositler ve makrofajlardan salınır. VEGF reseptörlerinin granülasyon dokusundaki kan damarlarında tespit edilmesi VEGF-A'nın parakrin yol ile anjiogenezi stimüle ettiği düşünülmektedir. Temel olarak VEGF'in yara iyileşmesindeki rolü granülasyon dokusu oluşumunu ve anjiogenezi uyarmasıdır (Werner ve Grose, 2003, s. 843-844).

1.5. *Arnica montana* ve Helenalin

1.5.1. *Arnica montana*

Arnica montana (Şekil 1.11 ve Şekil 1.12) ilk defa 1753 yılında Linnaeus tarafından keşfedilmiş olan, Asteraceae (eski adı Compositae) familyasına ait,

antienflamatuvar özellikleriyle bilinen bir bitkidir (Macedo vd., 2004, s. 84; Lass vd., 2008, s. 849). 20-60 cm yükseklikte, kalın, silindirik, eğik veya hafif sürünücü saçak kök salan, çok yıllık bir bitkidir. Radyal açık yeşil yaprakları bütün, sapsız, oval, lanseolat, tabanda düzleşmiş bir rozettir; lamina nispeten dentattır; ana yaprak damarı beş sekonder paralel damara ayrılır. Yaprakların üst ve alt yüzeyleri tüyler ve salgı tüyleri ile kaplıdır. Çiçekler 6-8 cm çapta sarı turuncu renktedir. Kapitulum 18-24 adet lanseolat brakteden oluşan involukrum ile çevrilidir (Fransız Farmakopesi, 2008; May, 2013, s. 1).



Şekil 1.11. *Arnica montana* L. (Shiffman, 2011, s. 290).



Şekil 1.12. *A. montana* çiçekleri (Başer, 2016, s. 27)

Dağ öküzgözü olarak bilinen *Arnica montana* Avrupa kıtasına özgü bir bitkidir. Orta Avrupa’da, İskandinavya’nın güneyinde, Rusya’da, Kuzey İspanya’da, Balkanlarda 2500 m rakıma kadar olan vadilerde doğal olarak yetişmektedir. Almanya, İtalya, Fransa, İsviçre ve Şili’de tarımı yapılarak üretim sağlanmaktadır (Macedo vd., 2004, s. 84; May, 2013, s. 1; Başer, 2016, s. 26). Avrupa Farmakopesi’nin 5. versiyonunda *Arnica montana* L. Avrupa dağlarında yetişen endemik bir bitki olarak yer almaktadır (Ganzea vd. 2008, s. 196). Günümüzde nesli tükenmekte olan bitki olarak koruma altına alınmıştır (Purkait ve Sharma, 2015, s. 59).

Arnika kelimesi Latince hapşırmaya sebep olan anlamındaki “ptarnica” kelimesinden gelmektedir. Arnika aynı zamanda hapşırtan ağaç, kutsal ot ve düşen ot olarak da bilinmektedir (Macedo vd., 2004, s. 84; Alfredo vd. 2009, s. 467).

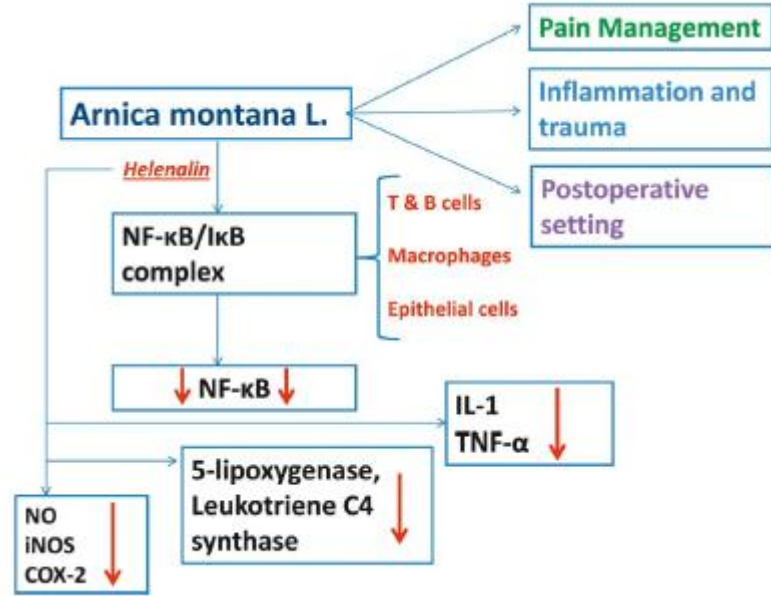
Bu bitki temel olarak %0,4-0,6 oranında flavonoidler (kersetin ve türevleri), %0,3-0,9 oranında seskiterpen laktonları (arnikolit, helenalin ve dihidrohelenalin), alkoller (arnidiol, arnilenediol, izoarnilenediol), karotenoidler, %0,23-0,35 oranında uçucu yağ, polisakkaritler, inulin, reçine ve tanenler içermektedir (Macedo vd., 2004, s. 84; Ahmad, 2013, s. 590; May, 2013, s. 2). Ayrıca lignanlar, pinorezinol, matairezinol ve kafeik asit türevlerini de içermektedir (Purkait ve Sharma, 2015, s. 59). Avrupa Farmakopesi’ne göre kuru drogda helenalintiglat olarak hesaplanmış total lakton miktarı %0.40’tan az olmamalıdır (Staneva vd., 2011, s. 94).

Arnica montana ilaç ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılan, tıbbi önemi olan bir bitkidir. Seskiterpen laktonları, flavonoidler, uçucu yağlar, terpenoidler ve fenolik asitlerden zengin olup antiseptik, antienflamatuvar, antiradikal, antibakteriyel, antisklerotik, antifungal, dekonjestan, yara iyileştirici ve antioksidan etkiler göstermektedir (Ahmad, 2013, s. 590; Kowalski vd., 2015, s. 857-858; Başer, 2016, s. 25).

Arnica montana batıda 16. yy.’dan beri bilinmekte olup topikal olarak tentürleri ve merhemleri hematomlar, ezilmeler, burkulmalar, romatoid durumlar, deride ve ağızda yüzeysel enflamasyonlar, yanıklar, serebral bozukluklar, deri kanseri ve uykusuzluk gibi çeşitli durumların tedavisi için kullanılmaktadır (Woerdenbag vd., 1995, s. 127; Alfredo vd., 2009, s. 467; Ahmad, 2013, s. 590; Başer, 2016, s. 25).

Geleneksel olarak çiçek ekstraktları hematomlar, ekimozlar, kemik kırıkları, burkulmalar, kramplar, kas ağrıları, romatizmal şikayetler, konküzyon, alopesi gibi durumlarda kullanıldığı bilinmektedir ve yakın zamanda yapılan klinik çalışmalar A.

montana'nın geleneksel kullanımını destekler niteliktedir (Lass vd., 2008, s. 849; May, 2013, s. 1; Purkait ve Sharma, 2015, s. 60). Avrupa Farmakopesi'nde *Arnicae flos* (dağ öküzgözü çiçeği) ve *Arnicae tinctura* (dağ öküzgözü tentürü) kayıtlıdır. Avrupa Farmakopesi, Fransız Farmakopesi, ABD Homeopatik Farmakopesi ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) dağ öküzgözü monografları yayımlanmıştır (Başer, 2016, s. 26).

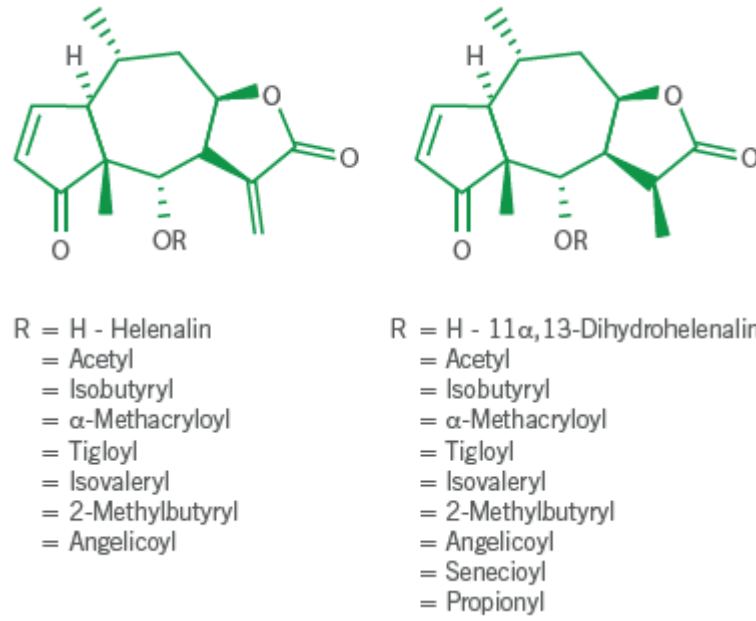


Şekil 1.13. *A. montana*'nın etki mekanizmaları (Iannitti vd., 2014, s. 2).

Oral olarak alındığında vazodilatasyon, kapiller geçirgenlikte artış, endotel membranının hasar görmesi, kanama gibi etkiler oluşabilir. Kaslarda ağrı ve rijidite görülebilir, santral ve sempatik sinir sistemi etkilenebilir (Macedo vd., 2004, s. 85). Ancak homeopatik preparatlar halinde dahilen kullanımı bulunmaktadır. Sadece Almanya'da 360 adet homeopatik preparatı kayıtlıdır (May, 2013, s. 5; Başer, 2016, s. 27).

Genellikle *A. montana* ticari olarak şampuanlar, kepek önleyici ürünler, saç tonikleri gibi çeşitli kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır (Başer, 2016, s. 26).

Bitkinin etkilerinden sorumlu bileşenlerin helenalin, 11- α , 13- dihidrohelenalin ve chamissonolide gibi seskiterpen laktonları ve bunların kısa zincirli esterleri (Şekil 1.14) olduğu ileri sürülmektedir (Staneva, 2011, s. 94; Purkait ve Sharma, 2015, s. 59; Rodrigues vd., 2016, s. 331).



Şekil 1.14. Helenalin ve 11-α, 13- dihidrohelenalin'in kimyasal yapıları (May, 2013, s. 2)

Antienflamatuvar etkiler temel olarak nükleer faktör (NF) κ B ve NF-AT'nin seskiterpenlaktonları tarafından inhibisyonu ile açıklanır (Ganzera vd., 2008, s. 196). Bu etkinin helenalin, 11-α, 13- dihidrohelenalin ve bunların ester türevleri gibi psödoguaianolit tip seskiterpen laktonlarından oluşan sekonder metabolitler tarafından yönetilmektedir (Lass vd., 2008, s. 849).

A. montana içeriğinde bulunan seskiterpen laktonları (özellikle helenalin ve 11-α 13-dihydrohelenalin gibi türevleri) bitkinin temel aktif bileşenleri olarak bilinir. Antienflamatuvar etkinlik gösterdikleri pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada gösterilmiştir, deriden penetre oldukları ve NF- κ B aracılı etki gösterdikleri bilinmektedir (Alfredo vd., 2009, s. 469-470; Huber vd., 2011, s. 279).

A. montana'nın genellikle çiçekli kısımlarının kullanıldığı çeşitli çalışmalarda antioksidan, asetilkolin esteraz inhibitörü, kolajen ile indüklenmiş platelet agregasyonu inhibitörü, antienflamatuvar, analjezik, anksiyolitik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Macedo vd., 2004, s. 85; Alfredo vd., 2009, s. 467; Dimitrova ve Balabanova, 2012, s. 736; Ahmad, 2013, s. 590). Topikal formülasyonlarının kontakt dermatite yol açabileceği ve varfarin ile etkileşime girdiği belirtilmiştir (Hill vd., 2016, s. 47).

1.5.2. Seskiterpen laktonları

Doğal Bileşenler Sözlüğü'nde seskiterpen laktonlarına ait yaklaşık 5000 yapı kayıtlıdır. Bunların 4000'den fazlası Asteraceae familyasına aittir (Talhouk vd., 2015, s. 1-2). Bunun yanında Umbelliferae ve Magnoliaceae familyalarında da kuru bitki ağırlığının %1'inden fazla miktarlarda bulunurlar. Lipofilik yapıdaki sekonder metabolit familyası olan terpenoitlerin alt grubu olup renksiz, acı ve stabildirler. Kimyasal olarak bakıldığında üç adet izopren (5 karbonlu) biriminden ve bir lakton halkasından oluşan 15 karbonlu bileşiklerdir (Ghantous vd., 2010, s. 668).

Asteraceae familyası bol miktarda terpenoitler, alkaloitler, fenolikler ve poliasetilenler içermesi sebebiyle biyolojik ve farmakolojik açıdan önemli bir familya olup bu familyada en bol bulunan sekonder metabolitlerin seskiterpen laktonları olduğu belirtilmiştir (Chadwick vd., 2013, s. 12781).

Seskiterpen laktonları açısından zengin bitki ekstraktlarının enflamasyonlar, enfeksiyonlar ve baş ağrısı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ilgi çektiği bilinmektedir. Yine bu grupta yer alan aktif bileşenler olan tansigargin, artemisin ve partenolit kanser klinik çalışmalarındadır (Ghantous vd., 2010, s. 668).

1.5.3. Helenalin

Arnica montana L. ve Asteraceae familyasındaki birkaç bitki türünde bulunan antienflamatuvar, antiparazitik ve antitümör etkileri bulunan bir seskiterpen laktonudur (Supornsilchai vd., 2006, s. 631; Jang vd., 2013, s. 588). Avrupa'nın dağlık bölgelerinde, özellikle Rusya'da doğal olarak yetişen *A. montana* bitkisinin toprak üstü kısımlarında helenalin bulunur (Auld vd., 2006, s. 314).

Helenalin tiyol grubu taşıyan enzimlerin aktivitelerini engellemesi nedeniyle sitotoksiktir. Fakat tarihte yıllar boyunca helenalin ve türevlerini içeren alkollü ekstraktlar hematomları, burkulmaları, romatoid hastalıkları ve yüzeysel deri enflamasyonlarını tedavi etmek için antienflamatuvar olarak kullanılmıştır (Woerdenbag vd., 1995, s. 127; Berges, 2009, s. 2892). Temel kullanımı antienflamatuvar etkinlik olsa da helenalinin *in vivo* hayvan modellerinde siklik AMP'yi yükselterek kardiyotonik etki gösterdiğine dair kanıtlar vardır (Auld vd., 2006, s. 314).

Helenalinin selektif olarak NF- κ B'yi inhibe ettiğini ve bunu yüksek ihtimalle p65 alt biriminde DNA bağlanma bölgesindeki s-38 ve s-120 sistein rezidülerini alkilliyleyerek hedef DNA sekanslarına bağlanmasını engelleyerek yaptığı ileri sürülmüştür. Bu yolla

DNA tanıma ve bağlanmayı inhibe etmektedir. Farklı bir çalışmada ise helenalinin aynı zamanda insan kan hücrelerinde 5-Lipoksigenaz ve Lökotrien C4 sentazı inhibe ederek etki gösterdiği rapor edilmiştir (Tornhamre vd., 2001, s. 904; Supornsilchai vd., 2006, s. 631; Gautam ve Jacoback, 2009, s. 776; Chadwick vd., 2013, s. 12785). Helenalin NF- κ B inhibisyonu üzerinden pek çok enflamatuvar sitokinin üretimini inhibe etmektedir. Bu durum makrofajlar, nötrofiller gibi immün hücrelerin görev yapmasını engelleyerek enflamasyonu azaltır (May, 2013, s. 4).

Helenalin ve diğer seskiterpen laktonları, sistein ve glutatyon gibi tiyol grubu taşıyan enzimler ile reaksiyona girer ve kovalent bağ oluştururlar (Tornhamrea vd., 2001, s. 903; Supornsilchai vd., 2006, s. 631).

1.5.4. NF- κ B

Enflamasyonun başlangıcında aktifleşen transkripsiyon faktörlerinden biridir (Chan, 1995, s. 1551). 50 kD'lık p50 ve 65 kD'lık p65 alt birimlerinden oluşur. Sitoplazmada I- κ B ile birlikte inaktif halde bulunur. TNF- α , IL-1 ve endotoksin gibi uyarılar, I- κ B'nin fosforilasyon ile degradasyonunu tetikler. Böylece aktifleşmiş olan NF- κ B nükleusu içine göç eder ve proenflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu başlatır (Cheng vd., 2008, s. 161; Huang vd., 2015, s. 32).

NF- κ B insanlarda sitokinler, enflamatuvar moleküller ve hücre adezyon moleküllerine yanıtını kontrol ederek immün cevabı yönetir. Aynı zamanda apoptoz ve metastaz yollarının regülasyonu üzerinden kanser ile de ilişkilidir. NF- κ B inhibisyonu enflamatuvar yanıtı azaltır ve kanser büyümesini inhibe eder (Chadwick vd., 2013, s. 12784-12785).

Seskiterpen laktonlarının NF- κ B'nin p65 alt biriminin alkilasyonu ile antienflamatuvar etkili, antijenik T hücre determinantları oluşturmak üzere proteinlerin haptan modifikasyonu ile proenflamatuvar ve proalerjik etki gösterdiği belirtilmektedir (Lass vd., 2008, s. 854).

2. GEREÇLER

2.1. Kullanılan Maddeler ve Malzemeler

THP-1 (ATCC-TIB 202, Amerika Birleşik Devletleri)
HaCaT (CLS no: 300493, Almanya)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (D6429, Sigma–Aldrich, Almanya)
RPMI-1640 medyum (1X) (HyClone, Thermo Scientific, Almanya)
Fetal Bovine Serum (FBS) (FBS-HI-11A, Capricorn Scientific, Almanya)
Penisilin/Streptomisin (Gibco, Almanya)
Merkaptoetanol (Sigma–Aldrich, Almanya)
25 cm²'lik hücre kültür flaskı (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetör (Eppendorf, Kanada)
10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere)
50 ml'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)
Cedex Smart Slide (Roche, Almanya)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma–Aldrich, Almanya)
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya)
Tripan mavisi (Roche, Almanya)
Kryotüp (2 ml) (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
Lamel (Isolab, Almanya)
Hücre kazıyıcı (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)
Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen, Almanya)
Trypsin-EDTA 10X (Pan, Biotch)
LPS, L4391, E. coli (Sigma–Aldrich, Almanya)
WST-1 sitotoksitesite kiti (25 ml) Cat no:11644807001 (Roche, Almanya)
Helenalin (sc-218579, Santa-Cruz Biotechnology, Amerika Birleşik Devletleri)
Cell Proliferation Reagent WST-1(Roche, Almanya)
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre)
xCELLigence E-plate 16 (Roche, Almanya)
CIM-plate 16 (Roche, Almanya)

2.2. Kullanılan Cihazlar

HERAcell 150 Steril CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific, Almanya)

Laminer flow kabini (Heal Force, Çin)

Masaüstü soğutmalı santrifüj (5810 R, Eppendorf, Kanada)

Hücre sayımı için Cedex XS (Innovatis, Almanya)

Inverted mikroskop (Leica, Almanya)

Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Amerika Birleşik Devletleri)

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) (Roche, Almanya)

Akış Sitometri Cihazı (BD) (Accury, Amerika Birleşik Devletleri)

Sterilizatör (Nuve, Türkiye)

Su banyosu (Nuve BM 302, Türkiye),

Vorteks (Daihan, Güney Kore)

Otoklav (Alp, Türkiye)

3. YÖNTEMLER

3.1. Deneylerde Kullanılan THP-1 Hücre Hattı ve Özellikleri

1980’de Tsuchiya ve arkadaşları tarafından geliştirilen THP-1 hücre hattı keşfedildikleri günden itibaren monosit ve makrofajların fonksiyonlarının araştırılmasında, antienflamatuvar etkilerin değerlendirilmesinde en sık kullanılan hücrelerden olmuştur. Bununla birlikte bu hücreler akut monositik lösemi hastasının kanından elde edildiği için monosit ve makrofajları ne ölçüde taklit ettiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Başlangıçta yapılan çalışmalar THP-1 hücrelerinin morfolojik ve farklılaşma özellikleri bakımından primer monosit ve makrofajlara benzediğini göstermiştir (Shah vd., 2007, s. 1; Qin, 2012, s. 2). Dolayısıyla bu hücre hattı sadece monosit ve makrofaj benzeri hücrelerin immün yanıt çalışmalarında kullanılmaktadır. Monosit durumundaki THP-1 hücreleri forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) gibi bazı ajanlar kullanılarak makrofaja dönüştürülebilir (Shah vd., 2007, s. 2; Chanput, 2014, s. 37).

THP-1 hücrelerinin makrofajlara dönüşümü için yapılan çalışmalarda PMA maruziyetini takiben THP-1 hücrelerinin neredeyse tamamı kültür plaklarına yapışmaya başlamış, belirgin morfolojik değişiklikler (gelişmiş golgi aygıtı, granüllü endoplazmik retikulum, sitoplazmada bol miktarda serbest ribozom ve ameboid şekil) ile makrofaj fenotipine dönüşmüştür. PMA’dan başka $1\alpha,25$ -dihidroksi vitamin D₃ de THP-1 hücrelerini makrofaja dönüştürücü etki göstermektedir. THP-1 hücrelerinin primer insan monosit-makrofaj hücrelerine kıyasla homojen genetik yapı sayesinde hücre fenotip değişikliklerini en aza indirmek gibi bazı avantajları vardır (Qin, 2012, s. 3-4).

3.2. Deneylerde Kullanılan HaCaT Hücre Hattı ve Özellikleri

HaCaT hücreleri (Human adult Calcium high Temperature) ölümsüzleşmiş insan keratinosit hücreleri olup epidermal homeostaz ve bunun patofizyolojisinin araştırıldığı çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Seo vd., 2012, s. 171; Hofmann vd., 2014, s. 11295). Uygun besiyeri içerisinde uzun kültüre edilebilir (Deyrieux ve Wilson, 2007, s. 78). Normal keratinosit morfolojisini ve epidermal farklılaşma kapasitesini sürdürmektedir, sitokin ve kemokin salınımı gerçekleştirebilir (Wedler vd., 2014, s. 1681).

HaCaT hücreleri ölümsüzleşmiş hücreler (140 pasajdan daha fazla yaşayabilir) olmasına rağmen non-tümörojenik yapıdadır. Morfojenez ve farklılaşma özellikleri olup nüde fareye transplante edildiğinde veya başka şekilde optimal koşullar sağlandığında normal keratinositler gibi davranmakta ve düzenli yapılanmış epidermis oluşturabilmektedir (Boukamp vd., 1988, s. 761; Sandt vd., 1999, s. 727; Szabowski vd., 2003, s. 2938).

HaCaT hücre hattının IL-1 β ve TNF- α ekspresyonunun LPS ile indüklenmesi özelliğinden dolayı deri enflamasyonunun moleküler mekanizmalarının araştırılması için yaygın kullanılan bir keratinosit hücre hattıdır (Cheng vd., 2008, s. 165).

Daha önce yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılan bu hücre hattı primer insan keratinositlerine benzer migrasyon indeksine sahiptir, normal keratinositlerin pek çok özelliğini taklit eder, kalsiyum ve retinoitler gibi farklılaşma modülatörlerine yanıt verir (Sandt vd., 1999, s. 728; Ranzato vd., 2008, s. 538).

3.3. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

3.3.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak kuru sterilizatörde 180°C’de 2 saat; sıvı solüsyonlar ise 121°C, 1,5 atm/Hg’de otoklavda 20 dakika steril edilmiştir.

3.3.2. Helenalin konsantrasyonlarının hazırlanması

Toz haldeki Helenalin DMSO içinde çözülerek 20 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyon kullanılarak kültür medyumuna ile çeşitli seyreltmeler yapılarak 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 ve 0,095 μ M Helenalin çalışma konsantrasyonları hazırlanmıştır. En yüksek Helenalin konsantrasyonunda DMSO konsantrasyonu %0,1 olduğu için kontrol grubuna, kültür medyumuna ile hazırlanmış %0,1 DMSO uygulanmıştır. Helenalin ile hazırlanan ana stok aliquatlanarak -20°C’de saklanmıştır. Deneylerde kullanılan Helenalin çalışma konsantrasyonları her deney için taze hazırlanarak kullanılmıştır.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

HaCaT hücre hattı %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren *Dulbecco’s Modified Eagles Medium* (DMEM) besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5

CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de inkübe edilmiştir (HaCaT hücreleri Ankara Üniversitesi’nden Sayın Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKCİ’den temin edilmiştir).

THP-1 hücre hattı %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %0,37 merkaptotanol içeren RPMI-1640 besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de inkübe edilmiştir.

3.4.1. Hücre sayımları

3.4.1.1. HaCaT hücrelerinin sayımı

25 cm²’lik flaskta büyütülen HaCaT hücrelerinin üzerinden kültür medyumunu pipetle alınarak atılmış ve PBS ile hücreler yıkanmıştır. Yıkama solüsyonu pipetle alındıktan sonra hücrelerin kalkmasını sağlamak amacıyla 1ml tripsin EDTA eklenerek inkübatörde 3 dakika bekletilmiştir. İnkübatörden alınan hücrelerin üzerine tripsinin etkisini nötralize etmek için 5 ml kültür medyumuna eklenmiş ve hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 1200 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınmış ve pelet üzerine 1 ml kültür medyumuna ilave edilmiştir. Bu süspansiyondan alınan 10 µl örnek, bir lamel üzerinde 10 µl Tripan mavisi ile karıştırılarak Cedex Smart Slide’a aktarılmış ve Cedex XS (Innovatis) cihazı ile 1ml’deki hücre sayısı bulunmuştur. Deneylerde kullanılmak istenen hücre sayısına göre besiyeriyle dilüsyonlar yapılmıştır.

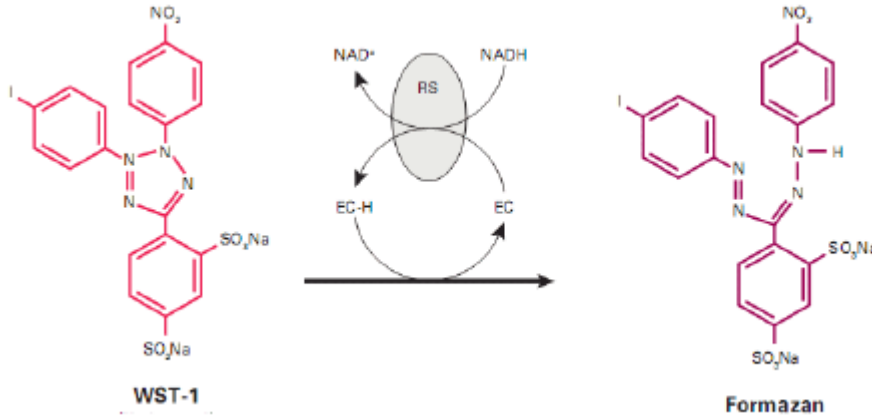
3.4.1.2. THP-1 hücrelerinin sayımı

25 cm²’lik flaskta bulunan THP-1 hücreleri pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alınmış ve 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant alındıktan sonra pellet üzerine 1 ml besiyeri ilave edilmiştir. Bu süspansiyondan alınan 10µl örnek, bir lamel üzerinde 10 µl Tripan mavisi ile karıştırılarak Cedex Smart Slide’a aktarılmış ve Cedex XS (Innovatis) cihazı ile 1 ml’deki hücre sayısı bulunmuştur. Deneylerde kullanılmak istenen hücre sayısına göre besiyeriyle dilüsyonlar yapılmıştır.

3.5. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksitenin Belirlenmesi

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı testlerde yaygın olarak 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2, 4- disülföfenil)-2 H-tetrazolyum monosodyum (WST-1) gibi tetrazolyum tuzları kullanılır (Terzioğlu vd., 2013, s. 78). Bu yöntemin temel prensibi sarı renkli tetrazolyum tuzunun mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla suda

çözünmeyen koyu kırmızı renkte formazan kompleksine dönüşmesine dayanır (Mutlu-Altundağ, 2016, s. 35).



Şekil 3.1. WST-1'in formazana dönüşümü (Çanaklı, 2016, s. 31).

WST-1 yöntemi sitotoksosite, hücre canlılığı, hücre aktivasyonu ve hücre proliferasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. WST-1 reaktifi canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleri ile bir ara elektron alıcısı varlığında parçalanarak (Şekil 3.1) formazan kristallerini oluşturur. Bu durum canlı hücrelerde nikotinamid adenin dinükleotid fostat (NAD/NADP) ve indirgenmiş NADP (NADPH) oluşumuna bağlıdır, dolayısıyla bu yöntem sadece metabolik olarak aktif (canlı) hücreleri tespit eder (Çanaklı, 2016, s. 31). Formazan miktarındaki artış kültür ortamındaki canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü canlı hücre sayısı hakkında bilgi verir (Kapucı, 2011, s. 19-20). Hücre canlılık oranı aşağıdaki yöntemle hesaplanır (Toplayıcı, 2015, s. 34):

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100 \quad (3.1)$$

WST-1 yönteminin diğer yöntemlere karşı avantajları; düşük hücre sayılarının tespit edilebilir olması, absorbans-hücre sayısı korelasyonunun yüksek olması, daha verimli ve daha parlak sinyal vermesidir (Terzioğlu vd., 2013, s. 85).

WST-1 toksik olmayan, suda çözünebilir membran-geçirgen ürünlere metabolize edilmesi nedeniyle kültürde kolayca difüze olur. Bu sayede hücre kültürlerinin canlılığını riske atmaz, arada çözünme gibi başka bir aşama da içermediğinden uygulanması diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında daha kolaydır (Galluzi vd., 2009, s. 10).

HaCaT hücreleri %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyerinde %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de kültüre edilmiştir. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılmış ve 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 3000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. HaCaT hücreleri yapışmaları için %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

THP-1 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %0,37 merkaptotanol içeren RPMI-1640 besiyerinde %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de kültüre edilmiştir. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılmış ve 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 3000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

DMSO ile çözülerek hazırlanmış olan Helenalin stok çözeltisinde her iki hücre kültür besiyeri ile gerekli seyreltmeler yapılarak uygun Helenalin konsantrasyonları (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,095 µM) hazırlanmıştır.

HaCaT hücrelerinin üzerindeki besiyeri pipet yardımı ile alınmış ve kuyucuklara taze olarak kültür besiyerinde hazırlanmış olan Helenalin konsantrasyonları uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücelere ise %0,1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır.

THP-1 hücreleri süspansiyon halinde olduğu için konsantrasyonları verilmeden önce %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de 3-4 saat bekletilmiştir. Kuyucuklara taze olarak kültür besiyerinde hazırlanmış olan Helenalin konsantrasyonları uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücelere ise %0,1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır.

Helenalin konsantrasyonları uygulanan plakalar 24 ve 48 saat %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine WST-1 kit (Katalog no:11644807001, Roche) prosedürü talimatlarına göre 10 µl WST-1 reaktifi ilave edilmiş ve hücreler 3 saat %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda ELISA okuyucu cihazında her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde 420 nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçülmüştür. Renk oluşumuna göre ölçülen absorbands değerleri direkt olarak hücre canlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % canlılık ve % inhibisyon olarak hesaplanmıştır.

3.6. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Proliferasyonu ve Migrasyon Analizi

3.6.1. Proliferasyon analizi

Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde kullanılacak Helenalin konsantrasyonları, ön tarama testimiz olan WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Helenalinin belli konsantrasyonları hücre hatları için xCELLigence cihazında uygulanmıştır.

xCELLigence geleneksel olarak hücre kültürlerinden belirli zamanlarda örnek olarak yapılan biyokimyasal ölçümlerden farklı olarak elektriksel empedans ölçümü ile hücre canlılığını tespit eder. Hücre kültürlerindeki çoğalma ve ölümler gerçek zamanlı olarak hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin ölçülmesi ile tespit edilir. Ölçümün yapılabilmesi için çalışılacak hücrelerin adhezif nitelikte olması ve E-plakanın tabanına tutunması gerekir (Bülbül, 2011, s. 1; Limame vd., 2012, s. 2).

xCELLigence RTCA-DP sisteminin temel çalışma ilkesi kültür flaskı üzerine yapışan hücre miktarının artması ile elektrik akımına karşı direncin de artması prensibine dayanır. Bu sistem uzun süreli sitotoksitenin, hücre canlılığının ve hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanılır (Urcan vd., 2010, s. 52; Bülbül, 2011, s. 1; Serdaroğlu, 2015, s. 23-24).



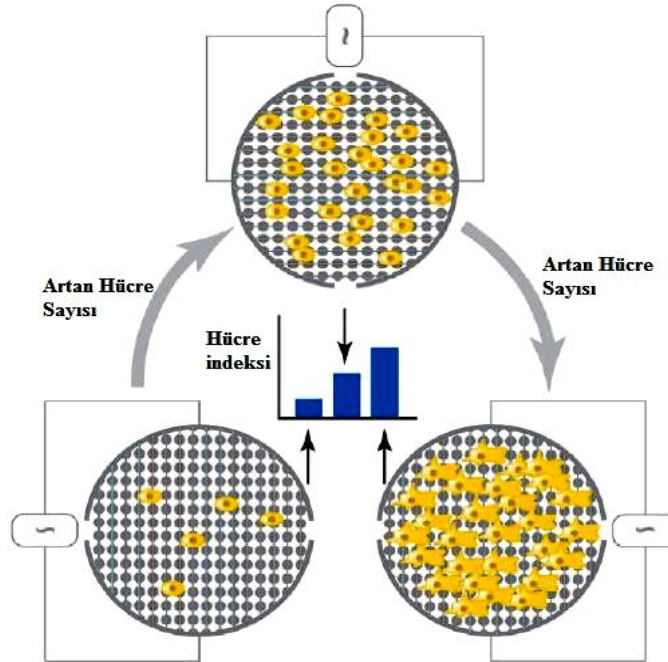
Şekil 3.2. xCELLigence RTCA-DP sisteminde kullanılan 16 kuyucuklu E-plaka

E-plakalarda kuyucukların dibinde bulunan altın mikroeletrotlar aracılığıyla sistem tarafından ölçülen empedans değerleri literatürde kabul edilen ‘cell index’ (CI)

(hücre indeksi) değeri olarak hesaplanır. Bu değer, hücreler E-plakanın tabanını kaplayıp çoğaldıkça verilen elektriksel yanıtla (Şekil 3.2) paralel olarak artar (Xi vd. 2011, s. 416; Limame vd., 2012, s. 2; Özdemir ve Ark, 2013, s. 16). Ayrıca xCELLigence sisteminde zamana bağlı olarak EC50 değerinin hesaplanabiliyor olması klasik toksisite testlerinde hesaplanan EC50 değerinden daha aydınlatıcıdır (Urcan vd., 2010, s. 52).

$$\text{Hücre indeksi (CI)} = \max_{i=1, \dots, N} + \left(\frac{R_{\text{hücre}}(fi)}{R_0(fi)} - 1 \right) \quad (3.2)$$

$R_{\text{hücre}}$ ya da R_0 değerleri plakanın her bir gözünde bulunan hücreli ya da hücresiz alanların verdiği direncin sıklığına göre ölçülür.



Şekil 3.3. RTCA DP Cihazında E-plakalardaki hücre sayısının artışına bağlı olarak CI değerlerinin gösterilmesi. (Limame vd., 2012, s. 2)

Bu sistem ile HaCaT hücre hattında helenalinin hücre proliferasyon ve migrasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak kayıt altına alınmış ve bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak izlenmiştir.

3.6.2. Migrasyon analizi

RTCA DP sistemi ile CIM plaka kullanılarak farklı helenalin konsantrasyonlarının hücre migrasyonuna etkilerine bakılmıştır. CIM plakalar iki odalı bir sistem olup hücrelerinin geçişine izin veren mikro gözenekli membrandan

oluşturmuştur. Hücreler serumsuz medyum ile üst odacığa ekilirler. Üst odacıktaki hücreler porlu membranı geçerek alt odacıktaki serumlu medyuma doğru hareket ederler. Migrasyon özelliğine sahip hücreler serumsuz medyumun olduğu odacıktan serumlu medyumun olduğu alt odacığa geçme eğilimindedirler. Dolayısıyla migrasyonu hızlı olan hücreler daha çok alt odacığa geçerek çoğalırlar ve geçiş sırasında cihaz tarafından sinyal alınır. Migrasyona uğramayan hücreler ise üst odacığa kalırlar ve sinyal alımı olmaz.



Şekil 3.4. *Migrasyon Çalışmalarında Kullanılan CIM Plakalar*

3.6.3. Proliferasyon ve migrasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hücre hatlarının ve maddelerin hazırlanması

Lipopolisakkarit (LPS), Gram negatif bakteriler ile enfeksiyonun neden olduğu çeşitli konakçı yanıtlarının başlamasında önemli rol oynar. Bu tür bir etki, örneğin pro ve anti-enflamatuvar sitokin genlerinin up-regülasyonu gibi sitokin proteinlerinin salgılanması ile sonuçlanan sistemik enflamatuvar yanıtı yol açar. Bazı transkripsiyon faktörlerinin, enflamasyonla ilişkili sitokin ve enzim genlerinin reseptör aracılı ekspresyonu ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bardaş, R., 2015, s. 11-12).

İnsan monosit hücrelerinin LPS ile stimülasyonu, LPS'nin Toll-benzeri reseptör-4 (TLR4) ve ilişkili proteinlere bağlanması ile başlar. Oluşan bu kompleks çeşitli intraselüler yolları aktive eder. NF- κ B, Akt/fosfoinositit-3-kinaz (PI3K) yolları ve mitojen aktif protein (MAP) kinazlar aktifleşerek çeşitli proenflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinlerin üretimine sebep olur (Olafsdottir vd., 2014, s. 1452).

THP-1 hücrelerinin enflamatuvar sitokin üretmek üzere stimüle edilmesi amacıyla 5 μ g/ μ l konsantrasyonda LPS stok çözeltisinden 1 μ l alınıp 500 μ l besiyerine eklenmiş

ve bu çözeltiden 10 µl alınarak 1 ml besiyerine eklenmesiyle 100 ng/ml LPS konsantrasyonu stimülasyon için kullanılmıştır.

THP-1 hücreleri flasktan alınmış, santrifüj edilmiş ve 1 ml besiyerinde dağıtılıp sayım yapılmıştır. THP-1 hücrelerinin stimülasyonu için 25 cm² flaska 6 ml’de 600.000 hücre ekimi yapılp 60 µl LPS çözeltisi verilerek 4 saat %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C’de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda santrifüj yapılmış ve xCELLigence hücre proliferasyon analizi ve çizik deneylerinde kullanılmak üzere süpernatant alınmış, -20°C’de stoklanmıştır.

Helenalin konsantrasyonlarının hazırlanması için 20 mM olan stok çözeltisinden taze besiyeri ve THP-1 hücrelerinin LPS ile stimüle edilmesinden sonra alınmış olan stimüle süpernatant ile gerekli dilüsyonlar yapılarak 4 µM, 0,4 µM, ve 0,04 µM helenalin konsantrasyonları hazırlanmıştır.

HaCaT hücreleri flasktan kaldırılmış, santrifüj edilmiş ve dağıtılmıştır. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının belirlenmesi için Cedex cihazında hücreler sayılmıştır.

3.6.4. Hücre proliferasyonunun gerçek zamanlı olarak belirlenmesi

Proliferasyon çalışmasında hücrelerin adezif nitelikte olması gerektiğinden HaCaT hücre hattı ile çalışılmıştır. 3 adet 16 kuyucuklu altın elektrot kaplı E-plakaya ekim yapılmıştır.

Çalışmada kullanılacak E-plakalara 100 µl hücreye ait besiyeri eklenmiştir ve cihazda ilk okuma alındıktan sonra E-plakalar cihazdan çıkarılıp 100 µl besiyeri üzerine 100 µl’de 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 30 dakika steril kabinde bekletilen plakalar daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve saatte 1 ölçüm alacak şekilde cihaz programlandıktan sonra deney başlatılmıştır. Kontrol grupları için %0.1 DMSO ve LPS ile koşullandırılmış medyum uygulanmış ve sistem 48 saat daha çalıştırılmıştır. Elektriksel empedans, RTCA DP sisteminin RTCA’ya bağlı yazılımı ile CI adı verilen boyutsuz bir parametre ile analiz edilmiştir.

24 saat sadece HaCaT hücreleri ve besiyeri ile sistem çalıştırılmış ve hücreler log fazına ulaşmıştır. 24 saatin sonunda sistem durdurulmuş, plakalar çıkarılmıştır. Plaka kuyucuklarından 100 µl besiyeri çekilmiştir. Bir grup hücrenin üzerinde 100 µl Helenalin çözeltisi (son konsantrasyon 2 µM, 0,2 µM ve 0,02 µM olacak şekilde) eklenmiştir. Bir grup hücrenin üzerine ise THP-1 hücrelerinin LPS ile stimüle

edilmesinden alınan süpernatant ile hazırlanmış LPS'li besiyerinde hazırlanmış helenalin konstantasyonları (2 μ M, 0,2 μ M ve 0,02 μ M olacak şekilde) uygulanmıştır. Kontrol gruplarına %0,1 DMSO içeren taze besiyeri ile THP-1 hücrelerinin LPS ile stimüle edilmesinden sonra alınan %0.1 DMSO içeren medyum uygulanmıştır. Sistem konsantrasyonların uygulanmasından sonra 48 saat daha çalıştırılmıştır.

Toplamda 72 saatin sonunda çalışma durdurulmuş ve sonuçlar CI değeri olarak hesaplanmıştır.

3.6.5. Hücre migrasyonun belirlenmesi

RTCA DP sisteminde migrasyon analizi için kullanılan CIM plakalar iki odalı bir sistem olup hücrelerinin geçişine izin veren mikro gözenekli membrandan oluşmuştur. Hücreler serumsuz medyum (SFM) ile üst odacığa ekilirler. Üst odacıktaki hücreler porlu membranı geçerek alt odacıktaki serumlu medyuma (SM) doğru hareket ederler. Migrasyon özelliğine sahip hücreler serumsuz medyumun olduğu odacıktan serumlu medyumun olduğu alt odacığa geçme eğilimindedirler. Dolayısıyla migrasyonu hızlı olan hücreler daha çok alt odacığa geçerek çoğalırlar ve geçiş sırasında cihaz tarafından sinyal alınır. Migrasyona uğramayan hücreler ise üst odacıkta kalırlar ve sinyal alımı olmaz.

Migrasyon çalışması için CIM plakanın alt odacıklarına 160 μ L SM eklenmiş ve üst ile alt odacık birleştirilmiştir. Ardından migrasyon için üst odacıklara 20 μ L SFM eklenmiştir. CIM plakalar 1 saat 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda cihazda ilk ölçüm alınmıştır. Ölçüm alındıktan sonra her bir üst kuyucuğa 2×10^4 HaCaT hücresi ekilmiştir ve hücreler üzerine xCELLigence proliferasyon analizine göre belirlediğimiz 0,2 ve 0,02 μ M helenalin konsantrasyonları LPS'li medyum içinde uygulanmıştır. Daha sonra CIM plakalar cihaza yerleştirilmiş ve 10 dakikada bir ölçüm alacak şekilde cihaz programlanmış ve deney başlatılmıştır. 24 saat sonunda deney durdurulmuştur.

3.7. Çizik Deneyi ile Helenalinin Yara İyileşmesi ve Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Keratinosit fizyolojisini araştırmak için genellikle HaCaT gibi hücre hatları veya deri rezeksiyonundan elde edilen primer hücreler kullanılır (Subalakshmi vd., 2014, s. 130). *In vitro* yara iyileşmesi testleri arasında çizik deneyi standart bir teknik olarak

kabul edilir (Liang vd., 2007, s. 329). Çizik deneyi yara iyileşmesinde hücre migrasyonunun iki boyutlu olarak ölçülmesinde kullanılan basit, teknik gerektirmeyen, ekonomik bir yöntemdir (Kramer vd., 2013, s. 15; Subalakshmi vd., 2014, s. 130). Tek tabaka hücre kültüründe mekanik, termal veya kimyasal tahrip ile düz bir çizgi şeklinde hücresiz alan oluşturulması esasına dayanır. Hücresel parçalanma sebebiyle ATP gibi intraselüler moleküllerin açığa çıkması reaksiyonları başlatır. Oluşan hücresiz alan hücrelerin boşluğu doldurmak üzere göç etmesini uyarır. Epitelyal migrasyonun çeşitli hücresel sinyaller ile başlatılmasının ve sürdürülmesinin araştırılması için kullanılan en yaygın yöntemdir (Klarlund ve Block, 2011, s. 106-107; Jonkman vd., 2014, s. 440).

Epitelyal ve mezenkimal kanser hücreleri, keratinositler, normal epitelyal hücreler, endotelyal hücreler ve fibroblastlar gibi çeşitli hücrelerin migrasyon analizi bu yöntemle yapılabilir (Kramer vd., 2013, s. 15). Genel olarak tek tabakalı hücre kültüründe mikropipet ucu ile çizik oluşturulur. Fakat önceden ısıtılmış veya ısıtılmamış damga, kısa süreli yüksek voltaj uygulaması veya lazer ile yara oluşumu bu yöntemde uygulanabilir (Jonkman vd., 2014, s. 440; Planz vd., 2018, s. 20). Hücreler oluşan boşluğu doldurmak üzere yara bölgesine göç etme başlar. Belirli zaman aralıklarıyla mikroskop yardımıyla yara bölgesinin görüntüleri alınarak yara bölgesinin büyüklüğündeki değişikliklere göre hücre migrasyonu hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlar (Subalakshmi vd., 2014, s. 130). Kültür plakları hücrelerin ekiminden önce kolajen, fibronektin veya bazal membran ekstresi ile kaplanması farklı zeminler üzerinde hücre migrasyonunun değerlendirilmesine olanak sağlar (Kramer vd., 2013, s. 15). Çizik deneyinde tek tabakalı hücre kültüründe büyüme faktörleri ve sitokinler de ölçülebilir (Mzindle, 2017, s. 64). Uygun ekipman ile kombine edilerek intraselüler sinyallerin analizi gerçekleştirilebilir (Liang vd., 2007, s. 329).

Avantajları: Özel ekipman gereksinimi olmadığı için herhangi bir hücre kültürü laboratuvarında uygulanabilir (Liang vd., 2007, s. 329). Diğer yöntemlere kıyasla oldukça ekonomiktir (Jin vd., 2017, s. 225). Kurulumu ve sonuçların okunması kolaydır (Kramer vd., 2013, s. 15).

Dezavantajları: Kültür plağında tek tabakanın oluşabilmesi için 24-48 saat ve yaranın kapanmasını gözlemlemek için en az 8-18 saat gereklidir. Çok sayıda hücre kullanılmasını gerektirir ve bu nedenle hücrelerin veya kullanılacak kimyasal maddelerin erişilebilirliğine göre tercih nedeni olmayabilir (Liang vd., 2007, s. 329). Bireysel olarak çizik oluşturulduğu durumlarda iyi sınırlanmamış bir yara oluşabilir

fakat bu sorunu çözmek amacıyla çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Kramer vd., 2013, s. 15; Jin vd., 2017, s. 225). Fizyolojik nemlenme koşullarını yansıtmadığı için katı veya yarı katı dozaj şekillerinin araştırılmasına uygun değildir, aynı zamanda bu dozaj formlarının uygulanması kültür yapısını bozabileceğinden tercih edilmez (Planz vd., 2018, s. 20).

Hücre migrasyonu, büyümede ve fizyolojik onarımda önemli role sahip olup aynı zamanda kanser invazyonu ve metastaz, anjiogenez ve enflamatuvar reaksiyonlar ile de ilişkilidir. Farklı hücre tiplerinin migrasyon potansiyelinin değerlendirilmesi, ilgili moleküler mekanizmaların anlaşılmasının yanı sıra hücre migrasyonunu modüle eden farmasötik bileşenlerin izlenmesi ve patolojik durumlarda fayda sağlayabilecek etkilerin görülebilmesi için önemlidir. Bu anlamda en yaygın kullanılan teknik *in vitro* çizik deneyidir. Bu deneyde plastik kapta konfluent hücre tabakası oluşturulur, yapay olarak yaralanır ve açılan bölgenin göç eden hücreler ile kapanmasının zamanla değişmesi görüntüleme yöntemleri ile ölçülür. Bu yöntemin sınırlılıkları yara açıklığının manuel ve oldukça bireysel faktörlere bağlı olmasıdır. Bu sınırlılıkların üstesinden gelebilmek çalışmalarda önemli ölçüde hız ve otomasyon sağlanması ile kantitatif yüksek verim sağlayacaktır (Gebäck vd., 2009, s. 265; Klarlund ve Block, 2011, s. 106).

Hücre kültüründe HaCaT hücrelerinin migrasyonunun değerlendirilebilmesi amacıyla çizik deneyi yapılmıştır. Hücreler flasktan kaldırılmış, santrifüj edilmiş ve sayım yapılmıştır. 24 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 1 ml'de 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C'de kültüre edilmiştir.

24 saatin sonunda hücrelerin kuyucuğun tabanını yeterli yoğunlukta kapladığı mikroskopta kontrol edildikten sonra steril 200 µl mikropipet ucu ile kuyucuklara yara oluşumunu taklit etmek üzere kuyucuğun çapı doğrultusunda çizik yapılmıştır (Ho vd., 2016, s. 3-8; Muniandy vd., 2018, s. 3-5). Kuyucuklardaki besiyeri pipetle çekilmiş ve hücre artıklarının temizlenmesi için PBS ile yıkama yapılmıştır. Çizik yapılmış kuyucuklara helenalin konsantrasyonları THP-1 hücrelerinin LPS ile stimüle edilmesinden sonra alınan süpernatant besiyerinde ya da LPS'siz medyumda hazırlanmıştır (0,2 µM ve 0,02 µM olacak şekilde). Kontrol gruplarına %0,1 DMSO içeren taze besiyeri ile THP-1 hücrelerinin LPS ile stimüle edilmesinden sonra alınan medyum uygulanmıştır. Helenalin konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat ve 48 saat sonunda Leica DM 300 Inverted mikroskop ile yara kapanmasını belirlemek

üzere grupların her grup için farklı bölgelerden 3 adet olmak üzere fotoğraflar çekilmiş ve görüntülerde Leica LAS Image Analysis programı ile yara genişlikleri ölçülmüştür. Graphpad Prism 6.0 one way ANOVA ve Tukey's post hoc test yazılımı ile analiz edilmiştir. Daha sonra 48. saatte her kuyucuktan 100 µl çekilmiş ve akış sitometrisi ile sitokin ölçümü yapılmak üzere -20°C'de stoklanmıştır.

3.8. Akış Sitometri Cihazı İle Sitokinlerin Ölçümü

CBA antikor kaplı boncuk sistemi, enfeksiyon gibi sitokin düzeylerinin çok yüksek olduğu durumlarda ELISA'dan daha elverişli bir yöntemdir. Esnek ve maliyet-etkili bir sistemdir. Oldukça az manuel işlem gerektirir ve yüksek konsantrasyonlu numuneler için ilave dilüsyon gerektirmez. (Tarnok vd., 2003, s. 1001).

Farklı floresan yoğunluklarına sahip beş çekirdek popülasyonu, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- α proteinlerine özgü yakalama antikorları ile kaplanmıştır. Bu beş çekirdek popülasyonu, akış sitometresinin kırmızı kanalında (FL3 veya FL4) hücre süpernatantlarıyla inkübe edilerek sitokin ölçümleri gerçekleştirilir.

Bu çalışmada, Helenalinin HaCaT ve THP-1 hücreleri üzerindeki anti/pro-enflamatuvar etkilerini araştırmak üzere BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit ile çalışılmıştır.

Çizik deneyinde 48. saatte alınan süpernatantlarda sitokin seviyelerinin belirlenebilmesi için CBA insan enflamasyon sitokin kiti (BD 551811) kullanılmıştır. Kit içinde bulunan IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF-α düzeyleri kit prosedürüne uygun olarak belirlenmiştir. Önce kit içinde bulunan sitokin standartları 1:2-1:256 aralığında dilüye edilerek ve üzerine 300 µl dilüsyon tamponu eklenerek florometrik olarak okutulmuştur. Elde edilen standartizasyondan sonra kontrol, 0,2 ve 0,02 µM helenalin konsantrasyonlarını uyguladığımız (LPS'li ve LPS'siz medyumda) hücrelerin süpernatantları, medyuma salınan sitokin seviyeleri açısından incelenmek üzere kit prosedüründe belirtilen yıkama ve inkübasyon işlemlerine uyularak yapılmış ve 1,5 saat sitokin kaplı boncuklarla içeren kitle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi yapıp santrifüj edildikten sonra hücrelerin florometrik olarak sitokin seviyeleri akım sitometre kullanılarak belirlenmiş ve aynı anda FCAP Array Software çoklu analiz yazılımı kullanılarak veriler analiz edilmiştir.

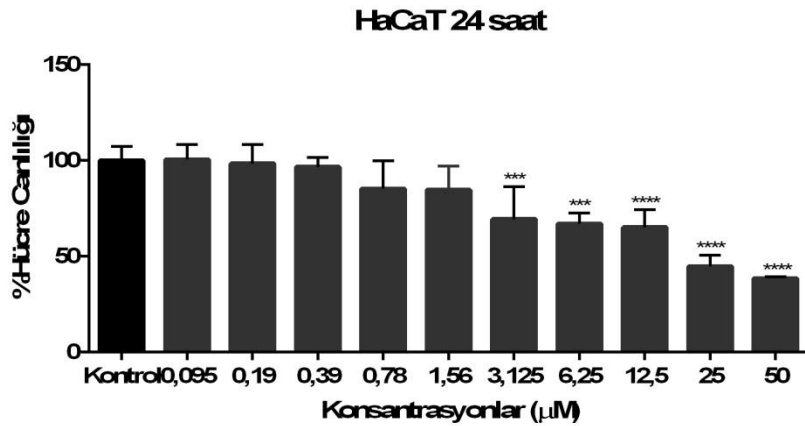
3.9. İstatistiksel Analiz

Grafikler Graphpad Prism 6.0 yazılımı ile çizilmiş ve one way ANOVA ve Tukey's post hoc test kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma ve üç bağımsız deney olarak verilmiştir (n=8), $p>0,1^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$, $p<0,0001^{****}$.

4. BULGULAR

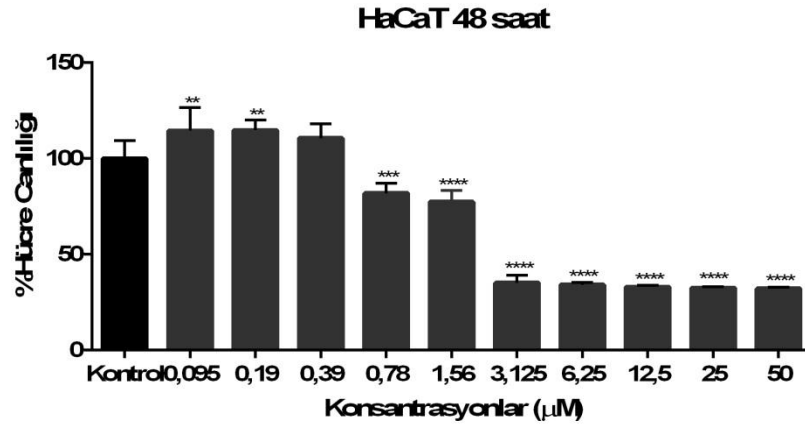
4.1.WST-1 Yöntemiyle Sitotoksitenin Belirlenmesi

Helenalin konsantrasyonlarının HaCaT ve THP-1 hücrelerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri belirlenmiştir. HaCaT hücreleri için kontrol ve 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,095 μ M; THP-1 hücreleri için ise kontrol ve 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,095, 0,047 μ M helenalin konsantrasyonlarına ait WST-1 sonuçları ELISA cihazında 420 nm dalga boyunda okutulmuştur. Daha sonra her bir gruba ait 24. saat ve 48. saat için kontrole göre % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. HaCaT hücrelerine uygulanan helenalin gruplarına ait % hücre canlılık değerleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Tablo 4.1 de; THP-1 hücrelerine uygulanan helenalin gruplarına ait % hücre canlılık değerleri ise Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Tablo 4.2 de verilmiştir.



Şekil 4.1. Helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 24 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p<0,001$ ***, $p<0,0001$ ****.

24. saatteki % hücre canlılık değerleri HaCaT hücrelerinde kontrol grubuna göre 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,095 μ M helenalin konsantrasyonlarında sırasıyla % 38,54, 44,77, 65,22, 67,07, 69,39, 84,71, 85,32, 96,70, 98,46, 100,57 olarak hesaplanmıştır. 3,125 ve 6,25 μ M helenalin konsantrasyonlarında kontrole göre, hücre canlılık değerlerinde meydana gelen azalma istatistiksel anlamlılık olarak $p<0,001$ ***; 12,5, 25 ve 50 μ M helenalin konsantrasyonlarında da $p<0,0001$ **** olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 48 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

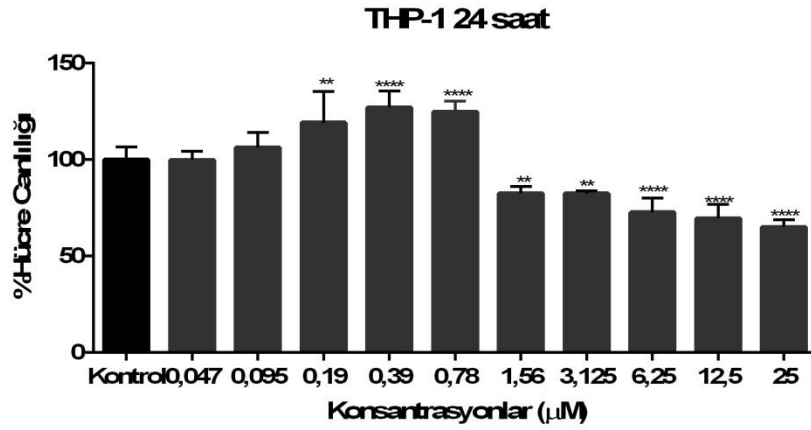
48. saatteki % hücre canlılık değerleri HaCaT hücrelerinde kontrol grubuna göre 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,095 μ M helenalin konsantrasyonlarında sırasıyla %32,22, 32,57, 33,05, 34,22, 35,21, 77,42, 81,98, 110,68, 114,80 ve 114,57 olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre hücre canlılık değerlerinde meydana gelen azalmaların istatistiksel anlamlılık değerleri, 0,95 ve 0,19 μ M helenalin konsantrasyonlarında $p < 0.01$ **; 0,78 μ M helenalin konsantrasyonunda $p < 0.001$ ***; 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ve 1,56 μ M helenalin konsantrasyonlarında ise $p < 0.0001$ **** olarak belirlenmiştir. HaCaT hücreleri için IC50 değeri 24. saatte 10,359 μ M, 48. saatte 2,531 μ M olarak Microsoft Excel 2013 ile hesaplanmıştır.

WST-1 analizi sonuçlarına göre Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 'de görüldüğü üzere HaCaT hücrelerinde helenalin konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak % hücre canlılık değerlerinde artış ve azalmalar görülmektedir. Grafikler Graphpad Prism 6.0 yazılımı ile çizilmiş ve one way ANOVA ve Tukey's post hoc test kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma ve üç bağımsız deney olarak verilmiştir (n=8), $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

Tablo 4.1. WST-1 Sonuçlarına Göre Helenalinin HaCaT Hücreleri Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri
(Kontrol % İnhibisyonu 0'dır)

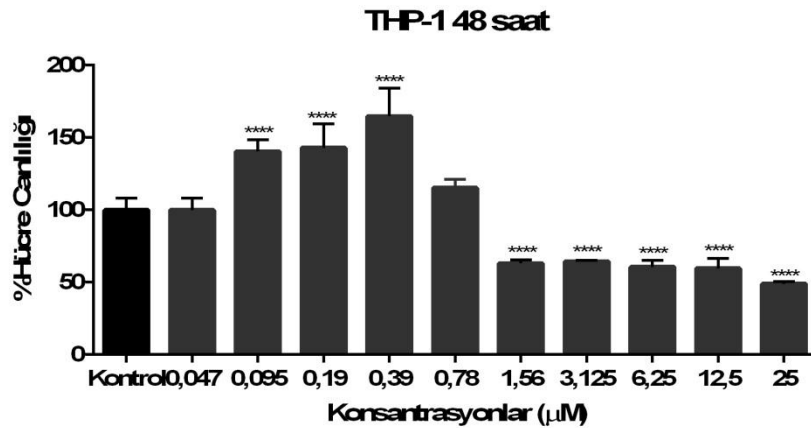
% İnhibisyon Değerleri (HaCaT-helenalin)		
Konsantrasyonlar (μ M)	24.saatt	48.saatt
0,78	14,68	18,02
1,56	15,29	22,58
3,125	30,61	64,79
6,25	32,93	65,75
12,5	34,78	66,95
25	55,22	67,43
50	61,45	67,78

Tablo 4.1'deki WST-1 sonuçlarına göre HaCaT hücre hattı üzerinde kontrole göre 24. saatte; 0,78 μ M helenalin konsantrasyonunda %14,68; 1,56 μ M'da %15,29; 3,125 μ M'da %30,61 ve 6,25 μ M'da %32,93 oranında hücre canlılığında inhibisyon meydana gelmiştir. 48. saatte ise bu sitotoksik etkinin kontrole kıyasla 0,78 μ M helenalin konsantrasyonunda %18,02; 1,56 μ M'da %22,58; 3,125 μ M'da %64,79 ve 6,25 μ M'da %65,75 oranında olduğu belirlenmiştir. Diğer konsantrasyonlarda proliferasyon görüldüğü için % inhibisyon değerleri verilememiştir. Tablo 4.1 ve Şekil 4.2 'de de görüldüğü üzere Helenalin ile 48 saatlik inkübasyondan sonra özellikle 3,125 μ M konsantrasyondan sonra HaCaT hücrelerinde önemli %50 den fazla sitotoksik etki meydana gelmiştir($p<0,0001$ ****.)



Şekil 4.3. Helenalin konsantrasyonlarının THP-1 hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 24 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p<0,01$ **, $p<0,0001$ ****.

THP-1 hücrelerinde 24. saatteki % hücre canlılık değerleri, kontrol grubuna göre 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,095 ve 0,047 μ M helenalin konsantrasyonlarında sırasıyla %65,02, 69,60, 72,69, 82,39, 82,53, 124,76, 127,08, 119,13, 106,37 ve 99,87 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri kontrol grubuna göre 0,19, 1,56 ve 3,125 μ M helenalin konsantrasyonlarında (hücre canlılığında artış) $p<0,01$ ** iken 0,39, 0,78, 6,25, 1,25 ve 25 μ M konsantrasyonlarda da (hücre canlılığında azalma) $p<0,0001$ **** olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Helenalin konsantrasyonlarının THP-1 hücre hattında WST-1 sonuçlarına göre 48 saatlik % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma (n=8), $p<0,0001$ ****.

48. saatteki % canlılık değeri THP-1 hücrelerinde, kontrol grubuna göre 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,095 ve 0,047 μ M helenalin konsantrasyonlarında sırasıyla %44,88, 59,62, 60,65, 64,43, 63,09, 115,31, 164,80, 142,95, 140,48 ve 104,75

olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,39, 0,19 ve 0,095 μM helenalin konsantrasyonunda $p<0,0001^{****}$ olarak belirlenmiştir. 0,78 μM ve altındaki helenalin konsantrasyonlarında hücre canlılığında artış olduğu görülmektedir. THP-1 hücreleri için IC50 değeri 24 saatte 26,931 μM , 48 saatte 24,583 μM olarak hesaplanmıştır.

WST-1 analizi sonuçlarına göre Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 'te görüldüğü üzere THP-1 hücrelerinde helenalin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak % canlılık değerinde artış ve azalmalar belirlenmiştir. HaCaT hücrelerinde 50 μM helenalin konsantrasyonunda önemli sitotoksik etki görüldüğü için THP-1 hücrelerinde 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,39, 0,19 ve 0,095 μM helenalin konsantrasyonları kullanılmıştır.

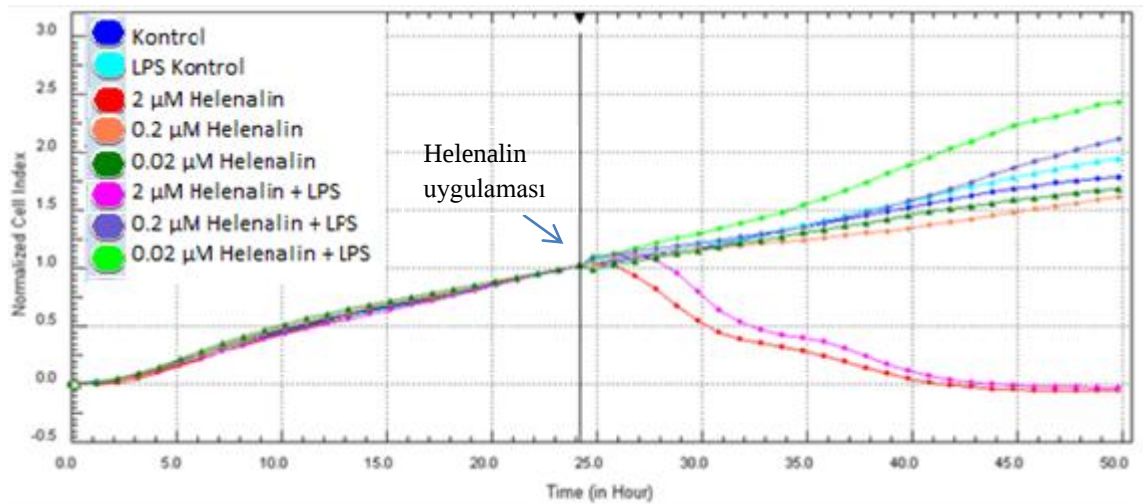
Tablo 4.2. WST-1 Sonuçlarına Göre Helenalinin THP-1 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri
(Kontrol % İnhibisyonu 0'dır)

% İnhibisyon Değerleri (THP-1-helenalin)		
Konsantrasyonlar (μM)	24.saat	48.saat
1,56	17,47	36,91
3,125	17,6	35,57
6,25	27,31	39,35
12,5	30,39	40,37
25	34,98	51,11

Tablo 4.2'deki WST-1 sonuçlarına göre THP-1 hücre hattı üzerinde kontrole göre 24. saatte; 1,56 μM helenalin konsantrasyonunda %36,90; 3,125 μM 'da %35,56; 6,25 μM 'da %39,34; 12,5 μM 'da %40,37 ve 25 μM 'da %51,11 oranında hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. Bu sitotoksik etkinin kontrole göre 48. saatte ise 0,78 μM konsantrasyonda %18,02; 1,56 μM 'da %22,58; 3,125 μM 'da %64,79 ve 6,25 μM 'da %65,78 oranında olduğu belirlenmiştir. Diğer konsantrasyonlarda proliferasyon görüldüğü için % inhibisyon değerleri verilememiştir. Tablo 4.2 ve Şekil 4.2 'de de görüldüğü üzere Helenalin ile 48 saatlik inkübasyondan sonra özellikle 1,56 μM konsantrasyondan sonra HaCaT hücrelerinde %35 den fazla sitotoksik etki meydana gelmiştir ($p<0,0001^{****}$.)

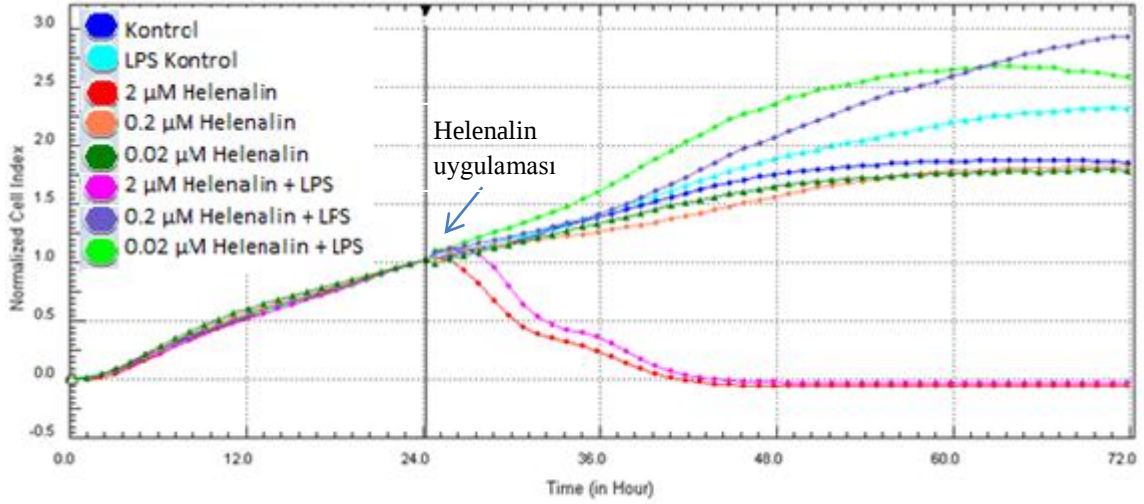
4.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Proliferasyon Analizi

Bu sistem kullanılarak 16 kuyucuklu altın ve elektrot kaplı plakaların her bir kuyucuğuna 1×10^4 sayıda HaCaT hücreleri ekilmiş ve hücrelerin proliferasyon eğrisi belirlenmiştir. 24 saat sonunda log fazına girmiş hücrelere helenalin konsantrasyonları uygulanmış ve proliferasyonları belirli zaman aralıklarında gerçek zamanlı olarak, konsantrasyona göre bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak izlenmiştir. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP), WST-1 sonuçlarına göre seçtiğimiz 2, 0,2 ve 0,02 μM helenalin konsantrasyonlarının, normal medyumda veya THP-1 hücrelerinde LPS ile sitümülasyon yapılmış medyumda HaCaT hücrelerine uygulamalarının zamana bağlı olarak hücre indeks grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Helenalin ve LPS'li medyumda helenalin konsantrasyonlarının 24 saatte HaCaT hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisinin RTCA DP'de İzlenmesi ($n=6$; $\text{ort} \pm \text{st.sapma}$)

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi konsantrasyonların uygulandıktan 24 saat sonra 2 μM ve LPS'li 2 μM helenalin konsantrasyonlarda belirgin düzeyde antiproliferatif etki görülürken diğer konsantrasyonlarda ve özellikle LPS'li besiyeri ile hazırlanmış 0,02 μM helenalin konsantrasyonunda kontrole ve diğer gruplara göre proliferatif etki belirlenmiştir.

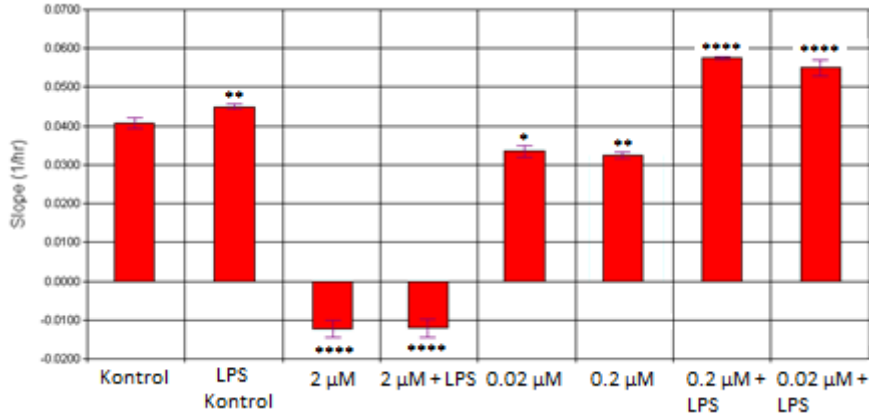


Şekil 4.6. Helenalin ve LPS’li helenalin konsantrasyonlarının 48 saatte HaCaT hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisinin RTCA DP’de İzlenmesi ($n=6$; $ort \pm st.sapma$)

Helenalin konsantrasyonları uygulandıktan 48 saat sonra ise 24 saat sonunda elde edilen verilere benzer şekilde 2 μM ve LPS’li 2 μM konsantrasyonlarda belirgin düzeyde antiproliferatif etki görülürken diğer konsantrasyonlarda ve özellikle LPS’li besiyeri ile hazırlanmış 0,2 μM ve 0,02 μM helenalin konsantrasyonlarında kontrole göre daha belirgin proliferatif etki görülmüştür. 0,02 μM ve 0,2 μM helenalin konsantrasyonlarında hücre proliferasyon grafikleri kontrole yakın olarak belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonucuna göre LPS’li 0,02 μM helenalin konsantrasyonundaki CI değerlerinde uygulamanın hemen sonunda hızlı bir artış gösterirken yaklaşık 36 saat sonra LPS’li 0,2 μM grubuna göre aşırı proliferasyona bağlı olarak azalma görülmüştür.

Helenalin ile 48 saatlik inkübasyon sonunda ise LPS’li 0,2 μM helenalin konsantrasyonunda hücre proliferasyonunun fazla olduğu görülmekle birlikte, LPS’li 0,02 μM helenalin proliferasyonunun uygulama anından itibaren hızlıca artış göstermesi ve 36 saat sonra da CI değerindeki azalmaların kuyucukta hücre çoğalması için yeterli alanın kalmamasına bağlı olarak yorumlayabiliriz (Şekil 4.6).

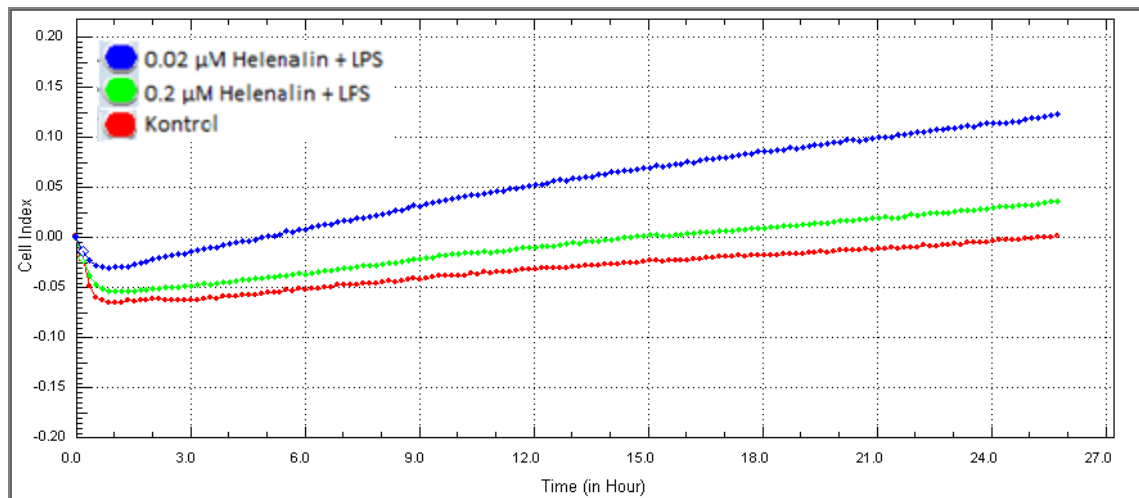
RTCA DP cihazından elde edilen gerçek zamanlı CI değerlerine göre çizilmiş olan grafiklerden hesaplanan 24. saatteki CI değerleri (eğim) grafiği Şekil 4.7’de verilmiştir.



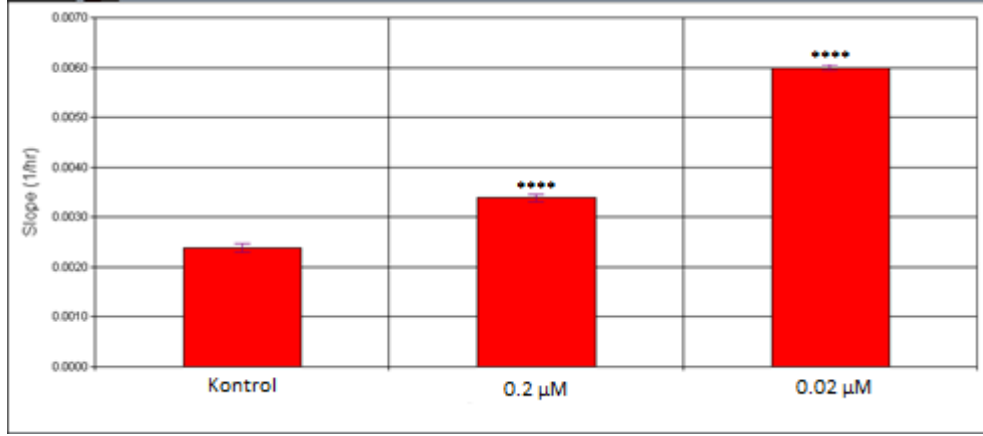
Şekil 4.7. RTCA DP sisteminde HaCaT hücrelerinde helenalin konsantrasyonlarının 24 saat sonraki slope değerleri ($n=6$; $ort \pm st.sapma$) (Kontrolle göre $p<0,1^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,0001^{****}$).

4.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Migrasyon Analizi

Bu migrasyon çalışmasında, proliferasyon eğrilerine ve hücre indeksi ile hesaplanan slope grafiklerine göre LPS'li 0,2 ve 0,02 μM helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücre migrasyonuna olan etkileri araştırılmıştır. Migrasyon çalışmasında iki odacıklı bir sistem olan CIM plakanın üst odacığının her bir kuyucuğuna 2×10^4 hücre ekilmiş ve hücreler üzerine gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi sonuçlarına göre seçtiğimiz helenalin konsantrasyonları LPS medyumunda içinde uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresince RTCA-DP sistemi kullanılarak gerçek zamanlı olarak migrasyon analizi yapılmıştır. Kontrol olarak da LPS'li medyum kullanılmıştır.



Şekil 4.8. RTCA DP sisteminden elde edilen LPS'li helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücrelerindeki migrasyon verileri



Şekil 4.9. RTCA DP sisteminde HaCaT hücrelerinde LPS’li Helenalin konsantrasyonlarının 24 saat sonraki migrasyon değerlerine ait slope değerleri ($n=6$; $ort \pm st.sapma$) (Kontrole göre $p < 0,0001$ ****).

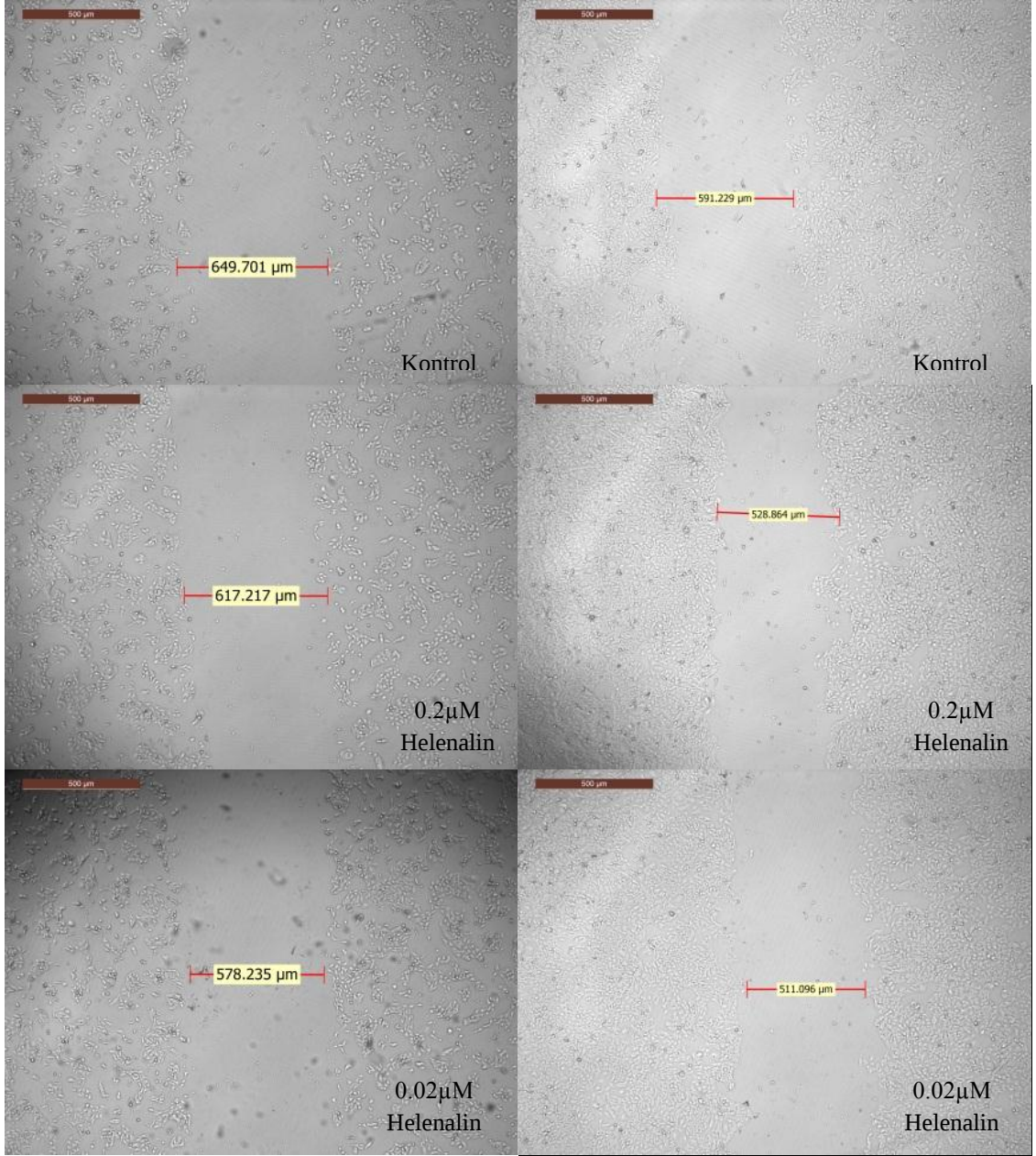
Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da görüldüğü üzere HaCaT hücrelerine uygulanan LPS’li helenalin konsantrasyonları kontrole göre migrasyonu arttırmıştır. LPS’li 0,02 µM helenalin konsantrasyonunda en fazla hücre migrasyonu medyana gelmiştir.

4.4. Çizik Deneyi İle Helenalinin Yara İyileşmesi ve Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

24 kuyucuklu plakada kültüre edilmiş HaCaT keratinosit hücrelerinde steril mikropipet ucu ile yara oluşturulmuştur. LPS’li ve LPS içermeyen medyumlarda hazırlanan 0,2 µM ve 0,02 µM helenalin konsantrasyonları hücreler üzerine uygulandıktan sonra 24. ve 48. saatlerde yara kapanmasını ölçmek üzere Leica mikroskop ile kuyucukların fotoğrafları x100 büyütme ile çekilmiştir (Şekil 4.10). Görüntülerde Leica LAS Image Analysis programı ile yara genişlikleri ölçülmüştür.

24. Saat

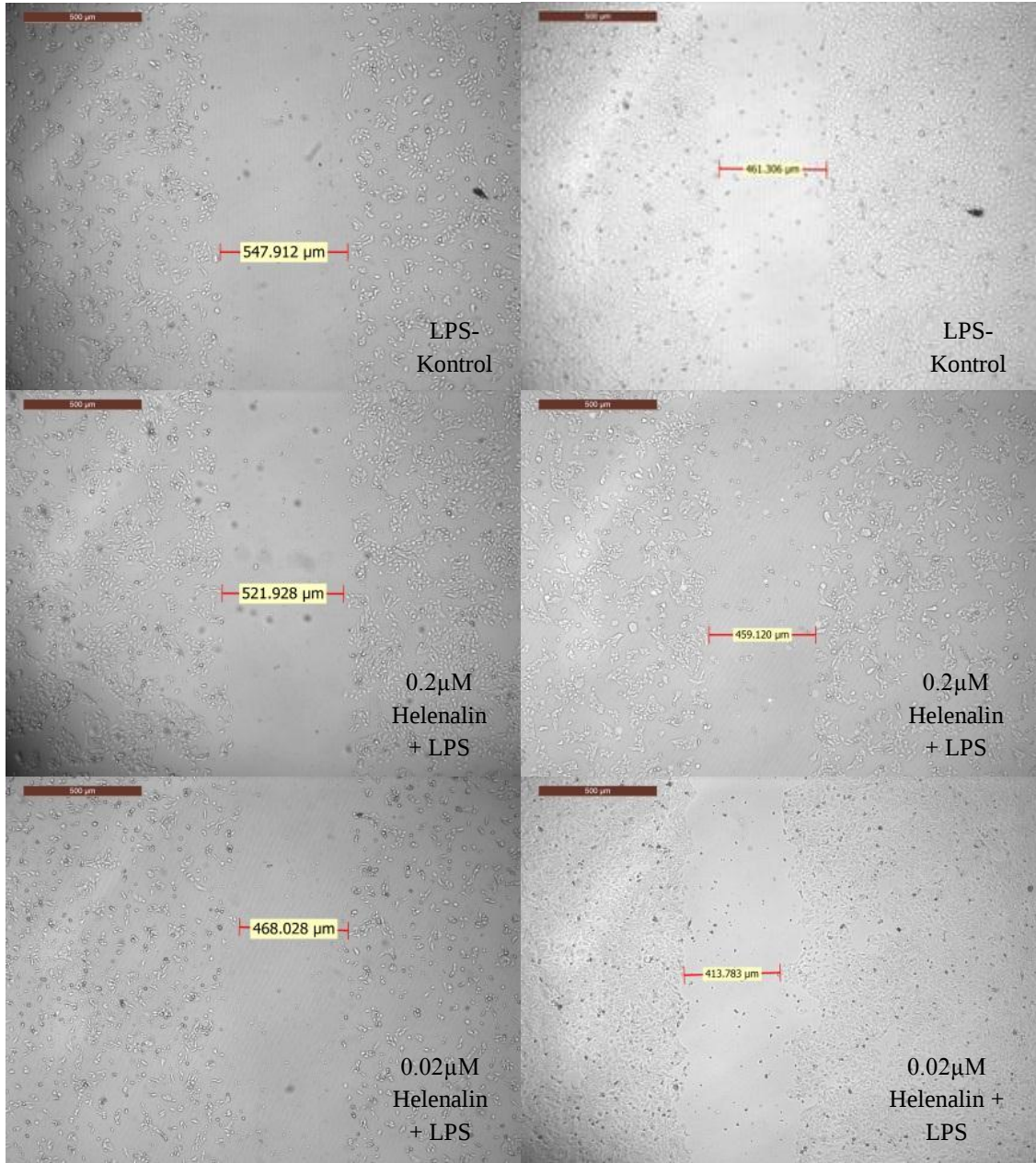
48. Saat



Şekil 4.10. *HaCaT* keratinosit hücre kültürü çizik deneyinde helenalin konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerde yara genişlikleri (Mikroskop büyütmesi: 100X, Fotoğraf skalası: 500 μm)

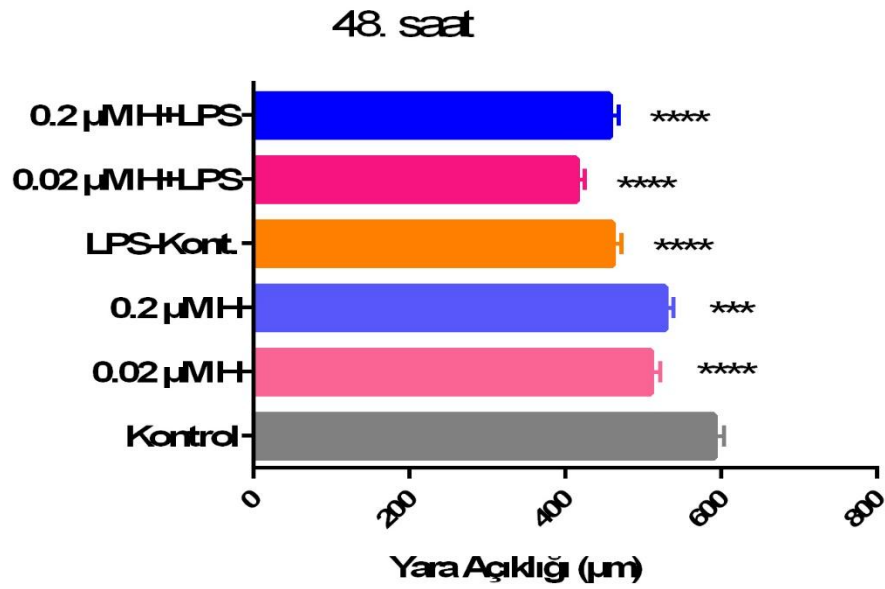
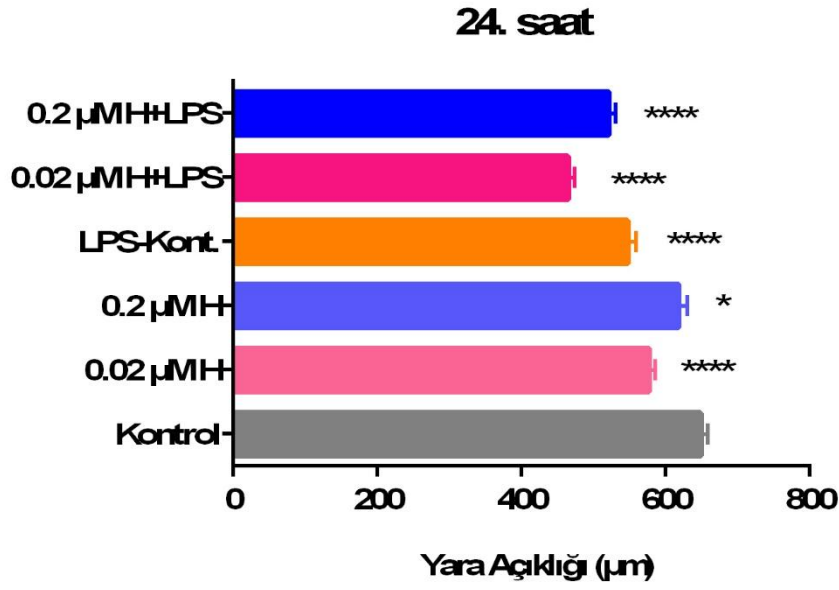
24. Saat

48. Saat



Şekil 4.11. HaCaT keratinosit hücre kültürü çizik deneyinde LPS'li helenalin konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerde yara genişlikleri (Mikroskop büyütmesi: 100X, Fotoğraf skalası: 500 µm)

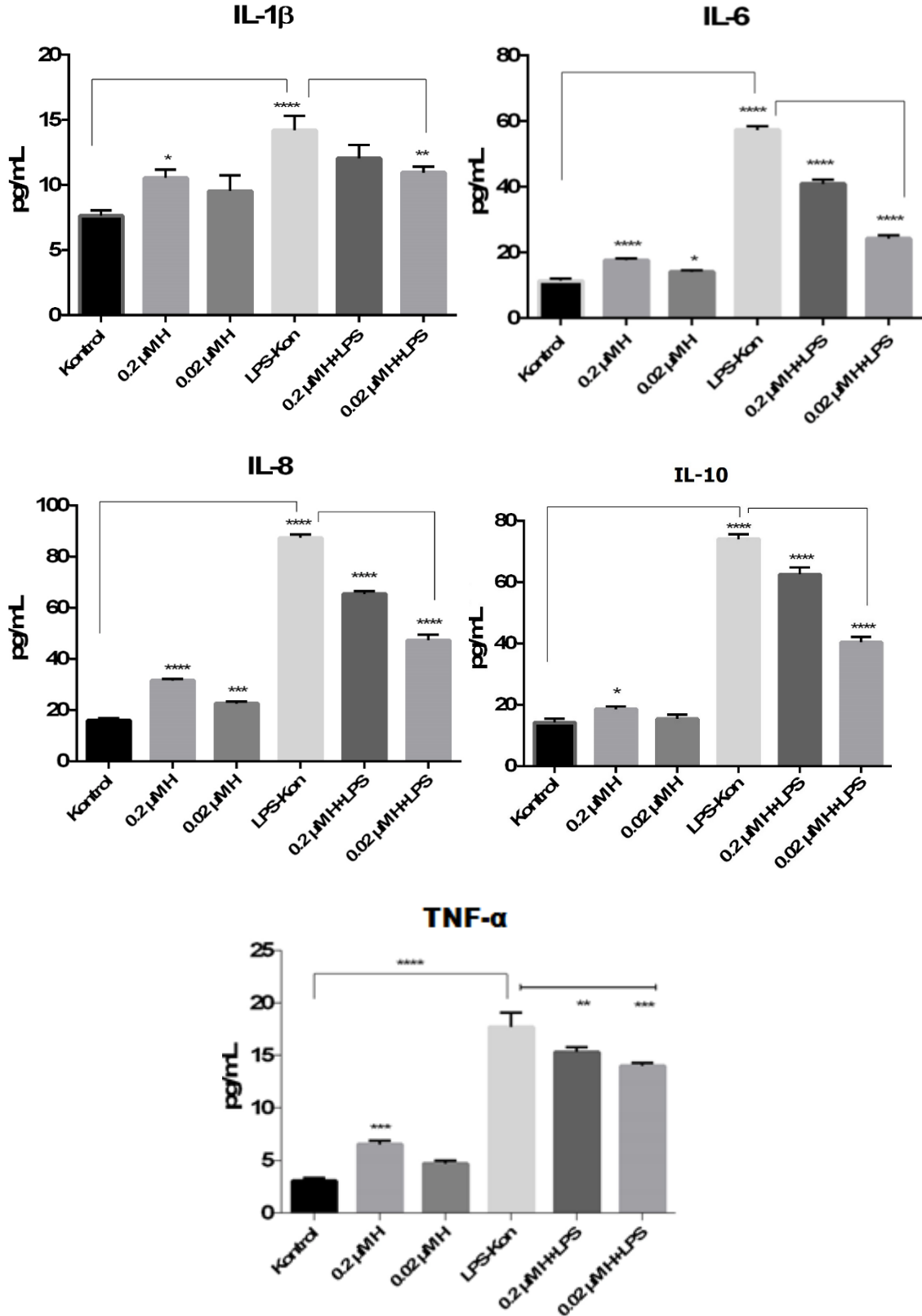
Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de görüldüğü gibi 24 ve 48. Saatlerde, LPS'li helenalin konsantrasyonlarında, LPS içermeyen helenalin konsantrasyonları ile ve LPS ve medyum kontrol gruplarına göre migrasyon aktivitesinin artışına bağlı olarak yara kapanmasının daha fazla olduğu görülmüştür. Özellikle 48. saatte LPS'li 0,2 µM grubuna göre LPS'li 0,02 µM helenalin grubunda yara kapanmasının az bir fark ile daha fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.12. HaCaT keratinosit hücre kültüründe çizik deneyinde 24. ve 48. saatlerde yara açıklık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirmesi. Değerler: ortalama $\pm$ standart sapma ($n=3$), $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***, $p<0,0001$ ****.

4.5. Akış Sitometri Cihazı ile Sitokinlerin Ölçümü

Çizik deneyinde 48. saatte 0,2 µM ve 0,02 µM helenalin konsantrasyonlarının uygulandığı HaCaT hücrelerinin her bir kuyucuğundan toplanan 100 µl süpernatant örneklerinde CBA insan enflamasyon kiti kullanılarak IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α sitokin düzeyleri ölçülmüş ve FCAP Array v 3.0 çoklu analiz yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışmaya ilişkin sonuçlar Şekil 4.13'te yer almaktadır.



Şekil 4.13. Helenalin konsantrasyonlarının HaCaT hücrelerinde sitokin düzeylerine etkileri

LPS'li medyum uygulanan HaCaT kontrol grubunda (100 ng/ml LPS, THP-1 hücrelerine 4 saat uygulanmış ve medyum alınarak HaCaT hücrelerine konsantrasyon

uygulanmasında sitümülasyonlu LPS'li medyum olarak kullanılmıştır), stimülasyona bağı olarak IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α sitokin düzeyleri sadece medyum uygulanan kontrole göre artmıştır ($p<0,0001****$). 0,2 μ M ve 0,02 μ M helenalin gruplarında IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α sitokin düzeylerinde kontrole göre bir miktar artış meydana gelmiştir. LPS'li 0,2 μ M ve 0,02 μ M helenalin gruplarında ise IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α sitokin düzeylerinde ise LPS-kontrole göre azalma görülmüştür. Özellikle LPS-kontrol grubuna göre IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α sitokin düzeyleri en fazla LPS'li 0,02 μ M helenalin grubunda belirlenmiştir (Şekil 4.13).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arnica montana, Asteraceae familyasına ait, antienflamatuvar özellikleri ile bilinen bir bitkidir (Macedo vd., 2004, s. 84). Dağ öküz gözü olarak bilinen *A. montana* geleneksel olarak çiçek esktreleri şeklinde antiseptik, antienflamatuvar, antibakteriyel, antisklerotik, antifungal, dekonjestan, yara iyileştirici ve antioksidan özellikleri ile kullanılmaktadır (Başer, 2016, s. 26). Bitkinin etkilerinden sorumlu bileşenin bir seskiterpen laktonu olan helenalin olduğu ileri sürülmektedir (Rodrigues vd., 2016, s. 331).

Tarihte yıllar boyunca helenalin ve türevlerini içeren alkollü ekstreler hematomları, burkulmaları, romatoid hastalıkları ve yüzeysel deri enflamasyonlarını tedavi etmek için kullanılmıştır (Woerdenbag vd., 1995, s. 127; Berges, 2009, s. 2892). Helenalinin selektif olarak NF- κ B inhibisyonu yaptığı ve bu sayede antienflamatuvar etki gösterdiği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Tornhamre vd., 2001, s. 904). NF- κ B inhibisyonunun yanı sıra pek çok enflamatuvar sitokinin üretimini inhibe etmektedir. Özellikle makrofaj ve nötrofiller gibi immün hücrelerin görev yapmasını engelleyerek enflamasyonu azaltır (May, 2013, s. 4).

HaCaT hücre hattı deri enflamasyonunun moleküler mekanizmalarının araştırılmasında, özellikle LPS ile indüklenerek IL-1 β ve TNF- α ekspresyonunun belirlenmesi için uygun keratinosit hücre hattıdır (Cheng vd., 2008, s. 165). Bu hücre hattı primer insan keratinositlerine benzer migrasyon indeksine sahiptir, normal keratinositlerin pek çok özelliğini taklit eder, kalsiyum ve retinoitler gibi diferansiyasyon modülatörlerine yanıt verir (Sandt vd., 1999, s. 728; Ranzato vd., 2008, s. 538). THP-1 hücreleri de keşfedildikleri günden itibaren monosit ve makrofajların fonksiyonlarının araştırılmasında, antienflamatuvar etkilerin değerlendirilmesinde en sık kullanılan hücre hattıdır (Shah vd., 2007, s. 1; Qin, 2012, s. 2).

Bu çalışmada helenalinin HaCaT keratinosit hücreleri üzerinde yara iyileşmesi üzerindeki antienflamatuvar etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. THP-1 monosit hücreleri ise enflamatuvar etkinin araştırılması için kullanılmıştır.

Schildberger vd. (2013, s.1-10) tarafından yapılan bir çalışmada THP-1 hücrelerinin LPS ile stimüle edilmesinden elde edilen, çeşitli sitokinleri (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10) içeren süpernatant ile insan umbilikal ven endotelial hücrelerinin uyarılmasına yönelik bir hücre kültürü modeli tasarlanmıştır. Bu doğrultuda yapılan

deneyde insan umbilikal ven endotelyal hücrelerinin uyarıya cevap olarak sitokin ürettiği görülmüştür.

Bu çalışmada HaCaT keratinosit hücrelerinde hem yara iyileşmesini hem de antienflamatuvar etkiyi araştırmak üzere; THP-1 hücrelerinin LPS ile stimüle edilerek sitokin üretiminin sağlanması ve buradan alınan süpernatantın HaCaT keratinositler üzerine uygulanması ile enflamatuvar koşulların sağlanacağı bir hücre kültürü modeli tasarlanmıştır. Bu doğrultuda WST-1 yöntemi ile helenalin konsantrasyonlarının sitotoksosite analizi yapılarak, toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Ayrıca RTCA-DP hücre analiz sisteminde HaCaT keratinosit hücreleri 24 saat inkübe edildikten sonra helenalin konsantrasyonları LPS'li ve LPS'siz şartlarda hücrelere uygulanarak helenalinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. Daha sonra 24. saatte elde edilen veriler doğrultusunda en yüksek proliferasyon gösteren helenalin konsantrasyonları ile yine RTCA-DP hücre analiz sisteminde hücre migrasyon analizi yapılmıştır. Yara iyileştirici etkiye ilave olarak çizik deneyi de yapılmıştır. HaCaT keratinosit hücreleri ile yapılan çizik deneyinde helenalin konsantrasyonları LPS'li medyum ve LPS'siz medyumda hazırlanarak keratinosit hücrelerine uygulanmıştır. Böylelikle helenalinin yara iyileştirici ve antienflamatuvar etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çizik deneyinde 48 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklardan alınan süpernatant örneklerinde de sitokin analizi yapılarak helenalinin antienflamatuvar etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmamız WST-1 yöntemi sonucunda, THP-1 hücre hattında 24. saatte 0,78, 0,39, 0,19, 0,095, 0,047; 48. saatte 0,78, 0,39, 0,19, 0,095, 0,047 μM konsantrasyonlarda % canlılık değerinde görülen artış hücre proliferasyonunu ifade etmektedir. HaCaT hücre hattında ise 24. saatte 0,095 μM helenalin konsantrasyonunda; 48. saatte 0,39, 0,19, 0,095 μM konsantrasyonlarda % canlılık değerinde görülen artış hücre proliferasyonunu ifade etmektedir. Hücre proliferasyonundaki en belirgin artış THP-1 hücre hattı için 0,39 μM konsantrasyonda görülürken HaCaT hücre hattı için 0,19 μM konsantrasyonda 48. saatte görülmüştür. HaCaT hücreleri için IC50 değeri 24. saatte 10,539 μM , 48. saatte ise 2,531 μM olarak hesaplanmıştır.

WST-1 yöntemi ile sitotoksosite analizinden elde edilen veriler ile her iki hücre hattı için de toksik olmayan konsantrasyon belirlenmiş ve ileri çalışmalar yapılmıştır.

Yapılan literatür taramasında bizim çalışmamızda olduğu gibi; helenalin ile HaCat veya THP-1 hücre hatlarından herhangi biri kullanılarak LPS stimülasyonlu ve

stimülasjonsuz, WST-1 yöntemi ve xCELLigence ile proliferasyon analizi, xCELLigence ve çizik deneyi ile migrasyon analizi ve antienflamatuvar etkiye yönelik herhangi bir çalışma bulunamamıştır.

Jang vd. tarafından yapılan bir çalışmada (2017, s. 590) Caki hücre hattında 4 ve 6 μM helenalin konsantrasyonlarının hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Zwicker vd. tarafından yapılan çalışmada (2017, s. 48) üç farklı hücre tipinde helenalinin THP-1 monositlerde 0,19 μM ve üzeri konsantrasyonlarda, Jurkat T hücrelerinde 0,75 μM ve üzeri konsantrasyonlarda, periferel kan mononükleer hücrelerinde ise 0,38 μM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada THP-1 hücre hattı için helenalinin IC50 değeri 1,08 μM olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise THP-1 hücreleri için IC50 değeri 24 saatte 26,931 μM , 48 saatte 24,583 μM olarak hesaplanmıştır.

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde hücre proliferasyon analizinde 2 μM ve 0,2 μM helenalin konsantrasyonlarında belirgin düzeyde antiproliferatif etki görülürken diğer konsantrasyonlar kontrol grubu ile benzer proliferasyon göstermiştir. Özellikle LPS’li besiyeri ile hazırlanmış 0,2 μM ve 0,02 μM helenalin konsantrasyonlarında ise kontrol gruplarına göre belirgin bir proliferatif etki görülmüştür. Bu sonuçlar WST-1 yöntemi sonuçlarımız ile uyumludur.

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde hücre proliferasyonu verilerine bakıldığında LPS kontrol ile kontrol arasında farklılık olduğu görülmüştür. 2 ve 0,2 μM helenalin konsantrasyonlarında önemli antiproliferatif etki görülürken, 0,02 μM helenalin proliferasyonu sadece medyum uygulanan kontrolden daha düşükken LPS’li 0,2 μM ve 0,02 μM konsantrasyonlarındaki proliferasyon değerinin medyum kontrol ve LPS’li medyum kontrolden daha yüksek olması helenalinin enflamatuvar koşullarda hücre proliferasyonu üzerinde pozitif etkili olduğunu göstermektedir.

İn vitro çizik deneyi ile yapılan yara kapanması ölçümlerinde kontrol grubuna kıyasla LPS-kontrol grubunda yaranın daha fazla kapandığı görülmüştür. Bu durum proenflamasyonun yara iyileşmesinde önemli bir adım olduğunu göstermektedir. Kontrol ve LPS-kontrol gruplarına kıyasla LPS’li medyum ortamında helenalin verilmiş gruplarda yara kapanmasının daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum Helenalin’in yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermektedir. 24. ve 48. saatlerin

sonunda tüm yara kapanma ölçüleri değerlendirildiğinde en fazla yara kapanmasının LPS’li 0.02 µM Helenalin konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir.

Balekar vd. tarafından grandiflorenik asitin yara iyileştirme potansiyelinin araştırıldığı çalışmada (2013, s. 542-544) keratinosit ve fibroblast hücre kültürlerinde çizik deneyi yapılmıştır. Her kuyucukta iki çizik yapılmıştır. 0., 1. ve 2. günlerde fotoğraf çekilerek yara kapanması ölçülmüş ve bunların ortalaması alınarak migrasyon verileri elde edilmiştir. Fibroblastlardaki migrasyon oranının HaCaT keratinositlerden daha fazla olduğu bulunmuştur.

Perfetto vd. 2012 tarafından krom ve nikelin yara iyileşmesindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada (2012, s. 393-395) HaCaT keratinositler ve THP-1 monositler ile ko-kültür çalışması yapılmıştır. HaCaT keratinositlere krom ve nikel ile ön uygulama yapıldıktan sonra çizik deneyi yapılmış, ko-kültür uygulanmış ve 72 saat sonra mikroskop ile fotoğrafları çekilmiştir. Bizim çalışmamızda direkt kokültür modeli uygulanmasa da bu modele uygun olarak THP-1 hücrelerinin LPS ile stimülasyonunda elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır. Hücre proliferasyon çalışmasında RTCA DP yöntemi kullanılmıştır. RTCA DP sisteminden elde edilen proliferasyon verileri ile çizik deneyinden elde edilen veriler paraleldir. Proliferasyonun en yüksek olduğu konsantrasyonda yara kapanmasının da en yüksek olduğu belirlenmiştir.

Takada vd. tarafından poliriboinosinik asit ve poliribositidik asitin IL-8 aracılı migrasyonu indüklediği yönünde yapılan çalışmada (2017, s. 3-6) yara kapanması doz ile orantılı olarak artmıştır. IL-8 keratinosit migrasyonunu indükleyici olarak etki göstermiştir. Bizim çalışmamızda da bu bulguya paralel olarak sitokin ölçümleri ve yara kapanması değerlendirildiğinde helenalin konsantrasyonlarında IL-8’in yüksek olduğu gruplarda yara kapanmasının daha fazla olduğu görülmüştür.

Girija vd. tarafından *Aristolochia bracteolata*’nın yara iyileştirici, proliferatif ve antienflamatuvar etkilerinin araştırıldığı çalışmada (2017, s. 131-133) HaCaT ve insan dermal fibroblast hücrelerinin *in vitro* yara iyileşmesi esnasındaki proliferasyon ve migrasyon özellikleri incelenmiş, antienflamatuvar etki için ise RAW 264.7 makrofajlar kullanılmıştır. Tüm konsantrasyonlarda yara açıklığı küçülmüş fakat hiçbirinde tam kapanma gerçekleşmemiştir.

Çizik deneyinde 48. saatte 0,2 µM ve 0,02 µM helenalin konsantrasyonlarının uygulandığı HaCaT hücrelerinin her bir kuyucuğundan toplanan süpernatant

örneklerinde CBA insan enflamasyon kiti kullanılarak IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α protein düzeyleri ölçülmüştür.

IL-8, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α önemli proenflamatuvar sitokinler olup yara iyileşmesinde önemli görevleri bulunmaktadır (Turabelidze ve Dpipetro, 2012, s. 30). NF- κ B yi aktive ettiği bilinen IL-1 β , keratinosit proliferasyonunda ve migrasyonunda etkilidir. Keratinositler üzerinde mitojenik etkili olan IL-6, yara iyileşmesi yanıtının başlamasında oldukça önemlidir. IL-6'nın TNF- α üretimini azalttığı yönünde çalışmalar bulunduğundan hem proenflamatuvar hem de antienflamatuvar olarak değerlendirilmektedir (Lin vd., 2003, s. 713). IL-8'in keratinosit migrasyonu ve proliferasyonunu arttırarak reepitelizasyona katkı sağladığı bilinmektedir (Wedler vd., 2014, s. 1679). IL-10 ise antienflamatuvar sitokin olarak enflamatuvar sürecin sonlandırılması veya sınırlandırılmasında temel bir faktördür (Cornelissen, 2004, s. 14).

Lipopolisakkaritler olarak da adlandırılan endotoksinler, Gram (-) bakterilerin dış membranının ana bileşenidir (Kirikae vd., 1998, s. 1015). Endotoksinlerin oluşturduğu doku hasarı, şok ve ölüm gibi fizyopatolojik etkiler çeşitlilik gösterir (Ogikubo vd., 2004, s. 89). Endotoksinler hücre ve organlar üzerine direkt etki etmezler. Fakat bunun yerine, monosit ve makrofajlar başta olmak üzere immün sistemin aktive edilmesiyle ve dolayısıyla immün yanıtın artırılması ile etki gösterirler. Bu durum, aktive edilen immün sistem hücrelerinden özellikle TNF, interlökinler, prostoglandinler, koloni sitümüle edici faktörler, trombosit aktivite edici faktörler ve serbest radikaller gibi mediyatörlerin salınmasına sebep olur (Magalhães vd., 2007, s. 388-392).

LPS'lerin moleküler aktiviteleri, LPS molekülünün kendisinden kaynaklanmaz. Makrofajların, LPS molekülünün Lipid A bölümü tarafından indüklenen aktivasyonu, biyoaktif lipidlerin, reaktif oksijen türlerinin ve özellikle de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi peptit mediyatörlerinin üretilmesine yol açar (Ergün, 2013, s. 8).

Akış sitometri yöntemi ile yapılan sitokin ölçümünde LPS'li medyum uygulanan HaCaT stimülasyona bağlı olarak IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α sitokin düzeyleri kontrole göre artmıştır ($p < 0,0001^{****}$). LPS'siz koşullarda ise helenalin uygulandığında konsantrasyon ile orantılı olarak ölçülen sitokin miktarlarında, kontrole göre çok az artış olduğu belirlenmiştir. LPS'li koşullarda ise helenalin uygulaması ile ölçülen sitokin miktarlarında LPS-kontrole göre azalma görülmekle birlikte en belirgin azalma 0,02 μ M helenalin konsantrasyonunda olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α üretimi olduğunun görülmesi, HaCaT keratinositlerin

insan keratinosit hücrelerine benzer şekilde yara iyileşme yanıtı verdiğini göstermektedir.

Enflamasyon olgularında sitokin olarak ilk önce TNF- α uyarılmaktadır (Van der Poll, 2001, s. 302). Sepsis/endotoksemi olgusunun en önemli belirteçleri, serumda yüksek düzeyde belirlenen TNF- α ve IL-1 β 'dir. İki sitokin sinerjistik etkiyle, enflamasyonu artırarak klinik bulguların büyük kısmının ortaya çıkmasına neden olurlar (Bochud vd., 2003, s. 264-265).

Cheng vd. tarafından (2008, s. 162) HaCaT hücre hattında farklı konsantrasyonlarda LPS ile yapılan hücre stimülasyon çalışmaları değerlendirildiğinde 100 ng/ml LPS ile stimüle edilen grupta IL-1 β ve TNF nin maksimum artış gösterdiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda da 100 ng/ml LPS ile stimüle edilen kontrol grubunda IL-1 β ve TNF seviyelerinin benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda da 0,02 μ M helenalin uygulanan grupta hem IL-1 β hem de TNF- α görülen azalma, helenalinin antienflamatuvar etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.13)

Hong ve Lyu tarafından (2011, s. 44-46) yapılmış olan Kore Kırmızı Ginseng ekstrelerinin LPS ile stimüle edilmiş HaCaT hücre hattında sitokin artışı üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada IL-8 ve TNF'nin benzer azalma göstermesinin nedeni olarak TNF'nin IL-8 için uyarıcı olduğunu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan tüm konsantrasyonlarda IL-8'in TNF- α ile paralellik göstermesi TNF'nin IL-8 için uyarıcı olduğunu göstermektedir.

Lin vd. tarafından (2014, s. 204-210) helenalinin alkol ile indülenmiş karaciğer hasarı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada model grupta kontrole göre oldukça yükselmiş olan serum TGF- β 1, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β seviyelerinin helenalin uygulaması ile düştüğü gösterilmiştir. Bizim çalışmamızdan elde edilen sitokin sonuçlarına göre de helenalinin sitokin üretimini azalttığı ve yara iyileşme süreçleri üzerinde olumlu etkisi olduğu doğrulanmıştır.

Walter vd. tarafından (2010, s. 1278-1279) yapılmış olan çalışmada L929 fibroblast ve HaCaT hücre hatlarında LPS ile stimüle edilmiş durumda IL-8'in yüksek olduğu grupta yara kapanmasının daha fazla olduğu görülmüştür. IL-8'in reepitelizasyonu ve keratinosit migrasyonunu stimüle ediyor olması yönündeki bulguları doğrultusunda bizim çalışmamızda da benzer olarak helenalin konsantrasyonunun uygulandığı gruplarda kendi içinde kıyaslandığında IL-8'in yüksek

olduğu gruplarda yara kapanmasının daha fazla olması IL-8'in enflamatuvar sitokin olarak yara iyileşmesini katkı sağladığını desteklemektedir.

Zhou vd. tarafından (2013, s. 3-6) HaCaT hücre hattında palmitik asitin etkilerini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada IL-6, IL-1 β ve TNF- α üretimi ile hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamız da helenalin normal koşullarda IL-6, IL-1 β ve TNF- α üretimini arttırırken, enflamatuvar koşullarda aynı sitokinlerin üretimini azaltmıştır.

Huang vd. tarafından (2015, s. 86-90) TNF ile indüklenmiş HaCaT hücre hattında daha önce antienflamatuvar olduğu gösterilmiş olan floretin ile kemokin seviyelerinin, yara iyileştirilmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hücrelere önce floretin uygulanmış, daha sonra ise TNF- α ile stimüle edilmiştir. Bu durumda kontrole kıyasla IL-6 ve IL-8 seviyelerinde doza bağlı bir artış görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise HaCaT hücre hattı öncelikle LPS ile stimüle edilmiş THP-1 hücre hattından alınan süpernatant ile muamele edilmiş, daha sonra helenalin konsantrasyonları uygulanmıştır. Bu durumda yine yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde IL-6 ve IL-8 seviyelerinde azalma görülmüştür, ancak bu azalma 0,02 μ M helenalin konsantrasyonunda 0,2 μ M helenalin konsantrasyonundan daha fazla olarak belirlenmiştir.

Lyss vd. tarafından (1997, s. 952-958) Jurkat T hücreler, 70Z/3 e Mo7/E hücrelerin TNF- α ve LPS ile stimüle edilmesiyle yapılan çalışmada helenalinin mikromolar konsantrasyonlarda NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Nguyen vd. tarafından (2007, s. 7) yapılan kalofillolidin yara iyileştirici ve antienflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kalofillolidin proenflamatuvar sitokinler olan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'yı azaltırken antienflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesini arttırdığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda da IL-10 salınımı olduğu ancak bu salınının LPS-Kontrolden fazla olmadığı belirlenmiştir.

Weng vd. tarafından (2014, s. 2-4) luteolin ile HaCaT keratinositlerde NF- κ B inhibisyonu üzerinde yapılan bir çalışmada psöriyatik deriyi taklit etmek amacıyla TNF ile stimüle edilmiş olan keratinositlere ön uygulama olarak luteolin uygulandığında IL-6, IL-8 ve VEGF seviyelerinde azalma görülmüştür. Aynı çalışmada Weng vd. (2014, s. 5-6) luteolinin HaCaT keratinositlerin proliferasyonunu azalttığı ve NF- κ B inhibisyonu yaptığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda kullanmış olduğumuz helenalin de NF- κ B

inhibitörü olduğu için yukarıdaki çalışmaya benzer olarak enflamasyon koşullarında IL-6 ve IL-8 seviyelerinde azalmaya neden olmuştur.

Wiegand vd. tarafından (2012, s. 1) yapılan çalışmada TNF- α stimülasyonunun HaCaT keratinositlerde proliferasyonu etkilemediği, fakat IL-6 ve IL-8 üretimini artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuca benzer olarak bizim çalışmamızda da kontrol gruplarında LPS stimülasyonunun proliferasyonu etkilemediği fakat proenflamatuvar sitokinlerin üretimini artırdığı görülmüştür.

Hennen ve Blömeke tarafından yapılan (2017, s. 283) HaCaT keratinositlerin THP-1 hücreleri ile birlikte kültüre edildiği bir çalışmada keratinositlerin duyarlılaştırıcı bir madde ile karşılaştığında proenflamatuvar sitokinler salgıladıkları açıklanmıştır. Lass vd. (2008, s.849-857) tarafından yapılan çalışmada *A. montana* tentürlerinin hipersensitizasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Bu doğrultuda bizim sonuçlarımıza göre enflamatuvar olmayan (LPS'siz) gruplarda helenalin konsantrasyonları uygulandığında, doz ile orantılı olarak sitokin seviyelerinin artmış olması helenalinin duyarlılaştırıcı etkisini doğrulamaktadır.

Valsero vd. tarafından (2014, s. 190) insan korneal epitel hücre hattında yapılan yara iyileşmesi çalışmasında IL-6 ve IL-10'un *in vitro* yara iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir.

Gaspar vd. tarafından (2014, s. 9362) yapılan bir çalışmada Arnika'dan elde edilen polifenol ve polisakkarit ekstraktlarının antienflamatuvar etkileri araştırılmıştır. Fibroblast hücre hattı ekstraktları ile ön uygulamaya tabi tutulduktan sonra hidrojen peroksit ile stimüle edilmiştir. ELISA ile yapılan ölçümler neticesinde kontrole kıyasla helenalin uygulanan gruplarda IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız helenalin de Arnika'dan elde edilen bir seskiterpen laktonu olması nedeniyle enflamasyon durumunda aynı sitokinlerin seviyelerinde benzer şekilde azalma meydana getirmiştir.

Wang ve Zhang tarafından (2018, s. 107-110) yapılan bir çalışmada HaCaT keratinositler enflamasyonu indüklemek üzere 12 saat boyunca LPS ile inkübe edilmiş daha sonra da çeşitli resveratrol konsantrasyonları ilave edilerek 24 saat daha inkübe edilmiştir. IL-6, 8 ve TNF- α için m-RNA düzeyleri belirlenmiştir. Sadece LPS verilenlerde her üç sitokin de artmış olup en fazla da TNF- α artışı belirlenmiştir. LPS+resveratrol verildiğinde her üç sitokin de azalmış olduğu, en fazla azalmanın TNF, en az azalmanın ise IL-8'de gerçekleştiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise

LPS-kontrol grubunda en fazla üretilen sitokin IL-8 olmakla birlikte yine en çok azalma gösteren de IL-8 olarak belirlenmiştir.

Svensson vd. (2018, s. 120-121) HaCaT keratinositler ve insan dermal fibroblastlar üzerinde, seskiterpen laktonu olan kronofilin ve damsinin antienflamatuvar etkilerini çalışmıştır. Her iki bileşenin, her iki hücre tipinde proenflamatuvar sitokin üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan helenalin de bir seskiterpen laktonudur ve enflamatuvar şartlarda proenflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmıştır.

Pastore vd. tarafından (2011 bitki polifenollerinin (verbaskozit, resveratrol ve kersetin) UVA, LPS ve TNF- α ile indüklenmiş hücrelerdeki stres enflamasyon yanıtının araştırıldığı çalışmada HaCaT keratinositler ile normal insan epidermal keratinositleri kullanılmıştır. UVA, LPS ve TNF- α ile stimülasyon her iki hücre tipinde de strese bağlı enflamatuvar yanıtı arttırmıştır. Bitki polifenolleri ise her iki hücre tipinde sitokin üretimini (IL-8, IL-10 ve MCP-1) azaltmıştır. Bizim çalışmamızda da *A. montana*'dan elde edilmiş olan helenalin enflamatuvar koşullarda IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- α seviyelerini azaltmıştır, uygulama olarak yukarıdaki çalışmadan farkı ise Pastore vd.'nin çalışmasında bitki polifenolleri hücreler stimüle edilmeden önce ön uygulama olarak verilmiştir, bizim çalışmamızda ise HaCaT keratinositlere helenalin ve LPS aynı anda uygulanmıştır.

Bu çalışmada, çeşitli literatürlerde belirtildiği üzere temel aktif bileşeni, anti enflamatuvar etkili helenalin olan *A. montana*'nın yara iyileştirici etkileri olmasından yola çıkılarak, helenalinin yara iyileşmesinde antienflamatuvar etki göstererek iyileşmeye katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Bu doğrultuda yapılan deneylerde helenalinin özellikle enflamasyonlu durumlarda enflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı, hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde pozitif etkiler yaparak yara kapanmasını arttırdığı bulunmuştur. Ancak farklı deney modelleri ile çalışmanın sonuçlarını destekleyecek ilave moleküler çalışmaların yapılmasının önemli olduğu kanaatindeyiz.

KAYNAKÇA

- Abbas, A.K. ve Lichtman, A.H. (2003). *Cellular and Molecular Immunology*, 5th. Ed. Saunders, 243-275.
- Acartürk, F. Ağabeyoğlu, İ. Çelebi, N. Değim, T. Değim, Z. Doğanay, T. Takka, S. Tırnaksız, F. (2009). *Modern Farmasötik Teknoloji* (2. Baskı). Ankara: TEB Eczacılık Akademisi Yayını.
- Ahmad, M., Saeed, F., Mehjabeen, Jahan, N. (2013). Neuro-pharmacological and analgesic effects of *Arnica montana* extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (4), 590-593.
- Aksakal, A.B. (2010). Kozmetoloji ve Tırnaklar. Yazan, Y. (Ed.). Kozmetik Bilimi içinde (21-31). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Arab, A., Orakcı, V., Erbilin, M., Şahin, M. (1994). Yara iyileşmesi. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 1 (2), 160-166.
- Arıkan, F., Becerik, S., Sönmez, Ş., Deliloğlu Gürhan, İ. (2007). Trombositten zengin plazmanın farklı konsantrasyonlarının üç farklı hücre üzerine etkisi - yeni in vitro yara iyileşmesi modeli. *EÜ Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 28, 85-92.
- Ashcroft, G.S., Jeong, M.J., Ashwort, J.J., Hardman, M., Jin, W., Moutsopoulos, N., Wild, T., Francis, N.M., Sim, D., McGrady, G., Song, X., Wahl, S.M. (2012). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration*., 20, 38–49.
- Auld, C.A., Hopkins, R.G., Fernandes, K.M., Morrison, R.F. (2006). Novel effect of helenalin on Akt signaling and Skp2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 314–320.
- Balaji, S., Moles, C.M., Bhattacharya, S.S., LeSaint, M., Dhamija, Y., Le, L.D., King, A., Kidd, M., Bouso, M.F., Shaaban, A., Crombleholme, T.M., Bollky, P., Keswani, S.G. (2014). Comparison of interleukin 10 homologs on dermal wound healing using a novel human skin ex vivo organ culture model. *Journal of Surgical Research*, 190, 358-366.

- Balekar, N., Nakpheng, T., Srichana, T. (2013). Wound-healing potential of grandiflorenic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*., 35 (5), 537-546.
- Bardaş, R. (2015). *Deneyisel rat sepsis modelinde etanersept ve talidomid tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD.
- Başer, K.H.C. (2016). Dağ öküzgözü (*Arnica montana* L.). *Bağbahçe*, 63, 26-27.
- Battaglia, T.M., Masson, J.F., Sierks, M.R., Beaudoin, S.P., Rogers, J., Foster, K.N., Hollway, G.A., Booksh, K.S. (2005). Quantification of cytokines involved in wound healing using surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry*., 77, 7016-7023.
- Bediz Ölçer, A. ve Gönül, N. (2002). Perkütan absorpsiyon ve perkütan absorpsiyonu etkileyen faktörler. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*., 31 (1), 33-49.
- Bekalp, İ., Mamur, B.A., Derici Yıldırım, D., Tamer, L., Çolak, T., Aras, N. (2014). İnterlökin-6 ve interlökin-18 gen polimorfizmlerinin ve plazma düzeylerinin kolorektal kanser ile ilişkisi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7 (2), 35-46.
- Berges, C., Fuchs, D., Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C. (2009). Helenalin suppresses essential immune functions of activated CD4+ T cells by multiple mechanisms. *Molecular Immunology*, 46, 2892–2901.
- Berk, A., Dokumacı, A.H., Kaymaz, M.B. (2015). Yara iyileşmesi ve diyabetik yara tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 24, 185-192.
- Bermudez, D.M., Canning, D.A., Liechty, K.W. (2011). Age and pro-inflammatory cytokine production: Wound-healing implications for scar-formation and the timing of genital surgery in boys. *Journal of Pediatric Urology*, 7, 324-331.
- Besler, E. (2007). Celecoxib'in mastektomi sonrasında gelişen seroma ve yara iyileşmesine etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi: Genel Cerrahi Anabilim Dalı.
- Beyhan, Ş.G. (2008). *Kollajen sentezi inhibitörlerinden 5-florourasil ve halofuginon'un yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi.

- İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği.
- Bochud, P.Y. ve Calandra, T. (2003). Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *British Medical Journal*, 326, 262-266.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Hornung, J., Breitkreutz, D., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988). *The Journal of Cell Biology*, 106, 761-771.
- Bülbül, D. (2011). *Pirazol türevi bileşiklerin olası anti kanser aktivitelerinin incelenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Cantürk, Z. (2016). Compared effects of azole antifungals on cytokine production of THP-1 cells activated by *Candida albicans*. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20, 288-292.
- Cantürk, Z., Ay, C. (2015). Flow sitometrinin mikrobiyoloji alanında kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 30 (3), 144-151.
- Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 12780-12805.
- Chan, M.M.Y. (1995). Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin a phytochemical. *Biochemical Pharmacology*, 49 (11). 1551-1556.
- Chanput, W., Mes, J.J., Wichers, H.J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23, 37-45.
- Cheng, H.M., Hsiang, C.Y., Chen, G.W., Wu, S.L., Chen, J.C., Huang, C.Y., Bau, D.T., Ho, T.Y. (2008). Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production by menthone through nuclear factor- κ b signaling pathway in HaCat cells. *Chinese Journal of Physiology*, 51(3), 160-166
- Choi, J.H., Jun, J.H., Kim, J.H., Sung, H.J., Lee, J.H. (2014). Synergistic EFFECT of Interleukin-6 and hyaluronic acid on cell migration and ERK activation in human keratinocytes. *Journal of Korean Medical Science*, 29, 210-216.

- Cornelisen, L.H. (2004). *Which molecules of the initial phase of wound healing may be used as markers for early detection of skin damage?* Netherlands: Materials Technology Institute: Eindhoven University of Technology, Eindhoven.
- Çanaklı, G. (2016). *Tip 1 diyabet in vitro modelinde Cinnamomum cassia ekstralarının etkilerinin araştırılması*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İzmir: Ege Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Çetinkaya, B. (2009). *Romatoid artrit ve kronik periodontitis hastalarında proenflamatuar (TNF- α , IL-1 β) ve antiinflammatuar (IL-10, IL-4) sitokin düzeylerinin incelenmesi*. Ankara: Başkent Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Çetinkaya, Ö.A. (2010). *Ratlarda statinlerin yara iyileşmesi üzerine etkileri*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Genel Cerrahi Anabilim Dalı.
- Deniz, Ç. (2010). *Yara iyileşmesinde bitki reçinesi olan sığla yağı (Liquidambar orientalis) ile kollagenaz içeren pomadların karşılaştırılması*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Kahramanmaraş: Sütçü İmam Üniversitesi. Genel Cerrahi Anabilim Dalı.
- Deyrieux, A.F., Wilson, V.G. (2007). In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, 54, 77–83.
- Diegelmann, R.F. ve Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9, 283-289.
- Dikmen, M. ve Er, S. (2017). Camellia sinensis increased apoptosis on U2OS osteosarcoma cells and wound healing potential on NIH3T3 fibroblast cells. *Cytotechnology*, 69, 901-914.
- Dimitrova, D.Z., Balabanova, V. (2012). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory potential of *Arnica montana* cultivated in Bulgaria. *Turkish Journal of Biology*, 36, 732-737.
- Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M. (2017). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 514–525.
- Er, S. (2010). *Camellia sinensis (çay) ekstralarının in vitro antioksidan, yara iyileştirici ve U2OS osteosarkom hücrelerinde antikanser aktivitelerinin araştırılması*.

- Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Erfan Türker, G. (2009). *Sıçanlarda er: yağ ile oluşturulmuş yarada bitki ekstraktlarının karışımı topikal hemostatik bir ajanın yara iyileşmesine etkisi*. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul: İstanbul Eğitim Ve Araştırma Hastanesi. Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği.
- Ergün, Z. (2013). Bakteri endotoksinlerinin viral aşı üretiminde kullanılan devamlı hücre hatlarına etkisinin araştırılması. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Evans, N.D., Oreffo, R.O.C., Healy, E., Thurner, P.J., Man, Y.H. (2013). Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *Journal of The Mechanical Behaviour of Biomedical Materials*, 28, 397-409.
- Farrar, M.A. ve Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review of Immunology*, 11, 571-611.
- Frank, J., Born, K., Barker, J.H., Marzi, I. (2003). In vivo effect of tumor necrosis factor alpha on wound angiogenesis and epithelialization. *European Journal of Trauma*, 4, 208-219.
- Fredriksson, C. (2008). *Keratinocytes in tissue engineering of human skin: in vitro and in vivo studies*. İsveç: Linköping Üniversitesi.
- French Pharmacopoeia (2008). Arnica (Whole Plant) For Homoeopathic Preparations.
- Galanos, C. ve Freudenberg, M.A. (1993). Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology*, 187 (3-5), 346-56.
- Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Kroemer, G., Zhivotovsky, B. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16 (8), 1093–1107.
- Ganzer, M., Egger, C., Zidorn, C., Stuppner, H. (2008). Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 614, 196–200.

- Gaspar, A., Craciunescu, O., Trif, M., Moisei, M., Moldovani, L. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory properties of active compounds from *Arnica montana* L. *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (3), 9353-9365.
- Gautam, R., Jacobak, S.M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, 29 (5), 767-820.
- Gebäck, T., Schulz, M.M.P., Koumoutsakos, P., Detmar, M. (2009). TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Short Technical Reports*, 46 (4), 265-274.
- Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N.A., Darwiche, N. (2010). What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. *Drug Discovery Today*, 15 (16), 668-678.
- Gillitzer, R. ve Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of Leukocyte Biology*, 69, 513-521.
- Girija, D.M., Kalachaveedu, M., Subbarayan, R., Jenifer, P., Rao, S.R. (2017). *Aristolochia bracteolata* enhances wound healing in vitro through anti-inflammatory and proliferative effect on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Pharmacognosy Journal*, 9 (6), 129-136.
- Güner, İ., Özmen, D., Bayındır, O. (1997). Sitokinler. *T. Klin. J. Med. Sci.*, 17, 65-74.
- Han, Y.P., Tuan, T.L., Hughes, M., Wu, H., Garner, W.L. (2001). Transforming growth factor- β - and tumor necrosis factor- α -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276 (25), 22341–22350.
- Hegarty-Diaz, B.P., Trivedi, M.K., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Gangwar, M., Jana, S. (2017). Skin photo-protective and anti-ageing activity of consciousness energy healing treatment based herbomineral formulation. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, 3 (3), 49-59.
- Hennen, J. ve Blömeke, B. (2017). Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells. *Alternatives to Animal Experimentation*, 34 (2), 279-288.

- Hill, H., Anderson, N., Malakouti, M., Jacob, S.E. (2016). Herbals in the holistic treatment of psoriasis. *Practical Dermatology*, 46-63.
- Ho, T., Jiang, S., Lin, G., Li, T., Yiin, L., Yang, J., Hsieh, M., Wu, C., Lin, J., Chen, H. (2016). The in vitro and in vivo wound healing properties of the Chinese herbal medicine (jinchuang ointment). *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-11.
- Hofmann, U., Priem, M., Bartsch, C., Winckler, T., Feller, K.H. (2014). A sensitive sensor cell line for the detection of oxidative stress responses in cultured human keratinocytes. *Sensors*, 14, 11293-11307.
- Hong, C.E. ve Lyu, S.Y. (2011). Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Korean red ginseng extract in human keratinocytes. *Immune Network*, 11, 42-49.
- Huang, W., Dai, Y., Peng, H., Kang, C., Kuo, C., Liou, C. (2015). Phloretin ameliorates chemokines and ICAM-1 expression via blocking of the NF- κ B pathway in the TNF- α -induced HaCaT human keratinocytes. *International Immunopharmacology*, 27, 32–37.
- Iannitti, T., Morales-Medina, J., Bellavite, P., Rottigni, V., Palmieri, B. (2014). Effectiveness and Safety of Arnica montana in Post-Surgical Setting, Pain and Inflammation. *American Journal of Therapeutics*, 0, 1-17.
- Jang, J.H., Iqbal, T., Min, K.J., Kim, S., Park, J.W., Son, E.I., Lee, T.J., Kwon, T.K. (2013). Helenalin-induced apoptosis is dependent on production of reactive oxygen species and independent of induction of endoplasmic reticulum stress in renal cell carcinoma. *Toxicology in Vitro*, 27, 588–596.
- Jiang, W.G., Sanders, A.J., Ruge, F., Harding, K.G. (2012). Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC- γ and potential clinical implications. *Experimental And Therapeutic Medicine*, (3), 231-236.
- Jin, W., Lo, K.Y., Chou, S.E., McCue, S.W., Simpson, M.J. (2017). The role of initial geometry in experimental models of wound closing. *Chemical Engineering Science*, 179, 221-226.

- Jonkman, J.E.N., Cathcart, J.A., Xu, F., Bartolini, M.E., Amon, J.E., Stevens, K.M., Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*. 8 (5), 440--451.
- Kapucı, M. (2011). *Naftalin, 1-naftol ve 2-naftolün insan lenfosit kültürlerinde sitotoksik ve genotoksik etkisinin belirlenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Fatih Üniversitesi. Biyoloji Anabilim Dalı.
- Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S. (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6 (2).
- Kasap, Ş. (2013). Fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan keratinositlerin diyabetik yara iyileşmesi üzerine etkisinin moleküler düzeyde analizi. Tıpta Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi: Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı.
- Keskin, E. (2016). *L-dopa ve lawsone biyomalzemelerinin yara iyileşmesi üzerine tedavi edici etkisinin araştırılması*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Fatih Üniversitesi. Biyomedikal Mühendislik Enstitüsü.
- Kılınç., A.N. (2012). *The role of the interaction between tissue transglutaminase and nitric oxide in wound healing*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Yeditepe Üniversitesi. Institute of Graduate Studies in Science and Engineering.
- Kirika, T., Kirika, F., Saito, S., Tominaga, K., Tanura, H., Uemura, Y., Yokochi, T., Nakano, M. (1998). Biological characterization of endotoxins released from antibiotic-treated *P. aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (5), 1015-1021.
- Kieran, I., Knock, A., Bush, J., So, K., Metcalfe, A., Hobson, R., Mason, T., O'Kane, S., Ferguson, M. (2013). *Wound Repair and Regeneration*, 21, 428-436.
- King, A., Balaji, S., Le, L.D., Crombelholme, T.M., Keswani, S.G. (2014). Regenerative wound healing: The role of Interleukin-10. *Advances in Wound Care*, 3 (4), 315-323.
- Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3 (4), 203-213.

- Kondo, T. ve Ohshima, T. (1996). The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. *International Journal of Legal Medicine*, (108), 231-236.
- Korkina, L.G., Mikhal Chik, E.V., Suprun, M.V., Pastore, S., Toso, R.D. (2007). Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides. *Cellular and Molecular Biology*, 53 (5), 84-91.
- Kowalski, R., Suiger, D., Suiger, P., Kolodziej, B. (2015). Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry. *Industrial Crops and Products*, 76, 857–865.
- Kramer, N., Walzi, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengtschlager, M., Dolznig, H. (2013). *In vitro* cell migration and invasion assays. *Mutation Research*, 752, 10-24.
- Kuralay, F., Çavdar, Z. (2006). İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış, *Genel Tıp Dergisi*, 16 (3), 143-152.
- Lass, C., Vocanson, M., Wagner, S., Schempp, C.M., Nicolas, J.F., Merfort, I., Martin, S.F. (2008). Anti-inflammatory and immune-regulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to *Arnica montana* L. *Experimental Dermatology*, 17, 849–857.
- Lass, C., Merfort, I., Martin, S.F. (2010). *In vitro* and *in vivo* analysis of pro- and anti-inflammatory effects of weak and strong contact allergens. *Experimental Dermatology*, 19, 1007-1013.
- Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L. (2007). *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*, 2 (2), 329-333.
- Lin, X., Zhang, S., Huang, R., Wei, L., Tan, S., Liang, S., Tian, Y., Wu, X., Lu, Z., Huang, Q. (2014). Helenalin attenuates alcohol-induced hepatic fibrosis by enhancing ethanol metabolism, inhibiting oxidative stress and supressing HSC activation. *Fitoterapia*, 95, 203-2013.

- Lyss, G., Schmidt, T.J., Merfort, I., Pahl, H.L. (1997). Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF- κ B. *Biological Chemistry*, 378, 951-961.
- Macêdo, S.B., Ferreira, L.R., Perazzo, F.F., Carvalho J.C.T. (2004). Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6CH: preclinical study in animals. *Homeopathy*, 93, 84-87.
- Magalhaes, P.O., Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C., Penna, T.C., Pessoa, A.JR. (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: A Review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 10 (3), 388-404.
- Magcwebaba, T., Riedel, S., Swanevelder, S., Bouic, P., Swart, P., Gelderblom, W. (2012). Interleukin-1 α induction in human keratinocytes (HaCaT): An in vitro model for chemoprevention in skin. *Journal of Skin Cancer*, 2012, 1-8.
- May, P. (2013). Arnica flower CO₂ extract-approved efficacy in topical treatment. *Cosmetic Science Technology*, 1-6.
- Michael, N.Y. (2010). The role of mast cells in wound healing. *International Wound Journal*, 7,55-61.
- Mirza, R.E., Fang, M.M., Ennis, W.J., Koh, T.J. (2013). Blocking Interleukin-1b induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 62, 2579-2587.
- Muniandy, K., Gothai, S., Tan, W.S., Kumar, S.S., Esa, N.M., Chandramohan, G., Al-Numair, K., Aruselvan, P. (2018). In vitro wound healing potential of stem extract of *Alternanthera sessilis*. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-13.
- Mutlu Altundağ, E. (2016). *Kronik myeloid lösemi hücrelerinde (K562) apoptotik süreç ve reaktif oksijen türleri arasındaki ilişkinin araştırılması*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Mzindle, N.B. (2017). *Anti-inflammatory, anti-oxidant and wound-healing properties of selected South African medicinal plants*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. South Africa: Durban University of Technology, Biotechnology in the Department of Biotechnology and Food Technology.

- Noronha, I.L., Niemir, Z., Stein, H., Waldher, R. (1995) Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 10, 775-786.
- Ogikubo, Y., Norimatsu, M., Noda, K., Takahashi, J., Inotsume, M., Tsuchiya, M., Tamura, Y. (2004). Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. *Biologicals*, 32, 88-93.
- Olafsdottir, A., Thorlacius, G.E., Omarsdottir, S., Olafsdottir, E.S., Vikingsson, A., Freysdottir, J., Hardardottir, I. (2014). A heteroglycan from the cyanobacterium *Nostoc commune* modulates LPS-induced inflammatory cytokine secretion by THP-1 monocytes through phosphorylation of ERK1/2 and Akt. *Phytomedicine*, 21, 1451-1457.
- Oliosio, D., Marzotto, M., Bonafini, C., Brizzi, M., Bellavite, P. (2016). Response to commentary: Arnica montana effects on gene expression in a human macrophage cell line. evaluation by quantitative real-time PCR. *Frontiers in Immunology*, 7, 1-2.
- Omar, M.N., Alfara, H.Y., Jauhari, S., Ichwan, A. (2017). Wound healing properties of biotransformed asiaticoside by *Aspergillus niger*. *Journal of Sustainability Science and Management*, 12 (2), 96-102.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. (2002). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık, 557-569.
- Ötün, B. (2015). *Centaurea pterocaula* Trautv. (çoruşbozan) bitkisinin farklı ekstrelerinin yara iyileştirici etkisinin belirlenmesi. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Öz, C. (2011). *Hypericum perforatum* L. ekstresinin ratlarda oluşturulan deneysel yanık modelinde epitelizasyon üzerine etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı.
- Özdemir, A. ve Ark, M. (2013). xCELLigence real time cell analysis system: a new method for cell proliferation and cytotoxicity. *Niche Journal*, 2, 15-7.
- Park, E.J., Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American Journal of Surgery*, 187, 11S-6S.

- Pastore, S., Lulli, D., Potapovich, A.I., Fidanza, P., Kostyuk, V.A., Dellambra, E., De Luca, C., Maurelli, R., Korkina, L.G. (2011). Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells. *Journal of Dermatological Science*, 63, 104–114.
- Peranteau, W.H., Zhang, L., Muvarak, N., Badillo, A.T., Radu, A., Zoltick, P.W., Liechty, K.W. (2008). IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 1852–1860.
- Perfetto, B., Stellavato, A., Melito, A., De Gregorio, V., Cammarota, M., Guiliano, M. (2012). A time-lapse approach to examine chromium and nickel effects on wound healing in vitro. *Journal of Immunotoxicology*, 9 (4): 392–400.
- Peşin, İ. (2007). *Hypericum perforatum L. ve Hypericum scabrum L. bitkilerinin yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktiviteleri üzerinde çalışmalar*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Planz, V., Wang, J., Windbergs, M. (2018). Establishment of a cell-based wound healing assay for bio-relevant testing of wound therapeutics. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 89, 19-25.
- Pugin, J., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. (1995). Mechanism of cellular activation by endotoxin. *Modulation of the Inflammatory Response in Severe Sepsis International Symposium: Madrid*. s. 8-17.
- Purkait, B. ve Sharma, A. (2015). Identification and characterization of medicinally active ingredient of endangered plant *Arnica montana*. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*, 2 (2), 59-64.
- Pushparani, D.S. (2015). Role of cytokines in periodontal wound healing process - A Review. *Pharmaceutical Analytical Chemistry:Open Access*, 1 (1), 1-5.
- Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221, 2– 11.

- Quing, C. (2017). The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology*, 20, 189-193.
- Rajan, V. ve Murray, R.Z. (2008). The duplicitous nature of inflammation in wound repair. *Wound Practice and Research*, 16 (3), 122-129.
- Ranzato, E., Patrone, M., Burlando, B. (2008). Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. *British Journal of Dermatology*, 159, 537–545.
- Ritsu, M., Kawakami, K., Kanno, E., Tanno, H., Ishii, K., Imai, Y., Maruyama, R., Tachi, M. (2017). Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, 21, 14-19.
- Rodero, M.P. ve Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3 (7), 643-653.
- Rodrigues, D.F., Luna, S.P.L., Brondani, J.T., Minto, B.W. (2016). Comparison of morphine, ketoprofen and Arnica montana 6x and 30x per oral transmucosal or subcutaneous route for control of postoperative pain in cats subjected to hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy. *Ciência Rural*, 46 (2), 330-335.
- Rozlomiy, V.L. ve Markov, A.G. (2010). Effect of Interleukin-1 β on the expression of tight junction proteins in the culture of HaCaT keratinocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 149 (3), 280-283.
- Safferling, K., Sütterlin, T., Westphal, K., Ernst, C., Breuhahn, K., James, M., Jäger, D., Halama, N., Grabe, N. (2013). Wound healing revised: A novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. *Journal of Cell Biology*, 203 (4), 691-709.
- Sandt, J., Roguet, R., Cohen, C., Esdaile, D., Ponec, M., Corsini, E., Barker, C., Fusenig, N., Liebsch, M., Benford, D., Fraissinette, A.B., Fartasch, M. (1999). The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *Alternatives to Laboratory Animals*, 27, 723-743.

- Schildberger, A., Rossmannith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., Weber, V. (2013). Monocytes, peripheral blood mononuclear cells and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, 2013, s. 1-10.
- Seo, M.D., Kang, T.J., Lee, C.H., Lee, A.Y., Noh, M. (2012). HaCaT keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope- associated genes to T helper cell cytokines. *Biomolecules & Therapeutics*, 20 (2), 171-176.
- Serdaroğlu, İ. (2015). *Diş macunlarının sitotoksik ve mutajenik etkileri*. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Kırıkkale: Kırıkkale Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Shanthi, S., Seethalakshmi, S., Chamundeeswari, D., Manna, P.K. (2015). Evaluation of wound healing effect of *Dodonaea viscosa* Linn. by cell proliferation assay. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7 (3), 559-562.
- Slavin, J. (1996). Role of cytokines in wound healing. *Journal of Pathology*, 178, 5-10.
- Staneva, J., Denkova, P., Todorova, M., Evstatieva, L. (2011). Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L. by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, 94–99.
- Subalakshmi, M., Saranya, A., Maheswari, M.U., Jarina, A., Kavimani, S., Murali, R. (2014) An overview of the current methodologies used for the evaluation of drugs having wound healing activity. *International Journal of Experimental Pharmacology*, 4 (2), 127-131.
- Supornsilchai, V., Söder, O., Svechnikov, K. (2006). Sesquiterpene lactone helenalin suppresses Leydig and adrenocortical cell steroidogenesis by inhibiting expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Reproductive Toxicology*, 22, 631–635.
- Svensson, D., Lozanob, M., Almanzac, G.R., Nilssona, B.O., Sternerb, O., Villagomez, R. (2018). Sesquiterpene lactones from *Ambrosia arborescens* Mill. inhibit proinflammatory cytokine expression and modulate NF-κB signaling in human skin cells. *Phytomedicine*, 50, 118–126.

- Szabowski, N.M., Stärker, A., Fusenig, N.E. (2003). Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . *Journal of Cell Science*, 116, 2937-2948.
- Talhok, R.S., Nasr, B., Fares, M.B., Ajeeb, B., Nahhas, R., Al Aaraj, L., Talhok, S.N., Ghaddar, T.H., Saliba, N.A. (2015). Anti-inflammatory and cytostatic activities of a parthenolide-like sesquiterpene lactone from *Cota palaestina* subsp. *syriaca*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
- Takada, K., Komine-Aizawa, S., Hirohata, N., Trinh, Q.T., Nishina, A., Kimura, H., Hayakawa, S. (2017). Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8. *BMC Immunology*, 18 (19), 1-10.
- Tanga, S., Liaoa, P., Hunga, S., Gea, J., Chena, S., Laid, J., Hsiao, Y., Yanga, J. (2017). Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF- κ B signaling pathway in keratinocytes and mice skin. *Journal of Dermatological Science*, 86, 238-248.
- Tárnok, A., Hambsch, J., Chen, R., Varro, R. (2003). cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clinical Chemistry*, 49 (6), 1000-1002.
- Tokgün, O. (2011). *Epidermal büyüme faktörü aktivasyonuna neden olan EGFR vIII, E746-A750 del ve L858R mutasyonlarının biyolojik etkilerinin araştırılması*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Denizli: Pamukkale Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tonks, A.J., Cooper, R.A., Jones, K.P., Blair, S., Parton, J., Tonks, A. (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 21, 242-247.
- Toplayıcı, S. (2015). *Resveratrolün, epiteloid malign plevral mezotelyoma hücrelerindeki oksidatif stres üzerindeki etkisinin incelenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tornhamre, S., Schmidt, T.J., Glaser, B.N., Ericsson, I., Lindgren, J.A. (2001). Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leukotriene C₄ synthase in human blood cells. *Biochemical Pharmacology*, 62, 903-911.

- Turabelidze, A. ve Dipietro, L.A. (2012). Inflammation and wound healing. *Endodontic Topics*, 24, 26–38.
- Türköz-Uluer, E. (2009). *Fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan epidermal seri hücrelerinden keratinositlerin primer yara iyileşiminde kullanımı*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- Unutmaz, D., Pileri, P., Abrignani, S. (1994). Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 1159-66.
- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H., Reichl, F.X. (2010). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 26, 51–58.
- Ünver, N. ve Emre, S. (2008). Sistem biyolojisi ve deri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 68-74.
- Valsero, I.A., Soriano-Romaní, L., García-Posadas, L., Lopez-García, L., Diebold, Y. (2014). IL-6 as a corneal wound healing mediator in an *in vitro* scratch assay, *Experimental Eye Research*, 125, 183-192.
- Varol, Y. (2008). *Nigella sativa yağının sıçanlarda oluşturulan yara modeli üzerine etkisinin incelenmesi*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Walter, M.N.M., Wright, K.T., Fuller, H.R., MacNeil, S., Johnson, W.E.B. (2010). Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Experimental Cell Research*, 316, 1271-1281.
- Wang, X., Coradin, T., H  lary, C. (2018). Modulating inflammation in a cutaneous chronic wound model by IL-10 released from collagen– silica nanocomposites via gene delivery. *Biomaterials Science*, 6, 398–406.
- Wang., X. ve Zhang, Y. (2018). Resveratrol alleviates LPS-induced injury in human keratinocyte cell line HaCaT by up-regulation of miR-17. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501, 106-112.

- Wedler, J., Daubitz, T., Schlotterback, G., Butterweck, V. (2014). *In vitro* anti-inflammatory and wound-healing potential of a *Phyllostachys edulis* leaf extract – identification of isoorientin as an active compound. *Planta Medica*, 80, 1678–1684.
- Weng, Z., Patel, A.B., Vasiadi, M., Therianou, A., Theoharides, T.C. (2014). Luteolin inhibits human keratinocyte activation and decreases NF- κ B induction that is increased in psoriatic skin. *PLoS ONE*, 9 (2), 1-8.
- Werner, S. ve Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83, 385-870.
- Wiegand, C., Abel, M., Ruth, P., Ch. Hipler, U. (2012). Anti-inflammatory effects of a collagen-containing wound dressing in a cell-based inflammation model *in vitro*. *4th International Workshop on Wound Technology (IWWT)*’ de sunulan poster. 15.-16. January 2012, Paris.
- Woerdenbag, H.J., Merfort, I., Schmidt, T.J., Passreiter, C.M., Willuhn, G., Uden. W.V., Pras, N., Konings, A.W.T. (1995). Decreased helenalin-induced cytotoxicity by flavonoids from Arnica as studied in a human lung carcinoma cell line. *Phytomedicine*, 2 (2), 127-132.
- Wulff, B.C., Wilgus, T.A. (2013). Mast cell activity in the healing wound: More than meets the eye?. *Experimental Dermatology*, 22 (8), 507–510.
- Yılmaz, B., Kesikburun, S. (2013). Plateletten zengin plazma uygulamaları. *Türk Fiziksel Tıp Rehabilitasyon Dergisi*, 59, 338-344.
- Zheng, X.F., Hong, Y.X., Feng, G.J., Zhang, G.F., Rogers, H., Lewis, M.A.O., Williams, D.W., Xia, Z.F., Song, B., Wei, X.Q. (2013). Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by candida albicans mediated up-regulation of EBI3 expression. *PLoS ONE*, 8 (5).
- Zhou, B., Zhang, J., Zhang, Q., Permatasari, F., Xu, Y., Wu, D., Yin, Z., Luo, D. palmitic acid induces production of proinflammatory cytokines interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α via a NF- κ B-dependent mechanism in HaCaT keratinocytes. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, 2013, 1-11.

- Zubaidi, A.M., Hussain, T., Alzoghaibi, M.A. (2018). The time course of cytokine expressions plays a determining role in faster healing of intestinal and colonic anastomatic wounds. *The Saudi Journal of Gastroenterology*, 21 (6), 413-417.
- Zwicker, P., Schultze, N., Niehs, S., Albrecht, D., Methling, K., Wurster, M., Wachlin, G., Lalk, M., Lindequist, U., Haertel, B. (2017). Differential effects of helenalin, an antiinflammatory sesquiterpenelactone, on the proteome, metabolome and the oxidative stress response in several immune cell types. *Toxicology in Vitro*, 40, 45-54.
- http-1: <http://www.dermatorium.net/icerikler.asp?id=123&anakat=2&katid=181> (Erişim tarihi: 25 Mart 2016).
- http-2: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/epidermis/> (Erişim tarihi: 3 Mart 2019).
- http-3- <http://slideplayer.com/slide/8856810/> (Erişim tarihi: 17 Mayıs 2015).
- http-4: <https://www.dicle.edu.tr/Contents/5b682db4-a2bf-456e-ad8b-8b8eb31572c6.pdf> (Erişim tarihi: 12 Mayıs 2015).
- http-5: https://www.researchgate.net/publication/272149715_Chapter_1_-_Skin_Structure_and_Function (Erişim tarihi: 18 Haziran 2015).
- http-6: <https://www.hakanbuzoglu.com/deri-ve-derinin-yapisi> (Erişim tarihi: 12 Nisan 2018).
- http-7: www.dermaneturk.com/yara_online/buyume_faktor.doc (Erişim tarihi: 21 Mayıs 2015).
- http-8: <http://tusyad.org/icerik/3162--ortopedide-sitokin-kullanimi--dr--tahsin-beyzadeoglu> (Erişim tarihi: 11 Mart 2019).