

T.C.



NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***IN VITRO* ÜÇ BOYUTLU DERİ KESİK YARA
MODELİ GELİŞTİRİLMESİ VE
KANABİDİOLÜN YARA İYİLEŞTİRME
ETKİSİNİN MODEL ÜZERİNDE
İNCELENMESİ**

Sümeyye KOZAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Haziran-2026
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Sümeyye KOZAN tarafından hazırlanan “*In Vitro* Üç Boyutlu Deri Kesik Yara Modeli Geliştirilmesi ve Kanabidiolün Yara İyileştirme Etkisinin Model Üzerinde İncelenmesi” adlı tez çalışması 02/06/2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF

.....

Danışman

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından 25YL19008 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Sümeyye KOZAN

02.06.2026

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IN VITRO ÜÇ BOYUTLU DERİ KESİK YARA MODELİ GELİŞTİRİLMESİ VE KANABİDİOLÜN YARA İYİLEŞTİRME ETKİSİNİN MODEL ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Sümeyye KOZAN

**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof.Dr. Meltem DEMİREL KARS

2026, 129 Sayfa

Jüri

Prof.Dr. Meltem DEMİREL KARS

Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

Rejeneratif tıpta estetik ve işlevsel olarak deri iyileşmesi, derinin karmaşık yapısı ve dinamik sinyal yolları nedeniyle hala önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bu süreçlerin moleküler seviyede anlaşılması açısından, geleneksel iki boyutlu (2B) hücre kültürleri; hücre ve matris etkileşimlerini ile fizyolojik derinliği yeterince temsil edememektedir. Ancak, doku mühendisliği ilkeleriyle tasarlanan üç boyutlu (3B) modeller; hücreler arası etkileşimler, hücre dışı matris yapısı ve hava sıvı arayüzü gibi deri ile ilgili belirli unsurları başarıyla simüle edebilmektedir. Bu çerçevede, biyofonksiyonel nitelikleriyle öne çıkan Kanabidiol gibi bileşenlerin yara yenilenmesi üzerindeki potansiyelini belirlemek; yalnızca hücre hareketlerinin izlenmesini değil, aynı zamanda bu etkilerin genetik ifade düzeyindeki yansımalarının yeniden yapılandırılmış insan epidermisi ve tam katmanlı deri gibi ileri düzey *in vitro* üç boyutlu modellerde doğrulanmasını gerektirmektedir. Bu gelişmiş modelleme yaklaşımları, hayvan deneylerine hem etik hem de bilimsel bir alternatif sunarak, iz bırakmayan iyileşmeyi hedefleyen yenilikçi farmasötik taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde temel bir rol oynamaktadır. Tez çalışmanın başlangıç bölümünde, CBD insan dermal fibroblast (HDF) ve insan keratinosit (HS2) hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonları WST-1 canlılık testi ile incelenmiştir. Analizlerin bulgularına göre, 12,5 µM seviyesine kadar hücrelerin canlılık oranının %90'ın üzerinde kaldığı, fakat 12,5 µM'yi aşan dozlarda hücre ölümünün başladığı gözlemlenmiştir. CBD'nin farklı doz ve süre uygulamalarının HDF ve HS2 hücrelerinin üremesine etkileri değerlendirildiğinde hem 2B yara modeli hem de her iki hücrenin bir arada kullanılacağı 3B deri yara modeli için de uygulanabilecek olan 12,5 µM konsantrasyon toksik olmayan güvenli doz olarak belirlenmiştir. İkinci aşamada CBD'nin keratinositlerin göçü üzerindeki etkisi, HS2 hücreleri kullanılarak oluşturulan 2B çizik modelinde zamana bağlı olarak (0. , 1. , 2. ve 7. gün) hem ters mikroskop hem de konfokal mikroskop ile gözlemlenmiştir. CBD uygulaması, 2 boyutlu çizik testinde yara kapanmasını önemli ölçüde artırarak iki gün içinde %99,9 oranında kapanma sağlamıştır. CBD uygulanan hücrelerdeki yara kapanma oranı, kontrol grubuna göre 3,83 kat daha yüksek olmuştur. Bu bulgular, CBD'nin yara iyileşmesini destekleyici özelliklerini vurgulamakta ve farmakolojik ajanların değerlendirilmesinde gelişmiş *in vitro* modellerin faydasını ortaya koymaktadır. Bu morfolojik değişikliklerin moleküler altyapısını anlamak amacıyla yapılan RT-qPCR incelemeleri; epidermal farklılaşma ve bariyer dengesinin sağlanmasında önemli rol oynayan Keratin 10 (K10), Laminin (LAM) ve Involukrin (INV) genlerinin ifade seviyelerinin belirgin bir şekilde yükseldiğini göstermiştir. Bu bulgu, CBD'nin iyileşme sürecini yalnızca fiziksel bir yarayı kapama şeklinde değil, genetik düzeyde programlanmış matris sentezi ve hücre uyum süreci olarak başlattığını ortaya koymaktadır. Üçüncü aşamada, insan derisi fizyolojisini en gerçekçi şekilde modelleyen *in vitro* 3B yeniden yapılandırılmış

insan epidermisi (RHE) ve tam katmanlı deri (FTSE) modelleri yapılmıştır. RHE modelinde yara iyileşmesinin doğal fazlarını temsil eden 7, 14 ve 21. günlerde XTT canlılık testi ile analiz edilmiştir. Analizlerin bulgularına göre, metabolik aktivite ve yeniden epitelizasyonda, yaralanma sonrasında CBD uygulanan gruplardaki metabolik aktivitenin kontrol grubuna oranla daha dengeli kaldığını ortaya çıkartmıştır. Bu denge, CBD'nin yalnızca hücre hareketliliğini hızlandırmakla kalmayıp, aynı zamanda dokunun yeniden yapılanma süreçlerindeki enerji metabolizmasını da desteklediği anlamına gelmektedir. Konfokal mikroskopisi analizinde ise epidermal bariyerin CBD etkisiyle yeniden oluştuğu gözlemlenmiştir. 21 günlük takip süreci, CBD'nin dermal fibroblastların matris üretimini uyumlu hale getirerek doku olgunlaşmasını geliştirdiğini ve daha dayanıklı bir deri benzeri yapı oluşturduğunu göstermiştir. Histolojik (H ve E) analizler ve taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleme ile de CBD'nin modellerde açılan yaranın kapanmasına katkı sağladığı gösterilmiştir. Geliştirilen bu modelleme yaklaşımı, hayvan deneylerine etik bir alternatif sunan 3R prensibi ile uyumlu olup, kronik ve akut yaraların tedavisinde CBD temelli yeni nesil yara bakım sistemlerinin geliştirilmesi için hem moleküler hem de dokusal düzeyde güçlü bir temel sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: CBD, Doku Mühendisliği, *In vitro* 3B Deri Modeli, Kanabidiol, Yara İyileşmesi



ABSTRACT

MS THESIS

DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* THREE-DIMENSIONAL SKIN INCISION WOUND MODEL AND EXAMINATION OF THE WOUND HEALING EFFECT OF CANNABIDIOL ON THE MODEL

Sümeyye KOZAN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOMEDICAL ENGINEERING**

Advisor: Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

2026, 129 Pages

Jury

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF

Asist. Prof. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

In regenerative medicine, achieving aesthetically and functionally effective skin healing remains a significant challenge due to the complex structure of the skin and its dynamic signaling pathways. In terms of understanding these processes at the molecular level, traditional two-dimensional (2D) cell cultures fail to adequately represent cell-matrix interactions and physiological depth. However, three-dimensional (3D) models designed based on tissue engineering principles can successfully simulate specific skin-related features such as cell-cell interactions, extracellular matrix structure, and the air liquid interface. In this context, determining the potential of biofunctional components such as cannabidiol (CBD) in wound regeneration requires not only monitoring cellular behaviors but also validating the genetic expression-level effects of these interactions in advanced in vitro 3D models, such as reconstructed human epidermis and full-thickness skin. These advanced modeling approaches provide both an ethical and scientific alternative to animal experiments and play a fundamental role in the development of innovative pharmaceutical delivery systems aimed at scarless healing. In the initial phase of the thesis study, different concentrations of CBD were evaluated on human dermal fibroblast (HDF) and human keratinocyte (HS2) cells using the WST-1 viability assay. According to the findings, cell viability remained above 90% up to a concentration of 12.5 μM , whereas cell death was observed at doses exceeding 12.5 μM . When assessing the effects of different doses and exposure durations of CBD on the proliferation of HDF and HS2 cells, 12.5 μM was determined as a non-toxic and safe concentration applicable to both the 2D wound model and the 3D skin wound model involving co-culture of both cell types. In the second phase, the effect of CBD on keratinocyte migration was evaluated using a 2D scratch assay model created with the HS2 cell line. Observations were conducted over time (day 0, 1, 2, and 7) using both inverted and confocal microscopy. CBD treatment significantly enhanced wound closure in the 2D scratch assay, achieving 99.9% closure within two days. The wound closure rate in CBD-treated cells was 3.83 times higher than in the control group. These findings highlight the wound-healing potential of CBD and demonstrate the utility of advanced in vitro models in evaluating pharmacological agents. To understand the molecular basis of these morphological changes, RT-qPCR analyses revealed a significant upregulation in the expression levels of Keratin 10 (K10), Laminin (LAM), and Involucrin (INV), which play crucial roles in epidermal differentiation and barrier homeostasis. These results indicate that CBD

initiates the healing process not merely as physical wound closure but as a genetically programmed process involving matrix synthesis and cellular coordination. In the third phase, advanced *in vitro* 3D models that most closely mimic human skin physiology, reconstructed human epidermis (RHE) and full-thickness skin equivalents (FTSE) were developed. In the RHE model, wound healing was analyzed using the XTT viability assay on days 7, 14, and 21, representing the natural phases of healing. The results demonstrated that metabolic activity and re-epithelialization remained more balanced in CBD-treated groups compared to controls following injury. This balance suggests that CBD not only accelerates cell migration but also supports energy metabolism during tissue remodeling. Confocal microscopy analysis further showed that the epidermal barrier was re-established under the influence of CBD. The 21-day observation period indicated that CBD enhances tissue maturation by harmonizing matrix production of dermal fibroblasts, resulting in a more robust skin-like structure. Histological (H and E) analyses and scanning electron microscopy (SEM) imaging also confirmed that CBD contributes to wound closure in the developed models. This modeling approach is aligned with the 3R principles, offering an ethical alternative to animal experimentation, and provides a strong molecular and tissue-level foundation for the development of next-generation CBD-based wound care systems for both chronic and acute wound treatment.

Keywords: Cannabidiol, CBD, *In vitro* 3D Skin Model, Tissue Engineering, Wound Healing.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecimin başından sonuna kadar yardım ve desteğini her daim hissettiğim, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk ve onur duyduğum, karşılaştığım zorlukları değerli bilgi ve tecrübesi ile büyük bir sabırla karşılayan çok değerli ve sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS'a teşekkür ediyor, en derin saygılarımı sunuyorum.

Lisansüstü eğitimim ve çalışmalarım boyunca desteklerini ve değerli bilgilerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi, üniversitemizin diğer kıymetli akademisyenlerine ve Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM) akademik, idari ve teknik personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bilgi desteği aldığım 101079123 nolu Ufuk Avrupa Twinning Projesi REGENEU' ya teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarım kapsamında doku kesitlerinin hazırlanması sürecinde destek veren Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı akademisyenleri Doç. Dr. Gülsemin ÇİÇEK, Araş. Gör. Dr. Abdullah ÖZDEMİR ve Nihal CANBULAT'a teşekkür ederim. Tez jüri üyeleri Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF ve Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI'ya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, yıllarca sevgilerini her an hissettiren, maddi manevi desteklerini bir an olsun esirgemeyen ve eğitim hayatım boyunca araştırmalarım odaklanabilmem için gerekli tüm şartları özveriyle oluşturan değerli annem Ayşe KOZAN'a, babam Mustafa KOZAN'a ve kardeşim Muhammed KOZAN'a sonsuz teşekkür ediyorum. Bu tezi onların bana olan inanç ve sevgilerine ithaf ediyorum.

Sümeyye KOZAN

KONYA-2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Derinin Anatomik Yapısı	5
2.1.1. Derinin fizyolojisi	5
2.1.2. Yara iyileşmesinin genel mekanizması	7
2.1.3. Pansuman bazlı yara tedavisi	13
2.2. Rejeneratif Tıp	19
2.2.1. <i>In vitro</i> yara modelleri ve 3B hücre kültür sistemleri	20
2.3. Kenevirin Tarihçesi, Kullanımı ve Taksonomisi	26
2.3.1. CBD'nin kimyasal yapısı ve endokannabinoid sistemler ile ilişkisi	27
2.3.2. CBD'nin yara iyileşmesindeki rolü	30
2.4. Tez Çalışmasının Hedefleri ve Önemi	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyaller	39
3.1.1. Kullanılan cihazlar	39
3.2. Yöntemler	41
3.2.1. CBD'nin hücre canlılığına etkisinin <i>in vitro</i> değerlendirilmesi.....	42
3.2.2. CBD'nin etkisinin <i>in vitro</i> 2B yara modelinde değerlendirilmesi	44
3.3. CBD'nin <i>in vitro</i> 3B modellerde yara iyileştirme etkisinin değerlendirilmesi....	51
3.3.1. <i>In vitro</i> 3B yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli	52
3.3.2. <i>In vitro</i> tam katmanlı deri modeli (FTSE) geliştirilmesi	57
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	63
4.1. CBD'nin Hücre Canlılığına <i>In Vitro</i> Etkisi	63
4.2. CBD'nin <i>In Vitro</i> 2B Yara Modelinde Etkisi	68
4.2.1. CBD'nin <i>in vitro</i> 2B yara kapanma hızına etkisi.....	68
4.2.2. CBD'nin <i>in vitro</i> 2B yara modelinde etkisinin gen ifade düzeyinde değerlendirilmesi	71
4.3.1. <i>In vitro</i> 3B yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli değerlendirilmesi.....	77
4.3.2. <i>In vitro</i> 3B tam katmanlı deri modeli (FTSE) değerlendirmesi	85
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	94
5.1. Sonuçlar	94
5.2. Öneriler	96
6. KAYNAKLAR	98

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Deri tabakalarının yapı açısından genel görünümü. Deri, kök hücreler için önemli kaynak olan iki ana katman içerir: epidermis ve dermis. A) katmanları sergileyen epidermisin karmaşık düzeni ve B) dermisin hücre yapısı sunulmaktadır (biorender ile çizilmiştir).....	6
Şekil 2.2. A) akut yara: iyileşme süreçlerini standart bir biçimde tamamlayan yaradır. B) kronik yara: sürekli iltihaplanma ve yetersiz hücresel tepki yüzünden normal sürede iyileşmeyen yaradır (biorender ile çizilmiştir).....	7
Şekil 2.3. Yara iyileşme süreci (biorender ile çizilmiştir).....	8
Şekil 2.5. Deri yara iyileşme diyagramı (biorender ile çizilmiştir).....	12
Şekil 2.6. Yara iyileşmesinde sitokin sinyal ağı A) sinyal kaynakları, B) hedef hücreler ve etkiler, C) biyolojik oluşum (biorender ile çizilmiştir).....	15
Şekil 2.8. Kanabidiolün (CBD) kimyasal yapısı (pubchem).....	28
Şekil 2.9. Derinin endokannabinoid yapısı. Derinin hücre bölümlerindeki endokannabinoid sistemin temel bileşenlerinin (ana olarak kannabinoid reseptörleri ve bunların doğal lipid bileşenleri) şematik gösterimi (biorender ile çizilmiştir).....	29
Şekil 2.10. CBD'nin yara iyileşmesi sinyal ağları. A) sinyal kaynakları, B) reseptörler ve sinyaller, C) hedef hücreler ve biyolojik çıktılar (biorender tarafından yapılmıştır).....	31
Şekil 3.1. Canlılık analizi aşamaları (biorender ile çizilmiştir).....	44
Şekil 3.2. Çizik testi şematik gösterimi (biorender ile çizilmiştir).....	46
Şekil 3.3. Çizik model oluşturma ve CBD'nin yara iyileştirme etkisinin <i>in vitro</i> 2B yara modelinde RT-PCR ile değerlendirilmesi (biorender ile çizilmiştir).....	51
Şekil 3.4. RHE model şematik gösterimi (biorender ile çizilmiştir).....	53
Şekil 3.5. <i>In vitro</i> 3B yeniden oluşturulmuş insan epidermis (RHE) modeli yaralanma şematik gösterimi (biorender ile çizilmiştir).....	54
Şekil 3.6. <i>In vitro</i> 3B yeniden oluşturulmuş insan epidermis (RHE) modelde XTT aşamasının şematik gösterimi (biorender tarafından yapılmıştır).....	55
Şekil 3.7. CBD'nin etkisinin 3B epidermal yara modelinde konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesinin şematik gösterimi (biorender ile çizilmiştir).....	56
Şekil 3.8. Üç boyutlu hücre kültürü ortamında deri doku modeli geliştirilmesinin şematik gösterimi (biorender tarafından yapılmıştır).....	58
Şekil 3.9. Deri model dokunun mikroskopi ve immunohistokimya ile karakterizasyonu şematik gösterimi (biorender ile çizilmiştir).....	61
Şekil 3.10. Hematoksin ve eosin, immunohistokimyasal (IHC) boyama şematik gösterimi (biorender ile çizilmiştir).....	61
Şekil 4.1. Fibroblast hücrelerinin farklı CBD konsantrasyon gruplarında morfolojik görünümünün faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 µm boyundadır.....	63
Şekil 4.2. CBD'nin fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi.....	64
Şekil 4.3. Keratinosit hücrelerinin farklı CBD konsantrasyon gruplarında morfolojik görünümünün faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 µm boyundadır.	65
Şekil 4.4. CBD'nin keratinosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi.....	65
Şekil 4.5. CBD içerisinde bulunan DMSO'nun tek başına fibroblast hücrelerinin morfolojilerine etkisinin faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 µm boyundadır.....	66

Şekil 4.6. CBD içerisinde bulunan DMSO'nun tek başına keratinosit hücrelerinin morfolojilerine etkisinin faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 µm boyundadır.....	67
Şekil 4.7. Yara modeli oluşturulan keratinosit hücreleri ters mikroskop görüntüsü.....	68
Şekil 4.8. Yara modeli oluşturulan keratinosit hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü.....	69
Şekil 4.9. Yara kontrol ve CBD uygulanmış yara grubunda 1., 2., 7. Gün çizik kapanma yüzde grafiği.....	70
Şekil 4.10. RNA izolasyonu ve RT-PCR aşamaları şematik gösterimi.....	71
Şekil 4.11. Agaroz jel elektroforez görüntüsü. İlk kuyucuk DNA ladder göstermektedir. Sırasıyla GAPDH, K10, LAM, INV PCR ürünleri ve RNA örneği görüntülendi.....	72
Şekil 4.12. HS2 hücreleri ile yapılan 2B yara modelinde RT-qPCR analiz grafikleri.....	73
Şekil 4.13. HS2 hücreleri ile yapılan 2B yara modelinde CBD uygulamasının gen ekspresyonu (RQ) üzerindeki etkileri.....	74
Şekil 4.14. Yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli şematik gösterimi. A) HS2 hücre ekimi b) E2 besiyeri atılması c) hava-sıvı arayüzü (ALI) geçilmesi.....	77
Şekil 4.15. Yeniden oluşturulmuş insan epidermis (RHE) yaralanma aşamaların şematik gösterimi.....	79
Şekil 4.16. CBD uygulanan rhe modelinde 7., 14. Ve 21.gün XTT canlılık analizi sonuçları. Günlere bağlı olarak hücre metabolik aktivitesindeki değişimler gösterilmiştir.....	80
Şekil 4.17. Rhodamine-phalloidin ile boyanmış RHE modeli konfokal mikroskop görüntüsü.....	82
Şekil 4.18. Epidermal modelde CBD'nin yara kapanmasına etkisinin SEM ile görüntülenmesi (100x).....	84
Şekil 4.19. Tam katmanlı deri modeli (FTSE) yapılış aşamaları şematik gösterimi.....	86
Şekil 4.20. Tam katmanlı deri model (FTSE) yaralanma aşamaların şematik gösterimi.....	87
Şekil 4.21. FTSE modelinde (1,12 cm ²) zamana bağlı morfolojik değişimler.....	88
Şekil 4.22. H ve E boyama aşamaları şematik gösterimi.....	89
Şekil 4.23. <i>In vitro</i> 3B tam katmanlı deri modellerinden alınan mikrotom kesitlerinin H ve E boyaması ile değerlendirilmesi.....	90
Şekil 4.24. A) tam katmanlı <i>in vitro</i> 3B deri modeli kesiti (ışık mikrsokopu, 100µm), B) DAPI ile boyanmış tam katmanlı <i>in vitro</i> 3B deri modeli kesiti (CLSM, 100µm), C) DAPI ile boyanmış tam katmanlı <i>in vitro</i> 3B deri modeli kesiti (CLSM, 50µm), D) DAPI ve rhodamine-phalloidin ile boyanmış tam katmanlı <i>in vitro</i> 3B deri modeli kesiti (CLSM, 20µm), E) DAPI ile boyanmış tam katmanlı <i>in vitro</i> 3B deri yara modeli 21. Gün kesiti (CLSM, 50µm), F) DAPI ile boyanmış tam katmanlı <i>in vitro</i> 3B deri yara modeli +CBD kesiti 21. Gün (CLSM, 50µm).....	92

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri.....	14
Tablo 3.1. cDNA sentezi termal döngü koşulları.	48
Tablo 3.2. Standart PCR analizinde kullanılan primer dizileri.	49
Tablo 3.3. Standart PCR termal döngü koşulları.	50
Tablo 3.4. Real-Time PCR (QPCR) termal döngü koşulları.	51
Tablo 4.1. CBD'nin fibroblast hücreleri üzerinde IC ₅₀ değerleri.....	64
Tablo 4.2. CBD'nin keratinosit hücreleri üzerinde IC ₅₀ değerleri	64
Tablo 4.3. Yara kontrol ve CBD uygulanmış yara grubunda 1., 2.,7. Gün çizik kapanma oranları	70
Tablo 4.4. CBD doz uygulama (RQ ± SD) üzerindeki etkileri.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°	Derece
C	Santigrad
μ	Mikro
g	Gram
L	Litre
M	Molar
μg	Mikrogram
mg	Miligram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mol	Mol
cm	Santimetre
mm	Milimetre
pH	Power of hydrogen (hidrojen gücü)
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)

Kısaltmalar

2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
ALI	Hava-Sıvı Arayüzü
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstraselüler Matris
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTSE	Tam katmanlı deri eşdeğeri
H ve E	Hemotoksilin ve Eozin
HCl	Hidroklorik asit
HDF	İnsan dermal fibroblast
HS2	İnsan keratinosit hücre hattı
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu çözelti
RHE	Yeniden yapılandırılmış insan epidermisi
Rh-Phalloidin	Rodamin faloidin
RNA	Ribonükleik asit
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-

1. GİRİŞ

Deri, insan vücudundaki en büyük organ olup dış etkilere karşı bir koruyucu kalkan oluşturur. Yaklaşık 1,5–2 m²'lik bir yüzey alanı olan deri, vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini temsil eder. Derinin ana işlevleri arasında su kaybını engelleme, fiziksel ve kimyasal zararlara karşı koruma, bağışıklık sistemine katkıda bulunma, vücut sıcaklığını dengeleme ve D vitamini üretimi yer alır. Ayrıca deri, bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir (Sanjarnia vd., 2024). Deri; epidermis, dermis ve hipodermis adı verilen üç ana katmandan oluşmaktadır. Epidermis, çoğunlukla keratinositlerden oluşarak su geçirmeyen bir koruyucu katman işlevi görür (Javierre vd., 2008). Dermis, fibroblastların ürettiği hücre dışı matris, kan damarları, sinirler ve bağ dokusu elemanlarını içererek deriye mekanik bir dayanıklılık kazandırır (Supp ve Boyce, 2005). Kolajen ve elastin lifleri, dermisin ana yapısını oluşturarak derinin esneklik ve dayanıklılığına katkıda bulunur (Prost-Squarcioni vd., 2008), (Reihsner vd., 1995).

Deri yaraları oldukça yaygındır ve özellikle kronik yaralar büyük sağlık problemlerine neden olabilmektedir. Yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden epitelizasyon olmak üzere dört aşamadan oluşan karmaşık bir süreçtir (Strodtbeck, 2001). Hemostaz aşamasında kanama durdurulurken pıhtı oluşumu gerçekleşir, inflamasyon aşamasında bağışıklık hücreleri yaraya yönelir. Proliferasyon aşamasında fibroblastlar ve keratinositler yeni doku üretiminde aktif hale gelir. Son aşamada epitel hücreleri yarayı kaplayarak dokunun yeniden onarımını sağlar (Velnar vd., 2009a), (Gurtner vd., 2008). Fakat bu süreç her zaman en iyi şekilde sonuçlanmaz. Diyabet gibi bazı hastalık durumları iyileşme sürecini uzatırken, bazı vakalarda aşırı yara izi oluşumu gözlemlenebilir (Dong vd., 2017). Bu nedenle, yara iyileşmesini hızlandıracak ve doku fonksiyonlarının geri kazandırılmasını sağlayacak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır. Günümüzde doku mühendisliği ve biyomateryaller, yara tedavisinde önemli bir potansiyel sunmaktadır (Hodge vd., 2022).

Yara iyileşmesine dair araştırmalar, deney hayvanı kullanımlarını azaltmak amacıyla *in vitro* testlerin yapılmasını önemli kılmaktadır. Bu testler, belirli bileşiklerin etkisini ve genetik değişikliklerin iyileşme süreçlerine etkisini incelemekte mükemmel bir yöntem sunar. Yara iyileşme süreci, sadece iki boyutlu hücre kültürü ile sınırlı değildir; üç boyutlu *in vitro* modeller, hücre-matriks-hücre etkileşimleri nedeniyle daha

fazla ilgi görmektedir (Stamm vd., 2016). Hayvan refahına yönelik artan hassasiyetler ve Avrupa Birliği bünyesindeki araştırma merkezlerinde 3R kurallarına (Hayvan kullanımında Yerine Koyma, Azaltma, İyileştirme) uyulmasının zorunlu hale gelmesi, birçok firmanın farmasötik, deri bakım ve kozmetik ürünlerinin *in vitro* etkinliğini değerlendirmek amacıyla deri modeli alternatifleri geliştirmesine neden olmuştur. Böylelikle hayvan derisinin zarar görmesine ilişkin uygulamalara olan duyarlılık azalır. Ayrıca, deri modelleri deri hastalıklarının temel etkenlerinin tespitinde de yararlı bir rol oynamaktadır. Bir deri modeli tasarlarırken, biyomimetik bir yapının oluşturulmasında fizyolojik, kimyasal ve fiziksel unsurların göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Suhail vd., 2019a). Yara iyileşmesinde uygulanan yöntemler arasında pansumanlar, büyüme faktörleri ve hücre odaklı ya da hücre dışı yaklaşımlar yer alır. Özellikle doğal polimer bazlı biyomateriyaller, biyouyumlulukları ve düşük toksik etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir. (Fadilah vd., 2022). Ayrıca, büyüme faktörleri hücresel çoğalmayı artırarak iyileşme sürecini hızlandırır (Barrientos vd., 2008).

Rejeneratif tıp, hasar görmüş dokuların yeniden yapılandırılmasını amaçlayan çok disiplinli bir alandır. Hücre tedavileri, biyomateriyaller ve doku mühendisliği teknikleri ile doku fonksiyonlarının yeniden kazanılması hedeflenmektedir (Atala, 2008). Bu kısım da *in vitro* yara modelleri, özellikle 3B hücre kültürü sistemleri, hücre-matris etkileşimlerini daha gerçekçi bir şekilde incelemeye olanak tanır (Duval vd., 2017).

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), Cannabaceae ailesine mensup, çeşitli kullanım alanları bulunan ve tarih boyunca tıbbi amaçlarla kullanılan tek yıllık bir bitki türüdür (ElSohly vd., 2017). Kenevir, M.Ö. 8000 yılından beri çeşitli amaçlarla yetiştirilmektedir: tıpta, tekstil alanında, ip yapımında kullanılmaktaydı. 19. yüzyılda doktorlar, sindirim problemleri ve mide bulantısı gibi rahatsızlıklar için bile onu reçetelendirmekteydi (Russo, 2007). Fakat 20. yüzyılda esrarın eğlence amaçlı kullanımını ve tıbbi yönlerini denemede kısıtlamalar getirildi (Adrian, 2015). Kesin bir taksonomi üzerinde anlaşma sağlanmamış olsa da, marihuananın üretiminde kullanılan bitkinin, daha geniş Cannabis cinsindeki bir tür (*Cannabis indica*) veya *Cannabis sativa* türünün bir alt türü (*C. sativa subsp. indica*) olduğu düşünülmektedir. Kenevirden elde edilen ürünlerdeki bitki, ilk taksonomide *Cannabis sativa* veya ikinci durumda *C. sativa subsp. sativa* olarak sınıflandırılmaktadır (Small ve Cronquist, 1976). Kenevir, tarihsel

olarak hem tıbbi hem de endüstriyel alanlarda kullanılan bir bitkidir (ElSohly vd., 2017). Bitkide bulunan en önemli bileşiklerden birisi olan kanabidiol (CBD), psikoaktif bir etkisi olmadan çeşitli biyolojik aktiviteler taşımaktadır (Chelminiak-Dudkiewicz vd., 2022).

CBD, endokannabinoid sistemi üzerinden etki eder. Bu sistem; CB1 ve CB2 reseptörleri ile bunlara bağlanan ligandlardan oluşur ve hücresel dengeyi sağlar (Maccarrone vd., 2015). Özellikle CB2 reseptörünün aktivasyonu, inflamasyonu azaltarak yara iyileşmesini destekler (Correia-Sá vd., 2020). CBD, inflamasyonu düşürerek IL-6 ve IL-8 seviyelerini azaltırken IL-10 seviyesini artırır (Parikh vd., 2024). Aynı zamanda VEGF düzeylerini yükselterek yeni damar oluşumunu teşvik eder (Solinas vd., 2012). Fibrozisi azaltarak yara izi oluşumunu sınırlandırması ve fibroblast ve keratinosit göçünü artırması da dikkate değer etkilerindendir (Shah vd., 2024a). Bununla birlikte CBD'nin antibakteriyel özellikleri, enfeksiyon riskini azaltmaya yardımcı olurken, makrofaj polarizasyonunu düzenleyerek iyileşme sürecini hızlandırdığı bildirilmiştir (Niyangoda vd., 2024a). Ayrıca diyabetik yara modellerinde yeniden epitelizasyonu artırdığı da tespit edilmiştir (Solinas vd., 2012).

Tıbbi kenevirden üretilen CBD, Δ^9 -THC'nin aksine kötü niyetle kullanılan bir madde olarak değerlendirilmemekte ve ayrıca yasal olarak düzenlenmediği için, bu durum CBD yağı, tentürleri ve buharları gibi CBD içeren ürünler pazarında hızlı bir artışa neden olmuştur. Bu, sağlık açısından bazı riskler doğurmuştur. Bu tür ürünler için bir düzenleme olmayışı, hastaların ürün kalitesi, CBD'nin etkili dozu, saflığı veya terapötik etkinlikte meydana gelebilecek kimyasal veya mikrobiyolojik kontaminasyon hakkında yeterli bilgiye sahip olamadığını göstermektedir (Pisanti vd., 2017). Küresel politik değişimler, kenevir ve onun ana bileşeni olan kannabidiol (CBD) içeren ürünlerin daha erişilebilir olmasına yardımcı olmuştur. CBD ürünleri sektörü, kısmen CBD'nin farklı sağlık sorunları için etkili bir tedavinin tanıtılmasının sonucu olarak büyük bir gelişim göstermiştir. Ancak ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yalnızca bir CBD ürünü (Epidiolex®) onaylanmıştır. Tüketiciler ve bilim dünyası, FDA onayı almayan kullanımlar da dahil olmak üzere CBD'nin tedavi edici potansiyeliyle büyük bir merak içindedir (Sholler vd., 2020). Klinik öncesi veriler, CBD'nin epilepsi, anksiyete bozuklukları, şizofreni, nörodejeneratif hastalıklar ve inflamasyon gibi birçok hastalığın tedavisindeki potansiyel faydasını desteklemektedir (Pisanti vd., 2017).

Vücutun her yerinde yer alan endokannabinoid sistemi, homeostazın sağlanmasında ve farklı hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır. CBD'nin deriye etkili bir şekilde ulaşmasını sağlamak ve özelliklerini en üst düzeye çıkarmak için çeşitli stratejiler ve dağıtım sistemleri geliştirilmiştir. CBD'nin dermatolojik faydaları hakkında mevcut bilgilere rağmen, tedavi mekanizmaları hala sınırlı kalmaktadır. Klinik araştırmalarda, özellikle güvenlik ve düzenleme alanında en düşük etkili dozla ilgili birçok boşluk bulunmaktadır (Ferreira vd., 2023a). Kenevirin sistemik etkileri iyi anlaşılmış olsa da yara iyileşmesi üzerindeki etkilerine dair literatürde önemli bir eksiklik bulunmaktadır (Cohen ve Weinstein, 2018a).

CBD'nin yaraların iyileşmesinde inflamasyonun kontrol altına alınması, hücre çoğalmasının teşvik edilmesi ve doku yenilenmesinin desteklenmesine dair çeşitli etkileri mevcuttur. Ancak bu konu üzerine gerçekleştirilen araştırmalar kısıtlıdır ve mekanizmaların daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Massi vd., 2006a).

Bu çalışmada, yara iyileşmesi, CBD'nin biyolojik etkileri ve üç boyutlu (3B) deri modelleri üzerine yapılan çalışmalar hakkında literatür ve araştırma konusu ile ilgili boşluklar özetlenmiştir. CBD'nin yara iyileşmesi üzerine etkileri tez çalışmasında geliştirilen *in vitro* 2B keratinosit modeli, 3B tam katmanlı deri ve 3B epidermal modeller üzerinde oluşturulan yaralar üzerinde moleküler biyoloji ve mikroskopi analizleriyle gösterilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan yöntem ve elde edilen sonuçlar, CBD'nin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisinin geliştirilen modeller üzerinde doğrulanması ve gösterilmesi açısından önemli olup, ileride deri modelleri üzerinde yapılabilecek yara ve iritasyon testlerinin geliştirilmesi çalışmalarına metodolojik referans olacak niteliktedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölüm kapsamında, araştırmanın tekrarlanabilirliği açısından kritik öneme sahip olan kaynaklar, ilgili alt başlıklar altında yapılandırılmıştır.

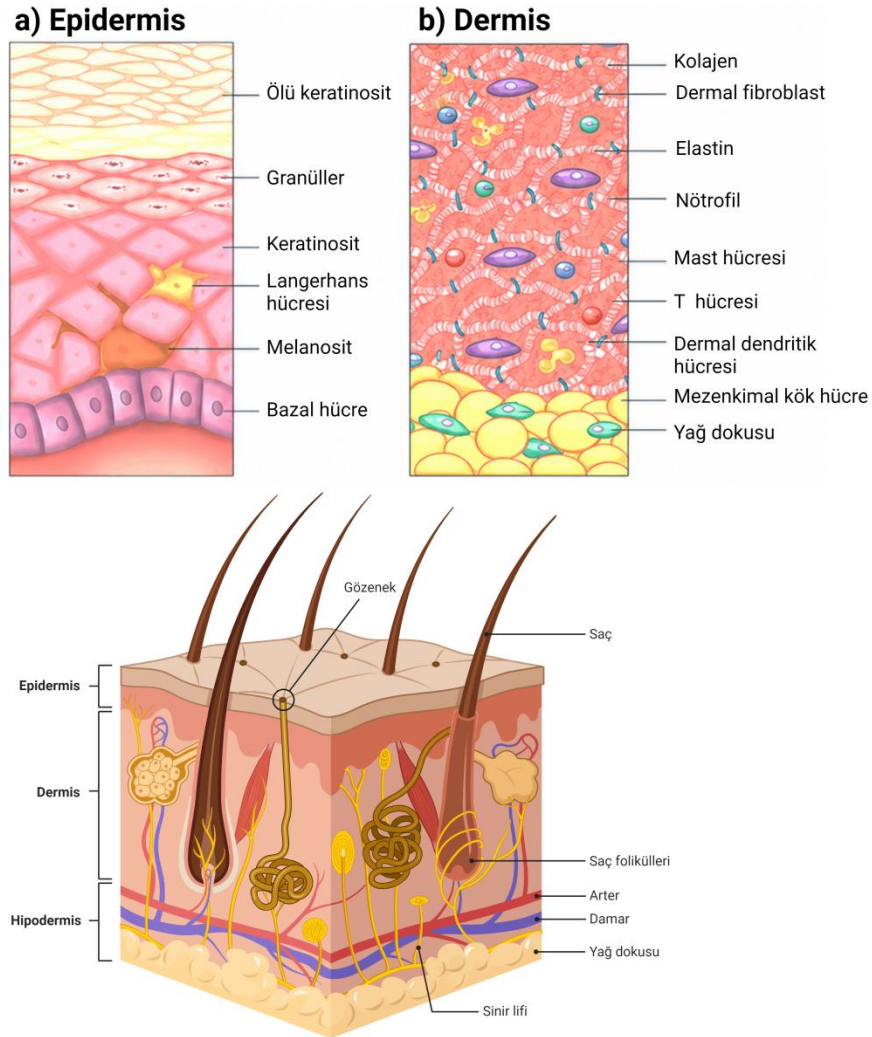
2.1. Derinin Anatomik Yapısı

Deri, vücudumuzun en büyük organıdır ve dışarıdaki mikroplara karşı koruyucu bir engel işlevi görür, ayrıca su kaybını önler. Derideki yaralar oldukça sık görülür ve bu durum yüksek ölüm ve hastalık oranlarıyla bağlantılıdır. (Dong vd., 2017). Deri üç katmandan oluşur: epidermis, dermis ve hipodermis (Şekil 2.1.). Derinin dış tabakası olan epidermis, insan vücudunun iç elemanlarını dış ortamdan ayıran su geçirmez bir bariyer görevi görür. Bu yüzden, derinin fiziksel özelliklerine katkısı oldukça azdır. Epidermis, çoğunlukla keratinositlerden meydana gelmektedir; ancak içinde melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri gibi diğer hücre türleri de bulunur (Javierre vd., 2008). Epidermis birkaç katmandan oluşur; stratum korneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum ve stratum bazale. Derinin daha kalın iç tabakası olan dermis yaklaşık 2 mm kalınlığındadır ve bu doku, deriye hem yapısal hem de besin desteği sunar. Temelde fibroblastlar tarafından oluşturulan hücre dışı matristen (ECM) oluşurken (Supp ve Boyce, 2005) aynı zamanda kan damarlarını, lenf damarlarını, kıl foliküllerini, ter bezlerini, kollajen demetlerini, farklı hücre tipleri (çoğunlukla fibroblastlar) ve sinir uçları içerir (Prost-Squarcioni vd., 2008). Dermis, kollajen liflerinin sağlamlık ve sertlik sağladığı, elastinin normal esneklik ve elastikiyeti koruduğu ile proteoglikanların viskozite ve nem sağlayan bir mukopolisakkarit jel işlevi görür. Dermisteki yoğun kollajen ve elastin yapısı, derinin fiziksel niteliklerinin belirleyicisidir (Reihnsner vd., 1995).

2.1.1. Derinin fizyolojisi

İnsanlarda yara iyileşmesi sorunları, gecikmiş iyileşme (örneğin diyabet veya radyasyon maruziyeti), aşırı iyileşme (örneğin hipertrofik veya keloid yara izleri) ya da deri eklerinin eksikliği (örneğin kıl folikülleri veya ter bezleri) şeklinde kendini göstermektedir. Bu nedenle, yara iyileşmesini geliştirmek için etkili bir yol bulmak gereklidir (Dong vd., 2017).

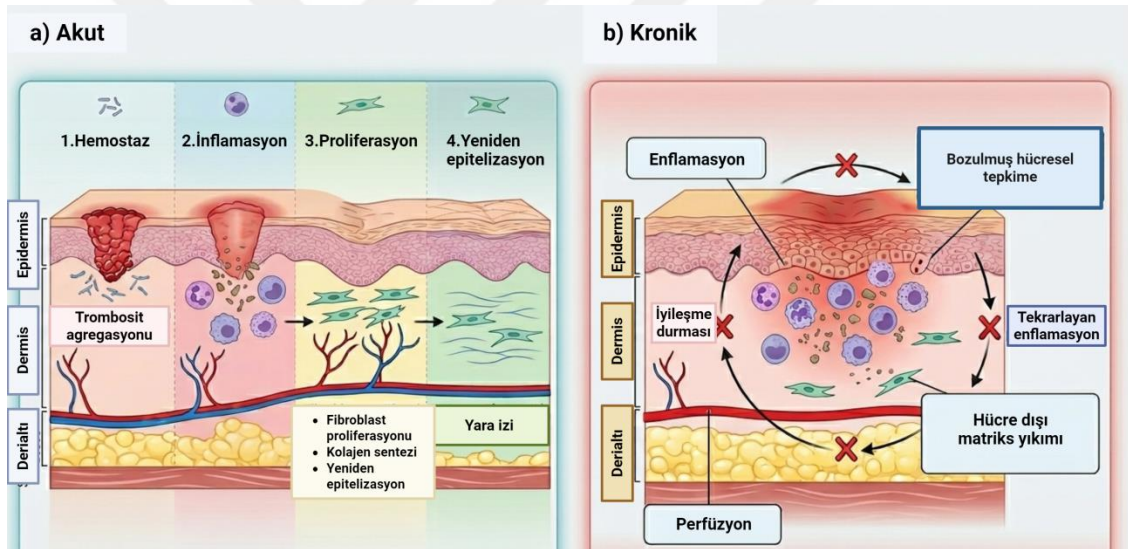
Yara bakımı, gelişmiş ülkelerde halkın büyük bir kesimini etkileyen ve yaşam standartlarını olumsuz yönde etkileyen önemli bir sağlık sorunu olmanın yanı sıra, sağlık sistemlerine de büyük mali yük getirerek dikkat çekmektedir. Son yıllarda teknoloji alanındaki ilerlemeler, yara tedavisinde kullanılan ilaç ve tıbbi cihazlarda önemli gelişmeler sağlamış olsa da, yaranın karmaşık yapısı dolayısıyla yara bakımı ile ilgili deneysel çalışmalar hâlâ büyük bir önem arz etmektedir (Mamun vd., 2024).



Şekil 2.1. Deri tabakalarının yapı açısından genel görünümü. Deri, kök hücreler için önemli kaynak olan iki ana katman içerir: epidermis ve dermis. a) Katmanları sergileyen epidermisin karmaşık düzeni ve b) dermisin hücre yapısı sunulmaktadır (Biorender ile çizilmiştir).

Doku onarımını ve iyileşmenin başarısızlık sebeplerini destekleyen hücresel ve moleküler mekanizmalar henüz yeterince anlaşılmamıştır ve mevcut tedavi seçenekleri sınırlı kalmaktadır (Eming vd., 2014a). Yara iyileşmesi, yeni dokuların oluşumunu ve

anatomik işlevlerin tekrar sağlanmasını hedefleyen bir dizi bağlı olayın dinamik sürecidir (Şekil 2.2.). Ancak yara bakımının karmaşıklığı, sık sık kronik yaraların ortaya çıkmasına neden olabilir ve bu durum şu anda sağlık sistemimizi ciddi şekilde zorlamaktadır. Mevcut tedavi yöntemleri genellikle yetersiz kaldığı için, yeni ve etkili yara tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önemli bir konu olmaya devam etmektedir. Özellikle doku mühendisliği alanı, polimerik biyomateryallerin esnek özellikleri ve kullanım alanları sayesinde son yıllarda büyük bir gelişim göstermiştir. Kimya, biyoloji, fizik ve malzeme biliminin disiplinlerarası birleşimi, biyomateryallere dair anlayışın ilerletilmesi ve yeni yara bakım tekniklerinin geliştirilmesiyle ilgilidir. Bununla birlikte, karmaşık yaraların tedavisi için yeni yara bakım yöntemlerinin daha etkili bir şekilde geliştirilmesi açısından klinik ve malzeme bilimi arasında mevcut olan boşluğun kapatılması gerekmektedir (Hodge vd., 2022).

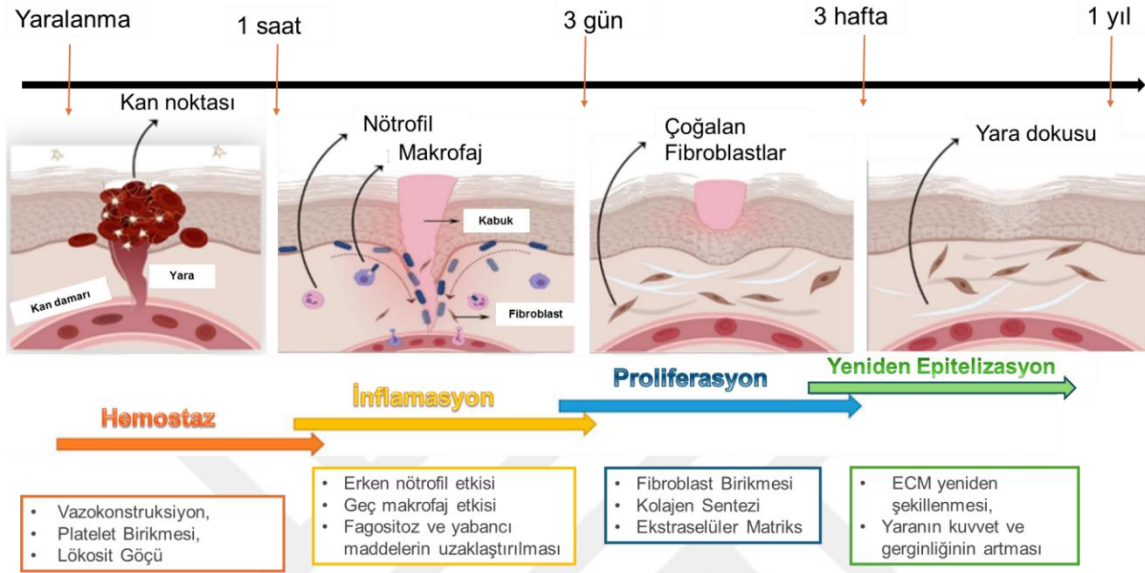


Şekil 2.2. a) Akut Yara: İyileşme süreçlerini standart bir biçimde tamamlayan yaradır. b) Kronik Yara: Sürekli iltihaplanma ve yetersiz hücresel tepki yüzünden normal sürede iyileşmeyen yaradır (Biorender ile çizilmiştir).

2.1.2. Yara iyileşmesinin genel mekanizması

Derideki yaraların iyileşmesi, hücre bazında, humoral ve moleküler mekanizmaların karmaşık ve oldukça organize bir sürecidir; bu süreç yaralanmanın hemen ardından başlar ve yıllar sürebilir (Velnar vd., 2009b). Yara iyileşimi, biyolojik olarak aktif ve yerel etkili bileşiklerin karmaşık kimyasal tepkimelerini ve deri elastikiyetindeki değişikliklerle çekme gücünde artış gibi fiziksel olayları kapsar (Singh

vd., 2017). Yara iyileşme süreci insan vücudunda hemostaz, inflamasyon, proliferasyon (göç veya doku oluşumu) ve yeniden epitelizasyon (olgunlaşma) dahil olmak üzere ardışık dört aşamadan elde edilen normal bir biyolojik ve kendiliğinden kendini onarma sürecidir (Şekil 2.3.) (Strodtbeck, 2001).



Şekil 2.3. Yara iyileşme süreci (Biorender ile çizilmiştir).

2.1.2.1. Hemostaz

Hemostaz sürecinde, yaralı bölgedeki kan damarları, kan akışını azaltmak amacıyla kasılır ve bu sayede açık damar yüzeyinde pıhtı oluşumu gerçekleşir. Yaralanmalar sırasında genellikle kanama gözlemlenir. Bu kanama, yaradan mikropların ya da antijenlerin temizlenmesine yardımcı olmasının yanı sıra, hemostaz mekanizmasını da başlatır. Hemostaz, çeşitli nedenlerle tetiklenir. Deri hücreleri yaralandığında pıhtılaşma faktörleri salgılar ve bu da dış pıhtılaşma aşamasını harekete geçirir (Cooper, 1999). Hemostaz süreci, öncelikle trombosit tıkaçı oluşumuyla başlar; ardından fibrin matrisinin ortaya çıkması, hücrel infiltrasyona zemin hazırlar. İlerleyen süreçte, nötrofiller yarada birikir ve bu durum, kompleman aktivasyonu, trombosit degranülasyonu ve bakteriyel parçalanma ürünlerine cevap olarak gerçekleşir. Yaralanmadan 2-3 gün sonra monositlerin yarada ortaya çıkması ve bunların makrofajlara dönüşmesi gözlemlenir. Makrofajların yaralanma sonrası süreçlerin düzenlenmesinde hayati bir rol üstlendiği düşünülmektedir fakat nötrofillerin ve

makrofajların yara iyileşmesindeki işlevleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Grose ve Werner, 2004).

Trombositlerin aktifleşmesi, doku onarım sürecinin başlamasına yol açar ve çeşitli etkili sitokinlerin serbest kalmasını tetikler (Şekil 2.4). Aktifleşmiş trombositler, yaralardaki açık kollajen liflerine yapışarak yeni ECM bileşenlerinin oluşumunu destekler. Bu sitokinlerin aracılık ettiği bazı süreçler arasında iltihap hücrelerinin yaralanma alanında toplanması ve iltihap yanıtının başlaması, yeni hücrelerin artışı yani epitelizasyon ve kan damarlarının oluşması, yani anjiyogenez bulunmaktadır. Bu sitokinlerin kuvveti ve özel etkileri sayesinde, yaralanma bölgesindeki mikroçevrede yalnızca az miktarda sitokine ihtiyaç vardır (Simpson ve Ross, 1972).

2.1.2.2. İnflamasyon

Enflamatuvar tepki, hasar görmüş dokulardan ve kılcal damarlardan salınan çeşitli maddeler, aktive olmuş trombositler, onların ürettiği sitokinler ve hemostaz sürecinde oluşan ürünler tarafından tetiklenir (Şekil 2.4.). Yaralanmadan birkaç dakika sonra, mikroplarla dolu nötrofiller yaralı bölgeye ulaşır. Nötrofiller, ayrıca yerel fibroblastları ve epitel hücrelerini uyarak yara iyileşmesini başlatır. Monositler, lenfositler ve plazma hücreleri gibi diğer beyaz kan hücreleri de yaralanma alanına gelirken, ilk birkaç gün boyunca öncelikle nötrofiller rol oynar ve eğer yara iltihaplanmazsa kaybolurlar (Strodtbeck, 2001). Enfeksiyon ortaya çıktığında, nötrofillerin sayısı enfeksiyon kontrol altına alınana kadar devam eder. Enfeksiyon yoksa mevcut monositler makrofajlara dönüşerek yaralanma bölgesinde temel fagositik hücre haline gelir. Makrofajların, yaraların iyileşme sürecinde önemli bir işlevi bulunur. Bunlar, hayatta kalan mikropları, ölü nötrofilleri, fibrin pıhtılarını ve diğer hücre atıkları sindirirken, yara iyileşmesini başlatmak amacıyla nitrik oksit üretir ve sitokinler salgılar (Gallucci vd., 2001). Yara iyileşmesinin iltihap dönemi sırasında önemli bir mekanizma olarak serotonin, bradikinin, prostaglandinler ve histamin gibi vazoaaktif bileşenlerin etkileri ortaya çıkar. Bu bileşenler, yaralanma bölgesindeki endotelin geçirgenliğini ve kan akışını artırır. Artan geçirgenlik, bağışıklık ve onarım hücrelerinin bölgeye girmesini kolaylaştırırken, artan kan akışı da oksijen dağılımını iyileştirir. Sonuç olarak, yarada bir sıcaklık artışı yaşanırken, yaraya sıvı sızmaya başlar. Klinik olarak bu durum, derideki kızarıklık ve şişlik meydana getirir, ancak yaranın içindeki

sıcak ve nemli ortam, iyileşmenin bir sonraki aşaması için gereklidir. Yara iyileşmesinin iltihaplı dönemi sona erdiğinde, kanama kontrol altına alınır ve yara temizlenir. Bu durum, hücrelerin bölünüp onarılması için en uygun koşulları oluşturur (Simpson ve Ross, 1972).

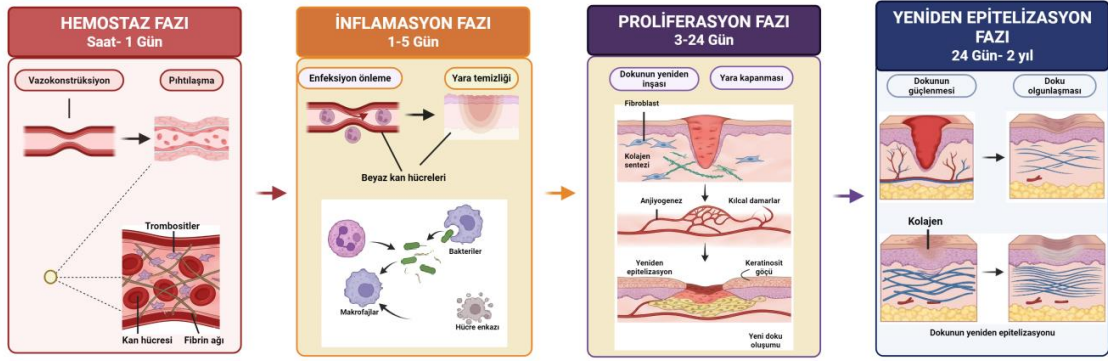
2.1.2.3. Proliferasyon

Amaç, yara alanını yeni bir deri ile kaplamak, bölgedeki kan damarlarının bütünlüğünü yeniden sağlamak ve doku hasarını yeni bağ dokusuyla doldurarak yapının bütünlüğünü geri kazanmak olarak tanımlanır. Bu aşamada yara, gerginlik kuvvetinin etkisiyle büyümeye başlar. Bu süreçte en önemli hücreler fibroblastlar ve keratinositlerdir. Yaranın sıcak ve nemli atmosferi, hücrelerin çoğalmasını ve onarımını da destekler (Strodtbeck, 2001). Fibroblastlar, kollajen liflerini üretir. Kollajen, yaranın uyuşmasına ve gerilmesine neden olur. Bu aşamada epitelizasyon ve büzülme süreci gelişir. Doku hasarına büyük ölçüde doku kaybı eşlik ettiğinde, yaranın kenarlarında yenileme süreci başlar (Şekil 2.4.). Epitel, granülasyon dokusundan meydana gelir. Bu göç süreci, epitel dokular birleşene kadar devam eder. Bir sonraki aşama büzülme aşamasıdır. Yara küçüldükçe, yaranın boyutu da düşer. Bu duruma esas olarak miyofibroblastların neden olduğu görülmektedir. Granülasyon dokusu oluştuğunda ve epitelizasyon tamamlandığında, proliferatif faz sona erer (El Ayadi vd., 2020).

2.1.2.4. Yeniden epitelizasyon

Yaranın epitel hücreleriyle yeniden kaplanma süreci, kan hücrelerinin derideki hasarlı alanı tamamen kapladığında başlamaktadır. Epidermisin en çok bulunan hücre grubu olan keratinositler, yaraların çevresinde yoğun bir şekilde bölünme gösterirler. Yerel olarak salınan büyüme faktörleri aracılığıyla harekete geçen keratinositler hızlı bir şekilde çoğalır ve yaralanmadan sonraki 12 ile 24 saat içinde yara yüzeyine doğru hareket etmeye başlar. Genellikle çoğalma alanı, lezyona yakın bir konumda bulunduğu için yeni oluşan keratinositlerin bu onarım bölgesine ulaşması gerekir. Bu hareket, sıvı bir ortamda gerçekleşir ve çeşitli büyüme faktörlerinin neden olduğu yönlendirici kimyasal değişikliklerin oluşturduğu karmaşık aşamaları içerir. Sıvı bir yüzeyin yokluğunda, keratinositler ihtiyaç duydukları nemi bulmak amacıyla proteolitik enzimler salgılayarak kendilerini hareket ettirebilirler (Stallmeyer vd., 1999). Bu aşama

süresince yaralanma sonrası gelişen tüm süreçler yavaşlar ve duraklama yaşar. Çoğu endotele hücresi, makrofajlar ve miyofibroblastlar programlanmış hücre ölümü geçirir ya da yaradan ayrılır ve geride esas olarak kollajen ile diğer hücre dışı matris proteinlerinden oluşan sınırlı bir hücresel kütle bırakır. Epitelyal ve mezenkimal etkileşimlerin derinin bütünlüğünün ve homeostazisinin sürekli olarak ayarlandığı düşünülmektedir. Ayrıca, diğer deri hücre türlerinin korunması için ek önerilerde bulunulmalıdır. Bununla birlikte, hücresel matris, 6-12 ay içerisinde büyük ölçüde tip III kollajen yapısından tip I kollajen yapısına aktif olarak dönüştürülür. Bu süreç, fibroblastlar, makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından üretilen matris metaloproteinazlar aracılığıyla gerçekleştirilir ve iyileşmiş dokunun güçlenmesine katkıda bulunur (Şekil 2.4.). Ancak, doku asla sağlıklı derinin tüm özelliklerini tam olarak geri kazanamaz (Gurtner vd., 2008).

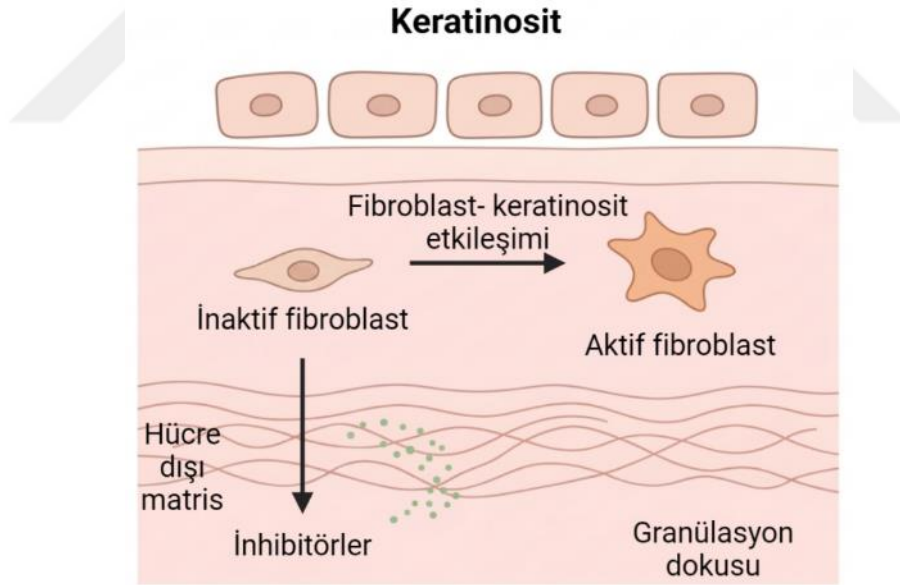


Şekil 2.4. Yara iyileşme sürecinin dört aşaması (Biorender ile çizilmiştir).

Derideki hasarın bulunduğu bölgede, uzun süreli iltihabi süreç, doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasını geciktirir ve bu da iyileşme sürecini olumsuz etkiler. Yara bölgesindeki doku bütünlüğünü geri kazandırmayı hızlandıran önemli bir unsur, deri hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını tetikleyerek iyileşme sürecini hızlandıran TGF β faktörüdür (Deng vd., 2024; Kiritsi ve Nyström, 2018a). Deri bütünlüğü, yaralanma, cerrahi müdahale ve diğer kimyasal ya da patolojik etkilerle zarar görebilir, bu nedenle hemen onarılması şarttır. Deri yaralarının iyileşmesi, periferik kan mononükleer hücreleri, yerleşik deri hücreleri, hücre dışı matris, sitokinler, kemokinler ve birçok düzenleyici molekül gibi farklı hücre türlerinin ve büyüme faktörlerinin uyumlu bir şekilde etkileşime girmesini gerektirir (Bensa vd., 2023; Eming vd., 2014b).

Dermal fibroblastlar, yara iyileşmesi sırasında ekstraselüler matrisin yeniden yapılandırılmasından sorumlu olan başlıca hücrelerdir ve başlangıçta oluşan fibrin pıhtısını hyaluronik asit, fibronektin ve proteoglikanlarla değiştirip daha sonra olgun kolajen lifleri ile yer değiştirir (Şekil 2.5.) (Berthiaume vd., 2011a). Epidermal keratinositler ile dermal fibroblastlar arasındaki hücresel etkileşim, deri sağlığının korunması ve yara iyileşmesi açısından son derece önemlidir (Amiri vd., 2022a; Zhong vd., 2010).

Yara iyileşmesi, granülasyon bağ dokusunun epitelik yara kapanması ile yeniden sağlanan bariyer işlevini yeniden kazandırmayı hedefler. Son dönemlerde, dışardan alınan keratinositlerin yeniden epitelizasyon sürecini ve deri yaralarının iyileşmesini desteklediği kanıtlanmıştır. Dermal fibroblastlar, keratinositler ve dermal ECM arasında etkili etkileşimlerin normal yara iyileşmesi ve deri yenilenmesinde önemli bir katkı sağladığına dair kanıtlar artmaktadır (Jevtić vd., 2020).



Şekil 2.5. Deri yara iyileşme diyagramı (Biorender ile çizilmiştir).

Fibroblastlar ve keratinositler, deri onarım ve yenilenme sürecindeki inflamatuvar aşamaya yanıt veren başlıca hücre türleridir. İnflamatuvar sinyaller, yaraların iyileşmesi için bu iki hücre türünün çoğalma ve olgunlaşma süreçlerini tetikler (Barrientos vd., 2008; Shaw ve Martin, 2009). Ayrıca, keratinositler ve fibroblastlar, yaralanma sonrası normal doku dengesini yeniden sağlamak için eylemlerini koordine eden çapraz iletişim

veya dinamik etkileşim denilen çift parakrin sinyalleşme döngüleri aracılığıyla birbirleriyle haberleşirler (Schultz vd., 2011). Akut yara iyileşmesinin ilk aşamasında, yaralı bölgedeki inflamatuvar hücrelerden gelen sinyaller, fibroblastların yara kenarlarından içeriye doğru hareket etmesini destekler (Shaw ve Martin, 2009). Fibroblastlar, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF/FGF-2) (Schultz vd., 2011), keratinosit büyüme faktörü (KGF/FGF-7) (Martin, 1997; Singer ve Clark, 1999; Werner vd., 2007), vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGF-A) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) (Edmondson vd., 2003; Reiss ve Sartorelli, 1987) gibi parakrin faktörler üretir ve bunlar çevresindeki keratinositlere sinyal iletmektedir. Ayrıca, keratinositlerden ve inflamatuvar hücrelerden gelen parakrin sinyallere tepki olarak fibroblastlar kolajen sentezler, hücre dışı bir matris oluşturmak için çapraz bağlanmayı artırır ve yara kapanmasını desteklemek üzere miyofibroblastik bir fenotipe dönüşür (Heng, 2011). Keratinositler, iyileşmeye katkı sağlayan çeşitli hücre tiplerinin etkilerini toplar, harekete geçirir ve koordine eder, ayrıca derinin epidermal bariyer tabakasını yeniden inşa eder. Bariyerin zarar görmesi durumunda keratinositler, hem otokrin hem de parakrin sinyal görevini üstlenen, keratinositlerin hareketini ve çoğalmasını artıran ve çevredeki hücreleri iyileşme sürecine dahil olmak üzere harekete geçiren depolanmış interlökin 1 (IL-1) salgılar (Barrientos vd., 2008). IL-1, fibroblastların KGF üretimini artırarak keratinositlerin çoğalmasını ve göçünü teşvik ettiğinden, çift parakrin sinyalleşmesine bir örnek sunmaktadır (Maas-Szabowski vd., 2001). Ayrıca keratinositler, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (Barrientos vd., 2008). ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) (Werner vd., 2007) gibi anjiyojenik büyüme faktörleri de salgırlar; bunlar yarada endotel hücrelerinin hareketini ve yeni damar oluşumunu tetikler (Bao vd., 2009) ve PDGF aracılığıyla fibroblast çoğalmasını ve hücre dışı matris üretimini destekler. Normal derideki, fibroblastlar ve keratinositler tarafından salgılanan büyüme faktörleri ve sitokinler, doku dengesinin korunmasında hayati öneme sahiptir ve bu üyelerin koordineli çapraz iletişimi, yaraların tamamen iyileşmesi için gereken hücrelerin toplanmasına zemin hazırlar.

2.1.3. Pansuman bazlı yara tedavisi

Yara pansumanıyla ilgili en son gelişmeler, biyomedikal alanlarda nanopartiküllerin ve nanomateryallerin kullanımını destekleyerek doğal polimer bazlı pansumanların üretilmesine yardımcı olmuştur (Fadilah vd., 2022). Bunun nedeni, alerji

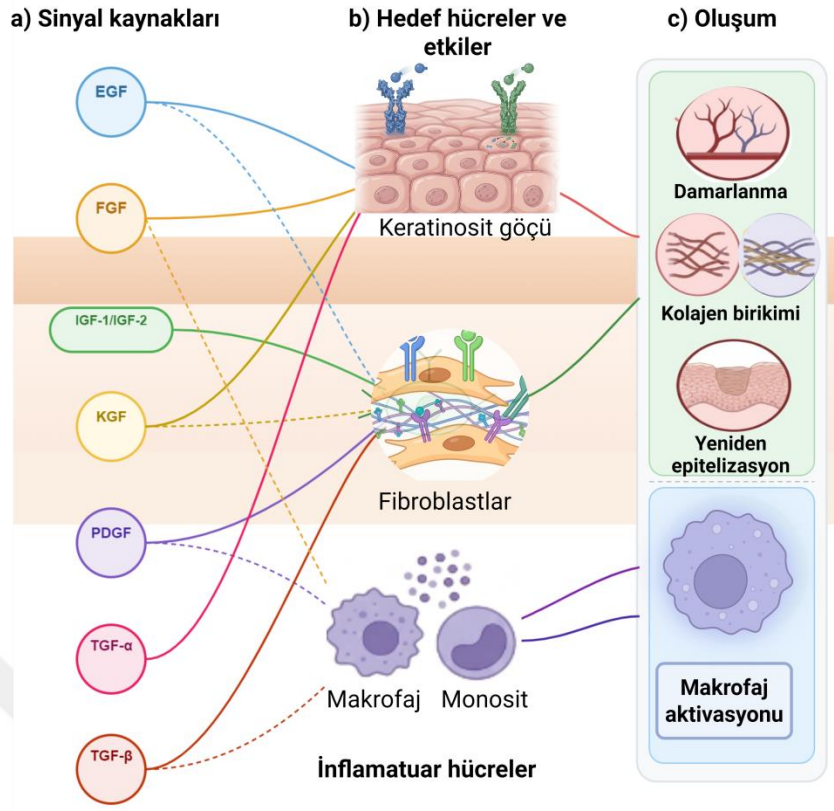
yapmaması, uyum sağlama yeteneği, doğal olarak çözünme özelliği ve düşük toksik düzeyleri gibi mükemmel özelliklere sahip olmasıdır. Yara iyileşmesinde çeşitli zorluklar bulunmaktadır; enfeksiyon dışındaki sebepler hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır. Bu zorluklar arasında yaranın boyutu ve konumu, hastaların hissettiği ağrı düzeyi ve pansuman bakımıyla ilgili belirli uygulamalar üzerindeki kısıtlamalar yer alır. En ideal senaryoda, yeni yara pansumanlarının tasarımında; pansumanın uygulanma veya çıkarılma kolaylığı, yaşam kalitesinin yükseltilmesi ve yara bakımında ağrının belirlenip azaltılması konularında çalışmalar yapılmalıdır (Berthiaume vd., 2011b).

2.1.3.1. Büyüme faktör tedavisi

Yara iyileşme aşamasında, salgılanan moleküller veya büyüme faktörleri, biyolojik süreç için önemli olan sinyal iletimini başlatarak veya engelleyerek hayati bir işlev üstlenmektedir. Bu sebepten ötürü, bu moleküller yara tedavisinde destekleyici bir yöntem olarak kullanılabilir. İyileşme sürecinde epitelleşmeyi etkileyen önemli büyüme faktörleri arasında transforme edici büyüme faktörü (TGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) yer almaktadır (Şekil 2.6.) (Barrientos vd., 2008).

Tablo 2.1. Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri

SİTOKİN	AMAÇ/ İŞLEV
Epidermal büyüme faktörleri (EGF)	Keratinositlerin bölünmesi ve hareketi; yaraların yeniden epitel hücreleriyle kaplanmasını teşvik eder; yeni damar oluşumunu sağlar.
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Keratinositler ve fibroblastların bölünmesi ve hareketi; kollajen üretimini artırır, damarlanma oluşumunu destekler.
İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1, IGF-2)	Keratinositlerin bölünmesini sağlamaktadır.
Keratinosit büyüme faktörü (KGF)	Keratinositlerin bölünmesi; monositlerin aktive olmasına yardımcı olur.
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)	Fibroblastlar ve diğer hücreler için kemo-çekici; hücrelerin sayısının artması, yaranın küçülmesi gözlemlenir.
Dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α)	Keratinositlerin bölünmesi ve hareketi; iltihap hücrelerinin düzenlenmesine yardımcı olmaktadır.
Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β)	Fibroblastlar ve makrofajlar için kemo-çekici; keratinositlerin hareketi; fibroblast matrisinin sentezine ve yeniden yapılandırılmasına olanak tanımaktadır (Strodtbeck, 2001).



Şekil 2.6. Yara iyileşmesinde sitokin sinyal ağı a) sinyal kaynakları, b) hedef hücreler ve etkiler, c) biyolojik oluşum (Biorender ile çizilmiştir).

2.1.3.2. Deri ikameleri

Deri yerine geçen materyaller, tedavi sürecinde iyileşmiş olmayan kronik yaraların iyileştirilmesi için uygundur; bu tür yaralar, daha derin olmasının yanı sıra, daha geniş alanlara sahip veya başka faktörler sebebiyle iyileşmeyen daha küçük yaralar için de etkilidir (Auger vd., 2009a). Yeniden epitelizasyon, fibroblastların kollajen ve matris üretmeye başlaması ile dermisin onarımı için etkinleşmektedir. Biyolojik deri ikameleri, derinin yenilenmesi ya da iyileşmesi sırasında yahut geçici bandajlar olarak kalıcı destekler olarak (Halim vd., 2010). Nakledilen deri ikamesi, otolog deri grefti gibi işlev görerek hasarlı alanı destekler ve hem fizyolojik hem de mekanik dayanıklılık açısından normal deri fonksiyonunu sunar. En uygun deri ikamesi, bağışıklık veya toksik etkiler taşımamalıdır; biyoyumlu olmalı ve hastalık bulaşma riski düşük olmalıdır. Ayrıca, deri yerine geçen malzemelerin diğer faydaları şunlardır: (a) mikrobiyal enfeksiyonlardan koruma sağlaması ve buhar, su, protein ile elektrolit kaybını en aza indirmesi; (b) Geciktirme: yara debridmanı sonrasında kapatılana kadar

ve deri grefti uygulanana kadar yarayı kapama amacı taşımaktadır; (c) Teşvik: deri matrisini sunarak iyileşme sürecini destekleyebilen, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerini serbest bırakarak gerçekleştirir; (d) İyileşme aşamasında yaraya dahil edilen çeşitli biyomateryaller kullanılarak deri kollajeni veya kültür hücreleri ile yeni anatomik deri yapılarının inşa edilmesi ve deri fonksiyonunun geri kazandırılmasıdır (Shakespeare, 2005).

Akut yaralar tedavi edilirken deri yenileyici ürünler kullanılmasına rağmen, hiçbir ürün hasara uğramış derinin tam yerini alamaz (MacNeil, 2007). Her bir deri değiştirme ürünü, hastanın sağlık durumu ile bağlantılı özel avantaj ve dezavantajlar içerir: (a) epidermal, (b) deri, (c) çift katmanlı ve (d) amniyotik membran. Epidermal birinci derece yaralar, yüzeysel ya da derin deri yaraları; ikinci derece yaralar, çift katmanlı veya tam kat üçüncü derece yaralar; ve amniyotik ise keskin yaralar olarak sınıflandırılabilir (Goodarzi vd., 2018).

2.1.3.3. Hücresel yaklaşımlar

Hücre bazlı tedavi, oldukça kolay bir yöntemdir ve ani yaralanmalarda hastalar üzerindeki cerrahi yükü hafifletme potansiyeline sahiptir. Terapi amaçlı kullanılan hücreler, yenilenme kapasitelerini artırarak önemli bir alternatif sunabilirler. Bunun sebebi, hücrelerin yüksek miktarda çoğalma yeteneği, farklı hücre türlerine dönüşebilme kapasitesi ve yara iyileşmesi açısından kritik olan çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri üretme yetenekleridir. Ancak her yöntemin ayrı avantajları ve sınırlılıkları mevcuttur; çünkü hücre bazlı deri ikameleri genelde uzun bir üretim aşaması gerektirdiğinden, hastalar uzun bekleme süreleri ile karşılaşabilmektedir (J. Y. Kim ve Suh, 2010).

2.1.3.4. Hücresel olmayan yaklaşımlar

Yara iyileşme süreci, hücreler arası dinamik etkileşimlerin yanı sıra extracellüler matris (ECM) ve büyüme faktörlerini içerir. ECM, dermisin temel bileşeni olarak kabul edilen hücresel olmayan bir yapı olarak tanımlanır ve fibronektin, kollajen, laminin, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve diğer yapısal olmayan matris hücre proteinlerini barındırır. Yaralardaki proteolitik dengesizlik, iyileşme ve yenilenme için kritik öneme sahip olan ECM bileşenleri, reseptörleri ve büyüme faktörlerinin işlevlerinin bozulmasına yol açar. Bu durum, hücrelere yapısal bir destek sağlarken,

yaralanma sonrası hücrelerin çoğalmasını ve göçünü artırmak için etkili büyüme faktörlerinin bir depolama alanı olarak işlev görmesine olanak tanır (Schultz ve Wysocki, 2009).

Dermal fibroblastlar, kutanöz rejenerasyon sürecinde yer alan başlıca hücrelerdir ve hücre çoğalması/göç oranları, miyofibroblast oluşum yetenekleri, ECM üretimi ve inflamatuvar işaretçilere karşı gösterilen tepkiler gibi birçok konuda fetal ve yetişkin deri arasında farklılıklar mevcuttur (Li vd., 2015).

Keratinositler ve fibroblastların yara iyileştirme özelliklerinden faydalanmak amacıyla, bu hücreleri kullanan biyomühendislik ürünleri kronik yaraların tedavisi için tasarlanmıştır. Yara bölgesine uygulandıklarında, bu hücreler iyileşmeyi destekleyen sinyal molekülleri, büyüme faktörleri ve hücre dışı matris proteinleri sağlar. Ticari olarak bulunan tedavi seçenekleri arasında keratinositleri (örneğin EpiCel), fibroblastları (örneğin Dermagraft) veya her ikisini de içeren ürünler (örneğin Apligraf) bulunmaktadır (Auger vd., 2009b).

Yara bakımı, gelişmiş ülkelerde nüfusun geniş bir kesimini etkileyen ve yaşam standardını olumsuz etkileyen önemli bir sağlık sorunu olmanın yanı sıra, sağlık sistemleri üzerinde de ciddi bir mali yük oluşturmaktadır. Son yıllarda teknolojiye gelişmelerle birlikte yara bakımında kullanılan ilaçlar ve tıbbi cihazlarda kayda değer ilerlemeler sağlanmış olmasına rağmen, yaranın karmaşık yapısı nedeniyle deneysel araştırmalar hala büyük önem taşımaktadır (Mamun vd., 2024).

Tarihsel süreçte eski medeniyetler, yaraları çeşitli doğal malzemeler, bitkiler, su veya diğer sıvılar (yağlar, süt, bira ve şarap gibi), metal oksitler ve çevrede bulunan diğer kaynaklarla tedavi etmişlerdir (Sanjarnia vd., 2024).

Antik dönemlerde yaraların bakım ve iyileşmesi konusunda farklı yöntemler geliştirmiştir. Mısırlılar yaraları bal ve süt gibi maddelerle tedavi ederken, Yunanlılar ise yara iyileşmesinde hijyen ve temizlik kavramlarının önemine dikkat çekmişlerdir. Orta Çağ'da yaraların tedavisi genellikle dinî ritüeller ve doğal bileşenler kullanılarak yapılmaktaydı. Yaralara bitkisel preparatlar ve zaman zaman cerrahi müdahaleler uygulanmıştır. Rönesans döneminde tıptaki bilimsel gelişmeler iyileşme süreçlerini etkilemiştir. Mikroskop sayesinde mikroorganizmaların yaralarda enfeksiyona yol

açabileceği anlaşılmıştır. Modern Tıp Döneminde (19. yüzyıl) Louis Pasteur ve Robert Koch gibi bilim insanlarının mikrobiyoloji üzerine yaptıkları çalışmalar, enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde modern tıbbın önemli bir dönüm noktasını oluşturmuştur (Sanjarnia vd., 2024).

Son yıllarda yara bakımında hidrojel, kök hücreler, antibiyotikler gibi farklı tedavi unsurlarının ve işlevsel yara pansumanlarının kullanımıyla iyileşme süreci desteklenmekte ve hızlandırılmaktadır. Uygun bir yara ortamı, malzemenin bakteri öldürücü, pH, nem, oksijen, besinler ve hücresel bileşenler (kalsiyum, hidrojen peroksit, bakır, demir vb.) açısından zenginleştirilmesi ile sağlanabilmektedir. Sonuç olarak, canlılık etkiler göstermeden daha yüksek iyileşme oranları, yeniden epitelizasyon ve anjiyogenezi teşvik ederler. Yara tedavisinde malzeme özelliklerinin yanı sıra, spesifik ihtiyaçlara yönelik karmaşık şekillere sahip malzemelerin kullanılması gerektiğinde, kişiye özel hidrojellerin hızlı ve doğru bir şekilde üretilmesinde üretim teknolojisinin önemi büyük bir rol oynamaktadır (Suhail vd., 2019b). Günümüzde, yara gelişimi ve iyileşmesi hakkında edindiğimiz bilgiler, bilimsel araştırmalar ve teknolojik yenilikler sayesinde sürekli olarak gelişmektedir. Yara iyileşmesinde kullanılan malzemeler ve yöntemler, her geçen gün daha etkili ve hızlı sonuçlar almak amacıyla güncellenmektedir.

Geleneksel yara bantları, 19. Yüzyılın 1800'lü yıllarında ortaya çıktığından beri, kullanım kolaylığı, maliyet etkinliği ve üretim kolaylığı sebebiyle oldukça yaygındır. Bu tür bandajlar arasında gazlı bez, bandaj ve alçı gibi çeşitler bulunmaktadır. Yarayı dışardan gelen enfeksiyonlardan korusa da, yaranın içerisindeki nemin kontrol edilememesi nedeniyle geç iyileşmesine neden olabilecek kadar kuru kalabilmektedir. Ayrıca, yaranın fazladan kanaması durumunda, bandajların yaraya yapışması, giysilerin çıkartılmasının zor ve acı verici olmasına yol açabilir. Bu sebeple, hafif kanamalı yaralarda veya ikinci bir pansuman olarak sıklıkla geleneksel pansumanlar (örneğin; filmler, köpükler, hidrojel, hidrokolloidler, aljinatlar ve biyoaktif pansumanlar gibi) tercih edilmektedir (Rezvani Ghomi vd., 2023). En uygun yara pansumanı; fayda, hasta güvenliği ve maliyet etkinliği arasında dengeli bir yaklaşım gerektirir. İdeal bir yara pansumanı, biyolojik uyumluluğa sahip, biyolojik olarak parçalanabilir ve iyileşme süresince uygun bir ortam sağlamak için optimal su buharı geçirgenliğine sahip olmalıdır. Ayrıca, yaranın yapısına uyum sağlamalı, yara yüzeyine yapışmamalı,

mikroplar için koruma sunmalı ve yaralı bölgedeki nemi optimize etmelidir. Kronik yaraların yerel tedavisi sağlık sistemine büyük mali yükler getirmektedir (Tatarusanu vd., 2023).

Doku onarımı ve iyileşmenin başarısız olmasıyla ilgili hücresel ve moleküler mekanizmaların tamamı henüz kesin bir şekilde kavranmamıştır ve mevcut tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Travma, cerrahi müdahale, akut ya da kronik hastalıklar sonucunda yara iyileşmesinin yetersiz olması, her yıl milyonlarca insanı etkilemekte ve iltihaplanma, anjiyogenez, matris birikimi ve hücre birikimi gibi sağlıklı doku onarımını bozan faktörlere yol açmaktadır. Bu hücresel süreçlerden birinin veya birkaçının aksaması, genellikle damar hastalıkları, diyabet veya yaşlanma gibi mevcut sağlık sorunlarıyla ilişkilidir ve bu durumlar çoğunlukla çeşitli patolojilerin iyileşmesiyle bağlantılıdır. Vücudun doğal onarım mekanizmalarını geliştirecek klinik yaklaşımların araştırılması, yenilenme ve iyileşmenin temel biyolojisinin daha derinlemesine anlaşılmasına bağlı olmalıdır (Eming vd., 2014a).

Deri, dış etkenlere karşı koruyucu bir engel işlevi sağlar. Çalışmalar, derinin, kutanöz ECS'nin önemli bir rol üstlendiği karmaşık bir doğuştan gelen nöro-immüno-endokrin işlevine sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Nejati vd., 2013; Río vd., 2018).

2.2. Rejeneratif Tıp

Çoğu canlı, yaşamları boyunca kendilerini yenileme yeteneklerinde değişimler gösterir. Yaşlanma sürecinde birçok dokunun dengesi ve yenilenme yeteneği giderek bozulur; bu da doku bozulması, işlev kaybı ve çeşitli hastalıklara neden olur. Bu bozulmadan sorumlu olan mekanizmalar, hücresel yaşlanma gibi iç faktörler ve rejeneratif ortamda meydana gelen dış faktörlerden oluşur. Bu mekanizmaların rejeneratif süreçlere olan etkisini anlamak, doku yenilenmesini iyileştiren ve sağlık hizmetlerini uzatan terapi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır (Yun, 2015). Rejeneratif tıp uygulamaları, yaralanmalar, ölümcül hastalıklar veya diğer tıbbi sorunları olan hastalar için yeni tedavi olanakları sunabilir. Günümüzde hastalıklı ve organları hasar görmüş bireyler, organ nakli ile tedavi edilebilmektedir. Ancak nüfus yaşlanmaya devam ettikçe ve yeni organ yetersizliği vakaları artarak çoğaldıkça, donör bulma sorunları her yıl daha da derinleşmektedir. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında çalışan bilim insanları, hastalanmış ve

hasar görmüş dokularda normal işlevi yeniden sağlamak ve korumak amacıyla hücre nakli, malzeme bilimi ve biyoteknoloji yöntemlerini kullanmaktadır (Atala, 2008).

Biyolojik açıdan bakıldığında, rejenerasyon, memeliler de dahil olmak üzere birçok canlıda gözlemlenen doku yenileme ve sınırlı yaralanma yanıtını kapsayan kayıp veya hasar görmüş hücrelerin eski haline getirilmesi yeteneğiyle, memelilerde sıkça gözlemlenmeyen karmaşık yapıların yeniden oluşturulma kapasitesine ayrılabilir. Bunun yanı sıra, diğer birçok hayvanda da benzer şekillerde ifade edilir (Sharpless ve DePinho, 2004). Yaşlanma süreci sırasında memelilerin, kan damarları, sinir sistemleri, kaslar, kan hücreleri üretimi ve iskelet gibi yaşam için gerekli yapılarındaki yenileme yetenekleri değişir ve bu, genel vücut hasarı ile ilişkilidir. Rejeneratif tıp, organizmanın doğal yenileme yeteneğini artırmak için tıp, bilim ve teknoloji alanlarını bir araya getiren disiplinler arası bir çalışma alanıdır (Rajabzadeh vd., 2019).

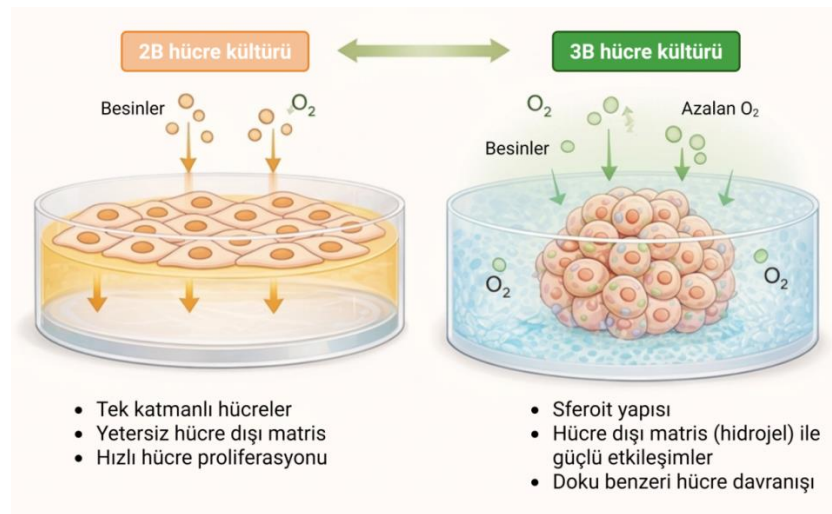
Rejeneratif tıp, tıbbın en modern ve gelişmekte olan bir dalıdır ve bu alan, ciddi yaralanmalar ya da kronik hastalıklarla mücadele eden hastalarda dokuların ya da organların işlevlerinin geri kazanılması üzerine odaklanmaktadır. Rejenerasyon ve diğer hücre türlerine dönüşüm konusundaki belirsiz potansiyel, rejeneratif tıbbın temelini oluşturan kök hücreleri temsil eder. Gen düzenleme ve doku mühendisliği alanlarındaki ilerlemeler, bireysel tedavi uygulamaları için geliştirilen kök hücrelerin *ex vivo* 3B organoidlerine ve doku yapıları haline getirilmesine olanak tanımaktadır (Mahla, 2016).

2.2.1. *In vitro* yara modelleri ve 3B hücre kültür sistemleri

Yara iyileşmesine dair araştırmalar, deney hayvanı kullanımlarını azaltmak amacıyla *in vitro* testlerin yapılmasını önemli kılmaktadır. Bu testler, belirli bileşiklerin etkisini ve genetik değişikliklerin iyileşme süreçlerine etkisini incelemekte mükemmel bir yöntem sunar. Yara iyileşme süreci, sadece iki boyutlu hücre kültürü ile sınırlı değildir; üç boyutlu *in vitro* modeller, hücre-matriks-hücre etkileşimleri nedeniyle daha fazla ilgi görmektedir (Stamm vd., 2016). Hayvan refahına yönelik artan hassasiyetler ve Avrupa Birliği bünyesindeki araştırma merkezlerinde 3R kurallarına (Hayvan kullanımında Yerine Koyma, Azaltma, İyileştirme) uyulmasının zorunlu hale gelmesi, birçok firmanın farmasötik, deri bakım ve kozmetik ürünlerinin *in vitro* etkinliğini değerlendirmek amacıyla deri modeli alternatifleri geliştirmesine neden olmuştur. Böylelikle hayvan derisinin zarar görmesine ilişkin uygulamalara olan duyarlılık azalır.

Ayrıca, deri modelleri deri hastalıklarının temel etkenlerinin tespitinde de yararlı bir rol oynamaktadır. Bir deri modeli tasarlarken, biyomimetik bir yapının oluşturulmasında fizyolojik, kimyasal ve fiziksel unsurların göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Suhail vd., 2019a).

Yara iyileşme süreçleri, kronik yaralar ve ülserler gibi uzun zaman ve maliyet tüketen yara türleri nedeniyle büyük bir önem taşımaktadır. Yara ve yarayı onarma yöntemleri; yeni tedavi alternatiflerinin test edilmesi, biyolojik işaretlerin tespit edilmesi ve doku onarımında işleyiş mekanizmalarının araştırılabilmesi için elzemdir (Sami vd., 2019; Ud-Din ve Bayat, 2017). Yara iyileşme araştırmalarında *in silico*, *in vivo*, *in vitro* ve *ex vivo* gibi farklı modeller kullanılmaktadır. Hesaplamalı model olarak bilinen *in silico* modelleri, yara iyileşme süreçlerini anlamak ve geliştirmek için faydalı olsa da, teorik düzeyde kalmakta ve pratikte uygulanması için biyolojik ortama ihtiyaç duymaktadırlar. *In vivo* modeller, insan derisine en yakın deney ortamını sağlamakta, ancak etik sorunlar ve yüksek maliyetler gibi dezavantajlara sahiptir. *Ex vivo* modeller ise canlı ortamda çalışma imkânı sunmakta, fakat etkilerin anında ve kısa süreli olması dezavantajları arasında yer almaktadır. *In vitro* yara modelleri, hücre içi ve hücreler arası etkileşimlerin araştırılabilmesi için uygun olan modellere işaret etmektedir. *In vitro* yara modelleri, iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) olarak kategorize edilmektedir (Şekil 2.7.) (Sami vd., 2019).



Şekil 2.7. 2B ve 3B hücre kültür sistemlerinin yapısal ve biyolojik farklılıklarının karşılaştırılması (Biorender ile çizilmiştir).

2.2.1.1. İki boyutlu (2B) *in vitro* yara modelleri

2B *in vitro* yara modelleri, hücrelerin hareketini ve yara iyileşmesini incelemek için en yaygın tercihlerden biridir. Bu modeller, hücrelerin tek tabaka halinde yetiştirilmesi ve belirli bir alanın çeşitli yöntemlerle (damgalama, termal yaralama, elektrik ile yaralama, lazer ışığı kullanılarak optik yaralama, pipet ucu ile yapılan çizikler, kimyasal müdahaleler veya insert/barrier kullanımı gibi) yara bölgesi olarak şekillendirilmesi prensibine dayanmaktadır (Amiri vd., 2022b). Oluşturulan yara bölgesi, zamanla hücrelerin hareketi ve çoğalması ile kapanır ve bu süreç, mikroskopik ya da dijital görüntüleme teknikleri ile nicel olarak analiz edilebilir (Jevtić vd., 2020). Yeniden epitelizasyon, yara iyileşiminin belirleyici bir özelliği olarak kabul edilir, bu yüzden her yara iyileşme testinin bir sonucudur. Çizik testi, kolay uygulanabilen ve ekonomik bir yöntem olduğundan oldukça yaygın bir testtir ve hücrelerin 2B yüzeylerdeki hareketlerini gözlemlemeyi sağlar. İncelenen yapışkan hücreler, yani keratinositler veya dermal fibroblastlar, genellikle plastik bir pipet ucu yardımıyla hücrelerin kazınarak kasıtlı bir şekilde yaralandığı birleşik bir tabaka halinde yetiştirilir (Eming vd., 2014a).

2B yara modellerinin en belirgin faydaları; uygulama kolaylığı, düşük maliyet ve hızlı sonuç verme özellikleri ile yüksek sayıda örneğin aynı anda incelenmesine imkan tanımlar. Bu modeller, farklı farmasötik maddelerin, biyomalzemelerin veya genetik değişikliklerin hücresel göç ve yara onarımına etkilerini araştırmak için uygun bir başlangıç aracı olarak işlev görür (Shaw ve Martin, 2009). Ancak, 2B modellerin bazı önemli dezavantajları bulunmaktadır. Hücre-matris etkileşimlerinin yetersiz temsil edilmesi, üç boyutlu doku yapısının olmaması gibi bu modellerin *in vivo* yara iyileşmesini tam anlamıyla yansıtmamasını engeller (Schultz vd., 2011). Bu nedenle, 2B modeller genellikle 3B kültür sistemleri veya hayvan deneylerinden önce ön araştırma aşaması olarak değerlendirilerek yer almaktadır.

2.2.1.2. Üç boyutlu (3B) *in vitro* yara modelleri

3B laboratuvar ortamında yara simülasyonları, canlı dokunun yapısını, hücrelerin matris ve birbirleriyle olan etkileşimlerini, kan damarlarını ve mikroçevre şartlarını daha gerçekçi bir biçimde yansıtmaya yeteneği nedeniyle yara iyileşmesi çalışmaları açısından giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Duval vd., 2017).

Hayvan modelleri ile kıyaslandığında, 3B kültürler deri fizyolojisi ve yara iyileşmesindeki türler arası farklılıkları ortadan kaldırmakta ve böylelikle translasyonel alaka düzeyini artırmaktadır (Langhans, 2018). Ticari ve tedavi odaklı ürünlerin geliştirilmesine yönelik deri dokusu eşdeğerlerinin mevcut durumu incelenmektedir. Artan hayvan refahı kaygıları nedeniyle birçok firma, farmasötik, deri bakım ve kozmetik ürünlerin *in vitro* etkilerini değerlendirmek amacıyla alternatif deri modelleri geliştirerek bu tür yöntemlere olan bağımlılıklarını azaltmaya çalışmaktadır. Deri modelleri, deri hastalıklarının kök nedenlerini belirlemede de etkili bir rol oynamıştır. Deri modeli tasarlarırken, biyomimetik bir yapı oluşturulması için çeşitli kimyasal ve fiziksel faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Suhail vd., 2019b). Bu modeller genellikle fibroblastlar, keratinositler gibi hücre türlerinin oluşturduğu 3B deri benzeri yapılar içerisinde kullanılır ve biyomaterial destekler (hidrojeller, iskeleler) ile biyobaskı veya mikro-çip sistemlerle birlikte geliştirilir (Di Stefano vd., 2025; Nuwayhid vd., 2025).

Üç boyutlu yara iyileşme testlerinde genellikle farklı yapay deri yapıları kullanılmaktadır. Bu yapılar; deri ikameleri, deri eşdeğeri veya biyoteknolojik deri olarak da bilinir (Netzlaff vd., 2005). Klinik deri ikameleri ve greft örnekleri arasında Integra®, Apligraf® ve Epicel® bulunmaktadır. Tam kalınlıktaki deri modelleri EpidermFT® ve StrataTest® olarak karşımıza çıkarken, epidermal modeller arasında daha sonra ele alınacak olan SkinEthic®, EpiSkin® ve EpiDerm® yer almaktadır. Integra DRT®, Integra Lifesciences tarafından oluşturulmuş ve gözenekli sığır kollajeni ile glikozaminoglikan matrisine sahip bir ince silikon membran içermektedir. Apligraf®, Organogenez şirketinin ürettiği bir üründür ve keratinositlerin büyüyebileceği tek bir dermal matris içinde fibroblast ve kollajen içermektedir. Genzyme tarafından üretilen Epicel®, *in vivo* geliştirmeden elde edilen otolog keratinositler ve fare fibroblastları barındırmaktadır. Yeniden yapılandırılmış insan derisi modelleri, yapay bir polimer matris üzerinde geliştirilen deri hücrelerinden oluşur. Ticari olarak temin edilebilen yeniden yapılandırılmış insan epidermisi modelleri arasında EpiSkin®, SkinEthic® ve Epiderm® bulunmaktadır. Ticari olarak edinilebilen canlı deri eşdeğerleri ise GraftSkin®, EpidermFT® ve Phenion®'dur. Canlı deri benzerleri belirli klinik uygulamalar için hayati öneme sahip olsa da, çoğu *in vitro* çalışma insan epidermisinin sentetik modellerini kullanmaktadır (Suhail vd., 2019b). Şu anda yara yönetimi için iyileştirici, antimikrobiyal ve/veya nemlendirici özelliklere

sahip kremler, jeller, merhemler, tozlar, macunlar ve bantlar gibi birçok türde farmasötik ürün mevcuttur.

Yapay membranlar, tekrar üretilebilirlik, düşük maliyet, kullanım kolaylığı, saklama koşulları ve modifiye edilebilirlik gibi birçok avantajı nedeniyle insan ve hayvan derisine tercih edilmektedir. Yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri ise, kolay erişilebilir olmaları, yüksek veri tekrarlanabilirliği sunmaları, etik kurullardan onay gerektirmemeleri ve deri metabolizması, deri korozyonu ile fototoksitenin değerlendirilmesinde faydalı olmaları gibi nedenlerle önemli hayvan derisi alternatifleri olarak kabul edilmektedir (Yedikaya ve Badıllı, 2021).

In vitro modeller, deri yaralarının iyileşme süreçlerini incelemek için etik ve uygun maliyetli bir alternatif sunar. Ayrıca, insan hücreleri kullanan modeller, insan yaralanmalarını hayvan modellerine göre daha iyi temsil etmektedir. Hücre göçü ve çoğalma gibi süreçleri incelemek için iki boyutlu modeller yaygın olarak kullanılsa da, yara iyileşmesinin daha derinlemesine anlaşılabilmesi için daha karmaşık modellere ihtiyaç vardır. Farklı deneysel çalışmalardan karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek için doğru, tekrarlanabilir lezyonların ve uygun bir şablon sisteminin oluşturulması büyük bir önem taşımaktadır. Bir yara iyileştirme modelinin oluşturulması, yalnızca zor olmakla kalmaz, aynı zamanda modelde belirli bir standardizasyon ile yara oluşumunu gerçekleştirmek de zordur. Sıklıkla kullanılan yaralanma teknikleri arasında çizik testleri, yanık, bant aşınması, termal yaralanma, sıvı nitrojen, lazer, neşter ve biyopsi zımbaları yer almaktadır. Bu yöntemlerin çoğu benzer zorluklar taşımaktadır. Elle uygulanan yaraların standardize edilmesi ve çoklu testlerde yeniden oluşturulması güçtür. Yara boyutu, şekli ve derinliği çalışmalar arasında farklılık göstermektedir (Rossi vd., 2015).

Yara iyileşme sürecini geliştirmek amacıyla birçok yöntem önerilmiştir. Etkili yara tedavisinin bir yolu, yara bölgesine rejenerasyonu teşvik eden ilaçların mikroiğnelerle ulaştırılmasıdır. Ancak, bağışıklık sistemine duyarlı bu noktada mikroiğnelerin kullanılması, yarayı enfeksiyona ve ek zarar görmeye daha açık hale getirir. Bu durumu aşmak için Yao ve diğerleri, mikroiğne dizisini taşımak üzere bir metil akrilat hyaluronik asit (MeHA) jeli kullandılar, böylece biyobozunur ve antibakteriyel bir yöntemle ilaçların iletimini sağladılar (Yao vd., 2021).

Son yıllarda kök hücre tabanlı tedaviler büyük ilgi çekmeye başladı (Chen vd., 2009). Yara iyileşmesindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, derideki kök hücreler fizyolojik koşullar altında rejeneratif iyileşmeyi desteklemek için çeşitli sinyal yollarını aktive eden sitokinler üretmektedir (Nourian Dehkordi vd., 2019). Lee ve arkadaşları, dermis, katmanlı epidermis, kıl folikülleri ve diğer deri yapılarından oluşan bir organoid geliştirmek için insan pluripotent kök hücrelerini kullanarak hücre farklılaşmasını teşvik ettiler, böylece yaranın tamamen iyileşmesine imkan tanıdılar. Ancak, bu uygulamanın sunduğu potansiyele rağmen, organoidin işlevselliği genel yapısının kısıtlamaları nedeniyle tehlikeye giriyor ve bu, anormal kıl büyümesine ve dökülmesine neden olabiliyor (J. Lee vd., 2022).

Huttenlocher ve ekibi, yara iyileşme sürecinin doku içinde bulunan yerel elektrik alanıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir. O tarihten bu yana, birçok araştırma grubu, yara iyileşmesini destekleyen elektrik alanlarından yararlanan etkili yöntemler geliştirmek için çalışmaktadır (Huttenlocher ve Horwitz, 2007). Zheng ve arkadaşları, derin yaraların iyileşmesinin sağlanması amacıyla elektriksel uyarımın polimerler üzerinden iletilebileceği fikriyle, çapraz bağlı elektriksel iletken polimerler içeren bir jelatin bazlı hidrojel (MESgel) geliştirdiler (Zheng vd., 2021).

Biyo-yazım yöntemi için Binder ve diğerleri, fibroblastları ilk katmanda, keratinositleri ise ikinci katmanda içeren fibrinojen/kollajen hidrojel öncüllerini tam kalınlıktaki bir deri defekti üzerine direkt yerleştirmek için mürekkep püskürtmeli bir biyoyazıcı kullandılar (Binder vd., 2010). Yara bölgelerinde basılan dokunun normal fare derisini taklit edebildiğini gözlemlediler. Lee ve arkadaşları, fibroblastlar ve keratinositleri kolajen ile basarak insan derisini taklit eden bir yöntem önerdiler (V. Lee vd., 2014).

Yanez ve ekip arkadaşları, damlacık bazlı biyobaskı tekniğini (genellikle mürekkep püskürtmeli biyobaskı olarak bilinir) kullanarak, mikrovasküler yapıları basarak oluşturdukları çift katmanlı deri greftini tam kalınlıkta yaraların tedavisinde değerlendirdiler; entegrasyon ve iyileşmeyi fareler üzerinde incelediler (Yanez vd., 2015). Basılan deri grefti, kontrol gruplarına göre yüzde on daha iyi büzülme oranıyla yara iyileşmesini artırdı ve yerleştirilen hücrelerin canlı kaldığını kanıtladı.

Koch ve ekibi, deri hücreleri ve kök hücrelerini deri yenilenmesi ve kök hücre tedavileri için lazerle indüklenen ileri transfer (LIFT) şeklinde adlandırılan bir lazer baskı yöntemi ile belirli desenlerde bir araya getirdiler. Lazer baskı uygulaması sırasında deri hücreleri ve insan mezenkimal kök hücreleri (hMSC) canlı kaldı ve bölünme yeteneklerini koruduğu gözlemlendi, böylece hücrelere zarar vermeden doku yedekleri elde etmek için yeni bir yöntem geliştirilmiş oldu (Koch vd., 2010).

Douillet ve arkadaşları, derinin doğal hücre dışı matrisinin taklidini yaparak, fibroblastların derinin destek yapısını nasıl değiştirdiğini ve düzenlediğini araştırmak üzere kolajen iskeleti içinde desenler halinde basılan lazer tabanlı biyoyazma tekniğini kullandılar. Bu, araştırmacılara yara iyileşimi sırasında fibroblastların bu yapı içinde yeniden nasıl şekillendiğini inceleme fırsatı sundu (Douillet vd., 2022). Basılan deri destek yapısı bir süre boyunca incelendi ve elde edilen bulgular, Douillet ve ekibinin yara iyileştirme yöntemleri hakkında hipotezler geliştirmesine ve doğal iyileşme süreçlerini taklit eden, potansiyel olarak daha az iz bırakan ve daha hızlı iyileşme sürelerine neden olabilecek yeni tedavilerin yaratılmasına yardımcı oldu. Rimann ve ekibi, insan hücreleri (fibroblastlar ve keratinositler) ile yüksek hücre canlılığına sahip olan kullanıma hazır bir biyomürekkep kullanarak, özel bir damlacık tabanlı biyoyazım tekniği ile yumuşak dokuların 3B modellerini oluşturmak için optimize edilmiş bir yöntem geliştirdiler ve bu yöntemin kozmetik sektöründeki uygulama potansiyelini kanıtladılar (Rimann vd., 2016).

Zhang ve ekibi, yağ dokusundan elde edilen ECM ile bir biyomalzeme tasarladılar (Zhang vd., 2023). Bu malzeme, doku büzülmesini, kolajen üretimini, yeniden şekillenmeyi ve neovaskülarizasyonu artırarak yara iyileşimini desteklemek için kullanabileceği 3B biyomimetik, çok katmanlı implantların üretimi için biyoyazma süreciyle bir araya getirilebilir (Fratini vd., 2023).

2.3. Kenevirin Tarihçesi, Kullanımı ve Taksonomisi

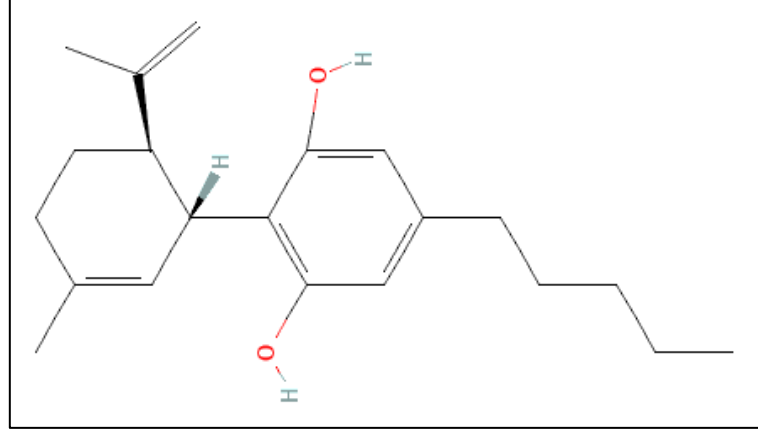
Kenevir (*Cannabis sativa L.*), Cannabaceae ailesine mensup, çeşitli kullanım alanları bulunan ve tarih boyunca tıbbi amaçlarla kullanılan tek yıllık bir bitki türüdür (ElSohly vd., 2017). Kenevir, M.Ö. 8000 yılından beri çeşitli amaçlarla yetiştirilmektedir: tıpta, tekstil alanında, ip yapımında, kağıt üretiminde ve eğlence amaçlı olarak kullanılmaktaydı. 19. yüzyılda doktorlar, sindirim problemleri ve mide

bulantısı gibi rahatsızlıklar için bile onu reçetelendirmekteydi (Russo, 2007). Fakat 20. yüzyılda esrarın eğlence amaçlı kullanımını ve tıbbi yönlerini denemede kısıtlamalar getirildi (Adrian, 2015).

Taksonomiden bağımsız olarak, kenevir bitkisinde birçok farklı kimyasal bileşen keşfedilmiştir. Bu bitkideki etkin bileşenler tetrahidrokanabinol (THC) ve kanabidiol (CBD) gibi kanabinoid maddelerdir. THC, psikoaktif etkileri ile bireyin zihinsel durumunda değişiklikler yaratırken, CBD'nin tıbbi faydaları bulunmaktadır (ElSohly vd., 2017). Bunlar arasından kanabinoidler özellikle dikkat çekmiştir. Bu kanabinoidler arasında, başlıca *C. indica* türünde yer alan ve düzenlemelerin ana merkezi olan psikoaktif madde delta-9 tetrahidrokanabinol (THC) ile esasen *C.sativa*'da bulunan ve tıbbi araştırmalarda endüstriyel amaçlarla kullanılabilen psikotropik olmayan kanabinoid (CBD) bulunmaktadır (Massi vd., 2006b).

2.3.1. CBD'nin kimyasal yapısı ve endokannabinoid sistemler ile ilişkisi

Kanabidiol (CBD), kimyasal formülü $C_{21}H_{30}O_2$ olan ve *Cannabis sativa* bitkisinden elde edilen psikoaktif olmayan bir fitokanabinoiddir (Martinez Naya vd., 2023). CBD molekülü, bir terpenoid halkası (monoterpen bölüm) ve bezenlenmiş bir resorsinol çekirdeği ile beş karbondan oluşan (n-pentil) bir hidrokarbon kuyruk içerir (Duczmal vd., 2024). Molekülün fenolik -OH grupları ile hidroksil gruplarının varlığı ve aromatik halka ile olan bağlantısı, antioksidan ve diğer kimyasal reaktivite özelliklerine katkıda bulunur (Martinez Naya vd., 2023). Kristal yapısı üzerine yapılan araştırmalar, saf CBD'nin monoklinik sistemde kristalleştiğini ve moleküller arasında hidrojen bağlarının önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (Koryťáková vd., 2025). Ayrıca, izomerik varyantlar ve stereokimya, molekülün biyolojik etkileri ve reseptör etkileşimleri ile farmakokinetik özelliklerinde farklılıklara yol açabilmektedir (Rao vd., 2025). CBD'nin yağda çözünebilen yapısı, su içinde düşük çözünürlüğü, pasif difüzyon yoluyla hücre zarını geçme yeteneği ve metabolik dönüşümler (örneğin, karaciğerde CYP enzimleri aracılığıyla) kimyasal yapısıyla doğrudan ilişkilidir (Şekil 2.8.) (Martinez Naya vd., 2023).

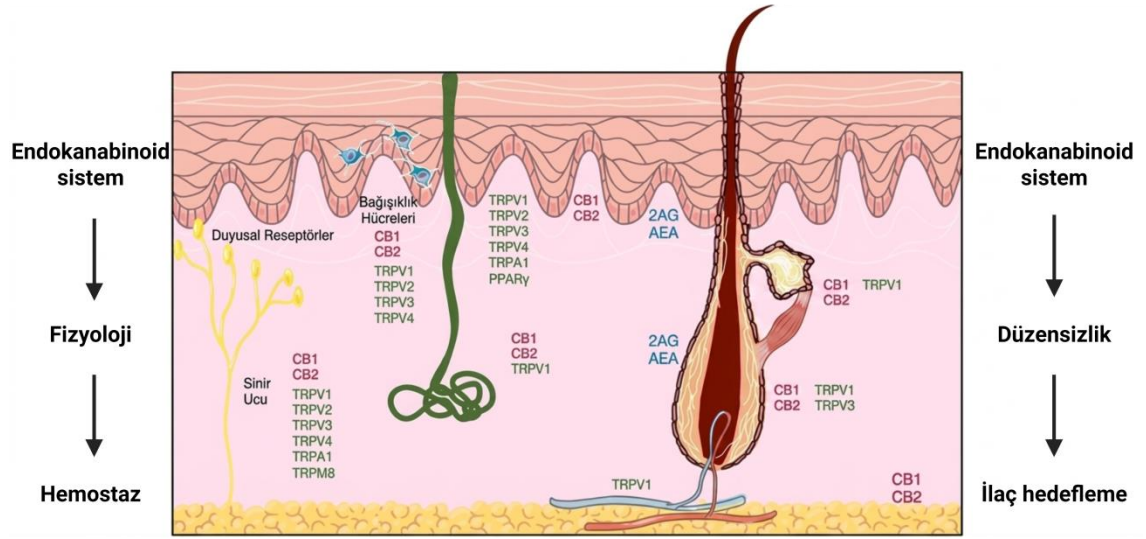


Şekil 2.8. Kanabidiolün (CBD) kimyasal yapısı (PubChem)

Kanabinoidlerin birçok biyolojik etkisi, kanabinoid reseptörlerinden tip 1 (CB1) ve tip 2 (CB2) aracılığıyla ortaya çıkmaktadır; ancak bu maddelerin etkilerinin farklı reseptörler ve moleküler hedeflerden etkilendiği de bilinmektedir. CB1 reseptörleri genellikle nöronlarda bulunurken, CB2 reseptörleri daha çok mikrogliada ve bağışıklık sistemi içinde yer almaktadır (Blair vd., 2015). CB1 reseptörleri merkezi sinir sisteminde hem glutamaterjik hem de GABAerjik internöronlarda presinaptik olarak yer alır ve bu reseptörlerin aktif hale gelmesi, glutamat salınımı da dahil olmak üzere sinaptik iletim üzerinde engelleyici bir etki yapar. Bu mekanizmalar, endokannabinoid sistemin sinaptik plastisite ve nörolojik dengeyi sağlamada önemli bir düzenleyici rolü olduğunu göstermektedir (M. E. Hofmann ve Frazier, 2013; Katona, 2015).

Endokabinoid Sistem (ECS), insan bedeninin bazı önemli ve hayati işlevlerinde kritik bir rol üstlenen çeşitli işlevselliğe sahip bir fizyolojik sistemdir (Lu ve Mackie, 2021). CBD, beyinde ve aynı zamanda dalak, kaslar, üreme organları, karaciğer, kolon, pankreas ve bağışıklık sistemi gibi periferik bölgelerde bulunan spesifik endokannabinoid reseptörleri aracılığıyla etki göstermektedir (Lu ve Mackie, 2021). En yaygın ve en fazla araştırılan endokannabinoidler arasında anandamid (AEA), 2-araşidonoilgliserol (2-AG), 2-araşidonoilgliseril eter (2-AGE), O-araşidonoiletanolamid (virodamin) ve naraşidonoildopamin (NADA) bulunmaktadır (Greco vd., 2022). Kanabinoid reseptörleri, kanabinoid tip 1 ve tip 2 reseptörleri (sırasıyla CB1R ve CB2R) yanı sıra serotonin reseptörleri (5HT) ve GPCR'ler (örneğin, GPR18, GPR55 ve GPR119) ile ligand iyon kanalları (TRPV1) gibi G-protein bağlı reseptörler (GPCR'ler) olarak kategorize edilebilir. CB1 reseptörleri, beyin ve omuriliğe odaklanarak etkide

bulunur, bu nedenle bunlarla etkileşimde bulunan maddelerin psikoaktif etkileri daha belirgindir; CB2 ile etkileşime geçen bileşikler ise kaslar ve kemikler dahil olmak üzere vücudun genelini etkiler (Oyagawa ve Grimsey, 2021). Geniş kapsamlı bir modülatör olarak, farklı biyolojik mekanizmalar kullanmakta ve merkezi sinir sistemi (CNS) ile periferik sinir sistemindeki fizyoloji ve patolojiyi etkileyen sayısız etkileşime (Lu ve Mackie, 2021). ECS, iki ana G-protein-bağlı reseptörden (GPCR) meydana gelir: beyin yapılarında yoğun olarak bulunan CB1 ve bağışıklık sistemi hücrelerinde ise daha az seviyede bulunan CB2 (Iannotti vd., 2016).



Şekil 2.9. Derinin endokannabinoid yapısı. Derinin hücre bölümlerindeki endokannabinoid sistemin temel bileşenlerinin (ana olarak kannabinoid reseptörleri ve bunların doğal lipid bileşenleri) şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).

Endokannabinoid sistem (ECS), deri hücrelerinin çoğalması, hayatta kalması ve farklılaşmasının kontrolünde etkin bir rol üstlenmektedir (Şekil 2.9.). Bu süreçlerdeki ince denge, kutanöz homeostazın oluşturulmasında anahtar faktörlerden biridir. Ayrıca, endokannabinoid hassaslığı, deri hücrelerinin büyüme ve farklılaşma süreçlerinin düzenlenmesinde önemli bir unsur olarak görülmektedir (Bíró vd., 2009). Kannabinoid reseptörleri (CB₁ ve CB₂), endojen lipid ligandlar (endokannabinoidler), onların biyosentetik yolları ve metabolizmayı gerçekleştiren enzimler (genel olarak endokannabinoid sistemi –ECS) tanımlandıktan sonra (Mechoulam vd., 1998), ECS'nin fizyolojik ve patolojik olaylardaki düzenleyici rolünü araştıran çalışmaların sayısında kayda değer bir artış olmuştur. Bu ilerleme, CB reseptörleri için pek çok dışsal ligandın keşfi veya akıllı tasarımı ile desteklenmiştir (Pertwee, 2005). CB₁ ve CB₂

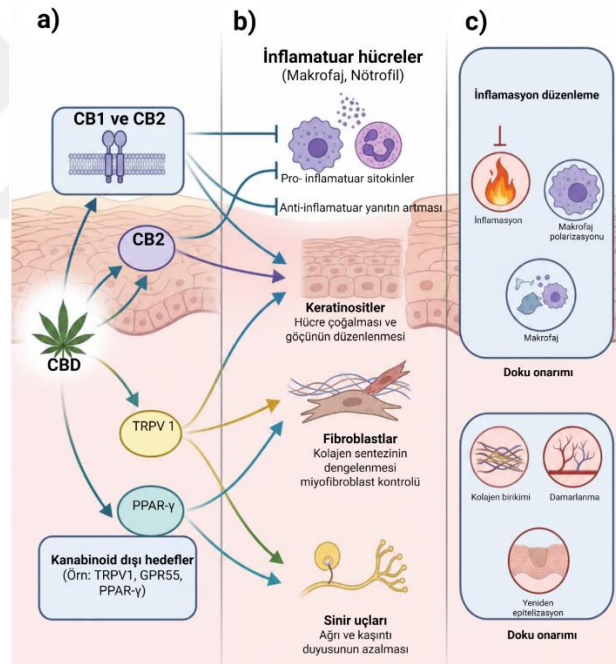
reseptörlerinin immünoreaktif davranışı, deri hücreleri üzerinde, kutanöz sinir lifleri, mast hücreleri, epidermal keratinositler ve eklem doku hücreleri dahil olmak üzere insana ve fareye ait deri hücrelerinde gözlemlenmiştir (Pacher ve Kunos, 2013). Endokannabinoid sisteminin deri yarası iyileşmesi ve patolojik fibroz üzerindeki etkisini inceleyen bazı çalışmalar da bulunmaktadır (Bíró vd., 2009; Kong vd., 2021; Milando ve Friedman, 2019; Tóth vd., 2019a).

Endokannabinoid sistemi derinin işlevlerinde önemli bir yere sahiptir ve deri homeostazının birçok yönünü düzenler (Sheriff vd., 2020a). Bu sistemdeki bozulmalar, yaygın şekilde görülen çeşitli deri rahatsızlıklarında etkili olabilir (Tóth vd., 2019a). CB1 ve CB2 reseptörleri, deri yarası iyileşmesi ve deri fibrozunda farklı etkiler göstermektedir. CB1 reseptörü aktive edildiğinde deride pro-fibrotik etkiler yaratırken, CB2 reseptörü, sistemik skleroz gibi deneysel modellerde ve yaralanma iyileşmesi hayvan deneylerinde iltihaplanmayı ve deri fibrozunu azaltmaktadır. CB2 reseptör aktivasyonu, keratinositlerin çoğalmasını, hareketliliğini ve yeniden epitelizasyonunu artırmaktadır. Teorik olarak, fibroblast faaliyetinin baskılanması ve keratinosit göçünün teşvik edilmesi aracılığıyla oluşturulan bu iki yönlü etki, daha az fibrotik tepki ile yara izi bırakmayan bir iyileşme elde etmek için etkili bir yöntem olabilir (Sheriff vd., 2020a). B2 reseptörleri, bağışıklık hücrelerinde yüksek oranda bulunur ve memelilerde antienflamatuvar etkinlik gösterir (Nagarkatti vd., 2009). İltihap, deri yarası iyileşmesi açısından kritik bir aşama olduğundan (Wilkinson ve Hardman, 2020), CB2 reseptörünün bu süreçteki rolü beklenmedik değildir. Bu nedenle, CB2 reseptörüne dair yürütülen araştırmaların, CB1 reseptörüne dair çalışmalardan daha fazla ve geçerli olması, muhtemelen CB2 reseptörünün yara iyileşmesi üzerindeki etkilerine gösterilen ilgiyi yansıtmaktadır. CB2 agonistleri, deri yarası tedavisi için yeni bir tedavi yöntemi olarak potansiyel taşımaktadır (Aizpurua-Olaizola vd., 2017; Akhmetshina vd., 2009; Du vd., 2018; Pertwee, 2005).

2.3.2. CBD'nin yara iyileşmesindeki rolü

Derinin endokannabinoid sistemi, derinin dengede kalmasını, bariyer oluşumunu ve yenilenmesini sağlamakta kritik bir öneme sahiptir. Kutanöz kannabinoid sinyallemedeki aksaklıklar, kontakt dermatit, sedef hastalığı, skleroderma ve akne gibi çeşitli deri hastalıklarının nedenleri arasında gösterilmektedir (Karsak vd., 2007).

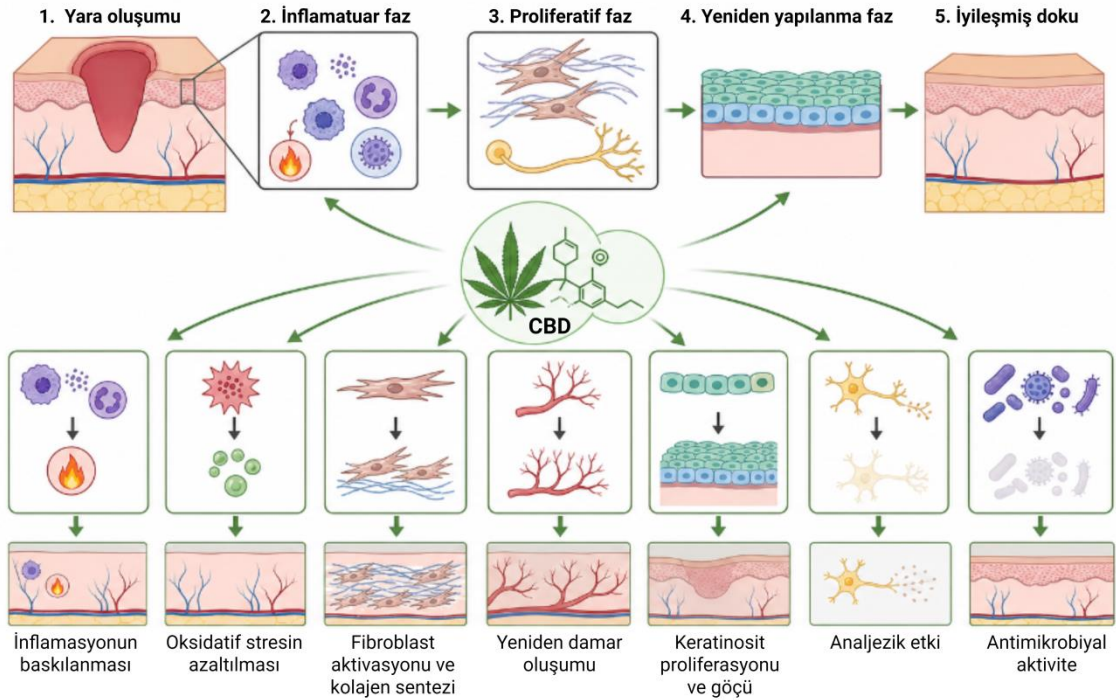
Endokannabinoid sistemin bileşenleri, epidermal keratinositler, melanositler, fibroblastlar, sebositler, ter bezleri, folikül hücreleri ve makrofajlar gibi pek çok deri hücresi türünde mevcut bulunmaktadır. Hem endokannabinoidlerin hem de kanabinoid sistem modulatorlerinin bu hücreler üzerindeki etkileri düzenlediği kanıtlanmıştır (Kiritsi ve Nyström, 2018b). Yara iyileşmesi sürecinde yaşanan uzun süreli iltihap, kolajen I, kolajen III ve kolajen IV gibi proteinler ile IL-1 β , IL-10, IL-4, IL-13, IL-17, TGF- α , TGF- β , VEGF, sitokeratinler 10, sitokeratinler 14, vimentin, fibronektin, laminin, α -SMA, CD31, CD34 gibi çeşitli sitokin ve proteinlerin etkinin altında yara iyileşmesini olumsuz etkileyebilir (Mai vd., 2008), (Echtermeyer vd., 2001). IL-6 ve IL-8, iltihabı artıran sitokinlerdir, IL-10 ise iltihabı önleyen bir sitokindir. Enflamasyon vücutta ortaya çıktığında proinflamatuar sitokinlerin seviyeleri yükselirken, antiinflamatuar sitokin seviyeleri düşmektedir (Şekil 2.10.) (Sharda vd., 2023).



Şekil 2.10. CBD'nin yara iyileşmesi sinyal ağları. a) Sinyal kaynakları, b) reseptörler ve sinyaller, c) hedef hücreler ve biyolojik çıktılar (Biorender tarafından yapılmıştır).

Deri yaralanması gerçekleştiğinde, yara kenarındaki keratinositler farklılaşmaya özgü K1 ve K10 keratinlerini artırır ve uyarılabilir keratinler olan K6, K16 ve K17'yi üretirler (şekil 2.11.). Bu aktif hale geçmiş keratinositler, bazal ya da suprabazal fenotiplerine geri dönmeye kadar, açık kalan dermis üzerinde bir tabaka oluşturmak

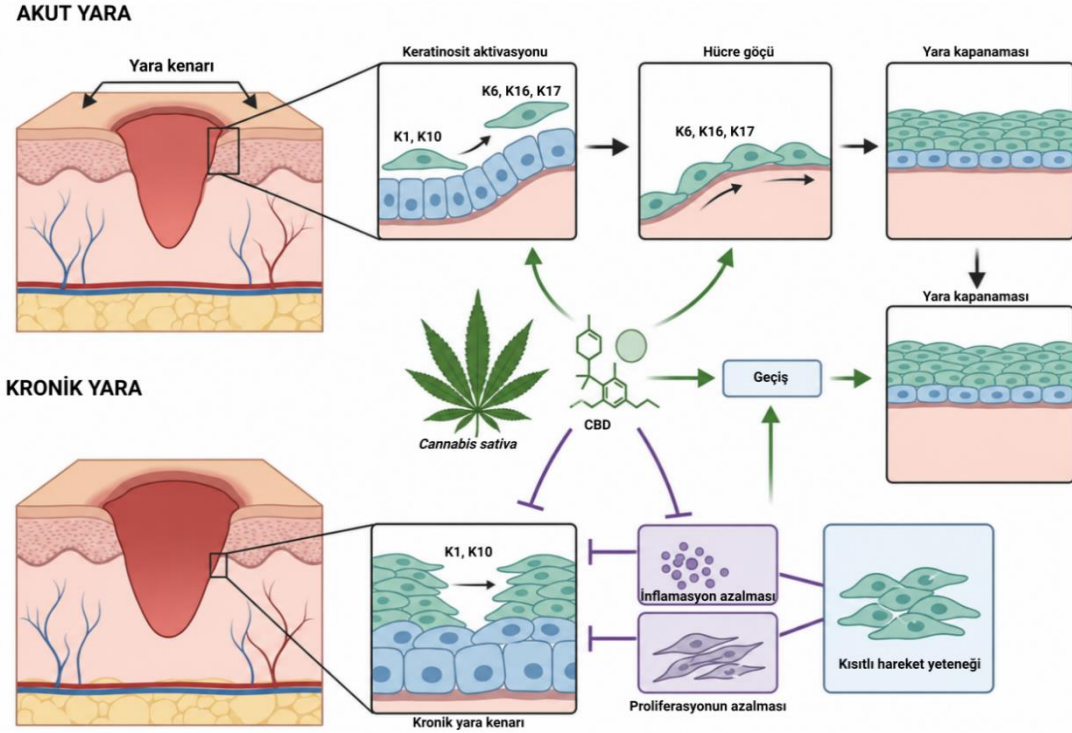
üzere hareket ederler. Kronik yaraların iyileşmeyen kenarlarındaki keratinositler, yaranın kapanmasını engelleyen, hareket yeteneği kısıtlı kalıcı bir proliferatif fenotipe sahiptir. Süreklilik arz eden bu proliferatif fenotipe sahip olan hiperproliferatif epidermis ve keratinositler, yara yatağı boyunca göç için gerekli farklılaşma ve aktivasyon süreçlerini başarılı bir şekilde tamamlayamazlar, bu da yara kapanma sürecindeki sorunlara yol açar (Weigelt vd., 2021). Keratinositlerin farklılaşmasını, proliferatif fenotiplerine göre yönlendirme yeteneği, kronik yaraların patolojik hiperproliferatif iyileşme eşiğini düşürebilir ve yara kapanma sorunlarını önlemek için hedef oluşturabilir.



Şekil 2.11. CBD'nin yara iyileşme üzerindeki etkileri (Biorender ile çizilmiştir).

Kök hücre tedavisi, dokuların yenilenmesi ve yaraların onarılması sürecine katkıda bulunmaktadır. Kök hücrelerin iyileşme yeteneklerini artırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kenevirin bazı bileşenleri, psikoaktif olmayan kanabidiol (CBD) ve psikoaktif tetrahidrokanabinol (THC) gibi, immünomodülatör özellikler taşıdığı ortaya konulmuştur. H. Miller ve ekip arkadaşları, insan ve domuz donörlerinden elde edilen yağ ve kemik iliğindeki iki ana kök hücre kaynağının rejeneratif yeteneklerini

artırma potansiyelini incelemek amacıyla; CBD veya THC ile tedavi edilen iki kök hücre kaynağında rejeneratif kapasitenin gelişip gelişmeyeceğini test etmişlerdir. Çalışmaya göre; kemik iliğinden türetilen kök hücreleri, yağdan türetilen kök hücreleri ve domuz birincil fibroblastlarını THC ve CBD ile tedavi ederek hücre göçünün arttığını ve domuz birincil fibroblastları CBD'ye maruz kaldığında yaranın %75 daha hızlı kapandığı belirtilmiştir (Miller vd., 2021).



Şekil 2.12. Yara iyileşmesinde CBD'nin olası etki mekanizmaları (Biorender ile çizilmiştir).

Enflamasyon, kronik yaralar da dahil birçok hastalığın temel nedenlerinden birini oluşturmakta ve hücrelerin çoğalmasını ile doku onarımını kısıtlamaktadır (Albanesi ve Pastore, 2010). Keten liflerinin yara bandı olarak kullanılmasına dair bir klinik araştırmada; keten lifinin hidrofobik bir özütünün anti-inflamatuar ve iyileştirici bir formül olarak değerlendirilmesi önerilmiştir (Skórkowska-Telichowska vd., 2010). Bu ekstrakt, kannabidiol (CBD), fitosteroller ve doymamış yağ asitlerini içermekte ve yara iyileşmesi açısından potansiyel sunmaktadır. *In vitro* olarak gerçekleştirilen hücre çoğalma ve yara kapanma testlerinde, bu ekstraktın hücre göçünü ve çoğalmasını desteklediği gözlemlenmiştir. Deri hücrelerinde matriks metaloproteinazların aktivitesindeki yükseliş, hücre dışı bileşenlerin yeniden yapılandırılmasının göstergesi

olarak kabul edilmektedir (Mechoulam vd., 2007). M. Styrzewska ve arkadaşları, hücrelerin çoğalmasını, göçünü, iltihap yanıtı genlerinin ifadesini ve hücre dışı metaloproteinaz aktivitelerini ölçerek keten lifi ekstraktını potansiyel bir yara iyileştirici madde olarak incelemiş, bu ekstraktın hangi özelliklerinin kannabidiol molekülü ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Nihayetinde; bu ekstraktın, sitokin ifadesini kannabidiol bağımlı bir şekilde azalttığı, ayrıca β -sitosterol'ün iltihap önleyici etki sağlamak amacıyla CBD ile birlikte sinerjik bir şekilde işlev gördüğü tespit edilmiştir. CBD barındıran hidrofobik keten lifi ekstraktı ile çizik testi analizleri yapmış ve sonuç olarak, kronik inflamasyonun azalması, hücre dışı matrisin yeniden yapılandırılması ve deri hücresi göçünün artmasına katkıda bulunarak yara iyileşmesini iyileştirdiği gösterilmiştir (Styrzewska vd., 2015).

Cui ve arkadaşları, CBD'nin PVA tabanlı hidrojellere başarıyla entegre edilebileceğini, PG/VG gibi katkı maddeleri ile hidrojelin yapısının ve CBD salınım hızının kontrol altında tutulabileceğini göstermiştir. Ayrıca, üretilen hidrojellerin 24 saatin üzerinde kararlı şekilde CBD saldıgını ve salınan CBD'nin antioksidan özelliğini koruduğunu bildirmişlerdir (Cui vd., 2024). Martyna Zagórska-Dziok ve arkadaşları, Cannabidiol (CBD) ile α -terpineol (TER) içeren yeni polimerik hidrojellerin sentezini, fiziksel ve kimyasal özelliklerini ile biyolojik işlevlerini incelemiştir. Bu hidrojellerin etkin maddeleri kontrollü bir biçimde saldıgı ve patlama salınımı olmadan birinci derece kinetiklere yakın bir salım gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, bu sistemlerin antioksidan, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar etkileri olduğu, deri hücrelerine karşı canlılık özellikler taşımadığı ve kollajenaz/elastaz enzimlerini inhibe edebildiği sonucuna ulaşılmıştır. Sonuç olarak, bu hidrojellerin deri yenilenmesi gibi dermatolojik ve kozmetik alanlarda büyük bir potansiyel taşıdığı vurgulanmıştır (Zagórska-Dziok vd., 2024). Ferreira ve diğerleri, CBD'nin deri için olası yararlarını ortaya koymuş; ayrıca uygun taşıma sistemleri ve formülasyonlarla deriye kontrollü bir şekilde uygulanabileceğini ve stabilitesinin muhafaza edilebileceğini göstermişlerdir (Ferreira vd., 2023). J. Maghfour ve diğerleri, topikal CBD içeren ürünlerin insan derisinde iyi bir şekilde tolere edildiğini, yani tahriş, duyarlılık (sensitizasyon) ve fototoksosite açısından önemli bir sorun oluşturmadığını kanıtlamıştır. Ticari piyasada çok çeşitli CBD içerikleri ve formülasyonları bulunması, genel güvenlik profilinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır (Maghfour vd., 2021).

Son dönemlerde CBD kozmetik alanında en popüler eğilimlerden biri haline gelmiştir. Future Market Insights tarafından hazırlanan "CBD Deri Bakım Pazarına Genel Bakış (2022-2028)" raporunda, CBD içeren deri bakım ürünlerinin global satışlarının 2022 yılına kadar 2.4 milyon dolara ulaşacağı ve bu pazarın 2028 yılına kadar %28 oranında büyüme göstereceği belirtilmiştir (*CBD Skin Care Market | Global Market Analysis Report - 2036*). CBD barındıran ticari kozmetik ürünleri arasında en öne çıkanlar; kremler, emülsiyonlar, balsamlar, yağlar ve serumlar olarak sıralanmaktadır. Bazen CBD'nin etkisi terapötik sınırların altında kalabilse de, yenilikçi ve çok yönlü formülasyonlarla sürekli yeni ürünler tanıtılmaktadır. Bu ürünlerin, anti-inflamatuar, nemlendirici, antioksidan, iyileştirici gibi özellikleri sayesinde derinin nemlendirilmesi, yaşlanma karşıtı etkileri, fotokoruma, akne tedavisi ve saç büyümesi gibi alanlarda potansiyel yararları olduğu öne sürülmektedir (Jhawar vd., 2019). Tıbbi amaçla kullanılan CBD içeren bazı ürünler de mevcuttur. Bunlardan biri, nadir çocukluk epilepsisi türleri için FDA ve EMA tarafından onaylanan ve tamamen CBD'ye özel olan Epidiolex®'dir (Devinsky Orrin vd., 2017). Sağlıklı bireylerle yapılan çalışmalarda, Epidiolex®'in günde 20 mg/kg dozunda alındığında bazı karaciğer enzim değerlerinin yükseldiği gösterilmiştir. Ancak daha düşük bir dozda, yani 4,3 mg/kg/gün uygulanan bir çalışmada da karaciğer enzimlerinde artışlar gözlemlenmiştir. Diğer antiepileptik ilaçlarla birlikte tedavi edilen epileptik hastalarda benzer doz aralığında karaciğer enzimlerinde yükselişler bildirilmiştir (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) vd., 2022). Bir başka örnek ise, Avrupa Birliği'nde multipl sklerozda spastisite tedavisi için onaylanan, THC ve CBD'yi eşit miktarda içeren Sativex® adlı spreydir (McGregor vd., 2020). CBD, farklı şekillerde uygulandığında genellikle yüksek bir güvenlik ve tolerans profiline sahiptir. Yeni dozaj yöntemleri ve uygulama şekilleri araştırılmasına rağmen, bu fitokanabinoid hakkında bilinenlerin çoğu ağız yoluyla uygulamalara dayanmakta ve hala birçok soru yanıt beklemektedir. Bunun en önemli sebebi, hem *in vivo* hem de *in vitro* gerçekleştirilen mevcut toksikoloji çalışmasının, ürünün türü, CBD yoğunluğu ve bitkide doğal olarak bulunan veya ekstraksiyon işlemleri sırasında ortaya çıkan diğer bileşenlere bağlı olarak değişiklik göstermesidir (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) vd., 2022). CBD'nin etkili terapötik dozlarının 300 ile 1500 mg arasında olduğunu belirlenmiş (Millar vd., 2019), ancak 6000 mg'lık dozların da oldukça iyi tolere edildiği gözlemlenmiştir (Taylor vd., 2018). Tüm bu avantajlara rağmen, toksisitesi ve

potansiyel yan etkileri, hayvan ve hücre çalışmaları ile klinik araştırmalarda kaygılara neden olmuştur. CBD, sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen 34 günlük bir çalışmada üreme toksisitesi sergilemiş ve bu çalışmada 15 ile 30 mg/kg/gün dozlarının testosteron seviyelerini, spermatogenezin çeşitli aşamalarını ve sperm üretimini değiştirdiği bulunmuştur (Carvalho vd., 2018). Ayrıca fare modelleri ve insan çalışmalarında karaciğer büyümesi, lipid metabolizmasında önemli değişiklikler ve karaciğer enzimleri ile toplam bilirubin seviyesinde artış gösteren hepatotoksisite vakaları rapor edilmiştir (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) vd., 2022). Luz-Veiga ve ekip arkadaşları, CBD ve CBG'nin, deri mikrobiyotasını olumsuz etkilemeden çeşitli deri hastalıkları açısından etkili topikal antimikrobiyal ajanlar olabileceğini belirtmiştir (Feldman vd., 2021a). Feldman ve arkadaşları, CBD'nin *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal etkileri olduğunu ve bu nedenle mantar enfeksiyonları için alternatif bir tedavi seçeneği sunduğunu keşfetmişlerdir (Feldman vd., 2021b). Palmieri ve ekibi, topikal CBD kreminin deri parametrelerini ve belirtilerini önemli ölçüde geliştirdiğini bulmuştur. Örneklem sayısı sınırlı olmasına rağmen, bu kremin deri lekeleri ve yara izleri üzerinde belirgin bir azalma sağladığı görülmüştür. Ancak, *in vivo* ilaç etkileşimlerini gösterebilen antikonvülsanlarla sıkça birlikte kullanıldığı için hepatotoksisite tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Izgelov vd., 2020). Ayrıca, CBD'nin ağız yoluyla uygulanması bazı olumsuz etkiler doğurabilmektedir; bu etkilerin en yaygınları ise uyuşukluk, ishal, bulantı ve üst solunum yolu enfeksiyonlarıdır (Scheffer vd., 2021). Bu sebeplerle, topikal uygulamanın bazı olumsuz yan etkilere yol açabileceği belirtilse de, topikal CBD'nin oral kullanıma göre gastrointestinal yan etkileri azalttığı kanıtlanmıştır (Maghfour vd., 2021a). Geri kalan üç topikal formülasyonun (jel, balm ve krem) da derideki tahriş, hassasiyet ve fototoksisiteye neden olmadığı gösterilmiş, bu da dermal ve topikal uygulamaların güvenli bir alternatif sağlayabileceğini ortaya koymuştur (Maghfour vd., 2021b).

Psikoaktif etkileri bulunmayan tek fitokanabinoid olan Kanabidiol (CBD), hem antioksidan hem de antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Bu nedenle, deri hücrelerini UV kaynaklı metabolik değişikliklere karşı koruyucu bir bileşik olarak önerilmektedir. A. Gęgotek ve diğerleri (Gęgotek vd., 2019), UVA ve UVB radyasyonuna maruz kalan 2B ve 3B kültürlü deri fibroblast modellerinin proteomik profillerini inceleyerek CBD'nin koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. CBD'nin 2B ve 3B kültürlü fibroblastlarda UV kaynaklı zararlara karşı koruyucu etkisinin farklı olduğunu ve bu etkinin, çeşitli

hücresel yanıtları hedefleyen farklı moleküler işlevlerle ilişkilendirilen farklı proteinleri içerdiğini ortaya koymuşlardır. 2B kültürlü hücrelerde, UV radyasyonunun ardından meydana gelen ana değişikliklerin antioksidan yanıt ve inflamasyonda rol oynayan proteinlerle ilişkili olduğu, 3B kültürlü fibroblastlarda ise CBD'nin UV kaynaklı değişikliklere karşı etkisinin, esas olarak sinyal yollarının aktivasyonu ile bağlantılı olduğu kabul edilmektedir. Bu bölümde, CBD'nin çok katmanlı deri hücresi modelindeki etkileri sayesinde, hücreler arası etkileşimler ve deri hücresi metabolizmasındaki değişikliklerin tahmin edilmesi mümkün olmuştur. UV koruması planlanırken CBD'nin 3B kültürlü fibroblastlar üzerindeki sınırlı koruyucu etkisi dikkate alınmalıdır (Geçotek vd., 2019). S. Pagano ve arkadaşları (Pagano vd., 2024), hem akut hem de kronik CBD uygulamalarının dış eti fibroblastları ve oral keratinositler üzerindeki biyolojik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçları; aynı zaman aralığında ve konsantrasyonlarda, oral keratinositlerin uygulama yöntemine bağlı olmaksızın, CBD'nin canlılık etkisinden daha az etkilendiğini göstermektedir. Deneysel araştırmalardan elde edilen bulgular, 50 µM dozunun hem morfolojik hem de işlevsel açıdan muhtemelen toksik bir seviyeyi temsil ettiğini ortaya çıkarmıştır. CBD maruziyetinin neden olduğu hücresel hasarın zaman ve doza bağlı olduğu ve benzer CBD konsantrasyonları uygulanarak gerçekleştirilen kronik tedavinin toksik etkileri önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. 25 µM CBD dozunun, özellikle dış eti fibroblastları üzerinde hücre canlılığını artırdığı ve bu durumun daha fazla araştırılmayı gerektirdiği düşünülmektedir. Etkili bir terapötik doz belirlemek amacıyla, CBD'nin doz ve zaman bağımlı etkilerini değerlendirmek için uzun süreli ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Pagano vd., 2024).

2.4. Tez Çalışmasının Hedefleri ve Önemi

Literatürde CBD'nin yara iyileştirme etkisi üzerine yayınlanmış çalışmalar ağırlıklı olarak akut yara modellerine odaklanmıştır. CBD'nin kronik yara modellerinde kullanımı ise sınırlıdır. *In vitro* 3B deri yara modellerinde CBD'nin etkilerinin sistematik olarak incelenmesi, bir sonraki aşamada *in vitro* kronik yara modellerinin geliştirilmesi için teknik altyapının oluşturulmasını sağlayacaktır. Mevcut Tez projesinde, 2024-2028 Cumhurbaşkanlığı 12. Kalkınma Planının hedefleri olan, ilaç hammaddesi olarak kullanılabilecek tıbbi aromatik bitki kaynaklarının tespit edilmesi ve ilaç sanayiinin üretim sürecinde değerlendirilmesine yönelik olarak, kenevirden elde

edilen CBD kullanılmıştır. İlaç ve tıbbi cihaz sektöründe katma değeri yüksek yerli üretim ve ihracatı artırmak üzere kurumsal yapılanmayı güçlendirmek hedefine yönelik olarak, ticari olarak elde edilebilecek deri/yara modelleri yerli olarak üretilebilmiştir. Sağlık hizmetlerinde öngörülebilirlik ve sürdürülebilirlik hedefine yönelik olarak, CBD'nin etkileri hayvan değil deri modelleri üzerinde araştırılmıştır. Tez çalışması özelinde ise,

- Biyomedikal sektörüne ve deri iritasyon ve yaraları üzerine yapılan araştırmalarda hayvan refahına katkıda bulunmak,
- *In vitro* deri/yara modelleri elde etmek ve yeni biyoteknolojik/kozmetik ürünlerin deri üzerinde etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla özgün *in vitro* deri modelleri ile araştırma alanına katkı sağlamak,
- CBD'nin yara üzerindeki iyileştirici etkisini deney hayvanları kullanmadan *in vitro* üç boyutlu deri yara modelinde göstermek ve doğrulamak,
- CBD'nin moleküler etkilerinin iki boyutlu modelde gen ifade analizleriyle belirlemek,
- CBD içeren yara iyileştirme formülasyonlarının geliştirilmesine katkıda bulunmak,
- *In vitro* yara modelinde CBD'nin iyileştirme potansiyeli sonuçlarıyla literatüre katkı sağlamak hedeflenmiştir.

Mevcut Tez çalışması, *in vitro* 3B deri ve deri yara modelleri geliştirmeyi ve CBD'nin yara iyileşmesindeki etkilerini *in vitro* üç boyutlu deri yara modelleri üzerinden göstermeyi ve doğrulamayı amaçlamaktadır. Tezde uygulanan yöntemler ve sonuçlar deney hayvanları kullanılmadan önce deri modelleri ve yara modelleri üzerinde yapılabilecek çalışmalara ve literatüre katkı sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Çalışma kapsamında yararlanılan cihazlar, gerçekleştirilen moleküler analizler ve histolojik incelemelere ait detaylar ilgili alt başlıklar altında sunulmuştur.

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü, moleküler analizler ve histolojik incelemelere ait deneysel süreçler ile bu süreçlerde yararlanılan cihazlar ilgili alt başlıklar altında detaylandırılmıştır.

3.1.1.1. Hücre kültürü çalışmaları

- Biyogüvenlik Kabini (Laminar Akışlı Kabin)
- Santrifüj Cihazı
- Su Banyosu (37 °C)
- CO₂'li İnkübatör (37 °C, %5 CO₂)
- Mikroskop (Ters, Işık ve Konfokal Mikroskobu)
- ELISA Okuyucu (Microplate Reader)

3.1.1.2. Moleküler çalışmalar

- Nanodrop
- PCR Termal Döngü Cihazı (Thermal Cycler)
- Real-Time PCR Cihazı (qPCR)
- Jel Elektroforez Sistemi

3.1.1.3. Histoloji çalışmaları

- Manuel Fiksasyon İstasyonu
- Doku Gömme ve Bloklama
- Mikrotom (Parafin kesitler için)
- Su Banyosu (Doku banyosu)
- Lam Isıtıcı Tabla
- Manuel Boyama İstasyonu

- Işık Mikroskobu

3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Araştırma süresince yararlanılan tüm kimyasal ve sarf malzemeler, ilgili alt başlık altında detaylandırılmıştır.

3.1.2.1. Deri modeli geliştirmek için kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

In vitro iki boyutlu model için; HS2 (sünnet derisinden daha önceki projelerde elde edilen insan keratinosit hücresi), 4.5 g/L glukoz ve L-glutamin içeren 1X Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Cat No: 41966-052), Fetal Dana Serum (FBS, Gibco, Cat No:A5256801), Gentamisin (Sigma, Cat No: G1272-50 mL), %0,05 Trypsin (MULTICELL Cat No: 325-542-EL), Fosfat tamponlu salin (PBS-SERANA Cat No: BDL-003-500mL) kullanılmıştır. HDF (İnsan Fibroblast Hücre hattı), Fibroblast büyüme ortamı (FGM- APPLICATIONS 116-500) kullanılmıştır. 96 kuyulu plaka (NEST, Cat No: 713011), DMSO (Sigma, Cat No: 1.16743.1000), Canabidiol (CBD- Cayman, Cat No: 90080), WST-1 (Beyotime, Cat No: C0036) kullanılmıştır.

In vitro epidermal model için gereken malzemeler; HS2 keratinosit hücresi, insan keratinosit büyüme serumu (HKGS (100X), Gibco Cat No: S-001-5), antibiyotik içeren (Penicilin/Streptomycin- Gibco Cat No: 15140-122) tam besiyeri (Epilife with 60 μ M $CaCl_2$, Cat No: MEPI500CA), %0,05 tripsin (MULTICELL Cat No: 325-542-EL), fosfat tamponlu salin (PBS-SERANA Cat No: BDL-003-500mL), 12 kuyulu plaka (Costar, Cat No: 3513), 12 kuyulu plaka için insert (Greiner, Cat No: 665640), hücre kültür şişesi (Nest, Cat No: 708003), steril bistüri ucu (Beybi), biyopsi punch (Disposafe), 100x150 mm lens kağıdı (Watman, Cat No: 2105-841), Canabidiol (CBD- Cayman, Cat No: 90080) kullanılmıştır.

In vitro tam katman deri modeli oluşturulması için; HS2 hücresinin üretilmesi için kullanılan besiyerleri sırasıyla; E1-E3 besiyeri (Epilife Medium– Gibco MEPI500CA), fetal dana serumu (FBS- Gibco Cat No: A5256801), antibiyotik (Penicilin/Streptomycin- Gibco Cat No: 15140-122), tip-1 sıçan kuyruğu kolajeni (Gibco Cat No: A10483-01), 5X rekonstrüksiyon tamponu (5xRB), DMEM-F12 (Gibco, Cat No: 42400-010), HEPES bufer çözeltisi (Gibco, Cat No: 15630-080), L-

askorbik asit (Sigma Aldrich- A7506-25G), Tripsin-EDTA (MULTICELL, Cat No: 325-542-EL), fosfat tamponlu salin (PBS-SERANA Cat No: BDL-003-500mL), 12 kuyulu plaka (Greiner, Cat No: 665640), 12 kuyulu plaka için insert (Greiner, Cat No: 665640), 12 derin kuyulu plaka (Greiner, Cat No: 665110), hücre kültür kabı (Nest, Cat No: 708003), steril bistüri ucu (Beybi), biyopsi punch (Disposafe), 100x150 mm lens kağıdı (Watman, Cat No: 2105-841), Canabidiol (CBD- Cayman, Cat No: 90080) kullanılmıştır. Hematoksilin ve Eozin Boyama Kiti (Abcam Cat No: ab245880), Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich- F4680-25 mL), 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich, Cat No: D9542-1MG), Rodamin Faloidin (Invitrogen), XTT (Hücre Proliferasyon Kiti, Serva Cat No: 39904.01) kullanılmıştır.

Toplam RNA izolasyonu için NucleoGene QuickEX Total RNA Extraction Kit (NUCLEO GENE, Cat No: NGE024) Saflaştırılan RNA'dan, Real-Time PCR için kalıp cDNA sentezlemek amacıyla iScript cDNA Synthesis Kit (BIORAD, Cat No: 1708891) kullanılmıştır. PCR reaksiyonları için Taq DNA Polymerase (BIONEER Cat No: E-2011-2), cDNA sentezi ve PCR için dNTP Mix (10 mM ea, GeneDirex, Cat No: DN046-1000), kantitatif gen ifadesi analizi için Real-Time PCR (qPCR) Master Mix (SYBR Green bazlı) olarak IQ SYBR™ Green SuperMix (BIORAD, Cat No: BR1708880), reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında nükleaz içermeyen su (Nuclease-Free Water) kullanılmıştır. Elektroforezde jelin polimer matrisini oluşturmak için agaroz (Cat No: B28-01-50), 50X TAE electrophoresis buffer (Thermo, Cat No: B49), RNA/DNA bantlarını UV ışık altında görünür hale getirmek için safe DNA gel stain, (Invitrogen, Cat No: S33102), DNA Loading Dye 6X, Thermo Fisher Scientific, Cat No: R0611) kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

Bu çalışmada CBD'nin hücrelerde toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi, 3B deri eşdeğeri oluşturulması, yara modellerinin geliştirilmesi ve CBD'nin yara iyileşmesine etkisinin 2B ve 3B *in vitro* modeller üzerinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3.2.1. CBD'nin hücre canlılığına etkisinin *in vitro* değerlendirilmesi

Bu çalışmada hücre kültürü deneyleri için HS2 (insan keratinosit hücresi) ve HDF (insan fibroblast hücre hattı) olmak üzere iki hücre hattı kullanıldı. HS2 ve HDF hücre hattı *in vitro* yara iyileştirme uygulamaları için değerlendirildi (Sangeetha vd., 2024).

Uygun hücre kültürü koşullarının sağlanması amacıyla HS2 hücrelerinin üretilmesi için DMEM besiyeri (Gibco™ 41966029) ve HDF hücre hattı için Fibroblast Growth Medium (CELL APPLICATION INC. 116-500) kullanıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ortamında kültüre edildi.

Hücrelerin yıkanması, ölü hücrelerin uzaklaştırılması ve tripsin öncesi besiyerinin çıkarılması işlemleri PBS ile gerçekleştirildi. Hücrelerin pasajlanması ve toplanmasında ise Tripsin-EDTA (MULTICELL, Cat No: 325-542-EL) kullanıldı.

CBD lipofilik bir bileşik olduğundan doğrudan kültür ortamında çözünmemektedir (Klinsang vd., 2023). Bu nedenle CBD, %0,1'i aşmayacak şekilde DMSO kullanılarak stok çözelti şeklinde hazırlandı. Deneylerde kullanılacak çalışma çözeltileri, stok çözeltinin kültür ortamı ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Çözücünün hücrelere etkisini kontrol etmek için kontrol grubu oluşturuldu.

Yara iyileşmesini desteklemek amacıyla CBD'nin çeşitli konsantrasyonları hücreye uygulandı (0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 5.0 µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 40 µg/mL). Bu konsantrasyonlar, literatürde mevcut olan değerler dikkate alınarak belirlenmiş olup, çalışmanın sürekliliği sırasında etkinin gözlemlenmesine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Kongkadee vd., 2022). Yara modelinde incelemeler 1., 2. ve 7. günlerde yapıldı.

CBD'nin fibroblast ve keratinosit hücrelerinin üremesine etkisi, WST-1 hücre canlılığı testi kullanılarak analiz edildi. İzlenen protokol aşağıda verilmektedir (Şekil 3.1.).

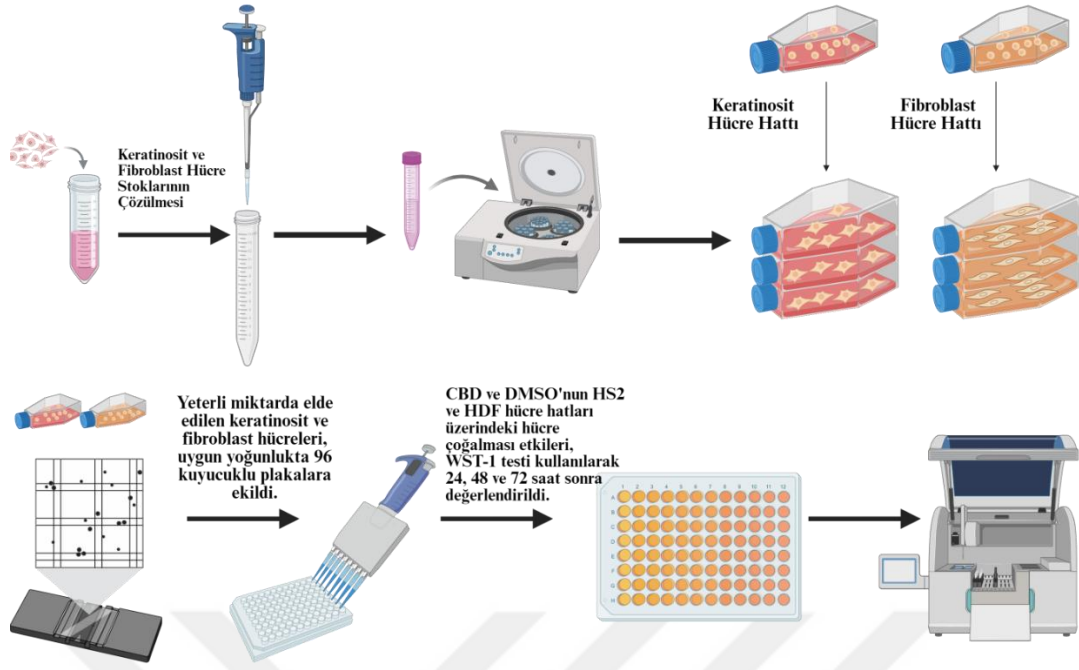
1. CBD'nin HS2 ve HDF hücrelerinin canlılıkları üzerine etkilerinin belirlenmesi için öncelikle hücreler %10 fetal dana serumu (FBS) ve

antibiyotik içeren tam besiyerinde (sırasıyla DMEM ve Fibroblast Growth Medium) üretildi.

2. CBD stok çözeltisinden seri seyreltmeler yapılarak 200µM- 0,39 µM aralığında 9 farklı konsantrasyonda kuyulara dağıtıldı.
3. Hücre kontrolü ve besiyeri kontrolü olarak belirlenen kuyulara CBD içermeyen besiyeri eklendi.
4. Aktif halde üremekte olan hücreler 96 kuyulu hücre kültürü plakasına, besiyeri kontrolü olan kuyular hariç olmak üzere, her kuyuya 5000 hücre olacak şekilde 50 µL besiyeri içerisinde ekildi.
5. Plakalar 24, 48 ve 72 saat süreyle CO₂'li inkübatörde 37°C'de bekletildi.
6. İnkübasyon sonrası her kuyuya mitokondri aktivitesini ölçen WST-1 canlılık (Beyotime-C0036) solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi.
7. Canlı hücrelerin yüzdesini hesaplayabilmek üzere kuyulardaki absorpsiyon, ELISA plaka okuyucusunda 450 nm'de ölçüldü.
8. CBD eklenmemiş kontrol hücrelerin canlılık yüzdesi %100'e karşılık gelecek şekilde CBD'nin hücre canlılığına etkisi % canlılık değerleri olarak hesaplandı.
9. Her doz grubu için en az sekiz kuyudan sonuçlar ve standart sapmaları hesaplanıp, kontrole göre hücre canlılığı yüzdeleri Student's t-test ile karşılaştırıldı (p<0,05).
10. Hücrelerin yüzde canlılığından yola çıkarak CBD'nin HS2 ve HDF hücreleri üzerine etkileri ve IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri hesaplandı.
11. Bu işlem aynı şekilde CBD'nin çözgeni olan DMSO için de uygulandı. Hücrelerinin canlılık yüzdesi, denklem 1 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{OD_{CBD \text{ group}}(450 \text{ nm})}{OD_{pozitif kontrol}(450 \text{ nm}) - OD_{negatif kontrol}(450 \text{ nm})}$$

Denklem 1



Şekil 3.1. Canlılık analizi aşamaları (Biorender ile çizilmiştir).

3.2.2. CBD'nin etkisinin *in vitro* 2B yara modelinde değerlendirilmesi

Yara iyileşme testi, hücrelerin göçünü ve hücreler arası etkileşimleri laboratuvar ortamında incelemek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, canlı organizmalardaki yara iyileşmesi esnasında meydana gelen hücre hareketini simüle eder. Bu testte hücre katmanına bir çizik açılarak bu yaranın iyileşmesi izlenmektedir (Rodriguez vd., 2005; Suarez-Arnedo vd., 2020).

3.2.2.1. CBD'nin *in vitro* 2B yara kapanma hızına etkisinin değerlendirilmesi

Yara iyileşme testleri aracılığıyla bir maddenin hücre göçüne olan etkisi laboratuvar ortamında incelenebilmektedir. Bu yöntemin esas aldığı mantık, hücre tabakasında bir yara açıp, bu yaranın belli aralıklarla fotoğraflanması veya bir kamera sistemiyle canlı olarak görüntülenmesi yoluyla, test edilen bileşiğin hücre hareketine olan etkisinin değerlendirilmesidir (Şekil 3.2.) (Addis vd., 2020).

WST-1 metodu ile IC_{50} değeri belirlenen maddelerin hücre göçü üzerindeki etkileri yara iyileşme testi kullanılarak gözlemlendi. Yara modelinde incelemeler 0.,1.,2.

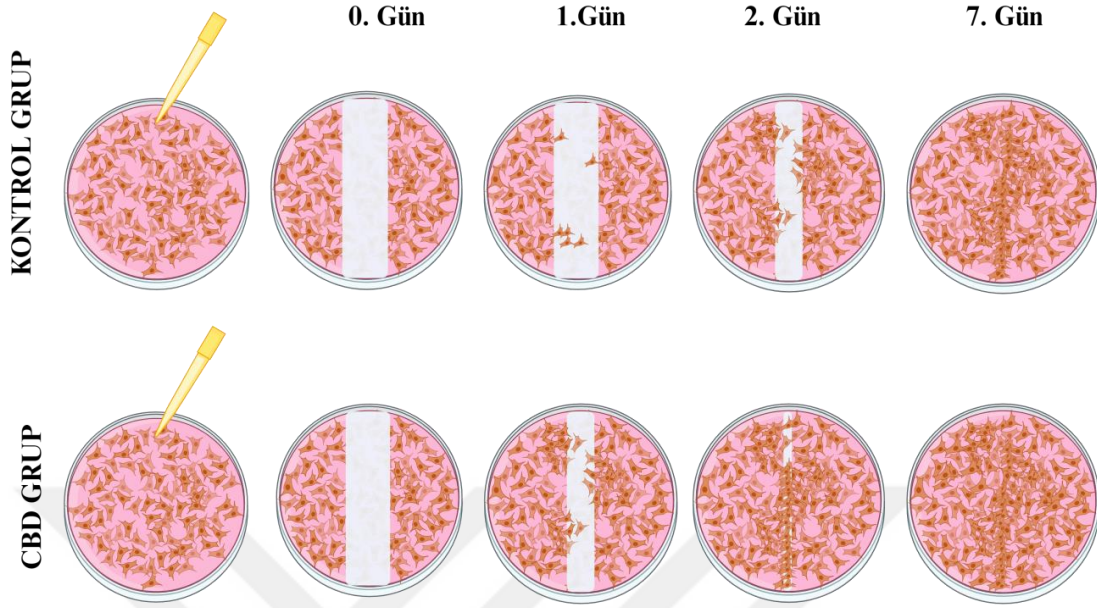
ve 7. günlerde yapıldı. *In vitro* yara iyileştirme etkisi çizik testi tekniği aşağıda verilen protokol ile yapıldı.

1. HS2 hücrelerinin üremeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için öncelikle hücreler %10 fetal dana serumu (FBS) ve antibiyotik içeren tam besiyerinde (sırasıyla DMEM ve Fibroblast Growth Medium) 200.000 hücre olacak şekilde kontrol grubu ve CBD'li grup 60 mm petri plakalara ekildi.
2. Hücreler %90-100 konfluensiye ulaşıncaya kadar çoğaltıldı.
3. Monolayer yapısı tamamen oluştuğunda, her bir kuyu üzerinde steril 200 µL pipet ucu ile hücre tabakası boyunca eşit bir çizik yapıldı.
4. Çizik hattı oluşturulduktan sonra kuyular PBS ile yıkandı, böylece ortamda kalan hücreler ve kalıntılar temizlenmiş oldu.
5. Her kuyuya kültür ortamı ilave edildi ve deney gruplarına göre belirlenen CBD konsantrasyonları uygulandı.
6. Kontrol gruplarına sadece kültür ortamı eklendi.
7. Çizik oluşturulduktan hemen sonra (0. saat) ve belirlenen inkübasyon sürelerinde (1., 2. ve 7. günlerde) çizik bölgesi ters mikroskop ve konfokal mikroskopunda 4X büyütmede incelenerek yara kapanması gözlemlendi.
8. Elde edilen görüntüler ImageJ yazılımıyla analiz edilerek çizik genişliği ölçüldü. Zaman içerisindeki kapanma yüzdesi, başlangıçtaki çizik genişliğine göre hesaplanarak hücre göçü kapasitesi değerlendirildi. Çizik kapanma yüzdesi denklem 2 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Çizik Kapanma (\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times \%100$$

Denklem 2

A0: ilk andaki çizik genişliği, At: belli zamandaki çizik genişliği.



Şekil 3.2. Çizik Testi Şematik Gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).

3.2.2.2. CBD'nin *in vitro* 2B yara modelinde etkisinin gen ifade düzeyinde değerlendirilmesi

CBD'nin yara iyileşme sürecini moleküler düzeyde nasıl etkilediğini anlamak amacıyla Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analizi uygulanmıştır. Bu analizde, yara iyileşmesinin farklı aşamalarını sembolize eden Keratin 10 (K10), Involucrin (INV) ve Laminin (LAM) genlerinin ifade seviyeleri incelenmiştir. Veri normalizasyonu için GAPDH referans olarak kullanılmıştır. CBD'nin etkileri 2B çizik modelinde çalışıldı.

3.2.2.2.1. 2B yara modelinden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

CBD'nin primer hücre yanıtları üzerindeki doğrudan etkisini araştırmak için 2B kültür ortamında kültüre edilen HS2 hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Gen ifadeleri, 2B yapının (0, 1. ve 2. gün) zamanla değişim sırasına göre değerlendirildi; bu aşamada, CBD'nin canlılık olmayan dozlarının çizik yarasının kapanması sırasında gen ifade üzerindeki temel düzenleme kapasitesi belirlendi. 2B

analizleri, hücrelerin kontrolsüz gelişimi ve erken moleküler işaretçilerin tespiti açısından temel bir veri kaynağı olarak kullanılmıştır.

- Daha önce bölüm 3.2.1.1'de ifade edildiği şekilde iki boyutlu (2B) yara modeli protokolü uygulanmıştır.
- Deney süresi sonunda, yara iyileşmesinin moleküler temelini incelemek amacıyla hücrelerden toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü.
- Yüksek kalitedeki RNA örnekleri, Ters Transkripsiyon (Reverse Transcription) yöntemiyle cDNA'ya dönüştürüldü. Yapısal bütünlükleri ise jel elektroforezi yöntemiyle doğrulandı.
- Hazırlanan cDNA'lar kullanılarak hedef genlerin (Keratin 10, Involukrin, Laminin) ekspresyon GAPDH referans genine göre normalize edilerek analiz edildi.

HS2 hücrelerinden elde edilen nükleik asit izolasyon çalışmaları, NucleoGene QuickEX Total RNA Extraction Kit (NUCLEO GENE, Katalog No: NGE024) aracılığıyla, spin kolon teknolojisi kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi, nükleaz içermeyen filtreli pipet uçları ve nükleaz içermeyen ultra saf su ile yapıldı, bu sayede kontaminasyon engellendi.

Kültüre edilmiş HS2 hücreleri için *in vitro* yara iyileştirme etkisi çizik testi tekniği aşağıda verilen protokol ile yapıldı:

- Aktif halde üremekte olan hücreler toplanmak için; PBS yıkandı, Tripsin EDTA eklendi ve 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.
- Hücreler 15 mL'lik bir falkon tüpe aktarıldı ve santrifüj edilerek keratinositlerin çökmesi sağlandı.
- Nükleaz içermeyen ependorf tüplerine (1.5-2 mL) aktarılan hücreler (3.2×10^6 h/mL) üzerine lisis tamponu eklendi ve vorteks yapıldı.
- Üstteki sıvı dikkatlice çekildi ve yeni nükleaz içermeyen ependorf tüplerine aktarıldı.
- RNA'nın çökmesini teşvik etmek için lisis edilen hücre karışımına %96-100 etanol eklendi ve vorteks yapıldı. Bu karışım, spin kolona aktarıldı ve santrifüj

yapıldı. RNaz içermeyen bir tüpe DNaz I tamponu eklendi. Karışım doğrudan kolon matriksine yerleştirildi. Oda sıcaklığında (20-30°C) inkübe edildi.

- Yıkama adımları ardından nükleaz içermeyen ependorf tüplerine aktarıldı.
- RNA'yı kolondan tüpe almak için elüsyon tamponu eklendi, inkübe edildi ve santrifüj uygulandı. Membrana bağlı olan saf total RNA, kolonun içinden salındı.
- İzole edilen toplam RNA'nın miktarı ve saflığı, NanoDrop™ ile 260/280 nm ve 260/230 nm absorbans oranları ölçülerek belirlendi. RNA örneklerinin 260/280 nm oranı, [1.8 ile 2.0] arasında, 260/230 nm oranı ise [>1.8] olarak doğrulandı.
- Yüksek kaliteli RNA örnekleri, cDNA sentezine kadar -80 °C'de saklandı.

RNA izolasyon aşamasından elde edilen ve kalite kontrolü yapılan total RNA örneklerinden, Real-Time PCR (qPCR) analizi için kalıp cDNA sentezlemek amacıyla iScript cDNA Synthesis Kit (BIORAD, Cat No: 1708891) kullanıldı. Sentez reaksiyonu, nükleaz içermeyen PCR tüplerinde (0.2 ml), 2 µg total RNA kullanılarak, tek tüplü bir reaksiyon karışımı çerçevesinde gerçekleştirildi. Sentez reaksiyonu, birbirini takip eden üç ana aşamadan oluşmaktadır:

- Her bir örnek için 2 µg total RNA, 4 µL 5X iScript Reaction Mix (oligo(dT) ve random hexamer primerleri, dNTP'ler, MgCl₂) ve 1 µL iScript Reverse Transcriptase enzimi eklendi. Toplam 20 µL reaksiyon hacmi, nükleaz içermeyen ultra saf su ile tamamlandı.

Hazırlanan reaksiyon karışımı, termal döngü cihazında (Thermal Cycler) Tablo 3.1'de sunulan termal koşullar kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reaksiyon profili, primerlerin bağlanması, cDNA sentezi ve enzimin inaktivasyonunu içermektedir.

Tablo 3.1. cDNA Sentezi Termal Döngü Koşulları

AŞAMA	SICAKLIK (°C)	SÜRE	AÇIKLAMA / AMAÇ
Bağlanma (Annealing)	25	5 dk	Random/Oligo(dT) primerlerin bağlanması
Uzama (Extension)	46	20 dk	cDNA sentezi
İnaktivasyon (Termination)	95	1 dk	Enzim inaktivasyonu

- Sentezlenen cDNA örnekleri, Real-Time PCR analizlerine kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Geliştirilen HS2 hücrelerinde hedef genlerin (K10, Laminin, Involucrin) ifade edildiğini doğrulamak ve primer spesifikliğini test etmek amacıyla, standart PCR tekniği kullanıldı. Reaksiyonlar, Taq DNA Polimeraz enzimi, dNTP'ler, tampon ve kofaktörleri hazır olarak içeren tek tüpte (premix) Taq DNA polimeraz (BIONEER, Cat No: E-2011-2) kullanılarak, son hacimde 20 µl son gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA örnekleri PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı. Sentez reaksiyonu, birbirini takip eden aşamalardan oluşmaktadır:

- Her bir 0.1 ml'lik PCR tüpüne, 2 µL 10X reaksiyon buffer, 5 uL cDNA, 1 µL her bir primer (İleri ve Geri), 2 µL dNTP, 1 µL MgCl₂, 1 µL Taq polimeraz ve 7 µL nükleaz içermeyen ultra saf su ile tamamlanacak şekilde hazırlandı. Tüpler, reaksiyonun başlangıcında homojen bir karışım sağlamak amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi.
- Çalışmada, keratinosit farklılaşma markerları (K10/Keratin-10, Laminin, Involucrin) ve referans gen olarak GAPDH analizi yapıldı.
- Genlere özgü primer dizileri Tablo 3.2.'de sunulmuştur. Primerlerin teorik bağlanma sıcaklıkları (T_m) optimize edilmiştir.

Tablo 3.2. Standart PCR Analizinde Kullanılan Primer Dizileri.

GEN ADI	İLERİ PRİMER DİZİSİ (5' → 3')	GERİ PRİMER DİZİSİ (5' → 3')	AMPLİKON BOYUTU (bp)	T _m (°C)
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TGGGATTTCATTGATGACA	201	57
K10	CATCCTGCTTCAGATCGACA	TCATTTCTCCTCGTGGTTC	218	57
Laminin	GAAGACGGGAAGAAAGGG	CAGGGCTAAGAACTGAAAG	124	56
Involucrin	TAGAGGAGCAGGAGGGACAA	AGGGCTGGTTGAATGTCTTG	139	59

- PCR reaksiyonları, termal döngü cihazında (Thermal Cycler) 35 döngüde gerçekleştirildi.
- Reaksiyonun termal profili, başlangıç denatürasyonu, döngüsel denatürasyon, primer bağlanma (annealing) ve uzama (extension) aşamalarından oluşmaktadır. Primer bağlanma sıcaklığı (T_m), her bir gen çifti için optimize edildi ve Tablo 3.3.'de sunulan termal koşullar kullanıldı.

Tablo 3.3. Standart PCR Termal Döngü Koşulları.

AŞAMA	SICAKLIK (°C)	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI
Başlangıç Denatürasyonu	94	1dk	1
Denatürasyon	94	20 sn	35
Bağlanma (Annealing)	50	30 sn	35
Uzama (Extension)	72	30 sn	35
Son Uzama	72	5 dk	1
Saklama	12	∞	

PCR ürün boyutlarını ve spesifikliğini doğrulamak amacıyla Agaroze Jel Elektroforezi (Jel Yürütme) ile analiz edildi.

3.2.2.2. Gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) ile gen ifadesi analizi

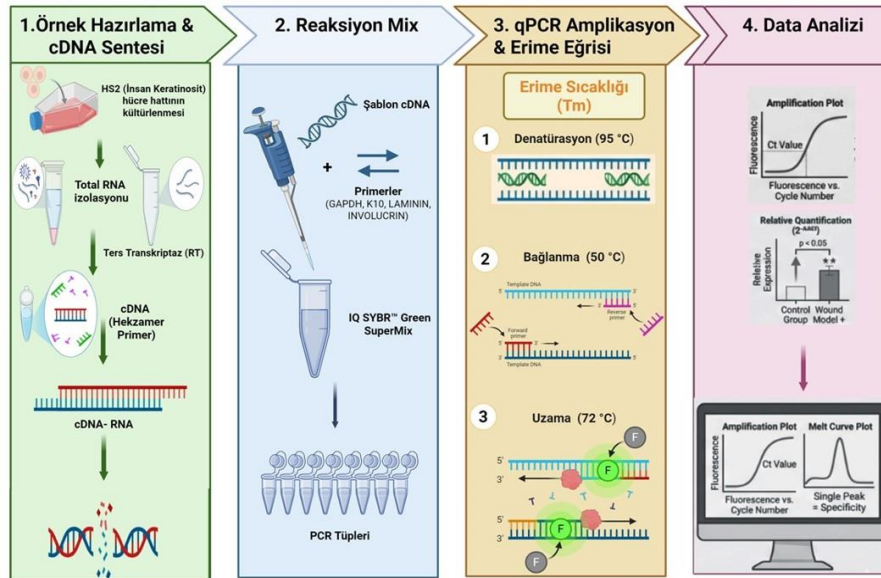
Geliştirilen 2B modelde hedef genlerin (GAPDH, K10, Laminin, Involucrin) ifadesi, SYBR Green bazlı Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR) yöntemiyle belirlendi. Reaksiyonlar, Taq DNA Polimeraz enzimi, dNTP'ler, tampon ve SYBR Green I boyasını hazır olarak içeren iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIORAD, Cat No: 172-5120) kullanılarak gerçekleştirildi.

- Çalışmada, keratinosit farklılaşma markerları (K10/Keratin-10, Laminin, Involucrin) ve referans gen olarak GAPDH analizi yapıldı.
- Genlere özgü primer dizileri Tablo 3.4.'de sunulmuştur.
- Primerlerin spesifikliği erime eğrisi (melting curve) analizi ile doğrulandı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı olarak PCR optimizasyonunda belirlenen sıcaklık kullanıldı. Reaksiyonlar, nükleaz içermeyen qPCR tüplerinde (Bio-Rad), 20 µL son hacimde hazırlandı.
- Reaksiyonlar, Real-Time PCR System cihazında, Tablo 3.4.'de sunulan termal döngü koşulları kullanılarak gerçekleştirildi.
- Başlangıç denatürasyonu sonrası 40 döngü amplifikasyon yapıldı ve floresan ışıma her döngünün Bağlanma/Uzama aşamasında anlık olarak ölçüldü.
- Reaksiyonun spesifikliğini doğrulamak amacıyla, amplifikasyon döngüleri sonrasında erime eğrisi (melting curve) analizi yapıldı.

Tablo 3.4. Real-Time PCR (qPCR) Termal Döngü Koşulları.

AŞAMA	SICAKLIK (°C)	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI
Başlangıç Denatürasyonu	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Bağlanma/Uzama	50	1 dk	40
Erime Eğrisi (Melting Curve)	95	0,05 sn	1
Son Uzama	55	0,05 sn	1
Saklama	95	0,01 sn	1

- Gen ifadesi verileri, CT (Cycle Threshold) değerleri kullanılarak nispi kantifikasyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) yöntemiyle analiz edildi.
- Hedef genlerin ifadesi, referans gen olan GAPDH ifadesine göre normalize edildi ve kontrol grubu ile CBD uygulanan gruplar arasındaki nispi değişimler belirlendi (Şekil 3.3).

**Şekil 3.3.** Çizik Model Oluşturma ve CBD'nin yara iyileştirme etkisinin in vitro 2B yara modelinde RT-PCR ile değerlendirilmesi (Biorender ile çizilmiştir).

3.3. CBD'nin *in vitro* 3B modellerde yara iyileştirme etkisinin değerlendirilmesi

Üç boyutlu (3B) hücre kültürü ortamında deri doku modeli geliştirilmesi, *in vivo* deri katmanlarını ve hücreler arası etkileşimleri en doğru şekilde oluşturmak için

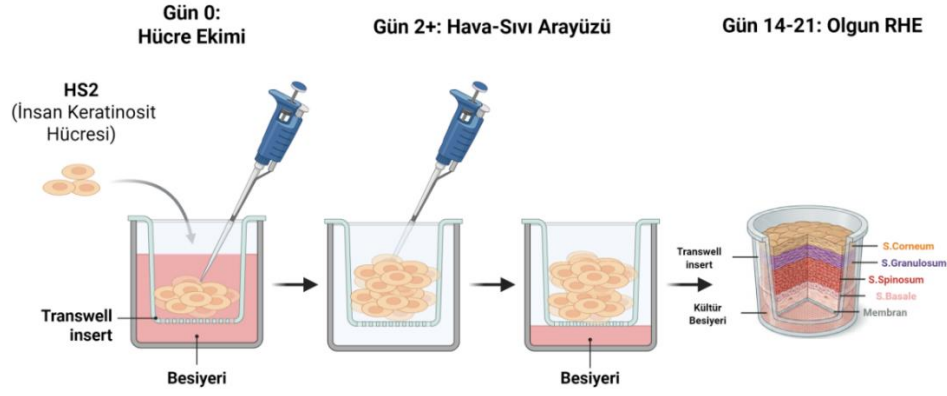
yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli ve tam katmanlı deri modeli (FTSE) olmak üzere iki farklı model yaklaşımıyla gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. *In vitro* 3B yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli

Bu aşamada, derinin en dış tabakası olan epiderminin bariyer fonksiyonları ve hücrel organizasyonu hedeflenmektedir. Yeniden yapılandırılmış epidermal model (RHE), keratinosit hücrelerinin insertler üzerine ekilmesi ile oluşturuldu (Şekil 3.4.).

Kullanılan besiyerleri sırasıyla; E1-E3 besiyeri (Epilife Medium, MEPI500CA), E2 besiyeri (E1 besiyeri + CaCl_2) ve E3 (E2 besiyeri + askorbik asit çözeltisi) şeklindedir. Bu farklı seviyeler, keratinositlerin farklılaşması için ek bir uyarı yapar.

- HS2 üremesi için öncelikle hücreler insan keratinosit büyüme serumu, antibiyotik içeren E1 besiyerinde üretildi. Günlük olarak besiyeri değiştirilerek CO_2 'li ortamında üretildi. Hücrelerin aktarımı için kültür kabının en az %80 dolu olması gerekmektedir.
- Aktif halde üremekte olan hücreler toplanmak için; PBS yıkandı, Trypsin EDTA eklendi ve 37°C 'de 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon boyunca, 12'li plaka için insertler hazırlandı.
- İnkübasyon sürecinin ardından hücreler santrifüj edilerek keratinositlerin çökmesi sağlandı.
- Hücre peleti E2 besiyerinde yeniden askıya alındı. Hücre sayımı, thoma sayım lamı kullanılarak ve tripan mavisi ile gerçekleştirildi.
- 12 kuyulu plakada insert için E2 besiyeri içerisinde 2×10^6 h/mL olacak şekilde toplandı ve insert içine eklendi; plaka 37°C ve %5 CO_2 ortamında 2 saat boyunca inkübe edilmek üzere bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda 12 kuyulu plakada insert dışına E2 besiyeri eklendi. Plakalar, 37°C ve %5 CO_2 ortamında 24 saat bekletildi.
- 24 saat sonra, hava-sıvı arayüzü (ALI) kültürü başlatmak üzere insertlerden E2 besiyeri aspire edildi. İntert dışına E3 besiyeri eklendi.
- Besiyeri değişiklikleri 12 kuyulu plaka için haftada üç kez olmak üzere besiyeri değişimi yapıldı.



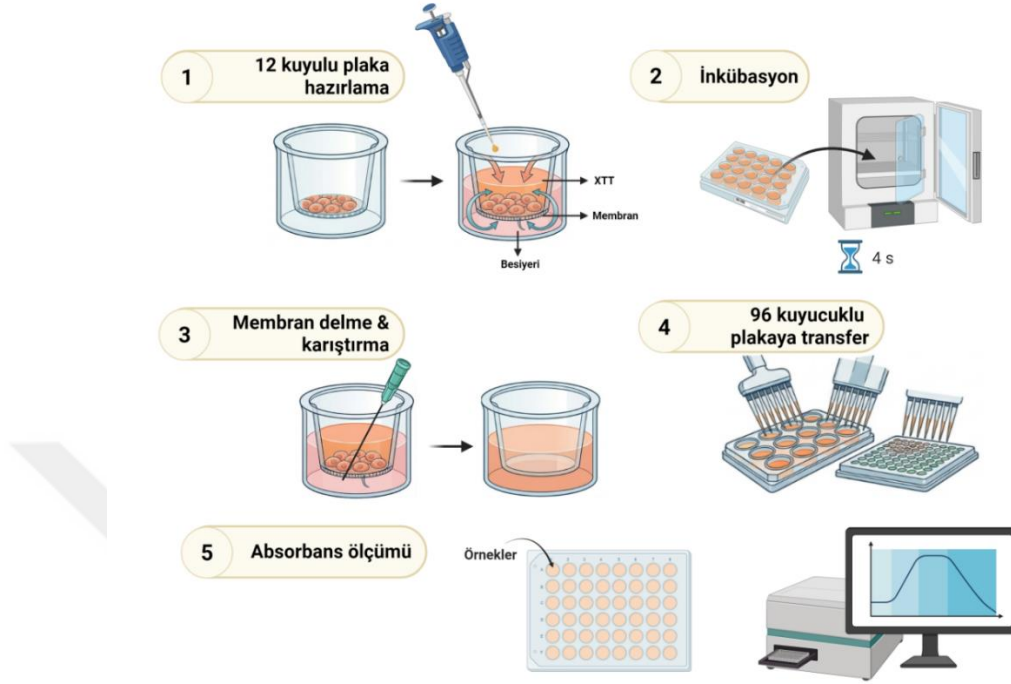
Şekil 3.4. RHE Model Şematik Gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).

3.3.1.1. *In vitro* 3B yeniden oluşturulmuş insan epidermis (RHE) modeli yaralanması

Yeniden Oluşturulmuş İnsan Epidermis (RHE) modellerinde mekanik yaralanma (punch/çizik vs.), dokunun *in vivo* deri fizyolojisini en iyi yansıttığı 10. ile 15. günler arasında gerçekleştirilmiştir. Bu zaman aralığının seçilme nedeni, keratinositlerin hava-sıvı arayüzü (ALI) kültüründe terminal farklılaşma süreçlerini tamamlayarak fonksiyonel bir stratum corneum tabakası ve sağlam bir bariyer yapısı oluşturmasıdır (Schäfer-Korting vd., 2008a).

- 12 kuyulu plaka içindeki RHE modelde yıkama için 12 kuyulu plaka hazırlandı.
- Punch ile delinmiş modelleri, herhangi bir kalıntı ortamı temizlemek için önce PBS içinde kısa süre daldırıldı, ardından oda sıcaklığında Tripsin/EDTA içinde inkübe edildi.
- Model tekrar küçük bir petri kabına konuldu ve ince uçlu cımbızla punch yeri dikkatlice çıkarıldı. Yaralanmış modeller plakalarına yerleştirildi.
- Yarasız kontrol, yara kontrol ve yara + CBD grupları 7., 14., ve 21. gün grupları oluşturuldu.
- Geliştirilen *in vitro* 3B epidermal modellerde, CBD uygulamasının hücre metabolik aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla XTT analizi yarasız kontrol, yara kontrol ve yara + CBD grupları 7., 14., ve 21. gün grupları ile gerçekleştirildi.
- Bu modellere fiksasyon, konfokal mikroskopta görüntüleme ve SEM ile görüntüleme yapılarak CBD'nin yara kapanmasına etkisi değerlendirilmiştir.

- Kontrol dokudaki canlılık %100'e karşılık gelecek şekilde dokulardaki yüzde canlılık denklem 1 ile hesaplandı. CBD'nin Epidermal model üzerindeki yaraya etkisi değerlendirildi.



Şekil 3.6. *In vitro* 3B Yeniden Oluşturulmuş İnsan Epidermis (RHE) Modelde XTT aşamasının şematik gösterimi (Biorender tarafından yapılmıştır).

3.3.1.3. CBD'nin etkisinin 3B epidermal yara modelinde konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi

Yara iyileşme sürecini incelemek amacıyla geliştirilmiş 3B *in vitro* RHE yara modeli, konfokal lazer taramalı mikroskop ile incelendi (Şekil 3.7.). RHE modeli üzerinde oluşturulan yara, deneyin başlangıcında ve belirlenen zaman aralıklarında (7., 14., ve 21.gün) konfokal mikroskop ile gözlemlenmiştir. Elde edilen görüntüler, yara alanının zamanla küçülmesini ve hücre göçü hızını değerlendirmek üzere kaydedilmiştir.

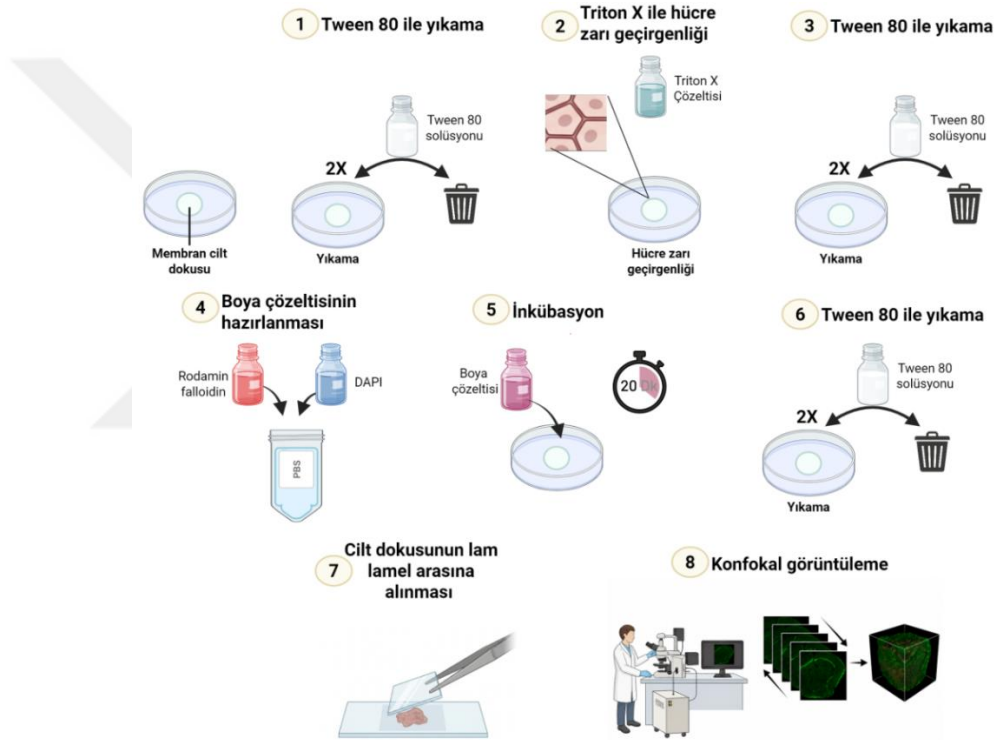
- İnsertler normal 12 kuyulu bir plakadaki karşılık gelen kuyucuklara aktarmak için steril forseps kullanıldı. Dokular paraformaldehit ile sabitlendi.
- Neşter ile ayrılan *in vitro* deri model dokusu 60 mm petri plakalara alındı.
- Tween-80 solüsyonu ile yıkandı, yıkamadan sonra Triton-X çözeltisiyle hücre zarı geçirgen hale getirildi.

- PBS içerisine rhodamine phalloidin ve DAPI eklendi, yıkama sonrası her bir örneğe boya çözeltisi eklenerek inkübe edildi. Yıkama sonrası doku örnekleri lam-lamel arasına alındı.

Rhodamine phalloidin: Eksitasyon Dalgaboyu: 546, Emisyon Dalgaboyu: 575 nm

DAPI: Eksitasyon Dalgaboyu: 359 nm, Emisyon Dalgaboyu: 461 nm

- Boyanan örnekler, konfokal lazer tarama mikroskobu (Zeiss, LSM 900) ile incelendi. Görüntüler, farklı derinliklerden z-stack tekniği ile elde edilerek epidermal tabakaların üç boyutlu yapısı analiz edildi.



Şekil 3.7. CBD'nin etkisinin 3B epidermal yara modelinde konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesinin şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).

3.3.1.4. CBD'nin etkisinin *In vitro* 3B epidermal yara modelinde SEM ile değerlendirilmesi

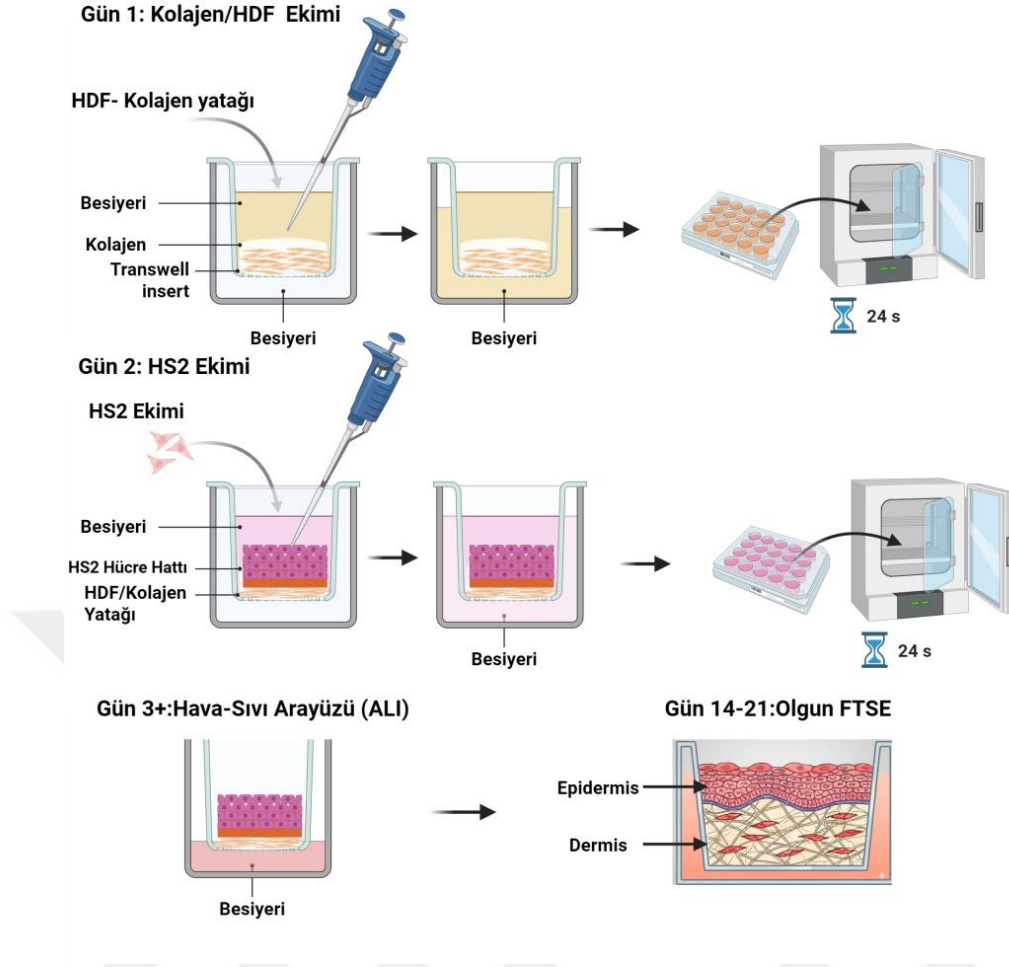
- Dokular paraformaldehit eklenerek 4 saat boyunca oda sıcaklığında sabitlendi.
- Paraformaldehit aspire edildikten sonra dışarıyla %50, %75, %90 ve %100 (h/h) konsantrasyon olan etanol çözeltileri ile dehidre edildi.

- Tüm doku örnekleri HMDS (Hekzametil Disilazan) ile işlenerek bir gece boyunca çeker ocakta kurutuldu. Doku örnekleri iridyum ile kaplanarak SEM’de gözlemlendi.

3.3.2. *In vitro* tam katmanlı deri modeli (FTSE) geliştirilmesi

Bu modelde, epidermise ek olarak derinin destek yapısı olan dermis tabakası vardır.

- HS2 üremesi için öncelikle hücreler insan keratinosit büyüme serumu (HKGS (100X), Gibco Cat No: S-001-5), antibiyotik içeren (Penicilin/Streptomycin-Gibco Cat No: 15140-122) tam besiyerinde (Epilife with 60 μ M CaCl₂) üretildi. Günlük olarak besiyeri değiştirilerek CO₂’li ortamında üretildi. Hücrelerin aktarımı için kültür kabının en az %80 dolu olması gerekmektedir.
- HDF (dermal fibroblast) hücrelerini uygun büyüme ortamında fibroblast besiyeri içerisinde (Fibroblast Growth Medium- Cell Applications Cat No:116-500) her gün besiyeri değiştirilerek CO₂’li inkübatörde çoğaltıldı. Hücrelerin pasajlanması için kültür kabının %70-80’ini doldurmuş olması gerekmektedir.
- İlk olarak aktif halde üremekte olan HDF’ler 4.5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde hazırlandı.
- 15 mL’lik falkon tüpte sırayla sıçan kuyruğu kolajeni, 5xRB ve HDF ($3,6 \times 10^5$ hücre/mL) karıştırılarak toplam hacmi 8 mL olan bir kolajen jeli hazırlandı.
- 12 kuyulu plaka içinde her bir inserte kolajen jel karışımı eklendi. İnsertler 37°C ve %5 CO₂’de 1 saat bekletilerek kolajen jelinin polimerleşmesi sağlandı.
- Katılaşmadan sonra dermal eşdeğerlere medium eklendi. 37°C ve %5 CO₂ inkübatörde 24 saat bekletildi.
- Kültür flasklarında çoğaltılan keratinosit hücreleri 2×10^6 hücre/mL’ye ayarlandı, kolajen yataklarına zarar vermeden her bir inserte keratinosit eklendi.
- İnsertler 37°C ve %5 CO₂ inkübatöründe 2 saat inkübe edildi ve 12 kuyucuklu plakada 2 mL E2 mediuma daldırıldı ve gece boyunca inkübatöre bırakıldı.
- Hava-sıvı arayüzü (ALI) kültürü başlatmak üzere insertlerden E2 besiyeri aspire edildi. Modeller derin kuyulu plakaya alındı. Besiyeri değişiklikleri 12 kuyulu plaka için haftada üç kez olacak şekilde gerçekleştirildi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Ortamında Deri Doku Modeli Geliştirilmesinin şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).

3.3.2.1. *In vitro* 3B FTSE yara modeli geliştirilmesi ve CBD uygulaması

Tam katmanlı deri örneklerinde (FTSE), mekanik yaralanma (punch biyopsi/çizik vs.) uygulaması, doku yapısının *in vivo* deri fizyolojisini ve dermal-epidermal etkileşimleri en iyi biçimde yansıtacak şekilde 10. ile 15. günler arasında gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte bu zaman diliminin tercih edilme sebebi, keratinositlerin hava-sıvı arayüzü (ALI) kültürü içinde son aşama farklılaşmasını tamamlayıp işlevsel bir stratum corneum oluşturması ve bununla birlikte dermal fibroblastlar ile bazal membran bütünlüğünün sağlanmasıdır (Bataillon vd., 2019).

- 12 kuyulu plaka içinde yarasız kontrol, yara kontrol ve yara + CBD grupları 7., 14., ve 21. gün grupları oluşturuldu (Şekil 3.9.).
- Bu modellere; 3B deri modellerinin fiksasyonu, 3B deri modellerinin parafine gömme, H ve E boyama ve konfokal taramalı lazer mikroskopisi ile değerlendirildi.

3.3.2.2. CBD'nin etkisinin *in vitro* 3B tam katmanlı deri yara modelinde histolojik değerlendirilmesi

Histolojik boyama, belirli doku yapılarına bağlanan boyaların kullanılmasıyla gerçekleştirilen bir tekniktir. Kesit kalınlığı, boya konsantrasyonu ve boyama süresi gibi etkenler, boyama sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Histolojik boyama için öncelikle ince doku kesitleri cam lamalar üzerine yerleştirilmelidir. *In vitro* olarak kültürlenmiş örnekler,

- İnsertlerin içine 1 mL; dışına 2 mL %10 paraformaldehit tekleterek 4 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- 4 saat sonunda paraformaldehit insert içinden aspire edildi.
- Dehidrasyon dokusunun işlenmesi sırasında deri dokusunun kıvrılması önlemek için deri dokularını 3 cm x 3 cm lens kağıdın aktarıldı.
- Kağıt; deri dokusu katlanmadan katlanılarak doku kasedine yerleştirildi.
- Doku kasedi petri içine %70'lik soğuk EtOH bırakıldı ve +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.1. 3B deri modellerinin parafine gömülmesi

Paraformaldehit ile yapılan fiksasyon, hücre ve dokuların mikroskopik inceleme için mümkün olduğunca doğal halleriyle korunmasını sağlayarak proteinleri belirli bir derecede çapraz bağlar.

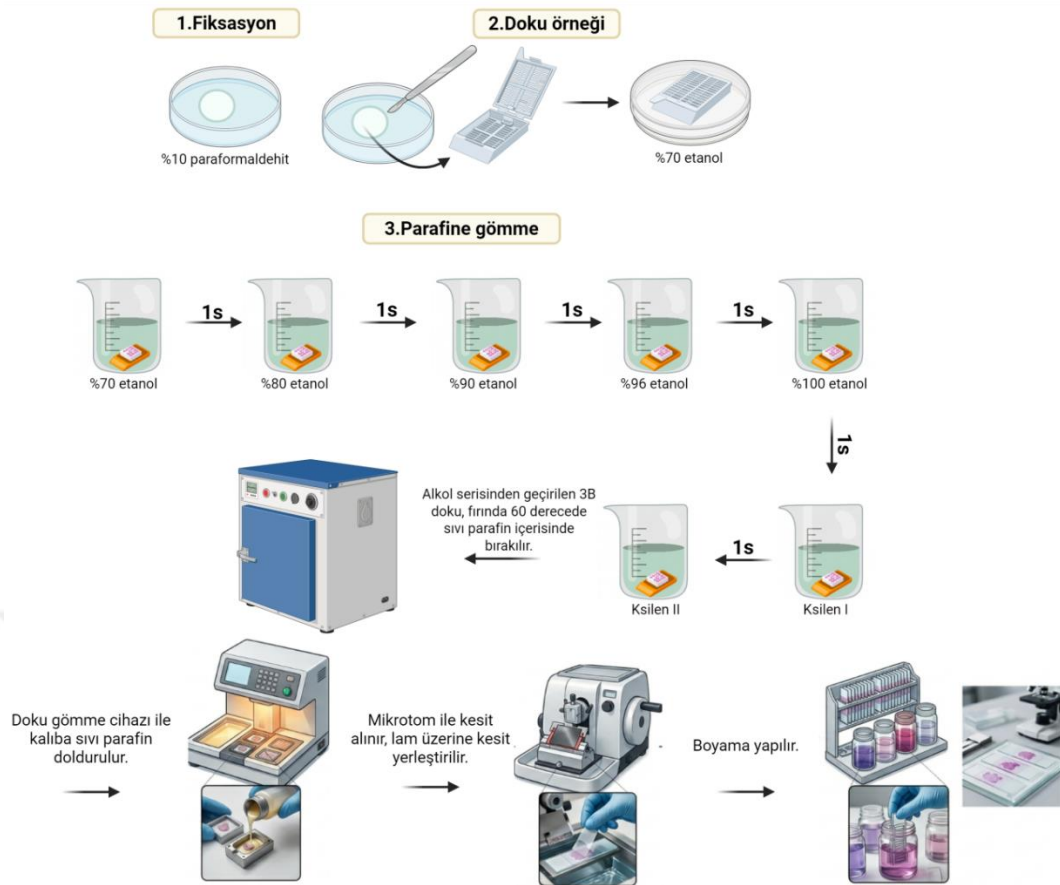
- Gömme işleminden önce doku, artan etanol konsantrasyonları ile dehidratasyon işlemine tabi tutuldu.
- Bu amaçla, sırasıyla %50, %70 ve %80 etanolde iki defa 30'ar dakika ve %96 etanolde iki kez 30'ar dakika bekletildi.
- Fiksasyon ve dehidratasyon işlemlerini tamamlamış deri örnekleri, parafinle doldurulmuş kalıbın içine yerleştirildi. Doku, istenilen kesit yönüne göre doğru bir şekilde yerleştirildi.
- Kalıp, doku gömme kasetiyle kapatıldı ve üzerine ek parafin ilave edildi.
- Parafine yerleştirilen doku örneği bir saat boyunca -80°C'de donduruldu.
- Sonrasında, mikrotom cihazına parafine gömülmüş doku konularak 3 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Bu kesitler, yaklaşık 35 °C sıcaklığa sahip su banyosuna koyuldu ve daha sonra cam lam üzerine aktarılıp fırında kurutuldu (Şekil 3.9.)

3.3.2.2.2. Histolojik analiz (H ve E boyama)

H ve E Boyama, histoloji ve sitoloji uygulamaları için geliştirilmiştir. Bu set, geleneksel alkol bazlı formüllerin avantajlarını sağlarken, kullanım kolaylığı açısından önemli geliştirmeler sunan yeni bir eozin formülüne sahiptir. Hematoksilin, çekirdekleri belirgin ve yoğun mavi bir renge boyayarak, sitoplazmanın eozin ile boyanmış kısımlarına karşı mükemmel bir kontrast oluşturur.

Histolojik Boyama Süreci (H ve E);

- Kesit alındıktan sonra 60°C’ de 3-4 saat bekletildi.
- Bekleme süresinden sonra ksilene daldırıldı.
- Ksilin işleminden sonra kesit, sırasıyla %90, %80, %70, %50 ve %30 olan etanol çözeltilerinde birer dakika bekletildi.
- Deparafinizasyon uygulandı ve kesit dH₂O ile nemlendirildi.
- Kesitlerin üzerini tamamen kaplayacak şekilde yeterli miktarda Mayer’s Hematoksilin (Lillie’s modifikasyonu) uygulanarak 30 sn bekletildi.
- Fazla boyayı temizlemek amacıyla lamalar, iki kez çeşme suyuyla durulandı.
- Lamaların üzerine Bluing Reaktif eklendi ve bekletildi.
- Tekrar iki kez çeşme suyuyla durulama yapıldı.
- Lamalar, saf alkol içine daldırıldı ve fazla sıvı nazik bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Tüm kesitleri kaplayacak şekilde Modifiye Alkollü Eozin Y çözeltilisi uygulanarak bekletildi.
- Lamalar, saf alkol ile durulandı.
- Daha sonra üç kez saf alkol ile dehidrasyon işlemi yapıldı.
- Son olarak lamalar şeffaflaştırıldı ve sentetik reçine ile kaplanarak montajlandı (Şekil 3.10.).



Şekil 3.9. Deri Model Dokunun Mikroskopi ve İmmünohistokimya ile Karakterizasyonu şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).



Şekil 3.10. Hematoksilin ve Eosin, immünohistokimyasal (IHC) Boyama şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).

3.3.2.3. CBD'nin etkisinin *in vitro* 3B tam katmanlı deri yara modelinde konfokal mikroskop ile değerlendirilmesi

Yara iyileşme sürecini incelemek amacıyla geliştirilmiş 3B *in vitro* FTSE yara modeli, konfokal lazer taramalı mikroskop ile incelendi. FTSE modeli üzerinde oluşturulan yara, deneyin başlangıcında ve belirlenen zaman aralıklarında (7. ve 21.gün) konfokal mikroskop ile gözlemlenmiştir. Elde edilen görüntüler, yara alanının zamanla küçülmesini ve hücre göçü hızını değerlendirmek üzere kaydedilmiştir.

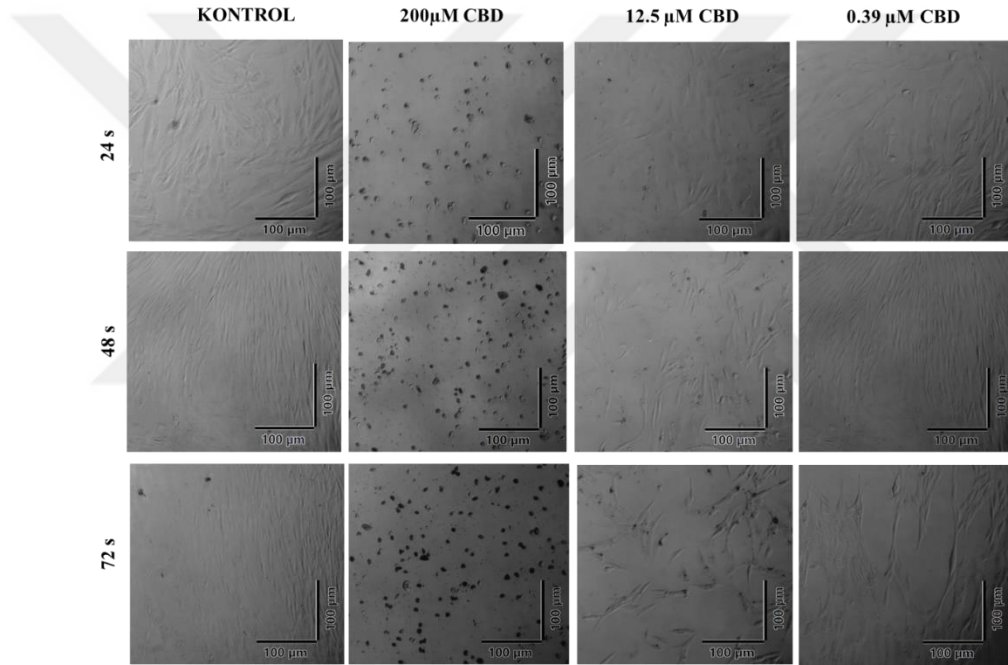
Kesit alınan örnekler, Şekil 3.10'da belirtilen dereceli alkol serisinden geçirilerek dehidre edilmiş; ardından Şekil 3.7'de şematize edilen protokol ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

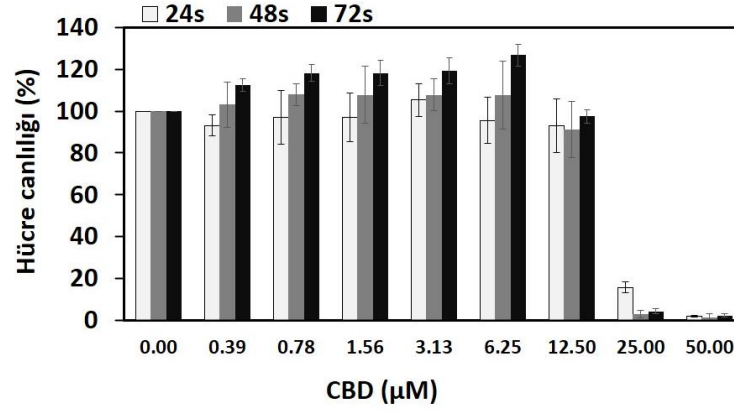
4.1. CBD'nin Hücre Canlılığına *In Vitro* Etkisi

Fibroblast ve keratinosit hücrelerinde CBD uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi, mitokondriyal metabolik aktiviteyi analiz eden WST-1 testi aracılığıyla araştırıldı. Bu çalışmada, hücreler farklı CBD konsantrasyonları içeren kültür ortamlarına Şekil 4.1. ve 4.3.'de görüldüğü gibi 24, 48 ve 72 saat boyunca maruz bırakıldı. Hücre canlılığı, her bir zaman diliminde kontrol grubuyla kıyaslanarak incelendi.



Şekil 4.1. Fibroblast hücrelerinin farklı CBD konsantrasyon gruplarında morfolojik görünümünün faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 µm boyundadır.

WST-1 analizinden elde edilen bilgiler doğrultusunda, dermal fibroblast hücreleri için güvenli CBD konsantrasyonu yaklaşık 12,5 µM olarak belirlendi (Şekil 4.2). IC₅₀ değerleri zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde ise uygulama süresinin artması IC₅₀ değerlerinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır (Tablo 4.1).



Şekil 4.2. CBD'nin fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi.

CBD'nin fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve her üç zaman diliminde 25 ve 50 μM CBD'nin etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p < 0.05$). 12,5 μM CBD uygulaması üç zaman diliminde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığını azaltmayan en yüksek konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir.

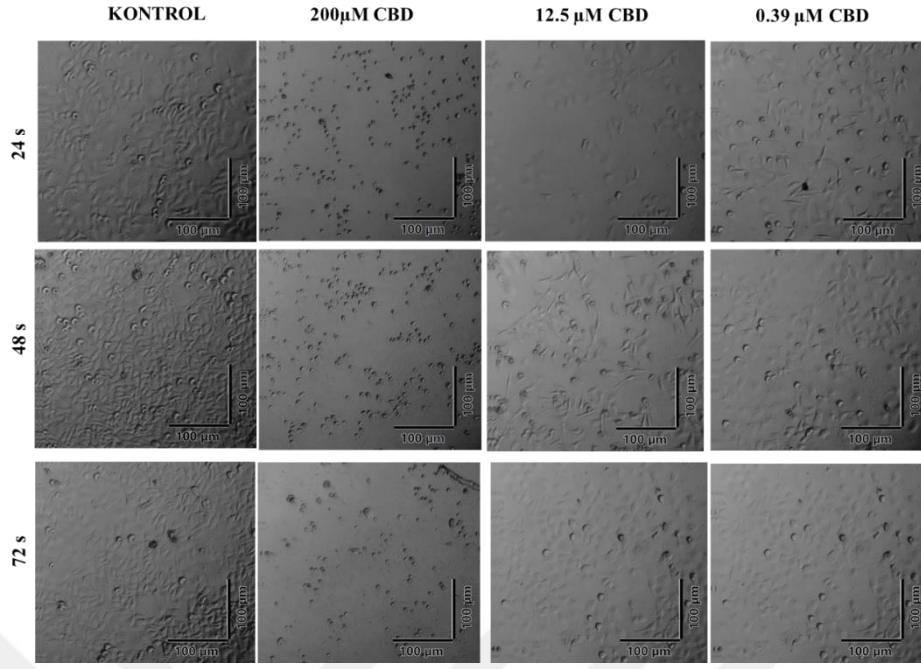
Tablo 4.1. CBD'nin fibroblast hücreleri üzerinde IC_{50} değerleri

Süre (s)	IC_{50} (μM)
24	17,16 ±10,34
48	16,28 ±4,70
72	20,90± 0,14

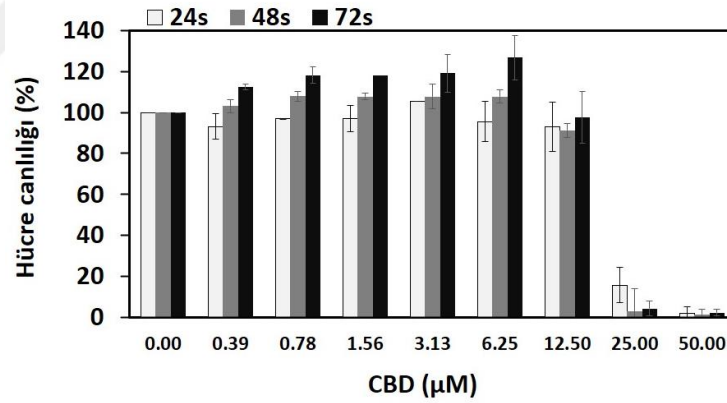
WST-1 analizinden elde edilen bilgiler doğrultusunda, keratinosit hücreleri için güvenli CBD konsantrasyonu yaklaşık 12,5 μM olarak belirlendi (Şekil 4.4). IC_{50} değerleri zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde ise uygulama süresinin artması IC_{50} değerlerinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. CBD'nin keratinosit hücreleri üzerinde IC_{50} değerleri

Süre (s)	IC_{50} (μM)
24	28,78± 0,46
48	16,28 ± 6,92
72	20,90± 5,14



Şekil 4.3. Keratinosit hücrelerinin farklı CBD konsantrasyon gruplarında morfolojik görünümünün faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 μm boyundadır.

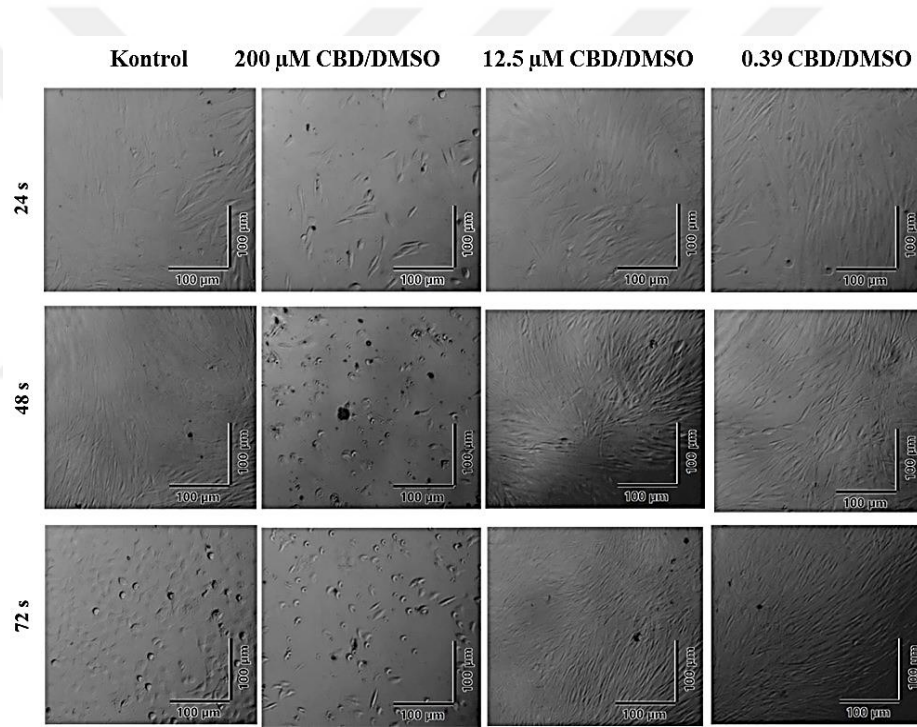


Şekil 4.4. CBD'nin keratinosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi.

CBD'nin keratinosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve her üç zaman diliminde 50 μM CBD'nin etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p < 0.05$). 12,5 μM CBD uygulaması üç zaman diliminde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığını azaltmayan en yüksek konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir.

Analizlerin bulgularına göre, 12,5 μM seviyesine kadar hücrelerin canlılık oranının %90'ın üzerinde kaldığı, fakat 12,5 μM'yi aşan dozlarda canlılığının başladığı

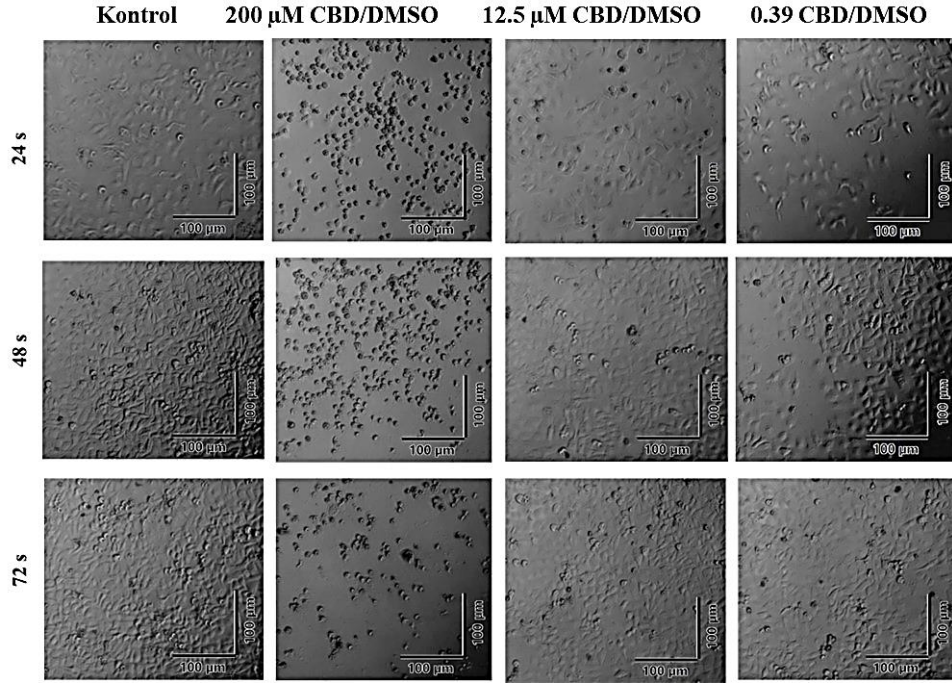
gözlemlenmiştir. CBD'nin farklı doz ve süre uygulamalarının fibroblast ve keratinosit hücrelerinin üremesine etkileri değerlendirildiğinde hem 2B yara modeli hem de her iki hücrenin bir arada kullanılacağı 3B deri yara modeli için de uygulanabilecek olan 12,5 μ M konsantrasyon toksik olmayan güvenli doz olarak belirlenmiştir. 3B kültür çalışmalarına en yüksek güvenli doz ile devam ederek CBD'nin 3B kültürde dokuya nüfuz edecek yüksek konsantrasyonun uygulanması garanti edilmiştir. Çözücü kontrol grubu olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO)'nun hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi de aynı deney koşulları altında incelendi. 12,5 μ M CBD'nin çözündüğü DMSO miktarlarının her iki hücre hattında da Şekil 4.5. ve 4.6.'da görüldüğü gibi hücre canlılığını azaltıcı bir etki yaratmadığı doğrulandı.



Şekil 4.5. CBD içerisinde bulunan DMSO'nun tek başına fibroblast hücrelerinin morfolojilerine etkisinin faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 μ m boyundadır.

Hücre morfolojileri incelendiğinde DMSO'nun yüksek miktarlarının hücre canlılığını azaltıcı etkisinin keratinosit hücreleri üzerinde fibroblast hücrelerine göre daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Hücre morfolojileri DMSO'nun keratinosit hücrelerini öldürme mekanizmasının daha çok apoptoza benzediğini göstermektedir.

Yüksek CBD konsantrasyonlarında hücre canlılığının azalmasının nedeninin çözümlen DMSO'nun olabileceği de ifade edilebilir (Şekil 4.5, 4.6).



Şekil 4.6. CBD içerisinde bulunan DMSO'nun tek başına keratinosit hücrelerinin morfolojilerine etkisinin faz-kontrast mikroskobu ile incelenmesi. Ölçek çubuğu 100 µm boyundadır.

Hücre morfolojileri incelendiğinde DMSO'nun yüksek miktarlarının hücre canlılığını azaltıcı etkisinin keratinosit hücreleri üzerinde fibroblast hücrelerine göre daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Hücre morfolojileri DMSO'nun keratinosit hücrelerini öldürme mekanizmasının daha çok apoptoza benzediğini göstermektedir. Yüksek CBD konsantrasyonlarında hücre canlılığının azalmasının nedeninin çözümlen DMSO'nun olabileceği de ifade edilebilir.

Elde edilen biyoyumluluk sonuçları, CBD'nin epidermal hücrelerdeki IC₅₀ değerlerini belirleyen Kongkadee ve arkadaşlarının (2022) araştırmalarıyla uyumlu bir şekilde örtüşmektedir (Kongkadee vd., 2022). Literatürde ifade edildiği gibi, dış eti fibroblastlarında saptanan biyoyumlu doz aralığı, bu çalışmada kullanılan CBD'nin güvenli profili ile paralellik göstermektedir. CBD düşük dozlarda hücre çoğalmasını

arttırırken, çok yüksek dozlarda apoptoz sürecini başlatabildiği bilinmektedir; bu durum, çalışmamızda tespit edilen doz-yanıt eğrisi ile desteklenmiştir.

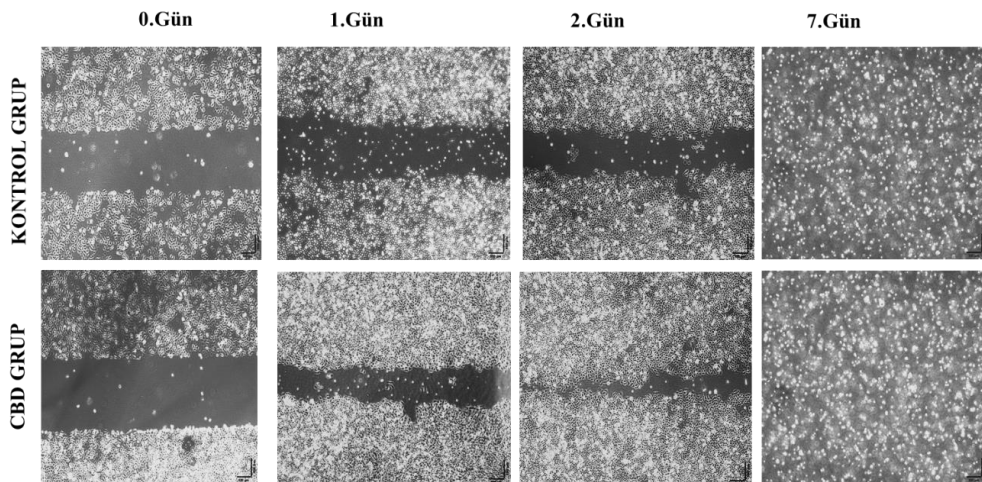
Elde edilen hücre canlılığı dayalı olarak, çizik (scratch) testi ve *in vitro* üç boyutlu deri yara modeli analizlerinde, hücre canlılığını olumsuz etkilemeyen güvenli CBD konsantrasyonları tercih edildi. Böylelikle, sonraki deneylerde tespit edilen hücre göçü, çoğalma ve doku yenilenmesi ile ilgili etkiler olası toksik etkilerden bağımsız olarak değerlendirildi. Bu sonuçlar, CBD'nin düşük miktarlarda hücre canlılığını sürdürebildiğini ve yüksek miktarlarda hücre canlılığını azaltıcı etkiler ortaya koyabileceğini ifade eden literatürle paralellik göstermektedir (Tassaneesuwan vd., 2025).

4.2. CBD'nin *In Vitro* 2B Yara Modelinde Etkisi

2B monolayer kültürlerde gerçekleştirilen çizik testi, HS2 hücrelerinde geliştirilen *in vitro* yara modelinde, kanabidiol (CBD)'nin hücre göçü ve yara iyileşmesi üzerindeki etkisi incelendi.

4.2.1. CBD'nin *in vitro* 2B yara kapanma hızına etkisi

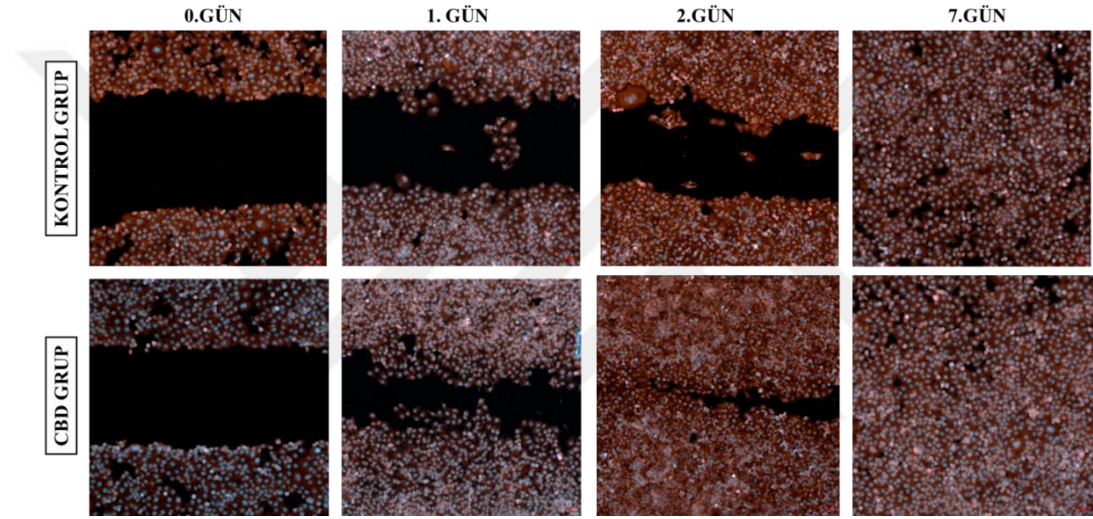
Bu çalışma için, hücre monolayerlerinde standart bir yara oluşturuldu ve yaranın kapanma süreci, CBD'nin 12,5 μ M uygulanmasının ardından Şekil 4.7.'de gözlemlendiği gibi 0., 1., 2. ve 7. günlerde ters ve konfokal mikroskobu ile gözlemlendi. Elde edilen görseller üzerinden, çizik alanındaki değişiklikler zamanla değerlendirildi.



Şekil 4.7. Keratinosit 2B yara modelinin ters mikroskop görüntüsü (4X).

Kontrol gruplarında, her iki hücre tipinde de yara bölgesinin kapanma sürecinin yavaş gittiği ve hücre hareketinin kısıtlı olduğu gözlemlendi. Buna karşın, CBD ile tedavi edilen gruplarda yara alanının zamanla belirgin bir şekilde küçüldüğü ve hücrelerin yara bölgesine doğru daha hızlı hareket ettiği tespit edildi. Bu bulgular, CBD'nin hücre migrasyonunu artırıcı bir etki sağladığını göstermektedir.

CBD uygulamasının etkileri zaman dilimleri açısından değerlendirildiğinde, en belirgin iyileşmenin 2. günde gözlemlendiği saptanmıştır. Özellikle 24. saatte yapılan incelemelerde, CBD uygulanan gruplardaki yara kapanma oranının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Keratinosit 2B yara modelinin konfokal mikroskop analiz görüntüsü.

CBD uygulaması, 2 boyutlu çizik testinde yara kapanmasını önemli ölçüde artırarak iki gün içinde %99,9 oranında kapanma sağlamıştır. CBD uygulanan hücrelerdeki yara kapanma oranı, kontrol grubuna göre 3,83 kat daha yüksek olmuştur. Bu bulgular, CBD'nin yara iyileşmesini destekleyici özelliklerini vurgulamakta ve farmakolojik ajanların değerlendirilmesinde gelişmiş *in vitro* modellerin faydasını ortaya koymaktadır.

Tez çalışmasında, keratinosit grubunda tespit edilen hızlı yara kapanması, literatürde Kongkadee ve arkadaşları (2022) tarafından bildirilen sonuçlarla tamamen örtüşmektedir (Kongkadee vd., 2022). Bu çalışmada, 0.5 µg/mL dozundaki CBD'nin insan dişeti fibroblastlarında (HGF-1) kontrol grubuna göre yaralı alanı (%24,34'ten

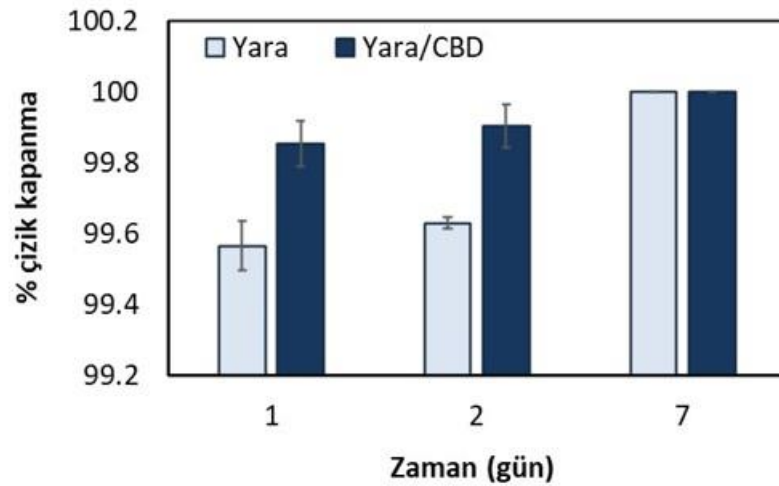
%33,49'a) anlamlı bir biçimde artırdığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasında 2B modelden hesaplanan %99,9 oranındaki kapanma verileri, CBD'nin aynı zamanda epidermal keratinositlerin göç eğilimlerini de benzer bir şekilde uyardığını göstermektedir.

Tablo 4.3. Yara kontrol ve CBD uygulanmış yara grubunda 1., 2.,7. gün çizik kapanma oranları

	Ortalama çizik açıklığı (µm)			
Zaman (gün)	0	1	2	7
Yara /kontrol	609.23 ± 28.72	2,63 ± 0.35	2,26± 0,01	0
Yara/CBD	-	0,89 ± 0,43	0,59± 0,40	0

Kapanma oranı (açıklık kontrol/ açıklık CBD)

Zaman (gün)		1	2	
	-	2.95 kat	3.83 kat	-



Şekil 4.9. Yara kontrol ve CBD uygulanmış yara grubunda 1., 2.,7. gün çizik kapanma yüzde grafiği.

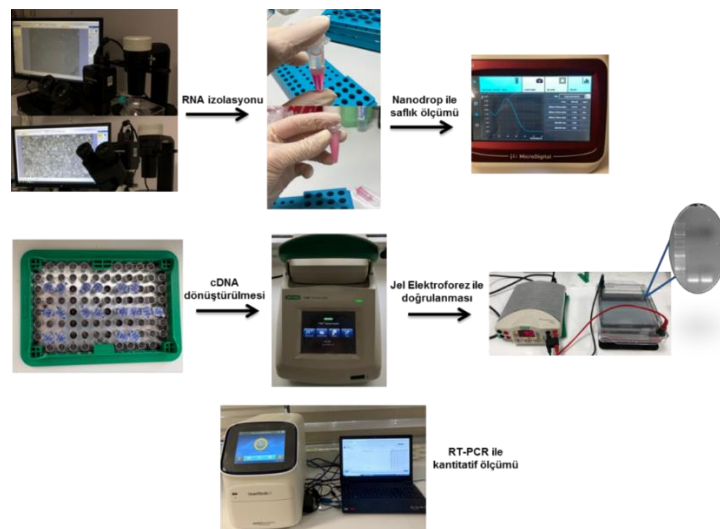
Di Marzo ve De Petrocellis ve arkadaşları (2012), endokannabinoid sinyalizasyonunun vücuttaki çeşitli dokuların dengede tutulmasında önemli bir rol oynadığını ve terapötik imkanlar sunduğunu belirtmişlerdir. Özellikle CB1 ve CB2

kannabinoid reseptörlerinin, yara iyileşmesi süreçlerinde (iltihaplanma, fibroblast hareketliliği ve keratinositlerin çoğalması) aktif olarak yer aldığı bilinmektedir. CBD ile ilgili yara iyileşme hızındaki artışın, kannabinoidlerin hücresel tepkileri ve iltihapları modüle etme kapasitesine dair literatürde mevcut olan verilerle uyumlu olduğu söylenebilir (DiPatrizio ve Piomelli, 2012). CBD'nin yara iyileşmesini destekleme potansiyeli, kannabinoid sinyalizasyonunun dermatolojik tedavilerdeki olasılıklarına yönelik bir bulgu sunmaktadır.

4.2.2. CBD'nin *in vitro* 2B yara modelinde etkisinin gen ifade düzeyinde değerlendirilmesi

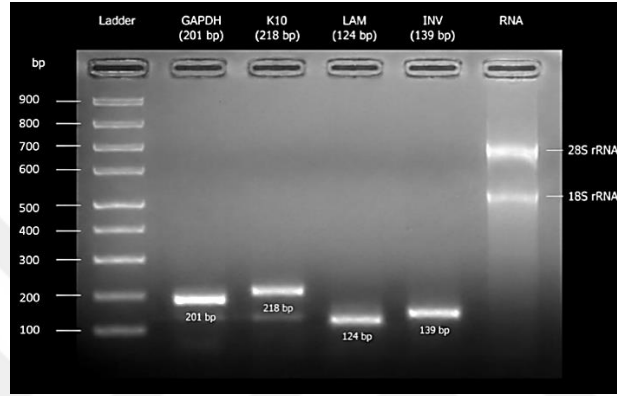
2B keratinosit yara modelinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri üzerinde yapılan kantitatif gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) incelemesi, CBD tedavisinin epidermal farklılaşma, bazal membran onarımı ve yara iyileşmesine dair genlerin ifade düzeyleri üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

CBD'nin gen ifadesi üzerindeki etkilerini sayısal olarak belirlemek amacıyla gerçekleştirilen moleküler analiz süreci Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bu aşamada hücre örneklerinden yapılan RNA izolasyonu, CBD'nin neden olduğu moleküler değişimlerin anlık bir görüntüsünü sağladı. Nanodrop ile gerçekleştirilen saflık ölçümleri analizlerde kullanılan genetik materyalin yüksek kalitede olduğunu gösterdi.



Şekil 4.10. RNA izolasyonu ve RT-PCR aşamaları şematik gösterimi

İzole edilen RNA'nın cDNA'ya dönüşümü ve jel elektroforezi ile kontrol edilmesi, RT-PCR aşamasında elde edilen kat değişimi (RQ) verilerinin doğruluğu için önemli bir adımdır. Bu aşama, örnekler arasındaki miktar farklarının standart hale getirilmesini sağladı (Şekil 4.11.). Bu sürecin son adımı olan RT-PCR analizi; sadece genin varlığını değil, CBD dozlarına bağlı olarak K10, LAM ve INV gibi işaretleyicilerin ne kadar arttığını sayısal bir biçimde ortaya koymaktadır.

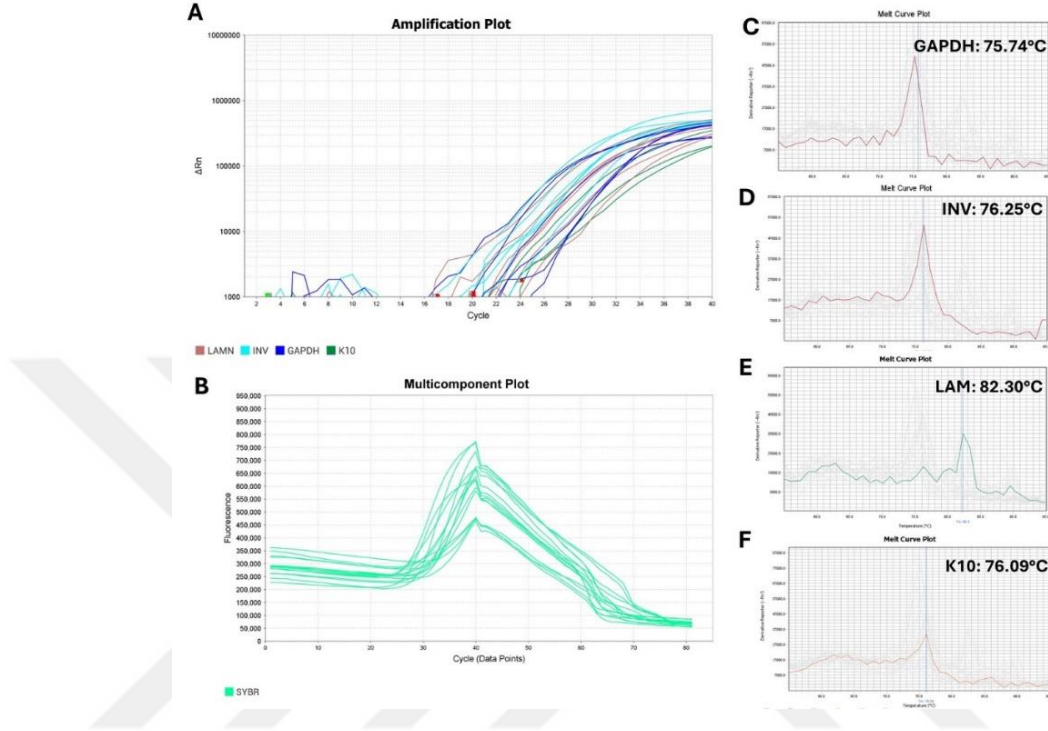


Şekil 4.11. Agaroz jel elektroforez görüntüsü. İlk kuyucuk DNA ladder göstermektedir. Sırasıyla GAPDH, K10, LAM, INV PCR ürünleri ve RNA örneği görüntülendi.

Şekil 4.11.'de yer alan jel görüntüsünde, HS2'den elde edilen toplam RNA örneğinin bütünlüğü, 28S ve 18S rRNA bantlarının belirgin ve yoğun bir şekilde görünmesiyle kanıtlanmıştır. Bu yüksek kaliteli RNA'dan üretilen cDNA ile gerçekleştirilen RT-PCR analizlerinin sonuçları; GAPDH (201 bp), K10 (218 bp), LAM (124 bp) ve INV (139 bp) genlerine ait PCR ürünlerinin, beklenen baz çifti uzunluklarında ve belirgin bantlar halinde tespit edildi. Elde edilen bulgular hem RNA izolasyonunun kalitesini hem de hedef genler için PCR reaksiyonlarının optimize edilmiş ve spesifik olduğunu göstermektedir. PCR şartlarının yarı kantitatif RT-PCR ile optimizasyonundan sonra kantitatif gen ifade analizi olan RT-qPCR çalışmalarına geçilmiştir. Primerlerin erime eğrisi analiz sonuçları ve örnek multi komponent grafiği ve RT-qPCR amplifikasyon grafiği Şekil 4.12'de verilmektedir.

Bir dizi amplifiye edildikten sonra, hedefinden ayrışması (Erime Eğrisi Analizi) genellikle 75–85 °C aralığında pikler gösterir. Mevcut tez çalışmasında kullanılan primerler ile qPCR reaksiyonları sonrası yapılan erime sıcaklığı eğrisi analizlerinden

elde edilen T_m dereceleri dört primer için de tek pik ile 75–85 °C aralığında bulunmuştur (Şekil 4.12). Sonuçlar primerlerin spesifik bağlandığını ve yalnızca tek PCR ürünü verdiğini göstermektedir.

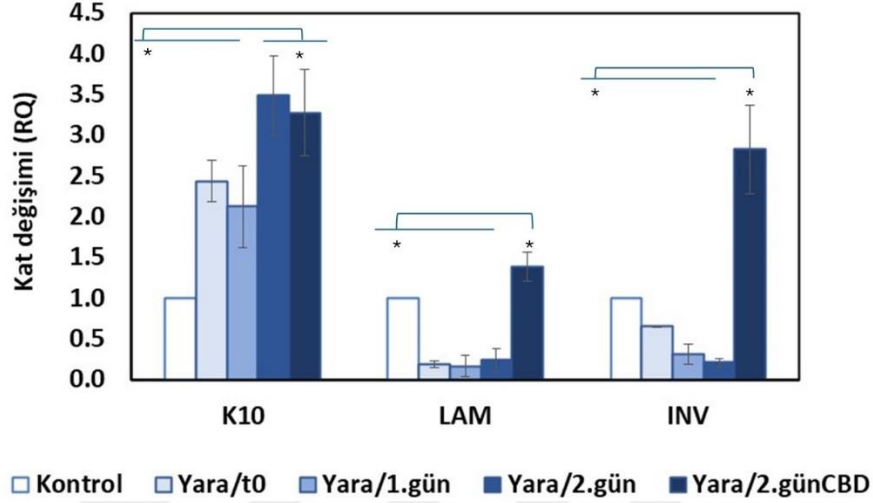


Şekil 4.12. HS2 hücreleri ile yapılan 2B yara modelinde RT-qPCR analiz grafikleri A) Amplifikasyon grafiği B) Multikomponent grafiği, C)- F) GAPDH, INV, LAM, K10 primerlerinin erime eğrisi grafikleri.

In vitro 2B kültür sistemlerinde yapılan yara iyileşmesi (scratch assay) ve gen ekspresyon analizleri, CBD'nin gen ifade düzeyindeki etkilerini belirlemek için gerçekleştirildi. HS2 2B yara modelinde RT-qPCR analizi sonucunda, CBD uygulanan grupların kontrol grubuna göre gen ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler Şekil 4.13.'de gösterilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, keratin 10 (K10) ekspresyonu; CBD uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla belirgin bir artış gözlemlendi; özellikle yara modelinin 2.günü ve yara modeli+CBD 2.gün gruplarında K10 ifadesinin yaklaşık 3,5 kat (RQ) arttığı tespit edildi. CBD uygulamasının gen ifade düzeyine etkisinin 2. gün yara grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Keratin 10, keratinositlerin spinöz tabakaya geçişini ve terminal farklılaşmasını temsil eden en

kritik belirteçtir. Sonuçlar, CBD'nin yaralı bölgedeki proliferatif hücrelerin sağlıklı ve fonksiyonel epidermal dokuya dönüşme sürecini teşvik ettiğini göstermektedir. Literatürde, kanabinoidlerin epidermal homeostazı dengeleyerek keratinositlerin olgunlaşma programını hızlandığı belirtilmektedir (Sermaksasithorn vd., 2025).



Şekil 4.13. HS2 hücreleri ile yapılan 2B yara modelinde CBD uygulamasının Gen ekspresyonu (RQ) üzerindeki etkileri

Deri bariyerinin mekanik direnci için önemli olan Involukrin (INV) geninde, yara modeli+CBD 2.gün grubunda yaklaşık 3 katlık belirgin bir artış kaydedildi. Yara modeli+CBD 2.gün dozunun oluşumunu moleküler düzeyde destekleyerek epidermal bariyerin yeniden inşasında anahtar rol oynadığı söylenebilir (Sheriff vd., 2020b).

qPCR sonuçları değerlendirildiğinde, yara oluşturulduktan itibaren 2 gün sonunda sonra LAM geninde yarasız kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış görülmüştür. İki günlük CBD uygulaması ise LAM gen ifadesinin 1,5 kat artmasına neden olmuştur. T0-t2 arası LAM ifadesindeki azalışın hücre dışı matris proteinlerinin artmasını sağladığı bilinmektedir (Wegner vd., 2016). Mevcut çalışmada CBD uygulaması LAM ifadesini tetikleyerek iyileşmeyi hızlandırıcı etki göstermiştir. Laminin gibi adhezyon moleküllerinin CBD etkisiyle artması, keratinositlerin dermal iskeleye daha sıkı tutunmasını ve yara yatağı üzerinde daha stabil bir tabaka oluşturmasını sağlamaktadır. Bu durum, CBD'nin belirli dozlarda (yara modeli+CBD

2.gün) hücre-matris etkileşimini optimize ederek doku bütünlüğünü desteklediğini kanıtlamaktadır (Jastrzab vd., 2019). Elde edilen RQ değerleri incelendiğinde, yara modeli + CBD grubunun 2. gününde, üç genetik gösterge bakımından kontrol grubuna göre en yüksek ve en tutarlı artışı LAM geninin gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu sonuç, CBD'nin yara iyileşmesinin başlangıç aşamalarında önemli bir deri dokusu inşası için gerekli genetik yolları senkronize bir şekilde aktive ettiğini göstermektedir.

CBD'nin iyileşme sürecini hızlandırdığı ve bariyer oluşumu (INV) ile matris tutunmayı (LAM) tamamlayarak doku bütünlüğünü yeniden sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu gen ifadesi profili, kannabinoidlerin deri hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran yayınlarla uyum göstermektedir. Puccini ve ekibi (2009), endokannabinoid sistemin deri bütünlüğünün korunmasındaki önemli işlevini vurgulamış ve harici kannabinoidlerin keratinositlerin çoğalma ve farklılaşma süreçlerini etkileyebileceğini ortaya koymuştur (Auger vd., 2009b). Mevcut tez çalışmasında, CBD'nin K10 ifadesindeki erken artışı (2. gün), CBD'nin epidermal farklılaşmayı destekleyerek doku yenilemesini başlattığını göstermektedir.

Yara oluşturulduktan sonraki iki günde bariyer işlevi için önemli olan Involukrin (INV) gen ifade düzeyi anlamlı bir şekilde azalmış olup, iki gün boyunca CBD uyulanmış yara modelinde gen ifadesinin arttığı görülmüştür. CBD'nin fonksiyonel bir destek yapısının oluşmasına katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. CBD uygulanmayan gruplardaki INV ifade düzeyindeki azalış ise bariyer yapısının bozulmasından kaynaklanmış olabilir. Bu bulgu, kannabinoidlerin dermatolojik tedavilerdeki olası etkilerini ele alan Tóth ve ekibi (2013) tarafından sunulan ve endokannabinoidlerin deri fizyolojisindeki çeşitli rollerini araştıran derleme çalışmalarıyla paralellik göstermektedir (V. Lee vd., 2014). CBD'nin yara iyileşmesini, keratinosit farklılaşmasından epidermal bariyerin oluşumuna kadar olan karmaşık süreçler aracılığıyla desteklemesi, bu bileşiğin doku yenilenmesindeki terapötik potansiyelini kanıtlayan yeni bir veriyi ortaya koymaktadır.

2B modellerde gözlemlenen belirgin INV ve LAM artışı, faz-kontrast mikroskopisi altında izlenen çizik kapanma (scratch assay) süreçleriyle örtüşmektedir. CBD'nin bu modelde sağladığı hızlı iyileşme, sadece fiziksel hücre hareketliliği değil, aynı zamanda Sangiovanni ve arkadaşlarının (2019) tanımladığı moleküler bir yeniden

programlama sürecini içermektedir. Bu süreçte hücreler, proliferatif aşamadan migratif aşamaya geçerken K10 gibi farklılaşma işaretçilerini eş zamanlı olarak aktive etmektedir (Sangiovanni vd., 2019).

Monolayer kültürlerde gözlemlenen bu hızlı genetik tepki, CBD'nin hücresel reseptörler (özellikle CB2 ve TRPV1) üzerindeki etkilerinin bir belirtisidir. Bu modelde elde edilen başarı, CBD'nin hücre düzeyindeki terapötik potansiyelini kanıtlamış ve hücre-matris etkileşimlerinin daha belirgin olduğu karmaşık *in vitro* 3B modeller için gereken ön doğrulama aşamasını tamamlamıştır (Maglie vd., 2021).

Farklı HS2 gruplarının gen ekspresyon seviyelerinde gösterdiği çeşitlilik, CBD'nin etkinliğinin sadece varlığına değil, bulunduğu kimyasal çevreye ve formülasyona da duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu durum, yaralanma iyileşmesi için en uygun moleküler tetikleyicinin seçilmesinde 2B ön taramalarının stratejik önemini vurgulamaktadır.

Tablo 4.4. CBD Doz Uygulama (RQ $\pm$ SD) Üzerindeki Etkileri

GRUPLAR / UYGULAMA (Doz)	K10 (RQ $\pm$ SD)	INV (RQ $\pm$ SD)	LAM (RQ $\pm$ SD)
Kontrol (Yarasız)	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
Yara/t0	2.40 $\pm$ 0.30	0.75 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.05
Yara/1.gün	2.15 $\pm$ 0.45	0.45 $\pm$ 0.15	0.25 $\pm$ 0.10
Yara/2.gün	3.50 $\pm$ 0.50	0.40 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.15
Yara/2gün+CBD	3.30 $\pm$ 0.55	2.90 $\pm$ 0.50	1.50 $\pm$ 0.20

Elde edilen RQ değerleri genel olarak incelendiğinde, yara modeli + CBD 2. gün grubunun, kontrol grubuna oranla K10, INV, LAM ifadesinde en istikrarlı artışı sağladığı görülmektedir. Bu sonuç, CBD'nin yaraların iyileşmesinin ilk aşamalarında kritik öneme sahip genetik yolları aynı anda harekete geçirdiğini göstermektedir.

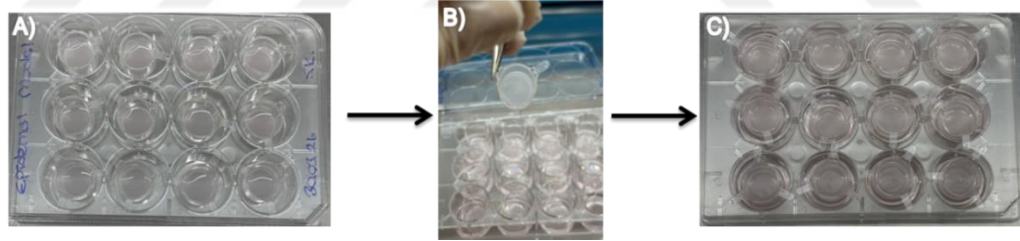
4.3.CBD'nin *In vitro* 3B Modellerde Yara İyileştirme Etkisinin Değerlendirilmesi

3B hücre kültürü ortamında deri doku modeli geliştirilmesi, *in vivo* deri katmanlarını ve hücreler arası etkileşimleri en doğru şekilde oluşturmak için yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli ve tam katmanlı deri modeli (FTSE) olmak üzere iki farklı model yaklaşımıyla gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. *In vitro* 3B yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli değerlendirilmesi

In vitro yara iyileşmesi araştırmalarında, gerçek deri dokusuna en yakın yanıtların elde edilmesi için üç boyutlu (3B) yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modeli oluşturuldu. Şekil 4.14.'de yer alan deneysel süreç aşamaları şu şekilde özetlemektedir: A) Hücre Ekimi: HS2 (İnsan Keratinosit) hücresi, insertlerin içine dikkatli bir şekilde ekildi. Bu aşama, hücrelerin yüzeye tam olarak tutunmasını ve monolayer yapısını oluşturmasını sağladı. B) Hücrelerin dikey katmanlaşması için, insert içindeki E2 besiyeri aspire edildi. C) ALI (hava-sıvı arayüzü) Geçiş: E3 besiyeri insert dışına eklendi ve hücrelerin üst yüzeyinin hava ile etkileşimi sağlandı.

Hava-sıvı arayüzünde 14-21 gün boyunca inkübe edilen modellerde, doku bütünlüğü ve bariyer işlevlerinin tamamlanması beklendi. Görselde (C), matürasyon sürecini tamamlamış ve analiz ile yaralanma protokollerine hazır hale gelmiş *in vitro* 3B epidermal modeller yer almaktadır.



Şekil 4.14. Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermis (RHE) Modeli şematik gösterimi. A) HS2 hücre ekimi B) E2 besiyeri atılması C) Hava-Sıvı arayüzü (ALI) geçilmesi

Geleneksel *in vitro* yara iyileşmesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan 2B monolayer (tek tabakalı) kültür sistemleri, hücrelerin sadece yatay düzlemdeki göç (migration) ve proliferasyon kapasitelerini ölçebilmektedir. Ancak bu klasik modeller, insan derisinin en temel savunma mekanizması olan stratum corneum bariyerini ve keratinositlerin dikey düzlemdeki üç boyutlu organizasyonunu simüle etmekte yetersiz kalmaktadır (Carragher vd., 2018). 2B sistemlerde hücreler sürekli besiyeri altında

(submerged) kaldıkları için, terminal farklılaşma süreci tamamlanamamakta ve deri histolojisinin karakteristik tabakalanması oluşmamaktadır.

Bu kısıtlamaları aşmak amacıyla geliştirilen ve Şekil 4.14.'de (C) şematize edilen hava-sıvı arayüzü (Air Liquid Interphase, ALI) aşaması, modelin biyolojik kilit noktasıdır. ALI fazında hücrelerin üst yüzeyinin atmosferik hava ile doğrudan teması, bazal keratinositlere doğal bir fizyolojik stres sinyali gönderir. Bu sinyal; keratinositlerin proliferatif fazdan ayrılıp terminal farklılaşma programına girmesini tetikleyerek; *stratum spinosum*, *stratum granulosum* ve en üstte asidofilik kornifiye bir yapı olan *stratum corneum* tabakalarının oluşumunu sağlar (Pruniéras vd., 1983; Tóth vd., 2019a).

Sonuç olarak, bu üç boyutlu yapı, CBD'nin yaraların iyileşmesine olan katkılarını değerlendirirken yalnızca hücresel hareketliliği değil, aynı zamanda dokunun bütünlüğünün yeniden sağlanmasını ve epidermal bariyer işlevlerinin tekrar inşasını da incelemeye imkân tanımıştır. Daha önce yapılan araştırmalar, yeniden yapılandırılmış insan epidermis modellerinin *in vivo* insan derisinin katmanlaşma ve bariyer özelliklerini önemli ölçüde taklit ettiğini ve bu nedenle prelinik araştırmalar için güvenilir bir platform sağladığını göstermiştir. Ayrıca, CBD'nin inflamasyonu düzenleme ve hücresel göçü artırma yoluyla yara iyileşme süreçlerini desteklediği ifade edilmiştir (T. Kim vd., 2025).

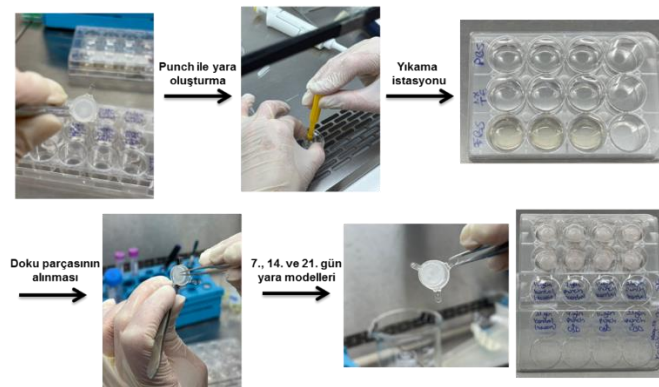
4.3.1.1. *In vitro* 3B yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) ve yara modelinde mikroskopi sonuçları ve CBD'nin etkileri

Hava-sıvı arayüzünde (ALI) 10-15 günlük olgunlaşma dönemi tamamlanmış RHE modelleri üzerinde gerçekleştirilen yara protokolü, modelin *in vivo* deri bütünlüğü ile mekanik streslere karşı tepki verme şeklinin incelenmesi açısından önemlidir. Mevcut literatüre göre, üç boyutlu modellerde meydana getirilen mekanik yaralanmalar (punch, kesik vb.), sadece hücre göçünü etkilemekle kalmaz, aynı zamanda yara kenarındaki keratinositlerin rejenerasyon sinyallerini ve doku yapısının yeniden düzenlenmesini de harekete geçirir (Imran vd., 2024).

Şekil 4.15.'de yer alan yaralanma modeline dair sonuçlar şu şekilde değerlendirilmiştir:

- Mekanik stabilite ve yara yapısı; tam katmanlı keratinosit tabakaları punch aracıyla yapılan dik kesilere karşı belirgin bir yapısal direnç gösterdi. Standart büyüklükte yaraların oluşumu, dokular arasında ayrılma (delaminasyon) olmaması, modelin tutucu gücünü ve bazal membran benzeri bağlanma yeteneğini kanıtlamaktadır (Agonia vd., 2022).
- Yaralanma anı (T_0); modelde epidermal dengenin bozulduğu ve iyileşme sürecinin başladığı noktadır. İki boyutlu çizik modellerinden farklı olarak, bu üç boyutlu yaralanma modelinde keratinositler yalnızca yanındaki alana doğru ilerlemekle kalmadı, bunun yanı sıra dikey bir tabakalaşma baskısı altında da hareket ettiği gözlemlendi. Bu durum, CBD'nin iyileşme üzerindeki etkisini daha karmaşık ve fizyolojik bir ortamda test etme imkânı sunmuştur.
- Yaralanma sonrasında yara yatağının temiz ve homojen olması, topikal olarak uygulanan CBD'nin doku içine difüzyonunu standart hale getirdi. Özellikle 7, 14 ve 21. günlerde yapılan takiplerde, yara kenarlarındaki epidermal dokunun ilerleyişi, CBD'nin yalnızca hücre proliferasyonunu değil, aynı zamanda dokunun üç boyutlu yapısının yeniden inşa edilme kapasitesini de gösterdi.

Geliştirilen standart yaralanma modeli, hücre migrasyonu ve doku yenilenmesinin değerlendirilmesine olanak tanıyan, biyolojik olarak anlamlı ve yüksek derecede tekrarlanabilir bir deneysel platform sunmaktadır (Ferreira vd., 2023a; Muthukumar vd., 2023). Bu tür modeller, terapötik ajanların, özellikle anti-inflamatuar özelliklere sahip bileşiklerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir (Baswan vd., 2020).

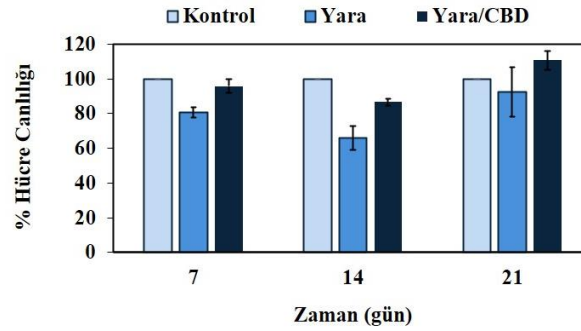


Şekil 4.15. Yeniden Oluşturulmuş İnsan Epidermis (RHE) yaralanma aşamaların şematik gösterimi

4.3.1.2. *In vitro* 3B epidermal model ve yara modelinde XTT canlılık analizi ve CBD'nin etkileri

3B RHE modelleri üzerine yapılan XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfonilfenil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid) canlılık testi, CBD uygulamalarının doku canlılığına olan etkilerini metabolik düzeyde belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu inceleme, mitokondriyal dehidrojenaz enziminin aktivitesine dayanarak, canlı hücrelerin turuncu renkte suda çözünür formazan kristalleri oluşturmadaki kabiliyetini ölçmektedir (Scudiero vd., 1988).

Doku spesifik canlılık analizi, 2B kültür sistemlerinde elde edilen XTT sonuçları genel olarak bileşiğin saf hücreler üzerindeki doğrudan etkisini yansıtırken; 3B modellerdeki sonuçlar, stratum corneum bariyerinin koruyucu işlevini de göz önünde bulundurmaktadır. Şekil 4.16.'de sunulan % canlılık verileri, uygulanan CBD'nin (7, 14 ve 21. günlerde) doku bütünlüğünü bozmadığını ve %80'in üzerinde canlılık seviyesi ile biyoyumlu bir profil sergilediğini göstermektedir. Bu durum, CBD'nin 3B deri yapısı için güvenli bir terapötik aralık sunduğunu kanıtlamaktadır (Schäfer-Korting vd., 2008b).



Şekil 4.16. CBD uygulanan RHE modelinde 7.,14. ve 21.gün XTT canlılık analizi sonuçları. Günlere bağlı olarak hücre metabolik aktivitesindeki değişimler gösterilmiştir.

Metabolik aktivite ve yeniden epitelizasyonda XTT testinden elde edilen veriler, yaralanma sonrasında CBD uygulanan gruplardaki metabolik aktivitenin yara grubuna oranla artış gösterdiğini ortaya çıkartmıştır. Bu denge, CBD'nin yalnızca hücre göçünü hızlandırmakla kalmayıp, aynı zamanda dokunun yeniden yapılanma süreçlerindeki enerji metabolizmasını da desteklediği anlamına gelmektedir.

4.3.1.3. *In vitro* 3B epidermal model ve yara modelinde mikroskopi sonuçları ve CBD'nin etkileri

Yara iyileşme sürecini incelemek amacıyla geliştirilmiş 3B *in vitro* RHE yara modeli, konfokal lazer taramalı mikroskop ve SEM ile incelendi.

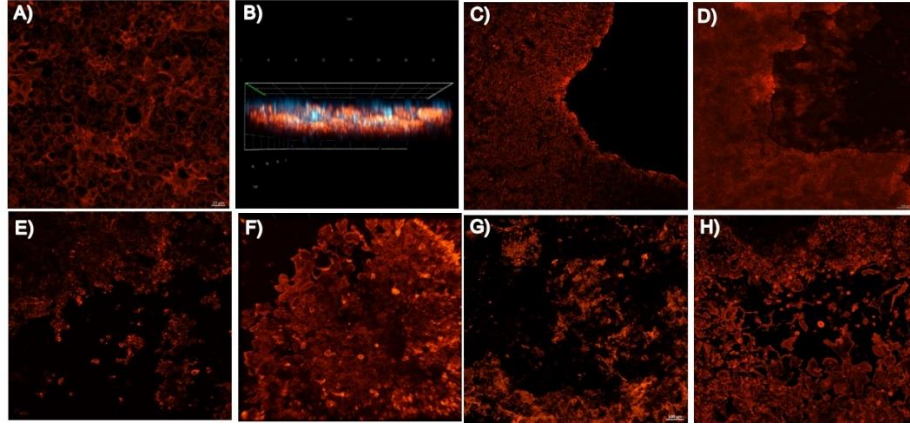
4.3.1.3.1. Konfokal mikroskopi analizleri

Konfokal lazer taramalı mikroskopi (CLSM) analizi, 3B RHE modellerinde CBD uygulamasının iyileşme üzerindeki etkilerini hücre ve molekül düzeyinde, yüksek çözünürlüklü floresan işaretleme ile incelemek için yapıldı. Bu yöntem, dokuyu fiziksel olarak kesmeden (optiğin kesilmesi) farklı derinliklerden bilgi toplayarak, CBD'nin epidermal katmanlardaki yeniden oluşturma etkisini üç boyutlu bir bakış açısı sunmaktadır (Tiziana Cesetti vd., 2026).

CBD uygulanan grupta 7. gün sonunda yara boyutunun belirgin şekilde küçüldüğü ve keratinositlerin yara merkezine daha düzenli bir şekilde yöneldiği gözlemlendi. Konfokal mikroskop görüntüleri, epidermal tabakanın daha homojen ve sıkı bir yapı kazandığını göstermektedir.

RHE modeli üzerinde yapılan konfokal mikroskopi ile yara alanlarının incelenmesi sonucunda, Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi yara merkezinde kısmen açık kalan, re-epitelizasyon sürecinin aktif bir şekilde sürdüğünü göstermektedir.

CBD uygulanan gruplarda yara alanında göç olduğu ve keratinositlerin yara merkezine daha düzenli bir biçimde yöneldiği görüldü. Yara merkezinde görülen boşluk yapısı, re-epitelizasyon aşamasının henüz tamamlanmadığını, fakat aktif bir şekilde sürdüğünü göstermektedir. Araştırmalarda, keratinositlerin yara kenarından merkeze doğru hareket ederek epitel bütünlüğünü yeniden sağladığı ve bu süreçte başlangıç aşamalarında geçici boşlukların meydana gelebileceği ifade edilmektedir (Egles vd., 2010; Safferling vd., 2013). Ayrıca, üç boyutlu yara modellerinde, hücre göçünün ilk 7 gün boyunca aktif bir şekilde devam ettiği ve bu sürecin *in vivo* yara iyileşmesi ile benzer dinamikler sergilediği bildirilmektedir (Iyer vd., 2018). CBD uygulanan gruptaki gözlemler, iyileşmenin yavaşladığını değil, aksine hızlanmış ve düzenli bir hücre göç sürecini yansıttığını göstermektedir.



Şekil 4.17. Rhodamine-Phalloidin ile boyanmış epidermal modeli konfokal mikroskop görüntüsü. A) 21. gün kontrol (yarasız), B) 21. gün kontrol (yarasız) Z-Stack görüntüsü, C) 7.gün yara kontrol, D) 7.gün yara+CBD, E) 14.gün yara kontrol, F) 14.gün yara+CBD, G) 21.gün yara kontrol, H) 21.gün yara+CBD.

Kontrol ve CBD grupları arasında kıyaslama yapıldığında, CBD uygulamasının yeniden epitelizasyon sürecini hızlandığı ve epidermal yenilenmeyi teşvik ettiği görülmektedir. Bu durum, CBD'nin anti-inflamatuar etkileri ve hücre göçünü destekleyici özellikleri ile örtüşmektedir. Önceki araştırmalar, CBD'nin CB2 reseptörleri aracılığıyla inflammatuar tepkiyi modüle ederek yara iyileşmesini hızlandığını ve keratinositlerin hareketini teşvik ettiğini göstermiştir (Atalay vd., 2021; Tóth vd., 2019b).

Kontrol ve tedavi grupları 21. gün itibarıyla karşılaştırıldığında (Şekil 4.17.), CBD uygulanan grupta epidermal tabakanın daha düzenli ve bütün bir yapıya sahip olduğu, yeniden epitelizasyonun büyük oranda tamamlandığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda epidermal yapı daha dağınık durumda olup, bazı bölgelerde aşırı hücre çoğalması ve organizasyon bozukluklarının sürdüğü görülmüştür. Bu durum, iyileşme sürecinin henüz tamamlanmadığını ve doku yenilenmesinin daha yavaş ilerlediğini göstermektedir.

CBD uygulamasının bu aşamadaki etkileri, yalnızca yeniden epitelizasyonu hızlandırmakla kalmayıp, aynı zamanda epidermal farklılaşma ve doku düzenini de desteklediğini göstermektedir. CBD'nin, endokannabinoid sistem aracılığıyla özellikle CB2 reseptörleri üzerinden iltihap yanıtlarını modüle ettiği, keratinositlerin çoğalmasını ve hareketini düzenleyerek yara iyileşmesini desteklediği belirtilmiştir (Ferreira vd., 2023b; Niyangoda vd., 2024b). Ek olarak, anti-inflamatuar maddelerin yeniden

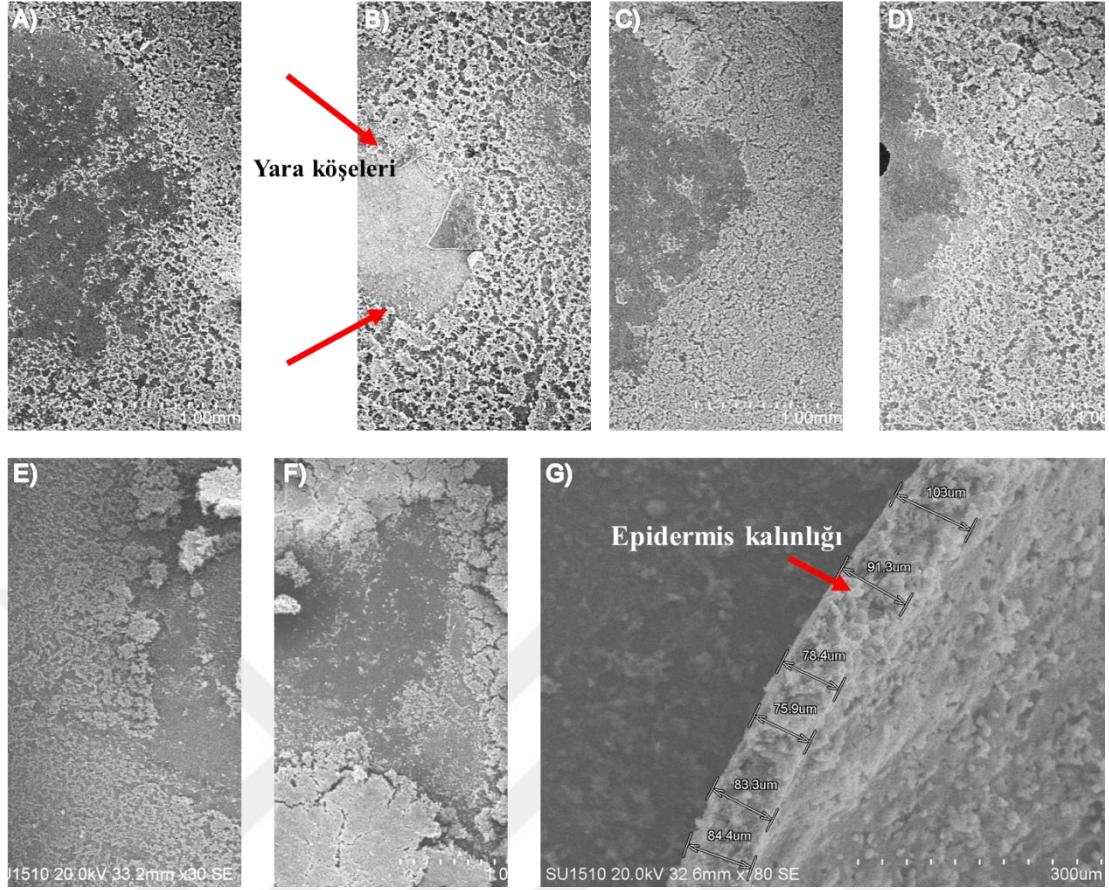
oluşturulmuş insan epidermisi modellerinde epidermal yenilenmeyi hızlandırdığı ve re-epitelizasyon oranını artırdığı tespit edilmiştir (Shah vd., 2024b). Bu bulgular değerlendirildiğinde, CBD uygulamasının yara iyileşmesinin geç döneminde daha düzenli, işlevsel ve fizyolojik olarak uygun bir epidermal yapının oluşmasına katkıda bulunduğu söylenebilir. Konfokal mikroskopun sunduğu derinlik analizi (Z-stack), CBD'nin sadece yüzey katmanında değil, dokunun alt katmanlarında da iyileşme sinyalleri aktifleştirdiğini ve dikey tabakalaşmayı (stratifikasyon) desteklediğini kanıtlamaktadır (Dagher vd., 2022).

Konfokal görüntüleme, yara bölgesinde yeniden yapılandırılan bariyer yapısının bütünlüğünü doğrulamıştır. CBD'nin, yara merkezindeki boş alanları daha hızlı doldurduğu ve floresan sinyallerinin bu bölgelerde daha yoğun ve sürekli bir çizgi halinde düzenlendiği belirlenmiştir. Hücreler arası bağlantıların floresan netliği, CBD'nin doku bütünlüğünü artırarak daha dayanıklı bir bariyer yapısına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

4.3.1.4. SEM ile yara kapanmasının görüntülenmesi

In vitro 3B RHE modelinde oluşturulan yara ve CBD'nin yara kapanmasına etkisi dokunun en üst katmanından SEM ile incelenmiştir (Şekil 4.18). Kontrol grubu görüntülerinde (Şekil 4.18- A,C ve E) yara kenarındaki hücrelerin migrasyon hızının daha sınırlı olduğu ve yara yatağının henüz tam olarak kapanmadığı gözlenirken; CBD uygulanan grupta (Şekil 4.18. –B,D ve F) belirgin bir göç olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürde, 3B RHE doku modellerinde yaraların iyileşmesi ve yeniden epitelizasyon süreçlerinin, keratinositlerin ekstraselüler matriks üzerinde tutunarak ilerlemesi ve katmanlı epidermal yapının yeniden inşası ile tanımlandığı gösterilmiştir (Pastar vd., 2014). Bu araştırmada elde edilen SEM bulguları, CBD'nin RHE modelinde sadece hücresel çoğalmayı desteklemekle kalmayıp, ayrıca migrasyon aşamasını da hızlandırarak *in vitro* yara kapanmasını iyileştirdiğini göstermiştir (Sangiovanni vd., 2019). Elde edilen doku morfolojisi verileri, CBD'nin 3B yapay deri modelimiz üzerindeki yara iyileştirici etkisini ve bariyer bütünlüğünü destekleyici potansiyelini mikroyapısal düzeyde güçlü şekilde göstermektedir.



Şekil 4.18. Epidermal (RHE) modelde CBD'nin yara kapanmasına etkisinin SEM ile görüntülenmesi (30X) A) yara modeli-7.gün B) RHE yara modeli-7. Gün/CBD (yara kenarları ok ile gösterilmiştir). C) RHE yara modeli-14. Gün D) RHE yara modeli-14. Gün/CBD E) RHE yara modeli-21. Gün F) RHE yara modeli-21. Gün/CBD G) RHE yara modelinde epidermis kalınlığı (80x) (Epidermis kalınlığı ok ile gösterilmiştir).

Elde edilen görüntülerde yara açıklığının uçtan uca boyutu SEM görüntüleme programıyla ölçülerek analiz edilmiştir. Hem görüntüler hem de yara çapının daralmasına yönelik hesaplamalar CBD'nin yara kapanmasına olumlu etkisini göstermiştir (Şekil 4.19.). 7. gün yara grubu ve CBD'li grup karşılaştırıldığında CBD uygulanan grubun yara çapının %26 oranında daha fazla kapandığı bulunmuştur. 14. ve 21.gün modellerde yara grubu ve CBD'li gruplar karşılaştırıldığında CBD'li gruplarda yara çaplarının sırasıyla %30 ve %28 oranında daha fazla kapandığı gösterilmiştir. Ayrıca epidermal modelde SEM ile epidermis katmanı gözlemlenmiş ve kalınlığı $86,05 \pm 8,34 \mu\text{m}$ ölçülmüştür. CBD uygulanmış gruplarda yara bölgesi dışında kalan dokulardaki hücre yoğunluğunun da zamana bağlı olarak artış gösterdiği görülmektedir.

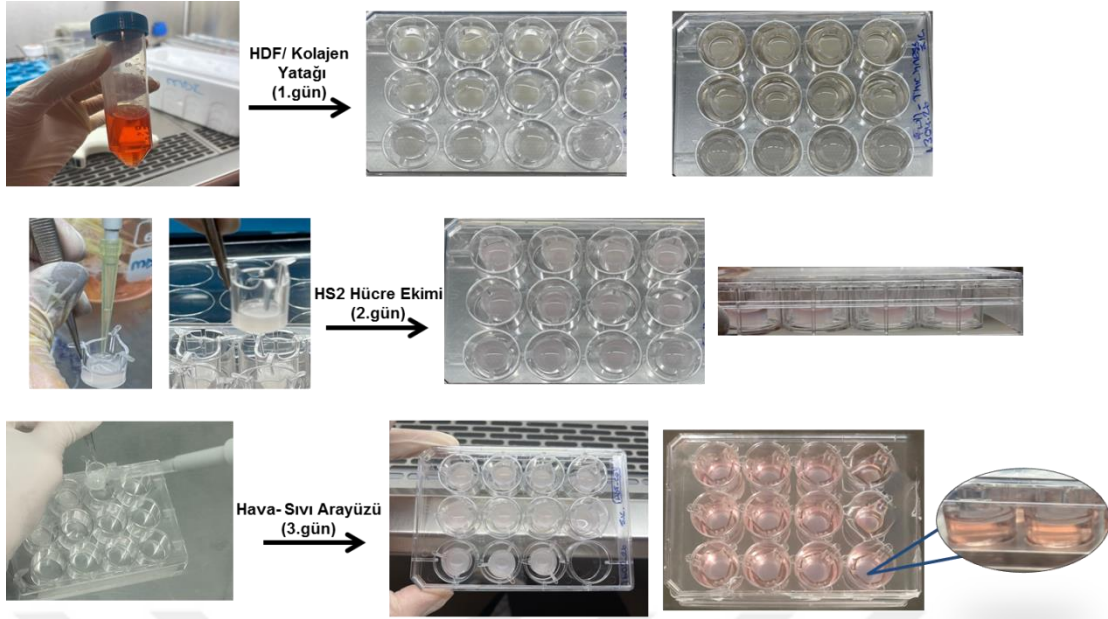
In vitro 3B epidermal modelde yapılan araştırma ve sonuçları değerlendirildiğinde, CBD'nin model üzerinde açılan yaranın kapanmasını hızlandırdığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, deney hayvanlarının derilerinde oluturulan yaralarda CBD'nin etkisinin gösterildiği analiz sonuçlarıyla örtüşmektedir (Atalay vd., 2021). Epidermal deri modeli, epidermal bariyerin bir maddeye yanıtını değerlendirmek için kullanılabilecek değerli bir doku modeli olmakla birlikte, bu çalışma CBD'nin deri üzerindeki etkisini deney hayvanı kullanmadan epidermal modelde oluşturulan yara üzerinde gösteren ilk çalışmadır.

4.3.2. *In vitro* 3B tam katmanlı deri modeli (FTSE) değerlendirmesi

In vitro yara iyileşmesi için Şekil 4.19.'de gösterilen *in vitro* tam katmanlı deri modeli (FTSE), hem epidermal hem de dermal bileşenleri barındırdığı için doku fizyolojisini en doğru şekilde yansıtmaktadır. FTSE model, tip I kollajen yapısının içine yerleştirilen insan dermal fibroblastları ile bu yapı üzerine eklenen keratinositlerin hava-sıvı arayüzündeki (ALI) olgunlaşmasıyla oluşturuldu. Bu karmaşık modelin incelenmesi; CBD uygulamasının yalnızca yüzeydeki keratinosit katmanını etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda dermal-epidermal etkileşim ve ekstraselüler matrisin (ECM) yeniden organizasyonu üzerindeki etkilerini de ortaya çıkarmıştır (Shishkov vd., 2025).

Dermal-epidermal etkileşim ve doku bütünlüğü, FTSE modellerinde görülen bazal membran benzeri yapı ve keratinositlerin bu yapıya olan güçlü tutunmaları, modelin biyofiziksel başarısını göstermektedir. CBD uygulanan gruplarda fibroblastların kollajen matrisi içindeki işlevlerinin korunduğu ve bu durumun epidermisin daha düzenli bir şekilde katmanlaşmasını desteklediği belirlenmiştir. Literatürde ifade edildiği gibi, fibroblastlar tarafından salınan büyüme faktörleri, CBD'nin rejeneratif etkisini birlikte artırmaktadır (Zoio ve Oliva, 2022).

RHE modelleriyle karşılaştırıldığında, FTSE modellerinin CBD uygulamalarına daha kararlı bir yanıt verdiği gözlemlendi. Dermal tabakanın varlığı, uygulanan maddenin doku içindeki difüzyon hızını daha gerçekçi bir şekilde yansıtmaktadır (Weimer, 2008).

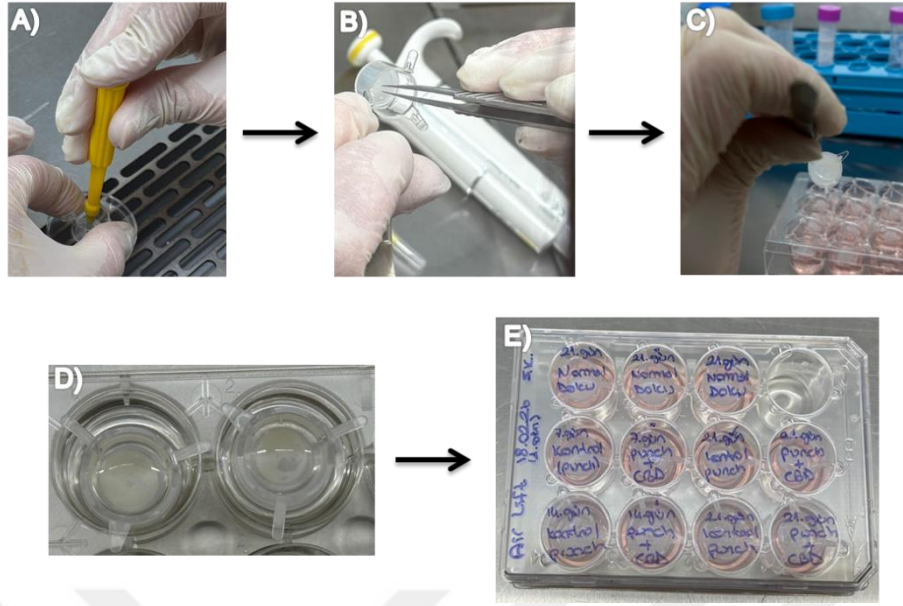


Şekil 4.19. Tam Katmanlı Deri Modeli (FTSE) yapılış aşamaları şematik gösterimi

Elde edilen *in vitro* FTSE model bulguları, CBD'nin karmaşık yara iyileşme süreçlerinde (örneğin, kronik veya derin doku yaralanmaları) hem dermisi hem de epidermisi eş zamanlı olarak modüle edebileceğini göstermektedir. Bu bulgu, CBD bazlı topikal ürünlerin klinik başarı olasılığının yüksek olduğuna dair güçlü bir kanıt sunmaktadır.

4.3.2.1. *In vitro* 3B tam katmanlı deri modeli (FTSE) ve yara modelinde mikroskopi sonuçları ve CBD'nin etkileri

In vitro tam katmanlı 3B deri modeli üzerinde uygulanan yaralanma ve CBD tedavi protokolü, *in vivo* yara iyileşme sürecini (enflamasyon, proliferasyon ve remodelling aşamaları) en doğru şekilde yansıtmak üzere tasarlanmıştır. FTSE modelinin dikey derinliği ve hücresel çeşitliliği, CBD'nin tedavi edici etkisini sadece yüzeysel bir kapanma olarak değil, tüm dokunun onarımı olarak değerlendirmemize imkan tanımıştır (Groeber vd., 2011). FTSE model üzerindeki yaralanma ve izlem süreçleri Şekil 4.20.'deki şematik akış ve deneysel gözlem ile gösterilmiştir.

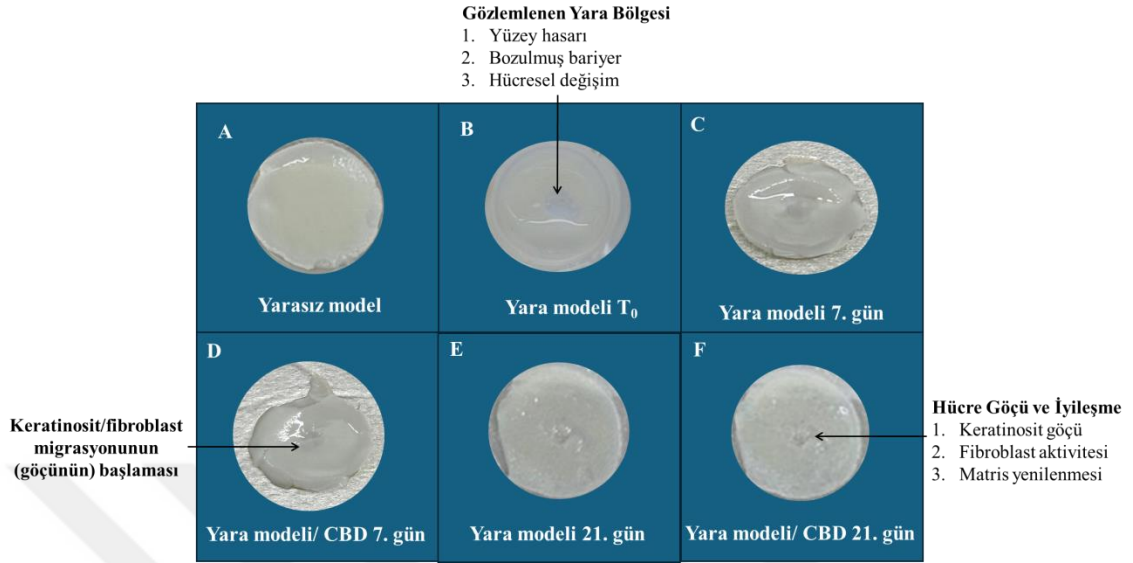


Şekil 4.20. Tam Katmanlı Deri Model (FTSE) yaralanma aşamalarının şematik gösterimi. A) yara ile yara oluşturma B) Yıkama istasyonundan sonra kalan doku parçasının alınması C-D) Oluşturulan yara modeli görünümü E) 7., 14. ve 21. gün yara modelleri

FTSE modelinde oluşturulan punch yarası, RHE modellerinin aksine dermal matrisin (kollajen/fibroblast) de zarar görmesini içermektedir. Yaralanma sırasında dermal tabakanın bütünlüğünü koruması ve yara kenarlarında belirgin bir dik kesit oluşması, modelin yapısal olgunluğunu göstermektedir. Bu derinlik, CBD'nin dermal fibroblastların hareketini teşvik eden etkisini ve bu hücrelerin yara bölgesini alttan doldurma yeteneğini incelemek için gereklidir (E. Hofmann vd., 2023). Literatürde CBD'nin lipofilik yapısının dermal katmanlara nüfuz etme yeteneğinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Rusu vd., 2025). Bu modelde gözlemlenen hızlandırılmış iyileşme, CBD'nin her iki katmandaki hücreler arası etkileşim olduğu gözlemlenmektedir.

21 günlük izleme dönemi boyunca (Şekil 4.21.), FTSE modellerindeki yara iyileşmesi, RHE modellerine göre daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Sadece epitel dokunun gelişimi değil, ayrıca dermal matrisin yara bölgesinde yeniden yapılandırılması, CBD'nin rejeneratif kapasitesinin tam katmanlı başarısını göstermektedir. Bu bulgu, CBD'nin kronik ve derin yaralarda skar dokusu oluşumunu azaltarak fonksiyonel onarıma yardımcı olma potansiyelini güçlendirmektedir. Tüm FTSE gruplarının (kontrol ve CBD) eş zamanlı ve benzer çevresel şartlarda (hava-sıvı

arayüzü, sıcaklık, besiyeri) yaralanması, elde edilen iyileşme oranlarının istatistiksel olarak karşılaştırılabilirliğini sağlamıştır.



Şekil 4.21. FTSE modelinde (1,12 cm²) zamana bağlı morfolojik değişimler. A) 21.gün yarasız model, B) Gözlemlenen yara modeli (T₀), C) 7. Gün yara kontrol, D) 7. Gün yara+CBD; CBD etkisiyle başlayan aktif hücre göçü ve yeniden epitelizasyon başlangıcı (Ok ile gösterilmiştir), E) 21. Gün yara kontrol ve F) 21. Gün yara+CBD ; hücre göçünün tamamlanmasıyla oluşan matür epidermal tabaka ve doku bütünlüğü.

Şemada belirtilen şekilde; fibroblast barındıran dermal matrisin keratinosit katmanları (FTSE) ile bir araya gelmesi, yapısal bütünlüğü olan bir FTSE modeli oluşturmuştur. Yaralanma anında (T₀) her iki doku katmanının da eşit şekilde hasar görebildiği ve modelin bütünlüğünü koruduğu tespit edilmiştir.

4.3.2.2. *In vitro* 3B epidermal model ve yara modelinde mikroskopi sonuçları ve CBD'nin etkileri

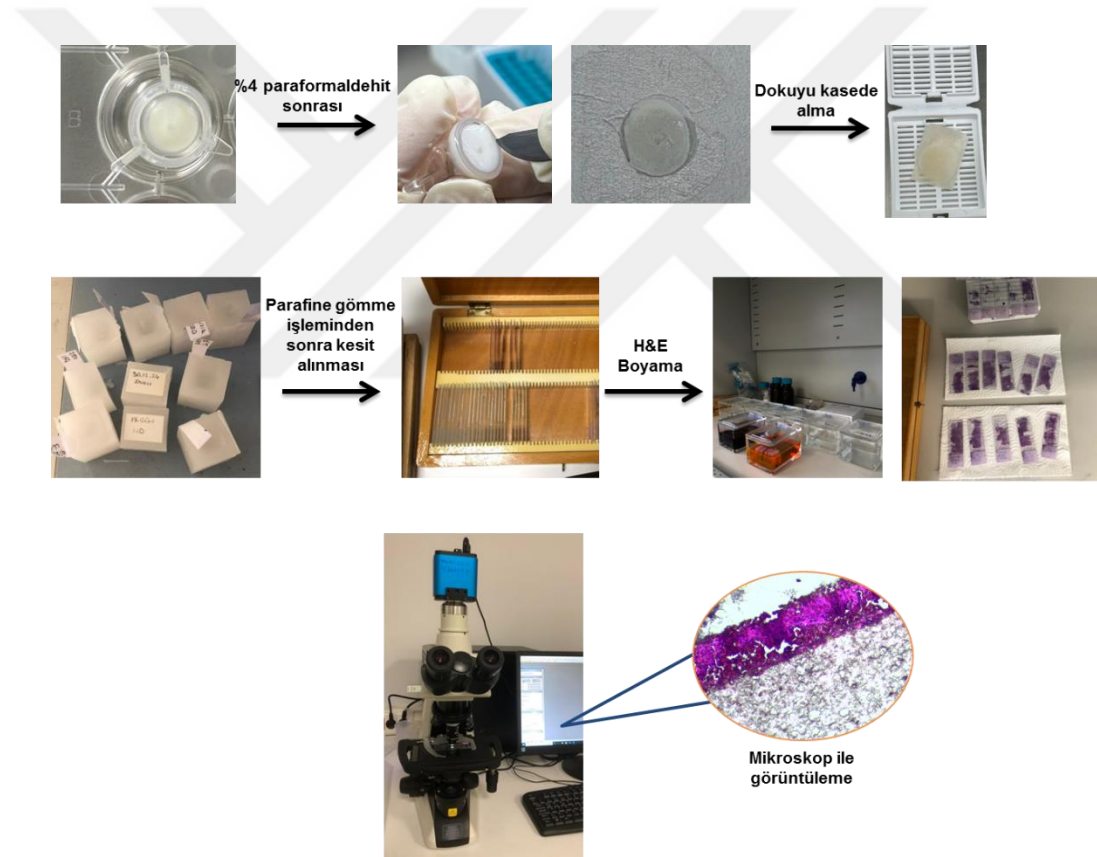
In vitro 3B epidermal model ve yara modelinde histoloji analizi ve konfokal mikroskop ile CBD'nin etkileri incelendi.

4.3.2.2.1. Histolojik analizler

Doku mühendisliği ile oluşturulan deri örneklerinin yapısal doğruluğu, doğal deri yapısının morfolojik benzerliği ile değerlendirilir. H ve E boyaması, bu incelemede dermal matrisin düzenini ve epidermal tabakaların gelişimini gösteren temel bir

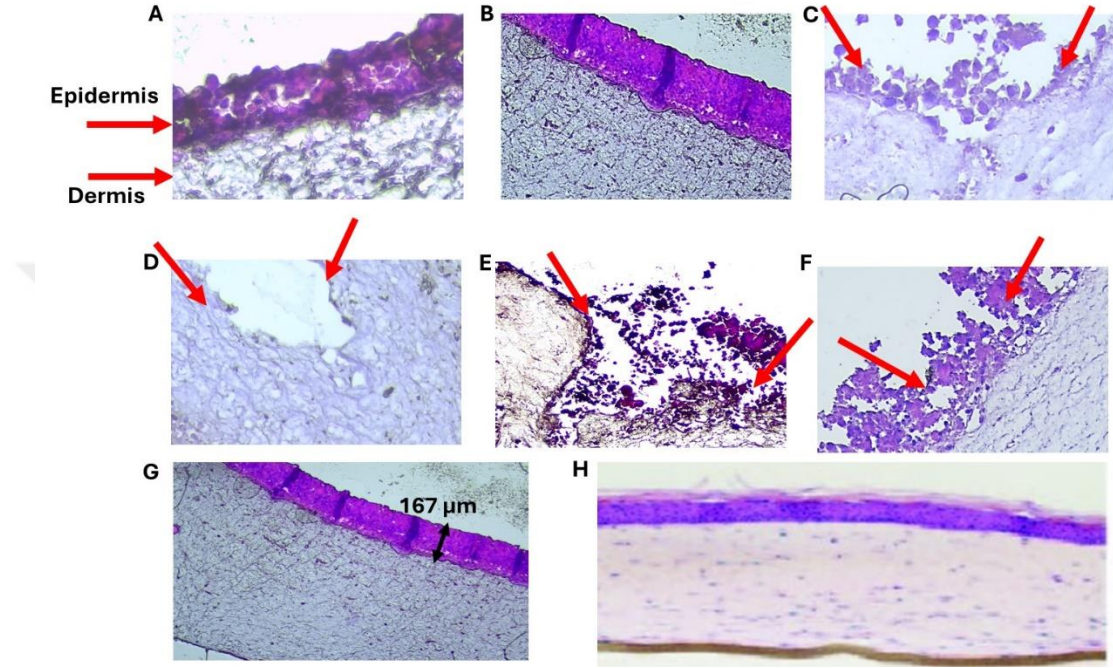
yöntemdir. Hematoksilenin bazofilik özelliği sayesinde keratinositlerin çekirdekleri belirgin bir şekilde ayırt edilirken, eozin boyası sitoplazmik proteinleri ve dermal kolajen liflerinin yoğunluğunu asidofilik bir şekilde görünür hale getirir (Mulder vd., 2023).

In vitro 3B tam katmanlı deri modellerinin (FTSE) doku yapısı ve CBD'nin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, Hematoksilen ve Eozin boyama tekniği Şekil 4.22. gösterildiği gibi morfolojik olarak incelenmiştir. Elde edilen histolojik kesitler; yarasız kontrol, yaralı kontrol ve CBD ile tedavi edilen gruplar arasında 7., 14. ve 21. günlerde karşılaştırmalı olarak ele alınmıştır.



In vitro FTSE modelinde yaraların iyileşme süreci ve doku olgunlaşma aşaması; 7., 14. ve 21. günlerde histolojik olarak incelenmiştir (Şekil 4.23.). T_0 aşamasında yara kenarlarının keskinliği Şekil 4.23.'de ok işaretleri ile gösterilmektedir. İyileşmenin ilk evresi olan 7. günde, kontrol grubunda epidermis ve dermis bileşenleri belirgin bir

şekilde görülmüştür. İyileşme sürecinin 14. gününde, kontrol grubunda yara alanının henüz tamamen kapanmadığı görülmüş ve hücresel hareketliliğin devam ettiği tespit edilmiştir. 21. günde ise, CBD grubunda yara hattında hücre göçünün daha belirgin bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.23. *In vitro* 3B tam katmanlı deri modellerinden alınan mikrotom kesitlerinin H ve E boyaması ile değerlendirilmesi. A) *In vitro* tam katmanlı deri model 7. gün doku kesiti B) *In vitro* tam katmanlı deri model 21. gün doku kesiti C) *In vitro* tam katmanlı deri modelinde yara kesiti (T0), D) C) *In vitro* tam katmanlı deri yara modeli kesiti (T 21.gün), E) CBD uygulanmış *in vitro* tam katmanlı deri yara modeli kesiti (T 14.gün), F) CBD uygulanmış *in vitro* tam katmanlı deri yara modeli kesiti (T 21.gün) G) *In vitro* tam katmanlı deri modeli 21. gün epidermis ölçümü H) Ticari olarak piyasada bulunan 3B tam katmanlı deri modeli (EpiDermFT™)

T₀ aşamasındaki keskin yara kenarlarının 7. günde hücresel hareketliliğe dönüşmesi, literatürde keratinosit aktivasyonu olarak adlandırılan iyileşme döneminin başlangıcını temsil eder. Kontrol grubunda dermal-epidermal yapının belirgin hale gelmesi, doku mühendisliği modellerinde bazal membranın stabilize olduğunu göstermektedir (Nishiyama vd., 2000).

14. günde kontrol grubunda yara alanının henüz tamamen kapanmamış olması, *in vitro* 3B deri modellerinde doğal iyileşme hızının kısıtlı olduğunu gösteren çalışmalarla örtüşmektedir (Mulder vd., 2023). 21. günde CBD grubunda hücre

göçünün belirgin şekilde artması ve yara hattının kapanma eğilimi, CBD'nin farklılaşmayı (keratinizasyonu) destekleyen bir rol üstlendiğini göstermektedir. Literatürde, deri eşdeğerlerinde 21 günlük kültür süresi, işlevsel bir bariyer bütünlüğü için kritik bir eşik olarak kabul edilir (Reijnders vd., 2015). CBD'nin bu aşamadaki başarısı, Fumagalli ve ark. tarafından vurgulanan endokannabinoid sistemin epidermal bariyerin oluşumunu düzenleyici etkisiyle doğrudan bağlantılıdır (Fumagalli vd., 2025).

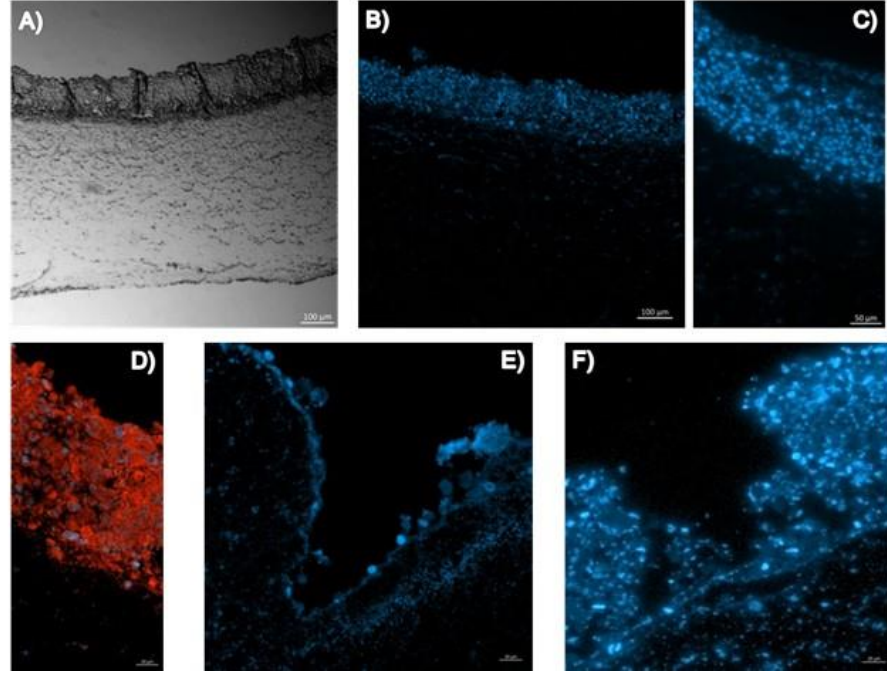
In vitro yara modellerinde H ve E boyası, yara kenarlarından içeriye doğru gerçekleşen hücresel hareketliliği (re-epitelizasyon) gözlemek amacıyla kullanılmaktadır. Araştırmalarda, yara üzerindeki hücresel yoğunluk ile yeni oluşan epidermal uzantının (epitelyal dil) morfolojik yapısı, test edilen maddeyi (örneğin CBD) değerlendirmede önemli bir faktör olarak görülmektedir (Nishiyama vd., 2000). H ve E boyamasında gözlemlenen güçlü göç eğiliminin, kontrol grubuna göre CBD grubunda daha düzenli bir yapı sergilemesi, CBD'nin yalnızca hücre sayısını artırmakla kalmadığını, aynı zamanda doku mimarisinin korunmasına da yardımcı olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, FTSE modellerinin CBD gibi tedavi edici maddelerin yara iyileşme potansiyelini değerlendirmek için yüksek çözünürlükte ve güvenilir bir platform sağladığını desteklemektedir.

Tez çalışmasında elde edilen tam katmanlı *in vitro* deri modelinin epidermal katmanının kalınlığı 167 µm olarak ölçülmüştür. Lintzeri ve arkadaşlarının derleme çalışmasında insan derisi epidermis kalınlığının organdan organa değişiklik gösterdiğini ve 12,7 µm (göz çevresi) ile 749 µm (ayak tabanı) arasında değişiklik gösterdiğini ifade etmişlerdir (Lintzeri vd., 2022). Ayrıca Tez çalışmasında geliştirilen 3B tam katmanlı deri modeli, ticari olarak ilaç ve kozmetik çalışmalar için piyasada olan MalTek firmasının EpiDermFT™ isimli 3B deri modeli ile histolojik olarak benzerlik göstermektedir. Bu sonuç, çalışmada geliştirilen modelin ticarileştirilme potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Tez çalışması hedeflerinden birisi olan tam katmanlı deri modeli geliştirilmesinin alt yapısı oluşturulmuştur.

4.3.2.2.2. Konfokal mikroskop analizi

FTSE modellerinin yapısal analizi, H ve E boyama ve konfokal mikroskopi yöntemleri ile karşılaştırmalı bir şekilde yapılmıştır (Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.). H ve E ile gözlemlenen keratinosit tabakalanması ve matris organizasyonu, konfokal

mikroskopi görüntüleri ile 3B olarak doğrulanmıştır (Şekil 4.24.). Her iki yöntemden elde edilen veriler, geliştirilen modelin doğal deri dokusuna benzer morfolojik, hücresel özellikler taşıdığını ve CBD uygulamasının doku bütünlüğünü bozmadığı halde iyileşme sürecini desteklediğini göstermiştir.



Şekil 4.24. A) Tam katmanlı *in vitro* 3B deri modeli kesiti (ışık mikroskobu, skala çubuğu:100µm), B) DAPI ile boyanmış tam katmanlı *in vitro* 3B deri modeli kesiti (CLSM, , skala çubuğu:100µm), C) DAPI ile boyanmış tam katmanlı *in vitro* 3B deri modeli kesiti (CLSM, skala çubuğu:50µm), D) DAPI ve Rhodamine-Phalloidin ile boyanmış tam katmanlı *in vitro* 3B deri modeli kesiti (CLSM, skala çubuğu:20µm), E) DAPI ile boyanmış tam katmanlı *in vitro* 3B deri yara modeli 21. gün kesiti (CLSM, skala çubuğu: 50µm), F) DAPI ile boyanmış tam katmanlı *in vitro* 3B deri yara modeli +CBD kesiti 21. gün (CLSM, skala çubuğu:50µm).

FTSE modellerinden alınan konfokal mikroskop görüntüleri, keratinositlerin fibroblast içeren kolajen matrisin üzerinde düzenli bir şekilde tabakalandığını ortaya koymuştur (Şekil 4.24.). Konfokal incelemeler, CBD uygulanan FTSE modellerinde yara kenarındaki hücre göçü ve çoğalmanın kontrol grubuna göre daha belirgin olduğunu göstermiştir. 21. gün yara + CBD’de hücresel yoğunluk ve yeniden epitelizasyon süreci, yüksek çözünürlüklü floresan işaretlemelerle 3B olarak doğrulanmıştır.

Konfokal mikroskopi analizleri, dokunun 3B bütünlüğünü ve hücresel organizasyonunu yüksek çözünürlükte kanıtlamıştır. H ve E kesitlerinde belirlenen epidermal ve dermal bileşimin yapısı, konfokal görüntüler ile uyumlu olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle konfokal analizler, H ve E ile saptanan morfolojik olgunlaşmanın belirli epidermal katmanlarda hücresel düzeyde de devam ettiğini gösterirken, CBD uygulamasının doku yapısına olan etkilerinin histolojik hem de moleküler boyutta tutarlılığını kanıtlamıştır.

CBD'nin yara iyileştirici etkileri literatürde çeşitli *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. Tez çalışmasıyla CBD gibi anti-enflamatuvar ve yara iyileştirici etkisi olan maddelerin yara kapanması üzerine etkilerinin *in vitro* 2B ve 3B deri modelleri üzerinde araştırılabileceği gösterilmiştir. Mevcut araştırma, CBD'nin deri bütünlüğü ve yara iyileştirici etkisinin *in vitro* 3B deri modellerinde doğrulandığı ilk çalışmadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Tez çalışması, modern rejeneratif tıbbın önemli hedeflerinden biri olan işlevsel doku onarımını ele alarak, CBD içeren biyofonksiyonel bir sistemin terapötik etkinliğini kapsamlı bir *in vitro* modelleme yöntemi ile ortaya koymuştur. Çalışma, hücre kültürü, moleküler genetik inceleme ve insan deri fizyolojisini yüksek bir doğrulukla taklit eden üç boyutlu doku mühendisliği modelleri sürecini içermektedir. Bu yöntem, CBD'nin biyolojik etkilerini yalnızca gözlem yaparak değil, aynı zamanda hücresel, moleküler ve doku yapısı açısından entegre bir şekilde değerlendirme olanağı sunmuştur.

Bu araştırmanın temel aşamasını oluşturan biyoyumluluk testlerinde, CBD'nin HDF ve HS2 hücreleri üzerindeki etkisinin belirgin bir şekilde doz ile orantılı olduğunu göstermektedir. Hücre canlılığı analizleriyle, 12,5 μ M CBD konsantrasyonunun hücresel metabolik aktiviteyi koruduğu ve zararlı bir etki yaratmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, CBD'nin derideki hücreler için güvenli bir tedavi aralığı sunduğunu göstermektedir. Bununla beraber, elde edilen doz yanıt grafiği, CBD'nin biyolojik sistemlerde olumlu etkiler gösterebileceğini göstermektedir. Düşük dozlarda hücresel aktivitenin artması, daha yüksek dozlarda ise potansiyel olarak inhibe edici etkilerin ortaya çıkması, tedavi uygulamalarında doz ayarlamının önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bu açıdan, çalışma sadece güvenli bir konsantrasyon belirlemekle kalmamış, aynı zamanda gelecekte geliştirilecek topikal ürünler ve biyomateryal bazlı taşıma sistemleri için bir doz önerisi sunmuştur.

2B yara modeli ile elde edilen veriler, CBD'nin yara iyileşme hızı üzerindeki teşvik edici etkisi, HS2 keratinosit hücre hattıyla oluşturulan iki boyutlu çizik modelinde 0, 1, 2 ve 7 gün zaman dilimleriyle incelenmiştir. Analizler, CBD uygulanan gruplarda hücrelerin yara merkezine doğru polarizasyonunun ve migrasyon yeteneklerinin önemli ölçüde arttığını, yara kapanma oranlarının kontrol grubuna göre %99,9 gibi dikkate değer bir oranla gerçekleştiğini göstermiştir. Bu değişimlerin moleküler temelleri RT-qPCR analizleri ile doğrulanmış; LAM ve INV genlerinin CBD uygulamasıyla (sırasıyla 1,5 kat ve 3 kat) anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. K10 geni ise kontrol grubuna kıyasla yara iyileşirken 3,5 kat artış göstermiştir. Bu genler, epidermal farklılaşma ve hücre dışı matris yapısı açısından hayati öneme sahiptir. Elde

edilen bulgular, CBD'nin yara iyileşmesini yalnızca hücrel göçle sınırlı bir süreç olarak değil, aynı zamanda genetik düzeyde yeniden programlanan bir iyileşme süreci olarak yönlendirdiğini göstermektedir.

Çalışmanın önemli katkılarından biri, elde edilen bulguların fizyolojik gerçekliğe daha yakın olan *in vitro* 3B modellerde doğrulanmasıdır. RHE ve FTSE modelleri kullanılarak gerçekleştirilen incelemeler, CBD'nin etkilerinin karmaşık doku yapısı içinde de sürdürülebilir olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın esas aşamalarından biri, elde edilen hücrel ve moleküler bulguların insan deri fizyolojisine en yakın sistemler olan *in vitro* 3B RHE ve FTSE modellerinde doğrulanmasıdır. Bu modeller, CBD'nin etkilerinin yalnızca hücrel düzeyde değil, karmaşık doku yapısı içinde de sürdürülebilir ve fonksiyonel olduğunu göstermek amacıyla kullanılmaktadır.

RHE modelinde belirlenen düzenli keratinosit katmanları ve epidermal bariyerin bütünlüğünün korunması, CBD'nin epidermal denge üzerindeki düzenleyici fonksiyonunu desteklemektedir. Konfokal lazer taramalı mikroskopi analizleriyle üç boyutlu olarak daha da güçlendirilmiştir. Z-stack görüntüleme yöntemi kullanılarak elde edilen optik kesit rekonstrüksiyonları, CBD uygulanan gruplarda keratinositlerin yalnızca yüzeyde değil, doku kalınlığı boyunca da düzenli bir hücrel dağılım sergilediğini göstermiştir. Bu 3B analizler, hücrelerin yan tarafa göçünün yanı sıra dikey yönlü anlamda da belirgin bir katmanlaşma ve yeniden katmanlama sürecine girdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle z-stack kesitlerin ardışık analiz edilmesi, kontrol grubunda gözlemlenen düzensiz hücrel boşlukların CBD uygulanmış gruplarda belirgin bir şekilde azaldığını ve hücreler arası bağlantıların daha sağlam, sürekli ve işlevsel bir doku bütünlüğü oluşturduğunu kanıtlamıştır. Bu bulgu, sadece yüzeysel yara iyileşmesini değil, aynı zamanda epidermal bariyerin üç boyutlu yeniden inşasını kanıtlayan güçlü bir morfolojik delil sunmaktadır. Bu nedenle konfokal z-stack analizleri, CBD'nin yara iyileşme sürecini iki boyutlu bir kapanma olayından çıkararak, fonksiyonel ve yapısal olarak bütünleşmiş üç boyutlu bir doku yeniden organizasyonuna dönüştürdüğünü güçlü biçimde destekleyen önemli bir kanıt kayıtları sağlamaktadır. SEM analizleri ile CBD'nin epidermal modelin üst katmanındaki yara kapanma hızına etkisi görüntülenmiş ve hesaplanmıştır. CBD'nin yara kapanmasına olumlu etkisi Sem analzi ile de teyit edilmiştir.

Daha gelişmiş bir fizyolojik model olan FTSE modelden alınan tam katmanlı deri ve yara modellerinde CBD'nin etkisi H ve E histolojik görüntüler ve CLSM görüntüleri üzerinden değerlendirilmiştir. Tam katmanlı modelde CBD'nin yeniden epitelleşmeye etkisi her iki mikroskopi yöntemiyle de doğrulanmıştır.

Elde edilen veriler, CBD'nin yara iyileşmesi sürecinde yalnızca destekleyici bir ajan değil, aynı zamanda süreci aktif olarak yönlendiren bir biyoterapötik aday olduğunu göstermektedir. CBD'nin; topikal krem formülasyonları, hidrojel bazlı yara örtüleri veya biyomateryal entegre doku mühendisliği ürünleri içinde kullanımı potansiyel bir klinik uygulama alanı sunmaktadır. Özellikle kronik yaralar, diyabetik ülserler ve gecikmiş iyileşme gösteren doku hasarlarında CBD bazlı sistemlerin alternatif ya da tamamlayıcı tedavi yöntemleri olarak değerlendirilmesi mümkündür.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, CBD'nin deri onarımı üzerindeki etkilerini hücresele seviyeden başlayarak doku yapısına kadar uzanan çok katmanlı bir biyolojik yapı içinde sistematik bir şekilde sunmaktadır. Elde edilen veriler, CBD'nin doku yenileyici ve doku düzenleyici özelliklerini ortaya koymaktadır. Bu araştırma, özellikle *in vitro* 3B FTSE modeli ile gerçekleştirilen kapsamlı doğrulama süreci sayesinde literatürde sınırlı sayıda bulunan çok katmanlı değerlendirme yöntemlerine katkıda bulunmakta ve CBD'nin rejeneratif tıp alanında yenilikçi bir tedavi aracı olarak yer almasına bilimsel bir temel sağlamaktadır. Tez çalışması, hayvan kullanımının azaltılmasını hedefleyen 3R Prensipleri (Hayvan kullanımında Yerine Koyma, Azaltma, İyileştirme) ile de tamamen uyumlu bir bakış açısı sunmaktadır. CBD uygulamasının rejeneratif potansiyelinin hem gen ekspresyon düzeyinde hem de *in vitro* çok katmanlı doku yapısında kanıtlanmış olması, doku mühendisliği alanında yeni nesil yara bakım ürünlerinin klinik aşamalara geçişi için metodolojik alt yapı oluşturmuştur.

5.2. Öneriler

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular doğrultusunda gelecek araştırmalar ve klinik uygulamalar için aşağıdaki öneriler sunulmaktadır:

RT-qPCR ile tespit edilen K10, Laminin ve Involukrin gen ifadelerinin artışının, protein düzeyindeki karşılıklarını net bir biçimde belirlemek amacıyla immünohistokimya (Immunohistochemistry, IHC) analizleri ile desteklenmesi

önerilebilir. CBD'nin yaraların iyileşmesini sağlayan özel sinyal yollarının inhibitör çalışmaları aracılığıyla incelenmesi, etki mekanizmasının moleküler şemasını daha anlaşılır hale getirecektir.

Mevcut *in vitro* FTSE modeline, anjiyogenez proseslerini simüle edebilen endotel hücrelerinin entegre edilmesi önerilebilir. Böylece CBD'nin kan damarları üzerindeki etkileri gözlemlenebilecektir. Yara iyileşmesinin inflamasyon evresini daha iyi analiz edebilmek için, 3B modellere makrofaj veya nötrofil gibi bağışıklık hücrelerinin dahil edilmesi, CBD'nin antienflamatuar etkisinin doku düzeyinde doğrulanması açısından faydalı olacaktır.

Geliştirilen CBD bazlı sistemin yalnızca sağlıklı hücrelerde değil, zor iyileşen diyabetik yaralar (ülser) veya enfekte yara modellerindeki etkinliğinin de araştırılması önerilmektedir. Özellikle CBD'nin antibakteriyel özellikleri ile yara iyileştirici etkisinin birlikte test edilmesi bu modellerde mümkün olabilir.

CBD'nin stabilitesini ve dolayısıyla raf ömrünü artırmak için, geliştirilen sistemin çeşitli depolama koşullarındaki (sıcaklık, nem, ışık) dayanıklılık testlerinin gerçekleştirilmesi önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Addis, R., Cruciani, S., Santaniello, S., Bellu, E., Sarais, G., Ventura, C., Maioli, M., ve Pintore, G. (2020). Fibroblast Proliferation and Migration in Wound Healing by Phytochemicals: Evidence for a Novel Synergic Outcome. *International Journal of Medical Sciences*, 17(8), 1030-1042. <https://doi.org/10.7150/ijms.43986>
- Adrian, M. (2015). What the History of Drugs Can Teach Us About the Current Cannabis Legalization Process: Unfinished Business. *Substance Use ve Misuse*, 50(8-9), 990-1004. <https://doi.org/10.3109/10826084.2015.1013725>
- Agonia, A. S., Palmeira-de-Oliveira, A., Cardoso, C., Augusto, C., Pellevoisin, C., Videau, C., Dinis-Oliveira, R. J., ve Palmeira-de-Oliveira, R. (2022). Reconstructed Human Epidermis: An Alternative Approach for In Vitro Bioequivalence Testing of Topical Products. *Pharmaceutics*, 14(8), 1554. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081554>
- Aizpurua-Olaizola, O., Elezgarai, I., Rico-Barrio, I., Zarandona, I., Etxebarria, N., ve Usobiaga, A. (2017). Targeting the endocannabinoid system: Future therapeutic strategies. *Drug Discovery Today*, 22(1), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.005>
- Akhmetshina, A., Dees, C., Busch, N., Beer, J., Sarter, K., Zwerina, J., Zimmer, A., Distler, O., Schett, G., ve Distler, J. H. W. (2009). The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis. *Arthritis ve Rheumatism*, 60(4), 1129-1136. <https://doi.org/10.1002/art.24395>
- Albanesi, C., ve Pastore, S. (2010). Pathobiology of Chronic Inflammatory Skin Diseases: Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells as a Target for Anti-Inflammatory Drugs. *Current drug metabolism*, 11, 210-227. <https://doi.org/10.2174/138920010791196328>
- Amiri, N., Golin, A. P., Jalili, R. B., ve Ghahary, A. (2022a). Roles of cutaneous cell-cell communication in wound healing outcome: An emphasis on keratinocyte-fibroblast crosstalk. *Experimental Dermatology*, 31(4), 475-484. <https://doi.org/10.1111/exd.14516>
- Amiri, N., Golin, A. P., Jalili, R. B., ve Ghahary, A. (2022b). Roles of cutaneous cell-cell communication in wound healing outcome: An emphasis on keratinocyte-fibroblast crosstalk. *Experimental Dermatology*, 31(4), 475-484. <https://doi.org/10.1111/exd.14516>
- Atala, A. (2008). Advances in tissue and organ replacement. *Current Stem Cell Research ve Therapy*, 3(1), 21-31. <https://doi.org/10.2174/157488808783489435>
- Atalay, S., Gęgotek, A., Domingues, P., ve Skrzydlewska, E. (2021). Protective effects of cannabidiol on the membrane proteins of skin keratinocytes exposed to hydrogen peroxide via participation in the proteostasis network. *Redox Biology*, 46, 102074. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102074>

- Auger, F. A., Lacroix, D., ve Germain, L. (2009a). Skin Substitutes and Wound Healing. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(2), 94-102. <https://doi.org/10.1159/000178868>
- Auger, F. A., Lacroix, D., ve Germain, L. (2009b). Skin Substitutes and Wound Healing. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(2), 94-102. <https://doi.org/10.1159/000178868>
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., ve Brem, H. (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 153(2), 347-358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., ve Tomic-Canic, M. (2008). PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585-601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
- Bataillon, M., Lelièvre, D., Chapuis, A., Thillou, F., Autourde, J. B., Durand, S., Boyera, N., Rigau, A.-S., Besné, I., ve Pellevoisin, C. (2019). Characterization of a New Reconstructed Full Thickness Skin Model, T-Skin™, and its Application for Investigations of Anti-Aging Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2240. <https://doi.org/10.3390/ijms20092240>
- Bensa, T., Tekkela, S., ve Rognoni, E. (2023). Skin fibroblast functional heterogeneity in health and disease. *The Journal of Pathology*, 260(5), 609-620. <https://doi.org/10.1002/path.6159>
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., ve Yarmush, M. L. (2011a). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(Volume 2, 2011), 403-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., ve Yarmush, M. L. (2011b). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(Volume 2, 2011), 403-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Binder, K. W., Zhao, W., Aboushwareb, T., Dice, D., Atala, A., ve Yoo, J. J. (2010). In situ bioprinting of the skin for burns. *Journal of the American College of Surgeons*, 211(3), S76. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2010.06.198>
- Bíró, T., Tóth, B. I., Haskó, G., Paus, R., ve Pacher, P. (2009). The endocannabinoid system of the skin in health and disease: Novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(8), 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.004>
- Blair, R. E., Deshpande, L. S., ve DeLorenzo, R. J. (2015). Cannabinoids: Is there a potential treatment role in epilepsy? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. (world). <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14656566.2015.1074181>

- Carragher, N., Piccinini, F., Tesei, A., Jr, O. J. T., Bickle, M., ve Horvath, P. (2018). Concerns, challenges and promises of high-content analysis of 3D cellular models. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(8), 606-606. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.99>
- Carvalho, R. K., Santos, M. L., Souza, M. R., Rocha, T. L., Guimarães, F. S., Anselmo-Franci, J. A., ve Mazaro-Costa, R. (2018). Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive toxicity in male Swiss mice. *Journal of Applied Toxicology*, 38(12), 1545-1545. <https://doi.org/10.1002/jat.3731>
- CBD Skin Care Market | Global Market Analysis Report—2036*. (t.y.). Geliş tarihi 07 Mayıs 2026, gönderen <https://www.futuremarketinsights.com/reports/cbd-skin-care-market>
- Chelminiak-Dudkiewicz, D., Smolarkiewicz-Wyczachowski, A., Mylkie, K., Wujak, M., Mlynarczyk, D. T., Nowak, P., Bocian, S., Goslinski, T., ve Ziegler-Borowska, M. (2022). Chitosan-based films with cannabis oil as a base material for wound dressing application. *Scientific Reports*, 12(1), 18658. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23506-0>
- Chen, M., Przyborowski, M., ve Berthiaume, F. (2009). Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Critical Reviewsvetrade; in Biomedical Engineering*, 37(4-5). <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v37.i4-5.50>
- Cohen, K., ve Weinstein, A. (2018). The Effects of Cannabinoids on Executive Functions: Evidence from Cannabis and Synthetic Cannabinoids—A Systematic Review. *Brain Sciences*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/brainsci8030040>
- Cooper, D. M. (1999). Wound healing: New understandings. *Nurse Practitioner Forum*, 10(2), 74-86.
- Correia-Sá, I., Paiva, A., Carvalho, C. M., ve Vieira-Coelho, M. A. (2020). Cutaneous endocannabinoid system: Does it have a role on skin wound healing bearing fibrosis? *Pharmacological Research*, 159, 104862. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104862>
- Dagher, J., Arcand, C., Auger, F. A., Germain, L., ve Moulin, V. J. (2022). The Self-Assembled Skin Substitute History: Successes, Challenges, and Current Treatment Indications. *Journal of Burn Care ve Research: Official Publication of the American Burn Association*, 44(Suppl 1), S57-S64. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irac074>
- Deng, Z., Fan, T., Xiao, C., Tian, H., Zheng, Y., Li, C., ve He, J. (2024). TGF- β signaling in health, disease and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 61. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01764-w>
- Devinsky Orrin, Cross J. Helen, Laux Linda, Marsh Eric, Miller Ian, Nabbout Rima, Scheffer Ingrid E., Thiele Elizabeth A., ve Wright Stephen. (2017). Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 376(21), 2011-2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611618>

- Di Stefano, A. B., Urrata, V., Schilders, K., Franza, M., Di Leo, S., Moschella, F., Cordova, A., ve Toia, F. (2025). Three-Dimensional Bioprinting Techniques in Skin Regeneration: Current Insights and Future Perspectives. *Life*, 15(5), 787. <https://doi.org/10.3390/life15050787>
- DiPatrizio, N. V., ve Piomelli, D. (2012). The thrifty lipids: Endocannabinoids and the neural control of energy conservation. *Trends in Neurosciences*, 35(7), 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.04.006>
- Dong, L., Hao, H., Liu, J., Ti, D., Tong, C., Hou, Q., Li, M., Zheng, J., Liu, G., Fu, X., ve Han, W. (2017). A Conditioned Medium of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Wnt7a Promotes Wound Repair and Regeneration of Hair Follicles in Mice. *Stem Cells International*, 2017, e3738071. <https://doi.org/10.1155/2017/3738071>
- Douillet, C., Nicodeme, M., Hermant, L., Bergeron, V., Guillemot, F., Fricain, J.-C., Oliveira, H., ve Garcia, M. (2022). From local to global matrix organization by fibroblasts: A 4D laser-assisted bioprinting approach. *Biofabrication*, 14(2), 025006. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac40ed>
- Du, Y., Ren, P., Wang, Q., Jiang, S.-K., Zhang, M., Li, J.-Y., Wang, L.-L., ve Guan, D.-W. (2018). Cannabinoid 2 receptor attenuates inflammation during skin wound healing by inhibiting M1 macrophages rather than activating M2 macrophages. *Journal of Inflammation*, 15(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12950-018-0201-z>
- Duczmal, D., Bazan-Wozniak, A., Niedzielska, K., ve Pietrzak, R. (2024). Cannabinoids—Multifunctional Compounds, Applications and Challenges—Mini Review. *Molecules*, 29(20), 4923. <https://doi.org/10.3390/molecules29204923>
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., ve Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 32(4), 266-277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M., ve Goetinck, P. F. (2001). Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(2), R9-R14. <https://doi.org/10.1172/JCI10559>
- Edmondson, S. R., Thumiger, S. P., Werther, G. A., ve Wraight, C. J. (2003). Epidermal Homeostasis: The Role of the Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Systems. *Endocrine Reviews*, 24(6), 737-764. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0021>
- EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., ... Knutsen, H. K. (2022). Statement on safety of cannabidiol as a novel food: Data gaps and uncertainties. *EFSA Journal*, 20(6), e07322. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7322>

- Egles, C., Garlick, J. A., ve Shamis, Y. (2010). Three-Dimensional Human Tissue Models of Wounded Skin. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 585, 345-359. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-380-0_24
- El Ayadi, A., Jay, J. W., ve Prasai, A. (2020). Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1105. <https://doi.org/10.3390/ijms21031105>
- ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., ve Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. İçinde A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, ve J. Kobayashi (Ed.), *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa* (ss. 1-36). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1
- Eming, S. A., Martin, P., ve Tomic-Canic, M. (2014a). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6-265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- Eming, S. A., Martin, P., ve Tomic-Canic, M. (2014b). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6-265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- Fadilah, N. I. M., Isa, I. L. M., Zaman, W. S. W. K., Tabata, Y., ve Fauzi, M. B. (2022). The Effect of Nanoparticle-Incorporated Natural-Based Biomaterials towards Cells on Activated Pathways: A Systematic Review. *Polymers*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/polym14030476>
- Feldman, M., Sionov, R. V., Mechoulam, R., ve Steinberg, D. (2021a). Anti-Biofilm Activity of Cannabidiol against Candida albicans. *Microorganisms*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020441>
- Feldman, M., Sionov, R. V., Mechoulam, R., ve Steinberg, D. (2021b). Anti-Biofilm Activity of Cannabidiol against Candida albicans. *Microorganisms*, 9(2), 441. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020441>
- Ferreira, B. P., Costa, G., Mascarenhas-Melo, F., Pires, P. C., Heidarizadeh, F., Giram, P. S., Mazzola, P. G., Cabral, C., Veiga, F., ve Paiva-Santos, A. C. (2023a). Skin applications of cannabidiol: Sources, effects, delivery systems, marketed formulations and safety. *Phytochemistry Reviews*, 22(3), 781-828. <https://doi.org/10.1007/s11101-023-09860-5>
- Ferreira, B. P., Costa, G., Mascarenhas-Melo, F., Pires, P. C., Heidarizadeh, F., Giram, P. S., Mazzola, P. G., Cabral, C., Veiga, F., ve Paiva-Santos, A. C. (2023b). Skin applications of cannabidiol: Sources, effects, delivery systems, marketed formulations and safety. *Phytochemistry Reviews*, 22(3), 781-828. <https://doi.org/10.1007/s11101-023-09860-5>
- Fratini, C., Weaver, E., Moroni, S., Irwin, R., Dallal Bashi, Y. H., Uddin, S., Casettari, L., Wylie, M. P., ve Lamprou, D. A. (2023). Combining microfluidics and coaxial 3D-bioprinting for the manufacturing of diabetic wound healing dressings.

Biomaterials Advances, 153, 213557.
<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213557>

- Fumagalli, M., Martinelli, G., Paladino, G., Rossini, N., Ciriello, U., Nicolaci, V., Maranta, N., Pozzoli, C., El Haddad, S. M., Sonzogni, E., Dell'Agli, M., Piazza, S., ve Sangiovanni, E. (2025). Beyond Cannabidiol: The Contribution of Cannabis sativa Phytocomplex to Skin Anti-Inflammatory Activity in Human Skin Keratinocytes. *Pharmaceuticals*, 18(5), 647. <https://doi.org/10.3390/ph18050647>
- Gallucci, R. M., Sugawara, T., Yucesoy, B., Berryann, K., Simeonova, P. P., Matheson, J. M., ve Luster, M. I. (2001). Interleukin-6 Treatment Augments Cutaneous Wound Healing in Immunosuppressed Mice. *Journal of Interferon ve Cytokine Research*, 21(8), 603-609. <https://doi.org/10.1089/10799900152547867>
- Gęgotek, A., Atalay, S., Domingues, P., ve Skrzydlewska, E. (2019). The Differences in the Proteome Profile of Cannabidiol-Treated Skin Fibroblasts following UVA or UVB Irradiation in 2D and 3D Cell Cultures. *Cells*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cells8090995>
- Goodarzi, P., Falahzadeh, K., Nematizadeh, M., Farazandeh, P., Payab, M., Larijani, B., Tayanloo Beik, A., ve Arjmand, B. (2018). Tissue Engineered Skin Substitutes. İçinde K. Turksen (Ed.), *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 3: Stem Cells, Bio-materials and Tissue Engineering* (ss. 143-188). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/5584_2018_226
- Greco, R., Demartini, C., Zanaboni, A. M., Francavilla, M., De Icco, R., Ahmad, L., ve Tassorelli, C. (2022). The endocannabinoid system and related lipids as potential targets for the treatment of migraine-related pain. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 62(3), 227-240. <https://doi.org/10.1111/head.14267>
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., ve Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering—In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4-5), 352-366. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.005>
- Grose, R., ve Werner, S. (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Molecular Biotechnology*, 28(2), 147-166. <https://doi.org/10.1385/MB:28:2:147>
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., ve Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Halim, A. S., Khoo, T. L., ve Mohd. Yussof, S. J. (2010). Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 43(Suppl), S23-S28. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.70712>
- Heng, M. C. Y. (2011). Wound healing in adult skin: Aiming for perfect regeneration. *International Journal of Dermatology*, 50(9), 1058-1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.04940.x>

- Hodge, J. G., Zamierowski, D. S., Robinson, J. L., ve Mellott, A. J. (2022). Evaluating polymeric biomaterials to improve next generation wound dressing design. *Biomaterials Research*, 26(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00291-5>
- Hofmann, E., Fink, J., Pignet, A.-L., Schwarz, A., Schellnegger, M., Nischwitz, S. P., Holzer-Geissler, J. C. J., Kamolz, L.-P., ve Kotzbeck, P. (2023). Human In Vitro Skin Models for Wound Healing and Wound Healing Disorders. *Biomedicines*, 11(4), 1056. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041056>
- Hofmann, M. E., ve Frazier, C. J. (2013). Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: Potential and challenges for improved therapeutic intervention. *Experimental Neurology*, Special Issue: *Epilepsy*, 244, 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.047>
- Huttenlocher, A., ve Horwitz, A. R. (2007). Wound healing with electric potential. *The New England Journal of Medicine*, 356(3), 303-304. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr066496>
- Iannotti, F. A., Di Marzo, V., ve Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research*, 62, 107-128. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.002>
- Imran, M., Moyle, P. M., Kamato, D., ve Mohammed, Y. (2024). Advances in, and prospects of, 3D preclinical models for skin drug discovery. *Drug Discovery Today*, 29(12), 104208. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104208>
- Iyer, K., Chen, Z., Ganapa, T., Wu, B. M., Tawil, B., ve Linsley, C. S. (2018). Keratinocyte Migration in a Three-Dimensional In Vitro Wound Healing Model Co-Cultured with Fibroblasts. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(6), 721-733. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0145-7>
- Izgelov, D., Davidson, E., Barasch, D., Regev, A., Domb, A. J., ve Hoffman, A. (2020). Pharmacokinetic investigation of synthetic cannabidiol oral formulations in healthy volunteers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 154, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.06.021>
- Jastrząb, A., Gęgotek, A., ve Skrzydlewska, E. (2019). Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation. *Cells*, 8(8), 827. <https://doi.org/10.3390/cells8080827>
- Javierre, E., Vermolen, F. J., Vuik, C., ve van der Zwaag, S. (2008). Numerical Modelling of Epidermal Wound Healing. İçinde K. Kunisch, G. Of, ve O. Steinbach (Ed.), *Numerical Mathematics and Advanced Applications* (ss. 83-90). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69777-0_9
- Jevtić, M., Löwa, A., Nováčková, A., Kováčik, A., Kaessmeyer, S., Erdmann, G., Vávrová, K., ve Hedtrich, S. (2020). Impact of intercellular crosstalk between epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on skin homeostasis. *Biochimica*

et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1867(8), 118722.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118722>

- Jhawar, N., Schoenberg, E., Wang, J. V., ve Saedi, N. (2019). The growing trend of cannabidiol in skincare products. *Clinics in Dermatology, Great imitators in dermatology: Part I*, 37(3), 279-281.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2018.11.002>
- Karsak, M., Gaffal, E., Date, R., Wang-Eckhardt, L., Rehnelt, J., Petrosino, S., Starowicz, K., Steuder, R., Schlicker, E., Cravatt, B., Mechoulam, R., Buettner, R., Werner, S., Di Marzo, V., Tüting, T., ve Zimmer, A. (2007). Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science*, 316(5830), 1494-1497. <https://doi.org/10.1126/science.1142265>
- Katona, I. (2015). Cannabis and Endocannabinoid Signaling in Epilepsy. İçinde R. G. Pertwee (Ed.), *Endocannabinoids* (ss. 285-316). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_10
- Kim, J. Y., ve Suh, W. (2010). Stem Cell Therapy for Dermal Wound Healing. *International Journal of Stem Cells*, 3(1), 29-31.
- Kim, T., Lim, J., Jeong, J., ve Ryu, H. (2025). Wound Healing in Human Skin Equivalents Reconstructed with Biopolymers Under Fine-Dust Exposure. *Polymers*, 17(7), 901. <https://doi.org/10.3390/polym17070901>
- Kiritsi, D., ve Nyström, A. (2018a). The role of TGFβ in wound healing pathologies. *Mechanisms of Ageing and Development, Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine*, 172, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.004>
- Kiritsi, D., ve Nyström, A. (2018b). The role of TGFβ in wound healing pathologies. *Mechanisms of Ageing and Development, Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine*, 172, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.004>
- Klinsang, T., Charoensit, P., Phimnuan, P., Luangpraditkun, K., Ross, G. M., Viennet, C., Ross, S., ve Viyoch, J. (2023). In Vitro Wound Healing Potential of a Fibroin Film Incorporating a Cannabidiol/2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin Complex. *Pharmaceutics*, 15(12), 2682. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122682>
- Koch, L., Kuhn, S., Sorg, H., Gruene, M., Schlie, S., Gaebel, R., Polchow, B., Reimers, K., Stoelting, S., Ma, N., Vogt, P. M., Steinhoff, G., ve Chichkov, B. (2010). Laser Printing of Skin Cells and Human Stem Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(5), 847-854. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0397>
- Kong, H. E., Pollack, B. P., ve Blalock, T. W. (2021). Cannabinoids in dermatologic surgery. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 85(6), 1565-1570. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.01.016>
- Kongkadee, K., Wisuitiprot, W., Ingkaninan, K., ve Waranuch, N. (2022). Anti-inflammation and gingival wound healing activities of *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* (hemp) extract and cannabidiol: An *in vitro* study. *Archives of Oral Biology*, 140, 105464. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105464>

- Koryťáková, A., Chatziadi, A., Rohlíček, J., Zmeškalová, E., Beránek, J., ve Šoóš, M. (2025). Stability study and structural insights into cannabidiol cocrystals. *CrystEngComm*, 27(14), 2154-2165. <https://doi.org/10.1039/D4CE01314J>
- Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Lee, J., van der Valk, W. H., Serdy, S. A., Deakin, C., Kim, J., Le, A. P., ve Koehler, K. R. (2022). Generation and characterization of hair-bearing skin organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 17(5), 1266-1305. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00681-y>
- Lee, V., Singh, G., Trasatti, J. P., Bjornsson, C., Xu, X., Tran, T. N., Yoo, S.-S., Dai, G., ve Karande, P. (2014). Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(6), 473-484. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0335>
- Li, M., Zhao, Y., Hao, H., Dai, H., Han, Q., Tong, C., Liu, J., Han, W., ve Fu, X. (2015). Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Improves the Proliferation and Migration of Keratinocytes in a Diabetes-Like Microenvironment. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 14(1), 73-86. <https://doi.org/10.1177/1534734615569053>
- Lintzeri, D. a., Karimian, N., Blume-Peytavi, U., ve Kottner, J. (2022). Epidermal thickness in healthy humans: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 36(8), 1191-1200. <https://doi.org/10.1111/jdv.18123>
- Lu, H.-C., ve Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging, Cannabis, Cannabinoids, the Endocannabinoid System, and Psychosis*, 6(6), 607-615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Maas-Szabowski, N., Szabowski, A., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., Stark, H.-J., ve Fusenig, N. E. (2001). Organotypic Cocultures with Genetically Modified Mouse Fibroblasts as a Tool to Dissect Molecular Mechanisms Regulating Keratinocyte Growth and Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(5), 816-820. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01349.x>
- Maccarrone, M., Bab, I., Bíró, T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Marzo, V. D., Konje, J. C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K. A., ve Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(5), 277-296. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.008>
- MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), Article 7130. <https://doi.org/10.1038/nature05664>

- Maghfour, J., Rietcheck, H., Szeto, M. D., Rundle, C. W., Sivesind, T. E., Dellavalle, R. P., Lio, P., Dunnick, C. A., Fernandez, J., ve Yardley, H. (2021a). Tolerability profile of topical cannabidiol and palmitoylethanolamide: A compilation of single-centre randomized evaluator-blinded clinical and in vitro studies in normal skin. *Clinical and Experimental Dermatology*, 46(8), 1518-1529. <https://doi.org/10.1111/ced.14749>
- Maghfour, J., Rietcheck, H., Szeto, M. D., Rundle, C. W., Sivesind, T. E., Dellavalle, R. P., Lio, P., Dunnick, C. A., Fernandez, J., ve Yardley, H. (2021b). Tolerability profile of topical cannabidiol and palmitoylethanolamide: A compilation of single-centre randomized evaluator-blinded clinical and in vitro studies in normal skin. *Clinical and Experimental Dermatology*, 46(8), 1518-1529. <https://doi.org/10.1111/ced.14749>
- Maglie, R., Souza Monteiro de Araujo, D., Antiga, E., Geppetti, P., Nassini, R., ve De Logu, F. (2021). The Role of TRPA1 in Skin Physiology and Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3065. <https://doi.org/10.3390/ijms22063065>
- Mahla, R. S. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, 2016, e6940283. <https://doi.org/10.1155/2016/6940283>
- Mai, R., Gedrange, T., Leonhardt, H., Sievers, N., ve Lauer, G. (2008). Immunohistochemical Comparison of Markers for Wound Healing on Plastic-Embedded and Frozen Mucosal Tissue. *Cells Tissues Organs*, 190(1), 34-41. <https://doi.org/10.1159/000166997>
- Mamun, A. A., Shao, C., Geng, P., Wang, S., ve Xiao, J. (2024). Recent advances in molecular mechanisms of skin wound healing and its treatments. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1395479>
- Martin, P. (1997). Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>
- Martinez Naya, N., Kelly, J., Corna, G., Golino, M., Abbate, A., ve Toldo, S. (2023). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Cannabidiol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(16), 5980. <https://doi.org/10.3390/molecules28165980>
- Massi, P., Vaccani, A., Bianchessi, S., Costa, B., Macchi, P., ve Parolaro, D. (2006a). The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(17), 2057-2066. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6156-x>
- Massi, P., Vaccani, A., Bianchessi, S., Costa, B., Macchi, P., ve Parolaro, D. (2006b). The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(17), 2057-2066. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6156-x>
- McGregor, I. S., Cairns, E. A., Abelev, S., Cohen, R., Henderson, M., Couch, D., Arnold, J. C., ve Gauld, N. (2020). Access to cannabidiol without a prescription:

- A cross-country comparison and analysis. *International Journal of Drug Policy*, 85, 102935. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2020.102935>
- Mechoulam, R., Fride, E., ve Di Marzo, V. (1998). Endocannabinoids. *European Journal of Pharmacology*, 359(1), 1-18. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00649-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00649-9)
- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., ve Hanuš, L. O. (2007). Cannabidiol – Recent Advances. *Chemistry ve Biodiversity*, 4(8), 1678-1692. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790147>
- Milando, R., ve Friedman, A. (2019). Cannabinoids: Potential Role in Inflammatory and Neoplastic Skin Diseases. *American Journal of Clinical Dermatology*, 20(2), 167-180. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0410-5>
- Millar, S. a., Stone, N. l., Bellman, Z. d., Yates, A. s., England, T. j., ve O’Sullivan, S. e. (2019). A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85(9), 1888-1900. <https://doi.org/10.1111/bcp.14038>
- Miller, H., De Leo, N., Badach, J., Lin, A., Williamson, J., Bonawitz, S., ve Ostrovsky, O. (2021). Role of marijuana components on the regenerative ability of stem cells. *Cell Biochemistry and Function*, 39(3), 432-441. <https://doi.org/10.1002/cbf.3609>
- Mulder, P. P. G., Raktue, R. S., Vlig, M., Elgersma, A., Middelkoop, E., ve Boekema, B. K. H. L. (2023). Full Skin Equivalent Models for Simulation of Burn Wound Healing, Exploring Skin Regeneration and Cytokine Response. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(1), 29. <https://doi.org/10.3390/jfb14010029>
- Nagarkatti, P., Pandey ,Rupal, Rieder ,Sadiye Amcaoglu, Hegde ,Venkatesh L, ve and Nagarkatti, M. (2009). Cannabinoids as Novel Anti-Inflammatory Drugs. *Future Medicinal Chemistry*, 1(7), 1333-1349. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.93>
- Nejati, R., Kovacic, D., ve Slominski, A. (2013). Neuro-immune-endocrine functions of the skin: An overview. *Expert Review of Dermatology*, 8(6), 581-583. <https://doi.org/10.1586/17469872.2013.856690>
- Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P. W., ve Schaefer, U. F. (2005). İnsan epidermis modelleri EpiSkin ® , SkinEthic ® ve EpiDerm ®: Morfolojilerinin ve fototoksisite, tahriş edicilik, aşındırıcılık ve madde taşınımı testleri için uygunluklarının değerlendirilmesi. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Selected papers of the 5th International Conference and Workshop on Cell Culture*, 60(2), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>
- Nishiyama, T., Amano, S., Tsunenaga, M., Kadoya, K., Takeda, A., Adachi, E., ve Burgeson, R. E. (2000). The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. *Journal of Dermatological Science*, 24 Suppl 1, S51-59. [https://doi.org/10.1016/s0923-1811\(00\)00142-0](https://doi.org/10.1016/s0923-1811(00)00142-0)

- Niyangoda, D., Muayad, M., Tesfaye, W., Bushell, M., Ahmad, D., Samarawickrema, I., Sinclair, J., Kebriti, S., Maida, V., ve Thomas, J. (2024a). Cannabinoids in Integumentary Wound Care: A Systematic Review of Emerging Preclinical and Clinical Evidence. *Pharmaceutics*, 16(8), 1081. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081081>
- Niyangoda, D., Muayad, M., Tesfaye, W., Bushell, M., Ahmad, D., Samarawickrema, I., Sinclair, J., Kebriti, S., Maida, V., ve Thomas, J. (2024b). Cannabinoids in Integumentary Wound Care: A Systematic Review of Emerging Preclinical and Clinical Evidence. *Pharmaceutics*, 16(8), 1081. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081081>
- Nourian Dehkordi, A., Mirahmadi Babaheydari, F., Chehelgerdi, M., ve Raeisi Dehkordi, S. (2019). Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Research ve Therapy*, 10(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2>
- Nuwayhid, R., Ngoc-Huyen, N., Notov, D., Langer, S., ve Kurow, O. (2025). Engineering a 3D wounded skin equivalent to study early inflammatory and regenerative responses in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1621566>
- Oyagawa, C. R. M., ve Grimsey, N. L. (2021). Cannabinoid receptor CB1 and CB2 interacting proteins: Techniques, progress and perspectives. İçinde A. K. Shukla (Ed.), *Methods in Cell Biology* (C. 166, ss. 83-132). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2021.06.011>
- Pacher, P., ve Kunos, G. (2013). Modulating the endocannabinoid system in human health and disease – successes and failures. *The FEBS Journal*, 280(9), 1918-1943. <https://doi.org/10.1111/febs.12260>
- Pagano, S., Valenti, C., Negri, P., Billi, M., Di Michele, A., Bruscoli, S., Febo, M., Coniglio, M., ve Marinucci, L. (2024). Acute and chronic cannabidiol treatment: In vitro toxicological aspects on human oral cells. *Food and Chemical Toxicology*, 185, 114513. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114513>
- Parikh, A. C., Jeffery, C. S., Sandhu, Z., Brownlee, B. P., Queimado, L., ve Mims, M. M. (2024). The effect of cannabinoids on wound healing: A review. *Health Science Reports*, 7(2), e1908. <https://doi.org/10.1002/hsr2.1908>
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., ve Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, 3(7), 445-464. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>
- Pertwee, R. G. (2005). Pharmacological Actions of Cannabinoids. İçinde R. G. Pertwee (Ed.), *Cannabinoids* (ss. 1-51). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_1
- Pisanti, S., Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., Abate, M., Faggiana, G., Proto, M. C., Fiore, D., Laezza, C., ve Bifulco, M. (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications.

- Pharmacology ve Therapeutics*, 175, 133-150.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041>
- Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., ve Boehm, N. (2008). [Functional histology of dermis]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 135(1 Pt 2), 1S5-20. [https://doi.org/10.1016/s0151-9638\(08\)70206-0](https://doi.org/10.1016/s0151-9638(08)70206-0)
- Pruniéras, M., Régnier, M., ve Woodley, D. (1983). Methods for Cultivation of Keratinocytes with an Air-Liquid Interface. *Journal of Investigative Dermatology*, 81(1, Supplement), S28-S33. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12540324>
- PubChem. (t.y.). *Cannabidiol*. Geliş tarihi 02 Mayıs 2026, gönderen <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/644019>
- Rajabzadeh, N., Fathi, E., ve Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investigation*, 6(0), Article 0. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04>
- Rao, V. K., Lewis-Bakker, M. M., Wasilewski, E., Clarke, H. A., ve Kotra, L. P. (2025). Stereoisomers of cannabidiols and their pharmacological activities – A potentially novel direction for cannabinoids. *Bioorganic ve Medicinal Chemistry*, 117, 118019. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.118019>
- Reihnsner, R., Balogh, B., ve Menzel, E. J. (1995). Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the *in vivo* configuration. *Medical Engineering ve Physics*, 17(4), 304-313. [https://doi.org/10.1016/1350-4533\(95\)90856-7](https://doi.org/10.1016/1350-4533(95)90856-7)
- Reijnders, C. M. A., van Lier, A., Roffel, S., Kramer, D., Scheper, R. J., ve Gibbs, S. (2015). Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Engineering. Part A*, 21(17-18), 2448-2459. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0139>
- Reiss, M., ve Sartorelli, A. C. (1987). Regulation of Growth and Differentiation of Human Keratinocytes by Type β Transforming Growth Factor and Epidermal Growth Factor1. *Cancer Research*, 47(24_Part_1), 6705-6709.
- Rezvani Ghomi, E., Niazi, M., ve Ramakrishna, S. (2023). The evolution of wound dressings: From traditional to smart dressings. *Polymers for Advanced Technologies*, 34(2), 520-530. <https://doi.org/10.1002/pat.5929>
- Rimann, M., Bono, E., Annaheim, H., Bleisch, M., ve Graf-Hausner, U. (2016). Standardized 3D Bioprinting of Soft Tissue Models with Human Primary Cells. *SLAS Technology*, 21(4), 496-509. <https://doi.org/10.1177/2211068214567146>
- Río, C. del, Millán, E., García, V., Appendino, G., DeMesa, J., ve Muñoz, E. (2018). The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders. *Biochemical Pharmacology, Cannabinoid Pharmacology and Therapeutics in Spain*, 157, 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.022>

- Rodriguez, L. G., Wu, X., ve Guan, J.-L. (2005). Wound-Healing Assay. İçinde J.-L. Guan (Ed.), *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols* (ss. 23-29). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>
- Rossi, A., Appelt-Menzel, A., Kurdyn, S., Walles, H., ve Groeber, F. (2015). Generation of a Three-dimensional Full Thickness Skin Equivalent and Automated Wounding. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (96), 52576. <https://doi.org/10.3791/52576>
- Russo, E. B. (2007). History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. *Chemistry ve Biodiversity*, 4(8), 1614-1648. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>
- Rusu, A., Farcaş, A.-M., Oancea, O.-L., ve Tanase, C. (2025). Cannabidiol in Skin Health: A Comprehensive Review of Topical Applications in Dermatology and Cosmetic Science. *Biomolecules*, 15(9), 1219. <https://doi.org/10.3390/biom15091219>
- Safferling, K., Sütterlin, T., Westphal, K., Ernst, C., Breuhahn, K., James, M., Jäger, D., Halama, N., ve Grabe, N. (2013). Wound healing revised: A novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. *The Journal of Cell Biology*, 203(4), 691-709. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212020>
- Sami, D. G., Heiba, H. H., ve Abdellatif, A. (2019). Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine*, 24(1), 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.12.001>
- Sangeetha, K., Albeshr, M. F., Shoba, K., Lavanya, G., Prasad, P. S., ve Sudha, P. N. (2024). Evaluation of cytocompatibility and cell proliferation of electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/montmorillonite clay scaffold with 1929 cell lines in skin regeneration activity and in silico molecular docking studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 268, 131762. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131762>
- Sangiovanni, E., Fumagalli, M., Pacchetti, B., Piazza, S., Magnavacca, A., Khalilpour, S., Melzi, G., Martinelli, G., ve Dell'Agli, M. (2019). Cannabis sativa L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury. *Phytotherapy Research: PTR*, 33(8), 2083-2093. <https://doi.org/10.1002/ptr.6400>
- Sanjarnia, P., Picchio, M. L., Polegre Solis, A. N., Schuhladen, K., Fliss, P. M., Politakos, N., Metterhausen, L., Calderón, M., ve Osorio-Blanco, E. R. (2024). Bringing innovative wound care polymer materials to the market: Challenges, developments, and new trends. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 207, 115217. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115217>
- Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.-J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H. C., Krächter, H.-U., Lehr, C.-M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., ... Weimer, M. (2008a). The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the

- validation study. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 36(2), 161-187.
<https://doi.org/10.1177/026119290803600207>
- Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.-J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H. C., Krächter, H.-U., Lehr, C.-M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., ... Weimer, M. (2008b). The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 36(2), 161-187.
<https://doi.org/10.1177/026119290803600207>
- Scheffer, I. E., Hulihan, J., Messenheimer, J., Ali, S., Keenan, N., Griesser, J., Gutterman, D. L., Sebree, T., ve Sadleir, L. G. (2021). Safety and Tolerability of Transdermal Cannabidiol Gel in Children With Developmental and Epileptic Encephalopathies: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Network Open*, 4(9), e2123930. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.23930>
- Schultz, G. S., Davidson, J. M., Kirsner, R. S., Bornstein, P., ve Herman, I. M. (2011). Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair and Regeneration*, 19(2), 134-148. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00673.x>
- Schultz, G. S., ve Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 17(2), 153-162. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., ve Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17), 4827-4833.
- Sermasaksasithorn, P., Nopsopon, T., Samuthpongton, C., Chotirosniramit, K., ve Pongpirul, K. (2025). Cannabis and cannabinoids in dermatology: A systematic review and meta-analysis of quantitative outcomes. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1609667. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1609667>
- Shah, P., Holmes, K., Chibane, F., Wang, P., Chagas, P., Salles, E., Jones, M., Palines, P., Masoumy, M., Baban, B., ve Yu, J. (2024a). Cutaneous Wound Healing and the Effects of Cannabidiol. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7137. <https://doi.org/10.3390/ijms25137137>
- Shah, P., Holmes, K., Chibane, F., Wang, P., Chagas, P., Salles, E., Jones, M., Palines, P., Masoumy, M., Baban, B., ve Yu, J. (2024b). Cutaneous Wound Healing and the Effects of Cannabidiol. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7137. <https://doi.org/10.3390/ijms25137137>
- Shakespeare, P. G. (2005). The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries. *Clinics in Dermatology*, 23(4), 413-418.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.015>

- Sharda, D., Kaur, P., ve Choudhury, D. (2023). Protein-modified nanomaterials: Emerging trends in skin wound healing. *Discover Nano*, 18(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03903-8>
- Sharpless, N. E., ve DePinho, R. A. (2004). Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(2), 160-168. <https://doi.org/10.1172/JCI20761>
- Shaw, T. J., ve Martin, P. (2009). Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(18), 3209-3213. <https://doi.org/10.1242/jcs.031187>
- Sheriff, T., Lin, M. J., Dubin, D., ve Khorasani, H. (2020a). The potential role of cannabinoids in dermatology. *Journal of Dermatological Treatment*, 31(8), 839-845. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1675854>
- Sheriff, T., Lin, M. J., Dubin, D., ve Khorasani, H. (2020b). The potential role of cannabinoids in dermatology. *Journal of Dermatological Treatment*, 31(8), 839-845. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1675854>
- Shishkov, V. V., Bikmulina, P. Y., Kardosh, A. V., Tsibulnikov, S. V., Grekova, E. V., Kolesova, Y. V., Zakharova, P. A., Nesterova, A. M., Alencar de Sena Pereira, F. D., Kotova, S. L., Olisova, O. Y., Vosough, M., Shpichka, A. I., ve Timashev, P. S. (2025). Advancing the in vitro drug screening models: Microbiome as a component of tissue-engineered skin. *Bioprinting*, 45, e00379. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2024.e00379>
- Sholler, D. J., Schoene, L., ve Spindle, T. R. (2020). Therapeutic Efficacy of Cannabidiol (CBD): A Review of the Evidence From Clinical Trials and Human Laboratory Studies. *Current Addiction Reports*, 7(3), 405-412. <https://doi.org/10.1007/s40429-020-00326-8>
- Simpson, D. M., ve Ross, R. (1972). The neutrophilic leukocyte in wound repair: A study with antineutrophil serum. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(8), 2009-2023. <https://doi.org/10.1172/JCI107007>
- Singer, A. J., ve Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, 341(10), 738-746. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>
- Singh, S., Young, A., ve McNaught, C.-E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford), Wound Management*, 35(9), 473-477. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.004>
- Skórkowska-Telichowska, K., Żuk, M., Kulma, A., Bugajska-Prusak, A., Ratajczak, K., Gąsiorowski, K., Kostyn, K., ve Szopa, J. (2010). New dressing materials derived from transgenic flax products to treat long-standing venous ulcers—A pilot study. *Wound Repair and Regeneration*, 18(2), 168-179. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00578.x>
- Small, E., ve Cronquist, A. (1976). A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis. *TAXON*, 25(4), 405-435. <https://doi.org/10.2307/1220524>

- Solinas, M., Massi, P., Cantelmo, A., Cattaneo, M., Cammarota, R., Bartolini, D., Cinquina, V., Valenti, M., Vicentini, L., Noonan, D., Albini, A., ve Parolaro, D. (2012). Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1218-1231. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02050.x>
- Stallmeyer, B., Kämpfer, H., Kolb, N., Pfeilschifter, J., ve Frank, S. (1999). The Function of Nitric Oxide in Wound Repair: Inhibition of Inducible Nitric Oxide-Synthase Severely Impairs Wound Reepithelialization. *Journal of Investigative Dermatology*, 113(6), 1090-1098. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00784.x>
- Stamm, A., Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., ve Pepelanova, I. (2016). In vitro wound healing assays – state of the art. *BioNanoMaterials*, 17(1-2), 79-87. <https://doi.org/10.1515/bnm-2016-0002>
- Strodtbeck, F. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 1(1), 43-52. <https://doi.org/10.1053/nbin.2001.23176>
- Styrczewska, M., Kostyn, A., Kulma, A., Majkowska-Skrobek, G., Augustyniak, D., Prescha, A., Czuj, T., ve Szopa, J. (2015). Flax Fiber Hydrophobic Extract Inhibits Human Skin Cells Inflammation and Causes Remodeling of Extracellular Matrix and Wound Closure Activation. *BioMed Research International*, 2015(1), 862391. <https://doi.org/10.1155/2015/862391>
- Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., ve Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PloS One*, 15(7), e0232565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>
- Suhail, S., Sardashti, N., Jaiswal, D., Rudraiah, S., Misra, M., ve Kumbar, S. G. (2019a). Engineered Skin Tissue Equivalents for Product Evaluation and Therapeutic Applications. *Biotechnology Journal*, 14(7), 1900022. <https://doi.org/10.1002/biot.201900022>
- Suhail, S., Sardashti, N., Jaiswal, D., Rudraiah, S., Misra, M., ve Kumbar, S. G. (2019b). Engineered Skin Tissue Equivalents for Product Evaluation and Therapeutic Applications. *Biotechnology Journal*, 14(7), 1900022. <https://doi.org/10.1002/biot.201900022>
- Supp, D. M., ve Boyce, S. T. (2005). Engineered skin substitutes: Practices and potentials. *Clinics in Dermatology*, 23(4), 403-412. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.023>
- Tassaneesuwan, N., Khongkow, M., Jansrinual, S., ve Khongkow, P. (2025). Discovering the Potential of Cannabidiol for Cosmeceutical Development at the Cellular Level. *Pharmaceuticals*, 18(2), 202. <https://doi.org/10.3390/ph18020202>
- Tatarusanu, S.-M., Lupascu, F.-G., Profire, B.-S., Szilagyi, A., Gardikiotis, I., Iacob, A.-T., Caluian, I., Herciu, L., Giscă, T.-C., Baican, M.-C., Crivoi, F., ve Profire, L.

- (2023). Modern Approaches in Wounds Management. *Polymers*, 15(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/polym15173648>
- Taylor, L., Gidal, B., Blakey, G., Tayo, B., ve Morrison, G. (2018). A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. *CNS Drugs*, 32(11), 1053-1067. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0578-5>
- Tiziana Cesetti vd. (2026, Nisan 2). *Advanced 3D spheroid-based skin models and deep-learning based image analysis enable in-depth investigation of keratinocyte differentiation and barrier function*. ResearchGate. <https://doi.org/10.64898/2026.01.21.700040>
- Tóth, K. F., Ádám, D., Bíró, T., ve Oláh, A. (2019a). Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the “C(ut)annabinoid” System. *Molecules*, 24(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/molecules24050918>
- Tóth, K. F., Ádám, D., Bíró, T., ve Oláh, A. (2019b). Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the “C(ut)annabinoid” System. *Molecules*, 24(5), 918. <https://doi.org/10.3390/molecules24050918>
- Ud-Din, S., ve Bayat, A. (2017). Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 25(2), 164-176. <https://doi.org/10.1111/wrr.12513>
- Velnar, T., Bailey, T., ve Smrkolj, V. (2009a). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Wegner J., Loser K., Apsite G., Nischt R., Eckes B., Krieg T., Werner S., Sorokin L. (2016). Laminin $\alpha 5$ in the keratinocyte basement membrane is required for epidermal–dermal intercommunication. *Matrix Biology*, 56, 24-41. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.05.001>.
- Weigelt, M. A., Sivamani, R., ve Lev-Tov, H. (2021). The therapeutic potential of cannabinoids for integumentary wound management. *Experimental Dermatology*, 30(2), 201-211. <https://doi.org/10.1111/exd.14241>
- Weimer, M.S.K., Bock U., Diembeck W., Düsing H.J., Gamer A., Ukomadu E. H. Hoffmann C., Kaca M., vd. (2008). The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study. (2008). *Alternatives to Laboratory Animals*. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290803600207>
- Werner, S., Krieg, T., ve Smola, H. (2007). Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), 998-1008. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700786>

- Wilkinson, H. N., ve Hardman, M. J. (2020). Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Yanez, M., Rincon, J., Dones, A., De Maria, C., Gonzales, R., ve Boland, T. (2015). In Vivo Assessment of Printed Microvasculature in a Bilayer Skin Graft to Treat Full-Thickness Wounds. *Tissue Engineering Part A*, 21(1-2), 224-233. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0561>
- Yao, S., Chi, J., Wang, Y., Zhao, Y., Luo, Y., ve Wang, Y. (2021). Zn-MOF Encapsulated Antibacterial and Degradable Microneedles Array for Promoting Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 10(12), 2100056. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100056>
- Yedikaya, Ö., ve Badıllı, F. U. (2021). İN VİTRO DERİ MODELLERİ. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45(3), 699-721. <https://doi.org/10.33483/jfpau.930099>
- Yun, M. H. (2015). Changes in Regenerative Capacity through Lifespan. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25392-25432. <https://doi.org/10.3390/ijms161025392>
- Zhang, D., Lai, L., Fu, H., Fu, Q., ve Chen, M. (2023). 3D-Bioprinted Biomimetic Multilayer Implants Comprising Microfragmented Adipose Extracellular Matrix and Cells Improve Wound Healing in a Murine Model of Full-Thickness Skin Defects. *ACS Applied Materials ve Interfaces*, 15(25), 29713-29728. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c21629>
- Zheng, M., Wang, X., Yue, O., Hou, M., Zhang, H., Beyer, S., Blocki, A. M., Wang, Q., Gong, G., Liu, X., ve Guo, J. (2021). Skin-inspired gelatin-based flexible bio-electronic hydrogel for wound healing promotion and motion sensing. *Biomaterials*, 276, 121026. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121026>
- Zhong, S. P., Zhang, Y. Z., ve Lim, C. T. (2010). Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5), 510-525. <https://doi.org/10.1002/wnan.100>
- Zoio, P., ve Oliva, A. (2022). Skin-on-a-Chip Technology: Microengineering Physiologically Relevant In Vitro Skin Models. *Pharmaceutics*, 14(3), 682. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030682>