



**PROBİYOTİK KAYNAKLI PARAPROBİYOTİK VE POSTBİYOTİĞİN
YARA İYİLEŞMESİ VE MOLEKÜLER İNFLAMASYON
MEKANİZMASINDAKİ ROLÜ**

Merve İÇİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Merve İÇİN

07/02/2023

PROBİYOTİK KAYNAKLI PARAPROBİYOTİK VE POSTBİYOTİĞİN YARA İYİLEŞMESİ VE MOLEKÜLER İNFLAMASYON MEKANİZMASINDAKİ ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Merve İÇİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2023

ÖZET

Yaralar, normal anatomik yapıda bir dizi işlev kaybıyla birlikte oluşan doku bozulmalarıdır. Mevcutta bulunan tedavi yöntemleri, yara iyileşme sürecinde yardımcı olsa da çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında, özellikle kronik yaraları hedef alacak yeni ajanlara ve tedaviye yönelik yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısı ile son dönemde, kronik yaraları hedefleyen terapötik doğal biyoaktif bileşiklere yönelik çalışmalara ilgi artmıştır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, probiyotik *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşundan elde edilen paraprobiyotik ve postbiyotiklerin deri yaralarının iyileşmesindeki potansiyel rollerinin birçok mekanizma üzerinden ortaya konulması amaçlanmaktadır. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının fibroblast migrasyonu üzerine etkisi L929 fare fibroblast hücreleri ile oluşturulan *in vitro* yara modelinde incelenmiştir. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yarada yaygın olarak bulunan patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan uygulamaların, L929 hücrelerinde TGF- β 1/Smad sinyal yolağı ile ilişkili genler (TGF- β 1 ve Smad-2/3/4) ile ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinden kollajen tip 1 alfa 1 (COL1A1), fibronektin (FN); Raw264.7 hücrelerinde anti-inflamatuar sitokinler ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenerek oluşturulan inflamasyon modeli ile pro-inflamatuar sitokinlerin mRNA ekspresyon düzeyleri q-RT PCR yöntemi ile belirlenmiştir. *In vitro* yara modelinde, paraprobiyotiklerin yara iyileşmesinde postbiyotiklerden daha etkin olduğu, yarayı 12. saat itibari ile kapatarak iyileşme sürecini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Her iki probiyotik kaynaklı ürünün de antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu, patojen gelişimini durdurduğu ve inhibe ettiği belirlenmiştir. Postbiyotiklerin düşük dozlarda dahi paraprobiyotiklerden daha etkili antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Postbiyotiklerin inhibisyonunun ağırlıklı asitliğe bağlı düşen pH ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Buna bağlı olarak, paraprobiyotik ve postbiyotikler patojenlerin gelişimini inhibe ederek yaranın kronikleşmesini önleyebilmektedirler. Postbiyotiklere kıyasla paraprobiyotik uygulamaları TGF- β 1/Smad sinyal yolağında TGF- β 1, Smad-2/3/4 genlerinin ekspresyon seviyelerini artırarak yara iyileşmesinde oldukça etkilidir ($p<0,05$). Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin COL1A1 ve FN gen ekspresyonu seviyelerini artırarak ECM oluşumunda etkili olabilecekleri gösterilmiştir ($p<0,05$). Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı üretimlerini baskılayarak yaranın kronikleşmesini önledikleri tespit edilmiş olup, anti-inflamatuar sitokinlerin ekspresyon seviyelerini artırarak da pro-inflamatuar sitokin üretimini baskılayabildikleri belirlenmiştir ($p<0,05$). Ek olarak, bu iki probiyotik kaynaklı ürün, kronik yara oluşumunu engellerken aynı zamanda iyileşme sürecinde etkili pro-inflamatuar sitokinlerin oluşumunda da etkilidirler ($p<0,05$). Sonuçta, probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinin farklı mekanizmalarında her ikisinin de etkili olduğu ancak paraprobiyotüğün daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Sonuçlarımıza göre, yara iyileşme sürecinin tüm fazlarında etkili TGF- β 1/Smad moleküler sinyal yolağı üzerinde etkili olması, ECM oluşumu ve yara kapatmada da aynı ölçüde başarı göstermesi ile özellikle paraprobiyotikler yara iyileşmesinde kullanılacak alternatif yeni terapötik bir ajan olarak önerilebilir. Aynı zamanda, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin inflamasyondaki regülatör etkisi, patojen bakterileri inhibe ederek kronik yaraları önleyici ve tedavi edici özellikleriyle iyileşme sürecinde etkili oldukları belirlenmiştir. Bu durum, probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinde kullanılacak alternatif yeni ajanlar olabileceklerini göstermektedir.

Bilim Kodu : 20309

Anahtar Kelimeler : Yara iyileşmesi, probiyotik, paraprobiyotik, postbiyotik, L929 fare fibroblast hücre hattı, RAW264.7 fare makrofaj hattı

Sayfa Adedi : 89

Danışman : Prof. Dr. Belma ASLİM

THE ROLE OF PROBIOTIC GENERATED PARAPROBIOTIC AND POSTBIOTIC IN WOUND HEALING AND THE MECHANISM OF MOLECULAR INFLAMMATORY

(M. Sc. Thesis)

Merve İÇİN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2023

ABSTRACT

Wounds are tissue disruptions that occur with a series of loss of functions in the normal anatomical structure. Although current treatment methods help in the wound healing process, they are often insufficient. Considering this situation, there is a need for new agents to specifically target chronic wounds and new approaches to treatment. Therefore, recently, there has been an increased interest in studies on therapeutic natural bioactive compounds targeting chronic wounds. In this master thesis, it is aimed to reveal the potential roles of paraprobiotics and postbiotics obtained from the probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 strain in the healing of skin wounds through many mechanisms. The effects of paraprobiotic and postbiotic treatments on fibroblast migration were investigated in an *in vitro* wound model created with L929 mouse fibroblast cells. The antimicrobial activities of paraprobiotics and postbiotics on pathogens commonly found in the wound were determined by the broth microdilution method. The applications were made in L929 cells with genes associated with TGF- β 1/Smad signaling pathway (TGF- β 1 and Smad-2/3/4) and extracellular matrix (ECM) proteins collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) and fibronectin (FN); the mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines in the inflammation model induced by lipopolysaccharide (LPS) and anti-inflammatory cytokines in Raw264.7 cells were determined by q-RT PCR method. In the *in vitro* wound model, it was determined that paraprobiotics were more effective than postbiotics in wound healing, and had a positive effect on the healing process by closing the wound as of the 12th hour ($p < 0.05$). It has been determined that both probiotic-derived products have antimicrobial properties, stop and inhibit the development of pathogens. It has been determined that postbiotics show more effective antimicrobial properties than paraprobiotics even at low doses. The inhibition of postbiotics was thought to be predominantly related to the decreasing pH due to acidity. Accordingly, paraprobiotics and postbiotics can prevent the chronicity of the wound by inhibiting the development of pathogens. Compared to postbiotics, paraprobiotic treatments are highly effective in wound healing by increasing the expression levels of TGF- β 1, Smad-2/3/4 genes in TGF- β 1/Smad signaling pathway ($p < 0.05$). It has been shown that paraprobiotics and postbiotics can be effective in ECM formation by increasing COL1A1 and FN gene expression levels ($p < 0.05$). It was determined that paraprobiotics and postbiotics prevented the wound from becoming chronic by suppressing the excessive production of pro-inflammatory cytokines, and it was determined that they could suppress pro-inflammatory cytokine production by increasing the expression levels of inflammatory cytokines ($p < 0.05$). In addition, these two probiotic-derived products are effective in the formation of pro-inflammatory cytokines that are effective in the healing process, while preventing the formation of chronic wounds ($p < 0.05$). As a result, it was determined that both probiotic-derived paraprobiotics and postbiotics were effective in different mechanisms of wound healing, but paraprobiotic gave better results. According to our results, especially paraprobiotics can be recommended as an alternative new therapeutic agent to be used in wound healing, as they are effective on TGF- β 1/Smad molecular signaling pathway, which is effective in all phases of the wound healing process, and with the same success in ECM formation and wound closure. At the same time, it has been determined that paraprobiotics and postbiotics are effective in the healing process with their regulatory effect on inflammation, inhibition of pathogenic bacteria, and preventive and therapeutic properties of chronic wounds. This shows that probiotic-derived paraprobiotics and postbiotics can be alternative new agents to be used in wound healing.

Science Code : 20309

Key Words : Wound healing, probiotic, paraprobiotic, postbiotic, L929 mouse fibroblast cell line, RAW264.7 mouse macrophage cell line

Page Number : 89

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLİM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayıp, her konuda yol gösteren, yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a teşekkür ederim. Tez sürecim boyunca, deneysel çalışmalarımındaki yardımları ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan değerli hocam Öğr. Gör. Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY'a ve ekip arkadaşım Abdullah DEMİR'e en içten duygularıyla teşekkür ederim. Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım ve bana her konuda yardımcı olup, destekleyen değerli arkadaşlarım Buse DENGİZ, Belgin GÜLDESTE, Jaafar AKEF, Reyhan KILIÇKAYA, Merve Sena KARA ve Ebrar BAKKALOĞLU başta olmak üzere tüm Biyoteknoloji ekibine ve Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeli Sayın Doğan KARA'ya teşekkürlerimi borç bilirim. Beni bugünlere getiren ve her zaman, her konuda yanımda olup beni destekleyen annem Naile İÇİN, babam Kemal İÇİN, kardeşim Furkan İÇİN ve anneannem Zehra AKAR'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Yara ve Yara Oluşum Mekanizması	5
2.1.1. Yara iyileşmesinde etkili lokal faktörler.....	5
2.1.2. Yara iyileşmesinde etkili sistemik faktörler	6
2.2. Yaraların Sınıflandırılması.....	7
2.2.1. Akut yaralar	8
2.3. Yara İyileşmesinin Ekonomi Üzerine Etkileri	10
2.4. Yara İyileşmesinde Kullanılan Güncel Tedavi Yöntemleri	11
2.5. Yara İyileşme Fazları	12
2.5.1. Hemostaz fazı	12
2.5.2. İnflamasyon fazı	13
2.5.3. Proliferasyon fazı.....	15
2.5.4. Yeniden şekillenme (Remodelling) fazı ve skar oluşumu	16
2.6. Yara İyileşmesinde TGF- β 1/Smad Yolağının Rolü.....	17
2.7. Probiyotikler.....	20
2.9. Paraprobiyotikler.....	21

	Sayfa
2.10. Postbiyotikler	22
2.11. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesi üzerine etkileri.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Çalışmalarda kullanılan mikroorganizma	25
3.1.2. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları	25
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. <i>L. plantarum</i> GD2 suşunun kültür koşullar ve muhafazası	26
3.2.2. McFarland değerinin ayarlanması	27
3.2.3. McFarland 10 değerine ayarlanan bakteri süspansiyonun koloni hesabı .	27
3.2.4. Paraprobiyotik eldesi	27
3.2.5. Postbiyotik eldesi.....	28
3.2.6. Hücre kültürlerinin hazırlanması	28
3.2.7. MTT analizi	29
3.2.8. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi.....	29
3.2.9. <i>In vitro</i> yara modeli (Scratch Assay) ve yara kapanma analizi	30
3.2.10. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin gen düzeyinde belirlenmesi	31
3.2.11. İstatistiksel analiz.....	37
4. DENEYSEL BULGULAR	39
4.1. Paraprobiyotik ve Postbiyotik Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	39
4.1.1. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının L929 hücre hattı canlılığı üzerine etkileri	39
4.1.2. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının RAW264.7 hücre hattı canlılığı üzerine etkileri	41
4.2. Paraprobiyotik ve Postbiyotiklerin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi	42

Sayfa

4.3. Paraprobiyotik ve Postbiyotik Uygulamalarının Yara Kapanması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	46
4.3.1. Paraprobiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri	46
4.3.2. Postbiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri	48
4.4. Paraprobiyotik ve Postbiyotiklerin Uygulamalarının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Gen Düzeyinde Belirlenmesi	50
4.4.1. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin TGF- β 1/Smad yolağı üzerindeki modölatör etkilerinin belirlenmesi	50
4.4.2. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri üzerindeki modölatör etkilerinin belirlenmesi	53
4.4.3. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin inflamasyon fazı üzerindeki modölatör etkileri	55
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	89

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. L929 (ATCC®CCL-1™) ve RAW264.7 (ATCC®TIB-71™) hücre hatlarına ait özellikler (İnternet 2 ve 3).....	25
Çizelge 3.2. MRS broth ve agar besiyeri içeriği	26
Çizelge 3.3. Uygulama gruplarının çalışmada kullanılan konsantrasyonları.....	30
Çizelge 3.4. qRT-PCR mix içeriği	33
Çizelge 3.5. qRT-PCR reaksiyonları.....	33
Çizelge 3.6. <i>In vitro</i> yara modeli ve PCR çalışmalarındaki uygulama grupları	34
Çizelge 3.7. <i>In vitro</i> inflamasyon modeli çalışmalarındaki uygulama grupları.....	34
Çizelge 3.8. Çalışmada kullanılan primer dizileri (FW: İleri primer, RV: Geri primer)	35
Çizelge 4.1. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin MİK ve MBK değerleri.....	43

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Akut yara iyileşmesinde rol oynayan hücreler	8
Şekil 2.2. Kronik yara durumu ve kronik yarada rol alan hücreler	9
Şekil 2.3. Kronik yaraların ekonomik yükünün coğrafi dağılımı	11
Şekil 2.4. A. Nötrofiller ve ardından makrofajların yara bölgesinde fagositozu. B. Fibroblast proliferasyonunu uyarmak amacıyla büyüme faktörlerinin salınımı	14
Şekil 2.5. Proliferasyon ve yeniden şekillenme faz sonrası yaranın kapanması	17
Şekil 2.6. TGF- β 1'in yara iyileşmesi fazlarında rolü	18
Şekil 2.7. TGF- β 1/Smad sinyal yolağı mekanizması aktivasyonu	19
Şekil 2.8. Probiyotiklerin yara enfeksiyonlarına yol açan patojen bakterilere karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal etkiler	20
Şekil 3.1. Kullanılan primerler ile hedef gen bölgelerinin erime eğrileri	36
Şekil 4.1. Paraprobiyotik uygulamalarının L929 hücreleri üzerindeki % canlılık sonuçları	39
Şekil 4.2. Postbiyotik uygulamalarının L929 hücreleri üzerindeki % canlılık sonuçları	40
Şekil 4.3. Paraprobiyotik uygulamalarının RAW64.7 hücreleri üzerindeki % canlılık sonuçları	41
Şekil 4.4. Postbiyotik uygulamalarının RAW264.7 hücreleri üzerindeki % canlılık değerleri.....	42
Şekil 4.5. Paraprobiyotik uygulamalarının MBK sonuçları	44
Şekil 4.6. Postbiyotiklerin uygulamalarının MBK sonuçları	45
Şekil 4.7. Paraprobiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri.....	47
Şekil 4.8. Paraprobiyotik uygulamaları sonucunda % yara kapanma oranları.....	48
Şekil 4.9. Postbiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri	49
Şekil 4.10. Postbiyotik uygulamaları sonucunda % yara kapanma oranları	50
Şekil 4.11. Paraprobiyotiklerin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modülatör etkileri	51

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. Postbiyotiklerin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modölatör etkileri	52
Şekil 4.13. Paraprobiyotiklerin COL1A1 ve FN üzerindeki modölatör etkileri	53
Şekil 4.14. Postbiyotiklerin COL1A1 ve FN üzerindeki modölatör etkileri.....	54
Şekil 4.15. Paraprobiyotiklerin TNF- α , IL-6 ve IL-1 β üzerindeki modölatör etkileri...	56
Şekil 4.16. Postbiyotiklerin TNF- α , IL-6 ve IL-1 β üzerindeki modölatör etkileri	57
Şekil 4.17. Paraprobiyotiklerin IL-10 ve IL-4 üzerindeki modölatör etkileri.....	58
Şekil 4.18. Postbiyotiklerin IL-10 ve IL-4 üzerindeki modölatör etkileri	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

>	Büyüktür
%	Yüzde
<	Küçüktür
°	Derece
°C	Santigrat derece
CFU/mL	Koloni oluşturan birim/mililitre
g	Gram
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

Açıklamalar

COL1A1	Kollajen tip I alfa I
ECM	Ekstrasellüler matriks
FGF- β	Temel fibroblast büyüme faktörü
FN	Fibronektin
IL-1	İnterlökin 1
IL-10	İnterlökin 10
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IL-4	İnterlökin 4
KGf	Keratinosit büyüme faktörü
LPS	Lipopolisakkarit
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyon
MMP	Matriks metalloproteinaz
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
SF	Serum fizyolojik

Kısaltmalar**Açıklamalar**

TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TGF-β1	Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
TGF-β2	Dönüştürücü büyüme faktörü beta 2
TGF-β3	Dönüştürücü büyüme faktörü beta 3
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Amerika Birleşik Devletleri'nde kronik yaralar 6 milyon üzeri insanı etkilemektedir, yaşlanan nüfus ve diabetes mellitus prevalansının yüksek olması nedeniyle bu sayının artması beklenmektedir. 2004 yılında yapılan bir analiz, kronik yaraların tüm insan deri hastalıklarının tıbbi maliyet merkezi olduğunu ve yalnızca bir yılda Amerika Birleşik Devletleri'nde 9,7 milyar dolara mal olduğunu ortaya çıkarmıştır (Powers, Higham, Broussard ve Phillips, 2016). Yara iyileşmesi, birçok düzenleyici faktörden etkilenebilen doğal bir biyolojik süreçtir (Guo ve DiPietro, 2010). Yaralar, bir takım patolojik süreçlerden kaynaklanabilir. Kazalar veya bir hastalık sürecinin sonucu meydana gelebilirler. Yaralanma, nedeni ve şekli ne olursa olsun dokuya zarar verir (Lazurus ve diğerleri, 1994; Robson, 1997). Yaralar klinik olarak akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir ve genel olarak süreci dört faz içerir: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme-skar oluşumu (Alonso ve diğerleri, 1996; Reinke ve Sorg, 2012). Akut yaralar, travmatik bir doku kaybı veya cerrahi işlem sonucu oluşabilir ve iyileşme süresi 5 ila 30 gün arasında değişir (Lazurus ve diğerleri, 1994; Robson, 1997). Kronik yaralar ise inflamasyon sürecinin uzamasına bağlı olarak iyileşmenin diğer fazlarının tamamlanamaması sonucu oluşurlar. Diyabet, damar veya arter hastalıkları, ileri yaş ve enfeksiyon gibi bazı faktörler kronik yara oluşumuna sebep olmaktadır (Guo and DiPietro, 2010). Kronik yaralar, özellikle tedavi süreçlerinin getirdiği maliyetleri nedeniyle sağlık sistemleri için dünya çapında büyük bir sorundur (Şen ve diğerleri, 2009). Bu nedenle, ekonomik olarak en az gelişmiş ülkeler için finansal erişilebilir olan tedaviler üzerine yapılacak çalışmalara ihtiyaç artmaktadır (Greer ve diğerleri, 2013). Yara iyileşme tedavilerinin ve yara bakım malzemelerinin neden oldukları ekonomik yükleri göz önüne alındığında düşük maliyetli, üretimi kolay ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunmayan terapötik ajanların yara iyileşmesi tedavi ve malzemelerinde kullanılabilir hale getirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır.

Sağlık üzerindeki olumlu etkilerine rağmen probiyotikler, kısa ömürlü olmaları, canlılık ve stabilitenin korunmasında zorluklar, türe özgü davranışlar, bakteriyel translokasyona sebep olma ihtimalleri ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde bakteriyemi antibiyotik direnci geliştirme, virülans gen transferi gibi olumsuz etkileri üzerinde durulmaktadır (Belete ve diğerleri, 2017; Evivie ve diğerleri, 2017; Suez ve diğerleri, 2019). Canlı probiyotiklerde yaşanan bu tür sıkıntılar sebebiyle paraprobiyotik ve postbiyotik olmak üzere iki yeni

kavram ortaya çıkmıştır. Paraprobiyotikler, Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü'nün (FAO/WHO) tarafından "yeterli miktarlarda uygulandığında, insanlara fayda sağlayan inaktive (canlı olmayan) mikrobiyal hücreler" olarak tanımlanmaktadır (Aguilar-Toala, 2018). Paraprobiyotikler, hücre zarf bileşenleri, peptidoglikan, teikoik asit, hücre duvarı polisakkaritleri, hücre yüzeyi ile ilişkili proteinler ve proteinli filamentleri olarak kategorize edilirler (Singhal ve diğerleri, 2018). Postbiyotikler ise konakçıda biyolojik aktiviteye sahip mikroorganizmalardan kaynaklanan canlı olmayan bakteriyel ürünler veya metabolik ürünler olarak tanımlanmaktadır (Taverniti ve Guglielmetti, 2011). Postbiyotikler genel olarak hücre içermeyen süpernatant, vitaminler, organik asitler, kısa zincirli yağ asitleri, salgılanan proteinler, bakteriyosinler, nörotransmitterler, salgılanan biyosüpfaktanlar, amino asitleri içermektedir (Cavallari ve diğerleri, 2017). Paraprobiyotik ve postbiyotikler, konakta en az canlı bakteriler kadar olumlu etkiler göstermektedirler. Kolit gibi inflamasyonla ilişkili sindirim sistemi doku hasarları, ülseratif yaralar, intestinal mukozit, enfekte ve enfekte olmayan yaralar üzerinde de etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Varian ve diğerleri, 2017; Russo ve diğerleri, 2019; Batista ve diğerleri, 2020; França, 2021; Nam ve diğerleri, 2021). Ek olarak postbiyotiklerin anti-inflamatuar, antimikrobiyal, anti-proliferatif, anti-oksidan aktivitelere sahip olmaları dikkate alındığında bu özellikleri ile paraprobiyotik ve postbiyotiklerin probiyotiklerden daha etkili ve stabil yara iyileştirici ajan olarak kullanım potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir (Hill ve diğerleri, 2014; Zolkiewicz ve diğerleri, 2020; Siciliano ve diğerleri, 2021; Yeşilyurt ve diğerleri, 2021). Bu etkilerinin özellikle yara iyileşme mekanizması üzerindeki rolleri tam aydınlatılmamış, yara iyileştirici ajan olarak kullanılabilme potansiyelleri net olarak ortaya konulmamıştır.

Günümüzde, yara iyileşmesinde kabul görmüş tedavi yöntemleri arasında büyüme faktörleri, gen terapisi, kök hücre terapisi, yara pansuman ve ikameleri yer almaktadır. Ancak, bu tedavi yöntemlerinin etkisinin yetersiz olup, zaman zaman tedavi sürecinde komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu durum da göz önüne alındığında, özellikle kronik yaraları hedef alacak yeni ajanlara ve tedaviye yönelik yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin özellikle yara iyileştirici ajanlar olarak kullanılması güncel literatürlerde yakın zamanda yerini almaya başlamış olup, konu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, bu ajanların etkilerini yara iyileşmesinin hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarındaki moleküler mekanizmalar ile gerçekleştirdiğini ortaya koyan bir çalışma literatürde mevcut değildir. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin immünomodülatör/immünoregülatör etkileri üzerine

alışmalar bulunmakla birlikte bu etkilerinden dolayı yara iyileşmesinde ve özellikle kronik yaralarda immün düzenleyici olarak kullanımlarına yönelik kapsamlı çalışmalar olmadığı dikkat çekmiştir. Literatürdeki bu eksikliklerden yola çıkılarak bu tez çalışması kapsamında aşağıdaki amaç ve hedefler belirlenmiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında;

- Yara iyileşmesinde kullanılabilecek etkili bir ajan olarak probiyotik *Lactobacillus plantarum* yeni isimlendirmesi ile *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşu kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesi mekanizmalarından inflamasyon, migrasyon, ekstrasellüler matriks proteinlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi,
- Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinde etkin doz seviye ve sürelerinin belirlenmesi,
- Kronik bir yara sebebi olan enfeksiyon oluşumuna karşı paraprobiyotik ve postbiyotiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi,
- *In vitro* yara modeli ile paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara bölgesindeki fibroblastların göçü (migrasyonu) ile ilişkili olarak yara kapatma potansiyelinin ortaya konması,
- Probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinin proliferasyon ve yeniden şekillenme fazları için kritik öneme sahip ekstrasellüler matriks proteinlerinden (ECM) kollajen ve fibronektin ekspresyon düzeylerine etkilerinin belirlenmesi,
- Bu probiyotik kaynaklı ürünlerin, kronik yaralarda yara iyileştirici ajanlar olarak tanımlanmaları hedeflenen, TGF-β1/Smad sinyal yolağı üzerindeki etkisini ortaya koyarak, bu yolla ilişkili olabilecek migrasyon, inflamasyon, ECM oluşumu araştırılarak kronik yaralarda paraprobiyotik ve postbiyotiğın kullanılabılme potansiyelinin ortaya konması,
- Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin kronik yara için kritik olan inflamatuvar fazdaki sitokinlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkilerinin incelenerek TGF-β1/Smad moleküler sinyal yolağı ile yaradaki inflamatuvar yolağ arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Yukarıda belirtilen amaçlar doğrultusunda, bu tez çalışması kapsamında, yara iyileşmesinin birçok fazı üzerinde etkili probiyotik kaynaklı kronik yara oluşumunda önemli olan inflamasyonu düzenleyici ve beraberinde fırsatçı patojenler üzerinde de antimikrobiyal etkiye sahip yeni bir doğal bileşenin bulunması hedeflenmiştir. Ayrıca, probiyotik kaynaklı ürünlerden TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aracılığıyla yara iyileşmesinde fibroblast migrasyonu ve kollajen sentezini indükleyici yeni bir yara iyileştirici ajan elde edilmesi de bu tez çalışmasının bir diğer hedefidir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Yara ve Yara Oluşum Mekanizması

Yara, derinin epitel bütünlüğünün bozulma durumudur ve zamanla alttaki dokunun yapı ve işlevinin bozulması da bu süreci takip edebilir. Yaralar, fiziksel travmalar (sıyrık, kesik, batma, ezik, yanık gibi) veya hastalıklar gibi birçok farklı nedenle oluşur, beraberinde, damar, sinir ve kas gibi yapılarla birlikte iç organ ve dokuları da etkileyebilir (Velnar, 2009). Yara iyileşmesi, doku yaralanmasına karşı doğal bir fizyolojik tepkidir. Bununla birlikte, yara iyileşmesi çok sayıda hücre tipi, sitokin, mediatör ve vasküler sistem arasındaki karmaşık etkileşimi içerir (Kangal ve Regan, 2022). Yara iyileşmesi, sürekli ve birbiri ile örtüşen dört fazdan (hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme-skar oluşumu) oluşan dinamik bir süreçtir. Bu süreç, düzenli bir şekilde gerçekleşmelidir. Yaralar, genellikle 4 ila 6 hafta içinde iyileşir. Ancak, süreçteki kesintiler, anormallikler veya uzama, yara iyileşmesinin gecikmesine ya da iyileşmeyen kronik yaraya yol açabilir (Guo ve Dipetrio, 2009). Bu tür yaralar sıklıkla ertelenmiş, tamamlanmamış veya koordinasyonsuz bir iyileşme süreci nedeniyle patolojik bir inflamasyon durumu ile sonuçlanmaktadır (Mathieuve diğerleri, 2006; Menke ve diğerleri, 2007). Cilt yaraları, dünya çapında sağlık sistemleri ve ekonomi üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Gelişmiş ülkelerde, kronik yara tedavisi ile ilgili harcamaların toplam sağlık harcamalarının %3'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir. İyileşme oranlarının günbegün düşmesi nedeniyle durumun daha da kötüleşmesi muhtemeldir (Raziyeva ve diğerleri, 2021). Yaraların oluşumunda genel olarak sistemik ve lokal faktörler etkilidir.

2.1.1. Yara iyileşmesinde etkili lokal faktörler

Oksijenasyon

Oksijen ve hücre metabolizması özellikle ATP aracılığıyla enerji üretimi için önemlidir ve hemen hemen tüm yara iyileşme süreçleri için kritiktir. Yaraları enfeksiyondan korur, keratinosit farklılaşmasını, göçünü ve anjiyogenezi indükler; fibroblast proliferasyonunu, kollajen sentezini ve yeniden epitelizasyonu artırır ve yara kontraksiyonunu destekler. Oksijenlenmenin sağlanamadığı yaralarda iyileşme süreci kesintiye uğrar (Bishop, 2008; Rodriguez ve diğerleri, 2008). İlerleyen yaş ve diyabet de dahil olmak üzere birçok

sistemik durum, bozulmuş vasküler akışa neden olarak zayıf doku oksijenasyonuna neden olabilir. Bu durum, hipoksik bir yara oluşumuna neden olabilir (Tandara ve Mustoe, 2004). Yaralanmadan sonra geçici hipoksi yara iyileşmesini tetiklemektedir. Uzun süreli veya kronik hipoksi yara iyileşmesini geciktirir (Bishop, 2008; Rodriguez ve diğerleri, 2008).

Enfeksiyon

İnflamasyon, yara iyileşme sürecinin normal bir parçasıdır ve kontamine mikroorganizmaların uzaklaştırılması için önemlidir. Bakteri ve endotoksinler, interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) gibi proinflatuar sitokinlerin uzun süreli salınımına yol açabilir ve inflamatuar fazı uzatabilir. Uzun süreli salınımına bağlı olarak, yara kronik bir duruma girebilir ve iyileşmeyebilir (Edwards and Harding, 2004). Yine enfekte yaralarda bulunan bakteriler, biyofilm oluşturarak mikro ortamlar geliştirirler. Bu durum da yaranın kronikleşmesine neden olmaktadır (Davis ve diğerleri, 2008).

2.1.2. Yara iyileşmesinde etkili sistemik faktörler

Yaş

Günümüz dünyasında yaşlı nüfus (60 yaş üstü insanlar) hızla artmaktadır ve artan yaş, yara iyileşmesinde bozulma için önemli bir risk faktörüdür (Dünya Sağlık Örgütü, WHO). Hücresel ve moleküler seviyedeki birçok klinik ve hayvan çalışması, yaşa bağlı değişiklikleri ve yara iyileşmesindeki gecikmeleri incelemiştir (Gosain and DiPietro, 2004). Geciken yara iyileşmesi, yaşlılarda, kemokin üretimindeki değişiklikler ve azalmış makrofaj fagositik kapasitesi ile yara bölgesine gecikmiş T-hücresi infiltrasyonu gibi bir inflamatuar yanıtla ilişkilidir (Swift ve diğerleri, 2001).

Stres

Stres, insan sağlığı ve sosyal davranışlar üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Kardiyovasküler hastalıklar, kanser, bozulmuş yara iyileşmesi ve diyabet gibi birçok hastalık stresle ilişkilidir (Glaser ve Kiecolt-Glaser, 2005). Çok sayıda çalışma, nöroendokrin bağışıklık dengesinin stres kaynaklı bozulmasının sağlık açısından önemli olduğunu doğrulamaktadır (Vileikyte, 2007).

Diyabet

Diyabet, bozulmuş yara iyileşmesinin önde gelen nedenlerinden biridir. Diyabet hastalığına sahip kişilerde meydana gelebilecek herhangi bir küçük yaralanma genellikle enfeksiyona yatkın olan kronik, iyileşmeyen ülserlere yol açar. Bu kişilerde, enfeksiyon kangrene ve nihayetinde amputasyon ihtiyacına neden olmaktadır. Diyabetik hastalar, kronik yaralarda en yüksek amputasyon oranına sahiptirler (Greenhalgh, 2003).

Tiroid disfonksiyonu

Tiroid hormon eksikliği, kardiyovasküler, pulmoner, renal ve merkezi sinir sistemi fonksiyonlarında bozukluklara neden olur ve ilaç metabolizmasını cerrahi komplikasyonlara zemin hazırlayabilecek şekilde değiştirir. Birçok çalışma, tiroid fonksiyon bozukluğu olan hastalarda kollajen sentezi değişimini bildirmektedir (Chhabra ve diğerleri, 2017).

Obezite

Çeşitli çalışmalar, yağ dokusunun doğasında var olan azalmış vasküleritenin yara komplikasyonlarına yol açtığını bildirmektedir. Ayrıca obezite, kronik, düşük dereceli bir inflamatuvar süreci indükler (Pitanguy ve diğerleri, 2000).

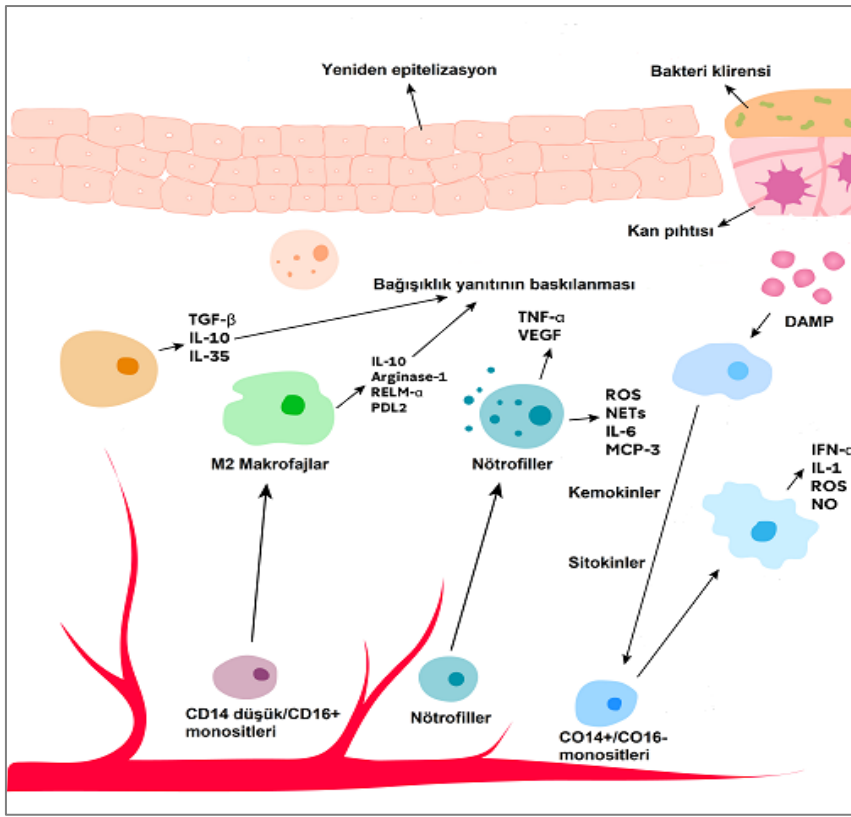
İyileşmeyi bozan lokal ve sistemik faktörlere ek olarak, azalan doku büyüme faktörleri, hücre dışı matrisi bozan matriks metalloproteinazlar gibi artan proteolitik enzimler, aşırı nötrofil infiltrasyonu (basınç ülserlerinde olduğu gibi) gibi artmış inflamatuvar araçlar ve yaşlanan hücrelerin yüzdesi kronik yaralar için potansiyel biyobelirteçler olabilir (Monika ve diğerleri, 2022).

2.2. Yaraların Sınıflandırılması

Deri yaraları tipik olarak akut ve kronik olarak ikiye ayrılır.

2.2.1. Akut yaralar

Akut yaralar, genellikle normal yara iyileşme sürecine göre zamanla iyileşen travmatik veya cerrahi yaralardır. Akut yara iyileşmesi, birçok farklı hücre tipi (koruyucular, resolvinler ve maresin gibi pro-çözücüler), büyüme faktörü, sitokin ve kemokin tarafından düzenlenen (Şekil 2.1) karmaşık bir fizyolojik süreç olup; hayatta kalmak için yaralanmaya vücudun doğal tepki verme şeklidir (Martin, 1997; Gurtner ve diğerleri, 2008; Leoni ve diğerleri, 2015).

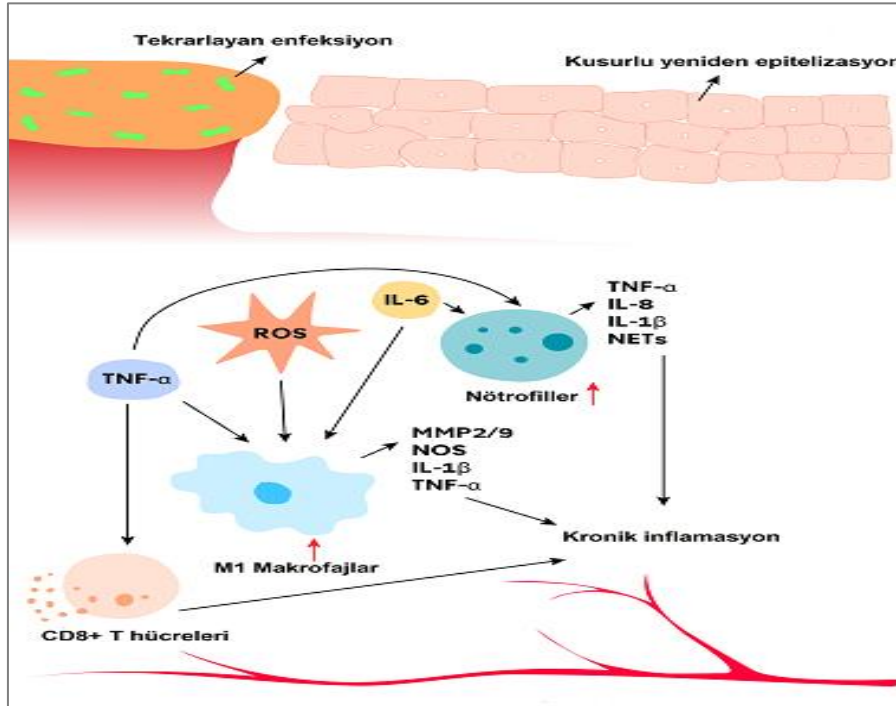


Şekil 2.1. Akut yara iyileşmesinde rol oynayan hücreler (Ozgok ve diğerleri, 2022)

2.2.2. Kronik Yaralar

Kronik yaralar ise beklenen bir zaman çerçevesi içinde iyileşememelerine bağlı olarak ağırlıklı olarak inflamasyon sürecinin sürekli devam ettiği bir inflamasyon (kronik inflamasyon) ortamı oluşturan ve buna bağlı olarak da tekrarlayan inflamasyon sebebiyle yüksek sayıda inflamatuvar hücrenin (yüksek konsantrasyonlarda reaktif oksijen türleri (ROS) ve aynı zamanda sırasıyla matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) varlığı ile karakterize edilirler. Yaraya eşlik eden çeşitli patojenlerin (*Staphylococcus aureus* ve

Pseudomonas aeruginosa ve *Candida albicans*) neden olduğu enfeksiyonlar, yaraların iyileşme sürecini bozmakta ve uzamasına, yaranın kronikleşmesine neden olmaktadır (Şekil 2.2). Yaraların enfeksiyonu bakteriyemi veya sepsise yol açabilir ve buna yüksek mortalite ve morbidite eşlik eder (Hirsch ve diğerleri, 2009; Serra ve diğerleri, 2015). Ayrıca, yaranın kronikleşmesinin önemli bir nedeni olan lokal veya sistemik inflamasyona yol açmaktadır (Zhu ve diğerleri, 2016; Kim ve diğerleri, 2014). Kronik bir yaradaki bir bakteriyel biyofilm (BBF), yara yatağına bağlanan ve film tarafından salgılanan hücre dışı matris (ECM) ile kaynaşmış bakteriler tarafından oluşturulan membranöz bir dokudur. Bakteri ve ürünleri, (ECM, nekrotik doku vb.) klinik basınç ülseri, diyabetik ayak ülseri, alt ekstremitte arteriyovenöz ülseri ve diğer kronik yaralarda daha sık görülmektedir (Wei ve diğerleri, 2019). Özellikle kronik alt ekstremitte ülserleri, iyileşme sürecinde zamanında iyileşmeyen ve dünya çapında sağlık sistemleri için büyük bir zorluk haline gelen ülserlerdir. Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde, bu yaralar tahmini olarak 2,4-4,5 milyon insanı etkilemektedir. Bu tür ülserler ortalama 12 ila 13 ay sürer, hastaların %60 ila %70'inde tekrarlar, fonksiyon kaybına ve yaşam kalitesinin düşmesine neden olabilir ve önemli bir morbidite nedenidir (Frykberg ve Banks, 2015).

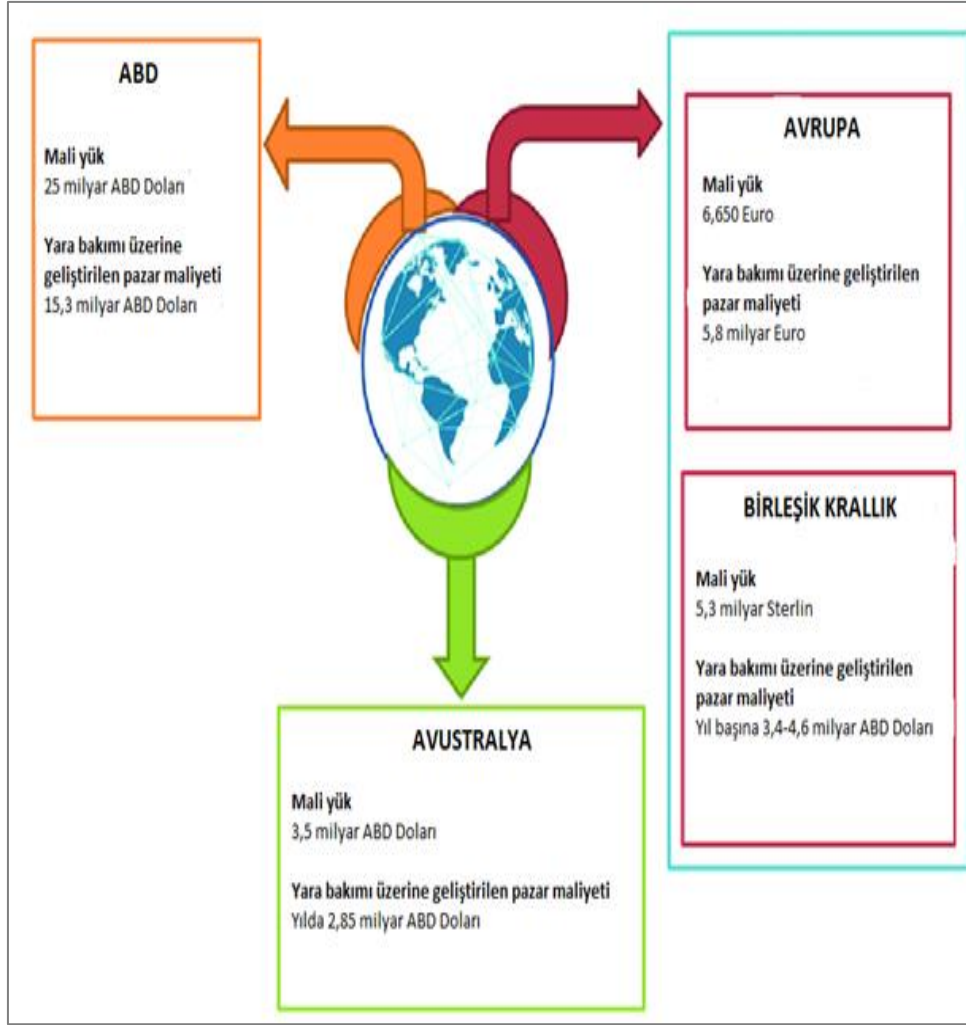


Şekil 2.2. Kronik yara durumu ve kronik yarada rol alan hücreler (Ozgok ve diğerleri, 2022)

Kronik yaralar genellikle yetişkin popülasyonu etkiler; venöz yetmezlik, diyabet ve nöropatiler, hareket edememe ve/veya omurilik yaralanması (basınç ülserleri) ve arteriyel yetmezlik komplikasyonlarının sonucudur (Leoni ve diğerleri, 2015; Falanga ve diğerleri, 2022). Kronik yaralar, her yıl milyonlarca hastayı etkilemekte ve morbidite ve mortalitelerine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu tip yaralar, ekonomik yükleri ve yaşam kalitesindeki azalma üzerindeki önemli etkilerinin yanı sıra hastalarda artan ölüm riski nedeniyle önemli bir etkiye sahiptir (Leaper ve diğerleri, 2015).

2.3. Yara İyileşmesinin Ekonomi Üzerine Etkileri

Çok sayıda hastalık süreciyle birlikte, yara iyileşmesine dahil olan olaylar zinciri etkilenebilir; sonuç olarak da tıbbi sistemler ciddi derecede kaynak tüketirken, hastaları günlük yaşantılarında sıkıntıya maruz bırakan kronik, iyileşmeyen yaralarla sonuçlanabilir. Bir yaranın iyileşmesi, birçok faktörü bir arada gerektirir ve yara pansumanları ve tedavileri, enfeksiyondan hipoksiye kadar yara iyileşmesinin önündeki olası engelleri ortadan kaldırabilmek için önemli ölçüde geliştirilmeye çalışılmaktadır. Optimal durumda bile, yara dokusu hiçbir zaman yaralanma öncesi gücüne ulaşmaz ve birden fazla anormal iyileşme durumu, iyileşmeyen kronik yaralara neden olabilir. Özellikle kronik yaralar olmak üzere yaralanmaların neden olduğu rahatsızlıklar, doku bütünlüğünün geri kazanımından ziyade esas olarak yara onarımını sınırlayan tedavi ve yönetim prosedürleriyle ilgilidir (Han ve Ceilley, 2017; Monika ve diğerleri, 2022). Kronik yaraların Avrupa nüfusunun yaklaşık %1'ini etkilediği bilinmektedir. Kronik yaralar, etkilenen bireylerin yaşam kalitesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmanın yanı sıra önemli bir ekonomik yük de oluşturmaktadır: sağlık bütçelerinin yaklaşık %2'si kronik yaraların tedavisine ayrılmaktadır (Schreml ve diğerleri, 2010). 2014 yılında yapılan bir araştırmaya göre kronik yaraların tedavi maliyeti yıllık 28,1 ile 31,7 milyar dolar arasında değişmektedir (Jarbrink ve diğerleri, 2016). Şekil 2.3.'te kronik yaraların Avustralya, Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Birleşik Krallık'ta ekonomik etkilerinin 2021 yılına ait verileri verilmiştir.



Şekil 2.3. Kronik yaraların ekonomik yükünün coğrafi dağılımı (Gupta ve diğerleri, 2021)

Yara iyileşmesi üzerine kullanılan güncel tedavi yöntemleri ile ilgili gerek ön çalışmalar gerek mevcutta yapılmakta olan klinik çalışmalar devam etmektedir. Devletler üzerine getirdiği mali yük ile birlikte hasta refahını olumsuz yönde etkileyen hatta ölümle sonuçlanabilen yara iyileşmesi üzerine kullanılabilecek, özellikle kronik yaraları hedef alacak yeni ajan ve tedavilere yönelik yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Yara İyileşmesinde Kullanılan Güncel Tedavi Yöntemleri

Dünya çapında, şekilsel olarak bozulmalar ve meydana gelen ölümlerin en büyük nedenlerinden biri meydana gelen yaralardır. Günümüzde, yara iyileşmesi üzerine birçok tedavi stratejileri geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Genel olarak, yara iyileşmesi üzerine kullanılan tedavi yöntemleri hastalar ve sağlık sistemleri açısından ciddi oranlarda mali yük sebebidir (Singh ve diğerleri, 2013). Mevcutta yara iyileşmesinde

kullanılan tedaviler arasında büyüme faktörleri, gen terapisi, kök hücre terapisi, yara pansuman ve ikameleri yer almaktadır (Singh ve diğerleri, 2013; Dreifke ve diğerleri, 2015).

2.5. Yara İyileşme Fazları

Deri, insan vücudundaki en büyük organdır; hidrasyon, kimyasallardan ve patojenlerden korunma, D vitamini sentezi başlatma, atılım ve termal düzenleme gibi farklı süreçlerde çok önemli bir rol oynar. Bu nedenle, deride oluşabilecek ciddi bir hasar yaşamı tehdit edici olabilir (Tottoli ve diğerleri, 2020). Yara iyileşmesi, derinin bariyer işlevini sürdürmede kritik öneme sahip, karmaşık ve oldukça düzenli bir süreçtir (Han ve Ceilley, 2017). Yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme-skar oluşumu fazlarını içeren karmaşık bir süreçtir.

2.5.1. Hemostaz fazı

Hemostaz fazı, yaralanmadan hemen sonra başlayarak yaralanmanın 4 veya 6. gününe kadar devam eder. Bu faz; doku hasarı, mikrovasküler hasar ve kanın yaraya ekstrevasyonu ile karakterizedir, aynı zamanda inflamatuvar süreci başlatır (Velnar ve diğerleri, 2009). Yaralanmadan hemen sonra trombosit hücreleri yara bölgesine ilk olarak göç eden hücrelerdir. Trombosit hücreleri, iyileşmenin ileriki fazlarında birden fazla hormon, kemokin ve sitokin salgıladıkları için yalnızca hemostaz fazı değil tüm iyileşme sürecinin aşamalarında kritik bir öneme sahiptir. Trombositler, aktive olmak ve ilk pıhtıyı oluşturmak için hasarlı subendotelyumun kollajeni üzerindeki GpIIb-IIIa reseptörü ile etkileşime girer. Aktive olan trombositler, granüllerini serbest bırakarak pıhtılaşma sürecini başlatır. (Robson ve diğerleri, 2001; Kenneth, 2012). Oluşan kan pıhtısı, fibrin molekülleri, fibronektin, vitronektin ve trombospondinler içerir; plateletlerin, lökositlerin, keratinositlerin, fibroblastların ve endotel hücrelerinin göçü için bir iskele yapısı, büyüme faktörleri için de bir rezervuar olarak geçici matrisi oluşturur (Broughtonve diğerleri, 2006).

2.5.2. İnflamasyon fazı

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonunu içeren inflamasyon fazında, nötrofiller ve monositler yara bölgesine hızla göç ederler. İnflamasyon fazı, hemostaz fazı ile eşzamanlıdır ve hücrel yanıtın süresine, ilgili inflamatuvar hücrelere bağlı olarak erken ve geç faz olarak ikiye ayrılır (Hart, 2002).

Erken inflamatuvar faz (yaralanmanın 1. ve 2. günü)

Bu süreçte, yaralanmadan sonraki 24-48 saat içinde hücre dışı matris proteini parçaları, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), tamamlayıcı bileşenler (C3a, C5a) gibi birçok kemoatraktan tarafından yara bölgesine çekilen nötrofil granüositleri (polimorfonükleer lökositler) ile yaranın infiltrasyonu gerçekleşir (Hart, 2002). Kısa bir süre içinde polimorfonükleer lökositler komşu kan damarlardaki endotel hücrelerine yapışmaya (marjinasyon) ve damar duvarında aktif olarak hareket etmeye (diapedez) başlar (Broughton ve diğerleri, 2006). Yara bölgesindeki bakterileri ve diğer yabancı partikülleri, parçalayıcı enzimleri ve oksijenden türetilen serbest radikalleri serbest bırakarak fagosite eder (Şekil 2.4.A). Bu süre boyunca yara kenarındaki bazal hücreler artmış mitotik aktivite sergilemeye başlar, yara bölgesinde bazal membran bileşenleri birikir (Richardson ve diğerleri, 2004). Polimorfonükleer lökositlerin aktivitesi genellikle yaralanmadan sonraki birkaç gün içinde durur (yarayı kontamine eden bakteriler temizlendikten sonra). Kalan hücreler, yara yüzeyine kabuk olarak ekstrüzyon veya makrofajlar tarafından fagositoz yoluyla yaradan temizlenir. Polimorfonükleer lökositlerin ana işlevi, yaranın bakteriyel kontaminasyonunu en aza indirmek, böylece enfeksiyonu önlemektir (Hart, 2002; Broughton ve diğerleri, 2006).

Geç inflamatuvar faz (yaralanmanın 2. ve 3. günü)

Pıhtılaşma bileşenleri, immünoglobulin G (IgG) parçaları monositleri yara bölgesine çekerler. Monositler yara bölgesine ulaştıklarında fenotipik değişime uğrayarak makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar, inflamasyon sürecinin sonraki (48-72 saat) aşamalarında bulunan en önemli hücrelerdir ve onarım için anahtar düzenleyici hücreler olarak rol alırlar (Hart, 2002). Patojenlerin ve hücre artıklarının fagositozunu gerçekleştirmenin yanı sıra büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler salgılayarak

iyileşme sürecinin devamını sağlarlar (Gonzalez ve diğerleri, 2016) (Şekil 2.4.B). Makrofajlardan salınan sitokinler arasında IL-1, IL-6 ve TNF- α pro-inflamatuar sitokinler yer almaktadır. Bu sitokinler; keratinosit stimülasyonu ve fibroblast proliferasyonu, ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin sentezi ve parçalanması, fibroblast kemotaksisi ve immünyanın düzenlenmesi dahil olmak üzere yara bölgesindeki çeşitli süreçleri etkileyebilirler (Nguyen ve diğerleri, 2017). Aktive edilmiş bir makrofaj, proliferatif faza geçiş için de önemlidir; anjiyogeneze aracılık eder (Arıtaş, 1992).



Şekil 2.4. A. Nötrofiller ve ardından makrofajların yara bölgesinde fagositozu. B. Fibroblast proliferasyonunu uyarmak amacıyla büyüme faktörlerinin salınımı (desJardins-Park ve diğerleri, 2018)

İnflamasyon fazı, yara iyileşme sürecinin bir parçasıdır ve yara bölgesinde kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların uzaklaştırılması için hayati öneme sahiptir. Yaralanma durumunda derinin zarar görmüş bölümünden bakteri girişinin olması kaçınılmaz bir durumdur. Bu durum, bağışıklık sisteminin baskılanarak özellikle kronik deri lezyonları olan kişilerde komplikasyonlara ve ileri süreçlerde ölümlere yol açar. Her bakteri, IL-1 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin uzun süreli salınımına neden olabilir ve bu durum, inflamatuvar süreci uzatabilir. İnflamasyon sürecinin uzaması yaranın kronikleşerek iyileşmemesine neden olur. Yara bölgesinde bulunan bakteriler, yara yatağına yapışan, bakterileri koruyan ve çoğalmalarını artıran glikoprotein açısından

zengin biyofilm üreterek yarayı enfekte ederler. Biyofilm matrisi, bakterileri zorlu koşullara karşı dayanıklı ve antibakteriyel tedavilere dirençli hale getirir. Ek olarak, biyofilmler çok çeşitli kronik hastalıklara neden olmakta ve bakterilerde ortaya çıkan antibiyotik direnci nedeniyle etkili bir tedavi sağlanamamaktadır (Tottoli ve diğerleri, 2020; Visha ve Karunagaran, 2022).

2.5.3. Proliferasyon fazı

Proliferatif faz, yaralanmanın 3. günü başlayarak 2 hafta kadar devam eder. Fibroblast göçü, hücre dışı matrisin birikmesi ve granülasyon dokusunun oluşumu ile karakterize edilir. Proliferatif fazın ilerleyen dönemlerinde hemostazda oluşan geçici fibrin/fibronektin matrisinin yerini yeni oluşan granülasyon dokusu alır. Yara epitelizasyonu ile birlikte proliferatif faz sonlanır (Şekil 2.5) (Diegelmann ve Evans, 2004).

Fibroblast göçü

Yaralanmayı takiben, fibroblastlar, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve TGF- β dahil olmak üzere bir dizi faktör tarafından yara bölgesine çekilir. Yaranın içine girdikten sonra fibroblastlar çoğalır ve matriks proteinleri fibronektin, hyaluronan, daha sonra kollajen ve proteoglikanları üretir. Bu bileşenler, hücrelerin büyümesini destekler ve onarım sürecinde gerekli olan yeni hücre dışı matrisin oluşturulmasına yardımcı olur (Greenhalgh, 1998).

Kollajen sentezi

Yara iyileşmesinin tüm aşamaları için önemli bir bileşen olan kollajenler, fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Özellikle, proliferatif ve remodelling aşamalarında dokulara bütünlüğünü ve gücünü geri kazandırmak için anahtar bir rol oynarlar. Kollajenler aynı zamanda yara içerisinde hücre içi matriks oluşumu için temel rol oynarlar (Robson ve diğerleri, 2001).

Hücre dışı matris oluşumu

Hücre dışı matris, proteoglikan ve glikozaminoglikan jeli içine gömülü, lifli yapısal proteinlerden (kollajenler, elastin) ve yapışkan glikoproteinlerden oluşan interstisyel bir

matristen oluşur. İnterstisyel matriks dizisi; epitel, endotel ve düz kas hücreleri etrafında yüksek düzeyde organize olur ve hücre polaritesini yönlendiren, epitel dokusunun düzenli yenilenmesi için gerekli olan özelleşmiş ECM'yi oluşturur (Xue ve Jackson, 2015).

Granülasyon dokusu oluşumu

Bu faz, anjiyogenez (yaralanma bölgesinde önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşumu - neovaskülarizasyon) ile karakterizedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (FGF- β), TGF- β ve PDGF gibi büyüme faktörleri anjiyogenezi indükler (Vaidyanathan, 2020). Anjiyojenik kılcal damarlar, fibrin/fibronektin açısından zengin yara pıhtısını kaplayarak, birkaç gün içinde granülasyon dokusu boyunca bir mikrovasküler ağ halinde organize olur. Kan damarlarının yoğunluğu azalır çünkü kollajen granülasyon dokusunda birikerek yara izi (skar) oluşturur; bu dinamik sürecin bozulması, kronik yaraların (bozulmuş yara iyileşmesi) gelişimini etkileyebilir (Wolgemuth, 2005).

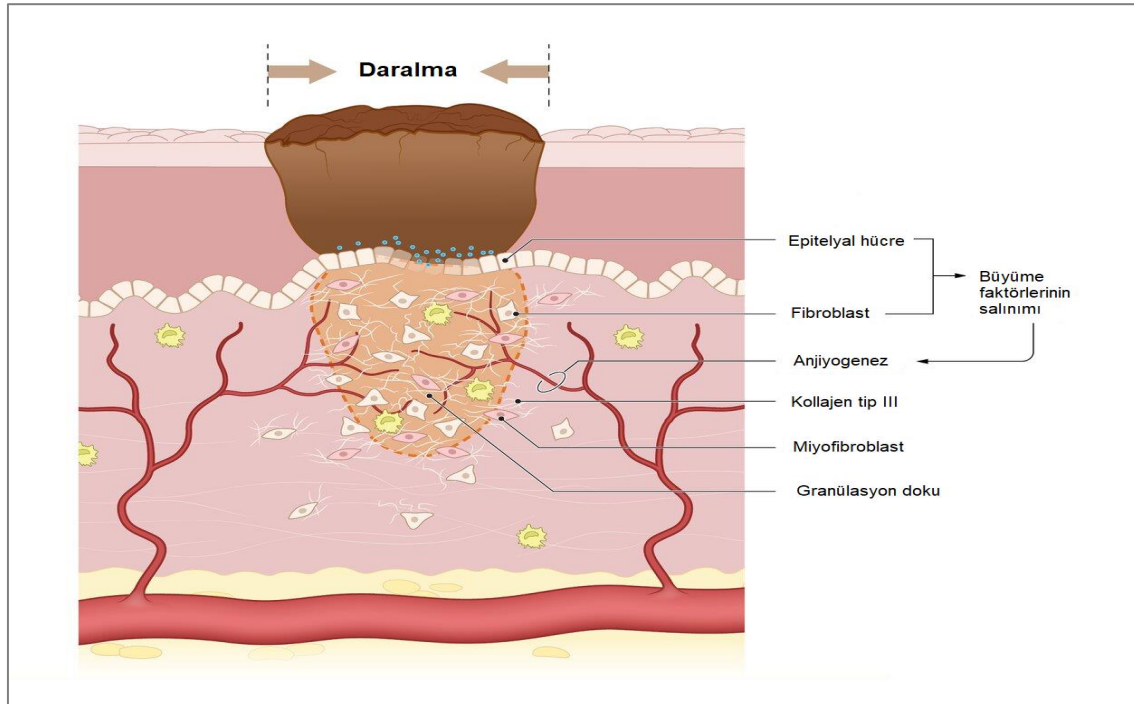
Epitelizasyon

Yaralanmadan sonraki birkaç saat içinde, tek bir epidermal hücre tabakası yara kenarlarından bir tabaka halinde göç ederek açıkta kalan alan üzerinde hassas bir örtü oluşturur, bu süreç 'epiboli' olarak bilinir (Pastar ve diğerleri, 2014). Özellikle 12 saatten itibaren, yara kenarlarının bazal epitel hücrelerinde mitotik aktivitede belirgin bir artış olur. Epitel hücre sayısındaki artış ve farklılaşmaya bağlı olarak da tabakalı epitel yeniden oluşur (Eming ve diğerleri, 2007). Epitelizasyon, nemli bir ortam ve bakteriyolojik kontrol gerektirir, ayrıca, keratinosit büyüme faktörü (KGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve FGF- β dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri tarafından modüle edilir (Rizzo ve diğerleri, 2012).

2.5.4. Yeniden şekillenme (Remodelling) fazı ve skar oluşumu

Hücre dışı matris sentezi ve yeniden şekillenme, granülasyon dokusu gelişimi ile eş zamanlı olarak başlar ve uzun süre devam eder. Hücre dışı matris sürekli olarak yeniden şekillenir ve ancak, yaralanmadan yaklaşık 21 gün sonra dengelenir. Bu yeniden şekillenme sürecinde, kollajen sürekli olarak sentezlenir ve parçalanır. Yara kapanması, fibroblastlar ve hücre dışı matris arasındaki etkileşimler yoluyla meydana gelir ve TGF- β ,

PDGF ve FGF- β dahil olmak üzere bir dizi sitokinden etkilenir (Ramasastry, 2005). Yara iyileşirken, fibroblast ve makrofajların yoğunluğu apoptoz ile giderek azalır. Zamanla kılcal damarların büyümesi durur, yara bölgesinde kan akışı ve metabolik aktivite azalır. Kan damarları ve hücrelerin sayısı azalırken yaranın gerilim direnci artmasına bağlı olarak skar doku oluşur (Şekil 2.5). Skar doku oluşumu, 6-12 hatta 24 aya kadar devam edebilir (Baum ve Arpey, 2005; Toy, 2005).

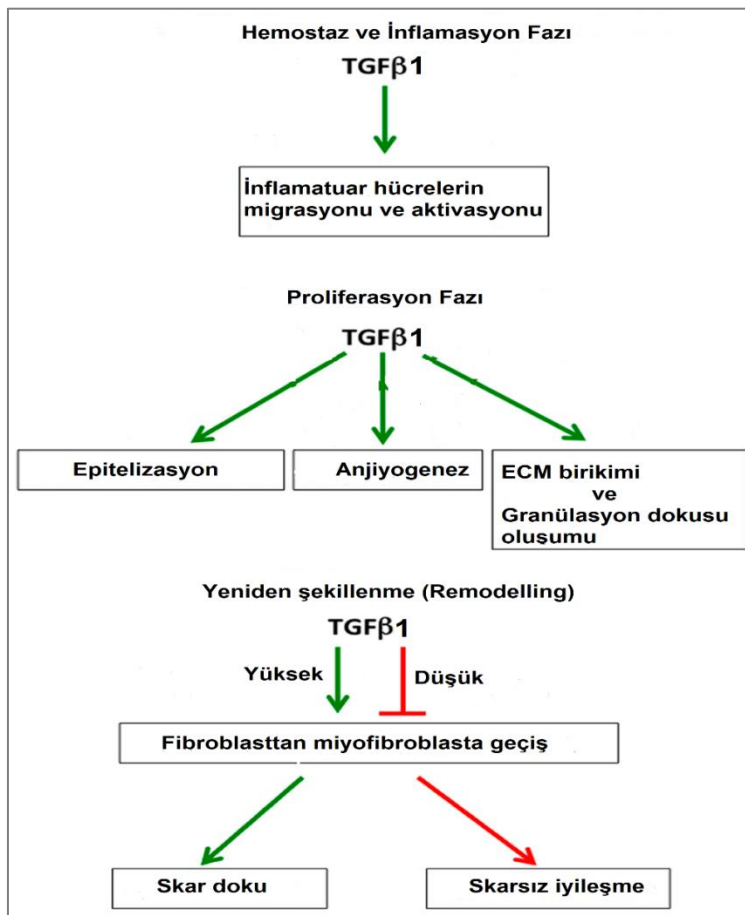


Şekil 2.5. Proliferasyon ve yeniden şekillenme faz sonrası yaranın kapanması (İnternet 1)

2.6. Yara İyileşmesinde TGF- β 1/Smad Yolağının Rolü

Yara iyileşmesinin tüm aşamalarını düzenleyen pleiotropik bir sitokindir TGF- β , embriyonik gelişim, yetişkin kök hücre farklılaşması, bağışıklık regülasyonu, yara iyileşmesi ve yangı dahil olmak üzere birçok biyolojik süreci düzenler (Şekil 2.5) (Tanigawa ve diğerleri, 2005). TGF- β , hem fibriller kollajenler ve fibronektin gibi ECM ağının bileşenlerinin ekspresyonunu hem de proteaz inhibitörlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği için ECM birikiminin önemli bir düzenleyicisidir. Dolayısıyla TGF β ailesi sinyalleşmesinin düzensizliği gelişimsel anomalilere, fibrotik bozukluklara, tümör oluşumuna ve bağışıklık hastalıklarına katkıda bulunur (Tuncer ve Kozacı, 2022).

Üç alt tip TGF- β (TGF- β 1–3), yara iyileşme sürecinde kritik rol oynar (Penn ve diğerleri, 2012). Bu proteinler, yara iyileşmesinin geç safhasında özellikle önemlidir. Bu üç izoform içerisinde TGF- β 1, yara iyileşmesinde hücre proliferasyonu ve farklılaşması, immün yanıt, anjiyogenez ve doku onarımında önemli roller oynar (Şekil 2.6) (Lichtman ve diğerleri, 2016). Fibronektin, kolajen tip I ve III ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi ECM proteinlerinin temel bileşenlerinin ekspresyonunu indükler. Ayrıca, yaranın kapanmasını sağlamak için fibroblastların migrasyonunu uyarır (Pakyari ve diğerleri, 2013).

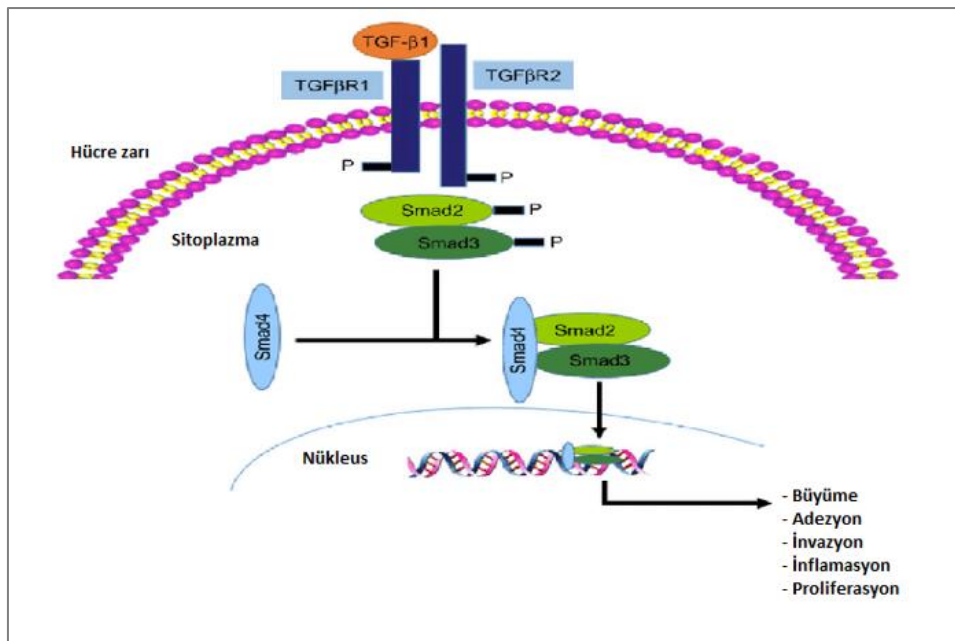


Şekil 2.6. TGF- β 1'in yara iyileşmesi fazlarında rolü (Gilbert ve diğerleri, 2016)

Smad proteinleri, yara iyileşmesi için önemli bir faktör olan fibroblast farklılaşmasının başlıca indükleyicisi olarak bilinir (Jiang ve diğerleri, 2020). Smad ailesinin proteinleri, TGF- β tip I reseptör kinazlarının ilk tanımlanan substratlarıdır. Reseptör sinyallerinin çekirdekteki belirli hedef genlere dönüştürülmesinde merkezi bir rol oynarlar. Bu nedenle, TGF-1/Smad yolu yara iyileşmesinde hayati bir rol oynar (Ru ve diğerleri, 2021). Şimdiye kadar yapısal ve fonksiyonel farklılıklara dayalı olarak üç gruba ayrılan sekiz Smad Ailesi

üyesi tanımlanmıştır: reseptörle ilişkili Smad'lar (R-Smad'lar; TGF- β ailesi reseptör kinazlarının doğrudan substratlarıdır), bu reseptör tarafından düzenlenen Smad'larla sinyalleşme sırasında ilişkilendirilen ortak Smad'lar ve önceki grupların sinyalleşme işlevini antagonize eden inhibitör Smad'lar (Smad 6, 7; Smad2 ve Smad3 T β RI substratlarıdır ve hem TGF- β hem de aktivin sinyallerine aracılık ederler) (Verrecchia ve diğerleri, 2002; Flanders, 2002; Schiller ve diğerleri, 2004).

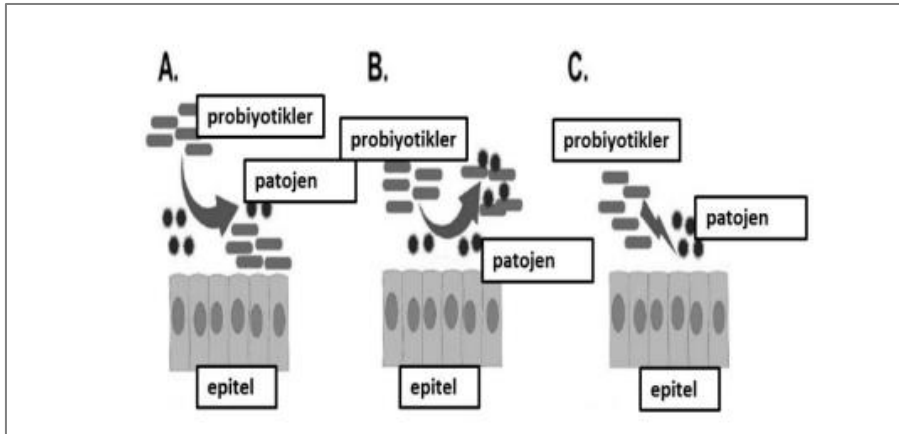
TGF- β 1/Smad sinyal yolu, çok sayıda fonksiyona sahip, evrimsel olarak korunmuş bir yoldur. TGF- β 1, dokularda skar bırakan ve çoğunlukla Smad sinyaline karşı uyarının olduğu yönde etkinleştirerek anahtar bir aracı olarak kabul edilir (Li ve diğerleri, 2006). TGF- β 1'in biyolojik etkilerini Smad-2 ve Smad-3 medyatörlerini aktive ederek gösterdiği kanıtlanmıştır. T β RII yapısal olarak fosforile edilir ve ligandın bağlanması üzerine T β RI'yi fosforile eder. Reseptör kompleksinin fosforilasyonu ile birlikte fosforile edilmiş R-Smad'lar (Smad-2/-3) Smad-4 ile heteromerik kompleksler oluşturur ve çekirdeğe geçerek transkripsiyonel faktörler yardımı ile DNA üzerindeki hedef gen bölgesine bağlanarak transkripsiyonel cevabı oluştururlar (Zhang ve diğerleri, 2020; Ru ve diğerleri, 2021) (Şekil 2.7). Böylelikle reseptör Smadlar (Smad-2 ve Smad-3) ve co-Smad 4 yoluyla TGF- β 1/Smad hücre içi sinyal yolağı aktive edilerek yara iyileşmesinde hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasından sorumlu genlerin salınımı ile birlikte inflamatuvar fazdaki sitokinlerin üretimi gerçekleşir (Mokoena ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.7. TGF- β 1/Smad sinyal yolağı mekanizması (Ru ve diğerleri, 2021)

2.7. Probiyotikler

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tanımına göre probiyotikler, 'yeterli miktarlarda uygulandıklarında konakçıya bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar' olarak tanımlanmaktadır (Wegh ve diğerleri, 2019). Probiyotik mikroorganizmalar, bazı laktik asit bakterileri (LAB), Bifidobacterium türleri, mayalar ve bazı spesifik gram-negatif suşlar dahil olmak üzere farklı türleri içerir (Çizelge 2.1). Ağırlıklı olarak LAB, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* olmak üzere farklı cinslerden oluşur (Rozada-Sanchez ve diğerleri, 2008). Deri mikrobiyotasının doğal dengesinin bozulması durumunda, probiyotiklerin bağışıklık hücrelerinin salınımını uyarak, yara enfeksiyonlarına yol açan patojenlere karşı yara bir antimikrobiyal etkiye sahip oldukları kanıtlanmıştır (Balqadi ve diğerleri, 2015). Bu etkilerini üç farklı şekilde gösterebilirler (Şekil 2.8). Birincisi, patojenin üremesini engelleyen ve/veya çoğunluğu algılama sistemine müdahale eden biyoaktif molekülleri serbest bırakırlar (Şekil 2.8. A). İkinci olarak, patojenin koagregasyonunu ve mukozal yüzeylerden elimine edilmesini sağlarlar (Şekil 2.8.B). Son olarak da epitel hücre reseptörlerine bağlanarak deri ve mukozal yüzeylerde patojenin yer değiştirmesine neden olurlar (Şekil 2.8.C) (Lukic ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.8. Probiyotiklerin yara enfeksiyonlarına yol açan patojen bakterilere karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal etkiler. (A) LAB, algılama sistemine müdahale eden biyoaktif molekülleri serbest bırakır (B) LAB, patojenin elimine edilmesini sağlar (C) LAB, patojenin yer değiştirmesine neden olur (Lukic ve diğerleri, 2018)

Probiyotiklerin konakçıya sağladığı faydalar besleyici veya terapötik olabilir. Ancak her probiyotik suşu, aynı cinse ait olmalarına rağmen, konakta kendine özgü farklı yanıtlara sahiptir (Saarela ve diğerleri, 2000). Günümüze kadar yapılan çalışmalar da osteoporoz,

kanser, obezite ve tip 2 diyabet, depresyon, otoimmün hastalıklar, yara iyileşmesi ve atopik dermatitte probiyotiklerin insan sağlığına yönelik faydalarını göstermiştir (Suez ve diğerleri, 2019). Ek olarak, probiyotiklerin yara iyileşmesinde, iyileşme sürecinin bozulmasında önemli bir rol oynayan inflamasyon fazını etkiledikleri ve patojenler üzerinde antimikrobiyal etkinlikleri olduğu bilinmektedir. Topikal veya sistematik olarak uygulandığında, insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan son araştırmalar, oksitosin aracılı bir şekilde inflamatuvar yanıtı etkileyerek yara iyileşmesinde olumlu yönde bir etkiye sahip olduklarını göstermektedir (Gonzalez ve diğerleri, 2016). Bu nedenle, yara iyileşmesinde terapötik ajanlar olarak çalışmaları özellikle önemlidir. Son yıllarda yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalar değerlendirildiğinde, yara enfeksiyonlarına neden olan patojenlere karşı en çok kullanılan probiyotiklerin, laktik asit bakterileri olduğu ve içlerinden *L. plantarum*, *L. acidophilus* ve *L. reuteri* türlerinin daha çok araştırıldığı bilinmektedir (Ramos ve diğerleri, 2012). Ancak şu an ki mevcut çalışmalar, probiyotiklerin insan sağlığı üzerine faydalı etkilerinin gösterilmesine rağmen probiyotik etki için organizmanın canlı olmasına gerek olmadığını vurgulamaktadır. Hücre ölümünden sonra da üretilen karbonhidratlar, proteinler, lipitler, vitaminler, organik asitler, hücre duvarı bileşenleri ve diğer karmaşık moleküller gibi farklı bileşenler etkilerini koruyarak sağlık açısından fayda sağlamaktadırlar (Rao ve diğerleri, 2015). Bu bağlamda, bu bileşenleri ifade etmek amacıyla 'paraprobİYotik' ve 'postbiyotik' terimleri kullanılmaktadır.

2.9. ParaprobİYotikler

ParaprobİYotik terimi, inaktive edilmiş mikrobiyal hücreleri tanımlamak için kullanılır. İnaktive edilmiş bakteri hücreleri; ısıtma, asit deaktivasyonu, dondurarak kurutma, sonikasyon ve ultraviyole muamelesi gibi kimyasal veya fiziksel yöntemlerle elde edilir (de Almada ve diğerleri, 2016). Son çalışmalar, probiyotiklerin inaktive halde dahi sağlık açısından faydaları olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum "probiyotik paradoks" olarak adlandırılmıştır ve bakteriyel hücreler sindirim sisteminde çözüldüğünde salınan biyoaktif bileşiklerle açıklanmaktadır (Akter ve diğerleri, 2020). Bu hücreler içerisinde peptidoglikan, teikoik asit, hücre duvar polisakkaritleri ve hücre yüzey proteinleri (LPXTG proteinleri, s katman proteinleri, pili proteinleri, moonlighting proteinleri) yer almaktadır. Son çalışmalar, bu inaktive hücrelerin, mikrobiyal fraksiyonların veya hücre lizatlarının biyojenik ve paraprobİYotik fonksiyonunun konakçı sağlığını koruyabildiğini göstermiştir (de Almada ve diğerleri, 2016). ParaprobİYotiklerin sağlığa faydalı etkilerinin

mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bu etkilerini içerdikleri hücre zarı, hücre duvarı ve sitoplazmik komponentleri aracılığıyla konağın immün sistemini etkileyerek gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Paraprobiyotiklerin, düşük enfeksiyon riski, mikrobiyal translokasyon veya potansiyel inflamatuvar yanıtlar oluşturdıkları için bağışıklık sistemi bozulmuş bireyler gibi seçilmiş hasta gruplarında canlı bakteriyel ürünlerden daha güvenli olduğu öne sürülmüştür (Dubey ve diğerleri, 2021).

2.10. Postbiyotikler

2014 yılında, Uluslararası Probiyotik ve Prebiyotik Bilim Derneği, metabolik yan ürünlerin, ölü mikroorganizmaların ve diğer mikroorganizma bazlı canlı olmayan ürünlerin geliştirilmesini vurgulamış, fakat bunların probiyotik kapsamına girmediğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar ölü bakterilerin ve bakteriyel moleküler bileşenlerin de probiyotik özellikler gösterebildiğini vurgulamaktadır. Günümüzde, “postbiyotik” terimi biyolojik aktiviteye sahip çözünür bileşenleri ifade etmekte olup, bütün bakteri kullanımına karşı daha güvenilir bir alternatif olarak gösterilmektedir. Bu yan ürünler, ek biyoaktivite sağlayarak, konakçıya fizyolojik yararlar sunmaktadırlar. Kısa zincirli yağ asitleri, enzimler, organik asitler (laktik asit), peptitler, teikoik asit, peptidoglikan bazlı peptitler, endo-ekzopolisakkaritler, hücre duvarı proteinleri, bakteriyosinler (asidofilin, bifidin, reuterin) ve vitaminler postbiyotikleri oluşturmaktadır (Tsilingiri ve diğerleri, 2012; Aguilar-Toalá ve diğerleri, 2018; Tang ve diğerleri, 2014). Postbiyotiklerin konakta fizyolojik, immünolojik, biyolojik ve metabolik reaksiyonlar bağlamında yararlı bir etki göstermesini sağlayan aktif yapı ve etki mekanizması henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Ancak bu etkiler, anti-inflamatuvar, antiproliferatif, antioksidan, hipokolesterolemik, antihipertansif, anti-obezonejik, hepatoprotektif ve antimikrobiyal aktiviteleriyle ilişkilendirilmiştir (de Almada ve diğerleri, 2016).

2.11. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesi üzerine etkileri

Çok yakın zamanda, *Lactobacillus rhamnosus* paraprobiyotik içeriğinin, yeniden yapılandırılmış bir insan epidermis modelinde cilt bariyer fonksiyonunu iyileştirdiği ve topikal olarak uygulanan çok suşlu probiyotik formülasyonunun, enfekte kronik iskemik yara lezyonunu iyileştirdiği de gösterilmiştir (Nole ve diğerleri, 2014; Knackstedt ve

diğerleri, 2019). Ayrıca *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 paraprobiyotik içeriği, IL-6 ve IL-8 ekspresyonunu azaltarak morötesi ışın (UVB) stresli deri epidermal eksplantlarında anti-inflamatuar etki gösterir (Khmaladze ve diğerleri, 2019). Kamilya, Baruah ve Sangma (2015), iki probiyotik *Bacillus amyoliquefaciens* FPTB16 ve *Bacillus subtilis* FPTB13'ün canlı ve inaktive edilmiş (yani ısı şoku, UV ışığı ve formalin ile) bakterilerinin farklı koşullarda immünomodülatör etkisini bildirmiştir. Ek olarak, ısıl işlem görmüş probiyotikler ve en düşük konsantrasyon dozu (10^7 ml⁻¹) en iyi uyarıyı göstermiş ve bazı durumlarda bu inaktive formun uyarıcı etkisinin canlı formdan bile daha iyi olduğu bildirilmiştir. Çalışma ayrıca, bakteriyel canlılığın faydalı etkileri sağlamak için temel bir gereklilik olmadığına dair güçlü kanıtlar göstermiştir (Kamilya ve diğerleri, 2015). Yine yapılan bir çalışmada, UV ile inaktive edilmiş *Lactobacillus rhamnosus* GG suşunun (LGG), Caco-2 hücrelerinde IL-8 yanıtını aşağı regüle etmede canlı LGG kadar etkili olduğu kanıtlanmıştır (Claes ve diğerleri, 2012). Aynı zamanda ısı ile inaktive edilen LGG, bebek sıçan modelinde lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı inflamasyon üzerinde test edilmiş olup, hem canlı hem de inaktive edilmiş suşlar enteral olarak uygulanmıştır; (10^8 CFU/kg) iki grup da LPS tarafından indüklenen pro-inflamatuar medyatörleri azaltabilmiş; anti-inflamatuar medyatörleri pozitif bir şekilde düzenleyebilmiştir (Li ve diğerleri, 2009). Singh ve ekibi, enteropatojenlere karşı paraprobiyotiklerin (ısıyla inaktive edilmiş form) oldukça etkin bir antagonistik yeteneği olduğunu bildirmişlerdir (Singh ve diğerleri, 2017). Yine yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M kaynaklı paraprobiyotikler, yüksek seviyelerde IL-10 ve düşük seviyelerde TNF- α , IL-6 ve IL-12'yi indükleyerek makrofajlar üzerinde immünomodülatör etki göstermiştir (Bleau ve diğerleri, 2010). Şu anda postbiyotiklerin karmaşık etkilerini bütünüyle anlamak için yeterli veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, postbiyotiklerin insan vücudu üzerinde pleiotropik etkileri olduğu düşünülmektedir. Gecikmiş anjiyogenez ve yara iyileşmesi olan diyabetik bir hayvan modelinde eksizyonel bir yara üzerinde postbiyotiklerin yara iyileştirme aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada, kullanılan *Lactococcus chungangensis* CAU 1447 kaynaklı postbiyotiğin profil analizi yapılmış; tespit edilen palmitik asit ve palmitoleik asitin inflamasyon ve cilt dokusu yenilenmesini düzenleyerek yara iyileşmesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Nam ve diğerleri, 2021). Mouritzen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Lactococcus lactis*'in ürettiği bir bakteriyosin olan Nisin A'nın yara iyileşmesindeki immünomodülatör potansiyeli gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucu Nisin A'nın 24 saatlik tedaviden sonra TNF- α , IL-6 ve IL-8 için önemli bir azalma gösterdiği kaydedilmiştir (Mouritzen ve diğerleri, 2019). Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara

iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri yapılan çalışmalar ile kanıtlanmış olsa da bu etkilerini hangi moleküler yollar üzerinden gösterdiklerini içeren detaylı bir literatür çalışması bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmalarda kullanılan mikroorganizma

Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, sağlıklı bebek gaitasından izole edilen *Lactobacillus plantarum* GD2, yeni adlandırılmasıyla *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşu kullanılmıştır (Zheng ve diğerleri, 2020). Kullanılan GD2 suşunun daha önceki tez ve projeler kapsamında fizyolojik ve biyokimyasal testler analitik profil indeks 50 CHL (Biomerieux) test kiti ile yapılmış, 16S rRNA/rDNA'ya göre moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiştir (Şirin ve Aslım, 2021).

3.1.2. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları

Yapılan çalışmalarda, L929 (ATCC®CCL-1™) sağlıklı fare fibroblast ve RAW264.7 (ATCC®TIB-71™) fare makrofaj hücre hatları kullanılmıştır. Kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler Çizelge 3.1.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. L929 (ATCC®CCL-1™) ve RAW264.7 (ATCC®TIB-71™) hücre hatlarına ait özellikler (İnternet 2 ve 3)

	L929 (ATCC®CCL-1™)	RAW264.7 (ATCC®TIB-71™)
Organizma	Fare	Fare
Doku	Deri altı bağ dokusu; Yağ; Areolar	Abselon Lösemi Virüsünün (A-MuLV) intraperitoneal enjeksiyonu ile farede indüklenen bir tümörün asitinden oluşturulmuştur.
Morfoloji	Fibroblast	Makrofaj
Fenotip	Adherent	Adherent
Uygulama	Hücre Kültürü, Protein Ekspresyonu, Kararlı Hücre Transfeksiyonu, Transfeksiyon	Hücre Kültürü, Protein Ekspresyonu, RNAi, Stabil Hücre Transfeksiyonu, Transfeksiyon: Gen Ekspresyonu, Geçici Transfeksiyon

3.2. Yöntem

3.2.1. *L. plantarum* GD2 suşunun kültür koşullar ve muhafazası

L. plantarum GD2 suşu; de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth ve agar besi kültür koşulları ortamlarında geliştirilmiştir. Broth besi ortamı hazırlanırken Çizelge 3.2’de yer alan içerikler tartılıp, bir miktar distile su (dH₂O) içerisinde manyetik karıştırıcıda (Heidolph) karıştırılarak pH 6,2’ye ayarlanmıştır. Son hacim, dH₂O ile 1000mL’ye tamamlanmıştır. Agar besi ortamı ise MRS broth içerisine %1,5g bakteriyolojik agar eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan MRS broth ve agar besi ortamları otoklav (Sanyo) ile steril edilmiştir (121°C, 15dk). Broth besiyeri içerisine %2 oranında stok kültürlerinden 1. aktif bakteri ekimleri yapılmıştır. Ekim sonrası bakteriler 37°C’de inkübasyona bırakılmış, 18-24 saat aralığında 2 ve 3. aktifi yapılan, gram boyama yöntemi ile temiz olduğu saptanan bakteriler çalışmalarda kullanılmıştır. Kullanılan MRS Besiyeri içerikleri Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MRS broth ve agar besiyeri içeriği

Kullanılan maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	10,00
Maya özütü	5,00
Sığır eti özütü	10,00
Glukoz	20,00
Dipotasyum Fosfat	2,00
Sodyum Asetat	5,00
Magnezyum Sülfat	0,20
Amonyum Sitrat	2,00
Manganez Sülfat	0,05
Bakteriyolojik Agar	15,00
Tween 80	1,00

Kullanılan mikroorganizmanın muhafazası

Çalışmalar kapsamında kullanılan *L. plantarum* GD2 suşu gliserol içerisinde kriyoviyal tüplere stok alınarak -30°C’de ve Skim Milk Broth besiyeri içerisinde liyofilize edilerek (Christ alpha 2-4 LD plus) +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. McFarland değerinin ayarlanması

Paraprobiyotik ve postbiyotik eldesi için kullanılacak bakterilerin optik yoğunluğunun ayarlanması için McFarland yöntemi kullanılmıştır. *L. plantarum* GD2 suşu, MRS broth besi ortamında %2 oranında 2 kez aktifleştirilmiştir. 2. aktif bakterileri 3000 rpm’de 30 dk santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet üzerine 5 mL SF (%0,9 NaCl) eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmıştır. Ardından bakteriler 200 µL SF içerisinde süspanse edilmiştir. Optik yoğunluğun ayarlanması için cam deney tüpü içerisinde bulunan 5 mL SF çözeltisi kullanılmıştır. McFarland densitometre cihazı ile yoğunluğu ölçülen bakteriler, McFarland değeri 10 olarak ayarlanmıştır (Demir, 2022).

3.2.3. McFarland 10 değerine ayarlanan bakteri süspansiyonun koloni hesabı

McFarland densitometresi ile optik yoğunluğu 10’a ayarlanan bakterilerin sayımının yapılması için süspansiyon içerisinde 10⁻⁸ değerine kadar dilüsyonlar hazırlanarak seri dilüsyon yapılmıştır. Hazırlanan Dilüsyonlar, drigalski 38 spatülü kullanılarak yayma ekim yöntemi ile MRS agar besiyerine ekilmiştir. Ekimi yapılan bakteriler 37 °C’de ~ 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası agarda oluşan kolonilerin sayımı yapılmıştır (Demir, 2022). Çalışma, her bir dilüsyon faktörü için 3 paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Total bakteri sayımı birimi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Total bakteri sayımı birimi (cfu/mL)} = \frac{\text{(Toplam koloni sayısı)} \times \text{(Dilüsyon faktörü)}}{\text{Örnek hacmi}} \quad (3.1)$$

3.2.4. Paraprobiyotik eldesi

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, probiyotik özellik gösteren *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen paraprobiyotik kullanılmıştır.

3. aktifi yapılan *L. plantarum* GD2 suşu 3000 rpm’de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı steril koşullarda ayrı bir steril falkona alınmıştır. Süpernatant kısmı ortamdan ayrıldıktan sonra bakteri pelleti 2 kez serum fizyolojik (SF) ile yıkanmış ve 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılmıştır. Hücre

pelleti, steril ortamda SF içerisinde Mc Farland 10 (10^8 CFU/ml)'a ayarlanmıştır. Daha sonra Mc Farland 10 değerine ayarlanmış olan bakteri pelleti, buz banyosu içerisinde 30 dk sonike (Vibra-cell) edilmiştir. Sonikli preparasyon $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildikten sonra bakteri özleri dH_2O içerisinde çözülmüş, kullanılabilecek kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Çalışmalar öncesi $0,22\ \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır (Han ve diğerleri, 2019).

3.2.5. Postbiyotik eldesi

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, probiyotik özellik gösteren *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen postbiyotik kullanılmıştır.

Santrifüj sonrası pelletten ayrılan süpernatant, NaOH ile pH 7'ye ayarlandıktan sonra $0,22\ \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilip çalışmalarda kullanılmıştır (Dubey ve diğerleri, 2021).

3.2.6. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmalarda, L929 (ATCC®CCL-1™) fare fibroblast ve RAW264.7 (ATCC®TIB-71™) fare makrofaj hücreleri %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içeren flasklarda (T-25 ve T-75), 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatör ortamında geliştirilmiştir (Elisia ve diğerleri, 2018; Zahirnia ve diğerleri, 2019). Çalışmalarda, stoklardan açılan, 2-3 pasaj sonrası %90 yoğunluğa ulaşan hücreler çalışmalarda kullanılmıştır. Stok hücrelere belirli aralıklardaki aracılığıyla mikoplazma testi yapılmıştır.

Kullanılan hücre hatlarının muhafazası

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan her iki hücre hattı da %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren kriyoviyal tüpler içerisinde stok alınmış ve -196°C 'de muhafaza edilmiştir. Dondurma işlemi kademeli olarak gerçekleştirilmiştir. Stok için kriyoviyal tüpler içerisinde hazırlanan hücreler; 1 saat -20°C ve 1 gece -80°C 'de bekledikten sonra sıvı azot tankında (-196°C) muhafaza edilmiştir.

3.2.7. MTT analizi

L. plantarum GD2 suşu'ndan elde edilen paraprobiyotik ve postbiyotiklerin L929 ve RAW264.7 hücre hatları canlılığı üzerindeki farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerindeki etkileri 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir. %90 hücre yoğunluğuna ulaşan hücreler 0.25% Tripsin-EDTA (1X) yardımıyla flasklardan kaldırılmış, kuyu başına yaklaşık 1×10^4 hücre yoğunluğu olacak şekilde 96'lı hücre plakalarına ekilmişlerdir. Hücre plakaları 24 saat inkübe edilmiştir (37°C, %5 CO₂). İnkübasyon sonrası paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları yapılmıştır. Hazırlanan ana stok paraprobiyotik (10^8 CFU/mL) ve postbiyotiklerden 20, 50, 100, 150 ve 200 µL/mL uygulanmış, hücreler 12, 18 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonlar sonunda her bir kuyuya 20 µL dH₂O içerisinde hazırlanan MTT solüsyonu (5mg/mL) eklenmiştir. MTT solüsyonu eklenen plakalar 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyular boşaltılmış, kuyular içerisine 200 µL DMSO eklenmiştir. Plakalar DMSO ile 30 dk inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda 570 nm'de mikropilaka okuyucuda (Epoch, Biotek) absorbans değerleri belirlenmiştir. Yüzde canlılık hesaplamaları aşağıdaki formüle göre yapılmıştır;

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{(\text{Ortalama örnek absorbansı})}{(\text{ortalama kontrol absorbansı}) \times 100} \quad (3.2)$$

3.2.8. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) tayini

Yapılan çalışmada paraprobiyotik ve postbiyotiklerin *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853, ve *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231 suşları üzerindeki antimikrobiyal etkinliği Amerika Birleşik Devletleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından belirtildiği gibi, broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. MİK, mikrodilüsyon kuyularında organizmanın gelişimini tamamen engelleyen, en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonudur. Çalışmada, Mueller Hinton Broth (MHB) ve Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri ortamları kullanılmıştır. Etken patojenler Mc Farland standardı 0,5 olarak ayarlanarak çalışmada kullanılmıştır (2×10^5 CFU/mL ila 8×10^5 CFU/mL). 96 kuyulu

plakalı kuyular; Mc Farland standardı ayarlanan bakteri inokulumu, paraprobiyotik, postbiyotik ve broth besiyeri ile son hacim 200 µL'ye tamamlanarak 35±2°C'de 16 ila 20 saat boyunca inkübe edilmiştir. 200 µL MHB içeren negatif kontroller ve 200 µL bakteriyel inokulum içeren pozitif kontroller kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda, her numunenin optik yoğunluğu OD520'de ölçülmesiyle kuyulardaki mikrobiyal gelişime göre MİK değeri belirlenmiş, büyüme sınırı 0,200 olarak kabul edilmiştir (CLSI-M07-A9, 2012; Rodriguez-Melcon ve diğerleri, 2021).

Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) tayini

MİK sonucunda üreme görülmeyen kuyulardan 0,1 mL hacimde MHA'lara ekimler yapılmıştır. Ekimi yapılan agarlar, 48 saat 37°C'de inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda, hiçbir koloni oluşumunun olmadığı en düşük konsantrasyon MBK olarak belirlenmiştir (CLSI-M07-A9, 2012; Rodriguez-Melcon ve diğerleri, 2021).

Çalışmalarda kullanılan uygulama grupları Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Uygulama gruplarının çalışmada kullanılan konsantrasyonları

Uygulama Grupları	Konsantrasyonlar (µL/mL)
Paraprobiyotik	25, 50, 75, 100, 150, 200, 250
Postbiyotik (pH 7.0)	25, 50, 75, 100, 150
Postbiyotik (pH 4.5)	25, 50, 75, 100, 150

3.2.9. *In vitro* yara modeli (Scratch Assay) ve yara kapanma analizi

Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla *in vitro* yara modeli oluşturulmuştur. L929 fare fibroblast hücreleri 2x10⁵ yoğunlukta olacak şekilde 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekilerek 1 gece inkübe edilmişlerdir (37°C, %5 CO₂). İnkübasyondan sonra kuyulara uygulama öncesi hücreler 6-8 saat serum negatif besiyeri ile muamele edilmiştir. 200 µL'lik pipet ucu yardımıyla hücreler üzerinde yapay bir yara bölgesi oluşturulmuştur. Ardından tüm kuyular 2-3 defa serum negatif besiyeri ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası kuyulara paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları (hücre canlılık testinde belirlenen ideal uygulama dozları 50, 100 ve 150 µL/mL) yapılmıştır. Uygulamalar sonrası 0, 12, 18 ve 24.

saatler yara bölgelerinden inverted mikroskop yardımıyla 4x büyütmede görüntüler alınarak kapanma oranları belirlenmiştir (Guy ve diğerleri, 2017). Görüntüler ImageJ (1.X) yazılımı ile analiz edilmiştir. Kapanma oranlarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\% \text{ Kapanma} = \frac{(\text{başlangıç yara alanı} - \text{t anında ölçülen yara alanı}) \times 100}{\text{başlangıç yara alanı}} \quad (3.3)$$

Başlangıç yara alanı: 0.'ıncı saat yara alanı

t anı: t saat çizik alanı

3.2.10. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin gen düzeyinde belirlenmesi

Yapılan tez çalışması kapsamında paraprobiyotik (50, 100,150 µL/mL) ve postbiyotik (50, 100,150 µL/mL) uygulamalarının ECM proteinlerinden COL-1A1 ve FN; TGF-β1/Smad sinyal yolağı ile ilişkili olarak TGF-β1, Smad2/3/4 ekspresyon seviyelerinde indükleyici; LPS ile indüklenen in vitro inflamasyon modelinde interlökin-1β (IL-1β), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör-alpha (TNF-α) pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyon seviyelerinde inhibe edici ve interlökin-4 (IL-4), interlökin-10 (IL-10) anti- inflamatuvar sitokinler mRNA ekspresyon seviyelerinde indükleyici etkilerini belirlemek amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. L929 ve RAW264.7 hücrelerinin, 6 kuyucuklu hücre plakalara 2,5x10⁵ hücre/kuyu yoğunluk olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Hücre plakaları 1 gece inkübe edilmiştir (37°C, %5 CO₂). İnkübasyon sonrası COL1A1, FN, TGF-β1, Smad-2/3/4 mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için L929 hücrelerine paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları yapılarak 12-18 saat inkübe edilmiştir. IL-1β, IL-6, TNF-α, mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla RAW264.7 hücreleri 18 saat 1µg/mL LPS ile muamele edildikten sonra paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları yapılmış, uygulamalar sonrası hücreler tekrar 18 saat inkübe edilmiştir (Çizelge 3.7). IL-4 ve IL-10 mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla ise RAW264.7 hücreleri 18 saat boyunca paraprobiyotik ve postbiyotikler ile muamele edilmiştir. Uygulamalar sonunda ilgili genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla hücrelerden total RNA izolasyonları yapılmıştır.

Total RNA izolasyonu

Her iki hücre hattı içinde total RNA izolasyonu GeneJET RNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak yapılmıştır. İnkübasyonlar sonunda hücre içeren plakalarda bulunan besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Plakalar üzerine 1X soğuk PBS eklenerek hücreler toplanmış, santrifüj aracılığıyla çöktürülmüştür. Hücre pelletleri, içerisinde 12 µL β-merkaptoetanol bulunan 1200 µL lizis solüsyonu ile süspanse edilmiş, ardından vortekslenmiştir. Süspansiyonlar 1200 µL (%96) etil alkol (EtOH) ile karıştırılarak toplama tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 12000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası akış kısmı atılmış, toplama tüplerine 2800 µL Yıkama Solüsyonu I (Wash Buffer I) eklenmiştir. Ardından tüpler 12000 g'de 15 saniye (sn) santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası kolonlar yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. Aktarım sonrası 2000 µL Yıkama Solüsyonu II (Wash Buffer II) toplama tüplerine eklenmiş, tüpler 12000 g'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası akış kısmı atılmıştır. Yıkama Solüsyonu II ile yıkama işlemi iki kez yapılmıştır. Son yıkamada akış kısmı atıldıktan sonra kolonlar 12000 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjler sonrası kolonlar içerisine 30-100 µL dH₂O eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 1 dk'lık inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrası 13000 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Tüm bu aşamalar sonunda elde edilen total RNA tüp içerisinde toplanmıştır, izolasyon sonrası RNA saflık ve miktar tayini için örnekler Epoch (Biyotek) mikrolaka okuyucu cihazında 260 ve 280 nm dalga boyunda okutulmuş, 260/280 saflık değerleri ~2 olan örnekler çalışmalarda kullanılmıştır. İzole edilen RNA'lar, çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

Elde edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi

cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Steril PCR tüplerine; 2 µL 10xRT buffer, 0,8 µL 25xdNTP karışımı (100 mM), 2 µL 10XRT Random Primer, 1 µL reverse transkriptaz enzimi, 4,2 µL nükleaz içermeyen su ve 10 µL RNA örneği eklenmiştir. Bu aşamada her bir PCR tüpü içerisinde 20 µL total hacim bulunmaktadır. Her bir tüp 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlanmıştır. İzolasyon sonrası cDNA saflık ve miktar tayini için örnekler Epoch (Biyotek) mikrolaka okuyucu cihazında 260 ve 280 nm dalga boyunda okutulmuş, 260/280 saflık değerleri ~1,8 olan örnekler çalışmalarda

kullanılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar çalışmalarda kullanılabilecek kadar -80°C 'de saklanmıştır.

qRT-PCR reaksiyonu

Sentezlenen cDNA'ların mRNA ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada, PCR reaksiyonu için Quant Studio 3 qRT-PCR (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılmış olup, reaksiyon için SYBR Green PCR Kit (SensiFAST SYBR® LowROX Kit) (BIO94005-Bioline, ABD) kullanılmıştır. Deneylerde tüm örnekler ve genler ile üçer kez çalışılarak analizlerde bu ölçümlerin ortalaması kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan qRT-PCR karışımı içeriği Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. qRT-PCR mix içeriği

Kullanılan madde	Miktar (μl)
SYBER Green	10,00
cDNA	2,00
İleri primer (10 pmol/ μl)	1,00
Geri primer (10 pmol/ μl)	1,00
ddH ₂ O	6,00

Çalışmalarda kullanılan qRT-PCR reaksiyonları Çizelge 3.5.'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. qRT-PCR reaksiyonları

Çalışılan genler	qRT-PCR reaksiyonu
COL1A1, FN, TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4, IL-4 ve IL-10	95 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dk, 60 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20 sn
IL-1 β	95 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dk, 62 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20 sn, 72 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20 sn
IL-6	95 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dk, 63 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20sn
TNF- α	95 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dk, 62 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20 sn, 72 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20sn

Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPH) geni bu çalışmada housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri Çizelge 3.8'de verilmiştir (Wang ve diğerleri, 2013; Kim ve diğerleri, 2014; Martignago ve diğerleri, 2015; Lu ve diğerleri, 2017; Quiros ve diğerleri, 2017; Smyrek ve diğerleri, 2019; Sheng-B, ve diğerleri, 2020).

Çizelge 3.6. *In vitro* yara modeli ve PCR çalışmalarındaki uygulama grupları

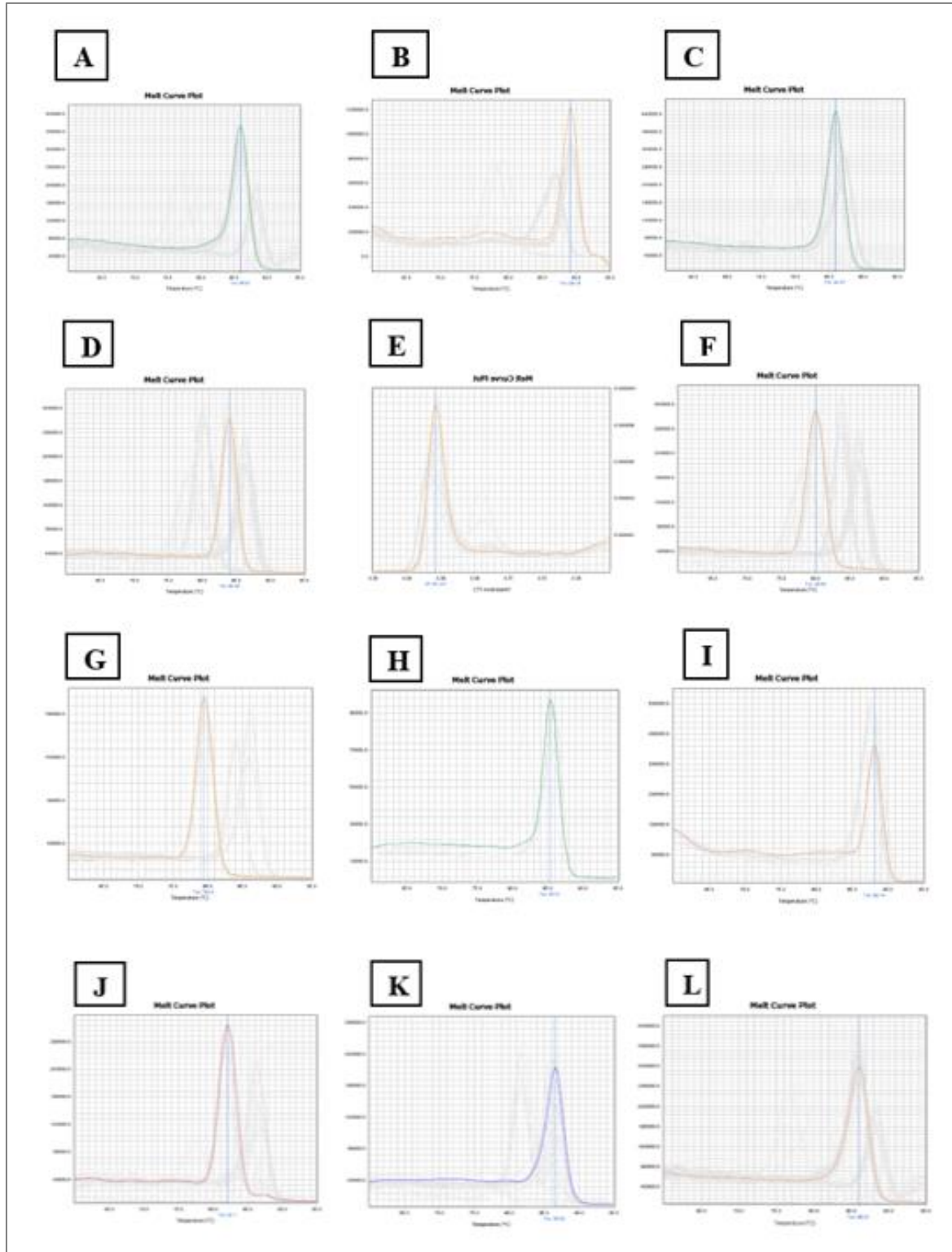
Uygulama Grupları	Konsantrasyonlar (µL/mL)	Uygulama Koşulları
Kontrol (DMEM)		L929 hücreleri 12, 18 ve 24 saat sadece DMEM ile muamele edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
ParaprobİYotik	50 µL/mL	L929 hücreleri 12, 18 ve 24 25 µL/mL paraprobİYotik ile muamele edilmiştir.
	100 µL/mL	L929 hücreleri 12, 18 ve 24 50 µL/mL paraprobİYotik ile muamele edilmiştir.
	150 µL/mL	L929 hücreleri 12, 18 ve 24 100 µL/mL paraprobİYotik ile muamele edilmiştir.
Postbiyotik	50 µL/mL	L929 hücreleri 12, 18 ve 24 50 µL/mL postbiyotik ile muamele edilmiştir.
	100 µL/mL	L929 hücreleri 12, 18 ve 24 100 µL/mL postbiyotik ile muamele edilmiştir.
	150 µL/mL	L929 hücreleri 12, 18 ve 24 150 µL/mL postbiyotik ile muamele edilmiştir.

Çizelge 3.7. *In vitro* inflamasyon modeli çalışmalarındaki uygulama grupları

Uygulama Grupları	Konsantrasyonlar (µL/mL)	Uygulama Koşulları
Kontrol (LPS)		Raw264.7 hücreleri 18 saat sadece 1µg/mL LPS ile muamele edilmiştir.
Kontrol (DMEM)		Raw264.7 hücreleri 18 saat sadece DMEM ile muamele edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
ParaprobİYotik	25 µL/mL	Raw264.7 hücreleri 18 saat 1µg/mL LPS ve 25 µL/mL paraprobİYotik ile muamele edilmiştir.
	50 µL/mL	Raw264.7 hücreleri 18 saat 1µg/mL LPS ve 50 µL/mL paraprobİYotik ile muamele edilmiştir.
	75 µL/mL	Raw264.7 hücreleri 18 saat 1µg/mL LPS ve 75 µL/mL paraprobİYotik ile muamele edilmiştir.
Postbiyotik	50 µL/mL	Raw264.7 hücreleri 18 saat 1µg/mL LPS ve 50 µL/mL postbiyotik ile muamele edilmiştir.
	100 µL/mL	Raw264.7 hücreleri 18 saat 1µg/mL LPS ve 100 µL/mL postbiyotik ile muamele edilmiştir.
	150 µL/mL	Raw264.7 hücreleri 18 saat 1µg/mL LPS ve 150 µL/mL postbiyotik ile muamele edilmiştir.

Çizelge 3.8. Çalışmada kullanılan primer dizileri (FW: İleri primer, RV: Geri primer)

Genler	Primerler 5'→ 3'	bc
COL1A1	FW: 5'-ACATGCCGCGACCTCAAGAT-3'	20
	RV: 5'-ATGTCTAGTCCGAATTCCTG-3'	20
FN	FW: 5'-ATGTGGACCCCTCCTGATAGT-3'	21
	RV: 5'-GCCCAGTGATTTTCAGCAAAGG-3'	21
TGF-β1	FW: 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTCTA-3'	25
	RV: 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'	20
Smad2	FW: 5'-AACCCGAATGTGCACCATAAGAA-3'	23
	RV: 5'-GCGAGTCTTTGATGGGTTTACGA-3'	23
Smad3	FW: 5'-GTCAACAAGTGGTGGCGTGTG-3'	21
	RV: 5'-GCAGCAAAGGCTTCTGGGATAA-3'	22
Smad4	FW: 5'-TGACGCCCTAACCATTTCCAG-3'	21
	RV: 5'-CTGCTAAGAGCAAGGCAGCAAA-3'	22
GAPDH	FW: 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAA-3'	20
	RV: 5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'	20
TNF-α	FW: 5'-CAAGGGACAAGGCTGCCCCG-3'	20
	RV: 5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'	20
IL-1β	FW: 5'-GCAACTGTTCTGAACTC-3'	18
	RV: 5'-CTCGGAGCCTGTAGTGCA-3'	18
IL-6	FW: 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	18
	RV: 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	18
IL-10	FW: 5'-CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG-3'	20
	RV: 5'-CACTGCCTTGCTCTTATTTTCACA-3'	24
IL-4	FW: 5'-ACCACAGAGAGTGAGCTCGT-3'	20
	RV: 5'-AGGCATCGAAAAGCCCGAAA-3'	20



Şekil 3.1. Kullanılan primerler ile hedef gen bölgelerinin erime eğrileri A. FN, B. COL1A1, C. TGF- β 1, D. Smad-2, E. Smad-3, F. Smad-4, G. IL-6, H. IL-1 β , I. TNF- α , J. IL-4, K. IL-10, L. GAPDH

3.2.11. İstatistiksel analiz

Çalışma sonuçları SPSS 16.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile paraprobiyotik 50, 100, 150 µL/mL ve postbiyotik 50, 100, 150µL/mL uygulamalarının grup arasındaki farklar t testi ile belirlenmiştir. MTT testinde elde edilen hücre canlılığı ortalama değerleri arasındaki farklar Multivariate Anova Post Hoc Tukey HSD ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. *In vitro* yara analizi çalışmasında paraprobiyotik 50, 100, 150 µL/mL ve postbiyotik 50, 100, 150 µL/mL uygulamaları ile elde edilen ortalama yara kapanma değerleri arasındaki farklar Multivariate Anova Dunnett ($p<0,05$) ile tespit edilmiştir. TGF-β1, Smad-2, Smad-3, Smad-4, FN, COL1A1, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-10 ve IL-4 qRT-PCR analizlerinde elde edilen ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar ve antimikrobiyal etkinlik değerlendirmeleri tek yönlü Anova Post Hoc Tukey HSD ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. Tüm çalışmalar 3 paralel ve 2 tekrarlı yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

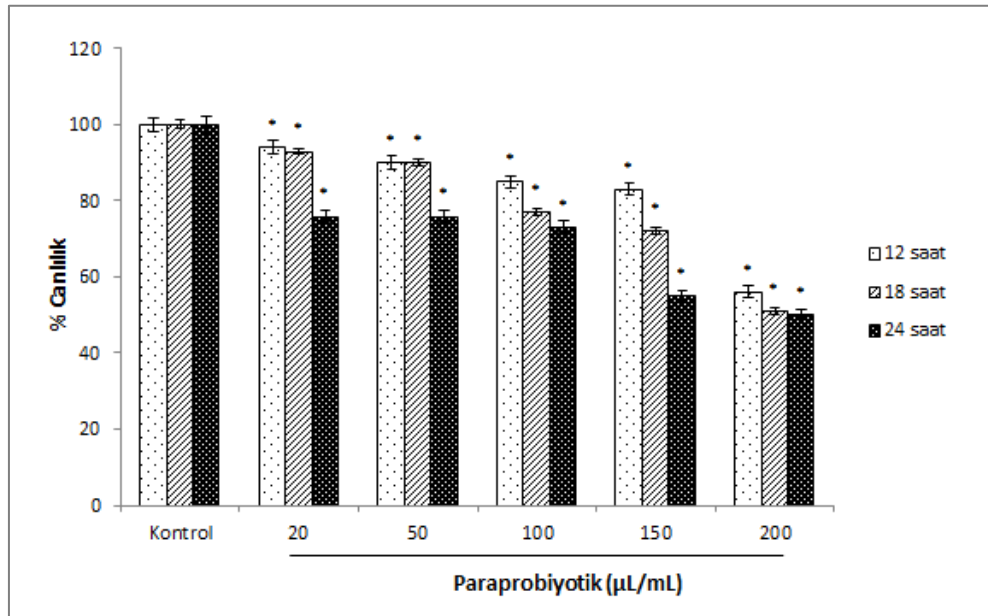
4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Paraprobiyotik ve Postbiyotik Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

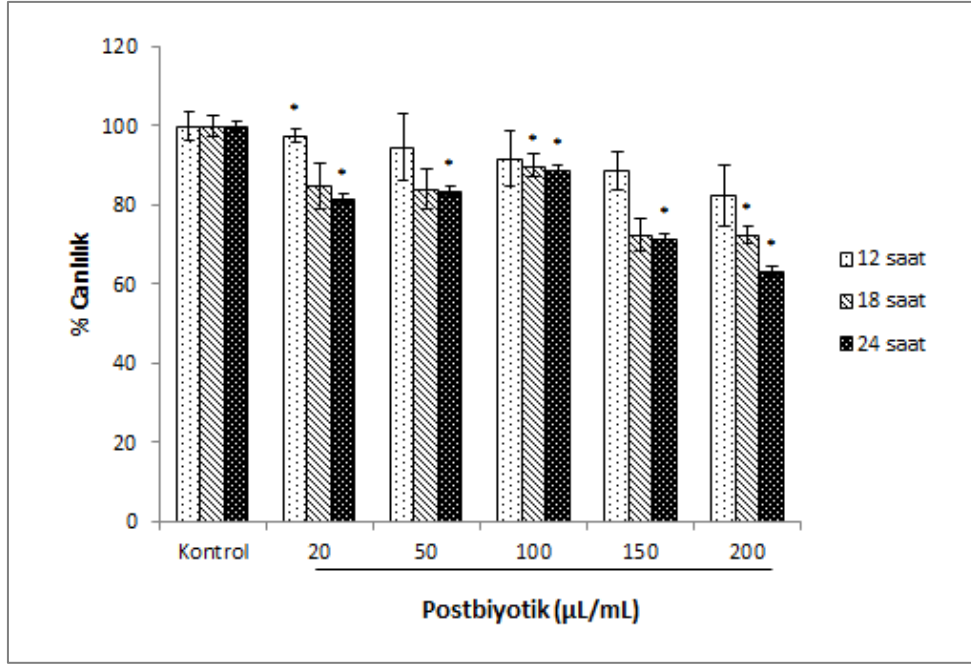
Yapılan bu tez çalışmasında kullanılacak olan L929 ve RAW264.7 hücre hatlarına uygulanacak paraprobiyotik ve postbiyotiklerin, toksik olmayan ve etkin olabilecek konsantrasyon ve inkübasyon sürelerini belirlemek amacıyla toksisite çalışmaları yapılmıştır. Uygulamaların hücrelerin canlılığı üzerine etkileri, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir. MTT sonuçlarına göre % canlılık oranı esas alınarak ideal uygulama dozu ve muamele süresi belirlenmiştir.

4.1.1. Paraprobiyotikve postbiyotik uygulamalarının L929 hücre hattı canlılığı üzerine etkileri

Hazırlanan paraprobiyotik ve postbiyotiklerin 20, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{L/mL}$ 'lik dozları L929 hücreleri ile 12, 18 ve 24 saat boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyonlar sonunda yapılan uygulamaların hücreler üzerindeki etkileri % canlılık olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar 4.1. ve 4.2.'de verilmiştir. Çalışmada, kontrol grubu yalnızca DMEM (%10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin) ile muamele edilmiştir.



Şekil 4.1. Paraprobiyotik uygulamalarının L929 hücreleri üzerindeki %canlılık sonuçları
n:6, OD $\pm$ SD *(p<0,05)



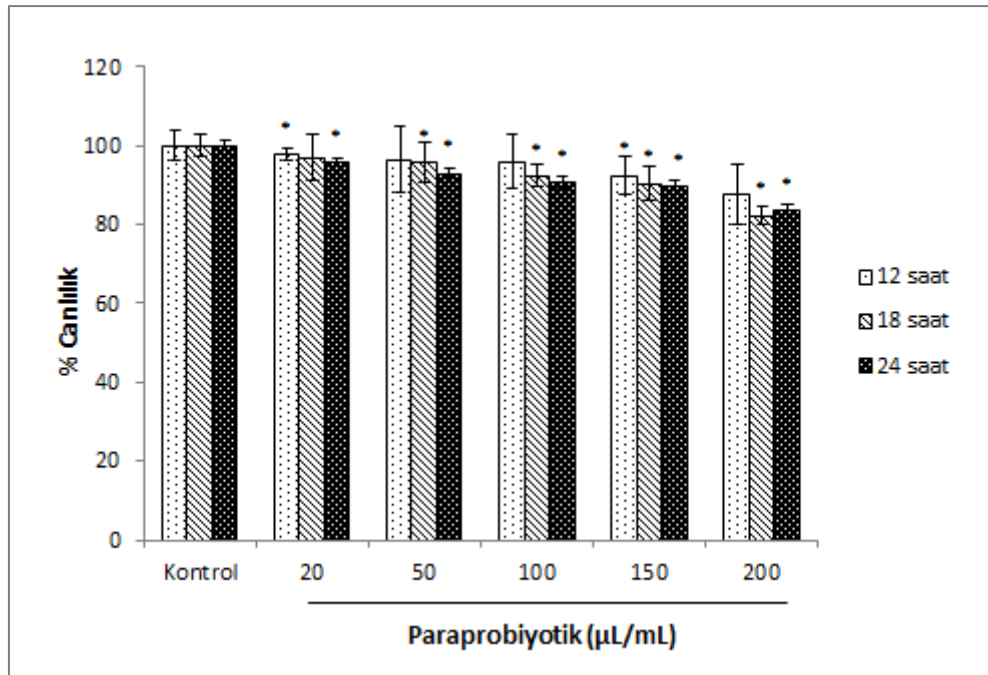
Şekil 4.2. Postbiyotik uygulamalarının L929 hücreleri üzerindeki % canlılık sonuçları n:6, OD ± SD *(p<0,05)

Paraprobiyotik uygulamalarında 12 ve 18. saatte 20-150 µL/mL aralığında hücre canlılığı sırası ile %94-83 ve %93-72 aralığında belirlenirken, postbiyotik uygulamalarında %97-82 ve %84-72 aralığında tespit edilmiştir. Paraprobiyotik uygulamalarında, 24 saatlik inübasyon sonunda doz artışına bağlı olarak % canlılık değerinde bir azalma meydana gelmiştir. Özellikle, 200 µL/mL uygulamalarının tüm inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığında %50 oranında azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. Postbiyotik uygulamalarında da paraprobiyotik uygulamalarında olduğu gibi inkübasyon sürelerinin artmasına bağlı olarak % canlılık değerinde azalmalar meydana gelmiştir. 24.'üncü saatin sonunda 200 µL/mL uygulamasının %70'in altına düştüğü tespit edilmiştir. 20 µL/mL uygulamaları ise yapılacak diğer çalışmalar için düşük bir doz seviyesi kalmıştır. Bu hücre hattı için sonraki çalışmalarda toksik olmayan ve etkin olabileceği düşünülen, L929 hücre hattı ile yapılacak olan *in vitro* yara modeli ve PCR çalışmalarındaki uygulama grupları Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

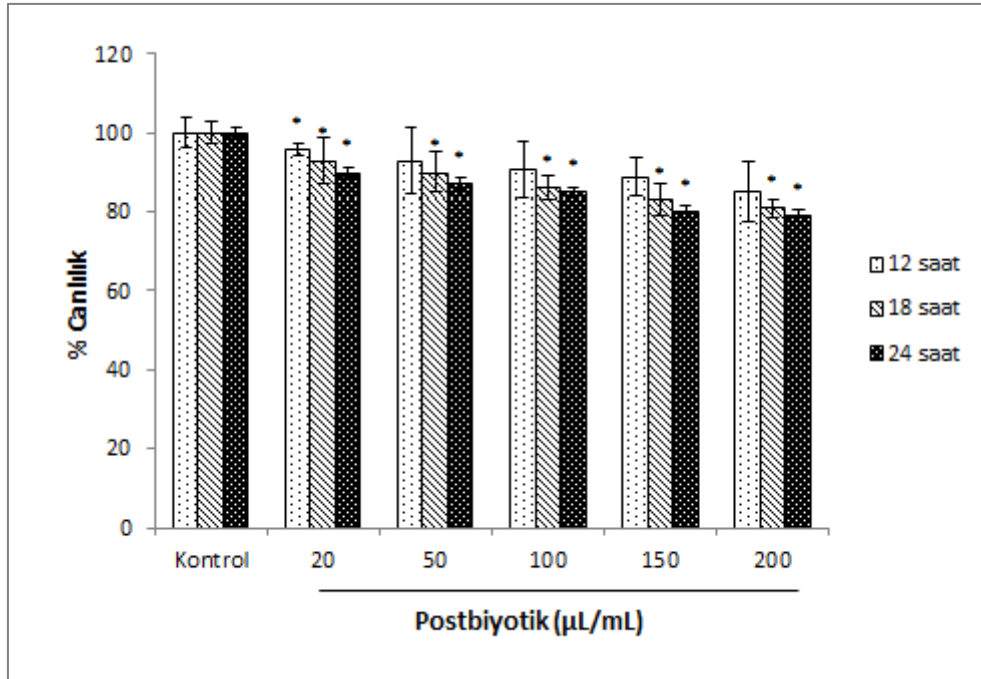
İstatistiksel olarak, kontrole kıyasla paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının azalan hücre canlılığı değerlerinin anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

4.1.2. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının RAW264.7 hücre hattı canlılığı üzerine etkileri

Hazırlanan paraprobiyotik ve postbiyotiklerin 20, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{L/mL}$ 'lik dozları RAW264.7 hücreleri ile 12, 18 ve 24 saat boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyonlar sonunda yapılan uygulamaların hücreler üzerindeki etkileri % canlılık olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.3. ve 4.4.'te verilmiştir. Çalışmada, kontrol grubu yalnızca DMEM (%10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin) ile muamele edilmiştir.



Şekil 4.3. Paraprobiyotik uygulamalarının RAW64.7 hücreleri üzerindeki % canlılık sonuçları n:6, OD $\pm$ SD *($p<0,05$)



Şekil 4.4. Postbiyotik uygulamalarının RAW264.7 hücreleri üzerindeki % canlılık değerleri n:6, OD ± SD *(p<0,05)

Paraprobiyotik uygulamalarında 12 ve 18. saatte 20-200 µL/mL aralığında hücre canlılığı sırası ile %97-87 ve %96-82 aralığında belirlenirken, postbiyotik uygulamalarında %95-85 ve %93-81 aralığında tespit edilmiştir. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları bu hücre hattında canlılığı %70'in üzerinde korumasına rağmen L929 hücre hattı ile yapılacak olan *in vitro* yara modeli ve PCR çalışmalarında elde edilen sonuçların uyumlu ve karşılaştırılabilir olması amacı ile uygulama süresi ve konsantrasyonları 50, 100 ve 150 µL/mL; 12 ve 18. saat olarak seçilmiştir.

İstatistiksel olarak, kontrole kıyasla paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının azalan hücre canlılığı değerlerinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

4.2. Paraprobiyotik ve Postbiyotiklerin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi

Açık yara bölgesinin patojen bulaşları sonucu inflamasyon sürecinin uzamasına ve yara iyileşme sürecinde gecikmelere neden olarak yaranın kronikleşmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara patojenlerinden sıkça rastlanan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Candida albicans* (*C. albicans*) üzerindeki antimikrobiyal etkileri 'Clinical and Laboratory

Standards Institute' (CLSI) mikrodilüsyon yöntemini kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

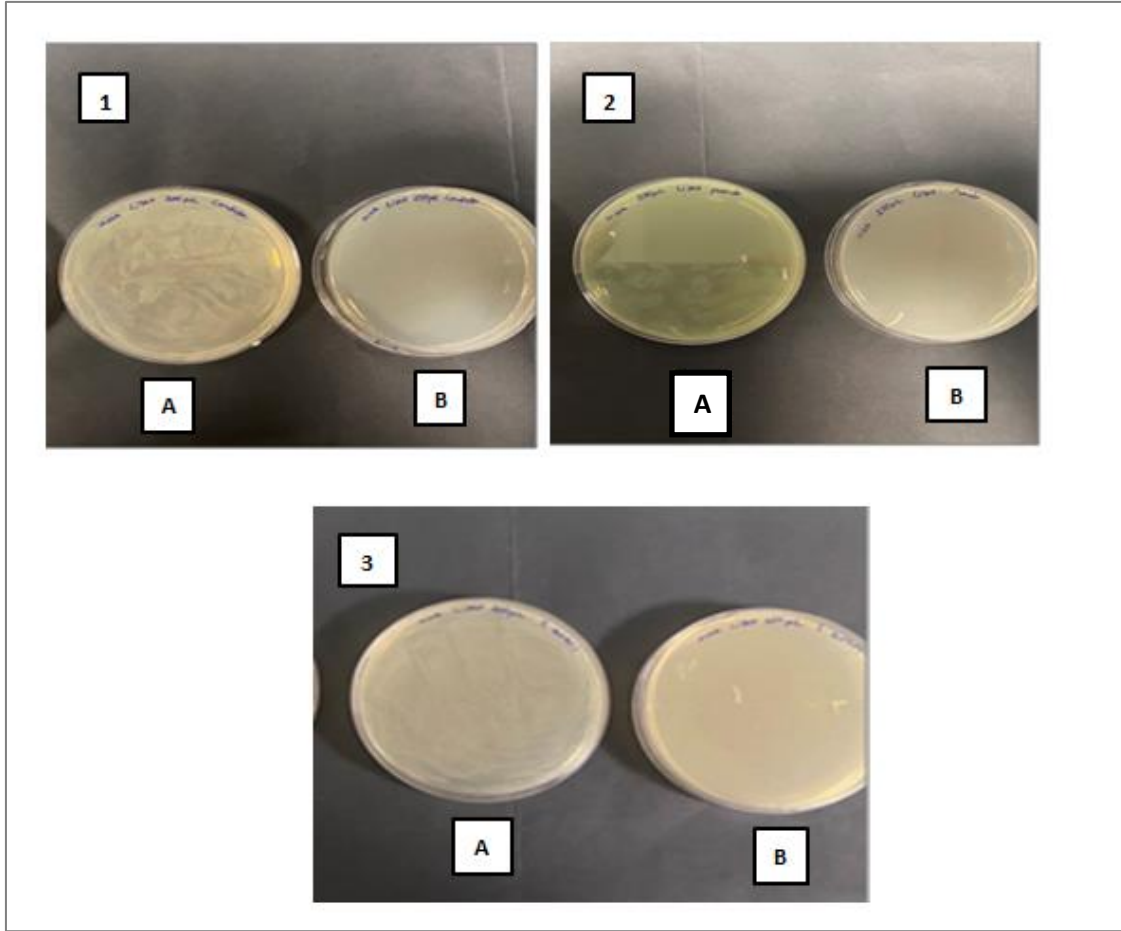
Çalışmada, pozitif kontrol olarak MHA, negatif kontrol olarak da etkenlerin kendisi kullanılmıştır.

Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin MİK ve MBK değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin MİK ve MBK değerleri (µL/mL). a: MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyon, b: MBK: minimum bakterisidal konsantrasyon

	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	MİK ^a	MBK ^b	MİK ^a	MBK ^b	MİK ^a	MBK ^b
Uygulama Grupları						
Paraprobiyotik	100	250	100	250	100	250
Postbiyotik (pH 4,5)	25	50	25	50	25	50

Paraprobiyotiklerin çalışmalarda kullanılan 25, 50, 75, 100 ve 150 µL/mL dozları üç etken üzerinde de etkinlik gösterememesi nedeni ile 200 ve 250 µL/mL dozları da çalışmaya eklenmiştir. Üç etkende de Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), paraprobiyotik uygulamaları için 100 µL/mL olarak belirlenmiştir. Minimum Bakterisidal Konsantrasyon ise (MBK) 250 µL/mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.5.'te verilmiştir.

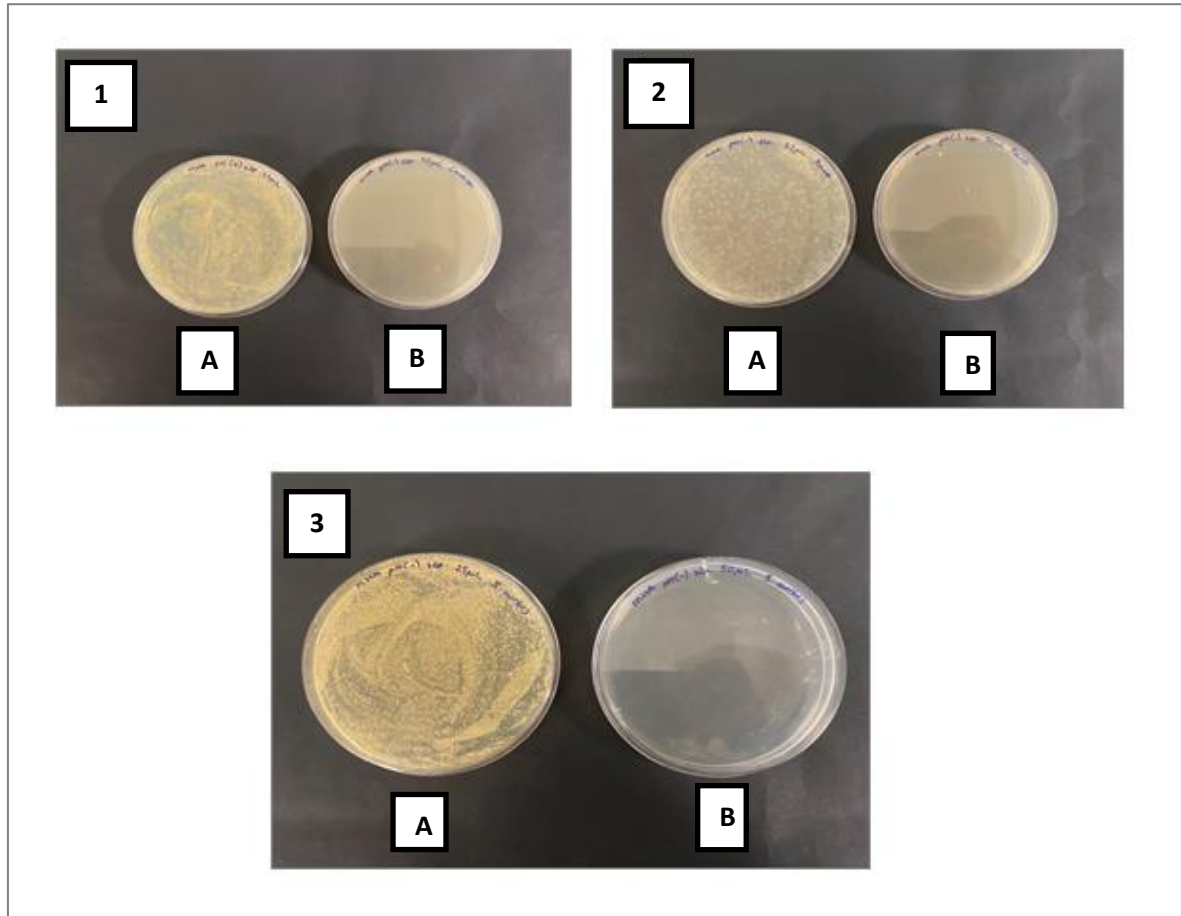


Şekil 4.5. Paraprobiyotik uygulamalarının MBK sonuçları. 1.A. *C. albicans*, B. 250 $\mu\text{L/mL}$ paraprobiyotik, 2.A. *P. aeruginosa* B. 250 $\mu\text{L/mL}$ paraprobiyotik; 3.A. *S. aureus* B. 250 $\mu\text{L/mL}$ paraprobiyotik

Paraprobiyotikler, hücre duvar bileşenleri dahil olmak üzere içeriğinde birçok çeşit farklı protein bulundurması sebebi ile antimikrobiyal etkinliğin ancak doz artışına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Kullanılan postbiyotikler, yapılan diğer çalışmalarda hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemesi nedeni ile pH 7 ayarı yapılarak çalışmalarda kullanılmıştır. Bu çalışmada, antimikrobiyal etkinliğin pH'ya bağlı olarak değişip değişmediğinin belirlenmesi amacı ile pH 7'ye ayarlanan postbiyotikler ve pH ayarı yapılmayan postbiyotikler kullanılmıştır. Çalışmada her iki grup için de 25, 50, 75, 100 ve 150 $\mu\text{L/mL}$ dozları kullanılmıştır. pH 7 postbiyotikler patojenik etkenlerin gelişimini inhibe etmediği kaydedilirken pH ayarı yapılmadan kullanılan postbiyotikler için üç etkende de MİK değeri 25 $\mu\text{L/mL}$ olarak belirlenmiştir. MBK değeri ise 50 $\mu\text{L/mL}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Laktik asit bakterilerinin ürettikleri metabolitler arasında laktik asit ve diğer yağ asitleri

bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda postbiyotik içeriğinde yer alan bu asitlerin patojenlerin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Gomez-Garcia ve ve diğerleri, 2019). Buna bağlı olarak çalışmamızda pH ayarı yapılmadan kullanılan postbiyotiklerin ortamda bulunan laktik asit varlığına bağlı olarak patojen gelişimini inhibe ederken, pH 7 olarak kullanılan postbiyotiklerin pH'nın artmasına bağlı olarak antimikrobiyal özelliğinin düşmesine neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Postbiyotiklerin uygulamalarının MBK sonuçları 1.A.C. *albicans*, B. 50 µL/mL postbiyotik, 2. A. *P. aeruginosa* B. 50 µL/mL postbiyotik; 3. A. *S. aureus* B. 50 µL/mL postbiyotik

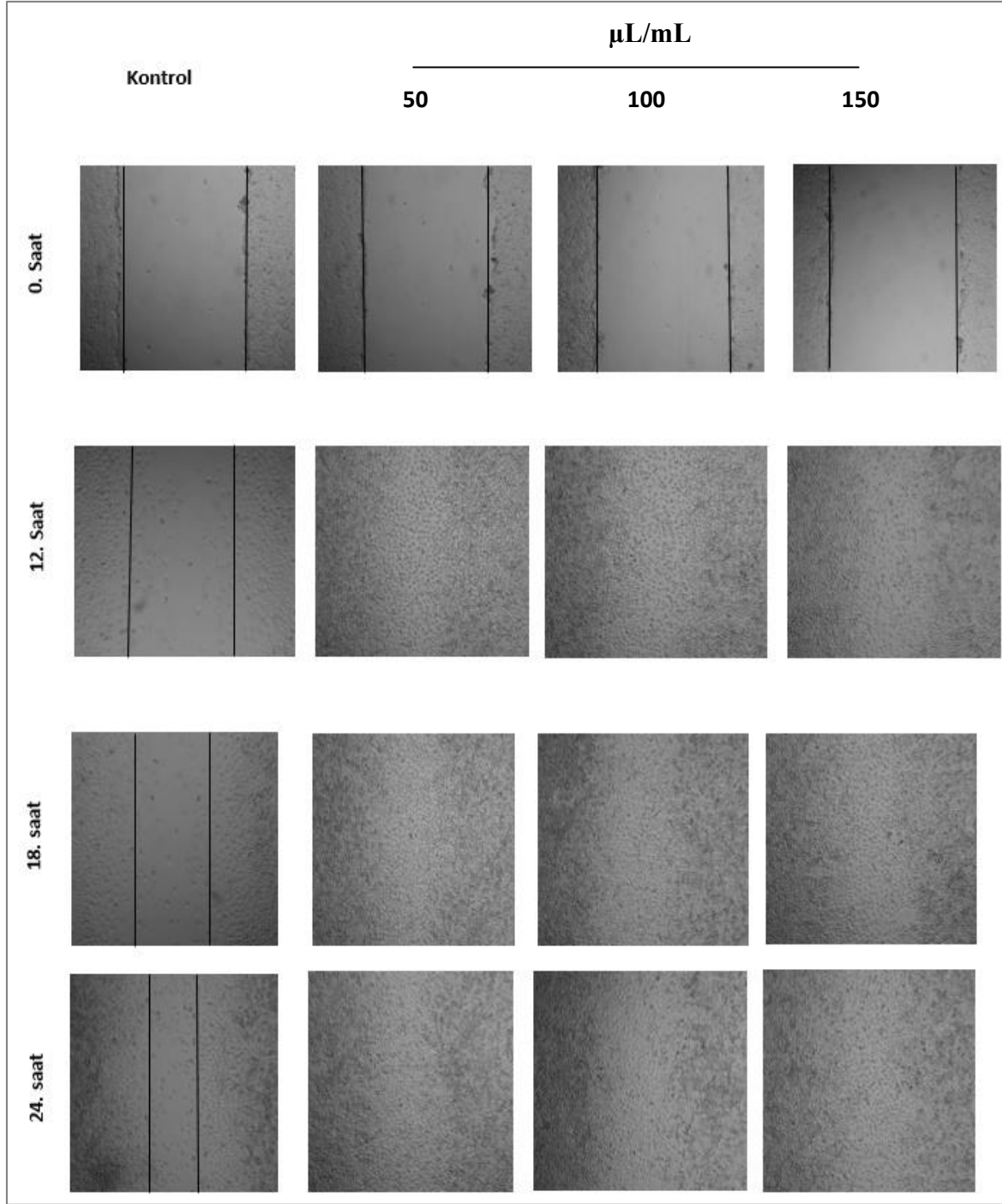
İstatistiksel olarak, kontrol gruplarına kıyasla paraprobiyotik ve pH 7, pH 4,5 postbiyotik uygulamalarının MİK ve MBK değerlerinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

4.3. Paraprobiyotik ve Postbiyotik Uygulamalarının Yara Kapanması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Fibroblastların yara bölgesine göçü (migrasyon), proliferasyon fazı için kritik bir aşamadır. Bu nedenle, bu çalışmada paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara kapanmasında fibroblastların migrasyonu üzerine etkisinde ideal doz ve sürenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, L929 hücreleri ile *in vitro* yara modeli oluşturulmuştur. *In vitro* yara modeli için Scratch Assay (Çizik Deneyi) yöntemi kullanılmıştır. Kontrol grubu yalnızca DMEM ile muamele edilmiştir.

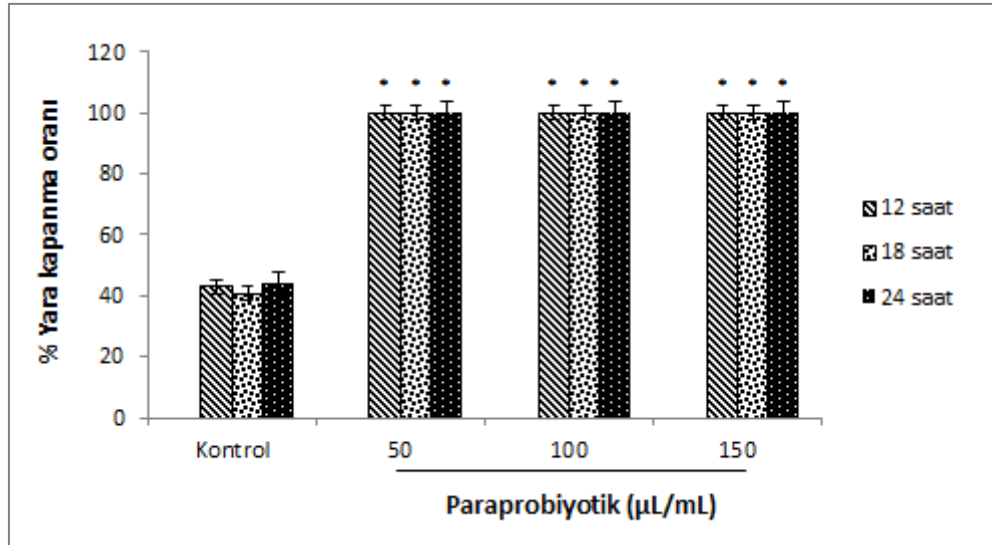
4.3.1. Paraprobiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri

Belirlenen dozların yara kapanması üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla oluşturulan *in vitro* yara modeli üzerinde uygulamalar yapılmış, 12, 18 ve 24 saatlik inkübasyonlar sonucunda kapatma oranları % kapatma olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Paraprobiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri

Paraprobiyotik uygulamalarında tüm dozların in vitro yara modelinde 12. saat itibariyle yarayı tamamen kapattığı gözlenmiştir. 12. saati takiben 18 ve 24. saatlerde de aynı şekilde yara alanının tamamen kapandığı, ek olarak, 18 ve 24. saatlerde yara kenarındaki hücrelerin proliferasyon oldukları gözlenmiştir. Şekil 4.8.'de paraprobiyotik uygulamaları sonucunda 12,18 ve 24. saatlerde % yara kapanma oranları verilmiştir.

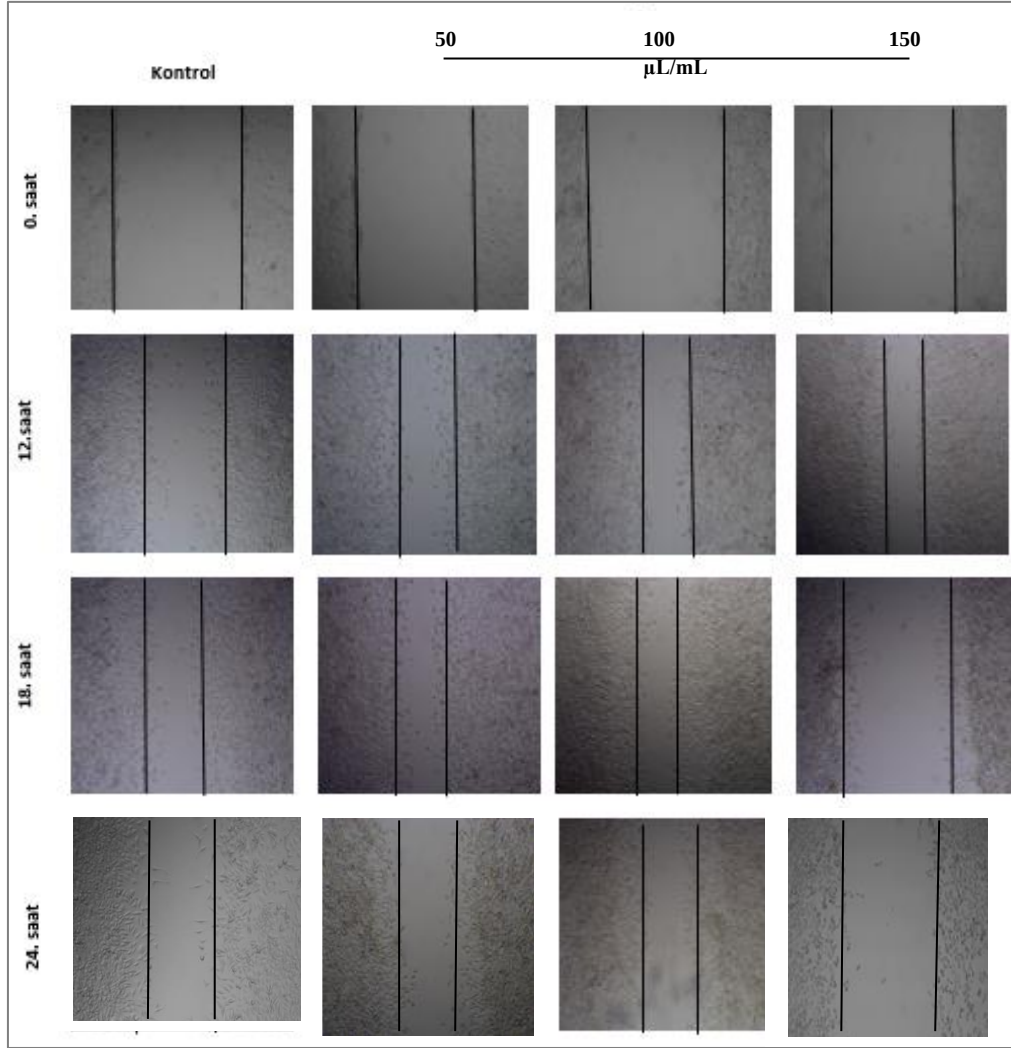


Şekil 4.8. Paraprobiyotik uygulamaları sonucunda %yara kapanma oranları n:4, OD $\pm$ SD
*($p < 0,05$)

İstatistiksel olarak, kontrol grubuna kıyasla paraprobiyotik uygulamalarında tüm dozlarda 12, 18 ve 24 saatlerde yüzde kapanma değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

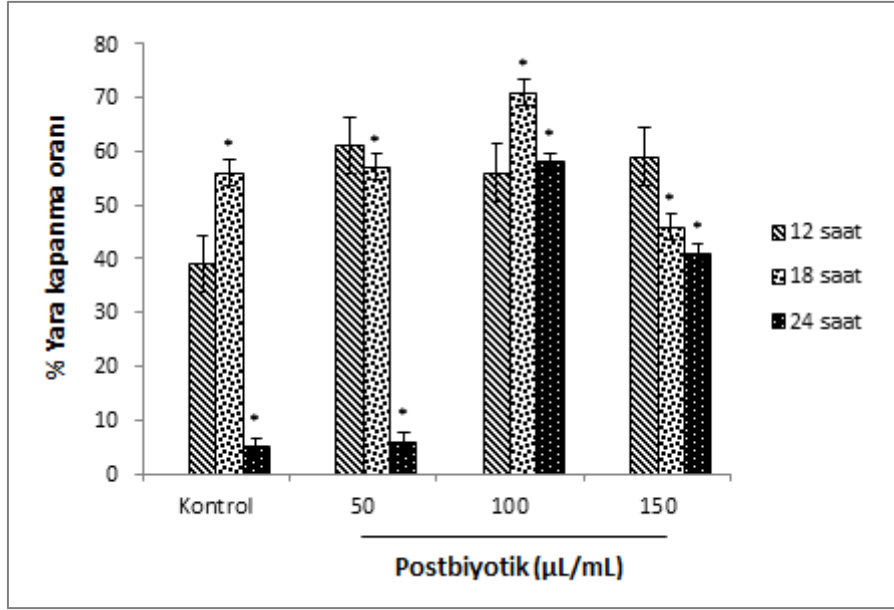
4.3.2. Postbiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri

Uygulamalar sonrası 12, 18 ve 24 saatlik inkübasyonlar sonucunda kapatma etkileri %kapatma olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Postbiyotik uygulamalarının yara kapanması üzerine etkileri

Postbiyotik uygulamalarının in vitro yara modelinde 12. saatte dozlara göre yara kapanma yüzdeleri 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de %61, 100 $\mu\text{L/mL}$ 'de %56, 150 $\mu\text{L/mL}$ 'de ise %59'dur (Şekil 4.9). 18. saate gelindiğinde 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de %57, 100 $\mu\text{L/mL}$ 'de %71'e çıkarken 150 $\mu\text{L/mL}$ 'de hücre morfolojisinin bozulmaya başlayarak yara kapanma yüzdesinde %13'lük bir düşüş olduğu kaydedilmiştir. 24. saatte uygulama yapılan tüm dozlarda yara bölgesindeki hücrelerin morfolojilerinin bozulduğu buna bağlı olarak iyileşmede %20-40 oranında düşüşler meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Postbiyotik uygulamaları sonucunda %yara kapanma oranları n:4, OD $\pm$ SD
*(p<0,05)

İstatistiksel olarak, kontrol gruplarına kıyasla postbiyotik uygulamalarında 12, 18 ve 24. saatlerde yüzde kapanma değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

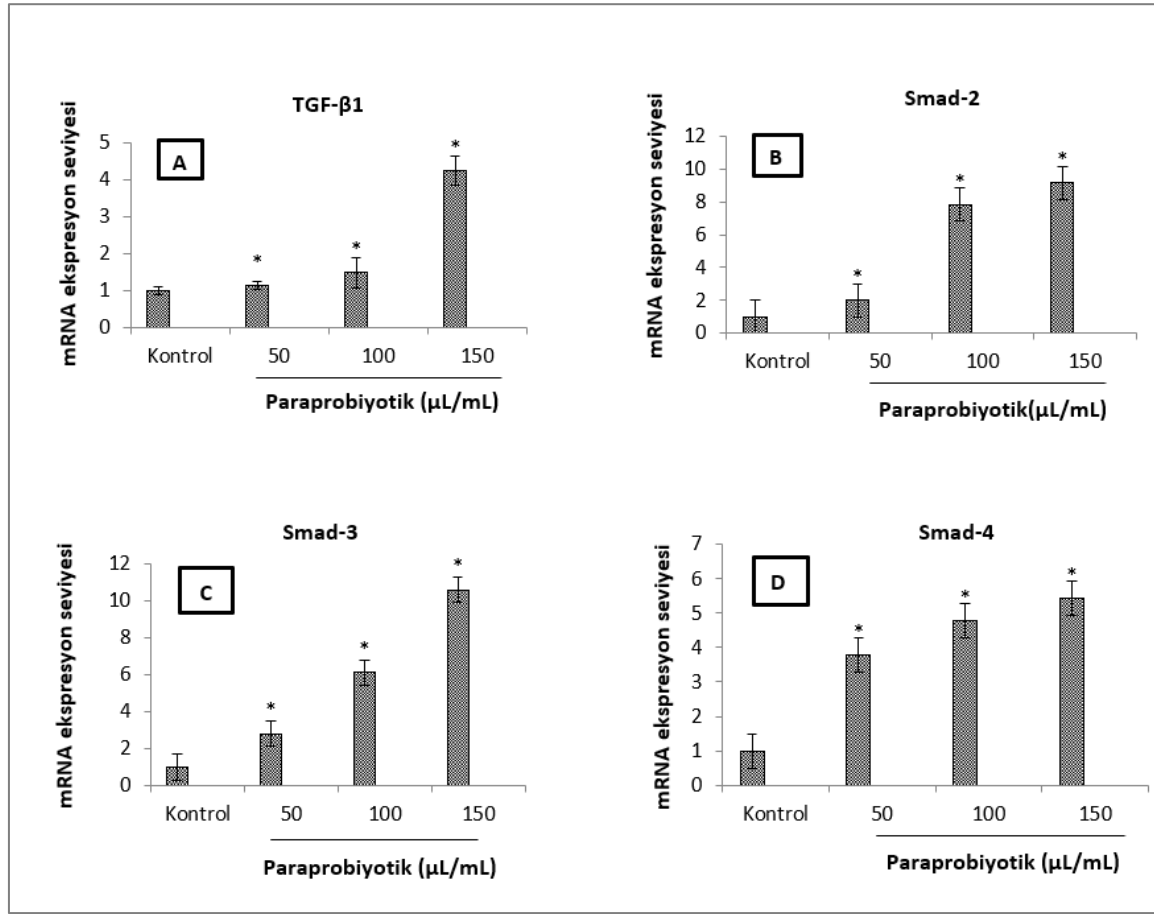
4.4. Paraprobiyotik ve Postbiyotiklerin Uygulamalarının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Gen Düzeyinde Belirlenmesi

TGF- β 1/Smad yolağı, yara iyileşmesinde büyüme faktörü reseptörü etkileşimi faktörleri ile doğrudan bağlantılı olup, hücre proliferasyonu, farklılaşması gibi hücresel olaylarda önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara kapanması üzerine etkilerinin TGF- β 1/Smad yolağı'nda gen düzeyinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla q-RT PCR yöntemi kullanılmıştır. L929 hücrelerinde paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları 12-18. saatlerde 50, 100 ve 150 µL/mL dozlarının TGF- β 1, Smad-2, Smad-3, Smad-4, kollajen (COL1A1) ve fibronektin (FN) gen seviyelerindeki etkileri belirlenmiştir. Kontrol grubu yalnızca DMEM ile muamele edilmiştir.

4.4.1. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin TGF- β 1/Smad yolağı üzerindeki modülatör etkilerinin belirlenmesi

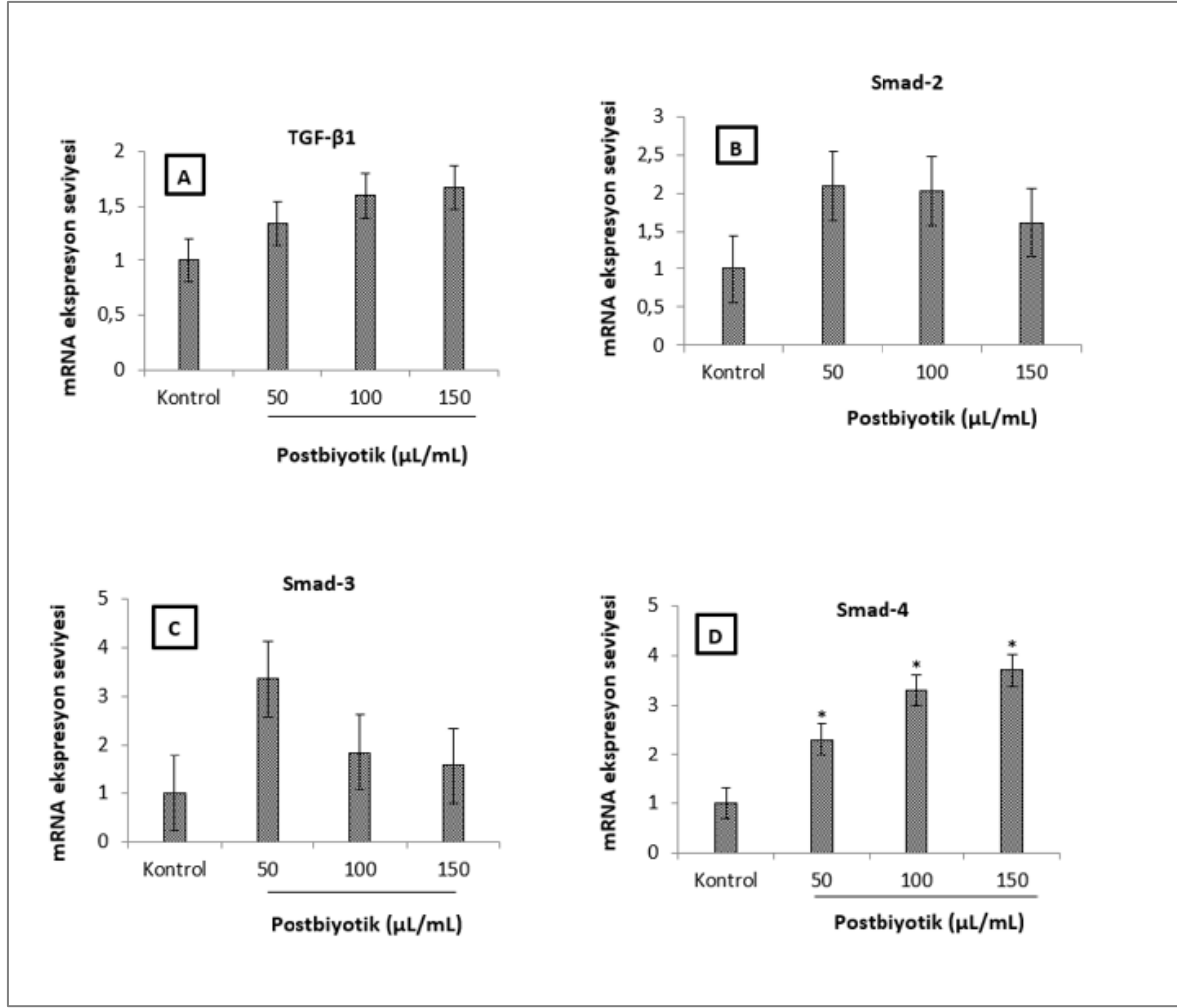
TGF β -1/Smad sinyal yolağı; TGF- β reseptörlerinin aktivasyonu ile Smad-2/3'ün fosforile olması ve Smad-4 ile kompleks oluşturarak nükleusa göç edip hücre proliferasyon,

migrasyonu ve ECM proteinleri sentezini indüklenerek yara iyileşme sürecinde fonksiyonel bir rol oynar. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları sonucunda TGF- β 1, Smad-2, Smad-3 ve Smad-4 mRNA ekspresyon seviyeleri Şekil 4.11. ve 4.12.'de verilmiştir. Paraprobiyotik uygulamalarında mRNA seviyelerinde en iyi sonuçlar 12. saate ait iken postbiyotik için en iyi sonuçlar 18. saate aittir. Her iki grup için de elde edilen mRNA ekspresyon seviyeleri *in vitro* yara modeli sonuçlarını desteklemektedir.



Şekil 4.11. Paraprobiyotiklerin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modülatör etkileri. (A) TGF- β 1, (B) Smad-2, (C) Smad-3 ve (D) Smad-4 mRNA ekspresyonu sonuçların:4, OD $\pm$ SD *(p<0,05)

Paraprobiyotik uygulamalarının doz artışına bağlı olarak TGF- β 1, Smad-2, Smad-3 ve Smad-4 mRNA ekspresyon seviyelerini arttırdığı ve TGF β -1/Smad sinyal yolağında etkili olduğu belirlenmiştir. TGF β -1 mRNA ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla 4,2; Smad-2 9,1; Smad-3 10,6 ve Smad-4'te 5,4 kat artışı olmuştur.



Şekil 4.12. Postbiyotiklerin TGF-β1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modölatör etkileri. (A) TGF-β1, (B) Smad-2, (C) Smad-3 ve (D) Smad-4 mRNA ekspresyonu sonuçları n:4, OD ± SD *(p<0,05)

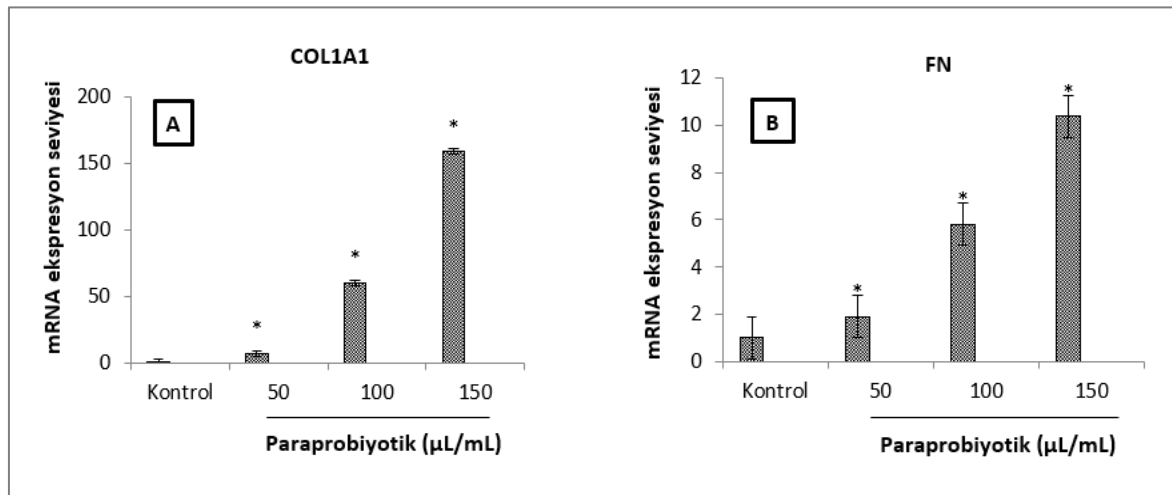
Postbiyotik uygulamalarının doz artışına bağlı olarak TGF-β1 ve Smad-4 mRNA ekspresyon seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir. TGFβ-1 mRNA ekspresyon seviyesi tüm dozlar için kontrol grubuna kıyasla 1,6 kat; Smad-4’te ise 3,7 kat artışı olduğu belirlenmiştir. Smad-2 ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 2 kat artış olmuştur. Ancak 150 µL/mL’de kontrole kıyasla 1,6 kat azalma söz konusudur. Smad-3 mRNA ekspresyon seviyesine bakıldığında ise durum tam tersidir. Doz artışına bağlı olarak Smad-3’te mRNA ekspresyon seviyesi azalmaktadır. En yüksek ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla 50 µL/mL’de 3,3 kat olarak belirlenmiştir.

İstatiksel olarak paraprobiyotik uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla TGF-β1, Smad-2, Smad-3 ve Smad-4 mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde etkisi anlamlıdır (p<0,05). Postbiyotik uygulamalarında ise Smad-4 mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde etkisi

anlamli iken ($p<0,05$) TGF- β 1, Smad-3 ve Smad-2 ekspresyon seviyeleri üzerindeki postbiyotiklerin etkisinin kontrol grubuna kıyasla anlamli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

4.4.2. Paraprobiyotikve postbiyotiklerin ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleriüzerindeki modölatör etkilerinin belirlenmesi

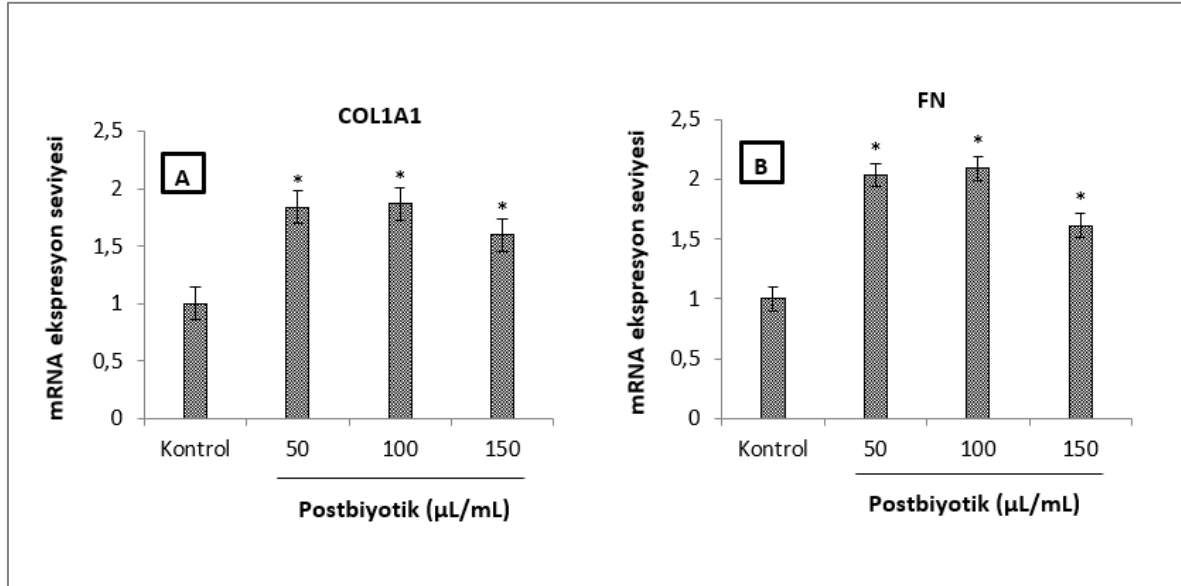
Yaralanma sonrası yara, pıhtılaşma, granülasyon dokusu oluşumu, yeniden epitelizasyon ve hücre dışı matris (ECM) yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere bir dizi dinamik fizyolojik olay yoluyla iyileşir. Bununla birlikte, son bulgular da ECM'nin büyüme faktörleri ve sitokinlerin depolanması ve iletilmesi, doku onarımı ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlar dahil olmak üzere birçok işlevi olduğunu göstermektedir. Doğal ECM'de bulunan iki protein kollajen ve fibronektindir. Kollajen, ECM'de bulunan en yaygın proteindir. Fibroblastlar tarafında sentezlenir ve derinin yaklaşık %50-90'ını oluşturur. Bu çalışmada, paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.13. ve 4.14.'te verilmiştir.



Şekil 4.13. Paraprobiyotiklerin COL1A1 ve FN üzerindeki modölatör etkileri. (A)COL1A1, (B) FNmRNA ekspresyonu sonuçların:4, OD $\pm$ SD *($p<0,05$)

Paraprobiyotik uygulamalarının doz artışına bağılı olarak COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon seviyelerini arttırdığı ve COL1A1 ve FN üretiminde etkili olduğu belirlenmiştir. COL1A1 mRNA ekspresyon seviyesi en yüksek konsantrasyonda kontrole kıyasla 159,2 kat; FN ise 10,3 kat artmıştır. Kollajenin fazla üretimi skar dokusunun aşırı

birikimine neden olarak hipertrofik yara izi oluşur. Hipertrofik skar, yara iyileşmesine anormal bir skar oluşumudur ve yarada istenmeyen bir iyileşme durumudur. Genel olarak, paraprobiyotik uygulamalarının gen düzeyindeki etkileri incelediğinde *in vitro* yara modeli sonuçlarını desteklemektedir.



Şekil 4.14. Postbiyotiklerin COL1A1 ve FN üzerindeki modülatör etkileri. (A) COL1A1, (B) FN mRNA ekspresyonu sonuçları: $4, OD \pm SD$ *($p < 0,05$)

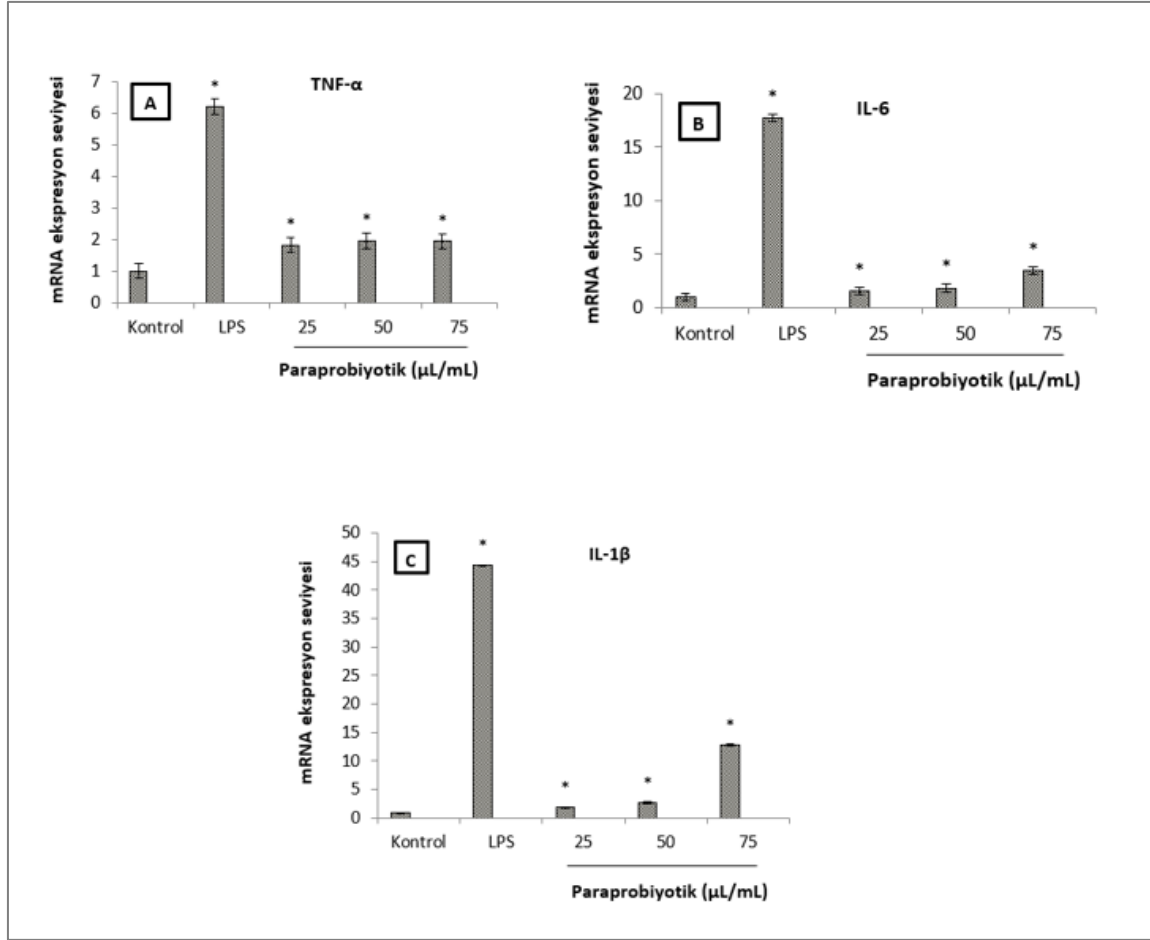
Postbiyotik uygulamalarının doz artışına bağlı olarak COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon seviyelerinde 150 µL/mL’de düşüş olduğu belirlenmiştir. COL1A1 mRNA ekspresyon kontrole kıyasla seviyesi 1,8 kat olduğu 150 µL/mL uygulamasında 1,5 kat düştüğü belirlenmiştir. FN mRNA ekspresyon seviyesi ise 50 ve 100 µL/mL’de 2 katartarken, 150 µL/mL uygulamasında 1,6 kat azalmıştır. Buna bağlı olarak, COL1A1 ve FN üretiminde postbiyotiklerin etkili olduğu ancak yüksek konsantrasyonlarda ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla 1,5-1,6 kat arası bir düşüş olduğu kaydedilmiştir.

İstatiksel olarak kontrol grubuna kıyasla paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde etkisinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

4.4.3. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin inflamasyon fazı üzerindeki modölatör etkileri

Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin pro-inflamatuar sitokinler üzerindeki modölatör etkileri

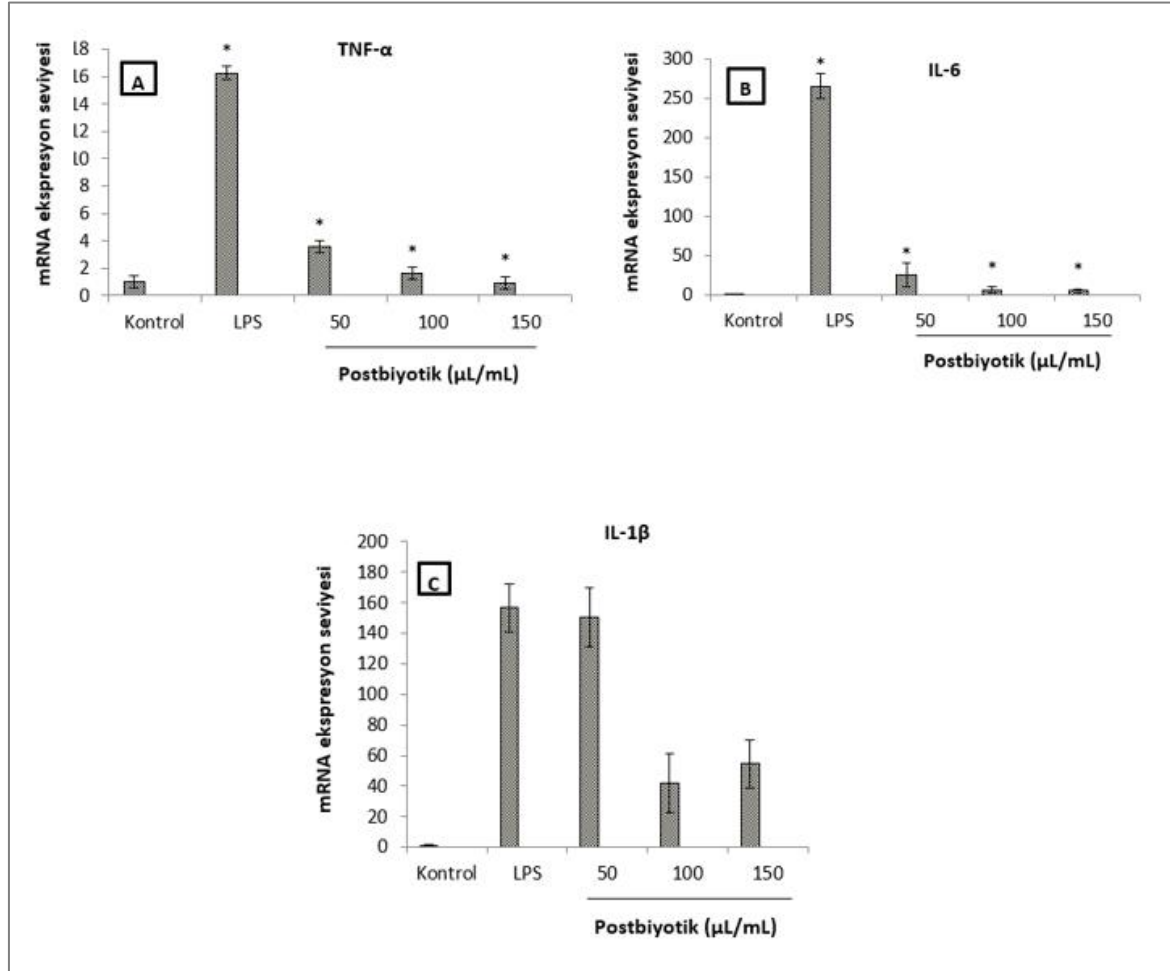
İnflamasyon fazı, yara iyileşmesinin ikinci fazıdır; enfeksiyonu önler. İnflamasyon fazının süresi yaranın kronikleşerek iyileşememesine neden olmaktadır. Bu faz süresince makrofajlar tarafından üretilen yüksek miktarda pro-inflamatuar sitokinler ve bu sitokinlerin uzun süreli salınımı sürecin uzamasına ve yaranın kronikleşmesine sebep olmaktadır; bu da yara iyileşmesinde istenmeyen bir durumdur. Bu çalışmada, RAW264.7 makrofaj hücrelerinde paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının inflamatuvar fazda önemli rol oynayan pro-inflamatuar sitokinlerden TNF- α , IL-6 ve IL-1 β 'nin ekspresyon seviyelerinde etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. İnflamasyon aşamasını taklit etmek amacıyla RAW264.7 hücreleri lipopolisakkarit (LPS) ile muamele edilmiştir. Bu çalışmada iki farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Kontrol gruplarından biri yalnızca DMEM ile diğer grup yalnızca LPS ile muamele edilmiştir (Çizelge 3.7). Sonuçlar 4.15. ve 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.15. Paraprobiyotiklerin TNF- α , IL-6 ve IL-1 β üzerindeki modülatör etkileri. (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-1 β mRNA ekspresyonu sonuçları n:4, OD $\pm$ SD *(p<0,05)

Paraprobiyotik uygulamalarında 12 saatte tüm doz uygulamalarının gen ekspresyon seviyelerinde aşırı sitokin üretimine neden olduğu belirlenmiştir (veri gösterilmiyor). Bu nedenle tüm doz seviyeleri yarıya indirilerek 12 saat uygulamaları yapılmıştır (veri gösterilmiyor). Ancak bu durumda da sitokinlerin aşırı üretimi kaydedilmiştir. Paraprobiyotikler içerisinde yer alan hücre duvarı bileşenleri, Toll benzeri reseptörlere bağlanarak uzun süreli inflamatuvar yanıt oluşumuna neden olabilmektedir. Yapılan saat ve doz denemeleri sonucunda Çizelge 3.7.'de uygulama grupları belirlenmiştir. Paraprobiyotik uygulamalarının LPS ile indüklenen sitokin üretimine göre TNF- α , IL-6 ve IL-1 β mRNA ekspresyon seviyelerinde düşüşleri neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, paraprobiyotiklerin pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini düzenleyerek inflamasyon sürecinin zamanında tamamlanmasını sağlayarak yaranın normal süresi boyunca iyileşme göstererek yara bölgesinin kapanmasını, bölgedeki hücrelerin proliferasyonunu olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Kontrol grubuna kıyasla (LPS), TNF- α mRNA

ekspresyon seviyesi tüm dozlar için 3,2kat, IL-6 25 ve 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 11,3 kat, 75 $\mu\text{L/mL}$ 'de 5 kat, IL-1 β için 25 $\mu\text{L/mL}$ 'de 24,4 kat, 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 16,9 kat 75 $\mu\text{L/mL}$ 'de 3,45 kat düşüş belirlenmiştir.



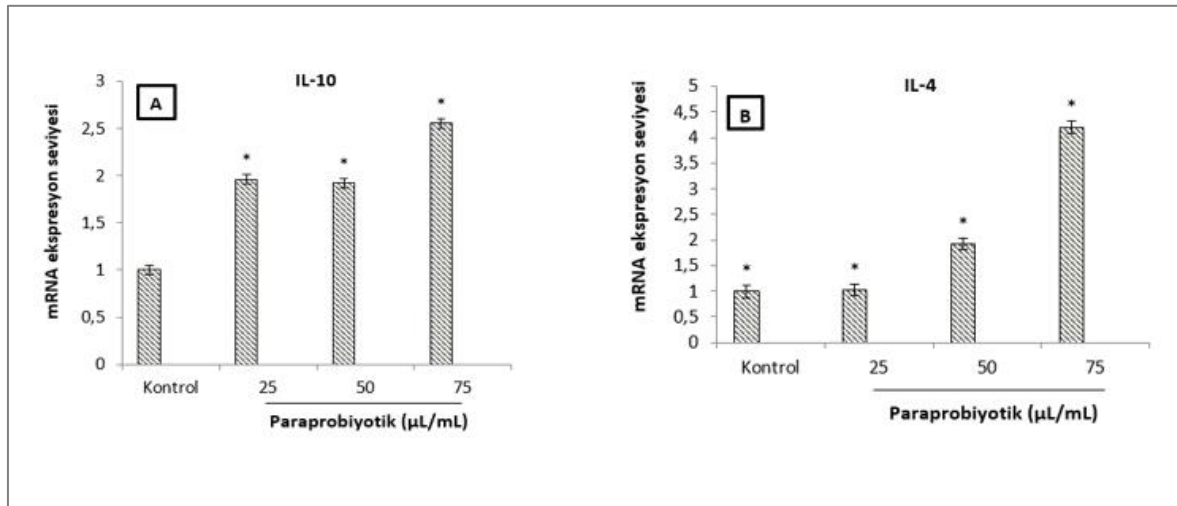
Şekil 4.16. Postbiyotiklerin TNF- α , IL-6 ve IL-1 β üzerindeki modülatör etkileri. (A) TNF- α , (B)IL-6, (C)IL-1 β mRNA ekspresyonu sonuçları n:4, OD $\pm$ SD*(p<0,05)

Postbiyotik uygulamaları 18 saat inkübasyon sonucundadoz artışına bağlı olarak TNF- α , IL-6 ve IL-1 β mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrol gurubuna (LPS) kıyasla 10-200 kat arası düşüşlerin olduğu belirlenmiştir. Postbiyotik uygulamalarının LPS ile indüklenen sitokin üretimine göre daha düşük olması postbiyotiklerin sitokinlerin üretimini düzenleyerek inflamasyon sürecinin zamanında tamamlanmasını sağlayarak yaranın normal süresi boyunca iyileşme göstererek yara bölgesinin kapanmasını olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. TNF- α 'da 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 4,5 kat, 100 $\mu\text{L/mL}$ 'de 10 kat, 150 $\mu\text{L/mL}$ 'de 16 kat, IL-6 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 10,6 kat, 100 ve 150 $\mu\text{L/mL}$ 'de 42,6 kat, IL-1 β 'da için doz artışına bağlı olarak 100 ve 150 $\mu\text{L/mL}$ 'de 3,9 katdüşüş belirlenmiştir.

İstatiksel olarak paraprobiyotiklerin TNF- α , IL-6 ve IL-1 β mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde etkisinin anlamlı olduğu ($p<0,05$); postbiyotik uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla TNF- α ve IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde etkisinin anlamlı olduğu ($p<0,05$), IL-1 β mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde etkisinin anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin anti-inflamatuar sitokinler üzerindeki modölatör etkileri

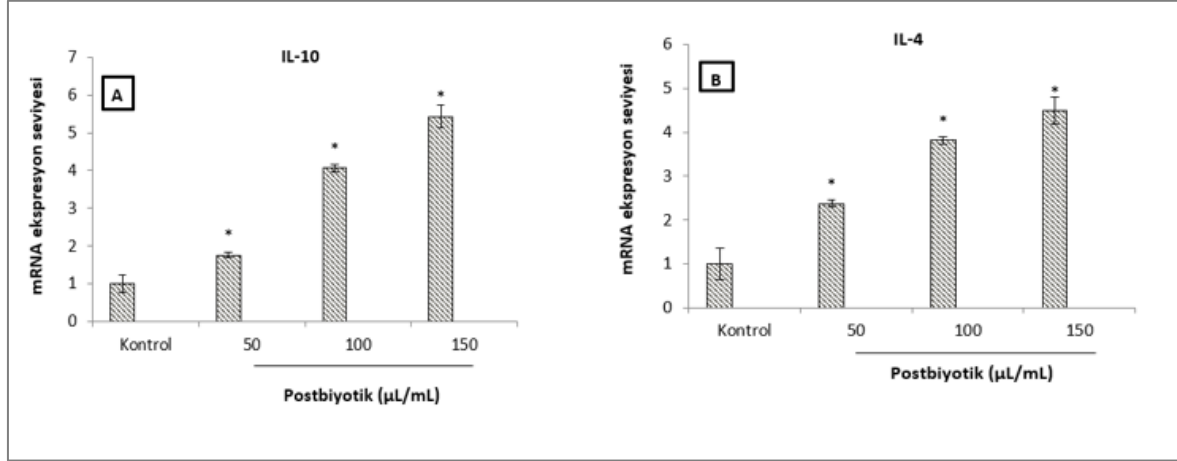
Pro-inflamatuar sitokinlerin uzun süreli üretimine bağlı olarak inflamasyon süresinin uzaması ile kronik yaralar meydana gelmektedir. Anti-inflamatuar sitokinler, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ederek inflamasyon süresinin uzamasını engelleyebilmektedir. Bu çalışmada, paraprobiyotik uygulamalarının anti-inflamatuar sitokin üretimini etkileyerek inflamatuvar sürecin uzamasını engelleyebilmedeki rollerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak, RAW264,7 makrofaj hücreleri için Çizelge 3.7.'deki uygulama grupları ile muamele edilerek anti-inflamatuar sitokinlerin gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kontrol grubu yalnızca DMEM ile muamele edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.17. ve 4.18.'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Paraprobiyotiklerin IL-10 ve IL-4 üzerindeki modölatör etkileri. (A) IL-10, (B) IL-4 mRNA ekspresyonu sonuçları n:4, OD $\pm$ SD *($p<0,05$)

Paraprobiyotik uygulamalarının 12 saat inkübasyon süresi ve 50, 100 ve 150 μ L/mL'lik dozları sonrası ekspresyon seviyelerinde anlamlı sonuçlar kaydedilememiştir (veri gösterilmiyor). Bu nedenle, paraprobiyotik uygulamalarında inkübasyon süresi arttırılmış (18 saat) ve dozlar azaltılarak 25, 50 ve 75 μ L/mL konsantrasyonlarında uygulamalar

yapılmıştır. mRNA ekspresyonu seviyelerinde IL-10 için doz artışına bağlı olarak artışın olduğu kaydedilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, 25 $\mu\text{L/mL}$ 'de 1,9 kat, 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 1,9 kat ve 75 $\mu\text{L/mL}$ 'de 2,5 katlık artış belirlenmiştir. IL-4 için ise 25 $\mu\text{L/mL}$ 'de 1,02 kat, 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 1,9 kat, 75 $\mu\text{L/mL}$ 'de 4,2 kat artışı belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Postbiyotiklerin IL-10 ve IL-4 üzerindeki modülatör etkileri. (A)IL-10, (B)IL-4 mRNA ekspresyonu sonuçları n:4, OD $\pm$ SD *(p<0,05)

Postbiyotik uygulamalarında da paraprobiyotik uygulamalarına benzer şekilde doz artışına bağlı olarak anti-inflamatuar sitokinlerden IL-10 ve IL-4 ekspresyon düzeylerinde artış gösterdikleri tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, IL-10'da 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 1,7 kat, 100 $\mu\text{L/mL}$ 'de 4 kat, 150 $\mu\text{L/mL}$ 'de 5,4 kat artış belirlenmiştir. IL-4'de 50 $\mu\text{L/mL}$ 'de 2,3 kat, 100 $\mu\text{L/mL}$ 'de 3,8 kat ve 150 $\mu\text{L/mL}$ 'de 4,4 kat artış kaydedilmiştir.

Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları anti-inflamatuar sitokinlerin ekspresyon düzeyleri üzerinde olumlu yönde bir etkiye sahiptir. Bu bağlamda, probiyotik kaynaklı postbiyotiklerin paraprobiyotikler gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretiminde etkin rol oynayıp pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı salınımını inhibe ederek yaranın kronikleşmesini önlemede etkili olabilecekleri düşünülmektedir.

İstatiksel olarak paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının kontrol grubuna kıyasla IL-10 ve IL-4 mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde etkisinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Kronik yaralar, artan prevalansları ve maliyetleri nedeniyle dünya çapında sağlık sistemlerini etkilemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki toplam nüfusun yaklaşık %2,5'inin yaşam kalitesini etkileyen kronik yaraların sağlık hizmetleri üzerinde önemli bir ekonomik etkisi vardır (Guest ve diğerleri, 2015). Yaşlanan nüfus, dünya çapında devam eden diyabet ve obezite tehdidi özellikle enfeksiyon sorunu göz önüne alındığında, kronik yaralar önemli bir klinik, sosyal ve ekonomik zorluk olmaya devam etmektedir. Kronik, iyileşmeyen yaralar yaklaşık 8,2 milyon kişiyi etkilemektedir (Guest ve diğerleri, 2017). 2014-2018 yılları arasında yapılan bir çalışma yara bakım ve tedavi maliyetlerinin 28,1 ile 96,8 milyar dolar arasında olduğunu göstermiştir. Kronik yaralar çoğunlukla yaşlı popülasyonda görülmektedir. 2060 yılına gelindiğinde, ABD hükümeti yaşlı nüfusun 77 milyonun üzerinde olacağını tahmin ediyor ve bu da kronik yaraların bu nüfusta giderek artan kalıcı bir sorun olmaya devam edeceğini göstermektedir. Kronik yaraların olumsuz etkileri dünya çapında hissedilmektedir. Küresel gelişmiş yara bakımı pazarının 2020-2027 analiz dönemi boyunca %6,6 Bileşik Yıllık Büyüme Oranı (CAGR) ile büyüyerek 2027 yılına kadar 18,7 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Lo ve diğerleri, 2020; Sen ve diğerleri 2009).

Yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazları dahil olmak üzere ardışık ancak birbiri ile örtüşen fazlarla karakterize edilen çok yönlü ancak karmaşık bir süreçtir. Yaralar genel olarak akut ve kronik olarak ikiye ayrılmaktadır (Wilkinson ve Hardman, 2020). Akut yaralar, iyileşme süreci sonunda yapısal bütünlüğün yeniden kazanılmasıyla sonuçlanan bir dizi moleküler olaydan geçer. Buna karşılık, kronik yaralar iyileşmez ve sürekli inflamasyon, kalıcı enfeksiyonlar ve nekroz gibi patolojik süreçlerle karakterize edilir (Raziyeva ve diğerleri, 2021). Kronik yaralar, kişilerin günlük yaşamını olumsuz etkilemekte ve ekonomik olarak ciddi bir yük oluşturmaktadır. İlerleyen süreçte kronik yaralar ölümle dahi sonuçlanabilmektedir. Mevcutta kullanılan yara tedavileri ve yara bakım malzemeleri zaman zaman hastalar için yetersiz kalmaktadır. Günlük yaşamda yaralanma kaçınılmaz bir durumdur. Kronik yaraların artması ve bunlarla ilişkili morbidite göz önüne alındığında, yara bakımı giderek daha önemli hale gelmektedir. Bu durum ciddi ekonomik ve sosyal yüke neden olmaktadır. Yara iyileşmesinde uygulanan tedavilerin yetersizliği ve şu an yara iyileşmesi üzerine standart bir tedavi yönteminin uygulanmaması, bu konu üzerinde daha kapsamlı çalışmalar

yapılması gerekliliğini göstermektedir. Özellikle son dönemde kronik yaraların hedefleyen, terapötik doğal biyoaktif bileşiklere yönelik çalışmalara ilgi artmaktadır.

Probiyotik mikroorganizmaların suşa özgü etkileri, kısa ömürlü olmaları ve nişe özgü etkisi, gelişen antibiyotik direnci, virülans gen transferi ve inflamatuvar yanıt gibi birtakım etkilerinin olması sebebiyle probiyotik kaynaklı inaktif ürünlere yönelim artmıştır. Probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotikler, konakçı üzerinde immünomodülatör, anti-tümör ve antimikrobiyal özellikler gibi çok çeşitli pozitif etkilere aracılık ederler (Danladi ve diğerleri, 2022). Bunun yanı sıra, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin, çeşitli yaraların (deri, kolit, diyabetik ve diyabetik olmayan ülserler, intestinal mukozit, enfekte ve enfekte olmayan yaralar) iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin olduğu üzerinde duran çalışmalar bulunmaktadır (Varian ve diğerleri, 2017; Russo ve diğerleri, 2019; Batista ve diğerleri, 2020; França, 2021; Nam ve diğerleri, 2021).

Mevcut literatürde paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinde inflamasyon, migrasyon, ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimi üzerinde etkili TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin gösterildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Yine literatürde yara iyileşmesinde paraprobiyotik ve postbiyotiği çalışılan probiyotik bakteriler içerisinde *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşu bulunmamaktadır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *L. plantarum* GD2 suşunun paraprobiyotik ve postbiyotiği kullanılmıştır. Çalışmada, paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının L929 ve RAW264.7 hücreleri üzerinde toksik olmayan, çalışmalarda kullanılacak etkin süre ve dozlar belirlenmiştir. Paraprobiyotik uygulamaları, L929 hücrelerinde doz artışına bağlı olarak 12. saatte 200 μ L/mL’de %50 oranında düşerek hücre ölümüne neden olduğu bulunmuştur. 18. saat için yine aynı şekilde 200 μ L/mL uygulamasında canlılık %50 oranında düşmüştür. 24. saate gelindiğinde ise hücre canlılığının 150 μ L/mL ve 200 μ L/mL uygulamalarında %45-50 oranları arasında düştüğü kaydedilmiştir. Çalışmamızda uygulamalar sonucunda sitotoksik etki ISO 10993-5 standartlarına göre değerlendirilmiştir. Standartta sitotoksik etki; $\geq$ %50 ise yüksek derecede sitotoksik etki, %50-21 aralığında ise orta derecede sitotoksik etki, %20-11 ise düşük derecede sitotoksik etki ve $\leq$ %10 ise sitotoksik olmayan etki olarak değerlendirilir. Çalışmamızda, L929 hücrelerinde 12 ve 18. saatlerde 20, 50, 100 ve 150 μ L/mL paraprobiyotik doz uygulamalarının %80’in üzerinde hücre canlılığını koruduğu gösterilmiştir. L929 hücrelerinde postbiyotik uygulamalarında

ise 12 ve 18. saatlerde tüm uygulama dozları için hücre canlılığı %70'in üzerindedir. 24. saatte en yüksek uygulama dozunda (200 $\mu\text{L/mL}$) hücre canlılığında %36,68 oranında bir düşüş olduğu kaydedilmiştir. Ek olarak, uygulanan diğer dozların 24. saate gelindiğinde dahi %70 üzerinde hücre canlılığını koruduğu gösterilmiştir. Paraprobiyotik uygulamalarının RAW264.7 hücrelerinde tüm saat ve dozlarda hücre canlılıkları %70'in üzerindedir. Ancak L929 hücrelerinde en yüksek konsantrasyon olan 200 $\mu\text{L/mL}$ 'nin hücre canlılıklarını %50 oranında düşürmesi neden ile yapılan *in vitro* yara modeli ve PCR çalışmaları ile uyumlu olması adına RAW264.7 hücre çalışmalarında da seçilen konsantrasyonlar 50, 100, 150 $\mu\text{L/mL}$ 'dir. RAW264.7 hücrelerinde postbiyotik uygulamalarının hücre canlılıkları üzerinde paraprobiyotik uygulamalarında olduğu gibi tüm doz ve saatlerde hücre canlılığı %70'in üzerindedir. RAW264.7 hücrelerinde, paraprobiyotik uygulamalarında olduğu gibi postbiyotik uygulamalarında da uyumlu olması için 50, 100 ve 150 $\mu\text{L/mL}$ dozları uygulanmıştır. Hücre canlılığı sonuçlarına bakıldığında, ISO standartlarına göre "etken maddelerin *in vitro* sitotoksitesi" kriterlerine göre paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının L929 fibroblast ve RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerinde yüksek derecede toksik etki göstermemektedir. Bu nedenle, kullanılan dozlar biyogüvenlik açısından uygun olup, yara çalışmalarında da kullanılmıştır.

Yaraya eşlik eden çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar, yaraların iyileşme sürecini bozmakta ve uzamasına neden olmaktadır (Zhu ve diğerleri, 2016). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), ve *Candida albicans* (*C. albicans*) yaralarda en sık görülen (özellikle kronik yaralarda) patojenlerdir. *S. aureus* genellikle derinin üst tabakasında yer alırken, *P. aeruginosa* yara yatağının en derin bölgesinde tespit edilir. Yapılan çalışmalara göre *C. albicans* türlerinin yaklaşık olarak %22'si kronik yaralardan izole edilmektedir. Yaraların enfeksiyonu bakteriyemi veya sepsise yol açabilir ve buna yüksek mortalite ve morbidite eşlik eder (Hirsch ve diğerleri, 2009; Serra ve diğerleri, 2015; Gil ve diğerleri, 2022). Yapılan çalışmalarda, spesifik laktobasil suşlarının, yara iyileşme sürecinde, deriyi etkileyen inflamatuvar süreçlere karşı savunmada ve patojenlere müdahale ederek enfeksiyonlara karşı dirençte yararlı bir role sahip oldukları gösterilmiştir (Jung ve diğerleri, 2019; Venosi ve diğerleri, 2019). Çalışmamızda, özellikle yaranın kronikleşmesinde önemli rol oynayan patojenlerden *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'ın gelişiminde paraprobiyotik ve postbiyotiklerin etkileri incelenmiştir. Önceki çalışmalarımızda hücre canlılığını ciddi derecede etkileyen asidik ortama sahip olması nedeni ile postbiyotikler pH 7 ayarlanarak

kullanılmıştır. Bu çalışmada pH etkisinin değerlendirmesi amacıyla pH 7 ve pH 4,5 olan postbiyotikler kullanılmıştır. Paraprobiyotik, pH 7 postbiyotik ve pH 4,5 postbiyotik gruplarının 25, 50, 75, 100 ve 150 µL/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. Paraprobiyotikler artan doz seviyelerinde patojen gelişimini anlamlı derecede inhibe etmiş ancak, bakterisidal etkinliği zayıf kalmıştır. Bu nedenle, paraprobiyotik grubunda doz arttırımına gidilerek 200 ve 250 µL/mL konsantrasyonları da deneye dahil edilmiştir. Sonuçta, paraprobiyotikler için MİK değeri 100 µL/mL, MBK değeri ise 250 µL/mL olarak belirlenmiştir. pH 7 postbiyotik konsantrasyonları ortamda bulunan patojenlerin gelişimi üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. pH 4,5 postbiyotik grubunda MİK değeri 25 µL/mL olarak belirlenirken, MBK değeri 50 µL/mL olarak belirlenmiştir. Postbiyotikler içeriğinde yer alan metabolitler arasında laktik asit ve diğer yağ asitleri ortamdaki asiditeyi arttırarak patojen gelişimini baskılamaktadır (Ishikawa ve diğerleri, 2021). Buna bağlı olarak pH 4,5 postbiyotikler düşük konsantrasyonlarda dahi güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilerken, pH 7’de asiditenin düşerek ortamın nötrlenmesi antimikrobiyal aktiviteyi düşürmektedir. Hasheminya ve Dehghannya (2020), yaptıkları çalışmada paraprobiyotik ve postbiyotiklerini içerilerinde bulundukları hücre duvar bileşenleri ve metabolitler sayesinde gram negatif ve gram pozitif patojenlerin hücre bölünme mekanizmasını etkileyerek antimikrobiyal etkinliklerini gösterdiklerini belirtmişlerdir. Buna bağlı olarak çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin içeriklerindeki hücre duvar bileşenleri ve metabolitleri ile yara iyileşmesinde kullanılabilecek antimikrobiyal ajanlar olabilecekleri düşünülmektedir (Hasheminya ve Dehghannya, 2020).

Fibroblastlar, bağ dokularında en bol bulunan hücre tiplerinden biridir. Bu hücreler, normal fizyolojik koşullar altında doku homeostazından sorumludur. Herhangi bir yaranın durumunda, fibroblastlar aktive olur ve yaranın kapanmasını kolaylaştırmak için aktif olarak hücre dışı matris (ECM) proteinleri üreten miyofibroblastlara farklılaşırlar (Li ve Wang, 2011). Yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılan *in vitro* yara modeli ile potansiyel terapötik ajanların hücre migrasyonunu modüle etme kapasiteleri incelenir (Guy ve diğerleri, 2017). Yapılan bu tez çalışmasında, L929 fibroblast hücreleri ile oluşturulan *in vitro* yara modelinde paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinde etkili doz ve süreleri belirlenmiştir. Paraprobiyotik uygulamaları ile 12. saatte uygulanan tüm dozların yara bölgesini %100 oranında kapattığı belirlenmiştir. 18 ve 24. saatlerde ise uygulamalar sonunda yaranın %100 oranında kapandığı, yara kenarlarında bulunan hücrelerin proliferasyon

olduğu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak, paraprobiyotik uygulamalarının yara iyileşmesinde yara bölgesindeki hücrelerin proliferasyonunu etkileyerek yaranın kapanmasını teşvik ettiği sonucuna varılmıştır. Postbiyotik uygulamalarında 12 saatte en iyi yara kapanma oranı %61 iken, 18. saatte en iyi yara kapanma oranı %71'dir. Ancak 18. Saatte en yüksek dozda (150 µL/mL) uygulama yapılan hücrelerin morfolojilerinde bozulmaların meydana geldiği kaydedilmiştir. 24. saate gelindiğinde tüm uygulama dozlarında hücrelerin morfolojilerinin bozularak yara bölgesinde migrasyonun durmasıyla birlikte yara kapanma oranı %10-50 arasında azalmıştır. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda postbiyotiklerin yara iyileşmesinde en etkili dozu 18. saatte 100 µL/mL olarak belirlenmiştir. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinde fibroblastların yara bölgesine migrasyonunda etkili oldukları belirlenmiştir. Paraprobiyotiklerin postbiyotiklere göre yaranın kapanmasında güçlü bir etkiye sahip olması ve antimikrobiyal özellik göstermesi paraprobiyotikleri yara iyileşmesinde kullanılabilecek potansiyel terapötikler haline getirmektedir. Çalışma sonuçlarımız ilgili literatür sonuçları ile de doğrulanmıştır (Golkar ve diğerleri, 2021). Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yaranın kapanmasında oldukça etkili oldukları tespit edilmiştir. Özellikle paraprobiyotik uygulamalarının kullanılan sınırlı konsantrasyonlara rağmen 12 saat gibi kısa bir sürede %100 oranında yarayı kapatmış olması, literatürde Probiyotikler ve bitkisel ekstrakt/bileşenlerle yapılan yara çalışmalarına kıyasla paraprobiyotiklerin birçok çalışmadan daha etkili sonuç vermesi paraprobiyotiklerin yara iyileşmesinde yaranın kapanmasında daha etkili bir ajan olacağının önemli bir göstergesi olmuştur (İğci ve Aytaç, 2020; Bekiaridou ve diğerleri, 2021).

Paraprobiyotik ve postbiyotikler ile ilgili yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda, bu probiyotik kaynaklı inaktive ürünlerin yara iyileşmesinde olumlu etkilere sahip oldukları belirtilmiştir. Ancak bu etkinliklerini hangi moleküler mekanizmalar yolu ile gerçekleştirdikleri henüz bilinmemektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda paraprobiyotik ve postbiyotiklerin bu etkinliklerini anti-inflamatuar, antimikrobiyal, anti-oksidan, aktiviteleriyle ilişkilendirilmektedir (Hill ve diğerleri, 2014; Zolkiewicz ve diğerleri, 2020). TGF-β1/Smad sinyal yolağı, yara iyileşme sürecine katılmak için etkilenen bölgelerdeki keratinositlerin, dermal fibroblastların ve diğer deri hücrelerinin çoğalmasını ve migrasyonunu düzenleyerek yara iyileşmesinde hayati bir rol oynamaktadır (Schiller ve diğerleri, 2004; Jiang ve diğerleri, 2020). Yara iyileşmesinde paraprobiyotik ve postbiyotiklerin kullanımına dair çalışmalar mevcut olsa da bu iki probiyotik kaynaklı ürünün etkisinin yarada TGF-β1/Smad moleküler sinyal yolağı üzerinden gösterilmesini

konu alan bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu nedenle, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesindeki etkilerinin özellikle, yara iyileşmesinde kritik bir role sahip moleküler yollar ile aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda, paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının TGF- β 1/Smad sinyal yolağının modülasyonu üzerinde etkinliğinin belirlenmesi amacıyla gen düzeyinde etkileri incelenmiştir. Paraprobiyotik uygulamalarında kullanılan tüm dozların TGF- β 1 ve Smad-2, Smad-3 ve Smad-4 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla 3,2-9,6 kat arası bir artış tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda TGF- β 1'de 3,2 kat, Smad-2'de 9,1 kat, Smad-3'te 9,6 kat ve Smad-4'te 4,4 kat artışı olduğu belirlenmiştir. Böylelikle, paraprobiyotiklerin TGF- β 1/Smad yolağı aracılığıyla yara iyileşmesinde etkili olduğu doğrulanmıştır (Salkin ve diğerleri, 2022). Postbiyotik uygulamalarında ise TGF- β 1 ve Smad-4 ekspresyon seviyeleri doz artışına bağlı olarak artmıştır. TGF- β 1 kontrole kıyasla tüm dozlar için 1,6 kat artarken, Smad-4 2,7 kat artmıştır. Smad-3 ekspresyon seviyesi doz artışına bağlı olarak en yüksek konsantrasyonda kontrole kıyasla 0,5 kat düşmüştür. Smad-3 için en yüksek ekspresyon seviyesi 50 μ L/mL 2,3 kattır Smad-2'de ise postbiyotik uygulamaları sonucunda en yüksek dozda ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla 0,6 kat düşmüştür. Smad-3 ve homoloğu Smad-2 proteinleri, nükleer transkripsiyonel aktivatörler olarak işlev görür ve yara iyileşmesinde hücre fonksiyonları düzenleyen TGF- β 'ler ve aktivin tarafından hücre içi sinyallemeye aracılık ederler (Ashcroft ve Roberts, 2000). Postbiyotik uygulamaları sonucunda Smad-2 ve Smad-3 ekspresyon seviyelerindeki azalmalar *in vitro* yara modeli sonucunda alınan sonuçları desteklemektedir. 50 ve 100 μ L/mL uygulamalarında gen ekspresyon seviyeleri 2-2,3 kat artarken yine bu konsantrasyonlarda yara kapanma yüzdesi %50'den fazladır. Ancak konsantrasyon arttıkça gen seviyesindeki azalmaya bağlı olarak yaranın kapanması güçleşmiş ve sonuçta yara bölgesinde bulunan hücrelerin morfolojilerinde de bozulmalar meydana gelmiştir. Mevcut literatürlerde paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesindeki etkinliklerinin TGF- β 1/Smad moleküler sinyal yolağı üzerinden gösterildiği bir çalışma bulunmamakta olup, çalışmamız bu konuyla ilgili yapılan ilk çalışmadır. Literatürde, yara iyileşmesinde kullanılan mevcut potansiyel ajanlar ile karşılaştırıldığında, yapılan paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının, yara iyileşme sürecinin tüm fazlarında etkili TGF- β 1/Smad sinyal yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Ve elde edilen sonuçlar sınırlı olan literatürdeki sonuçlarla mukayese edildiğinde bizim sonuçlarımız ve paraprobiyotik

uygulamalarımızın TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerinde dikkati çeker düzeyde daha iyi olduğu belirlenmiştir.

TGF- β 1/Smad yolağı yara iyileşmesinin tüm fazları ve inflamasyon, migrasyon, proliferasyon, ECM proteinlerinin üretiminde etkilidir. Doğal ECM’de bulunan iki protein kollajen ve fibronektindir. Fibronektin yara iyileşmesinde trombositlerin, nötrofillerin, monositlerin, fibroblastların ve endotel hücrelerinin yara bölgesine migrasyonunu ve epidermal hücrelerin granülasyon dokusu boyunca göçünü teşvik eder (Grinnell, 1984). Hücre dışı matrisin önemli bir bileşeni olan kollajen, ya doğal, fibriler konformasyonunda ya da yara ortamında çözünür bileşenler olarak yara iyileşmesi fazlarının düzenlenmesinde kritik roller oynar (Mathew-Steiner ve diğerleri, 2021). Çalışmamızda paraprobiyotiklerin ECM proteinlerinden kollajen (COL1A1) ve fibronektin (FN) proteinlerinin üretimleri üzerindeki etkileri gen düzeyinde incelenmiştir. Kollajen ekspresyon seviyesi en yüksek dozda kontrole kıyasla 158,2 kat artış göstermektedir. 100 μ L/mL’de ise 59,2 kat artmıştır. Ancak yarada kollajen üretiminin fazla olması hipertrofik skar ile sonuçlanmaktadır. Hipertrofik skarlar, sürekli lokal inflamasyon ve aşırı kollajen birikimi ile karakterizedirler (Wang ve diğerleri, 2020). Bu nedenle kollajen üretiminde en ideal doz 50 μ L/mL (kontrole kıyasla 6,2 kat) olarak belirlenmiştir. Paraprobiyotik uygulamaları sonucunda fibronektin üretimi en yüksek dozda 9,3 kat artmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, paraprobiyotiğin yara iyileşmesinde yara kapanmasını teşvik edici ve antimikrobiyal etkisi ile birlikte ECM proteinlerinin üretiminde de etkili olduğu söylenebilmektedir. Postbiyotiler için Smad-2 ve Smad-3’te olduğu gibi benzer sonuçlar kollajen ve fibronektin ekspresyon sonuçlarında da elde edilmiştir. Bu iki ECM proteinin ekspresyon seviyeleri en yüksek dozda 1,5-1,6 kat azalmıştır. ECM proteinleri ekspresyon seviyelerinde doza bağlı düşüşlerin olması yine *in vitro* yara modeli sonuçlarını doğrulamaktadır (Chaitrakoonthong ve diğerleri, 2020). ECM proteinlerinin üretilmemesi yeniden modelleme fazının eksik ya da hiç tamamlanamamasına neden olarak yaranın iyileşmemesine yani kronikleşmesine neden olur (Diller ve Tabor, 2022).

Yaralanma sürecinin erken dönemlerinde makrofajlardan salınan IL-1, IL-6 ve TNF- α pro-inflamatuar sitokinler görülür. Bu sitokinler; keratinosit stimülasyonu ve fibroblast proliferasyonu, ECM proteinlerinin sentezi ve parçalanması, fibroblast kemotaksisi ve immün yanıtın düzenlenmesi dahil olmak üzere yara bölgesindeki çeşitli süreçleri etkileyebilirler (Gezer, 2018). İnflamasyon fazında yer alan bu sitokinlerin (IL-1, IL-6 ve

TNF- α) uzun süreli salınımı kronik inflamasyon nedenlerinden biridir ve belli bir süre sonra aşağı regülasyonları gereklidir. Çalışmamızda, paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının pro-inflamatuar sitokinler üzerindeki etkileri gen düzeyinde incelenmiştir. *In vitro* inflamatuvar ortamın oluşturulabilmesi için RAW264.7 hücreleri LPS ile muamele edilmiştir. Paraprobiyotik uygulamalarında LPS kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarda proinflamatuar sitokinlerin gen ekspresyon seviyeleri 4-32 kat azalmış ve inflamasyon durumunda uzun süreli salınan pro-inflamatuar sitokinlerin paraprobiyotik uygulamaları ile baskılandığı tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak da paraprobiyotiklerin yara iyileşmesinde uzun süreli inflamasyonu baskılayarak da yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Qi ve diğerleri, Li ve Shah, 2016). Ek olarak, paraprobiyotik uygulamalarında DMEM kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarda ekspresyon seviyeleri 1,9-11,7 kat artmıştır. Bu durum, paraprobiyotiklerin uzun süreli inflamasyonu engellerken yara iyileşme sürecinde önemli rol oynayan pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini de teşvik ettiğini göstermektedir. Pro-inflamatuar sitokinlerinin üretiminin artması paraprobiyotiklerin fibroblast proliferasyonunda etkili olduğunu doğrulamaktadır. Postbiyotik uygulamalarında LPS kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarda pro-inflamatuar ekspresyon seviyeleri 10-200 kat azalmıştır. Bu durum, postbiyotiklerin de uzun süreli inflamasyonu baskılayarak yara iyileşmesinde olumlu yönde bir rol oynadığını göstermektedir. DMEM kontrol grubu ile kıyaslandığında postbiyotik uygulamalarının aynı zamanda pro-inflamatuar sitokinlerin üretiminde de rol oynadığı belirlenmiştir. Kontrole kıyasla doz artışına bağlı olarak ekspresyon seviyelerini azalmasına rağmen en yüksek konsantrasyonlarda bile 1,9-53 kat artış olduğu belirlenmiştir. Anti-inflamatuar sitokinler, pro-inflamatuar sitokinlerin yanıtını kontrol eden bir dizi immün düzenleyici moleküldür. Başlıca anti-inflamatuar sitokinler, IL-4, IL-10, IL-11 ve IL-13'ü içerir (Uçeyler ve diğerleri, 2006). Çalışmamızda, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin anti-inflamatuar sitokinler üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Paraprobiyotiklerin 50, 100 ve 150 $\mu\text{L/mL}$ ekspresyon seviyelerinde anlamlı sonuçlar vermemiş olup (veri gösterilmiyor), paraprobiyotik uygulamalarında 25, 50 ve 75 $\mu\text{L/mL}$ konsantrasyonlar kullanılmış, postbiyotik uygulamaları için 50, 100 ve 150 $\mu\text{L/mL}$ konsantrasyonları kullanılmıştır. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının doz artışına bağlı olarak anti-inflamatuar sitokinler üzerinde ekspresyon düzeyinde olumlu yönde bir etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Qi ve diğerleri, Li ve Shah, 2016). Bu durum, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin anti-inflamatuar sitokinler üzerinden pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı salınımı engelleyerek yaranın kronikleşmesini önlediklerini bir kez daha kanıtlamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, probiyotik *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşundan elde edilen paraprobiyotik ve postbiyotikler kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve öneriler yapılmıştır:

1. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin artan doz ve sürelerde L929 fare fibroblast ve RAW264.7 fare makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin tüm uygulamalarında en yüksek dozun toksisite açısından kabul edilebilir oranda olduğu belirlenmiştir. Bu uygulamalar sonucunda, probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşmesinde kullanılmasının güvenilir olduğu saptanmıştır.
2. Çalışmamızda, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin antimikrobiyal etkinlikleri belirlenmiştir. Yaralar, bakteriyel kontaminasyonlara açık bir ortamdır. Patojen bulaşı, yara iyileşmesinde inflamasyon fazının uzamasına bunu takiben diğer yara iyileşmesi fazlarının gecikmesine ya da süreçte aksamalara neden olmaktadır. Yarada inflamasyonun uzaması yaranın iyileşememesi (kronikleşme) ile sonuçlanır. Yarada en sık görülen patojenler arasında *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Candida albicans* (*C. albicans*) yer almaktadır. Yapılan paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları sonucu *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* üzerinde, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin fırsatçı patojenler üzerinde antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle, postbiyotik uygulamalarının paraprobiyotik uygulamalarına kıyasla daha güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Paraprobiyotikler, doz artışına bağlı olarak 100 µL/mL’de patojen üremesini inhibe ederken, 250 µL/mL’de patojen gelişiminin tamamen durduğu saptanmıştır. Postbiyotik uygulamalarında ise kullanılan en düşük dozda dahi gelişimin inhibe edilebildiği (25 µL/mL), 50 µL/mL konsantrasyonda gelişimi tamamen durdurduğu tespit edilmiştir. Paraprobiyotik ve postbiyotikler, yara patojenlerinden *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde bakterisidal etkiye sahip olup aynı zamanda, yaranın kronikleşmesinde ciddi bir rol oynayan *C. albicans* gelişimini engelleyerek de anti-fungal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yarada patojenlerini gelişimini baskılayarak inflamasyon sürecinin uzamasını engelleyip,

sürecin normal akışında ilerlemesini sağladıkları ve bu durumda, yaranın kronikleşmesini engelledikleri söylenebilmektedir.

3. L929 fibroblast hücreleri ile oluşturulan *in vitro* yara modelinde, paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının yara iyileşmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan uygulamaların fibroblast hücrelerinin yara bölgesine migrasyonunu teşvik ederek yaranın kapanmasını sağladıkları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, paraprobiyotik uygulamalarında kullanılan tüm dozların postbiyotik uygulamalarına kıyasla fibroblast migrasyonunu indükleyerek yara kapanmasını sağladığı belirlenmiştir. Bu durum antimikrobiyal bir ajan olarak yara kapanmasını teşvik eden paraprobiyotikleri ön plana çıkarmakta olup, iyileşme sürecinde kullanılabilecek potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.
4. TGF- β 1/Smad sinyal yolağı, yara iyileşmesinde hücre migrasyonu, proliferasyonu ve ECM sentezi dahil olmak üzere tüm iyileşme sürecinde kilit bir rol oynamaktadır. Paraprobiyotik uygulamalarının, doz artışına bağlı olarak TGF- β 1/Smad sinyal yolağında TGF- β 1, Smad-2/3/4 ekspresyon seviyelerini modüle ederek yara iyileşmesinde olumlu yönde etkin bir rol oynadığı yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Postbiyotiklerin ise TGF- β 1/Smad yolağında Smad-2 ve Smad-3 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri doz artışı ve süreye bağlı olarak azalmıştır. Smad-3 ve homoloğu Smad-2 proteinleri, nükleer transkripsiyonel aktivatörler olarak işlev görür ve yara iyileşmesinde hücre fonksiyonları düzenleyen TGF- β 'ler ve aktivin tarafından hücre içi sinyallemeye aracılık ederler (Ashcroft ve Roberts, 2000). Bu durum, postbiyotiklerin yara iyileşmesindeki etkinliğini desteklemektedir. Smad-2 ve Smad-3 ekspresyon seviyelerinde doza bağlı ve süreye bağlı azalmalar, *in vitro* yara modelinde postbiyotik uygulamaları sonucu artan doz ve sürelerle bağlı olarak yara kapanma oranının düşmesini desteklemektedir. Ancak, yine de postbiyotiklerin de yara iyileşmesinde belli bir doz ve sürede yara iyileştirici etkisinin olduğu düşünülmektedir. Bu düşüncemizi, postbiyotik uygulamalarında (18 saat, 100 μ L/mL) yara kapanma yüzdesinin %70'in üzerinde olması desteklemektedir. Ek olarak yaranın iyileşmesi ve yeniden şekillenmesinde ECM proteinleri aktif bir rol oynamaktadır. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin ECM proteinlerinin oluşumundaki etkileri ekspresyon seviyeleri incelenerek, gen düzeyinde belirlenmiştir. Aynı zamanda, paraprobiyotik ve postbiyotikler, TGF- β 1/Smad moleküler sinyal yolağını regüle ederek fibroblast migrasyonu ve fibroblastlar aracılığıyla üretilen ECM proteinlerinin oluşumunda da etkilidirler. Sahip oldukları bu özellikler nedeniyle yara iyileşmesi

üzerinde potansiyel terapötik ajanlar olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Yapılan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bu düşüncemizi destekler niteliktedir.

5. Bakteriyal lipopolisakkaritler (LPS), hücre duvar bileşenleri arasında yer alan bir polisakkarit olup, inflamasyonu indüklemektedir. Bu nedenle de *in vitro* inflamasyon modeli oluşturulurken genellikle LPS kullanılmaktadır. Çalışmamızda, RAW264.7 hücrelerinde LPS ile indüklenen inflamasyon modelinde paraprobiyotik ve postbiyotiklerin inflamasyon fazında makrofajlar aracılığıyla salınımı gerçekleşen pro-inflamatuar sitokinler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının inflamasyon fazında pro-inflamatuar sitokinlerinin uzun süreli salınımını baskıladıkları tespit edilmiştir. TGF- β 1, pro-inflamatuar sitokinlerin üretiminde düzenleyici bir role sahiptir. Bu çalışmamızda, paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının TGF- β 1/Smad moleküler yolağını regüle etmesi ile birlikte sitokin salınımını düzenleyerek inflamasyon fazını olumlu yönde etkilediği kanıtlanmıştır. İnflamasyon fazında pro-inflamatuar sitokinlerin uzun süreli salınımı, sürecin uzamasına ve yaranın kronikleşmesine neden olmaktadır. Paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamaları, yarada inflamasyon süresinin uzamasını engelleyerek iyileşme sürecinde kesintilerin olmasını ve yaranın kronikleşmesini önlemektedirler.
6. Anti-inflamatuar sitokinler, pro-inflamatuar sitokinlerin uzun süreli salınımını baskılayarak yaranın kronikleşmesini önlerler. Çalışmamızda paraprobiyotik ve postbiyotiklerin anti-inflamatuar sitokinler üzerindeki etkileri gen düzeyinde incelenmiştir. Paraprobiyotik ve postbiyotiklerin anti-inflamatuar sitokinlerin gen düzeyinde ekspresyon seviyelerinde artış gösterdikleri belirlenmiştir. Buna bağlı olarak da paraprobiyotik ve postbiyotiklerin anti-inflamatuar sitokinler üzerinde etkili oldukları böylelikle de pro-inflamatuar sitokinlerin uzun süreli salınımını baskılayarak yaranın kronikleşmesini önledikleri söylenebilir.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında, probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aracılığıyla fibroblast migrasyonunu teşvik edici ve kollajen ve fibronektin sentezini indükleyici etkilerinin yanı sıra anti-inflamatuar ve antimikrobiyal etkilere sahip oldukları ortaya konulmuştur. Yara iyileşme sürecinde en büyük problem yaranın kronikleşmesi olduğu tartışma, sonuç ve literatürde belirtilmiştir. Bu çalışmada, elde ettiğimiz sonuçlara göre paraprobiyotiklerin daha iyi olmak üzere hem inflamasyonu baskılayıcı hem de yarada önemli olabilecek patojenleri durdurucu ve inhibe edici etkilerinin

olduğu belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak özellikle paraprobiyotiklerin yaranın kronikleşmesinde veya kronikleşen yaranın tedavisinde etkili bir ajan olabileceği söylenebilir. Literatürde, probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotik uygulamalarının yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerini gösteren çalışmalar bulunsa da bu etkinliklerini birden fazla mekanizma ve moleküler yolak üzerinden gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durum, çalışmamızın özgün yanını ortaya koymakta olup, bu çalışmanın devamı niteliğinde yara iyileşme süreçlerinin hayvan denemeleri ile araştırılması, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin yara iyileşme süreci mekanizmasına etkilerinin *in vivo* alışmalar ile desteklenerek ortaya konması bizim sonuçlarımızı güçlendirmesi açısından önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González- Córdoba, A.F., Vallejo-Cordoba, B. and Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: an evolving term within the functional foods Field. *Trends in Food Science Technology*, 75, 105–14.
- Ahangar, P., Mills, S.J. and Cowin, A.J. (2020). Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 7038.
- Akter, S., Park, J.H. and Jung, H.K. (2020). Potential health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated probiotic cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 477-481.
- Alonso, J.E., Lee J., Burgess, A.R. and Browner, B.D. (1996). The management of complex orthopedic injuries, *Surgical Clinics of North America*, 76(4), 879-903.
- Arıtaş, Y. (1992). Makrofaj Fonksiyonu ve Cerrahi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 14, 288-295.
- Aryana, K.J. and Olson, D.W., (2017). A 100-year review: yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987–10013.
- Ashcroft, G.S. and VRoberts, A.B. (2000). Loss of Smad3 modulates wound healing. *Cytokine and growth factor reviews*, 11(1-2), 125-131.
- Balqadi, A.A., Salama, A.J., Mudarris, M.S.A. and Satheesh S. (2015). Effect of A Probiotic Product, Promarine on Growth Responses of Indian White Prawn, *Penaeus (Fenneropenaeus) Indicus*. *Yunus Araştırma Bülteni*, 1, 33-43.
- Batista, V.L., da Silva, T.F., de Jesus, L.C.L., Coelho-Rocha, N.D., Barroso, F.A.L., Tavares, L.M., Azevedo, V., Mancha-Agresti, P. and Drumond, M.M. (2020). Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. *Frontiers in Immunology*, 11, 544490.
- Baum, C.L. and Arpey, C.J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery*, 31, 674-648.
- Bekiaridou, A., Karlafti, E., Oikonomou, I.M., Ioannidis, A. and Papavramidis, T.S. (2021). Probiotics and Their Effect on Surgical Wound Healing: A Systematic Review and New Insights into the Role of Nanotechnology. *Nutrients*, 13, 4265.
- Belete, A.T.A., Alcbachew, T., Tschayc, H., Bcrhanu, H. and Minwuyelet, A. (2017). Bacterial Probiotics Their Importance and Limitiations: A Review. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 4(2), 1-8.
- Bishop, A. (2008). Role of oxygen in wound healing. *Journal of Wound Care*, 17:399-402.

- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J.P., Lacroix, M. and Van Calsteren, M.R. (2010). Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 666–675.
- Broughton, G., Janis, J.E. and Attinger, C.E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 12 – 34.
- Cavallari, J.F., Fullerton, M.D., Duggan, B.M., Foley, K.P., Denou, E., Smith, B.K., Desjardins, E.M., Henriksbo, B.D., Kim, K.J., Tuinema, B.R. and Stearns, J.C. (2017). Muramyl dipeptide-based postbiotics mitigate obesity-induced insulin resistance via IRF4. *Cell Metabolism*, 25, 1063–74.
- Chaitrakoonthong, T., Ampornaramveth, R. and Kamolratanakul, P. (2020). Rinsing with L-Ascorbic Acid Exhibits Concentration-Dependent Effects on Human Gingival Fibroblast In Vitro Wound Healing Behavior. *International Journal of Dentistry*, 2020, 1-7.
- Chhabra, S., Chhbra, N., Kaur, A. and Gupta, N. (2017). Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 16(4), 403-423.
- Claes, I.J.J., Segers, M.E., Verhoeven, T.L.A., Dusselier, M., Sels, B.F., De Keersmaecker, S.C.J., Vanderleyden, J. and Lebeer, S. (2012). Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microbial Cell Factories*, 15(11), 161.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS). (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition CLSI document M07-A9. Wayne, PA, USA, *Clinical Laboratory Standards Institute*, 1,67.
- Danladi, Y., Loh, T.C., Foo, H.L., Akit, H., Aida, N., Tamrin, M. and Naeem, A.M. (2022). Impact of Feeding Postbiotics and Paraprobiotics Produced From *Lactiplantibacillus plantarum* on Colon Mucosa Microbiota in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1-13.
- Davis, S.C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W.H. and Mertz, P.M. (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 23-29.
- de Almada, C.N., Almada, C.N., Martinez, R.C.R. and Sant'Ana, A.S. (2016). Paraprobiotics: evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science Technology*, 58, 96–114.
- Demir, A. (2022) *Potansiyel probiyotik lactobacillus plantarum gd2 tarafından üretilen ekzopolisakkarit'in (EPS) yara iyileşme özelliklerinin araştırılması*, Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- desJardins-Park, H.E., Foster, D.S. and Longaker, M.T. (2018). Fibroblasts and wound healing: an updating. *Regenerative Medicine*, 13(5), 491-495.

- Diegelmann, R.F. and Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9(1), 283-289.
- Diller, R.B. and Tabor, A.J. (2022). The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review, *Biomimetics*, 7, 87.
- Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A. and Nampoothiri, K.M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health –benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186.
- Dreifke, M.B., Jayasuriya, A.A. and Jayasuriya, A.C. (2015). Current wound healing produres and potential care. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 48, 651-662.
- Dubey, A.K., Podia, M., Raut, S., Singh, S., Pinnaka, A.K. and Khatri, N. (2021). Insight Into the Beneficial Role of *Lactiplantibacillus plantarum* Supernatant Against Bacterial Infections, Oxidative Stress, and Wound Healing in A549 Cells and BALB/c Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 728614.
- Du, X., Rodriguez, J. and Wee, J. (2022). Dietary Postbiotics Reduce Cytotoxicity and Inflammation Induced by Crystalline Silica in an *In Vitro* RAW264.7 Macrophage Model. *Foods*, 11(6), 877.
- Edwards, R. and Harding, K.G. (2004). Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17, 91-96.
- Elisia I., Pae H.B., Lam V., Cederberg R., Hofs E. and Krystal G. (2018). Comparison of RAW264.7, human whole blood and PBMC assays to screen for immunomodulators. *Journal of Immunological Methods*, 452, 26-31.
- Eming, S.A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6.
- Evivie, S.E., Huo, G.C., Igene, J.O. and Bian, X. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1318034.
- Falanga, V., Isseroff, R.R., Soulika, A.M., Romanelli, M., Margolis, D., Kapp, S., Granick, M. and Harding, K. (2022). Chronic wounds. *NATURE REVIEWS*, 8, 50.
- Flanders, K.C. (2002). Smad3 as a mediätör of the fibrotic response. *International Journal of Experimental Pathology*, 85(2), 47-64.
- França, K. (2021). Topical Probiotics in Dermatological Therapy and Skincare: A Concise Review. *Dermatologic Therapy*, 11, 71–77.
- Frykberg, R.G. and Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 4(9), 560-582.

- Gezer, A. (2018). Ratlarda Erken Dönem Yara İyileşmesinde Deksmetomidin İnfiltrasyonunun Etkisi, Yayınlanmış Tıpta Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Ankara.
- Ghosi F.M. (2018). Bazı tıbbi bitkisel ekstraktların çeşitli patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması, Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gil, J., Solis, M., Higa, A., Davis, S.C. (2022). Candida albicans Infections: a novel porcine wound model to evaluate treatment efficacy. *BMC Microbiology*, 22(45), 1-9.
- Gilbert, R.W.D., Vickaryous, M.K., Vilorio-Petit, A. (2016). Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound-Healing and Tissue Regeneration. *Journal of Developmental Biology*, 4(2), 21.
- Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology*, 5, 243-251.
- Golkar, N., Ashoori, Y., Heidari, R., Omidifar, N., Abootalebi, S.N., Mohkam, M., Gholami, A. (2021). A Novel Effective Formulation of Bioactive Compounds for Wound Healing: Preparation, In Vivo Characterization, and Comparison of Various Postbiotics Cold Creams in a Rat Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 13.
- Gomez-Garcia, M., Sol, C., de Nova, P.J.G., Puyalto, M., Mesas, L., Puente, H., Mencia-Ares, O., Miranda, R., Argüello, H., Rubio, P., Carvajal, A. (2019). Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils Against swine enteropathogenic bacteria. *Porcine Health Management*, 5(32), 1-8.
- Gonzalez, A.C.de O., Costa, T.F., Andrade, Z. de A., Medrado, A.R.A.P. (2016). Wound healing-A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614-620.
- Gosain, A., DiPietro, L.A. (2004). Aging and wound healing. *World Journal of Surgery*, 28, 321-326.
- Greenhalgh, D.G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology (The International Journal of Biochemistry & Cell Biology)*, 30(9), 1019-1030.
- Greenhalgh, D.G. (2003). Wound healing and diabetes mellitus. *Clinics in Plastic Surgery*, 30(1), 37-45.
- Greer, N., Foman, N.A., MacDonald, R., Dorrian, J., Fitzgerald, P., Rutks, I., Wilt, T.J. (2013). Advanced wound care therapies for nonhealing diabetic, venous, and arterial ulcers: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 159(8), 532-542.
- Grinnell, F. (1984). Fibronectin and wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, 26(2), 107-116.

- Guest, J.F., Ayoub, N., McIlwraith, T., Uchegbu, I., Gerrish, A., Weidlich, D., Vowden, K., Vowden, P. (2015). Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ Open*, 5(12), E009283.
- Guest, J.F., Ayoub, N., McIlwraith, T., Uchegbu, I., Gerrish, A., Weidlich, D., Vowden, K., Vowden, P. (2017). Health economic burden that different wound types impose on the UK's National Health Service. *International Wound Journal*, 14(2), 322-330.
- Guo, S., DiPietro, L.A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
- Gupta, S., Sagar, S., Maheshwari, G., Kisaka, T., Tripathi, S. (2021). Chronic wounds: magnitude, socioeconomic burden and consequences. *Wounds Asia*, 4(1), 8-14.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321.
- Guy, J.B., Espenel, S., Vallard, A., Battiston-Montagne, P., Wozny, A.S., Ardail, D., Alphonse, G., Rancoule, C., Rodriguez-Lafrasse, C., Magne, N. (2017). Evaluation of the Cell Invasion and Migration Process: A Comparison of the Video Microscope-based Scratch Wound Assay and the Boyden Chamber Assay. *The Journal of Visualized Experiments (Journal of Visualized Experiments)*, 129, 56337.
- Hamdan, S., Pastar, I., Drakulich, S., Dikici, E., Tomic-Canic, M., Deo, S., Daunert, S. (2017). Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *ACS Central Science*, 3(3), 163-175.
- Han, G., Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, 34, 599-610.
- Han, N., Jia, L., Su, Y., Du, J., Guo, L., Luo, Z., Liu, Y. (2019). Lactobacillus reuteri extracts promoted wound healing via P13K/AKT/ β -catenin/TGF β 1 pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, 10, 243.
- Hart, J. (2002). Inflammation.1: Its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*. 11(6), 205-209.
- Hasheminya, S. M., Dehghannya, J. (2020). Novel ultrasound-assisted extraction of kefiran biomaterial, a prebiotic exopolysaccharide, and investigation of its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties. *Materials Chemistry and Physics*, 243, 1-8.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. (2014). The international Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 506–514.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. (2014). The international Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 506–514.

- Hirsch, T., Spielmann, M., Zuhaili, B., Fossum, M., Metzger, M., Koehler, T., Steinau, H.U., Yao, F., Onderdonk, A.B., Steinstraesser, L., Eriksson, E. (2009). Human beta-defensin-3 promotes wound healing in infected diabetic wounds. *The Journal of Gene Medicine*, 11, 220-228.
- İğci, B.K., Aytaç, Z. An Investigation on the *In Vitro* Wound Healing Activity and Phytochemical Composition of *Hypericum pseudolaeye* N. Robson Growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(6), 610-619.
- İnternet 1: Proliferasyon ve yeniden şekillenme faz sonrası yaranın kapanması, https://www.amboss.com/us/knowledge/Wound_healing, Son Erişim Tarihi: 27.02.2023.
- İnternet 2: L929 (ATCC®CCL-1™) ve RAW264.7 (ATCC®TIB-71™) hücre hatlarına ait özellikler, <https://www.atcc.org/products/tib-71>, Son Erişim Tarihi: 09.01.2023.
- İnternet 3: L929 (ATCC®CCL-1™) ve RAW264.7 (ATCC®TIB-71™) hücre hatlarına ait özellikler, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/technical-resources/cell-lines/l/cell-lines-detail-125.html>, Son Erişim Tarihi: 09.01.2023.
- Ishikawa, T., Sasaki, D., Aizawa, R., Yamamoto, M., Yaegashi, T., Irie, T., Sasaki M. (2021). The Role of Lactic Acid on Wound Healing, Cell Growth, Cell Cycle Kinetics, and Gene Expression of Cultured Junctional Epithelium Cells in the Pathophysiology of Perodontal Disease. *Pathogens*, 10(11), 1507.
- Jarbrink, K., Ni, G., Sönnergen, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R., Car, J. (2016). Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*, 5(1), 152.
- Jiang, T., Wang, Z., Sun, J. (2020). Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cutaneous wound healing mediates through TGF- β /Smad signaling pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, 11, 198.
- Jung, Y.O., Jeong, H., Cho, Y., Lee, E.O., Jang, H.W., Kim, J., Nam, K., Lim, K.M. (2019). Lysates of a Probiotic, *Lactobacillus rhamnosus*, Can Improve Skin Barrier Function in a Reconstructed Human Epidermis Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4289.
- Kamilya, D., Baruah, A., Sangma, T., Chowdhury, S., Pal, P. (2015). Inactivated Probiotic Bacteria Stimulate Cellular Immune Responses of Catla, *Catla catla* (Hamilton) In Vitro. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 101-106.
- Kenneth, J.C. (2012). Platelets and Primary Haemostasis. *Thrombosis Research*, 129 (3), 220–224.
- Khmaladze, I., Butler, E., Fabre, S., Gillbro, J.M. (2019). *Lactobacillus reuteri* DSM 17938: a comparative study on the effect of probiotics and lysates on human skin. *Experimental Dermatology*, 28, 822-828.
- Kılıç, U.T. (2021). *Probiyotiklerin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisinin In Vitro Ko-Kültür Modelinde Araştırılması*, Yayımlanmış Yüksek Lisans Tezi, Hitit Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Çorum.

- Kim, S., Lee, M.S., Lee, B., Gwon, W.G., Joung, E.J., Yoon, N.Y., Kim, H.R. (2014). Anti-inflammatory effects of sargachromenol-rich ethanolic extract of *Myagropsis myagroides* on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 14, 231.
- Knackstedt, R., Knackstedt, T., Gatherwright, J. (2019). The role of topical probiotics on skin conditions: a systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. *Experimental Dermatology*, 29(1), 15-21.
- Laverdet, B., Micallef, L., Lebreton, C., Mollard, J., Lataillade, J.J., Coulomb, B., Desmoulière, A. (2014). Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol Biol (Paris)*, 62, 108-117.
- Lazurus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Pecoraro, R.E., Rodeheaver, G., Robson, M.C. (1994). Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Archives of Dermatological Research*, 130(4), 489-493.
- Leaper, D., Assadian, O., Edmiston, C.E. (2015). Approach to chronic wound infections. *British Journal of Dermatology*, 173(2), 351–358.
- Leoni, G., Neumann, P.A., Sumagin, R., Denning, T.L., Nusrat, A. (2015). Wound repair: role of immune – epithelial interactions. *Mucosal Immunology*, 8, 959-968.
- Li, B., Wang, J.H.C. (2011). Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *Journal of Tissue Viability*, 20(4), 108-120.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K.L., Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 24, 99-146.
- Li, N., Russell, W.M., Douglas-Escobar, M., Hauser, N., Lopez, M., Neu, J. (2009). Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: Effects on Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines/Chemokines in Gastrostomy-Fed Infant Rats. *Pediatric Research*, 66, 203-207.
- Li, S., Shah, N.P. (2016). Characterization, Anti-Inflammatory and Antiproliferative Activities of Natural and Sulfonated Exo-Polysaccharides from *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Journal of Food Science*, 81(5), 1167-1176.
- Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D.J., Pompa, P.P., Bayer, I.S., Athanassiou, A. (2014). All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 463, 137–145.
- Liarte, S., Bernabe-Garcia, A., Nicolas, F.J. (2020). Role of TGF- β in Skin Chronic Wounds: A Keratinocyte Perspective. *Cells*, 9(2), 306.
- Lichtman, M.K., Otero-Vinas, M., Falanga, V. (2016). Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair and Regeneration*, 24(2), 215-222.

- Lo, Z.J., Lim, X., Eng, D., Car, J., Hong, Q., Yong, E., Zhang, L., Chandrasekar, S., Tan, G.W.L., Chan Y.M., Sim., S.C., Oei, C.W., Zhang, X., Dharmawan A., Ng, Y.Z., Harding, K., Upton, Z., Yap, C.W., Heng, B.H. (2020) Clinical and economic burden of wound care in the tropics: a 5-year institutional population health review.
- Lukic, J., Chen, V., Strahinic, I., Begovic, J., Lev-Tov, H., Davis, S.C., Tomic-Canic, M., Pastar I. (2018). Probiotics or pro-healers the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regeneration*, 25(6), 912-922.
- Lu, Y., Lou, J., Liu, X., Wang, S. (2017). Oxysophocarpine reduces oxygen-glucose deprivation-induced microglial activation and injury. *American Journal of Translational Research*, 9 (5), 2266.
- Martignago, C.C.S., Oliveira, R.F., Pires-Oliveira, D.D.A., Oliveira, P.D., Pacheco Soares C., Monzani P.S., Poli-Frederico R.C. (2015). Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers in Medical Science*, 30(1), 203-208.
- Martin, P. (1997). Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309):75-81.
- Mathew-Steiner, S.S., Roy, S., Sen, C.K. (2021). Collagen in Wound Healing. *Bioengineering*, 8(5), 63.
- Mathieu, D., Linke, J.C., Wattel, F. (2006). Non-healing wounds. In: *Handbook on hyperbaric medicine*. Hollanda: Springer Yayinevi, 401-427
- Menke, N.B., Ward, K.R., Witten, T.M., Bonchev, D.G., Diegelmann, R.F. (2007). Impaired wound healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, 25(1), 19-25.
- Mokoena, D., Kumar, S.S.D., Houreld, N.N., Abrahamse, H. (2018). Role of photobiomodulation on the activation of the Smad pathway via TGF- β in wound healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 189, 138-144.
- Monika, P., Chandrababha, M.N., Rangarajan, A., Waiker, P.V., Murthy, K.N.C. (2021). Challenges in Healing Wound: Role of Complementary and Alternative Medicine. *Frontiers in Nutrition*, 8, 791899.
- Mouritzen, M.V., Andrea, A., Qvist, K., Poulsen, S.S., Jenssen, H. (2019). Immunomodulatory potential of Nisin A with application in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27(6), 650-660.
- Nakatsuji, T., Chen, T.H., Narala, S., Chun, K.A., Two, A.M., Yun, T., Shifqi, F., Kotol, P.F., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Latif, H., Kim, J.N., Lockhart, A., Artis, K., David, G., Taylor, R., Streib, J., Dorrestein, P.C., Grier, A., Gill, S.R., Zengler, K., Hata, T.R., Leung, D.Y.M., Gallo, R.L. (2017). Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *S. aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*, 9, 4680.
- Nam, Y., Kim, J., Baek, J., Kim, W. (2021). Improvement of Cutaneous Wound Healing via Topical Application of Heat-Killed *Lactococcus chungangensis* CAU 1447 on Diabetic Mice, *Nutrients*, 13(8), 2666.

- Nam, Y., Kim, J., Baek, J., Kim, W. (2021). Improvement of Cutaneous Wound Healing via Topical Application of Heat-Killed *Lactococcus chungangensis* CAU 1447 on Diabetic Mice. *Nutrients*, 13(8), 2666.
- Nguyen, V.L., Truong, C.T., Nguyen, B.C.Q., Vo, T.N.V., Dao, T.T., Nguyen, V.D., Trinh, D.T.T., Huynh, H.K., Bui, C.B. (2017). Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* Linn *Plos One*, 12(10), 0185674.
- Noh, H.J., Park, J.M., Kwon, Y.J., Kim, K., Park, S.Y., Kim, I., Lim, J.H., Kim, B.K., Kim, B.Y. (2022). Immunostimulatory Effect of Heat-Killed Probiotics on RAW264.7 Macrophages. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(5), 638-644.
- Nole, K.L.B., Yim, E., Keri, J.E. (2014). Probiotics and prebiotics in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71, 814–821.
- Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M.K., Ghahary, A. (2013). Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 2(5), 215-224.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N.C., Ramirez, H., Nusbaum, A.G., Sawaya, A., Patel, S.B., Khalid, L., Isseroff, R.R., Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*, 3(7), 445-464.
- Penn, J.W., Grobbelaar, A.O., Rolfe, K.J. (2012). The role of the TGF- β 1 family in wound healing burns and scarring: a review. *International Journal of Burns and Trauma*, 2(1), 18-28.
- Pitanguy, I., De Amorim, N.F.G., Radwanski, H.N. (2000) Contour surgery in the patient with great weight loss. *Aesthetic Plastic Surgery*, 24(6), 406–411.
- Powers, J.G., Higham, C., Broussard, K., Phillips, T.J. (2016). Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(4), 607-625.
- Qi, S.R., Cui, Y.J., Liu, J.X., Luo, X., Wang, H.F. (2020). *Lactobacillus rhamnosus* GG component, SLP, gDNA, and CpG, exert protective effects on mouse macrophages upon lipopolysaccharide challenge. *Letters in Applied Microbiology*, 70(2), 118-127.
- Quiros, M., Nishio, H., Neumann, P.A., Siuda, D., Brazil, J.C., Azcutia, V., Hilgarth, R., O’Leary, M.N., Garcia-Hernandez, V., Leoni, G., Feng Bernal, G., Williams, H., Dedhia, P.H., Germer-Smidt, C., Spence, J., Parkos, C.A., Denning, T.L., Nusrat, A. (2017). Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3510-3520.
- Ramasasthy, S.S. (2005). Acute wounds. *Clinics in Plastic Surgery*, 32, 195-208.

- Ramos, A.N., Sesto, Cabral, M.E., Nosedá, D., Bosch, A., Yantorno, O.M., Valdez, J.C. (2012). Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *P. aeruginosa*: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(4), 552-562.
- Rao, K.P., Chennappa, G., Suraj, U., Nagaraja, H., Raj, C.A.P., Sreenivasa, M.Y. (2015). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from sorghum-based traditional fermented food. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 7(2), 146–156.
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A. (2021). Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*, 11(5), 700.
- Reinke, J.M., Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43.
- Ribeiro, M.P., Morgado, P.I., Miguel, S.P., Coutinho, P., Correia, I.J. (2013). Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 33, 2958–2966.
- Richardson, R., Slanchev, K., Kraus, C., Knyphausen, P., Eming, S., Hammerschmidt, M. (2013). Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing Research. *The Journal of Investigation Dermatology*, 133(6), 1655-1665.
- Rizzo, A.E., Beckett, L.A., Baier, B.S., Isseroff, R.R. (2012). The linear excisional wound: an improved model for human ex vivo wound epithelialization studies. *Skin Research and Technology*, 18(1), 125-132.
- Robson, M.C. (1997). Wound Infections: A Failure of Wound Healing Caused by an Imbalance of Bacteria. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 637-650.
- Robson, M.C., Steed, D.L., Franz, M.G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38, 72 – 140.
- Rodriguez, P.G., Felix, F.N., Woodley, D.T., Shim, E.K. (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic Surgery*, 34, 1159-1169.
- Rodriguez-Melcon, C., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, C., Carballo, J., Capita, R. (2021). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology*, 11(1), 46.
- Rozada-Sanchez, R., P. Sattur, A., Thomas, K., S. Pandiella, S. (2008). Evaluation of *Bifidobacterium* spp. for the production of a potentially probiotic malt-based beverage. *Process Biochemistry*, 43, 848-854.
- Ru, Z., Hu, Y., Huang, S., Bai, L., Zhang, K., Li, Y. (2021). Bioflavonoid Galangin Suppresses Hypertrophic Scar Formation by the TGF- β /Smad Signalling Pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-10.

- Russo, E., Giudici, F., Fiorindi, C., Ficari, F., Scaringi, S., Amedei, A. (2019). Immunomodulating Activity and Therapeutic Effects of Short Chain Fatty Acids and Tryptophan Post-biotics in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology*, 10, 2574.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Sandholm, T.M. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
- Salkin, H., Yay, A., Gokdemir, N.S., Gönen, Z.B., Özdamar, S., Yakan, B. (2022). TGF- β 1-over-expressed adipose stem cells-derived secretome exhibits CD44 suppressor and anti-cancer properties via antagonistic effects against SMAD4 in breast cancer cells. *American Journal of Stem Cell*, 11(5), 64-78.
- Schiller, M., Javelaud, D., Mauviel, A. (2004). TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodelling and wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 35(2), 83-92.
- Schreml, S., Szeimies, R.M., Prantl, L., Landthaler, M., Babilas, P. (2010). Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(5), 866-881.
- Sen, C.K., Gordillo, G.M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T.K., Gottrup, F., Gurtner, G.C., Longaker, M.T. (2009). Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 17(6), 763-771.
- Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U.F., Caroleo, B., Amato, B., Gallelli, L., de Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(5), 605-613.
- Shahin, A.A.M. (2007). Removal of aflatoxin B1 from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9, 71-75.
- Sheng-Bi, C., Li, X., Qu, H.L., Sun, L.J., An, Y., Hong, Y.L., Tian, B.M., Chen, F.M. (2020). Calcitriol inhibits osteoclastogenesis in an inflammatory environment by changing the proportion and function of T helper cell subsets (Th2/Th17). *Cell Proliferation*, 53, 1-12.
- Siciliano, R.A., Reale, A., Mazzeo, M.F., Morandi, S., Silvetti, T., Brasca, M. (2021). Paraprobiotics: A New Perspective for Functional Foods and Nutraceuticals. *Nutrients*, 13(4), 1225.
- Singh, M.R., Saraf, S., Vyas, A., Jain, V., Singh, D. (2013). Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41(3), 202-212.
- Singh, T.P., Kaur, G., Kapila, S., Malik, R.K. (2017). Antagonistic activity of *Lactobacillus reuteri* strains on the adhesion characteristics of selected pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 486.

- Singhal, B., Vishwakarma, V., Singh, A. (2018). Metabiotics: the functional metabolic signatures of probiotics: current state-of-art and future Research priorities—metabiotics: probiotics effector molecules. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 9, 720–6.
- Sirin, S., Aslim, B. (2021). Protective effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria against amyloid beta1-42induced oxidative stress in SH-SY5Y cells: Involvement of the AKT, MAPK, and NF- κ B signaling pathway. *Process Biochemistry*, 106, 50-59.
- Smyrek, I., Mathew, B., Fischer, S.C., Lissek, S.M., Becker, S., Stelzer, E.H.K. (2019). E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biology Open*, 8(1), 1-11.
- Suez, J., Zmora, N., Segal, E., Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, 25, 716–29.
- Swift, M.E., Burns, A.L., Gray, K.L., DiPietro, L.A. (2001). Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *Journal of Investigative Dermatology*, 117, 1027-1035.
- Tandara, A.A., Mustoe, T.A. (2004). Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World Journal of Surgery*, 28, 294-300.
- Tang, J., Liu, H., Gao, C., Mu, L., Yang, S., Rong, M., Zhang, Z., Liu J., Ding, Q., Lai, R. (2014). A Small Peptide with Potential Ability to Promote Wound Healing. *PlosOne*, 9(3), e92082.
- Tanigawa, T., Pai, R., Arakawa, T., Higuchi, K., Tarnawski, A.S. (2005). TGF- β Signaling Pathway: Its role in Gastrointestinal Pathophysiology and Modulating of Ulcer Healing. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(1), 3-13.
- Taverniti, V., Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrions*, 6, 261-274.
- Tottoli, E.M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., Conti, B. (2020). Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, 12(8), 735.
- Toy, L.W. (2005). Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair. *Journal of Wound Care*, 14, 20-22.
- Tuncer, Z., Kozacı, L.D. (2022). Growth Factors, Receptors and Signal Transduction Pathways. *KTO Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(2), 91-107.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex vivo organ culture model. *Gut*, 61(7), 1007–1015.

- Uçeyler, N., Valenza, R., Stock, M., Schedel, R., Sprotte, G., Sommer, C. 2006. “Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain”, *Arthritis & Rheumatism (Arthritis & Rheumatology)*, 54(8), 2656-2664.
- Uppal, R., Ramaswamy, G.N., Arnold, C., Goodband, R., Wang, Y. (2011). Hyaluronic acid nanofiber wound dressing--production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*, 97B, 20.
- Utoiu, E., Matei, F., Toma, A., Diguta, F.C., Stefan, L.M., Manoiu, S., Vrajmasu, V.V., Moraru, I., Oancea, A., Israel-Roming, F., Cornea, C.P., Constantinescu-Aruxandei, D., Moraru, A., Oancea, F. (2018). Bee Collecte Pollen with Enhanced Health Benefits, Produced by Fermentation with a Kombucha Consortium. *Nutrients*, 10, 1365.
- Vaidyanathan, L. (2021). Growth Factors in Wound Healing – A Review. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 14(3), 1469-1480.
- Varian, B.J., Poutahidis, T., DiBenedictis, B.T., Levkovich, T., İbrahim, Y., Didyk, E., Shikhman, L., Cheung, H.K., Hardas, A., Ricciardi, C.E., Kolandaivelu, K., Veenema, A.H., Alm, E.J., Erdman, S.E. (2017). Microbial lysate upregulates host oxytocin. *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, 36-49.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V. (2009). The wound healing process:an Overview of the cellular and molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Venosi, S., Ceccarelli, G., de Angelis, M., Laghi, L., Bianchi, L., Martinelli, O., Maruca, D., Cavallari, E.N., Toscanella, F., Vassalini, P., Trinchieri, V., Oliva, A., d’Ettorre, G. (2019). Infected chronic ischemic wound topically treated with a multi-strain probiotic formulation: a novel tailored treatment Strategy. *Journal of Translational Medicine*, 17, 364.
- Verrechia, F., Mauviel, A. (2002). Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of Smad proteins in fibrosis. *Current Rheumatology Reports*, 4(2), 143-149.
- Vileikyte, L. (2007). Stress and wound healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, 25, 49-55.
- Visha, M.G., Karunagaran, M. (2019). A review on wound healing. *International Journal of Clinicopathological Correlation*, 3(2), 50-59.
- Wang, J., Zhang, C., Wei, X., Blagosklonov, O., Lv, G., Lu, X., Mantion, G., Vuitton, D.A., Wen, H., Lin, R. (2013). TGF- β and TGF- β /Smad Signalling in the Interactions between *Echinococcus multilocularis* and Its Hosts. *Plos One*, 8(2), 1-17.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119-126.

- Wang, Z.C., Zhao, W.Y., Cao, Y., Liu, Y.Q., Sun, Q., Shi, P., Cai, J.Q., Shen, X.Z., Tan, W.Q. (2020). The Roles of Inflammation in Keloid and Hypertrophic Scars. *Frontiers in Immunology*, 11, 603187.
- Wegh, C., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., Belzer, C. (2019). Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4673.
- Wei, D., Zhu, X.M., Chen, Y.Y., Li, X.Y., Chen, Y.P., Liu, H.Y., Zhang, M. (2019). Chronic wound biofilms: diagnosis and therapeutic strategies, *Chinese Medical Journal*, 132(22), 2737-2744.
- Wilkinson, H.N., Hardman, M.J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, 10(9), 200223.
- Wolgemuth, C.W. (2005). Lamellipodial contractions during crawling and spreading. *Biophysical Journal*, 89, 1643 – 1649.
- Wu, Y., Huang S., Enhe, J., Ma, K., Yang, S., Sun, T., Fu, X. (2013). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *International Wound Journal*, 11(6), 701-710.
- Xue, M., Jackson, C.J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3), 119-136.
- Yang, H.S., Shin, J., Bhang, S.H., Shin, J.Y., Park, J., Im, G.I., Kim, C.S., Kim, B.S. (2011). Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma. *Experimental & Molecular Medicine*, 43, 622–629.
- Yao, C., Yao, P., Wu, H., Zha, Z. (2006). Acceleration of wound healing in traumatic ulcers by absorbable collagen sponge containing recombinant basic fibroblast growth factor. *Biomedical Materials*, 1, 33–37.
- Yeşilyurt, N., Yılmaz, B., Ağagündüz, D., Capasso, R. (2021). Involvement of Probiotics and Postbiotics in the Immune System Modulation. *Biologics*, 1(2), 89-110.
- Zahirnia, A., Boroomand, M., Nasirian, H., Salehzadeh, A., Soleimani-Asl, S. (2019). Comparing Cytotoxicity of propoxur and Nepeta crispa (Lamiales: Lamiaceae) essential oil Against invertebrate (Sf9) and vertebrate (L929) cell line. *Veterinary World*, 12(11), 1698-1706.
- Zhang, X., Shu, W., Yu, Q., Qu, W., Wang, Y., Li, R. (2020). Functional Biomaterials for Treatment of Chronic Wound. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 516-530.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2758.

Zhu, Z., Ding, J., Ma, Z., Iwashina, T. and Tredget E.E. (2016). Systemic depletion of macrophages in the subacute phase of wound healing reduces hypertrophic scar formation. *Wound Repair and Regeneration*, 24(4), 644-656.

Zolkiewcz, J., Marzec, A., Ruszczynski, M. and Feleszko, W. (2020). Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189.



Gazili olmak ayrıcalıktır