



**SIĞLA YAĞININ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE YARA İYİLEŞTİRİCİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

Ecz.Burcu GÖKŞEN EKİZ

Eskişehir 2023

**SIĞLA YAĞININ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE YARA İYİLEŞTİRİCİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz.Burcu GÖKŞEN EKİZ

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2023

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Burcu Gökşen Ekiz'in "Sığla Yağının Hücre Kültüründe Yara İyileştirici Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki Doktora Tezi, 26.07.2023 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Ünvanı-Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK	
Üye	:Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	:Prof. Dr. Rana ARSLAN	
Üye	:Prof. Dr. V. Melih ALTAN	
Üye	:Prof. Dr. Nuray ARI	

.....
Enstitüsü Müdürü

ÖZET

SIĞLA YAĞININ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ecz.Burcu GÖKŞEN EKİZ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Tüm dünya çapında yara tedavisi için yapılan araştırmalar ve uygulamalar göz önüne alındığında, başarılı bir yara tedavisinin ne denli kıymetli olduğu açıktır. Günümüzde yeni ve etkili ajanların keşfi iyileşme sürecini kısaltarak hastaların yaşam konforunu artırmaktadır.

Bu tez çalışmasında ülkemizde endemik bir tür olan *Liquidambar orientalis*’in ürünü olan sıgla yağının yara iyileştirici etkilerinin hücre kültürü ortamında test edilmesi ve etki mekanizması araştırılmıştır. Çalışmada in vitro deneyler uygun koşullarda kültüre edilen insan kökenli HaCaT keratinosit hücre hatlarına uygulanmıştır. Çalışmada Muğla’dan iki farklı lokal üreticiye ait sıgla yağı getirtilmiştir. Sıgla yağının etkinlik karşılaştırması için pozitif kontrol olarak yara iyileştirici etkisi kanıtlanmış olan *Centella asiatica* bitkisinin standardize ekstresi kullanılmıştır. HaCaT keratinosit hücrelerinde sıgla yağının etkinliğinin değerlendirilmesi için toksik olmayan konsantrasyon tespitinde MTT; proliferasyon ve hücre migrasyon tespiti için gerçek zamanlı hücre analiz sistemi; ekstreinin yara iyileşmesi üzerine etkilerini belirlemek için scratch deneyi ve sıgla yağının COL1A1 (kollajen tip-1 alfa-1) mRNA ekspresyon düzeyine etkilerinin belirlenmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri uygulanmıştır.

Araştırmada MTT yöntemi sonucunda toksik olmayan konsantrasyonlar 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml) olarak belirlenmiştir. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde yapılan 72 saatlik analize göre hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda zamana bağımlı olarak 0,001 µg/ml konsantrasyonlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Scratch analizine göre 48.saat sonunda hücre migrasyonunda zamana bağımlı olarak 0,001 µg/ml konsantrasyonlarında yaranın her iki yakasındaki mesafenin anlamlı bir şekilde kapandığı gözlemlenmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonucuna göre ise COL1A1 mRNA ekspresyon düzeylerinde hiçbir artış gözlenmemiştir. Araştırmamızda in vitro ortamda sıgla yağının yara iyileşmesinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sıgla yağı, *Liquidambar orientalis*, sweetgum, storax, yara iyileştirici etki

ABSTRACT

WOUND HEALING EFFECTS OF SWEETGUM OIL ON CELL CULTURE

Ecz.Burcu GÖKŞEN EKİZ

Department of Pharmacology

Anadolu Üniversitesi, Graduate School of Health Sciences, July 2023

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Considering the researches and practices for wound treatment all over the world, it is clear how valuable a successful wound treatment is. Today, the discovery of new effective agents increases the quality of life of patients by shortening the healing process.

The wound healing effects of Sığla oil (Sweetgum oil), which is the product of *Liquidambar orientalis* grown in our country, were tested in cell culture medium and its mechanism of action was investigated in the study. *In vitro* experiments were applied to human derived HaCaT keratinocyte cells lines which cultured under appropriate conditions. Sweetgum oil belonging to two different local producers was brought from Muğla. Centella asiatica plant extract, which has proven wound healing effects, was used as a positive control for the comparison of the efficacy of sweetgum oil. Methods which applied to determine the effects of the extract on wound healing is, firstly MTT for non-toxic concentration determination for evaluation of the efficacy of sweetgum oil in HaCaT keratinocyte cells; real time cell analysis system and scratch test for proliferation and cell migration detection; and real time polymerase chain reaction to check COL1A1 (collagen type-1 alpha-1) mRNA expression.

In the study, non-toxic concentrations were determined as 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) and 0,001 µg/ml (1 ng/ml) as a result of MTT method. According to the real time cell analysis system results, a significant increase in cell proliferation and migration was observed at 0,001 µg/ml concentrations in a time (72 h) dependent manner. According to the scratch analysis, at the end of the 48th hour it was observed that the distance on both sides of the wound was significantly closed at 0,001 µg/ml concentrations in a time-dependent manner. According to the Real-Time PCR result, no increase in COL1A1 (collagen type-1 alpha-1) mRNA expression levels was observed. In the study, it was concluded that sweetgum oil is effective in wound healing *in vitro*.

Keywords: Sweetgum oil, *Liquidambar orientalis*, sweetgum, storax, wound healing effect

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecim boyunca benden desteğini esirgemeyen; eş zamanlı serbest eczacılık yapıyor olmama rağmen, bana her daim anlayış gösteren; gerek ders saatleri, gerek laboratuvar süreçleri, gerek projelerin yürülmesi olsun her alanda işimi kolaylaştırmaya çalışan, engin bilgi ve tecrübelerini tereddüt etmeden paylaşan, hem akademisyenliğine hem kişiliğine son derece saygı duyduğum sevgili danışman hocam Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e;

Hücre kültürünü bana sevdiren, öğreten, tez aşamasında önerileriyle bana yol gösteren; bilimsel olarak kattıklarının dışında en önemlisi de her zaman gülümsemesini ve molalarımızda bir fincan kahvesini eksik etmeyen sohbetinden keyif aldığım çok değerli hocam Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e;

Şehirdışından gidip gelerek laboratuvar sürecini tamamlamaya çalıştığım 1,5 yıl boyunca bir gün olsun yüzünü asmadan bana destek veren , bu süreci doğru ve eksiksiz tamamlamama yardımcı olan geleceğin kıymetli akademisyenleri Bio.Dr.Selin ENGÜR ÖZTÜRK'e ve Dr.Ecz.Elif KAYA TİLKİ'ye;

Eczanemde eğitimim nedeniyle bulunamadığım tüm zamanlarda gözüm arkada kalmadan sorumluluk bilinciyle her işimi yürütmeye çalışan tüm ekip arkadaşlarıma;

Manevi olarak her zaman yanımda olduklarını hissettiren, en karamsar anlarımda kahrımı çeken hayatıma anlam katan aileme; özellikle de doğduğum günden beri sonsuz şefkati ile beni sarıp sarmalayan, beni ben yapan, bugünlere gelebilmem için emeğini esirgemeyen, koşulsuz sevgisini, sabrını, özverisini ortaya koyarak hayatımın her aşamasında beni destekleyen, cesaretlendiren ve motive eden; kendisi de emekli bir eğitimci olan canım annem, Mualla GÖKŞEN'e;

Sonsuz teşekkür ederim...

Ecz.Burcu GÖKŞEN EKİZ

Temmuz 2023

26/ 07 /2023

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Ecz.Burcu GÖKŞEN EKİZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	14
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1. Yara Nedir?.....	15
2.1.1. Akut yaralar	15
2.1.2. Kronik yaralar	16
2.2. Yara İyileşmesi Aşamaları.....	16
2.2.1. Hemostaz	16
2.2.2. İnflamatuvar faz.....	18
2.2.3. Proliferatif faz	23
2.2.4. Onarım/ Yeniden modelleme (Remodelling)	24
2.3. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	26
2.3.1. Yara iyileşmesini etkileyen lokal faktörler	26
2.3.2. İyileşmeyi etkileyen sistemik faktörler.....	28
2.4. Yara İyileşmesinde Etkinliği Kanıtlanmış Maddeler	33
2.4.1. Dekspantenol	33
2.4.2. Centella asiatica	35
2.4.3. Hamamelis virginiana L.....	37
2.4.4. Gümüş sülfadiazin	38
2.4.5. Hypericum perforatum.....	39

2.5.5. Sığla yağı (Styrax liquidambar).....	41
---	----

Sayfa

3. YÖNTEM	44
3.1. Sığla Yağı	44
3.2. Kimyasal Maddeler.....	44
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Cihazlar	44
3.3.1.Kullanılan sarf malzemeleri.....	44
3.3.2.Kullanılan cihazlar	44
3.4. Sterilizasyon.....	46
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	46
3.5.1. Hücrelerin hazırlanması.....	46
3.5.2. Hücrelerin sayımı.....	47
3.5.3. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi.....	47
3.5.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP) kullanılarak hücre proliferasyonunun elektriksel empedans tekniği ile belirlenmesi.....	48
3.5.5. RTCA-DP ile migrasyonun belirlenmesi.....	51
3.5.6. Scratch assay metodu ile hücre migrasyonunun incelenmesi.....	53
3.5.7. Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR) yöntemi ile COL1A1 mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	53
3.5.6.1. Total RNA izolasyonu	57
3.5.6.2. cDNA sentezi.....	58
3.5.6.3. RT-PCR (Real time PCR) ile mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi.....	58
3.6. Sığla Yağı İçerik Analizi	59
4. BULGULAR.....	60
4.1. MTT Yöntemine İlişkin Sitotoksiste Bulguları	60
4.2. RTCA-DP Yöntemine İlişkin Proliferasyon Bulguları.....	61
4.3. RTCA-DP Yöntemine İlişkin Migrasyon Bulguları.....	63
4.4. Scratch Assay Metoduna İlişkin Hücre Migrasyon Bulguları.....	65
4.5. RT-PCR mRNA Ekspresyon Bulguları	68
4.6. Sığla yağına ilişkin içerik analizi bulguları	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	71
KAYNAKÇA	74
ÖZGEÇMİŞ.....	94

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. HaCaT RNA Nanodrop sonuçları	57
Tablo 3.2. Light Cyclers PCR uyumlu clear plakalara yüklenen kimyasallar.....	59
Tablo 4.3. Sığıla yağına ilişkin yapılan içerik analizi ile ilgili sonuçlar.....	70



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Yara iyileşme aşamaları	17
Şekil 2.2. Yara iyileşmesinde makrofajların rolü	22
Şekil 3.1. RTCA DP cihazında e-plakalarda ki hücre sayısının artışına bağlı olarak Hücre İndeks (CI) değerlerinin gösterilmesi	49
Şekil 3.2. RTCA-DP kullanılarak hücre proliferasyonu analizi için e-plakalarda uygulanan konsantrasyonların yerleşimi	50
Şekil 3.3. İnvazyon ve migrasyon çalışmalarında kullanılan 16 kuyucuklu CIM plaka	52
Şekil 3.4. RTCA-DP kullanılarak yapılan hücre migrasyonu analizi için CIM plaka konsantrasyonların yerleşimi.....	52
Şekil 3.5. PCR aşamaları	54
Şekil 3.6. TaqMan tekniği aşamaları	56
Şekil 4.1. MTT 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 µg/ml dozlarda hücre canlılığı grafikleri	61
Şekil 4.2. MTT 100, 10, 1, 0.1, 0.01 µg/ml dozlarda hücre canlılığı sonuç grafikleri ...	61
Şekil 4.3. Sığla-1 için RTCA-DP hücre proliferasyonu analiz sonuçları	62
Şekil 4.4. Sığla-2 için RTCA-DP hücre proliferasyonu analiz sonuçları	62
Şekil 4.5. TEKA için RTCA-DP hücre proliferasyonu analiz sonuçları	62
Şekil 4.6. Sığla-1 (SO-1) konsantrasyonlarının HaCaT keratinosit hücrelerindeki migrasyon etkisinin RTCA-DP’de izlenmesi	63
Şekil 4.7. RTCA-DP sisteminde HaCaT keratinosit hücrelerinde Sığla-1 konsantrasyonlarının 72 saat sonraki slope değerleri	63
Şekil 4.8. Sığla-2 (SO-2) konsantrasyonlarının HaCaT keratinosit hücrelerindeki migrasyon etkisinin RTCA-DP’de izlenmesi (n=6)	64
Şekil 4.9. RTCA-DP sisteminde HaCaT keratinosit hücrelerinde Sığla-2 konsantrasyonlarının 72 saat sonraki slope değerleri (n=6; ort±st.sapma)	64
Şekil 4.10. TEKA Konsantrasyonlarının HaCaT keratinosit hücrelerindeki migrasyon etkisinin RTCA-DP’de İzlenmesi	64

Şekil 4.11. RTCA-DP sisteminde HaCaT keratinosit hücrelerinde TEKA konsantrasyonlarının 72 saat sonraki slope değerleri.....	65
---	----

Şekil 4.12. Sığla-1 için scratch analizi görüntüleri.....	66
--	----

Sayfa

Şekil 4.13. Sığla-2 için scratch analizi görüntüleri	67
---	----

Şekil 4.14. TEKA için scratch analizi görüntüleri	68
--	----

Şekil 4.15. SO-1 , SO-2, ve TEKA'nın 1 ng (0,001 μ M); 10 ng (0,01 μ M) 100 ng (0,1 μ M) konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen HaCaT keratinosit hücrelerinde COL1A1 geninin amplifikasyon eğrisi	69
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	: Asiatik Asit
AS	: Asiaticoside
BBDI	: Bisülfid Bloke Diizosiyanat
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
cDNA	: Komplementer DNA
CH	: Kitosan
CI	: Cell Index
DAMP	: Hasarla İlişkili Moleküler Model
DAÜ	: Diyabetik Ayak Ülseri
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
ECM	: Hücre Dışı Matrisi
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
ESCOP	: European Scientific Cooperative on Phytotherapy
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GC	: Glukokortikoid
GE	: Gentamincin
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HPA	: Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal
HT	: Hamamelitannin
IL	: İnterlökin
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
LTB ₄	: Lökotrien B ₄

MA	: Madecassik Asit
MMP	: Matris Metalloproteinaz
MS	: Madecassoside
O ₂	: Süperoksit
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
PAI-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü 1
PAMP	: Patojenle İlişkili Moleküler Model
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PMN	: Polimorfonükleer Nötrofil
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
qRT-PCR	: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT	: Revers Transkriptaz
rTEM	: Ters Transendotelyal Göç
SMA	: Düz Kas Aktinini
SSD	: Gümüş Sülfadiazin
ROS	: Reactive oxygen species (Reaktif Oksijen Türleri)
TEKA	: Titrated Extract of Centella asiatica (Standardize Centella asiatica Ekstresi)
TGF- α	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α
TGF- β 1	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β 1
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
uPA	: Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü



1. GİRİŞ

Yaraların ve yara enfeksiyonlarının erken ve geç komplikasyonları, yüksek hastalık ve ölüm oranlarıyla sonuçlanabileceğinden klinik uygulamada ciddi bir sorun olabilir. Kutanöz yara iyileşmesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, migrasyon ve doku yeniden şekillenmesinden geçen iyi organize edilmiş bir fizyolojik süreci içerir [1]. Bu sürecin tamamı, farklı hücre tiplerinin, kemokinlerin ve hormonların uyumlu katılımıyla yürütülen sıkı bir düzenleme altındadır ve sonuçta yaralı bölgenin uygun şekilde onarılması ve doku bütünlüğünün restorasyonu ile sonuçlanır. Günümüzde yara iyileşme sürecinin fizyolojisi ve moleküler mekanizması ile ilgili çalışmalar, yara iyileşmesini ve komplikasyonlarını azaltmak için yeni terapötik ajanların ve terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır [1].

Yaralar ve yara iyileşmesi uzun yıllardır çalışılmasına rağmen, geliştirilen ajanların yüksek maliyetlere sahip olması ve yan etki potansiyelleri nedeniyle tedavilerde istenilen verimliliklere ulaşılamaması bu konunun gündemde kalmasına sebep olmaktadır [2]. Travma ile başlayıp doku rejenerasyonu ile tamamlanan yara iyileşmesi süreci, sadece yara bölgesi ile değil vücuttaki diğer sistemleri de bu sürece dahil ederek ilerleyen hücresel ve biyokimyasal olaylar bütünüdür. Hücreden hücreye iletişim, çok hücreli sistemlerde farklı hücre tiplerinin koordinasyonu ve uygun organizasyonu için gereklidir. Hücreler arasındaki bilgi alışverişi salgılanan büyüme faktörleri ve kemokinler, küçük moleküller (peptitler, iyonlar, biyoaktif lipidler ve nükleotitler), hücre-hücre teması ve hücre dışı matris bileşenlerinin salgılanması gibi çok sayıda mekanizma yoluyla gerçekleşir [3]

Sığla Ağacı ya da yaygın olarak bilinen bölgesel adıyla Günlük Ağacı (*Liquidambar orientalis* L.) ülkemizde sadece Fethiye, Köyceğiz, Marmaris bölgesinde yetişmektedir. Ağaç gövdesinin çizilmesi suretiyle elde edilen Sığla Yağı (*Styrax liquidambar*) halk arasında çeşitli terapötik amaçlarla kullanıldığı gibi parfümeri ve kozmetik alanlarında da kullanımı bulunmaktadır. Elde edilen ürün bir oleorezindir. Bileşiminde reçine, uçucu yağ ve ürüne kokusunu veren sinnamik asit bulunur. Yağ, antiseptik ve antiparaziter özelliğe sahiptir. Halk arasında ciltte yumuşatıcı, rahatlatıcı, iltihap giderici ve yara iyileştirici olarak, özellikle midede hazımsızlık ve ülser şikayetlerinde, solunum sistemi rahatsızlıklarında balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır [4]. Ülkemize özgü bu ürünün halk arasında yara iyileştirici etkileri iyi bilinmekle beraber, etkinliği bilimsel olarak tam doğrulanamamıştır. Ayrıca, yara iyileştirici etkinliğinin mekanizması da hiç bilinmemektedir. Bu çalışma ile ticari olarak satışı yapılmakta olan sığla yağının hücre kültürü ortamında etkileri araştırılarak hem yara iyileştirici etkinliğinin deneysel olarak doğrulanması ve etki mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara Nedir?

Yara fiziksel, kimyasal, ısı ve ışık radyasyonu ya da cerrahi müdahalelere bağlı olarak veya kendiliğinden gelişen insan vücudundaki canlı dokunun (cilt ve cilt altı dokuların) anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır [5]. Günümüzde yaranın tıbbi tedavisi yaranın onarımına yardımcı olmak amacıyla ya lokal (topikal) ya da sistemik (oral ya da parenteral) ilaçların verilmesi ile gerçekleştirilir. Kullanılan topikal ajanlar arasında antibiyotikler, antioksidanlar, antiseptikler ve yara iyileşme artırıcı kimyasal maddeler vardır [6]. Zaman, yara onarımı sürecinde önemli bir faktör olarak rol alır. Bu nedenle yara iyileşmesi klinik olarak akut veya kronik yaralar şeklinde sınıflandırılır.

2.1.1. Akut yaralar

Akut yaralar kolay iyileşebilen ve iyileşme sonucu hasarlı doku bırakmayan yaralardır. Günlük hayatta en sık karşılaşılan yara türüdür. Akut yaralar açık ve kapalı yaralar olmak üzere ikiye ayrılırlar [7].

Açık Yaralar: Aşağıda belirtilen yaralar açık yaralar olarak adlandırılır.

1. Eksizyon: Bir deri parçasını kesip çıkarmak sureti ile oluşturulmuş yaralardır.
2. İnsizyon: Bir deri hattı üzerine kesik atmak sureti ile oluşturulmuş yaralardır.
3. Laserasyon: Vücut dokusunun delici bir alet ile yırtılması sonucu oluşan yaralardır.
4. Abrasyon: Deri ve mukoza üzerinde kazıma ya da ovalama ile oluşan yaralardır.
5. Dil Yaraları: Çivi ve iğne gibi delici objelerin batmasıyla oluşan yaralardır.
6. Delinme Yaraları: İnce ve uzun bir cisimle oluşmuşsa penetran, cisim kendisine çıkış yeri bulmuşsa perforan yaralar olarak adlandırılır.
7. Ateşli Silah Yaraları: Ateşli silahtan çıkan objenin oluşturduğu yaralardır.

Kapalı Yaralar: Aşağıda belirtilen yaralar kapalı yaralar olarak adlandırılır [8].

1. Kontüzyon: Sivri uçlu cisimle ezilme veya sıkışma sonucu damarlarda zedelenme ve kanın ekstrevasyonu ile karakterize bir durumdur.
2. Hematom: Deri altı dokularda damarlarda gelişen hasar ile deri altında kan birikmesidir.

3. Ezilme: Dokulara çok büyük miktarda bir gücün kısa bir sürede, ya da daha az bir gücün uzun sürede uygulandığı durumlarda oluşur.

Akut yaraların tedavisi; kanamayı durdurma, yaranın temizlenmesi, yaranın kapatılması ve antibiyotik tedavisini içermektedir.

2.1.2. Kronik yaralar

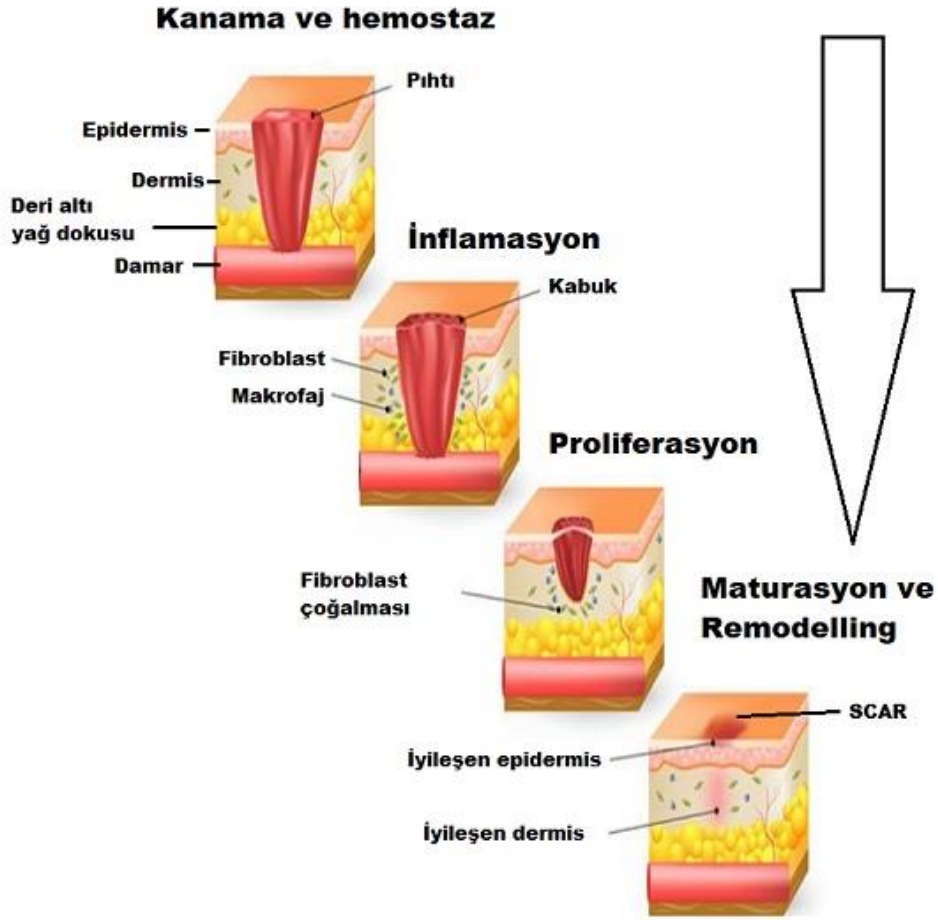
Cilt bütünlüğünün bozulması, fonksiyonel kayıp ile karakterize olan ve yavaş iyileşen yaralardır. Kronik yaralar etiyolojik nedenlere göre; bası yaraları, vasküler yaralar, metabolik yaralar (diyabetik ülserler), enfektif yaralar, enflamatuvar yaralar, malignite yaraları, hematolojik yaralar, yanık, donma ve radyasyon yaraları olarak sınıflandırılırlar. Kronik yaraların iyileşmesi birçok faktöre bağlı olarak günlere hatta yıllara varan bir süreç alabilir. Kronik yaraların bazıları iyileşemediklerinden dolayı tedavi planı ve yara bakım ürünü kullanması için hastanın bir merkeze yönlendirilmesi gerekir. Akut ve kronik yaralarda tedavi yöntemlerini belirlemek için yaranın çok iyi değerlendirilmesi gerekir [7].

2.2. Yara İyileşmesinin Aşamaları

2.2.1. Hemostaz

Hemostaz; vücudun kan kaybını önleyen fizyolojik bir savunma mekanizmasıdır. Enflamatuvar ve vücut onarım süreçleri ile kanamanın durmasını, kanın damar içinde tutulmasını sağlar. Yaralanmayı takiben hemostazı sağlamak için bir dizi serin proteaz mekanizması devreye girer. Bu basamakta, trombosit aktivasyonu ve fibrin pıhtısı oluşumunu işlevsel hale getirmek için biyolojik olarak inert zimojenler (enzim öncüleri) katalitik olarak aktif serin proteazlara dönüştürülür. Nihai sonuç, polimerizasyondur. Fibrin ve trombositlerin aktivasyonu, bir kan pıhtısına yol açar.

Trombosit aktivasyonu sonucunda sadece hemostaz oluşmamaktadır. Bu basamakta pıhtının oluşumuna müteakip bağışıklık sistemi hücrelerinin de harekete geçmesi sağlanır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri de devreye girerek yara iyileşmesinin inflamatuvar fazına geçişten sorumlu immün mediatörlerin salınması da gerçekleştirilir [9].



Şekil 2.1. Yara iyileşme aşamaları [9]

Hemostaz fazında doku hasarı olan bölgede kanın açıkta kalan yara bölgesine sızması sağlanarak dışsal pıhtılaşma kaskadı tetiklenmektedir. Aynı zamanda lokal olarak vazokonstriksiyon sağlayan serotonin gibi aracılar ortamda serbest kalarak kanamanın durmasına yardımcı olmaktadır [10]. Trombositler daha sonra kümelenirler ve subendotelial kollajen üzerinde aktive olurlar. Bu aktivasyon sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımı desteğiyle beraber hemostatik bir tıkaç oluşumunu sağlar [11]. Trombositlerin agregasyonu defektli vasküler alanı doldurur. Bu olay kanamayı azaltmakla beraber hemostazın oluşması için kendi başına yeterli değildir.

Kan yara bölgesine sızarken kan bileşenleri ve trombositler, açığa çıkan ekstraselüler matriks bileşenleri ve kollajenle temasa geğer. Bu temas sonucunda fibronektin, fibrin, vitronektin ve trombospondinler kan pıhtısının oluşumu ve trombositlerden pıhtılaşma faktörlerinin salınımı sağlanmış olur. Trombosit degranülasyonu ayrıca IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve

tümör nekroz faktörüne (TNF) ek olarak IL-8 veya CXCL8 (güçlü bir nötrofil kemoatraktan) gibi inflamatuvar araçların salınmasına da yol açar [10,13]. Bu olaylar zinciriyle keratinositlerin, bağışıklık hücrelerinin ve fibroblastların göçüne izin verilerek hücre göçü için bir ön matris görevi yerine getirilir [10,12]. Hemostaz sağlandıktan sonra, aktive komplement kaskadı tarafından salınan histamin, kapiller dilatasyon ve sızıntıya neden olarak, inflamatuvar hücrelerin yara yatağına göçünü sağlayıp yara iyileşmesinin inflamatuvar fazına tam geçişini hızlandırmaktadır [14].

2.2.2. İnflamatuvar faz

İnflamatuvar faz, doku hasarından sonraki ilk 72 saat içinde meydana gelen ilk hemostaz ile önemli ölçüde örtüşmektedir [15]. Bu basamağın aslen işlevi gereksiz doku hasarını önlenmesi ve patojenik mikroorganizmaların yara bölgesinde enfeksiyon oluşturmalarının önüne geçilmesi ve yabancı kalıntıları ortadan kaldırmak için yara yatağına nötrofil ve monosit infiltrasyonunu kolaylaştırarak devamında kompleman kaskadını aktive eden moleküler olayların başlamasını sağlamaktır.

Yara bölgesine inflamatuvar hücre alımı, koagülasyon fazından hemen sonra başlar. Akut bir yarada, hasar gören konakçı hücreler ölür ve örneğin ürik asit, DNA, RNA, hücre dışı matris bileşenleri gibi içerikleri ortama serbest bırakırlar. Bu içerikler ilgili bölgede bir hasar oluştuğunu belirten tehlike sinyalleri olarak hizmet ederler. Bu ürünler hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMP'ler) olarak adlandırılırlar [17,18]. Aynı zamanda hasar gören bölge patojen mikroorganizmalar tarafından kontamine olduğunda, patojenlerle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler) de yara ortamına salınır [19]. Bu iki tip içeriğin oluşturduğu tehlike sinyalleri lokal dokuda yerleşik hücreler üzerindeki örüntü tanıma reseptörleri tarafından algılanır. Bu da lokal hücre aktivasyonuna yol açar. Bu hücreler, inflamatuvar yanıtı ilerletecek önemli kimyasal araçları kodlayan çok sayıda geni eksprese etmektedir [20].

Nötrofil aktivasyonu ve amplifikasyonu: Nötrofillerin birincil rolü, bakterilere karşı konak savunmasını sağlamak ve istilacı mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturmaktır. Böylece yara yerinde enfeksiyon oluşumu önlenir [21]. Nötrofiller hasarlı dokudaki yabancı partikülleri, bakterileri fagositoz yoluyla parçalar ve ortamdan uzaklaştırır. Nötrofiller, patojen istilasının ve enflamatuvar ortamın tanınması için çok sayıda hücre yüzeyi reseptörünü eksprese ederler. Bu reseptörlerin bazıları mikrobiyal yapıları doğuştan tanıma yeteneğine sahipken, diğerlerinin yanıtı adaptif bağışıklık tepkisinin aktivasyonu ile

bağlantılıdır. Fagositik etki enflamasyonu takip eden süreçler için çok önemlidir çünkü akut yaralarda bakteriyel kontaminasyon fazla ise iyileşme süreci gecikir.

Vücutta IL-8 veya CXCL8 dahil olmak üzere nötrofil migrasyonuna aracılık eden bir dizi kimyasal sinyal kaskadı bulunur. Nötrofiller, göçlerini ve aktivasyon yanıtlarını düzenleyen 30'dan fazla farklı reseptöre sahiptirler [22]. Nötrofillerin yara iyileşmesinde erken kalıntı giderme işlevi gördüğü, fakat iyileşme kalıcılığı, gecikmiş yara iyileşmesi ve kronik yaralarla da ilişkili oldukları belirtilmiştir. Yapılan modelleme çalışmalarında nötrofil düzeyinde azalmanın yara iyileşmesini etkilediği belirtilmiştir [23]. Enfeksiyon riskinin daha yüksek olduğu ve diyabet varlığının bulunması gibi olgularda yara iyileşmesinde nötrofillerin gerekli olduğu bildirilmiştir [24].

Travmalara bağlı hasar nedeniyle nekroza uğrayan konakçı hücrelerden salınan DAMP'lerin, nötrofilleri yara yatağına toplayan ilk sinyaller olduğu düşünülmektedir [25]. Bu tehlike sinyali molekülleri, dokuda yerleşik hücrelere nötrofil kemoatraktan maddeler üretmek için sinyal göndermenin yanı sıra çeşitli nötrofil yüzey reseptörlerini bağlayarak nötrofilleri doğrudan aktive edebilir [26].

Dokuda yerleşik makrofajlar ve fibroblastlar tarafından üretilen en iyi tanımlanmış kemokinlerden biri interlökin-8 (IL-8) ya da CXCL8'dir [27]. CXCL8, nötrofil yüzey reseptörleri CXCR1 ve CXCR2'yi bağlayarak uyarır. Bu da nötrofillerin doku hasarı bölgesine alınmasını sağlamaktadır [28]. Nötrofillerin yara bölgesine ilerlemesinden sonra salgılanan CXCL8 sonucunda proinflamatuar bir geri besleme döngüsü oluşmaktadır [29]. Aynı zamanda CXCL8 tarafından artırılan endotel geçirgenlik yara bölgesine inflamatuvar hücre akışını daha da teşvik etmektedir [30]. CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 ve CXCL7 gibi diğer CXCL8 ailesi kemokinlerinin de nötrofil kemotaksisinde rol oynadığı gösterilmiştir [29,31]. CXCL8 dahil olmak üzere bu kemokinler, glikozaminoglikanları doku hücre duvarlarına ve hücre dışı matriste bağlayarak nötrofillerin yaralanmaya doğru net yönlü göçünün oluşması için bir sinyal gradyanı oluşturmaktadır [32,33]. Hasar neticesinde konakçı hücrelerden yara ortamına salınan DAMP'ler ile indüklenen hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lökotrien B4 (LTB4) gibi hücresel yan ürünler de nötrofilleri yara yatağına güçlü bir şekilde yönlendirmek için çeşitli gradyanlar oluşturmaktadır [21].

Yara iyileşmesinde nötrofillerin görevi: Çeşitli sitokinler ve trombosit ürünleri gibi kemotaktik ajanlarla 24 ila 36 saat içerisinde yara bölgesine çekilen nötrofiller reaktif oksijen türleri, proteazlar veya antimikrobiyal proteinlerin salınımı yoluyla patojenleri fagosit ederek yara enfeksiyonuna karşı savunma yaparlar [24]. Yapılan çalışmalarda nötrofillerin, hücre dışı ortamda bulunan organizmaları, nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) yardımıyla inhibe edebileceği de gösterilmiştir. NET'ler, nötrofil tarafından üretilen bakterisidal proteinlere bağlı yoğunlaştırılmış kromatin ipliklerinden oluşan ağ benzeri yapılardır. Fagositozu kolaylaştırmak için ya doğrudan mikroorganizmaları öldürerek ya da patojenleri hareketsizleştirerek çalışırlar [35,36, 37].

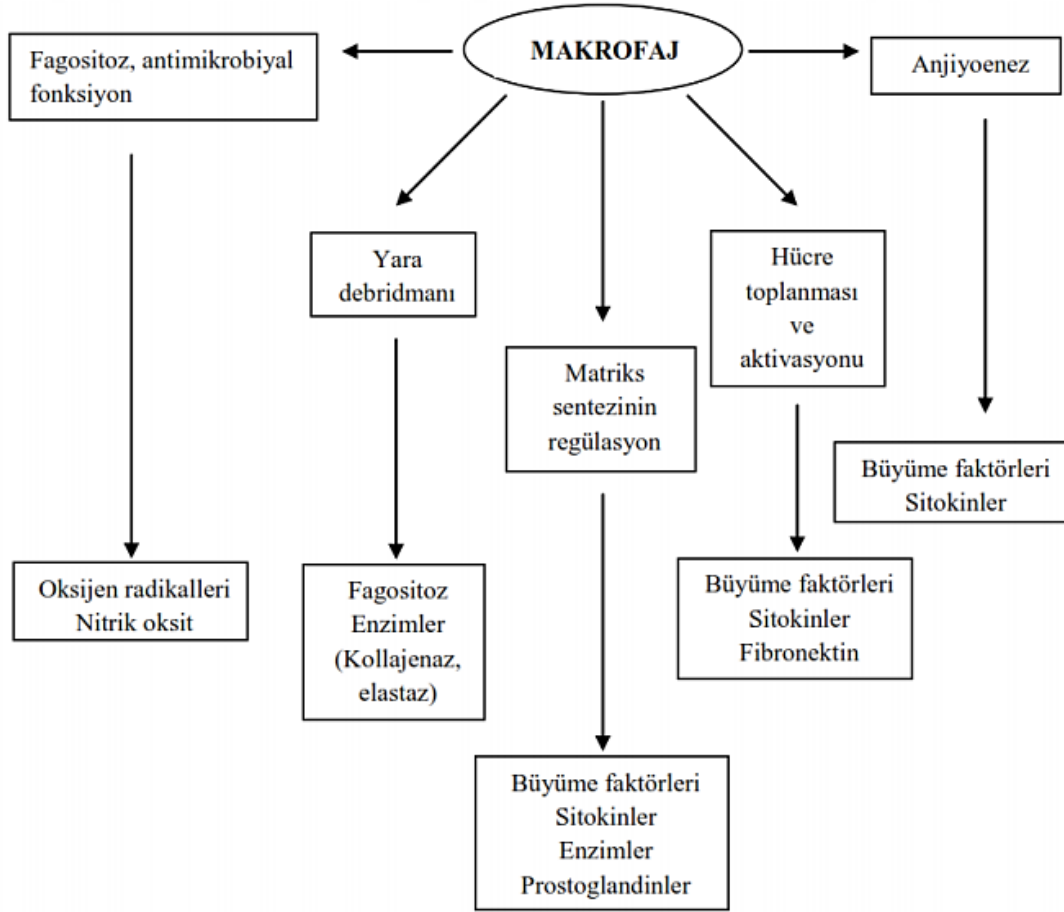
İstilacı mikroorganizmaları temizlemeye ek olarak, nötrofiller ayrıca yara yerindeki iltihabı düzenler ve yara iyileşmesini indüklemek için büyüme faktörleri ve sitokinler üretirler. Yara ortamında nötrofiller, makrofajların, T hücrelerinin ve TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8, CXCL2 ve monosit gibi ek nötrofillerin anahtar toplayıcıları olan kemokinlerin gen ekspresyonunu yukarı regüle etme yeteneği sergilemiştir [38]. Ayrıca nötrofillerin anjiyogenezi, fibroblastların ve keratinositlerin çoğalmasını, keratinositlerin dermal tabakaya yapışmasını (laminin 5 β -3) ve doku yeniden şekillenmesini [ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA)] destekleyen sitokinlerin ekspresyonunu arttığı gösterilmiştir [39,40]. Doğru ilerleyen bir yara iyileşmesinde nötrofiller süreci destekleyen pek çok işlevi yerine getirmiş olur [34].

Kronik yaralarda nötrofillerin görevi: Yara bölgesindeki nötrofil aktivitesi birkaç gün içerisinde tekrar değişir çünkü nötrofiller görevlerini tamamladıktan sonra yara iyileşmesinin sonraki fazına kadar elimine edilirler. Nötrofiller, yara iyileşmesinin erken dönemlerinde inflamatuvar yanıtın oluşturulmasında önemli bir rol oynarken, diğer taraftandan da gerekli yanıt oluşturulduktan sonra bu fazın inaktive edilebilmesi için bir sinyal görevi de görürler [41]. Sağlıklı yara onarımında nötrofiller, yaralanma bölgesinde işlevini tamamladıktan sonra inflamasyonun ve beraberinde gelen iltihabın uzun süreli devam etmemesi için apoptoza uğramalıdır. Nötrofillerin toplanması, konakçının korunmasında çok önemli olsa da devamlı enfeksiyon hali yarayı kronikleştirir [44]. Birçok çalışma, yara ortamındaki nötrofillerin ve bunlarla ilişkili inflamatuvar mediatörlerin uzun süreli varlığının, kronik yaraların oluşumuna ve kalıcılığına katkıda bulunduğunu göstermektedir. Örneğin, elastaz ve matris metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi nötrofil türevli proteazlar, sağlıklı hücre dışı matrisi (ECM) bozabilir [45,46]. ECM'nin ek yıkımına neden olan en büyük etken nötrofiller tarafından üretilen zararlı seviyelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre zarlarına zarar vermesidir.

Hücre dışı matriste meydana gelen bu harabiyet IL-1, TNF-a gibi iltihaplanma araçlarının ve MMP'ler gibi proteolitik enzimlerin yeniden üretimine yol açarak, bir iltihaplanma amplifikasyonu döngüsünü oluşturabilmektedir [47]. Örneğin fagositozu hızlandırmak için nötrofiller tarafından ortama salınan hücre dışı tuzakların (NET'lerin) diyabetik ayak ülserlerinde yoğun miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum diyabet hastalarında iyileşmeyi geciktirmektedir [48].

Apoptoza uğrayan nötrofiller bölgeye makrofaj infiltrasyonunu sağlar ve böylece inflamatuvar fazdan başka bir faza geçişi düzenler [42,43]. Bazı kaynaklarda nötrofillerin yara bölgesini terk ederken ters göçe uğrayabileceği, yaralanma alanından uzaklaşıp tekrar kan dolaşımına katılabileceği belirtilmiştir. Bu mekanizma ters transendotelyal göç (rTEM) olarak adlandırılır. Bu durum lokal inflamasyonu çözme mekanizması ve/veya aktif nötrofilleri vücudun diğer bölgelerine yeniden dağıtarak diğer bölgelerde inflamasyona yol açan bir mekanizma olarak görev alır [21].

Makrofaj aktivasyonu ve enflamasyon amplifikasyonu: İnflamatuvar basamağın başlamasından 48 ila 72 saat sonra yara yerinde makrofajlar hâkim olan hücre tipi haline gelir. Trombosit ve nötrofillerden salınan TGF- β , monositler için en güçlü kemotaktik maddelerden biridir. Damar dolaşımındaki monositler, yara yerine geldiği zaman etkinleşerek makrofajlara dönüşürler. Patojen eliminasyonuna devam edebilmek için fagositoz işlemi bu hücreler tarafından sürdürülür. Nekroze olan dokudaki ölü hücre debris ve toksik metabolitler temizlenir [50]. Makrofajların önemi, yara iyileşmesinde hücrel ve biyokimyasal olayları etkileyen birçok sitokin ve büyüme faktörünü salgılamasından gelmektedir. Aynı zamanda makrofajlar inflamatuvar fazdan çıkıp proliferatif faza geçişte anjiyogenez, fibroplazi ve hücre proliferasyonunun indüklenmesini sağlamasıyla kritik bir rol sahibi olurlar [49].



Şekil 2.2. Yara iyileşmesinde makrofajların rolü [49]

Deri yaralanması ile deride yerleşik makrofajlar tehlike sinyalleri ve diğer yaralanma yan ürün molekülleri aracılığıyla aktive olurlar. Çalışmalarda yaralanmadan hemen sonra yaraya sızan tek inflamatuvar hücrelerin nötrofiller olduğu belirtilmiştir [51]. Fakat bir çalışma monositlerin nötrofillerle aynı anda yara yatağına girerek vasküler sızıntı bölgelerinden geçtiğini göstermiştir [52].

İmmüitenin en önemli hücrelerinden olan doğal öldürücü hücreler (natural killer cells, NK) salgıladıkları interferon-y (IFN-y) yardımıyla makrofajları bir pro-inflamatuvar fenotipe polarize eder [53]. Bu tip makrofajlar M1 fenotipi aktive edilmiş makrofajlar olarak adlandırılırlar [54]. Bu fenotip, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra makrofaj ve yardımcı T hücre yanıtlarını indükleyen kemokinleri salgılar [55,56]. Yaralanmadan önce ciltte nispeten az sayıda yerleşik makrofaj bulunur ve yarayla ilgili makrofajların çoğu intravasküler monositlerden türetilir [57]. Yara yatağına lökositlerin toplanmasını işaret etmeye ek olarak, M1 fenotipi makrofajlar, yaralanma bölgesini temiz

tutmak için mikropları ve hücre kalıntıları yok etme ve fagosite etme kapasitesini arttırırlar. [58,59].

Anti-inflamatuvar makrofajlar: Yara yerinde apoptoza uğraması gereken nötrofillerin fagositoza uğraması eferositoz olarak adlandırılır. Eferositoz sürecinden makrofajlar sorumludur [60]. Bu eylemin kendisi, makrofajların proinflamatuvar bir fenotipten, sıklıkla M2 veya “alternatif olarak aktive edilmiş” makrofajlar olarak adlandırılan bir anti-inflamatuvar fenotipe geçişini indükler. M1 fenotipi ve M2 fenotipi birbirinden farklı iki tip makrofaj olarak düşünmek yerine, bu makrofajları pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar proses arasındaki bir aktivasyon spektrumunda var olarak karakterize etmek daha iyidir [61]. Glukokortikoidler, prostaglandinler, IL-10, IL-4/IL-13 yolu ve toll benzeri reseptörlerin (TLR'ler) bağlanması her iki fenotipin dönüşümünü hızlandıran diğer araçlar arasında yer alır [62,63]. Düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), adenosin sinyali ve mikroRNA'lar (miRNA'lar) için rolleri göstermiştir [64,65]. Anti-inflamatuvar makrofajlar, daha heterojen bir hücre popülasyonunu ifade eder. Bu hücreler, anti-inflamatuvar moleküllerin yanı sıra ECM sentezini, anjiyogenezi ve transforme edici büyüme faktörü- β gibi fibroblast proliferasyonunu destekleyen büyüme faktörleri salınımını indükleyerek inflamasyonu baskılar ve doku onarımını uyarır [66,67].

Kronik yaralarda makrofajlar: Pro-inflamatuvar makrofaj tipinden anti-inflamatuvar makrofaj fenotipine dönüşüm sekteye uğradığında, yara iyileşmesi bu fazda durur ve yara kronikleşmeye başlar [68]. Bazı sinyallerin, venöz staz ortamında deride yaygın olarak görülen aşırı demir yüklenmesi dahil, pro-inflamatuvar makrofajların varlığını uzattığı bilinmektedir [69]. Ortamda artmış pro-inflamatuvar molekül ekspresyonuna ek olarak, aşırı demir yüklü makrofajlar, IL-4, IL-10 ve CD206 gibi düşük anti-inflamatuvar belirteç seviyeleri göstermiştir [69]. Prusya mavisini boyama tekniğine dayanarak, kronikleşmiş iyileşmeye direnç gösteren yaraları olan hastalardan alınan makrofaj örneklerinde daha yüksek demir seviyelerine rastlanmıştır [70].

2.2.3. Proliferatif faz

İnflamatuvar faz tamamlanınca proliferasyon ve tamir evresi başlar. Çoğalma aşamasında anjiyogenezi yapılandırılır, vasküler kanallar yeniden kurulmaya başlar, granülasyon dokusu oluşur ve yara yüzeyi yeniden epitelize edilir. Fizyolojik yara onarımında, yara kenarındaki keratinositler doku yaralanmasından saatler sonra merkezi olarak göç etmeye başlar ve epidermin bazal tabakasından epitel kök hücreleri ve kıl folikülleri doku

yaralanmasından 2-3 gün sonra çoğalmaya başlar [71]. Yeni kan damarı oluşumu ve yeniden epitelizasyon, bazıları anti-inflamatuvar, onarım öncesi makrofajlar dahil olmak üzere bağışıklık hücrelerinden gelen çoklu kimyasal ve fiziksel sinyallere ikincil olarak gerçekleşir.

Anjiyogenez olarak adlandırılan vasküler ağın restorasyonu yeni kan damarı oluşumu için damarın köken alması ve ardından damar anastomozu olmak üzere iki aşamalı bir süreçte gerçekleşir [72]. Anti-inflamatuvar onarıcı makrofajlar, yalnızca damarların yeniden oluşturulmasını destekleyen vasküler endotel büyüme faktörünü (VEGF) üretmekle kalmaz, aynı zamanda vasküler anastomozu teşvik ettiği gösterilen iki transmembran proteini de eksprese eder [73]. Etkili yara iyileşmesi için hayati önem taşıyan anjiyogenez aşaması makrofaj eksikliği olan modellerde bozulur [72].

Fibroblastlar granülasyon dokusu inşa edilmesinde rol oynayan ana oyuncu olarak bu evrede karşımıza çıkar [74]. Tip III kollajen, fibroblastlar ve yeni kan damarlarından oluşan granülasyon dokusunun oluşumu, anjiyogenez ile eş zamanlı olarak meydana gelir. Fibroblastlar bu görevleri yerine getirirken ağırlıklı olarak, onarım öncesi makrofajlar tarafından üretilen bir molekül olan TGF- β 'dan etkilenmektedir [75,76].

Keratinositlerin çoğalarak re-epitelizasyonu gerçekleştirmesi hem granülasyon dokusundaki fibroblastlar hem de onarım öncesi makrofajların koordineli çalışmasıyla gerçekleşir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF) ve keratinositler ile aktive edilen pro-onarım, anti-inflamatuvar makrofajların ürettiği dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α) tarafından yeniden epitelizasyon ile tamamlanır [77]. Çoğalan keratinositler ayrıca fibronektin, tenascin C ve laminin 332 üretimi yoluyla bir geri besleme döngüsünde fibroblastları aktive ederler [78].

2.2.4. Onarım/ Yeniden modelleme (Remodelling)

Yaranın yeniden modellenmesi aşamasında onarım, yaralanmadan birkaç hafta sonra başlar ve bir yıla kadar devam edebilir. Vasküler ağın restorasyonu tamamlandıkça neovaskülarizasyon hızını kaybeder. Tip III kollajen daha güçlü tip I kollajene dönüştükçe yara bölgesindeki mukavemet artar ve granülasyon dokusundan yara izine geçiş başlamış olur. Yara normal dokuyu taklit etmeye çalışırken, tamamen olgunlaşmış yara izleri başlangıçtaki gerilme kuvvetinin sadece %80'ine geri dönebilir, elastikiyet ve absorpsiyon kapasitesi gibi özellikler ise normale dönemez [68]. Yeniden şekillenme fazında makrofajlar ve fibroblastlar kaybolur,

TGF- β sinyaline yanıt olarak fibroblastlardan üretilen ve yaranın kontraksiyonundan sorumlu olan miyofibroblastlar yeniden modellemeyi gerçekleştirir [79].

Birkaç ay devam edecek olan bu evrede miyofibroblastlar hızlı bir şekilde düz kas aktinini (SMA) eksprese etmeye başlar. SMA kasılma kuvvetinin üretilmesinden sorumludur [79,80]. Skar matriksindeki yeni içeriklerin sentezi ile kolajenaz gibi proteazların degradasyonu arasında bir denge oluşur. Primer iyileşen yaralarda 21.günde kollajen oluşması durur. Miyofibroblastlar, granülasyon dokusu oluşumu sırasında ortaya çıkan kolajeni bozan MMP'lerin salınmasıyla yeniden şekillenmeye katkıda bulunur [81]. Yapılan araştırmalar miyofibroblastların yaranın yeniden şekillenmesini takiben farklılaşak deri altı yağ dokusunu yenileyip yağ hücrelerine dönüşebildiğini göstermektedir. Bu süreç, kemik morfojenik protein (BMP) sinyalleşmesine ve adiposit transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açan neojenik saç foliküllerine bağlıdır [82].

Hipertrofik ve keloid skar oluşumu: Hipertrofik skarlar ve keloidler arasında klinik farklılıklar olsa da aşırı yara izleri, fizyolojik yara iyileşmesindeki anormalliklerin bir sonucu olarak oluşur ve derin dermise yönelik herhangi bir hasardan sonra ortaya çıkabilir. Patolojik skar oluşumu, yara bölgesinde kaşıntıya, ağrıya veya kontraktürlere neden olarak hastanın yaşam kalitesini hem fiziksel hem de psikolojik olarak önemli ölçüde etkileyebilir.

Hipertrofik skar genellikle yara enfeksiyonun aşırı gerilimle yara kapanması veya diğer travmatik deri yaralanmalarını takiben 4-8 hafta içinde ortaya çıkar, 6 aya kadar hızlı bir büyüme fazı gösterir ve ardından birkaç yıl içinde kademeli olarak geriler, sonunda başka semptom göstermeyen düz yara izlerine yol açar. Buna karşılık keloidler, küçük yaralanmalardan birkaç yıl sonra gelişebilirler. Keloidler genellikle uzun süre devam eder ve kendiliğinden gerilemezler. Keloidler sert, hafif hassas, parlak yüzeylidir. Epitel incelmıştır, renk pembeden mora değişir ve buna hiperpigmentasyon eşlik edebilir [83]. Yeniden modelleme aşamasında granülasyon dokusunun parçalanarak tip III kollajenin daha dayanıklı olan tip I kollajen ile değişimini dikkatli bir şekilde yürütmekte olan miyofibroblastların koordinasyonu bozulduğunda bu sonuç oluşur [84]. Araştırmalar miyofibroblastın neden olduğu fibrozisin, yalnızca TGF-p yoluyla oluşturulan sinyal düzeylerinde değil, aynı zamanda Th2'den türetilen sitokinler IL-4 ve IL-13 düzeylerindeki aşırı aktivasyon nedeniyle de oluşabileceğini göstermektedir [85,86].

2.3. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara iyileşmesini hücresel ya da biyokimyasal düzeyde etkileyen çeşitli faktörler dokuların fonksiyonel bütünlüğünün devam etmesinde olumlu ya da olumsuz etken olabilirler. Birden fazla faktör eş zamanlı olarak yara iyileşmesinin bozulmasına neden olabilir. Onarımı etkileyen faktörler klinik olarak lokal ve sistemik olarak ikiye ayrılabilir. Lokal faktörler, yaranın durumunu doğrudan etkileyen faktörler iken sistemik faktörler, bireyin iyileşme yeteneğini etkileyen genel sağlık durumları ile ilişkilidir. Bu faktörlerin çoğu birbirinden bağımsız değildir ve sistemik faktörler yara iyileşmesini etkileyen lokal faktörler yoluyla hareket eder.

2.3.1. Yara iyileşmesini etkileyen lokal faktörler

Oksijenlenme: Oksijenizasyon tüm yara iyileşme süreçleri için kritik öneme sahiptir. Hücre düzeyinde ATP aracılığıyla enerji üretimi oksijen olmadan gerçekleşmez ve tüm metabolik aktiviteler etkilenmeye başlar. Ortamda yeterli oksijen bulunması iyileşme evrelerinin her basamağında sürece katkı sunar. İnflamatuvar evrede enfeksiyonlara karşı savunma hattının oluşturulmasına, proliferasyon aşamasında anjiogenezin tetiklenmesine, keratinositlerin farklılaşp göçüne ve yeniden epitelizasyonuna, fibroblastların çoğalarak granülasyon dokusunun oluşumuna, kollajen senteziyle birlikte yara kontraksiyonun sağlanmasına destek olur [87,88]. Yara bölgesinde oksijen azlığı genellikle kan akışındaki yetersizliğe bağlı olarak ortaya çıkar. Travmalara bağlı oluşan vasküler hasarlar ve metabolik olarak sağlıklı olan hücreler tarafından devam eden oksijen tüketimi nedeniyle, yaraların mikro çevresi oldukça hipoksiktir. Yaşın ilerlemesi, periferik damar hastalıkları, venöz yetmezlikler, diyabet gibi sistemik olarak dolaşım bozukluğuna yol açan etkenler de zayıf doku oksijenasyonu için zemin hazırlayabilir. Akut yaralanmadan sonra oluşan geçici hipoksi, yara iyileşme sürecini uyaran bir sinyal görevi görür ancak uzun süreli veya kronik hipoksi yara iyileşmesini geciktirir [87,88]. Yapılan çalışmalarda transkutan olarak yapılan ölçümlerde arteriyel parsiyel oksijen basıncı (PaO_2) 100 mmHg iken yara merkezindeki oksijen basıncının 0 mmHg'ya kadar düşebildiği gösterilmiştir. Oysa yara iyileşmesi için yara dokusunda minimum 40 mmHg'lık bir oksijen basıncı gereklidir [87].

Hipoksik katmana yanıt olarak PDGF, TGF- β , VEGF, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve endotelin-1 gibi sitokinler üretilir. Bu sitokinler hücre proliferasyonu, migrasyonu, kemotaksisinin ve anjiyogenezin önemli destekleyicileridir. Normal olarak iyileşen yaralarda, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin yara iyileşmesi ile

ilişkili anahtar süreçleri uyarmak için hücrel haberciler olarak hareket ettiği düşünülmektedir. Hem hipoksi hem de hiperoksi, ROS üretimini artırır, ancak artan bir ROS seviyesi, faydalı etkiyi aşar ve ek doku hasarına neden olur [88].

Enfeksiyonlar: Travmalara bağlı olarak dış dünyaya karşı bariyer fonksiyonu yitirildiğinde normalde deri yüzeyinde tutulan mikroorganizmalar alttaki dokulara erişim sağlarlar. Bakterilerin yara iyileşme süreçleri üzerindeki etkilerine olan ilgi giderek artmaktadır. Düşük bakteri seviyeleri yara iyileşme sürecinde inflamasyonun oluşması için faydalı olurken mikroorganizmaların kontaminasyon, replikasyon ve kolonizasyonla kalıcı ya da invaziv enfeksiyonlara sebebiyet vermesi istenen bir durum değildir. Etkili dekontaminasyon olmadığında, mikrobiyal klirens eksik olduğundan inflamasyon uzayabilir. Hem bakteri hem de endotoksinler, interlökin-1 (IL-1) ve TNF-a gibi proinflamatuvar sitokinlerin uzun süreli yükselmesine yol açabilir ve inflamatuvar fazı uzatabilir ve yara kronikleşebilir. Bu uzun süreli iltihaplanma, aynı zamanda, ECM'yi bozabilen bir proteaz ailesi olan matris metalloproteazların (MMP'ler) seviyesinin artmasına da yol açar. Artan proteaz içeriğine paralel olarak, doğal olarak oluşan proteaz inhibitörlerinin düşük bir seviyesi meydana gelir. Proteaz dengesindeki bu kayma, kronik yaralarda görülen büyüme faktörlerinin dengesinin hızla bozulmasına neden olabilir [89].

Enfeksiyonun tipik klinik özelliklerinin yokluğunda yara iyileşmesi gecikebilir ve kritik kolonizasyon veya lokal enfeksiyon kavramı giderek gündeme gelmektedir. Yara kolonizasyonundan enfeksiyona ilerleme, yalnızca bakteri sayısına veya mevcut türlere değil, aynı zamanda konakçının bağışıklık tepkisine, mevcut farklı türlerin sayısına, organizmaların virülansına ve farklı türler arasındaki sinerjistik etkileşimlere de bağlıdır. Kronik yaralardaki bakterilerin, bakterilerin konak savunmasından korunduğu ve antibiyotik tedavisine direnç geliştirdiği biyofilm toplulukları içinde yaşadığına dair artan kanıtlar vardır [89].

Olgun biyofilmler korumalı mikro ortamlar geliştirir ve geleneksel antibiyotik tedavisine daha dirençlidir. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve β -hemolitik streptokoklar, enfekte ve klinik olarak enfekte olmayan yaralarda yaygın bakterilerdir [89]. *P. aeruginosa* ve *Staphylococcus* türleri, yaralardaki bakteriyel enfeksiyonda önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir. Pek çok kronik ülser muhtemelen *P. aeruginosa* içeren biyofilmlerin varlığı nedeniyle iyileşme göstermez. Biyofilm oluşumu bakterileri istilacı polimorfonükleer nötrofillerin (PMN'ler) fagositik aktivitesinden korur [90].

2.3.2. İyileşmeyi etkileyen sistemik faktörler

Yaş: Hücresel ve moleküler düzeyde yapılan birçok klinik ve hayvan çalışması, yara iyileşmesinde yaşa bağımlı değişiklikleri ve gecikmeleri incelemiştir. Artan yaşla birlikte dokuların rejenerasyon hızı düşse de sağlıklı yetişkin bireylerde yaşlanmanın yara iyileşmesinde geçici bir gecikmeye neden olduğu, ancak iyileşme kalitesi açısından gerçek bir bozulmaya neden olmadığı yaygın olarak kabul edilmektedir [91,92]. Yaşlılarda gecikmiş yara iyileşmesi, kemokin üretimindeki değişiklikler ve düşük makrofaj fagositoz kapasitesi ile yara bölgesine gecikmiş T-hücre infiltrasyonu gibi değişmiş bir inflamatuvar yanıtla ilişkilidir [93]. Gecikmiş yeniden epitelizasyon, kollajen sentezi ve anjiyogenez, genç farelere kıyasla yaşlı farelerde de gözlenmiştir. İyileşme kabiliyetindeki yaşa bağlı değişikliklerin gözden geçirilmesi, iyileşmenin her aşamasının, artan trombosit agregasyonu, artan inflamatuvar mediatörlerin salgılanması, makrofaj ve lenfositlerin gecikmeli infiltrasyonu, bozulmuş makrofaj işlevi, azalmış büyüme sekresyonu dahil olmak üzere yaşa bağlı karakteristik değişikliklere bağımlı olduğunu göstermektedir [91].

Stres: Stresin insan sağlığı üzerindeki etkileri üzerine yapılan yaklaşık bir asırlık araştırmalar stres ve bağışıklık fonksiyonu arasında daha da yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir. Stresin bağışıklık sistemi işleyişini nasıl etkilediğini konu alan pek çok çalışma, stres kaynaklı nöroendokrin bağışıklık dengesinin bozulmasının kardiyasküler sistem hastalıklarından diyabet ve kansere kadar pek çok hastalığın önünü açtığını kanıtlamıştır [94,95].

Stres etkenleri doğrudan hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ve sempatik-adrenal medüller eksenleri aktive ederek hipofiz ve adrenal hormonların salınmasına neden olur. Bu hormonlar arasında adrenokortikotropik hormon, kortizol, prolaktin ve katekolaminler (epinefrin ve norepinefrin) bulunur. Murin ve insan çalışmaları, kortizol seviyelerindeki artışla erken inflamatuvar yanıtın down-regülasyonunun gecikmiş yara onarımı ile sonuçlandığını ortaya koymuştur ve stres ile yara iyileşmesini birbirine bağlayan birkaç potansiyel hücresel mekanizma tanımlamıştır. Stres, glukokortikoidleri (GC'ler) upregüle eder ve yara bölgesindeki proinflamatuvar sitokinler IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın seviyelerini azaltır. Stres ayrıca yara bölgelerindeki IL-1 α ve IL-8 ekspresyonunu da azaltır ve bunların her ikisi de yara iyileşmesinin ilk inflamatuvar fazı için gerekli olan kemotaktanlardır. Ayrıca, GC'ler, farklılaşma ve proliferasyonu baskılayarak, gen transkripsiyonunu düzenleyerek ve bağışıklık hücresi gen ekspresyonunu azaltarak bağışıklık hücrelerini etkiler. Yani glukokortikoid hormonlar ve katekolaminlerin aracılık ettiği gen ekspresyonundaki değişiklikler, bağışıklık fonksiyonunu

düzensiz hale getirebilir. Bu nedenle psikolojik stres, yara bölgesindeki normal hücre aracılı bağışıklığı bozar ve iyileşme sürecinde önemli bir gecikmeye neden olur [96,97].

Diyabet: Diyabet pankreastaki beta hücrelerinden salgılanan insülindeki yetersizlik veya insülin yanıtındaki bozukluk neticesinde ortaya çıkan, kan şekerinin yükselmesiyle karakterize olan ve uzun vadede vasküler sistemde hasarlara yol açan metabolik bir hastalıktır. Son yüzyılda insanların yaşam şeklinin değişmesiyle diyabet ve komplikasyonları tüm dünyada morbidite ve mortalite oranlarını artırmış ve sağlık bakım maliyetlerine ciddi bir yük getirmiştir.

Uzun süreli hiperglisemi kan damarlarında anjiopatiye neden olur. Damar iç yüzeyindeki endotel tabakasına ait hücreler yüksek kan şekere maruz kaldıklarında bazal membran kalınlaşır ve daha kırılgan hale gelir. Zaman içerisinde mikrosirkülasyon ve makrosirkülasyonun bozulmaya başlar. Diyabetik bireylerde akut yaraların iyileşmesinde gecikmeler meydana gelir. Ayrıca, diyabetli kişilerin en az %15'ini etkilediği düşünülen kronik iyileşmeyen diyabetik ayak ülserleri (DAÜ'lar) diyabetin ciddi bir komplikasyonudur. Alt bacak ve ayak amputasyonların önde gelen nedenlerinden biridir. Azalan hücre ve büyüme faktörü yanıtı da dahil olmak üzere bir dizi çoklu mekanizma, periferik kan akışının azalmasına ve lokal anjiyogenezin azalmasına yol açar ve bunların tümü, DAÜ'lü kişilerde iyileşme eksikliğine katkıda bulunabilir [98]. Venöz staz hastalığı ve basınca bağlı kronik iyileşmeyen yaralar gibi DAÜ'lara her zaman hipoksi eşlik eder [87]. Hem yetersiz perfüzyondan hem de yetersiz anjiyogenezden kaynaklanabilen uzun süreli hipoksi durumu, yara iyileşmesi için zararlıdır. Hipoksi, erken inflamatuvar yanıtı güçlendirebilir, böylece oksijen radikallerinin seviyelerini artırarak hasarın artmasına katkıda bulunabilir.

Hiperglisemi altında ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu ve bunların reseptörleri ile etkileşimi, diyabetik farelerde de bozulmuş yara iyileşmesi ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek metalloproteaz seviyeleri, diyabetik ayak ülserlerinin bir özelliğidir ve kronik yara sıvısındaki MMP seviyeleri, akut yaralardakinden neredeyse 60 kat daha yüksektir. Bu artan proteaz aktivitesi, doku yıkımını destekler ve normal onarım süreçlerini engeller. Diyabetik yaralarda Arızalı T-hücre bağışıklığı, lökosit kemotaksisindeki kusurlar, fagositoz ve bakterisidal kapasitedeki düşüşler, fibroblastların ve epidermal hücrelerin işlev bozuklukları gibi çeşitli düzensiz hücresel işlevler rol oynar. Bu kusurlar, diyabetli bireylerde yetersiz bakteri klirensi ve gecikmiş veya bozulmuş onarımdan sorumludur [99].

Diyabetik bireylerde ortaya çıkan nöropati, muhtemelen yara iyileşmesinin bozulmasına da katkıda bulunur. Sinir büyüme faktörü, madde P ve kalsitonin geni ile ilişkili peptit gibi

nöropeptitler, hücre kemotaksisini teşvik ettikleri, büyüme faktörü üretimini indükledikleri ve hücrelerin proliferasyonunu uyardıkları için yara iyileşmesi ile ilgilidir. Nöropeptitlerdeki azalma, diyabetik ayak ülseri oluşumunu tetikleyebilir. Ek olarak, duyuşal sinirler azaltılmış lökosit infiltrasyonu sergileyen denerve cilt ile beraber bağışıklık savunma mekanizmalarını modüle etmede rol oynar [100].

İlaçlar: Pıhtı oluşumunu veya trombosit işlevini inhibe eden antitrombotikler, enflamatuvar rahatsızlıklardaki agresif inflamasyonu önlemek için kullanılan antienflamatuvarlar ve epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) olarak adlandırılan proteinin aktivitesini engelleyerek kanseri tedavi etmek amacı ile kullanılan antineoplastik ilaçlar gibi pek çok ilaç grubu etki mekanizmalarının dizaynı sebebiyle yara iyileşme süreçlerinde aksamalara neden olabilir. Örneğin romatolojik rahatsızlıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ajan olan sistemik glukokortikoidlerin (GC), yüksek enflamatuvar yanıtı baskılaması, fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezi dahil olmak üzere hücreşel yara tepkilerinin inhibisyonu yoluyla yara onarımını engellediğı iyi bilinmektedir. Sistemik steroidler, yaraların eksik granülasyon dokusu ile iyileşmesine ve yara kontraksiyonunun azalmasına neden olur [101]. Glukokortikoidler ayrıca yaraların iyileşmesinde önemli bir transkripsiyonel faktör olan hipoksi ile indüklenabilir faktör-1 üretimini de engellerken yara enfeksiyonu riskini artırabilir. Sistemik kortikosteroidler yara onarımını engellerken, topikal uygulama oldukça farklı etkiler yaratır. Kronik yaraların topikal düşük doz kortikosteroid tedavisinin yara iyileşmesini hızlandırdığı, ağrıyı ve eksüdayı azalttığı ve vakaların %79'unda hipergranülasyon dokusu oluşumunu baskıladığı bulunmuştur [102].

Romatoid artrit tedavisinde olduğu gibi ağrı yönetimi için yaygın olarak kullanılmakta olan ibuprofen ve benzeri steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçların (NSAI'ler) sistemik kullanımı hayvan modellerinde yara iyileşmesi üzerinde anti-proliferatif bir etki göstermiştir [103]. Diyabet gibi metabolik hastalıkların bir komplikasyonu olan ateroskleroz riskini azaltmak için terapötik amaçlı kullanılan düşük doz aspirin, antitrombotik işlevi nedeniyle, fizyolojik pıhtılaşma mekanizmalarını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu durum ilerleyen aşamalarda fibroblast sayısında azalmaya, kırılma mukavemetinde azalmaya, yara kontraksiyonunda azalmaya, epitelizasyonun gecikmesine neden olmaktadır [103].

Kanser tedavisinde kemoterapi planına dahil edilen pek çok antineoplastik ilaç, hücreşel metabolizmayı, hızlı hücre bölünmesini ve anjiyogenezi inhibe etmek üzere tasarlanmıştır ancak uygun yara onarımı için kritik olan birçok evreyi de eşzamanlı baskılamış olurlar. Bu ilaçlar DNA, RNA veya protein sentezini inhibe ederek fibroplazi ve yaraların

neovaskülarizasyonunun azalmasına neden olur [101,104]. Kemoterapötik ilaçlar yaraya hücre göçünü geciktirir, erken yara matriks oluşumunu azaltır, kollajen üretimini düşürür, fibroblast proliferasyonunu bozar ve yaraların kasılmasını engeller [101]. Kemoterapi nötropeni, anemi ve trombositopeniye neden olur. Hastaların bağışıklık fonksiyonları çökmeye başlar, oksijenasyon zayıflar ve böylece yaralar enfeksiyona karşı savunmasız kalır.

Obezite: Obezite dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen büyük bir tehdittir. Obezitenin koroner kalp hastalığı, tip 2 diyabet, kanser, hipertansiyon, hiperlipidemi, felç, uyku apnesi, solunum sorunları ve yara iyileşmesinin bozulması gibi birçok hastalık riskini artırdığı iyi bilinmektedir. Obez bireyler sıklıkla, yara iyileşmesini gecikmesine bağlı olarak enfeksiyonlarla, yara bölgesinde ayrılma, hematoma oluşumu, basınç ülserleri ve venöz ülserler gibi yara komplikasyonlarıyla karşı karşıya kalırlar [105]. Hem bariatrik hem de bariatrik olmayan operasyonlar geçiren obez bireylerde yara komplikasyonlarının sıklığının arttığı bildirilmiştir [106].

Obezite yara iyileşmesini çeşitli şekillerde etkiler. Vücuttaki subkutan fazla yağ dokusu nispi hipoperfüzyon ve sonucunda oluşan iskeminin bir sonucu olarak iyileşme sürecini yavaşlatabilen kronik iltihaplanmaya yol açabilir. Enflamasyon ayrıca yara iyileşmesini daha da geciktirmeye yarayan bağışıklık tepkisini de bozabilir. Cerrahi yaralarda, obez hastalarda sıklıkla görülen yara kenarlarında artan gerilim de yara açılmasına katkıda bulunur. Yara gerilimi doku basıncını artırır [105,106]. Obezite ile mücadele edenlerde yağ dokusu hacmi arttıkça, dolaşım sistemi üzerinde ek stres oluşur ve bu durum vasküler yetmezlik, iltihaplanma, gecikmiş anjiyogenez ve zayıf oksijenlenme ile sonuçlanır. Bunların hepsi yara iyileşmesini yavaşlatabilir.

Alkol Tüketimi: Alkole uzun süreli maruziyet başta karaciğer ve pankreas olmak üzere tüm kardiovasküler sistemi kapsayan bir etkilenmeye neden olur. Travmalara bağlı yaralanmalar ve yanık yaralanmaları üzerindeki etkileri, immün hücrelerin rolü açısından değerlendirilmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık tepkisindeki spesifik değişiklikler ve alkol alımının neden olduğu adaptif bağışıklıktaki anormallikler alkolün yara iyileşmesini bozduğunu ve enfeksiyon insidansını artırdığını göstermiştir [107].

Pek çok klinik ve deneysel çalışmada akut, orta düzey ya da kronik aşırı alkol kullanımının immün sistemin modülasyonuna yol açarak vücut direncinin düşmesine neden olduğu kanıtlanmıştır. Etanol intoksikasyonu, yarada enfeksiyona karşı artan duyarlılık için bir risk faktörü oluşturur. Yara vaskülaritesindeki etanol aracılı azalma, artan yara hipoksisine ve oksidatif strese neden olur. Bağ dokusu restorasyonu da akut etanol maruziyetinden etkilenir

ve kollajen üretimini azalmasına ve yara bölgesindeki proteaz dengesinde değişikliklere neden olur [108].

Sigara: Sigara başta kronik akciğer hastalıkları olmak üzere kalp ve damar hastalıkları, periferik vasküler yetmezlik, felç ve akciğer kanseri riskini artırmaktadır. Sigara kullanımı ve gecikmiş yara iyileşmesi arasındaki ilişki klinik uygulamada iyi bilinmektedir [109]. Bu etkiler sigara dumanı içindeki toksik bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Nikotin, karbon monoksit ve hidrojen siyanürün kanıtlanmış etkileri, sigaranın hızlı yara onarımını baskılar. Kuvvetli bir vazokonstriktör olan nikotin bu etkisiyle dokulardaki kanlanmayı bozarak doku iskemisine neden olur. Diğer taraftan trombosit agregasyon eğiliminde artışa neden olarak mikrovasküler tromboz riskini artırır. Nikotin kırmızı kan hücrelerinin, fibroblastların ve makrofajların proliferasyonunu azaltır. Karbon monoksit, oksijen taşınmasını ve metabolizmasını azaltırken, hidrojen siyanür, hücresel düzeyde oksidatif metabolizma ve oksijen taşınması için gerekli enzim sistemlerini inhibe eder.

Özellikle cerrahi operasyon geçiren kişiler üzerinde yapılan klinik çalışmalarda sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında sigara kullanan bireylerde daha yavaş iyileşme ve enfeksiyon, yara reptürü, anastomoz kaçağı, yara ve flep nekrozu, epidermoliz ve yaraların gerilme mukavemetinde azalma gibi çeşitli komplikasyonlarda artış görülmektedir. Sigara içenlere elektif cerrahiden önce, ya da travma , hastalık veya acil ameliyattan kaynaklanan yaralar iyileşirken sigarayı bırakmaları tavsiye edilmelidir. Çünkü yara onarımı için azaltılmış bir kapasitenin varlığı bu hastalarda özel bir endişe kaynağıdır [109,110].

Beslenme: Beslenme yara iyileşmesi arasındaki doğru ilişkinin kurulabilmesi için besinlerle yeterli miktarda karbonhidrat, yağ ve protein alımının gerekli olduğuna şüphe yoktur. Ancak son dönemde yapılan bazı araştırmalar, arginin, glutamin, çinko, selenyum, C vitamini gibi mikronütrisyonal spesifik beslenme ürünlerinin yara iyileşmesi üzerinde önemli yararlı etkileri olabileceğini göstermiştir. Malnutrisyon ve iyileşme süreçlerine etkileri üzerine yapılan çalışmalarda klinik çıkarımlar, beslenme ve yara iyileşmesi arasındaki ilişkiyi optimize etmek için her hastanın bakım ve beslenme planının bireyselleştirilmesi gerektiğini kabul etmektedir [111].

Yetersiz beslenme veya belirli mikrobesein eksiklikleri büyük ölçüde travma ve ameliyat sonrası gecikmiş veya tehlikeye atılmış bir iyileşme sürecine yol açabilir. Tam yara iyileşmesi için hücrelerde migrasyon, anjiyogenez, kollajen birikimi, granülasyon ve dokunun yeniden şekillenmesi gerekir. Bu evrelerin gerçekleşmesi büyük ölçüde enerjinin mevcudiyetine bağlıdır. Yağlarla birlikte karbonhidratlar, yara iyileşme sürecinde birincil enerji kaynağıdır.

Glikoz, yeni dokuların anjiyogenez ve kollajen birikimi için enerji sağlayan hücresel ATP'yi oluşturmak için kullanılan ana yakıt kaynağıdır. ATP sentezi için bir kaynak olarak glikoz kullanımı, diğer amino asit ve protein substratlarının tükenmesini önlemede esastır [111]. Protein eksikliği kılcal damar oluşumunu, fibroblast proliferasyonunu, proteoglikan sentezini, kollajen sentezini ve yaranın yeniden şekillenmesini bozabilir. Aynı zamanda immün sistemi de etkileyerek daha az lökosit infiltrasyonuna yol açıp daha az fagositoz olmasına neden olur. İyileşen dokuda kırılabilirlik, enfeksiyona karşı artan duyarlılık oluşur. Dokuların yeniden şekillenmesinde önemli bir görev sahibi olan kollajen, glisin, prolin ve hidroksiprolin bağ dokusunun ana protein yapıtaşları bileşenleridir [112]. Lipidler, metabolik aktivitelerin devamı için enerji taleplerini karşılamaya yardımcı olan iyi bir kaynak olmanın yanında ve yara iyileşmesi ve doku onarımı için temel yapı taşları sağlayan hormon ve sitokin üretiminde kritik bir göreve sahiptir. Memeliler tarafından *de novo* sentezlenemeyen çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), esas olarak n-6 yağ asitleri (omega-6) ve n-3 yağ asitleri (omega-3) olmak üzere iki aileden oluşur. Sağlığa olan yararları yaygın olarak tartışılan eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) gibi omega-3 yağ asitlerinin, yara bölgelerinde proinflatuar sitokin üretimini, hücre metabolizmasını, gen ekspresyonunu, anjiyogenezi ve bağışıklık fonksiyonunu iyileştirmek suretiyle etkilediği bildirilmiştir [113].

C vitamini (L-askorbik asit), A vitamini (retinol) ve E vitamini (tokoferol) güçlü anti-oksidan ve anti-inflatuar etkiler gösterir. C vitamini eksikliklerinin iyileşmeye dair negatif etkileri kollajen sentezinde ve fibroblast proliferasyonunda azalma, anjiyogenezde azalma ve kılcal kırılabilirliğin artmasıyla bağlantılıdır. Ayrıca, C vitamini eksikliği, bağışıklık tepkisinin bozulmasına ve yara enfeksiyonuna karşı duyarlılığın artmasına neden olur [111,113]. A vitamininin biyolojik özellikleri arasında antioksidan aktivite, artan fibroblast proliferasyonu, hücresel farklılaşma ve proliferasyonun modülasyonu, artan kollajen ve hiyalüronat sentezi ve MMP aracılı hücre dışı matris bozulmasının azalması yer alır [114].

2.4. Yara İyileşmesinde Etkinliği Kanıtlanmış Maddeler

2.4.1. Dekspantenol

Cilde topikal olarak uygulandığında, dekspantenol kolayca emilir ve enzimatik bir reaksiyonla hızla koenzim A'nın bir bileşeni olan pantotenik aside dönüştürülür. B kompleks vitamin ailesinin (B5 vitamini) bir üyesi olan pantotenik asit, 1934'te maya hücreleri üzerindeki proliferatif etkilerinin gözlemlenmesiyle ilk olarak topikal bir merhem olarak kullanılmaya

başlanmıştır. Günümüzde, pediyatrikten yetişkin kullanımına kadar değişen, bireysel ihtiyaçlara göre uyarlanmış farklı topikal dekspantenol preparatları (krem, merhem, damla, jel, losyon, yağ, merhem, solüsyon ve sprey) mevcuttur. Ayrıca ağız ve boğaz tahrişlerinde yumuşatıcı olarak pastil formuyla da kullanılmaktadır [115,116].

Koenzim A, ciltteki stratum corneum lipid tabakaları için önemli olan yağ asitleri ve sfingolipidlerin sentezini katalize eder. Epitelin fizyolojik fonksiyonlarının devamı için gerekli olan dekspantenol, epidermal farklılaşmayı artırarak cilt yenilenmesini destekler, cildin bariyer özelliklerini arttıran bir nemlendirici gibi davranır ve onarımı kolaylaştırır [120,121]. Kuru cilt koşullarında, azalan hidrasyonu telafi eder [117, 118]. Ayrıca biyofilm oluşumunun önlenmesinde aktivite gösterdiği ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu belirtilmiştir [119,122]. Bu özellikler dermatolojik alanda yaygın olarak kullanılan çeşitli topikal dekspantenol içeren galenik formülasyonların geliştirilmesini teşvik etmiştir.

Baron ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada dekspantenolün üç yara iyileşme evresinin tamamında aktivite sergilediğini öne sürmüştür. Aslında, dekspantenolün çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında yara iyileşmesinin farklı adımlarına yardımcı olduğu gösterilmiştir [116,123].

Marquardt ve ark. üç boyutlu cilt modelini kullanarak dekspantenolün yara iyileşmesi ve gen regülasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Deri yüzeyinde yara oluşturmak için, sıralı olmayan fraksiyonel ultrapulslu bir CO₂ lazeri kullanılmıştır. Daha sonra, yaralı deri modelleri, üç gün boyunca çeşitli %5 dekspantenol içeren merhemler veya vazelin ile muamele edilmiştir. Lazerle ışınlanmış tedavi edilmeden bırakılmış 3D cilt kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Farklı zamanlarda deri örnekleri üzerinde histolojik incelemeler yapılmış, mikrodizi ve kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizleri gerçekleştirilmiştir. %5 dekspantenol içeren formülasyonlar ile tedavi edilen örnekler, CO₂ lazerle ışınlanmış fakat tedavi edilmemiş kontrol grubu örnekleri ve vazelin ile tedavi edilen yara örneklerine kıyasla daha hızlı iyileşme göstermiştir. Kültür analizleri, gözlenen olumlu etkinin merhem bazından değil, dekspantenolden kaynaklandığını doğrulamıştır. qRT-PCR analizlerine göre ise yara iyileşmesinin üç fazında etkili olan proinflamatuvar bir sitokin olan interleukin (IL)-1 α 'nın ve yara iyileşmesinin bir düzenleyicisi olan matris metalloproteinaz 3'ün (MMP3) gen ekspresyonları upregüle olmuştur. Sonuçlar kayda değerdir, çünkü tedavi olmaksızın, IL-1 α ve MMP3 ekspresyonu, fraksiyonel ultrapulslu CO₂ lazer ışınlamasının ardından gerçekte aşağı regüle edilir [124,125].

Wiederholt ve ark.'nın araştırmasında ise kalsiyum pantotenat (20 µg/mL) ile inkübe edilen dermal fibroblastlarda, tedavi edilmeyen hücrelere kıyasla gelişmiş bir proliferasyon varlığının saptandığı ve bu durumun pantotenatın dermal fibroblastların proliferasyonu üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğunu ortaya koyduğu belirtilmiştir. Kalsiyum pantotenat tarafından yaraların iyileşmesinde büyük önemi olan sitokinlerden IL-6 ve IL-8'i kodlayan genlerin upregüle olduğu saptanmıştır [126,127].

Başka bir çalışmada, Schmitt ve ark., yine sıralı olmayan fraksiyonel ultrapulslu CO₂ lazer ile standart lezyonlar uyguladıktan sonra dekspantenolün mukozal yara iyileşmesi üzerindeki moleküler etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, *in vitro* D keratinize edilmemiş insan mukoza zarı modeli kullanılmıştır. Lazerle yara oluşturulmasından hemen sonra modellere, 5 gün boyunca %5 dekspantenol ve plasebo içeren bir merhem topikal olarak uygulanmıştır. Kültür ortamı, dekspantenol veya proliferasyonu arttırdığı bilinen diğer bileşenlerden arındırıldıktan sonra yapılan histolojik incelemeler, dekspantenol içerikli merhem ile tedavinin plaseboya kıyasla yara iyileşmesini indüklediği sonucunu ortaya koymuştur. Gen ekspresyonu analizleri, dekspantenolün topikal uygulamasının, CXCL10 geni, müsin protein ailesi genleri ve retinoik asit reseptör yanıt veren protein 1 geni (RARRES1) gibi yara iyileşmesinde rol oynayan çeşitli genlerin 1,5 kat upregülasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [128].

2.4.2. *Centella asiatica*

Gotu Kola, Bua-bok, Tiger otu veya Indian Pennywort olarak da bilinen *Centella asiatica*, Umbelliferae olarak da bilinen *Apiaceae* familyasının çok yıllık otsu bir bitkisidir [129]. Tarih öncesi çağlardan beri kullanılan bu tıbbi bitki besin değeri ve tedavi edici özellikleri olması nedeniyle özellikle Güneydoğu Asya'da, Çin, Hindistan ve Sri Lanka gibi ülkelerde geleneksel tıp uygulamalarında önemli bir değere sahiptir. Lupus, egzama, sedef hastalığı, cüzzam ve varis ülserleri gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavisi için tavsiye edildiği gibi romatizma, inflamasyon, sifiliz, epilepsi, histeri, enteritlerde dehidratasyon amacıyla da kullanımına rastlanmıştır. Diğer şifalı bitkilerin aksine, *Centella asiatica* oldukça kapsamlı deneysel ve klinik araştırmalara tabi tutulmuştur. Günümüzde deneysel olarak kanıtlanmış sedatif, analjezik, antidepresif, antimikrobiyal, antiviral ve immünomodülatör etkilerinin araştırılmasına yönelik daha çok klinik çalışmaların yapılması bu bitkinin çok yönlü terapötik potansiyelinin ayrıntılı bir biçimde ortaya konulması için gereklidir [130].

C. asiatica'nın antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif ve epitelizan özellikler taşıması, *C. asiatica* özlerinin kollajen sentezini ve mikrosirkülasyonu geliştirerek

yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini göstermiştir [131,134]. *C. asiatica* özü geleneksel tıp uygulamalarında fibroproliferatif lezyonların yol açtığı keloidlerin yönetimi için kullanılmıştır. Keloid oluşumunun patolojisinde dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) kollajen oluşumunu indükler ve böylelikle kollajenin daha yüksek proliferasyonu ve birikimi meydana gelir. Plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1) ise plazminojen aktivatörlerinin etkisini engeller. Bu faktörler kan damarlarını tamir eden, onları koruyan ve kan kaybını önleyen pıhtıların çözülmesinden sorumludur [135].

Centelloidler olarak da bilinen *C. asiatica*'da bulunan aktif bileşenler pentasiklik triterpenlerdir. Asiatik asit (AA), asiaticoside (AS), madecassoside (MS) veya brahminosid ve madecassik asit (MA) veya brahmik asit tedavi edici özellikleri sunan ana triterpenlerdir [136,137]. Bitkideki bu biyoaktif bileşiklerin miktarı ekstraksiyon için tercih edilen solüsyon türüne bakılmaksızın, ekstraksiyonları için kullanılan doku ve ekotipe bağlıdır [138]. *C. asiatica*'nın alkol ekstraktının hem oral hem de topikal tedavisinin farelerde kollajen ve hidrokisprolin sentezinin uyarılmasıyla, olgunlaşmayı ve kollajenin çapraz bağlanmasını uyardığı gösterilmiştir [139]. Yara iyileşmesi, özellikle anjiyogenezin artması, tip I kollajenin uyarılmasının yanı sıra fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) üretiminin artmasından kaynaklanabilir [140]. Bu, T β R2 kinazdan bağımsız olan yolakların aktivasyonu yoluyla gerçekleşir [141]. Erken anjiyogenezde FGF, endotel hücrelerinin proliferasyonunu indüklerken benzer şekilde VEGF, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonunun düzenlenmesi yoluyla yeni kılcal damarların oluşumuna katkıda bulunur [142]. Ayrıca VEGF, vazodilatasyonu ve hücre dışı matrisin oluşumunu uyarır [143].

C. asiatica, Interleukin1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) ve Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α), E2 (PGE2), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve prostaglandin'deki azalma ile gözlemlenen bir anti-inflamatuvar etki göstermiştir [144-147]. Buna ek olarak, *C. asiatica*'nın lipoksijenaz aktivitesini inhibe ederek ve proteinaz aktivitesini azaltarak inflamasyonu azalttığı ve böylece protein denatürasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [148].

C. asiatica kullanımıyla ilgili mevcut zorluklardan biri, aktif bileşenlerinin (esas olarak AS, AA, MS ve MA) düşük biyoyararlanıma sahip olmasıdır. Biyoyararlanımlarını artırmak için nanopartikülleri, nanolifleri, hidrokolloidleri, hidrojel ve nanokapsülasyonu içeren çeşitli taşıyıcı sistemler üzerinde çalışılmaktadır [149-151]. Farklı çalışmalar, *C. asiatica* özelliklerinin özellikle nanoenkapsülasyon kullanılarak geliştirilebileceğini göstermiştir.

Uygun taşıyıcı sistemler varlığında bu aktif bileşenlerin biyolojik aktiviteleri, gelişmiş biyoyararlanımı sayesinde %50-60'a kadar arttırılabilir [152].

2.4.3. *Hamamelis virginiana* L.

Cadı fındığı olarak da isimlendirilen *Hamamelis virginiana* L. Kuzey Amerika'nın Atlantik kıyılarına özgü yaprak döken bir ağaçtır. Geleneksel tıptaki veriler *Hamamelis virginiana*'nın yapraklarından ve kabuğundan elde edilen ekstraktların ve distilatların cilt bakım ürünlerinin bir parçası olarak özellikle güneş yanığı, cilt tahrişi, atopik egzama gibi dermatolojik rahatsızlıkların tedavisinde uzun yıllardır tıbbi bir bitki olarak tercih edildiğini göstermektedir. Bitkinin antienflamatuar özellikleri yara iyileşmesini desteklemektedir. 1878'den beri Almanya'da ve diğer birçok ülkede şifalı bir merhem olarak yerini alan *Hamamelis virginiana*, yerli Kızılderililer tarafından ateş, soğuk algınlığı ve cilt iltihaplarını kapsayan geniş bir hastalık listesi için kullanılmıştır. *Hamamelis* merheminin geleneksel tıbbi kullanım alanları, küçük cilt yaralanmaları, cilt ve mukoza zarlarının lokal iltihaplanması ve hemoroidlerdir [153].

Avrupa İlaç Ajansı hamamelisin çeşitli cilt hastalıklarının tedavisi için %30-%60 etanolle hazırlanmış hidroalkolik yaprak veya ağaç kabuğu ekstraktlarının ve bitkinin taze veya kurutulmuş kısımlardan elde edilen %6-%15 etanol distilatının konsolide kullanımını bildirmiştir. Alman Komisyonu E (2012) monografı, temel olarak insan deneyimine ve uzun süreli kullanıma dayanarak, küçük cilt yaralanmaları için *H. virginiana* kullanımını doğrulamıştır [154].

Klinik öncesi ve klinik araştırmalar, *Hamamelis virginiana* özlerinin antienflamatuar, antiviral, anti-inflamatuar ve anti-oksidatif özellikleri olduğunu bildirmektedir. Aktiviteden sorumlu bileşikler ile etkinlik arasındaki korelasyon henüz net olarak belirlenememiştir. Ancak *hamamelis* kabuğu ve yapraklarında bol miktarda bulunan hidrolize edilebilir ve yoğunlaştırılmış tanen fraksiyonlarından yani proantosiyanidinlerden köken aldığı varsayılmaktadır. EMA Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi bildirisine göre, *hamamelis* kabuğu yapraklardan daha yüksek oranda tanen (%8-12'ye karşı %3-10) ve daha yüksek oranda *hamamelitannin* (HT, %1-7) içermektedir [153].

H. virginiana yaygın geleneksel kullanımına ve bazı klinik çalışmaların varlığına rağmen, *hamamelis* özlerinin cilt üzerindeki anti-inflamatuar etkilerinin mekanizmaları yeterince belgelenememiştir [155,156]. Literatürlerde bildirilen dermatitle ilgili insan üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, etkinlik gösteren bitki distilatları kullanılırken, yedi sağlıklı gönüllünün

katıldığı başka bir pilot çalışmada, sodyum lauril sülfatın neden olduğu cilt iltihabı üzerinde yarı katı bir formülasyonun etkinliği test edilmiştir [157].

Bazı *in vitro* çalışmalar proantosiyanidinlerin antioksidan etkilerini araşidonat 5-lipoksijenaz (5-LOX) ve trombosit aktive edici faktör (PAF) üzerindeki baskın inhibisyona, özellikle de esasen endoteller üzerinde protektif etkiler gösteren hamamelitanine bağlamıştır [159,160]. İnsan kökenli keratinositlerle hücre kültüründe yapılan iki ön çalışma, hamamelis kabuğu ekstresinin antioksidan ve sitoprotektif etkilerinde gallotaninler ve proantosiyanidinlerin olası rolünü öne sürmüştür. Ayrıca, *H. virginiana* özütü *in vitro* olarak antibakteriyel aktivite de göstermiştir [161-163].

2.4.4. Gümüş sülfadiazin

Gümüş sülfadiazin (SSD) ve topikal olarak yaygın bir şekilde kullanılan krem formları, yanık tedavisinde kullanılan şaşırtıcı düzeyde düşük toksisiteye sahip antimikrobial bir ajandır. Vücut yüzey alanının büyük bir yüzdesini kaplayan ciddi yanıklar, sonraki aşamada yüksek enfeksiyon ve ölüm riski nedeniyle ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Cilt bariyerinin bozulması, bakteriyel besinlerin yanık ortamında hazır bulunması, yanık deriye giden vasküler kaynağın bozulması ve sistemik rahatsızlıklar gibi bir dizi faktör, bir araya gelerek yanık yaralarını enfeksiyona karşı özellikle duyarlı hale getirmek için bir araya gelerek immün baskılanmaya yol açar. 20. yüzyılda antibiyotik ve antifungal ilaçların tanıtılması, yanıklara uygulanabilen topikal antimikrobiyallerin kullanımı, erken eksizyon ve aşılamının yaygın olarak benimsenmesi gibi gelişmeler sağkalımı önemli ölçüde artırmaya yardımcı oldu. Bununla birlikte, antibiyotiklere ve diğer antimikrobiyallere karşı mikrobiyal dirençteki amansız artış, yanık enfeksiyonlarını önlemek ve bunlarla mücadele etmek için alternatif yaklaşımların yeniden araştırılmasına yol açmıştır.

Gümüş içeren karışımlar ve özellikle gümüş sülfadiazin (SSD) kısmi ya da tam kalınlıktaki karmaşık yanıklarda, yanık enfeksiyonlarıyla mücadelede standart topikal bir antibiyotik olarak kabul görmüştür [164]. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yanı sıra bazı mayalara karşı da etkili olan geniş spektrumlu bakterisidal bir antimikrobiyal olan SSD, gümüş ve sülfadiazinin kombinasyonundan oluşur. SSD'den salınan gümüş iyonları, membran pertürbasyonu, DNA sentezi inhibisyonu ve serbest radikal üretimi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla antibakteriyel etkiler gösterirken, bir antibiyotik olan sülfadiazin o kadar etkili olmayabilir [165].

Bakteri yaşam döngüsünün bir şekli olan biyofilm oluşumu bakterilerin antibiyotik ve antimikrobiyal ajanlara direnç mekanizmaları geliştirmesini sağlayarak kronik yara enfeksiyonlarına sebep olur. Yapılan klinik mikrobiyal çalışmalarda biyofilm tabakalarının cilt substratları üzerinde serbest bakterilere kıyasla 50 kat daha fazla ilaç direnci sergilediği gösterilmiştir [166]. Bu bağlamda, vankomisin ve SSD kullanarak MIC'e karşı bakteri öldürme konsantrasyonlarının analiz edildiği bir araştırmada MBC/MIC ve MBEC/MIC oranları SSD için vankomisine kıyasla 1/8 ve 1/4 oranında bulunmuştur. Bu, SSD'nin hem planktonik durumda hem de biyofilmde bakterileri yok etmede etkili olduğunu göstermiştir [167].

Campos ve ark'nın yürüttüğü bir araştırmada ilaç yüklü çapraz bağlı kitosan filmlerinin iyileşme potansiyelinin değerlendirilmesi için *in vitro* bir yara iyileştirme modeli geliştirilmiştir. İnsan osteosarkomundan köken alan bir hücre hattı olan MG-63, tek tabaka olarak kültürlenmiş ve %100 birleşmeye ulaşıldığında, bir sıyrıcı kullanılarak yara modeli oluşturulmuştur. Yara iyileşme süreci 21 gün boyunca takip edilerek değerlendirilmiş ve hücreler 0, 7, 14 ve 21 günlük inkübasyondan sonra boyanmıştır. Yaralar kitosan film (CH), kitosanisülfite bloke diizosiyanat çapraz bağlı film (CH-X), gentamisin yüklü kitosan çapraz bağlı film (CH-X-GE) ve gümüş sülfadiazin (CH-X-SS) yüklü kitosan çapraz bağlı film ile muamele edilmiştir. Kitosan (CH), bisülfite bloke diizosiyanat (BBDI), gentamisin (GE) ve gümüş sülfadiazin (SS)'in yara iyileşme yanıtı üzerindeki etkileri yara dolum hızı parametresi göz önüne alınarak mikroskopik olarak analiz edilmiştir. CH ve CH-X filmleri, çalışılan süre boyunca herhangi bir ilaç yüklü film uygulanmamış pozitif kontrole kıyasla hücre büyümesi üzerinde zararlı etkiler göstermemiştir. CH-X-GE, bu dönemde gentamisin salınımına bağlı olarak ilk haftada yara dolum hızında azalma göstermiştir. CH-X-SS, muhtemelen gümüş sitotoksitesi ve hücreler tarafından gümüş birikmesi nedeniyle incelenen tüm dönem boyunca yara dolum oranlarında azalma göstermiştir [168].

2.4.5. *Hypericum perforatum*

Hypericaceae familyasının bir üyesi olan *Hypericum perforatum*, kullanımı antik çağ ve orta çağa kadar uzanan Avrupanın en eski şifalı bitkileri arasındadır. Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika bölgelerine özgü sarı çiçekli, çok yıllık bir bitkidir. Sarı kantaron bitkisinin geleneksel olarak çiçeklenip hasadının yapıldığı tarihler St. Johns gününe denk geldiği için halk arasında St. Johns Wort olarak da bilinir. Yüzyıllar boyunca çok çeşitli preparatları hazırlanan bu tıbbi bitkinin *hyperici herba* olarak adlandırılan çiçek açan taze kısımları ya da kurutulmuş aerial kısımları tedavi edici olarak kullanılmıştır. Ham bitki materyalinin kalitesi, yüksek ve sürekli aynı kalitede ürünlerin hazırlanması için gereklidir. Tüm tıbbi bitkilerde olduğu gibi

harici iklim koşulları ve toplanma zamanı gibi etkiler, hasat ve kurutma şekli ham maddenin kalitesinin değişken olmasına yol açar. Bu nedenle, üreticiler en verimli sonucu alabilmek için tipik olarak bitki materyalini karıştırırlar [169].

Hypericum perforatum içindeki önemli biyoaktif bileşenler tomurcuklarda, çiçeklerde ve dal uçlarında yoğunlaşmıştır. *Hypericum* özleri, şimdiye kadar en iyi karakterize edilmiş bitkisel ilaçlar arasındadır. Çok yönlü etki potansiyeli içeriğindeki 150'den fazla bileşen veya çok sayıda katkı maddesinin birbiri üzerinde sinerjik etki yaratmasıyla oluşur. Yine de bileşiklerinin %30-50'si henüz yapısal olarak tanımlanamamıştır ve bunlardan bazılarının klinik etkilere katkı sunmakta olduğu düşünülmektedir.

H. perforatum'un etkilerini oluşturan karakteristik bileşenleri naftodiantron türevi olan hiperisin ve psödohiperisin ile floroglusinol türevi olan hiperforin ve adhiperforindir. Gelişim evresine bağlı olarak ham ilaç materyalindeki konsantrasyonu %0,03 ile %0,3 arasında değişmekte olan hiperisin ve psödohiperisin antidepresan etkilerden sorumludur. ESCOP monograflarında, *H. perforatum*'un hidroalkolik ekstraktlar ve tentürlerinin 'hafif depresif bozukluk epizotları veya hafif ila orta şiddette depresif epizodlar' için terapötik endikasyonları listelenmiştir. Ancak bu tıbbi bitkinin geleneksel kullanımı çok daha geniştir. Antik medeniyetlerden beri uygulanan maserasyon tekniğiyle yani zeytinyağı içinde güneş ışığı altında bekletilerek bitkinin özüne ulaşılabilir. Yağ bazlı preparatları dispeptik şikayetlerde, miyajide, antiviral ve antibakteriyel etkileri nedeniyle haricen dermatolojik hastalıklarda, antienflammatuvar olarak hemoroidlerde, yara iyileştirici olarak ve özellikle de yanık yaraları ile bası ülserlerinde oral ya da topikal yolla kullanılmaktadır [170].

Damlar ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sığır kaynaklı ksenograft ile doldurulmuş defektlerde *H. perforatum*'un kemik iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir. Çalışmalar, *H. perforatum*'un kollajen birikimini arttırdığını, iltihaplanma süresini kısalttığını ve yara iyileşmesi sırasında fibroblastların göçünü durdurduğunu göstermiştir [171,172].

Uzunhisarcıklı ve Yerer'in çalışmasında *Hypericum perforatum* ve nar çekirdeği özü yağının bir anti inflamatuvar ajan olarak kurkumin ile birlikte yara iyileştirme etkinliği araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak ibuprofen kullanılmıştır. Uygulanan bileşiklerin yara iyileştirici etkilerini belirlemek için öncelikle etkili konsantrasyonları tespit edilmiş, kültüre edilen HaCaT keratinosit hücreleriyle bir iyileşme belirteci olan migrasyon deney modeline göre ileri testler yapılmıştır. *H. perforatum*, nar çekirdeği yağı, ibuprofen ve kurkuminin tek başına HaCaT hücrelerinde sitotoksik/proliferatif etkilerini ve bunların belirli konsantrasyonlarda kombine kullanımlarını belirlemek için gerçek zamanlı bir hücre analizörü

olan xCELLigence kullanılmıştır. Sonuçlara göre kurkumin ve *H. perforatum* kombinasyonunun yara iyileştirici etkinliğinin ibuprofen kombinasyonlarına göre daha etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sonuçlara göre, kurkumin ve nar çekirdeği yağı kombinasyonunun yara iyileştirme etkinliği ibuprofen kombinasyonlarından daha iyi olduğu ve her iki yağın da gelişmiş yara iyileştirme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır [173].

2.5.5 Sığla yağı (*Styrax liquidambar*)

Hamamelidaceae familyasına ait Anadolu sığlası olarak da adlandırılan, yöresel adıyla günlük ağacı olarak bilinen *Liquidambar orientalis* Miller (Anadolu Sığla Ağacı), ekolojik ve ekonomik açıdan oldukça önemli endemik bir tür olup, Türkiye'nin güneybatı kıyı bölgesinde özellikle Köyceğiz, Fethiye, Marmaris ve Ula'da yaygın olarak yetişmektedir. Anadolu günlük ağacı, kışın yapraklarını dökmeyen, çınara benzeyen yapraklara sahip , boyu 20 metreye kadar uzayabilen bir bitki olup ya tek cins ya da diğer ağaçlarla birlikte ormanlar oluşturarak gelişir. Balzamik salgılarıyla tanınan bu ağacın, gövdesini yaralamak suretiyle elde edilen ve yerel halk tarafından “Sığla Yağı” (*Styrax liquidambar*, *Styrax liquids*, *Orientalis sweet gum*, *Levant styrax*) olarak adlandırılan bu kompleks materyal esasen reçineli bir eksüdadır. *Liquidambar*, latince *liquidus*, Arapça amber sözcüklerinin birleşmesinden meydana gelmiştir ve güzel kokulu sıvı demektir. Sığla yağı ülkemizde bulunan *L. orientalis*'in dışında sadece Orta Amerika'da bulunan *L. styraciflua*'dan elde edilmektedir. Amerikan storax (*Sweet gum*, *Red gum*, *Styrax Americanus*, *White Peru Balsam*) olarak bilinen bu balzamin üretimi Honduras ve Guatemala'da yapılmaktadır. [174-176].

Geleneksel olarak sığla yağının elde edilişi odunlaşmış ağaç gövdesinde yara açılması işlemiyle başlar. Bu amaçla önce ağaçlarda yara açılacak kısımlar üzerindeki kabuk kısımları mart ayı sonuna doğru yontularak inceltir ve ağaçlar bir ay süreyle bu şekilde bırakılır. Mayıs ayı sonunda kaşık adı verilen aletle yaraların açılmasına başlanır. Damar adı verilen bu yaralar gövde üzerindeki balsam kanallarına girecek şekilde açılır. Bir hafta sonra yaralar tazelenir ve bu işleme sur adı verilir. Bu işlemten iki hafta sonra, damarlar içinde biriken yağ kaşıktan sıyrılarak alınır ve buna da sur arkası denir. Toplanan reçineden sığla yağının çıkarılması temmuz ayı ortasından ekim ayı sonuna kadar devam eder. Bu süre zarfı içinde, her on beş günde bir yaralar üzerinde biriken yağ, kabuk ve odun tabakalarıyla birlikte kaşıkla yontularak alınır. Halk arasında sefer adı verilen işlem esnasında işçilerin önlerine astıkları torbalar içerisinde yağı toplarlar. Kapçık adı verilen yağ ile birlikte kabuk ve odun içeren yongalar bakır kaplarda, yarım ila bir buçuk saat süreyle suda kaynatılır. Kaynatılan yongalar keçi kılından yapılmış torbalara alınır ve bu torbalar preslerle sıkıştırılarak sığla yağı elde edilir [174].

Sıgla yağı, kahverengimsi sarı renkte olup yarı katı, yapışkan ve opak bir görünüme sahiptir. Karakteristik tarçına benzer bir kokusu ve acı bir tadı vardır. Özgül ağırlığı 1,091-1,113, asit sayısı 50-85 ve sabunlaşma sayısı 160-180 gibi fiziksel özelliklere sahip olan sıgla yağı oda sıcaklığında hegzanda çözünmezken suda eser miktarda çözünmektedir. Kaliteli üretilmiş yağlar fazla su içermemeli ve %60 oranda etanolde çözünebilir olmalıdır. Eter ve aseton gibi çözücülerde alkolden daha iyi verim alınır. Etanolde çözünmesinden sonra az miktarda çözünmeyen madde kalabilmektedir [177].

Günümüzde sıgla yağı saflaştırılması, ham sıgla yağının alkol ekstraksiyonu ile gerçekleştirilir. Sıgla yağı hem serbest hem de ester halde bulunan ve toplam ağırlığın %30-45'ini oluşturan sinamik asit ile birleştirilmiş reçine alkollerinden oluşur. Bu yağın kimyasal yapısıyla ilgili yapılan araştırmalarda araştırmacıların kullanmış oldukları yöntem ve cihazlar farklı olduğundan ve farklı sonuçlar bulunmuştur. Sıgla yağının ayrıntılı kimyasal bileşimi çeşitli raporlarda ana bileşenleri α -pinen (%1,02), benzaldehit (%0,47), β -pinen (%0,15), benzil alkol (%1,22), asetofenon (%0,19), 1-fenil-1-etanol (%0,17), hidrosinnamil alkol (%41,13); trans-sinnamil aldehit (%0,24), transsinnamil alkol (%0,45,07), β -karofillen (% 3,60), stiren (% 1,56) olarak sunulmuştur [180]. Bugüne kadar yapılmış araştırmalarda içerisindeki sinamik asit, styracin, styrol, styrene, storesinol, storegenin gibi yüksek molekül ağırlıklı majör komponentlerin biyolojik etkilerinden sorumlu bulunduğu düşünülmektedir [174,177].

Hovaneissian ve arkadaşları ticari sıgla yağında yapmış oldukları bir çalışmada ise şimdiye kadar rastlanmayan ve yağın büyük bir kısmını oluşturan benzil benzoat ve benzoik asit, isovanilin, sinamik asit ve az miktarda benzil sinamat bulmuşlardır. Sıgla yağının içerdiği uçucu yağlar (esansiyel yağ) üzerine yapılan araştırmalarda uçucu yağ miktarının en fazla %1 oranında olduğu bulunmuştur. Hafızoğlu ve ark. uçucu yağ miktarını yaklaşık % 0,5 bulmuşlardır. [177-182]

Günümüzde sıgla yağı kozmetik ve parfüm sanayisinde fiksator olarak kullanılır. Parfümlerde kullanılmakta olan güzel kokulu uçucu yağlar, sıgla yağı ile sabitlenerek 24 hatta 36 saat boyunca uçmamaları sağlanır. Bu nedenle sıgla yağı parfüm sanayisinin önemli bir hammaddesidir. Ülke ekonomisine değer katan doğal bir ihraç ürünü olan sıgla yağı sabun üretiminde oldukça hoş bir koku vermesi ve cildi yumuşatması nedeniyle de hala cazibesini korumaktadır.

Günlük ağacından elde edilen sıgla yağı yüzyıllardır yöre halkı tarafından anti-ülserojenik özelliği nedeniyle mide şikayetlerinde bal ile karıştırılarak oral yoldan kullanılmıştır. Halk

arasında sığla yağı, balgam söktürücü ve astım, bronşit gibi solunum yolu hastalıklarında tercih edilmektedir. Balzamin yatıştırıcı ve analjezik özelliği olduğuna inanıldığı için özellikle romatizma ağrılarını azaltmakta kullanılmıştır. Antibakteriyel ve skatrizan etkisi varsayılarak antiseptik amaçlı yaraların iyileşmesinde pomat olarak kullanılmış, yanık ve yaranın çabuk iyileşmesi için sığla yağı ve bal karışımı emdirilmiş bezler yara bölgesine sarılarak yakı şeklinde uygulanmıştır. Ayrıca dişetlerini güçlendirmek amacıyla çiğnenerek bukkal yoldan ayrıca ağız yaraları ve aft tedavisinde de kullanılmıştır. Pomat ve yakı şeklinde uygulandığında uyuz ve mantar gibi kaşıntılı cilt hastalıklarında fayda sağlamaktadır.

Halk arasındaki geleneksel uygulamalardan yola çıkarak günümüzde sürdürülen bilimsel çalışmalar ışığında yağın antibakteriyel, antiseptik, antiparaziter, antioksidan özellikleri yanında yapısında bulunan esansiyel bileşenlerin nematisidal ve antifungal aktiviteye sahip olduğu da doğrulanmıştır. Pek çok araştırmada antioksidan, sedatif ve antikonvülsan, genotoksik ve sitotoksik özellikleri üzerinde durulmuş, yara iyileştirici etkilerini sağlayan epitelizan ve skatrizan özelliklerini teyit edebilmek adına sığla yağı *in vivo/ in vitro* çalışmaların konusu olmuştur. Canlı organizmalar üzerinde sığla yağının toksikolojik etkileri henüz çalışılmamıştır, ancak literatürlere göre sığla yağı kontakt bir alerjen olarak tanımlanmış olup, alerjenik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [181-190].

3. YÖNTEM

3.1. Sıgla Yağı

Analiz için Muğla'dan menşei Köyceğiz ve Marmaris olmak üzere iki farklı lokal üreticiden sıgla yağı temin edilmiştir. Köyceğiz menşeli olana çalışma süresince SO-1, Marmaris menşeli olana SO-2 ismi verilmiştir. Sıgla yağının etkinlik karşılaştırması için pozitif kontrol olarak yara iyileştirici etkisi kanıtlanmış olan *Centella asiatica* bitkisi ekstresi “TEKA” (BAYER) kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetilsülfoksit (DMSO)	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(Sigma- Aldrich, Almanya)
DMEM medium	(Sigma- Aldrich, Almanya)
L-Glutamin	(Sigma- Aldrich, Almanya)
Penisilin-streptomisin	(Gibco, Almanya)
Phospate Buffer Saline (PBS)	(Invitrogen, Almanya)
RPMI-1640 medium (1X)	(HyClone, Thermo Scientific),
Sodyum pirüvat	(Biochrom AG, Almanya)
Parafilm	(Pechiney, Fransa)
Thiazol Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	(Sigma- Aldrich, Almanya)
Tripan mavisi	(Roche, Almanya)
Tripsin-EDTA 10X	(Pan, Biotech)
İnsan kökenli keratinosit hücre hattı	(Cell line services-CLS,Almanya)
<i>Centella asiatica</i> bitki ekstresi “TEKA”	(BAYER, Almanya)
Sıgla Yağı 1 (SO-1)	(Köyceğiz, Muğla, Türkiye)
Sıgla Yağı 2 (SO-2)	(Marmaris, Muğla, Türkiye)

3.3 Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Cihazlar

3.3.1.Kullanılan Sarf Malzemeleri

25 cm ² 'lik hücre kültür flaskı	(Greiner bio-one, Amerika)
75 cm ² 'lik hücre kültür flaskı	(Greiner bio-one, Amerika)
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	(TPP, İsviçre)

CIM-plate 16	(Roche, Almanya)
E-plate 16	(Roche, Almanya)
Cedex Smart Slide	(Roche, Almanya)
6 kuyucuklu hücre kültür plakası	(TPP, İsviçre)
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	(TPP, İsviçre)
50, 100, ve 200 ml'lik cam şişeler	(Isolab, Almanya),
5ml, 10ml, 25 ml'lik cam pipet	(Isotherm, Türkiye),
5ml ve 10 ml'lik steril enjektör	(Ayset, Türkiye),
15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri	(Isolab, Almanya),
12 kanallı otomatik pipet	(Axygen, İngiltere),
10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipet ucu	(Eppendorf, Kanada)
10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu	(Greiner bio-one, Amerika)
2 mL'lik Eppendorf tüp	(Greiner bio-one, Amerika)
0,2 ml'lik PCR tüpü	(Greiner bio-one, Amerika)
Lam ve lamel	(Isolab, Almanya)
Şarjlı pipetör	(Starlab, Almanya)
Kryotüp (2mL)	(Greiner Bio-One, ABD)
Hücre Kazıyıcı	(Greiner Bio-One, ABD)

3.3.2.Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi	(Ohaus, Avustralya)
Inverted mikroskop	(Leica, Almanya)
Laminar flow kabin	(Heal Force,Çin)
DNA-RNA çalışma kabini HEPA/ UV PCR (UVP)	(Kanada)
Otomatik pipetler	(Eppendorf, Almanya)
Hücre sayımı için Cedex XS	(Innovatis, Amerika)
Light Cyclers 480	(Roche, Almanya)
MagNA Lyser	(Roche,Almanya)
MagNA Pure Compact	(Roche, Almanya)
Invert ışık mikroskobu	(Leica DM 300 invert mikroskop)
Mikroplaka okuyucu (ELİSA cihazı)	(Biotech,Amerika)

Mikro santrifüj	(Hettich, Almanya)
Masaüstü soğutmalı santrifüj	(Eppendorf, Almanya)
Nanodrop 2000 Spektrofotometre	(Thermo Scientific)
PCR Thermal Cycler (Gradient PCR)	(Takara, Japonya)
xCELLigence	(Roche)
Cytation 3 Multi-Mode Reader	(Biotech, Amerika)
RTCA-DP	(Roche, Almanya)
Otoklav	(Alp, Türkiye)
Otomatik pipetler	(Eppendorf)
Steril CO ₂ İnkübatörü	(Thermo Scientific)
Sterilizatör	(Nuve, Türkiye)
Su banyosu	(Nuve, Türkiye)
Vorteks	(Daihan, Güney Kore)
Derin Donduruculu Buzdolabı	(Altus, Türkiye)

3.4. Sterilizasyon

Araştırmada kullanılan tüm cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak kuru sterilizatörde 180°C’de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise 121°C, 1.5 atm/Hg’de otoklavda 20 dakika sterilize edilmiştir.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.5.1. Hücrelerin hazırlanması

Araştırmada Almanya Cell Line Services (CLS, Germany) kurumundan temin edilen ve fakültemiz bünyesinde stokta bulunan insan kökenli HaCaT keratinosit hücreleri kullanılmıştır. HaCaT keratinosit hücreleri yapışan tipte (adhere) hücrelerdir. Bulundukları yüzeyin alanı büyümeyi sınırlar, bu nedenle belirli sürelerde pasajlanması gerekmektedir. Çalışmamızda hücre yoğunluğu tutundukları yüzeyde belli bir seviyeye geldikten sonra enzimatik yolla ayrıştırılarak çoğaltılmıştır.

Stoktan çıkarılan HaCaT keratinosit hücreleri, %20’lik fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (%1 L-glutamin, %1 sodyum pirüvat) besiyeri içinde, flasklarda %95 bağıl nem ve %5 CO₂’li gaz ortamında ve 37°C’deki inkübatörde kültüre edildi.

Çoğalan hücreler yeni 25 ve 75 cm²'lik flasklara pasajlanmış ve deneylerde kullanılmak üzere hücre stokları hazırlanmıştır.

3.5.2. Hücrelerin sayımı

Araştırmada uygulanan hücre sayım yöntemi aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- Sayım yapılmadan önce flasklarda çoğalan insan kökenli HaCaT keratinosit hücreleri PBS ile yıkanmıştır.
- Kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, flask yüzeyine yapışan adhere hücrelerin kalkması için 2 ml tripsin ile muamele edilmiştir.
- Yaklaşık 3-5 dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır.
- Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine hemen besiyeri ilave edilerek, besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpü olan falkona aktarılmıştır.
- 1200 rpm' de 5 dakika santrifüjden sonra, supernatant atılmış ve kalan pelet üzerine 1ml %20'luk FBS (fötal sığır serumu); %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM besiyeri eklenerek ve pipetleme yapılmıştır.
- Pipetlemeden sonra, 96'lık plakalara ekim yapılmadan önce hücreler CEDEX (hücre sayıcı) cihazı yardımıyla sayılmıştır. Hücre sayım işlemlerinde hücreler Tripan mavisi solüsyonu ile boyanarak sayımlar gerçekleştirilmiştir.

HaCaT keratinosit hücrelerine MTT, Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) proliferasyon ve migrasyon belirlenmesi, scratch deneyi ve Real-Time PCR yöntemleri uygulanmadan önce her seferinde Tripan mavisi solüsyonu ile boyanarak hücre sayımı yapılmıştır.

3.5.3. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

HaCaT keratinosit hücrelerinde; sığla yağının etkin olduğu konsantrasyonların tespiti için MTT yöntemine başvurulmuştur. MTT ölçümü, in vitro koşullarda hücre metabolizmasını, canlılığı ve sitotoksitenin ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmaktadır [191]. Canlılığı azaltan; fakat öldürmeyen özellikteki, sarı renkli, suda çözünebilir tetrazolium

tuzu (MTT), hücrelere aktif olarak absorbe olur ve suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazona indirgenir.

Daha net bir ifadeyle; bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanmasıyla soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi formazon ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. DMSO, isopropanol veya diğer uygun çözücü ilavesi yapıldığında formazon kristaller çözünerek serbest kalır ve kolorimetrik olarak tespit edilebilir hale gelir. Çözünen materyalin optik dansitesi, çözünmüş olan formazonun miktarının verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği mitokondrinin sağlamlığı ve metabolik aktivitesinin tanınmasını sağlar. Bu da hücre canlılığının ölçütü olarak tanımlanır. Spektrofotometrik olarak ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır. MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu gözle görülebilir düzeyde canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir. Bu yöntem daha çok hızlı çoğalan ve mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur.

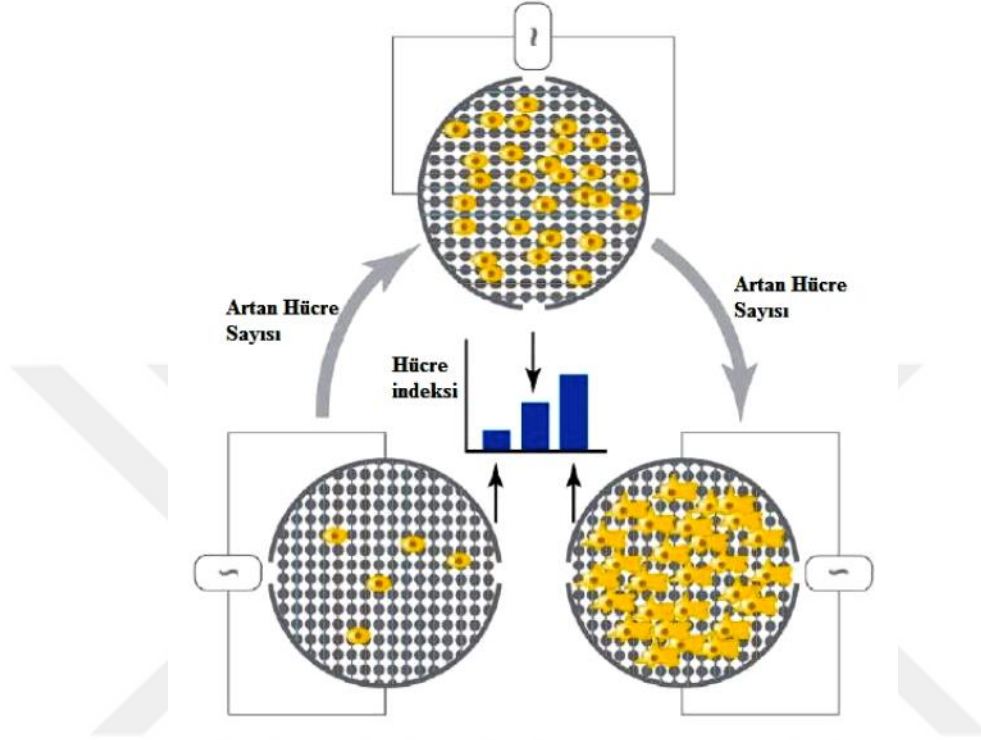
Araştırmamızda her MTT de 0,02 gr sıgla yağı, 100 µL DMSO ile çözünmüş ve farklı konsantrasyonlar her deney öncesinde taze olarak hazırlanarak ölçümler yapılmıştır.

3.5.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) kullanılarak hücre proliferasyonunun elektriksel empedans tekniği ile belirlenmesi

RTCA-DP, elektriksel empedans ölçerek hücre canlılığını tespit eder ve günlerce, istenilen aralıklarla bu ölçümü devam ettirerek gerçek zamanlı veriler oluşturur. Ölçümün gerçekleşmesi için, çalışılan hücrelerin hücre kültürü kabının (E-plaka) tabanına tutunabilmesi gerekmektedir. E-plakadan sistem tarafından alınan değerler, literatürde kabul edilen birimsiz ‘cell index (CI)’ (hücre indeksi) değeri olarak hesaplanır. Bu değer, hücreler E-plakanın tabanını kaplayıp çoğaldıkça verilen elektriksel yanıtla paralel olarak artar.

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

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



Şekil 3.1. RTCA DP cihazında e-plakalarda ki hücre sayısının artışına bağlı olarak Hücre İndeks (CI) değerlerinin gösterilmesi [192]

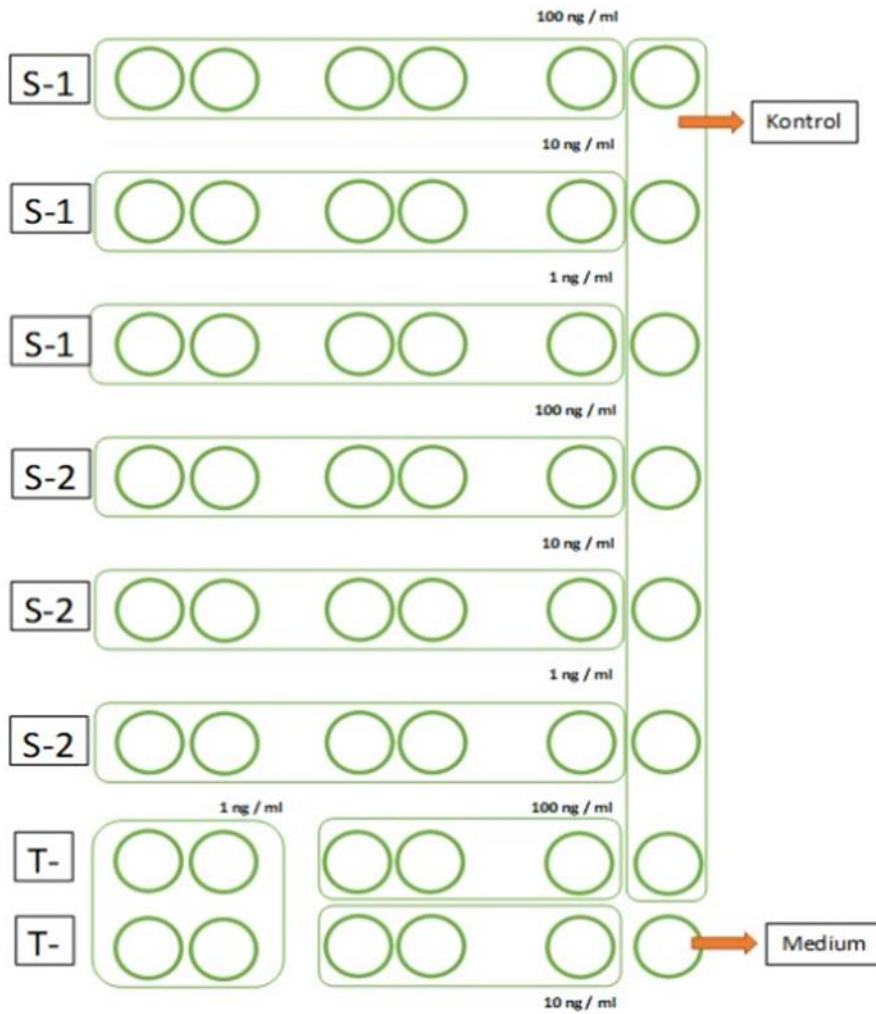
Araştırmamızda proliferasyon çalışmasında her bir hücre hattı için 3 adet 16 kuyucuklu altın elektrot kaplı E-plaka kullanılmıştır. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının belirlenmesi için Cedex cihazında hücreler sayılmış ve her kuyucuğa 100 µl besiyeri içinde 10.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir.

Öncelikle kullanılacak E-plakalara 100 µl hücreye ait besiyeri ekilip ve cihazda ilk okuma alındıktan sonra E-plakalar cihazdan çıkarılıp 100 µl besiyeri üzerine 10.000 hücre ekilmiştir. 30 dakika steril kabinde bekletilen plakalar daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve saatte 1 ölçüm alacak şekilde cihaz programlandıktan sonra deney başlatılmıştır.

HaCaT keratinosit hücreleri belirli bir indeks değerine ulaşınca cihaz durdurulmuş ve hücre-besiyeri karışımından 100 µl çekilip atılmıştır. Taze hazırlanmış sıgla yağı konsantrasyonları E-plaka kuyucuklarına 100 µl medyum içinde uygulanmıştır.

RTCA-DP’de uygulanacak konsantrasyonlar, ön tarama testi olan MTT yöntemine göre seçilmiştir. MTT sonuçlarına göre tespit edilen hücre canlılığının devam edebildiği non-toksik konsantrasyonlar 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml) olarak belirlenmiştir. E-plakalarda konsantrasyonların yerleşimi Şekil 3.2’da verilmiştir.

E-plakalar steril kabinde yaklaşık 15 dakika bekletildikten sonra cihaza yerleştirilmiş ve program kaldığı yerden devam ettirilmiştir. Gerçek zamanlı ölçümler kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.2. RTCA-DP kullanılarak hücre proliferasyonu analizi için e-plakalarda uygulanan konsantrasyonların yerleşimi (S-1: Sıgla-1, S-2: Sıgla-2, T: TEKA; 1 ng=0.001 µM, 10 ng=0.01 µM, 100 ng=0.1 µM)

3.5.5. RTCA-DP ile migrasyonun belirlenmesi

RTCA-DP sistemi kullanılarak HaCaT keratinosit hücre hattında sıgla yağının hücre migrasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak kayıt altına alınmıştır ve bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak izlenmiştir.

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

RTCA-DP sistemi ile 16 kuyucuklu CIM plaka (CIM PLATE 16) (Şekil 3.3) kullanılarak hücrelerin farklı konsantrasyonlardaki migrasyon davranışları incelenmiştir. RTCA-DP’de migrasyon için uygulanan konsantrasyonlar 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml), ön tarama testi olan MTT yöntemine göre seçilmiştir. Migrasyon çalışması için uygulanan yöntem aşağıda basamaklar halinde verilmiştir:

- CIM plakanın alt odacığına 160 µl serumlu medyum eklenmiş ve üst odacık ile alt odacık bir hamlede birleştirilmiştir.
- Daha sonra üst odacıklara 20 µl serumsuz medyum eklenmiştir.
- CIM plaka 1 saatliğine süresince 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- 1 saatlik inkübasyondan sonra cihazdan ilk ölçümler alınmıştır.
- Kuyucuklarda problem olmadığından emin olunduktan sonra üst odacıktaki her kuyuya 100 µL serumsuz besiyeri içerisinde 2×10^4 hücre ekilmiştir.
- Uygulama sonrasında CIM plaka cihaza yerleştirilmiştir.
- Cihaz 72 saat boyunca her 10 dakikada bir ölçüm alacak şekilde programlanarak analiz başlatılmıştır.
- Cihazda elde edilen hücre indeksi değerleri, RTCA-DP analiz programı kullanılarak slope grafiğine aktarılmıştır.



Şekil 3.3. İnvazyon ve migrasyon çalışmalarında kullanılan 16 kuyucuklu CIM plaka

CIM plaka üzerinde konsantrasyonların yerleşimi aşağıda Şeki 3.4’de verilmiştir:

HaCat 20.000 SO-1 1 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 1 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 1 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 1 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 1 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 1 ng/ml
HaCat 20.000 SO-1 1 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 1 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 1 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 1 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 1 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 1 ng/ml
HaCat 20.000 SO-1 10 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 10 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 10 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 10 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 10 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 10 ng/ml
HaCat 20.000 SO-1 10 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 10 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 10 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 10 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 10 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 10 ng/ml
HaCat 20.000 SO-1 100 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 100 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 100 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 100 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 100 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 100 ng/ml
HaCat 20.000 SO-1 100 ng/ml	HaCat 20.000 SO-1 100 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 100 ng/ml	HaCat 20.000 SO-2 100 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 100 ng/ml	HaCat 20.000 Teka 100 ng/ml
HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol
HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol	HaCat 20.000 kontrol

Şekil 3.4. RTCA-DP kullanılarak yapılan hücre migrasyonu analizi için CIM plaka konsantrasyonların yerleşimi (SO-1: Sığla-1, SO-2: Sığla-2, T: TEKA; standart 1 ng=0.001 μ M, 10 ng=0.01 μ M, 100 ng=0.1 μ M)

3.5.6. Scratch assay metodu ile hücre migrasyonunun incelenmesi

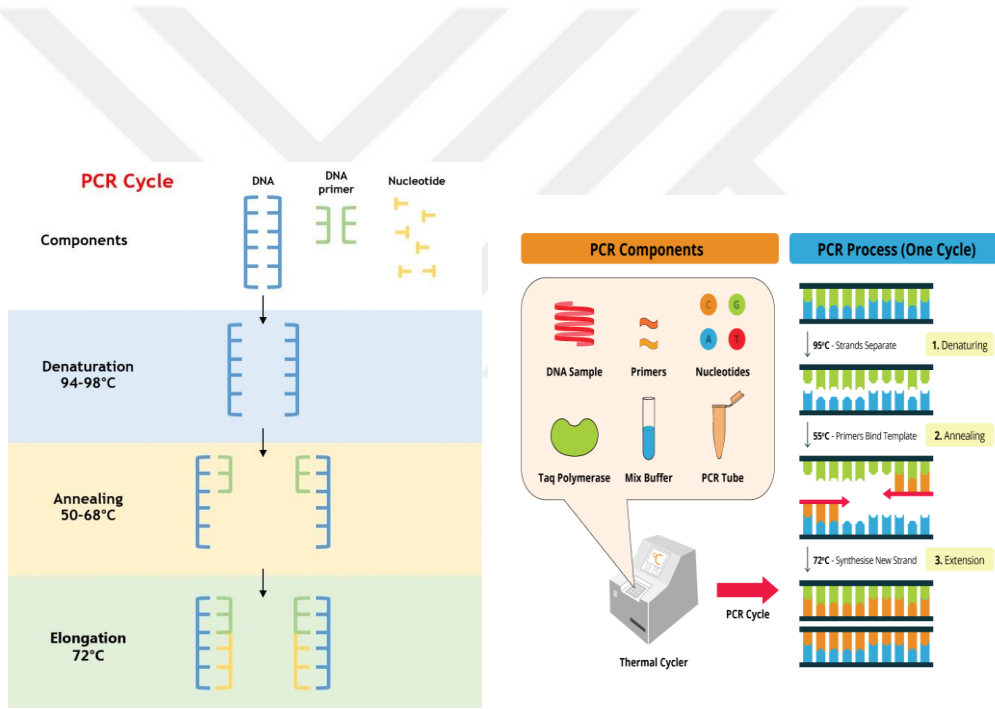
Scratch assay tekniği HaCaT keratinosit hücrelerinin migrasyon, yayılma ve dağılım davranışlarının mikroskop altında fotoğraflayarak incelenmesini sağlayan bir yöntemdir. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara sağlıklı bir şekilde ekildikten sonra steril pipet ucu kullanılarak hücreler üzerinde doğrusal bir insizyon ile yara açıklığı modeli oluşturulur. 0.saat 24.saat ve 48.saatte yara açıklıkları invert bir mikroskop yardımıyla fotoğraflanır ve yaranın her iki ucu arasındaki mesafe ölçülür. Araştırmada uygulanan Scratch assay metodu aşağıda basamaklar halinde verilmiştir:

- SO-1 ve SO-2 nin yara iyileşmesi üzerine etkileri belirlemek amacıyla 6 kuyucuklu plakalara HaCaT keratinosit hücreleri 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için 24 saat bekletilmiştir.
- Daha sonra yaklaşık %90 yoğunlukta monolayer şeklinde olan HaCaT keratinosit hücreleriyle *in vitro* yara modeli oluşturmak amacıyla; 200 μ L'lik steril pipet ucu kullanılarak, yaklaşık 1 mm doğrusal bir açıklık oluşturulmuş ve kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır.
- Bu oluşan açıklık 0. saat kabul edilerek fotoğraflanmıştır. RTCA-DP cihazında kontrolden daha fazla proliferasyon yapan konsantrasyonlar bu deney için seçilmiştir. SO-1, SO-2 ve TEKA için 0,1 μ g/ml (100 ng/ml), 0,01 μ g/ml (10 ng/ml) ve 0,001 μ g/ml (1 ng/ml) konsantrasyonları uygulanmıştır.
- Sırayla 24.saat ve 48.saat inkübasyon sonunda SO-1, SO-2 ve TEKA konsantrasyonlarının, oluşturulan yaraların kapanma miktarlarına olan etkileri invert ışık mikroskopunda (Leica DM 300 invert mikroskop) görüntülenmiştir. Her ölçüm 3 kez tekrar edilmiştir.

3.5.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-PCR) yöntemi ile COL1A1 mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

Kollajen, dokular arası alanı dolduran ekstraselüler matriksin (ECM) önemli bir bileşenidir. Günümüze kadar birçok kollajen tipi bulunmuştur. Tip I kollajen ECM'de en fazla bulunan kollajen tipidir. İki α 1 ve bir tane α 2 zincirlerinden oluşan heterodimerik bir molekül olan kollajen, COL1A1 ve COL1A2 genleri tarafından şifrelenir.

PCR, 1985 yılında Cetus şirketinden Kary Mulis tarafından ilk uygulaması yapılan bir teknik olup, belirli bir DNA parçasının kopyalanmasına ve çoğaltılmasına olanak sağlayan *in vitro* bir yöntemdir. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin (primer) bilinmesi gereklidir. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra, baz dizilerinin tek iplikli DNA bölgeleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle hibridizasyonu yapılmaktadır. Primerlerin hedef dizilere özgün bağlanması düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enziminin, uygun tampon ve deoksiribonükleozid trifosfat varlığında; primerin 3' ucundan uzatarak yeni tamamlayıcı DNA ipliğini sentezlediği gösterilmiştir. PCR'ın bir döngüsü, denatürasyon, annealing (yapışma) ve extension (uzama) olmak üzere üç aşamadan oluşur ve döngülerin defalarca tekrarlanmasıyla sonuç elde edilmektedir.



Şekil 3.5. PCR aşamaları

Amaca uygun olarak farklı PCR teknikleri kullanılmaktadır. Real Time (gerçek zamanlı) PCR, hedef DNA parçasının hem amplifikasyonu hem de miktarının saptanması için kullanılan bir yöntemdir. Real Time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapıldığı için diğer PCR tekniklerinde kullanılmakta olan agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere gerek kalmaz. Prosedür sırasında PCR protokolü

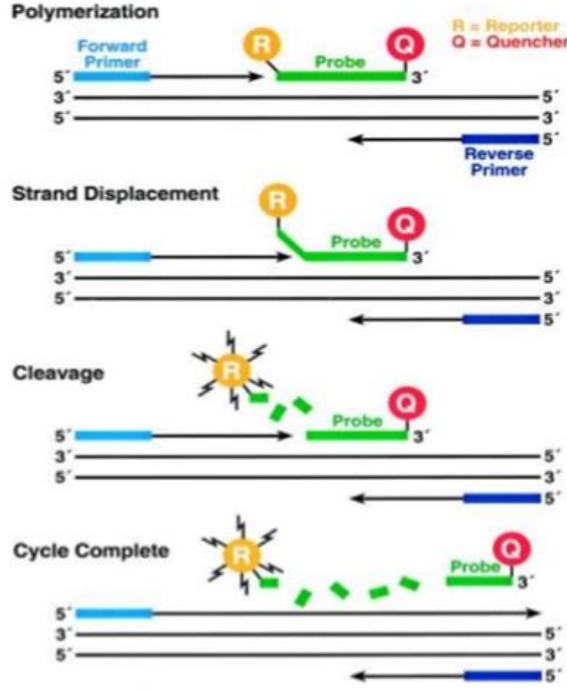
kullanılırken DNA miktarının her amplifikasyon sonrası ölçülmesi, reaksiyona “Real Time” yaklaşımını kazandırmaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan (DNA ölçümü sırasında çift sarmal DNA’ya yapışan floresan boyalar) ya da diziye özgün problardan (DNA ile birleştiğinde floresan veren modifiye oligonükleotitler) yararlanılmaktadır. Amplifikasyon sonucunda oluşan DNA molekülü (amplikon) ile doğru orantılı olarak floresan ışığa meydana gelmektedir. Real-time PCR reaksiyon esasında her bir PCR siklusunda yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir.

PCR için sadece DNA örnekleri kullanılmaktadır. Ancak, hücrelerden elde edilen RNA’lar Polimeraz zincir reaksiyonunda doğrudan kullanılamadıklarından, önce revers transkriptaz (RT) enzim reaksiyonu ile komplementer DNA’ya (cDNA) çevrilirler. Bu olaya revers transkripsiyon denir [193].

Sekansa bağımlı ölçüm tekniklerinde sadece PCR sırasında oluşan ürünün sekansına özgü oligonükleotid hibridizasyon problemlerine bağlanan floroforlar kullanılır. Bunlar tek işaretli problemler (SimpleProb), hibridizasyon problemler (HybProbe) ve hidroliz problemler (TaqMan, Moleküler Beacons ve Scorpions) olarak belirtilmiştir.

TaqMan sistemi prob hidrolizi olarak da tanımlanmaktadır. Sistemde bir proba bağlı iki floresan boya (florokrom) kullanılmaktadır. Probun 5’-ucuna “reporter yani haber veren florokrom” ve 3’- ucuna “quencher, yani baskılayan florokrom” baskılayıcı floresan boyalar ilave edilmiştir. Bu prob, ekspresyonuna bakılacak gen mRNA’sı için spesifik olup, mRNA spesifik oligo primer bağlanma sekansının önünde yer alacak şekilde düzenlenmiştir.

Ekspresyonuna bakılacak gen mRNA’sı için kullanılan oligo primerler, denatüre olmuş primer spesifik cDNA sekansına bağlanır ve bunu takiben DNA polimeraz, oligo primeri kullanarak mRNA karşıt zincirini sentezlemeye başlar. Kullanılan DNA polimeraz enzimi 5’ nükleaz aktivitesine sahiptir. Hazırlanan probun ucundaki boyalar mRNA sekansına bağlandıklarında herhangi bir ışığa vermemektedir. mRNA sekans dizisini çoğaltan DNA polimeraz, prob ile karşılaştığında, probun 5’ ucundaki boyanın hidrolize olmasına neden olur ve buna bağlı olarak da bir ışığa meydana gelmektedir (Şekil 3.6) [194]. Bu ışığının miktarı ekspresyonuna bakılacak gen mRNA miktarı ile doğru orantılıdır. Probun iki ucunda floresan raportör ve baskılayıcı boyalar bulunmaktadır. Bu boyalar birbirlerini baskırlar. Uzama esnasında prob kırılır ve boyalardan biribiri üzerindeki baskısı kalkar ve ışığa gözlenir.



Şekil 3.6. TaqMan tekniği aşamaları

Niceliksel ölçümde miktarı belirlenmek istenen örnekler, içerdiği cDNA miktarı bilinen standartlarla PCR sonunda karşılaştırılmaktadır. Bu standartların amplifikasyonları, her dokuda aynı ifade edilen genlerle (housekeeping genler) gerçekleştirilir. Housekeeping genler; belirli bir türde veya organizmada her hücre için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan genlerdir. Kesişme noktası (Crossing point: CP) her döngüde eşit miktarda PCR ürününün oluştuğu noktayı ifade etmektedir. Bu standart örneklerin eşik değerine (CP) girdikleri döngü, PCR cihazı tarafından saptanmaktadır ve miktarı belirlenmek istenen esas örneklerle karşılaştırılmaktadır. Reaksiyon sonunda, standartların eşik değerleri belirlenerek bir eğri oluşturulur. Miktarları bilinmeyen örneklerin bu eğriyi kestiği döngüler belirlenerek miktar sayımı yapılabilmektedir. Göreceli (relative) sayıma göre çalışılacak her iki örnek için farklı karışım hazırlanır. Bu karışımlardan birinde housekeeping genlerine ait primerler bulunurken, diğerinde hedef genin primerleri bulunmaktadır. PCR sonunda hedef genin değeri, referans genin değerine oranlanarak ölçülür ve normalize edilir.

Bu araştırmada yöntemde total RNA'dan cDNA sentezi ve kalıp cDNA'dan da COL1A1 geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) kullanılmıştır. Araştırmada Real Time-PCR yöntemi ile ilgili uygulama basamakları aşağıda başlıklar halinde verilmiştir.

3.5.6.1. Total RNA izolasyonu

SO-1, SO-2 ve TEKA konsantrasyonları ile HaCaT hücrelerinin inkübasyonundan sonra, total RNA izolasyon robotu MagNA Pure Compact (Roche) kullanılarak total RNA izolasyonları yapılmıştır. SO-1, SO-2 ve TEKA'nın 0.1 µg/ml (100 ng/ml), 0.01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0.001 µg/ml (1 ng/ml) konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edilen HaCaT keratosit hücrelerinden, total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyon basamakları aşağıda verilmiştir:

- İnkübe edilen hücreler kaldırıldıktan sonra santifrj edilir.
- 2 mL PBS ile yıkanır ve tekrar santifrj edilir.
- 220 µl lysis buffer konur, pipetaj yapılır ve hücre zarı patlatılır.
- Robotun sample tüpüne 200 µl olarak aktarılır.
- Robottan 30 dk içinde 50 µl RNA izole edilir.
- İzole edilen RNA'lar miktar tayini için nanodrop cihazına gönderilir.
- İleri çalışmalar için saklanmak istenen RNA -20°C veya -80°C 'lik tanka gönderilir.

RNA verimi Nanodrop cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm optik dansitede spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. RNA'dan cDNA yapım aşamasına geçmeden önce RNA miktarları eşitlenir. Bunun için nanodrop cihazından alınan ölçüm RNA sonuçları kullanılır. Daha sonra cDNA sentezi için her bir örnekten eşit miktarda RNA (100 ng/örnek) PCR aşaması için kullanılmıştır. HaCaT RNA Nanodrop sonuçları (48h) Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. HaCaT RNA Nanodrop sonuçları (48h)

Uygulama	Doz	Absorbans
SO-1	1 ng/ml	351,6
SO-1	10 ng/ml	372,6
SO-1	100 ng/ml	289,3
SO-2	1 ng/ml	340,7
SO-2	10 ng/ml	417,1
SO-2	100 ng/ml	274,7
TEKA	1 ng/ml	329,4
TEKA	10 ng/ml	379,5
TEKA	100 ng/ml	463
Kontrol		610,4

3.5.6.2. cDNA sentezi

Genlerin mRNA ekspresyonlarına bakabilmek için ilk olarak elde edilen total RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. RNA izolasyondan sonra 'Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit' (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak reverse transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA eldesi sağlanmıştır.

Bu işlem için tüm total RNA havuzundaki küçük poli(A) havuzuna spesifik primerler olan oligo (dT) primerler kullanılmıştır. Her bir PCR tüpüne örnek başına 100 ng total RNA (1000 / nanodrop RNA sonucu), 1 µl Oligo (dT) konulmuş ve toplam hacim 11.4 µl'ye distile su ile tamamlanmıştır. Her bir örnek tüpü thermal cyclerda 10 dakika 65°C'de ısıtılarak kalıp-primer karışımı denature edilmiştir.

Tüp içeriğine;

- 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer,
- 0.5 µl protector RNase inhibitörü (20U),
- 2 µl dNTP (deoxynucleotide mix) karışımı (her biri 10mM),
- 1 µl DTT (5mM),
- 12,5 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10U) ilave edilerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

Daha sonra tüpler 55°C'de 30 dk, 85 °C'de 5dk PCR Thermal Cycler cihazında inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, Real Time-PCR'da amplifikasyon için kullanılmıştır.

3.5.6.3. RT-PCR (Real time PCR) ile mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

RT-PCR ile HaCaT keratiosit hücre hatları üzerinde SO-1, SO-2 ve TEKA'nın 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml) konsantrasyonlarında COL1A1 mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. RT-PCR yöntemi, cihaza uygun kit ve primerler kullanılarak tek adımda uygulanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, LightCycler® 480 RT-PCR cihazında, COL1A1 genine spesifik TaqMan'lı primer ve PCR kit kullanılarak kit protokolüne göre her bir örnekten 3 tekrar olacak şekilde, cihazda optimize edilerek çoğaltılmıştır. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Light Cycler PCR 480'e uyumlu 96'lık clear plakalara yüklenen kimyasallar sırasıyla Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3. 2. *Light Cycler PCR uyumlu clear plakalara yüklenen kimyasallar*

Sıra	Kimyasal	Miktar
1	H ₂ O	4 µl
2	Prob Master	10 µl (LightCycler® 480 Probe Master kiti REF: 04 707 494 001 COL1A1 için)
3	Primer (Taqman'lı)	1 µl (COL1A1 / GAPDH)
4	cDNA	5 µl

Hazırlanan bu karışım 96'lık plakaya COL1A1 ve GAPDH için ayrı ayrı yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra 96'lık plaka Light Cycler 480 cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçüm miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar 'Advanced Relative Quantification' programı kullanılarak, sıgılanın COL1A1 ekspresyonu üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

3.6. Sığla Yağı İçerik Analizi

Araştırma kapsamında deneylerde kullanılan numune sıgla yağları (SO-1 ve SO-2) içindeki etken maddelerin kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Analizler Eczacılık Fakültesi bünyesinde bulunan Doping ve Narkotik Maddeler Analiz Laboratuvarı (DOPNA-LAB) tarafından yapılmıştır.

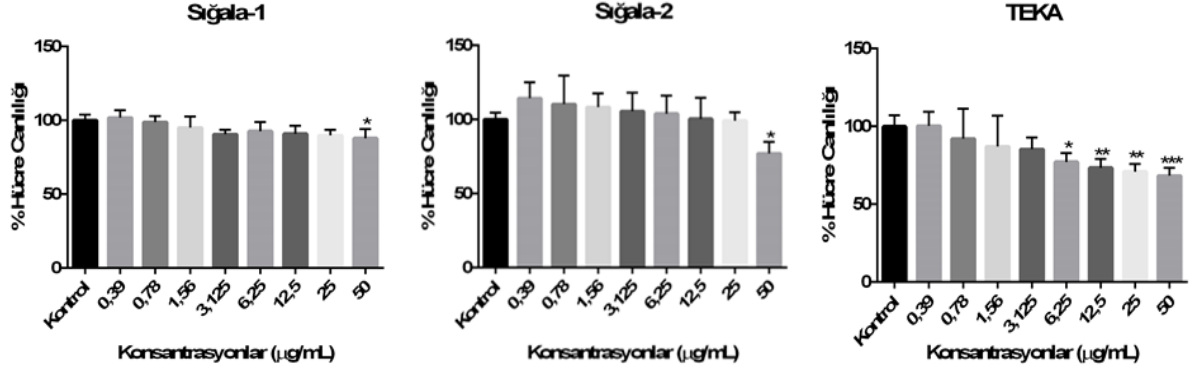
Numuneler su ve metanol içerisine alınarak ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilmiş, ardından karışımlar 0,22 µm gözenek çaplı PTFE veya CA şırınga ucu filtrelerden süzülerek Shimadzu marka IT-TOF/MS (Shimadzu, Kyoto, Japonya) yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) sistemiyle analiz edildi. Elektronsprey iyonizasyon (ESI) tekniğiyle pozitif ve negatif modda analiz edilmiştir. Mobil faz olarak % 0,1 Formik asit içeren Asetonitril ve su karışımı gradyan olarak kullanılmıştır. MS şartları şu şekildedir; high voltage probe, -3.5 kV (Negatif ESI için 3.5 kV); nebulizing gaz akış hızı, 1.5 L/min; CDL sıcaklığı, 200 °C; heat block sıcaklığı, 200 °C; drying gaz basıncı, 200 KPa. TOF dedektör voltajı 1.6 kV'dır. LC kısmı iki adet LC-20AD dual pompa, DGU-20A3R degasser ünitesi, CTO-10ASvp kolon fırını, SIL-20AC otoörnekleyici and SPD-M20A PDA detektörden oluşmuştur. Ters faz kromatografik

ayrımın yapıldığı analizlerde Shim-Pack FC-ODS (150 x 2 mm, 2 µm) C 18 HPLC kolonu kullanılmıştır. 0,1 % Formik asit içeren Su/Asetonitril karışımı gradient olarak karıştırılarak hareketli faz olarak kullanılmıştır. Datalar LCMSsolution (v. 3.80) yazılımı kullanılarak proses edilmiştir. PDA veya MS spektrumlarında yoğun olarak tespit edilen piklerin kütleleri kullanılarak drugbank (drugbank.ca) online veri tabanı ve literatür bilgisinden faydalanılarak tarama gerçekleştirilmiştir. Bulgular kısmında raporladığımız Tablo 4.3 de yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

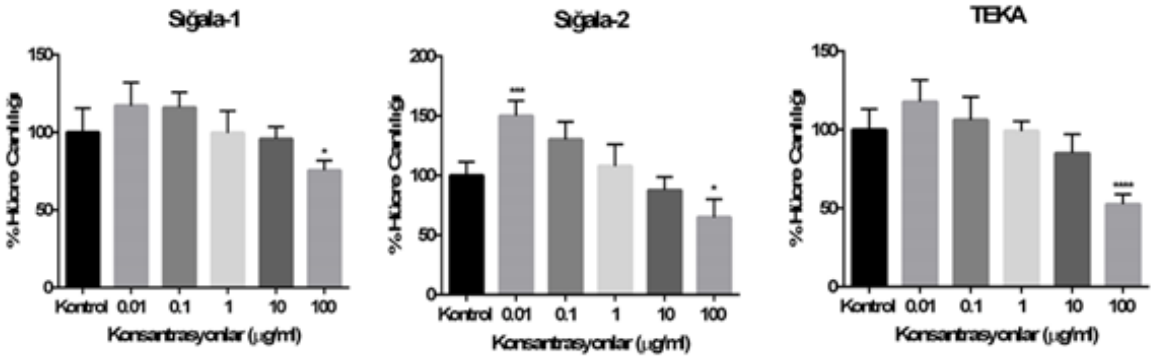
4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemine İlişkin Sitotoksikite Bulguları

Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığın değerlendirilmesinde, hücrelerin sayımları yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiştir ve yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sıgla yağının hazırlanan stok solüsyonundan, hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda, plakalara yapışan HaCaT keratinosit hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra plakalar tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol kuyusuna DMEM besiyeri ve %0,1 oranda DMSO uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plakanın içindeki besiyeri atılmış ve kuyucuktaki hücreler üzerine, 100 µL MTT solüsyonu ilave edilerek hücreler 3 saat daha inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyucuk 100 µL DMSO ile muamele edilip ve 540 nm dalga boyunda CYTATION cihazında absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, hücrelerin metabolik aktivitelerini vermiştir. Bu değerle yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlar 50, 25, 12.5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml ve 100, 10, 1, 0,1, 0,01 µg/ml olarak belirtilmiştir. MTT yöntemi sonucunda toksik olmayan konsantrasyonlar 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml) olarak belirlenmiştir.



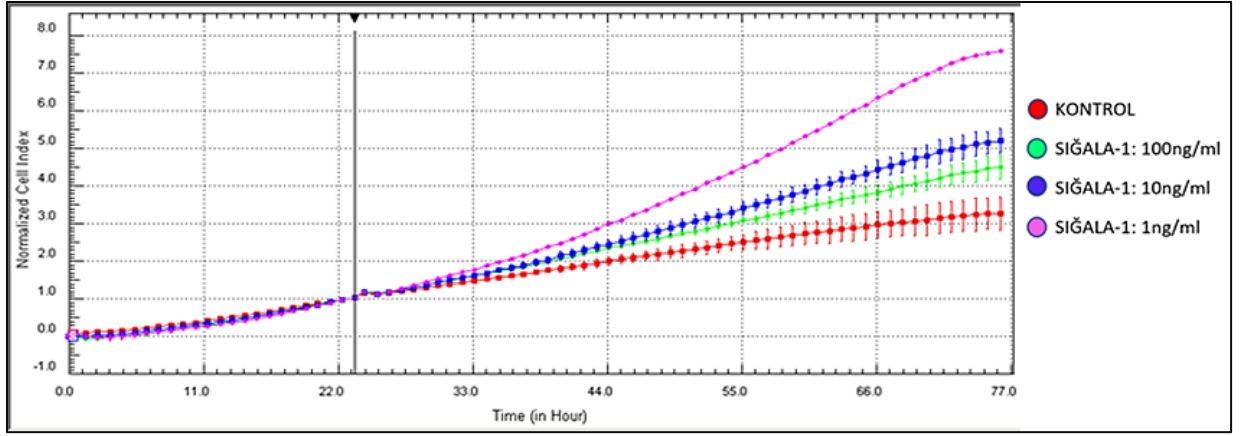
Şekil 4.1. MTT 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 µg/ml dozlarda hücre canlılığı grafikleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, kontrole karşı anlamlılık)



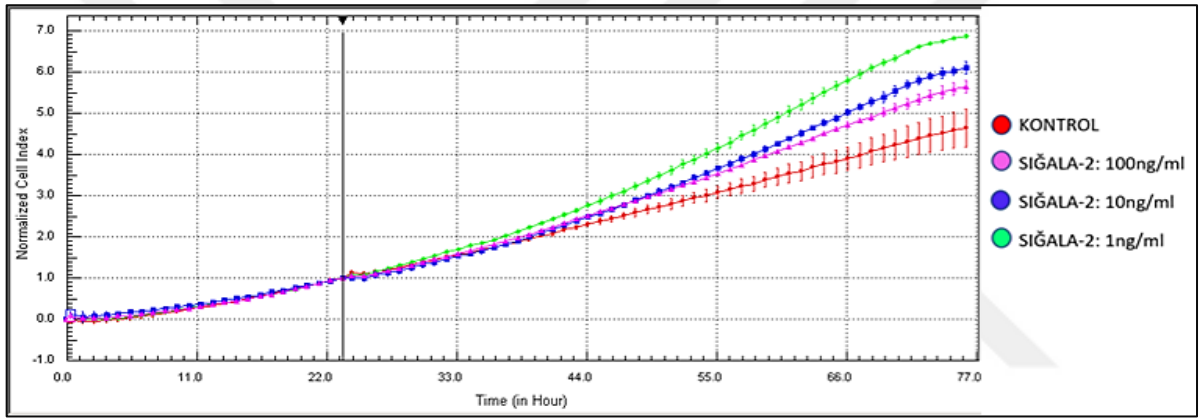
Şekil 4.2. MTT 100, 10, 1, 0.1, 0.01 µg/ml dozlarda hücre canlılığı sonuç grafikleri (* $p < 0.05$, kontrole karşı anlamlılık)

4.2. RTCA-DP Yöntemine İlişkin Proliferasyon Bulguları

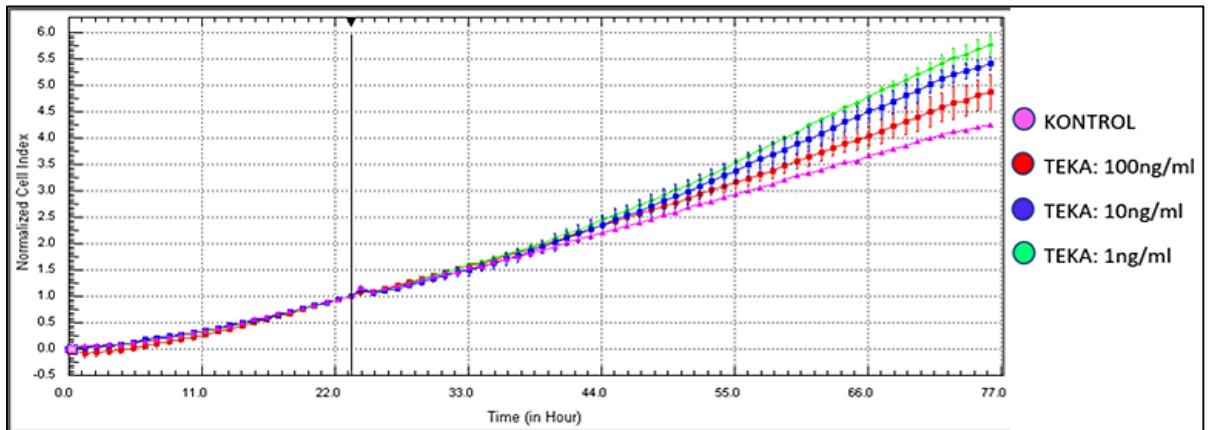
SO-1 ve SO-2 ile yapılan MTT denemelerine göre 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml) konsantrasyonlarında yapılan hücre kültürü sonuçlarında HaCat hücrelerinde toksisiteye rastlanmamıştır. Sitotoksikite açısından bu doz aralığının güvenli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 72 saat boyunca yapılan RTCA-DP analizine göre hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda zamana bağımlı olarak 0,001 µg/ml (1 ng/ml) konsantrasyonlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Aşağıda uygulanan maddelere ilişkin RTCA-DP analiz grafikleri Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.3. Sığla-1 için RTCA-DP hücre proliferasyonu analiz sonuçları (1 ng = 0.001 μ M; 10 ng = 0.01 μ M; 100 ng = 0.1 μ M)



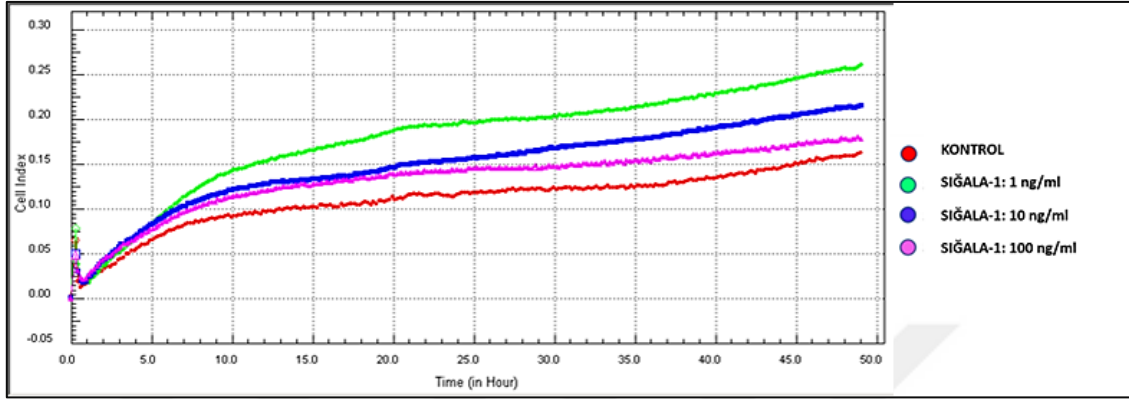
Şekil 4.4. Sığla-2 için RTCA-DP hücre proliferasyonu analiz sonuçları (1 ng = 0.001 μ M; 10 ng = 0.01 μ M; 100 ng = 0.1 μ M)



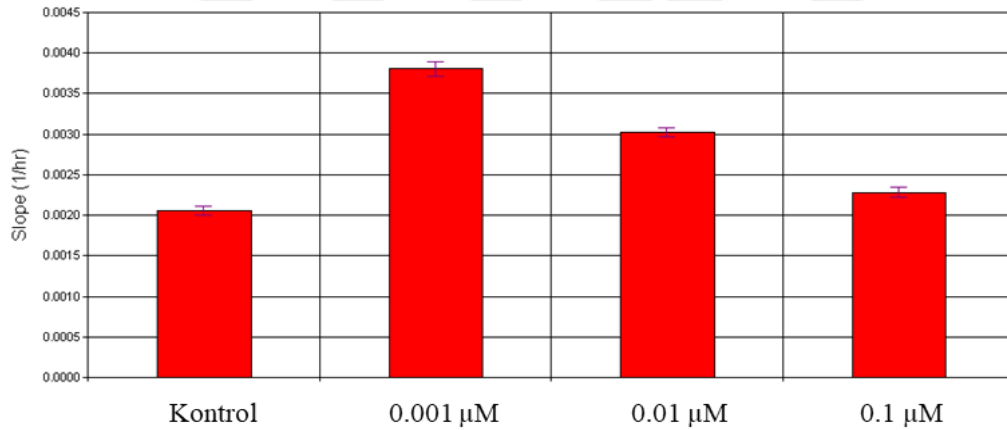
Şekil 4.5. TEKA için RTCA-DP hücre proliferasyonu analiz sonuçları (1 ng = 0.001 μ M; 10 ng = 0.01 μ M; 100 ng = 0.1 μ M)

4.3. RTCA-DP Yöntemine İlişkin Migrasyon Bulguları

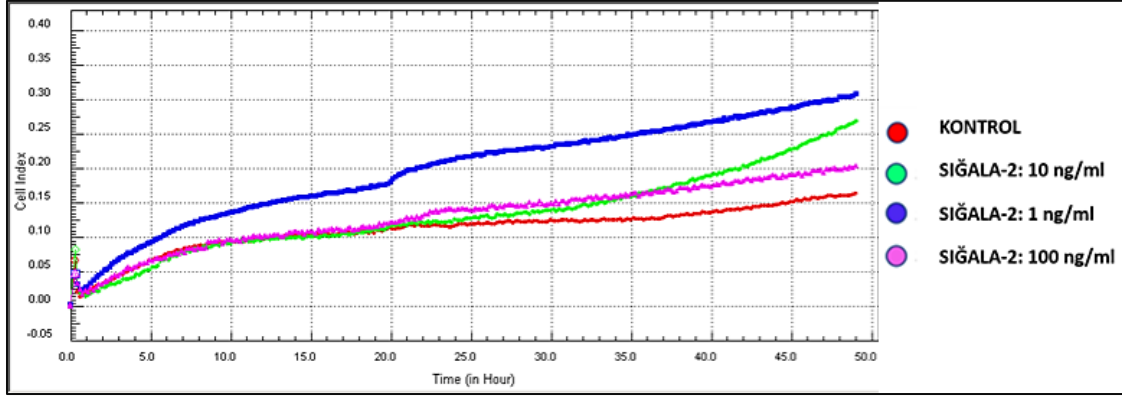
72 saat boyunca yapılan RTCA-DP analizine göre hücre migrasyonunda zamana bağımlı olarak 1ng/ml (0,001 µg/ml) konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir.



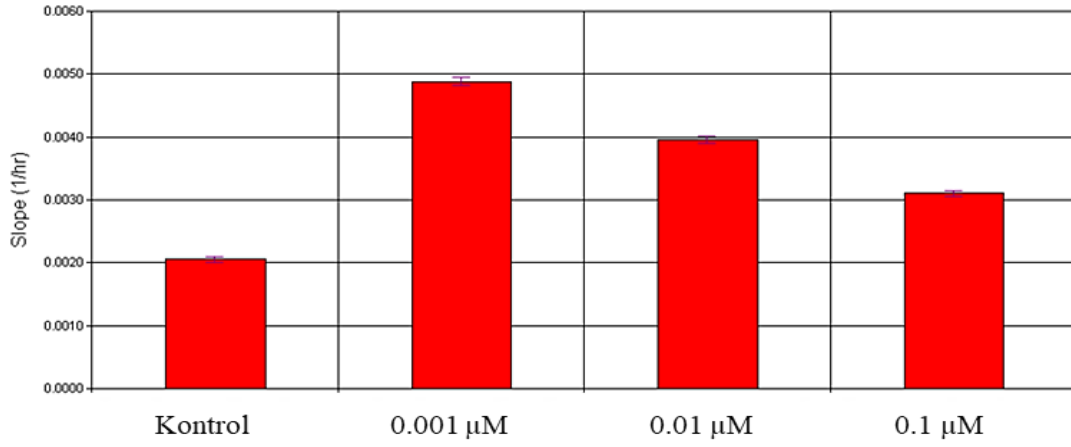
Şekil 4.6. Sığla-1 (SO-1) konsantrasyonlarının HaCaT keratinosit hücrelerindeki migrasyon etkisinin RTCA-DP’de izlenmesi (n=6)



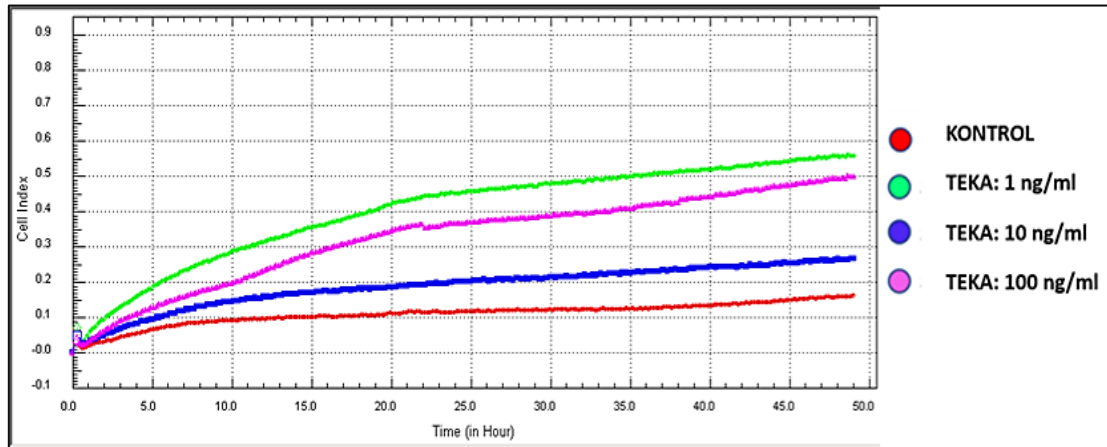
Şekil 4.7. RTCA-DP sisteminde HaCaT keratinosit hücrelerinde SIĞLA-1 konsantrasyonlarının 72 saat sonraki slope değerleri (n=6; ort±st.sapma)



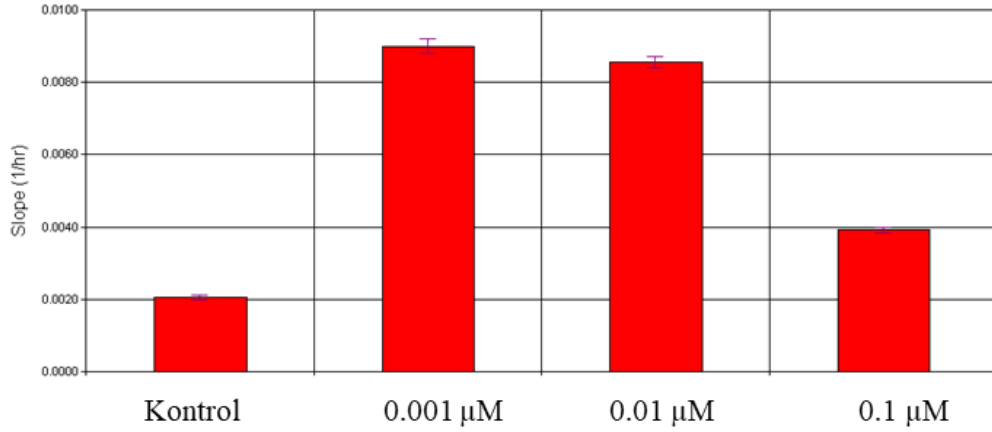
Şekil 4.8. Sığla-2 (SO-2) konsantrasyonlarının HaCaT keratinosit hücrelerindeki migrasyon etkisinin RTCA-DP’de izlenmesi (n=6).



Şekil 4.9. RTCA-DP sisteminde HaCaT keratinosit hücrelerinde Sığla-2 konsantrasyonlarının 72 saat sonraki slope değerleri (n=6; ort±st.sapma)



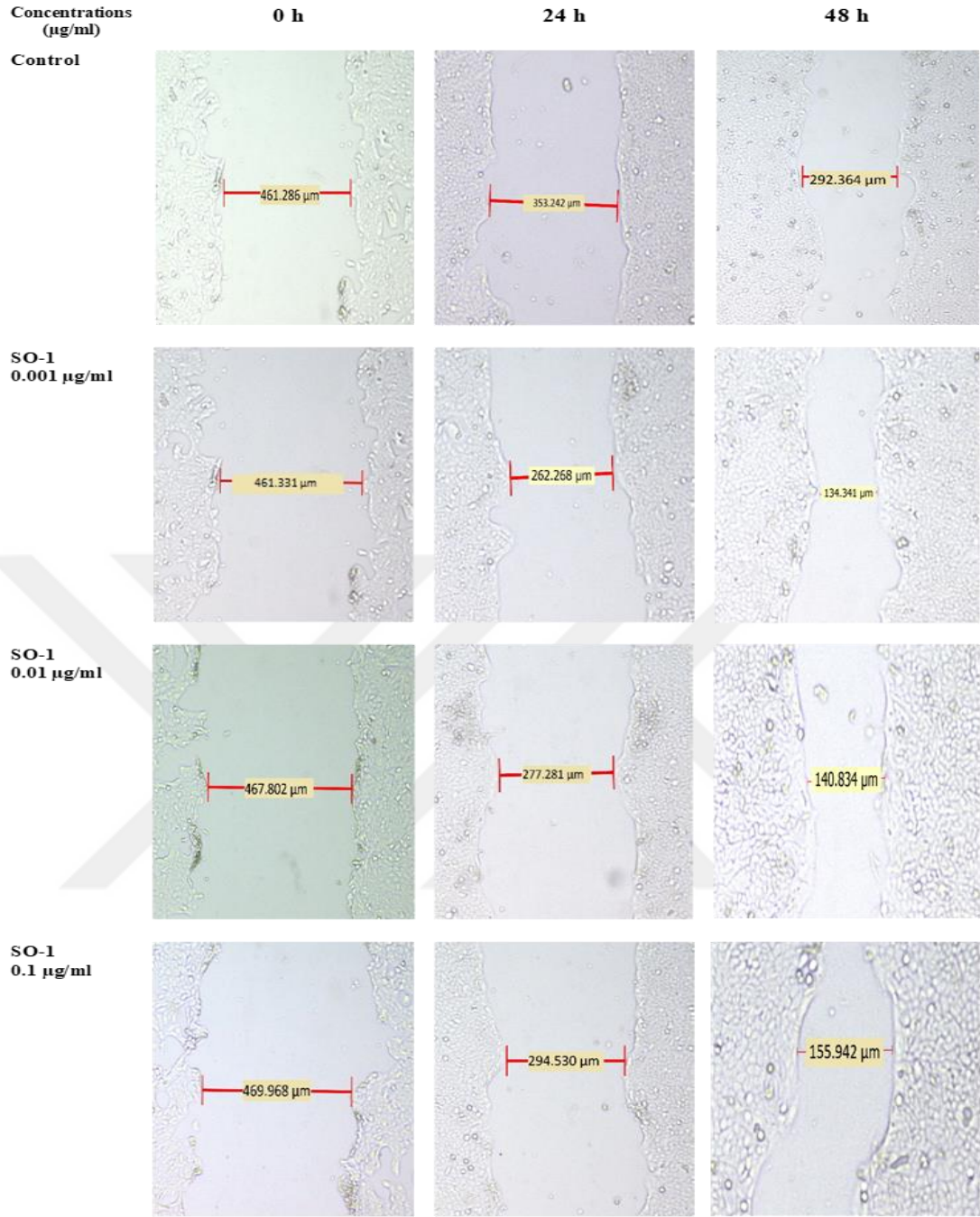
Şekil 4.10. TEKA konsantrasyonlarının HaCaT keratinosit hücrelerindeki migrasyon etkisinin RTCA-DP’de İzlenmesi (n=6)



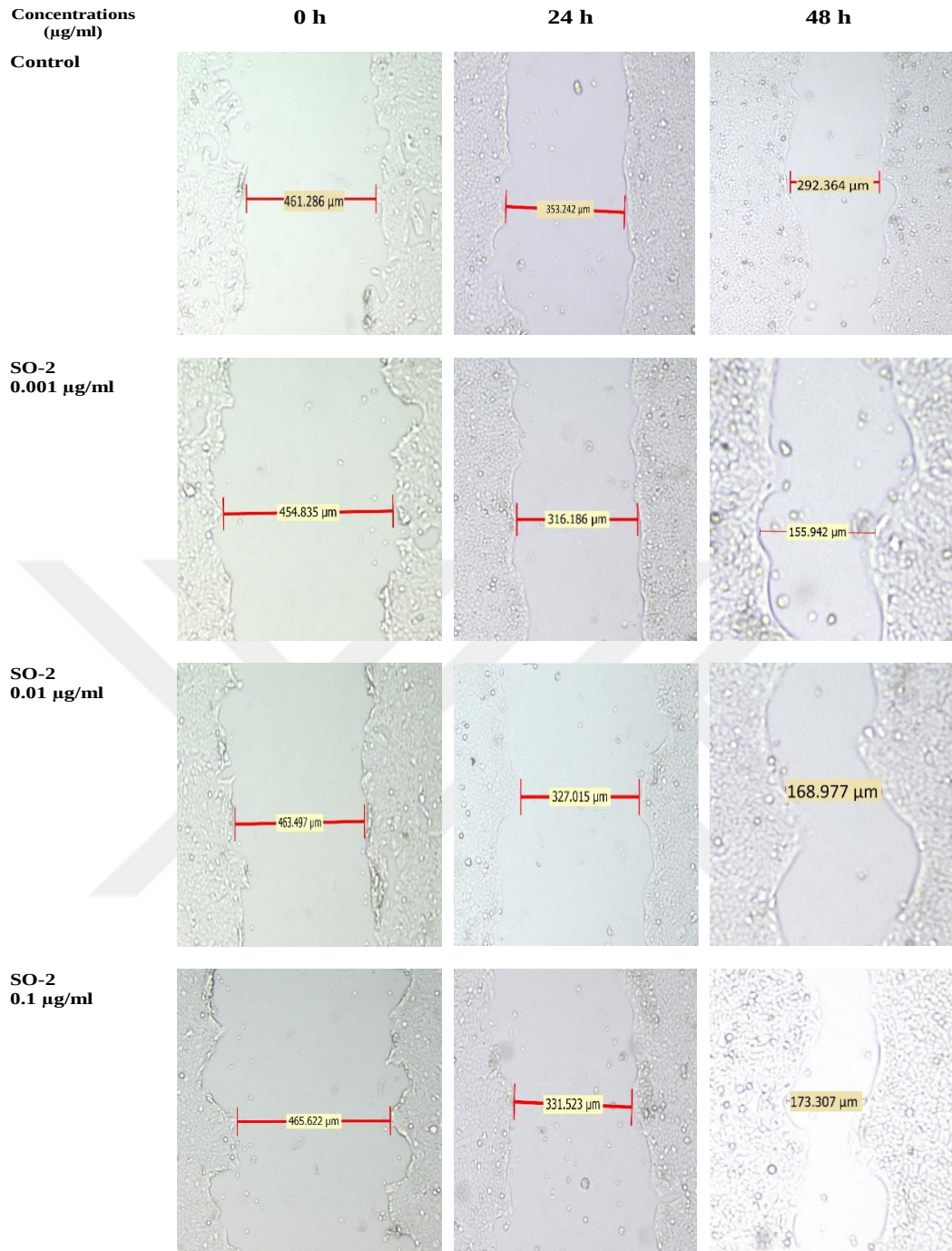
Şekil 4.11. RTCA-DP sisteminde HaCaT keratinosit hücrelerinde TEKA konsantrasyonlarının 72 saat sonraki slope değerleri ($n=6$; $ort \pm st.sapma$)

4.4. Scratch Assay Metoduna İlişkin Hücre Migrasyon Bulguları

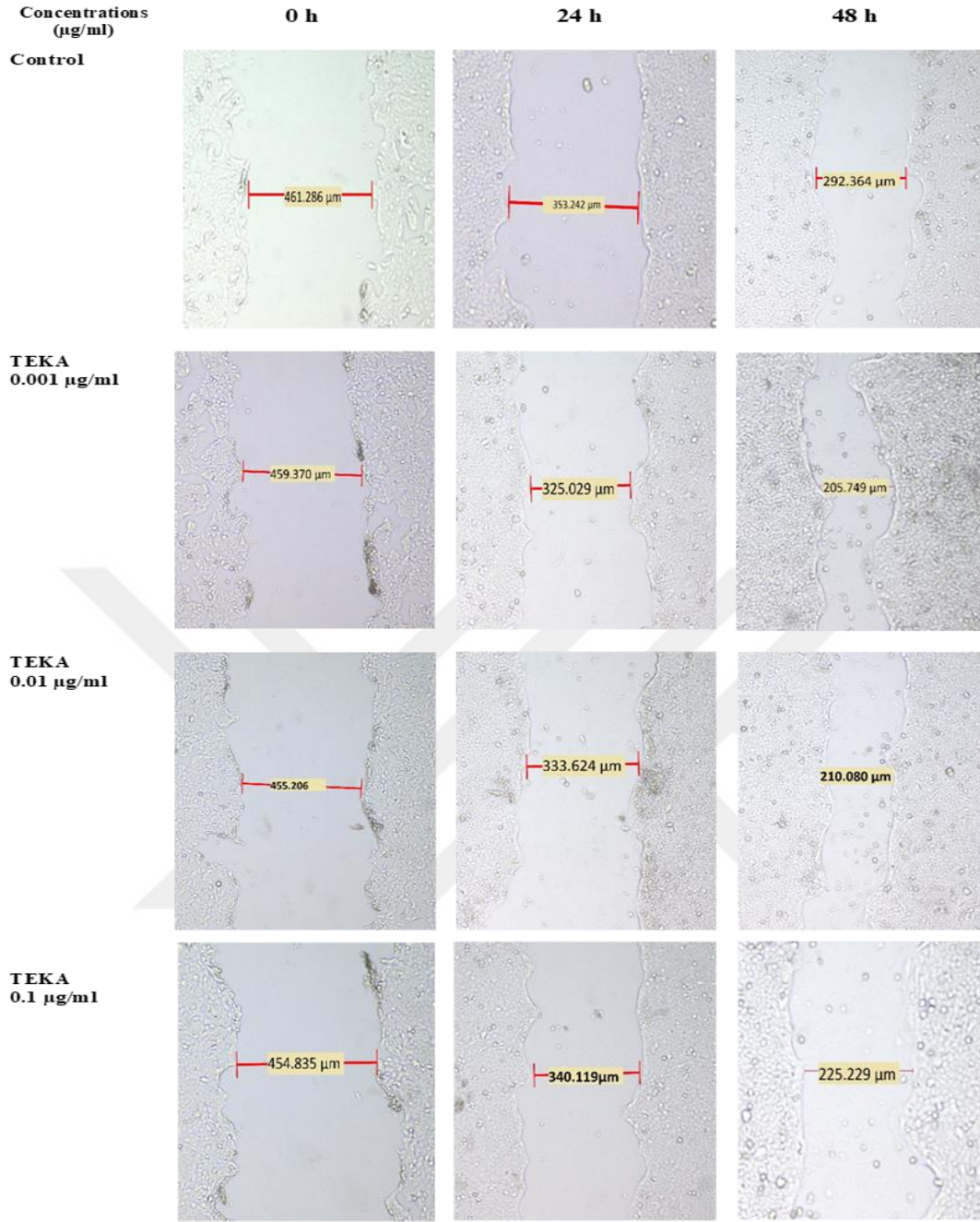
Scratch analizine göre 48.saat sonunda hücre migrasyonunda zamana bağımlı olarak 1ng/ml (0,001 µg/ml) konsantrasyonunda yaranın her iki yakasındaki mesafenin anlamlı bir şekilde kapandığı gözlemlenmiştir. Scratch analizi görüntüleri Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Sığla-1 için scratch analizi görüntüleri



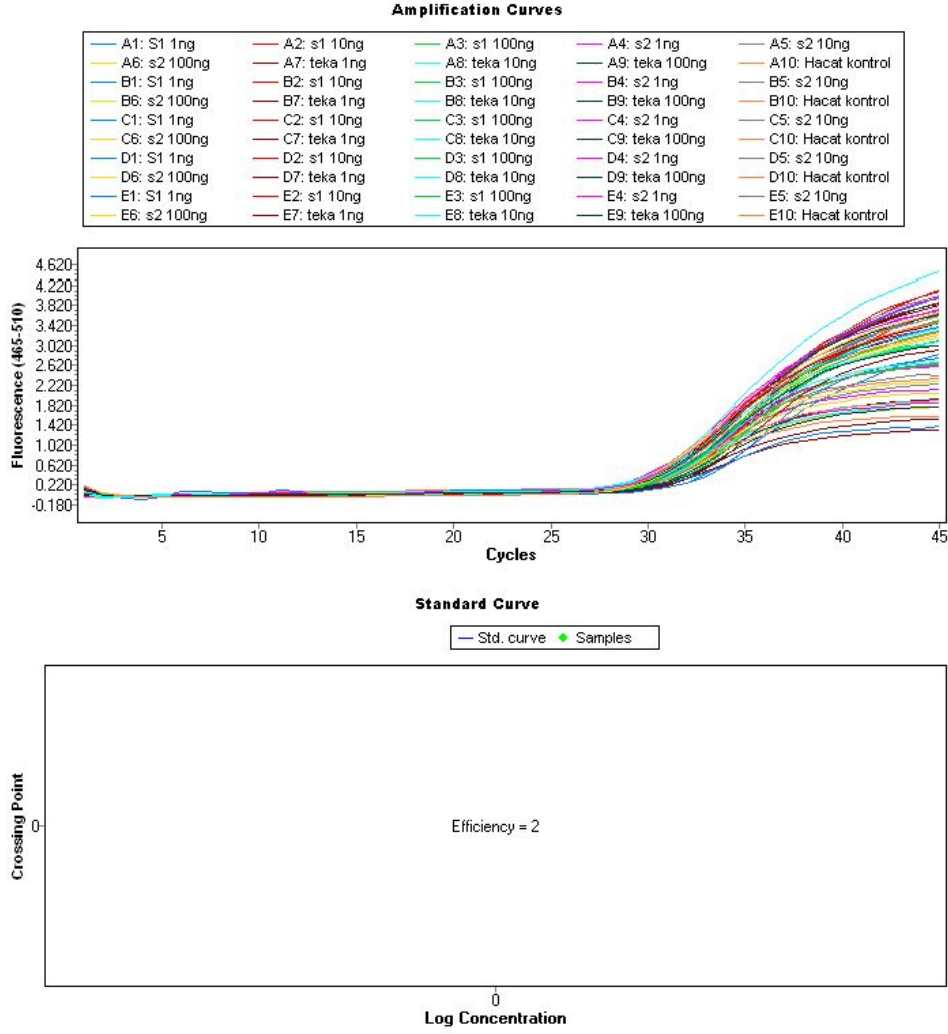
Şekil 4.13. *Sıgla-2 için scratch analizi görüntüleri*



Şekil 4.14. TEKA için scratch analizi görüntüleri

4.5. RT-PCR mRNA Ekspresyon Bulguları

RT-PCR ile yapılan inceleme sonucunda HaCaT keratiosit hücre hatları üzerinde SO-1, SO-2 ve TEKA' nın 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (100 ng/ml), 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (10 ng/ml) ve 0,001 $\mu\text{g/ml}$ (1 ng/ml) konsantrasyonlarında COL1A1 mRNA ekspresyon düzeyleri değişikliğe uğramadığı gözlemlenmiştir. Analiz sonuçları Software Release LCS480 version 1.5.0.39 da detaylı olarak oluşturulmuştur.



Şekil 4.15. SO-1 , SO-2, ve TEKA'nın 1 ng (0,001 μ M); 10 ng (0,01 μ M) 100 ng (0,1 μ M) konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen HaCaT keratinosit hücrelerinde COL1A1 geninin amplifikasyon eğrisi

4.6. Sığıla Yağına İlişkin İçerik Analizi Bulguları

Sığıla yağına ilişkin yapılan içerik analizi ile ilgili sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir. Yerel üreticilerden tedarik edilen sığıla yağı numulerinde bulunan ve biyoaktif olduğu düşünülen aktif içerikler sinnamil siklamat, fenilpropil siklamat , benzil alkol , sinnamaldehit ve sinnamik asit olarak tespit edilmiştir.

Sıġla-1(SO-1) için analiz sonuçları

Madde	İyonlaşma türü	Adduct	Hesaplanan Kütle	Bulunan Kütle	İntensite	% İntensite
Sinnamil siklamat	Pozitif	H	265.1223	265.1226	2554839	9,3
Fenilpropil siklamat	Pozitif	H	267.1380	267.1383	22659518	82,1
Benzil alkol	Pozitif	Na	131.0528	131.0499	583365	2,1
Sinnamaldehit	Pozitif	H	133.0648	133.0670	804333	2,9
Sinnamik asit	Pozitif	H	149.0597	149.0584	53238	0,2
p-hidroksisinnamik asit	Negatif	H	164.0401	163.0187	946147	3,4

Sıġla-2 (SO-2)için analiz sonuçları

Madde	İyonlaşma türü	Adduct	Hesaplanan Kütle	Bulunan Kütle	İntensite	% İntensite
Sinnamil siklamat	Pozitif	H	265.1223	265.1226	312.000	19,6
Fenilpropil siklamat	Pozitif	H	267.1380	267.1383	1.115.000	69,5
Benzil alkol	Pozitif	Na	131.0528	131.0499	50.000	3,1
Sinnamaldehit	Pozitif	H	133.0648	133.0670	100.000	6,2
Sinnamik asit	Pozitif	H	149.0597	149.0584	13.750	0,9
p-hidroksisinnamik asit	Negatif	H	164.0401	163.0187	11.500	0,7

Tablo 4.3. *Sıġla yaġına İlişkin Yapılan İçerik Analizi Sonuçları*

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığla yağı antik çağlardan günümüze kadar tıbbi amaçlı olarak mantar, uyuz gibi kaşıntılı dermatolojik hastalıklarda, mukolitik olarak astım bronşit ve diğer solunum yolu rahatsızlıklarında , hemoroidlerde, mide ülserleri tedavisinde, dizanteri gibi bağırsak hastalıklarında, yara iyileştirici olarak ve yaraya bağlı enfeksiyonların önlenmesinde kullanılmıştır [195].

Tıbbi ürünler çoğunlukla ağacın gövde kısmını yaralamak suretiyle elde edilen bir ürün olan storakstan gelir. Sığla yağının antioksidan ve antimikrobiyal etkileri yapısında bulunan çok sayıda bileşikten kaynaklanmaktadır [196-197]. Sığla yağının antioksidan ve antibakteriyel etkileri *in vitro* tekniklerle gösterilmiştir [174, 184]. Ayrıca yapılan bir çalışma sığala yağının çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etkisini ortaya koymuştur [198]. Bakteriyel kolonizasyon yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Yanıklara bağlı gelişen yaralarda ölümlerin yaklaşık %75'i enfeksiyonlar nedeniyle gerçekleşmektedir [200]. Ayrıca yapılan çalışmalar sığla yağının mide ülseri gelişimini de önlediğini göstermiştir.

Yara iyileşmesi sürecinde dokuların oksidatif hasardan korunması için antioksidan içeren bileşiklerin topikal uygulamalarının faydalı olacağı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [199]. Antioksidan ve antimikrobiyal etkileri nedeniyle sığla yağının yara iyileşmesini hızlandırıcı etki göstereceği düşünülmektedir. Sığla yağının yara iyileşmesini indükleyerek epitelizan özellikler gösterdiği ve antibakteriyel etkileriyle sürece katkı sunduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir [174,187]. Sığla yağının çok sayıda uyarıcı faktörle yara rejenerasyonunu etkilediği belirtilmiştir. Bununla birlikte, antioksidan ve inflamatuvar stimülasyon etkileri, cilt yara iyileşmesinde sığla yağının baskın faktörleri olarak tanımlanmıştır [197, 201]. Enflamasyon, yara iyileşme evrelerinin ilk ve belki de en kritik aşamasıdır. Sığla yağının yanık yaralarında hızlı inflamatuvar yanıtı sürdürdüğü bildirilmiştir ve inflamatuvar sürecin hızlanmasıyla iyileşen yaraya nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar göçünün artması erken epitelizasyon ile sonuçlanmaktadır [201].

Bir çalışmada sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan yanık yara modelinde sıgla yağının yanık yara iyileşmesi üzerine etkileri gümüş sülfadiazine ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sıgla yağının yanık yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdığı ve olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yapılan histopatolojik değerlendirmelerde yara iyileşmesinin aşamaları olan inflamasyon, kollajen birikimi, anjiogenezis, granülasyon dokusunun oluşumu ve epitelizasyon gibi parametrelerin sıgla yağı ve gümüş sülfadiazin (SSD) gruplarında kontrol gruplarına göre arttığı fakat sonuçların iki grupta benzer olduğu bildirilmiştir [201].

Başka bir çalışmada sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan yanık yara modelinde yara iyileşmesi üzerinde sıgla yağı ve kollagenaz içeren pomatların etkinliği değerlendirilmiştir. Araştırma sonucuna göre sıgla yağı ve kollagenaz içeren pomatların uygulandığı gruplarda kontrol ve sham grubuna göre yara iyileşme süresinin daha kısa olduğu ve yara yüzey alanının istatistiksel olarak daha fazla küçüldüğü belirtilmiştir [202].

Bu çalışmada ise sıgla yağının yara iyileşmesi üzerine etkisi *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Araştırmada MTT yöntemi sonucunda toksik olmayan konsantrasyonlar 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml) olarak belirlenmiştir. Sitotoksosite açısından bu konsantrasyon aralığının güvenli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 72 saat boyunca yapılan gerçek zamanlı hücre analizine (RTCA-DP) göre hücre proliferasyonunda/migrasyonunda zamana bağımlı olarak 0,001 µg/ml (1 ng/ml) konsantrasyonlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Scratch analizine göre 48.saat sonunda hücre migrasyonunda zamana bağımlı olarak 0,001 µg/ml (1 ng/ml) konsantrasyonlarında yaranın her iki yakasındaki mesafenin anlamlı bir şekilde kapandığı gözlemlenmiştir.

Sıgla yağının hem fibroblastik aktivite hem de kollajen yoğunluğu üzerinde bildirilmiş bir etkisi yoktur. Ötsel ve ark. ayrıca sıgla yağı ile yaptıkları yara iyileşme çalışmasında bu parametreler üzerinde hiçbir etki bulamamışlardır [187]. Araştırmamızda da HaCaT keratiosit hücre hatları üzerine uyguladığımız SO-1, SO-2 ve TEKA nın 0,1 µg/ml (100 ng/ml), 0,01 µg/ml (10 ng/ml) ve 0,001 µg/ml (1 ng/ml) konsantrasyonlarında COL1A1 mRNA ekspresyon düzeylerinde değişiklik görülmemiştir. Bu sonuç bize sıgla yağının etkilerini oluştururken kullandığı yolların hücre içi kollajen sentezini artırmak üzerinden gerçekleşmediğini ifade etmektedir.

Yapılan çok yeni bir deneysel çalışmada sıgla yağının nanoteknolojik olarak işlenmiş yara bandaj materyallerinde kullanılma potansiyeli araştırılmış, yağın antibakteriyel etkisi ve CCD-1072Sk insan fibroblast hücreleri üzerinden yara kapanma hızı ve geç dönem apoptoz değerlendirilmiştir. Her ne kadar keratiosit hücreleri ve epitelizasyonu konu almasa da bu

çalışmanın sonuçları oluşturulan 3 boyutlu yazıcı ile oluşturulan bu nanoteknolojik yara bandajının yara iyileşme sürecini hızlandırabileceği sonucuna varılmıştır [188].

Sıgla yağı ile ilgili birçok araştırmacı tarafından içerik analizi yapılmıştır. Bir çalışmada sıgla yağının ayrıntılı kimyasal bileşimi raporlanmış ve ana bileşenleri a-pinen (1.02), benzaldehit (0.47); b-pinen (0.15); benzil alkol (1.22); asetofenon (0.19); 1-fenil-1-etanol (0.17); hidrosinnamil alkol (41.13); trans-sinnamil aldehit (0.24); transsinnamil alkol (45.07); bcariophyllene (%3.60), stiren (% 1.56) olarak belirlenmiştir [180]. Gürbüz ve ark. sıgla yağının ana bileşenlerinin %81.9 stiren, %6.9 sinnamil alkol, %3.5 a-pinen olduğunu göstermiştir [175] Kim ve ark. [51] ve Park [203], sıgla'nın uçucu yağında stiren oranının sadece %1,56 olduğunu ve esas olarak hem serbest hem de sinnamik asit ile birleştirilmiş reçine alkollerinden oluştuğunu ve bu oranın yaklaşık %30-45 olduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise sıgladan elde edilen hidro damıtılmış uçucu yağların GC ve GC-MS ile analiz edilmiş ve ana bileşenler (E)-etil sinnamat (%27.5 ve %30.6), torreyol (%11.0 ve %12.0) ve sinnamil alkol (%7.2 ve %7.9) olarak bildirilmiştir [204].

Araştırmamızda ise sıgla yağında bulunan içerik sıgla-1 (SO-1) numunesi için sinnamil siklamat (%9,3), fenilpropil siklamat (% 82,1), benzil alkol (%2,1), sinnamaldehit (%2,9) ve sinnamik asit (%0,2) p-hidroksisinnamik asit (%3,4) olarak; sıgla-2 (SO-2) numunesi için sinnamil siklamat (%19,6), fenilpropil siklamat (% 69,5), benzil alkol (%3,1), sinnamaldehit (%6,2) ve sinnamik asit (%0,9) , p-hidroksisinnamik asit (%3,4) olarak tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalarda sıgla yağının yapısında bulunan bileşenlerle ilgili farklı oranların kullanılan analiz metodları ve sıgla yağının elde edilme yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar sıgla yağının yara iyileştirici etkisinde ana fitokimyasal faktörün fenilpropil siklamat olduğunu düşündürmektedir.

Sadece ülkemizde yetişmekte olan *Liquidambar orientalis* ağacından elde edilen bir balsam olan Sıgla yağının yara iyileşiminin son basamağı olan epitelizasyonda önemli rol oynayan keratinosit hücreleri üzerinde etkileri ilk kez bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Ancak, bu etkinin detaylı mekanizması ve etkiden sorumlu fitokimyasal bileşen(ler)in ortaya çıkarılması için daha başka araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1]. Gonzalez, AC de O., Costa, TF., Andrade Z de, A., Medrado, ARAP. (2016). Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 91(5):614–20.
- [2]. Borena, BM., Martens, A., Broeckx, SY., Meyer, E., Chiers, K., Duchateau, L. (2015). Regenerative skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. *Cell Physiol Biochem.* 36(1):1–23.
- [3]. Corrado, C., Raimondo, S., Chiesi, A., Ciccio, F., De Leo, G., Alessandro, R. (2013). Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci.* 14(3):5338–66.
- [4]. Baytop, T. (1984). *Türkiye 'de Bitkiler ile Tedavi* (Geçmişte ve Günümüzde). İstanbul Üniversitesi Yayınları No. 3255, İstanbul.
- [5]. Raina, R., Prawez, S., Verma, P., Pankaj, N. (2008). Medicinal Plants and their Role in Wound Healing. *VetScan*, 3.
- [6]. Demirci, S., Özhatay, N. (2012). An ethnobotanical study in Kahramanmaraş (Turkey); wild plants used for medicinal purpose in Andirin, Kahramanmaraş. *Turk J Pharm Sci*, 9: 75-92.
- [7]. Umar, DÇ., ve Damar, HT. (2017). Akut ve Kronik Yaralar ve Hemşirelik Bakımı. *Türkiye Klinikleri Surgical Nursing-Special Topics*, 3: 157-163.
- [8]. Falanga, V. (2004). The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32: 88-94.
- [9]. Smith, SA., Travers, RJ., and Morrissey, JH. (2015). How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 50(4):326–36.
- [10]. Reinke, JM., and Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 49(1):35–43.
- [11]. Palta, S., Saroa, R., and Palta A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 58(5):515–23.

- [12]. Balaji, S., Watson, C. L., Ranjan, R., King, A., Bollyky, P. L., & Keswani, S. G. (2015). Chemokine involvement in fetal and adult wound healing. *Advances in wound care*, 4(11), 660-672.
- [13]. Bjork, J., Hugli, TE., and Smedegard, G. (1985). Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol.* 134(2):1115–9.
- [14]. Sinno, H., Prakash, S. (2013). Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plast Surg Int.*146764–7.
- [15]. Eming, SA., Martin, P., Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 6(265):265sr6.
- [16]. MacLeod, A. S., & Mansbridge, J. N. (2016). The innate immune system in acute and chronic wounds. *Advances in wound care*, 5(2), 65-78.
- [17]. Kono, H., Rock, KL. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 8(4):279–89.
- [18]. McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C., ... & Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330(6002), 362-366.
- [19]. Bianchi, ME., Manfredi, AA. (2009). Immunology. Dangers in and out. *Science.* 323(5922):1683–4.
- [20]. Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140(6):805–20.
- [21]. de Oliveira, S., Rosowski, EE., Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol.* 16(6):378–91.
- [22]. Futosi, K., Fodor, S., Mocsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 17(3):638–50.
- [23]. Pinhal-Enfield, G., Ramanathan, M., Hasko, G., Vogel, S. N., Salzman, A. L., Boons, G. J., & Leibovich, S. J. (2003). An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A2A receptors. *The American journal of pathology*, 163(2), 711-721.

- [24]. Wilgus, T.A., Roy, S., McDaniel, J.C. (2013). Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care*. 2(7):379–88.
- [25]. Pittman, K., Kubes, P. (2013). Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immun.*;5(4):315–23.
- [26]. De Oliveira, S., López-Muñoz, A., Candel, S., Pelegrín, P., Calado, Â., & Mulero, V. (2014). ATP Modulates Acute Inflammation In Vivo through Dual Oxidase 1–Derived H₂O₂ Production and NF-κB Activation. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5710–5719.
- [27]. Baggiolini, M., Loetscher, P., Moser, B. (1995). Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol*. 17(2):103–8.
- [28]. Martins-Green, M., Petreaca, M., Wang, L. (2013). Chemokines and their receptors are key players in the orchestra that regulates wound healing. *Adv Wound Care*. 2(7):327–47.
- [29]. Gillitzer, R., Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*. 69(4):513–21.
- [30]. Petreaca, M. L., Yao, M., Liu, Y., DeFea, K., & Martins-Green, M. (2007). Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Molecular biology of the cell*, 18(12), 5014–5023.
- [31]. Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert review of clinical immunology*, 10(5), 593–619.
- [32]. Patel, D. D., Koopmann, W., Imai, T., Whichard, L. P., Yoshie, O., & Krangel, M. S. (2001). Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clinical immunology*, 99(1), 43–52.
- [33]. Monneau, Y., Arenzana-Seisdedos, F., & Lortat-Jacob, H. (2016). The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells. *Journal of leukocyte biology*, 99(6), 935–953.
- [34]. Kolaczowska, E., Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 13(3):159–75.

- [35]. Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 33(5):657–70.
- [36]. Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30(11):513–21.
- [37]. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
- [38]. Theilgaard-Mönch, K., Knudsen, S., Follin, P., Borregaard, N. (2004). The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *The Journal of Immunology*, 172(12), 7684-7693.
- [39]. Robbins, P. B., Lin, Q., Goodnough, J. B., Tian, H., Chen, X., Khavari, P. A. (2001). In vivo restoration of laminin 5 β 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9), 5193-5198.
- [40]. Blasi, F., Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(12):932–43.
- [41]. Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 6:173.
- [42]. Serhan, CN., Chiang, N., Van Dyke, TE. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 8(5):349–61.
- [43]. Widgerow, AD. (2012). Cellular resolution of inflammation—catabasis. *Wound Repair Regen.* 20(1):2–7.
- [44]. Moor, AN., Vachon, DJ., Gould, LJ. (2009). Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 17(6):832–9.
- [45]. Nwomeh, B. C., Liang, H. X., Cohen, I. K., & Yager, D. R. (1999). MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *Journal of Surgical Research*, 81(2), 189-195.
- [46]. Pirilä, E., Korpi, J. T., Korkiamäki, T., Jahkola, T., Gutierrez-Fernandez, A., Lopez-Otin, C., ... & Sorsa, T. (2007). Collagenase-2 (MMP-8) and matrilysin-2 (MMP-26) expression in human wounds of different etiologies. *Wound Repair and Regeneration*, 15(1), 47-57.

- [47]. Wlaschek, M., Scharffetter-Kochanek, K. (2005). Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 13(5):452–61.
- [48]. Fadini, G. P., Menegazzo, L., Rigato, M., Scattolini, V., Poncina, N., Bruttocao, A., ... & Avogaro, A. (2016). NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans. *Diabetes*, 65(4), 1061-1071.
- [49]. Koh, T.J., DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 13:e23.
- [50]. Gordon, S., Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5(12):953–64.
- [51]. Kim, M. H., Liu, W., Borjesson, D. L., Curry, F. R. E., Miller, L. S., Cheung, A. L., ... & Simon, S. I. (2008). Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), 1812-1820.
- [52]. Rodero, M. P., Licata, F., Poupel, L., Hamon, P., Khosrotehrani, K., Combadiere, C., & Boissonnas, A. (2014). In vivo imaging reveals a pioneer wave of monocyte recruitment into mouse skin wounds. *PLoS One*, 9(10), e108212.
- [53]. Adams, D.O. (1989). Molecular interactions in macrophage activation. *Immunol Today.* 10(2):33–5.
- [54]. Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13:453–61.
- [55]. Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., ... & Ottenhoff, T. H. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13), 4560-4565.
- [56]. Sica, A., Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787–95.
- [57]. Rodero, M.P., Hodgson, S.S., Hollier, B., Combadiere, C., Khosrotehrani, K. (2013). Reduced Il17a expression distinguishes a Ly6cloMHCIIhi macrophage population promoting wound healing. *J Investig Dermatol.* 133(3):783–92.

- [58]. Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*, 12(11), 1035-1044.
- [59]. Brown, BN., Sicari, BM., Badylak, SF. (2014). Rethinking regenerative medicine: a macrophage-centered approach. *Front Immunol.* 5:510.
- [60]. Elliott, MR., Koster, KM., Murphy, PS. (2017). Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J Immunol.* 198(4):1387–94.
- [61]. Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., & Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *The Journal of Immunology*, 175(1), 342-349.
- [62]. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, 23(11), 549-555.
- [63]. Daley, JM., Brancato, SK., Thomay, AA., Reichner, JS., Albina, JE. (2010). The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol.* 87(1):59–67.
- [64]. Nosbaum, A., Ettinger, M., Truong, H. A., Pauli, M. L., Gearty, S. V., Abbas, A. K., & Rosenblum, M. D. (2015, May). Regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 135, pp. S3-S3).
- [65]. Li, D., Landen, NX. (2017). MicroRNAs in skin wound healing. *Eur J Dermatol.* 27(S1):12–4.
- [66]. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12), 677-686.
- [67]. Brancato, SK., Albina, JE. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol.* 178(1):19–25.
- [68]. Landen, NX., Li, D., Stahle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 73(20):3861–85.
- [69]. Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., ... & Scharffetter-Kochanek, K. (2011). An unrestrained proinflammatory M1 macrophage

population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(3), 985-997.

- [70]. Zamboni, P., Izzo, M., Tognazzo, S., Carandina, S., De Palma, M., Catozzi, L., Gemmati, D. (2006). The overlapping of local iron overload and HFE mutation in venous leg ulcer pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(10), 1869-1873.
- [71]. Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P., Bayat, A. (2009). Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol*. 18(11):921–33.
- [72]. Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhij, S., ... & Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(5), 829-840.
- [73]. Affolter, M., Zeller, R., Caussinus, E. (2009). Tissue remodelling through branching morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:831–42.
- [74]. Takehara, K. (2000). Growth regulation of skin fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 24:S70–7.
- [75]. Lin, Z. Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., & Mukaida, N. (2003). Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of leukocyte biology*, 73(6), 713-721.
- [76]. Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., ... & Eming, S. A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3964-3977.
- [77]. Schultz, G., Rotatori, DS., Clark, W. (1991). EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *J Cell Biochem*. 45(4):346–52.
- [78]. Iorio, V., Troughton, LD., Hamill, KJ. (2015). Laminins: roles and utility in wound repair. *Adv Wound Care*. 4(4):250–63.
- [79]. Yannas, IV., Tzeranis, DS., So, PTC. (2017). Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation. *Wound Repair Regen*. 25(2):177–91.

- [80]. Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American journal of pathology*, 180(4), 1340-1355.
- [81]. Darby, IA., Laverdet, B., Bonte, F., Desmouliere, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 7:301–11.
- [82]. Plikus, M. V., Guerrero-Juarez, C. F., Ito, M., Li, Y. R., Dedhia, P. H., Zheng, Y., ... & Cotsarelis, G. (2017). Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*, 355(6326), 748-752.
- [83]. Gauglitz, G. G., Korting, H. C., Pavicic, T., Ruzicka, T., & Jeschke, M. G. (2011). Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Molecular medicine*, 17(1), 113-125.
- [84]. Wynn, TA. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 4(8):583–94.
- [85]. Hinz, B. (2016). The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med*. 64(4):171–7.
- [86]. Shi, J., Li, J., Guan, H., Cai, W., Bai, X., Fang, X., ... & Zhu, X. (2014). Anti-fibrotic actions of interleukin-10 against hypertrophic scarring by activation of PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways in scar-forming fibroblasts. *PloS one*, 9(5), e98228.
- [87]. Tandara, A. A., & Mustoe, T. A. (2004). Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World journal of surgery*, 28(3), 294-300.
- [88]. Schreml, S., Szeimies, R. M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., & Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 163(2), 257-268.
- [89]. Edwards, R., and Harding, K. G. (2004). Bacteria and wound healing. *Current opinion in infectious diseases*, 17(2), 91-96.
- [90]. Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. Ø., Madsen, K. G., Phipps, R., Krogfelt, K., Givskov, M. (2008). Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound repair and regeneration*, 16(1), 2-10.
- [91]. Gosain, A., and DiPietro, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World journal of surgery*, 28(3), 321-326.

- [92]. Keylock, K. T., Vieira, V. J., Wallig, M. A., DiPietro, L. A., Schrementi, M., Woods, J. A. (2008). Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(1), R179-R184.
- [93]. Swift, M. E., Burns, A. L., Gray, K. L., DiPietro, L. A. (2001). Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(5), 1027-1035.
- [94]. Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 243-251.
- [95]. Vileikyte, L. (2007). Stress and wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 49-55.
- [96]. Godbout, J. P., and Glaser, R. (2006). Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(4), 421-427.
- [97]. Boyapati, L., and Wang, H. L. (2007). The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontology 2000*, 44(1), 195-210.
- [98]. Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1219-1222.
- [99]. Gary Sibbald, R., and Woo, K. Y. (2008). The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 24(S1), S25-S30.
- [100]. Galkowska, H., Wojewodzka, U., and Olszewski, W. L. (2006). Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 14(5), 558-565.
- [101]. Franz, M. G. (2007). Optimizing healing of the acute wound by minimizing complications. *Curr Prob Surg*, 44, 679-766.
- [102]. Hofman, D., Moore, K., Cooper, R., Eagle, M., Cooper, S. (2007). Use of topical corticosteroids on chronic leg ulcers. *Journal of wound care*, 16(5), 227-230.
- [103]. Pieringer, H., Stuby, U., Biesenbach, G. (2007, April). Patients with rheumatoid arthritis undergoing surgery: how should we deal with antirheumatic treatment?. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 36, No. 5, pp. 278-286). WB Saunders.

- [104]. Zimmerman-Pope, N., Waldron, D. R., Barber, D. L., Forrester, S. D., Wilcke, J. R., Marini, M. (2003). Effect of fenoldopam on renal function after nephrotomy in normal dogs. *Veterinary Surgery*, 32(6), 566-573.
- [105]. Wilson, J. A., and Clark, J. J. (2004). Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Advances in skin & wound care*, 17(8), 426-432.
- [106]. Anaya, D. A., and Dellinger, E. P. (2006). The obese surgical patient: a susceptible host for infection. *Surgical infections*, 7(5), 473-480.
- [107]. Szabo, G., and Mandrekar, P. (2009). A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(2), 220-232.
- [108]. Radek, K. A., Kovacs, E. J., DiPietro, L. A. (2007). Matrix proteolytic activity during wound healing: modulation by acute ethanol exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 31(6), 1045-1052.
- [109]. Ahn, C., and Mulligan, P. (2008). Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Advances in skin & wound care*, 21(5), 227-236.
- [110]. Chan, L. K., Withey, S., and Butler, P. E. (2006). Smoking and wound healing problems in reduction mammoplasty: is the introduction of urine nicotine testing justified?. *Annals of plastic surgery*, 56(2), 111-115.
- [111]. Arnold, M., and Barbul, A. (2006). Nutrition and wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 42S-58S.
- [112]. Gogia, P. P. (1995). Physiology of wound healing. *Clinical wound management*, 8-12.
- [113]. McDaniel, J. C., Belury, M., Ahijevych, K., Blakely, W. (2008). Omega-3 fatty acids effect on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(3), 337-345.
- [114]. Olsen, C. E., Liguori, A. E., Zong, Y., Lantz, R. C., Burgess, J. L., & Boitano, S. (2008). Arsenic upregulates MMP-9 and inhibits wound repair in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(2), L293-L302.
- [115]. Wollina, U., Kubicki, J. (2007). Multiaktive Eigenschaften von Dexpanthenol-haltigen Externa. *Kosm Med.* 3, 14–18.
- [116]. Proksch, E., de Bony, R., Trapp, S., Boudon, S. (2017). Topical use of dexpanthenol: A 70th anniversary article. *J. Dermatol. Treat.* , 28, 766–773.

- [117]. Giménez-Arnau, A. (2016). Standards for the Protection of Skin Barrier Function. *Curr. Probl. Dermatol.* 49, 123–134.
- [118]. Proksch, E., Berardesca, E., Misery, L., Engblom, J., Bouwstra, J. (2019). Dry skin management: Practical approach in light of latest research on skin structure and function. *J. Dermatol. Treat.* 1–7.
- [119]. Helaly, G.F., Abd El-Aziz, A.A., Sonbol, F.Iahn., El-Banna, T.E., Louise, N.L. (2011). Dexpanthenol and propolis extract in combination with local antibiotics for treatment of Staphylococcal and Pseudomonal wound infections. *Arch. Clin. Microbiol.* 2, 1–15.
- [120]. Stettler, H., Kurka, P., Lunau, N., Manger, C., Böhling, A., Bielfeldt, S., Wilhelm, K.P., Dähnhardt-Pfeiffer, S., Dähnhardt, D., Brill, F.H. (2017). A new topical panthenol-containing emollient: Results from two randomized controlled studies assessing its skin moisturization and barrier restoration potential, and the effect on skin microflora. *J. Dermatol. Treat.* 28, 173–180.
- [121]. Stettler, H., Kurka, P., Wagner, C., Sznurkowska, K., Czernicka, O., Böhling, A., Bielfeldt, S., Wilhelm, K.P., Lenz, H. (2017a). A new topical panthenol-containing emollient: Skin-moisturizing effect following single and prolonged usage in healthy adults, and tolerability in healthy infants. *J. Dermatol. Treat.* 28, 251–257.
- [122]. Björklund, S., Pham, Q.D., Jensen, L.B., Knudsen, N.Ø., Nielsen, L.D., Ekelund, K., Ruzgas, T., Engblom, J., Sparr, E. (2016). The effects of polar excipients transcutol and dexpanthenol on molecular mobility, permeability, and electrical impedance of the skin barrier. *J. Colloid Interface Sci.* 479, 207–220.
- [123]. Baron, J.M., Glatz, M., Proksch, E. (2020). Optimal support of wound healing: New insights. *Dermatology*, 1– 8.
- [124]. Marquardt, Y., Amann, P.M., Heise, R., Czaja, K., Steiner, T., Merk, H.F., Skazik-Voogt, C., Baron, J.M. (2015). Characterization of a novel standardized human three-dimensional skin wound healing model using nonsequential fractional ultrapulsed CO₂ laser treatments. *Lasers Surg. Med.* 47, 257–265.
- [125]. Schmitt, L., Huth, S., Amann, P.M., Marquardt, Y., Heise, R., Fietkau, K., Huth, L., Steiner, T., Hölzle, F., Baron, J.M. (2018). Direct biological effects of fractional ultrapulsed CO₂ laser irradiation on keratinocytes and fibroblasts in human organotypic full-thickness 3D skin models. *Lasers Med. Sci.* 33, 765–772.

- [126]. Wiederholt, T., Heise, R., Skazik, C., Marquardt, Y., Joussen, S., Erdmann, K., Schröder, H., Merk, H.F., Baron, J.M. (2009). Calcium pantothenate modulates gene expression in proliferating human dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 18, 969–978.
- [127]. Takamiya, M., Fujita, S., Saigusa, K., Aoki, Y. (2008). Simultaneous detection of eight cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay for wound age estimation. *Int. J. Legal. Med.* 122, 143–148
- [128]. Schmitt, L., Marquardt, Y., Heise, R., von Felbert, V., Amann, P.M., Huth, L., Steiner, T., Hölzle, F., Huth, S., Baron, J.M. (2019). Novel human full-thickness three-dimensional nonkeratinized mucous membrane model for pharmacological studies in wound healing. *Skin Pharmacol. Physiol.* 32, 265–274
- [129]. Bown, D. (1995). *Encyclopedia of Herbs & Their Uses*; Houghton Mifflin: Boston, MA, USA,
- [130]. Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., Hahn, E.G. (2000). Chemical, Pharmacological and Clinical Profile of the East Asian Medical Plant *Centella Asiatica*. *Phytomedicine*, 7, 427–448.
- [131]. Prakash, V., Jaiswal, N., Srivastava, M. (2017). A Review on Medicinal Properties of *Centella Asiatica*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 10, 69–74.
- [132]. Tan, S.C., Bhattamisra, S.K., Chellappan, D.K., Candasamy, M. (2021). Actions and Therapeutic Potential of Madecassoside and Other Major Constituents of *Centella Asiatica*: A Review. *Appl. Sci.*, 11, 8475
- [133]. Maquart, F.X., Chastang, F., Simeon, A., Birembaut, P., Gillery, P., Wegrowski, Y. (1999). Triterpenes from *Centella Asiatica* Stimulate Extracellular Matrix Accumulation in Rat Experimental Wounds. *Eur. J. Dermatol.* 9, 289–296.
- [134]. Incandela, L., Cesarone, M.R., Cacchio, M., De Sanctis, M.T., Santavenere, C., D'Auro, M.G., Bucci, M., Belcaro, G. (2001). Total Triterpenic Fraction of *Centella Asiatica* in Chronic Venous Insufficiency and in High-Perfusion Microangiopathy. *Angiology*, 52, S9–S13.
- [135]. Scott, L.N., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W. (2021). Safety Assessment of Saccharide Esters as Used in Cosmetics. *Int. J. Toxicol.* 40, 52S–116S.

- [136]. Nhiem, N.X., Tai, B.H., Quang, T.H., Van Kiem, P., Van Minh, C., Nam, N.H., Kim, J.H., Im, L.R., Lee, Y.M., Kim, Y.H. (2011). A New Ursane-Type Triterpenoid Glycoside from *Centella Asiatica* Leaves Modulates the Production of Nitric Oxide and Secretion of TNF- α in Activated RAW 264.7 Cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 21, 1777–1781.
- [137]. James, J., Dubery, I. (2011). Identification and Quantification of Triterpenoid Centelloids in *Centella Asiatica* (L.) Urban by Densitometric TLC. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, 24, 82–87.
- [138]. Coldren, C.D., Hashim, P., Ali, J.M., Oh, S.K., Sinskey, A.J., Rha, C.K. (2003). Gene Expression Changes in the Human Fibroblast Induced by *Centella Asiatica* Triterpenoids. *Planta Med*, 69, 725–732.
- [139]. Shukla, A., Rasik, A.M., Jain, G.K.K., Shankar, R., Kulshrestha, D.K.K., Dhawan, B.N. (1999). In Vitro and in Vivo Wound Healing Activity of Asiaticoside Isolated from *Centella Asiatica*. *J. Ethnopharmacol.* 65, 1–11.
- [140]. Liu, M., Dai, Y., Li, Y., Luo, Y., Huang, F., Gong, Z., Meng, Q. (2008). Madecassoside Isolated from *Centella Asiatica* Herbs Facilitates Burn Wound Healing in Mice. *Planta Med.* 2008, 74, 809–815.
- [141]. Feng, X., Huang, D., Lin, D., Zhu, L., Zhang, M., Chen, Y., Wu, F. (2021). Effects of Asiaticoside Treatment on the Survival of Random Skin Flaps in Rats. *J. Investig. Surg.* 34, 107–117.
- [142]. Zhang, F. (2011). Acute and Sustained Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Survival of Flaps and Skin Grafts. *Ann. Plast. Surg.* 66, 581–582.
- [143]. Angelos, P.C., Winn, S.R., Kaurin, D.S., Holland, J., Wax, M.K. (2011). Evaluating Revascularization and Flap Survival Using Vascular Endothelial Growth Factor in an Irradiated Rat Model. *Arch. Facial Plast. Surg.* 13, 185–189.
- [144]. Hafiz, Z.Z., Amin, M.M., James, R.M.J., Teh, L.K., Salleh, M.Z., Adenan, M.I. (2020). Inhibitory Effects of Raw-Extract *Centella asiatica* (RECA) on Acetylcholinesterase, Inflammations, and Oxidative Stress Activities via In Vitro and In Vivo. *Molecules*, 25, 892.
- [145]. Pakdeechote, P., Bunbupha, S., Kukongviriyapan, U., Prachaney, P., Khrisanapant, W., Kukongviriyapan, V. (2014). Asiatic Acid Alleviates Hemodynamic and

Metabolic Alterations via Restoring ENOS/INOS Expression, Oxidative Stress, and Inflammation in Diet-Induced Metabolic Syndrome Rats. *Nutrients*, 6, 355–370.

- [146]. Somchit, M.N., Sulaiman, M.R., Zuraini, A., Samsuddin, L., Somchit, N., Israf, D.A., Moin, S. (2004). Antinociceptive and Antiinflammatory Effects of Centella Asiatica. *Indian J. Pharmacol*, 36, 377–380.
- [147]. Wan, J., Gong, X., Jiang, R., Zhang, Z., Zhang, L. (2013). Antipyretic and Anti-Inflammatory Effects of Asiaticoside in LipopolysaccharideTreated Rat through up-Regulation of Heme Oxygenase-1. *Phytother. Res*, 27, 1136–1142.
- [148]. Gunathilake, K.D.P.P., Ranaweera, K.K.D.S., Rupasinghe, H.P.V. (2018). In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. *Biomedicines*, 6, 107.
- [149]. Avval, Z.M., Malekpour, L., Raeisi, F., Babapoor, A., Mousavi, S.M., Hashemi, S.A., Salari, M. (2020). Introduction of Magnetic and Supermagnetic Nanoparticles in New Approach of Targeting Drug Delivery and Cancer Therapy Application. *Drug Metab. Rev*, 52, 157–184.
- [150]. Mousavi, S.M., Nejad, Z.M., Hashemi, S.A., Salari, M., Gholami, A., Ramakrishna, S., Chiang, W.H., Lai, C.W. (2021). Bioactive AgentLoaded Electrospun Nanofiber Membranes for Accelerating Healing Process: A Review. *Membranes*, 11, 702.
- [151]. Kuo, C.W., Chiu, Y.F., Wu, M.H., Li, M.H., Wu, C.N., Chen, W.S., Huang, C.H. (2021). Gelatin/Chitosan Bilayer Patches Loaded with Cortex Phellodendron Amurense/Centella Asiatica Extracts for Anti-Acne Application. *Polymers*, 13, 579
- [152]. Da Rocha, P.B.R., dos Santos Souza, B., Andrade, L.M., dos Anjos, J.L.V., Mendanha, S.A., Alonso, A., Marreto, R.N., Taveira, S.F. (2019). Enhanced Asiaticoside Skin Permeation by Centella Asiatica-Loaded Lipid Nanoparticles: Effects of Extract Type and Study of Stratum Corneum Lipid Dynamics. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 50, 305–312.
- [153]. Committee on Herbal Medicinal Products. Community Herbal Monograph on Hamamelis virginiana L., Folium et Cortex aut Ramunculus Destillatum; Doc. Ref.: EMA/HMPC/114584/2008; European Medicines Agency: London, UK, 2010.

- [154]. European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP). Hamamelidis cortex (Hamamelis bark); European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP): Exeter, UK, 2012; p. 15.
- [155]. Wolff, H.H., Kieser, M. (2007). Hamamelis in children with skin disorders and skin injuries: Results of an observational study. *Eur. J. Pediatr*, 166, 943–948.
- [156]. Hughes-Formella, B.J., Filbry, A., Gassmueller, J., Rippke, F. (2002). Anti-inflammatory efficacy of topical preparations with 10% hamamelis distillate in a UV erythema test. *Ski. Pharm. Appl Ski. Physiol.* 15, 125–132
- [157]. Deters, A., Dauer, A., Schnetz, E., Fartasch, M., Hensel, A. (2001). High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from Hamamelis virginiana bark: Influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*, 58, 949–958.
- [158]. Erdelmeier, C.A., Cinatl, J., Jr., Rabenau, H., Doerr, H.W., Biber, A., Koch, E. (1996). Antiviral and antiphlogistic activities of Hamamelis virginiana bark. *Planta Med*, 62, 241–245.
- [159]. Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H. (1993). Evaluation of superoxide scavenging activities of hamamelis extract and hamamelitannin. *Free. Radic. Res. Commun*, 19, 333–340.
- [160]. Habtemariam, S. (2002). Hamamelitannin from Hamamelis virginiana inhibits the tumour necrosis factor-alpha (TNF)-induced endothelial cell death in vitro. *Toxicon*, 40, 83–88.
- [161]. Touriño, S., Lizárraga, D., Carreras, A., Lorenzo, S., Ugartondo, V., Mitjans, M., Vinardell, M.P., Juliá, L., Cascante, M., Torres, J.L. (2008). Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (Hamamelis virginiana) bark: Electron transfer capacity, in vitro antioxidant activity, and effects on skin-related cells. *Chem. Res. Toxicol*, 21, 696–704.
- [162]. Cheesman, M.J., Alcorn, S., Verma, V., Cock, I.E. (2021). An assessment of the growth inhibition profiles of Hamamelis virginiana L. extracts against Streptococcus and Staphylococcus spp. *J. Tradit. Complement Med*, 11, 457–465.

- [163]. Iauk, L., Lo Bue, A.M., Milazzo, I., Rapisarda, A., Blandino, G. (2003). Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res*, 17, 599–604.
- [164]. Dai, T., Huang, Y.Y., Sharma, S.K., Hashmi, J.T., Kurup, D.B., Hamblin, M.R. (2010). Topical antimicrobials for burn wound infections. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov*, 5, 124–151.
- [165]. Marx, D.E., Barillo, D.J. (2014). Silver in medicine: The basic science. *Burns*, 40 (Suppl. 1), S9–S18.
- [166]. Jimi, S., Miyazaki, M., Takata, T., Ohjimi, H., Akita, S., Hara, S. (2017). Increased drug resistance of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms formed on a mouse dermal chip model. *J. Med. Microbiol*, 66, 542–550.
- [167]. De Francesco, F., Riccio, M., and Jimi, S. (2022). Contribution of Topical Agents such as Hyaluronic Acid and Silver Sulfadiazine to Wound Healing and Management of Bacterial Biofilm. *Medicina*, 58(6), 835.
- [168]. Campos, M. G. N., Rawls, H. R., Mei, L. H. I., Satsangi, N. (2017). In vitro wound healing model: Effects of chitosan films loaded with gentamicin and silver sulfadiazine on the wound filling rate. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access*, 2(3), 00031.
- [169]. Linde, K. (2009). St. John's wort - an overview. *Forsch Komplementmed*, 16: 146-55.
- [170]. Zorzetto, C., Sánchez-Mateo, C. C., Rabanal, R. M., Lupidi, G., Petrelli, D., Vitali, L. A., ... & Maggi, F. (2015). Phytochemical analysis and in vitro biological activity of three *Hypericum* species from the Canary Islands (*Hypericum reflexum*, *Hypericum canariense* and *Hypericum grandifolium*). *Fitoterapia*, 100, 95-109.
- [171]. Damlar, I., Arpağ, O. F., Tatli, U., & Altan, A. (2017). Effects of *Hypericum perforatum* on the healing of xenografts: a histomorphometric study in rabbits. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 55(4), 383-387.
- [172]. Süntar, I. P., Akkol, E. K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., & Yeşilada, E. (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of ethnopharmacology*, 127(2), 468-477.
- [173]. Uzunhisarcıklı, E., and Yerer, M. B. (2022). Role of *Hypericum perforatum* oil and pomegranate seed oil in wound healing: an in vitro study. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 77(5-6), 189-195.

- [174]. Sagdic, O., Ozkan, G., Ozcan, M., Özçelik, S. (2005). A study on inhibitory effects of sigla tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) storax against several bacteria. *Phytotherapy Research* 19(6): 549-551
- [175]. Gurbuz, I., Yesilada, E., Demirci, B., Sezik, E., Demirci, F., Baser, H.C. (2013). Characterization of volatiles and anti-ulcerogenic effect of TSB balsam (TSB). *Journal of ethnopharmacology* 14(1): 332-336.
- [176]. Pesmen, H. (1997). *Liquidambar* L. In: Flora of Turkey and the east aegean Islands (ed. Davis, P.H.). Pp 264-265. University Press. Edinburgh, UK
- [177]. Hafizoglu, H., Yalinkilic, M.K., Yildiz, U.C., Baysal, E., Peker, H., Demirci, Z. (1994). Utilization of Turkey's boron reserves in wood preservation industry. Project of Turkish Science and Tech. Council (TUBITAK), Code: TOVAG-875, 377 pp.
- [178]. Ozturk, M., Celik, A., Guvensen, A., Hamzaoglu, E. (2008). Ecology of tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill.. *Forest Ecology and Management* 256(4): 510-518.
- [179]. Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A.M., Perichet, C., Delbecque, C., Arnaudo, J.F. (2005). Chemical composition of the essential oils from Turkish and Honduras styrax. *Flavour Fragrance Journal* 20(1): 70-73.
- [180]. Lee, Y.S., Kim, J., Lee, S.G., Oh, E., Shin, S.C., Park, I. (2009). Effect of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93(3): 138-143.
- [181]. Charehsaz, M., Reis, R., Helvacioğlu, S., Sipahi, H., Güzelmeriç, E., Acar, E.T., Çiçek, G., Yeşilada, E., Aydın, A. (2016). Safety evaluation of styrax liquidus from the viewpoint of genotoxicity and mutagenicity. *Journal of Ethnopharmacology* 194:506–512.
- [182]. Hovaneissian, M., Archier, P., Mathe, C., Culioli, G., Vieillescazes, C. (2008). Analytical investigation of styrax and benzoin balsams by HPLC- PAD-fluorimetry and GC-MS. *Phytochemical Analysis* 19:301–310.
- [183]. Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N., Papapeorgiou, V.P. (2003). Biological Activity of Some Naturally Occurring Resins, Gums and Pigments Against In Vitro LDL Oxidation. *Phytotherapy Research* 17: 501–507.

- [184]. Topal, Ü., Sasaki, M., Goto, M., Otles, S. (2008). Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 59(7-8):619-634.
- [185]. Guo, J., Duan, J., Tang, Y., Li, Y. (2011). Sedative and anticonvulsant activities of styrax after oral and intranasal administration in mice. *Pharmaceutical Biology* 49(10):1034–1038.
- [186]. Karadeniz, B., Ülker, Z., and Alpsoy, L. (2011). Genotoxic and cytotoxic effects of storax in vitro. *Toxicology and Industrial Health* 29(2):181–186.
- [187]. Öçsel, H., Teke, Z., Sacar, M., Kabay, B., Düzcan, S.E., Kara, İ.G. (2012). Effects of Oriental Sweet Gum Storax on Porcine Wound Healing. *Journal of Investigative Surgery* 25:262–270.
- [188]. Kim, J., Seo, S.M., Lee, S.G., Shin, S.C., Park, I.K. (2008). Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:7316–7320.
- [189]. Onaran, A., and Bayan, Y. (2016). Antifungal Activity of Liquidambar Orientalis L., and Myrtus Communis L. Against Some Plant Pathogenic Fungi. *Scientific Papers. Series A. Agronomy* 59:360-364.
- [190]. Teker, N., and Kolancılar, H. (2020). Sığla yağının sinnamik asit ve alkollerinden elde edilen türevler. *Eurasian Journal of Forest Science*, 8(3), 285-294.
- [191]. Hansen, M. B., Nielsen, S. E., and Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*, 119(2), 203-210.
- [192]. Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., Pauwels, P. (2012). Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays.
- [193]. Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.

- [194]. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
- [195]. Lingbeck, J. M., O'Bryan, C. A., Martin, E. M., Adams, J. P., Crandall, P. G. (2015). Sweetgum: An ancient source of beneficial compounds with modern benefits. *Pharmacognosy reviews*, 9(17), 1.
- [196]. Duru, M. E., Cakir, A., and Harmandar, M. (2002). Composition of the volatile oils isolated from the leaves of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* var. *integriloba* from Turkey. *Flavour and fragrance journal*, 17(2), 95-98.
- [197]. Sova, M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(8), 749-767.
- [198]. Bayazit, V. (2009). Effects of sweet gum (*Liquidambar orientalis*), mulberry leaves (*Morus alba*) and the larval ganglion extracts of silkworm (*Bombyx mori*) on stroke parameters (hemoglobin, strokin, cortexin, frontalin, temporalin, parietalin, occipitalin, brain ventriculin, hemorrhagic clot) in rabbits (*Lepus capensis*). *Journal of animal and veterinary advances*, 8(11), 2164-2170.
- [199]. Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R., Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. *Journal of ethnopharmacology*, 114(2), 103-113.
- [200]. Vindenes, H., and Bjerknes, R. (1995). Microbial colonization of large wounds. *Burns*, 21(8), 575-579.
- [201]. Yanik, M. E., Uygur, R., Aktas, C., Emir, S., Kumral, B., Sener, U., Kulac, M. (2016). Comparison of topical treatment with silver sulfadiazine and sweetgum oil (*Liquidambar orientalis*) on burn wound healing in an experimental rat model. *Anal Quant Cytol Histol*, 38(3), 168-174..
- [202]. Deniz, Ç. (2010) Yara iyileşmesinde bitki reçinesi olan sığla yağı (*liquidambar orientalis*) ile kollagenaz içeren pomadların karşılaştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD. Uzmanlık Tezi. Kahramanmaraş.

- [203]. Park, I. K. (2014). Fumigant toxicity of Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils and their components, including their acetylcholinesterase inhibitory activity, against Japanese termites (*Reticulitermes speratus*). *Molecules*, 19(8), 12547-12558.
- [204]. Aşkun, T., Kürkçüoğlu, M., and Güner, P. (2021). Anti-mycobacterial activity and chemical composition of essential oils and phenolic extracts of the balsam of *Liquidambar orientalis* Mill.(*Altingiaceae*). *Turkish Journal of Botany*, 45(8), 800-808

