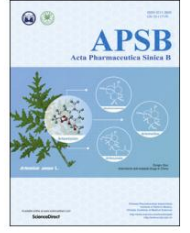




Çin Eczacı lar Birliğ i

Materia Medica Enstitü sü , Çin Tı p Bilimleri Akademisi

Acta Pharmaceutica Sinica B

www.elsevier.com/locate/apsb
www.sciencedirect.com


ORİ Jİ NAL MAKALE

Sodyum humat, sı çanlarda TGF- β /Smads sinyal yolunu aktive ederek kutanöz yara iyileş mesini hızlandı rır



Yuanyuan Jia^a, Aijun Zhang^{b,n}, Xiao Bin Chen^b, Xiaoxia Che^b, Kai Zhou^b, Zhidong Wang^{c,n}

^aBilimsel Araş tırma Merkezi, Xi'an Jiaotong Üniversitesi İkinci Bağ lı Hastanesi, Xi'an 710004, Çin

^bXi'an Jiaotong Üniversitesi İkinci Bağ lı Hastanesi Eczacı lı k Bölü mü , Xi'an 710004, Çin

^cXi'an Jiaotong Üniversitesi İkinci Bağ lı Hastanesi VIP Genel Cerrahi Bölü mü , Xi'an 710004, Çin

18 Ağ ustos 2015 tarihinde alı ndı ; revize edilmiş ş ekleyle 3 Kası m 2015'te alı ndı ; 17 Kası m 2015'te kabul edildi

ANAHTAR KELİ MELER

sodyum humat;
Yara iyileş mesi;
Dönü ş tü rü cü bü yü me faktörü - β ;
kü çü k;
Fare

Özet Sodyum humat (HA-Na), halk hekimliğ inde yara iyileş tirici ve iltihap önleyici bir madde olarak topikal olarak kullanı lmaktadır. Bu çalı ş mada, HA-Na, Sprague-Dawley sı çanları nda kutanöz yara iyileş mesi için araş tır ıldı . HA-Na solü syonu (%1.0, w/v) eksizyon yarası modellerinden geçen sı çanlara topikal olarak uygulandı . İ yileş me, pozitif kontrol olarak harici kullanı m için bir rekombinant sı ğ ı r temel fibroblast bü yü me faktörü ile değ erlendirildi. Yara iyileş me oranları , yaranın sonras ı 3., 6., 9., 14. ve 21. Gü nlerde hesaplandı ve histolojik analiz için aynı aralı klarla dokular da toplandı . Ayrıca doku hidroksiprolin seviyeleri değ ü ldü . Ayrıca dönü ş tü rü cü bü yü me faktörü - β 1, 2, 3'ü n (TGF- β 1, 2, 3) mRNA seviyeleri ve protein ifadeleri RT-PCR ve western blot ile belirlendi. Smad-2, -3, -4 ve -7'nin protein ekspresyon seviyeleri de western blot ile tespit edildi. Çalı ş mamız, HA-Na'nı n, hızlandı rı lması ş yara kası lması ve artan hidroksiprolin içeriğ i yoluyla sı çanlarda yara iyileş mesini destekleme kapasitesine sahip olduğ unu göstermektedir. Daha da önemlisi, HA-Na'nı n bu yara iyileş tirici etkilerine TGF- β /Smad sinyal yolu aracılı ğ ı yla aracılı k edilebilir. HA-Na geliş miş yara iyileş mesi için etkili bir ajan olabilir.

© 2016 Çin Eczacı lar Birliğ i ve Materia Medica Enstitü sü , Çin Tı p Bilimleri Akademisi. Üretim ve barı ndı rma Elsevier BV taraf ından yapı lmı ş tır. Bu, CC BY-NC-ND lisansı (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) kapsamında nda ağ k eriş imli bir makedir .

ⁿSorumlu yazarlar.

E-posta adresleri: zhangaj2005@163.com (Aijun Zhang), xawzd@163.com (Zhidong Wang).

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences ve Chinese Pharmaceutical Association sorumluluğ unda emsal değ erlendirmesi.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.01.009> 2211-3835

© 2016 Çin Eczacı lar Birliğ i ve Materia Medica Enstitü sü , Çin Tı p Bilimleri Akademisi. Üretim ve barı ndı rma Elsevier BV taraf ından yapı lmı ş tır. Bu, CC BY-NC-ND lisansı (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) kapsamında nda ağ k eriş imli bir makedir .

1. Giriş

Son birkaç yı lda, doğ al ü rü nlerin tı bbi özelliklerine iliş kin araş tı rmalar önemli ölçü de arttı ve çok sayı da kanı t, turba ve sarpolden elde edilen ekstraktları n, tı bbi özelliklere sahip yeni bileş iklerin kaynağı nı temsil edebileceğ ini öne sü rü yor1-4 . Humik maddeler geleneksel olarak halk tı bbı nda kolit ve Alzheimer hastalı ğ ı dahil olmak ü zere çeş itli bozuklukları n tedavisi için kullanı lmı ş tı r5,6 Hü mik asit, kimyasal ve/veya biyokimyasal kaynaklı ve tı bbi özelliklere daha ziyade karboksil ve fenolat grupları içeren birçok farklı asidin karmaş ı k bir karı ş ı mı dı r. Hü mik asit, geleneksel Çin tı bbı nda (TCM) kullanı lmı ş tı r ve çeş itli farmakolojik özelliklere sahiptir. Sodyum humat (HA-Na), hü mik asit tuzudur ve birçok ü lkede yü zyı llardır geleneksel tı p sistemlerinin bir parçası olarak terapötik olarak kullanı lmaktadır .

Özellikle HA-Na, Çin'de binlerce yı ldır tı bbi uygulamada geleneksel olarak uygulanmaktadır . Gü ßü bir anti inflamatuvar, anti-mikrobiyal, anti-virüs, anti-tümör ve anti-ülser ilacı olan HA-Na, bağ ı ş ı klı k dü zenleme, endokrin dü zenleme ve diğ er hastalı kları n tedavisi için kullanı lmı ş tı r .

Yara iyileş mesi, enflamasyonun farklı aş amaları nı , yeni doku oluş umunu ve yeniden ş ekillenmeyi içeren karmaş ı k bir sü recir7 . Bu fazlar farklı değ ildir, ancak sü rekli bir yara iyileş me sü reci oluş turur. Yara iyileş mesi, hasarlı dokuyu yeniden yapı landı rmayı amaçlayan yaralanmaya bir yanı ttı r ve bağ dokusu onarı mı , yeniden epitelizasyon ve anjiyogenezin8 hassas koordinasyonunu gerektirir . Birçok geliş miş ü lkede, yara iyileş mesi için çeş itli büyü me faktörleri kullanı lmı ş tı r. Ş u anda hastalar ü çbü büyü me faktörü ile tedavi edilmektedir: trombosit kaynaklı büyü me faktörü -BB (PDGF-BB), temel fibroblast büyü me faktörü (bFGF) ve granü losit-makrofaq koloni uyarı cı faktör (GM-CSF), ancak bunun maliyeti gelişmekte olan ü lkelerde terapi yü ksek tir9 Yarı k travması ve yaraları , gelişmekte olan ü lkelerde hala önemli bir sorun olarak kabul edilir. ü ksek tedavi maliyetleri içerir. TCM'nin yanı kları n ve yaraları n tedavisinde kullanı lması , mali yü kü azaltmanı n yanı sıra iyileş meyi iyileş tirmek için önemli bir maddur. Çin'de birçok bitki ve ş ifalı bitki, cilt bozuklukları nı ve yara yaralanmaları nı tedavi etmek için geleneksel ilaç olarak deneysel olarak kullanı lmı ş tı r. ı llardır birçok Çin hastanesinde travmanı n benzersiz ilaç tedavisi. Bununla birlikte, ş u anda, HA-Na'nı n yara iyileş mesi ü zerindeki etkisine iliş kin kontrollü çalı ş malar eksiktir.

HA-Na'nı n yara iyileş tirme aktivitesi, geleneksel kullanı mı nı mantıklı hale getirmek için etkililiğ i ve olası etki mekanizmaları nı araş tı rmak ü zere ş u anda farelerde belirlenmiş tir.

2. Malzemeler ve yöntemler

2.1. İ laçlar ve reaktifler

HA-Na örneğ i, Çin Bilimler Akademisi (Taiyuan, Çin) Kömür Kimyası Enstitü sü 'nden satın alı nmı ş tı r. HA-Na'nı n bileş enleri %14,22 su (hava kurusu bazda), %23,34 yakı cı kalı ntı (kuru baz), %73,33 hü mik asit (kuru baz) ve %4,48 suda çözü nü r maddelerden (kuru baz) oluş maktadır . ü rü n. Harici kullanı m için rekombinant sı ğ ı r temel fibroblast büyü me faktörü (rb-bFGF), Zhuhai YiSheng biyolojik ilaç Co., Ltd.'den (Zhuhai, Çin) satın alı ndı . Hydroxyprohattı saptama kiti (alkali hidroliz yöntemi) ş u adresten satın alı nmı ş tı r:

Nanjing Jiancheng Biyomü hendislik Enstitü sü (Nanjing, Çin). Jel hazı rlama kiti (Tris-HCl, SDS, TEMED, AP), fenilmetan sü lfonil florü r, glisin, nitroselü loz membran, birincil/ikincil antikolar ve western blot ECL kromojenik tespit kiti Wuhan boster biyolojik mü hendislik Co., Ltd.'den (Wuhan) satın alı nmı ş tı r. , Çin). CD31 birincil antikoru, Bioss biyolojik mü hendislik Co., Ltd.'den (Pekin, Çin) temin edilmiş tir. Biotin streptavidin HRP saptama sistemleri, ZSGB biological Engineering Co., Ltd.'den (Pekin, Çin) satın alı ndı . Diğ er tüm kimyasallar ve reaktifler analitik saflı ktaydı .

2.2. deney hayvanları

Erkek Sprague-Dawley fareleri (SPF, ağ ı rlı k 200-250 g), Xi'an Jiaotong Üniversitesi Tı p Fakü ltesi (Xi'an, Çin) Deneysel Hayvan Merkezinden satın alı ndı . Hayvanlar kontrollü koş ullar altında barı ndı rıldı (12 saat/12 saat aydı nlı k/karanlı k döngü sü , 22-28°C ve %60-70 hava nemi), normal fare yemi ve istenildiğ i kadar su ile beslendi. Tüm hayvanlar,

İ lk tedaviden en az 3 gü n önce. Sı çanlara, deneysel yaraları n aç ılması ndan önce ve sı rası nda anestezi uygulandı . Cerrahi giriş imler %10 kloral hidrat anestezi (300 mg/kg, ip) kullanı larak steril koş ullarda gerçekleştirildi. Bu çalı ş mada gerçekleştirilen tüm deneysel prosedürler, Xi'an Jiaotong Üniversitesi Tı p Fakü ltesi Etik Kurulu tarafı ndan onaylandı ve ABD Laboratuvar Hayvanları nı n Bakı mı ve Kullanı mı Yönergelerine (NIH yayı nı #85-23, revize edildi. 1985).

2.3. Yara oluş umu ve tedavisi

Sı çanlar deneyden önce tartı ldı ve deney yaraları nı n aç ılması ndan önce ve sı rası nda anestezi uygulandı . Sı çanlara, Arunachalam ve ark.14 ve Ganeshkumar ve ark.15 tarafı ndan tarif edildiğ i gibi ekizyon yaraları verildi . Kı saca, sı çanlara anestezi uygulandı , hayvanı n sı rt kü rkü elektrikli bir makasla tı raş edildi ve oluş turulacak yarayı n alanı , dairesel paslanmaz çelik bir ş ablon kullanı larak metilen mavisi ile hayvanları n sı rtı nda çizildi. Yarayı n derinliğ i, yarayı n kenarı na dik olarak dizildiğ inden emin olarak yaraya esnek bir cihaz sokularak belirlendi. 500 mm2 ve 2 mm derinliğ inde ekizyon yarası nı n tam kalı nlı ğ ı , diş li forseps, cerrahi bı çak ve sivri uçlu makas kullanı larak iş aretler boyunca oluş turuldu. Sı çanlar rastgele 3 gruba ayrı ldı . Grup 1, kontrol grubu olarak tedavi edilmedi; grup 2, 0,5 mL/cm2 rb-bFGF (4200 IU/mL) ile tedavi edildi ve referans standart olarak kullanı ldı (pozitif kontrol); grup 3, topikal olarak eş it miktarda %1.0 (a/h) HA-Na solü syonu ile tedavi edildi. HA-Na veya rb-bFGF uygulaması ndan önce tüm gruplar için gü nlü k olarak standart yara temizliğ i yapı ldı . HA-Na veya rb-bFGF, 14 gü n boyunca gü nde iki kez topikal olarak uygulandı . Epitelizasyonun, herhangi bir artı k ham yara bı rakmadan eskar dü ş tü ğ ü nde meydana geldiğ i kabul edildi. Enfeksiyon belirtileri gösteren herhangi bir sı çan dı ş landı ve %10 kloral hidrat doz aş ı mı ile öldü rü ldü .

Yara kapanma oranı , ş effaf kağ ı t ve kalı cı bir iş aretleyici ile yarayı n 3., 6., 9., 14. ve 21. Gü nlerde izlenmesiyle değ erlendirildi. Kaydedilen yara alanları bir grafik kağ ı dı 16kullanı larak ölçü ldü . Yara yatağ ı tamamen yeniden epitelize edildiğ inde ve yeni doku ile dolduğ unda yara kapanması için geçen sü re tanı mlandı . Yaralanma gü nü 0. Gü n olarak kabul edildi.

yara boyutundaki değ iş iklikler, orijinal yara boyutunun (0. Gü n) yü zde daralması olarak ifade edildi. Yara iyileş me hı zı aş ağ ı daki formü ile hesaplandı :

Yara kontraksiyon yü zdesi $\frac{A_0 - A_n}{A_0} \times 100$ δ1p

burada An, n. Gü ndeki yara alanı dı r ve A0, 017. Gü ndeki yara alanı dı r.

Histopatolojik çalı ş malar ve biyokimyasal analizler için yaralar, çevreleyen dokunun (altta yatan herhangi bir kas ve di ş doku hariç) ü niform bir çevresi ile birlikte, yaralanmayı takip eden 3, 6, 9, 14 ve 21. Gü nlerde toplandı . Hasat edilen dokunun bir kısı mı daha fazla analiz için hemen sı vı nitrojen içinde saklandı ve baş ka bir kısı mı histopatolojik çalı ş ma için %4 formaldehit içinde fikse edildi.

2.4. histopatolojik değ erlendirme

HA-Na solü syonu, rb bFGF ve iş lenmemiş kontrol ile tedaviden sonra yara bölgesinden alı nan dokular kurban edildikten sonra ç karı ldı ve %4 formaldehit içinde sabitlendi, bir dizi alkolle kurutuldu, ksilen içinde temizlendi ve parafin mumu içne gömü ldü . Yaralanma sonrası 6. ve 14. gü nlerde alı nan 5 mm kalı nlı ğ ı ndaki kesitler hematoksilin-eozin (HE) ve Masson trikrom (MT) ile boyandı ve i ş i k mikroskobu altı nda gözlemlendi ve fotoğ rafları çekildi. Ameliyat sonrası 6. ve 14. gü nlerde kontrol grubu, bFGF grubu ve %1.0 HA-Na grubunda CD31 için immü nohistokimyasal boyama yapı ldı . Endotel hü crelerinin görü ntü lerinde bulunan kahverengi noktalar pozitif boyanmayı gösterdi. Gözlem için altı rastgele, tekrarlanmayan alan seçildi (400). Yeni geliş en mikrodamarları n sayısı (kahverengi boyama), Image-Pro Plus 6.0 kullanı larak, 0,1885 mm²'lik her bir görü ş alanı alanı nı n 1 mm²'ye eş it olduğ u dönü ş ü me göre hesaplandı . Mikroydamar u (MVD)18 olarak ortalama 6 kopya kaydedildi18 .

2.5. hidroksiprolin testi

Doku hidroksiprolin seviyeleri, ü reticinin protokolü ne göre hidroksiprolin tespit kiti kullanı larak yaralanma sonrası 3., 6., 9., 14. ve 21. Gü nlerde ölçü ldü .

2.6. RNA ekstraksiyonu ve RT-PCR analizi

Yaralanmadan sonraki 6. ve 14. gü nlerde yaralı dokunun Tgf-β1, Tgf-β2 ve Tgf-β3 ekspresyon paternleri RT-PCR ile analiz edildi. Toplam RNA içeriğ i, ü reticinin talimatı na göre izole edildi (guanidin tiyosiyanat fenol, kloro form prosedü rü , toplam RNA izolasyon kiti, FSATGEN biyolojik teknoloji Co., Ltd., Ş angay, Çin). Ters transkripsiyon reaksiyonları , ü reticinin yönergeleri (Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit, Kanada) izlenerek bir GeneAmp PCR Sisteminde (Applied Biosystems, CA, ABD) gerçekleş tirildi.

Tgf-β1 (5'-CT GAACCAAGGAGACGGAATAC-3', R5'-AACCCAGGTCCTTCCTAAAGTC-3'), Tgf-β2 (5'-AGGCAGAGTTACGGTCTTT C-3', R5'-TGCTCTTATTTGGGATGATG-3'), için özel primerler oluş turuldu. Tgf-β3 (5'-GAAG` AGG GTGGAAGCCATTAG-3', R5'-GAGGACACATTGAAACG GAAA-3') ve Gapdh (5'-GCCTTCTCCATGGTGGTAA-3', R5'-GGTCGGTGTGTAACGGATTG-3') ve Sangon Bio tech Co. ., Ltd. (Ş anghay, Çin). İ lk denatü rasyon 94°C'de 3 dakika sü reyle gerçekleş tirildi; daha sonra 94 1C'de 30 s (denatü re etme), 53 1C'de Tgf-β1, Tgf-β2, Tgf-β3 ve Gapdh için 30 s (tavlama) ve 72 1C'de 1 dakika (uzatma) ve baş ka bir uzatma 72 1C'de 5 dakika sü reyle

gerçekleş tirillen. Amplifikasyondan sonra RT-PCR ü rü nleri, gethidium bromü r içeren %2 agaroz jel ü zerinde elektroforeze tabi tutuldu.

Görü ntü ler alı ndı ve Image-ProPlus Yazı lı mı ile donatı lmı ş Bio-Rad Gel Doc™ XR jel dokü mantasyon sistemi kullanı larak densitometrik analize tabi tutuldu. Değ erler, temizlik geni (Gapdh) için referans mRNA'nı n seviyesine göre hedef genin (Tgf-β1/Tgf-β2/Tgf-β3) bant yoğ unluğ u olarak ifade edildi.

mRNA seviyelerini incelemek için ü çbağ ı mısı z deney gerçekleş tirildi.

2.7. Western blot analizi

Hasat edilen yara dokuları , %1 Triton X-100, %1 deoksikolat, %0.1 SDS ve 1 mmol/L fenilmetilsü lfonil florü r (PMSF) içeren bir lizis tamponunda homojenleş tirildi. Homojenat 12,000 rpm'de 10 dakika 4 1C'de (Micro-21R, Thermo Scientific, ABD) santrifü jlendi. Protein konsantrasyonu NanoDrop1000 (ND-1000, NanoDrop, ABD) tarafı ndan tahmin edilmiş tir. %5 istifleme jel yuvaları na sahip %10 SDS-PAGE ü zerine eş it miktarda protein yü klendi ve 80 V'de 25 dakika ve ardı ndan 120 V'de 45 dakika elektroforezlendi; daha sonra, proteinler NC membranı ü zerine transblotlanmı ş tı r.

Bloklama solü syonu ile bloke edildikten sonra, membranlar gece boyunca TGF-β1, 2, 3, Smad-2, 3, 4, 7 ve β-aktin primer antikorları (1:400) ile inkü be edildi, ardı ndan sekonder antikorlarla 1 saat inkü basyon (1:5000) 37 1C'de sallanan çalkalay ı cı da (ZHWHY-100B, Shanghai zhicheng, Çin). İ stenen proteinler western blot ECL kromojenik tespit kiti ile tespit edildi. Bantları n optik yoğ unlukları tarandı ve Syngene Gene Tools (Syngene Corp., Cambridge, UK) ile ölçü ldü . Protein ifadesini incelemek için ü çbağ ı mısı z deney gerçekleş tirildi.

2.8. istatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama SEM olarak ifade edilir. Veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardı ndan Dunnett testi kullanı larak istatistiksel olarak analiz edildi. P-değ eri <0.05, kontrol grubuyla karşı laş tı rı ldı ğ ı nda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Sonuçlar

3.1. Yara kontraksiyonu ve epitelizasyon periyodu

Çalı ş ma boyunca tüm hayvan grupları nda yara temiz ve eksü dası z görü ndü . Tüm gruplarda yaralanma sonrası 3. Gü nden itibaren yara kenarları nda granü lasyon dokusu belirgindi. HA-Na solü syonunun topikal uygulaması ndan sonra yara kontraksiyonu ve epitelizasyon sü resinin sonuçları **Tablo 1** ve **Ş ekil 1'de rapor edilmiş tir.** %1,0 (a/h) HA-Na tedavisini takiben yara kontraksiyonu, İ lgili kontrol grubuyla karşı laş tı rı ldı ğ ı nda 6., 9. ve 14. gü n. %1.0 HA-Na çözeltisi ile tedavi edilen olgularda 14. gü nde epitelizasyon sü resi de daha yü ksekti.

3.2. histopatoloji

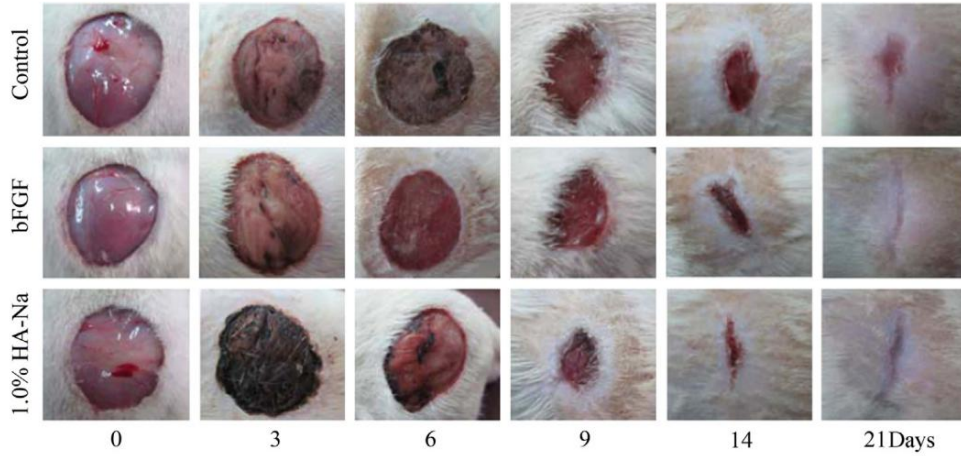
HA-Na solü syonu veya rb-bFGF ile tedaviyi takiben iyi organize yara iyileş me sü reğ eri gözlemlendi. Hematoksilin ve eozin lekeli bölü mlerde, %1,0 (w/v) HA-Na solü syon grubundan yaralar, kontrol tedavileriyle karşı laş tı rı ldı ğ ı nda, çevreleyen yoğ un ve kalı n mezenkimal matris birikimi ile daha fazla fibroblast, kollajen lifi ve sağ lam dermal kan damarı oluş umu gösterdi. . Dokuları n HA'dan görü nü mü

Tablo 1 HA-Na'nın topikal uygulamasının sı çanlarda eksizyon yara modelinin yara kontraksiyonu ve yeniden epitelizasyon süresi üzerindeki etkisi.

Gün	Kontrol grubu (%)	bFGF grubu (%)	%1,0 HA-Na grubu (%)
	10.4372.11	12.6771.53	14.2271.18
3	30.2272.98	34.2372.16	40.1673.22**
6	72.3372.40	75.4271.17	88.1171.68**
9	88.4173.24	95.3672.51**	98.7671.26**
14-21	100.17.1672.87	100.14.3371.03**	100.14.1671.47**

Değerler, her grupta ortalama \pm SEM, n=8'dir.

**Po0.01 ve kontrol grubu.



Şekil 1 Farklı eksizyon sonrası günlerde (3, 6, 9, 14 ve 21 gün) yara kontraksiyonunun fotoğrafik temsili, her grupta n=8.

Na tedavi grubu, yaralanmadan sonraki 6. ve 14. günlerde pozitif kontrol grubu ile oldukça benzerdi. Kontrol grubundaki yaralı dokularda zayıf kollajen lifleri ve epidermis mevcuttu. Yaralanmadan sonraki 6. günün histopatolojik kesitleri, HA-Na ve pozitif kontrol gruplarında yeni cilt kalınlaması, granülasyon dokusu hiperplazisi ve küçük kan damarları gösterdi. Kontrol grubundan alınan dokular, HA-Na grubuyla karşılaştırıldığında enflamasyon, ince deri ve önemli ölçüde daha az sayıda fibroblast gösterdi (Şekil 2A).

Histopatolojik kesitler, HA-Na ve pozitif kontrol gruplarında yaralanmadan sonraki 14. günde hizalamada yeni oluşan kollajen ile yalnızca birkaç fibroblast gösterdi. Hücre farklılaşması ve yara iyileşmesi de belirgindi. Kontrol yara dokusu, epidermal tabakayı oluşturan artan sayıda fibroblast ile az sayıda enflamatuar hücre gösterdi. Bu dokularda, yeni kollajen düzensiz görünüyordu. Masson'un trikrom boyaması, %1.0 HA-Na solüsyonu işleminde açık ve belirgin şekilde yüksek makrofaj ve fibroblast yoğunluğu gösterdi. Kontrol grubunda, kollajen demetlerinin düzensiz gevşek bir şekilde paketlenmiş tipte yaralar, fibroblastlarla yalnızca orta derecede hücreleşti (Şekil 2A).

Ameliyattan sonraki 6. ve 14. günlerde, CD31-pozitif ekspresyonu, HA-Na grubunda kontrol ve pozitif kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksekti. CD31-pozitif ekspresyon, iskele ve deri altı dokunun temas bölgesinde sınırlıydı. Ayrıca, her grupta 14 gün sonra, farklı seviyelerde epitelizasyon ortaya çıktı ve epidermisteki hücreler yüksek oranda küçüldü (Şekil 2A). HA-Na grubunda MVD, kontrol ve pozitif kontrol gruplarına göre 6. ve 14. günlerde daha yüksekti (Şekil 2B).

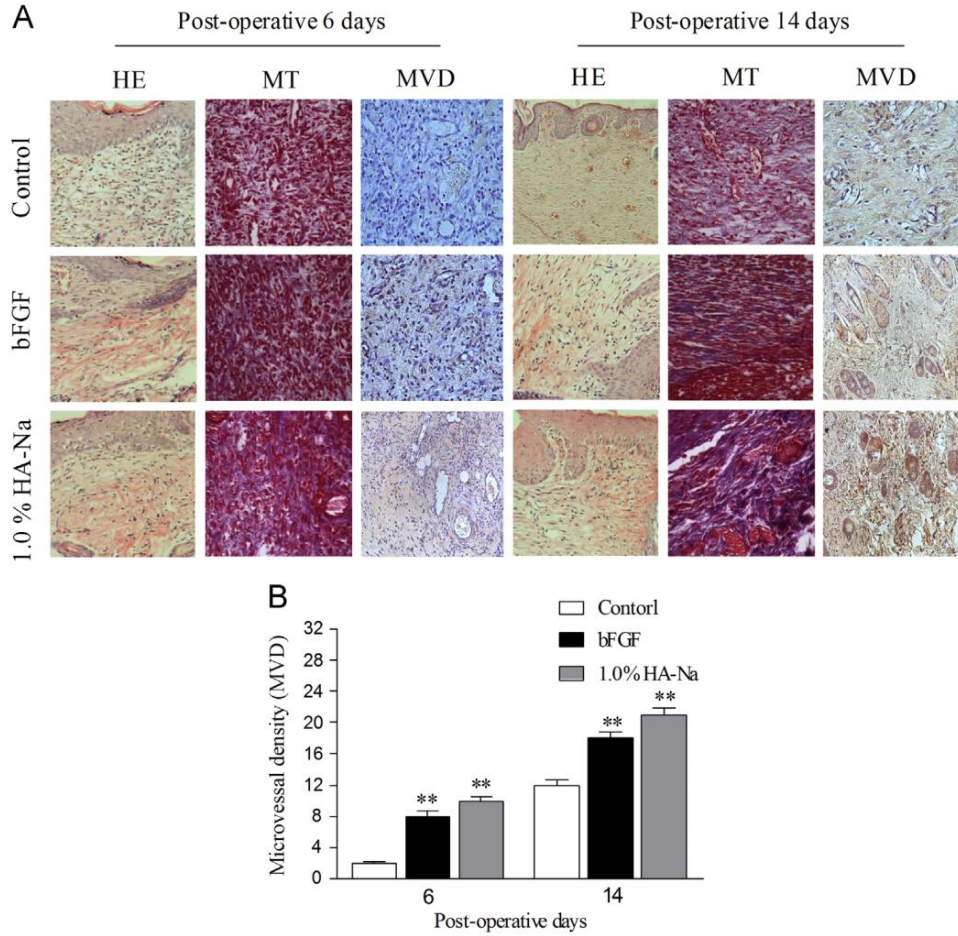
3.3. hidroksiprolin içeriği

Kollajen, yara granülasyon dokusunda bulunur ve yeni fibroblastlar tarafından üretilir [19,20]. Dokunun hidroksiprolin içeriği kollajen sentezini yansıtabilir. Hidroksiprolin içeriği, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında HA-Na ile muamele edilmiş grupta önemli ölçüde arttı. b-FGF ile tedavi edilen grubun hidroksiprolin içeriği, HA-Na grubu ile karşılaştırıldığında biraz artmış olması nedeniyle, seviye istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 3).

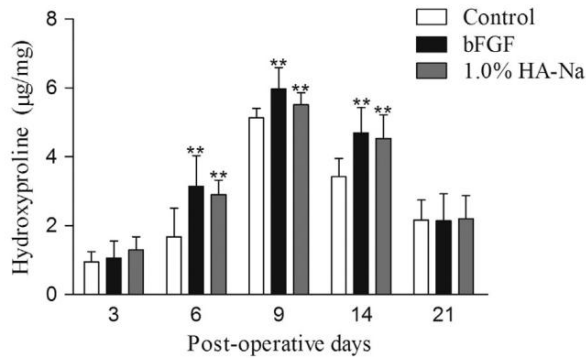
3.4. TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün mRNA seviyeleri ve protein ekspresyonu

Tgf- β 1, Tgf- β 2 ve Tgf- β 3'ün mRNA seviyeleri, RT-PCR analizi kullanılarak yarı kantitatif olarak ölçüldü ve temizlik geni Gapdh için referans mRNA seviyesine göre hedef genin densitometrik bant yoğunlukları olarak ifade edildi.

Sonuçlar, yara oluşumundan sonraki 6. günde Tgf- β 1'in mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre HA-Na grubunda önemli ölçüde arttığını, ancak 14. günde Tgf- β 1'in mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla azaldığını gösterdi. Ayrıca, yara oluşumundan 6 gün sonra Tgf- β 2 ve Tgf- β 3'ün mRNA ifadeleri HA-Na grubunda belirgin bir şekilde artış göstermezken, 14. günde Tgf- β 2 ve Tgf- β 3'ün mRNA ifadeleri kontrol grubuna göre artmıştı (Şekil 4). Western blot analizi ile yara oluşumundan sonra TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün protein ekspresyonları üzerinde HA-Na'nın etkilerini daha da gözlemledik ve protein ekspresyon paternlerinin mRNA ile aynı olduğunu bulduk.



Ş ekil 2 İ yileş en yara dokusunun ve epidermal/dermal yeniden modellenmenin eksizyon sonrası farklı gü nlerde (6 ve 14 gü n) mikroskopik görü nü mü . (A) Deri kesitleri, kontrol grubu, bFGF grubu ve %1.0'da hematoksilin ve eozin (HE) boyası nı (bü yü tme 100), Masson'un trikrom (MT) boyası nı (bü yü tme 100) ve mikrodamar yoğunluğ unu (MVD) (bü yü tme 400) gösterir. HA-Na grubu. (B) MVD'nin yarı kantitatif aç klaması . Değ erler ortalama7SEM'dir (n=8). **Po.0.01 ve kontrol grubu.



Ş ekil 3 HA-Na'nı n hidroksiprolin içeriğ i ü zerindeki etkisi. Değ erler ortalama7SEM'dir (n=8). **Po.0.01 ve kontrol grubu.

6. ve 14. gü nlerde Tgf-β1, Tgf-β2 ve Tgf-β3 için desenler (Ş ekil 5).

3.5. Smad-2, -3, -4 ve -7'nin protein ekspresyon paternleri

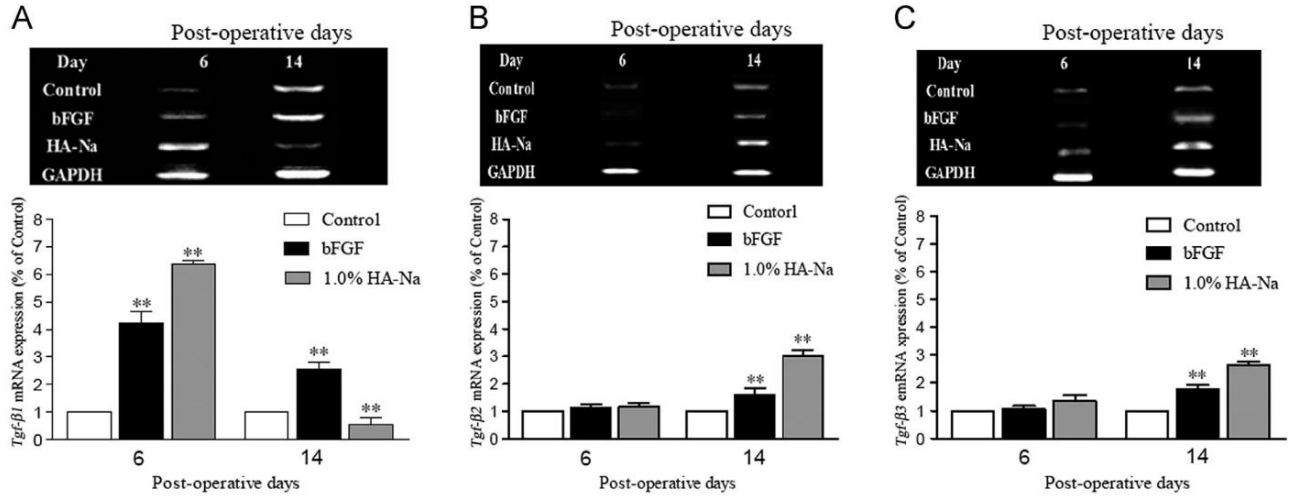
Hü cre iç Smad proteinleri, kollajen ü retimi için hü cre di ş i TGF-β sinyallerini fibroblast çekirdeğ ine ilettiğ inden, 6. ve 14. gü nlerde Smad-2, -3, -4 ve -7 ekspresyonu

yara granü lasyon dokuları nda değ erlendirilir. Western blot analizi, Smad-2, -3 ve Smad-4 ifadelerinin HA-Na grubunda kontrollere göre arttı ğ ı nı ortaya koydu. Ancak Smad-7 protein seviyeleri azaldı (Ş ekil 6).

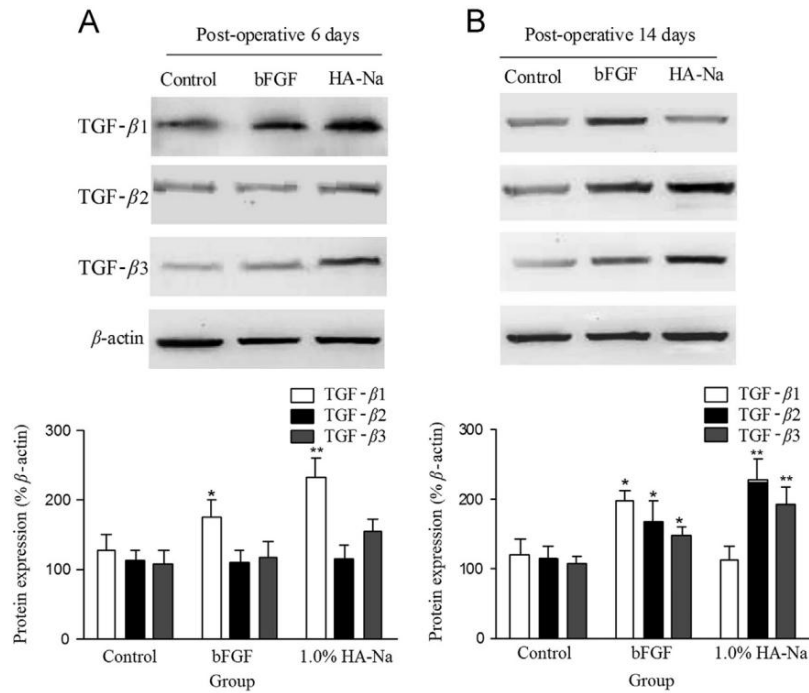
4. Tartı ş ma

HA-Na, halk hekimliğ inde topikal olarak yara iyileş tirici ve iltihap önleyici bir madde olarak kullanı lmı ş tır. Bu çalı ş mada HA-Na, geleneksel değ erini doğ ru bir ş ekilde aydınlatmak için sı çanlarda kutanöz yara iyileş mesi için araş tırıldı . Çalı ş mamız, HA-Na'nı n, hı zlandı rı lmı ş yara kası lması , hidroksiprolin içeriğ indeki artı ş lar yoluyla sı çanlarda yara iyileş mesini destekleme kapasitesine sahip olduğ unu gösterdi. Daha da önemlisi, HA-Na'nı n yara iyileş tirme etkilerine TGF-β/Smad sinyal yolu aracılı ğ ı yla aracılı k edilebilir. Bu nedenle, sonuçları mız HA-Na'nı n bir yara iyileş tirme ajanı olarak kullanı mını doğ rulamaktadır.

Yara kontraksiyonu, tam kalı nlı kta bir yaranı n iyileş en kenarları nı n merkezci hareketidir ve iyileş me ilerlemesi, kontrakte olan yara dokusunun periyodik değ iş imi ile değ erlendirilebilir. HA-Na ile tedavi edilen grubun yara kası lma değ erleri, kontrol grubu ile karşı laş tırıldı ğ ı nda önemli değ iş im de arttı . HA-Na'nı n topikal uygulaması yarayı önemli değ iş imde hı zlandı rdı



Ş ekil 4 HA-Na'nın Tgf- β 1, Tgf- β 2 ve Tgf- β 3'ün mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri. (A)-(C) 6. ve 14. günlerde sı çan yara dokusunda Tgf- β 1, Tgf- β 2 ve Tgf- β 3 mRNA'nın temsili RT-PCR analizi. Gapdh, dahili bir standart olarak birlikte bu yütüldü. Değ erler, Gapdh ifadesine göre normalleş tirildi ve Tgf- β 1, Tgf- β 2 ve Tgf- β 3 (hedef gen)/Gapdh'nin bant yoğ unluğ u olarak temsil edildi. Değ erler ortalama \pm SEM (n=8) olarak ifade edilir. **Po0.01 ve kontrol grubu.



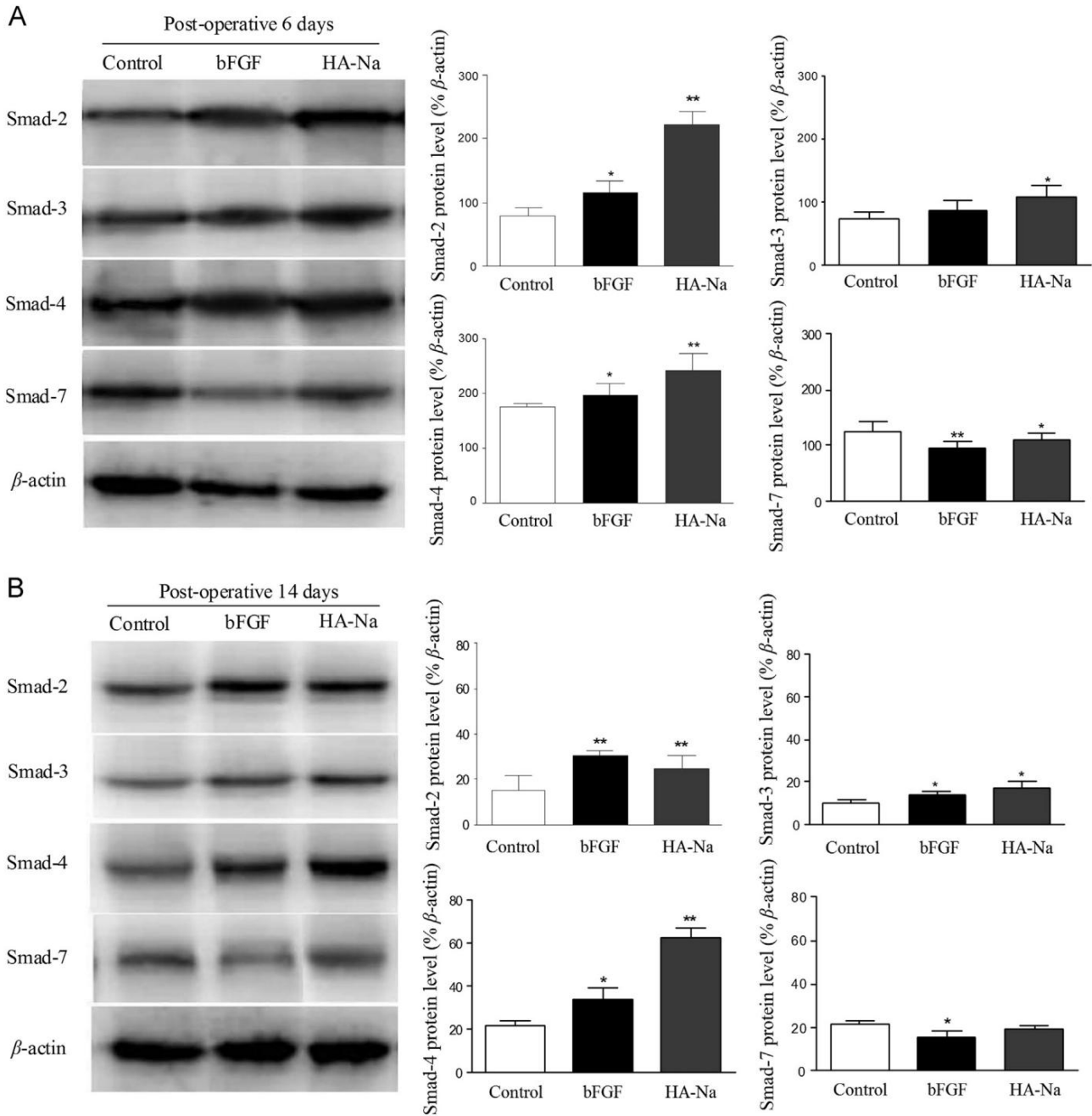
Ş ekil 5 HA-Na'nın TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün protein ifadeleri üzerindeki etkileri. (A) ve (B) Western blot ile tespit edilen 6. ve 14. günlerde sı çan yara dokularında TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün protein ifadeleri ve kantitasyon verileri. Değ erler β -aktin ifadesine göre normalleş tirildi ve TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 (hedef protein)/ β -aktinin bant yoğ unluk oranı olarak temsil edildi. Değ erler ortalama \pm SEM'dir (n=8).

*Po0.05, **Po0.01 - kontrol grubu.

kası lma ve histopatolojik inceleme yukarı daki bulguyu destekledi. Ek olarak, histolojik çalı ş ma, HA-Na ile tedavi edilen grubun, kontrol grubu ile karşı laş tırıldı ğ ında daha hızlı yeniden epitelizasyon ve anjiyogeneze sahip olduğ unu gösterdi. Ayrıca bFGF, doku onarı mındaki, en yaygın olarak eksizyonel cilt yaraları nın iyileş mesindeki rolü aç sından da incelenmiş tir. Bu çalı ş mada, pozitif grup (bFGF grubu) ile karşı laş tırıldı ğ ında, HA-Na'nın topikal uygulaması , yara kası lması nı ve yeniden epitelizasyonunu önemli ölçü de destekledi, ayrıca HA-Na'nın daha iyi olduğ unu dü ş ündü.

geleneksel ilaç tedavisi. Aslında, ön deneyde, belirtilen HA-Na konsantrasyonları (%0,5, %1 ve %2) yara kontraksiyonunu konsantrasyona bağı lı bir şekilde hızlandı rdı (veriler gösterilmemiştir). Bu nedenle, bu çalı ş mada HA-Na (%1) topikal olarak uygulandı .

Bağ dokusunun temel bir bileş eni olan kollajen, yaraları n iyileş mesinde kilit bir rol oynar ve yenilenen doku için yapı sal bir çerçeve sağlar ve iyileş me süreci, düzenlenmiş ü retime, birikmeye



Ş ekil 6 HA-Na'nın Smad-2, -3, -4 ve -7'nin protein ifadeleri üzerindeki etkileri. (A) ve (B) Smad-2, Smad-3, Smad-4 ve Smad-7'nin sı çan yara dokuları ndaki protein ifadeleri ve kantitasyon verileri, western blot ile sıaptanan 6. ve 14. günlerde sı çan yara dokuları nda. Değ erler β -aktin ifadesine göre normalleştirildi ve Smad-2, -3, -4 ve -7 (hedef protein)/ β -aktinin bant yoğunluk oranı olarak temsil edildi. Değ erler ortalaması \pm SD, * p < 0,05 - kontrol grubu.

mü teakip olgunlaş ma23-25. Bu çalışmada, HA-Na'nın topikal uygulaması , daha fazla kollajen, fibroblast ve daha az enflamatuvar hü cre içeren granü lasyonu aç kça arttı rdı . Verilerimiz ayrı ca HA-Na'nın kollajen oluş umunu önemli ölçü de arttı rdı ğ ını ortaya ç kardı , gü nkü HA-Na ile muamele edilmiş hayvan grubundaki granü lasyon dokusunun hidroksiprolin içeriğ i, kontrol grubuyla karşı laşt ırıldı ğ ında bariz bir şekilde daha yük sekti.

Kanaatimizce, HA-Na'nın yara kontraksiyonunu ve kollajen sentezini teş vik edici aktivitesi, yara iyileş me aktivitelerini hız landı rması ndan kaynaklanı r. Yara iyileş mesi aş amaları sı rasında, çeş itli hü cresel iş levleri tamamlamak için çoklu hü cre tipleri ve büyü me faktörleri gerekir.

etkinlikler^{9,24,26}. TGF- β , yara iyileş mesinde ve yara oluş umunda önemli bir aktif molekü ldür²⁷. TGF- β 'nin üç altı tipi (TGF- β 1-3), yara iyileş mesinin farklı aş amaları nda kritik roller oynar. Bu proteinler, yara iyileş mesinin geç aş aması nda özellikle önemlidir. Deneyimizde, HA-Na yaralanmanın ardından 6. Günde TGF- β 1'in mRNA ekspresyonunu yukarı regüle etti ve 14. Günde TGF- β 1'in mRNA ekspresyonunu aş ağı regüle etti. TGF- β 1'in yara iyileş mesini teş vik eden bir faktör olarak iş lev gördü ğ ü iyi bilinmektedir. ve bu proteinin etkileri, hipertrofik yara izi ve keloid gibi aş ırı iyileş me sonuçları na yol açabilir²⁸. Bu gerçek, TGF- β 1'in aş ağı regüle lasyonunun anlaş ılması na yardımcı olabilir.

14. Günde HA-Na grubu. Çalı ş mamı z ayrı ca HA-Na'nı n 14. Gü nde TGF-β2 ve TGF-β3'ü n mRNA ifadelerini indü klediğ ini gösterdi.

Ayrı ca, western blot analizi ile yara oluş turulduktan sonra TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3'ü n protein ifadeleri ü zerinde HA-Na'nı n etkilerini gözlemledik ve protein incelemesi yukarı daki bulguları destekleyerek HA-'nin yara iyileş tirici etkisinin olduğ unu dü ş ü ndü rdü . Na, TGF-β sinyal yolu aracı lı ğ ı yla aracı lı k edilebilir.

TGF-β aracı lı sinyal yolunun yara iyileş mesi ve skar oluş umu29 ile yakı ndan iliş kili olduğ una inanı lmaktadı r. Smad proteinleri, TGF-β ailesi ü yelerinin30 hü cre iç sinyal aracı ları olarak iş lev görü r. Mevcut çalı ş ma, HA-Na topikal uygulaması nı n Smad-2, -3 ve -4 proteinlerinin ekspresyonunu yukarı regü le ettiğ ini, oysa inhibe edici protein olan Smad-7'nin ekspresyonunun aş ağı regü le edildiğ ini tespit etti. Azalan inhibitör Smad-7 seviyesi ayrı ca HA-Na'nı n yara iyileş mesindeki etkisini gü çlendirdi, bu da HA-Na'nı n TGF-β/Smad sinyal yolunu aktive edebileceğ ini dü ş ü ndü rdü . Ş imdiye kadar bu çalı ş ma, sı çanlarda oluş turulan eksizyonel yaraları ve ardı ndan TGF-β/Smad sinyal yolu bileş enlerinin değ ü mü nü kullanımı ş tı r.

Mevcut sonuçlar, HA-Na'nı n yara iyileş mesini destekleyen aktivitesinin, TGF-β/Smad sinyal yolu ile iliş kili olabileceğ ini bulmuş tur. Bununla birlikte, sı çan modelinde TGF-β izoform spesifik nötrale edici antikolar ve Smad-2, Smad-3 ve/veya Smad-4'ü n yara iyileş mesi aş amaları nda adenoviral iletimini kullanan ileri çalı ş malar, dü zenlemeyi daha fazla aydı nlatmak için gelecekteki araş tı rmaları n olası yolları dı r. HA-Na'nı n TGF-β/Smad sinyal yolunda.

Yara iyileş mesini iyileş tirmek ve/veya yara izini azaltmak için terapötik ajanlar kullanarak TGF-β/Smad sinyal yolunu hedeflemek, klinik öncesi çalı ş malarda baş arı lı olmuş tur. CAT-192, TGF-β1'i nötrale eden bir insan monoklonal antikorudur ve yeniden epitelizeasyonu teş vik ederek sı ğ ı r organ kü ltü rlerinde kornea yara iyileş mesini iyileş tirdiğ i gösterilmiş tir31. Örnekle olarak, peptid 144 (P144), bir TGF-21 inhibitörü olarak tasarlanmı ş ve farklı hayvan modellerinde fibrozisi azaltmada etkinlik göstermiş insan betaglikanı ndan elde edilen 14-mer bir peptittir32,33 . Ek olarak, Smad-3 antisens oligonü kleotidleri, bir fare eksizyonel yara modelinde yara iyileş mesini hızlandı rdı ve yara izini azalttı 34. TGF-β/Smad sinyal yolunun yara iyileş mesindeki rolü iyi karakterize edildiğ inden, HA-Na'nı n yara iyileş mesi ü zerindeki etkisini ve TGF-β/Smad sinyal yolunun altı nda yatan molekü ler mekanizmaları araş tı rmak mü mkü ndü r.

Bir anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal ve anti-ü lser ilacı olan HA-Na'nı n en geniş etki spektrumuna sahip olduğ u dü ş ü nü lmektedir. HA-Na'nı n yanı kları n ve yaraları n tedavisinde kullanı lması , tedavi maliyetini dü ş ü rmenin yanı sı ra iyileş meyi iyileş tirmek için özellikle önemli bir yöntemdir. Bu çalı ş ma umut verici olsa da, HA-Na henü z faz I klinik deneylerinde gü venlik ve tolere edilebilirlik ağı sı ndan tarandı ğ ı ndan, HA-Na'nı n klinik kullanı mda olup olmayacağı henü z görü lmektedir.

5. Sonuçlar

HA-Na, hızlandı rdı lması ş yara kası lması , daha yü ksek hidroksiprolin içeriğ i ve iyileş tirilmiş doku iyileş mesi seviyesi yoluyla sı çan modelinde yara iyileş mesini destekleme kapasitesine sahiptir. Daha da önemlisi, HA-Na'nı n yara iyileş tirme etkisine TGF-β/Smad sinyal yolu aracı lı ğ ı yla aracı lı k edilebilir. HA-Na gelecekte yeni bir yara iyileş tirici ajan olarak kullanı labilir.

teş ekkü rler

Bu çalı ş ma, Shaanxi Eyaleti Bilim ve Teknoloji İ novasyon Planı Projesi (2013KTCQ03-13) tarafı ndan mali olarak desteklenmiş tir.

Referanslar

1. Aeschbacher M, Graf C, Schwarzenbach RP, Sander M. Hü mik maddelerin antioksidan özellikleri. *Environ Sci Technol* 2012;46:4916-25.
2. Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. Shilajit: bir inceleme *Fitother Res* 2007;21:401-5.
3. Buzlama AV, Chernov Iu N. Hü mik maddeler: farmakolojik özellikler, etki mekanizmaları ve tı pta kullanı m beklentileri. *Eksp Klin Farmakol* 2010;73:43-8.
4. Schepetkin IA, Xie G, Jutila MA, Quinn MT. Shilajit ve diğ er doğ al kaynaklardan gelen fulvik asidin tamamlayı cı sabitleme aktivitesi. *Fitother Res* 2009;23:373-84.
5. Cornejo A, Jimenez JM, Caballero L, Melo F, Maccioni RB. Fulvik asit , agregasyonu inhibe eder ve Alzheimer hastalı ğ ı ile iliş kili tau fibrillerinin parçalanması nı destekler. *J Alzheimer Dis* 2011;27:143-53.
6. Guzman-Martinez L, Farias GA, Maccioni RB. Alzheimer teş hisi ve yeni ilaçlar için potansiyel hedefler olarak tau oligomerleri . *Ön Nörol* 2013;4:167.
7. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Yara onarı mı ve rejenerasyonu. *Doğ a* 2008;453:314-21.
8. Reinke JM, Sorg H. Yara onarı mı ve yenilenmesi. *Eur Surg Res* 2012;49:35-43.
9. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Yara iyileş mesinde bü yü me faktörleri ve sitokinler. *Yara Onarı m Regeni* 2008;16:585-601.
10. Jia Y, Zhao G, Jia J. Ön değ erlendirme: Aloe ferox Miller ve Aloe arborescens Miller'ı n yara iyileş mesi ü zerindeki etkileri. *J Ethnopharmacol* 2008;120:181-9.
- [PMC ü cretsiz makale] [PubMed] 11. Lau KM, Lai KK, Liu CL, Tam JC, To MH, Kwok HF, et al. Diyabetik yara iyileş mesini desteklemek için bir Çin bitkisel formü lü nde astragalı Radix ve rehmanniae Radix arası ndaki sinerjistik etkileş im . *J Ethnopharmacol* 2012;141:250-6.
12. Tam JC, Lau KM, Liu CL, To MH, Kwok HF, Lai KK ve ark. 2 bitki formü lü nü n in vivo ve in vitro diyabetik yara iyileş tirici etkileri ve etki mekanizmaları . *J Ethnopharmacol* 2011;134:831-8.
13. Wu XB, Luo XQ, Gu SY, Xu JH. *Polygonum cuspidatum* ekstraktı nı n sı çanlarda yara iyileş mesi ü zerine etkileri . *J Ethnopharmacol* 2012;141:934-7.
14. Arunachalam K, Parimelazhagan T. *Ficus amplessima* Smith'in yaprakları nı n antiinflamatuar, yara iyileş tirici ve in-vivo antioksidan özellikleri . *J Ethnopharmacol* 2013;145:139-45.
15. Ganeshkumar M, Ponrasu T, Krithika R, Iyappan K, Gayathri VS, Suguna L. *Acalypha indica*'nı n topikal uygulaması , tip I ve III kollajen ekspresyonunu yukarı doğ ru dü zenleyerek sı çan kutanöz yara iyileş mesini hızlandı rdı rı r. *J Ethnopharmacol* 2012;142:14-22.
16. Nayak BS, Pinto Pereira LM. *Catharanthus roseus* ççeğ i özü , Sprague-Dawley farelerinde yara iyileş tirici aktiviteye sahiptir. *BMC Tamamlayı cı Altern Med* 2006;6:41.
17. Upadhyay A, Chattopadhyay P, Goyary D, Mazumder PM, Veer V. *Eleutherine indica* L., Smad aracı lı kollajen ü retimini uyarak in vivo kutanöz yara iyileş mesini hızlandı rdı rı r. *J Ethnopharmacol* 2013;146:490-4.
18. Quan R, Zheng X, Xu S, Zhang L, Yan D. Jelatin-kondroitin-6- sü lfat-hyaluronik asit iskelesi, vaskü ler endotelial bü yü me faktörü 165 ile tohumlanmı ş , ü ç boyutlu bir deri ikamesi olarak değ iş tirilmiş saç folikü lü kök hü creleri. *Kök Hü cre Res Ther* 2014;5:118.
19. Bainbridge P. Yara iyileş mesi ve fibroblastları n rolü . *J Yara Bakı mı* 2013;22:407-8 410-12.
20. Wong T, McGrath JA, Navsaria H. Fibroblastları n doku mü hendisliğ i ve rejenerasyondaki rolü . *Br J Dermatol* 2007;156:1149-55.
21. Li B, Wang JH. Yara iyileş mesinde fibroblastlar ve miyofibroblastlar: kuvvet ü retimi ve değ ü mü . *J Doku Canlı lı ğ ı* 2011;20:108-20.
22. Breuing K, Andree C, Helo G, Slama J, Liu PY, Eriksson E. Kı smi kalı nlı kta domuz derisi yaraları nı n onarı mı nda bü yü me faktörleri. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:657-64.
23. Grabska-Liberek I, Galus R, Owczarek W, Wlodarsk K, Zabielski S, Malejczyk J, et al. Yara iyileş mesinin tedavisinde kollajen bazlı pansumanlar . *Pol Medikal Merkur* 2013;35:51-4.

24. Montesano R, Orci L. Dönüş en büyüme faktörü beta, fibroblastlar tarafından kollajen-matris kaskılaşmasını uyarır: yara iyileşmesi için çarkımlar. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:4894-7.
25. Zhou S, Salisbury J, Preedy VR, Emery PW. Kasta yara iyileşmesi sırasında artan kollajen sentezi oranı. PLoS Bir 2013;8: e58324.
- [PMC'de ücretsiz makale] [PubMed] 26. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. [PMC'de ücretsiz makale] [PubMed] [Çapraz Ref] 26. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS. Vasküler endotelial büyüme faktörü nü n yara iyileşmesindeki rolü. J Surg Res 2009;153:347-58.
27. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. TGF-β ailesinin yara iyileşmesi, yanıklar ve skar oluşumundaki rolü: bir gözden geçirme. Uluslararası Yanık Travması 2012;2:18-28.
28. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. Dönüş en büyüme faktörü β'ni n yara iyileşmesinin farklı aşamalarında kritik rolü. Adv Yara Bakımı 2013;2:215-24.
29. Leas A, Abraham DJ. TGF-β sinyali ve fibrotik tepki. FASEB J. 2004;18:816-27.
30. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. Smad proteinleri aracılığıyla hücre zarından çekirdeğe TGF-β sinyali. Doğ a 1997;390:465-71.
31. Carrington LM, Albon J, Anderson I, Kamma C, Boulton M. TGF-β izoformları ve bunların inhibitörleri tarafından erken kornea yara iyileşmesinde anahtar aşamaların farklı düzenlenmesi. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:1886-94.
32. Zquerro IJ, Lasarte JJ, Dotor J, Castilla-Cortázar I, Bustos M, Pen-uelas I, et al. Dönüş tü rü cü büyüme faktörü beta tip III reseptöründen elde edilen sentetik bir peptit, karbon tetraklorür karaciğer hasarını olan sıçanlarda karaciğer fibrogenezini inhibe eder. Sitokin 2003;22:12-20.
33. Santiago B, Gutierrez-Canas I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, et al. Dönüş tü rü cü büyüme faktörü -21'in bir peptit inhibitörünü n topikal uygulaması, bleomisin kaynaklı cilt fibrozunu iyileştirir. J Invest Der matol 2005;125:450-5.
34. Hong HJ, Jin SE, Park JS, Ahn WS, Kim CK. Smad3 antisens oligonükleotit emdirilmiş kitosan/aljinat polielektrolit kompleksi ile hücre zılandırılması yara iyileşmesi. Biyomateryaller 2008;29:4831-7.