

ELVAN ALKAYA

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI TUZLARDAN ELDE EDİLEN HİPOKLORÖZ ASİTİN
KERATİNOZİT VE FİBROBLAST HÜCRELERİNE ETKİSİ

Elvan ALKAYA

Eylül 2022
DENİZLİ

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI TUZLARDAN ELDE EDİLEN HİPOKLORÖZ ASİTİN
KERATİNOZİT VE FİBROBLAST HÜCRELERİNE ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Elvan ALKAYA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Denizli, 2022

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Elvan Alkaya

İmza :

ÖZET

FARKLI TUZLARDAN ELDE EDİLEN HİPOKLORÖZ ASİTİN KERATİNO SİT VE FİBROBLAST HÜCRELERİNE ETKİSİ

Elvan Alkaya

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin Abban Mete

15 Eylül 2022

57 Sayfa

Hipokloröz asit (HOCl), nötrofiller tarafından fagositoz sırasında sentezlenen ve tüm mikroorganizmaların yok edilmesinde aktif rol oynayan fizyolojik bir moleküldür. Genel olarak HOCl'nin antiseptik etkili olduğu ve ortam konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerde apoptozu veya hücre nekrozunu indükleyen bir ajan olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada amacımız, farklı tuzlarından elde edilen Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipokloröz asitin iyileştirici etkisini in vitro olarak keratinosit hücre hattı ve fibroblast hücre hatlarında incelemektir. Hipokloröz asitin keratinosit ve fibroblast hücre hatlarındaki etkisi hücre canlılık, koloni oluşturma ve yara iyileştirme testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca hücrelerdeki apoptozis varlığı Tunel yöntemiyle belirlenmiştir.

Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipokloröz tuzları keratinosit hücrelerinde çoğalma üzerine etki ederken, fibroblast hücrelerinde çoğalmayı etkilememiştir. Sodyum Hipokloröz çözeltisinin keratinosit hücre hattında apoptozisi kontrol grubuna göre oldukça düşürdüğü saptanmıştır. Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipokloröz çözeltileri fibroblast hücrelerinde apoptozise etki etmemiştir. HOCl tuzları hem kanser dokularında hem de yaralanmalarında kullanılan moleküllerdir. Bu çözeltilerin işlevlerinin daha ileri düzeyde araştırılmasına gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Yara iyileşmesi, hipokloröz asit, fibroblast, keratinosit

ABSTRACT**EFFECT OF HYPOCHLOROUS ACID FROM DIFFERENT SALTS
ON KERATINOSIDE AND FIBROBLAST CELLS**

Elvan Alkaya

MSC THESIS, HISTOLOGY AND EMBRYLOGY DEPARTMENT

SUPERVIVOR: Prof. Dr. Gülçin Abban Mete

15 September 2022

57 Page

Hypochlorous acid (HOCl) is a physiological molecule synthesized by neutrophils during phagocytosis and plays an active role in the destruction of all microorganisms. In general, HOCl has been shown to be an antiseptic and an agent that induces apoptosis or cell necrosis in cells, depending on the media concentration.

In this study, our aim is to examine the curative effect of Sodium Hypochlorous and Zinc Hypochlorous acid obtained from different salts in vitro in keratinocyte cell lines and fibroblast cell lines. The effects of different concentrations of hypochlorous acid on keratinocyte and fibroblast cell lines were compared using cell viability, colony formation and wound healing tests. In addition, the presence of apoptosis in the cells was determined by the Tunel method.

While sodium hypochlorous and zinc hypochlorous salts affected proliferation in keratinocyte cells, they did not affect proliferation in fibroblast cells. It was determined that the sodium hypochlorous solution significantly reduced apoptosis in the keratinocyte cell line compared to the control group. Sodium Hypochlorous and Zinc Hypochlorous solutions did not affect apoptosis in fibroblast cells. HOCl salts are molecules used in both cancer tissues and their injuries. The functions of these solutions need further investigation.

Key Words: Wound healing, hypochlorous acid, fibroplate, kerotinocyte

TEŞEKKÜR

Bu tez alıőmasında ve yüksek lisans boyunca bana hiçbir desteğini esirgemeyen ailem, danıőmanım Prof. Dr. Gölin ABBAN METE'ye, Prof. Dr. Ahmet KOLUMAN'a, Prof. Dr. Őevki Aslan'a, Arő. Gör. Hatice Őiyzen OBAN'a, Arő. Gör. Elif ÖNDER'e, Arő. Gör. Deniz Kalemci, Arő. Gör. Doğukan Mutlu'ya teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI	3
2.1 Derinin Yapısı ve Histolojisi	3
2.1.1 Epidermis	3
2.1.1.1 Stratum Basale.....	4
2.1.1.2 Stratum Granulosum	4
2.1.1.3 Stratum Lusidum	4
2.1.1.4 Stratum Corneum	4
2.1.1.5 Stratum Superficiale	5
2.1.1.6 Stratum Profundum	5
2.2 Hipokloröz Asit	6
2.3 Hipotezler.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	10
3.1 Gereçler	10
3.1.1 Hücre Kültürü	10
3.1.2 XTT Proliferation Kit	10
3.1.3 Tunel Kit	10
3.1.4 Hücre Kültürü Flaskı	10
3.1.5 Hücre Kültürü Plakaları.....	10
3.1.6 Thoma Lamı	11
3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	11
3.2.1 Farklı Tuzlardan Elde Edilen Hipokloröz Asit	11
3.2.2 Fötal Sığır Serum (FBS).....	11
3.2.3 Penisilin Streptomisin	11
3.2.4 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	12
3.2.5 Tripsin EDTA (0.25 %).....	12
3.2.6 Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi	12
3.2.7 Dimetil Sülfoksit (DMSO)	12
3.2.8 XTT Reagent	13
3.2.9 Kristal Viole	13
3.2.10 %4 Form Aldehit	13
3.2.11 Tripan Mavisi	13
3.3 Yöntem.....	13
3.3.1 Tek Tabakalı Hücre Kültürü (HacaT ve L929).....	13
3.3.2 XTT ve MTT Testi	15
3.3.3 Koloni Oluşum Testi	16
3.3.4 Wound Healing Testi	16
3.3.5 Tunel Boyama	17
4. BULGULAR	18
4.1 XTT ve MTT Testi Bulguları.....	18

4.2 Koloni Oluşum Bulguları.....	26
4.3 Wound Healing Migrasyon Testi Deneyi Bulguları.....	29
4.4 Tunel Boyama Bulguları.....	34
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
7. KAYNAKLAR	42
8. ÖZGEÇMİŞ.....	46

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1: Epidermis Tabakaları	3
Şekil 2.2: Derinin Tüm Histolojik Tabakaları	5
Şekil 2.3: Hipokloröz Asitin Oluşum Mekanizması	6
Şekil 2.4: Yara bölgesinde Hipokloröz asitin reaksiyonu	7
Şekil 2.5: Hipokloröz asitin inflamasyon bölgesindeki aktivitesi	8
Şekil 2.6: Hipokloröz asit ve Apoptozis	9
Şekil 4.1.1: 24 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz IC50 değeri	19
Şekil 4.1.2: 48 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz IC50 değeri	20
Şekil 4.1.3: 72 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz IC50 değeri	21
Şekil 4.1.4: 24 saat sonucunda Çinko Hipokloröz IC50 değeri	22
Şekil 4.1.5: 48 saat sonucunda Çinko Hipokloröz IC50 değeri	23
Şekil 4.1.6: 72 saat sonucunda Çinko Hipokloröz IC50 değeri	24
Şekil 4.2.1: 24, 48 ve 72. saatlerde keratinosit kontrol grubu koloni oluşum	26
Şekil 4.2.2: 24, 48 ve 72. saatlerde Sodyum Hipokloröz eklenmiş keratinosit grubu koloni oluşum	26
Şekil 4.2.3: 24, 48 ve 72. Saatlerde Çinko Hipokloröz eklenmiş keratinosit grubu koloni oluşum	27
Şekil 4.3.1: Sodyum Hipokloröz grubu fibroblast hücreleri migrasyon izleme	29
Şekil 4.3.2: Çinko Hipokloröz grubu fibroblast hücreleri migrasyon izleme	29
Şekil 4.3.3: Sodyum hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında yara alanı kapatma yeteneği görselleri	30
Şekil 4.3.4: Çinko hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında yara alanı kapatma yeteneği görselleri	32
Şekil 4.4: HaCat ve L929 hücre hatlarında Tunel boyama sonuçları	34

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 3.1: Dulbecco'S Modified Eagle's Medium (DMEM) içeriği	11
Tablo 4.1.1: 24 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri	18
Tablo 4.1.2: 48 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri.....	20
Tablo 4.1.3: 72 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri.....	21
Tablo 4.1.4: 24 saat sonucunda Çinko Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri	22
Tablo 4.1.5: 48 saat sonucunda Çinko Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri.....	23
Tablo 4.1.6: 72 saat sonucunda Çinko Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri.....	24
Tablo 4.1.7: Farklı konsantrasyonlardaki sodyum hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonucu hücre canlılığı üzerine etkisi (* p < 0.05) ..	25
Tablo 4.1.8: Farklı konsantrasyonlardaki sodyum hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonucu hücre canlılığı üzerine etkisi (* p < 0.05) ..	25
Tablo 4.3.1: Sodyum Hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı migrasyonuna etkisinin yüzde grafiği	31
Tablo 4.3.2: Çinko Hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı migrasyonuna etkisinin yüzde grafiği	33

KISALTMALAR

HOCl	:	Hipokloröz asit
OCl⁻	:	Hipoklorit İyonu
H⁺	:	Proton
Cl₂	:	Klor
H₂O	:	Su
NADPH	:	Nikotinamidadenindinükleotit fosfat-oksidadaz
SOD	:	Süperoksit dismutaz
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
MPO	:	Miyeloperoksidadaz
HaCaT	:	Keratinosit Hücre Hattı
HDFa	:	Fibroblast hücre hattı
FBS	:	Fötal sığır serum
L929	:	Fibroblast hücreleri
Zn	:	Çinko
Na	:	Sodyum
DMEM	:	Dulbecco'S Modified Eagle's Medium
FBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
XTT carboxanilide	:	2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-
OD	:	Absorbans değeri
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
MPO	:	Myeloperoksidadaz
MMP	:	Matrix metalproteinaz
FDA	:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

1. GİRİŞ

Hipokloröz asit (HOCl), nötrofiller tarafından fagositoz sırasında sentezlenen ve tüm mikroorganizmaların yok edilmesinde aktif rol oynayan fizyolojik bir moleküldür. HOCl zayıf bir asittir ve çözeltinin pH'sına bağlı olarak hipoklorit iyonu (OCI-) ve proton (H+) yapısına ayrışır (Foote ve diğ. 1983). Genel olarak HOCl'in antiseptik etkili olduğu ve ortam konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerde apoptozu veya hücre nekrozunu indükleyen bir ajan olduğu gösterilmiştir (Fukuzaki S.2006) (Güngör 2009). Bu özelliklerinden dolayı HOCl dezenfektan ve antibakterial ajan olarak kullanılmaktadır. Hipokloröz asit etkenli dezenfektanlar; bakteriler, virüsler ve mantarların duvar yapısından DNA'sına kadar tüm yaşamsal fonksiyonlarına etki ederek saniyeler içerisinde öldürür. Uygulandığı ortamda bulunan prokaryot hücrelerin atomlarından elektron kopartarak stabilitesini bozar ve dört farklı yönden müdahale ederek etkisiz hale gelmelerini sağlar (Robaszkievicz ve diğ. 2011).

Mikroorganizmaların antibiyotiklere direncinde etkili olan ve mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm tabakayı yok ederek, bu tabakanın altındaki zararlı mikroorganizmaların da ortamdan yok olmasını sağlar. Özellikle yara iyileşmesinde yara bölgesindeki zararlı mikroorganizmaları etkisiz hale getirirken, aynı zamanda yaranın iyileşmesini ve doku yenilenmesini de destekler (Hoekstra ve diğ. 2017) (Romanowski ve diğ. 2018). Alkol ya da iyot içeren antiseptiklerin, sağlıklı dokudaki keratinosit ve fibroblastlara verdiği zararın aksine, hipokloröz asit etkenli dezenfektanlar bu hücrelerin hasarlı bölgeye proliferasyonunu (göçünü) artırarak yaranın iyileşme sürecini hızlandırır. Bir dakikadan daha az bir sürede %99,99 oranında antisepsi sağlar ve 2- 3 dakikada suya dönüşür, kalıntı bırakmaz. Sistemik dolaşıma katılmadığı için tedavi süresince ihtiyaç duyulan preparatlarla birlikte kullanılabilir. Sistemik hiçbir ürün ile etkileşime girmez (Morris 1966).

Hipokloröz asit yara iyileşmesinde de etkili bir ajandır. Akut ve kronik yaralar, kısmi ve tam deri yaraları, parçalı yaralanmalar, ameliyat sonrası yaralar, greft meshleri, punch deri grafleri ve biyopsilerinde, yanıklar (1 derece 2 derece), cilt ülserleri (I-IV. evre), küçük yırtıklar ve kesikler, apseler, yara

irigasyonu ve debridmanı, yarayı nemlendirme ve kokularını azaltmada Hipokloröz asit etken maddeli dezenfektanlar kullanılmaktadır (Sakarya 2014).

Bu dezenfektanlar yara tedavisi dışında deri döküntüleri, alerji bölgeleri, dışkı veya idrar temasları ile gelişen cilt tahrişleri, kıl kökü tahrişleri, göz kapağı iltihabı, kulak iritasyon ve enfeksiyonları, genital bölge temizliği, burun ve boğaz enfeksiyonları, diş eti rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Khan ve Naqvi 2006).

1.1. AMAÇ

Bu çalışmada, farklı klor tuzlarından elde edilen hipokloröz asitin iyileştirici etkisi in vitro olarak hücre hatlarında incelenmiştir. Bu amaçla hipokloröz asitin keratinosit ve fibroblast hücre hatlarındaki etkisi hücre canlılık, koloni oluşturma ve yara iyileştirme (wound healing) testleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca hücrelerdeki apoptozis varlığı TUNEL yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmanın yara iyileşmesi ve kanser araştırmalarına katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

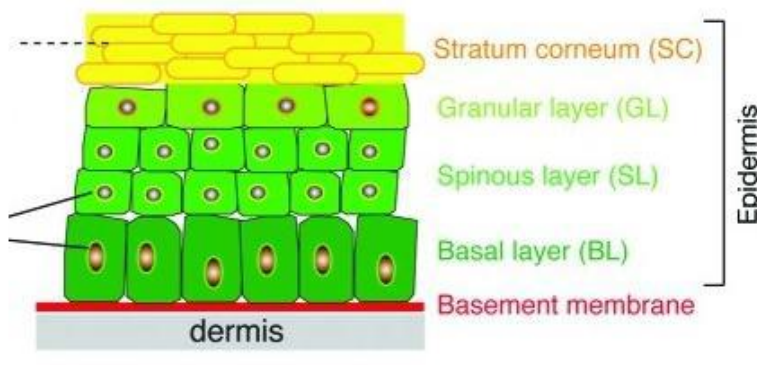
2.1 Derinin Yapısı ve Histolojisi

Vücudumuzun iç ve dış çevresinin ara yüzü özelliğindeki deri, vücut ağırlığımızın %6'sını oluşturmaktadır. Yetişkin bir insan derisi vücudun yaklaşık 2 m²' lik bir alanı kaplar ve ortalama 2.5 mm kalınlığındadır. Deri, vücutta bariyer oluşturmasının yanı sıra çevresel bir algı sistemi oluşturmaktadır. Kimyasal, mekanik ve biyolojik uyarılara karşı da yalıtım ve immun-regülasyon görevi üstlenmektedir. Yapılan araştırmalar derinin vücutta homeostazın sağlanmasında kritik bir görev üstlendiğini göstermektedir (Tobin 2006) (Shevchenko ve diğ. 2010).

Deri ektodermden köken alan epidermis ve mezodermden köken alan dermiş tabakalarından oluşur. Dermisin alt kısmında bulunan ve gevşek bağ dokusu özelliğindeki hipodermis derinin alttaki dokulara bağlanmasını sağlamaktadır (Aktaş ve Dağlıoğlu 2005).

2.1.1. Epidermis

Epiderminin %95-97'sini temel hücre tipi olan keratinositler oluşturmaktadır. Epidermal hücreleri olarak ayrıca melanositler, immün sistemin dentritik hücreleri (Langerhans hücreleri) ve Merkel hücreleri bulunmaktadır. Keratinosit farklılaşma süreçleri sonucunda epidermis, katmanlardan oluşmaktadır (Zeren 2014).



Şekil 2.1: Epidermis Tabakaları (Xu 2012)

Epiderminin katmanları dermişten yūzeeye dođru stratumbasale, stratumspinosum, stratumgranulosum, stratumlucidum ve stratumcorneum'dur.

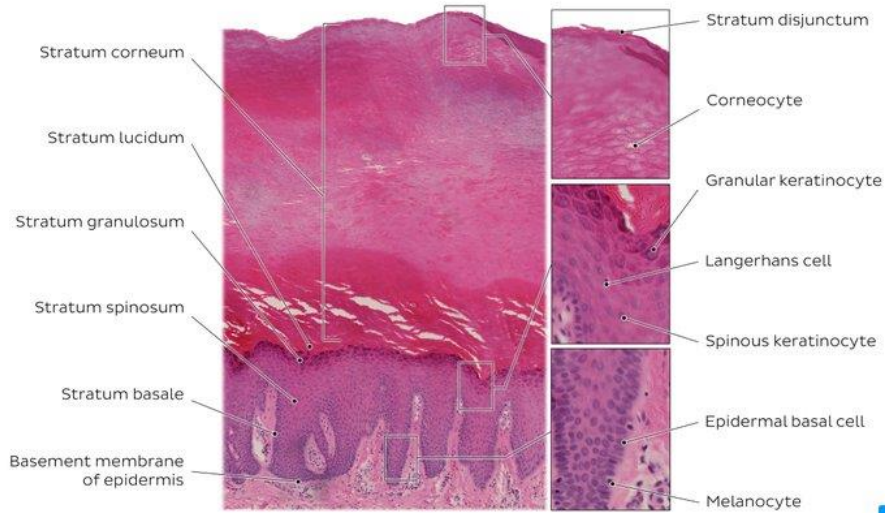
2.1.1.1 Stratum Basale: Tek katlı prizmatik hūcrelerden oluřan ve derindeki epitel katmanıdır. Melanositler, Merkel hūcreleri ve Langerhans hūcreleri bulunur. Buradaki hūcreler mitozla bōlünerek hūcre kayıplarını karřılar.

2.1.1.2 Stratum Spinosum : Melanositler ve Langerhans hūcrelerinin sitoplazmik uzantıları bulunur. Poligonal hūcrelerin meydana getirdiđi ve desmozomlara bađlı tonofibrillerden oluřan kalın ve dikenimsi bir katmandır.

2.1.1.3 Straum Granulosum: Őst ũste sıralanan yassı hūcrelerden oluřur. Stratum spinosum katmanındaki keratinleřme belirtileri bu katmanda hūcrelerdeki granũl birikimi ile gōrũlũr. Bu granũller su ve yabancı hūcreler iin bariyer oluřturur.

2.1.1.4 Stratum Lucidum: Belirsiz hūcre sınırlarından oluşur. Derinin ince ve kıllarla kaplı bōlũmũnde bu katmana rastlanmaz.

2.1.1.5 Stratum Corneum: Bu katmanın kalınlığı mekanik etkenlere gōre değişkenlik gōsterir. Őlũ hūcrelerin keratinleşmesi sonucu oluşur. (Aktař ve Dağlıoğlu 2005)



© www.kenhub.com



şekil 2.2: Derinin Tũm Histolojik Tabakaları (www.kenhub.com)

Epidermisten deri altı bağ dokusuna uzanan ve kollajen, retikulum ve elastik iplikleri içeren bölümdür. Stratum superficiale ve stratum profundum olmak üzere iki katmandan oluşur. Bu iki katman arasında belli bir sınır bulunmamaktadır.

2.1.1.6: Stratum Superficiale: Epiderminin hemen alt kısmında başlayan bağ dokusunun oluşturduğu bölümdür. Gevşek ve ince demetler halinde sıralanan kollajen iplikler ve daha az sayıdaki retikulum ve elastik ipliklerden meydana gelir. Kıl folikülleri, ter ve yağ bezlerini taşır.

2.1.1.7 Stratum Profundum: Kalın ve güçlü kollajen iplikleri bu katmanda kendi aralarında örgü oluştururlar (Aktaş A., Dağlıoğlu S).

2.2. Hipokloröz Asit

Hipokloröz asit, klorun suda çözünmesiyle oluşan zayıf bir asittir. HOCl formülüyle gösterilmektedir.

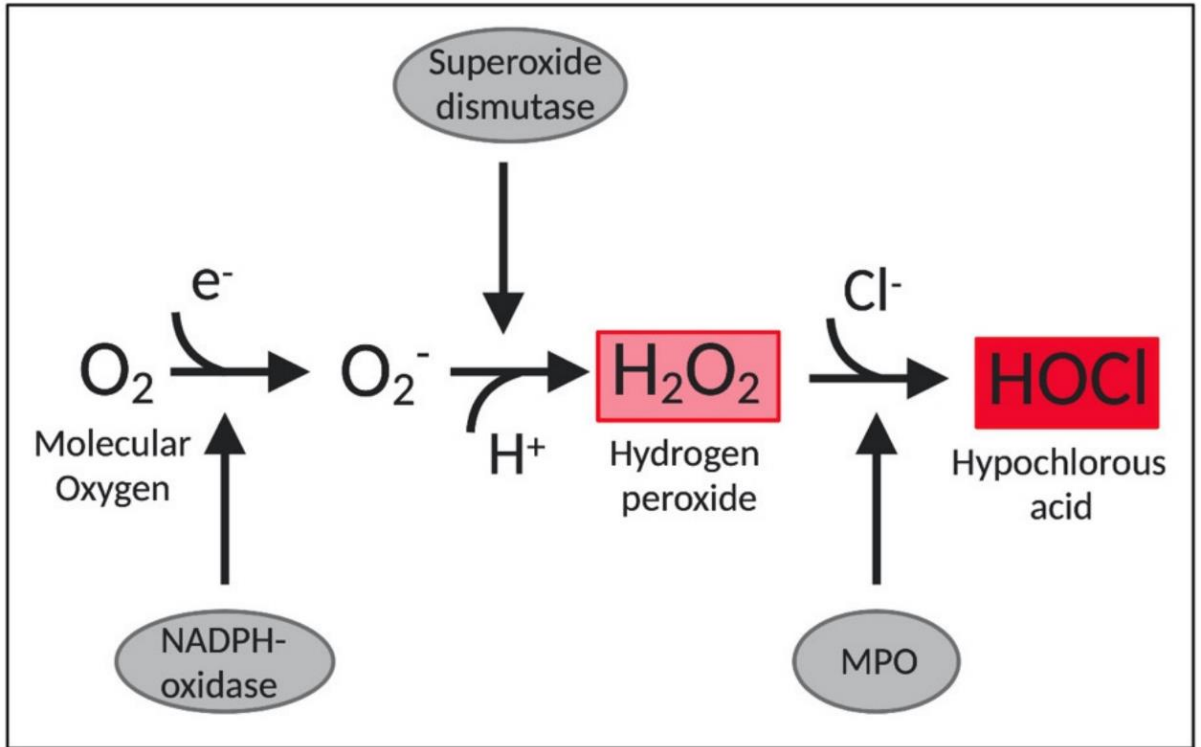


Hipokloröz asit (HOCl), enfeksiyonlara karşı nötrofiller tarafından üretilen güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Günümüzde ABD Çevre Ajansı tarafından antiviral ve antimikrobiyal dezenfektan olarak COVID-19'a karşı önerilen bir dezenfektan olarak kullanılmaktadır.

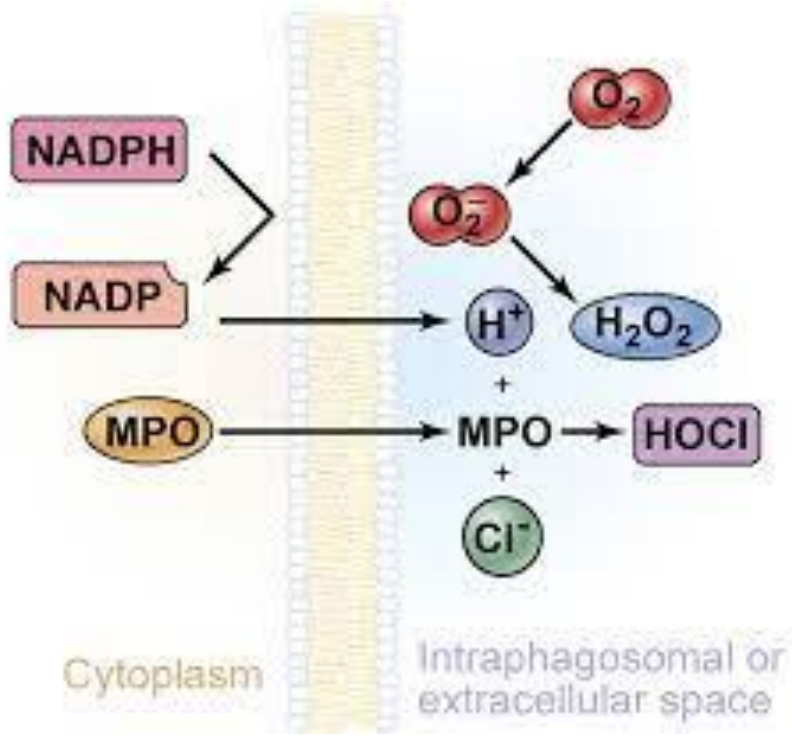
Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığıyla aktive edilen Hipokloröz asit, nörodejeneratif ve kardiyovasküler gibi pek çok hastalığın gelişiminde vücut tarafından yüksek seviyede üretilmektedir (Kaluç ve Thomas 2021).

Hipokloröz asit, antimikrobiyal bir ajan olarak virüs bakterilere karşı bağışıklık sisteminin ayrılmaz bir parçası olan nötrofiller tarafından doğal olarak üretilmektedirler (Tran ve diğ. 2020). Son yıllarda yapılan araştırmalar, anti-enflamatuar etkisi ve biyofilmleri parçalama yeteneği olan HOCl solüsyonlarının yara ve skar yönetiminde güçlü bir ajan olarak kullanıldığını göstermektedir (Joachim 2020).

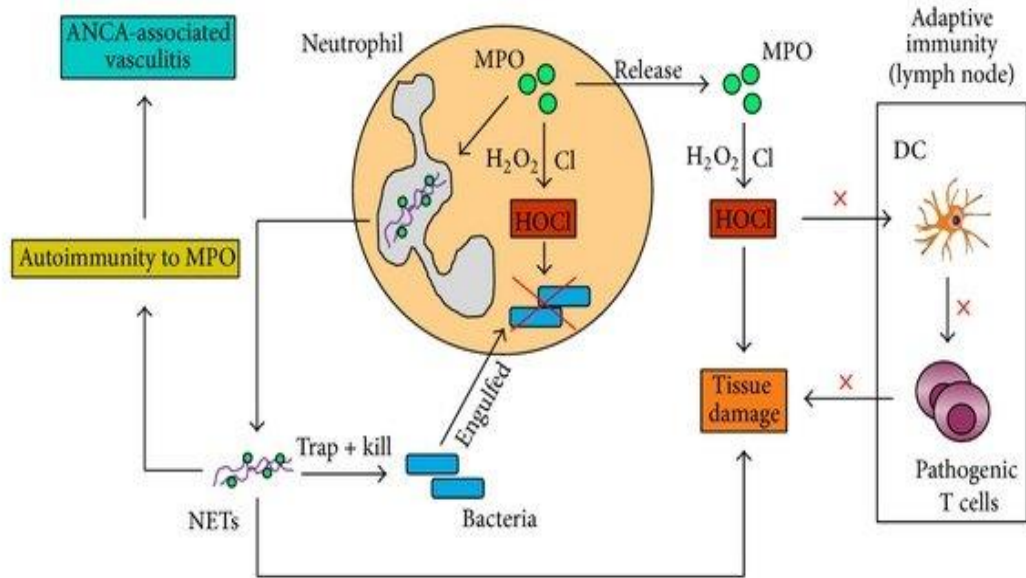
Hipokloröz asit yara sonucunda oluşan inflamasyonda nötrofiller tarafından üretilir. Nötrofiller inflamasyon bölgesinde nikotinamideninükleotit fosfat-oksidad (NADPH) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerini aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) üretir. Klor iyonu varlığında miyeloperoksidad (MPO), hidrojen peroksiti hipokloröz asite katalize eder. Hipokloröz asit güçlü bir antioksidan olarak bakteri ve virüsleri parçalar (Babior 1984).



Şekil 2.3: Hipokloröz asitin oluşum mekanizması



Şekil 2.4: Yara bölgesinde Hipokloröz asitin reaksiyonu (NebraskaRedoxBiology Center Education Portal)



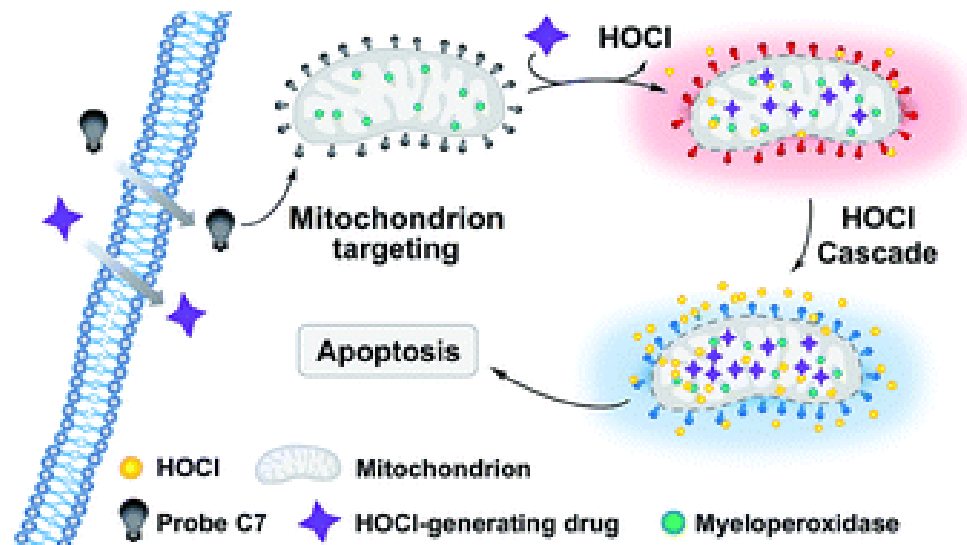
Şekil 2.5: Hipokloröz asitin inflamasyon bölgesindeki aktivitesi (Odobasic ve diğ. 2016).

Hipokloröz asit yara iyileşmesinde de etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır. Akut ve kronik yaralar, deri yaraları, ameliyata bağlı yaralar, 1. ve 2. derece yanıklar, 1-4. evre cilt ülserleri, küçük yırtıklar ve kesikler, apseler v.b. yaralarda hipokloröz asit etken maddeli dezenfektanlar kullanılmaktadır (Sakarya ve diğ. 2014).

Hipokloröz asit etken maddeli dezenfektanlar bazı mantar, parazit ve bakteri tiplerine karşı güçlü ve geniş bir etkinliğe sahiptir. Hipokloröz asit etkenli dezenfektanlar etkinliğini saniyeler içerisinde ve %99,99 oranda gösterir (Anagnostopoulos ve diğ. 2019).

Hipokloröz asit hücre proteinlerinde ve membran lipidlerinde peroksidasyona neden olur. Bu durum hücre zarında hasara yol açarak, hücrenin ölümüne yani hücre apoptozuna ya da hücre nekrozuna neden olur.

Apoptozis; yetişkin dokularında ve embriyolojik gelişimde çok önemli role sahip hücre ölümünün normal fizyolojik bir biçimidir. Apoptozis ile dokulardaki hücre sayısı sabit tutularak organizma için tehlike arz eden virüsle enfekte hücrelerin tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlar ve önemli bir savunma oluşturur. DNA hasarının meydana geldiği hücre apoptoz ile ortadan kaldırılır. Böylece DNA yapısındaki zararlı mutasyonları bulunduran hücrelerin, kanserleşme potansiyeli ortadan kaldırılmış olur (Kerr ve diğ. 2013).



Şekil 2.6: Hipokloröz asit ve Apoptozis (Shi, ve diğ. 2019)

Apoptotik hücreler organizmanın bazı doku ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmakta ve bu süreç ömür boyu devam etmektedir. Organizmadaki hücrelerin ölüm ve yapımındaki dinamik dengeyi korumak, homeostazisini oluşturma önem teşkil etmektedir. Bu dengenin apoptoz lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın da ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır. Bu durumlar organizma için oldukça büyük bir tehlike yaratma kapasitesine sahiptir (Kerr ve diğ 1972).

Apoptozise gidemeyen ya da genetik olarak değişmiş hücreler, ilerleyen süreçte kanser gelişimine neden olabilirler (Li veYuan 2008).

2.3 Hipotezler

1. Sodyumdan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre keratinosit hücrelerinin çoğalmasını artırır.
2. Sodyumdan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre fibroblast hücrelerinin çoğalmasını artırır.
3. Çinkodan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre keratinosit hücrelerinin çoğalmasını artırır.
4. Çinkodan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre fibroblast hücrelerinin çoğalmasını artırır.
5. Sodyumdan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre keratinosit hücrelerinde apoptozisi düşürür.
6. Sodyumdan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre fibroblast hücrelerinde apoptozisi düşürür.
7. Çinkodan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre keratinosit hücrelerinde apoptozisi düşürür.
8. Çinkodan elde edilen hipokloröz asit kontrol grubuna göre fibroblast hücrelerinde apoptozisi düşürür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada keratinosit (HaCaT) ve fibroblast hücre hattı (human dermal fibroblast HDFa) kullanılmıştır. Hücrelerinin kültürü için %10 fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren medyum uygulanmıştır. Hücrelerde apoptozis Tunel yöntemiyle belirlenmiştir.

3.1 Gereçler

3.1.1. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında fibroblast (L929) ve keratinosit (HaCaT) tek tabakalı hücre kültürü (2Dmonolayercellculture) hattı kullanılmıştır.

3.1.2 XTT Cell Proliferation Kit

Farklı maddelerden elde edilen hipokloröz asit solüsyonlarının sitotoksitesi ve doz ve zamana bağlı etkisi "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit" ile ölçülmüştür.

3.1.3 Tunnel Kit

Hücrelerde apoptozis varlığının belirlenmesi için TUNEL kiti protokolü uygulanmıştır.

3.1.4 Hücre Kültürü Flaskı

Hücrelerin üretilmesinde ve uygulamalarda 25'lik ve 75'lik hücre kültürü flaskları kullanılmıştır.

3.1.5 Hücre Kültürü Plakaları

Tez çalışması ile ilgili uygulamalarda ELISA plakaları ve derin kuyulu hücre kültürü plakaları kullanılmıştır.

3.1.6 Thoma Lamı

Mikroskopta hücre sayımında kullanılan lamdır. Hücre ekiminde kullanılacak olan hücre sayısını hesaplamak için kullanılmıştır.

3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.2.1 Farklı Tuzlardan Elde Edilen Hipokloröz Asit

Tez çalışmasında kullanılan Zn (Çinko) ve Na (Sodyum) tuzlarından elde edilen hipokloröz asit solüsyonları PAÜ Teknoloji Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği laboratuvarında üretilmiştir.

3.2.2 Fetal Sığır Serum (FBS)

Fetal sığır serum (FBS) hücrelerin yüzeye tutunabilmelerini ve çoğalmaları için kullanılan zengin bir protein çözeltisidir. FBS içinde enzimler, hormonlar, hücrenin büyümesini ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayan hücrelerarası matrix proteinleri bulunur. Bu çözelti biyolojik güvenlik kabininde 10 mL'lik falkon tüplere bölünerek -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmaktadır.

3.2.3 Penisilin Streptomisin

Penisilin ve streptomisin hücre kültüründe kullanılan antibiyotiklerdir. Hücrelerde meydana gelebilecek herhangi bir bakteri veya mantar kontaminasyonuna karşı hücreyi korumaktadır. Hücreler için kullanılan en standart antibiyotiklerdir. Penisilin 10,000 U/ml stoktan 100 U/ml (37°C'deki yarı ömürleri 2 gün) ve Streptomisin 10 mg/ml stoktan 100 µg/ml olacak şekilde (37°C'deki deki yarı ömürleri 4 gün) kullanılmıştır.

3.2.4 Dulbecco'S Modified Eagle'S Medium (DMEM)

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin canlılığını koruyabilmesi ve üremesi için sıvı besi yeri tercih edilir. Tez çalışmasında Dulbecco'S Modified Eagle'SMedium (DMEM) kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Dulbecco'S Modified Eagle's Medium (DMEM) içeriği

İçindekiler	Miktarı
L-Glutamine	4.00 nM
L Glucose	1000 mg/L
Sodium Pyruvate	110 mg/L

Hücreler farklı besi yerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besi yeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Tez çalışmamızda %10 fetal sıgır serum (FBS) ve 100 IU/mL penisilin ve 10 mg/mL streptomisin eklenerek besi yeri hazırlanmıştır.

3.2.5 Tripsin-EDTA (0.25 %)

Hücre pasajlamaları için kullanılan bir enzimdir. Bu çalışmada kullanılan tripsin solüsyonu %0.25 EDTA içermektedir. Tez çalışmasında tripsin-EDTA solüsyonu -20 °C'de oligotlanarak saklanmıştır.

3.2.6 Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solüsyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler, pH'yı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar. Hücre kültüründe, ölü hücreler ile hücre atıklarını uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır.

3.2.7 Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Tez çalışmasında besi yerinde üretilen hücrelerin dondurularak saklanması için kriyotüplere DMSO (Dimetil sülfoksit) eklenmiştir. Hücrelerin dondurulmasında önce

tripsinizasyon ve santrifüj basamakları gerçekleştirilmiş daha sonra 1,5 ml'lik kriyotüplere, 9:1 oranında besi yeri ve DMSO (%10) olacak oranda hücre süspanse edilerek eklenmiştir. Kriyotüplere depolanan hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak için -80 derecede muhafaza edilmiştir.

Dondurulan hücrelerin yeniden çözülüp ekilmesi işlemleri için; daha önce dondurulan kriyotüpteki hücreler 37°C deki su banyosunda çözdürülmüştür. Çözünme işlemi sonrası hücrelere besi yeri eklenmiştir. Hücreler falkona alınıp santrifüj işlemi edilmiştir. Santrifüj sonrasında DMSO içeren besi yeri uzaklaştırılmış ve yeni besi yeri eklenmiştir. Uygun kültür şartları sağlanarak hücreler inkübe edilmiş ve kültür kaplarına ekilmiştir.

3.2.8 XTT Reagent

Tez çalışmasında 2 madde, farklı dozlarda tekli şekilde hücre hatlarına uygulanmıştır. Doz ve zamana göre hücre canlılığın tespiti ile hücrelerin yüzde ellisinin (%50) yaşadığı dozu bulmak için XTT ile hücre proliferasyon testi kullanılmıştır.

3.2.9 Kristal Viole

Koloni testi uygulanan hücreler fikse olduktan sonra kristal viole ile boyanarak sayımı yapılmıştır.

3.2.10 Form Aldehit

Keratinosit ve fibroblast hücreler oda sıcaklığında 20 dakika boyunca % 4 formaldehit içinde tespit edilmiştir.

3.2.11 Tripan Mavisi

Tripan mavisi hücre canlılık tayininde kullanılan ve ölü hücrelerin sitoplazmalarını boyayan kimyasal bir maddedir.

3.3 Yöntem

3.3.1 Tek Tabakalı Hücre Kültürü (HacaT ve L929)

Hücre hatları medyum içeren petri kaplarına ekilmiştir. İki günde bir besi yeri tazelenmiş ve 37°C de %95 nem, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler monolayer olup, tutunarak üremiştir.

Hücre pasajlanması için yapıştıkları yüzeyden ayrılmalarını sağlamak gerekmektedir. Petrideki hücreler PBS ile yıkanarak ölü hücrelerden ve hücre atıklarından arındırılmıştır. Aspirasyon sonrası tripsin ilave edilerek hücreler petri yüzeyinden kaldırılmıştır.

Petri içerisindeki hücreler 15 ml'lik falkonlara alınmış ve 1500g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken hücreler besi yerinde tekrar homojenize edilerek uygun oran sağlanarak petrilere ekilmiştir. Hücrelerin çoğalarak petriye tekrar yapışması için uygun ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin sayılması için tripan mavisi boyası kullanılmıştır. Tripan mavisi sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Ölü hücreler mavi (boya almış) ve canlı hücreler (boya almamış) olarak görülmüştür.

Deneilerin standardizasyonunu için tüm deney basamaklarında hücre sayımları yapıldıktan sonra hücrelerin ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin dondurulmasını sağlamak için kriyotüpler içerisinde DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılmıştır. Hücrelerin dondurulması için önce tripsinizasyon ve santrifüj işlemleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1,5 ml'lik kriyotüplere, 9:1 oranında besi yeri ve DMSO (%10 DMSO) olacak oranda hücre süspansiyonu edilerek konulmuştur. Resüspanse edilen hücreler kriyotüplere konularak başka çalışmalarda kullanılmak üzere -80 derecede muhafaza edilmiştir.

Fibroblast ve keratinosit hücre hatları 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besi yerinde geliştirilmiş ve çoğaltılmıştır. Hücre hatları 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna bağlı olarak pasajlanmıştır.

100mm'lik kültür plakalarında çoğaltılan hücreler yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılarak santrifüj edilmiş ve taze besi yeri ile tekrar süspansiyon edilmiştir.

3.3.2 XTT ve MTT Testi

İki madde farklı dozlarda tekli ve kombine şekilde hücre hatlarına uygulanıp zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin yüzde ellisinin (%50) yaşadığı dozu bulmak için XTT ile hücre proliferasyon testi kullanılmıştır.

Bu test suda eriyebilen bir bileşik olan XTT (2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'yi canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibine göre işlemektedir.

Suda eriyebilir özellikte olan boyanın yoğunluğu bir spektrometre ile verilen dalga boylarında okutulmakta ve metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan formazon oluşumu sayesinde hızlı bir şekilde hücre canlılığı testi sonuçlarının değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Maddelerin sitotoksitesisi ve doz ve zamana bağlı etkisi "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation" Kit ile yapılmıştır. Kerotosit ve fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilmiş ve hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenmiştir.

Çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı ile hazırlanmıştır. Kontrol kuyucukları dışında maddeler gruplara uygulanmıştır. Belirlenen konsantrasyonda maddelerin uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit" ile saptanmıştır. Aynı zamanda zamana bağımlı etkinin araştırılması amacıyla test işlemi 24, 48 ve 72.saatlerde çalışılmıştır.

Bu saatler sonunda her bir kuyucuğa 100 µL ortam koyulduktan sonra 50 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu (49 µL XTT Reagent Solüsyonu ve 1 µL Aktivatör Solüsyonu) eklenmiştir. Madde eklenmesinden 4saat sonra çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okutulmuştur.

Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak IC50 oranı belirlenmiştir.

Sodyum Hipokloröz (sodyum klorür) ve Çinko Hipokloröz (çinko klorür) çözeltilerinin L929 hücre hattı canlılığına etkisini araştırmak için MTT testi kullanılmıştır. Thoma lamı

ve Tripan mavisi boyası yardımıyla ışık mikroskopunda sayılan hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilerek (2×10^3 hücre/kuyu) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından besi yeri yenilenerek farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Ardından kültür ortamı uzaklaştırılmış ve 10 µL MTT (5 mg/mL) ile 100 µL besi yeri hücrelerin üzerine ilave edilerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra MTT içerek besi yeri ortamdan uzaklaştırılarak ortaya çıkan formazan kristalleri %100 DMSO yardımıyla çözülmüştür. Oluşan rengin absorbansı bir mikro plaka okuyuculu spektrofotometre (Epoch, BioTek) yardımıyla 590nm'de okunmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.3.3 Koloni Oluşum Testi

Maddelerin uygulanması sonrasında hücrelerde koloni oluşumunun nasıl etkilendiğini belirlemek için, 6 kuyucuklu kültür kaplarına kontrol ve doz grupları için 103 hücre ekimi yapılmış ve 14 gün boyunca hücreler 2 günde bir ortamlarını değiştirmek suretiyle 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda bekletilmiştir.

On dört günün sonunda hücrelerin soğuk metanolla -20°C'de 10 dakika fikse olmaları sağlanmıştır. Fikse olmuş koloniler kristal viole boyası ile 15 dakika boyanmıştır. Boyanmış olan koloniler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılarak değerlendirilmiştir.

3.3.4 Wound Healing Testi

Yara iyileşme deneyi, hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu aynı zamanda çizik deneyi olarak da bilinir, çünkü hücre tek tabakası üzerinde çizik yapılır ve mikroskopla düzenli aralıklarla görüntü yakalanır.

Özellikle bir hücre tabakasının hücre göçünü yarı kantitatif olarak ölçmek için 2D hücre göçü yaklaşımıdır. Bu çizik, mekanik, termal veya kimyasal hasar gibi çeşitli yaklaşımlarla yapılabilir. Bu kazımanın amacı, boşluğu geçirmek ve kapatmak için hücresiz bir alan üretmektir.

Bu deneyle kontrol grupları ve doz uygulanan hücrelerdeki migrasyon kapasitesi değişimi tespit edilmiştir. %100 konfluente ulaşan hücreler 200 mikrolitrelik pipet ucuyla çizilecek hücrelerin 0,16,24. saatlerdeki migrasyon durumları invert mikroskop altında gözlemlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipokloröz çözeltilerinin MTT testi sonuçlarına göre seçilen toksik olmayan iki doz seçilmiş, ardından hücre hatları üzerinde yara iyileştirme (wound-healing) kapasitesi araştırılmıştır.

Bu amaçla, 6 kuyulu plakalara ekilen hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, steril bir 200 µL'lik tip yardımıyla hücre tabakası düz bir şekilde çizilmiş ve besi yeri uzaklaştırılmıştır.

Kalkan hücreleri uzaklaştırmak için PBS yardımıyla kuyular nazikçe yıkanmış ve taze besi yeri eklenmiştir. Daha sonra seçilen dozlar uygulanmış ve 24 saat süre sonra kuyular sadece tam besi yeri ile değiştirilmiştir. 0, 24 ve 48. saatlerde fotoğrafları alınan yara alanlarının analizi ImageJ uygulaması ile yapılmıştır.

3.3.5 Tunel Boyama

Chamber slaytlarda kültürle edilen keratinosit ve fibroblast hücreler oda sıcaklığında 20 dakika boyunca %4 formaldehit içinde tespit edilmiştir. %0,5 lik Triton X 30 dakika ile yıkanan hücreler bloking solüsyonunda 30 dakika inkübe edilmiştir.

Hücrelerde apoptozis varlığının belirlenmesi için TUNEL kiti protokolü uygulanmıştır. Apoptotik hücreler OlympusBX51 mikroskobu ile resimlendirilmiştir.

Toplam hücre sayısı ve TUNEL pozitif hücreler, mikroskopta rastgele seçilen 10 alanda sayıldı. Sonuçlar, apoptotik hücrelerin toplam hücrelere oranını apoptotik indeks (API) hesaplanmıştır.

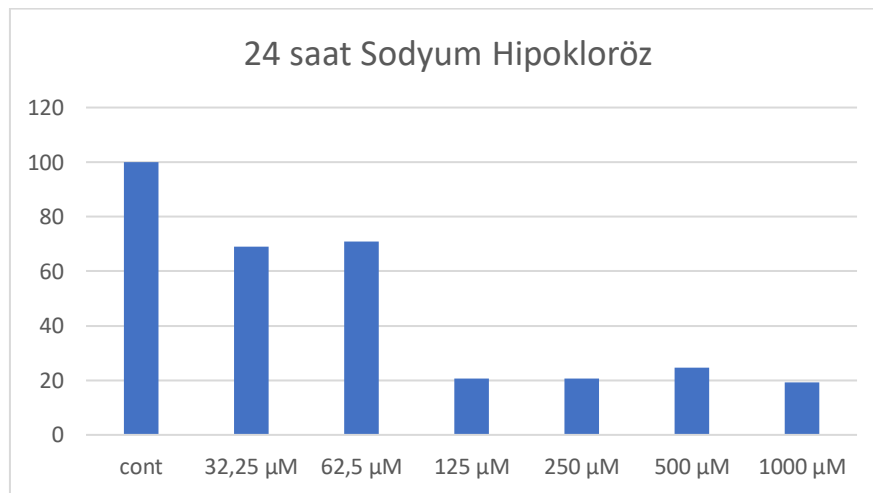
4.BULGULAR

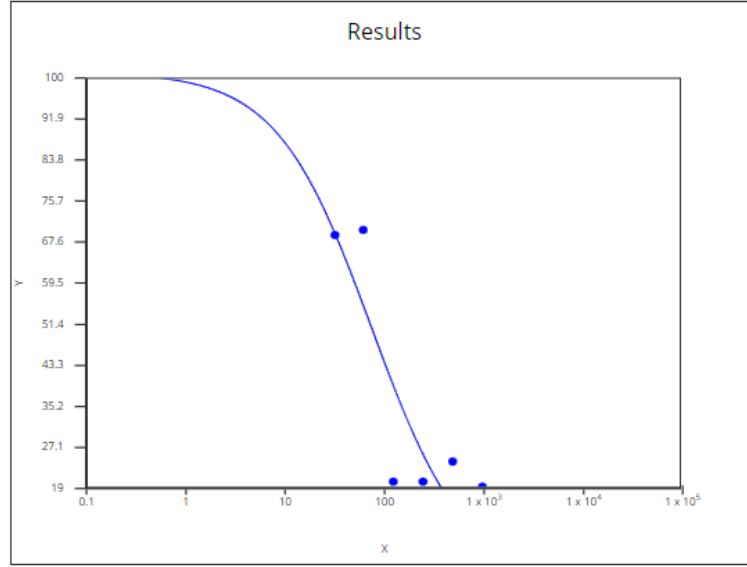
4.1 XTT ve MTT Testi Bulguları

Bu çalışmada Sartarius Ref:20-30-1000 Lot: 213190 XTT hücre proliferasyon kiti kullanılmıştır.

24, 48 ve 72 saatlerde keratinosit hücrelerine uygulanan XTT kiti ile Sodyum Hipokloröz sonuçları ve IC50 değerleri tablo ve şekillerde belirtilmiştir.

Tablo 4.1.1: 24 saat sonucunda Sodyum hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri

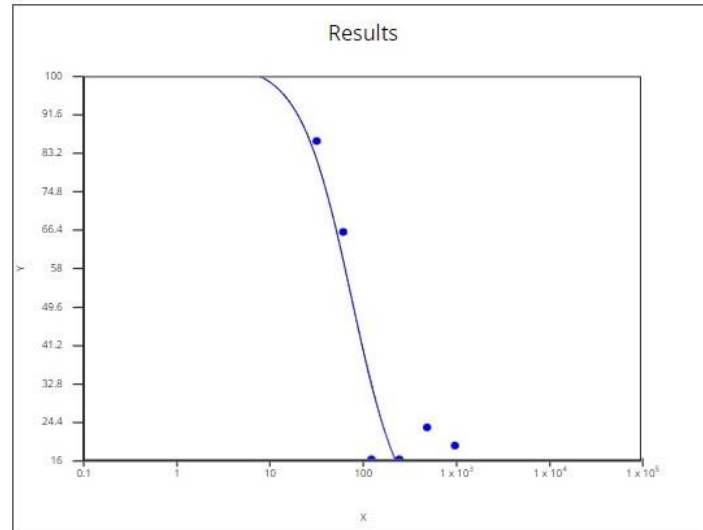
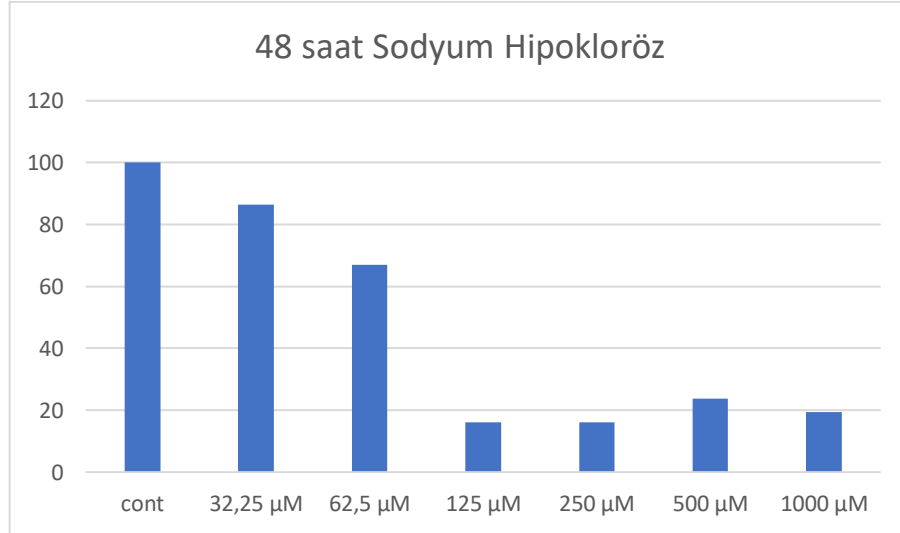




IC₅₀ Regresyon Sonuçları [Veri 1]

Parametre	Değer
IC ₅₀	74.9973

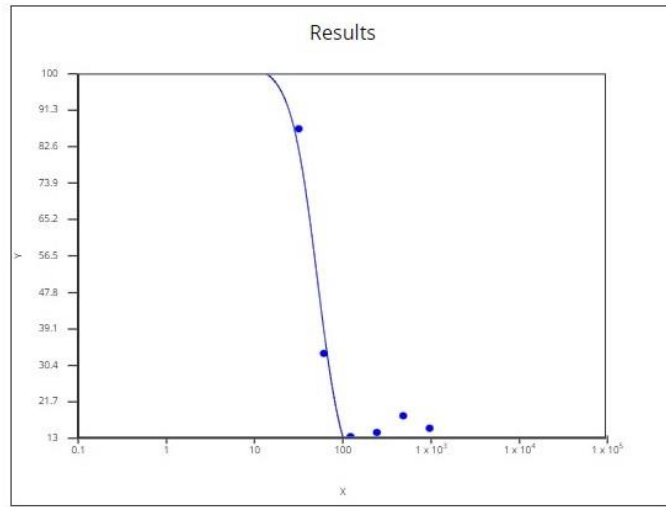
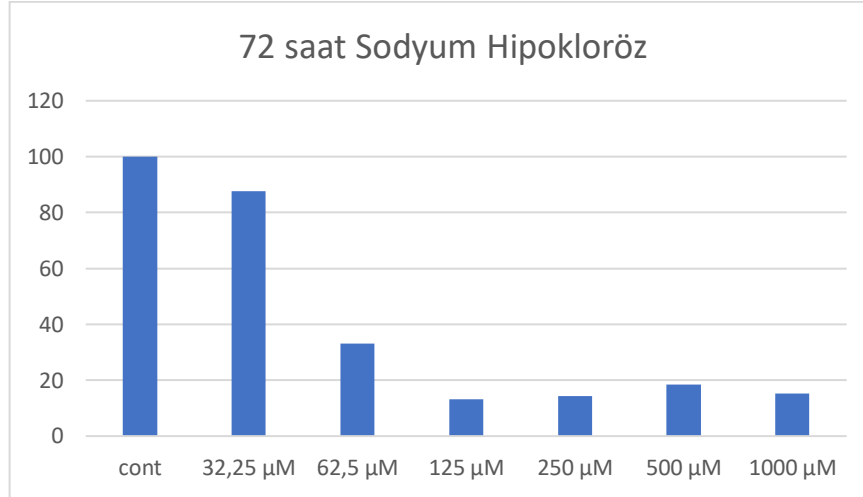
Şekil 4.1.1: 24 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz IC50 değeri

Tablo 4.1.2: 48 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri

IC₅₀ Regresyon Sonuçları [Veri 1]

Parametre	Değer
IC ₅₀	76.1541

Şekil 4.1.2: 48 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz IC₅₀ değeri

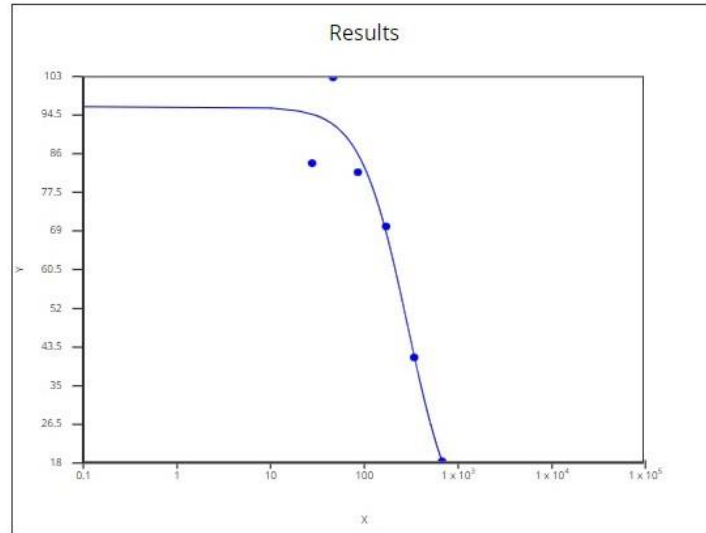
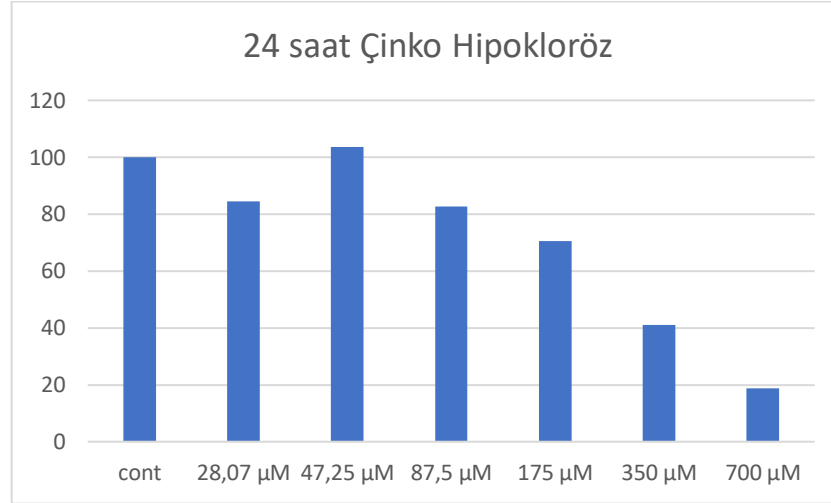
Tablo 4.1.3: 72 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri**IC₅₀ Regresyon Sonuçları [Veri 1]**

Parametre	Değer
IC ₅₀	52.055

Şekil 4.1.3: 72 saat sonucunda Sodyum Hipokloröz IC₅₀ değeri

24, 48 ve 72 saatlerde XTT kiti uygulanan Çinko Hipokloröz sonuçları ve IC50 değerleri tablo ve şekillerde belirtilmiştir.

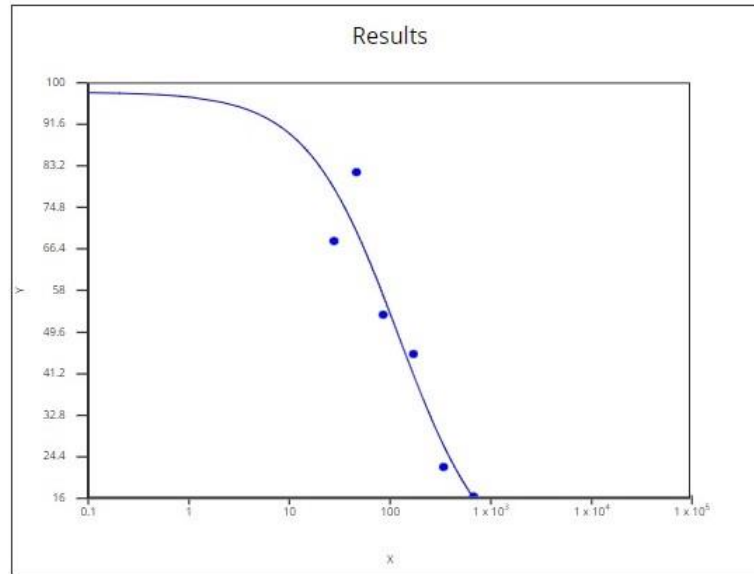
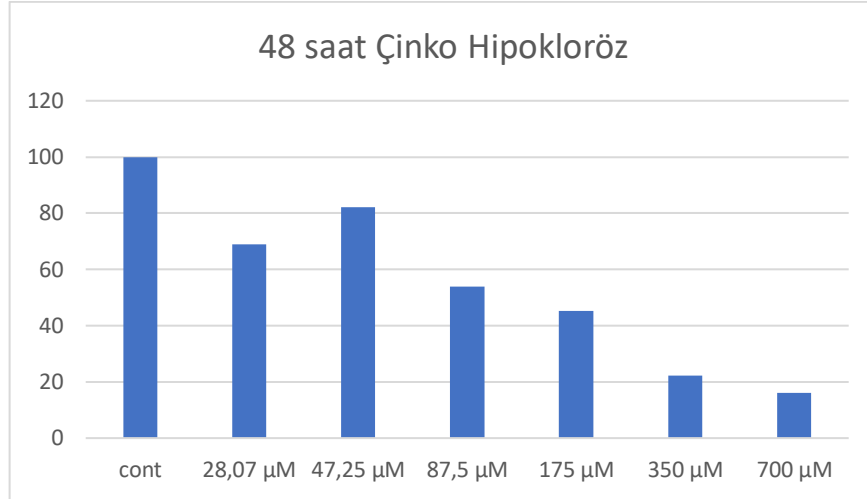
Tablo 4.1.4: 24 saat sonucunda Çinko Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri



IC₅₀ Regresyon Sonuçları [Veri 1]

Parametre	Değer
IC ₅₀	296.4463

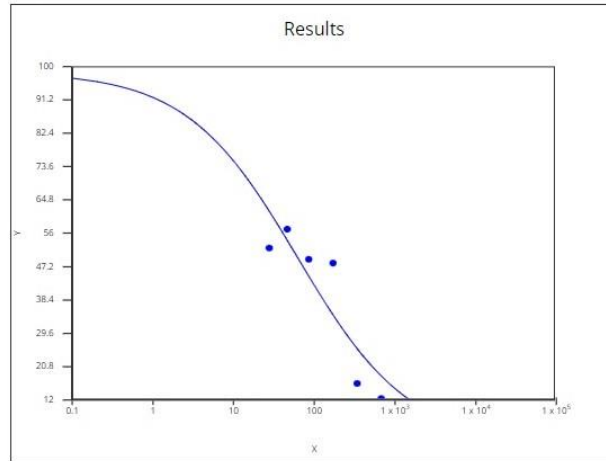
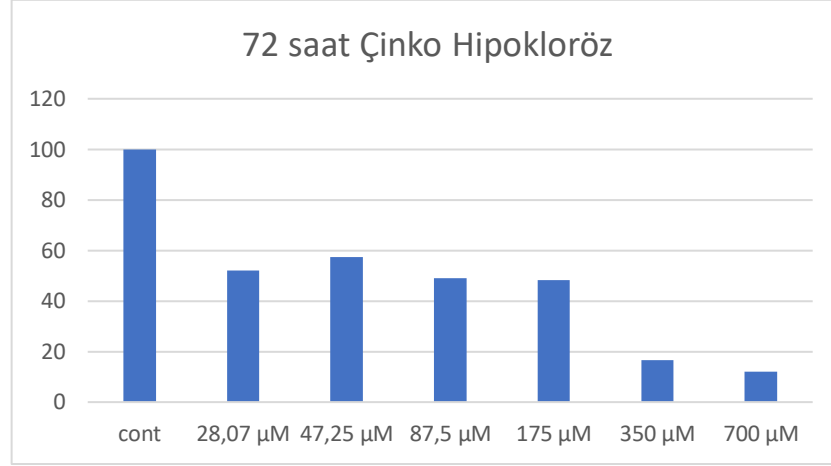
Şekil 4.1.4: 24 saat sonucunda Çinko Hipokloröz IC50 değeri

Tablo 4.1.5: 48 saat sonucunda Çinko Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleri

IC₅₀ Regresyon Sonuçları [Veri 1]

Parametre	Değer
IC ₅₀	121.7566

Şekil 4.1.5: 48 saat sonucunda Çinko Hipokloröz IC₅₀ değeri

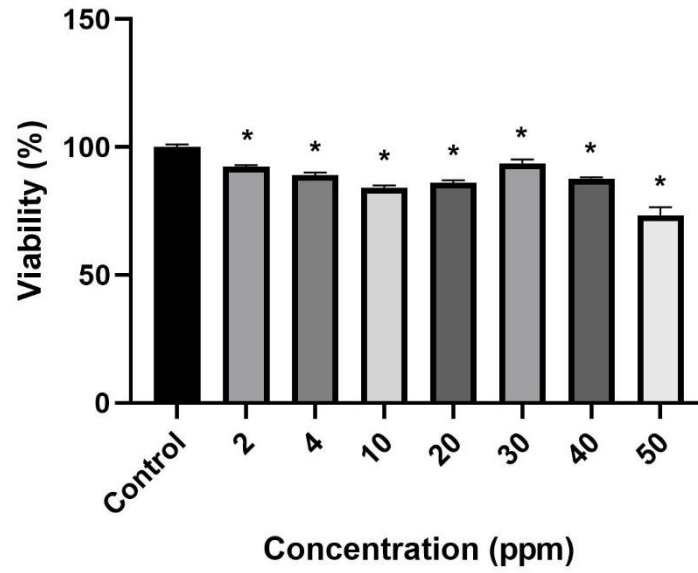
Tablo 4.1.6: 72 saat sonucunda Çinko Hipokloröz eklenmiş kuyucuklardaki XTT değerleriIC₅₀ Regresyon Sonuçları [Veri 1]

Parametre	Değer
IC ₅₀	63.4682

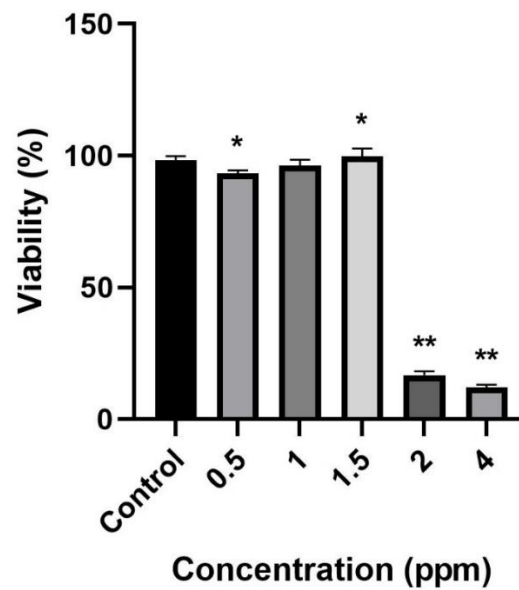
Şekil 4.1.6: 72 saat sonucunda Çinko Hipokloröz IC₅₀ değeri

HacaT hücre hattında sodyum hipoklorözün 24. saatte en düşük XTT değeri 1000 µM, 48. ve 72 saate ise 125 µM bulunmuştur. Çinko hipoklorözün ise 24., 48. ve 72. saatlerdeki en düşük değeri 700 µM'dir.

Tablo 4.1.7: Farklı konsantrasyonlardaki sodyum hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonucu hücre canlılığı üzerine etkisi (* p < 0.05)

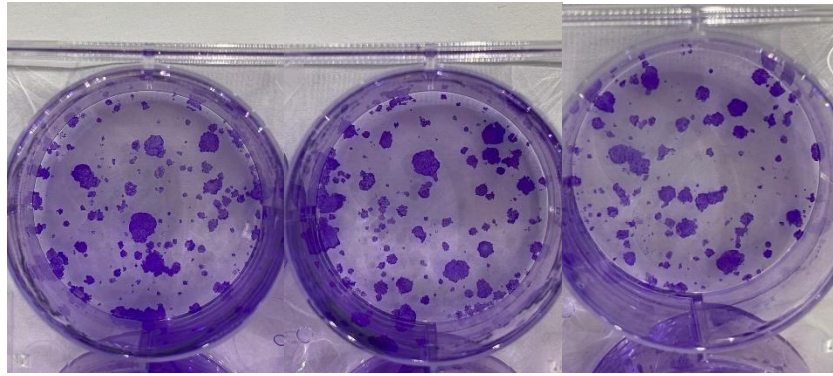


Tablo 4.1.8: Farklı konsantrasyonlardaki Çinko Hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonucu hücre canlılığı üzerine etkisi (* p < 0.05, ** < 0.001)

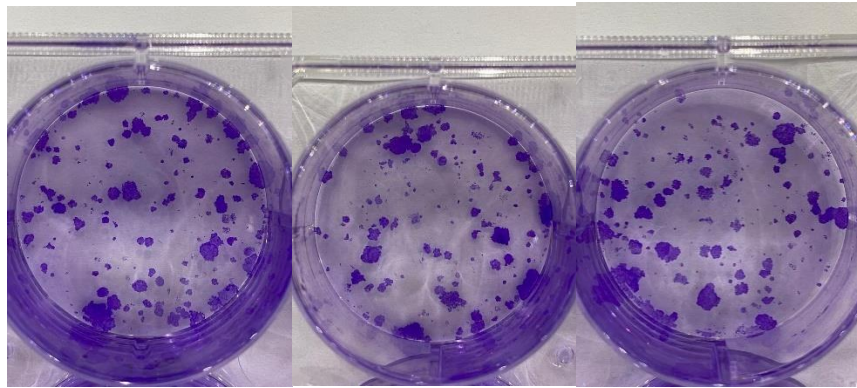


4.2 Koloni Oluşum Bulguları

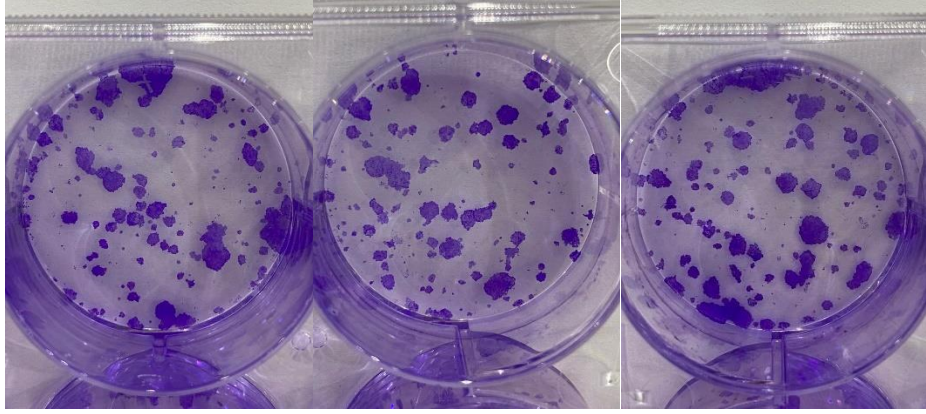
Kontrol, Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipoklorözün HaCAT hücre hatlarında koloni oluşumlarına etkisi



Şekil 4.2.1: 24, 48 ve 72. saatlerde keratinosit kontrol grubu koloni oluşum



Şekil 4.2.2: 24, 48 ve 72. saatlerde Sodyum Hipokloröz asit eklenmiş keratinosit hücre grubu koloni oluşumu



Şekil 4.2.3: 24, 48 ve 72. saatlerde Çinko hipokloröz asit eklenmiş keratinosit hücre grubu koloni oluşumu

Kontrol grubunda: 42 koloni, Sodyum hipokloröz eklenmiş grupta: 45 koloni, Çinko hipokloröz eklenmiş grupta: 49 koloni sayıldı.

Besi yerinde yapılan koloni sayımı 'her canlı hücre 1 koloni oluşturur' prensibine dayanmaktadır. İnkübasyondan sonra petri kutusunda 40 koloni sayılırsa, bu sadece 0,1 ml materyaldeki sayıyı belirtir.

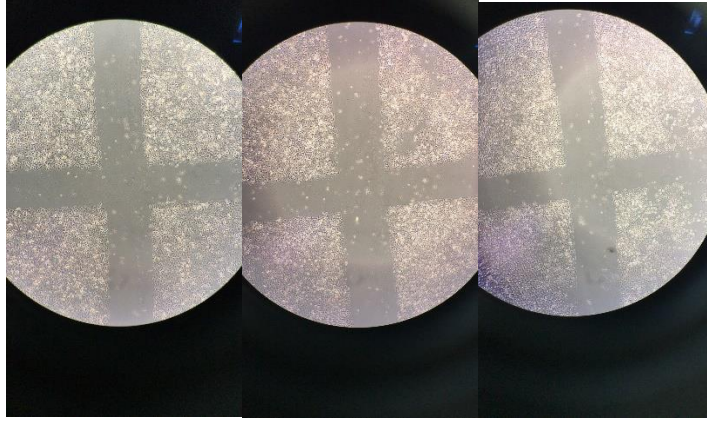
Bu hesaplama göre kontrol gurubunda 840 adet/ml,

Sodyum Hipokloröz eklenmiş grupta 900 adet/ml adet

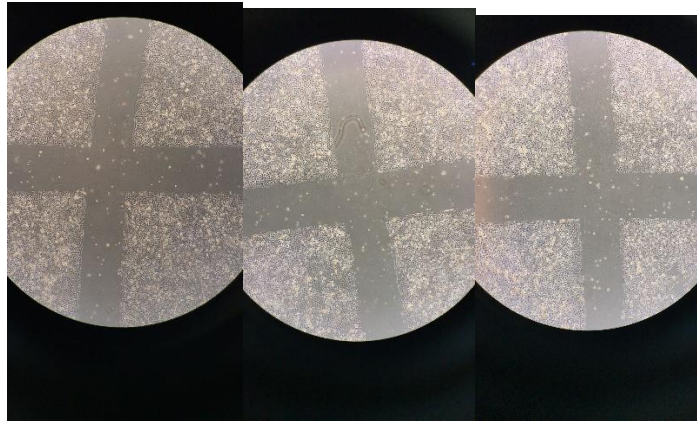
Çinko Hipokloröz eklenen 980 adet/ml adet canlı hücre vardır.

Sonuçlara göre Sodyum hipokloröz ve Çinko hipoklorözün keratinosit hücre hatlarında koloni oluşumlarını artırmaya yönelik etkisi olmuş, fibroblast hücre hatlarında koloni oluşumu gözlenmemiştir.

4.3 Wound Healing Migrasyon Deneyi Bulguları

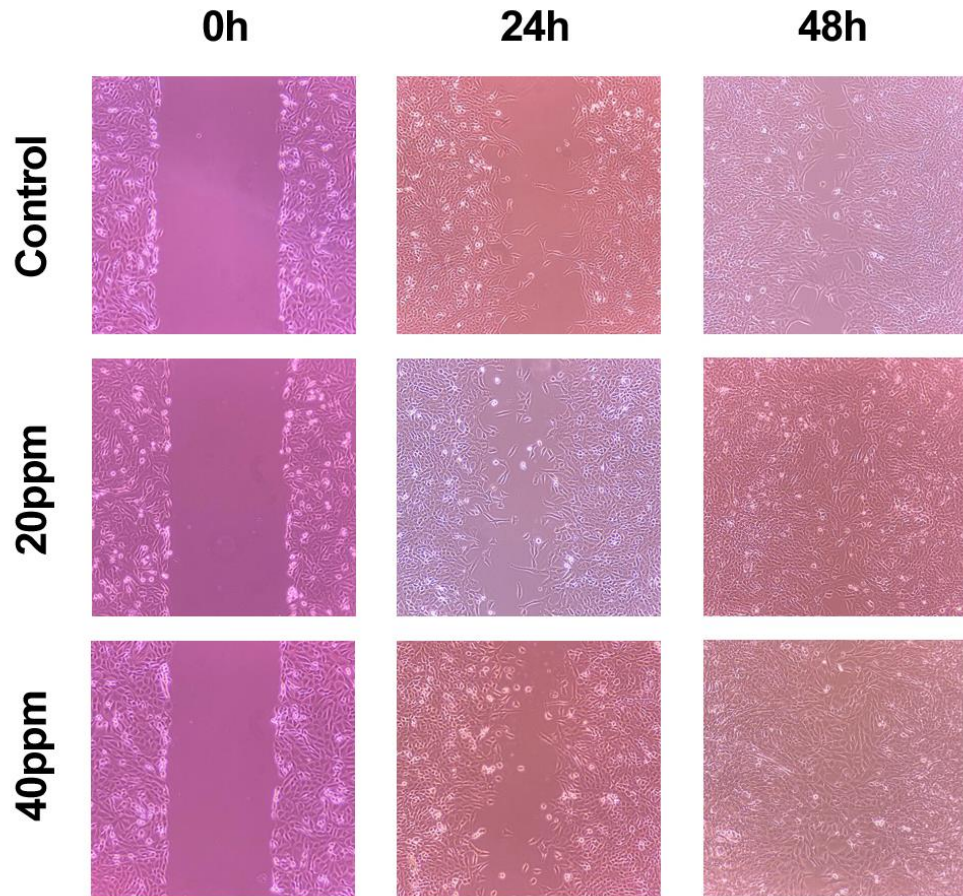


Şekil 4.3.1: Sodyum hipokloröz grubu fibroblast hücreleri migrasyon izleme



Şekil 4.3.2: Çinko hipokloröz grubu fibroblast hücreleri migrasyon izleme

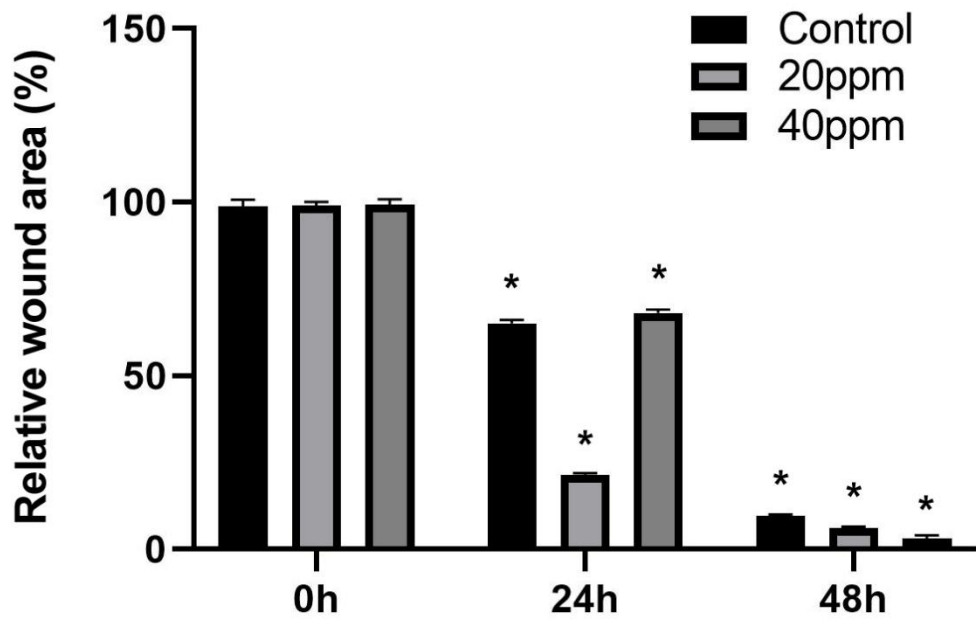
HacaT hücre hattında hücre çoğalmasının olmadığı izlenmiştir.



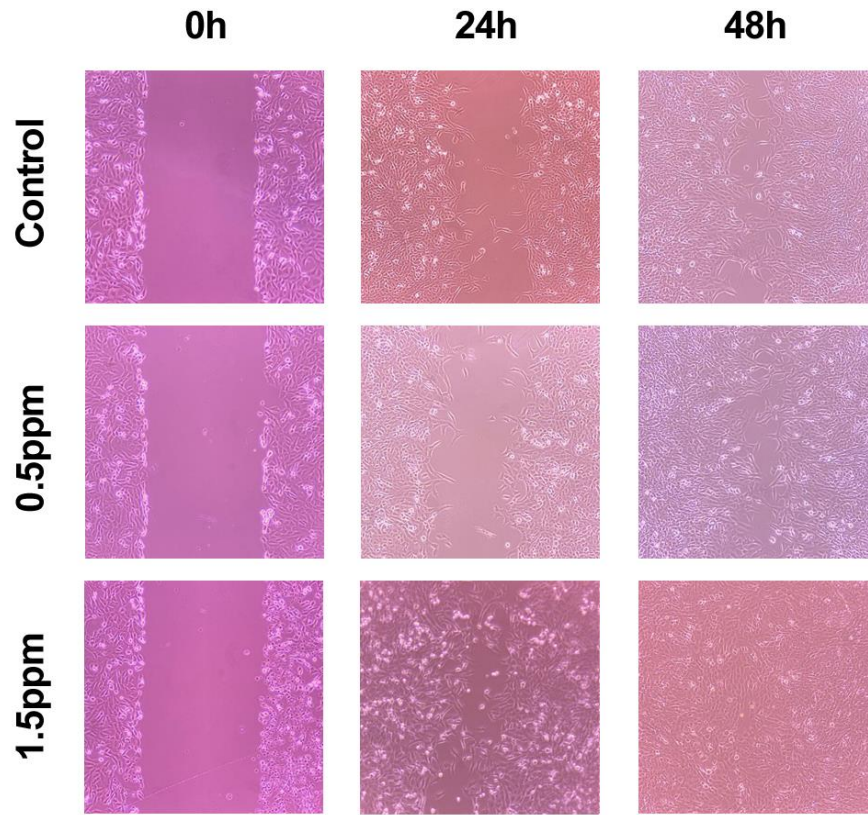
Şekil 4.3.3: Sodyum hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında yara alanı kapatma yeteneği görselleri.

20 ve 40 ppm konsantrasyondaki Sodyum hipokloröz uygulaması sonucunda 48. saatte kontrol grubuna göre 20 ppm Sodyum hipokloröz çözeltisinin kontrol grubuna göre yara alanına hücre migrasyonunu yaklaşık 1.2 kat daha fazla, ayrıca 40 ppm Sodyum hipokloröz çözeltisinin kontrol grubuna göre yara alanını 2.7 kat daha fazla kapattığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.3).

Tablo 4.3.1: Sodyum Hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı migrasyonuna etkisinin yüzde grafiği.



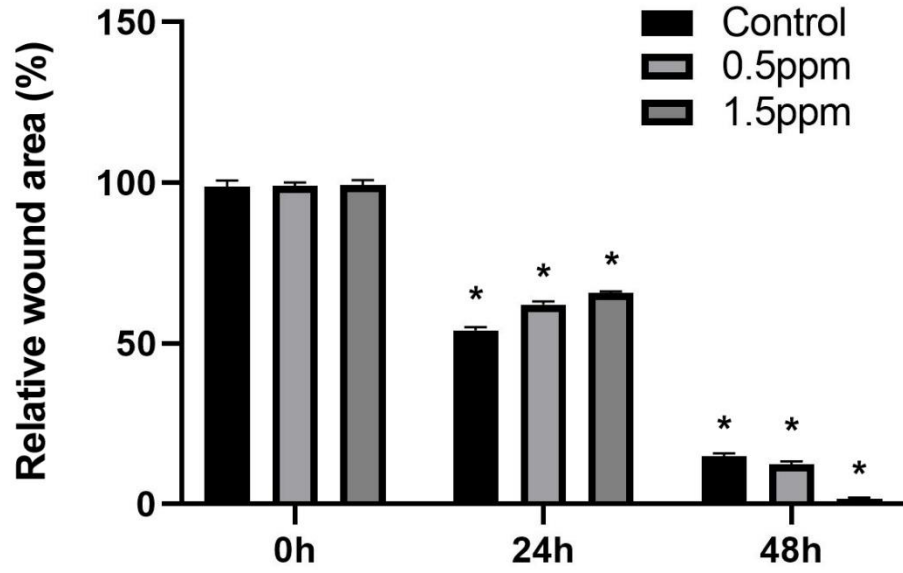
Uygulama yapılan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir (\pm SS, $n=3$, $p < 0.05$).



Şekil 4.3.4: Çinko hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında yara alanı kapatma yeteneği görselleri.

0.5 ve 1.5 ppm konsantrasyondaki Çinko hipokloröz uygulaması sonucunda 48. saatte kontrol grubuna göre 0.5 ppm Çinko hipokloröz çözeltisinin kontrol grubuna göre yara alanını 1.21 kat kapattığı, 1.5 ppm Çinko hipokloröz çözeltisinin ise kontrol grubuna göre yara alanını yaklaşık 9.7 kat daha fazla kapattığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.4).

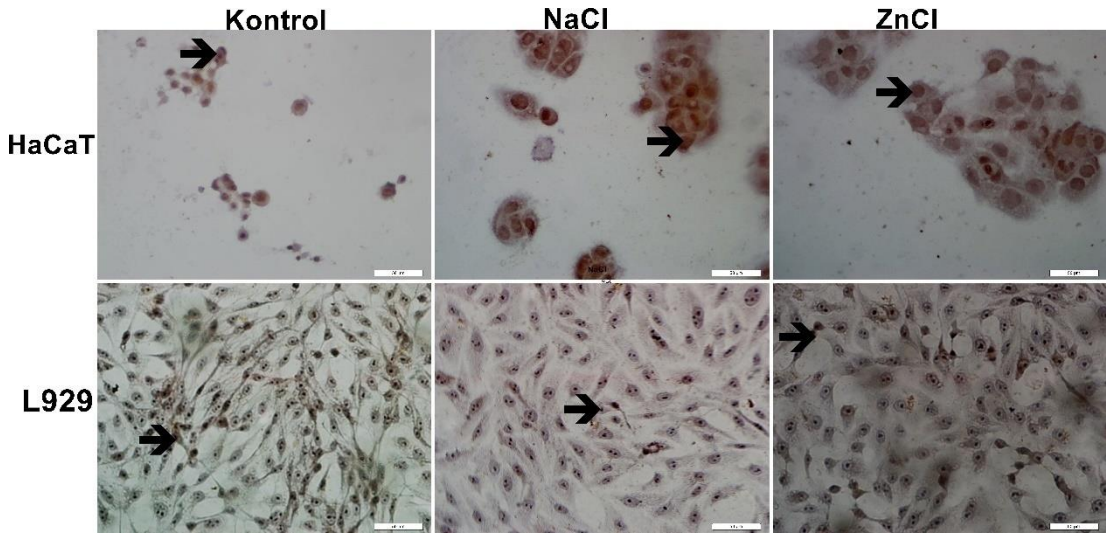
Tablo 4.3.2: Çinko hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı migrasyonuna etkisinin yüzde grafiği.



Uygulama yapılan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir (\pm SS, $n=3$, $p < 0.05$).

4.4 Tünel Boyama Bulguları

HaCaT ve L929 hücre hattında Sodyum hipokloröz ve Çinko hipokloröz çözeltisinin apoptozise etkisi Tünel yöntemiyle belirlenmiştir. Apoptotik indeks keratinosit hücre hattı olan HaCaT'ta en düşük Sodyum Hipokloröz grubunda bulunurken fibroblast hücre hattı olan L929 da deney grupları arasında farklılık izlenmemiştir.



Şekil 4.4.1: HaCat ve L929 hücre hatlarında Tünel boyama sonuçları. Ok Tünel (+) hücreleri göstermekte. (İmmunoperoksidaz&Hematoksilen, X400, Bar=50µM)

5.TARTIŞMA

HOCl, bağışıklık sisteminin önemli bir endojen mikrobisidal bileşenini temsil eder, yara iyileşmesi, ateroskleroz, astım, nörodejenerasyon, tümörigenez ve kronolojik yaşlanma ile ilgili enflamatuar patolojilerde ve dokuların yeniden şekillenmesinde de rol oynayan küçük molekülü bir elektrofildir. Aynı zamanda HOCl kaynaklı oksidasyon kamu içme suyu güvenliği ve havuz dezenfeksiyonu ile ilgilidir (Whiteman ve Rose 2005). Buna ek olarak, HOCl ortaya çıkan COVID-19 pandemisi bağlamında çağdaş bir önem taşıyan virüsleri, bakterileri ve diğer mikropları hedef alan yüzey ve cilt dezenfeksiyonu için küresel ölçekte kullanılmaktadır (Lyod ve diğ. 2003).

Klor gazı sudan geçirildiğinde suyla reaksiyona girer ve hipokloröz aside dönüşür. Tıpta hipokloröz asidin sodyum tuzuyla olan sodyum hipoklorid solüsyonları kullanılır. Hipokloröz asit, bilinen tüm mikroorganizmalara (virüs, bakteri ve mantarlara) karşı 1 dakikadan kısa sürede etkilidir. Hipokloröz asit ile yapılan yara iyileşmesi çalışmalarında, çözeltinin yara iyileşmesine olan etkisi, mikroorganizmaları öldürme hızı, biyofilm oluşumu üzerinde etkisi incelenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Günümüzde hipokloröz asit etkenli antiseptik ve dezenfektanlar FDA onaylı olarak insan ve hayvan sağlığında kullanılmaktadır.

Yara bakımında kullanılan yaygın solüsyonlardan biri %0.09'luk Sodyum hipokloröz solüsyonudur. İzotonik ekstraselüler dehidratasyon, sodyum kayıpları tedavisi ve parenteral uygulamalarda geçimli olduğu ilaçların seyreltici çözeltisi olarak kullanılır. İzotonik sodyum klorid jelleri yara yatağını nemlendirmek için kullanılır.

Çinko, insan vücudu için bir eser element olup, antioksidanlara karşı önemli bir savunma mekanizması olan süperoksit dismutaz enziminin kofaktörüdür. Çinko eksikliği olan canlılarda, Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesinin azalmasına bağlı olarak çeşitli hastalıklar bildirilmiştir.

Çinko, temel bir beslenme gereksinimidir ve karbonik anhidraz, alkalın fosfatlar, laktik dehidrojenaz ve hem RNA hem de DNA polimeraz dahil olmak üzere 70'den fazla farklı enzim için bir kofaktör görevi görür. Çinko, yara iyileşmesini kolaylaştırır, normal büyüme oranlarının, normal cilt neminin ve tat ve koku alma duyusunun korunmasına yardımcı olur.

Çinko, kas, kemik, deri, böbrek, karaciğer, pankreas, retina, prostatta ve özellikle kırmızı ve beyaz kan hücrelerinde bulunur. Çinko, plazma albümini, α 2-makroglobulin ve histidin, sistein, treonin, lizin ve asparagin dahil olmak üzere bazı plazma amino asitlerine bağlanır. Yutulan Çinko, esas olarak dışkı ile (yaklaşık % 90) ve daha az oranda idrar ve terle atılır.

Çinko tereyağı olarak da bilinen çinko (II) klorür, suda çok çözünen ve çoğunlukla katalizör olarak ve dezenfektan olarak organik sentezde kullanılan inorganik bir tuzdur. Tekstil materyallerine antimikrobiyal özellik kazandırmak için kullanılan antimikrobiyal maddelerden biri çinkodur.

Reçetesiz satılabilen bazı merhemlerin bileşiminde bulunur ve ince bir tabaka halinde uygulandığında cildin su kaybetmesini önler. Yazın güneş, kışın da soğuk yanıklarına karşı koruyucudur. Bebeklerin bez bağlanan bölgelerinde çok az miktarda kullanılarak ciltte meydana gelebilecek kızarıklıklar önenebilir. Yaşa bağlı göz hastalıklarının tedavisinde, deodorantlarda ve ahşap koruyucu olarak kullanılır. Çinko klorür bazı cilt kanserleri tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır.

Yara iyileşmesi keratinositler, fibroblastlar ve inflamatuvar hücreler gibi birçok hücrenin uyarılması ile başlayan ve yara bölgesine migrasyonu ile devam eden çok evreli bir süreçtir. Yangının başladığı ilk süreçte yara bölgesine öncelikle nötrofiller gelir. Makrofajlar ise nötrofillerden sonra erken dönemde kolonize olarak diğer hücre tiplerinin aktivasyonunu organize ederler. Mast hücreleri ile ve T hücre alt grupları da yara iyileşmesinin önemli hücreleri arasında yer alır (Tekin İ.Ö. 2015).

Yara bakımında uygulanan antimikrobiyal tedavide, mikroorganizmaların biyofilm oluşturması ve mikroorganizmaların direnci büyük bir zorluk oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturması yaradaki makrofajların ve nötrofillerin varlığını uzatmaktadır. Yara bölgesindeki makrofajların ve nötrofillerin varlığının uzaması normal yara iyileşmesini süresini de uzatır. Bu durumun doğuştan kazanılan immünolojik tepkilerin etkinliğini de azalttığı düşünülmektedir (Gold ve diğ. 2019).

HOCl'nın bakterilere, virüslere ve mantarlara karşı olan etkisi çalışmalarla desteklenmiştir. Yara tedavi öncesi ve sonrasında antiseptik ve anti-enflamatuar ajan olarak kullanılmaktadır. Günümüz tıp tedavilerinde önemli bir antiseptik olarak tercih edilebilecek ilk seçenekler arasında yer almaktadır (Tran ve diğ. 2020, Gold ve diğ. 2019).

Sağlıklı dokulardaki keratinosit ve fibroblastlara alkol ya da iyot içeren antiseptiklerin zarar vermektedir. Hipokloröz asit ise bu hücrelerin hasarlı bölgeye proliferasyonunu artırarak yara iyileşme sürecini hızlandırır. Bir dakikadan daha az bir sürede % 99,99 oranında antisepsi sağlar ve 2- 3 dakikada suya dönüşür. Bu özelliği ile dokuda kalıntı bırakmaz. Sistemik dolaşıma katılmaması nedeniyle tedavi süresince ihtiyaç duyulan preparatlarla birlikte kullanılması uygun hale gelmektedir. Hipokloröz asit aynı zamanda sistemik hiçbir ürün ile etkileşime girmez (Morris J. C 1966, Harris, Daniel C. 2009).

Kütöz doku onarımı, cildin bariyer fonksiyonunu geri kazanmayı amaçlar. Bunu başarmak için, yara yerinin yeni bağ dokusu oluşturmak için granülasyon dokusu ile değiştirilmesi gerekir ve fiziksel bariyeri restore etmek için epitelyal yara kapanması gerekir. Epitel yara kapanması sağlandıktan sonra granülasyon dokusu birikimine ve skar yeniden şekillenmesine yol açan inflamasyonun baskın olduğu erken bir faz ile başlayan farklı yara iyileşme fazları tanınır. Granülasyon dokusunda, mezankimal hücreler maksimum derecede aktive edilir, hücreler çoğalır ve büyük miktarda hücre dışı matris sentezler. Epitel hücreleri ayrıca altta yatan granülasyon dokusunun geçici matrisi üzerinde çoğalır ve göç eder ve sonunda yara yeri kapanır (Eming S.A. ve diğ. 2014, Reed B.R. ve diğ. 1985, Brem H. ve diğ. 2007). Fibroblastlar, önce trombositler tarafından ve ardından makrofajlar tarafından salınan çeşitli çözünür mediatörlere yanıt olarak yara yerine göç ederler. Extrsellüler matrix (ECM)'deki fibroblastların göçü, kollajenler, fibrin ve fibronektin gibi ECM bileşenleri ile etkileşimleri ile düzenlenir. Düzenli dermisteki fibroblastlar genellikle sessiz ve sporadik olarak dağılırken, yara yerinin geçici matrisinde ve granülasyon dokusunda orta derecede aktif ve bol miktarda bulunurlar (Gould L. Ve diğ 2015, Siedel H. ve diğ 1985). Kan damarlarının yaralanması hızlı bir hemostatik yanıt ve enflamatuar aşamaya geçişlere neden olur. TGF- β 1 ve PDGF gibi inflamatuvar sitokinler, fibroblast proliferasyonunu ve yara bölgesine göçü teşvik eder ve fibroblastları miyofibroblastlara dönüştüren fenotipik modifikasyonları teşvik eder. Ayrıca, yara bölgesindeki göçleri ve genişlemeleri, onları ECM'den yara bölgesine geçişleri için bir yol açmak üzere proteazlar üretmeye ve serbest bırakmaya zorlar.

Fibroblastlar tarafından salınan enzimler, kollajenazlar (MMP-1), jelatinazlar (jelatin substratlarını bozan MMP-2 ve MMP-9) ve stromelizin (ECM'de çoklu protein substratlarına sahip MMP-3) olarak sınıflandırılabilen Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler) içerir (Cui N. Ve diğ 2017). Yukarıda bahsedildiği gibi yara iyileşmesinde hem keratinositler hem de fibroblastlar etkilidirler.

Bizim çalışmamızda iki farklı kaynaktan elde edilen Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipokloröz tuzları kullanıldı. Bu tuzlar yara iyileşmesi deneylerinde hem keratinosit hücre hattında hem fibroblast hücre hattında etkili oldular. Werner ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada keratinosit ve fibroblast etkileşimini in vitro olarak HaCaT ve fibroblast kültürlerinde incelemişlerdir. Çalışmada yaralanma sonrası erken evrelerde, keratinosit kaynaklı IL-1 gibi proinflatuar mediatörler, keratinosit-fibroblast etkileşimlerini düzenlediği ve keratinosit-fibroblast kokültürlerinde TGF-b aktivitesinin güçlü bir şekilde up regüle olduğu gösterilmiştir. Ayrıca keratinosit büyüme faktörü (KGF), IL-6, endotelin-1 (ET-1), heparin bağlayıcı EGF ve GMCSF genleri gibi IL-1-duyarlı genlerin fibroblastlarda up regüle olduğu ve bu faktörlerin daha sonra keratinosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarabildiği ifade edilmiştir. Epidermisin bazal membranını bileşenleri hem keratinositler hem de daha az ölçüde fibroblastlar tarafından eksprese edilir. Araştırmacılar Keratinosit-fibroblast etkileşimlerinin orta evresinde, keratinosit kaynaklı IL-1 ve TGF-b etkilerinin dengesi değişmeye başladığını bunu sonucunda da fibroblastların bazal membran bileşenlerinin sentezini arttırmaya başladığını belirtmişlerdir. Yara iyileşmesi sürecinin son aşamasında bazal membran bileşenlerinin fibroblastlarda güçlü bir şekilde eksprese edildiği ortaya konmuştur (Werner S. Ve diğ 2007). Bu çalışma bize yara iyileşmesinde her iki doku grubunun da gerekli olduğunu etkileşim halinde olduklarını gösterdi. Biz çalışmamızda ko-kültür yapmadık.

Bunun yanı sıra Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipokloröz tuzlarından Çinko Hipokloröz tuzunun kontrol grubuna göre keratinosit hücrelerinde daha etkili olduğu gözlemlendi.

Apoptotik hücreler organizmanın bazı doku ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmakta ve bu süreç ömür boyu devam etmektedir. Organizmadaki hücrelerin ölüm ve yapımındaki dinamik dengeyi korumak, homeostazisini oluşturma önem teşkil etmektedir. Bu dengenin apoptoz lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın da ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır. Bu durumlar organizma için oldukça büyük bir tehlike yaratma kapasitesine sahiptir (Kerr ve diğ. 1972 ve McIlwain ve diğ. 2013).

Apoptozise gidemeyen ya da genetik olarak değişmiş hücreler, ilerleyen süreçte kanser gelişimine neden olabilirler (Li J, Yuan J 2008).

HOCl oksidatif stres, kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptozu indükler. Patofizyolojik olarak HOCl'ün hücre kültürleri ile ilgili çoğu çalışmada, apoptoz esas olarak kaspaz-3'ün aktivasyonundan bağımsız yollarla veya kaspaz-3'ün dolaylı aktivasyonu yoluyla ele alınmaktadır.

HOCl aracılı apoptozun esas olarak süperoksit anyonu, hidroksil radikal, singlet oksijen, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, nükleer faktör kappa B (NF-kappaB), p53 ve kaspaz-3 aktivasyonu oluşumu yoluyla apoptozu teşvik eden diğer ROS'ların uygulanan konsantrasyonlarına, maruz kalma süresine ve indüksiyonuna bağlıdır (Whiteman, ve diğ. 2007).

Çoğu durumda kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşmesine karşın bazı durumlarda HOCl ve ilgili hipohalöz asitler kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe edebilmektedir (Bauer 2013). HOCl, klorürün (Cl^-) iki elektronlu oksidasyonunu katalize etmek için solunum patlaması sırasında hidrojen peroksit kullanan nötrofil kaynaklı bir peroksidaz (MPO) olan miyeloperoksidaz (MPO) tarafından enzimatik olarak üretilir (Podrez ve diğ. 2000).

HOCl, birçok biyolojik moleküle reaksiyona girme ve daha sonra çift sarmallı DNA denatürasyonuna neden olan lipid peroksidasyonuna ve tirozin klorlamasına yol açma yeteneğine sahiptir (Yap ve diğ. 2010).

HOCl, ek hücrel hasara neden olan daha fazla ROS ve serbest radikaller üretmek için diğer oksidanlarla reaksiyona girme yeteneğine sahiptir; örneğin, hidroksil radikali üretmek için süperoksit ile reaksiyona girer. Ek olarak, bir alkali çözeltinin varlığında, eşlenik tabanı, singlet oksijen türlerini oluşturmak için H_2O_2 ile reaksiyona girer. İnsan sıvısında HOCl kararsız ve reaktif olduğu için doğrudan ölçümü yapılmamıştır.

Normal koşullar altında güçlü bir oksidan olan HOCl, antimikrobiyal bir ajan olarak işlev görür. Tersine, hastalık durumlarında, HOCl, patojenleri ortadan kaldırmak için kullanılan benzer bir eylemle konakçı dokuya zarar verebilir. Bu mekanizma kanser, glomerülonefrit, akut vaskülit, diyabet, kronik böbrek hastalığı, romatoid artrit, solunum

sıkıntısı, ateroskleroz ve birçok inflamatuvar hastalık gibi birçok patolojik durumlarda gerçekleşmektedir (Malech ve diğ. 1987).

2020 yılında Jeelani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HOCl konsantrasyonunun ve maruz kalma süresinin apoptozsin uyarımında etkili parametreler olduğu bildirilmiştir. Fare oositleri ile yaptıkları çalışmada düşük konsantrasyonun kaspaz3 oluşumunu engellediğini göstermişlerdir (Jeelani ve diğ. 2020).

Bizim çalışmamızda HOCl farklı dozlarda ve sürelerde kullanılmamıştır. XTT ve MTT sonuçlarına göre uygulanan fizyolojik dozlarda keratinosit hücrelerine uygulanan tuzlardan Sodyum Hipoklorözün en düşük apoptotik indekse sahip olduğu fibroblast kültürlerinde değişiklik izlenmemiştir. Bu sonuçlarda aslında HOCl'nin apoptozis ve proliferasyon dengesinde dozun önemini göstermektedir.

7.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sodyum hipokloröz ve Çinko hipoklorözün keratinosit hücre hatlarında koloni oluşumlarını artırmaya yönelik etkisi olmuş, fibroblast hücre hatlarında koloni oluşumu gözlenmemiştir.

Migrasyon deneyinde HacaT hücre hattında hücre çoğalmasının olmadığı izlenmiştir. Sodyum ve Çinko hipokloröz çözeltisinin L929 hücre hattı üzerinde yara alanı kapattığı gözlenmiştir. Aynı etki keratinosit hücre hattında tespit edilmemiştir. Sodyum Hipokloröz çözeltisinin keratinosit hücre hattında apoptozisi kontrol grubuna göre oldukça düşürdüğü saptanmıştır. Sodyum Hipokloröz ve Çinko Hipokloröz çözeltileri fibroblast hücrelerinde apoptozise etki etmemiştir.

Bu kapsamda yapılan çalışmamızdan çıkarımlar şu şekilde özetlenebilecektir; HOCl tuzları hem kanser dokularında hem de yaralanmalarında kullanılan moleküllerdir. Bu çözeltilerin işlevlerinin daha ileri düzeyde araştırılmasında moleküler yaklaşımların oluşturulmasına gereksinim vardır. Sadece yaralanmalar değil aynı zamanda kokültür ortamında üretilen fibroblast ve keratinosit hücreleri ve kan hücreleri ile yapılacak araştırmaların kanser dokuları için tedavi açısından değerlendirilmelidir. Hipokloröz asitin mikroorganizmalar üzerindeki etkisi göz önüne alınarak, deri ve bağ doku hücrelerinde yapılacak araştırmalar ile yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için fayda sağlayacaktır. Sonuçların biyomedikal mühendisliği ile ürün yönelimine yönelik geliştirilmesi, tedaviler açısından yeni ve etkili tıbbi ürünlerin sunulmasına katkı sağlayacaktır. Yaralanmalarda çevreye zararsız, kalıntısı az, çabuk etki eden ve eldesi kolay ürünler arayışında HOCl öne geçmektedir. Ekonomik açıdan da eldesi diğer preparatlara kıyasla daha kolaydır.

Bundan sonraki çalışmalarda moleküler etkiler, farklı dokular üzerine etkiler ve dokuların beraber hazırlandığı ortamda meydana gelen değişimler gözlemlenmelidir.

8.KAYNAKLAR

Aktaş, Abit, and Suzan Dağlıoğlu. "Yerli Koyun Irklarında Derinin Fötal Dönemdeki Yapısal Özelliklerinin Histolojik Yöntemlerle İncelenmesi." *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15.3 391-396, (2009).

Anagnostopoulos AG, Rong A, Miller D, Tran AQ, Head T, Lee MC, Lee www.Anagnostopoulos AG, et al.0.01% HypochlorousAcid as an Alternative Skin Antiseptic: An In Vitro Comparison. *DermatolSurg.* Dec;44(12):1489-1493, (2018).

Babior, BM Fagositlerin solunum patlaması. *Klinik Araştırma Dergisi*, 73 (3), 599-601, (1984).

Bauer, Georg. "HOCl'ye bağımlı singlet oksijen ve hidroksil radikal üretimi, malign hücrelerin apoptozunu modüle eder ve indükler." *Antikanser aAştırması* 33.9 3589-3602, (2013).

Boyce, Steven T. "Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes." *Burns* 27.5: 523-533, (2001).

Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.*;117:1219–1222 (2007).

Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl* 147, 1–73, (2017).

Orgill, D., Blanco, D.C. *Biomaterials for treating skin loss*: CRC; (2009).

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 6:265sr266 (2014).

Foote, Christopher S., Thomas E. Goyne, and Robert I. Lehrer. "Assessment of chlorination by human neutrophils." *Nature* 301.5902: 715-716, (1983).

Fukuzaki, Satoshi. "Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes." *Biocontrol science* 11.4: 147-157, (2006).

Gould L, Abadir P, Brem H, et al. Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. *Wound Repair Regen.*;23:1–13 (2015)

Güngör, Nejla, et al. "Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid." *Mutagenesis* 25.2: 149-154, (2010).

Hoekstra, M. J., Westgate, S. J., & Mueller, S. Povidone-iodine ointment demonstrates in vitro efficacy against biofilm formation. *International wound journal*, 14(1), 172-179, (2017).

Jeelani, Roohi, et al. "Hypochlorous acid reversibly inhibits caspase-3: A potential regulator of apoptosis." *Free Radical Research* 54.1: 43-56, (2020).

Kaluç, Nur, and Pinar B. Thomas. "Hypochlorous Acid Induces Caspase Dependent Apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biosciences and Medicines* 9.4: 42-53, (2021).

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon on with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-257, (1972).

Khan, Muhammad N., and Abul H. Naqvi. "Antiseptics, iodine, povidone iodine and traumatic wound cleansing." *Journal of tissue viability* 16.4: 6-10, (2006).

Li, J., & Yuan, J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194-6206, (2008).

Lloyd, M. M., Grima, M. A., Rayner, B. S., Hadfield, K. A., Davies, M. J., & Hawkins, C. L. Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 1352-1362, (2013).

Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med.*;317(11):687–694, (1987).

Morris, J. Carrell. "The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35." *The Journal of Physical Chemistry* 70.12 3798-3805, (1966).

Odobasic, D., Kitching, A. R., & Holdsworth, S. R. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: the role of myeloperoxidase. *Journal of immunology research*, (2016).

Pattison, D. I., Hawkins, C. L., & Davies, M. J. What are the plasma targets of the oxidant hypochlorous acid? A kinetic modeling approach. *Chemical research in toxicology*, 22(5), 807-817, (2009).

Podrez, Eugene A., Husam M. Abu-Soud, and Stanley L. Hazen. "Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis." *Free Radical Biology and Medicine* 28.12: 1717-1725, (2000).

Reed BR, Clark RA. Cutaneous tissue repair: practical implications of current knowledge. *II. J Am Acad Dermatol.*;13:919–941 (1985).

Robaszkiewicz, A., Pogorzelska, M., Bartosz, G., & Soszyński, M. Chloric acid (I) affects antioxidant defense of lung epithelial cells. *Toxicology in vitro*, 25(7), 1328-1334, (2011).

Romanowski, Eric G., et al. "In vitro evaluation of a hypochlorous acid hygiene solution on established biofilms." *Eye & contact lens* 44.Suppl 2 S187, (2018).

Sakarya, S., Gunay, N., Karakulak, M., Ozturk, B., & Ertugrul, B. Hypochlorous acid: an ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm, and wound healing potency. *Wounds*, 26(12), 342-350, (2014).

Shevchenko, Rostislav V., Stuart L. James, and S. Elizabeth James. "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction." *Journal of the royal Society Interface* 7.43 229-258, (2010).

Shi, D., Chen, S., Dong, B., Zhang, Y., Sheng, C., James, T. D., & Guo, Y. Evaluation of HOCl-generating anticancer agents by an ultrasensitive dual-mode fluorescent probe. *Chemical science*, 10(13), 3715-3722, (2019).

Seidel, H.; Richter, J.; Kurerov, N.N.; Schajpak, E.J.; Bluthner, R.; Erdmann, U.; Hinz, B. Psychophysical assessment of sinusoidal whole-body vibration in z-axis between 0.6 and 5 Hz combined with different noise levels. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 61, 413–422 (1989)

Tobin, Desmond J. "Biochemistry of human skin—our brain on the outside." *Chemical Society Reviews* 35.1: 52-67, (2006).

Tran, A. Q., Topilow, N., Rong, A., Persad, P. J., Lee, M. C., Lee, J. H. and Lee, W. W., "Comparison of skin antiseptic agents and the role of 0.01% hypochlorous acid", *Aesthetic Surgery Journal*, 41(10), 1170–1175, (2020).

Xu, S., Cheng, F., Liang, J., Wu, W., & Zhang, J. Maternal xNorrin , a canonical Wnt signaling agonist and TGF- β antagonist, controls early neuroectoderm specification in *Xenopus*. *PLoS biology*, 10(3), e1001286, (2012).

Werner S, Kreg T, Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing *Journal of Investigative Dermatology* 127, 998–1008 (2007) .

Whiteman M, Rose P, Siau JL, et al. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med.* 38(12):1571–1584, (2005).

Zeren, Müşra. "İnsan Dermal Fibroblast ve Keratinositlerini İçeren Kitosan-Jelatin Fibrin Yapıcı Esaslı İki Tabakalı Yapay Deri Sisteminin Geliştirilmesi." (2014).