

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI
ANATOMİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SERUMLA BİRLİKTE TİMOKİNON UYGULANMASININ
SIÇANLARDA YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

HAZIRLAYAN

ZEYNEP YÜKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2024

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI
ANATOMİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SERUMLA BİRLİKTE TİMOKİNON UYGULANMASININ
SIÇANLARDA YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

HAZIRLAYAN

ZEYNEP YÜKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF DR. ATILLA DAĞDEVİREN

ANKARA - 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anatomi Anabilim Dalı Anatomi Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Zeynep Yüksel tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/09/2024

Tez Adı: Serumla Birlikte Timokinon Uygulamasının Sıçanlarda Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Atilla Dağdeviren, Başkent Üniversitesi

.....

Prof. Dr. İ. Can Pelin, Başkent Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Begümhan Turhan, Başkent Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Sevdâ Fatma Müftüoğlu, Hacettepe Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Tuncay Peker, Gazi Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Ayşe Hande Arslan

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 21 /08/2024

Öğrencinin Adı, Soyadı:Zeynep Yüksel

Öğrencinin Numarası:22020221

Anabilim Dalı:Anatomi

Programı:Tezli Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:Prof. Dr. Atilla Dağdeviren

Tez Başlığı: Serumla Birlikte Timokinon Uygulanmasının Sıçanlarda Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 83 sayfalık kısmına ilişkin, 21/08/2024tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % %9'dır. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

Tarih: 21/08/2024

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

Prof. Dr. Atilla Dağdeviren

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans projemi oluşturma ve yazma sürecimde sonsuz desteğini yanımda hissettiğim kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Atilla DAĞDEVİREN'e teşekkürlerimi ve saygımı sunarım.

Tez çalışmamda histolojik bulguların elde edilmesinde değerli katkıları için sevgili hocam Araş. Gör. Ekin EFE'ye teşekkürlerimi ve saygımı sunarım.

Anatomi Departmanı'ndaki kıymetli hocam sayın bölüm başkanı Prof. Dr. İsmail Can PELİN'e eğitim sürecimdeki katkıları için teşekkürlerimi ve saygımı sunarım.

Tecrübeleriyle yolumu açan ve ihtiyacım olduğunda yanımda olan arkadaşım Merve Büşra ÇATAKÇI'ya sevgilerimi sunarım; eğitim ve deney süreçlerimizi birlikte paylaştığım laboratuvar görevlileri Ece Lakşe ÇOŞAR ve Ayhan YÜKSEK'e ve Vet. Hek. Şevval TARHAN'a teşekkür ederim.

Sevgileri ve destekleriyle eğitimimde güvenle yol almamı sağlayan kıymetli annem Necla YÜKSEL ve kıymetli babam Orhan YÜKSEL ile sevgili abim Mehmet YÜKSEL'e tüm kalbimle sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA22/21) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ÖZET

Yüksel Z. Serumla Birlikte Timokinon Uygulanmasının Sıçanlarda Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi. Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Programı. Yüksek Lisans Tezi, 2024

Deri bütünlüğünün bozulmasına neden olan fiziksel faktörler ve kimyasal faktörler akut yara oluşumuna sebep vermektedir. Timokinon; anti-inflamatuvar, antioksidan özellikleri sebebiyle yara iyileştirici etki göstermektedir. Yapılan bu tez çalışmasında, timokinonun oluşturulan eksizyonel yara modelinde tek başına ve/veya serumla birlikte iyileştirici etkisi incelenmiştir. Çalışmada Wistar-Albino sıçanlar (erkek, 6-8 aylık, 200-250 gr) kullanılmıştır. Çalışmamızda 5 grup oluşturulmuştur (n=8). Anestezi altındaki sıçanların üst sırt bölgesinden epidermis, dermis ve hipodermisi içeren tam kalınlıkta 3 mm dairesel eksizyon yarası oluşturulmuştur. Cerrahi sonrası 1. günden itibaren 21 gün boyunca deney gruplarına 3 günde 1 kez olacak şekilde timokinon, dimetil sülfoksit serum ve timokinon+serum solüsyonu uygulaması yapılırken; kontrol grubuna uygulama yapılmamıştır. Sakrifikasyon sonrasında yara morfolojisi ve iyileşmesi histolojik olarak değerlendirilmiştir. Histolojik değerlendirmelerde Hematoksilen-Eozin ve Masson trikrom boyamaları yapılmıştır. Timokinon uygulanan grupta kontrol grubu ve diğer gruplara epitelizasyonun arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ($p<0.05$) yara derinliği de kontrol grubuna göre timokinon grubunda ve serum+timokinon grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır ($p=0.04$ ve $p=0.02$, sırasıyla). Sonuçta, timokinonun tek başına uygulandığında ve serumla birlikte uygulandığında kontrol grubuna göre epitelizasyona katkı sağladığı görülmüştür; ancak tek başına timokinon uygulamasının epitelizasyona katkısı serumla birlikte uygulandığı gruba göre yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca, timokinon tek başına uygulandığında ve serumla birlikte uygulandığında yara derinliğini kontrol grubuna göre azaltmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.04$ ve $p=0.02$, sırasıyla). Ancak timokinon tek başına uygulandığında ve serumla birlikte uygulandığında iki grup arasındaki yara iyileşmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: ekzisyonel yara modeli, yara iyileşmesi, timokinon

Bu araştırma (Projenö: DA22/21) Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Yüksel Z. The Effect of Concurrent Thymoquinone and Serum Application on Wound Healing in Rats. Başkent University, Institute of Health Sciences, Anatomy Program. Master's Thesis, 2024

Acute wound development is caused by both physical and chemical elements that compromise the integrity of the skin. Because of its anti-inflammatory and antioxidant characteristics, thymoquinone aids in the healing of wounds. The healing effect of thymoquinone alone, in combination with serum, or neither was examined in this thesis study using an excisional wound model. The study employed male Wistar-Albino rats weighing 200–250 grams, aged 6–8 months. In our investigation, five groups were constituted ($n = 8$). In the upper back region of anesthetized rats, a full thickness 3 mm circular excision wound encompassing the epidermis, dermis, and hypodermis was generated. The experimental groups received once every 3 days thymoquinone, dimethyl sulfoxide, serum, and thymoquinone+serum solution for 21 days beginning on the first day following surgery, while the control group received no treatment. Following sacrifice, the morphology and wound healing were assessed histologically. In histological assessments, Hematoxylin-Eosin and Masson trichrome stains were used. Thymoquinone application resulted in a statistically significant increase in epithelialization ($p < 0.05$) in comparison to the control group and other groups, as well as a decrease in depth ($P < 0.05$) in the thymoquinone group relative to the control group. Additionally, thymoquinone given in conjunction with serum was demonstrated to reduce wound depth in comparison to the control group ($p = 0.044$ and $p = 0.02$, respectively). Therefore, compared to the control group, it was noted that thymoquinone contributed to epithelialization when applied alone and with serum; however, the group that received serum application did not contribute as much to epithelialization as the group that received thymoquinone application alone ($p < 0.05$). As a result, it was observed that thymoquinone contributed to epithelialization when applied alone and with serum compared to the control group; however, the contribution of thymoquinone application alone to epithelialization was found to be higher than the group applied with serum ($p < 0.05$). In addition, thymoquinone applied alone and with serum reduced the wound depth compared to the control group and this decrease was found to be statistically significant ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). However, statistically insignificant difference

was found between the wound healing between the two groups when thymoquinone was applied alone and with serum.

Keywords: excisional wound model, wound healing, thymoquinone, serum

This research (Project: DA22/21) was supported by the Başkent University Research Fund.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Deri Histolojisi.....	3
2.2. Yara Tipleri.....	6
2.2.1. Akut yara.....	7
2.2.2. Kronik yara.....	8
2.3. Yara İyileşmesi.....	9
2.4. Akut ve Kronik Yara Arasındaki Farklar.....	14
2.5. Akut Yara Tedavi Yöntemleri.....	15
2.6. Timokinon.....	17
2.6.1. Timokinonun kimyasal özellikleri.....	17
2.6.2. Timokinonun etki mekanizması.....	18
2.7. Serumun Özellikleri.....	19
2.8. Sıçanlarda Oluşturulan Yara Modelleri.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	21
3.2. Timokinonun Hazırlanışı.....	22
3.3. Serumun Hazırlanması.....	22
3.4 Eksizyonel Yara Modelinin Oluşturulması.....	22
3.5 Doku Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması.....	24
3.6. Doku takibi ve Histokimyasal Yöntemler.....	24
3.6.1. Hematoksilen-Eozin boyama ile yara dokusunun	
Değerlendirilmesi.....	26
3.6.2. Masson's Trikrom boyama ile yara dokusunun	

değerlendirilmesi.....	27
3.7. İstatistiksel Analiz.....	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. Deney Hayvanlarının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	30
4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama ile Yara Dokusunun Değerlendirilmesi.....	32
4.3. Masson's Trikrom Boyama ile Yara Dokusunun Değerlendirilmesi	37
4.4. Yara İyileşmesinin Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesinin İstatistiksel incelenmesi.....	43
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	52
EKLER	
EK 1: Etik Kurul Onayı	
EK 2: Grupların Skorlama Değerleri	

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Sıçanlarda yara modelleri.....	20
Tablo 3.1. Morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi için kullanılan skorlama.....	26
Tablo 4.1. Yara iyileşmesi için kullanılan parametrelerin 21. gün sonunda karşılaştırılması.....	44
Tablo 4.2. Epidermis ve yara derinlik ölçümü istatistiksel analiz sonuçları	45



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Deri ve eklerinin.....	6
Şekil 2.2. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörleri ve hücreler.....	11
Şekil 2.4. Yara iyileşme sürecinde dokuda görülen değişiklikler.....	13
Şekil 2.5. Timokinon, Nigella Sativa'nın (Çörek Otu) kimyasal yapı modeli.....	17
Şekil 3.1. Deney planı şeması.....	22
Şekil 3.2. Sıçanlarda yara modelinin oluşturulması.....	23
Şekil 3.3. Timokinon ve serum bileşiğinin yara yüzeyine uygulanması.....	24
Şekil 4.1. Kontrol grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün ve sakrifikasyon.....	30
Şekil 4.2. DMSO grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün ve sakrifikasyon.....	31
Şekil 4.3. Timokinon grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün sakrifikasyon.....	31
Şekil 4.4. Serum grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün ve sakrifikasyon.....	32
Şekil 4.5. Timokinon+serum grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün sakrifikasyon.....	32
Şekil 4.6. K grubunda epidermisin organizasyonu.....	33
Şekil 4.7. D grubunda epidermisin organizasyonu.....	34
Şekil 4.8. T grubunda epidermisin organizasyonu.....	35
Şekil 4.9. S grubunda epidermisin organizasyonu.....	36
Şekil 4.10. TS grubunda epidermisin organizasyonu.....	37
Şekil 4.11. K grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi.....	39
Şekil 4.12. D grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi.....	40

Şekil 4.13. T grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi.....	41
Şekil 4.14. S grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi.....	42
Şekil 4.15. TS grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi.....	43
Şekil 4.16. Epidermis kalınlığının ölçümünün uzunluk (arbitrary unit) değerlerinin dağılımlarının gösterimi.....	45
Şekil 4.17. Yara derinliğinin ölçümünün uzunluk (arbitrary unit) değerlerinin dağılımlarının gösterimi.....	46



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

CAT	Katalaz
COX2	Siklooksijenaz-2
ECM	Ekstraselüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAG	Glikozaminoglukan
IFN	Interferon
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
IL-12	İnterlökin-12
iNOS	Nitrik oksit sentaz
MMP-1	Matriks metalloproteinaz-1
NF- κ B	Nükleer faktör kappa-hafif zincir-aktive B hücresi
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B
ROS	Reaktif oksijen seviyesi
SOD	Süperoksit dismutaz
TBK1	Bağlayıcı kinaz 1
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
TNF- α	Tümör nekroze edici faktör
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
JNK	N-terminal kinaz

1. GİRİŞ

Deri bütünlüğünün bozulmasına neden olan fiziksel faktörler yara oluşumuna sebep vermektedir. Derinin bozulmuş anatomik yapısının ve fonksiyonel yapısının yenilenmesi için yaraların doğru şekilde iyileşmesi önemlidir (1).

Yara iyileşmesi, vücudun hasarlı dokuyu onarması için oluşturduğu doğal tepkisidir (2). Onarım süreçlerinin çoğu tüm dokular için ortaktır ve hücresel düzeyde başlayan cevap ilk aşamasıdır.

Yaralar, akut ve kronik yara olmak üzere ikiye ayrılır. Akut yaralar genellikle kendilerini hem fonksiyonel hem de anatomik doku bütünlüğü bakımından onarırlar (3, 4). İyileşme sürecini kesintiye uğratan herhangi bir değişiklik, doku hasarını ve onarım sürecini uzatarak kronik yaraya neden olur (4). Kronik yaralar, klasik yara iyileşme süreçlerinin kontrol edilemediği yaralardır. Kronik yaralarda, akut yara iyileşmesinde görülen homeostaz, inflamasyon, proliferasyon, yeniden modellenme ve olgunlaşma aşamaları düzenli olarak görülmez (3, 5).

Yara iyileşmesi süreci, birbirini takip eden dört aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar: Homeostaz, inflamasyon, proliferasyon ve dokunun yeniden şekillenmesidir. Bu süreç fibroblastlar, trombositler, makrofajlar, keratinositler ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinin görev aldığı süreçlerdir. Ayrıca yara iyileşmesinde sitokinleri, büyüme faktörlerini ve kemokinleri içeren bir sinyal ağı da görev almaktadır (6). Her fazın uzunluğu yarayı etkileyen fizyolojik ve ekzojen faktörlere bağlı olarak değişir.

Proliferasyon fazı, yara iyileşmesinde inflamasyonun azaldığı ve homeostazın yeniden sağlandığı bir aşamadır (4, 7). Bu fazın ana hücreleri epitel hücreleridir. Epitel hücrelerinin göçü, embriyogenez, bağışıklık tepkisi ve doku gelişimi dahil olmak üzere sağlıkta ve hastalıkta kritik bir rol oynayan karmaşık ve dinamik bir yara iyileşmesi sürecidir. Proliferasyon aşamasında, epidermis ve dermisteki hücreler çoğalmaya ve yara bölgesine göç etmeye başlar. Daha sonra dermal hücreler birikir ve yara kapanana kadar yara bölgesinde ekstraselüler matriksi yeniden yapılandırmaya devam eder. Dokunun yeniden şekillenmesinde epidermisin düzeninin tekrar kurulması önemlidir. Hücre göçünün esas

olarak gerçekleştiği dönemdir. Anjiyogenez bu dönemde görülür ve onarılan dokuya oksijen ve besin değişimi desteği sağlar (6, 8).

Nigella sativa, çörek otu olarak da bilinen bir bitkidir (6, 9). *Nigella Sativa*'da bulunan sarı kristalli bir molekül olan timokinon, sırasıyla 2. ve 5. pozisyonlarında bir metil ve bir izopropil yan zincir gruplarının eklendiği bir benzen halkasına konjuge edilmiş bazik bir kinon yapısına sahiptir (9). Anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar ve anti-tümör özellikleriyle terapötik aktiviteye sahip doğal bir biyoaktiftir (10). Yara iyileştirici etkisinin gelişmiş inflamatuvar yanıt, azaltılmış oksidatif stres, artan fibroblast üretimi, gelişmiş granülasyon dokusu oluşumu ve hızlı yara kontraksiyonu ve epitelizasyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (11, 12).

Timokinon, yara iyileşmesi için çeşitli araştırmalarda uygulanmasına rağmen sıçan kanından elde edilen serum ile birlikte daha önce uygulanmamıştır. Yapılan bu tez çalışmasında, timokinon ve serumun birlikte kullanılmasının yara iyileşmesi üzerindeki etkisi karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Hipotezimiz, "timokinon ve serumun birlikte yara bölgesine uygulanması yara iyileşmesinde daha etkilidir" olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışması, timokinon ve serumun birlikte uygulanmasının yara dokusundaki iyileştirici etkisinin gösterilmesi ve yöntemin klinik uygulamalarda kullanılması yolunda önemli bir bilimsel katkı sunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Histolojisi

Deri, vücudun en büyük organı olup, dış çevre ile doğrudan temas halinde olan koruyucu bir bariyerdir. Duyusal ve adaptif kapasiteye sahip olan bu organ bölgesel ve genel vücut homeostazında zararlı faktörlere karşı koruyucu yanıt olarak çalışır (12, 13). Vücudu dış etkenlere karşı korumanın yanı sıra, vücut sıcaklığını düzenlemeye, nemi korumaya ve dokunma duyusunu sağlamaya yardımcı olur (14). Epidermis ve dermis olmak üzere 2 tabakadan oluşur ve bu iki tabaka bazal membran ile birbirinden ayrılır. Dermisin hemen altında ise, yağ tabakası olan hipodermis bulunur.

Epidermis, derinin en dış katmanıdır ve çok katlı yassı epitelden oluşur. Çok katlı yassı epitel hücreleri 4 farklı tabakayı oluşturur ve her tabakada farklı hücreler bulunur. Keratinositler, epidermiste yaygın olarak görülür. Keratinositler, derin tabakadan yüzeysel tabakaya doğru olgunlaşarak keratinizasyon adı verilen bir süreçten geçerler. Bu süreçte hücreler, keratin adı verilen protein filamentleri ile dolmaya başlar. Keratin, epidermise sağlamlık ve su geçirmezlik kazandıran sert bir maddedir.

Epidermis katmanları bazaldan yüzeye kadar 4 tabakadan oluşur. Bu tabakalar şunlardır:

Stratum basale (Stratum germinativum): En alt katmandır ve aktif olarak yeni hücreler üreten kök hücreleri içerir.

Stratum spinosum: Keratinositlerin olgunlaşmaya başladığı katmandır. Hücreler dikenli bir görünüm alır.

Stratum granulosum: Keratin granüllerinin biriktiği katmandır.

Stratum corneum: Ölü hücrelerden oluşan ve cildimizin en dış katmanını oluşturan tabakadır. Bu katmandaki hücreler pullara benzeyen keratin tabakalarıyla doludur ve su geçirmez bir bariyer oluşturur (15).

Epidermis çok katlı yapısı sayesinde vücudu dış etkenlerden korur. Saç folikülleri, ter bezleri ve yağ bezleri, epidermisten kaynaklanan deri ekleridir. Saç folikülleri, kılların büyümesini sağlar. Ter bezleri, vücut sıcaklığını düzenlemeye yardımcı olur. Yağ bezleri ise cildin kurumasını önlemeye yardımcı olur (16).

Epidermis ile dermis arasında bulunan bazal membran, kolajen, laminin ve proteoglikanlar gibi proteinlerden oluşur. Hücreler arası iletişim ve destek için önemli bir rol oynarak cilt homeostazisine aracılık eder. Epiderminin en alt katmanında bulunan bazal hücreler, bazal membran üzerine yerleşir ve bu zarı üretmekten sorumludur (17). Bazal membran, epidermisi dermise sıkı bir şekilde bağlayarak derinin stabilitesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca epidermal hücrelerin dermis ile doğrudan temasını engeller. Bir diğer fonksiyonu ise, epidermis ve dermis arasındaki sinyallerin geçişini seçici olarak kolaylaştırabilmesi veya engelleyebilmesidir (18).

Dermis, epiderminin altında yer alan daha kalın katmanlı ve cilde yapısını veren bağ dokusu tabakasıdır. Dermis ince stratum papilla (papiller) ve stratum reticulare (retiküler) tabaka olmak üzere ikiye ayrılır. Papiller tabakada gevşek bağ dokusu, mast hücreleri, lökositler ve makrofajlar bulunur. Dermal papillalar, ayak tabanları, burun plakası ve ağız çevresi gibi epiderminin kalın olduğu bölgelerde yoğunlaşarak mekanik yapışmayı artırır ve iyi damarlanmış dermisten epidermise besinlerin difüzyonunu kolaylaştırır. Bu sayede, bu bölgelerde temas alanı ve besin alımı optimize edilir. Retiküler dermis, papiller tabakaya göre daha yoğun bağ dokusuna ve daha az hücreye sahiptir. Düzensiz kollajen liflerden ve az sayıda elastik liflerden oluşur. Retiküler tabaka aynı zamanda adipositleri, melanositleri, mast hücrelerini, sinir liflerini ve küçük kan damarlarını da içerir (19).

Dermisin temel hücreleri fibroblastlardır. Fibroblastlarda, ağırlıklı olarak yetişkinlerde tip I kollajen tarafından oluşturulan kollajen lifleri, elastin ve fibrillin; diğer hücre dışı matris bileşenleri olan glikozaminoglikanlar ile proteoglikanlar tarafından oluşturulan elastik lifler birikir. Kollajen ve elastik lifler, cilde yapısal koruma sağlamak için gerekli olan güç ve elastik olma özelliklerini verir. Dermiste kan damarları, sinirler, kıl kökleri, ter bezleri ve yağ bezleri bulunur (20).

Dermisin yapısal özellikleri:

Lifli Matriks: Dermis, kolajen ve elastin lifleri gibi proteinlerden oluşan bir matrikse sahiptir. Bu lifler, dermise sağlamlık ve esneklik kazandırır.

İki Katman: Dermis, papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki ana katmandan oluşur.

Papiller Dermis: Epidermis ile bağlantılı, daha ince ve vasküler olan üst katmandır.

Retiküler Dermis: Daha kalın ve yoğun olan alt katmandır.

Hücreler: Dermis, fibroblastlar, makrofajlar, yağ hücreleri, mast hücreleri, Schwann hücreleri ve kök hücreler dahil olmak üzere birçok farklı hücre türüne ev sahipliği yapar.

Dermisin fonksiyonları aşağıdaki gibidir:

Koruma: Dermis, mekanik hasarlardan, kimyasallardan, ultraviyole radyasyondan ve patojenlerden koruma sağlayarak vücudumuzun ilk savunma hattıdır.

Termoregülasyon: Dermisteki kan damarları, vücudumuzun sıcaklığını düzenlemeye yardımcı olmak için genişleyip daralarak terleme ve ısı kaybını kontrol eder.

Duyusal Algı: Dermis, dokunma, ağrı, sıcaklık ve basınç gibi duyu sinir uçlarını barındırarak dış dünyadan gelen bilgileri beyne iletir.

Destek ve Yapı: Dermis, epidermis, saç folikülleri, tırnaklar ve ter bezleri gibi cilt yapılarını destekler ve şekillendirir (21).

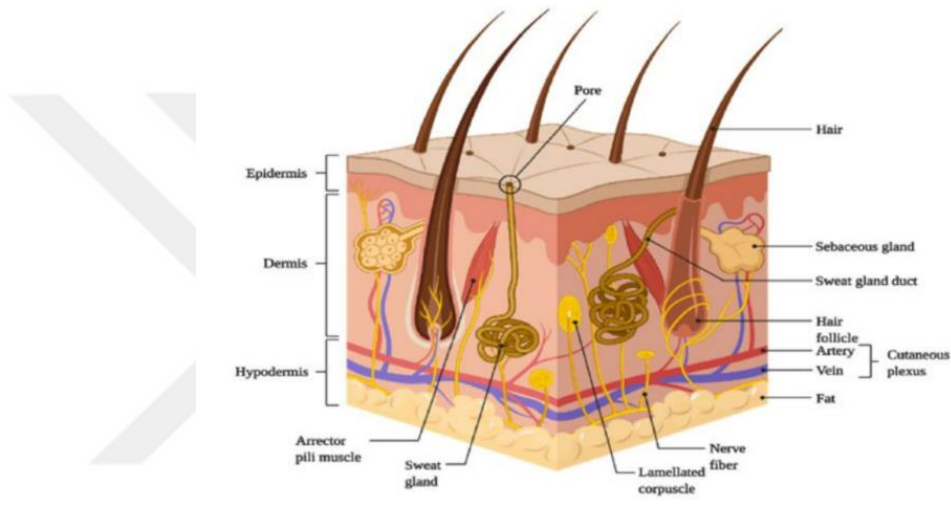
Retiküler dermisin altında yer alan hipodermis büyük ölçüde yağ dokusundan oluşur. Fibroblastlar, adipoz hücreler ve makrofajlardan oluşan dermis ile ilişkilidir. Cildin yalıtımını ve korunmasını sağlar. Yağ depolama, adipokinler ve leptin gibi hormonların üretimi, vücudun ısı üretme sürecine yardımcı olma, sıvı depolama ve doku bütünlüğünü koruma gibi önemli görevlerden de sorumludur. Yapısı, geometrik şekiller halinde düzenlenmiş lifli dokudan oluşan bir kafes ağı olarak tanımlanır. Bu lifler, sıkıştırma, genişleme, kesme ve esneme yoluyla yeni boşluklar oluşturmak için birleşebilir ve ayrılabilir. Bu sayede cilt hareket edebilir ve gerilebilir (22).

Dermal beyaz yağ dokusu ile fasya üzerindeki interstisyel bağ dokusu arasında yer alan panniculus carnosus ise, ince bir çizgili kas tabakasıdır (23). İnsanlar da dahil olmak üzere birçok memelide panniculus carnosus bulunmazken, bazı türlerde, örneğin kemirgenlerde, kedilerde, köpeklerde, atlarda ve balinalarda bulunmaktadır (24). Panniculus carnosus, kas liflerini harekete geçirmek üzere a-motor nöronlar tarafından innerve edilir (23).

Derin fasya ise, kaslar, kemikler, damarlar ve sinirler gibi vücudun daha derin yapılarının etrafında bulunan yoğun düzenli bağ dokusundan oluşur. Uzun yıllar boyunca derin fasya, sadece kasları saran bir yapı olarak kabul edilmiştir; ancak son çalışmalar derin fasyanın birden fazla işlevinin olduğunu ortaya koymuştur. Gallegos ve arkadaşları fasya'nın yara iyileşmesi için önemli olduğunu belirtmiş ve Taguchi ve arkadaşları derin fasya'nın

sadece ağrı duyusu için değil aynı zamanda miyofasyal ağrısı olan hastalarda tedavi için hedef doku olarak da önemli olduğunu göstermiştir (25, 26).

Derin fasya bol miktarda damar ve sinir içermektedir. Bu da fasyanın cilde kan temini rolünü ve olası ağrı kaynağı olduğunu göstermektedir (27). Stecco ve diğerleri derin fasyanın iki bileşene ayrıldığını; epimisyumla aynı özellikleri gösteren ve kolajen lifleri ve birçok elastik lif tarafından oluşturulan ince bir katman olan derin tabaka; ve paralel kolajen lif demetlerinden oluşan üç katmandan oluşan medyan tabakadan oluştuğu göstermiştir (28).



Şekil 2.1. Deri ve eklerinin gösterimi (29)

Cildin yapısı ve işlevinin korunması temelde epidermal hücre popülasyonlarına ve dermal fibroblastlara bağlıdır. Epidermis ve dermis arasındaki düzenlenen bu süreç deri gelişimi, homeostaz ve onarımında önemli bir rol oynar (30). Deri ayrıca bakteri, mantar ve virüslerden oluşan karmaşık ve dinamik bir ekosistemdir. Bu mikroorganizmalar toplu olarak deri mikrobiyomu olarak adlandırılır ve sağlıklı deri fizyolojisi ve bağışıklığı için esastır (31).

2.2. Yara Tipleri

Yaralar akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir. Akut veya kronik yarayı neyin oluşturduğuna dair yayın olarak kullanılan bir tanım yoktur. Ancak iyileşme süreçlerinin farklı olması bu iki yara tipini birbirinden ayırmaktadır. Akut yaralar, genellikle normal

iyileşme süreci gösterir ve 4 haftadan kısa sürede iyileşirler. Kronik yaralar ise normal iyileşme sürecini takip etmeyen ve 4 hafta içinde iyileşme belirtisi göstermeyen yaralardır (32).

Deride yara oluşumu hem metabolik hem de çevresel faktörlerden etkilenir. Metabolik faktörler arasında değişen beslenme durumu, vasküler hastalık sorunları ve diyabet sayılabilir. Çevresel faktörler arasında düşmeler, kazalar, basınç, hareketsizlik ve cerrahi prosedürler bulunur. Deri yaralarının etkili bir şekilde iyileşmesi, cildin hayati engelleyici işlevini korumak için çok önemlidir, ancak patolojik yara iyileşmesi ve skar oluşumu, hastalara hem fizyolojik hem de psikolojik zorluklar veren ciddi tıbbi sorunlardır. İyileşme sürecinde, homeostaz, çeşitli hücre tiplerinin yaraya göçü, iltihaplanma, anjiyogenez ve ekstrasellüler matrisin oluşumu gibi bir dizi yenileyici tepki rol oynar (33).

Derinin bütünlüğünün bozulması hayat kalitesini, günlük rutini ciddi şekilde olumsuz yönde etkiler. Deri sorunlarında tedavi sağlamak hasta bireyi, bakıcıları ve klinisyenleri içeren bir ekip yaklaşımı gerektirir (34). Bu sebeple yara iyileşmesi ile ilgili yapılan araştırma çalışmaları önem kazanmaktadır.

2.2.1. Akut yara

Akut yaralar kaza sonucu oluşan yaralar ve cerrahi yaralar olarak sınıflandırılır. Akut yaralar, yaralanma mekanizmasına ve/veya doku hasarının boyutuna ve türüne bağlı olarak da oluşabilir (35). Sağlam ciltte normal bakteri kolonizasyonu dengelidir. Akut bir yara bu dengeyi bozar ve enfeksiyon meydana gelebilir. Akut yaralarda *Staphylococcus aureus* gibi belirli bakteri türlerinin varlığı, enfeksiyon oluşması için bir risk faktörü gibi görünmektedir (36).

Akut yara, hasarlı dokunun onarılmasına yol açan bir dizi hücresel olayı içeren karmaşık bir biyolojik süreçtir. Büyüme faktörleri hücre çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını düzenleyerek bu süreçte kritik bir rol oynar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), trombositler tarafından salınır ve fibroblastların ve düz kas hücrelerinin büyümesini uyarır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinositler (epidermisteki ana hücre tipi) dahil olmak üzere çeşitli hücreler tarafından salınır. EGF, yeniden epitelizasyon

(yaranın yeni deri ile kaplanması süreci) için gerekli olan keratinositlerin çoğalmasını ve göçünü uyarır. Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), yara iyileşmesinin tüm aşamalarında rol oynayan çok işlevli bir büyüme faktörüdür. Fibroblastlar tarafından kollajen üretimini uyarır ve aynı zamanda inflamatuvar yanıtın düzenlenmesine yardımcı olur. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyogeneze anahtar bir faktördür. Yara bölgesine oksijen ve besin sağlamak için gerekli olan yeni kan damarlarının büyümesini uyarır. Bu büyüme faktörleri yaranın daha hızlı, daha az enfeksiyon cevap ile ve yara izinde iyileşme başarısının artması şeklinde etki eder (37).

Akut yaralarda enfeksiyon riskini azaltmak için yarayı temiz ve kuru tutmak önemlidir. Yarayı pansumanla kapatmak ve pansumanı düzenli olarak değiştirmek gerekir. Elleri sık sık yıkamak ve yaraya temas etmeden önce ve sonra dezenfekte etmek önemlidir. Ateş, kızarıklık, şişlik veya ağrı gibi enfeksiyon belirtileri görülürse doktora başvurulmalıdır.

Diyabet veya bağışıklık sistemi zayıflığı gibi bazı sağlık sorunları da akut yaralarda enfeksiyon riskini artırabilir. Kullanılan ilaçlar da, bağışıklık sistemini zayıflatarak enfeksiyon riskini artırabilir. Enfeksiyon ve diyabet gibi durumlar akut yara iyileşmesini bozarak kronik yara oluşumuna sebep olabilir (38).

2.2.2. Kronik Yara

Düzenli iyileşme sürecini içermeyen ve üç ay içinde iyileşmeyen yaralar, kronik yara kabul edilir. Kronik yaralarda enfeksiyona cevap akut yaralardaki cevaptan uzun sürmektedir. Kronik yara hastaları sıklıkla ağrının günlük yaşam aktivitelerine katılımlarında kısıtlayıcılığa sebep olduğunu bildirirler. Anormal yara iyileşmesi, kronik yaralar, normal deri işlevini bozar. Bu nedenle, etkili ve güvenli olan iyileştirici ajanların araştırılması önemlidir (39).

Kronik yaralarda aerobik veya fakültatif patojenler enfeksiyonun başlıca nedenleridir. Kronik yaraların tedavisi ülserin etiyolojik temelini tedavisini ve yara bölgesinin tedavisini içerir. Yara bölgesinin debridmanı yara enfeksiyonunun oluşmasını önler ve yara iyileşmesine yardımcı olur. Yara enfeksiyonu meydana gelirse, antimikrobiyal tedavi kaçınılmazdır ve hastaya olası etken organizmayı kapsayan bir antibiyotiğin verilmesi önerilir (40).

Zayıf dolaşım, nöropati ve hareket etme zorluğunun yanı sıra sistemik hastalıklar, yaş ve tekrarlanan travmalar kronik yaralara sebep olur. Kronik yaralara eşlik eden sekonder rahatsızlıklar arasında vaskülit, immün baskılanma, piyoderma gangrenozum ve iskemiye neden olan hastalıklar yer alır. Bağışıklığın baskılanması veya steroidler gibi uzun süre kullanılan tıbbi ilaçlardan kaynaklanabilir. Duygusal stres, bağışıklığı azaltan kortizol düzeylerini yükselterek yaranın iyileşmesini geciktirebilir. Kronik yaraların oluşumunda ve iyileşme sürecinde yaşlanma da önemli bir etkidir (41, 42, 43).

2.3. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, birbirini takip eden ve birbiriyle çakışan hücresel olayları içeren karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Dört ana aşamada incelenir: homeostaz, inflamasyon, proliferasyon, yeniden modelleme ve olgunlaşmadır (44).



Şekil 2.2. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi (41)

Homeostazis:

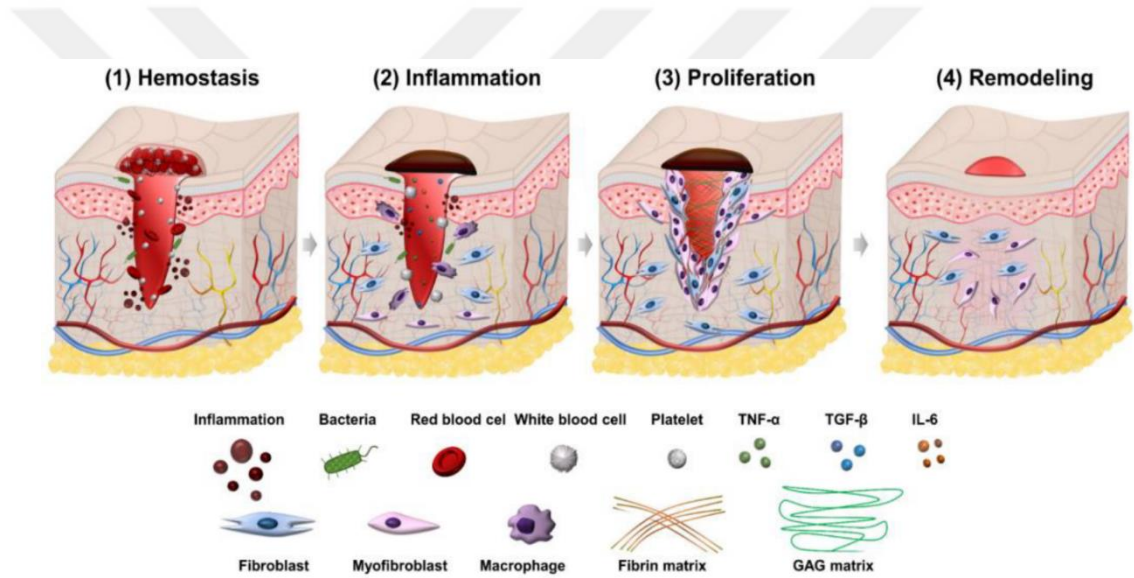
Yara iyileşme sürecinin ilk adımı olan homeostaz, damar hasarından sonra kanamayı durdurur. Homeostaz, damar duvarlarının daralması, ardından trombosit agregasyonu ve trombosit pıhtısı oluşumu (primer homeostaz) ile başlar. Damar hasarı sonrası, pıhtılaşma kaskadı adı verilen karmaşık bir dizi kimyasal reaksiyon aktive edilir. Bu kaskadın amacı, kan akışını durdurmak ve yaralanma bölgesini korumak için bir fibrin pıhtısı oluşturmaktır. Pıhtılaşma kaskadında birçok protein ve enzim rol oynar. Bu faktörlerden biri trombin'dir. Trombin, fibrinojeni adı verilen çözünür bir proteini, fibrin adı verilen çözünmez filamentlere dönüştüren enzimdir. Fibrin filamentleri, bir ağ oluşturarak kan hücrelerini yakalar ve trombus adı verilen bir pıhtı oluşturur. Kalsiyum iyonları (Ca^{+2}), pıhtılaşma kaskadında kritik bir rol oynar. Fibrinojenin fibrine dönüşmesi için Ca^{+2} gereklidir. Bu nedenle, Ca^{+2} eksikliği pıhtılaşma bozukluklarına yol açabilir (44, 45).

İnflamasyon Evresi:

İnflamasyon fazı, yara iyileşmesinin kritik bir aşamasıdır ve sonraki aşamaların başarıyla tamamlanması için gereklidir (46, 47). İnflamasyon belirtileri arasında ödem, kızarıklık, ağrı, işlev kaybı, ateş yer alır.

Artmış damarsal geçirgenlik ve pıhtı oluşumu aşamalarında hasarlı damar duvarlarının açılması, sıvı ve hücrelerin kana karışmasına yol açar. Trombositler aktive olur ve birbirlerine yapışarak pıhtı oluşturur. Pıhtılaşma faktörleri aktive olur ve fibrini oluşturarak pıhtıyı stabilize eder. Bir dizi biyokimyasal süreç meydana gelir ve trombositlerden salınan büyüme faktörleri (PDGF, IGF-1, TGF- β) doku onarımını başlatır. Histamin, damarsal geçirgenliği daha da artırır. Prostaglandin ve tromboksan, kan damarlarını daraltır (37). Hücre göçü sırasında nötrofiller, yara bölgesine göç eder ve anti-inflamatuvar cevap oluşur. Monositler ve makroflar, ölü dokuları ve mikropları ortadan kaldırır. Kompleman Sisteminin Aktivasyonu gerçekleşir. Kompleman sistemi, mikropları yok etmeye yardımcı olur (41). Oponizasyon, savunma hücrelerinin mikropları tanıyıp yutmasını kolaylaştırır. Membran atak kompleksi, mikrobun hücre zarını parçalayarak yok eder. Hücre göçü zaman çizelgesi olarak bakıldığında ilk 24 saatte nötrofiller baskındır. 48. saatten sonra ise mononükleer hücreler baskın olmaya başlar (44, 48, 49).

İnflamasyon fazında görülen diğer hücreler makrofajlar ve lenfositlerdir. Bunlar yara iyileşmesinde hayati rol oynayan ve sitokin salınımıyla öne çıkan hücrelerdir. Nötrofillerin hakimiyeti azaldıktan sonra, 24-48. saatlerde yara bölgesine hakim olurlar. Makrofajlar fagositoz yoluyla ölü dokuyu ortadan kaldırırlar. Debridman yoluyla nekrotik dokunun uzaklaştırılmasına yardımcı olurlar. Anjiyogenez ile damar oluşumunu teşvik ederler. Kollajen sentezi doku onarımına katkıda bulunur. İnflamasyon kontrolü de sitokinler salgılayarak inflamasyonu düzenlerler. Bu amaçla lenfositler yara oluşumundan 5 gün sonra ortaya çıkarlar ve 7. günde en yüksek seviyelerine ulaşırlar. İnflamasyon fazından proliferatif faza geçişi başlatırlar. Fibroblastların çoğalmasını ve doku onarımını hızlandırırlar (48, 49, 50, 51).



Şekil 2.3. Yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörleri ve hücreler (52)

Proliferasyon Evresi:

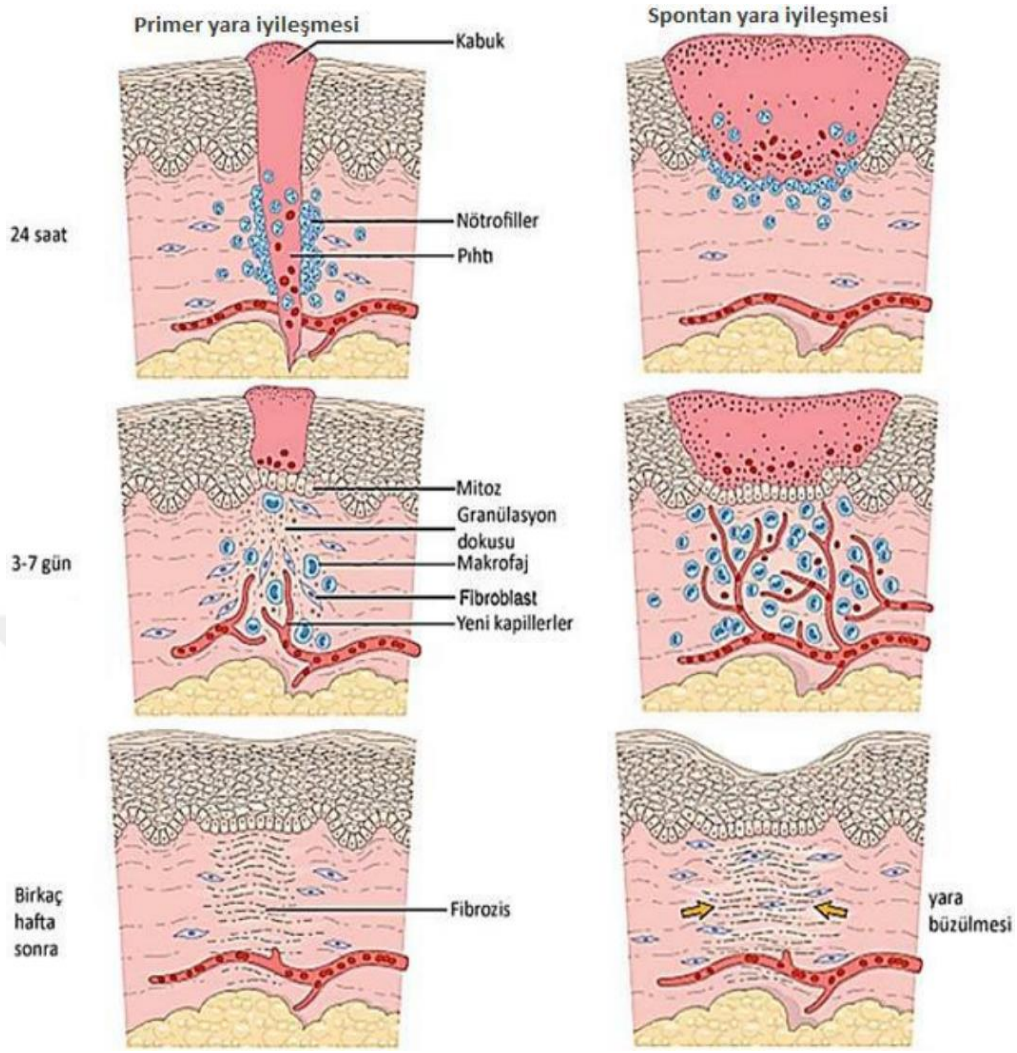
Proliferatif faz, yara iyileşmesinin 4-12. günleri arasında gerçekleşir. Fibroblastların çoğalması ve yeni doku sentezini, re-epitelizasyon ile deri tabakasının yeniden oluşmasını ve anjiyogenez yoluyla ise yeni kan damarlarının oluşumunu içerir. Bu evrede oluşan gevşek yapıdaki dokuya granülasyon dokusu denir. Fibronektin, hyaluronik asit ve kollajen gibi proteinler içerir. Doku makrofajları ve fibroblastlar tarafından üretilir. Anjiyogenez ise yeni kan damarlarının oluşumu, yara dokusuna oksijen ve besin taşınmasını sağlar. Damar endotel hücreleri bazal membranı aşarak yara dokusuna göç eder ve tübüler yapılar oluşturur. Bu tübüler yapılar zamanla olgunlaşarak damarlara dönüşür. Anjiyogenezi uyaran faktörler

arasında trombositler ve makrofajlardan salınan sitokinler, tümör nekroze edici faktör (TNF- α), VEGF bulunur (44).

Fibroblastlar, yara bölgesine göç eden ve yeni doku sentezinden sorumlu hücrelerdir. Trombosit ve makrofajlar tarafından salınan sitokinler tarafından uyarılırlar. En önemli görevi kollajen sentezidir. Kollajen üretimi yara oluşumundan sonra 3-5. günlerde başlar ve 4. haftaya kadar artar. Daha sonra matriks metalloproteinaz (MMP)-1 tarafından parçalanmaya başlar.

Epitelizasyon dış bariyerin yeniden sağlanması için kritik önem taşır. Cildin en dış tabakası olan epidermis, bakterilere karşı koruma sağlar. Dolayısıyla epitelizasyon derinin sağlıklı şekilde iyileşmesi için gereklidir. Epitelizasyonlar yara oluşumundan 24 saat sonra başlar. Sitokinler, epitel hücrelerinin yara yüzeyine göç etmesini tetikler. Epitel hücreleri bazal membranı onarır ve yeni deri tabakasını oluşturur. Bazal membran onarımı yara dokusundaki organizasyonun önemli bir parçasıdır (53, 54).

Proliferasyon aşamasındaki doku elemanı ekstrasellüler matrikstir. Hücrelerin etrafındaki boşluğu dolduran ve dokuya sağlamlık kazandıran yapıdır. Hücreler arası iletişimi ve doku tanınmasını sağlar. Ana bileşenleri kollajen ve glikozaminoglukanlardır (GAG). GAG'lar akışkanlığı sağlayarak besin ve hormonların taşınmasına yardımcı olur. İkinci doku elemanı olan kollajen lifler dokuyu sağlamlaştırır. Elastin doku esnekliğini sağlar. Kollajen vücuttaki en bol bulunan yapısal proteindir. Ekstrasellüler matriksin temel bileşenidir. Kollajenin bilinen 20 farklı tipi bulunur. Kollajen sentezi fibroblastlarda gerçekleşir. Granüllü endoplazmik retikulumda başlar. Prolin ve lizin amino asitleri hidroksile edilir. Askorbik aside (C vitamini) ihtiyaç duyar. Oksijen, demir ve α -ketoglutarat da gereklidir. Doku iskemisi, demir eksikliği ve C vitamini eksikliği sentezi bozabilir. Kollajen üretimi yaralanmadan sonra 14. günde pik yapar. Sonrasında, MMP-1 enzimi tarafından parçalanmaya başlar. Yara iyileşmesinin evrelerine göre kollajen tipi değişmektedir. Yara iyileşmesinin ilk saatlerde: Kollajen Tip IV ve Tip V, devam eden saatte: Tip III, günlerden sonra ise Tip I kollajendir (55, 56, 57). Elastik lifler deri, akciğer ve kan damarları gibi esneklik ve dirence ihtiyaç duyan dokularda bulunur. Elastinden oluşur ve esneyebilir. Yapısal olarak lizin ve alaninden oluşan bir polipeptittir. Hidrofiliktir. Fetal hayatta üretilir ve erken yaşlara kadar devam eder. Daha sonra üretimi durur ancak yıkılmaz. IGF-1 ve TGF- β sitokinleri üretimini stimüle eder (46).



Şekil 2.4. Yara iyileşme sürecinde dokuda görülen değişiklikler (54)

Yeniden Modellenme:

Granülasyon dokusunun olgunlaşmasını ve skar dokusunun oluşumunu içerir. Granülasyon dokusu, yeni kan damarlarının gelişimi olan anjiyogenezi uyarır. Bu, oksijen ve besinlerin yara bölgesine taşınmasını sağlar ve hücrelerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekler. Vasküler VEGF ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleri bu süreçte önemli rol oynar. Fibroblastlar, kollajenin proteinin üretimini ve birikimini artırır. Yeni sentezlenen kollajen, granülasyon dokusunun ekstrasellüler matriks (ECM) oluşturması için yeniden düzenlenir. ECM, hücrelerin göç etmesine, yapışmasına ve işlev görmesine destek olan bir dizi proteinden oluşur. Matriks metalloproteinazlar gibi enzimler, ECM'nin yeniden modellenmesini ve yara bölgesinin şekillenmesini sağlar. Granülasyon dokusundaki miyofibroblast adı verilen özel hücreler, yara kenarlarını birbirine

doğru çekerek yaranın küçülmesini sağlar. Bu süreç, yara kontraksiyonu olarak bilinir ve TGF- β gibi büyüme faktörleri tarafından düzenlenir.

Yeniden modelleme aşamasının sonunda, granülasyon dokusu olgunlaşmış skar dokusuna dönüşür. Skar dokusu, normal deriden daha az elastik ve sağlamdır, ancak yaranın kalıcı olarak kapanmasını sağlar. Bu aşamada, granülasyon dokusu olgunlaşmış skar dokusuna dönüşür ve yara bölgesi yeniden şekillendirilir. Yeniden modellemedeki bozukluklar, anormal skar oluşumuna ve işlevsel bozulmaya yol açabilir. Keloidler ve kontraktürler, aşırı kolajen birikimi veya yara kontraksiyonunun sonucu olarak oluşan iki yaygın anormal skar türüdür (58, 59).

Yara İyileşmesinde Olgunlaşma Evresi:

Olgunlaşma aşaması yaralanmadan sonra 7-21. günler arasında başlar ve 12 aya kadar devam edebilir. Düzensiz kollajen lifleri organize hale gelir. Lifler arası direnç ve sağlamlık artar. Kollajen miktarı sabit kalır, organizasyonu artar. Diğer ECM bileşenleri normal seviyelerine döner. Damar geçirgenliği ve anjiyogenez azalır. Doku ödemi azalır. İnflamatuvar hücreler ve fibroblast aktivitesi azalır (59, 60).

2.4. Akut ve Kronik Yara Arasındaki Farklar

Akut yaralar genel olarak kısa sürede ve komplikasyonsuz iyileşir (61). Akut yara iyileşmesinin ilk aşaması, homeostaz ve geçici bir yara matrisinin oluşumuyla başlar, bu da yaralanmadan hemen sonra meydana gelir ve birkaç saat içinde tamamlanır. Aynı aşamada iltihaplanma süreci de başlatılır. Yara iyileşme kaskadının iltihaplanma aşaması koagülasyon sırasında aktive edilir ve nötrofil artışının olduğu erken bir dönem ile monositlerin varlığının görüldüğü geç dönem olarak ikiye ayrılabilir. Proliferasyon aşamasında, iyileşme sürecinin ana odağı yara yüzeyinin iyileşmesi, granülasyon dokusunun oluşumu ve vasküler ağın yenilenmesidir (62).

Akut bir yaranın iyileşmesi, çok sayıda büyüme faktörünü, iyi organize olmuş ekstraselüler matriks ve çevresel sinyallere yanıt vererek bu sinyallere göre işlevlerini değiştirebilen duyarlı hücre popülasyonlarının varlığıyla karakterize edilir. Akut yaraların

anjyogenezi ve neovaskülarizasyonu, mevcut kan damarlarının yeniden meydana getirilmesi ve endotel progenitör hücrelerin toplanmasıyla devam eder. Kronik yaraların aksine, akut yaralar düşük bakteri yüküne sahiptir.

Kronik yaralar sadece epidermis ve dermisi etkileyebileceği gibi fasyaya kadar uzanan dokuları da etkileyebilir (63). Kronik yaralardaki bakteriyel biyofilm insidansları yüksektir, bu da kalıcı inflamasyona, aşırı proteolize ve kritik büyüme faktörlerinin, reseptörlerin ve ekstraselüler matriksin bozulmasına sebep olur. Bu yaralarda bulunan hücreler, fonksiyonel reseptörlerin veya uygun promigratör matris substratlarının yokluğundan dolayı etkili bir şekilde çoğalamaz ve/veya göç edemez. Her ikisi de kronik yaraların ayırt edici özellikleri olan bozulmuş anjyogenezi ve neovaskülarizasyon ile yara bölgesi içinde bulunan hücrelere yetersiz oksijen ve besin sağlanmasıyla şeklinde neticelenir. Bu da yara bölgesinin daha fazla hasarlanmasına ve iyileşmenin bozulmasına yol açar. Genellikle önemli bir müdahale gerektirmeden iyileşen akut yaraların aksine, her türlü kronik yara, hastalar ve bakıcılar için büyük zorlukları temsil eder. Kronik yaranın iyileşememesinin yara bölgesinde meydana gelen hem hücresel hem de moleküler anormalliklerden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Ancak yara etiyolojisinin doğru tanısı, etkili tedavinin seçimi ve yaranın tekrar oluşmasının önlenmesi, kronik yara hastaları ve sağlık hizmeti sağlayıcıları için bir sorun olmaya devam etmektedir (64, 65).

Yüzeysel yaralar sağlıklı kişiler için genellikle tedavi edilmesi kolay olsa da, klinisyenler için bir zorluk teşkil eden bazı daha ciddi yaralar (yanıklar, ülserler, diyabetik yaralar vb.) vardır. İyi bir terapötik sonuç, doğru zamanda, doğru hasta için bir tedavinin uygulanmasına dayanır (66). Bu noktada, büyüme faktörlerinin veya anti-inflamatuvar, anti-oksidan etkileri olan ve yara iyileşmesine katkı sağlayacak faktörlerin de kullanılması olumlu sonuçlar verir.

2.5. Akut Yara Tedavi Yöntemleri

Tedavi planlamasındaki ilk aşama yara değerlendirmesidir. Yaranın yeri, boyutu, derinliği ve tipi (kesik, delinme, yırtık vb.) belirlenir. Kanamanın varlığı ve şiddeti değerlendirilir. Enfeksiyon belirtileri (kızarıklık, şişlik, ağrı, ısı artışı, akıntı) aranır. Nörovasküler fonksiyon (duyu ve hareket) değerlendirilir. Eşlik eden yaralanmalar veya

travmalar kontrol edilir. Gerekli bulunduğu durumlarda, enfeksiyonu değerlendirmek için yara kùltürü veya görüntüleme testleri (röntgen, ultrason vb.) gibi yardımcı testler istenebilir (67).

Akut yara iyileşme sürecindeki temel amaçlar: enfeksiyon riskini belirlemek ve önleyici tedbirler almak, gerekli cerrahi müdahaleyi planlamak, uygun yara pansumanı ve tedavisini seçmek ve hastayı potansiyel komplikasyonlar ve iyileşme süreci hakkında bilgilendirmektir.

Akut yara tedavisi, yaranın tipine, boyutuna, derinliğine ve konumuna bağlı olarak değişir. Genel tedavi prensipleri şunlardır:

- Yaranın temizlenmesi ve enfeksiyonun önlenmesi.
- Kanamanın durdurulması.
- Yaranın kapatılması (dikiş, steril bandaj vb.).
- Ağrının kontrol altına alınması.
- Gerekirse, antibiyotik tedavisi.
- Düzenli takip ve pansuman.

Yaranın büyük, derin veya enfekte halde olması, yara bölgesindeki nörovasküler yapıların (sinirler, damarlar) zarar görmüş olması, yaranın yüz veya eller gibi hassas bir bölgede bulunması, kişinin tetanoz aşısının güncel olmaması, ateş, titreme veya halsizlik gibi enfeksiyon belirtileri görölmekteyse, ilk müdahale sonrası yara iyileşmez ve kötüleşirse farklı tedavi yaklaşımları planlanmalıdır (68). Tıbbi bitkilerin kullanımı, yaraların tedavisinde mevcut geleneksel uygulamalara yeterli bir alternatif olabilir. Son on yılın sonuçları, toplam 62 familya ve 109 şifalı bitki cinsini ortaya çıkarmıştır ve bunların bileşikleri hem in vivo hem de in vitro deneysel olarak incelenmiş ve klinik olarak iyileşmeyi etkili bir şekilde desteklediği bulunmuştur (69).

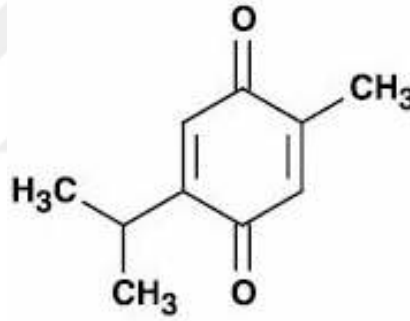
2.6. Timokinon

Timokinon , *Nigella sativa* bitkisinden elde edilen fitokimyasal bir bileşiktir. *Nigella sativa* Ranunculaceae familyasına aittir. Güney Avrupa ile Asya'da özellikle Suriye, Hindistan, Pakistan, Türkiye ve Suudi Arabistan'da yetişen tek yıllık bir bitkidir (68).

Anti-analjezik, anti-inflamatuvar, anti-astimatik, yara iyileştirici, anti-oksidatif ve bağışıklık yükseltici etkilerinin olduğu bilinmektedir (70, 71).

2.6.1. Timokinonun kimyasal özellikleri

Timokinonun (kimyasal adı 2-izopropil-5metil-1,4-benzokinin), moleküler formülü $C_{10}H_{12}O_2$ 'dir ve molar kütlesi 164,20 g / mol'dür. Timokinon, 0.1 N hidroklorik asit ve PBS içinde 5 ila 9 arasında değişen farklı pH seviyelerinde çözünürlüğü olan hidrofobik bir moleküldür (72, 73).



Şekil 2.5. Timokinon, *Nigella Sativa*'nın (Çörek Otu) kimyasal yapı modeli.

Timokinon'un anti-inflamatuvar ve anti-oksidan etkileri hücre içi kalsiyum alımı ve sitokinlerin salınımı azaltarak, siklooksijenaz-2 (COX2), nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/AKT), nükleer faktör kappa-hafif zincir-aktive B hücresinin (NF- κ B) aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli moleküler yollar aracılığıyla gerçekleşir (74, 75).

2.6.2. Timokinonun etki mekanizması

Timokinonun patofizyolojik durumlarda birden fazla faktörü hedef aldığı yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir. Başlıca etkileri; hücre döngüsü ve çoğalması, anjiyogenez, apoptoz, migrasyon, invazyon ve metastaz, inflamasyon ve oksidatif stres üzerinedir.

Antioksidan etkisi, reaktif oksijen seviyesini (ROS) düşürdüğü, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler ile malondialdehit ve glutatyon seviyesini düzenlediği bildirilmiştir (76, 77, 78). İntra-selüler ROS'un azalmasında ve antioksidanla ilgili genlerin süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) yanı sıra Jun geni gibi sinyal genlerinin artan regülasyonunu içeren bir mekanizma yoluyla insan SH-SY5Y hücrelerinde hidrojen peroksit kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. N-terminal kinaz (JNK), hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz (ERK)1/2, p53, protein kinaz B ve B hücrelerinin aktivasyonu ile ilişkili NF- κ B düzeylerini düzenlemektedir (79, 80).

Anti-inflamatuvar etkisi, interlökin (IL)-1 β , IL-6, IL-12 seviyesini düşürürken, TNF- α seviyesini normal değerlerine geri çevirme ve iyileşen dokuda ödem inhibisyonu ve lökosit sayısında azalma sağlayarak akut ve subakut inflamasyonu azaltmaktadır (81, 82). Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (iNOS) ve COX-2 dahil olmak üzere proinflamatuvar faktörleri inhibe ettiğini bildirilmiştir. Ayrıca bağlayıcı kinaz 1'in (TBK1) otofosforilasyonunu desteklediği, interferonların (IFN- α ve IFN- β) mRNA ekspresyonunu azalttığı ve IRF-3 sinyal yollarını aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (83).

İmmünomodülatör etkisi, immün sistemi uyarıcı işlevler gösterdiği (84); nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit, monosit sayısı korunmasında ve makrofajların aktive edilmesinde etkilidir (85).

Anti-diyabetik etkisi, çörek otu tohumu ekstraktından gümüş nanopartikül bazlı yeşil sentezi ile inflamatuvar sinyali inhibe ederek, antioksidan sistemi regüle ettiği bildirilmiştir (86).

Deri hastalıklarına karşı koruma, yara iyileşmesinde çörek otunun hidroetanolik ekstraktının diyabetik deri yaralarının iyileştirdiği (87), çörek otu tohumunun sıcak metanol

ekstraktının yara bölgelerinde kabuk oluşumunu ve granülasyon dokusu oluşumunu artırarak enfekte yaraları iyileşme sürecini hızlandırdığı bildirilmiştir (88).

2.7. Serumun Özellikleri

Pıhtılaşma faktörlerinin uzaklaştırılmasından sonra kanın kalan sıvı kısmı serum olarak tanımlanır. Yara iyileşmesini hızlandırmada potansiyel faydaları belirtilmiştir. Serum, PDGF ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri açısından zengindir. Bu faktörler, yara iyileşmesi sırasında doku onarımı için önemli olan hücre çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını uyarır. Serum, inflamatuvar yanıtı düzenleyen ve yara iyileşme süreçlerini uyaran sinyal molekülleri olan sitokinleri içerir. Enfeksiyonla savaşmak ve doku granülasyonunu (yeni bağ dokusu oluşumu) teşvik etmek için bağışıklık hücrelerinin ilgili bölgeye göçüne sebep olurlar. Serum ayrıca yara iyileşmesi sırasında hücre büyümesi ve doku onarımı için gerekli olan amino asitler, vitaminler ve mineraller gibi temel besinleri sağlar. Bazı araştırmalar, fibrinojen gibi serum proteinlerinin, yara yatağı boyunca hücre bağlanmasını ve göçünü destekleyen geçici bir yapı oluşturabileceğini öne sürmektedir (89).

Timokinon aracılı yara iyileşmesinin anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve anti-mikrobiyal özelliklerinin daha iyi tanımlanması ve bu mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir. Yaranın tedavisini zorlaştıran temel faktörler olan bu parametrelerde minimum yan etkileri olan etkili bir terapötik ajana ihtiyaç vardır. Bu bağlamda, yapılan bu tez çalışmasında hayvanın kanından elde edilen serum numunesinin timokinonun ile veya tek başına uygulanması planlanmıştır.

2.8. Sıçanlarda Oluşturulan Yara Modelleri

Yara iyileşmesini incelemek için yaygın olarak kullanılan kemirgen yara modellerinden bazıları şunlardır:

Tam kalınlıkta eksizyonel yara modeli, alttaki dokuları açığa çıkaran tam kalınlıkta bir yara oluşturmak için dairesel veya kare bir deri parçası kesilip çıkarılarak oluşturulur. Bu model araştırmacıların yara iyileşmesinin tüm aşamalarını incelemesine olanak tanır.

İnsizyonel yara modeli, deriden bir kesi yapılır ancak alttaki dokulara zarar verilmez. Bu model yara kapanmasını ve yeniden epitelizasyonunu incelemek için kullanılır.

Delinme yarası modeli, küçük, derin bir yara oluşturmak için bir iğne veya zımba biyopsi aleti kullanılır. Bu model yara kasılmasını ve granülasyon dokusu oluşumunu incelemek için kullanılır.

Yanık yarası modeli, yanık yarasını taklit etmek için cilde kontrollü bir termal yaralanma uygulanır. Bu model araştırmacıların yanıkların karmaşık iyileşme sürecini incelemesine yardımcı olur (90, 91, 92).

Eksizyonel yara modeli, bu modelde, deride çapı belli dairesel bir defekt oluşturulur. Granülasyon dokusu oluşumunu incelemek için daha uygundur. Granülasyon dokusu, yara bölgesini dolduran ve yeni deri oluşumu için temel sağlayan, kan damarları açısından zengin, geçici bir bağ dokusudur (93).

Tablo 2.1. Sıçanlarda yara modelleri.

Model	Yapılışı	Avantajları	Dezavantajları
Tam kalınlık eksizyonel yara modeli	Altındaki dokuları açığa çıkaran tam kalınlıkta bir yara oluşturulur.	Yara iyileşmesinin tüm aşamaları gözlenir.	Enfeksiyon riski yüksektir. Yara iyileşmesine bu açıdan etki edebilir.
İnsizyonel yara modeli	Deri altındaki dokuları dahil etmeden deriye yüzeysel bir kesi atılır.	Epitelizasyonu incelemek için önerilir.	Kesiye bağlı olarak yara iyileşmesi farklılık gösterebilir. Kesinin standardize edilmesi şarttır.
Delme modeli	Deride tam kat derin bir yara oluşturulur.	Granülasyon dokusu oluşumu ve kasılma özelliklerinin takibi için kullanılır.	Yaranın aşırı gergin olması iyileşmeyi etkiler.
Yanık yara modeli	Deriye uygulanan termal uygulamalar sonucunda oluşturulur.	Yanıkla ilgili modellemelerin ve ilaç uygulamalarının yapıp iyileşmenin takibine imkan tanır.	Enfeksiyon riski vardır.
Eksizyonel yara modeli	Deride çapı belirli olan derinliği de ayarlanabilen bir yara oluşturulur.	Granülasyon dokusunun incelenmesi için önemlidir. Epitelizasyonda izlenir.	Uzun süreli veri elde edilmesi açısından kısıtlılığı vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma için etik kurul onayı, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 22/20 sayılı kararı ile 30/05/2022 tarihindeki toplantıda alınmıştır. Bu araştırma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje No: DA22/21) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

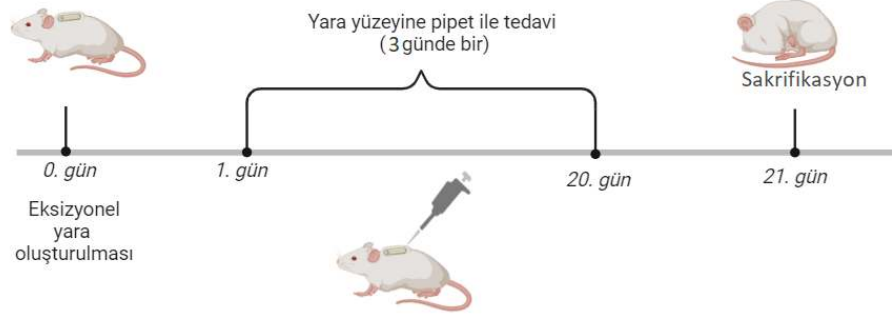
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

200-250 g ağırlığında ve yaşları altı ila sekiz ay arası yetişkin, 40 erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanılmıştır ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde sabit nem ve sıcaklık koşullarında tutulmuştur. Standart yem ile beslenmişler ve suya serbest bir şekilde ulaşabilmiştir. Cerrahi operasyon öncesi Xylazine (10 mg/kg) (Richter Pharma AG, Austria) ve ketamin (50 mg/kg) (Richter Pharma AG) anestezi için kullanılmıştır.

Deney boyunca açık kalacak yaralar üzerinde gruplara göre aşağıda tanımlanan uygulamalar aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Kontrol grubu (n=8) (K): Sadece cerrahi insizyon ile açılmış açık yaraların iyileşme süreci izlenmiştir.
2. DMSO grubu (n=8) (D): Cerrahi insizyon ile açılmış açık yaraya DMSO solüsyon sürülerek iyileşme süreci izlenmiştir.
3. Serum grubu (n=8) (S): Cerrahi insizyon ile açılmış açık yaraya serum uygulanarak iyileşme süreci izlenmiştir.
4. Timokinon grubu (n=8) (T): Cerrahi insizyon ile açılmış açık yaraya timokinon solüsyonu sürülerek iyileşme süreci izlenmiştir.
5. Timokinon+ Serum grubu (n=8) (TS): Cerrahi insizyon ile açılmış açık yaraya timokinon solüsyonu ve serum birlikte uygulanarak iyileşme süreci izlenmiştir (13, 90, 94, 95).

Tüm deney hayvanları 21. gün sonunda yüksek doz Xylazine (10 mg/kg) (Richter Pharma AG, Austria) ve ketamin (50 mg/kg) (Richter Pharma AG) uygulanması sonrasında dekapite edilmiştir.



Şekil 3.1. Deney planı şeması (52, 96) (BioRender.com ile oluşturuldu).

3.2. Timokinonun Hazırlanışı

Araştırmada ticari olarak satın alınacak timokinon etken maddesi (2-izopropil-5-metilbenzokinon) (Sigma-Aldrich Cat. No 274666) kullanılmıştır. 500 mg TQ'nun 100 ml Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmesiyle %0.5'lik topikal solüsyon hazırlanmış ve ardından hazırlanmış olan bu solüsyon 2 mg/kg dozunda deney hayvanlarına uygulanmıştır (4, 11, 97).

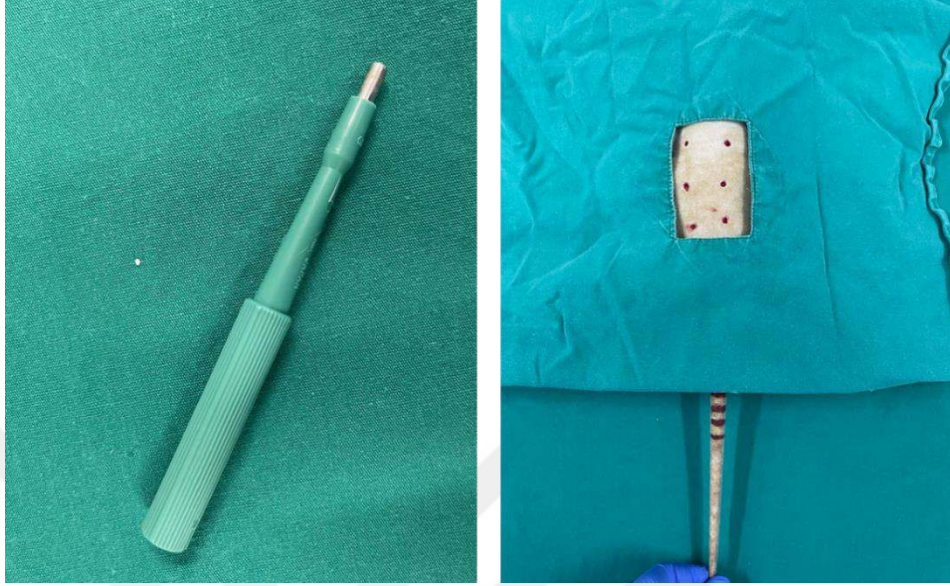
3.3. Serumun Hazırlanması

Araştırmada kullanılacak serum deney hayvanlarının kuyruğundan alınmış 500 µl kandan elde edilmiştir. Alınan kan kırmızı kapaklı tüplerde toplanmıştır. Tam kan alındıktan sonra, oda sıcaklığında 15-20 dk. süre ile kanın pıhtılaşması sağlanmıştır. Ardından 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (NF 415). Santrifüj sonrası elde edilen serum Pasteur pipeti kullanılarak temiz bir polipropilen tüpe aktarılmıştır. Numuneler deney süresince 2–8°C'de muhafaza edilmiştir. Serum uygulamadan hemen önce timokinon solüsyonunun içine 250 µl olacak şekilde eklenmiştir.

3.4. Eksizyonel Yara Modelinin Oluşturulması

Sıçanlara aseptik koşullar altında ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg,) intraperitoneal anestezi uygulaması yapılmıştır. Sıçanlar ameliyat masasına yatırılarak iki omuz arası sırt bölgesindeki kıllar tamamen tıraş edilmiştir. Deride epidermis, dermis ve

hipodermisten oluşan tam kalınlıkta punch biyopsi ile 3 mm çapında dairesel eksizyon yarası açılmıştır. Ameliyat günü 0. gün olarak kabul edilmiştir (11).



şekil 3.2. Sıçanlarda yara modelinin oluşturulması.

Yara oluşturulduktan 24. saat sonrasında 21 gün boyunca yara bölgesi gözlenmiştir. Deney gruplarında yara yüzeyine yapılan ilgili uygulamalar 3 günde bir kez pipetle yapılmıştır (şekil 3.3).

Tedavi uygulanmadan önce yara yüzeyleri ayrı ayrı fizyolojik serumlu tampon ile yavaş ve yakından temizlenmiştir. Araştırma boyunca yaralar çıplak bırakılmış ve 21 gün sonuna kadar 0., 7., 14., 21. günde kadar fotoğraflanarak yara iyileşmesi gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Timokinon ve serum bileşiğinin yara yüzeyine uygulanması.

3.5. Doku Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması

Deney sonu sıçanlara ketamin (50 mg/kg, ip) ve Xylazine (10 mg/kg) kullanılarak ötenazi gerçekleştirilmiş, dokular toplanmıştır. Toplanan örnekler %10 formalin içinde fikse edilmiş ve rutin histopatolojik doku incelemesine tabi tutulmuştur.

4 mikron kalınlığında kesitler alınmış ve örnekler hematoksilin-eozin (H&E), Masson's trikrom ile boyanarak ışık mikroskopunda (Leica DM 3000) incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Zeiss, Axicom 506 color).

3.6. Doku takibi ve Histokimyasal Yöntemler

Histolojik boyamaların yapılabilmesi için ilk olarak dokular rutin histolojik takip için %10 formaldehit (Birpa) içerisinde fikse edilmiştir. 72 saat süren fiksasyon sonrasında doku takibi aşamasına geçilmiştir. Doku takibi için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

1. %50 alkol içerisinde 30 dakika
2. %60 alkol içerisinde 30 dakika

3. %70 alkol içerisinde 30 dakika
4. %80 alkol içerisinde 30 dakika
5. %96 alkol içerisinde 30 dakika
6. %100 alkol içerisinde 1 saat
7. %100 alkol içerisinde 1 saat
8. %50 alkol+%50 ksilol karışımı içerisinde 30 dakika
9. Ksilol-I içerisinde 20 dakika
10. Ksilol-II içerisinde 25 dakika
11. %50 ksilol +%50 parafin karışımı içerisinde 30 dakika
12. Parafin-I içerisinde 15 dakika yıkama
13. Parafin-II içerisinde 15 dakika yıkama
14. Parafin-III içerisinde 60 °C etüvde 2-3 saat inkübasyon
- 15- Parafin bloklara gömme aşamasından sonra soğutulan bloklar +4 °C buzdolabında saklanmıştır.

Parafin bloklara gömülü dokularda kesitler mikrotom (Leica, SM2000R) aracılığıyla alınmıştır. Kalınlığı 4 mikron olacak şekilde alınan kesitler 46.6°C su banyosuna aktarılmıştır. Ardından lam üzerine alınan kesitler 60°C etüv içerisine alınmış ve deparafinizasyon gece boyu yapılmıştır. Deparafinize olan doku kesitleri histokimyasal boyamalar için ayrılmıştır.

Histolojik skora; re-epitelizasyon, granülasyon dokusunun durumu ve kollajen liflerinin dağılım/organizasyonu değerlendirilerek yapılmıştır. Histolojik skora için değerlendirme Tablo 3.1’de yer alan özellikler kullanılmıştır (98).

Tablo 3.1. Morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi için kullanılan skarlama

Skor	Re-epitelizasyon	Granülasyon Dokusu	Kollajen
0	Az / bölgesel	Az	Yok
1	Göç eden	Hücre yoğunluğu az/damar yok	Belirsiz
2	Kısmi	Hücre yoğunluğu çok/ birkaç damar	Az yoğunlukta
3	Hipertrofik / kısmi stratum Korneum	Çok sayıda fibroblast/lif yoğunluğu az /artan damar	Orta yoğunlukta
4	Tamamen	lif yoğunluğu fazla/ hücre yoğunluğu az/organize damarlanma	Belirgin

3.6.1. Hematoksilen-Eozin boyama ile yara dokusunun değerlendirilmesi

Kesitleri alınan ve 60°C’de deparafinizasyonu yapılan dokular Hematoksilen-Eozin (HE) boyama ile görüntülenmiştir. HE boyama için izlenen protokol adımları:

1. Ksilen 15 dakika X3 kez bekletme
2. Ksilene konan asansörün dışarıda bekletilerek ksilenin uçurulması
3. %96 alkol 10 dakika X2 kez, % 80 alkol 10 dakika X1 kez bekletilme
4. Çeşme suyu ile yıkama yapılması
5. Önceden süzölmüş hematoksilen boyada 15 dakika bekletilmesi
6. Çeşme suyunda yıkama yapılması
7. Asit alkol X2 kez batırıp çıkartılması
8. Çeşme suyu ile 2-3 kez yıkama yapılması
9. Amonyaklı su X2 kez batırıp çıkartılması
10. Çeşme suyu ile 2-3 kez yıkama yapılması
11. Eozin boyasında 1 dakika bekletilmesi
12. %80 alkol 1 kez, %96 alkol 2 kez batırıp çıkartılması
13. Dışarıya çıkartılan asansörün kurummasının beklenmesi ve asansörün ksilende en az 45 dakika bekletilmesi
14. Entellan kullanılarak lam ile preparatların kapatılması

Bu basamaklar sonucunda hazırlanan preparatlarda boyanın gerektirdiği şekilde çekirdeklerin mavi-mor renkte boyandığı ve sitoplazmanın kırmızıya renkte boyandığı mikroskop altında görülmüştür.

Histolojik değerlendirmede H&E boyama ile epidermin kalınlığı, Image J görüntüleme analiz programı (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) kullanılarak ölçülmüştür. Histolojik skorlamada ise re-epitelizasyon H&E boyama ile değerlendirilmiştir.

3.6.2. Masson's Trikrom boyama ile yara dokusunun değerlendirilmesi

Kesitleri alınan ve 60°C'de deparafinizasyonu yapılan dokular özellikle derinin dermis tabakasındaki bağ dokusunun kollajen liflerinin, derinlerde kas dokusunun ve epitelin ayırt edilmesi için Masson's Trikrom boyama (Bio-optica, 04-011802) yapılmıştır. Masson's Trikrom boyama için izlenen protokol adımları:

1. Kesitlerin üzerine Weigert's demirli hematoksilin damlatılıp 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
2. Slaytlar yıkanmaksızın üzerlerinden boya akıtılmış ve kesitlerin üzerine pikrik asit solüsyonu damlatılarak 4 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Distile su ile X2 kez yıkanma yapılmıştır.
4. Kesitlerin üzerine Ponceau asit fuksin damlatılmıştır ve 4 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
5. Distile su ile X2 kez yıkanma yapılmıştır.
6. Kesitlerin üzerine fosfomolibdik asit solüsyonu damlatılmıştır ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
7. Yıkama yapılmaksızın fosfomolibdik asit solüsyonu akıtılmış ve kesitlerin üzerine Light green boya solüsyonu damlatılmıştır ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
8. Distile su ile X2 kez yıkanma yapılmıştır.
9. Dokular artan alkol serisinden (% 80, %96 ve %100) geçirilmiştir.
10. Kesitler ksilen içerisinde 45 dakika tutulduktan sonra entellan ile kapatılmıştır.

Masson's Trikom boyama sonucunda sitoplazma, kas lifleri, keratin kırmızı renkte; kollajen lifler yeşil, eritrositler sarı renkte gözlenmiştir.

Histolojik skorlamada granülasyon dokusunun durumu değerlendirilmiştir. Bunun için, granülasyon dokusundaki kollajen liflerinin dağılım/organizasyonu, hücresel yoğunluk ve kan damarlarının dağılımı incelenmiştir. Yara bölgesinde uzunluk ölçümü yapılmıştır. Ölçüm, yara bölgesi granülasyon dokusunun olduğu alandan kollajen liflerin belirgin olarak ayırt edildiği sınırlara kadar yapılmıştır. Ölçümler, Image J görüntüleme analiz programı (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Araştırma için gerekli minimum örnek genişliği %80 test gücünü %95 güven düzeyinde sağlayacak şekilde:

“Tek Yönlü Varyans Analizi” için etki genişliği $f=0.673$, üç deney ve bir kontrol grubu olmak üzere her grupta 8 sıçan olacak biçimde toplam 32 sıçan kullanılmıştır.

Araştırmanın değişkenleri serum, timokinondur.

H0: Serumla birlikte timokinon uygulanmasının sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkisi yoktur.

H1: Serumla birlikte timokinon uygulanmasının sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkisi vardır.

Veri Toplama Araçlarında araştırmada tanımlayıcı istatistik olarak; kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde frekans (n) ve yüzde (%) değerleri kullanılmıştır.

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS versiyon 29.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ve grafiklerin oluşturulmasında Python 3.8 programları kullanılmıştır. Her tedavi grubu için tam sayı değerli re-epitelizasyon, granülasyon dokusu oluşumu, kollajen durumu hem ortalama $\pm$ standart sapma hem de medyan ve minimum-maksimum değerleri ile verilmiştir. Gruplar arası farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis H test ile kritik p değerini 0.05 alarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası anlamlı bir fark olduğunu gösterdikten sonra

Posthoc test olarak tedavileri karşılıklı karşılaştırmak için Tamhane testi uygulanmıştır ve anlamlı ($p<0.05$) şekilde farklı olan gruplar sunulmuştur.

Epitel uzunluğu ölçümü ve yara derinliği ölçümü ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde tüm gruplar için sunarak Shapiro-Wilk testi ile normallik ve Levene testi ile homojen varyans testleri gerçekleştirilmiştir. Gerekli şartların sağlandığını göstererek gruplar arası farklılığı göstermek için tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. ANOVA testinde gruplar arası farklılık gözlemlediğimizde ($p<0.05$), grupları karşılıklı karşılaştırmak için Tukey testi uygulanmış ve anlamlı şekilde farklı olan tedavi grupları gösterilmiştir.

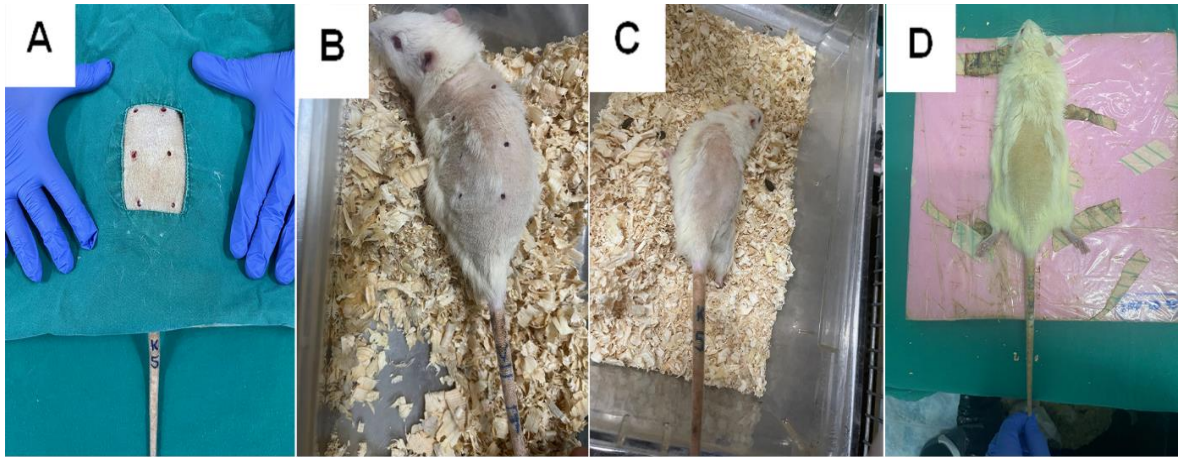


4. BULGULAR

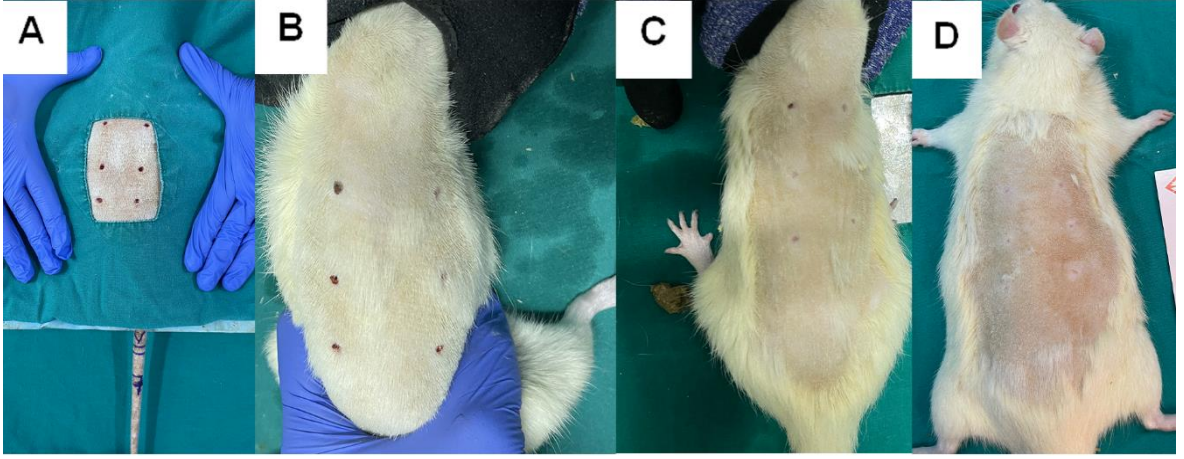
4.1. Deney Hayvanlarının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Deney gruplarının oluşturulması için rastgele seçilen deney hayvanlarına (n=8) kontrol grubu hariç 21 gün süre boyunca ilgili uygulamalar yapılmıştır. Deneyin 0., 7., 14., ve 21. günlerinde fotoğraflamalar yapılarak sırtta oluşturulan eksizyonel yaraların kapanması, kılların tekrar oluşumu, derinin düzgün kasılması gibi parametreler izlenmiştir.

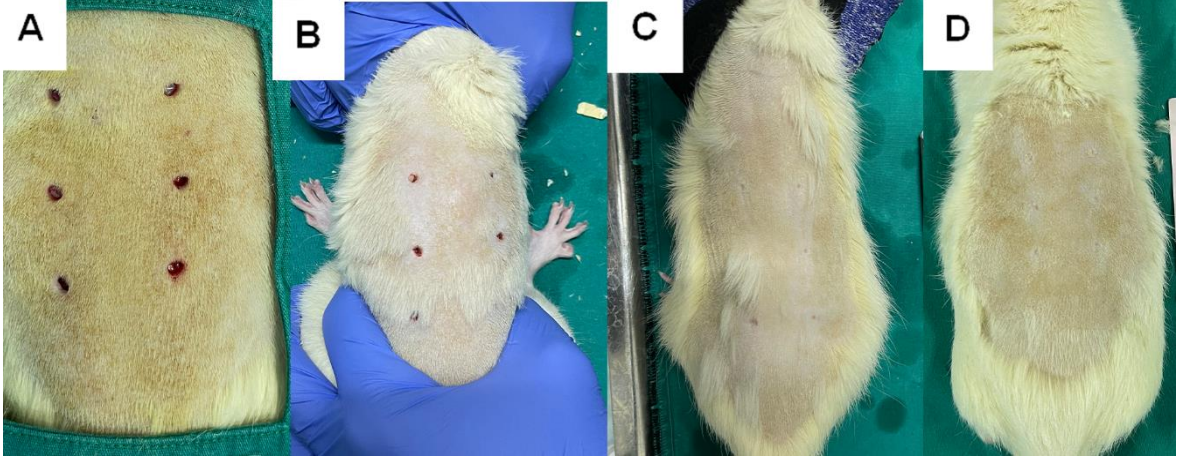
K grubu (Şekil 4.1) ve deney gruplarında 21. günün sonunda yara oluşturulan bölgede nekrotik doku varlığı, enfeksiyon durumu, anormal skar oluşumu görülmemiştir. D grubu (Şekil 4.2), K grubu ve T grubu (şekil 4.3) 7. günde benzer kapanmalar sergilemiştir. 7. günde K grubunda S grubu (Şekil 4.4), TS grubuna göre (Şekil 4.5) eksizyonel yaraların kapanmasının yavaş olduğu gözlemlenmiştir. 14. günde T, S ve TS gruplarında kapanmanın hızlandığı görülmüştür. K ve D gruplarında ise sırttaki kılların oluşumu artsa da, yara kapanmasının aynı hızda olmadığı görülmüştür. 21. günde T, S ve TS gruplarında yara kapanmasının olduğu ve buna kıllanmanın da eşlik ettiği görülmüştür. DMSO grubundaki kapanmanın ve K grubundaki yara kapanmasının diğer tüm gruplara göre daha az olduğu gözlemlenmiştir.



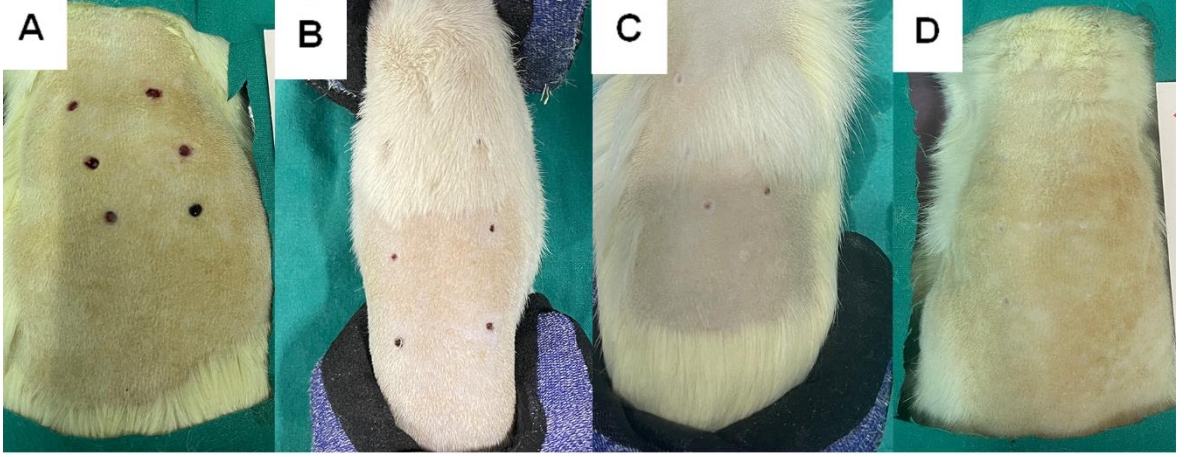
Şekil 4.1. Kontrol grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün ve sakrifikasyon.



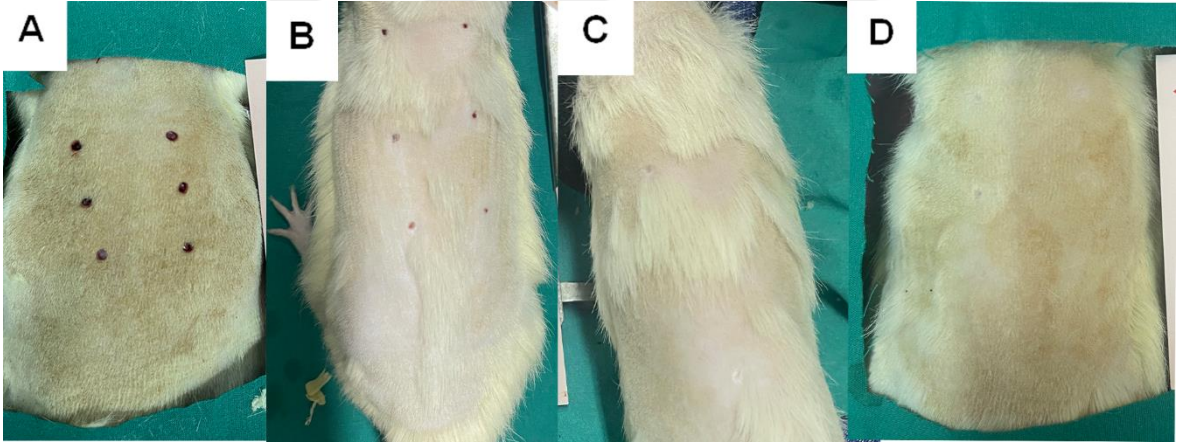
Şekil 4.2. DMSO grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün ve sakrifikasyon.



Şekil 4.3. Timokinin grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün sakrifikasyon.



Şekil 4.4. Serum grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün ve sakrifikasyon.



Şekil 4.5. Timokinon+serum grubunun fotoğraflanması; A: 0.gün uygulama, B: 7.gün, C: 14.gün, D: 21.gün sakrifikasyon.

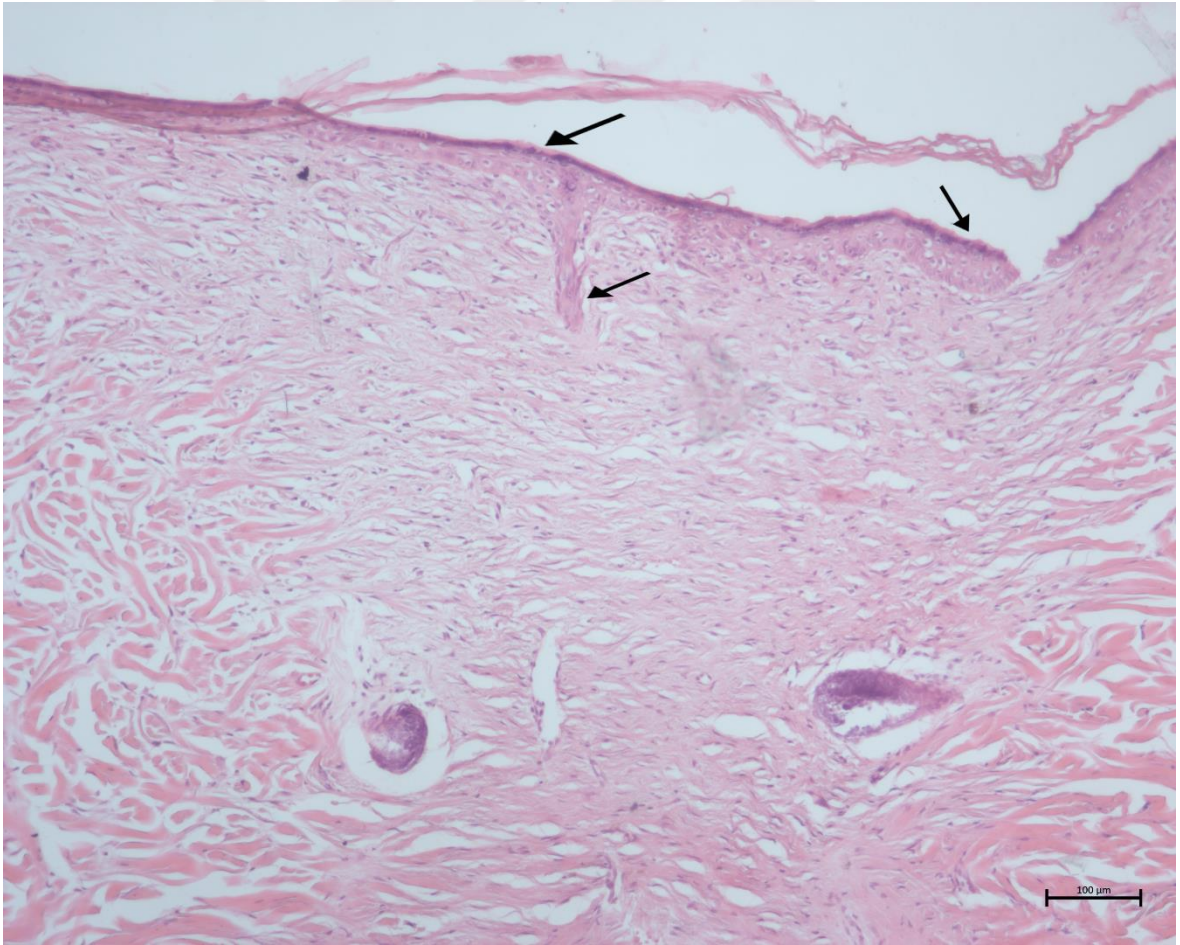
4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama ile Yara Dokusunun Değerlendirilmesi

Hematoksilen Eozin boyama ile epidermin kalınlığı, yara dokusu bölgesinde granülasyon dokusunun derinliğinin ölçümü ve histolojik skorlama için re-epitelizasyon değerlendirilmesi yapılmıştır.

Epitelizasyon değerlendirmesinde epitelin yara bölgesindeki yüzeyi kapatma durumu ve epidermin tabakalarının belirginliği skorlama yapılırken kullanılmıştır. Epitel yama şeklinde veya hiç yoksa az/bölgesel olarak değerlendirilmiştir. Bu durum, skorlamada “0”

değerini almıştır. Epitelde yara sınırlarında göç varsa değerlendirme göç/ bölgesel olarak tanımlanmıştır ve skorlamada “1” değerini almıştır. Epitelde kısmi bir oluşum varsa kısmi olarak tanımlanmıştır. Skorlamada “2” değerini almıştır. Epidermisteki hücrelerde şişme varsa ve tabakalar oluşmasına rağmen düzenli değilse epidermis henüz tam iyileşme göstermediği için skorlamada “3” değerini almıştır. Epitel tabakası tamamen yara yüzeyini örtmüş ve epidermis tabakaları tamamen düzenli ve ayırt edilebilir şekildeyse değerlendirmede bu durum re-epitelizasyonun tamamlandığı şeklinde yorumlanmış ve skorlamada “4” değerini almıştır (EK-2) (98).

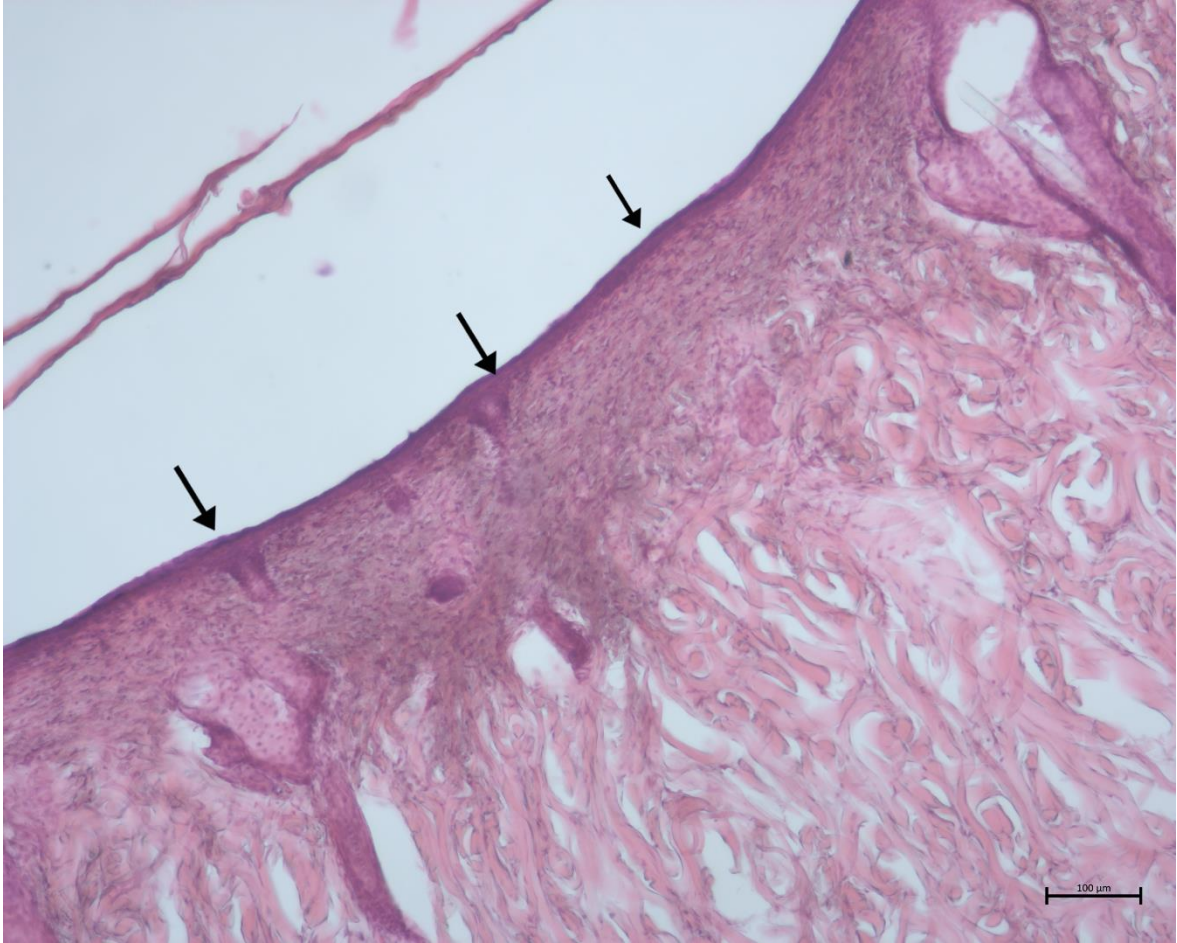
K grubunda re-epitelizasyon değerlendirildiğinde, epidermiste kalınlaşmalar olsa dahi genel görünümünün hipertrofik olduğu, epidermisin tabakalarının net olarak ayırt edilemediği görülmüştür. Keratinizasyonun tam olarak ayırt edilemediği tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. K grubunda epidermisin organizasyonu (ok). Epidermisin yüzeyinde kısmi tamamlanma ve epidermis organizasyonunun tam olarak sağlanamaması (X100)

K grubu epitelizasyonu değerlendirilmesi sonucunda ortalama olarak 1.62 ± 0.74 (2, 0-2) değerini almıştır. Kontrol grubu epidermis kalınlığı ölçüldüğünde ise gruplar arasındaki en az değerin K grubunda olduğu görülmüştür (1.902 ± 0.673).

D grubu incelendiğinde, epidermisin bütünlüğünün kontrol grubuna göre daha iyi kurulduğu ve epidermisin en üst yüzeyinde ince bir keratin tabakası olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7).

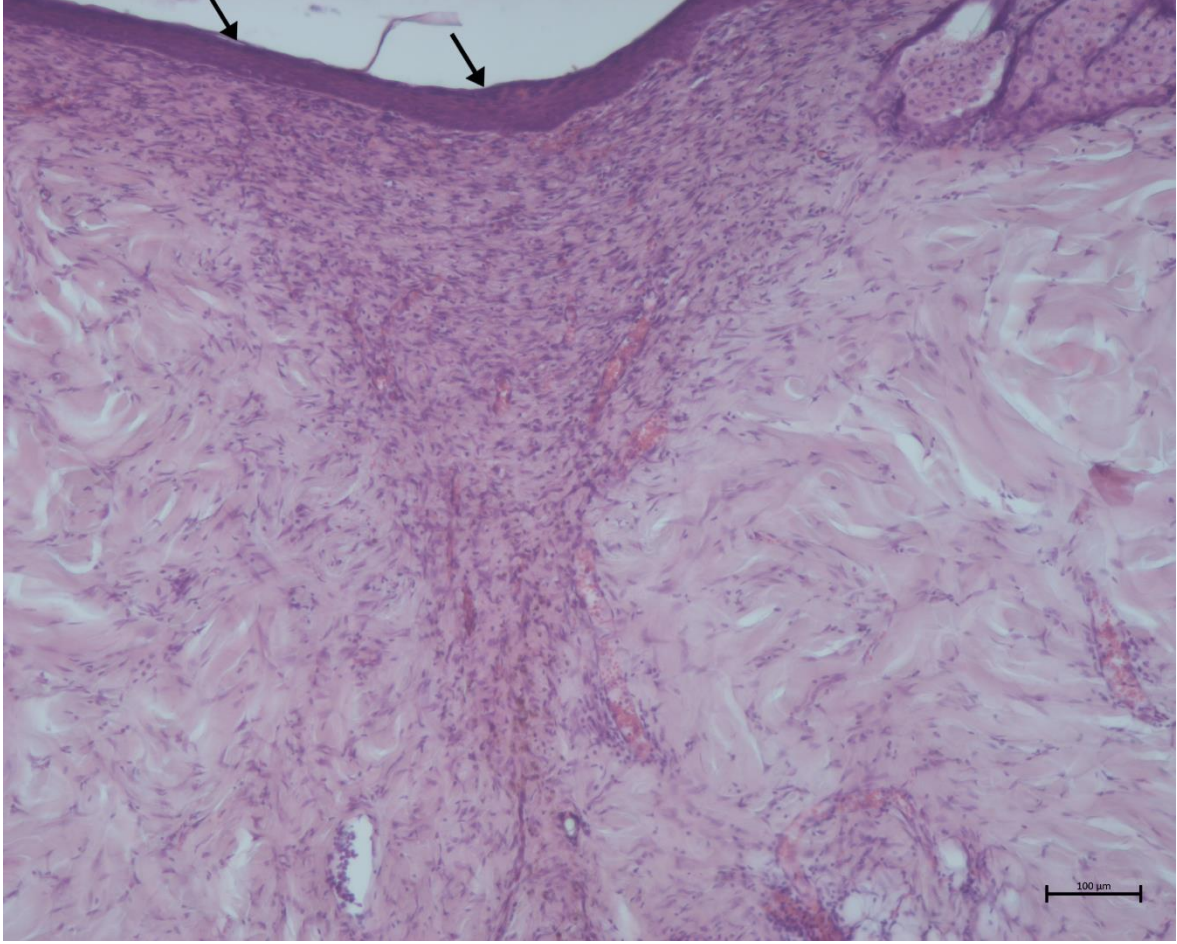


Şekil 4.7. D grubunda epidermisin organizasyonu (ok, X100).

Histolojik skorumla açısından D grubu epitelizasyonda ortalama 2.25 ± 0.71 (2,1-3) değerini almıştır. D grubundaki ortalama epitel uzunluk ölçümü ise 2.586 ± 0.910 olarak bulunmuştur.

Timokinon uygulaması sonucunda epitelizasyon neredeyse grubun tamamında yeniden sağlanmıştır ve epidermisin organizasyonun kurulduğu, hücrelerin bazaldan

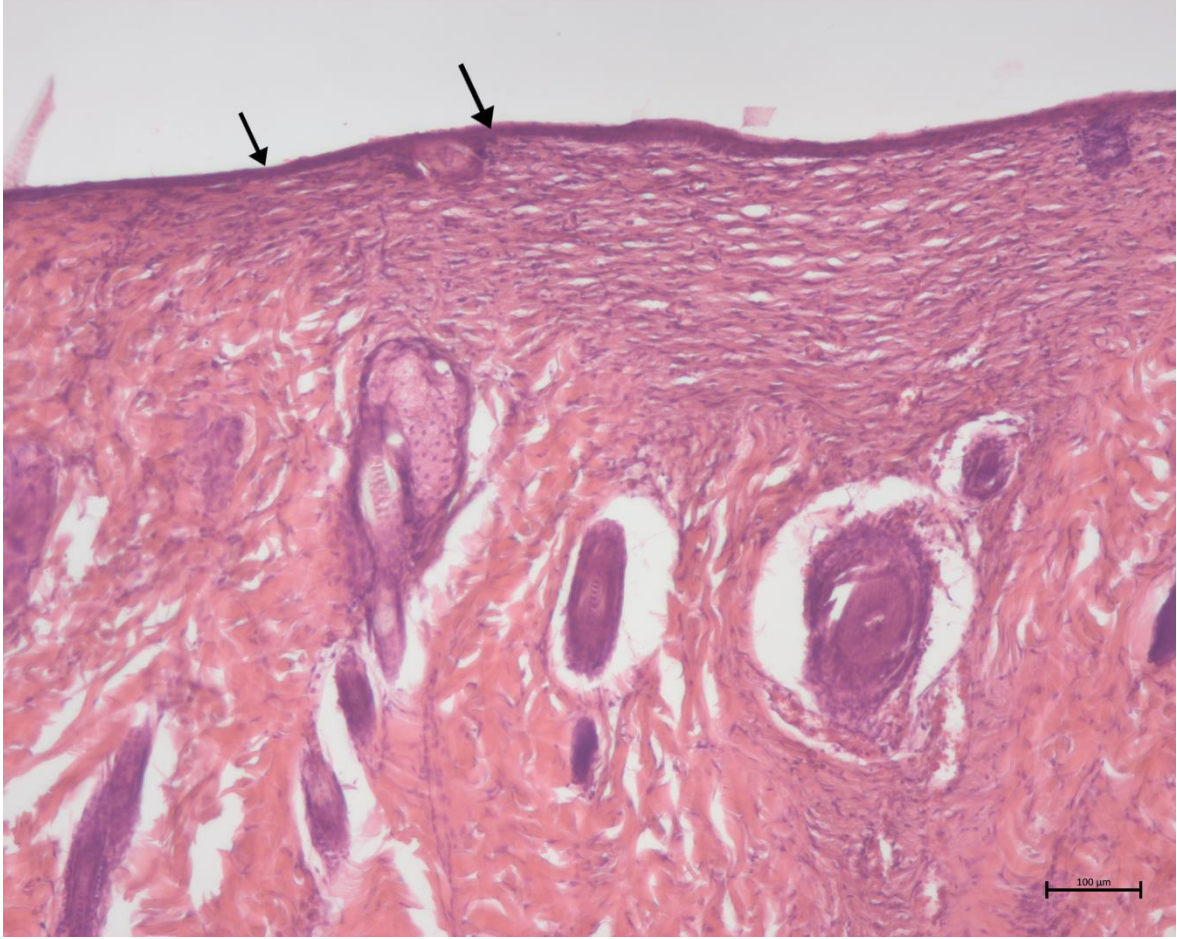
epidermsin üst katmanına doğru yassılaştığı görülmüştür. Keratinleşmenin diğer gruplara göre daha net ayırt edildiği gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. T grubunda epidermsin organizasyonu (ok). Bazalden epidermsin yüzeyine doğru hücrelerin yassılaşılarak gösterimi ve keratinizasyonun ayırt edilmesi (X100).

Timokinon epitelizasyonu histolojik skorum değeri ortalaması 3.25 ± 0.46 (3,3-4) olarak bulunmuştur. Epitelizasyon skoru ortalama değeri diğer gruplara göre en yüksek değeri almıştır ve kontrol, DMSO, serum ve serum+timokinon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla; $p < 0.001$, $p = 0.008$, $p = 0.003$ ve $p = 0.041$). Timokinon epidermsin uzunluk ölçümü verilerinde de en yüksek değeri almıştır (4.072 ± 0.779) ve bu değer; kontrol, DMSO, serum ve serum+timokinon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla; $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.001$ ve $p = 0.001$).

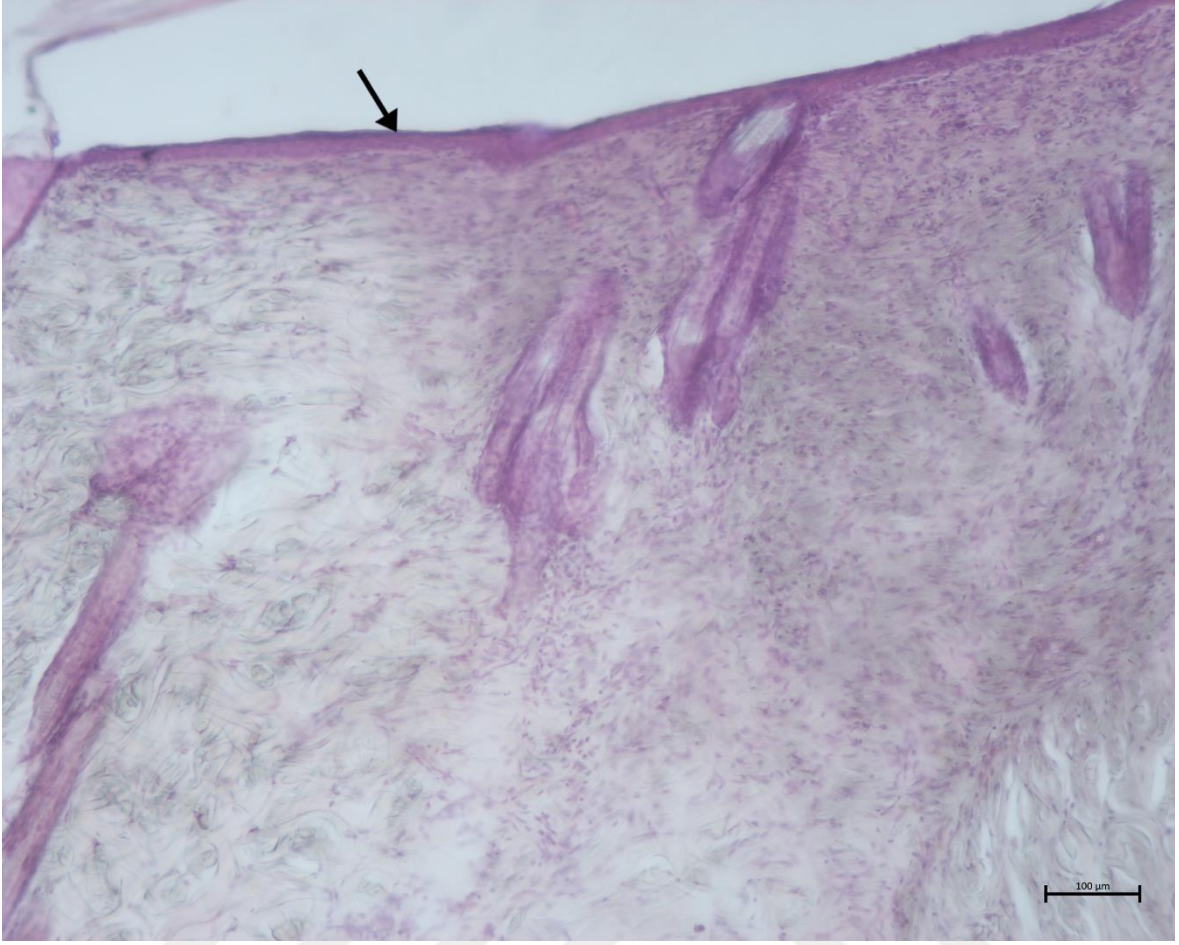
Serum uygulaması sonucunda epiderminin TS grubu ile benzer kalınlıkta olduğu görölmüştür. Epiderminin yüzeysel olarak bütünlük sağlamasına rağmen; tabakalarının net olarak ayırt edilemediği görölmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. S grubunda epiderminin organizasyonu (ok, X100).

Serum grubunun epitelizasyon açısından değerlendirildiğinde histolojik skorlama değeri ortalama 2.25 ± 0.46 (2,2-3) bulunmuştur. Epiderminin uzunluk ortalaması ise 2.532 ± 0.827 TS grubundan yüksek (2.174 ± 0.922); ancak timokinon grubundan (4.072 ± 0.779) düşük ölçölmüştür.

TS grubunda epitelizasyon gözlemleri serum grubuyla benzer bulunmuştur. TS grubunda epiderminin ileri tabakalarının net olarak ayırt edilemediği; ancak bazaldeki hücrelerin ayırt edildiği gözlenmiştir. Aynı şekilde keratinizasyonun da net olarak ayırt edilmediği görölmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. TS grubunda epidermin organizasyonu (ok, X100).

TS grubu epitelizasyonun histolojik değerlendirilmesi sonucunda ortalama olarak 2.50 ± 0.76 (3,1-3) değerini almıştır. Ayrıca uzunluk ölçümü sonucunda 2.174 ± 0.922 ortalama değerini almıştır.

4.3. Masson's Trikrom boyama ile yara dokusunun değerlendirilmesi

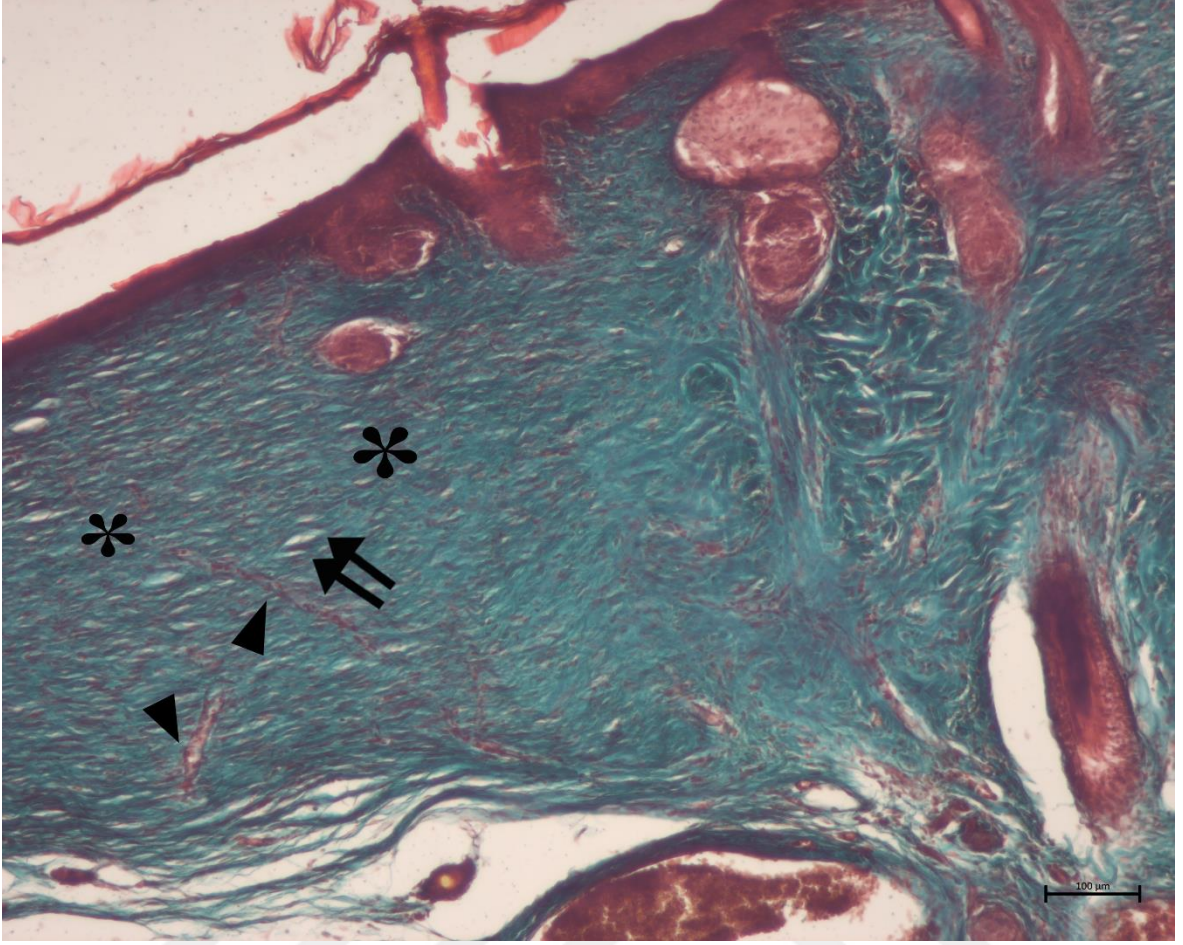
Histolojik skorlamada granülasyon dokusunun durumu ve kollajen liflerinin dağılım/organizasyonu ve granülasyon dokusunda kan damarlarının dağılımı Masson's Trikrom boyama ile değerlendirilerek yapılmıştır.

Granülasyon dokusu az olarak değerlendirildiğinde skorlamada "0" değerini almıştır. Granülasyon bölgesinde az sayıda lif varlığı, damarın olmaması ve hücrelerin az gözlenmesi skorlamada "1" değerini almıştır. Granülasyon dokusu yoğun, lif ve damar açısından daha

az yoğunsa skorlamada “2” değerini almıştır. Granülasyon dokusunda çok sayıda fibroblast, lif ve damar sayısı artmış ise skorlamada “3” değerini almıştır. Granülasyon dokusunun skar dokusuna doğru dönüşmesi ile azalan hücre ve çoğalan lif miktarı skorlamada “4” değerini almıştır (EK 2) (98).

Kollajen liflerin durumu granülasyon dokusunda değerlendirilmiştir. Kollajen liflerin varlığının granülasyon bölgesinde olmaması skorlamada “0” değerini almıştır. Kollajen lif varlığının kademeli olarak bir miktar artış göstermesi skorlamada sırasıyla “1” ve “2” değerini almıştır. Kollajen liflerin artışı ve net şekilde demetler halinde organize olması durumunda skorlamada “3” değerini almıştır. Kollajen liflerin uzunlamasına ve epidermise paralel olarak uzanan şekilde organize olarak granülasyon dokusunda artış göstermesi ve hücresel yoğunluğun azalması ise skorlamada “4” değerini almıştır. Kollajen durumu skorlamasında özellikle yara iyileşme yatağının etrafında olan kollajen liflerin durumu göz önüne alınarak değerlendirme yapılmıştır (EK 2) (98).

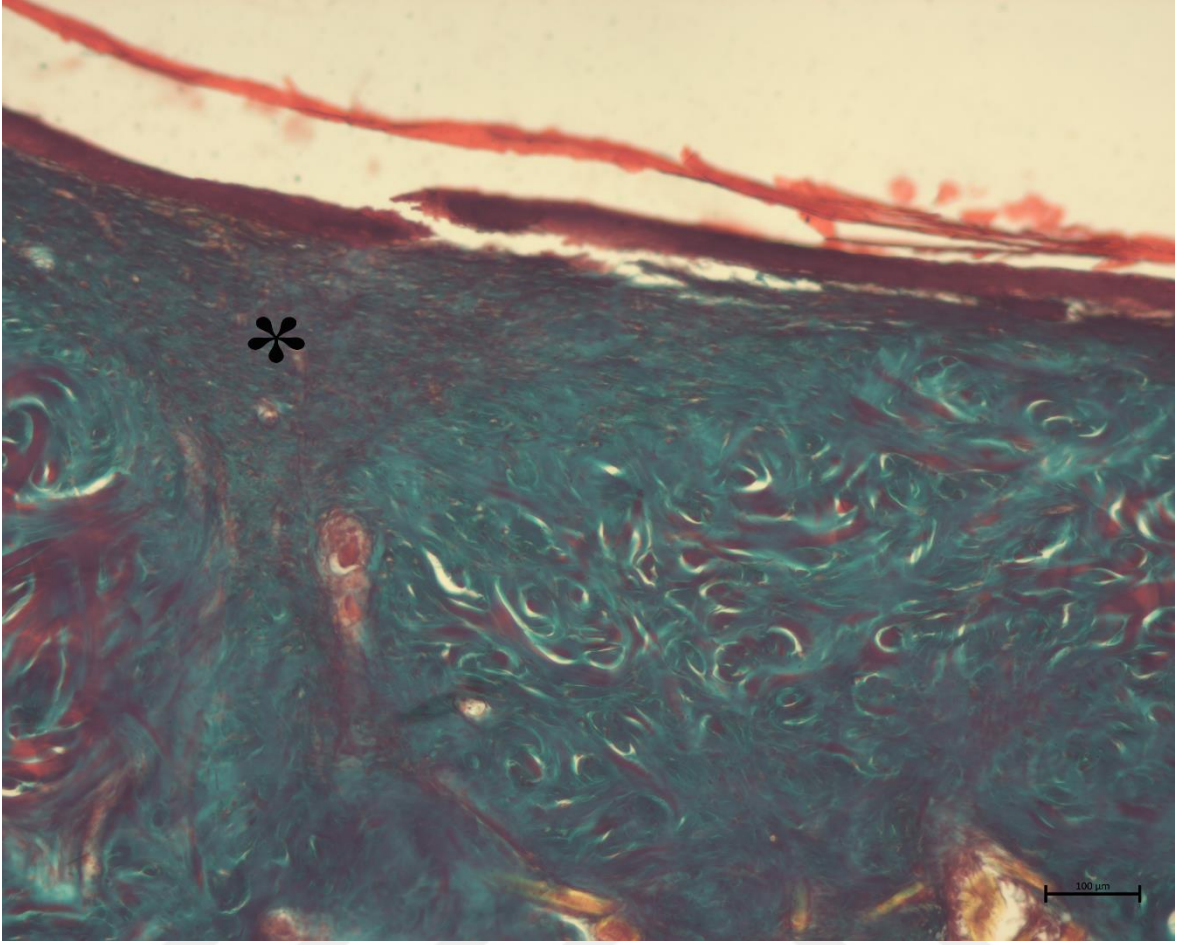
Kontrol grubunda granülasyon dokusunun varlığı ve kollajenin durumuna göre yapılan değerlendirmede granülasyon dokusunda hücresel yoğunluğun fazla, damarların ayırt edilemediği ve kollajen lif organizasyonunun az olduğu görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.111. K grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi. Granülasyon dokusunda hücresel artış (yıldız) ve az sayıda damar oluşumu (çift ok) görülmüştür. Kollajen liflerin organizasyonu düzensiz ve azdır (ok başı) (X100).

Histolojik skorlamada kontrol grubu granülasyon dokusu 1.75 ± 0.46 (2, 1-2) değerini almıştır. Bunun sebebi özellikle hücresel yoğunluğun fazla olmasıdır. Kollajen açısından ise 2.12 ± 0.83 (2,1-3) değerini almıştır. Yara bölgesinin uzunluğu ölçüldüğünde ise kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla en yüksek değerin kontrol grubunda olduğu görülmüştür (3.7 ± 0.922).

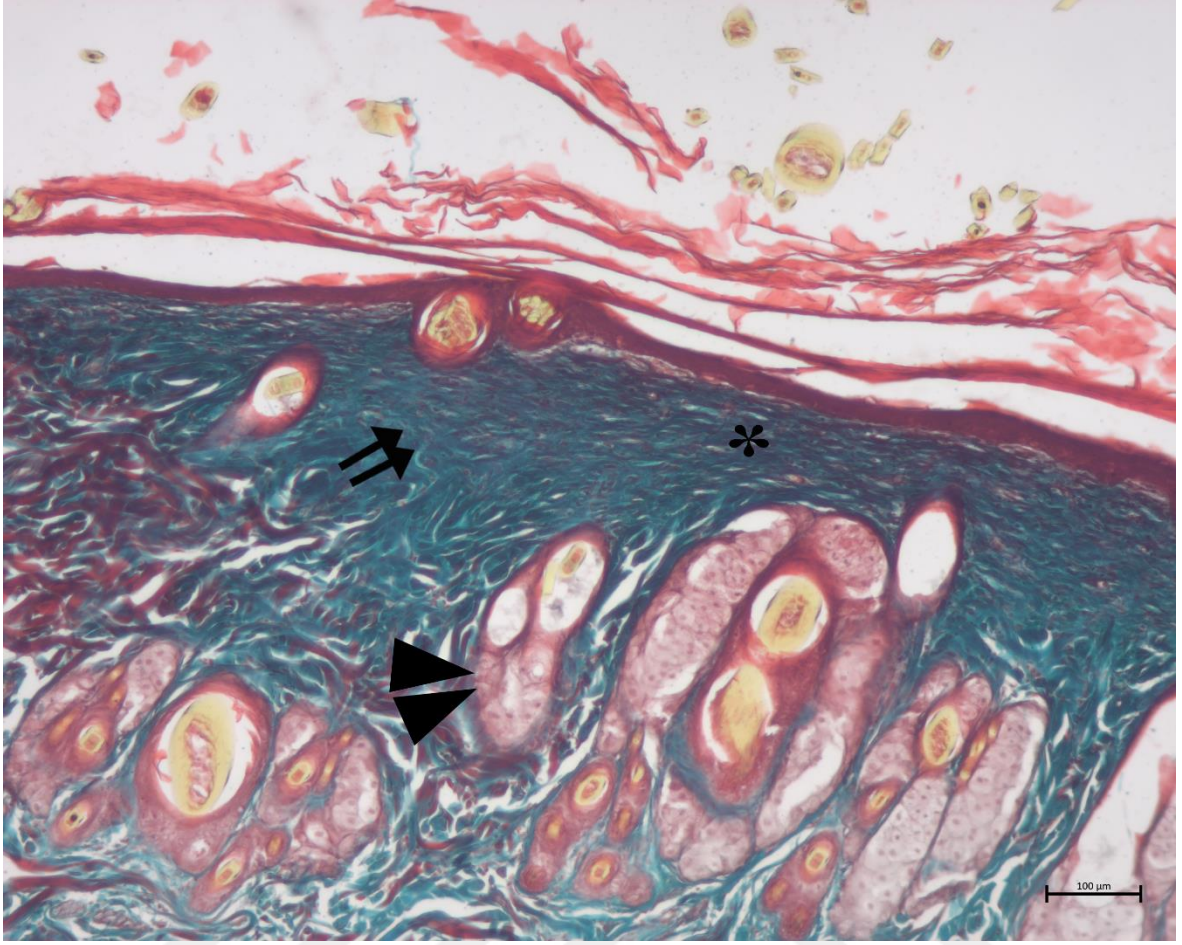
D grubu incelendiğinde kontrol grubuna benzer şekilde granülasyon dokusunda hücresel yoğunluk ve kollajen liflerin düzensizliği dikkat çekici olmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. D grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi. Granülasyon dokusunda hücresel artış (yıldız) (X100).

D grubu ortalama granülasyon skoru ve kollajen için sırasıyla 2.38 ± 0.52 (2,2-3) ve 2.00 ± 0.53 (2,1-3) değerlerini almıştır. Yara bölgesindeki ölçüm ortalaması sonucu 3.504 ± 0.922 olarak bulunmuştur.

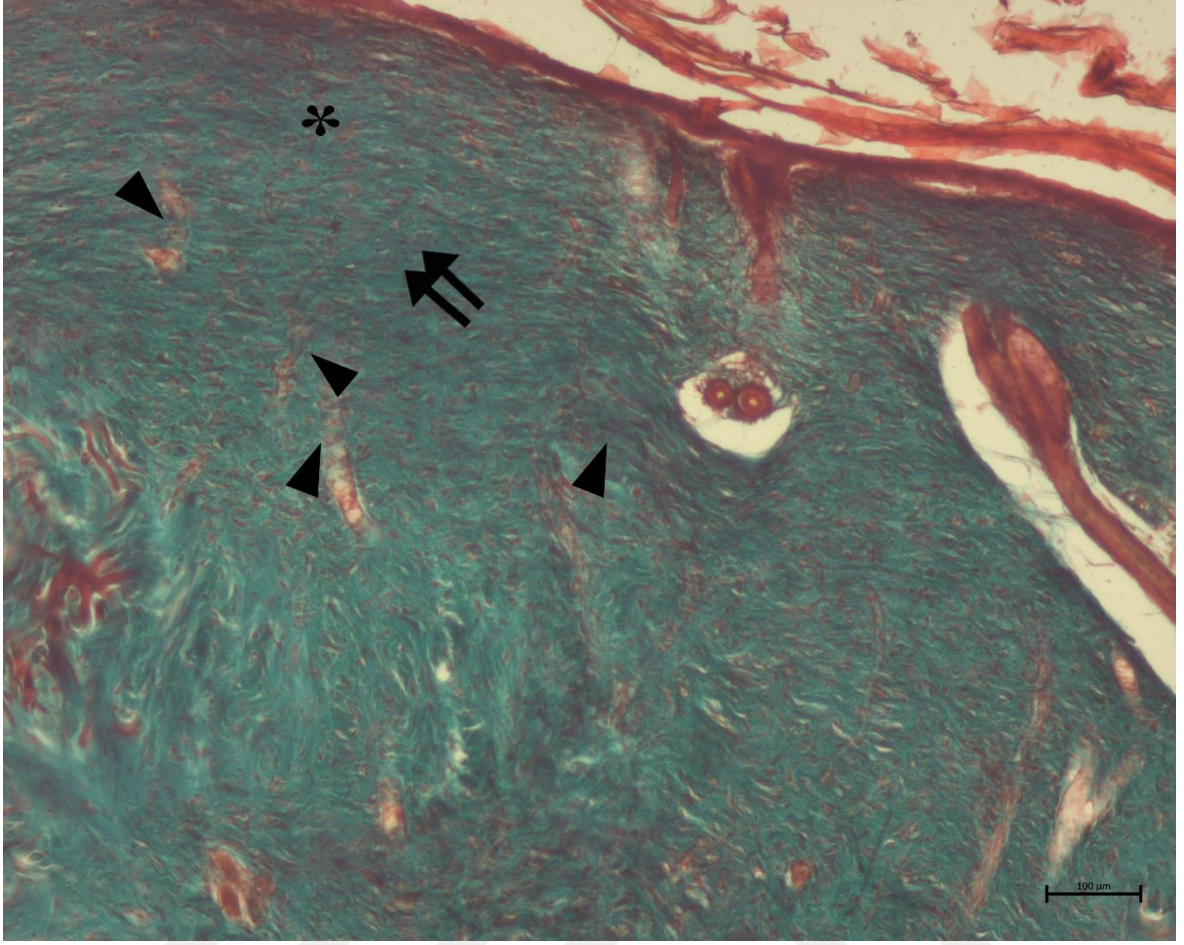
Timokinon grubunda granülasyon dokusu değerlendirildiğinde hücresel yoğunluğun azaldığı, kollajen liflerinin artış gösterdiği görülmüştür. Ayrıca dermiste artan deri eklerinin (sebase bezler) varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. T grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi. Azalan hücresel yoğunluk (yıldız), artan kollajen lif miktarı(çift ok) ve deri eklerinin gösterimi (çift ok başı) (X100).

Timokinin grubunun granülasyon dokusu değerlendirilmesinde histolojik skoru 3.25 ± 0.46 (3,3-4) ve kollajen değerlendirilmesinde histolojik skoru 2.88 ± 0.83 (3,2-4) olarak değerlendirilmiştir. Granülasyon dokusu ve kollajen lifler değerlendirildiğinde timokinin grubunda kontrol ve DMSO grubuna göre anlamlı farklılık olduğu görülmüştür (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p = 0.03$). Kollajen miktarı ve organizasyonu değerlendirilmesinde en yüksek değer timokinin grubunda olsa dahi kollajen durumu gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Timokinin yara bölgesi ölçüldüğünde 2.370 ± 0.721 değerini almıştır ve azalma kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($p = 0.04$).

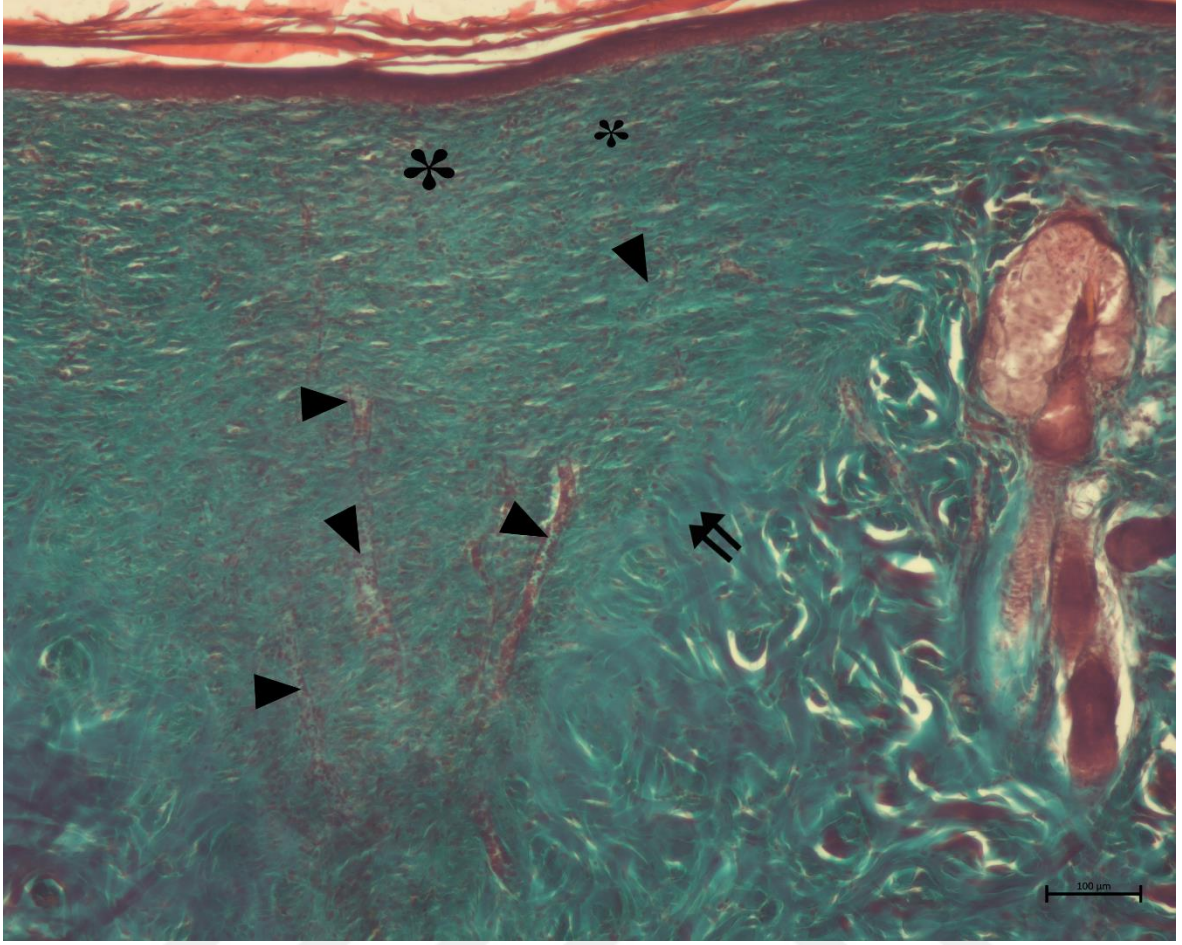
S grubu granülasyon dokusu değerlendirildiğinde kontrol, DMSO ve timokinin grubuna göre azalan hücresel yoğunluk, artan damarlanma ve kollajen liflerin varlığında artış gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. S grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi. Azalan hücresel yoğunluk (yıldız), artan kollajen lif miktarı(çift ok) ve artan damarlar (ok başı) (X100).

Serum grubu histolojik skorlamada granülasyon dokusu ortalama değeri 2.88 ± 1.13 (3,1-4) ve kollajen değeri 2.12 ± 0.83 (2,1-3) olarak bulunmuştur. Yara uzunluğu ölçümünde ise ortalama olarak 2.397 ± 0.466 değerini almıştır.

TS grubu granülasyon dokusu ve kollajen durumu açısından değerlendirildiğinde granülasyon dokusunda hücresel yoğunluğun azaldığı, damar sayısının arttığı gözlenmiştir. Kollajen liflerin granülasyon dokusunda miktarca arttığı ve organizasyonlarının deri histolojisine uygun şekilde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. TS grubunda yara bölgesinde granülasyon dokusu ve kollajen liflerin değerlendirilmesi. Azalan hücresel yoğunluk (yıldız), artan kollajen lif miktarı(çift ok) ve artan damarlar (ok başı) (X100).

TS grubu histolojik skorlamada granülasyon dokusu için 2.50 ± 0.53 (2.5, 2-3) ve kollajen için 2.25 ± 0.71 (2,1-3) değerini almıştır. Yara bölgesindeki uzunluk değeri ise 2.221 ± 0.626 olarak ölçülmüştür ve bu değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak az bulunmuştur ($P=0.02$).

4.4. Yara İyileşmesinin Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesinin İstatistiksel İncelenmesi

En yüksek ve en düşük epitelizasyon skorları sırasıyla T ve K gruplarında bulunmuştur (sırasıyla; 3.75 ± 0.71 ve 1.62 ± 0.74). Timokinon uygulaması epitelizasyon skorunu K, S ve TS grubuna göre anlamlı şekilde artırmıştır. Granülasyon dokusu skoru yine en yüksek T grubunda (3.25 ± 0.46) ve en düşük K grubunda (1.75 ± 0.46) bulunmuştur. Kollajen durumu

skoru en yüksek T grubunda (2.88 ± 0.83) ve en düşük D grubunda (2.00 ± 0.53) bulunmuştur. Kollajen durumu skorunda gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır. Gruplar arasında yapılan skorlamaların karşılaştırılmaları Tablo 4.1’ de verilmiştir.

Tablo 4. 1. Yara iyileşmesi için kullanılan parametrelerin 21. gün sonunda karşılaştırılması

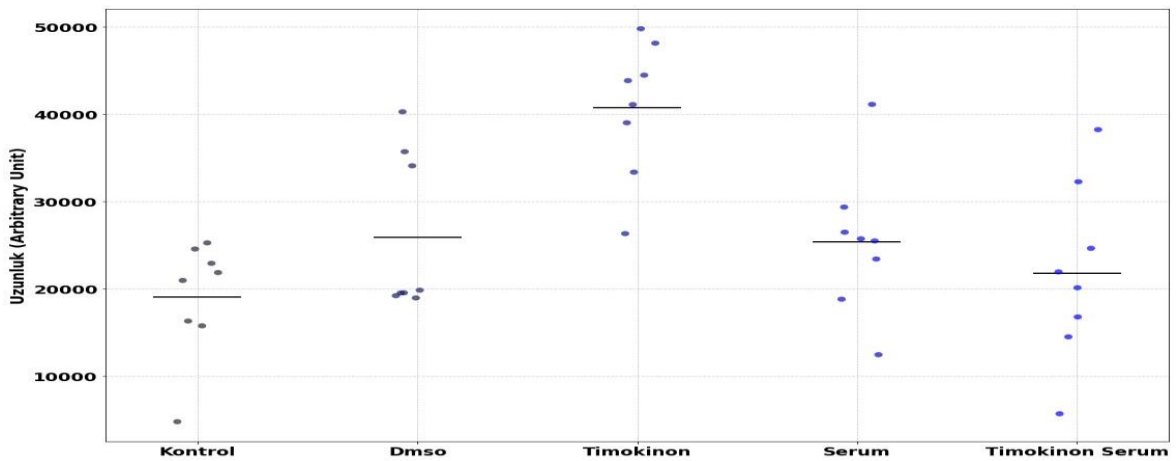
Gruplar	Epitelizasyon	Granülasyon Dokusu	Kollajen Durumu
Kontrol	1.62 ± 0.74 (2, 0-2)	1.75 ± 0.46 (2, 1-2)	2.12 ± 0.83 (2,1-3)
DMSO	2.25 ± 0.71 (2,1-3)	2.38 ± 0.52 (2,2-3)	2.00 ± 0.53 (2,1-3)
Timokinon	3.75 ± 0.71 (4, 2-4)	3.25 ± 0.46 (3,3-4)	2.88 ± 0.83 (3,2-4)
Serum	2.25 ± 0.46 (2,2-3)	2.88 ± 1.13 (3,1-4)	2.12 ± 0.83 (2,1-3)
Timokinon + Serum	2.50 ± 0.76 (3,1-3)	2.50 ± 0.53 (2.5, 2-3)	2.25 ± 0.71 (2,1-3)
Kruskal-Wallis H Test p-value	0.001	0.003	0.266
	Kontrol vs Timokinon p<0.001	Kontrol vs Timokinon p<0.001	
	DMSO vs Timokinon p=0.008	DMSO vs Timokinon p=0.031	
	Serum vs Timokinon p=0.003		
	Timokinon+Serum vs Timokinon p=0.041		

Gruplar arasında epidermisin kalınlığının ölçümü ve yara bölgesinin derinliğinin ölçümü yapılmıştır. Epitel ölçümü uzunluğu ortalama değerlerini en yüksek timokinon grubunda ($1.902 \times 10^4 \pm 0.673 \times 10^4$) ve en düşük kontrol grubunda ($1.902 \times 10^4 \pm 0.673 \times 10^4$) almıştır. Tek yönlü ANOVA testi ile epitel ölçümü uzunluk değerleri gruplar arasında anlamlı bir şekilde farklıdır (p<0.001). Posthoc Tukey testi ile timokinon grubunun alan derinliği uzunluk değerleri kontrol, DMSO, serum ve timokinon+serum gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur. Tüm p değerleri Tablo 4.2’de detayları ile verilmiştir. Yara derinlik ölçümü uzunluk ortalama değerleri en yüksek timokinon grubunda ($3.7 \times 10^5 \pm 0.922 \times 10^5$) ve en düşük timokinon+serum grubunda ($2.221 \times 10^5 \pm 0.626 \times 10^5$ uzunluk) bulunmuştur. Yara derinlik ölçümünde uzunluk değeri timokinon ve timokinon+serum gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur (sırasıyla p=0.044 ve p=0.020).

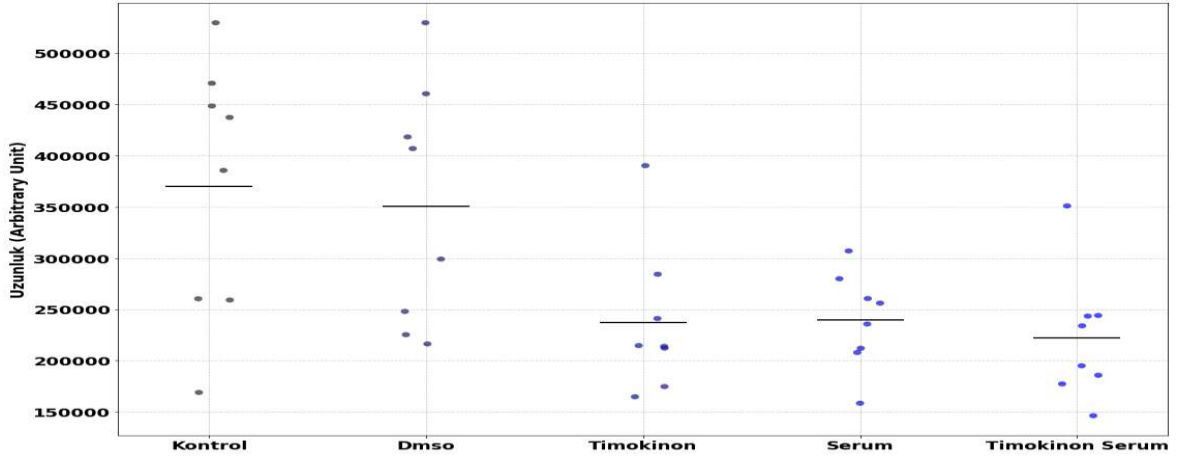
Tablo 4. 2. Epidermis ve yara derinlik ölçümü istatistiksel analiz sonuçları.

	Epidermis kalınlığı	Yara Derinliği
Gruplar	Uzunluk ($\times 10000$)	Uzunluk ($\times 100000$)
Kontrol	1.902 $\pm$ 0.673	3.7 $\pm$ 0.922
DMSO	2.586 $\pm$ 0.910	3.504 $\pm$ 0.922
Timokinon	4.072 $\pm$ 0.779	2.370 $\pm$ 0.721
Serum	2.532 $\pm$ 0.827	2.397 $\pm$ 0.466
Timokinon+Serum	2.174 $\pm$ 0.922	2.221 $\pm$ 0.626
Levene homojenik testi*	p=0.407	p=0.139
Tek yönlü ANOVA testi**	p<0.001	p=0.003
	Timokinon vs Kontrol p<0.001	Timokinon vs Kontrol p=0.044
	Timokinon vs DMSO p=0.011	Timokinon+ Serum vs Kontrol p=0.020
	Timokinon vs Serum p=0.008	
	Timokinon vs Timokinon+Serum p=0.001	

Ayrıca kontrol ve deney grupları arasındaki uzunluk ölçümlerinin dağılımı epidermis için (Şekil 4.16) ve yara bölgesi için (Şekil 4.17) ölçüm sonuçlarına göre hazırlanmıştır.



Şekil 4.16. Epidermis kalınlığının ölçümünün uzunluk (arbitrary unit) değerlerinin dağılımlarının gösterimi.



Şekil 4.17. Yara derinliğinin ölçümünün uzunluk (arbitrary unit) değerlerinin dağılımlarının gösterimi.

5. TARTIŞMA

Araştırmada, 200-250 g ağırlığında, 6-8 aylık, 40 adet erkek Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Yara modeli oluşturmak için, sıçanların sırt derilerinde 3 mm genişlikte epidermis, dermis ve hipodermisi içeren eksizyon yaraları oluşturulmuştur. Oluşturulan yara bölgelerine timokinonun çözücüsü olan DMSO, timokinon, hayvanların kanından elde edilen serum, ve timokinon ile serum birlikte 21 gün boyunca uygulanmıştır. Tüm gruplardan alınan yara dokuları histolojik olarak analiz edilmiştir.

Histolojik değerlendirmeler için Hematoksilen-Eozin boyama ve Masson trikrom boyamalar yapılmıştır. Yapılan incelemede yara dokusundaki epitelin tekrar organize olması yani epitelizasyon, granülasyon dokusunun organizasyonu, dokudaki damarların miktarı, kollajen birikimi ve kollajen organizasyonu incelenmiştir.

Yara iyileşmesi, özellikle yenileyici tıp alanında ilgi çekici bir alandır. Yara iyileşmesini hızlandırmak, yara bölgesinde oluşabilecek enfeksiyonel durumlara karşı belirli ajanlar kullanmak bu alandaki araştırma çalışmalarının konusunu oluşturmaktadır.

Nigella sativa (NS); hücreler üzerinde proliferatif, anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve hepatoprotektif özelliklere sahiptir. Timokinon, NS'nin en aktif bileşenidir (99, 100, 101, 102). Bu özellikleri sebebiyle timokinon yara iyileşmesi çalışmalarında da tercih edilmektedir. Timokinon yara iyileşmesine olan etkisini anjiyogenezi uyarması, hücre proliferasyonunu arttırması ve kollajen sentezini düzenlemesi ile gösterir (99, 103, 104). Bu sebeple yapılan tez çalışmasında timokinonun yara iyileşmesi üzerindeki etkisi hem tek başına hem de daha önce çalışılmamış şekilde serum uygulamasıyla birlikte incelenmiştir.

Araştırma sonucunda epitelizasyon açısından en etkin iyileşmenin timokinon grubunda olduğu görülmüştür ($p<0.05$). 21. günün sonunda timokinon uygulanan grupta epidermin katlarının belirginleştiği, hipertrofinin azaldığı, hücrelerin bazalden yüzeye doğru yassılaştığı gözlenmiştir. DMSO ve timokinon gruplarının sonuçları karşılaştırıldığında timokinonun bu etkisini çözücüsü olan DMSO'dan bağımsız olarak gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca kontrol grubu, serum ve timokinon+serum grubu ile karşılaştırıldığında timokinon grubunun epitelizasyon açısından en yüksek skor değerini aldığı (Tablo 4.1, $p<0.05$) ve bununla uyumlu olarak epidermis uzunluk ölçümleri de yine

en yüksek değerini timokinon grubunda göstermiştir (Tablo 4.2, $p<0.05$). Timokinon grubunun diğer gruplara göre daha fazla epitelizasyonu artırıcı yönde etki göstermesi timokinonun iyileşmesini sürdüren yara dokusunda koruyucu rolü olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Serumla birlikte timokinon uygulandığında ise epitelizasyonun tek başına timokinon uygulanmasına göre artmadığı; ancak kontrol grubuna göre epitelizasyonun uyarıldığı grlmştr. Tek başına timokinon uygulandığında ise istatistiksel olarak anlamlı şelikde ($p<0.05$) serumla birlikte uygulama sonucuna göre daha yüksek düzeyde epitelizasyon olduğu grlmştr. Epitelizasyon açısından, serum uygulamasının kontrole göre etkisi olsa dahi timokinona göre etkisinin olmadığı grlmştr. Bu durum, uygulanan serum miktarının arttırılması durumunda TS grubunun daha uyarıcı bir sonuç vereceği şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada da, yanık yara modelinde timokinonun topikal olarak uygulanmasının kontrol grubuna kıyasla re-epitelizasyonu oranını arttırdığı gösterilmiştir (105).

Yara iyileşmesi süreci, birbirini takip eden dört aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar: homeostaz, inflamasyon, proliferasyon ve dokunun yeniden şekillenmesidir (7, 8, 9). Bu süreçler fibroblastlar, trombositler, makrofajlar, keratinositler ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinin görev aldığı bir süreçtir. Ek olarak yara iyileşmesinde çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokinler içeren bir sinyal ağı da görev almaktadır (10).

Her fazın uzunluğu yarayı etkileyen fizyolojik ve ekzojen faktörlere bağlı olarak değişebilir. Proliferasyon fazı yara iyileşmesinde en önemli onarım sürecidir (11). Granülasyon dokusunun oluşması proliferasyonu izleyen ve yeniden modellenme aşamasına geçen yara iyileşmesinde görülmektedir ve yara bölgesine göç ederek iyileşme sürecine katılacak hücrelerin varlığı için de granülasyon doku oluşumu önemlidir.

Granülasyon dokusunun timokinon grubunda yüksek skor alması (Tablo 4.1) dermiste yara bölgesine göç ederek granülasyon dokusunu oluşturan hücrelerin varlığı ve bunların sentezlediği kollajen miktarının ykseklıği ile ilişkilendirilmiştir; ancak kollajen durumuyla ilgili gruplar arasında farklılık görülmemiştir. Ayrıca granülasyon dokusuyla birlikte değerlendirildiğinde ölçülen yara bölgesi derinliği sırasıyla yüksekten düşük değere doğru

kontrol, DMSO, serum, timokinon ve timokinon+serum grubu şeklinde sıralanmıştır (Tablo 4.2). Serumla birlikte uygulandığında timokinonun granülasyon dokusu ve kollajen organizasyonu açısından etkisinin epitelizasyonda olduğu gibi daha az olduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda da timokinon uygulamasının diyabetik yara (106), eksizyonel yara (107) ve enfekte (104) yara modellerinde fibroblast proliferasyonu ve kolajen sentezini indüklediği, granülasyon dokusunu artırdığı ve yara derinliğini azalttığı gösterilmiştir.

TS grubunun bu parametreler açısından kontrol grubuna göre daha uyarıcı etkisi olduğu gösterilse dahi bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak yara derinliği ölçülmesinde kontrol grubuna göre TS grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yara derinliği azalmıştır ($p=0.02$).

Timokinon tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre yara derinliğindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.04$); ancak timokinon ve timokinon+serum uygulanan iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Bu durum serumun uyarıcı etkisinin kontrol grubuna kıyasla görülmesine rağmen; yine uygulama miktarına bağlı olarak timokinon grubuna kıyasla farklılık gösterememiş olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Deri bütünlüğünün bozulmasına neden olan fiziksel süreçler, yara oluşumuna sebep vermektedir. Derinin bozulmuş anatomik devamlılığının ve bozulmuş fonksiyonel durumunun yeniden yapılanması için yaraların doğru şekilde iyileşmesi önemlidir (1).

Belirli bir zaman aralığıyla kontrol edilen iyileşme sürecini kesintiye uğratan herhangi bir değişiklik, doku hasarını ve onarım sürecini uzatacak ve sonuç olarak kronik yaraya neden olacaktır (3). Kronik yaralar, bozulmuş iyileşme gösteren yaralardır. Genellikle iyileşmenin normal aşamalarında ilerlemeyi başaramazlar (4).

Yara iyileşmesi, vücudun hasarlı dokunun onarılmasına yol açan doğal tepkisidir (5). Onarım süreçlerinin çoğu tüm dokular için ortaktır ve hücresel aşamadan başlayarak gerçekleşir. Yaranın uygun şekilde iyileşmesi için uygun seviyelerde sitokinler ve büyüme faktörleri gereklidir (6).

Serum, yara iyileşmesi sırasında doku onarımı için önemli olan hücre çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını uyaran büyüme faktörleri açısından zengin bir içeriğe sahiptir. Ayrıca, inflamatuvar yanıtı düzenleyen ve yara iyileşme süreçlerini uyaran sinyal molekülleri olan sitokinleri de içerir.

Serum yara iyileşmesi sırasında doku granülasyonunu artırarak yara yatağının yeniden modellenmesine, hücrelerin proliferasyonuna uyarıcı yönde etki eder. İçerdiği fibrinojen ile yara yatağının yenilenmesinde hücrelerin bölgeye göç ettikten sonra tutunup yeni bir matrikse oluşturmaya kadar tutunmalarını sağlar (89).

Serum uygulamasının sonuçları incelendiğinde tek başına veya timokinon ile birlikte uygulandığında birbirine yakın sonuçlar ortaya koydukları görülmüştür. Ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) Dikkat çekici şekilde epitelizasyon ve granülasyon dokusu varlığı timokinon ile uyarılırken serum ve timokinon+serum uygulamasında uyarılar daha az olmuştur. Özellikle epitelizasyonda ve granülasyon dokusunda serumun etkisinin az görülmesinin sebebi uygulanan serum miktarının yetersiz olabileceği ve gerekli uyarıcı etkiyi gösteremediği şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan tez çalışması, timokinonun serumla birlikte eksizyonel yara iyileşmesine etkisini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızda timokinonun tek başına uygulanmasının oluşturduğumuz eksizyonel yara modelinde epitelizasyonu arttırdığı ve yara iyileşmesine katkı sunduğu; ancak serumla birlikte uygulandığında yara iyileşmesine etkisinin daha fazla uyandırıldığı ortaya konmuştur.

Çalışmamızda yara iyileşmesi aşamalarına bağlı olarak zaman noktalarının 7., 14., 21. günlerinde histolojik incelemeler yapılamamış olup bunun yerine sadece iyileşmenin belli bir aşamada görüldüğü 21. günde incelemeler yapılmıştır. Bu sebeple çalışma zaman bağımlı olarak timokinonun etkisini ortaya koyamamıştır; ancak yara iyileşmesinin ileri bir evresinde serumla uygulamada olabilecek farklılıkları ortaya koyacak şekilde sonuçlanmıştır. Hem tek başına hem de timokinonla birlikte uygulanan serum miktarının artırılması çalışma sonucunda önerilmiştir. Ayrıca özellikle yara iyileşmesinin farklı aşamalarının daha iyi anlaşılması için immunohistokimyasal çalışmaların yapılması da önerilmiştir (108, 109, 110, 111).

6.SONUÇ

Çalışmamızda timokinin serum ile birlikte eksizyonel yara modeline uygulandığında yara iyileşmesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Timokinin ve diğer gruplar karşılaştırıldığında, epitelizasyon açısından en yüksek değerlerin timokinin grubunda olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu durum timokininin epitel hücre proliferasyonunu arttırıcı özelliği ile ilişkilendirilmiştir.

Granülasyon dokusunun histolojik skorlama değerleri en iyi timokinin grubunda görülmüştür. Timokinin grubunu serum ve timokinin+serum grubu izlemiştir. Bu durum uygulanan serum miktarının arttırılması halinde etkisinin daha fazla olacağı şeklinde yorumlanmıştır.

Kollajen skoru en yüksek timokinin grubunda ve en düşük DMSO grubunda bulunmuştur. Granülasyon skorlarına benzer şekilde timokinin grubunu, serum ve timokinin+serum grupları izlemiştir. Kollajen durumu skorunda ise, gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde uygulanan timokininle birlikte uygulanan serum miktarının arttırılması önerilmiştir.

Epidermin kalınlığı ölçüldüğünde, en yüksek değerin timokinin grubunda olduğu görülmüştür Bu durum, epitelizasyon skorlaması ile uyumlu bulunmuştur.

Yara derinliklerinin ölçümünde ise, en az değeri timokinin+serum grubu almıştır. Bu grubu serum ve timokinin grubu izlemiştir. Her üç grupta da yara, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır.

Yapılan çalışmanın sonuçları, timokinin ve serumun birlikte uygulanmasının yara iyileşmesini arttırıcı yönde etki edebileceği; ancak uygulanan timokininle birlikte uygulanan serum miktarının arttırılması şeklinde yorumlanmıştır.

KAYNAKLAR

- 1) Singh M., Govindarajan R., Nath V., Rawat A.K.S., Mehrotra S. Antimicrobial wound healing and antioxidant activity of *plagiochasma appendiculatum* lehm. et lind.. Journal of Ethnopharmacology, 2006; 107(1): 67-72.
- 2) Ammar I., Bardaa S., Mzid M., Sahnoun Z., Rebaii T., Attia H., Ennouri M. Antioxidant, antibacterial and in vivo dermal wound healing effects of opuntia flower extracts. International Journal of Biological Macromolecules. 2015; 81: 483-90.
- 3) Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997; 276(5309): 75-81.
- 4) Kurahashi T., Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. Journal of Developmental Biology. 2015; 3(2): 57-70.
- 5) Guo J.J., Yang H., Qian H., Huang L., Guo Z., Tang T. The effects of different nutritional measurements on delayed wound healing after hip fracture in the elderly. Journal of Surgical Research. 2010; 19(1): 503-8.
- 6) Alexander H.R., Alwi S.S.S., Yazan L.S., Ansar F.H.Z., Ong Y.S. Migration and proliferation effects of thymoquinone-loaded nanostructured lipid carrier (tq-nlc) and thymoquinone (tq) on in vitro wound healing models. Evidence Based Complement Alternative Medicine. 2019; 2019: 9725738.
- 7) Qing C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. Chinese Journal of Traumatology. 2017; 20 (4): 189-193.
- 8) Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak A.E.A. Regeneration of dermis: scarring and cells involved. Cells. 2019; 8(6): 607.

- 9) Haq A., Kumar S., Mao Y., Berthiaume F., Michniak-Kohn A.B. Thymoquinone-loaded polymeric films and hydrogels for bacterial disinfection and wound healing. *Biomedicines*. 2020; 8(10): 386.
- 10) Algahtani M.S., Ahmad M.Z., Shaikh I.A., Abdel-Wahab B.A., Nouredin I.H., Ahmad J. Thymoquinone loaded topical nanoemulgel for wound healing: formulation design and in-vivo evaluation. *Molecules*. 2021; 26(13): 3863.
- 11) Selçuk C.T., Durgun M., Tekin R., Yolbas L., Bozkurt M., Akçay C., Alabalk U., Basarali M.K. Evaluation of the effect of thymoquinone treatment on wound healing in a rat burn model. *Journal of Burn Care & Research*. 2013; 34(5): e274-81.
- 12) Negi P., Sharma G., Verma C., Garg P., Rathore C., Kulshrestha S., Lal U.R., Gupta B., Pathania D. Novel thymoquinone loaded chitosan-lecithin micelles for effective wound healing: development, characterization, and preclinical evaluation. *Carbohydrate Polymers*. 2020; 230: 115659.
- 13) Yaman I., Durmus A.S., Ceribasi S. Effects of nigella sativa and silver sulfadiazine on burn wound healing in rats. *Veterinari Medicina*. 2010; 55(12): 619-624.
- 14) Yousef H., Alhajj M., Fakoya A.O., Sharma S. Anatomy, skin (integument), epidermis. *Statpearls*. 2024; In: StatPearls [Internet].
- 15) Losquadro W.D. Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2017; 25(3): 283-289.
- 16) Mohammadi R., Mehrtash M., Mehrtash M., Hassani N. Effect of platelet rich plasma combined with chitosan biodegradable film on full-thickness wound healing in rat model. *Bulletin of Emergency and Trauma*. 2016; 4(1): 29-37.
- 17) Salimbeigi G., Vrana N.E., Ghaemmaghani A.M., Huri P.Y., McGuinness A.G.B. Basement membrane properties and their recapitulation in organ-on-chip applications. *Materials Today Bio*. 2022; 15: 100301.

- 18) Nishiyama T., Amano S., Tsunenaga M., Kadoya K., Takeda A., Adachi E., Burgeson R.E. The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. *J Dermatol Sci.* 2000; 24 Suppl 1:S51-9.
- 19) Lopez-Ojeda W., Pandey A., Alhajj M., Oakley A.M. Anatomy, skin (Integument) 2022; In: StatPearls [Internet].
- 20) Oikarinen A. Connective tissue and aging. *International Journal of Cosmetic Science.* 2004; 26(2): 107.
- 21) Brown T.M., Krishnamurthy K. Histology, dermis. 2022; In: StatPearls [Internet].
- 22) Wong R., Geyer S.H., Weninger W., Guimberteau J. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology.* 2015; 25(2): 92-8.
- 23) Naldaiz-Gastesi N., Bahri O.A., López de Munain A., McCullagh K.J.A, Izeta A. The panniculus carnosus muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. *J Anat.* 2018;233(3): 275–88.
- 24) Driskell R.R., Jahoda C.A., Chuong C.M., Watt F.M., Horsley V. Defining dermal adipose tissue. *Exp Dermatol.* 2014;23(9): 629-31.
- 25) Correa-Gallegos D., Jiang D., Christ S., Ramesh P., Ye H., Wannemacher J., Kalgudde Gopal S., Yu Q., Aichler M., Walch A., Mirastschijski U., Volz T., Rinkevich Y. Patch repair of deep wounds by mobilized fascia. *Nature.* 2019;576(7786): 287-292.
- 26) Taguchi T, Yasui M, Kubo A, Abe M, Kiyama H, Yamanaka A, Mizumura K. Nociception originating from the crural fascia in rats. *Pain.* 2013 Jul;154(7): 1103-14.
- 27) Imazato H., Takahashi N., Hirakawa Y., Yamaguchi Y., Hiyoshi M., Tajima T., Chosa E., Sawaguchi A. Three-dimensional fine structures in deep fascia revealed by combined use of cryo-fixed histochemistry and low-vacuum scanning microscopy. *Sci Rep.* 2023;13(1): 6352.

- 28) Stecco C., Porzionato A., Lancerotto L., Stecco A., Macchi V., Day J.A., De Caro R. Histological study of the deep fasciae of the limbs. *J Bodyw Mov Ther.* 2008;12(3): 225-30.
- 29) Kolimi P, Narala S, Youssef AAA, Nyavanandi D, Dudhipala N. A systemic review on development of mesoporous nanoparticles as a vehicle for transdermal drug delivery. *Nanotheranostics.* 2023 Jan 1;7(1):70-89.)
- 30) Alenzi F., Elbolkin Y., Salem M.L. Protective effects of nigella sativa oil and thymoquinone against toxicity induced by the anticancer drug cyclophosphamide. *British Journal of Biomedical Science.* 2010; 67(1): 20-8.
- 31) Flowers L., Grice E.A. The skin microbiota: balancing risk and reward. *Cell Host & Microbe.* 2021; 28(‘): 190-200.
- 32) Pan L., Zhang X., Gao Q. Effects and mechanisms of histatins as novel skin wound-healing agents. *Journal of Tissue Viability.* 2021; 30(2): 190-95.
- 33) Murphree R. Impairments in skin integrity. *Nursing Clinics of North America.* 2017; 52(3): 405-17.
- 34) Cioce A., Cavani A., Cattani C., Scopelliti F. Role of the skin immune system in wound healing. *Cells.* 2024; 13(7): 624.
- 35) Vu N.B., Nguyen H.T., Palumbo R., Pellicano R., Fagoonee S., Pham P.V. Stem cell-derived exosomes for wound healing: current status and promising directions. *Minerva Medica.* 2020; 112(3): 384-400.
- 36) Saleh K., Sönnerngren H.H., Wound healing biomaterials. *Functional Biomaterials.* 2016.
- 37) Falanga V. Growth factors and wound healing. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology.* 1993; 11(4): 667-75.

- 38) Lee C.K., Hansen S.L. Management of acute wounds. *Surgical Clinics of North America*. 2009; 89(3) 659-76.
- 39) Bowler P.G., Duerden B.İ., Armstrong D.G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews Journal*. 2001; 14(2): 244-69.
- 40) Kaya A. Deneysel hayvan yarasında lokal olarak uygulanan iloprost'un yara iyileşmesine etkisi [Doktora tezi]. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2023.
- 41) Townsend C.M. Sabiston textbook of surgery the biological basis of modern surgical practice. Elsevier. 2021.
- 42) Christian L.M., Graham J.E., Padgett D.A., Glaser R., Kiecolt-Glaser J.K. Stress and wound healing. *Neuroimmunomodulation*. 2006; 13(5-6): 337-46.
- 43) Diller R.B., Tabor A.J. The role of the extracellular matrix (ECM) in wound healing: A review. *Biomimetics (Basel)*. 2022; 7(3):87.
- 44) Rodrigues M., Kosaric N., Bonham C.A., Gurtner G.C. Wound healing: a cellular perspective. *Physiological Reviews*. 2019; 99(1): 665-706.
- 45) Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*. 2010; 78: 929-58.
- 46) Larrabee W.F. Principles of facial reconstruction: a subunit approach to cutaneous repair. Lippincott Williams & Wilkins. 1995.
- 47) Kim Y.S., Hong E.S., Kim H.S. Botulinum toxin in the field of dermatology: novel indications. *Toxins (Basel)*. 2017; 9(12): 403.
- 48) Brem H., Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117(5): 1219-22.

- 49) Zhu M., Cao L., Melino S., Candi E., Wang Y., Shao C., Melino G., Shi Y., Chen X. Orchestration of mesenchymal stem/stromal cells and inflammation during wound healing. *Stem Cells Trans Medicine*. 2023; 15;12(9): 576-587.
- 50) Smith P.D., Kuhn M.A., Franz M.G., Wachtel T.L., Wright T.E., Robson M.C. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. *Journal of Surgical Research*. 2000; 92(1): 11-7.
- 51) Tyavambiza C., Meyer M., Meyer S. Cellular and molecular events of wound healing and the potential of silver based nanoformulations as wound healing agents. *Bioengineering (Basel)*. 2022; 9(11): 712.
- 52) Kaur N. A stages of healing a wound with picture. <https://www.credihealth.com/blog/stages-of-healing-a-wound.2023>.
- 53) Karaman F. Yara bakımı ve uygulamaları. https://Gavsispanel.gelisim.edu.tr/Document/Fkaradagli/20200403201343820_F571B90A-6A93-4B01-8Aaa-161732E8Abd8.
- 54) Topivac. About wounds. 2024. <https://topivac.com/wound-care/wounds.asp>
- 55) Nusgens B.V., Humbert P., Rougier A., Colige A.C., Haftek M., Lambert C.A. Richard A., Creidi P., Lapière C.M. Topically applied vitamin c enhances the mrna level of collagens 1 and iii, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001; 116(6):853-9.
- 56) Ghahremani-Nasab M., Bakhshayesh A.R.D., Akbari-Gharalari N., Mehdipour A. Biomolecular and cellular effects in skin wound healing: the association between ascorbic acid and hypoxia-induced factor. *Journal of Biological Engineering*. 2023; 17(1): 62.
- 57) Wilkinson H.N., Hardman M.J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *The Open Biology Journal*. 2020; 10(9): 200223.

- 58) Bakhtyar N., Amini-Nik S., Jeschke M.G. Omics approaches evaluating keloid and hypertrophic scars. *International Journal of Inflammation*. 2022; 2022: 1490492.
- 59) Reinke J.M, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. 2012; 49(1): 35-43.
- 60) Crovetti G., Martinelli G., Issi M., Barone M., Guizzardi M., Campanati B., Moroni M., Carabelli A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfusion and Apheresis Science*. 2004; 30(2): 145-51.
- 61) Bonham P.A. Assessment and management of patients with venous, arterial, and diabetic/neuropathic lower extremity wounds. *AACN Clinical Issues*. 2003; 14(4): 442-56; quiz 548-50.
- 62) Demidova-Rice T.N., Hamblin M.R., Herman I.M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances In Skin & Wound Care*. 2013; 25(7): 304-14.
- 63) Stan D., Tanase C., Avram M., Apetrei R., Mincu N., Mateescu A.L., Stan D. Wound healing applications of creams and “smart” hydrogels. *Experimental Dermatology*. 2021; 30(9): 1218-1232.
- 64) Li Q., Wang D., Jiang Z., Li R., Xue T., Lin C., Deng Y., Jin Y., Sun B. Advances of hydrogel combined with stem cells in promoting chronic wound healing. *Frontiers in Chemistry*. 2022; 10: 1038839.
- 65) Payne W.G., Salas R.E., Ko F., Naidu D.K., Donate G., Wright T.E., Robson M.C. Enzymatic debriding agents are safe in wounds with high bacterial bioburdens and stimulate healing. *Eplasty*. 2008; 8: e17.
- 66) Li S., Renick P., Senkowsky J., Nair A., Tang L. Diagnostics for wound infections. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*. 2021; 10(6): 317-327.

- 67) Nicks B.A., Ayello E.A., Woo K., Nitzki-George D., Sibbald R.G. Acute wound management: revisiting the approach to assessment, irrigation, and closure considerations. *International Journal of Emergency*. 2010; 3(4): 399-407.
- 68) Cedillo-Cortezano M., Martinez-Cuevas L.R., López J.A.M., López I.L.B., Escutia-Perez S., Petricevich V.L. Use of medicinal plants in the process of wound healing: a literature review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024; 17(3): 303.
- 69) Parlar A., Arslan S.O. Thymoquinone reduces ischemia and reperfusion-induced intestinal injury in rats, through anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Turkish Journal of Surgery*. 2020; 36(1): 96-104.
- 70) Silachev D.N., Plotnikov E.Y., Zorova L.D., Pevzner I.B., Sumbatyan N.V., Korshunova G.A., Gulyaev M.V., Pirogov Y.A., Skulachev V.P., Zorov D.B. Neuroprotective effects of mitochondria-targeted plastoquinone and thymoquinone in a rat model of brain ischemia/reperfusion injury. *Molecules*. 2015; 20(8): 14487-503.
- 71) Goyal S.N., Prajapati C.P., Gore P.R., Patil C.R., Mahajan U.B., Sharma C., Talla S.P., Ojha S.K. Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: a multitargeted molecule of natural origin. *Frontiers in Pharmacology*. 2017; 8: 656.
- 72) Kohandel Z., Farkhondeh T., Aschner M., Samarghandian S. Anti-inflammatory effects of thymoquinone and its protective effects against several diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 138: 1114.
- 73) Mahmud N.M., Paraoan L., Khaliddin N., Kamalden T.A. Thymoquinone in ocular neurodegeneration: modulation of pathological mechanisms via multiple pathways. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2022; 16: 786926.
- 74) Singh S., Das S.S., Singh G., Schuff C., Lampasona M.P., Catalán C.A. Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *Biomed Research International*. 2014; 2014: 918209.

- 75) El-Gindy Y., Zeweil H., Zahran S., El-Rahman M.A., Eisa F. Hematologic, lipid profile, immunity, and antioxidant status of growing rabbits fed black seed as natural antioxidants. *Tropical Animal Health and Production*. 2020; 52(3): 999-1004.
- 76) Mabrouk A. Protective effect of thymoquinone against lead-induced antioxidant defense system alteration in rat liver. *Acta Biologica Hungarica*. 2017; 68(3): 248-254.
- 77) Ismail N., Ismail M., Azmi N.H., Abu Bakar M.F., Basri H., Abdullah M.A. Modulation of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human neuronal cells by thymoquinone-rich fraction and thymoquinone via transcriptomic regulation of antioxidant and apoptotic signaling genes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 2528935.
- 78) Cobourne-Duval M.K., Taka E., Mendonca P., Bauer D., Soliman K.F. The antioxidant effects of thymoquinone in activated bv-2 murine microglial cells. *Neurochemical Research*. 2016; 41(12): 3227-3238.
- 79) Bordoni L., Fedeli D., Nasuti C., Maggi F., Papa F., Wabitsch M., De Caterina R, Gabbianelli R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of nigella sativa oil in human pre-adipocytes. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 8(2): 51.
- 80) Attia H.N., Ibrahim F.M., Maklad Y.A., Ahmed K.A. Characterization of antiradical and anti-inflammatory activities of some cold pressed oils in carrageenan-induced rat model of acute inflammation. *Der Pharma Chemica*. 2016; 8(17): 148-158.
- 81) Dwita L.P., Yati K., Gantini S.N. The anti-inflammatory activity of nigella sativa balm sticks. *Scientia Pharmaceutica*. 2019; 87(1): 3.
- 82) Aziz N., Son Y.J., Cho J.Y. Thymoquinone suppresses irf-3-mediated expression of type 1 interferons via suppression of tbk1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(5):1355.
- 83) Mohamed M.S.N., Jaikumar K., Marimuthu S., Wyson J., Anand D., Periyasamy S. In vitro immunostimulation activity of nigella sativa linn. and psoralea corylifolia linn.

seeds using a murine macrophage cell line. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2017; 10(3): 329-32.

- 84) Meles D.K., Safitri E., Wurlina, Mustofa I., Susilowati S., Putri D.K. Immunomodulatory activity of black jinten oil (*nigella sativa*) as macrophage activator for salmonella typhimurium infected rat. Indian veterinary Journal. 2020; 97(1): 12-14.
- 85) Alkhalaf M.I., Hussein R.H., Hamza A. Green synthesis of silver nanoparticles by *nigella sativa* extract alleviates diabetic neuropathy through anti-inflammatory and antioxidant effects. Saudi Journal of Biological Sciences. 2020; 27(9): 2410-19.
- 86) Nourbar E., Mirazi N., Yari S., Rafieian-Kopaei M., Nasri H. Effect of hydroethanolic extract of *nigella sativa* l. on skin wound healing process in diabetic male rats. International Journal of Preventive Medicine. 2019; 10: 18.
- 87) Abdul J., Bannai A., Alrashid I., Adnan L.A., Jabbar A. Effect of hot methanolic extract of *nigella sativa* on the healing of infected cutaneous wounds in rabbits. Plant Archives. 2020; 20(2): 756-60.
- 88) Koca U., Süntar I.P., Keles H., Yesilada E., Akkol E.K. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *centaurea iberica* trev. ex spreng. Journal of Ethnopharmacology. 2009; 126(3): 551-6.
- 89) Gao S., Chen T., Hao Y., Zhang F., Tang X., Wang D., Wei Z, Qi J. Exosomal mir-135a derived from human amnion mesenchymal stem cells promotes cutaneous wound healing in rats and fibroblast migration by directly inhibiting lats2 expression. Stem Cell Research Journal. 2020; 11(1): 56.
- 90) Liu E., Gao H., Zhao Y., Pang Y., Yao Y., Yang Z., Zhang X., Wang Y., Yang S., Ma X., Zeng J., Guo J. The potential application of natural products in cutaneous wound healing: a review of preclinical evidence. Frontiers In Pharmacology. 2022; 13: 900439.

- 91) Trinh X., Long N., Van Anh L.T., Nga P.T., Giang N.N., Chien P.N., Nam S.Y., Heo C.Y. A comprehensive review of natural compounds for wound healing: targeting bioactivity perspective. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(17): 9573.
- 92) Masson-Meyers D.S., Andrade T.A.M., Caetano G.F., Guimaraes F.R., Leite M.N., Leite S.N., Frade M.A.C. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International Journal of Experimental Pathology*. 2020; 101(1-2): 21-37.
- 93) Grada A., Mervis J., Falanga V. Research techniques made simple: animal models of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018; 138(10): 2095-2105.
- 94) Yousif S., Kareem W.A. Evaluation of curcumin effect on wound healing in rat model. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2022; 12(3): 1208-1218.
- 95) Mohammadi R., Mehrtash M., Mehrtash M., Hassani N., Hassanpour A. Effect of platelet rich plasma combined with chitosan biodegradable film on full-thickness wound healing in rat model. *Bulletin of Emergency And Trauma*. 2016; 4(1): 29-37.
- 96) Trinh X.T., Long N.V., Van Anh L.T., Nga P.T., Giang N.N., Chien P.N., Nam SY, Heo CY. A comprehensive review of natural compounds for wound healing: targeting bioactivity perspective. *International Journal of Molecular*. 2022; 23(17): 9573.
- 97) Alenzi F.Q., El-Bolkiny Y.E., Salem M.L. Protective effects of nigella sativa oil and thymoquinone against toxicity induced by the anticancer drug cyclophosphamide. *British Journal of Biomedical Science*. 2010; 67(1): 20-8.
- 98) Simonetti O, Lucarini G, Cirioni O, Zizzi A, Orlando F, Provinciali M, Di Primio R, Giacometti A, Offidani A. Delayed wound healing in aged skin rat models after thermal injury is associated with an increased MMP-9, K6 and CD44 expression. *Burns*. 2013 Jun;39(4):776-87.

- 99) Sallehuddin N., Nordin A., Bt Hj Idrus R., Fauzi M.B. Nigella sativa and Its Active Compound, Thymoquinone, Accelerate Wound Healing in an In Vivo Animal Model: A Comprehensive Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(11): 4160.
- 100) Venkatachallam S.K., Pattekhan H., Divakar S., Kadimi U.S. Chemical composition of Nigella sativa L. seed extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *Int. J. Food Sci. Tech*. 2010;47: 598–605.
- 101) Khader M., Eckl P.M. Thymoquinone: An emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran. J. Basic Med. Sci*. 2014;17: 950–957.
- 102) Darakhshan S., Bidmeshki P.A., Hosseinzadeh C.A., Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol. Res*. 2015; 95–96:138–158.
- 103) Shahani M.Y., Memon S., Shahani S.B., Bano U., Arain S.N. Effect of Nigella Sativa Extract Oil on Granulation Tissue in Cutaneous Wound: An Experimental Study in a Rabbit Model. *Med. Forum Mon*. 2013;24: 72–77.
- 104) Abu-Al-Basal M.A. Influence of Nigella sativa fixed oil on some blood parameters and histopathology of skin in staphylococcal infected BALB/c mice. *Pak. J. Biol. Sci*. 2011;14: 1038–1046.
- 105) Selçuk CT., Durgun M., Tekin R., Yolbas L., Bozkurt M., Akçay C., Alabalk U., Basarali MK. Evaluation of the effect of thymoquinone treatment on wound healing in a rat burn model. *J Burn Care Res*. 2013;34(5):e274-81.
- 106) Nourbar E., Mirazi N., Yari S., Rafieian-Kopaei M., Nasri H. Effect of Hydroethanolic Extract of Nigella sativa L. on Skin Wound Healing Process in Diabetic Male Rats. *Int J Prev Med*. 2019;10:18.
- 107) Shahani M.Y., Memon S., Shahani S.B., Bano U., Arain S.N. Effect of Nigella Sativa Extract Oil on Granulation Tissue in Cutaneous Wound: An Experimental Study in a Rabbit Model. *Med. Forum Mon*. 2013;24:72–77.

- 108) Zomer H.D., Trentin, A.G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of dermatological science*. 2018; 90(1): 3–12.
- 109) Cooper P.O., Haas M.R., Noonepalle S.K.R., Shook B.A. Dermal Drivers of Injury-Induced Inflammation: Contribution of Adipocytes and Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4): 1933.
- 110) Morton L.M., Phillips T.J. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(4):589-605; quiz 605-6.
- 111) Alrafiah A. Thymoquinone Protects Neurons in the Cerebellum of Rats through Mitigating Oxidative Stress and Inflammation Following High-Fat Diet Supplementation. *Biomolecules*. 2021;11(2):165.

EK 1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 28.06.2022-139906



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu

Sayı : E-94603339-604.01.02-139906

Konu : Proje Onayı

28.06.2022

DAĞITIM YERLERİNE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. Attila Dağdeviren'in danışmanlığında, Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Anatomi Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Zeynep Yüksel'in sorumluluğunda yürütülecek olan DA22/21 nolu "Serumla birlikte timokinon uygulanmasının sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkisi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 30/05/2022 tarih ve 22/20 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Research on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Kurul Başkanı

Dağıtım:
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KARARI

TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
10	22/20	30/05/2022

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. Attila Dağdeviren tarafından yürütülecek olan DA22/21 nolu "Serumla birlikte timokinon uygulanmasının sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkisi" başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.

Prof. Dr. Hakan Özkardeş

Prof./Dr. A. Eftal Yücel

Prof. Dr. Ali Varan

Prof. Dr. Ayşe Arzu Yiğit

Prof. Dr. Feride Şahin

Prof. Dr. Tolga Resat Aydoğ

Doç. Dr. Seda Türkoğlu Babakurban

Vet. Hek. Sinem Pehlivan

Özgül Süzen

EK 2. Grupların Skorlama Değerleri

Gruplar	Re-pitelizasyon	Granülasyon dokusu	Kollojen durumu (miktarı/yönelimi)	Net skor
Kontrol 1	2	1	1	1-2
Kontrol 2	2	2	2	1-2
Kontrol 3	2	2	2	2-3
Kontrol 4	2	2	2	1-2
Kontrol 5	2	2	3	2-3
Kontrol 6	0	1	1	1-2
Kontrol 7	2	2	3	2-3
Kontrol 8	1	2	3	3-2

Gruplar	Re-epitelizasyon	Granülasyon dokusu	Kollojen durumu (miktarı/yönelimi)	Net skor
DMSO 1	2	2	2	3-4
DMSO 2	1	2	2	2-3
DMSO 3	3	2	1	2-3
DMSO 4	3	2	2	2-3
DMSO 5	3	2	2	2-3
DMSO 6	2	3	2	2-3
DMSO 7	2	3	2	2-3
DMSO 8	2	3	3	2-3

Gruplar	Re-epitelizasyon	Granülasyon dokusu	Kollojen durumu (miktarı/yönelimi)	Net skor
Serum 1	3	3	3	2-3
Serum 2	3	4	3	3-4
Serum 3	2	2	1	1-2
Serum 4	2	3	2	2-3
Serum 5	2	4	2	3-4
Serum 6	2	1	1	1-2
Serum 7	2	4	3	3-4
Serum 8	2	2	2	2-3

Gruplar	Re-epitelizasyon	Granülasyon dokusu	Kollojen durumu (miktarı/yönelimi)	Net skor
Timokinon 1	4	3	2	3-4
Timokinon 2	4	4	4	4
Timokinon 3	4	3	3	3-4
Timokinon 4	4	3	2	3-4
Timokinon 5	4	3	3	3-4
Timokinon 6	4	3	4	3-4
Timokinon 7	2	3	2	2-3
Timokinon 8	4	4	3	3-4

Gruplar	Re-epitelizasyon	Granülasyon dokusu	Kollojen durumu (miktarı/yönelimi)	Net skor
Timokinon Serum 1	2	3	2	2-3
Timokinon Serum2	3	2	1	2-3
Timokinon Serum 3	3	3	3	2-3
Timokinon Serum 4	1	2	3	2-3
Timokinon Serum 5	2	3	2	2-3
Timokinon Serum 6	3	2	2	2-3
Timokinon Serum 7	3	2	2	2-3
Timokinon Serum 8	3	3	3	2-3