

111563

FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİNİN ARAŞTIRILMASI

Ecz. Seval KORKMAZ

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Farmakoloji Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Mart 1996

Ecz. Seval Korkmaz'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİNİN ARAŞTIRILMASI " başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

5/4/1996

Üye: Prof. Dr. Melih ALTAN

Üye: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Üye: Yrd. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.03.96'nın ve 10..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

23

Prof. Dr. ~~Muzaffer~~ TUNÇEL



İÇİNDEKİLER	Sayfa
İçindekiler	3
Özet	6
Summary	7
Teşekkür	8
Şekiller Dizini	10
Tablolar Dizini	12
Kısaltmalar Dizini	13
1. Giriş ve amaç	14
2. Genel Bilgiler	16
2.1. Yaraların İyileşmesi	16
2.1.1. Derinin Önemi	16
2.1.2. Yara İyileşim Fazları	17
2.1.2.1. Hemostatik-Enflamasyon Fazı	18
2.1.2.2. Proliferatif Faz	20
2.1.2.3. Matriks Oluşumu ve Remodeling	20
2.1.2.4. Anjiyogenezis	21
2.2. Yara İyileşim Modelleri	21
2.2.1. Hücre Kültürü Modelleri	23
2.2.2. Hayvan Modelleri	23
2.3. Bağ Dokusu Elemanları ve Yara İyileşmesindeki Önemleri	25
2.3.1. Bağ Dokusu Yerleşimi ve Fonksiyonları	25
2.3.2. Bağ Dokusu Komponentleri	30
2.4. Fibroblastlar	30
2.4.1. Fibroblastların Fonksiyonları	30
2.4.2. Fibroblastların Morfolojisi ve Dağılımları	31

2.4.3. Fibroblastların Fonksiyonel Hücre Biyolojisi	31
2.5. Ekstraselüler Matriks	32
2.5.1. Kollajen ve Sentezi	32
2.5.1.1. Kollajen Sentezinin Erken Safhası	34
2.5.1.2. Kollajen Sentezinin Geç Safhası	34
2.5.1.3. Kollajen Bağları	37
2.5.1.4. Kollajen Fibrillerinin Boyama Karakterleri	37
2.5.2. Elastin	37
2.5.3. Fibronektin	37
2.5.4. Proteoglikanlar ve Glikoproteinler	38
2.5.5. Amorf Kristal Maddeler	38
2.5.6. Temel Hücre Membranı	38
2.5.6.1. Laminin	39
2.6. Tezde Kullanılan Maddelerin Farmakolojik Özellikleri	39
2.6.1. Dimetilsülfoksit'in Farmakolojik Özellikleri	39
2.6.2. Dekspantenol'ün Farmakolojik Özellikleri	39
2.6.3. <i>Centella asiatica</i> Ekstresinin Farmakolojik Özellikleri	40
2.6.4. <i>Arnebia densiflora</i> 'dan Elde Edilen İzovalerilalkanin ve α -Metil-n-bütılalkanin (KAR) ve Diğer Naftokinonların Farmakolojik Özellikleri	40
2.7. Yara İyileştirici Etkileri Olan Diğer Bitkiler	43
3. Yöntem ve Gereçler	46
3.1. Kullanılan Materyaller	46
3.1.1. Kimyasal Maddeler	46
3.1.2. Hücreler	47
3.1.3. Malzemeler	47
3.1.4. Cihazlar	47
3.1.5. Kullanılan Diğer Malzemeler	47
3.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları	48
3.2.1. Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM)	48
3.2.2. Kültür Vasatı (DMEM+%10 FCS)	49
3.2.3. L-Glutamin Solüsyonu	49
3.2.4. Puck's Saline-A	49
3.2.5. EDTA Solüsyonu	50

3.2.6. Tripsin Solüsyonu	50
3.2.7. Fosfat Tampon Çözeltisi	50
3.2.8. Dekspantenol Çözeltileri	50
3.2.9. TECA Çözeltileri	50
3.2.10. KAR Çözeltileri	50
3.2.11. Kombinasyon Çözeltileri	51
3.2.12. Boya Solüsyonları	51
3.3. Yöntemler	53
3.3.1. T15 Fibroblastların Tripsinlenmesi	53
3.3.2. Test İçin Hücre Hazırlanması	53
3.3.3. Tavuk Embriyosunun Elde Edilmesi	53
3.3.4. Yumurtanın Açılması ve Embriyonun İzolasyonu	54
3.3.5. Embriyonun Diseksiyonu ve Doku Parçacıklarının Ekilmesi	54
3.3.6. Hücrelerin Dokulardan Arındırılması ve Çoğalmalarının Kontrolü	54
3.3.7. T15 ve Tavuk Embriyonik Fibroblastlarına Test Maddelerinin Uygulanması	55
3.3.8. Hücrelerin Fiksasyonu, Boyanması ve Sabit Preparat Haline Getirilmesi	56
3.3.8.1. Hücrelerin Fiksasyonu	56
3.3.8.2. Hücrelerin Masson's Trichrome Tekniği ile Boyanması ve Sabit Preparat Haline Getirilmesi	56
3.3.9. Sabit Preparatlarda Hücrelerin Değerlendirilmesi	57
4. Sonuçlar	58
A. Primer Tavuk Embriyonik Fibroblastları ile Elde Edilen Sonuçlara ait Tablo, Fotoğraf ve Grafikler	62
B. T15 Fibroblastları ile Elde Edilen Sonuçlara ait Tablo, Fotoğraf ve Grafikler	102
5. Tartışma	125
Özgeçmiş	144

ÖZET

Bu tez çalışmasında, daha önce yara iyileştirici etkinliği bildirilmiş olan dekspantenol, standart *Centella asiatica* ekstresi ve *Arnebia densiflora*'dan elde edilen naftakinon karışımının hücre kültürü teknikleri kullanılarak fibroblastlar üzerindeki etkileri incelendi. Bu amaçla, "Masson's trichrome" tekniğiyle boyanan primer tavuk embriyonik fibroblastlar ve T15 fibroblastların mitoz yeteneği, morfolojik değişimleri ve kollajen yapımı mikroskopi yardımıyla parametre olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre, dekspantenol'ün yara iyileştirici etki mekanizmasında esas olarak mitotik aktivite artışının önemli bir rolü olabileceği, buna karşın, standart *C. asiatica* ekstresi ve *A. densiflora*'dan hazırlanan karışımın etkisi içinse kollajen yapımının önemli olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma, primer tavuk embriyonik fibroblastlarının yara iyileştirici etki için uygun bir deneysel model olabileceğini ilk kez rapor etmektedir.

Anahtar Kelimeler

Yara İyileşimi; Fibroblastlar; Mitoz; Kollajen; Migrasyon; Hücre Kültürü; Mikroskopi; *Centella asiatica*; *Arnebia densiflora*; Dekspantenol; Asiatikozid; İzovalerilalkanin; α -Metil-n-bütılalkanin

SUMMARY

In this thesis, the effects of dexpanthenol, standardized extract of *Centella asiatica* and the naphthaquinone mixture prepared from *Arnebia densiflora*, whose wound healing activities have previously been reported, were studied on fibroblasts using cell culture techniques. For this purpose, mitotic abilities, morphological changes and collagen production of primary chicken embryonic fibroblasts and T15 fibroblasts, which were stained according to "Masson's Trichrome" technique, were evaluated as a parameter by the means of microscopy. On the basis of findings obtained, it was determined that the increased mitotic activity may play an important role in the mechanism of wound healing activity of dexpanthenol, whereas the collagen production in fibroblasts may be important for the effects of standardized extract of *C. asiatica* and the mixture prepared from *A. densiflora*. In addition, this study has reported for the first time that primary chicken embryonic fibroblasts may be an appropriate experimental model for the wound healing activity.

Key Words

Wound healing; Fibroblasts; Mitosis; Collagen; Migration; Cell Culture; Microscopy; *Centella asiatica*; *Arnebia densiflora*; Dexpanthenol; Asiaticoside; Isovalerylalkannin; α -Methyl-n-butylalkannin

TEŞEKKÜR

Farmakoloji ile tanışmamı ve sevmemi sağlayan, çalışmalarım süresince bilimsel deneyimleriyle yanımda ve destek olan, değerli fikirleriyle yol gösteren, kişiliği ve hocalığını örnek aldığım sayın danışmanım, hocam Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölüm Başkanı ve Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanı; Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e

Başta TBAM gibi doğanın sırlarının laboratuvar ortamında çözüldüğü bir kuruluşu ve bu kuruluş içinde başka bir evrenin kapılarını açan hücre kültürü laboratuvarını bize kazandırmak için başından beri gösterdikleri çabaları bildiğim sayın hocam Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi Müdürü; Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e,

Hücre Kültürünü öğreten, beni çalışmalarım da cesaretlendiren, çalışmalarım ile ilgili problemlerde beni aydınlatan hocalarım; Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Öğretim Üyeleri Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU ve Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU'na ve şahıslarında imkanlarından yararlandığım Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne,

Standart maddelerimi bulmamda yardımlarından ve desteğinden dolayı sayın hocam, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erden GÜLER'e ve şahsında farmasötik teknoloji bölümündeki diğer hocalarıma,

İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımını hazırladığı ve *Arnebia densiflora* ile ilgili konularda bilgi ve yardımlarını esirgemediği için Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN'a,

İlgi ve desteklerinden dolayı sayın hocam Anadolu üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Bölüm Başkanı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü; Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e,

Hücre kültürü konusundaki problemlerimdeki yardımlarından dolayı Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Bülent ERGUN'a,

Yardımları ve desteği için arkadaşım Araştırma görevlisi Ecz. Nilgün ÖZTÜRK'e,

"Bitki Droğlarının Farmakolojik Etkilerinin Araştırılması" (89K120330 No'lu Proje) ve "Kanser Tedavisinde Kullanılma Potansiyeli Olan Çeşitli Maddelerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri" başlıklı projeler kapsamında tezime sağlanan destek için Devlet Planlama Teşkilatı (DPT) ve Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu'na,

Çalışmalarım süresince birlikte olduğum ve yardımlarını esirgemeyen; farmakoloji bölümündeki araştırma görevlisi arkadaşlarım ve TBAM'daki tüm çalışanlara,

Beni yetiştirip bu günlere getiren ve daima beni destekleyen aileme,

Teşekkürlerimi borç bilirim.

Şekil 1. Yaraların iyileşmesinde rol oynayan hücreler.	19
Şekil 2. Fibroblastlarda kollajen sentezi ve salgılanması.	35
Şekil 3. Fibroblastlarda kollajen granülü içeren vezikül.	36
Şekil 4. Çalışmalarda kullanılan maddelerin kimyasal formülleri.	44
Şekil 5. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kontrol grubunun fotoğrafları.	77
Şekil 6. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında DMSO uygulanan hücrelerin fotoğrafları.	78
Şekil 7. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 1 µg/ml DP uygulanan hücrelerin fotoğrafları.	79
Şekil 8. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 10 µg/ml DP uygulanan hücrelerin fotoğrafları.	80
Şekil 9. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 5 µg/ml TECA uygulanan hücrelerin fotoğrafları.	81
Şekil 10. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 10 µg/ml TECA uygulanan hücrelerin fotoğrafları	82
Şekil 11. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 1 µg/ml KAR uygulanan hücrelerin fotoğrafları	83
Şekil 12. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 10 µg/ml KAR uygulanan hücrelerin fotoğrafları	84
Şekil 13. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 1 µg/ml DP ve 5 µg/ml TECA kombinasyonu uygulanan hücrelerin fotoğrafları	85
Şekil 14. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 1 µg/ml DP ve 1 µg/ml KAR kombinasyonu uygulanan hücrelerin fotoğrafları	86
Şekil 15. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında 5 µg/ml TECA ve 1µg/ml KAR kombinasyonu uygulanan hücrelerin fotoğrafları	87
Şekil 16. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında toplam hücre sayılarını gösteren grafikler.	88
Şekil 17. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında fuziform hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	89
Şekil 18. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında poligonal hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	90
Şekil 19. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında yuvarlak hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	91
Şekil 20. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında vakuollü hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	92
Şekil 21. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında mitoz giden hücre sayılarını gösteren grafikler.	93
Şekil 22. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında granül sayılarını gösteren grafikler.	94
Şekil 23. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların toplam hücre sayılarını gösteren grafikler.	95
Şekil 24. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların fuziform hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	96
Şekil 25. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların poligonal hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	97
Şekil 26. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların yuvarlak hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	98

Şekil 27. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların vakuollü hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	99
Şekil 28. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların mitozaya giden hücre sayılarını gösteren grafikler.	100
Şekil 29. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların granül sayılarını gösteren grafikler.	101
Şekil 30. T15 fibroblastlarında kontrol ve DMSO uygulanan hücrelerin fotoğrafları.	110
Şekil 31. T15 fibroblastlarında DP uygulanan hücrelerin 6. saatteki fotoğrafları.	111
Şekil 32. T15 fibroblastlarında TECA uygulanan hücrelerin 6. saatteki fotoğrafları.	112
Şekil 33. T15 fibroblastlarında KAR uygulanan hücrelerin 6. saatteki fotoğrafları.	113
Şekil 34. T15 fibroblastlarında kontrol ve DMSO uygulanan hücrelerin 24. saatteki fotoğrafları.	114
Şekil 35. T15 fibroblastlarında DP uygulanan hücrelerin 24. saatteki fotoğrafları.	115
Şekil 36. T15 fibroblastlarında TECA uygulanan hücrelerin 24. saatteki fotoğrafları.	116
Şekil 37. T15 fibroblastlarında KAR uygulanan hücrelerin 24. saatteki fotoğrafları.	117
Şekil 38. T15 fibroblastlarında toplam hücre sayılarını gösteren grafikler.	118
Şekil 39. T15 fibroblastlarında fuziform hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	119
Şekil 40. T15 fibroblastlarında poligonal hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	120
Şekil 41. T15 fibroblastlarında yuvarlak hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	121
Şekil 42. T15 fibroblastlarında vakuollü hücre yüzdelerini gösteren grafikler.	122
Şekil 43. T15 fibroblastlarında mitozaya giden hücre sayılarını gösteren grafikler.	123

TABLolar

Sayfa

Tablo 1. Enflamasyon ve doku onarımının mediatörleri.	26
Tablo 2. Hazırlanan maddelerin sterilizasyonları ve saklama koşulları	52
Tablo 3. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında toplam hücre sayıları.	63
Tablo 4. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında fuziform hücre yüzdeleri.	64
Tablo 5. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında poligonal hücre yüzdeleri.	65
Tablo 6. Tavuk embriyonik fibroblastlarında yuvarlak hücre yüzdeleri.	66
Tablo 7. Tavuk embriyonik fibroblastlarında vakuollü hücre yüzdeleri.	67
Tablo 8. Tavuk embriyonik fibroblastlarında mitozaya giden hücre sayıları.	68
Tablo 9. Tavuk embriyonik fibroblastlarında granül sayıları.	69
Tablo 10. Tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların toplam hücre sayıları.	70
Tablo 11. Tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların füziform hücre yüzdeleri.	71
Tablo 12. Tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların poligonal hücre yüzdeleri.	72
Tablo 13. Tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların yuvarlak hücre yüzdeleri.	73
Tablo 14. Tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların vakuollü hücre yüzdeleri.	74
Tablo 15. Tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların mitozaya giden hücre sayıları.	75
Tablo 16. Tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların granül sayıları.	76
Tablo 17. T15 fibroblastlarında toplam hücre sayıları.	103
Tablo 18. T15 fibroblastlarında fuziform hücre yüzdeleri.	104
Tablo 19. T15 fibroblastlarında poligonal hücre yüzdeleri.	105
Tablo 20. T15 fibroblastlarında yuvarlak hücre yüzdeleri	106
Tablo 21. T15 fibroblastlarında vakuollü hücre yüzdeleri.	107
Tablo 22. T15 fibroblastlarında mitozaya giden hücre sayıları.	108
Tablo 23. T15 fibroblastlarında granül sayıları.	109

KISALTMALAR

a-FGF	: Asidik fibroblast büyüme faktörü (a-Fibroblast growth factor)
b-FGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü [(basic) b-Fibroblast Growth Factor]
DMEM	: Dulbecco's modification of eagles medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DP	: Dekspantenol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
FCS	: Fetal calf serum (Fetal bovine serum)
GAGs	: Glikozaminoglikanlar
GM-CSF	: Granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör (Granulocyte/macrophage colony stimulating factor)
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor)
IL	: Interlökin
INF	: İnterferon
12HPETE	: 12 Hidroperoksieikozatetraenoik asit
12 HETE	: 12 Hidroksieikozatetraenoik asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High-pressure liquid chromatography)
KAR	: İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı
PAF	: Platelet aktive edici faktör (Platelet activating factor)
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer saline)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase chain reaction)
PDCF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor)
PSA	: Puck' s saline-A
PVA	: Polivinil alkol
TDEC GF	: Trombosit kaynaklı endotelial büyüme faktörü (Thrombocyte derived endothelial growth factor)
TECA	: Standart <i>Centella asiatica</i> ekstresi
TGF	: Transforming growth factor
TNF	: Tumor necrosis factor
TxA₂	: Tromboksan A ₂
VEGF	: Vasküler kaynaklı endotelial büyüme faktörü
VPF	: Vasküler permeabilite faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yaraların, en kısa sürede ve en mükemmel biçimde iyileşmesi insanlar için oldukça önemlidir; ameliyat yaralarının, yanıkların, kesiklerin, derinliğine göre, iyileşmesi oldukça uzun sürer. Bu sürecin kısaltılmasına yardımcı olabilecek pek çok sentetik veya bitkisel kökenli ilaç, gerek halk arasında, gerekse klinikte kullanılmaktadır. Özellikle bitkisel ilaçların çoğunun yara iyileşimi üzerine olan etkilerinin, biyolojik sebepleri tam olarak bilinmemektedir. Bunların, yara iyileşimi üzerine olan etkilerinin, mekanizmaları ve etkili dozları bulunduğu yaraların iyileşmesinde daha iyi sonuçlar alınacaktır.

Yaraların iyileşme süreci içinde, organizmada, mikro düzeyde pek çok olay meydana gelir. Bugüne kadar yapılan çalışmaların genelinde mikro dünyaya inilmemiş, daha ziyade makro düzeyde kalmıştır. Gerek laboratuvar hayvanlarında yapılan *in vivo* çalışmalar, gerek histolojik çalışmalar ve gerekse biyokimyasal çalışmalar, mikro düzeyde gerçekleşen bu olaylara sadece sayısal değerlerle ve genel gözlemlerle yaklaşılmasını sağlar. Mikro düzeyde gerçekleşen bu olayları anlamının en iyi yolu onları yakından gözlemektir, bu da ancak mikro dünyaya girmekle gerçekleşebilir. Hücre kültürü mikro dünyanın bir anahtarıdır.

Fibroblastlar yaraların iyileşmesinin proliferatif fazında görev alan en önemli hücrelerdir. Fibroblastların davranışlarını gözlemek, sentezledikleri ürünleri kalitatif veya kantitatif olarak tespit etmek *in vitro* olarak izole hücrelerle yapılan hücre kültürlerinde diğer metodlara göre oldukça avantajlıdır.

Yaraların iyileşmesinde etkili olduğu düşünülen ilaçların fibroblast hücre kültürlerine uygulanması ile yaraların iyileşmesinde önemli bir yeri olan fibroblast proliferasyonu, migrasyonu ve kollajen sentezlemeleri üzerine olan değişikliklere bakılarak ilaçların etki mekanizmaları hakkında yorum yapılabilir.

Bu çalışmada yaraların iyileşmesi üzerine etkili olduğu bilinen ve etki mekanizmaları araştırılmış standart maddeler ile karşılaştırılarak, yara iyileştirici etkisi olduğu düşünülen bitkisel kökenli doğal ilaçların etki mekanizmalarının araştırılması ve *in vitro* olarak fibroblast hücre kültürlerinin, yaraların iyileşmesinde bir model olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmalarımızda kullandığımız standart maddelerden biri olan dekspantenolün kullanımı oldukça yaygındır; yara iyileştirici preparatların yanısıra vücutta pantotenik aside dönüştüğü için provitamin-B₅ olarak pek çok kozmetik preparatın da terkibine girmektedir.

Diğer standart maddemiz *Centella asiatica* ekstresi, bitkisel kökenlidir ve fibroblastlarda kollajen üretiminin artırılmasına etkisi olduğu bilinen bir ekstredir.

Kollajen ise yaraların iyileşmesinde ve yaşlanmanın önlenmesinde etkisi olduğu bilinen protein yapılı doğal bir maddedir. Bugün, kollajen yaşlanmayı önleyici etkili pek çok preparatın içeriğinde mevcuttur. Derinin gerilme direncini artırarak, yara iyileşimine ve yaşlanmanın önlenmesine katkıda bulunmaktadır.

Yaptığımız çalışmalarda; uyguladığımız bu maddelerle fibroblast proliferasyonu, migrasyonu ve kollajen sentezi üzerine olabilecek etkileri direkt olarak gözlemleyebilme imkanı bulduk. Bu şekilde esas olarak etkisini araştırmak istediğimiz *Arnebia densiflora*' dan elde edilen İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının fibroblastlar üzerindeki etkilerini, dolayısıyla yara iyileşimi üzerine olan etkilerinin sebeplerini araştırmaya çalıştık. İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin boyar özellikli naftakinonlar sınıfına ait maddelerdir.

Naftakinonlar, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde boya olarak kullanılmaktadır. Halk arasında doğal boya olarak halı ve kilimcilikte kullanılırlar. Naftakinonların, yara iyileştirici etkilerinden dolayı yanık, egzema ve diğer cilt yaralarında da kullanıldığı ve bu amaçla hazırlanan ilaçların terkibine girdikleri bilinmektedir.

Amacımız bu üç maddenin hücre kültürlerindeki etkilerini elimizdeki bilgilere dayanarak araştırmak ve izole fibroblastların da diğer metodlar kadar yara iyileşiminin araştırılmasında kullanılabilirliğini gösterebilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. YARALARIN İYİLEŞMESİ

2.1.1. DERİNİN ÖNEMİ

İlk bakıldığında deri , organizma ile çevresi arasında bariyer görevi gören bir yapı durumundadır.ancak deriyi bu şekilde tanımlamak pek doğru değildir. Çünkü; deri, vücudun önemli immünolojik ve endokrinolojik aktivitelerini içine alan sistemik ve fizyolojik bir önem taşımaktadır (1).

Geniş ve yaygın termal yanıklar, toksik epidermal nekrozlarda görüldüğü gibi, derinin (kritik bariyer fonksiyonlarının) önemli kayıplarının olduğu akut rahatsızlıklar hakikaten hayatı tehdit etmektedir.

Yaranın iyileşmesi derinliği ve dış görünüşü ile ilgilidir. Yaraların şiddetle onarılmaya başlanması, bariyer fonksiyonlarının yeniden oluşturulması sağlam epidermin yapılması gereklidir.

Epidermal rejenerasyonda keratinositlerin lateral çoğalması önemli yer tutar. Epitelial bütünlüğün oluşması, prolifer olmuş keratinositlerin çok çabuk bir şekilde epidermal defekti kapatmasına bağlıdır. Keratinositler normal deride differansiye olurken, yaralı dokuda migrasyonları dikkati çeker (2). Eksik yara dokusunun tamamlanması ve hızla reepitelize olması, yaraya eşit bölgenin ilave edilmesine bağlıdır.

Epitelial ve mesenşimal dokulardaki iyileşme arasında ayırt edici önemli bir fark vardır; Gerçek rejenerasyon veya esas normal yapıya dönüş yüksek yapılı canlılarda sadece epitelial yapıdaki epidermiste mümkündür. Mesenşimal dokularda (dermiste olduğu gibi) sadece onarım kabiliyetinin olması ile birlikte yapısal ve fiziksel özelliklerinin değişikliği, her zaman dokuda iyileşme yöntemini etkiler. Yaralı doku sıklıkla, kötü bir şekilde sağlam dermin yerini tutar. Ancak dokuların uyumlu hareket etmemesinden dolayı, esnekliğin kaybolması istenmeyen bir durumdur. Yine de, yara iyileşse de yaralı dokunun gerilme kuvveti asla sağlam dokununkine eşit olamamaktadır (3).

Aslında deri yaralarının iyileşmesi sadece bir kısmı anlaşılmış kompleks bir işlemdir. Henüz derinin fonksiyonları ve yenilenme mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Epitelyum devamlı tamir edilen ve yenilenen bir yapıdır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar epidermin rejenerasyonunun hızlanmasına ve dermin onarımında doğal faktörlerin doğrudan etkili oldukları kanıtlanmıştır.

Yaraların iyileşmesinde; repair (onarım), rejenerasyon, epitelizasyon, skatrizasyon, anjiojenezis gibi faktörlerin zamana bağlı sırası önem taşımakta ve enflamasyon, mitoz bölünme, sentez ve ekstraselüler matriksteki değişiklikleri kapsamaktadır. Bunlar şu kronolojik sırayı takip eder: Platelet agregasyonu ve kanın pıhtılaşması, fibrin oluşumu, bakteri ve yabancı cisimlere karşı enflamasyon cevabı, hücre hasar ve nekrotik doku, endotelial ve kapillerde proliferasyon, fibroblastik proliferasyon ve kollajen üretimi epitelial proliferasyon ve yüzeyin kaplanması, temel hücre tiplerinde görülen değişken rejenerasyon ve remodeling... Bu olaylar büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (4-8).

Büyüme faktörleri yara iyileşmesinde bir veya birden çok hücre tipini uyararak olayı düzenlerler: EGF ve TGF- α epitelial hücreler üzerine son derece etkilidir, b-FGF ise fibroblastlar ve vasküler endotelial hücreler üzerine mitojendir (9-11). IGF-1 ve PDGF esas olarak mesodermal hücreler (örnek: fibroblastlar) ve düz kas hücrelerini mitozu sevk eder. İnsülin, IGF-1 ve PDGF'in düz kas hücreleri üzerine mitojen etkisi; uterus düz kas hücrelerinde DNA stimülasyonuna sebep oldukları gösteren çalışma ile rapor edilmiştir (9). TGF- β ise hücre bölünmesinde bifonksiyonel düzenleyicidir; fibroblast gibi mesoderm hücrelerinde mitotik hücre bölünmesini uyarır, fakat keratinosit gibi ektoderm hücrelerinde mitozu inhibe eder (10, 11). PDGF ile TGF- β kombinasyonu, TGF- β 'nin yalnız başına olduğundan daha fazla kollajen depolanmasını stimüle ettiği bilinmektedir (12). Bazı büyüme faktörleri ekstraselüler matriks komponentlerinin sentezini artırır;örn: EGF fibronektin sentezini stimüle eder (13).

2.1.2.YARA İYİLEŞİM FAZLARI

Yara iyileşim fazları genel olarak dört fazda incelenebilir;

1. Hemostatik-Enflamasyon fazı
2. Proliferatif faz

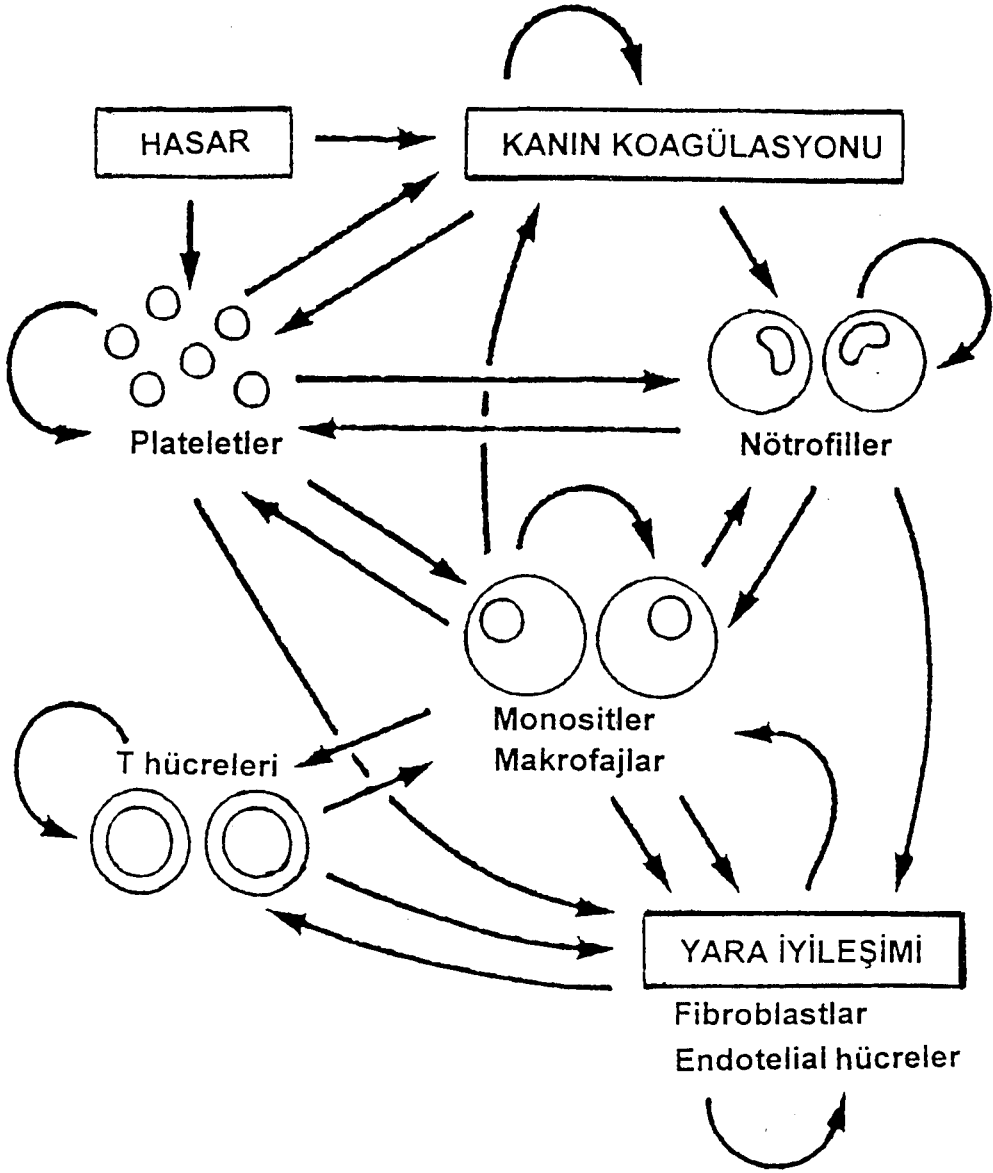
3. Matriks oluşumu ve remodelling
4. Anjiyogenezis

2.1.2.1. Hemostatik-Enflamasyon Fazı

Yaralanmadan hemen sonra klasik enflamasyon oluşmaya başlar. Genellikle enflamasyon doğal koruyucu bir yerel reaksiyondur. Damar endotelinde hasar başladığı gibi görevleri, yaralı dokuyu bakteri ve diğer yabancı maddeler gibi patojen ajanlardan arındırmak olan immünolojik aktiviteli maddeler salıverilir. Enflamasyonlu hücreler yaralı dokuda fibroblast ve endotelial hücreler üzerinden tamirin başlaması için fizyolojik temel sağlar. Bunların yara yerinde görülmesinden pek çok solubl mediatörler ardarda işlev görür. Başlangıçta plateletler, bunları takip eden nötrofiller ve sonra makrofaj ve lenfositler görülür. (5, 14, 15).

Monosit kaynaklı makrofajlar yaralanmanın ilk veya ikinci günü baskın hücrelerdir ve görünürde bu hücrelerin yaraya girmesini fibroblastların, kapiller damarların, çizgili kas hücrelerinin proliferasyonu takip eder (4, 16). Yaralanma sırasında plateletlerin aktivasyonu yaranın onarılmaya başladığını gösteren delildir. Platelet proliferasyonu fibroblast proliferasyonu için gereklidir (17). Yaralanmadan sonra ilk olan olay fibrin platelet pıhtısıdır. Geçici fibronektin matriksinin hemen ardından keratinosit ve fibroblast migrasyonu artar (18, 19). Dermal yara iyileşmesinin başlangıcında plateletler kritik hücrelerdir. plateletlerden proteazlar, eikozanoidler, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve transforming growth factor- β (TGF- β) 'yı içine alan kemotaktik faktörler salınır. Bu sırada anaflatoksin C3a ve C5a 'nın üretimi aktive edilir. Bu faktörler nötrofilleri ve monositleri çeker ve lokal kan damarlarının permeabilitesini artırır (20, 21). Nötrofiller görüldüğünde kontaminasyon oluşturan bakterileri fagosite etmeye başlarlar. Bu genellikle üç gün sürer. Bunları çok sayıda makrofaj takip eder.

Diğer taraftan kan-pıhtısı oluştuktan sonra iki türlü gelişim gösterebilir ; a-Kan-pıhtısı fibroblastlarla istila edilerek daha sonra bütün pıhtı bağ dokusuna dönüşebilir, b-Pıhtı eriyebilir (bazı şartlarda) (4, 22). Genellikle pıhtı oluştuktan bir kaç saat sonra fibroblastlar pıhtının içinde küçük bir delik oluşturmaya başlarlar. Bu olay trombositler tarafından salgılanan büyüme faktörleri, Tromboksan-A₂ (TXA₂) ile kısmen hızlandırılır (23, 24). Daha sonra pıhtının tümüyle fibröz dokuya dönüşmesi için 7-10 gün geçer. Şekil 1 yara iyileşiminde rol oynayan hücreleri göstermektedir.



Şekil 1. Yaraların iyileşmesinde görev alan hücrelerin sentezleyip salgıladıkları solubl mediatörler aracılığıyla otokrin veya endokrin olarak birbirlerini etkilemelerini gösteren şema.

2.1.2.2. Proliferatif faz

Monositler, makrofajların farklılaşması ve yaraya göç etmeleri sebebi ile kimyasal çekim oluştururlar. Makrofajlar, dermal yaraların iyileşmesinde, enflamasyon faz ortamında en önemli hücreler oldukları gibi proliferatif fazı başlatmak ve sürdürmekten de sorumludurlar.

Bunlara benzer biçimde plateletler, mesenşimal hücrelerde, makrofaj sentezinde platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve TGF- β salınımını etkileyerek mitojenik ve kemotaktik etkilere sebep olurlar (4, 25). Bunun yanısıra makrofajların ürettiği interlökin-1 (IL-1), fibroblast ve fibroblast büyüme faktörleri üzerine (FGFs) mitojenik etkili olduğundan çizgili kaslar ve endotelial hücreler üzerine de mitojendir (4, 5, 26). Bu hücrelerin yara bölgesine migrasyonu ve proliferasyonu, (formasyon ve granülasyon dokusunda) yara iyileşmesinin proliferatif fazı için karakteristiktir. Fibroblast proliferasyonunu stimüle ettiği bilinen diğer faktörler TNF- α , IL-1, TGF- β dir (27). TNF- α aktif makrofajlarda salgılanan bir sitokindir. Konsantrasyonuna göre yara iyileşmesinde sitolitik, mitojenik, antitümör, anjiyogenik veya antianjiyogenik etkileri vardır. TNF- α , PDGF ile birlikte hareket eder. TNF- α ve PDGF sinerjizm oluştururken, TNF- α ve TGF- β arasında antagonizma görülür (28).

Granülasyon dokusu, makrofaj, fibroblast ve endotelial hücrelerce zengindir. fibroblastlar başlangıçta fibronektin sentezini ve bunu takip eden tip-I ve tip-III kollajenlerin sentezini aktive eder. PAF makrofaj migrasyonunu artırır ve gerilme direncinin artmasına katkıda bulunur (27). Makrofajlarda üretilen TGF- β fibroblastlarda ekstraselüler matris komponentlerinin sentezini stimüle eder (29). TGF- β 1 ve TGF- α yaradaki granülasyon dokusunda plateletlerden salgılanır, nötrofillerde yara bölgesinde iyi bir TGF- β 1 kaynağıdır (30, 31). TGF- β 1 fibronektin sentezini artırır (32). Somatomedin C, IGF-1, IGF-3 de yara iyileşmesinde önemli rol oynar; bunlar mitojenik ve insülin benzeri aktivite gösteren polipeptid hormonlardır (33). IGF-1 fibroblastlarda kollajen sentezini stimüle eder (34).

Granülasyon dokusunda en yaygın fibroblast fenotipi myoblastlar, bol miktarda aktin flamenti içerdiğinden yaranın gerilmesine sebep olmaktadır (35). Granülasyon dokusunda bulunan endotelial hücreler anjiyogenez oluştururlar. makrofajlarda üretilen b-FGF endotelial hücreler için en önemli büyüme faktörüdür.

İnsan deri fibroblastlarında kollajen üretimi b-FGF ile kolayca, EGF ile dolaylı yoldan stimüle edilir (30, 31).

2.1.2.3. Matriks Oluşumu ve Remodeling

Dermal yaraların onarımında anjiyojenezden önceki final fazdır. Bu dönem erken başlar ve granülasyon dokusunun, gelişimi tamamlanmış yara izi (scar) dokusuna dönüşebilmesi için aylar geçer. Proliferatif fazın erken döneminde fibroblastların çok miktarda ürettiği fibronektin pek çok fonksiyona aracılık eder; Özellikle yaraya fibroblast ve diğer mesenşimal hücrelerin girerek yapı taşı oluşturmaları gibi (5)...

Çevreye uyum sağlayan fibroblastlar fibronektinin esas şekline bağlı kalarak belli bir hat boyunca yayılarak fibronektin ve myoblastlarla sınırlı bir gerilmeye sebep olurlar. Başlangıçta fibronektin matriksi muhtemelen fibrilleri bir araya getirerek tip-III kollajen sentezinde substrat olarak harekete geçer, bunu tip-I takip eder (36).

Fibroblastlar tarafından kompleks karbohidratlar sentez edilirken, büyük miktarda su absorbe edilerek ekstraselüler matrikste yaşanabilir bir ortam oluşturulur. Bu ortamda viskoz bir sıvı olan hyaluronik asit (ortama kayganlık verir) ve nonsülfat-glikozaminoglikanlar (GAGs) da ortamda bulunur (5, 37)

Daha sonra glikozaminoglikanlar kovalent bağlarla proteinlere bağlanır. Bu yapı muhtemelen proteoglikanlarla olan kondroitin-4-sülfat ve dermatan sülfatla olur (38, 39). Bu fazın karakteristik özelliği kollajen sentez ve yıkılımının periyotlar halinde aylar boyu sürmesidir.

Granülasyon dokusunda çok bol olan tip III kollajen, yavaş yavaş normal dermiste olduğu kadar, olgun yara izinde de baskın olan tip I kollajene yerini bırakır. Daha önceki tip I kollajen miktarı kollajenaz tarafından sürekli azaltılarak yerini gerilme hattı boyunca sıralanan yeni kollajen liflerine bırakır. Kollajen liflerinin yoğunluğunun artması, dolayısıyla kollajen molekülleri arasında çapraz kovalent bağların artması yara izindeki gerilme direncini artırır. Bu olay bir yıl veya daha fazla sürer. Yara dokusu ne kadar iyileşirse iyileşsin gerilme direnci (tensile strength) sağlam (yaralanmamış) deriye oranla en fazla %70-80 olabilir (5, 6, 40-42).

PDGF ve TGF- β hücre proliferasyonu ve matris sentezinde pozitif düzenleyici faktörlerdir. Negatif faktörler nonspesifiktir. Fakat INF- α ve INF- β fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezinde inhibitördür (5, 43, 44).

2.1.2.4. Anjiyogenezis

Dokular büyüyünce, kan damarları da normal kan gereksinimini sağlamak üzere proliferasyon olurlar. Dolayısıyla anjiyogenez fetal hayat, büyüme, yaraların iyileşmesi, korpus luteum oluşumu, ovülasyon ve menstrüasyondan sonra yeniden endometriyum oluşumunda önemlidir.

Yeni fibroblastların oluşması iyileşmenin olduğu bölgede yeni kan damarlarına ihtiyaç gösterir. Normalde endotelial hücreler kan damarlarının iç cidarında tek sıra halinde yer alır ve kollajen, fibronektin, proteoglikan-glikozaminoglikan tiplerini salgılama kabiliyetleri vardır (4, 45).

Damar oluşumunda (anjiyogenezde) rol oynayabilecek faktörler: Uyarıcılar: a-FGF (neovaskülarizasyona sebep olur (46, 47), b-FGF, trombosit kaynaklı endotel hücresi büyüme faktörü (TDECGF), vasküler kaynaklı endotelial büyüme faktörü (VEGF), vasküler permeabilite faktörü (VPF) dır. Baskılayıcılar : heparin trombosit faktörü 4, prolaktinin 16 KDaltonluk fragmanıdır. Çeşitli büyüme faktörlerinin anjiyojenik aktivitesi varken bazı başka faktörler ise anjiyogenez baskılar. Ekstraselüler matris ile etkileşim önemlidir (46, 48-51).

2.2. YARA İYİLEŞİM MODELLERİ

Yara iyileşim modellerinin temeli, genellikle bağ dokusu metabolizmasına dayanmaktadır. Ancak kullanılan metotlardan ne hücre kültürü, ne de hayvan modelleri insandaki yaraların iyileşmesinin anlaşılmasında yeterli görülmez. Sadece insanların kullanıldığı deneylerde sonuçların güvenilirliğinden bahsedilebilir. Ancak insan laboratuvar koşulları için uygun değildir ve genetik ve çevresel koşullar da sonuçları etkiler. Yara iyileşim modellerinin tamamına yakın bir kısmında kontaminasyon da sonuçları değiştirebilen önemli bir problemdir (52).

2.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELLERİ

Hücre kültürü ilk olarak 20. yy' ın başlarında memeli hücreleri ile *in vitro* model olarak Alexis Carrell çalışmış ve bu teknik ona nobel ödülü kazandırmıştır (52). Bundan sonra Stearn 1940' da primer fibroblast hücrelerinde kollajen sentezine bakmıştır (46, 52, 53).

Kültürdeki hücrelerin ; plazmadan kanın koagülasyonu ile elde edilen ve fizyolojik bir sıvı olan serum, büyüme faktörleri, proteinler, besleyici elemanlar, pH ve gaz gibi yaşamaları için gerekli ortama ihtiyaçları vardır. Bunlara ek olarak cam veya plastik kap da dokudan doğal matriks gelişmesini etkiler.

İzole hücrelerle spesifik hücre davranışlarından proliferasyon ve kollajen, hidroksiprolin gibi çeşitli ürünlerin sentezine çevre koşulları da kontrol edilerek çalışma yapmak mümkündür. Primer kültür olarak a- İnsan biyopsi materyali, b- Fare embriyosu, c- Tavuk embriyosu' ndan elde edilen fibroblastlar kullanılır. Sekonder kültür olarak da "cell-line" fibroblastlar kullanılır (54, 55).

2.2.2. HAYVAN MODELLERİ

Yara iyileşim modelleri olarak sıçan, kobay ve tavşanlar kullanılmaktadır. Hayvan yara çeşitleri şunlardır:

Kapalı Çizgisel Yaralar: Deri kalınlığı kadar çizgisel yara açılıp dikilir. Derinin gerilme şiddetine, histolojik kesit olarak Alcian blue ile proteoglikanlara ve Masson' trichrome ile boyanarak kollajen ve matrikse bakılabilir. Ancak yara dokusunda kontaminasyon alınan biyopsideki sonuçları değiştirebilir (52).

Açık Deri Yaraları: Yara açılır ve bırakılır. İlk olarak Stein ve Keiser tarafından bağ dokusu metabolizmasına bakılmıştır (56, 57). Bu teknik, kollajen, glikozaminoglikanlar ve enflamasyon hücreleri gibi parametrelerin değerlendirilmesine olanak sağlar. Topik ve sistemik farmakolojik ajanların denenmesi için uygun bir yöntemdir.

Diğer Yaralar: Kesik veya yarma yapılmadan uygulanan yaralardır. Yanık yaraları modellerinde sıcaklık etkisiyle yaralar açılır.

Yapılan bu çalışmalarda, oluşan yeni kıl folikülleri yara iyileşim proses ve kriterlerini değiştirmesi hayvan deneyleri için bir dezavantajdır (58).

Hayvanlarla veya insanlarla yapılan çalışmalarda uygulanan yara iyileşim modelleri şunlardır:

Polivinil alkol süngeri: Polivinil alkolün deriden çabuk infiltrasyonu sonucu yara bölgesinde bağ dokusu depolanır. En büyük dezavantajı; çevredeki bağ dokusundan ayırt etmenin çok güç olmasıdır (52).

Kaldırılabilir Sünger Yöntemleri:

a- Schilling Odacığı: Paslanmaz çelikten yapılmış, deri altına yerleştirilebilecek şekilde geliştirilmiş tel örgüdür ve deri altına yerleştirildiğinde o bölgeye çabuk bir şekilde yara sıvısı toplanır. Elde edilen sıvıda enzim, protein ve büyüme faktörlerine bakılabilir (59, 60). Bu cisim sadece tek bir yara için kullanılabilir.

b- Cellstic: Kare şeklinde visköz selüloz sünger ile birlikte silikon tüp sisteminden ibaret yapıdır. Eksudanın dışarı akmasına imkan verir ve özel boyama yöntemleri ile kollajen tespit edilir. Bu yöntemdeki problem, gelişen ve göç eden yara iyileşim elemanları sadece tüpün açık ucunda toplanır, süngerden düzenli bir şekilde süzülmesine rağmen toplanmamasıdır (52, 62).

c- Gore-Tex: İnsanda hidroksiprolin ölçümüne imkan veren tüp sistemidir. Fibröz tüpü yerleştirmek ve bağ dokusu infiltrasyonunu sağlamak oldukça zor ve uzun vadeli bir iştir. Bu metod ile bir kaç yıl içinde sadece bir kaç çalışma yapılabilir(52, 62).

d- Polivinil alkol İmplant Tekniğı: Polivinil alkol süngerinin değiştirilmiş şekilde uygulanmasıdır. Taşıyıcı silikon tüp ile birlikte polivinil alkol süngerinden oluşan silindirik geometriye sahip ve selüler matriks komponentlerinin düzenli infiltrasyonuna imkan veren sistemdir. Hayvanlarda ve insanlarda uygulanabilir. HPLC ile hidroksiprolin tayini yapılabilir (27, 63-65).

e- MCV Rezervuar Tüp Sistemi: Son zamanlarda MCV Wound Healing Center' da uygulanmıştır. Schilling odacığının daha küçük olarak yapılmış modelidir. Hayvanlarda uygulanır (66).

f- Tavşan Kulağı Odacığı: Tavşan kulağına uygulanan plastik bir sistemdir. Granülasyon dokusu, kanın koagülasyonu, eksudasyon ve fibroblastlar ile ilgili parametreleri inceleme imkanı sağlar (6, 49).

In Vivo ve In Vitro Ölçüm Teknikleri

HPLC ile hidroksprolin tayini, yara bölgesinden doku biyopsisi ile glikozaminoglikanlar gibi bağ dokusu elemanlarının incelenmesi mümkündür. ¹⁴C ile işaretlenmiş prolin ile hücre kültüründe yeni kollajen sentezinin takibi mümkündür.

PCR ile m-RNA' dan spesifik protein tayini yapılabilmektedir. Bu yöntem protein sentezinin erken basamağında final proteinler hakkında fikir verir (52, 66, 67).

Fetal Model

Hayvan modelleri, hücre kültürü ve diğer analitik tekniklerle birlikte uygulanabilir. Polivinil alkol implant tekniği ile akut enflamasyon fazında nötrofiller için kimyasal uyaranlara, fibrotik yanıtlara, TGF- β , PDCF ve kollajen tayinleri yapma imkanı sağlar (52).

2.3. BAĞ DOKUSU ELEMANLARI VE YARA İYİLEŞMESİNDEKİ ÖNEMLERİ

2.3.1. BAĞ DOKUSU YERLEŞİMİ VE FONKSİYONLARI

Bağ dokusu vücutta her yerde bulunur, bütün organların çevresini kuşatır. Kartilaj, kemik ve kan damarlarının dış yüzü kendilerine özel bağ dokusudur. İnsanda bağ dokusu dört tiptir; 1-Epitelial doku, 2-Fibröz (bağ) doku, 3-Kas dokusu, 4-Sinirsel doku.

Visseral organlarda (böbrekler, akciğerler) bağ dokusu parankimal epitelial hücrelerle birlikte organ şeklini oluşturur. Kardiyovasküler sistem de bağ dokusunca zengindir. Burada kas hücreleri ve endotelial hücrelerle birlikte fonksiyonel olarak sistemi tamamlarlar.

Tablo 1. ENFLAMASYON VE DOKU ONARIMININ MEDİYATÖRLERİ (4)

PLATELET KAYNAKLI FAKTÖRLER

- Polipeptit Büyüme Faktörleri :

Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

Transforming growth factor - β (TGF- β)

Esas fibroblast büyüme faktörü (b-TGF)

Platelet faktör-4

- Koagülasyon faktörleri :

Plasminojen

von Willebrand faktör

Fibrinojen

-Vazoaktif faktörler

Serotonin

ADP ve ATP

-Nötral proteinler ve diğer enzimler

-Araşidonik asit metabolitleri :

12-HPETE (12-hidroperoksieikozatetraenoik asit)

12-HETE (12-hidroksieikozatetraenoik asit)

Tromboksan A₂ (TXA₂)

-Yapıştırıcı ve şekil verici proteinler :

Fibronektin

NÖTROFİL KAYNAKLI FAKTÖRLER

-Oksijen aracılığıyla tepki yapanlar:

Süperoksit

Hidrojen peroksit

Hidroksil radikalleri

Tablo 1 (Devam)

-Yapıştırıcı ve şekil verici proteinler

-Proteoglikanlar

-Nötral proteaz ve diğer enzimler

-Biyoaktif lipidler :

Platelet aktive edici faktör (PAF)

Araşidonik asit metabolitleri

FİBROBLAST KAYNAKLI FAKTÖRLER :

-Polipeptid büyüme faktörleri :

İnterlökin-1 (IL-1)

İnterlökin-6 (IL-6)

Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

Granülosit/Makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)

-Yapıştırıcı ve şekil verici proteinler :

Kollajen

Fibronektin

Elastin

-Proteoglikanlar :

Hyaluronik asit

Kondroitin sülfat

Dermatan sülfat

Heparin ve heparan sülfat

Keratan sülfat

-Nötral proteazlar

-Biyoaktif lipidler

Tablo 1 (Devam)

MAKROFAJ KAYNAKLI FAKTÖRLER :

-Polipeptid büyüme faktörleri :

Transforming growth factor- α (TGF- α)

Transforming growth factor- β (TGF- β)

Plateket kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

İnterlökin-1 (IL-1)

İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-8 (IL-8)

Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)

İnterferon- α (INF- α)

İnterferon- β (INF- β)

Granülosit/Makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)

Esas fibroblast büyüme faktörü (b-FGF)

Fibroblast aktive edici faktörler

Monosit yapımını teşvik edici faktör

-Biyoaktif lipidler :

Araşidonik asit metabolitleri

Platelet aktive edici faktör

-Nötral proteazlar ve diğer enzimler

-Yapıştırıcı ve şekil verici proteinler

-Proteoglikanlar

-Oksijen aracılığıyla tepki yapanlar :

Süperoksit

Hidrojen peroksit

Hidroksil radikal

Tablo 1 (Devam)

T-LENFOSİT KAYNAKLI FAKTÖRLER

-Polipeptit büyüme faktörleri :

İnterlökin-2 (IL-2)

İnterlökin-3 (IL-3)

İnterlökin-6 (IL-6)

Granülosit/Makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)

İnterferon- γ (IFN- γ)

Fibroblast için lenfosit kaynaklı kemotaktik faktör

ENDOTELİAL HÜCRE KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRLERİ

-Polipeptit büyüme faktörleri :

İnterlökin-1

İnterlökin-6

Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)

Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

Granülosit/Makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)

Esas fibroblast büyüme faktörü (b-FGF)

-Yapıştırıcı ve şekil verici proteinler .

-Proteoglikanlar

-Koagülasyon faktörleri

von Willebrand faktör

Faktör V, VII, IX ve X

Doku faktörü

İskelet kaslarını kemiklere bağlayan ligament ve tendonlar spesyalize bağ dokusudur. Santral sinir sistemi diğer dokulara oranla daha az bağ dokusu içerir. Glia hücreleri ve nöronların parankimalarına bitişik olarak az miktarda bağ dokusu bulunur. Kollajen fibriller ve bağ dokusu hücreleri beyin ve omurilik çevresinde bir tabaka oluştururlar. Benzer bağ dokusu periferik sinir ve gangliyonların etrafında da vardır (68, 69).

2.3.2. BAĞ DOKUSU KOMPONENTLERİ

Tüm bağ dokusu hücrelerinde ekstraselüler fibriller ve amorf kristal maddeler bulunur.

-Bağ Dokusunun Temel Hücreleri; fibroblastlar, kondroblastlar ve kondrositler, osteoblast ve osteositler, adipozitler ve makrofajlardır.

-Bağ Dokusunun Göç Eden Hücreleri; Enflamasyona ve hasarlı dokuya göç ederler; lökositler, monositler, lenfositler ve fagositik granülositler (nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller) ... Enflamasyon döneminde mikroorganizmalar ile mücadele ettikten sonra yerlerini fibroblast ve diğer bağ dokusu elemanlarına bırakır.

-Bağdokusunun Ekstraselüler Fibrilleri; kollajen fibrilleri, retiküler fibriller ve elastik fibrillerdir. Kanın içerdiği fibröz komponent fibrinojendir. Kan pıhtılaştığı zaman muhtemelen fibrinojen aktif fibrin fibrillerine dönüşür.

-Bağ Dokusunun Amorf Kristal Maddeleri; proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinlerdir. Genelde proteoglikanlar ve glikoproteinlerin ömrü bir hafta ile sınırlıdır ve ekstraselüler matrikste nonkovalent bağlarla bulunurlar. Daha ziyade amorf kristal maddeler fibröz komponentlerdekiyle sınırlıdır. Bu amorf maddeler genelde mineralizedir. Bu mineraller kemik, dentin ve diş minesinde bulunur (68).

2.4. FİBROBLASTLAR

Fibroblastlar bağ dokusunun en önemli hücreleridir. Tendon, ligament ve fasiolar sadece fibroblastlardan ibarettir (68).

2.4.1. FİBROBLASTLARIN FONKSİYONLARI

Ekstraselüler matriks salgılanması, doku formuna göre oluşan ekstraselüler matriksin bağlanması ve yara iyileşmesinin kolaylaştırılmasından sorumludur. Deri kesildiğinde fibroblastlar prolifer olurlar ve yaraya doğru göç ederek yarığı

doldururlar. Proliferasyon sırasında geniş ölçüde ekstraselüler matriks salgırlar. Sikatri dokusu yaranın fibroblastlar tarafından kapanmış halidir (69).

2.4.2. FİBROBLASTLARIN MORFOLOJİSİ VE DAĞILIMLARI

Fibroblastlar, ekstraselüler matriksin bağı olduğu düzenli, toplu halde yayılmış fuziform hücrelerdir, aralarında düzenli bir şekilde yerleşmiş olan kollajen fibrilleri ile kabarık bir sandviç görünümündedirler.

Tek başlarına kalan fibroblastlar muhtemelen bağ dokusuna doğru hareket ettiklerinden morfolojileri çeşitlilik gösterir (pleomorfik).

2.4.3. FİBROBLASTLARIN FONKSİYONEL HÜCRE BİYOLOJİSİ

Fibroblastların tek hücreli morfolojisi aldatıcıdır, tek çekirdekle birlikte bir kaç çekirdekçiğe sahiptirler. morfolojileri yuvarlaktan poligonale, yaprak şeklinden fuziforma çeşitlilik gösterir. Fibroblastlar ekstraselüler matriks sentez ve salgılanması ile farklılaşırlar (diferensiye olurlar). Sitoplazma, bol granüllü endoplazmik retikulum, bir kaç mitokondri ve çok sayıda iyi görünen golgi cisimciklerini kapsar. Ayrıca lizozom ve vakuol üretimi ve salgılanması fibroblastlarda önemli görülür. Genç ve yaşlı hücrelerin vakuollerinin büyüklüğü ve sayısı aynı değildir. Genç hücrelerde çok sayıdaki vakuollerin, yaşlı hücrelerde birleşerek büyük vakuoller meydana getirdikleri bilinmektedir. Anormal olarak meydana gelen çeşitli iç ve dış koşullar, sitoplazmada vakuollerin oluşmasına neden olur. Yaşlı hücrelerde sitoplazmanın değişmesi ile anormal vakuoller teşekkül eder (69). Granüllü endoplazmik retikulumda aminoasit zincirlerine bağı prokollajen bulunur. prokollajen molekülleri fibroblastlarca salgılanan enzimlerle hücre dışına taşınır (24). Fibroblastlarda yapılan kollajen molekülleri, prokollajen moleküllerinin agrege biçimidir. C vitamini ve oksijen kollajenin şekillenmesinde önemlidir ve yara iyileşmesine karışırlar. Fibroblastlar kollajen, fibronektin, glikoproteinler ve proteoglikanları salgırlar, ekstraselüler glikokonjugatların sentezine yardımcı olan intraselüler glikojen içerir. Golgi cisimciğı glikokonjugatlara karbonhidrat kısmını ilave eden glikozil transferaz enziminin çok fazla zengindir. Fibroblastlar yüksek hareket kabiliyetine sahip olduklarından bir miktar aktin içeren mikrofilamentlere sahiptir. Fibroblastlar, tahminen fibroblastik hücre morfolojisinin korunmasına yardımcı olan sayısız mikrotübül içerir.

Hücre kültüründe çoğalan fibroblastlar tek sıra halindedir ve çoğalmaları kontakt inhibisyon ile kontrol altındadır. Ancak, transform fibroblastlarda (kansereleştirilmiş hücreler) bu özellik olmadığından tek sıra değil yığınlar oluşturarak kontrolsüz biçimde çoğalırlar (36, 38, 68).

2.5. EKSTRASELÜLER MATRİKS

Ekstraselüler matriks, fibröz proteinler ile birlikte amorf kristal maddeler ve Ca^{2+} tuzları içerir. Ekstraselüler matriksteki kollajen gibi fibröz proteinler gerilme direncinde önemlidir. Diğer makromoleküller olarak glikoproteinler ve proteoglikanlar da gerilme direncinde fibröz proteinlerle birlikte rol oynar (4, 69, 70). Ekstraselüler matriksin en önemli ve yaygın olan fibrilleri; kollajen fibriller, retiküler fibriller ve elastik fibrillerdir. Kollajen en yaygın ve önemli fibrildir ve %70-80' i tendon ve derinin dermis tabakasında yer alır (69, 70).

2.5.1. KOLLAJEN TİPLERİ VE KOLLAJEN SENTEZİ

Kollajen tipi üç polipeptid tipinin üçlü sarmaldaki yerleşimine bağlıdır. Polipeptidlerin sentezi yüksek yapıli canlılarda direkt genlerle kontrol edilir. Sentez kontrolünün 20 farklı gende yapıldığı tespit edilmiştir (71). Kollajen Yapısındaki polipeptidler içinde en yaygın olanlar; glisin, glutamik asit, aspartik asit, prolin, hidroksi prolin ve diğer amino asit çeşitlerinden arjinin, lizin, hidroksi lizin ve lösindir (69). Kollajen sentezi, tedavi sırasında verilen lokal glikokortikoidlerle de indüklenmektedir (81).

Bugün varlığı tespit edilmiş 17 tip kollajen vardır (72, 73). Kollajenlerin genetik farklılıklar gösteren proteinler olduğu gösterilmiştir.(72, 74) Normal insan derisinde yaygın formdaki kollajenler tip I ve tip III tür. Tip I kollajen total kollajenin %80' ini oluşturur, tip III kollajen %15 ve diğer kollajenler de %5' ini oluşturur. Tip IV ve VII kollajenler temel membranda sabit olarak bulunurlar (69, 72, 75, 76). Tip IV' e kadar olan kollajenler en önemlileridir, diğer tipler minör komponentlerdir. Kollajen sadece spesifik enzimi kollajenazla parçalanan son derece stabl bir moleküldür (77, 78).

Spesifik matriks metalloproteinaz enzimleri sadece o tip kollajeni yıkarlar. Fibroblast ve makrofajlarda üretilen kollajenaz tip I ve tip III kollajenin yapısını bozar (70, 77, 78). Nötrofillerde üretilen kollajenaz deride nötrofillerin yerleşiminde önemli rol

oyunur. Jelatinaz A ve B (tip IV kollajenaz) jelatin yapısını bozar, jelatinazlar tip IV, tip V ve tip VII kollajenleri ve elastini yıkarlar (77-80).

Tip I Kollajen

Tip I kollajene kemikte, tendon, deri ve korneada rastlanmaktadır. Tip I kollajen iki $\alpha 1(I)$ zinciri ve bir $\alpha 2(I)$ zincirinden oluşan $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$ ile gösterilir. Çok az karbonhidrat içerir ve lizin hidroksilasyonu çok yüksek değildir. Tip I kollajen bağ dokusu fibroblastları, osteoblastlar, çizgili kas hücreleri ve bazı epitelial hücrelerde sentezlenir. Tip I kollajen formu fibrilleri mikroskopta karakteristik 67 nm periyotlarla görülür. Benzer düzen tip II ve tip III kollajende de görülür (69-71).

Tip II Kollajen

Tip II kollajene kartilaj, kornea ve gözün camsı tabakasında (vitreous body) rastlanır. Üç $\alpha 1(II)$ zincirinden meydana gelen $[\alpha 1(II)]_3$ ile gösterilir. Tip I kollajene nazaran tip II kollajen yüksek derecede lizin hidroksilasyonuna sahiptir. Tip II kollajen sentezi kondroblastlar, kondrositler, nötral retinal hücreler ve embriyonun omurga taslağında (notochord) olur (69-71).

Tip III Kollajen

Tip III kollajen fetal dermiste, kan damarlarının aralarında ve bazı organlarda bulunur. Tip III kollajen üç $\alpha 1(III)$ zincirinden meydana gelen $[\alpha 1(III)]_3$ ile gösterilir. Tip III kollajen biraz sistein ve az miktarda lizin hidroksilasyonu içerir. Fibroblast ve miyoblastlar da sentezlenir (69-71).

Tip IV Kollajen

Tip IV kollajen temel membran yapısının önemli bir elemanıdır. Hemen hemen bütün epitelial tabakaların bazal yüzeyinde ekstraselüler matriks fibröz ağ yapısı vardır. Tip IV kollajenin iki ayrı alt tipine rastlanır. Bunlar; $[\alpha 1(IV)]_3$ ve $[\alpha 2(IV)]_3$ ile gösterilirler ve bir alt tipi epitelial hücrelerce sentez edilir. Tip IV kollajen yüksek lizin hidroksilasyonu ve yüksek glikozilasyona sahiptir (4, 69-71).

Tip V Kollajen

Tip V kollajene kan damarlarının arasında ve çizgili kas hücrelerinde bol miktarda rastlanır. Çizgili kas hücrelerinde ve kondrositlerde sentez edilir. İki ayrı $\alpha 1(V)$ zinciri ve bir $\alpha 2(V)$ zincirinden oluşan $[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$ ile gösterilir (69).

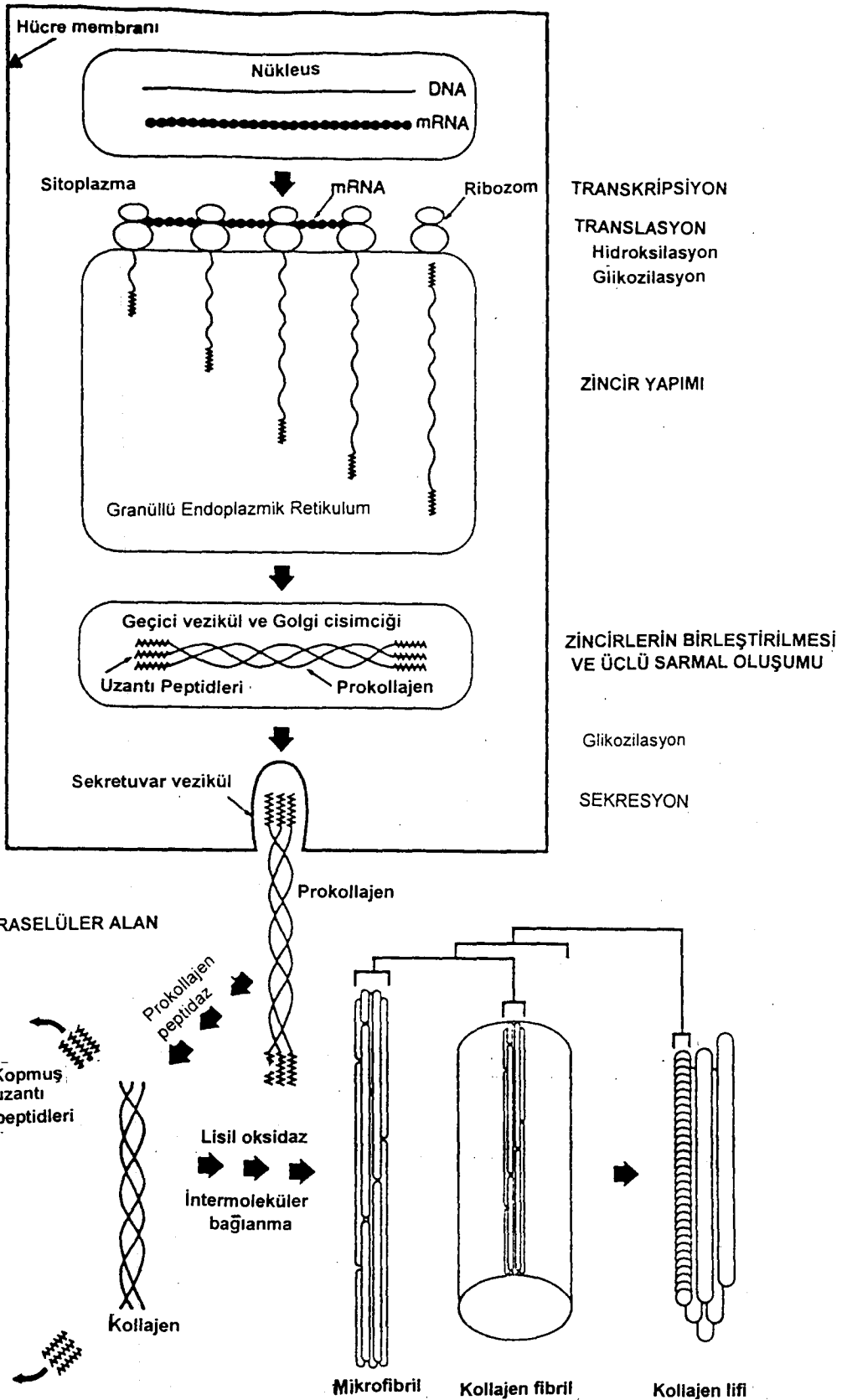
2.5.1.1. Kollajen Sentezinin Erken Safhası

Bütün kollajen molekülleri birbirlerine benzer temel yapıya sahiptir. Her birinin yapısında 300 nm uzunluğunda ve 1.5 nm çapıda üç α zinciri vardır. Kollajen polipeptid zincirleri endoplazmik retikulum zincirine bağlı ribozomlarda sentez edilir, granüllü endoplazmik retikulum lümeninden uzayarak geçerler ve "pro- α zincir" olarak tanımlanırlar. Pro- α zincirleri üçlü sarmal şeklini aldıklarında "prokollajen" adını alır. Prokollajen molekülündeki peptidlerin karboksil terminalleri zincirler arası disülfid bağları ile bağlıdır. Zincirler arasındaki hidrojen bağları da prokollajen molekülünün biraraya getirilmesine yardımcı olur (69, 70). Pro- α zincirleri prokollajen molekülünü oluşturmadan önce prolin ve lizinin artan miktarda hidroksilasyonu meydana gelmektedir. Lizin hidroksilasyonu glikozilasyon için önem taşır. Prokollajen molekülleri nadir olarak disakkarid ve genellikle glukoz ve galaktoz içerir. Diğer glikoprotein sekresyon ürünleri sialik asit yokluğu ile karakteristiktir (68, 69).

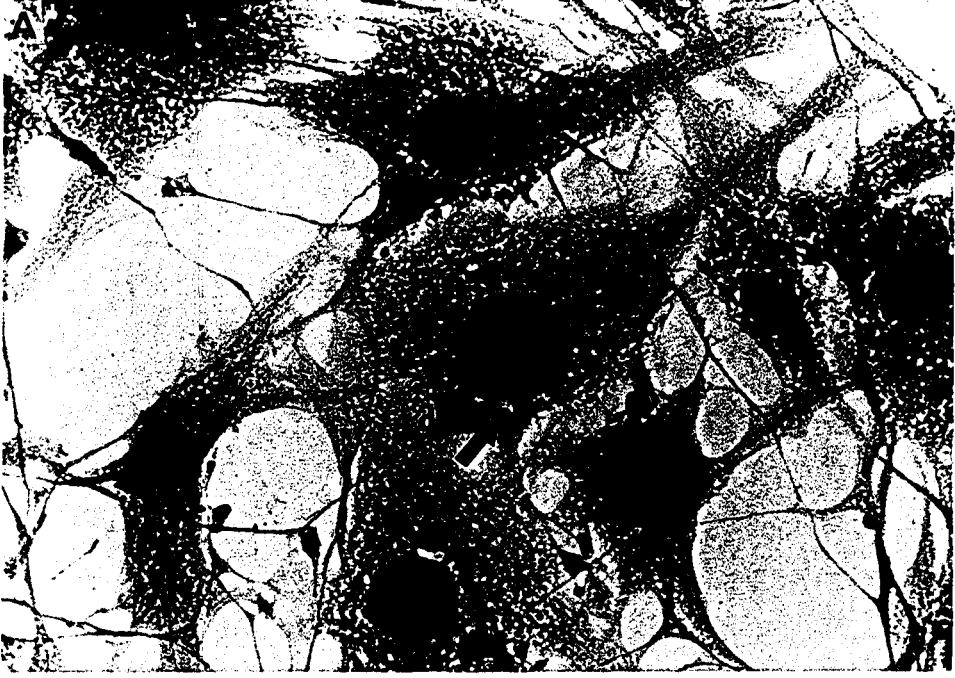
2.5.1.2. Kollajen Sentezinin Geç Safhası

Prokollajen molekülleri sentez edilip, hücreden salgılandıktan sonra prokollajen peptidaz prokollajenin uçlarındaki peptidleri ayırdıktan sonra oluşan molekül "tropokollajen" adını alır. Prokollajen peptidaz prokollajen molekül uçlarındaki peptidleri kopardıktan sonra kollajen molekülleri kendiliğinden kollajen fibrilleri oluşturmaya yönelir. Bu olay hücre içinde oluşabilecek fibrillojenezisi engeller (69, 71). Tip I, tip II ve tip III prokollajenler kollajene dönüşür, tip IV ve V prokollajen dönüşmez. Derideki hidroksi prolin total kollajen miktarında önemli indikatör görevi görür ve hidroksi prolin tayini yara iyileşiminde spesifik bir kimyasal metottur (70, 82).

Kollajen ile birlikte glikozaminoglikanlar ve fibronektin fibrillojenezisin düzenlenmesinde rol oynar. Dokularda kollajen fibrilleri; deride gelişi güzel, tendonlarda paralel, korneada üstüste düzendedir (68, 69, 70). Şekil 2 kollajen sentezinin basamaklarını ve Şekil 3 kollajen granüllerini göstermektedir.



Şekil 2 Fibroblastlarda kollajen sentezi ve salgılanması: pro- α zincirlerinin sentezi, hidroksilasyon ve glikozilasyon granüllü endoplazmik retikulumda, pro- α zincirlerinin üçlü sarmal oluşturmaları Golgi cisimciğinde olur ve sekretuar vezikül içinde hücre dışına çıkar. Ekstraselüler alanda uzantı peptidleri koparıldıktan sonra fibrillogenez ve çapraz bağlar aracılığıyla fibriller kollajen liflerinin oluştururlar.



Şekil 3 A- T15 Fibroblastlarının görüntülerinde vezikül içinde kollajen granülü oklarla gösterilmiştir. B- T15 Fibroblastlarının hücre zarından çıkmak üzere olan granül oklarla gösterilmiştir (Her iki fotoğrafta da 1600 kez büyütme uygulanmıştır).

2.5.1.3. Kollajen Bağları

Lizin ve hidroksi lizin, lizin oksidaz ile oksidatif deaminasyona uğradığında aldehit grupları ekstraselüler enzimlerle seyrek olarak reaksiyona girerler. Bu aldehit grupları diğer aldehitler ve aminoasitler ile molekül içi ve moleküller arası kovalent bağlar oluştururlar. Bu mekanizma kollajen moleküllerini bulunduğu fibroblastların kendine özgü gerilme direncini artırır (4, 69, 70, 83).

2.5.1.4. Kollajen Fibrillerinin Boyama Karakterleri

Kollajenin bulunduğu dokular çıplak gözle bakıldığında beyaz görülür(örn: facia, tendon). Hematoksilin ve eosin ile boyandığında pembe renk verir.Kullanımı yaygın olan ikinci bir metod Masson's trichrome ile boyandığında kollajen mavi renk verir ve von Gieson metodu ile pembeye boyanır (68, 84). Tropokollajen molekülleri glisin, hidroksiprolin ve hidroksi lizin aminoasitlerince zengindir. Kollajen molekülleri asit ve alkalilere dayanıksızdır (84).

2.5.2. ELASTİN

Elastin, kendine özgü elastikiyeti olan ekstraselüler matriks polipeptitidir. Deride, kan damarlarında, burunda, gözün dış tarafında, gastrointestinal organlarda ve akciğerde bulunur. Glisin ve prolince zengindir, ancak hidroksiprolin ve hidroksilizin kollajendeki kadar fazla değildir. Elastin hidrofobik aminoasitler, desmozin ve izodesmozin içerir. Desmozin ve izodesmozin elastine özgüdür ve molekül içi ve moleküller arası bağlar meydana getirirler. Elastin fibrilleri fibroblast ve çizgili kas hücrelerinde sentezlenir (69, 76).

2.5.3. FİBRONEKTİN

Fibronektin, kollajen fibrilleriyle hücre yüzeyi arasında yer alan glikoproteindir. Fibronektin reseptörü (Integrin) ile plazma membranının dış yüzüne tutunur. Integrin ise, sitoplazmik mikrofilamentlere vinkülin ve talin vasıtasıyla bağlanır. Fibronektin molekülünde dört farklı alan vardır; 1- hücre bağlayan, 2- kollajen bağlayan, 3- aktin bağlayan, 4- fibrin bağlayan alanlar. İki fibronektin polipeptid zinciri kovalent disülfid bağları ile birbirine bağlıdır (4, 85). Fibronektin hücre ve ekstraselüler matriks arasında adhesif köprü konumundadır. Fibronektin fibrin ile spesifik olarak bağlanır (86, 87, 88).

2.5.4. PROTEOGLİKANLAR ve GLİKOPROTEİNLER

Proteoglikanlar bağ dokusu yerleşik hücrelerinde sentezlenir ve salgılanır (89-91). Proteoglikanlar glikozaminoglikanlar ile kuvvetli sülfat bağları yapan proteinler içerir (90). Proteoglikanlar, diğer matriks proteinleri, hücre, diğer protein ve karbonhidrat tiplerini bağlar (91).

-Hyaluronik asit: N-asetilglikozamin ve D-glukronik asit disakkaritlerinden oluşur. Bağ dokusunda, gözün camsı tabakasında, kartilajda, deride ve göbek kordonunda bol miktarda bulunur.

-Kondroitin-4-sülfat: N-asetilgalaktozamin ve D-glukronik asit disakkarit ünitelerinin tekrarından ibarettir. Kartilaj, deri ve korneada bol miktarda bulunur.

-Dermatan sülfat: N-asetilgalaktozamin-4-sülfat ve L-iduronik asit ünitelerinden oluşur. Deri, kan damarları, tendonlar ve akciğer bağ dokusunda bulunur.

-Keratan sülfat: N-asetilglikozamin-6-sülfat ve galaktozamin (glikozamin de olabilir) içerir.

-Heparan sülfat: Heparinin bağlanmasına aracılık eder. N-asetil glikozamin ve D-glukronik asit (genellikle) veya iduronik asit içerir (nadir). Bazı hücre tiplerinde temel membran yüzeyinde bol miktarda bulunur. Heparin antitrombin III' ü bağlayan antikoagülandır (92)

-Kartilaj proteoglikanları: Hyalin kartilaj, embriyonik kemiklerde, uzun kemiklerin uçlarında bulunur. Hyaluronik asit molekülleri içerir.

2.5.5. AMORF KRİSTAL MADDELER

Bunların yapı ve görevleri henüz yeteri kadar aydınlatılmamıştır. Fibröz proteinler ve proteoglikanların aralarını doldurdukları ve bunların haricindeki komponentlerle bağlanmalarına yardımcı oldukları sanılmaktadır (68, 69, 93).

2.5.6. TEMEL HÜCRE MEMBRANI

Işık mikroskopunda çizgi şeklinde, elektron mikroskopunda ise açıkça görülür. Epitelial ve bağ dokusu hücrelerinde pek çok olayın meydana gelmesine yüzey sağlar. Membran yüzeyi laminin ve proteoglikanlarca zengindir, merkez kısmı ise tip III kollajence zengindir.

2.5.6.1. Laminin

Molekül ağırlığı 220 kDa olan A zinciri ve 440 kDa olan B zincirinin disülfid bağları ile bağlanmasından oluşan bir moleküldür. B zincirinin sonunda 50 kDa ağırlığında heparin bağlayıcı alan ve hücre bağlayıcı alan vardır. A zincirinde ise kollajen bağlayıcı alan vardır (4, 94). Fibronektine benzer olarak ekstraselüler matriks glikoproteinlerini hücreye bağlar (4, 95). Epitelial, endotelial, sinir ve kas hücrelerinde bulunur. Tip IV kollajen, heparan sülfat ve fibronektin de membran elemanları arasında sayılabilir.

2.6. TEZDE KULLANILAN MADDELERİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

2.6.1. DİMETİLSÜLFOKSİT'İN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Organik ve inorganik maddelerin kolayca çözündüğü yüksek polariteye sahip endüstriyel bir solvandır. Farmakolojik aktiviteleri; antienflamatuvar, lokal anestezi, bakteriyostatik, diüretik, vazodilatör olarak belirtilmiştir. Membranlardan kolayca penetrasyon ve kollajen dissolüsyonu gibi özellikleri olduğu da kaydedilmiştir. Topik olarak antineoplastik etkisi olduğu da gösterilmiştir. Deri için birinci derecede iritan bir maddedir (96). DMSO birinci derecede toksiktir, akut sistemik toksisitesi vardır. İlaçlar DMSO' da çözündürülerek verildiğinde aynı ilaçların sulu solüsyonlarında gözlenmeyen toksisiteler ortaya çıktığı görülmüştür.

Artirit, bursit ve sklodermia ile birlikte seyreden semptomlarda deneysel olarak DMSO' nun %70 ve daha yüksek konsantrasyonlarının lokal uygulamalarında antienflamatuvar özelliği olduğu gözlenmiştir (93, 97, 98). Ancak köpek, tavşan ve domuzlarda oral olarak uzun süre yüksek dozda DMSO uygulanmasının oküler toksisiteye sebep olduğu ve bu riskten dolayı antienflamatuvar olarak kullanılamayacağı gösterilmiştir (93, 97, 99). Hücre kültüründe antimitotik etkisinden dolayı sıvı nitrojen içinde hücre stoklanmasında kullanılır (100-102).

2.6.2. DEKSPANTENOLÜN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Dekspantenol, pantotenik asitin alkol analogunun dekstrojir formudur. % 2' lik merhemi (Bépanthène®) lokal olarak yanık, yara, ülser ve dermatit tedavisinde

kullanıldığında epitelyumdaki iyileşmeyi arttırdığı ve kaşıntıyı azalttığı gözlenmiştir. Bazı kozmetik preparatların formülüne de girer (93, 96).

Pantotenik asit veya pantotenat tuzu yaşayan tüm organizmalarda, ko-enzim-A' nın önemli bir komponentidir. Pantotenik asitin primer insan fibroblast hücre kültürlerinde intraselüler protein sentezini stimüle ederek hücreyi mitozaya sevkettiği ancak mekanizmasının henüz bilinmediği kaydedilmiştir (103).

2.6.3. *CENTELLA ASIATICA* EKSTRESİNİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ:

Centella asiatica (*Hydrocotyle asiatica*) Hindistan, Pakistan, Seylan ve Madagaskar'da yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir. Bu ülkelerde yüzyıllardır yaraların iyileştirilmesinde geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Avrupa'da yara ve bacak ülserlerinin tedavisinde iyi sonuç verdiği için hazırlanan ilaç preparatları (Madécassol®) vardır (53, 104). *Herba Hydrocotylis asiatica*, saponinlerden: asiatikozid, oksiasiatikozid ile triterpen asitlerden: asiatik asit, madekassik asit, madesiatik asit taşır. Antibakteriyel ve yara iyileştiricidir (105). Standart ekstrede asiatik asit (% 30 a/a), madekassik asit (% 30 a/a) ve asiatikozid (% 40) bulunmaktadır.

TECA' nın bağ dokusu hücrelerinin elemanları üzerine biyokimyasal etkileri olduğu bilinmektedir. Primer insan deri fibroblast kültürlerinde [¹⁴C]-prolin veya [¹⁴C]-lösin' in yeni sentez edilen kollajendeki ölçümleri ve hidroksi prolin miktar tayinleri yapılarak *Centella asiatica* ekstresinin kollajen sentezini stimüle ettiği gösterilmiştir (106). Ayrıca stresle oluşan ülserlerde diazepam ile karşılaştırmalı olarak çalışılmış, antiülser aktivitesi (mide ülserlerinde) gösterilmiştir. Sıçanlarla yapılan deneyler sonucu antistres aktivitesi olduğu tahmin edilmektedir (107).

2.6.4. *ARNEBIA DENSIFLORA*' DAN ELDE EDİLEN İZOVALERİLALKANİN VE α -METİL-n-BÜTİLALKANİN (108) VE DİĞER NAFTOKİNONLARIN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Boraginaceae familyasına dahil olan *Arnebia* bitkisinin kökleri, kırmızı renkli izoheksilnaftakinonlar (alkanninler) ihtiva ederler. *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. yurdumuzda Bursa, Manisa, Eskişehir, Kayseri, Adana, Erzincan, Konya, Niğde ve Maraş illeri ve çevresinde bulunmaktadır. Bugüne kadar, dünyada yedi *Arnebia* türü ile çalışılıp, içerdikleri naftokinonların bazıları alkannin, bazıları şikonin olarak

isimlendirilmiştir (109). *Arnebia densiflora*'nın içerdiği naftakinonlar: alkanin, arnebin-7, asetilalkanin, α -metil-n-bütillalkanin, izovalerilalkanin, β,β -dimetilakrilalkanin ve anjelikalkanin olarak tespit edilmiştir (109, 110).

Naftakinonların, antibakteriyel, antienflamatuvar, antitümör ve yara iyileştirici etkileri olduğu ve naftakinon taşıyan bitki ekstrelerinin bu amaçlarla halk arasında kullanıldığı bilinmektedir (111-113). Şikonin'in 50 μg dozda topik uygulanmasının (merhem olarak) histaminle artan vasküler permeabiliteyi %40 inhibe ettiği, yine alkanin veya şikoninden birinin 50-100 μg dozlarda topik uygulanması ile histaminin intradermal enjeksiyonu sonucu oluşan kapiller permeabilite artışını engellediği sıçanlarda test edilmiştir. Aynı çalışmada şikonin, şikalkin ve alkanin, fenilbutazon ile karşılaştırmalı olarak antienflamatuvar ve antibakteriyel etkileri ratlarda dermal yaralarda oluşan ödemlerde 50-100 μg olmak üzere iki doz olarak uygulanmış ve maksimum cevapların 50 μg dozda alındığı kaydedilmiştir (112).

Naftakinon ihtiva eden bitkilerin halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılmasından istifade ederek, *Alkanna tinctoria*'daki naftakinonların izole esterleri merhem olarak *ulcus cruritis* ve yanıklarda denenmiş lokal uygulamanın 6. ve 7. haftasında hastalarda belirgin düzeyde iyileşme görülmüş, enflamasyonun olmadığı tespit edilmiş, başarı oranı %80 kabul edilmiştir (114, 115). Şikonin ve türevleri, akut-kronik ekzemaya ve sivilcelere karşı da denenmiş ve özellikle akut egzemada iyileştirici etkisi olduğu görülmüştür (116).

Çin ve Japonya' da da naftakinon içeren bitkilerin (*Alkanna tinctoria*, *Arnebia nobilis*) antibakteriyel ve yara iyileştirici olarak kullanıldığı (115) ve yapılan bir çalışmada izole edilmiş şikoninlerin 50-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon serilerinde *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Sarcina lutea* ve *Bacillus subtilis* üzerine antibakteriyel etkileri olduğu, benzer etkinin *E. coli* üzerine olmadığı ve sadece alkaninlerin *Candida albicans* üzerine inhibe edici etkileri olduğu kaydedilmiştir (117, 118).

Yunanistan' da yapılan bir çalışmada *Alkanna tinctoria*'dan elde edilen naftakinonların hekzanlı ekstresinin (özellikle arnebin-7) antibiyotik ve sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Histoplastin Red® olarak isimlendirilen tıbbi müstahzarın terkinini oluşturur (115). Yurdumuzda (Gaziantep' te) "Eğlik kökü" olarak bilinen *Arnebia densiflora* (ya da *Alkanna tinctoria*) 'nın köklerinden eğlik macunu hazırlanmakta ve

hazırlanan bu karışımın yaralarda merhem olarak sürülmektedir. Eğlik macunu: 15 g eğlik kökü tereyağında kızartılıp, süzölür. Süzölen yağ, 25 g çekem (*Viscum album*), 25 g balmumu ve 50 g antep fıstığı sakızı ile birlikte bir kaba konur ve az ateşte tahta kaşıkla macun kıvamına gelene kadar karıştırılır. Hazırlanan bu macunun 1.5 misli süzölmüş bal ile karıştırılarak mide-bağırsak ülserlerinde ve veremli hastalarda sabah aç karnına birer kaşık verilerek kullanıldığı bildirilmiştir (119).

Naftakinonların antitümör aktiviteleri araştırılmış; 15 mg/kg/gün 'den yüksek dozlarda şikonin ve alkaninlerin toksik etkisi, daha düşük dozlarda antitümör aktiviteleri farelerde Sarcoma 180 hücreleri kullanılarak tespit edilmiştir (113, 120). *Arnebia* ekstresinin yüksek konsantrasyonları (1-1000 µg arası dozlar) kullanılarak Ehrlich ascites Carcinoma hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmada sitotoksik etkileri olduğu, düşük dozlarda ise bu etkinin olmadığı gözlenmiştir. Aynı çalışma, farelerde *in vivo* olarak yapıldığında, sitotoksik etkinin yanısıra hepatotoksik etkisinin de olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mutajenik etkileri laboratuvar hayvanlarında izlenmiştir (120).

Arnebia nobilis köklerinden izole edilen arnebin-1 ratlarda Walker karsinosarkoma 256 (RWC 256) ile *in vivo* olarak yapılan çalışmada antitümör etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (121). Arnebin-1' in kobaylarda Walker karsinosarkoma hücrelerine karşı 4 mg/kg/gün dozda gösterdiği sitotoksik etkiyi, farelerde PS (P 388 lenfoid lökoma) hücrelerine 3 mg/kg/gün dozda gösterdiği bildirilmiştir (112). Arnebin-1' in mitomisin-C veya difenilsülfon-4,4'-diazotiyosiyanat ile kombinasyonlarının antitümör aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir (122).

Naftakinonlar ve diğer sitostatik ve sitotoksik ajanlar ile (azatiyopirin, kolşisin, siklofosfamid, fluorourasil, metotreksat ve vinkristin) lenfosit ve granülosit hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda immünosupressif ve immünostimölan etkileri (fagositoz yeteneği) araştırılmış ve alkaninin 250 ng/ml, şikoninin 10 ng/ml' den yüksek dozlarının immünosupressif, alkaninin 250 pg/ml (875 pmol/l) ve şikoninin 100 pg/ml (350 pmol/l) dozlarda immünostimölan etkileri tespit edilmiştir (123).

Arnebia densiflora'nın, antienflamatuvar, analjezik ve yara iyileştirici etkileri *in vivo* olarak çalışılmıştır. *A. densiflora* ekstresinin 1, 3, 5 mg/kg/gün dozlarında intraperitoneal verilmesi sonucunda antienflamatuvar etkisi, farelerin sırtlarında oluşturulan yaralarda, %10, %20' lik pomadının kullanılması sonucu da yara iyileştirici etkisi gösterilmiştir. Yara dokusundan alınan histolojik kesitlerde hiperkeratinozis, deri

adneks gelişimi, granülasyon dokusu, kollajen üretimi, gerilme direnci gibi parametrelere bakılmıştır (108, 124).

Alkanninlerin boyar madde olarak kullanımları eski Yunan ve Roma medeniyetlerine kadar uzanır. Günümüzde boyar madde olarak kullanımları uzak doğu ülkelerinde yaygındır. Son yıllarda oniki Avrupa ülkesinde gıda, kozmetik ve şarap boyası olarak kullanıldıkları bilinmektedir (108). Alkanin ve şikonin Colour Index'te Natural Red 20 ve Shikonin veya Tokyo Violet olarak yer almaktadır. Alkanninin besin katkı maddesi olarak kullanımı FAO/WHO komitesi tarafından kabul edilmiş ve dünyada yaklaşık 20 ülkede boyar madde olarak kullanılmasına izin verilmiştir (108).

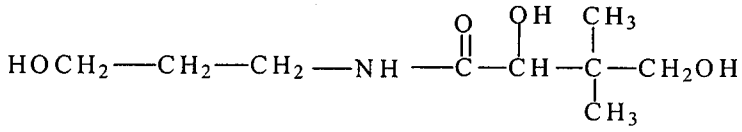
Bu tezde kullanılan dekspantenol, *Centella asiatica* ekstresinin (TECA) etken maddesi asiatikozid ve *Arnebia densiflora*'dan hazırlanan karışımdaki izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin'in kimyasal formülleri Şekil 4 de verilmiştir.

2.7. YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ OLAN DİĞER BİTKİLER

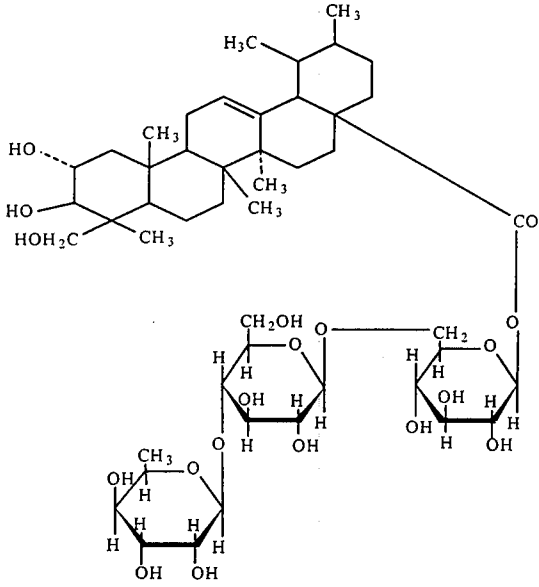
Aloe vera, antienflamatuvar ve yara iyileştirici etkileri gösterilmiş bir bitkidir. Ödemlerde, akut ve kronik enflamasyonlarda antienflamatuvar etkisi ve sıçanlarda oluşturulan yaralarda, granülasyon dokusunda gerilme direnci ve diğer biyokimyasal parametrelere bakılarak yara iyileştirici etkileri gösterilmiştir (125, 126). Yine *Aloe* ile, farelerde yapılan bir başka çalışmada; *Aloe* kreminin kullanıldığı yanık yaralarında iyileşmenin, *Aloe*'nin diğer topik preparasyon formlarına göre daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir (127).

Hamamelis virginiana' ın dal ve gövde kabuklarından elde edilen ekstre Hametan® adı ile hazırlanan krem, merhem ve topik losyonların etken maddesini oluşturur (95, 104, 128).

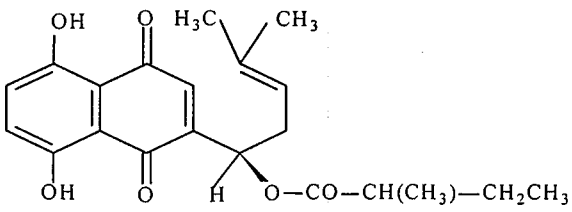
Dragon's Blood (*Croton* spp.) da yara iyileşiminde fibroblastlarda kollajen sentezini stimüle ettiği, epitelial dokuda rejenerasyonu hızlandırdığı gösterilen bir başka bitkidir (57).



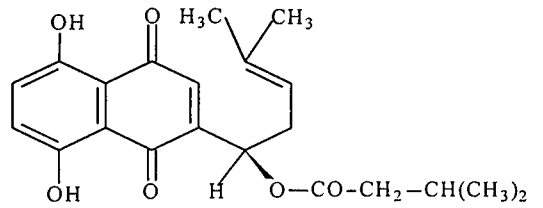
Dekspantenol (Bepanthen®)



Asiatikozid (Madécassol®)



α-Metil- n-butilalkanin



Izovalerilalkanin

Şekil 4. Çalışmalarda kullanılan maddelerin kimyasal formülleri

Moringo oleifera ve *Aegle marmelos* (Bilva) sıçanlarda yapılan çalışmalarda antienflamatuvar ve yara iyileştirici etkileri tespit edilmiş bitkilerdir (129). Her ikisinin de akut antienflamatuvar aktiviteleri olduğu, sadece Bilva' nın kronik enflamasyonda etkili olduğu ve (gerilme direncini arttırmada) heksozaminle lisil oksidaz aktivitesini taklit ederek kollajen üretiminde etkili olduğu sanılmaktadır (79). *Tridax procumbens* (130) ve *Hypericum* (131) da gerilme direncini arttırarak yara iyileşiminde etkili olan bitkilerdir. *Pongamia pinnata* ve *Cynodon dactylon* (133), *Cassia alata* (134), *Symphytum officinale* (ayrıca analjezik etkili) (135), *Curcuma aromatica* ve *Piper betle* (136), *Wedelia calendulaceae* (137), *Triticum vulgare* (138) yara iyileşimi üzerine etkileri gösterilmiş bitkilerdir.

Delphinidin klorür (IdB 1056) tavşan ve sıçanlarda histaminle oluşan kapiller permeabiliteyi azaltan ve yara iyileştirici etkisi gösterilmiş bir bitkisel flavanoiddir.(132)

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1. KİMYASAL MADDELER

- Dekspantenol (Roche İlaç Müstahzarları, İstanbul)
- Standart *Centella asiatica* ekstresi (Titrated extract from *Centella asiatica* = TECA) (Bilim İlaç Sanayi , İstanbul)
- Arnebia densiflora* bitkisinden elde edilmiş ;izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı
- Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM) (Gibco, Scotland Yard, UK)
- L-glutamin (Sigma, St.Louis, ABD)
- Fetal Bovine Serum (Sigma, St.Louis, ABD)
- Tripsin-EDTA solusyonu 10X (Sigma, St.Louis, ABD)
- Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Penisilin-streptomisin solüsyonu (Sigma, St.Louis, ABD)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Potasyum klorür (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sodyum klorür (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sodyum bikarbonat (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sodyum hidroksit (Merck,Darmstadt, Almanya)
- Potasyum hidrojenfosfat (KH₂ PO₄) (Merck,Darmstadt, Almanya)
- Sodyum hidrojenfosfat (Na₂ HPO₄) (Merck,Darmstadt, Almanya)
- Asit fuksin (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Fosfomolibdik asit (Merck,Darmstadt, Almanya)
- Metilen mavisi (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Glasiyel asetik asit (Merck,Darmstadt, Almanya)
- D-glukoz (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Fenol red (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Hematoksilin (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Potasyum sülfat (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Cıva oksit (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Gliserin
- Entellan
- Zefiran

3.1.2. HÜCRELER

- Tavuk embriyonik fibroblastları (Döllenmiş tavuk yumurtasından alındı.)
- T15 fibroblastları (East Anglia University School of Biological Sciences moleküler biyoloji departmanından sağlanmıştır.)

3.1.3. MALZEMELER

- Polistiren şişe 25 cm² - Corning (Sigma, St. Louis, ABD)
- Polistiren petri 6 cm çapta - Corning (Sigma, St. Louis, ABD)
- Lam, lamel
- Gilson mikropipet (1ml ve 200 ml'lik) ve uçları
- Sıvı azot tankı (30 LD)
- Kriyotüp
- Steril enjektör ucu filtresi-Milipor 0.22 mm X 25mm (Sigma, St. Louis, ABD)

3.1.4. CİHAZLAR

- CO₂ İnkübatörü (Heraeus 6000)
- Steril kabin (Holten HV2448)
- Derin dondurucu (Heraeus)
- Soğuk oda (Uniblock Zanotti)
- Santrfüj (Heraeus)
- İnvert mikroskop (Olympus CK 2)
- Mikroskop (Olympus BH-2)
- Etüv
- Mikroskop+fotoğraf makinesi sistemi (Olympus PM-30 exposure control unit + Olympus BX 50)

3.1.5. KULLANILAN DİĞER MALZEMELER

- Mikrodiseksiyon küveti
- Mikrodiseksiyon makası
- Bistüri
- Mikrodiseksiyon pensi
- Alkol lambası

- pHmetre
- Renkli fotoğraf filmi

3.2. KULLANILAN SOLÜSYONLAR VE HAZIRLANIŞLARI

3.2.1. DULBECCO' S MODIFICATION OF EAGLES MEDIUM (DMEM)

1X 500 ml için: DMEM 6.69 g, Sodyum bikarbonat 1.85 g, distile su

Hacmi kültür vasatına katılacak olan diğer sıvı maddeler de hesaplanarak tamamlandı. 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak pH 7.2-7.4 'e ayarlandı. Sterilize edildi.

DMEM' IN İÇİNDEKİLER

İNORGANİK TUZLAR	mg/lt
CaCl ₂ (anhidr)	200.00
Fe(NO ₃).9H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄ (anhidr)	97.67
NaCl	6400.00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125.00

DİĞERLERİ

D-glukoz	4500.00
Fenol red	15.00

AMİNO ASİTLER

L-arjinin	84.00
L-sistein	62.57
L-glutamin	584.00
Glisin	30.00
L-histidin HCl.H ₂ O	42.00
L-izolösin	105.00
L-lösin	105.00
L-lisin HCl	146.00
L-metionin	30.00

L-fenil alanin	60.00
L-serin	42.00
L-treonin	95.00
L-triptofan	16.00
L-tirozin (disodyum tuzu)	103.72
L-valin	94.00

VİTAMİNLER

D-Ca-pantotenat	4.00
Kolin klorür	4.00
Folik asit	4.00
İ-inositol	7.20
Nikotinamid	4.00
Piridoksal HCl	4.00
Riboflavin	0.40
Tiamin HCl	4.00

3.2.2. KÜLTÜR VASATI (DMEM+%10 FCS)

% 10 500 ml için: % 9.2 Steril sodyum bikarbonat çöz. 20 ml, L-glutamin sol. 5 ml (%1 olacak), Pen-strep sol. 5 ml (%1 olacak), Fetal bovine serum 50 ml (%10 için), DMEM sol. k.m. 500 ml (30).

NOT: Kullanılan DMEM glutamin içeriyorsa ayrıca glutamin solüsyonu ilave edilmedi (pH 7.2) (139).

3.2.3. L-GLUTAMİN SOLÜSYONU

100X için: L-glutamin 2.922 g., Steril distile su k.m. 100 ml (pH 4.5-5.5)

3.2.4. PUCK' S SALINE-A (PSA)

100 ml için: Potasyum klorür (4 g/l) 0.4 g, Sodyum klorür (80 g/l) 8 g, Sodyum bikarbonat 0.35 g, D-glukoz (10g/l) 1 g, Fenol red (0.05 g/l) 0.005 g, Steril distile su k.m. 100 ml (pH 7.2-7.4)(138).

3.2.5. EDTA SOLÜSYONU

100 ml - 300 mM için: EDTA 11.166 g, Steril distile su k.m. 100 ml, NaOH (k.m. pH: 8) yaklaşık 1.2 g..

3.2.6. TRİPSİN SOLÜSYONU

100 ml 2X için: PSA 10 ml, %5 Sodyum bikarbonat 0.7 ml, 300 mM EDTA 0.33 ml, 10X Tripsin/EDTA 25 ml, Steril distile su k.m.100 ml (pH 7.2) (51).

3.2.7. FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİSİ (PHOSPHATE BUFFER SALINE - PBS)

1 lt için: NaCl 8 g., KCl 0.2 g., KH_2PO_4 0.2 g., NaHPO_4 1.14 g. (pH 7.3) (54).

3.2.8. DEKSPANTENOL ÇÖZELTİLERİ

3.2.8.1. 5 mg/ml Dekspantenol çözeltisi : 50 mg dekspantenol DMSO ile 10ml' ye tamamlandı.

3.2.8.1. 0.5 mg/ml Dekspantenol çözeltisi: 5 mg/ml dekspantenol çözeltisinden 1 ml alınarak DMSO ile 10 ml' ye tamamlandı.

3.2.9. TECA ÇÖZELTİLERİ

3.2.9.1. 5 mg/ml TECA çözeltisi : 50 mg TECA tartılıp, DMSO ile 10ml' ye tamamlandı.

3.2.9.2. 2.5 mg/ml TECA çözeltisi: 5 mg/ml TECA çözeltisinden 5 ml alınarak DMSO ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.2.10. KAR ÇÖZELTİLERİ

3.2.10.1. 5 mg/ml KAR çözeltisi: 50 mg karışım tartıldı, DMSO ile 10 ml' ye tamamlandı.

3.2.10.2. 0.5 mg/ml KAR çözeltisi: 5 mg/ml 'lik karışım çözeltisinden 1 ml alınarak DMSO ile 10 ml' ye tamamlanır.

3.2.11. KOMBİNASYON ÇÖZELTİLERİ

3.2.11.1. Dekspantenol+TECA çözeltisi: 0.1mg/ml dekspantenol+2.5mg/ml TECA olacak şekilde 5 mg/ml dekspantenol çözeltisinden 1 ml ve 5 mg/ml asiatikozid çözeltisinden 5 ml alınıp DMSO ile 10 ml' ye tamamlandı.

3.2.11.2. Dekspantenol+KAR çözeltisi: 0.5 mg/ml dekspantenol+0.5 mg/ml KAR karışımı olacak şekilde 5 mg/ml dekspantenol çözeltisinden 1 ml ve 5 mg/ml KAR çözeltisinden 1 ml alınarak DMSO ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.2.11.3. TECA+KAR çözeltisi: 2.5 mg/ml TECA+0.5 mg/ml KAR olacak şekilde 5 mg/ml TECA çözeltisinden 5 ml ve 5 mg/ml KAR çözeltisinden 1 ml alınarak DMSO ile 10 ml'ye tamamlanır.

3.2.12. BOYA SOLÜSYONLARI

Aşağıda belirtilen boya solüsyonları hazırlandı (83).

3.2.12.1. Asit Fuksin Solüsyonu:

100 ml için: Asit fuksin 0.5 g, Glasiyel asetik asit 0.5 ml, Distile su 100 ml

3.2.12.2. Fosfomolibdik Asit Çözeltisi:

100 ml için: Fosfomolibdik asit 1 g, Distile su 100 ml

3.2.12.3. Metilen Mavisı Solüsyonu:

100 ml için: Metilen mavisı 2 g, Glasiyel asetik asit 2.5 ml, Distile su 100 ml

3.2.12.4. Asit-Alkol Solüsyonu:

100 ml için: %70' lik alkol 98 ml, Derişik HCl 2 ml

3.2.12.5. Asetik Asit Solüsyonu:

100 ml için: Glasiyel Asetik Asit 1 ml, Distile su 99ml

3.2.12.6. Harris'in Hematoksilin Solüsyonu:

Hematoksilin 1g , Absolü Etanol 10 ml, Potasyum Sülfat 20 g, Cıva Oksit 0.5 g, Glasiyel asetik asit 0.8 ml, Distile su 190 ml.

Tablo 2. HAZIRLANAN SOLÜSYONLARIN STERİLİZASYONLARI VE SAKLAMA KOŞULLARI

Solüsyon	Sterilizasyonu	Saklama Koşulları
Amino asitler	Filtre	+ 4 °C
Antibiyotikler	Filtre	- 20 °C
Bovine serum albumin	Filtre	+ 4 °C
Büyüme faktörleri	Filtre	- 20 °C
DMSO	Kendi steril	+20 °C (ışısız)
Droglar	Filtre (ilacın özelliğine göre)	- 20 °C
EDTA	Otoklav	+20 °C
Fenol-red	Otoklav	+20 °C
Glukoz % 20	Otoklav	+20 °C
Glukoz %1-2	Filtre (otoklavda karamelize olur)	+20 °C
Glutamin	Filtre	- 20 °C
HCl	Filtre	+20 °C
Kollajenaz	Filtre	- 20 °C
NaHCO ₃	Filtre	+20 °C
NaOH 1 N	Filtre	+20 °C
Tuz solüsyonları (glikozsuz)	Otoklav	+20 °C
Serum	Filtre	- 20 °C
Su	Otoklav	+20 °C
Tripsin	Filtre	- 20 °C

Otoklav: 100 kPa - 121 °C - 20 dak.

Filtre: 0.22 mm por çaplı

+20 °C: oda sıcaklığı

- 20 °C: Derin dondurucu

+ 4 °C: soğuk oda

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. T15 FİBROBLASTLARIN TRİPSİNLENMESİ

İnkübasyona bırakılmış hücrelerin invert mikroskopta ekildikleri alanı kapladıkları tespit edildiğinde hücreler kurallara uygun şekilde steril kabine alındı. Üzerlerindeki medyum steril pipet vasıtasıyla boşaltılıp zefiranlı su içine alındı. 37° C' ye getirilmiş 2X tripsin solüsyonu 25 cm²' ye 2ml olacak şekilde hücrelerin üzerine eklendi. Şişe veya petrinin kapağı kapatıldı ve tekrar inkübatöre koyuldu. Yaklaşık 5-10 dak. tripsinde bekletilen hücrelerin şekillerinin yuvarlaklaştığı ve tutundukları yüzeyden kalktığı gözlemlendi.

Petri veya şişe tekrar steril kabine alınarak üzerlerine tripsin solüsyonunun en az iki katı hacimde %10 FCS ilave edildi. Petri veya şişelere dağıtıldı ve üzerlerine yüzeyi kapatacak kadar medyum ilave edildi. İnkübasyon için tekrar %5 CO₂ ve 37°C de inkübatöre bırakıldı.

3.3.2. TEST İÇİN HÜCRE HAZIRLANMASI

Hücreler tripsinlendikten sonra içine steril lameller yerleştirilmiş petrilere eşit miktarlarda alındı ve üzerlerine yeterli miktar %10 FCS ilave edildi. Bir gün sonra birim alana düşen hücreler her petri için beş alan sayılarak tespit edildi. İlaç verildi. (Birim alan: 20X için A= 0.8655 mm², 40X için A=2.1638x10⁻³ mm²)

3.3.3. TAVUK EMBRİYOSUNUN ELDE EDİLMESİ

Alınan döllenmiş yumurtalar 38.5°C' de rutubetli ortamda inkübasyona bırakıldı. Bir taraflarına inkübatöre koyuldukları günün tarihi yazıldı ve her gün yumurtalar embriyonun normal gelişimini sürdürebilmesi için 180 derece çevrildi.

Yumurtalar inkübasyona bırakıldıklarının 8. günü alındı. Daha önce alındığında embriyo parçalandığı için alınmasının zor olduğu ve daha sonraki günlerde alındığında se dokuların farklılaşmaya başladığı gözlemlendi (99).

3.3.4. YUMURTANIN AÇILMASI VE EMBRİYONUN DİSEKSİYONU

Yumurtalar %70' lik alkol ile iyice silinerek steril kabine alındı. Absolü alkol içinde bekletilen steril pens alevden geçirildi ve kabuk çatlatılarak alındı ve yumurtaların dip tarafında yuvarlak bir delik açıldı. Korioallantoik (chorioallantoic) membranla birlikte kan damarları görüldü. Membran açıldığında görülen embriyo steril pens ile PBS içine alındı (99).

3.3.5. EMBRİYONUN DİSEKSİYONU VE DOKU PARÇACIKLARININ EKİLMESİ

PBS içine alınmış embriyonun gözleri ayrıldı. Geride kalan kısım pens ve bistüri yardımıyla bir kaç parçaya bölündü ve ikinci bir yıkama solüsyonu olarak başka bir kaptaki PBS içine alındı. Burada yıkanıp kan hücrelerinden arınan embriyo, içinde yaklaşık 1 ml %10 FCS olan diseksiyon küvetine alındı.

Bistüri ve pens ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılır. 6 cm çapındaki petriye yaklaşık bir embriyo ekildi. Parçalar pens ve pipet yardımıyla içinde lameller bulunan petrilere mümkün olduğunca homojen şekilde dağıtıldıktan sonra sadece kurumasına engel olacak kadar medyum ilave edildi. Petrilerin üzerlerine tarih ve hücre tipi yazılarak inkübatöre koyuldu (99).

3.3.6. HÜCRELERİN DOKULARDAN ARINDIRILMASI VE ÇOĞALMALARININ KONTROLÜ

Dokular ekildikten yaklaşık 12 saat sonra üzerlerine medyum ilave edildi. Bir veya iki gün sonra (doku parçacıklarının etrafında hücrelerin çoğaldığı gözlenince) üzerlerindeki medyum alındı ve doku parçacıkları pens yardımıyla (istenilirse) tekrar hücre üretilmesi için başka petri veya şişeye alındı. Çoğalmış olan hücreler bir kaç kez 37° C' ye getirilmiş PBS ile yıkandı, üzerlerine medyum ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. Medyumun kirlendiği gözlemlendiğinde değiştirildi. Hücrelerin yüzeyi kapladıkları görüldüğünde PBS ile yıkandı ve medyumları değiştirildi. Bir kaç saat sonra ilaç verildi.

3.3.7. T15 VE TAVUK EMBRİYONİK FİBROBLASTLARINA TEST MADDELERİNİN UYGULANMASI

Birim alana düşen hücreler beş değişik alanda sayıldıktan sonra deney setindeki petrilere hücrelere ilaçlar verildi.

1. Petri: (+) Kontrol boş

2. Petri: (-) Kontrol Medyumda 2 µl/ml olacak şekilde DMSO ilave edildi. (8 µl DMSO/ 4 ml medyum)

3. Petri: Despantenol-1 (0.5 mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 1 µg/ml dekspantenol olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 µl ilave edildi.

4. Petri: Dekspantenol-2 (5 mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 10 µg/ml despantenol olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 µl ilave edildi.

5. Petri: TECA-1 (2.5 mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 5 µg/ml TECA olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 µl ilave edildi.

6. Petri: TECA-2 (5 mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 10 µg/ml TECA olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 µl ilave edildi.

7. Petri : İzovalerilalkanin ve α-metil-n-bütılalkanin (KAR) karışımı-1 (0.5 mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 1 µg/ml izovalerilalkanin ve α-metil-n-bütılalkanin karışımı olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 µl ilave edildi.

8. Petri: İzovalerilalkanin ve α-metil-n-bütılalkanin (KAR) karışımı-2 (5 mg/ml) : Medyumda 10 µg/ml izovalerilalkanin ve α-metil-n-bütılalkanin karışımı olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 µl ilave edildi.

9. Petri: Despantenol-1+TECA-1 (0.5 mg/ml+2.5mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 1mg/ml dekspantenol ve 5 µg/ml TECA olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 µl kombinasyon çözeltisi ilave edildi.

10. Petri: Dekspantenol-1+İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin (KAR) karışımı-1 (0.5 mg/ml+0.5 mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 1 μ g/ml dekspantenol ve 1 μ g/ml izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 μ l kombinasyon çözeltisi ilave edildi.

11. Petri: TECA-1+İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin (KAR) karışımı-1 (2.5 mg/ml+0.5 mg/ml lik çözeltisinden) : Medyumda 5 μ g/ml TECA ve 1 μ g/ml izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin olacak şekilde, 4 ml medyuma 8 μ l kombinasyon çözeltisinden ilave edildi.

NOT: 9-10 ve 11. petri ler T15 fibroblastlarında yapılmadı. T15 fibroblastlarında saatler arasındaki farkı görebilmek için yapılan 6. saatteki boyama, hücreler arasında morfolojik açıdan bir fark gözlenmediği için tavuk embriyonik fibroblastlarında yapılmadı.

3.3.8. HÜCRELERİN FİKSASYONU, BOYANMASI VE SABİT PREPARAT HALİNE GETİRİLMESİ

Hücrelere ilaç verilmesinden 24 saat sonra petri ler inkübatörden alındı. Üzerlerindeki medyum boşaltıldı ve bu işlemler için steril kabin kullanılmadı.

3.3.8.1. Hücrelerin Fiksasyonu

Üzerlerindeki medyumları alınmış olan lamellerdeki hücreler %70' lik alkol içinde 15 dak. tutularak fikse edildi. Kaybettikleri suyu kazanmaları için 5-10 dak. distile suda tutuldular. Daha sonra boyama işlemine geçildi.

3.3.8.2. Hücrelerin Masson' s Trichrome Tekniği ile Boyanması

Fikse edilmiş preparatlar, hücre çekirdeklerinin boyanması için 10 dak.hematoksilinde bekletildi. Asit alkol ile uzaklaştırıldı. Lamel su ile yıkandı. Asit fuksin solüsyonu ile 10 dak. muamele edildi. Distile su ile çalkalandı. Fosfomolibdik asit ile 5 dak. muamele edildi, süzdürüldü. Metilen mavisi ile 5 dak. bekletildi. Distile su ile yıkandı. Asetik asit solüsyonu ile 2 dak. muamele edildi. %70' lik alkolle kurutuldu. Temiz lamın üzerine bir damla entellan damlatıldı. Lamellerin hücreli tarafları arada kalacak şekilde lamın üzerine kapatılarak sabit preparat haline getirildi (83). Bu boyama tekniğiyle nükleus koyu mavi, sitoplazma kırmızı, kollajen mavi-gri renklerde görülmektedir (49).

3.3.9. SABİT PREPARATLARDA HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Daha önce hazırlanan sabit preparatlar, belli bir sıra ile mikroskoba alındı. T15'ler için 20X, tavuk embriyonik fibroblastları için 40X objektifte görünür alandaki hücreler, morfolojik açıdan; fuziform, poligonal, vakuollü ve yuvarlak olarak sayıldı ve toplam hücre sayıları bulundu (Görünür alan 3.3.2. içinde mm² olarak verilmiştir.) Bu işlem en az beş değişik alanda yapıldı. T15 için 20X, tavuk embriyonik fibroblastları için 40X objektifte on değişik alanda mitozaya giden hücreler sayıldı. Her iki hücre tipi için de 40X objektifte hücrelerdeki granül sayıları 20 değişik alanda birer hücrede yapıldı. Alınan değerler; toplam hücre, mitozaya giden hücre ve granül sayıları hariç diğer parametreler % olarak hesaplandı ve sonuçlara Student Fisher *t*-testi uygulandı (140).

Tüm istatistik işlemler IBM uyumlu bir bilgisayarda gerçekleştirildi, grafikler için Harvard Graphics^R, kimyasal formüller için ChemWindow^R Ver.3.0, metnin yazımı için ise Microsoft Word^R Ver. 6.0a ve Write^R Ver. 3.1 paket programları kullanıldı.

4. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Dekspantenol, standart *Centella asiatica* ekstresi ve *Arnebia densiflora*'dan hazırlanan karışımın tavuk embriyonik fibroblastları ve T15 fibroblastlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Primer tavuk embriyonik fibroblastları ile T15 fibroblastların sonuçları karşılaştırma açısından birlikte verilmiş ve yeri geldikçe aradaki farklı noktalar vurgulanmıştır.

Dekspantenolün, toplam hücre (Şekil:16a ve 38a ile Tablo:3 ve 17) ve mitoza giden hücre (Şekil:21a ve 43a ile Tablo:8 ve 22) sayılarındaki artışın, DMSO'daki değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı olması; mitotik aktivitesi olduğunu ve yara iyileştirici etkisinin bu yolla ortaya çıktığı gösterilmiştir. Ayrıca 10 µg/ml dozda toplam hücre ve mitoza giden hücre sayılarında görülen artışın, 1 µg/ml doz ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da anlamlı düzeyde yüksek çıkması mitotik aktivitesinin doza bağımlı olduğu sonucunu vermektedir. Şekil:7 ve 8'de de mitoza giden hücrelerin artan dozla arttığı görülmektedir.

Poligonal hücre yüzdelerinde DMSO uygulanan gruba göre(Şekil:18a ve 40a ile Tablo:5 ve 19) artış ve fuziform hücre yüzdelerinde (Şekil:17a ve 39a ile Tablo:4 ve18) azalma migrasyonda da etkili olabileceğini göstermektedir. Yuvarlak (Şekil:19a ve 41a ile Tablo:6 ve 20) ve vakuollü (Şekil:20a ve 42a ile Tablo:7 ve 21) hücre yüzdelerinde DMSO verilen grup ile karşılaştırıldığında görülen azalma da mitotik aktivite sebebiyle hücre popülasyonunun gençleşmesi ile açıklanabilir. Bu sonuç da mitotik aktivitesi olduğunu desteklemektedir.

Granül sayıları (Şekil:22a ve 44a ile Tablo:9 ve 23) DMSO verilen grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır. Ancak granül sayılarındaki artışın dozlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı çıkmaması kollajen sentezi üzerine direkt bir etkisi olmadığını göstermektedir.

TECA; toplam hücre sayıları(Şekil:16b ve 38b ile Tablo:3 ve 17) ile poligonal (Şekil:18b ve 40b ile Tablo:5 ve 19), mitoza giden (Şekil:21b ve 43b ile Tablo:8 ve22) hücre yüzdelerinde DMSO uygulanan hücrelere göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde artış saptanmıştır. Poligonal hücre yüzdelerindeki artış, DP'nin olduğu gibi TECA'nın da migrasyonda etkili olabileceğini gösterir. Granül sayıları (Şekil:22b ve 44b ile Tablo:9 ve 23) yine DMSO uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde

artış olduğu görülmektedir. 10 µg/ml dozda TECA uygulanan hücreler ile 5 µg/ml uygulanan hücreler arasındaki artışın istatistiksel açıdan anlamlı çıkması etkisinin direkt kollajen sentezi üzerinden olduğunu göstermektedir (Şekil:9 ve 10). Ayrıca mitozaya giden hücre sayılarının dozlar arası karşılaştırılması, T15 fibroblastlarında anlamsız ve primer tavuk embriyonik az anlamlı çıkması direkt mitotik aktivitesi olmadığı ve esas etkisinin kollajen sentezinin stimülasyonu olduğunu göstermektedir. Fuziform (Şekil:17b ve 24b ile Tablo:4 ve 18), yuvarlak (Şekil:19b ve 41b ile Tablo:7 ve 21) ve vakuollü (Şekil:20b ve 42b) hücre yüzdelerinde de önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir.

KAR'ın 1 µg/ml dozda uygulanması ile; toplam hücre sayıları (Şekil:16c ve 38c ile Tablo:3 ve 17), poligonal hücre (Şekil:18c ve 40c ile Tablo:5 ve 19), mitozaya giden hücre (Şekil:21c ve 43c ile Tablo:8 ve 22) yüzdeleri ile granül sayılarında (Şekil:22c ve 44c ile Tablo:9 ve 23); DMSO uygulanan hücrelere göre anlamlı derecede artış meydana gelmiştir. Granül sayılarında görülen önemli derecede artış; bu dozda KAR'ın yara iyileştirici etkisi olduğu ve bu etkisini TECA'ya benzer şekilde kollajen sentezini stimüle ederek yaptığını göstermektedir (Şekil:11). Ayrıca, fuziform (Şekil:17c ve 39c ile Tablo:4 ve 18), Yuvarlak (Şekil:19c ve 41c ile Tablo:6 ve 20) ve vakuollü (Şekil:20c ve 42c ile Tablo:7 ve 21) hücre yüzdeleri önemli ölçüde azalmıştır.

10 µg/ml dozda KAR uygulandığında; ilk dozda görülmeyen toksik etkiler ortaya çıkmıştır: toplam hücre sayıları (Şekil:16c ve 38c ile Tablo:3 ve 17), poligonal hücre (Şekil:18c ve 40c ile Tablo:5 ve 19) yüzdeleri istatistiksel açıdan azalmıştır. Fuziform (Şekil:17c ve 39c ile Tablo:4 ve 18), mitozaya giden (Şekil:21c ve 43c ile Tablo:8 ve 22), yuvarlak (Şekil:19c ve 41c ile Tablo:6 ve 20) ve vakuollü hücre (Şekil:20c ve 42c ile Tablo:7 ve 21) yüzdeleri ile granül (Şekil:22c ve 44c ile Tablo:9 ve 23) sayılarındaki azalmalar DMSO uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bu dozda görülen etki sitotoksik etki olduğu söylenebilir (Şekil:12)

Tavuk embriyonik fibroblastlarında uygulanan kombinasyonlarda; 1 µg/ml DP ile 5 µg/ml TECA'nın kombinasyonunda; toplam hücre sayıları (Şekil:23a ile Tablo:10) ve mitozaya giden hücre yüzdelerinde (Şekil:28a ile Tablo:15) DP'ye göre anlamsız, TECA'ya göre istatistiksel açıdan anlamlı olan bir artış meydana gelmiştir. Granül sayıları (Şekil:29a ve Tablo:16) bazında ise TECA'ya göre anlamsız, DP'e göre anlamlı derecede artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar; DP ve TECA'nın her ikisinin de farklı mekanizmalar kullandıklarını göstermektedir. Yuvarlak (Şekil:26a ile Tablo:13) ve vakuollü hücre (Şekil:27a ile Tablo:14) yüzdelerinde; DP'e göre anlamsız, TECA'ya göre

ise istatistiksel açıdan anlamlı farklar görülmüştür. Fuziform hücre yüzdelerinde (Şekil:24a ile Tablo:11) azalma ve poligonal hücre yüzdelerinde (25a ile Tablo:12) artış her iki maddeye göre de anlamlı düzeydedir. Hücrelerde; mitoz ve kollajen sentezi mekanizmaları birlikte çalışacağından bu iki maddenin kombine halde kullanılmasının daha iyi sonuç verdiği görülmektedir (Şekil:13). Ayrıca poligonal hücrelerde her iki maddenin tek başlarına verilmesine göre görülen anlamlı artış hücrelerin migrasyon yeteneklerinin de artması olarak yorumlanabilir.

1 µg/ml DP ile 1 µg/ml KAR'ın kombinasyonu toplam hücre (Şekil:23b ile Tablo:10) ve mitoz giden hücre sayıları (Şekil:28b ile Tablo:15) baz olarak ele alındığında DP'ye göre anlamsız, KAR'a göre istatistiksel açıdan anlamlı artış meydana gelmiştir. Granül (Şekil:29b ile Tablo:16) sayılarında ise KAR'ın tek başına verildiği hücrelere göre anlamsız, DP'nin tek başına uygulandığı hücrelere göre anlamlı derecede artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar ikisinin de farklı mekanizmalar kullandığını göstermektedir. Poligonal hücre (Şekil:25b ve Tablo:12) yüzdelerindeki artış ile yuvarlak (Şekil:26b ile Tablo:13) ve vakuollü hücre (Şekil:27b ile Tablo:14) yüzdelerindeki azalma DP ve KAR'ın her ikisine göre de istatistiksel açıdan anlamlı çıkmaktadır. Bu kombinasyon hücrelere; DP'nin tek başına uygulanmasında olmayan kollajen sentezi ve KAR'ın tek başına uygulanmasında olmayan mitotik aktivitenin her ikisini birden kazandıracığı için bereber kullanılmasının daha iyi sonuç vereceği düşünülmektedir (Şekil:14).

5 µg/ml TECA ile 1 µg/ml KAR'ın kombinasyonunda; toplam hücre sayıları (Şekil:23c ile Tablo:10) ve granül sayılarındaki (Şekil:29c ile Tablo:16) değişiklik her ikisinin tek başlarına uygulandığı hücrelere göre istatistiksel açıdan anlamsızdır. Fuziform (Şekil:24c ile Tablo:11) ve mitoz giden hücre (Şekil:28c ile Tablo:15) yüzdelerinde TECA'nın tek başına uygulanmasına göre anlamsız, KAR'ın tek başına uygulandığı hücrelere göre istatistiksel olarak az anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Poligonal hücre (Şekil:25c ile Tablo:12) yüzdelerinde her iki maddenin de tek başlarına uygulandığı hücrelere göre artış ve yuvarlak (Şekil:26c ile Tablo:13) ve vakuollü hücre (Şekil:27c ile Tablo:14) yüzdelerinde azalma meydana gelmiştir. Muhtemelen TECA ve KAR aynı mekanizma ile kollajen sentezinde stimülasyona sebep olmaktadır (Şekil:15). Aynı mekanizmayı kullanmaları sebebi ile kombinasyonları; tek başlarına uygulanmalarında alınan sonuçlar ile fazla farklı çıkmamıştır.

Sonuç olarak; *Arnebia densiflora*'dan elde edilen izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütilalkanin karışımının düşük dozda yara iyileştirici, yüksek dozda sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Dekspantenol'ün sadece mitotik aktivitesi sebebiyle, *Centella asiatica* ekstresinin ise kollajen sentezi üzerine olan stimulan etkisi sebebiyle yaraların iyileşmesinde etkili oldukları ve KAR'ın etkisinin kollajen sentezi stimülasyonu ile TECA'ya benzediği gözlenmiştir.

A. Primer Tavuk Embriyonik Fibroblastları ile Elde Edilen Sonuçlara Ait Tablo, Fotoğraf ve Grafikler



Tablo 3-16



Şekil 5-15 (Fotoğraflar)



Şekil 16-29 (Grafikler)

Grafiklerdeki vertikal çizgiler ortalama değerlerin \pm standart hatalarını göstermektedir.

Tablo 3. Toplam hücre sayıları esas alınarak tavuk embriyonik fibroblastları üzerine dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) etkileri

Grup	Hücre sayısı \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	64.4 \pm 2.38	5
DMSO 2 μ l/ml	54.6 \pm 2.58 ^a	5
DP 1 μ g/ml	82.20 \pm 1.74 ^b	5
DP 10 μ g/ml	85.60 \pm 4.25 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	67.00 \pm 2.19 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	67.40 \pm 1.86 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	66.20 \pm 2.58 ^c	5
KAR 10 μ g/ml	38.00 \pm 1.82 ^b	5

^ap< 0.05 ; Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp<0.005 ve ^cp< 0.01 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 4. Fuziform hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA) İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	48.92 \pm 2.09	5
DMSO 2 μ l/ml	34.46 \pm 1.86 ^a	5
DP 1 μ g/ml	30.86 \pm 1.29 ^b	5
DP 10 μ g/ml	23.88 \pm 1.50 ^c	5
TECA 5 μ g/ml	14.84 \pm 1.08 ^c	5
TECA 10 μ g/ml	12.69 \pm 0.66 ^c	5
KAR 1 μ g/ml	19.66 \pm 2.07 ^c	5
KAR 10 μ g/ml	34.17 \pm 2.75 ^d	5

^ap< 0.05 Kontrole göre anlamlı farklılık. ^bp< 0.1, ^cp<0.005 ve ^dp> 0.1 DMSO' ya göre farklılıklar.

Tablo 5. Poligonal hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	29.15 \pm 1.34	5
DMSO 2 μ l/ml	23.18 \pm 0.89 ^a	5
DP 1 μ g/ml	63.28 \pm 0.65 ^b	5
DP 10 μ g/ml	69.36 \pm 1.93 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	74.47 \pm 1.74 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	80.49 \pm 1.04 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	68.61 \pm 2.45 ^b	5
KAR 10 μ g/ml	18.89 \pm 2.01 ^c	5

^ap > 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 ve ^cp < 0.05 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 6. Yuvarlak hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	10.73 \pm 1.00	5
DMSO 2 μ l/ml	19.33 \pm 1.43 ^a	5
DP 1 μ g/ml	2.68 \pm 0.47 ^b	5
DP 10 μ g/ml	4.34 \pm 0.30 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	6.23 \pm 0.39 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	4.16 \pm 0.29 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	6.64 \pm 0.67 ^b	5
KAR 10 μ g/ml	22.50 \pm 2.62 ^c	5

^ap < 0.005 Kontrolle göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 ve ^cp < 0.1 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar

Tablo 7. Vakuollü hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	11.21 \pm 0.89	5
DMSO 2 μ l/ml	23.04 \pm 1.14 ^a	5
DP 1 μ g/ml	3.18 \pm 0.52 ^b	5
DP 10 μ g/ml	2.33 \pm 0.33 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	4.46 \pm 0.41 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	2.65 \pm 0.51 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	5.09 \pm 0.38 ^b	5
KAR 10 μ g/ml	24.45 \pm 3.41 ^c	5

^ap < 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 ve ^cp > 0.1 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar,

Tablo 8. Mitoza giden hücreler esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), Dekspantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovaleerianin ve α -metil-n-bütülanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre sayısı \pm st hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	1.50 \pm 0.27	10
DMSO 2 μ l/ml	0.50 \pm 0.22 ^a	10
DP 1 μ g/ml	3.80 \pm 0.77 ^b	10
DP 10 μ g/ml	8.00 \pm 1.27 ^b	10
TECA 5 μ g/ml	2.00 \pm 0.58 ^c	10
TECA 10 μ g/ml	2.30 \pm 0.65 ^d	10
KAR 1 μ g/ml	1.60 \pm 0.22 ^c	10
KAR 10 μ g/ml	0.70 \pm 0.26 ^e	10

^ap< 0.01 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp< 0.005, ^cp< 0.05, ^dp< 0.01 ve ^ep> 0.10 DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 9. Hücrelerdeki granül sayısı esas alınarak tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), Dekspantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Granül sayısı \pm st. hata	Sayılan hücre sayısı
Kontrol	1.95 \pm 0.22	20
DMSO 2 μ l/ml	1.20 \pm 0.24 ^a	20
DP 1 μ g/ml	1.85 \pm 0.15 ^b	20
DP 10 μ g/ml	2.00 \pm 0.18 ^c	20
TECA 5 μ g/ml	3.85 \pm 0.25 ^d	20
TECA 10 μ g/ml	4.45 \pm 0.29 ^d	20
KAR 1 μ g/ml	4.30 \pm 0.33 ^d	20
KAR 10 μ g/ml	1.10 \pm 0.19 ^e	20

^ap< 0.05 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp< 0.05, ^cp<0.01, ^dp< 0.005 ve ^ep> 0.10 DMSO'ya göre farklılıklar.

Tablo 10 . Toplam hücre sayıları esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütüilalkanin karışımı (KAR) ve kombinasyonlarının etkileri

Gruplar	Hücre sayıları \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	64.40 \pm 2.38	5
DMSO 2 μ l/ml	54.60 \pm 2.58 ^a	5
DP 1 μ g/ml	82.20 \pm 1.74 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	67.00 \pm 2.19 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	66.20 \pm 2.58 ^c	5
DP 1 μ g/ml + TECA 5 μ g/ml	83.8 \pm 2.65 ^b	5
DP 1 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	83.00 \pm 2.86 ^b	5
TECA 5 μ g/ml+KAR 1 μ g/ml	68.60 \pm 1.78 ^b	5

^ap< 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp< 0.005 ve ^cp<0.01 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 11. Fuziform hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı (KAR) ve kombinasyonlarının etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	48.92 \pm 2.09	5
DMSO 2 μ l/ml	34.46 \pm 1.86 ^a	5
DP 1 μ g/ml	30.86 \pm 1.29 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	14.84 \pm 1.08 ^c	5
KAR 1 μ g/ml	19.66 \pm 2.07 ^c	5
DP 1 μ g/ml + TECA 5 μ g/ml	9.45 \pm 1.09 ^c	5
DP 1 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	10.06 \pm 0.73 ^c	5
TECA 5 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	12.29 \pm 1.84 ^c	5

^ap < 0.05 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.1 ve ^cp < 0.005 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 12. Poligonal hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı (KAR) ve kombinasyonlarının etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	29.15 \pm 1.34	5
DMSO 2 μ l/ml	23.17 \pm 0.89 ^a	5
DP 1 μ g/ml	63.28 \pm 0.65 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	74.47 \pm 1.74 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	68.61 \pm 2.45 ^b	5
DP 1 μ g/ml + TECA 5 μ g/ml	84.88 \pm 1.71 ^b	5
DP 1 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	86.73 \pm 1.02 ^b	5
TECA 5 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	82.75 \pm 1.46 ^b	5

^ap < 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 DMSO' ya göre anlamlı farklılık.

Tablo 13. Yuvarlak hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı (KAR) ve kombinasyonlarının etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	10.73 \pm 1.00	5
DMSO 2 μ l/ml	19.33 \pm 1.43 ^a	5
DP 1 μ g/ml	2.68 \pm 0.47 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	6.23 \pm 0.39 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	6.64 \pm 0.67 ^b	5
DP 1 μ g/ml + TECA 5 μ g/ml	2.36 \pm 0.33 ^b	5
DP 1 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	2.42 \pm 0.41 ^b	5
TECA 5 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	3.24 \pm 0.38 ^b	5

^ap< 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp< 0.005 DMSO' ya göre anlamlı farklılık.

Tablo 14. Vakuollü hücre yüzdeleri esas alınarak, tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı (KAR) kombinasyonlarının etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	11.21 \pm 0.89	5
DMSO 2 μ l/ml	23.04 \pm 1.14 ^a	5
DP 1 μ g/ml	3.18 \pm 0.52 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	4.46 \pm 0.41 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	5.09 \pm 0.38 ^b	5
DP 1 μ g/ml + TECA 5 μ g/ml	3.30 \pm 0.34 ^b	5
DP 1 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	1.68 \pm 0.27 ^b	5
TECA 5 μ g/ml + KAR 1 μ g/ml	1.72 \pm 0.84 ^b	5

^ap < 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 DMSO' ya göre farklılık.

Tablo 15. Mitoza giden hücreler esas alınarak tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), Dekspantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA) izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı (KAR) ve kombinasyonlarının etkileri.

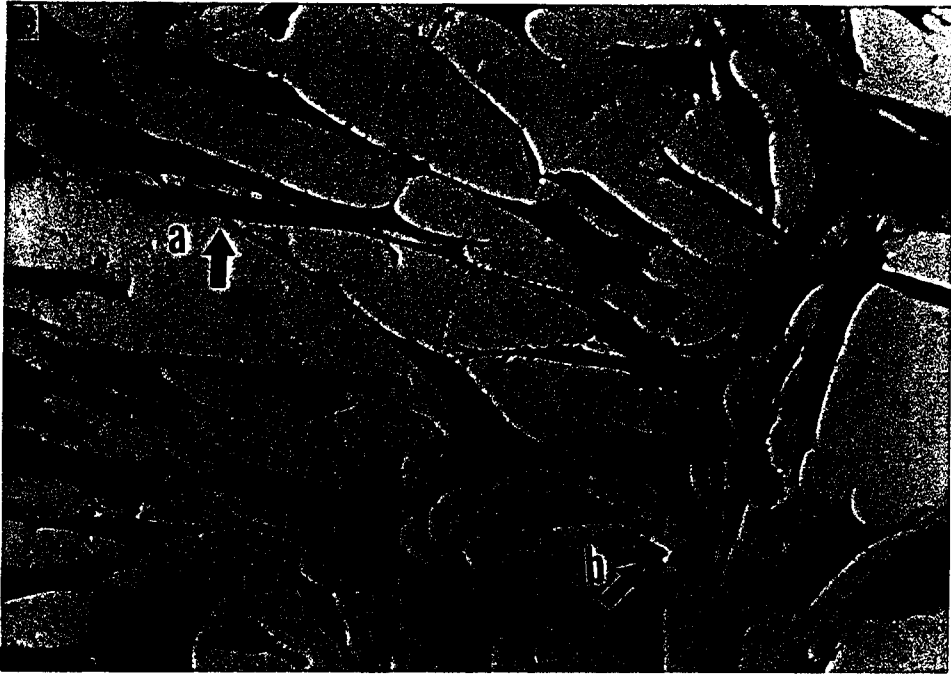
Gruplar	Hücre sayısı \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	1.50 \pm 0.27	10
DMSO 2 μ l/ml	0.50 \pm 0.22 ^a	10
DP 1 μ g/ml	3.80 \pm 0.77 ^b	10
TECA 5 μ g/ml	2.00 \pm 0.58 ^c	10
KAR 1 μ g/ml	1.60 \pm 0.22 ^c	10
DP 1 μ g/ml+TECA 5 μ g/ml	5.50 \pm 0.40 ^b	10
DP 1 μ g/ml+KAR 1 μ g/ml	4.70 \pm 0.42 ^b	10
TECA 5 μ g/ml+KAR 1 μ g/ml	2.30 \pm 0.33 ^b	10

^ap< 0.01 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp< 0.005 ve ^cp< 0.05 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

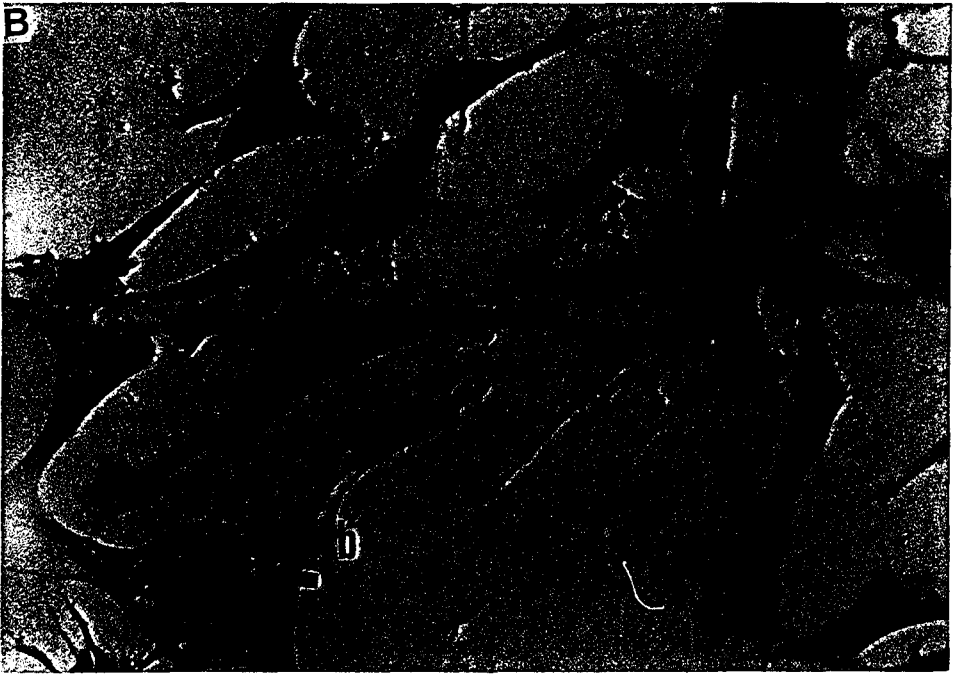
Tablo 16. Hücrelerdeki granül sayısı esas alınarak tavuk embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), Dekspantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı (KAR) ve kombinasyonlarının etkileri.

Gruplar	Granül sayısı \pm st. hata	Sayılan hücre sayısı
Kontrol	1.95 \pm 0.22	20
DMSO 2 μ g/ml	1.20 \pm 0.24 ^a	20
DP 1 μ g/ml	1.85 \pm 0.15 ^b	20
TECA 5 μ g/ml	3.85 \pm 0.25 ^c	20
KAR 1 μ g/ml	4.30 \pm 0.33 ^c	20
DP 1 μ g/ml +TECA 5 μ g/ml	3.60 \pm 0.30 ^c	20
DP 1 μ g/ml +KAR 1 μ g/ml	3.80 \pm 0.32 ^c	20
TECA 5 μ g/ml +KAR 1 μ g/ml	4.45 \pm 0.44 ^c	20

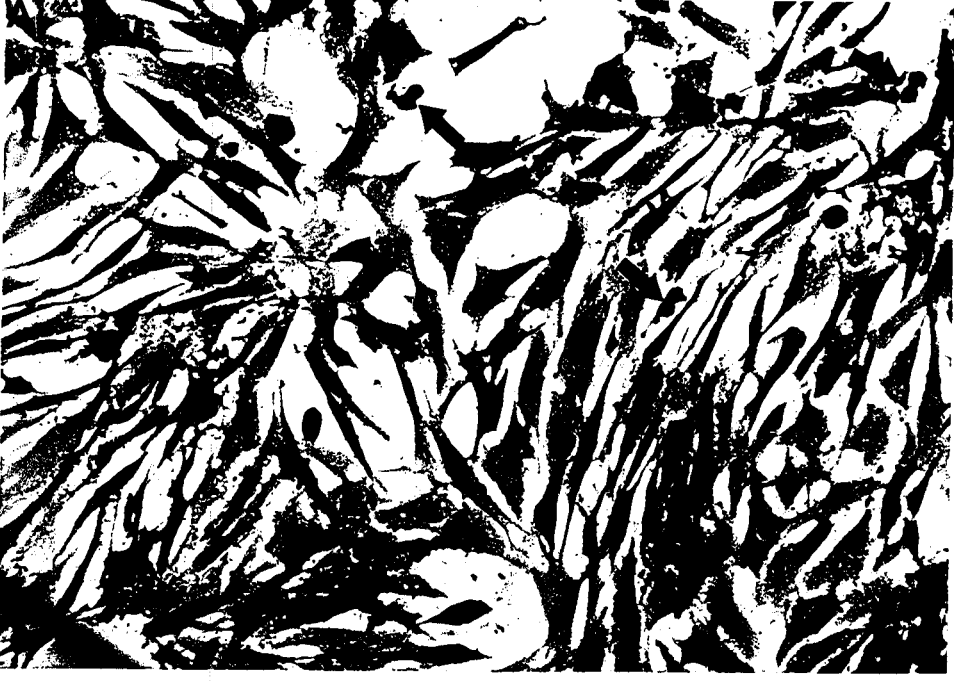
^ap < 0.05 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.05 ve ^cp < 0.005 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.



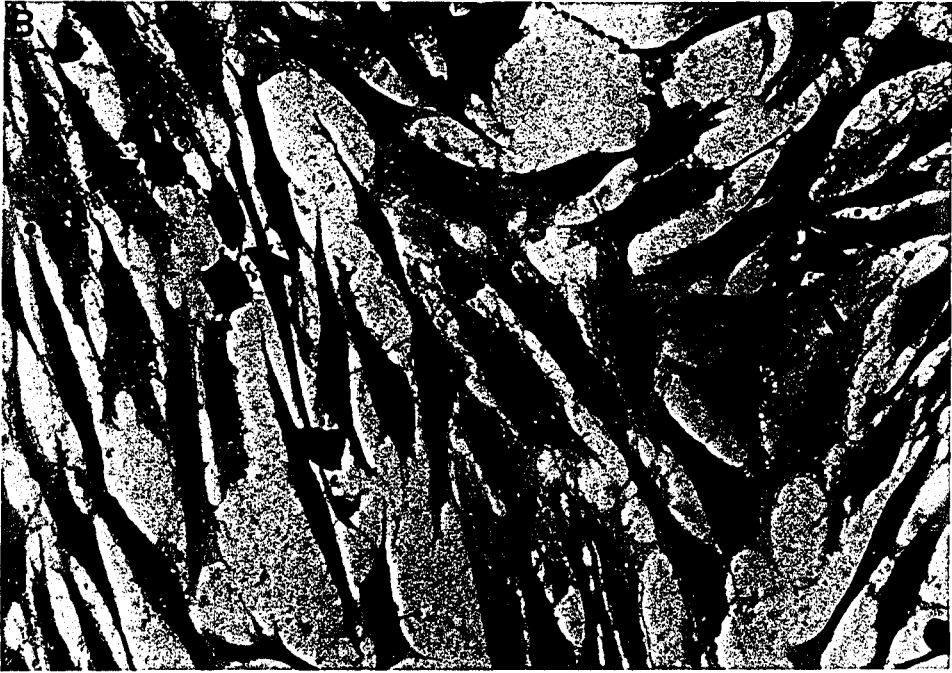
Şekil 5. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; kontrol grubu hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. a- Fuziform hücre, b-Yuvarlak hücre oklarla gösterilmiştir.



Şekil 6. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; DMSO uygulanan hücrelerin Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. a- Yuvarlak hücre, b- Vakuol oklarla gösterilmiştir..



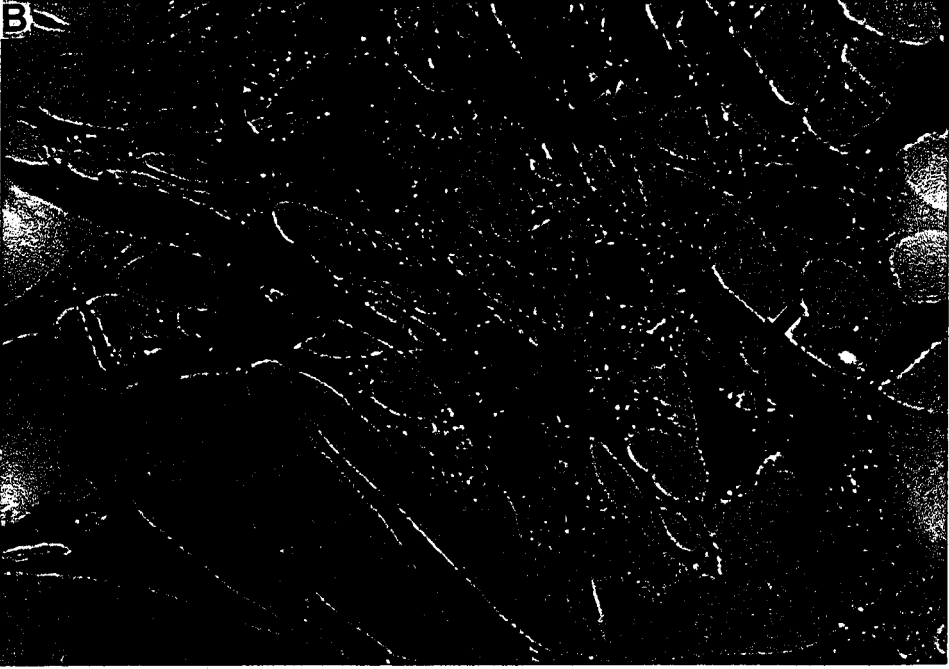
Şekil 7. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 1 µg/ml dozda Dekspantenol uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Mitoza giden hücreler oklarla gösterilmiştir.



Şekil 8. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 10 µg/ml dozda Dekspantenol uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Mitoza giden hücreler oklarla gösterilmiştir.



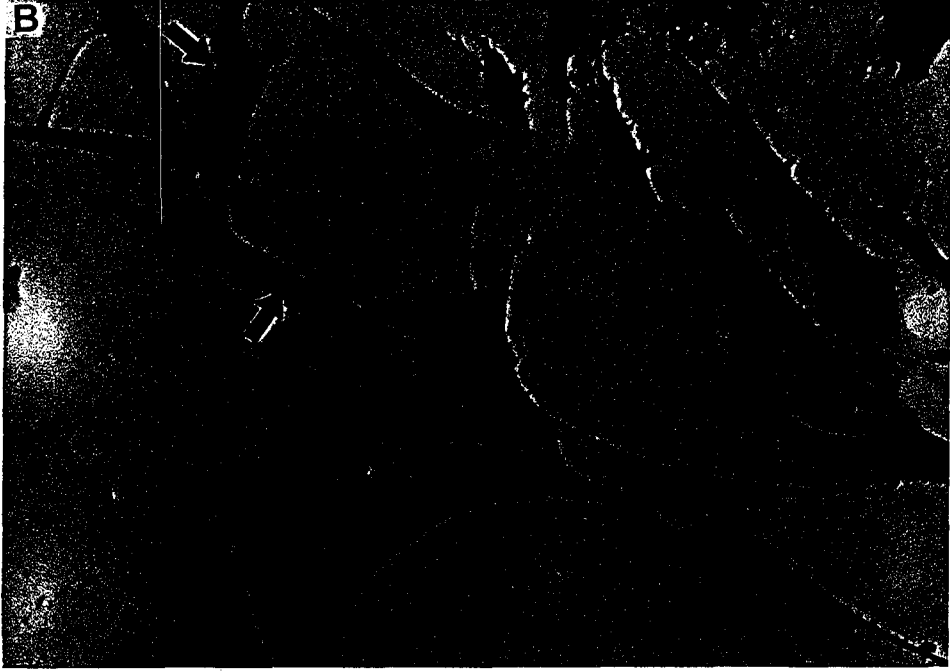
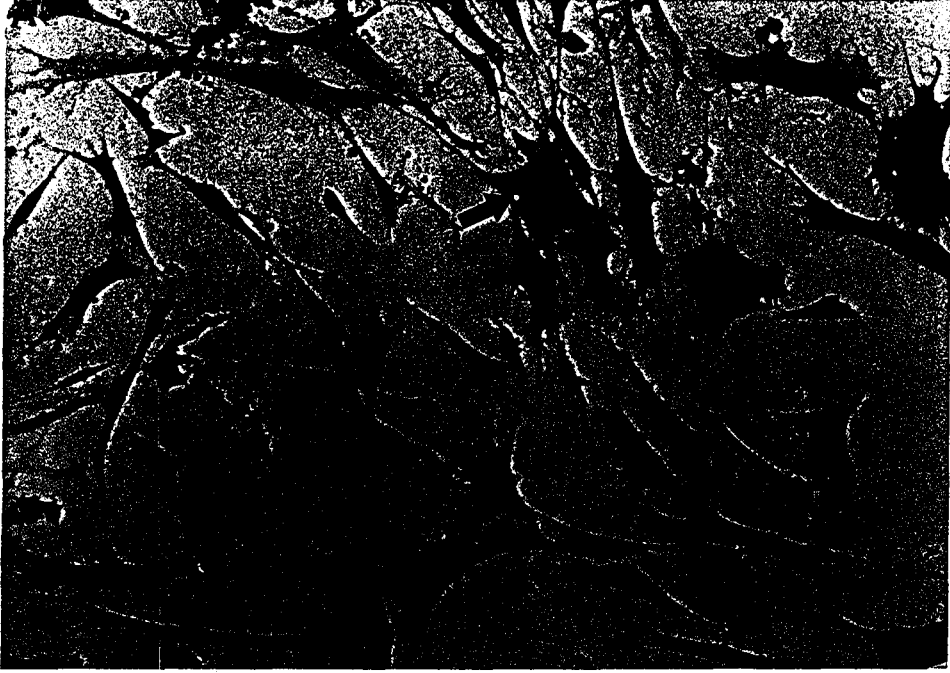
Şekil 9. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 5 µg/ml dozda *Centella asiatica* ekstresi uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. a- Mitoza giden hücre, b- Granüller oklarla gösterilmiştir



Şekil 10. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 10 µg/ml dozda *Centella asiatica* ekstresi uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. granüller oklarla gösterilmiştir.



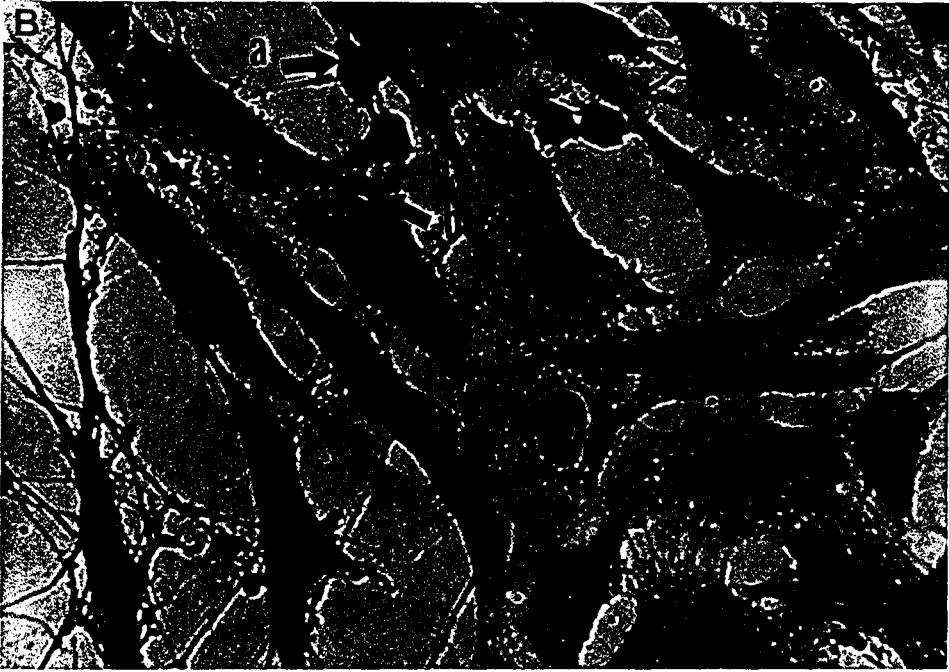
Şekil 11. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 1 µg/ml dozda İzovalerilalkanin ve α-metil-n-bütillalkanin karışımı uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson' trichrome tekniği ile boyanması sonucu A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. a-Poligonal hücre, b- Granül oklarla gösterilmiştir.



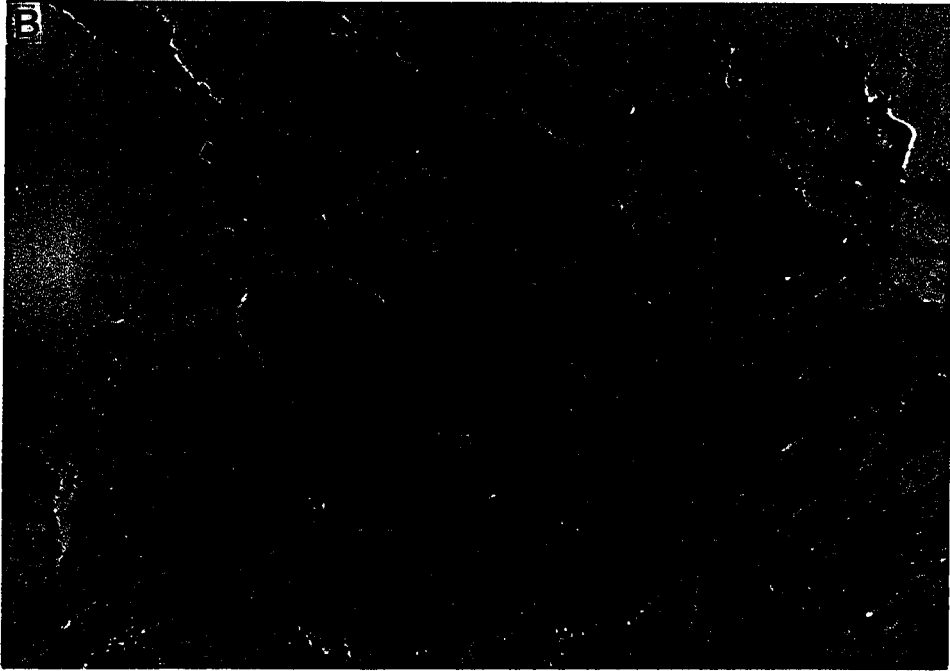
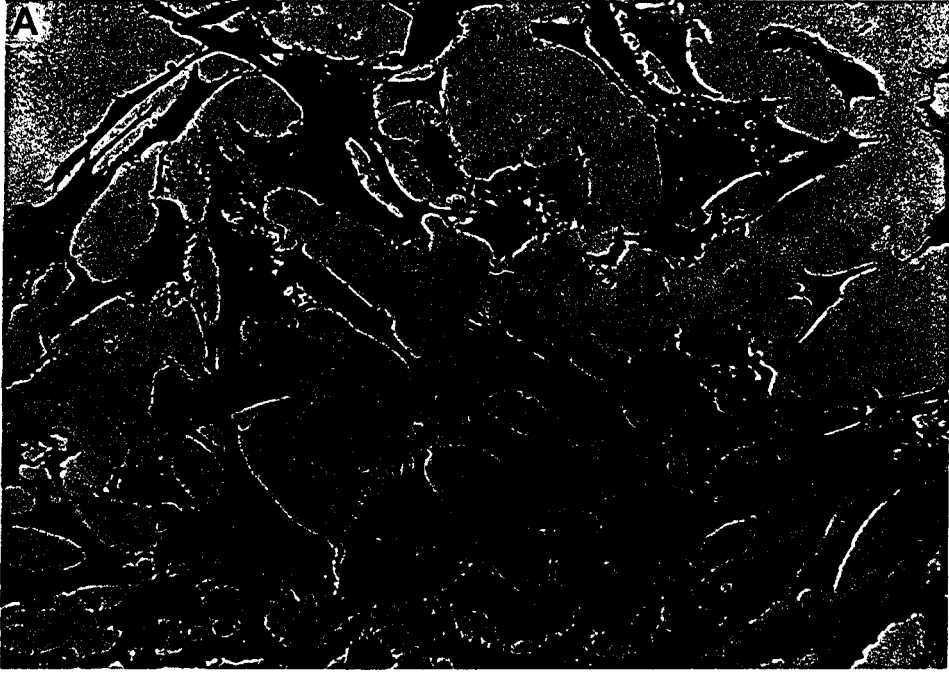
Şekil 12. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 10 mg/ml dozda İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson' trichrome tekniği ile boyanması sonucu; A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Vakuoller oklarla gösterilmiştir.



Şekil 13. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 1 µg/ml dekspantenol ve 5 µg/ml *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. a-Yuvarlak hücre, b-Mitoza giden hücre, c- Granül oklarla gösterilmiştir..

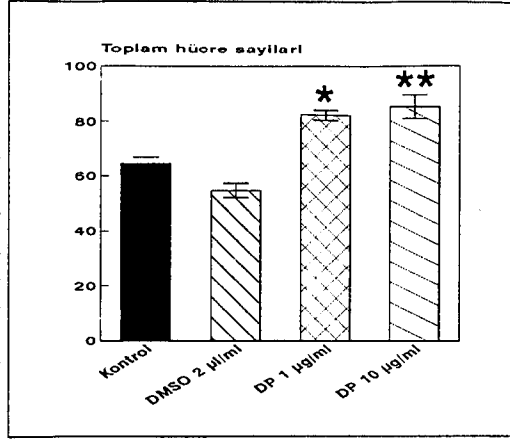


Şekil 14. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 1 µg/ml Dekspantenol ve 1 µg/ml İzovalerilalkanin ve α-metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyonu uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanması sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. a- Mitoza giden hücre, b- Granül oklarla gösterilmiştir..

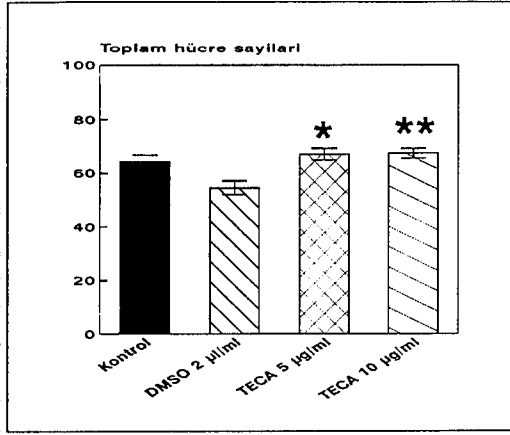


Şekil 15. Primer tavuk embriyonik fibroblast kültürlerinde; 5 mg/ml *Centella asiatica* ekstresi ve 1 mg/ml İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin kombinasyonu uygulanan hücrelerin 24.saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu, A- 800 kez büyütme, B- 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Granüller oklarla gösterilmiştir.

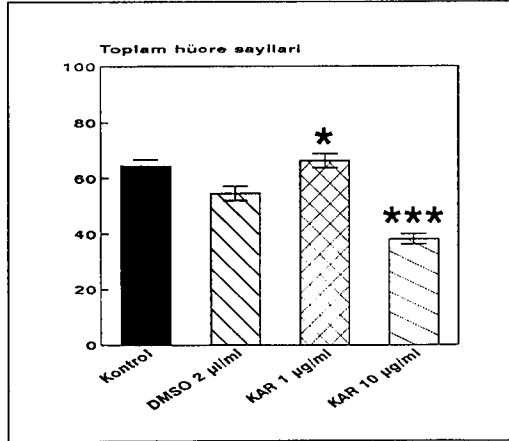
(a)



(b)

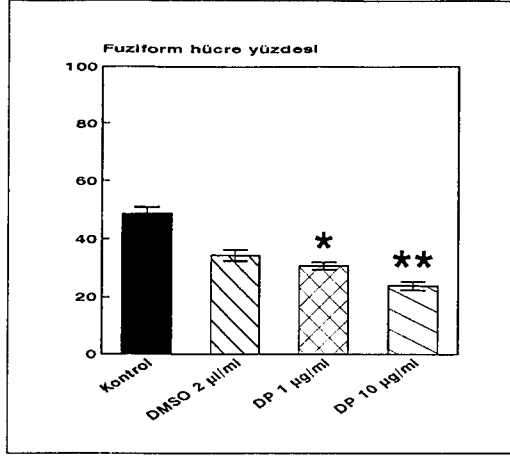


(c)

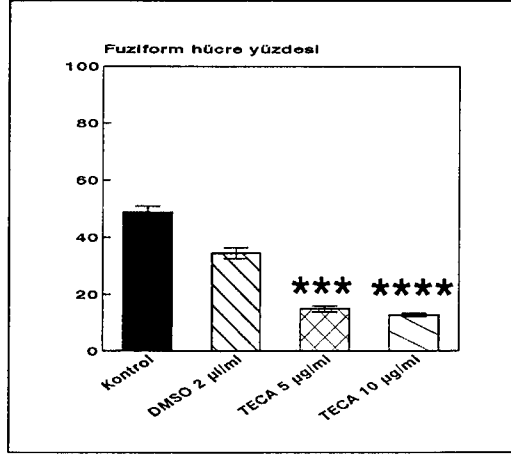


Şekil 16. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında toplam hücre sayılarını gösteren grafikler: a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α-metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$ ve *** $p < 0.005$ ilk doza göre farklılık.

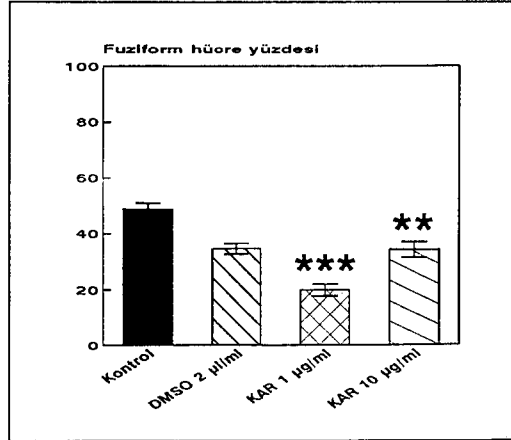
(a)



(b)

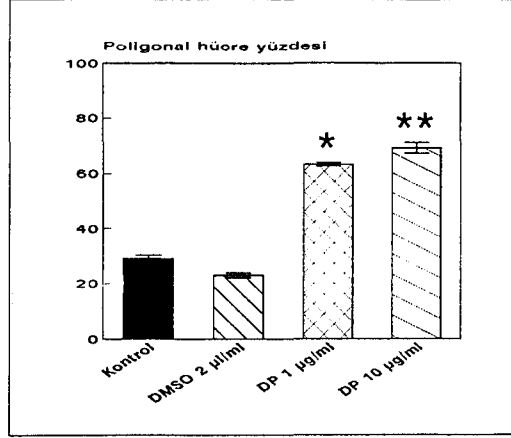


(c)

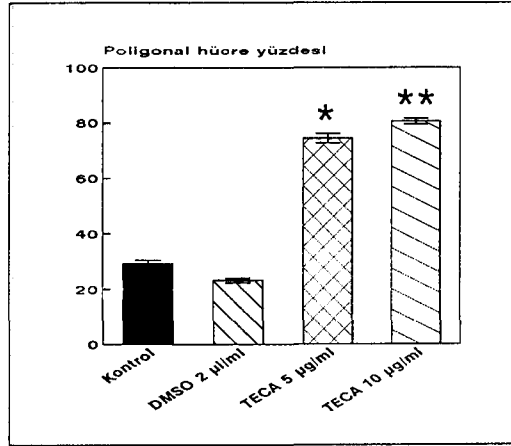


Şekil 17. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında fuziform hücre yüzdelerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.10$ ve *** $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.005$ ve **** $p < 0.10$ ilk doza göre farklılıklar.

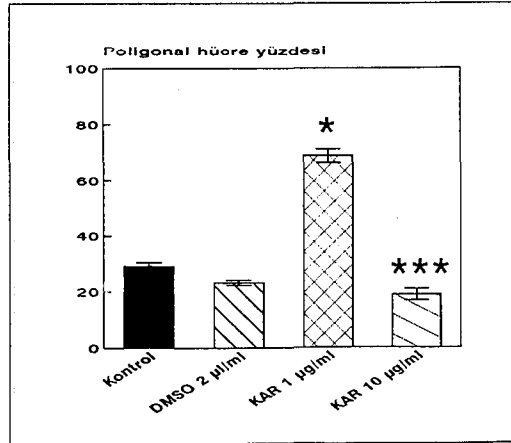
(a)



(b)

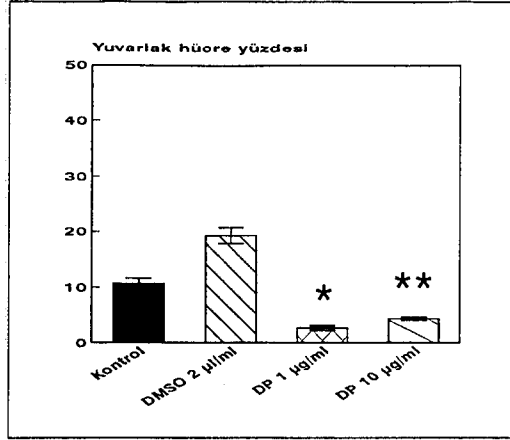


(c)

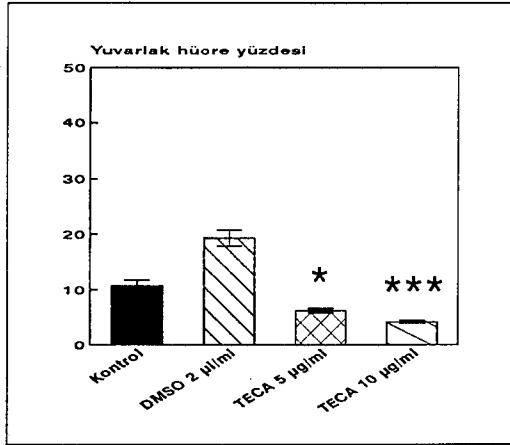


Şekil 18. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında poligonal hücre yüzdeslerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.005$ ilk dozlara göre farklılıklar.

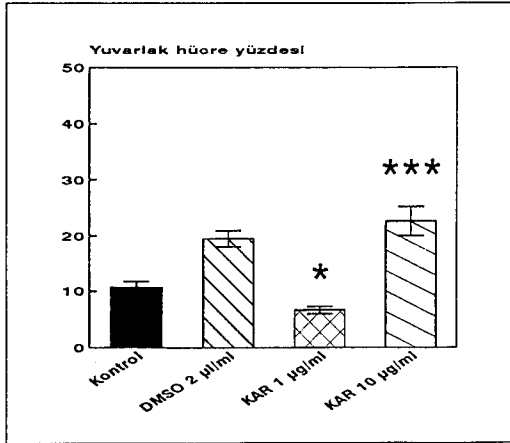
(a)



(b)

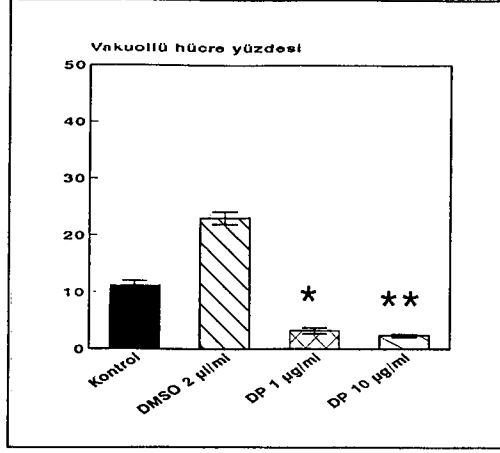


(c)

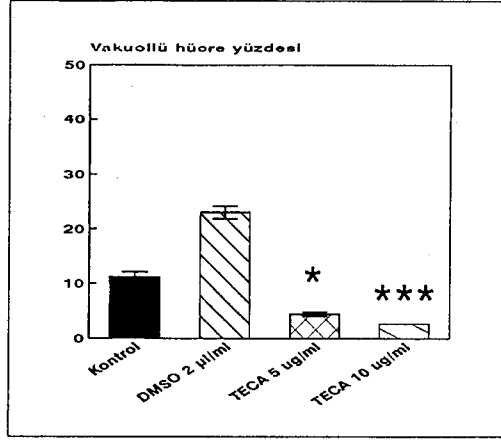


Şekil 19. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında yuvarlak hücre yüzdelerini gösteren grafikler, a- Dekspantenol (DP). b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$, *** $p < 0.05$ ve * $p < 0.005$ ilk doza göre farklılıklar.

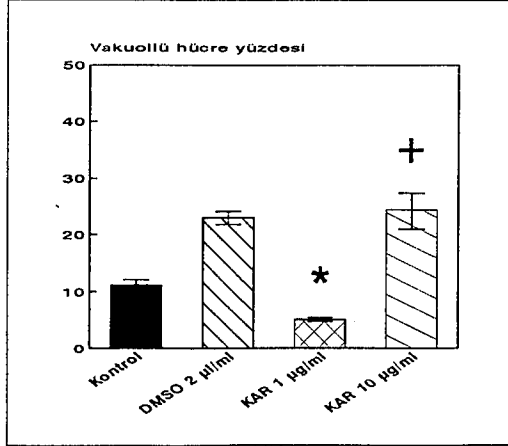
(a)



(b)

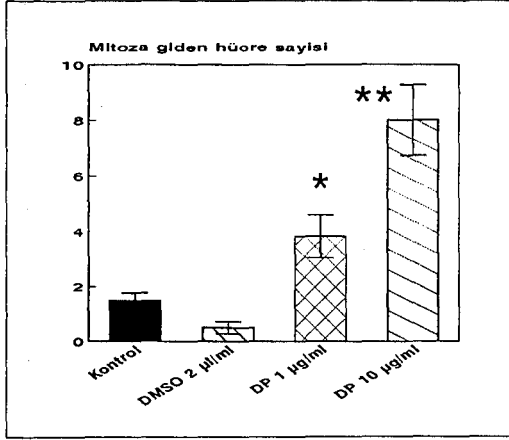


(c)

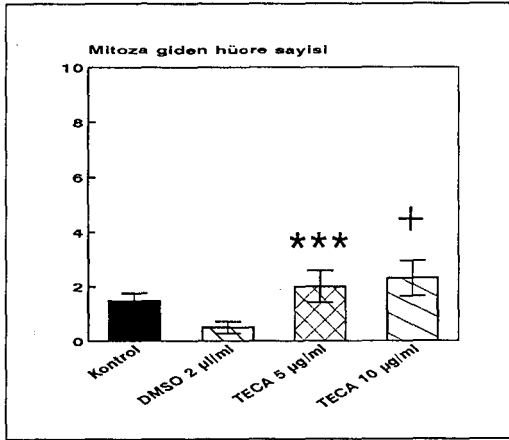


Şekil 20. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında vakuollü hücre yüzdelerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.005$ ilk dozlara göre farklılıklar.

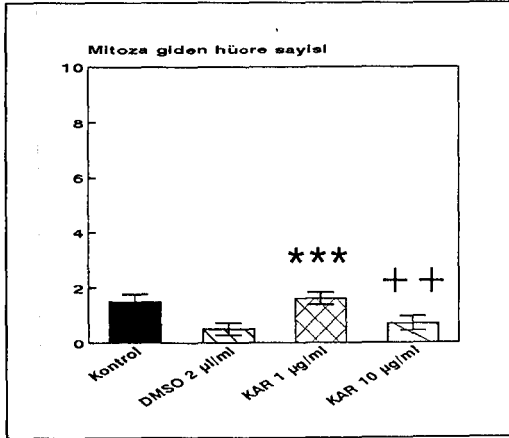
(a)



(b)

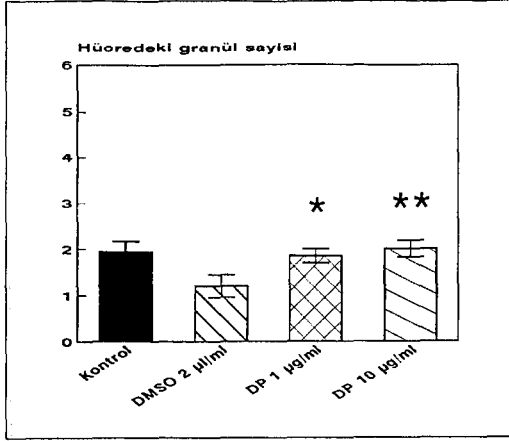


(c)

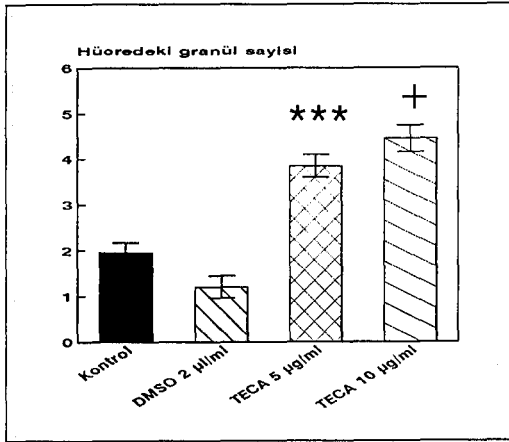


Şekil 21. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında mitoza giden hücre sayılarını gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ ve *** $p < 0.05$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.01$, + $p > 0.10$ ve ** $p < 0.05$ ilk dozlara göre farklılıklar.

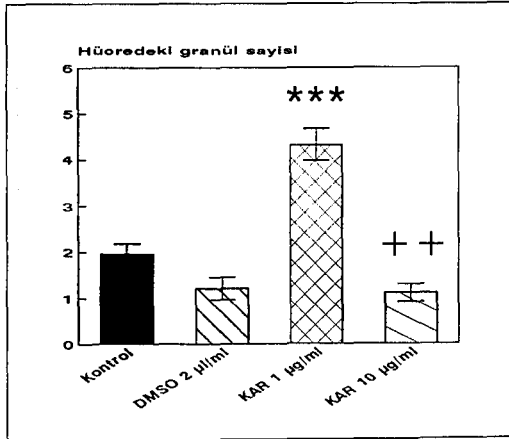
(a)



(b)

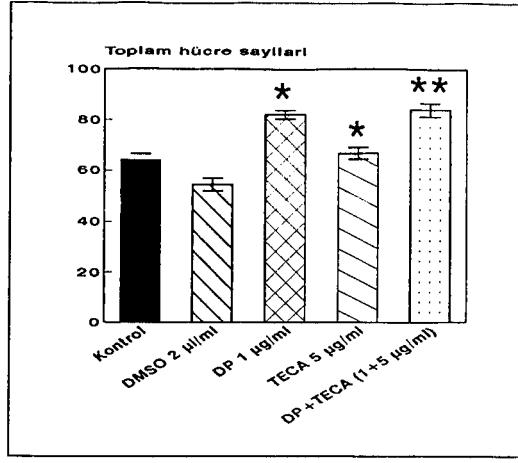


(c)

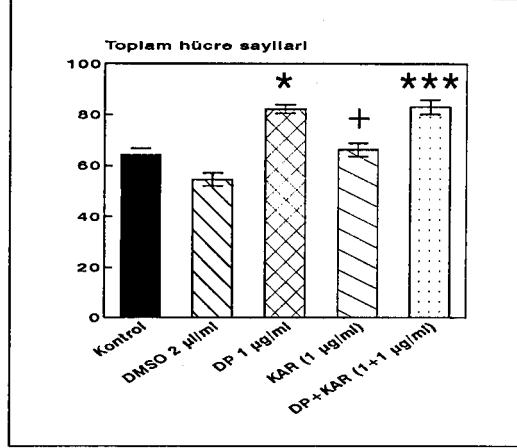


Şekil 22. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında granül sayılarını gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* (TECA), c- Izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının grafikleri. * $p < 0.05$ ve *** $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$, + $p < 0.10$ ve ++ $p < 0.005$ ilk dozlara göre farklılıklar.

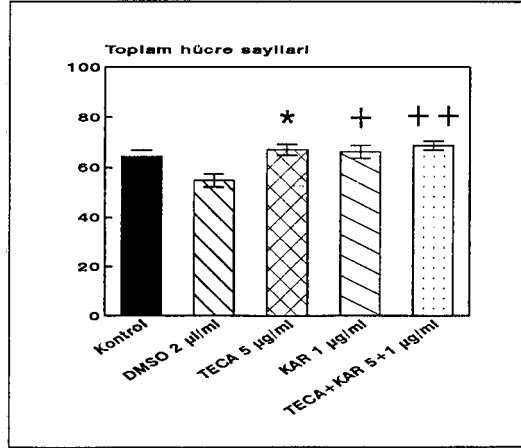
(a)



(b)

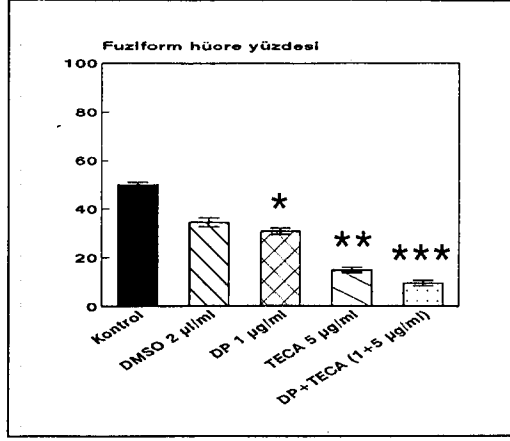


(c)

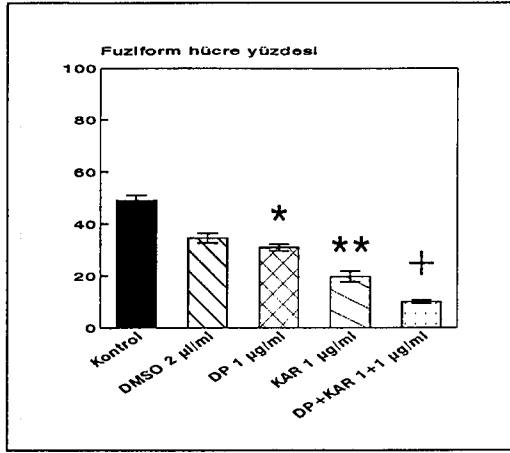


Şekil 23. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların toplam hücre sayılarını gösteren grafikler. a- Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu (DP+TECA), b- Dekspantenol ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyonu (DP+KAR), c- *Centella asiatica* ekstresi ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyon (TECA+KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ ve + $p < 0.01$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$ DP'ye göre ve $p < 0.005$ TECA'ya göre farklılıklar, *** $p > 0.10$ DP'ye göre ve $p < 0.005$ KAR'a göre farklılıklar, ++ $p > 0.10$ TECA'ya göre ve KAR'a göre farklılıklar.

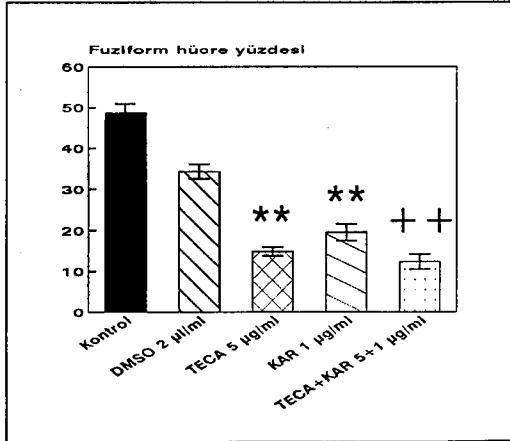
(a)



(b)

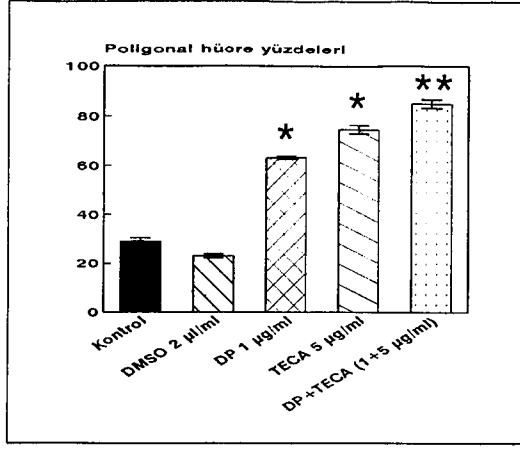


(c)

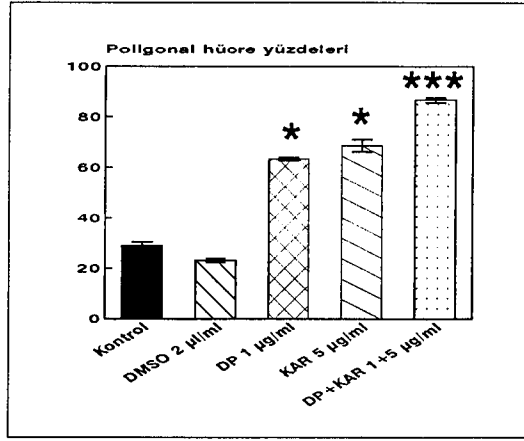


Şekil 24. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların fuziform hücre yüzdeslerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu (DP+TECA), b- Dekspantenol ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı kombinasyonu (DP+KAR), c- *Centella asiatica* ekstresi ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının kombinasyon (TECA+KAR) grafikleri. * $p < 0.10$ ve ** $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, *** $p < 0.005$ DP'ye göre ve TECA'ya göre farklılıklar, + $p < 0.005$ DP ve KAR'a göre farklılıklar, ** $p > 0.10$ TECA'ya göre ve $p < 0.05$ KAR'a göre farklılıklar.

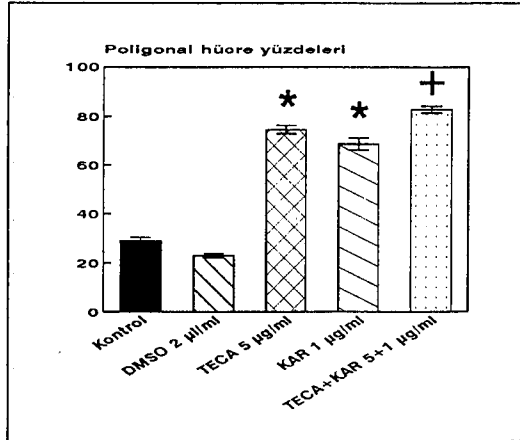
(a)



(b)

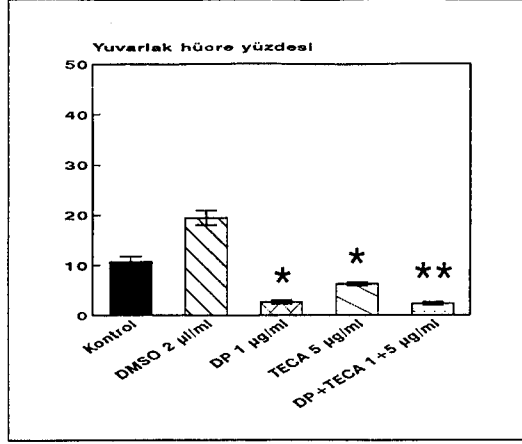


(c)

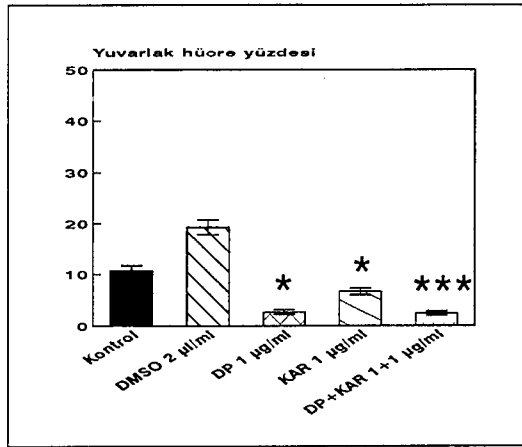


Şekil 25. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların poligonal hücre yüzdelerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu (DP+TECA), b- Dekspantenol ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı (DP+KAR), c- *Centella asiatica* ekstresi ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı kombinasyonu (TECA+KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.005$ DP'e göre ve TECA'ya göre farklılıklar, *** $p < 0.005$ DP'a ve KAR'a göre farklılıklar, + $p < 0.005$ TECA ve KAR'a göre farklılıklar.

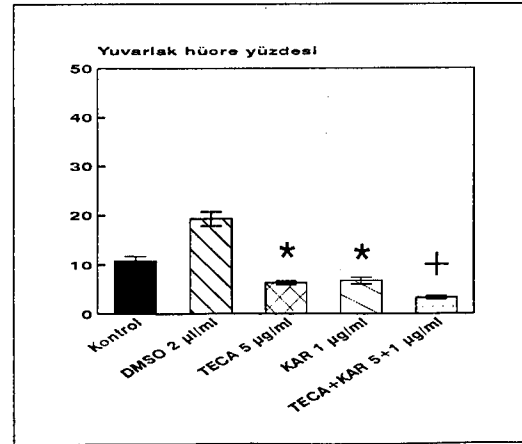
(a)



(b)

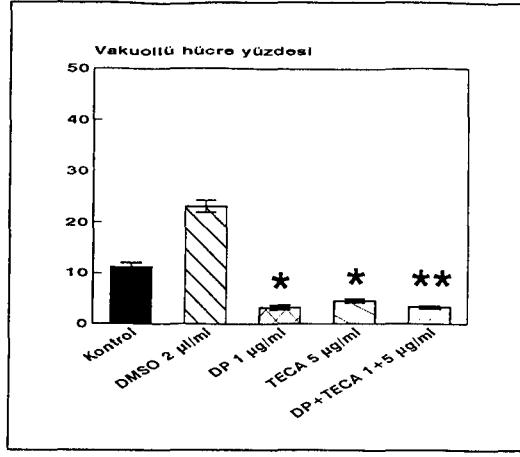


(c)

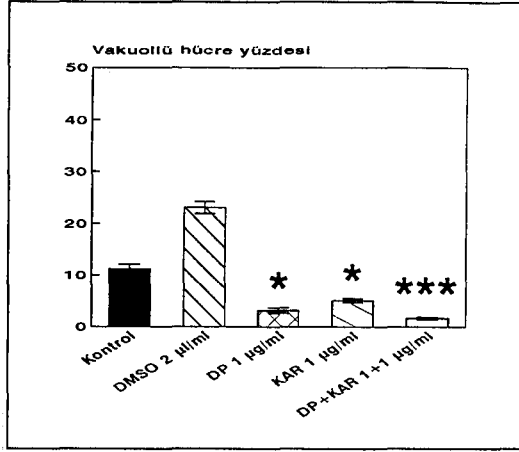


Şekil 26. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların yuvarlak hücre yüzdelerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu (DP+TECA), b- Dekspantenol ve izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyonu (DP+KAR), c- *Centella asiatica* ekstresi ve izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyon (TECA+KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$ DP'ye ve $p < 0.05$ TECA'ya göre farklılıklar, + $p < 0.01$ TECA'ya ve KAR'a göre farklılıklar.

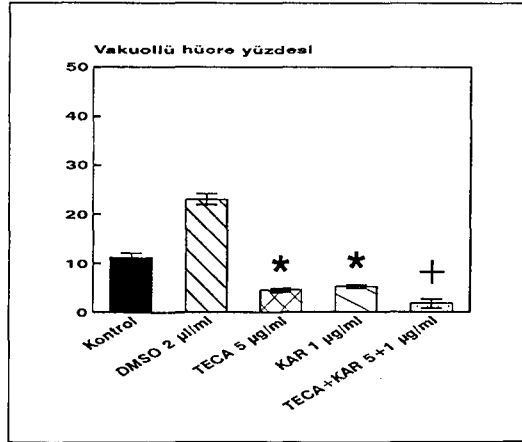
(a)



(b)

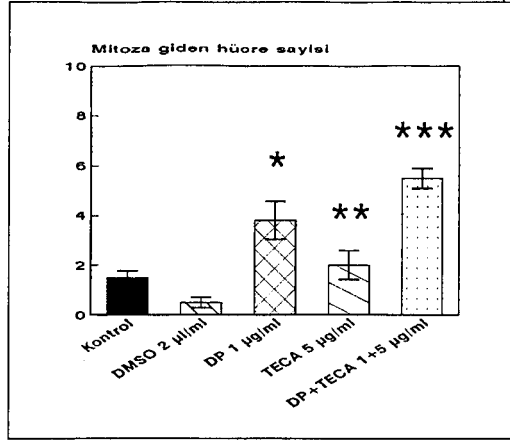


(c)

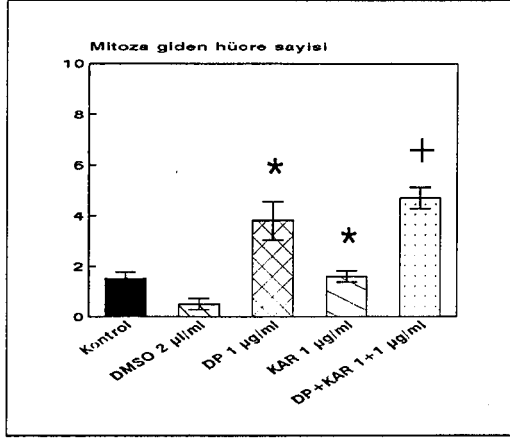


Şekil 27. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında kombinasyonların vakuollü hücre yüzdelerini gösteren grafikler. a-Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu (DP+TECA), b-Dekspantenol ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı kombinasyonu (DP+KAR), c- *Centella asiatica* ekstresi ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı kombinasyon (TECA+KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$ DP'ye ve $P < 0.005$ TECA'ya göre farklılıklar, *** $p > 0.10$ DP'ye ve $p < 0.005$ KAR'a göre farklılıklar, + $p < 0.005$ TECA'ya ve KAR'a göre farklılıklar.

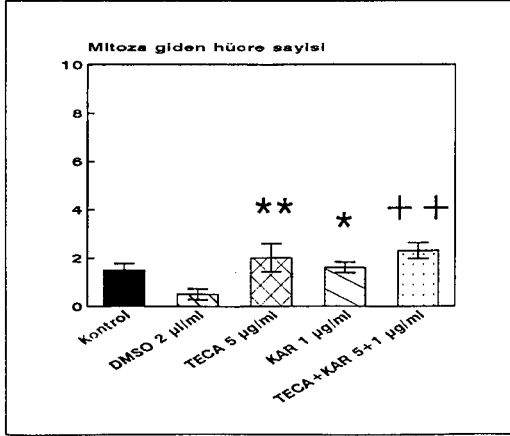
(a)



(b)

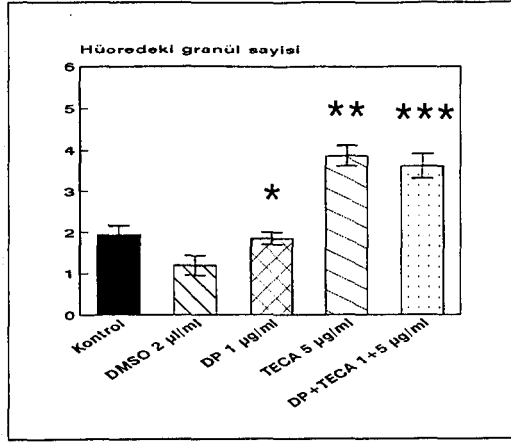


(c)

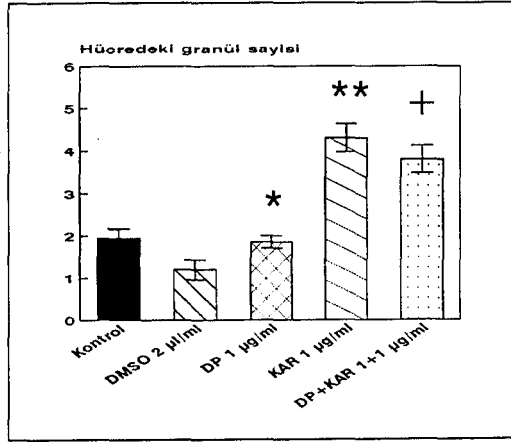


Şekil 28. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında mitoze giden hücre sayılarını gösteren grafikler. a- Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu (DP+TECA), b- Despantenol ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyonu (DP+KAR), c- *Centella asiatica* ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyonu (TECA+KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ ve ** $p < 0.05$ DMSO'ya göre farklılıklar, *** $p < 0.05$ DP'ye göre ve $p < 0.005$ TECA'ya göre farklılıklar, + $p > 0.10$ DP'ye ve $p < 0.005$ KAR'a göre farklılıklar, ++ $p > 0.10$ TECA'ya ve $p < 0.10$ KAR'a göre farklılıklar.

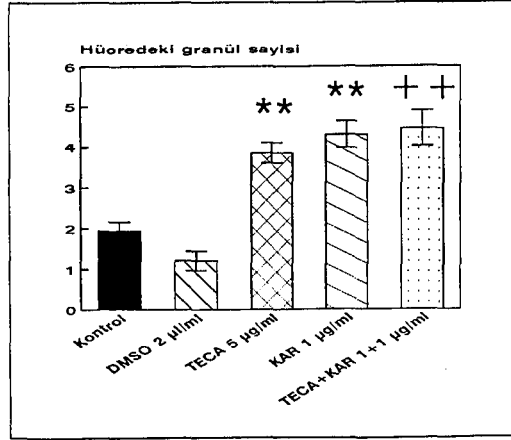
(a)



(b)



(c)



Şekil 29. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında granül sayılarını gösteren grafikler. a-Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi kombinasyonu (DP+TECA), b- Dekspantenol ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyonu (DP+KAR), c- *Centella asiatica* ekstresi ve İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı kombinasyonu (TECA+KAR) grafikleri. * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, *** $p < 0.005$ DP'ye ve $p > 0.10$ TECA'ya göre farklılıklar, + $p < 0.005$ DP'ye ve $p > 0.10$ KAR'a göre farklılıklar, ++ $p > 0.10$ TECA'ya ve KAR'a göre farklılıklar.

B. 715 Fibroblastları ile Elde Edilen Sonuçlara Ait Tablo,
Fotoğraf ve Grafikler



Tablo 17-23



Şekil 30-37 (Fotoğraflar)



Şekil 38-44 (Grafikler)

Grafiklerdeki vertikal çizgiler ortalama değerlerin \pm standart hatalarını göstermektedir.

Tablo 17. Toplam hücre sayıları esas alınarak, T15 fare embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol, Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) etkileri.

Gruplar	Hücre sayıları \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	58.80 \pm 2.29	5
DMSO 2 μ l/ml	47.00 \pm 2.88 ^a	5
DP 1 μ g/ml	66.80 \pm 1.24 ^b	5
DP 10 μ g/ml	87.00 \pm 1.52 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	59.40 \pm 2.18 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	60.60 \pm 1.50 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	59.40 \pm 3.85 ^c	5
KAR 10 μ g/ml	41.40 \pm 1.91 ^d	5

^ap<0.01 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp<0.005, ^cp<0.05 ve ^dp<0.1 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 18. Fuziform hücre yüzdeleri esas alınarak, T15 fare embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st.hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	49.58 \pm 1.54	5
DMSO 2 μ l/ml	34.89 \pm 0.98 ^a	5
DP 1 μ g/ml	28.69 \pm 1.07 ^b	5
DP 10 μ g/ml	22.73 \pm 1.16 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	17.41 \pm 1.24 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	14.12 \pm 0.99 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	21.27 \pm 1.99 ^b	5
KAR 10 μ g/ml	34.37 \pm 1.19 ^c	5

^ap<0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp<0.005 ve ^cp>0.10 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 19. Poligonal hücre yüzdeleri esas alınarak, T15 fare embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	30.57 \pm 1.79	5
DMSO 2 μ l/ml	25.82 \pm 1.79 ^a	5
DP 1 μ g/ml	62.61 \pm 1.24 ^b	5
DP 10 μ g/ml	68.98 \pm 0.42 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	73.89 \pm 2.12 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	79.31 \pm 1.59 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	67.96 \pm 0.65 ^b	5
KAR 10 μ g/ml	18.37 \pm 0.99 ^b	5

^ap < 0.05 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 DMSO'ya göre anlamlı farklılık.

Tablo 20. Yuvarlak hücre yüzdeleri esas alınarak, T15 fare embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının (KAR) etkileri.

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	9.57 \pm 0.91	5
DMSO 2 μ l/ml	18.57 \pm 1.54 ^a	5
DP 1 μ g/ml	4.80 \pm 0.58 ^b	5
DP 10 μ g/ml	4.59 \pm 0.64 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	4.34 \pm 0.79 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	4.29 \pm 0.38 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	5.61 \pm 0.85 ^b	5
KAR 10 μ g/ml	21.37 \pm 1.56 ^c	5

^ap < 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 ve ^cp > 0.10 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 21. Vakuollü hücre yüzdeleri esas alınarak, T15 fare embriyonik fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), D-pantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Hücre yüzdeleri \pm st.hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	10.29 \pm 1.10	5
DMSO 2 μ l/ml	21.15 \pm 0.85 ^a	5
DP 1 μ g/ml	3.90 \pm 0.38 ^b	5
DP 10 μ g/ml	3.44 \pm 0.51 ^b	5
TECA 5 μ g/ml	4.36 \pm 0.35 ^b	5
TECA 10 μ g/ml	2.28 \pm 0.79 ^b	5
KAR 1 μ g/ml	5.16 \pm 0.97 ^b	5
KAR 10 μ g/ml	24.93 \pm 2.71 ^c	5

^ap< 0.005 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp< 0.005 ve ^cp< 0.10 DMSO' ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 22. Mitoza giden hücre sayısı esas alınarak T15 fibroblastları üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), Dekspantenol (DP), Standart Centella asiatica ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütül alkanin karışımının (KAR) etkileri

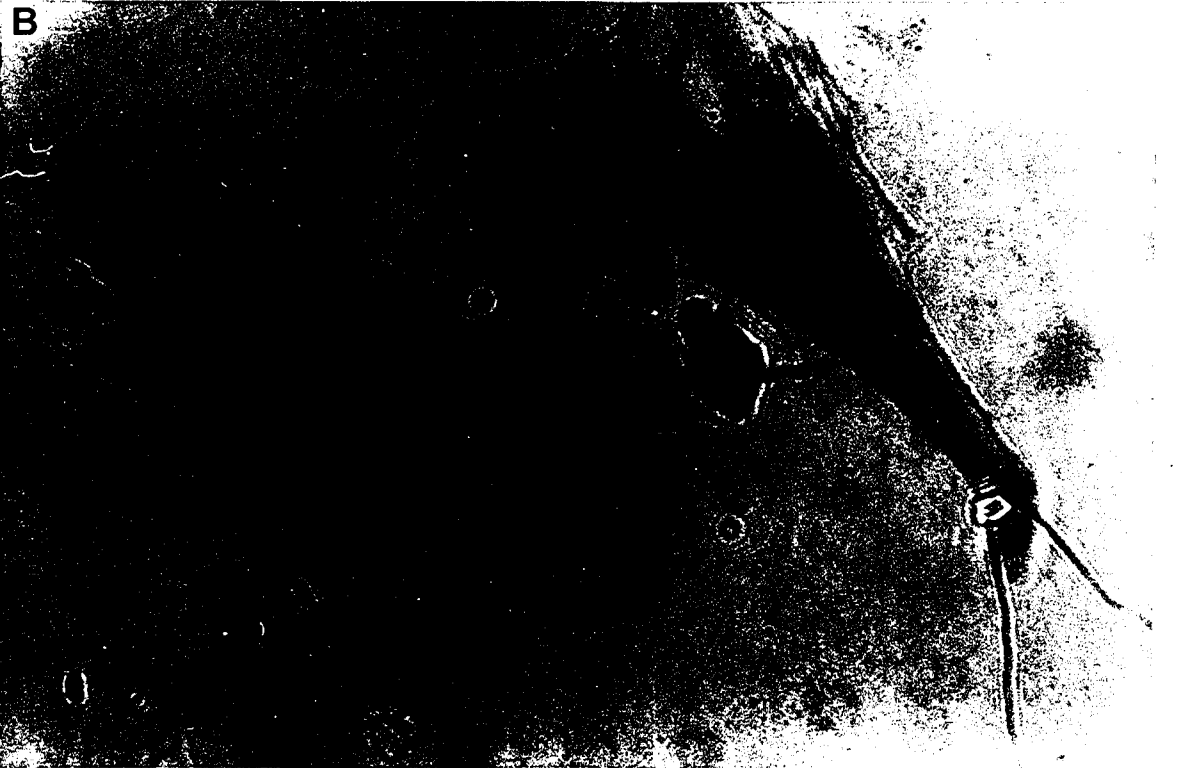
Gruplar	Hücre sayısı \pm st. hata	Sayılan alan sayısı
Kontrol	1.90 \pm 0.28	10
DMSO 2 ml/ml	0.80 \pm 0.25 ^a	10
DP 1 μ g/ml	4.10 \pm 0.38 ^b	10
DP 10 μ g/ml	5.50 \pm 0.34 ^b	10
TECA 5 μ g/ml	2.20 \pm 0.29 ^b	10
TECA 10 μ g/ml	2.30 \pm 0.37 ^b	10
KAR 1 μ g/ml	2.1 \pm 0.23 ^b	10
KAR 10 μ g/ml	0.60 \pm 0.22 ^c	10

^ap < 0.01 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.005 ve ^cp > 0.10 DMSO'ya göre anlamlı farklılıklar.

Tablo 23. Granül sayısı esas alınarak T15 fibroblastlar üzerine Dimetilsülfoksit (DMSO), Dekspantenol (DP), Standart *Centella asiatica* ekstresi (TECA), İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımının (KAR) etkileri

Gruplar	Granül sayısı \pm st. hata	Sayılan hücre sayısı
Kontrol	2.20 \pm 0.19	20
DMSO 2 ml/ml	1.55 \pm 0.27 ^a	20
DP 1 μ g/ml	2.40 \pm 0.25 ^b	20
DP 10 μ g/ml	2.70 \pm 0.30 ^c	20
TECA 5 μ g/ml	3.80 \pm 0.39 ^c	20
TECA 10 μ g/ml	4.10 \pm 0.38 ^c	20
KAR 1 μ g/ml	4.00 \pm 0.28 ^c	20
KAR 10 μ g/ml	1.45 \pm 0.20 ^d	20

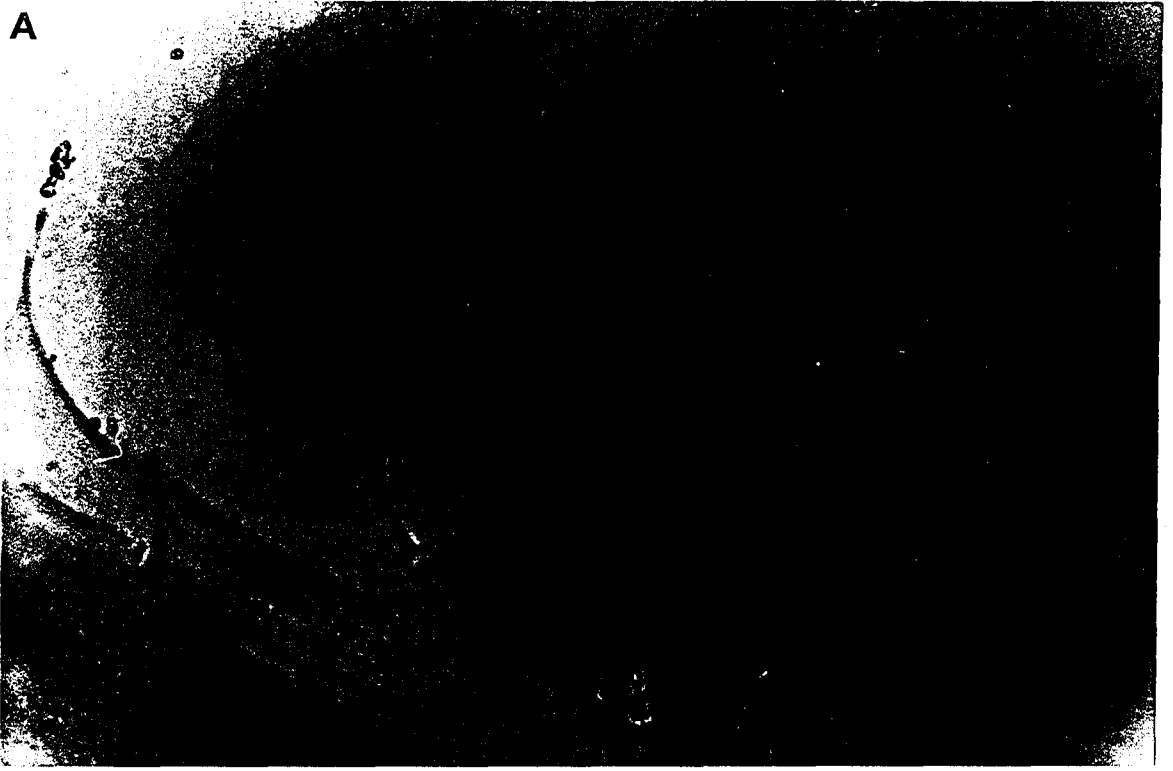
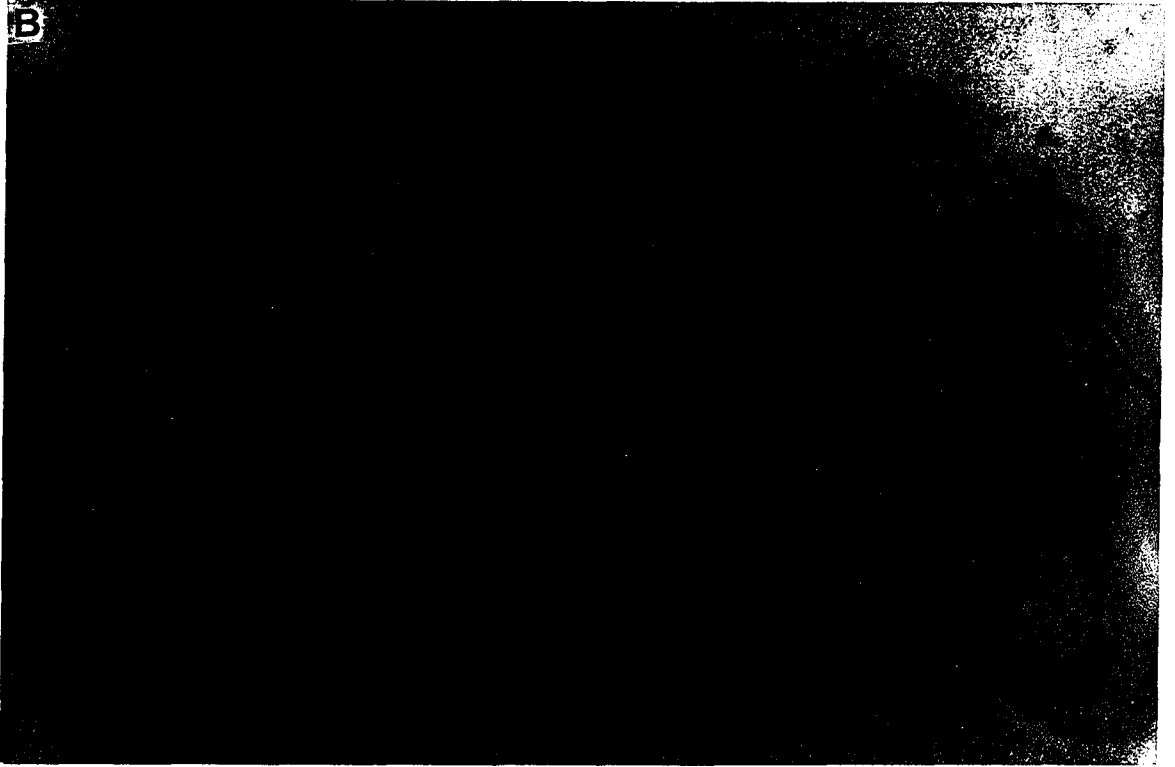
^ap < 0.05 Kontrole göre anlamlı farklılık, ^bp < 0.05, ^cp < 0.005 ve ^dp > 0.10 DMSO' ya göre farklılıklar.

A**B**

Şekil 30. T15 fibroblast kültürlerinde; A- Kontrol grubu, B- DMSO uygulanan hücrelerin 6.saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Kollajen varlığı mavi, sitoplazma pembe görülmektedir.



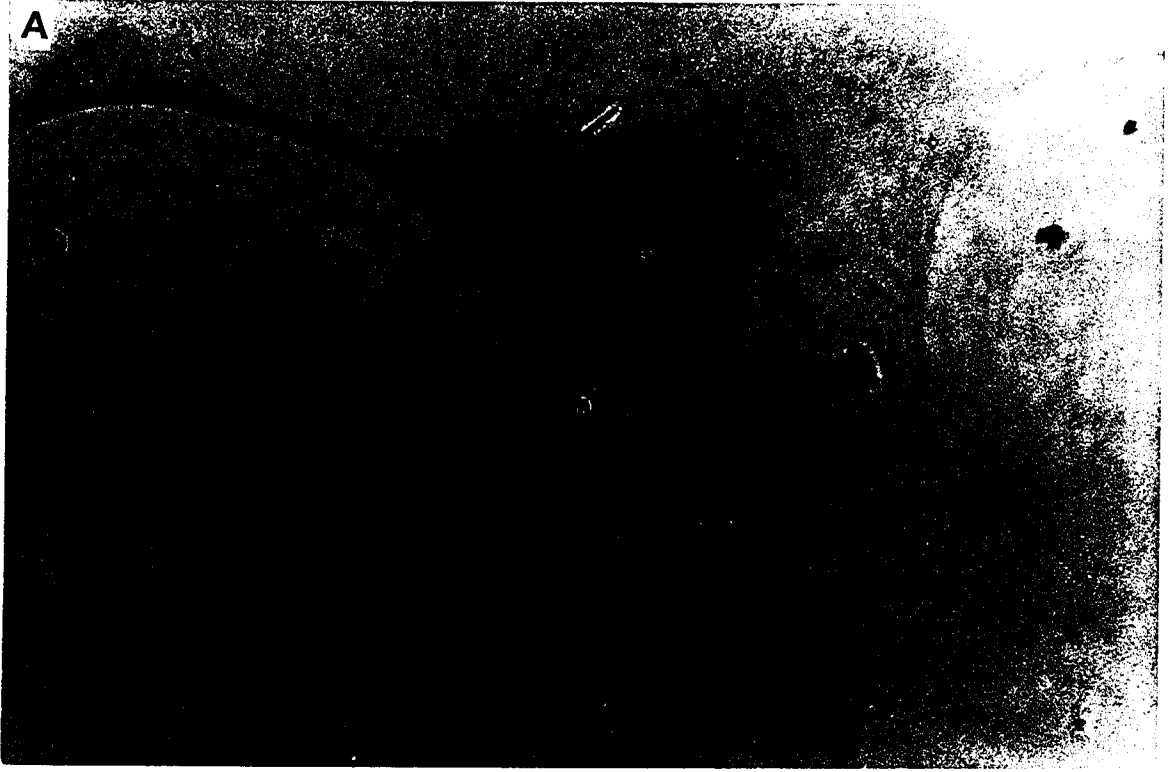
Şekil 31. T15 fibroblast kültürlerinde; A- 1 µg/ml dozda Dekspantenol uygulanan, B- 10 µg/ml dozda Dekspantenol uygulanan hücrelerin 6. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Kollajen varlığı mavi, sitoplazma pembe görülmektedir.

A**B**

Şekil 32. T15 fibroblast kültürlerinde; A- 5 µg/ml dozda ve B-10 µg/ml dozda *Centella asiatica* ekstresi uygulanan hücrelerin 6. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Kollajen varlığı mavi, sitoplazma pembe görülmektedir.



Şekil 33. T15 fibroblast kültürlerinde; A- 1 µg/ml dozda ve B- 10 µg/ml dozda İzovalerilalkanin ve α-metil-nöbütillalkanin karışımı uygulanan hücrelerin 6. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu 600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Kollajen mavi, sitoplazma pembe görülmektedir.



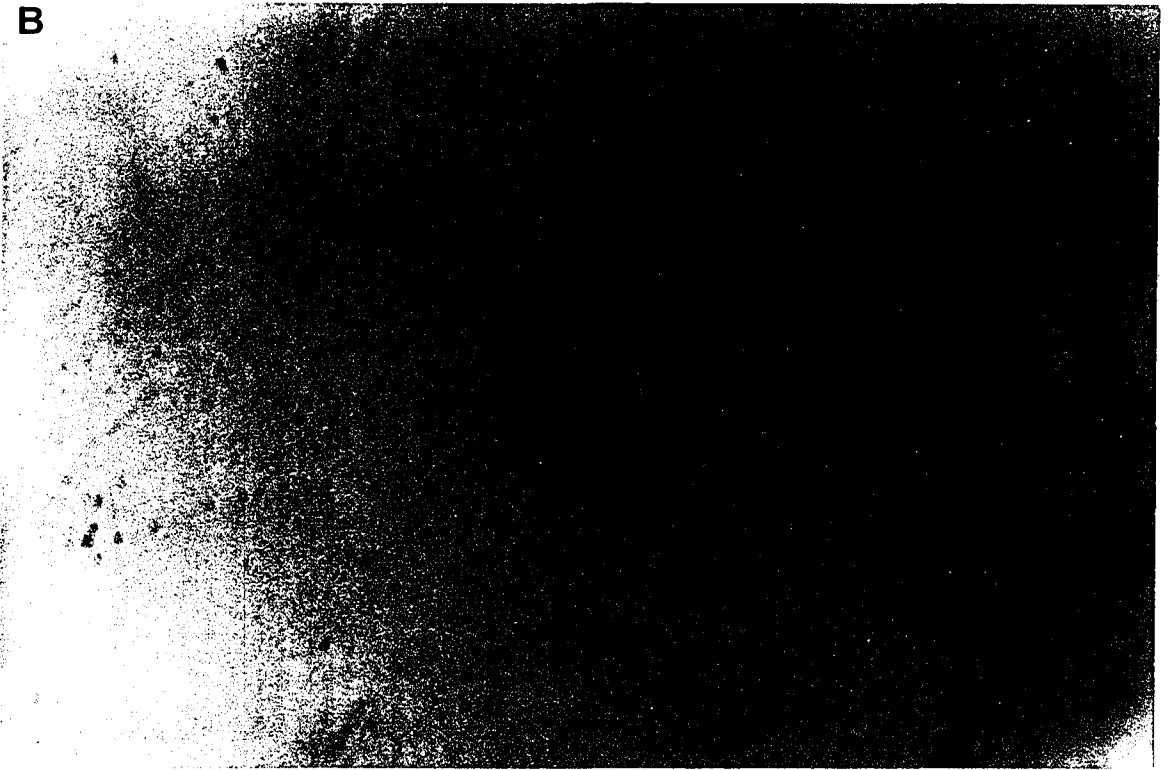
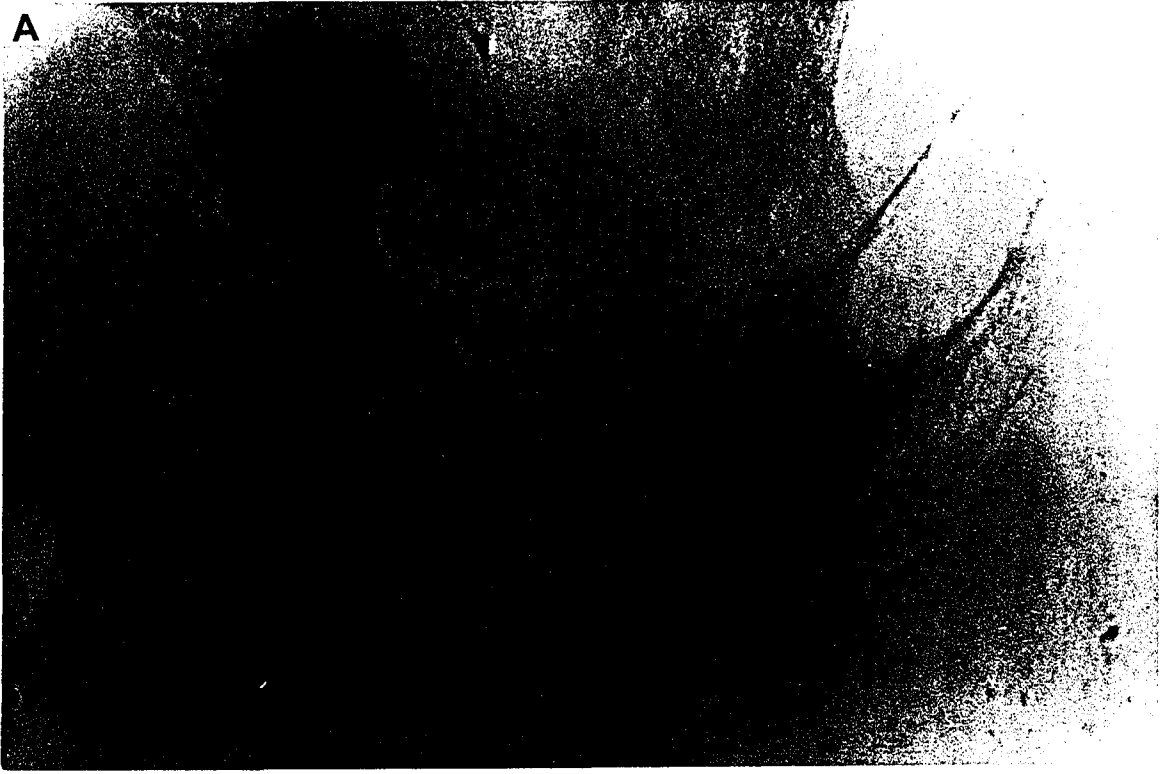
Şekil 34. T15 fibroblast kültürlerinde; A- Kontrol grubu hücrelerin, B- DMSO uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu 1600 kez büyütme kullanılarak elde edilen görüntüleri. Kollajen mavi, sitoplazma pembe görülmektedir.



Şekil 35. T15 fibroblast kültürlerinde; A- 1 µg/ml dozda ve B- 10 µg/ml dozda Dekspantenol uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Kollajen mavi, sitoplazma pembe, nükleolus koyu mavi görülmektedir. Yeni sentez edilen kollajenin varlığı sitoplazmanın da mavi görülmesiyle teşhis edilebilir.

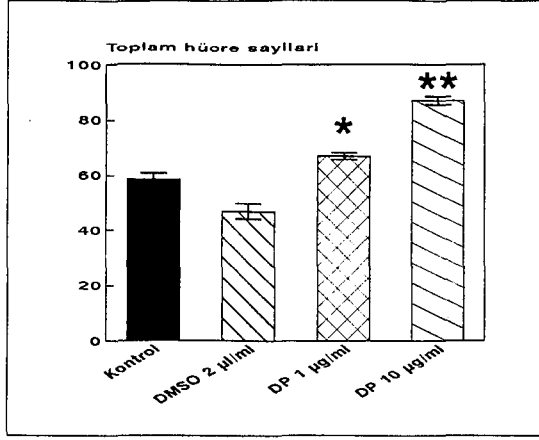


ekil 36. T15 fibroblast kültürlerinde; A- 5 µg/ml dozda ve B-10 µg/ml dozda *Centella asiatica* ekstresi uygulanan hücrelerin 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyanmaları sonucu 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Kollajen mavi, sitoplazma pembe, nükleolus koyu mavi görülmektedir. eni sentez edilen kollajenin varlığı sitoplazmanın da mavi görülmesiyle teşhis edilebilir.

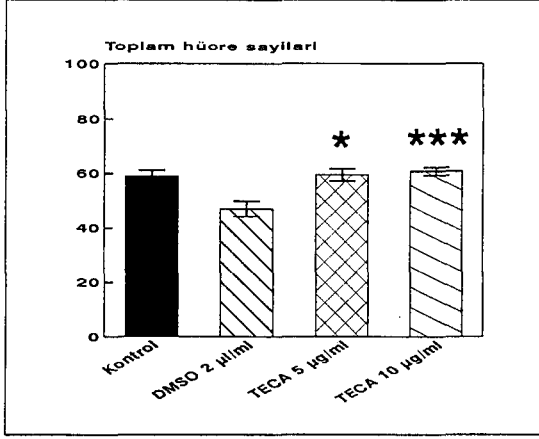


Şekil 37. T15 fibroblast kültürlerinde; A- 1 µg/ml dozda ve B- 10 µg/ml dozda İzovaleirilalkanin ve α-metil-n-ütilalkanin karışımı uygulanan hücrelerin 24. saatte boyanmaları sonucu 1600 kez büyütme uygulanarak elde edilen görüntüleri. Kollajen mavi, sitoplazma pembe, nükleolus koyu mavi görülmektedir. Yeni sentez edilen kollajenin varlığı sitoplazmanın da mavi görülmesiyle teşhis edilebilir.

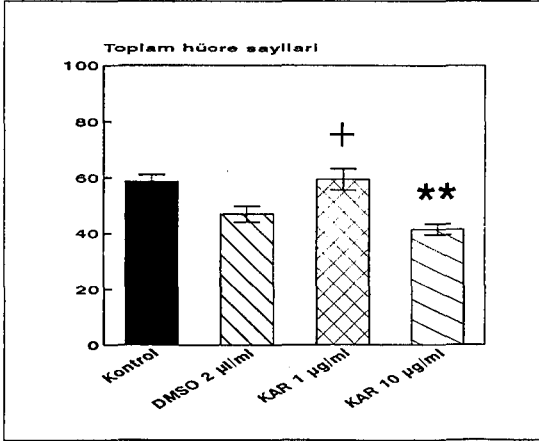
(a)



(b)

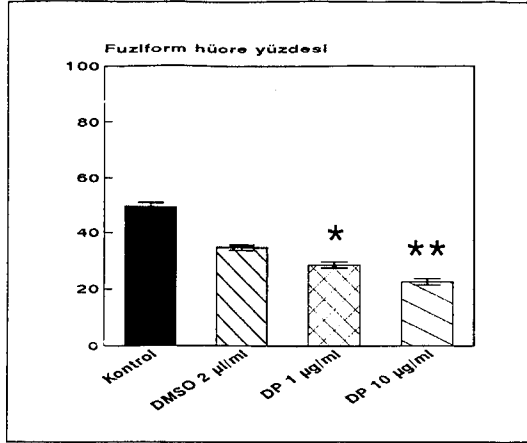


(c)

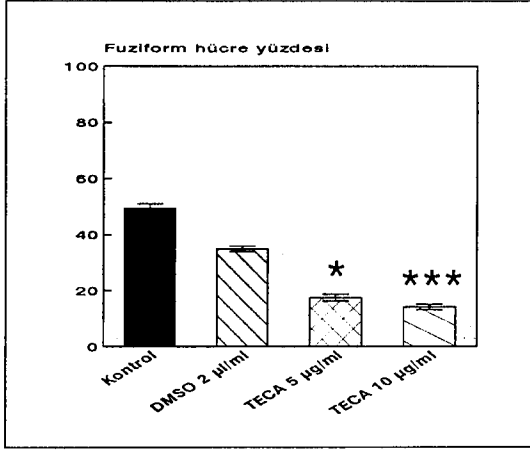


Şekil 38. T15 fibroblastlarda toplam hücre sayılarını gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica ekstresi* (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ ve + $p < 0.05$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.005$ ve *** $p > 0.10$ ilk dozlara göre farklılıklar.

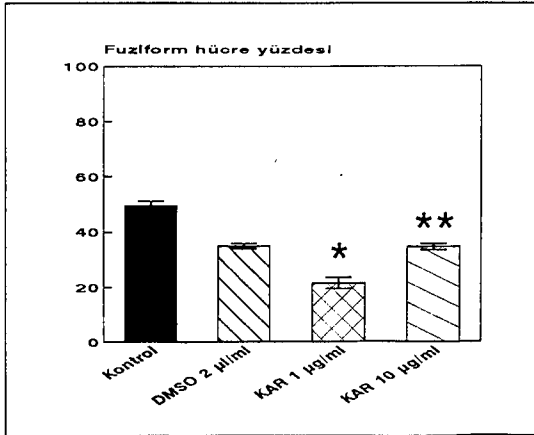
(a)



(b)

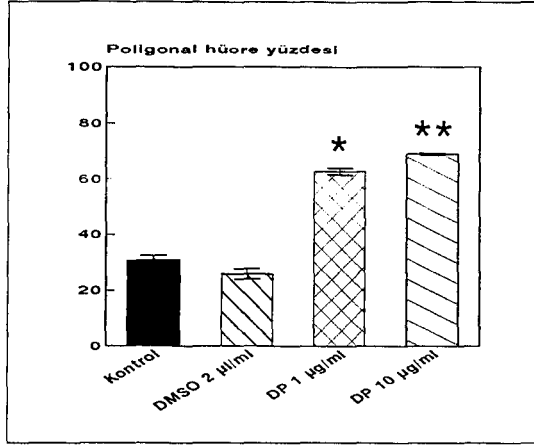


(c)

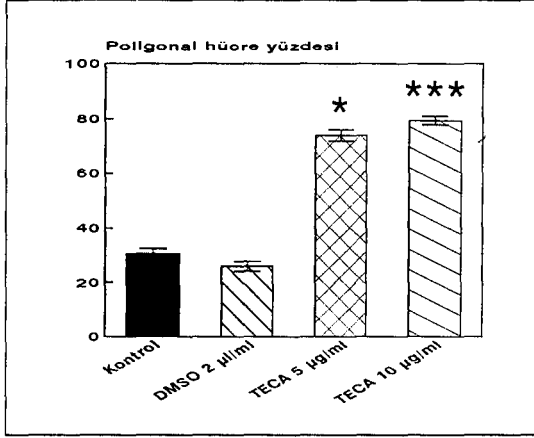


Şekil 39. T15 fibroblastlarda fuziform hücre yüzdeleri gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- Izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.005$ ve *** $p < 0.05$ ilk dozlara göre farklılıklar.

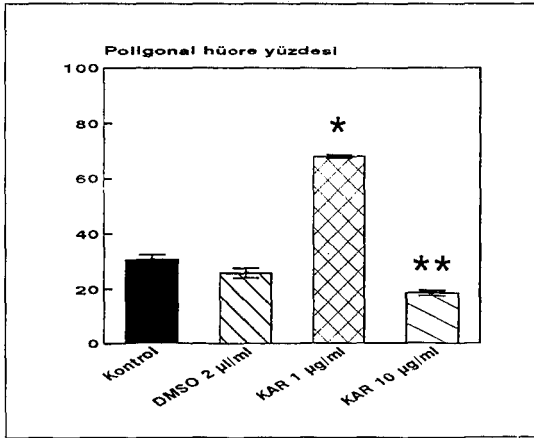
(a)



(b)

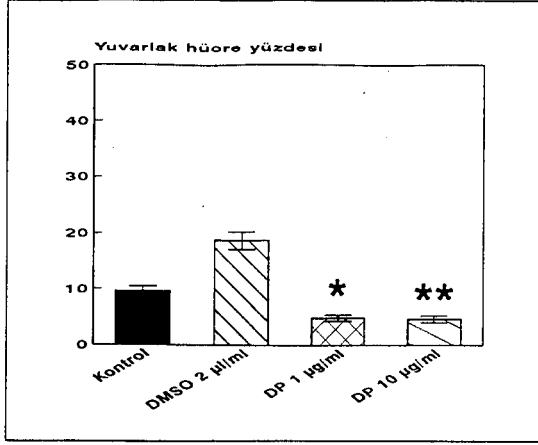


(c)

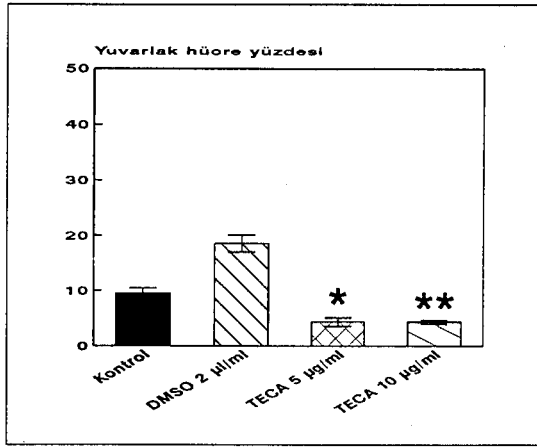


Şekil 40. T15 fibroblastlarda poligonal hücre yüzdeslerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Sentella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p < 0.005$ ve *** $p < 0.05$ ilk dozlara göre farklılıklar.

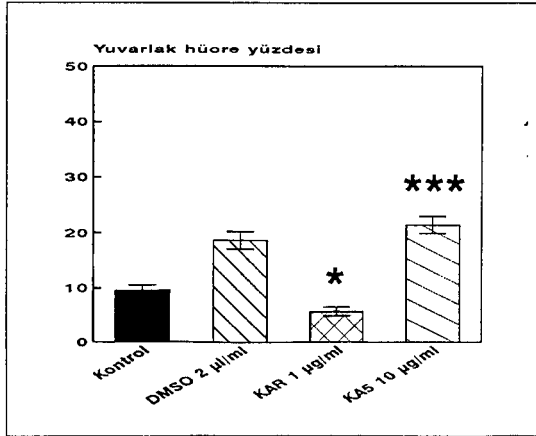
(a)



(b)

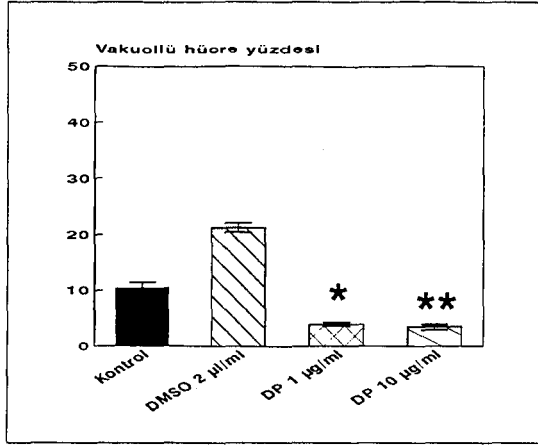


(c)

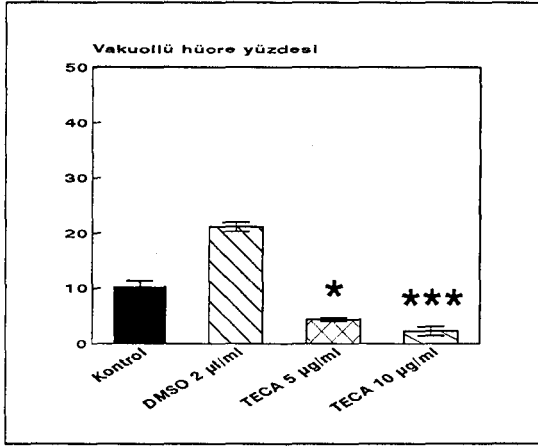


Şekil 41. T15 fibroblastlarda yuvarlak hücre yüzdeslerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımının (KAR) grafikleri. * $p < 0.05$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$, *** $p < 0.05$ ve + $p < 0.005$ ilk dozlara göre farklılıklar.

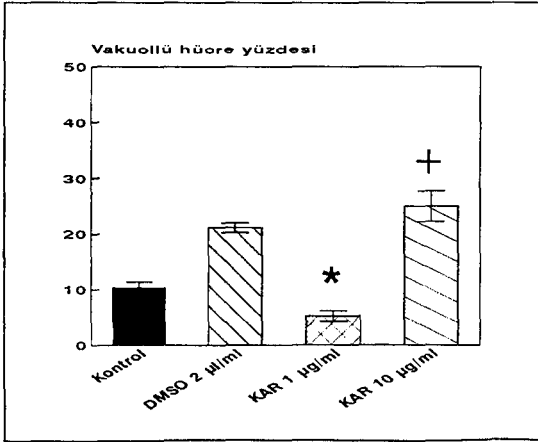
(a)



(b)

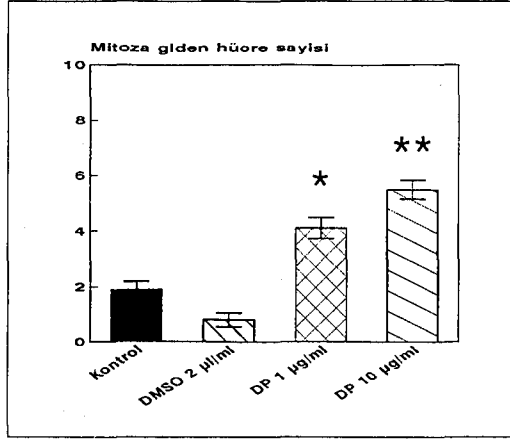


(c)

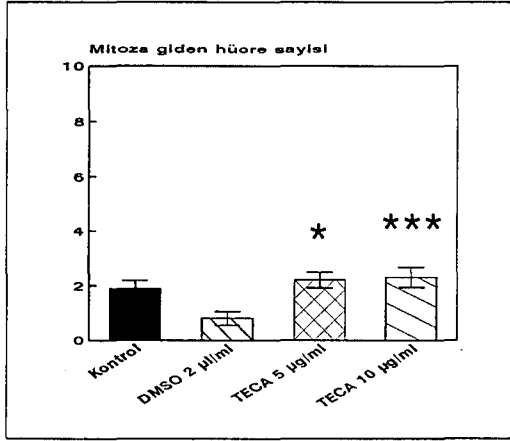


ekil 42. T15 fibroblastlarda vakuollü hücre yüzdeslerini gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı (KAR) grafikleri. * $p < 0.005$ DMSO'ya göre farklılıklar, ** $p > 0.10$ ve *** $p < 0.005$ ilk dozlara göre farklılıklar.

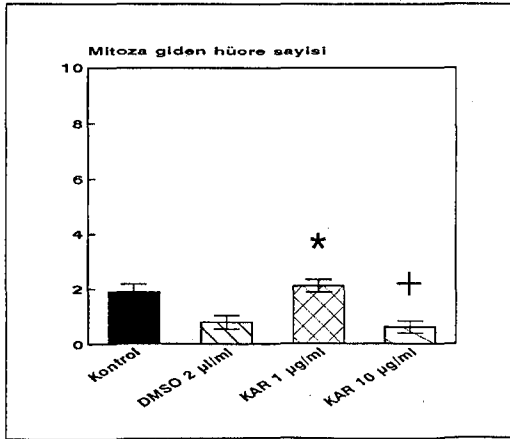
(a)



(b)

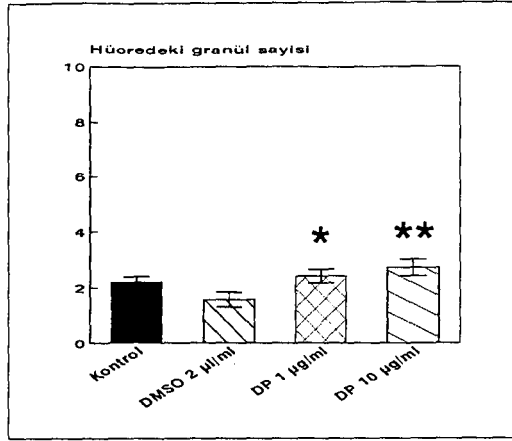


(c)

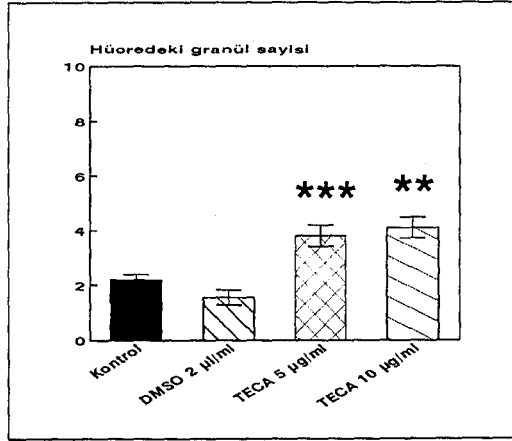


Şekil 43. T15 fibroblastlarda mitoza giden hücre sayılarını gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* ekstresi (TECA), c- İzovalerilalkanin ve α -metil-n-bütılalkanin karışımı (KAR) grafikleri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ DMSO'ya göre farklılıklar, + $p < 0.05$ ilk dozlara göre farklılıklar.

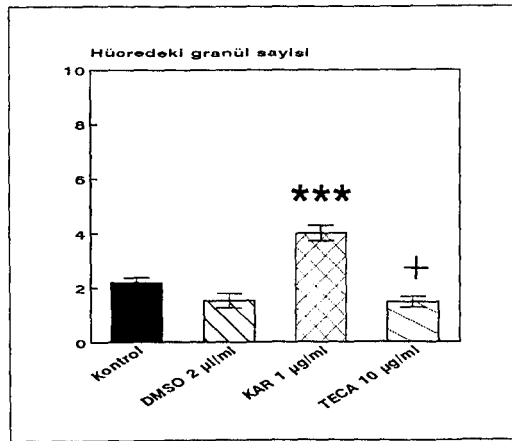
(a)



(b)



(c)



ekil 44. T15 fibroblastlarda granül sayılarını gösteren grafikler. a- Dekspantenol (DP), b- *Centella asiatica* (stresi) (TECA), c- Izovalerilalkanin ve α -metil-n-bütillalkanin karışımı (KAR) grafikleri. * $p < 0.05$ ve ** $p > 0.10$ DMSO'ya göre farklılıklar, *** $p > 0.005$ ilk dozlara göre farklılıklar.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, yara iyileştirici aktivitesi olan Dekspantenol, *Centella asiatica* ekstresi ve *Amebia densiflora*' dan elde edilmiş olan izovalerilalkanin ve α -metil-n-tilalkanin karışımının T15 ve tavuk embriyonik fibroblastları üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu etkiler; toplam hücre sayıları, fuziform hücre, poligonal hücre, vakuollü hücre, yuvarlak hücre yüzdeleri, mitoz giden hücre sayısı ve hücrelerdeki granül sayıları parametre olarak kabul edilerek yapılmıştır. Test maddeleri uygulandıktan sonra birinci saatte, morfolojik açıdan yapılan sayımlar arasında fazla fark olmadığı, yamalar neticesinde de kollajen sentezleri açısından fark gözlenemediği için sadece birinci saatteki sayımlar değerlendirilmiştir. Yirmidört saatten daha kısa süre protein sentezi için mitoz için yeterli bir süre olmamaktadır (37). Ayrıca test maddeleri verilmeden önce yapılan sayımlarda petripler arasında önemli derecede fark bulunmadığı için, yapılan bu sayımlar da değerlendirilmeye alınmamıştır.

Primer Tavuk Embriyonik Fibroblastlarında DMSO uygulanan hücrelerde, DMSO'nun sitotoksik etkisine bağlı olan toplam hücre, poligonal hücre, granül, mitoz giden hücre sayılarında ölçülebilir bir azalma ve fuziform, vakuollü ve yuvarlak hücre sayılarında artış olmuştur. Bu etki, büyük bir olasılıkla DMSO'nun daha önce rapor edilmiş olan toksik ve antimitotik etkisinden kaynaklanmaktadır (92, 95-98).

Dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstresi, klinikte yara iyileştirici etkileri sebebiyle yaygın biçimde kullanılmaktadır. Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında yapılan çalışmalarımızda dekspantenol toplam hücre ve mitoz giden hücre sayılarını artırmasından değerlendirildiğinde hücre sayılarında doza bağımlı olarak mitotik aktivitesinden kaynaklanan belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç, daha önce literatürde pantotenik asidin insan fibroblastlarında gözlenen mitotik aktivitesini de desteklemektedir (102). Fotoğraflarda da görüldüğü gibi TECA ve KAR'ın tek başlarına uygulanmalarında kontrole oranla belirgin bir mitotik aktivitesi gözlenemezken DMSO ya da TECA ile yapılan deneylerde ise anlamlı bir mitoz artışı gözlenmiştir. Dekspantenolde ise kontrolde hem de DMSO'ya göre anlamlı ve doza bağımlı bir mitotik aktivite gözlenmiştir (Şekil: 7-8). TECA ve KAR ile olan kombinasyonlarında ise toplam hücre sayılarında dekspantenolün tek başına verilmesi sonucunda ölçülen değerlere göre anlamlı farklılıkta değerler bulunmamıştır. Bu çalışmamızda, dekspantenol uygulamasının fuziform hücre sayılarını azalttığı, poligonal hücre sayılarını arttırdığı, vakuollü ve yuvarlak hücre sayılarını anlamlı derecede değiştirmediği gözlenmiştir. Bu

ulgular, pantotenik asidin daha önceki çalışmalarla bildirilen mitotik aktivitesi ve protein sentezi üzerindeki stimulan etkisi ile bağlantılı gibi gözükmektedir (102). Granül sayılarında kontrol ve dozlar arası değerlendirilmelere göre anlamsız, DMSO' ya göre ölçülebilir anlamlılıkta artışlar olduğu bunun da yine protein sentezi üzerine olan stimulan etkisine bağlı olduğu, ancak kollajen sentezi üzerine (TECA'da olduğu kadar) direkt etkisi olmadığı düşünülmelidir. Mitotik aktivitesi ve hücrede protein sentezini arttırdığından dolayı yaraların iyileşmesinde etkili olduğu ileri sürülmüştür. (92, 102) TECA ve KAR ile kombinasyonlarında, dekspantenolün tek başına uygulanmasına göre toplam hücre ve yuvarlak hücre sayılarında bir farkın olmadığı, TECA ile kombinasyonunda mitozaya giden hücre sayısının TECA' nın etkisine bağlı olarak hafifçe arttığı, KAR ile kombinasyonunda mitozaya giden hücrelerde artışın olmadığı gözlenmiştir. Yine TECA ve KAR ile kombinasyonlarında fuziform hücrelerde önemli ölçüde azalma, poligonal hücre ve granül sayılarında önemli ölçüde artış görülmüştür.

Primer tavuk embriyonik fibroblastlarında, TECA'nın uygulanması sonucu, DMSO' ya göre toplam hücre bazında anlamlı, mitozaya giden hücre bazında ise az bir artış gözlenmiştir. TECA, yuvarlak, vakuollü ve fuziform hücrelerde önemli derecede azalmaya, poligonal hücre ve granül sayısında ise önemli derecede artışa sebep olmaktadır. Şekil 2. de gösterildiği gibi kollajenin sentezinde, prokollajen molekülleri vezikül içinde hücre dışına taşınmaktadır (68). Ayrıca TECA'nın kollajen sentezi üzerine olan stimulan etkisi ve bu etkisi ile yara iyileşiminde rol oynadığı daha önce yapılmış olan çalışmalarla gösterilmiştir (52, 103, 105). Bu verilerden yararlanarak; bulduğumuz sayısal değerler ve Şekil: 9-10'da gördüğümüz granüllerin hücre dışına vezikül içinde taşınmakta olan prokollajen molekülleri olduğunu ve TECA' nın fibroblastlarda direkt kollajen sentezini stimüle ettiğini, bu mekanizma ile yaraların iyileşmesinde etkili olduğunu söyleyebiliriz. Granül sayılarının artan dozla artması etkinin doza bağımlı olduğunu göstermektedir.

TECA' nın DP ile olan kombinasyonunda, DMSO ve TECA' yla karşılaştırıldığında poligonal hücre sayılarının, DP' nin etkisine bağlı olarak, toplam hücre ve mitozaya giden hücre sayılarının da önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Fuziform ve vakuollü hücre sayılarından bir değişiklik olmamıştır. TECA ve DP' nin kombinasyonunda, granül sayılarında TECA' nın tek başına uygulandığından farklı sonuçlar alınmaması; dekspantenolün kollajen sentezi üzerine etkisi olmadığını, yara iyileştirici etkisinin sadece mitotik aktivitesinden kaynaklandığını göstermektedir. TECA ve KAR' ın kombinasyonunda toplam hücre sayıları ve mitozaya giden hücre sayılarında TECA' ya

göre fark yoktur. Fuziform hücre sayıları değişmezken, poligonal hücrelerde önemli ölçüde artış, yuvarlak hücre sayılarında önemli, vakuollü hücre sayılarındaysa ölçülebilir derecede azalma gözlenmiştir.

KAR'ın 1 µg/ml dozda uygulanması; DMSO'nun uygulandığı hücrelere göre fuziform, yuvarlak ve vakuollü hücre sayılarında azalmaya, poligonal hücre, mitozaya giden hücre ve granül sayılarında artışa sebep olması, bu dozda KAR'ın yara iyileştirici etkisi olduğunu göstermektedir. Bu daha önce yapılan bir *in vivo* çalışmada *Arnebia densiflora*'nın gösterilmiş olan yara iyileştirici etkisini doğrulamaktadır (124). KAR'ın bu dozunun DP ile kombinasyonunda, toplam hücre ve mitozaya giden hücre sayılarında dekspantenole göre anlamlı olmayan, fakat KAR'a göre anlamlı olan artışın dekspantenolün etkisi ile olduğu söylenebilir. DP ve KAR kombinasyonunun granül sayısında oluşturduğu artış tek başına uygulanan KAR'dan istatistiksel anlamlı düzeyde farklı bulunmamıştır. Bu gözlem DP'nin kollajen sentezi üzerine direkt etkisinin önemli düzeyde olmadığını doğrulamaktadır. Yine DP ve KAR kombinasyonunda, fuziform, vakuollü ve yuvarlak hücre sayılarında DP ve KAR'ın tek başlarına uygulanmalarına göre önemli ölçüde azalma olması, kombinasyonlarının yara iyileşmesinde daha iyi sonuç verebileceğini düşündürmektedir. Poligonal hücre yüzdeleri, toplam hücre sayıları ve granül sayılarında istatistiksel olarak önemli ölçüde artışın meydana gelmesi ve vakuollü hücre yüzdelerinin her iki maddenin de tek başlarına uygulanmaları ile kıyaslandığında büyük ölçüde azalma meydana gelmesi yaşanmayı geciktirici etkinin ortaya çıktığını düşündürmektedir. KAR'ın TECA ile kombinasyonunda; toplam hücre sayıları ve mitozaya giden hücre sayılarındaki farkın; KAR ve TECA'nın tek başlarına uygulanmaları ile alınan sonuçlarla karşılaştırıldığında anlamsız çıkması; TECA ve KAR'ın her ikisinin de yara iyileşimindeki etkilerinin kollajen sentezi üzerinden olduğunu, KAR'ın bu etkisinin; TECA'nın daha önce gösterilmiş olan kollajen sentezini stimüle edici etkisine benzediği söylenebilir (69). Poligonal hücre sayılarının artması, hücrelerin migrasyon yeteneklerinin de arttığını göstermektedir. Migrasyon ise yara iyileşiminde oldukça önem kazanmaktadır. Poligonal hücrelerin yüzdelerini arttıran DP ve TECA gibi, KAR'ın da bu özelliğe sahip olması yara iyileşiminde etkili olduğunu göstermektedir. Migrasyon ve hücre hareketleri için hücrelerin fuziform değil, poligonal olmasının gerektiği daha önce yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (141-143). PDCF ve FGF'ün, hücrenin fagositoz, pinositoz v.b. yeteneklerini, bunun yanı sıra migrasyon kabiliyetlerini arttırdığı, yapılmış olan çalışmalarda rapor edilmiştir (141,143). Özellikle TECA ve KAR'ın (poligonal hücre yüzdeleri ve ekzositozla hücre dışına atılan kollajen

granüllerinin artması sebebiyle), PDCF ve FGF sentezinin stimülasyonunda rol oynayabileceği düşünülebilir.

KAR'ın 10 µg/ml dozda uygulandığı hücrelerde; DMSO'nun uygulandığı hücelere nazaran toplam hücre ve poligonal hücre sayılarında anlamlı derecede azalma toksik etkinin olduğunun bir göstergesidir, fuziform, mitozaya giden, yuvarlak ve vakuollü hücre ve granül sayılarında istatistiksel anlamlılıktaki olmayan bir azalma görülmüştür. Bu yara terapötik etkinin yerine bu dozda toksik etkinin başladığını ya da antitümör etkinin ortaya çıktığını düşündürür. Daha önce *Arnebina nobilis*'ten elde edilen arnebin-1'in antitümör ve sitotoksik etkisi gösterilmiştir (112, 121, 122). Benzer etki bu dozda KAR'da da görülmüş olabilir. Fuziform hücre sayıları ise DMSO'ya göre ölçülebilir değerlerde değişmemektedir.

KAR'ın 1 µg/ml dozda uygulanmasında kollajen sentezini stimüle edici etkisine bağlı olarak gözlenen yara iyileştirici etkiye rağmen 10 µg/ml dozda uygulandığında görülen sitotoksik etki; karışımdaki iki maddeden birinin kollajen sentezini stimüle edici, diğerinin sitotoksik etkisinin olmasına bağlı olabilir. Yara iyileştirici etki ve 10 µg/ml'de görülen etkinin sınır noktasının anlaşılması için ara ve üst dozların denenmesi gerekir. Ayrıca iki maddenin de birbirlerinden ayrılarak aynı test sistemlerinde incelenmesi de bu düşüncemizin doğruluğunu araştırmak için uygulanmalıdır.

T15 fibroblast hücrelerinde yaptığımız çalışmaların primer tavuk embriyonik fibroblastları ile yaptığımız çalışmalarla paralellığı gözlenmiştir. T15 fibroblast hücrelerinde; Altıncı saatte ve 24. saatte Masson's trichrome tekniği ile boyamalar sonucunda; 6. saatte boyanan hücrelerde, DMSO uygulanan grupta toksik etki gözlenmesine rağmen, DMSO ile birlikte uygulanan test maddelerinde bu toksik etkiler yoktur, sitoplazmalarının pembe olarak görülmesi henüz yeni kollajen sentezinin olmadığını göstermektedir, kontrol grubu ile aralarında fazla bir fark yoktur. 24. saatte boyanan hücrelerde ise sitoplazmalarının mavimsi boyanmış olması yeni kollajen sentezini göstermektedir, kontrol grubunda ise sitoplazma yine pembe olarak görülmektedir (Şekil: 30-37).

DMSO'nun tek başına verilmesi ile toplam hücre, mitozaya giden hücre, poligonal hücre ve granül sayılarında ölçülebilir bir azalma, fuziform, vaküollü ve yuvarlak hücre sayılarında artış görülmüştür. Bu etki, DMSO'nun tavuk embriyonik fibroblastlarında görülen ve daha önce kaydedilmiş olan sitotoksik etkisi burada da görülmüştür.

DP'nin etkisi ile toplam, mitoza giden ve poligonal hücre sayılarında ve granül sayılarında artış, fuziform, vakuollü ve yuvarlak hücre sayılarında azalma görülmüştür. Toplam, mitoza giden ve poligonal hücrelerdeki etki doza bağlı iken, fuziform, yuvarlak ve vakuollü hücre sayılarındaki değişim doza bağlı görülmemiştir. Granül sayılarında da dozlar arası fark olmaması ve granül sayılarının TECA'daki kadar fazla olmaması kollajen sentezi üzerine direkt etkisi olmadığını, yara iyileştirici etkisinin mitotik aktivitesi ile ortaya çıktığı doğrulanmaktadır.

TECA uygulaması sonucu; DMSO'nun uygulandığı hücrelere göre; toplam hücre, mitoza giden hücre, poligonal hücre ve granül sayıları artarken, fuziform, vakuollü ve yuvarlak hücre sayıları azalmıştır. Özellikle granül sayısındaki artış, kollajen sentezini stimüle ederek yara iyileşimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Toplam hücre, poligonal hücre, fuziform hücre, vakuollü hücre ve granül sayılarındaki değişim doza bağlı görülürken, yuvarlak hücre ve mitoza giden hücrelerde doza bağlı değildir.

KAR'ın 1 µg/ml olarak uygulanan dozu; toplam, poligonal, mitoza giden hücre ve granül sayılarında DMSO'nun uygulandığı hücrelere göre artış, fuziform, vakuollü ve yuvarlak hücre sayılarında azalma görülmüştür.

KAR'ın 10 µg/ml dozda uygulanması; DMSO'nun uygulandığı hücrelere göre toplam ve poligonal hücre sayılarında azalmaya, vakuollü hücre sayılarında ölçülebilir bir artışa sebep olmuş, fuziform, mitoza giden, yuvarlak hücre ve granül sayılarında statiksel anlamlılıkta bir değişikliğe sebep olmamıştır.

Ayrıca bu fibroblastlar üzerinde gerçekleştirilen bu metodun; yaraların iyileşmesinde yer alan proliferatif faz için uygun bir yöntem ve tavuk embriyosu gibi kolay bulunan ve ucuz bir materyalle çalışmanın avantajlı olabileceği de gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bennet, N.T., Schultz, M.D., Gregory, S.: Growth factors and wound healing: Part II Role in normal and chronic wound healing. *Am. J. Surg.* **166**: 74-81, 1993.
2. Grinnell, F.: The activated keratinocyte: up regulation of cell adhesion and migration during wound healing. *J. Trauma* **30**: 144-148, 1990.
3. Langdon, R.C., Cuono, C.B., Birchall, N.B.: Reconstitution of structure and cell function in human skin grafts derived from cryopreserved allogeneic dermis and autologous cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatology* **91**: 478-481, 1988.
4. Sporn, M.B., Roberts, A.B.: *Peptide growth factors and their receptors I,II* Springer-Verlag, New York, 1991.
5. Langdon, R. C.: Wound healing. Ed.: Sams, W.M., Lynch, P.D., *Principles and practice of dermatology*. sf.69-73, Churchill Livingstone, New York, 1990
6. Langdon, R.C.: Wound healing. Ed.: Walter, J. B., Israel, M. C., *General Pathology*. sf. 117-129, Edinburgh, London, 1987.
7. Cuono, C.B., Langdon, R.C., Birchall, N.B.: Composite autologous-allogenic skin replacement: Development and clinical application. *Plast. Reconstr. Surg.* **80**: 626-635, 1987
8. Gallico, G.G., O'Conner, N.E., Compton, C.C.: Permanent coverage in large burn wounds with autologous cultured human epitelium. *N. Engl. J. Med.* **311**: 448-451, 1984.
9. Öztürk, Y., Altan, V.M., Yıldızoğlu-Arı, N.: Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.* **48**: 1-44, 1996.
10. Langdon, R.C., Cuono, C.B., Birchall, N.B.: Cryopreserved dermis is an ideal substrate for the engraftment and maturation of human epidermal keratinocyte cultures. *Mater Res. Soc. Symp.* **110**: 363-370, 1988.

11. Mansbridge, J.N., Knapp, A.M.: Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **89**: 253-263, 1987.
12. Lawrence, T.W., Sporn, M.B., Gorschboth, B.S., Norton, J.A., Grotendorst, G.R.: The reversal of an adriamycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factors. *Ann. Surg.* **203**:142-147, 1986
13. Nishida, T., Taranaka, H., Nakagawa, S., Sasane, T., Manabe, R.: Fibronectin synthesis in by the rabbit cornea; effects of mouse epidermal growth factor and cyclic AMP analogs. *Jpn. J. Ophthalmol.* **196**: 196-202, 1984
14. Efron, J.E., Frankel, H.L., Lazarou, S.A., Wasserkrug, H.L.: Wound healing and T lymphocytes. *J. Surg. Res.* **48**: 460-463, 1990.
15. Woudley, D.T., Peterson, H.D., Herzog, S.R.: Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils. *J. Am. Med. Assoc.* **259**: 2566- 2571, 1988.
16. Ross, R.: The fibroblasts and wound repair. *Biol. Rev.* **43**: 51-96, 1986.
17. Grotendorst, G.: Can collagen metabolism be controlled? *J. Trauma* **24**(suppl): S49-S52, 1984.
18. Buonnassisi, V.: Sulfated mucopolisaccharide synthesis and secretion in endotelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* **76**: 363-368, 1973
19. Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., Nachman, R.L.: Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endotelial cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1906-1909, 1974.
20. Stanley, J.R., Alvarez, D.M., Bere, E.W.: Detection of basement membrane zone antigens during epidermal wound healing in pigs. *J. Invest. Dermatol.* **77**: 240-243, 1981.
21. Noyan, A.: Fizioloji Ders Kitabı, sf.475-483, Meteksan, Ankara, 1984.

22. Guyton, A.C.: Tıbbi Fizyoloji (Çeviri: Prof. Dr. Nuran Gökhan), Cilt 1, Sf.115, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1988.
23. Kayaalp, S.O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji., Cilt 3, Sf.2887-2911, Feryal Matbaacılık, Ankara, 1990.
24. Nathan, C.F.: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**: 319-326, 1987
25. Schmith, J.A., Mizel, S.B., Cohen, D., Green, I.: Interleukin-1, a potential regulation of fibroblasts proliferation. *J. Immunol.* **128**: 2177-2182, 1982
26. Cromack, D.T, Porras-Reyes, B., Mustoe, T.A.: Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. *J. Trauma* **30**(suppl): S129-S133, 1990
27. Steenfos, H.H, Hunt, T.K., Scheuenstuhl, H., Goodson, W.H.: Selective effect of tumor necrosis factor-alpha on wound healing in rats. *Surgery* **106**: 171-176, 1989
28. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assosian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., Fauci, A.S.: Transforming growth factor- β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4167-6171, 1986
29. Buckley-Sturrock, A., Woodward, S.C., Senior, R.M.: Differential stimulation of collagenase and chemotactic activity in fibroblasts derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. *J. Cell. Physiol.* **138**: 70-78, 1989.
30. Finesmith, T.H., Broadley, K.N., Davidson, J.M.: Fibroblasts from wounds of different stages of repair vary in their ability to contract a collagen gel in response to growth factors. *J. Cell. Physiol.* **144**: 99-107, 1990.
31. Robert, C.J., Birkenmeier, T.M., McQuilan, J.J., Akiyama, S.K., Yamada, S.S., Wen-Tien, C., Yamada, K.M., McDonald, J.A.: Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human

- fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**: 4586-4592, 1988.
32. Assosian, R.K., Sporn, M.B.: TGF- β in human platelets release during platelet degranulation and action of vascular smooth muscle cell. *J. Cell Biol.* **102**: 1217-1223, 1986.
33. Ross, R., Glomset, B., Kariya, B., Harker, L.: A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1207-1210, 1974.
34. Darby, I, Skalli, O., Gabbiani, G.: α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblast during experimental wound healing. *Lab. Invest.* **63**: 21-29, 1990.
35. Peacock, E.E.: *Wound Repair*. WB Saunders, Philadelphia, 1984.
36. Bingöl, G. *Biyokimya*. Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, 1983.
37. Wayne, M.B.: *The World of the Cell*. The Benjamin/Cummings, California, 1986
38. Woodley, D.T. , O'Keefe EJ, Prunieras M. Cutaneous wound healing: A model for cell-matrix interaction. *J. Am. Acad. Dermatology.* **12**:420-433, 1985
39. Sage, H., Bornstein, P.L.: Endothelial cells from umbilical vein and hemangioendothelioma secrete basement membrane largely to the exclusion of interstitial collagens. *Arteriosclerosis* **2**:27-36, 1982.
40. Sage, H., Pritzel, P., Bornstein, P.: Characterization of cell matrix-associated collagens synthesized by aortic endothelial cells in culture. *Biochemistry* **20**: 436-442, 1991.
41. Moscatelli, D., Jaffe, E., Rifkin, D.B.: Tetradecanoyl phorbol acetate stimulates latent collagenase production by cultured human endothelial cell. *Cell* **20**: 343-351, 1980.

12. Duncan, M.R. , Berman, B.: Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J. Exp. Med.* **162**: 516-527, 1985.
13. Ross, R., Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F.: The biology of platelet derived growth factor. *Cell* **46**: 155-169, 1986.
14. Ganong, W.F.: Review of medical physiology. Appleton&Lange, Los Altos, California, 1987.
15. Knighton, D.R., Phillips, G.D., Fiegel, V.D., Griffin, G.L., Klagsbrun, M., Davidson, J.M.: Wound healing angiogenesis : Stimulation by basic fibroblast growth factor. *J. Trauma* **30**(suppl.): S134-S143, 1990.
16. Gospodarowicz, D., Bialeck, H., Tharkal, T.K.: The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Exp. Eye Res.* **28**: 501-514, 1979.
17. Carrel, A., Burrows, M.T.: Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. *J. Am. Med. Assoc.* **55**: 1379-1381, 1910.
18. Stearns, M.L.: Studies on the development of connective tissue in transparent chambers in the rabbit ear.I. *Am. J. Anat.* **66**: 133-140, 1940.
19. Folkmann, J., Klagsbrun, M.: Angiogenic factors. *Science* **235**: 442-447, 1987.
20. Fong-Fong, C., Olden, K.: The expression of ceruloplasmin, an angiogenic glycoprotein, by mouse embryonic fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 15-24, 1985.
21. Kelman, C., Bruce A.M.: Models of wound healing. *J. Trauma* **30**(suppl.): S149-S155, 1984.
22. Rosen, H., Blumenthal, A., McCallum, J.: Effect of asiaticoside on wound healing in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **125**: 279-280, 1967.

53. Hsu, T.C.: Karyology of the cells in culture: A. Preparation and analysis of karyotypes and idiograms. Ed.: Kruse, F.P, Patterson, M.K., *Tissue Culture Methods and Application*. p.764-767, Academic Press, New York, 1973.
54. Kruse, F.P., Petterson, M.K.: *Tissue Culture Methods an Application*. Academic press, New York, 1973.
55. Stein, H.D., Keiser, H.R.: Collagen metabolism in granulating wounds. *J. Surg. Res.* **11**: 277, 1971.
56. Diegelmann, R.F., Rothcopf, L.C., Cohen, I.K. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. *J. Surg. Res.* **19**: 239-243, 1975.
57. Pieters, L., De Bruyne, T., Van Poel, B., Vingerhoets, T.J., Vanderberghe, D., Vlietinck, A.: *In vivo* wound healing activity of Dragon's blood (*Croton* spp.), a traditional south American drug, and it is constituents. *Phytomedicine* **2**: 17-22, 1995.
58. Schilling, J.A., Joel, W., Shurley, H.M.: Wound healing: A comparative study of the histochemical changes in granulation tissue contained in stainless steel wire mesh and polyvinyl sponge cylinder. *Surgery* **46**: 702-710, 1959.
59. Schilling, J.A.: Wound healing. *Physiol. Rev.* **48**:374-423, 1968.
60. Vilijanto, J.: Cellstic: A device for wound healing studies in man: Description of the method. *J. Surg. Res.* **20**: 115, 1976.
61. Goodson, W.H., Hunt, T.K.: Development of a new miniature method for the study of wound healing in human subject. *J. Surg. Res.* **33**: 394, 1982.
62. Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J., Cohen, I.K.: A subcutaneous implant for wound healing studies in humans. *J. Surg. Res.* **40**: 229-237, 1986.
63. Lindblad, W.J., Diegelmann, R.F.: Quantitation of hydroxyproline isomers in acid hydrolisates by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **138**: 390, 1984.

34. Lundberg, C.: Inflammatory reaction and collagen accumulation in an experimental model of open wounds in the rat. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **19**: 11-16, 1985
35. Diegelmann, R.F., Kim, J.C., Lindblad, W.J., Cohen, I.K.: Collection of leucocytes, fibroblasts and collagen within an implantable reservoir tube during tissue repair. *J. Leuk. Biol.* **42**: 667-672, 1987
36. Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.J., Werb, Z.: Wound macrophages express TGF- α and other growth factors *in vivo*: Analysis of m-RNA phenotyping. *Science* **241**: 709-712, 1988
37. Inderbir, S.: *Text book of human histology (with colour atlas)*. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, India, 1987.
38. Johnson, K.E.: *Histology and Cell Biology*. Sf.65-101, Williams and Wilkens, Baltimore, 1991.
39. Alemdar, N.: *Sitoloji Ders Kitabı*, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 1983.
40. Gene, L., Yoshihiko, Y., de Crombrughe B.: Coordinate regulation of the levels of type III and type I collagen mRNA in most but not all mouse fibroblast. *J. Biol. Chem.* **260**: 531-536, 1985.
41. Uitto, J.: Cell-cell and cell-matrix interaction in the skin. *Lab. Invest.* **69**: 133-135, 1993.
42. Li, K., Tamai, K., Tan, E.M.L. , Uitto, J.: Cloning of type XVII collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 180 kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG 2) predict an interrupted collagenous domain a transmembrane segment and unusual features in the 5'- end of the gene and the 3'- untranslated region of the m-RNA. *J. Biol. Chem.* **268**: 8825-8834, 1993.
43. Vuorio, E., de Crombrughe, B.: The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem.* **39**: 837-872, 1990.

74. Uitto, J., Fazzio, M.J.: Biology and pathology of the extracellular matrix in dermis. Ed.: Sater, N.A., Baden, H.P., *Pathophysiology of dermatologic disease*. pp.349-367. McGraw-Hill, New York, 1990.
75. Oikarinen, A.: Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis. *Phytotherap. Phytoimmunol. Phytomed.* **19**: 47-52, 1994
76. Emonard, H., Grimaud, J-A.: Matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Biol.* **36**: 131-153, 1990
77. Murphy, G.J.P., Murphy, G., Reynolds, J.J.: The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Let.* **289**: 4-7, 1991.
78. Fessler, L., Duncan, K.G., Fessler, J.H., Salo, T.: Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J. Biol. Chem.* **259**: 9783-9789, 1984.
79. Murphy, G., Reynolds, J.J., Bietz, U., Baggiolini, M.: Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analyses of their actions on soluble and insoluble collagen. *Biochem. J.* **203**: 209-221, 1982.
80. Oikarinen, A., Autio, P.: New aspect of the mechanism of corticosteroid-induced dermal atrophy. *Clin. Exp. Dermatol.* **16**: 416-419, 1991.
81. Kivirikko, K.I., Laitinen, O., Prockop, D.J.: Modification of a specific assay for dihydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.* **19**: 249-255, 1976.
82. Brown, G.L., Curtsinger, L.J., White, M., Mitchell, R.O., Pietsch, J., Nordquist, R., von Fraunhofer, A., Schultz, G.: Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β . *Ann. Surg.* **208**: 788-794, 1988.
83. Bancroft, J.D., Stevens, A.: *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, Londra, 1977

34. Yamada, K.M.: Cell surface interaction with extracellular material. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 761-799, 1983.
35. Takashima, A., Billingham, R.E., Grinnell, F.: Activation of rabbit keratinocyte fibronectin receptor function *in vivo* during wound healing. *J. Invest Dermatol.* **86**: 585-590, 1986.
36. Rouslathi, E.: Fibronectin and its receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 375-413, 1988.
37. Martin, G.R., Kleinman, H.K., Terranova, V.P., Ledbetter, S., Hassell, J.R.: The regulation of basement membrane formation and cell-matrix interactions by defined supramolecular complexes. *Ciba Found Symp.* **108**: 197-212, 1984
38. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox M.M.: *Principles of biochemistry*. pp.312-315, Worth Publishers, New York, 1993.
39. Hassel, J.R., Kimura, J.H., Hascall, V.C.: Proteoglycan core protein families. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 539-568, 1986.
40. Rouslathi, E.: Structure and biology of proteoglycans. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**: 229-255, 1988.
41. Cavari, S., Fiorella, G., Vannucchi, S.: Binding and growth-inhibitory effect of heparin and oligoheparin (2 kDa) in Balb/c 3T3 cells: lack of effect on PDCF- or serum- induced inositol lipid turnover. *Br. J. Pharmacol.* **113**: 254-260, 1994.
42. Bowman, W.C., Rand, M.J.: *Textbook of pharmacology*. Blackwell, Oxford-London, 1980.
43. Charonis, A.S., Skuibitz, A.P.N., Koliakos, G.G., Reger, L., Dege, J., Vogel, A.M.: A novel synthetic peptide of the B1 chain of laminin with heparin-binding and cell-adhesion promoting activities. *J. Cell Biol.* **107**: 1253-1256, 1988.
44. Martin, G.R., Timpl, R.: Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **3**: 57-87, 1987.

95. Reynolds, J.E.F.: *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, p.1625. The Pharmaceutical Press, London, 1993.
96. Mayers, F.H., Jawetz, E., Goldfien, A.: *Review of Medical Pharmacology*. pp.38-39, Lange, Los Altos-California, 1980
97. Kligman, A.M.: Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide. *J. Am. Med. Assoc.* **193**: 796-923, 1965.
98. Rubin, L.F., Mattis, P.A.: Dimethyl sulfoxide: Lens changes in dogs during oral administration. *Science* **153**: 83, 1966.
99. Freshney, R.I.: *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss, New York, 1994.
100. Pollard, J.W., Walker, J.M.: *Animal Cell Culture*. Humana Press, New Jersey, 1990.
101. Jakoby, W.B., Pastan, I.H.: *Cell culture - Methods in Enzymology*, Vol.58, Academic Press, San Diego, 1979.
102. Lacroix, B., Didier, E., Grenier, J.F.: Effect of pantothenic acid on fibroblastic cell culture. *Res. Exp. Med.* **188**: 391-396, 1988.
103. Lawrence, J.C.: The morphological and pharmacological effects of asiaticoside upon skin *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* **1**: 414-424, 1967.
104. Zeybek, N.: *Farmasötik botanik*. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1985.
105. Maquart, F.-X., Bellon, G., Gillery, P., Wegrowski, Y., Borel, J.-P.: Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connect. Tissue Res.* **24**: 107-120, 1990.
106. Sarma, D.N.K., Khosa, R.L.: Antiulcer activity of *Tinospora cordifolia* Miers and *Centella asiatica* Linn. extracts. *Phytother. Res.* **9**: 589-590, 1995

07. Kırimer, N., Bozan, B., Başer, K.H.C.: A new naphthaquinone from the roots of *Arnebia densiflora*. *Fitoterapia* **66**: 499-500, 1995.
08. Bozan, B.: *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. Bitkisinden elde edilen naftakinonların gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılabilirliğinin araştırılması. Doktora Tezi Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1994
09. Papageorgiou, V.P.: Naphthaquinones from roots of *Macrotomia cephalotes* DC. *Planta Med.* **37**: 259-263, 1979.
10. Papageorgiou, V.P.: Naturally occurring isonaphthazarin pigments: A new class of drugs. *Planta Med.* **38**: 194-203 1980.
11. Tanaka, S., Mayumi, T., Tsukada, M., Tabuta, M.: A comparative study an anti-inflammatory activities of the enantiomers shikonin and alkannin. *J. Nat. Prod.* **49**: 466-469, 1986.
12. Katti, S.B., Shukla, Y.N., Tandon, J.S.: Arnebin derivates for anticancer activity. *Ind. J. Chem.* **18B**: 440-442, 1979.
13. Papageorgiou, V.P.: Wound healing properties of naphthaquinone pigments from *Alkanna tinctoria*. *Experientia* **34**: 1499-1501, 1978.
14. Papageorgiou, V.P., Mellidis, A.S., Segredos, A.N.: Study on the antibiotic fraction of *Alkanna tinctoria* Tausch. *Chem. Chron.* **9**: 57-63, 1980.
15. Futagoishi, H., Abe, T.: Application of the extract of *Lithospermi radix* to cosmetics. *Cosmetics Perfumery* **88**: 51-53, 1973.
16. Papageorgiou, V.P., Winkler, A., Sagredos, A.N., Diegenis, G.A.: Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of naphthaquinones and other constituents of *Alkanna tinctoria*. *Planta Med.* **35**: 56-60, 1979

17. Wahab, S., Tandon, R.N., Jakob, Z., Chandra, B., Sarivastava, O.P.: Comparative *in vitro* and *in vivo* effect of lactones and arnebins on *Trichophyton mentagrophytes* and *Candida albicans*. *Ind. J. Med. Res.* **76**: 77-82, 1982.
18. Başer, K.H.C., Honda, G., Miki, W.: *Herb Drugs and Herbalists in Turkey*. *Studia Culturae Islamicae* 27 Tokyo, 1986
19. Sankawa, U., Ebizuka, Y., Miyazaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S., Inomata, M., Fukuoka, F.: Antitumor activity of shikonin and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **25**: 2392-2395, 1977.
20. Wassel, G., El-Meshawi, B., Saeed, A., Gamal, M.: Screening of selected plants for Pyrrolizidine alkaloids and antitumor activity. *Pharmazie* **42**: 709, 1987.
21. Kenneth, D.P., Cheng, Z., Robert, K.Y., Cheng, C.C.: Some substituted Naphthazarin as potential anticancer agents. *J. Med. Chem.* **19**: 337-339, 1976.
22. Gupta, S.K., Mathur, I.S.: Effect of *Arnebia nobilis* and its naphthaquinones in rat Walker Carcinosarcoma 256. *Ind. J. Cancer* **9**: 50-55, 1972; *CA* **77**: 148065k, 1972.
23. Wagner, B., Kreher, B., Jurcic, K.: *In vitro* stimulation of human granulocytes and lymphocytes by pico- and femtogram quantities of cytostatic agents. *Arzneim. Forsch.* **38**: 273-75, 1988.
24. Aktan, Y.: *Arnebia densiflora* (Nord.) Ledeb. kök ekstresinin antienflamatuvar, analjezik, yara iyileştirici ve karaciğer üzerine olan etkileri. Yüksek lisans tezi Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1994
25. Udupa, S.L., Udupa, A.L., Kulkarni D.R.: Anti-inflammatory and wound healing properties of *Aloe vera*. *Fitoterapia* **65**: 141-145, 1994.
26. Haggars, J.P., Pelley, R.P., Robson, M.C.: Beneficial effect of *Aloe* in wound healing. *Phytoter. Res.* **7**: S48-S52, 1993.

27. Bunyapraphatsara, N., Jirakulchaiwong, S., Thirawarapan, S., Manonukul, J.: The efficacy of *Aloe vera* cream in the treatment of first, second and third degree burns in mice. *Phytomedicine* **2**: 247-251, 1996.
28. Budavari, S.: *The Merck index.*, p.726, Merck Co., Rahway, N.J., 1989.
29. Udupa, S.L., Udupa, A.L., Kulkarni, D.R.: Studies on the anti-inflammatory and wound healing properties of *Moringa oleifera* and *Aegle marmelos*. *Fitoterapia* **65**: 119-123, 1994.
30. Udupa, S.L., Udupa, A.L., Kulkarni, D.R.: Influence of *Tridax procumbens* on dead space wound healing. *Fitoterapia* **62**: 146-150, 1991.
31. Grumadhva, R.S., Udupa, L., Udupa, S.L., Rao, P.G.M., Rao, G., Kulkarni, D.R.: *Calendula* and *Hypericum*: Two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. *Fitoterapia* **62**: 508-510, 1991.
32. Conti, M., Cristoni, A., Magistretti, M.J.: Activity of Delphinidin on microvascular damage models in rodents. *Phytother. Res.* **6**: 99-103, 1993.
33. Subramania, S., Nagarajan, S.: Wound healing activity of *Pongamia pinnata* and *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia* **59**: 143-144, 1988.
34. Palanichamy, S., Bhraskar E.A., Bakthavathsalam, R., Nagarajan, S.: Wound healing activity of *Cassia alata*. *Fitoterapia* **62**: 153-156, 1991.
35. Goldman, R.S., De Freitas, P.C.D., Oga, S.: Wound healing and analgesic effect of crude extracts of *Symphytum officinale* in rats. *Fitoterapia* **56**: 323-329, 1985.
36. Santhanam, G., Nagarajan, S.: Wound healing activity of *Curcuma aromatica* and *Piper betle*. *Fitoterapia* **61**: 158-159, 1990.
37. Hedge, D.A., Khosa, R.L., Chansouria, J.P.N.: A study of the effect of *Wedelia calendulacea* Less. on wound healing in rats. *Phytother. Res.* **8**: 439-440, 1994.

138. Vanden Berge, D.A., Yang, Q.R., Totté, J., Vlietinck, A.J.: Specific stimulation of human endothelial cells by *Triticum vulgare* extract and its biologically active fraction. *Phytother. Res.* **7**: 172-178, 1993.
139. Baserga, R.: *Cell Growth and Division: A practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1990.
140. Goldstein, A.: *Biostatistics. An introductory text*. Macmillan, New York, 1964
141. Gherard, E.: Growth factor and cell movement. *Eur. J. Cancer* **27**: 403-405, 1991.
142. Bretscher, M.S.: Fibroblast on the move. *J. Cell Biol.* **106**: 235-237, 1988.
143. Schereier, T., Degen, E., Baschong, W.: Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing. *Res. Exp. Med.* **193**: 195-205, 1993.