

Leptinin Yara İyileşmesi Üzerine In Vitro Etkisinin Büyüme Faktörleri Üzerinden İncelenmesi

Investigation of The In Vitro Effect of Leptin on Wound Healing Through Growth Factors

Melike ÖZGÜL ÖNAL, Hülya ELBE, Gürkan YİĞİTTÜRK, Volkan YAŞAR, Feral ÖZTÜRK

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Muğla

Öz

Yara iyileşmesi; epitelyal, endotelial, mezenkimal ve inflamatuvar hücrelerin biraraya gelip, normal işlevlerini belirli bir sıra ve düzen içerisinde yerine getirmeleriyle karakterizedir. Leptin, ağırlıklı olarak yağ dokusundan salgılanan ve yara iyileşme süresini kısalttığı bilinen sitokin benzeri bir hormondur. Bu çalışmada; fibroblast hücrelerinde yara iyileşmesi modeli oluşturularak leptinin doz (100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL ve 800 ng/mL) ve süre (24 ve 48 saat) bağımlı etkilerinin in vitro yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Yara modeli oluşturulan hücreler üzerine artan dozlarda leptin uygulaması yapıldıktan 24 ve 48 saat sonra yara alanlarının kapanma oranları hesaplandı. Hücre canlılığını belirlemek amacı ile WST-1 analizi yapıldı. Crystal Violet boyaması ile fibroblast hücreleri morfolojik olarak incelendi ve FGFR2, KGF (FGF7), TGF- α , TGF- β 1 ve Ki67 ekspresyonlarını belirlemek için de immunositokimya (ICC) analizi yapılarak H-Skor değerleri hesaplandı. In vitro yara modeli analizinde fibroblast hücrelerinin en yüksek yüzde kapanma oranı ve WST-1 analizi ile en yüksek hücre canlılık yüzdesi 48 saat 800 ng/mL leptin uygulanan grupta tespit edildi. ICC sonucunda elde edilen H-Skor değerleri ise, değerlendirilen proteinlerin ekspresyonlarının fibroblast hücrelerinde leptin dozu ve süresine bağlı olarak arttığını gösterdi. Çalışma sonucunda fibroblast hücrelerinde leptinin in vitro yara iyileşmesini sağlayan en etkili dozunun 800 ng/mL olduğu belirlenmiştir. Ayrıca FGFR2, KGF (FGF7), TGF- α , TGF- β 1 ve Ki67 ekspresyonlarının leptin dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak hücrelerde arttığı ve en yüksek artışın en yüksek dozda ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının, yapılacak olan in vivo yara iyileşmesi araştırmalarında leptin kullanımına öncülük edeceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: FGFR2, KGF, Leptin, TGF, Yara İyileşmesi

Abstract

Wound healing is characterized by the epithelial, endothelial, mesenchymal and inflammatory cells come together and perform their normal functions in a certain order. Leptin is a cytokine-like hormone secreted predominantly from adipose tissue and known to shorten wound healing time. In this study, it is aimed to examine the dose (100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL and 800 ng/mL) and time (24 and 48h) dependent effects of leptin by in vitro methods by creating wound healing model in fibroblast cells. The closure rates of the wound areas were calculated 24 and 48h after the application of increasing doses of leptin. WST-1 analysis was performed to determine cell viability. Fibroblast cells were examined morphologically by Crystal Violet staining and immunocytochemistry (ICC) analysis was performed to determine FGFR2, KGF (FGF7), TGF- α , TGF- β 1 and Ki67 expressions, and H-Score values were calculated. In the in vitro wound healing model analysis, the highest percent closure rate of fibroblast cells and the highest cell viability percentage with WST-1 analysis were detected in the group that treated with 800 ng/mL leptin for 48 hours. The H-Score values obtained as a result of ICC showed that the expression of the evaluated proteins increased in fibroblast cells dose and time depended manner. As a result of the study, it was determined that the most effective dose of leptin in fibroblast cells for wound healing was 800 ng/mL in vitro. In addition, it was shown that FGFR2, KGF (FGF7), TGF- α , TGF- β 1 and Ki67 expressions increased in cells depending on the leptin dose and administration time, and the highest increase occurred at the highest dose. It is thought that the results of this study will lead to the use of leptin in in vivo wound healing model studies.

Keywords: FGFR2, KGF, Leptin, TGF, Wound Healing

Giriş

Yara yumuşak dokuların normal anatomik yapısının ve fonksiyonunun bozulması olarak tanımlanır (1). Yara yeri iyileşmesi ise travma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan fizyolojik, histolojik ve biyokimyasal bir süreçtir (2). Yara iyileşmesinde; epitelyal, endotelial, inflamatuvar hücreler, trombosit ve fibroblastlar

biraraya gelip, normal işlevlerini belirli bir sıra ve düzen içerisinde yerine getirirler (3). Yara iyileşmesi süreci temel olarak üç faza ayrılır. Bunlar; hemostaz/inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma/olgunlaşmadır (4). Bu fazların herhangi birinin bozulması ya da uzun sürmesi, yara iyileşmesinde gecikmeye ya da iyileşemeyen yaranın kronik hale gelmesine neden olmaktadır (5). Yapılan çalışmalar yara iyileşmesi sürecinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin yara iyileşmesinde etkin ve önemli rol oynadıklarını göstermiştir (6).

Büyüme faktörleri hücrelerin bölünmesi, migrasyonu, farklılaşması, protein ve enzim üretiminde rol alırlar. Büyüme faktörleri yara iyileştirici özelliklerini, angiogenezi ve hücresele çoğalmayı uyarmak yoluyla gösterirler. Bu nedenle büyüme faktörleri yara iyileşmesinin tüm evrelerinde önemli bir yere sahiptir (7). Yara iyileşmesinin proliferasyon evresinde, fibroblast göçü, kollajen sentezi, angiogenez ve granülasyon dokusu meydana gelir (8). Endotelial hücrelerin ve

	ORCID No
Melike ÖZGÜL ÖNAL	0000-0001-6710-5729
Hülya ELBE	0000-0002-1254-0683
Gürkan YİĞİTTÜRK	0000-0002-5315-253X
Volkan YAŞAR	0000-0003-3497-1238
Feral ÖZTÜRK	0000-0003-1207-5213

Başvuru Tarihi / Received: 21.01.2022
Kabul Tarihi / Accepted : 27.02.2023

Adres / Correspondence : Melike ÖZGÜL ÖNAL
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Muğla
e-posta / e-mail : melikeozgul@mu.edu.tr

fibroblastların proliferasyonundan, trombosit ve aktive olmuş makrofajlardan kaynaklanan büyüme faktörleri ve sitokinler sorumludurlar (9). İnflamatuvar hücrelerden salgılanan IL-1, TNF- α , PDGF, EGF, FGF özellikle TGF- β 1 ve TGF- β 2 fibroblastların yara bölgesine göçünü, çoğalmasını ve kollajen üretimini stimüle etmektedir (10). Günümüzde hücrel ve moleküler tekniklerin kullanılması ile yara iyileşmesinin hızlandırılabilceği bilinmektedir. Bilimsel çalışmalardaki ilerlemelere ve yara iyileşmesinin patofizyolojisinin aydınlatılmasına rağmen iyileşmeyen ya da aşırı iyileşen yaralar gibi komplikasyonlar veya tümörler gibi kontrolsüz büyüyen dokular ile ilgili mekanizmalar hâlâ tam olarak anlaşılmanmıştır (11). Yara iyileşmesi yaş, immunité, hormonal faktörler, enfeksiyon, diyabet, protein, vitamin, eser element eksiklikleri, kullanılan ilaçlar ve sistemik hastalıklar, çevre ısı ve sigara kullanımı gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir (12).

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) ve reseptörlerinin (FGFR'ler), yara iyileşmesi, anjiyogenez ve çoklu organ sistemlerinin gelişimi dahil olmak üzere çeşitli temel biyolojik süreçlerde kritik rol oynadığı bilinmektedir. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2), uygun büyüme faktörleri tarafından uyarıldığında hücrelerde doku tamiri için gerekli proteinlerin ekspresyonları meydana gelmektedir (13). Keratinosit büyüme faktörü (KGF), yara iyileşmesini destekleyen ve stromal fibroblastlar tarafından salgılanan bir büyüme faktörüdür. KGF, yara alanındaki dermal dokudan güçlü bir şekilde salgılanarak keratinosit hücrelerindeki reseptörüne bağlanır ve yara bölgesine hücre göçünü teşvik eder (14). Transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α); epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi üyelerinden erişkinde homeostazın korunması sırasında epitel gelişimini kontrol eden bir proteindir (15). Transforme edici büyüme faktörü-beta 1 (TGF- β 1)'in ise yara iyileşmesi, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve apoptoz süreçlerinin düzenleyicisi olduğu bilinmekte ve hemen hemen her hücre tipinden salgılanmaktadır (16). Ki67 ise hücre proliferasyon belirteci olarak kullanılan nükleer bir proteindir ve çoğalan hücrelerde Ki67 ekspresyonu artmaktadır (17).

Yağ dokusundan salgılanan sitokin benzeri bir protein olan leptin (tokluk hormonu), multifonksiyonel özelliği ile en çok araştırılan adipokinlerdendir (18). Leptin insanlarda yedinci kromozomun uzun kolunda bulunan ob/ob geni'nde kodlanmıştır (19, 20). Daha çok yağ dokusunda ve yağ dokusu miktarı ile orantılı olarak salgılanan leptin, daha az miktarda plasenta, mide epiteli, iskelet kası, hipofiz ve meme bezi gibi başka dokular tarafından da salgılanmaktadır (21-23). Leptin seviyesi inflamasyonda artmakta ve immün sistem üzerine olan etkileri dolayısıyla yara iyileşmesini de

etkilemektedir (24-25). Leptinin yara yeri iyileşme süresini kısalttığı ve anjiogenez arttırdığı tespit edilmiştir (26).

Bu çalışmada; fibroblast hücrelerinde yara modeli oluşturularak leptinin doza ve zamana bağlı etkilerinin FGFR2, KGF (FGF7), TGF- α , TGF- β 1 ve Ki67 ekspresyonları üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney Grupları

Bu çalışmada, leptin uygulamasının zamana ve doza bağlı etkisini ölçmek için kullanılacak İnsan Dermal Fibroblast (PCS-201-012) hücre hattı Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA)'ndan temin edildi. Fibroblast hücreleri; 2 mM L-Glutamin (HyClone, USA), %1 Penisilin/Streptomisin (Multicell) ve 10 mL Low Serum Growth Supplement (LSGS) (Gibco, USA) içerecek şekilde hazırlanan Medium 106 (Gibco, USA) besiyeri içerisinde ve 37°C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemli inkübatörde (MCO-18AC-PE, Panasonic) çoğaltıldı. Hücrelerin besiyerleri iki günde bir değiştirildi. Leptin (L4146, Sigma-Aldrich, USA) çözeltisinin hazırlanması aşamasında çözücü olarak steril saf su kullanıldı ve deney sırasında istenilen dozlarda dilüe edildi. Hücre kültür kaplarına ekilen hücreler gece boyu inkübe edildikten sonra kontrol grupları ve deney grupları oluşturuldu. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulaması yapılmadı.

Deney grupları; 1. Grup: Fibroblast hücreleri (kontrol grubu), 2. Grup: Fibroblast hücreleri + 100 ng/mL leptin, 3. Grup: Fibroblast hücreleri + 200 ng/mL leptin 4. Grup: Fibroblast hücreleri + 400 ng/mL leptin ve 5. Grup: Fibroblast hücreleri + 800 ng/mL leptin olacak şekilde oluşturuldu ve çalışmanın bulguları leptin uygulamalarının 24. ve 48. saatlerde incelendi.

In vitro Yara Modeli

Altı kuyucuklu kültür kabının kuyucuklarına ekilen hücreler gece boyu inkübe edildikten sonra in vitro yara modeli ve deney grupları belirlendi. Fibroblast hücrelerinin 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğunda oluşturduğu monolayer hücre tabakasının steril bir pipet ucu yardımıyla bir baştan öbür başa tek hamlede çizilmesiyle in vitro yara modeli oluşturuldu. Çizme işlemi sırasında kalkan hücreleri uzaklaştırmak için üstteki besi yeri alındı ve steril fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Lonza) ile yıkandıktan sonra uygun dozlarda leptin içeren taze besiyeri eklendi. Oluşturulan yara modeli invert mikroskopta (Zeiss Primovert), 10x büyütmede görüntüldü. Her kuyucuktan en az iki görüntü alındı ve 0.saat olarak kabul edildi. Deney düzeneği 37°C'de %5 CO₂'li atmosfer içeren inkübatörde hücre çoğalması için bırakıldı. Hem 24. saatte hem

de 48. saatte çizilmiş olan alanlar invert mikroskop ile 10x büyütme altında görüntülendi. Her kuyucuktan en az iki görüntü alındı. Alınan görüntüler Image J görüntü analiz programı kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla programda görüntünün tüm alanı ve yara alanları hesaplandı. Daha sonra Image J görüntü analiz programında hesaplanan değerler Microsoft Excel programına aktararak yara alanının toplam alan üzerinde işgal ettiği alan yüzde (%) olarak hesaplandı. Başlangıçtaki açık olan bölgelerin ne oranda hücrelerle kaplandığı yine Microsoft Excel kullanılarak % kapanma oranı olarak hesaplandı.

WST-1 Hücre Canlılık Analizi

Fibroblast hücreleri konfluent olduğunda, tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonu (Multicell) ile flasklardan kaldırılıp, 96 kuyucuklu kültür kaplarına 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde aktarıldı. Her kuyucuğa 100 µl farklı dozlarda leptin içeren taze besiyerleri uygulamaları yapıldı. 24. ve 48. saatlerde WST (Water-Soluble Tetrazolium Salt) ölçümleri gerçekleştirilmesi için süre sonunda her kuyucuğa WST solüsyonundan (Abbkine, China) 10 µl koyarak inkübatörde (37°C, %5 CO₂) 2 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası mikropilaka okuyucuda (SpectraMax i3, Molecular Devices) 450 nm absorbans ölçümü yapıldı. Deneyler en az üç tekrar olacak şekilde yapıldı. Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerleri %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Kontrole göre uygulama gruplarına ait absorbans değerleri yüzde (%) cinsinden oranlanarak canlılığı belirlendi. Microsoft Excel programı ile % hücre canlılık grafiği oluşturuldu.

Cresyl Violet Boyama Yöntemi

Yirmi dört kuyucuklu kültür kaplarında büyütülen fibroblast hücreleri konfluent hale gelip kültür kabını tamamen kapladıktan sonra belirlenen dozlarda leptin uygulaması yapıp 24 ve 48 saat bekledi. Bekleme süreleri tamamlandığında besiyerleri çekilerek hücreler iki kere steril PBS ile yıkandı ve %4'lük paraformaldehit (Carlo Erba, France) ile oda sıcaklığında 30 dakika fikse edildi. Fiksasyondan sonra distile su ile 5 dakika 3 kere yıkanan hücreler, distile su ile hazırlanan %0.1 Cresyl Violet (Carlo Erba, France) solüsyonu ile 10 dakika muamele edilerek boyandı. Takiben distile su ile 3 kez daha yıkanan lameller kültür kabından alınıp aköz kapatma maddesi (Invitrogen, USA) ile kapatıldı. Lameller Nikon Eclipse 80i (Japonya) ışık mikroskobu ve görüntü analiz sistemi ile değerlendirildi.

İmmünotokimyasal Analiz

Yirmi dört kuyucuklu kültür kabına 12 mm çapında steril yuvarlak lameller yerleştirildi. Çoğaltılan hücreler 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde yuvarlak lameller üzerine ekildi ve

hücrelerin yapışması için bir gece hücreler inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa artan dozlarda leptin içeren besiyerleri uygulandı. 24. ve 48. saatlerin sonunda kültür besiyeri uzaklaştırıldı ve steril PBS ile yıkanarak %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 30 dakika fikse edildi. Fiksasyondan sonra 3 kez 5 dakika PBS (ScyTek, USA) ile yıkandı. %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, USA) oda ısısında 5 dk uygulandıktan sonra, 3 defa PBS ile tekrar yıkama yapıldı. Permeabilizasyon için %0.1'lik Triton-X 100 (Biomatic, Canada) ile +4°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra 3 defa PBS ile tekrar yıkama yapıldı. 1 saat bloklama (ScyTek, USA) işleminden sonra yıkama yapmadan, 1:100 dilüsyon oranında PBS ile hazırlanan primer antikorlar anti-FGFR2 (E-AB-30646, Elabscience, China), anti-KGF (FGF7) (YID3053, Biont, China), anti-TGF- α (E-AB-33085, Elabscience, China), anti-TGF- β 1 (YID4953, Biont, China) ve anti-Ki67 (RB-9043-R7, NeoMarkers, USA) ile +4°C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikorlar biotin (30 dakika) (ScyTek, USA) ve ardından streptavidin (30 dakika) (ScyTek, USA) uygulandı. İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra 3 defa PBS ile yıkamalar yapıldı. Diaminobenedine (DAB) kromojeni (Thermo Scientific, USA) 3-6 dakika uygulanarak immunoreaktivitelerin görünürlüğü sağlandı. Daha sonra distile su ile en az 3 kez yıkanan hücreler Mayer'in hematoksileni (Beslab, Türkiye) ile 1 dakika zıt boyama yapıldıktan sonra distile su ile tekrar 3 kez yıkandı. Yıkanan lameller kültür kabından alınıp aköz kapatma maddesi (Invitrogen, USA) ile kapatıldı. İmmünoaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile kontrol boyamaları yapıldı. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar ve her grup 3 örnek olacak şekilde çalışıldı.

İmmün boyama uygulanmış lameller ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse 80i, Japonya) değerlendirildi. Lamellerdeki antikor ile işaretlenmiş alanlar X20'lik büyütmede yürütücü ve alan danışmanı tarafından kör olarak (gruplar bildirilmeden) incelendi. Hücrelerin boyanma yoğunluğu boyama yok (-)(0), hafif (1)(+), orta (2)(++) ve kuvvetli (3)(+++)) olarak skorlanarak reaktif olan hücre sayıları belirlendi ve skorlamadan sonra görüntü analiz sistemi ile kesitlerden fotoğraflar çekildi. Her grup için rastgele seçilmiş 3 alanda her 100 hücre içinde pozitif boyanan hücreler sayıldıktan sonra H-Skor değerleri hesaplandı. (H-Skor: $\sum P_i (i+1)$ (P_i: % pozitif boyanmış hücre sayısı; i: boyanma şiddeti).

İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda gerçekleştirilen bütün yöntemlere ait istatistiksel analizler GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı. Deney gruplarına ait sonuçlar "Two-Way ANOVA" istatistiksel testi ve

çoklu karşılaştırmalar için “Tukey’s multiple comparisons” testi kullanılarak kontrol grubuna göre değerlendirildi. Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

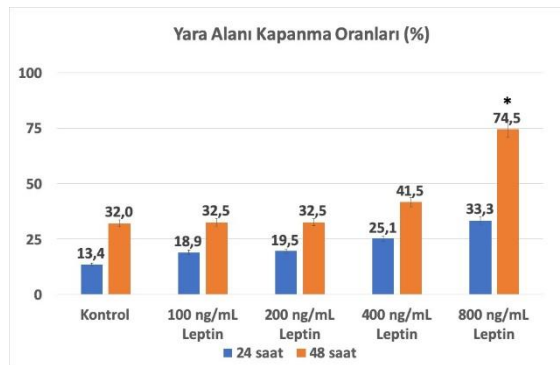
Bulgular

Leptinin In vitro Yara Modeli Üzerine Etkileri

Fibroblast hücrelerinin uygun koşullar altında çoğaltıldığında iğsi şekilli morfolojiye sahip oldukları ve üst üste gelecek şekilde büyüme eğilimi gösterdikleri gözlemlendi. Fibroblast hücreleri tek tabakalı olacak şekilde kültür kabını kapladıklarında steril pipet ucu yardımı ile oluşturulan yara alanları 0. saat, 24. saat ve 48. saat fotoğrafları çekilerek kapanma oranları hesaplandı ve her doza ve süreye ait değerler 0. saat yara alanına göre yüzde değerlerine dönüştürüldü. Kontrol grubuna göre 48 saat 800 ng/mL leptin uygulanan gruba ait yüzde yara alanı kapanma oranı istatistiksel anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 1, Resim 1 ve Resim 2).

Tablo 1. Leptin uygulamaları sonrasında sıfırıncı saate göre hesaplanan fibroblast hücrelerine ait yüzde yara alanı kapanma oranları (ortalama \pm standart sapma) (Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık: * $p < 0,05$).

Leptin Konsantrasyonu	Yara Alanı Kapanma Oranları (% , \pm SS)	
	24 saat	48 saat
Kontrol	13.4 \pm 2.5	32 \pm 2.4
100 ng/mL	18.9 \pm 6.1	32 \pm 5.1
200 ng/mL	19.5 \pm 5.9	32.5 \pm 7.9
400 ng/mL	25.1 \pm 0.4	41.5 \pm 4.7
800 ng/mL	33.3 \pm 11.6	74.0 \pm 6.4*



Resim 1. Leptin uygulamaları sonrasında fibroblast hücrelerine ait yüzde yara alanı kapanma oranları grafiği (Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık: * $p < 0,05$).

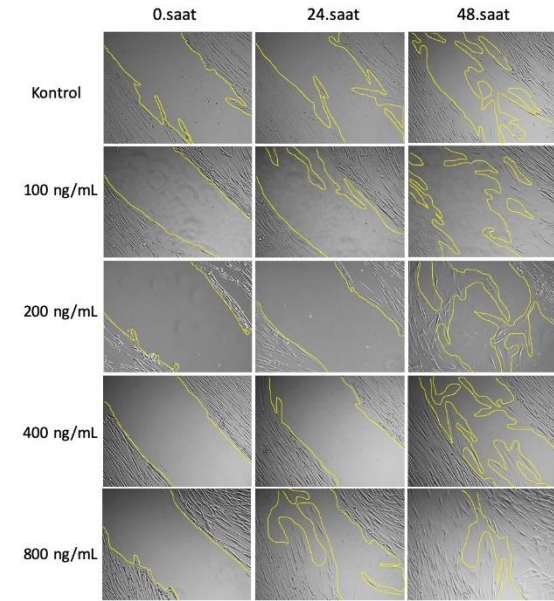
Leptinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Fibroblast hücrelerine 100, 200, 400 ve 800 ng/mL leptin uygulamaları yapıldıktan 24 ve 48 saat sonra gerçekleştirilen WST-1 hücre canlılık analizi sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde hücre canlılığı olarak hesaplandı. Doza ve süreye bağlı olarak leptin uygulamalarının fibroblast

canlılığını ve proliferasyonunu arttırdığı bulunduğ (p>0.05) (Tablo 2, Resim 3).

Leptinin Hücre Morfolojisi Üzerine Etkileri

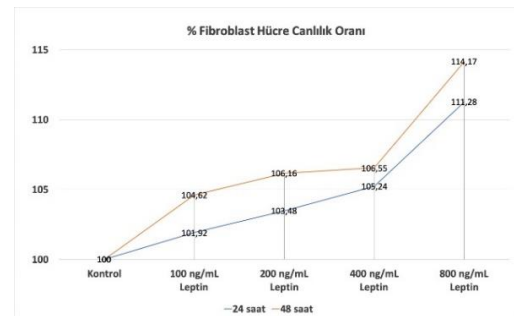
Cresyl Violet boyamaları sonucunda; fibroblast hücrelerinin iğsi şekilli morfolojilerinin farklı doz ve sürelerle sahip leptin uygulamaları ile değişmediği gözlemlendi ve bu sonuçlara göre hücrelerin deneysel uygulamalar sonucunda herhangi bir stres koşuluna maruz kalmadığı belirlendi (Resim 4).



Resim 2. Leptin uygulamaları sonrasında fibroblast hücrelerine ait yara alanı kapanma alanlarının inverted mikroskopik görüntüleri. Ölçek: 100 μ m.

Tablo 2. Fibroblast hücrelerinde farklı doz ve sürelerde leptin uygulamalarına ait yüzde hücre canlılık oranları.

Leptin Konsantrasyonu	Hücre Canlılığı (%)	
	24 saat	48 saat
Kontrol	100x ²	100
100 ng/mL	101.92	104.61
200 ng/mL	103.48	106.16
400 ng/mL	105.24	106.55
800 ng/mL	111.28	114.17



Resim 3. Fibroblast hücrelerinde leptin uygulamasının doza ve süreye bağlı WST-1 analiz grafiği.

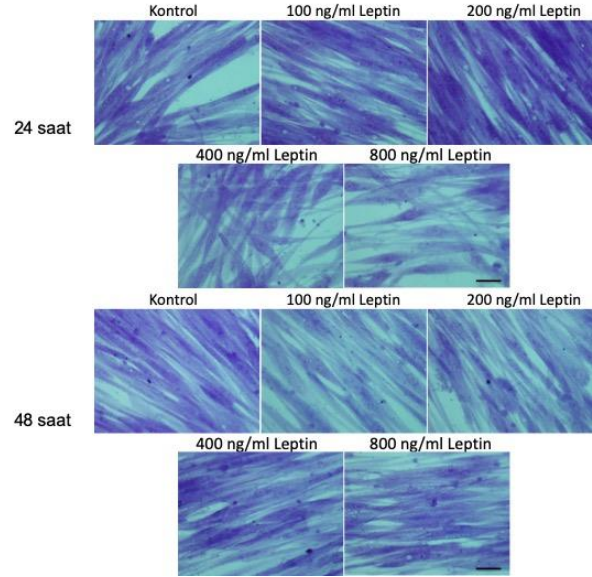
Leptinin FGFR2, KGF, TGF- α , TGF- β 1 ve Ki67 ekspresyonları üzerine etkileri

Fibroblast hücreleri üzerine 24 ve 48 saat leptin uygulamaları sonrasında hücreler immunositokimyasal olarak incelenmiştir (Resim 5-9). Elde edilen pozitif boyanan hücre boyanma şiddetleri kullanılarak her bir grup için H-Skor değerleri hesaplanarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 3, Resim 10).

Tartışma

Yara iyileşmesi, başta keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, immün hücreleri ve bunlarla ilişkili hücre dışı matriks olma üzere karmaşık hücreler arası etkileşimleri içerir. Yara iyileşmesi sürecinde, lokal ve kanla taşınan fibroblastlar çoğalarak yara granülasyon dokusunu oluşturmak için yara alanlarına göç ederler. Fibroblastlar çeşitli hücreler arası etkileşimlerinin etkisi altında yeni hücre dışı matriks (ECM) oluşumunu sağlarlar ve bazı fibroblastlar, yaranın kasılmasına yardımcı olmak için miyofibroblastlara farklılaşır (27). Leptin; enerji homeostazisi ve metabolizmanın fizyolojisi üzerinde önemli etkileri olan ve otokrin/parakrin düzenleyici olarak işlev gören adiipoz kökenli bir hormondur. Leptin'in birçok farklı doku üzerinde iyileştirici etkileri olduğu çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir (23). Büyüme faktörleri, hücre farklılaşması, hücre ölümü ve hücre

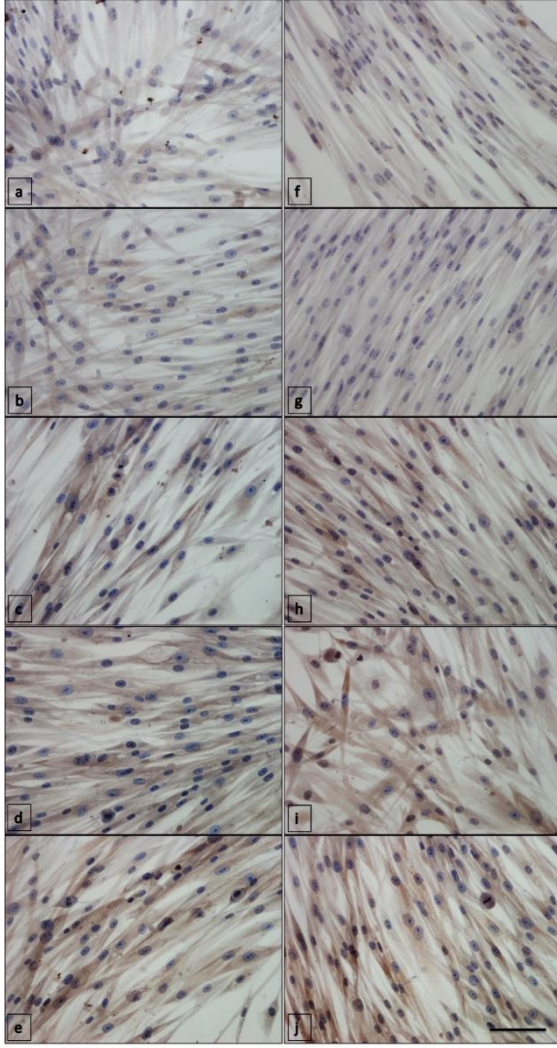
proliferasyonu gibi biyolojik aktiviteler için önemli sinyallerdir ve yara iyileşmesi sürecinde de hücreler ve hücre dışı matriks arasındaki etkileşimleri düzenlerler (6). Bu çalışmada leptin etkisinde çeşitli büyüme faktörlerinin ve büyüme faktörleri ile ilişkili proteinlerin fibroblast hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.



Resim 4. Artan dozlarda 24 ve 48 saat leptin uygulamaları sonrasında fibroblast hücrelerine ait Cresyl Violet fotoğrafları. Ölçek: 10 µm.

Tablo 3. Fibroblast hücrelerinin farklı doz ve sürelerde leptin uygulamaları sonrası immunositokimyasal analizi sonucunda hesaplanan H-Skor değerleri (ortalama \pm standart sapma) (Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

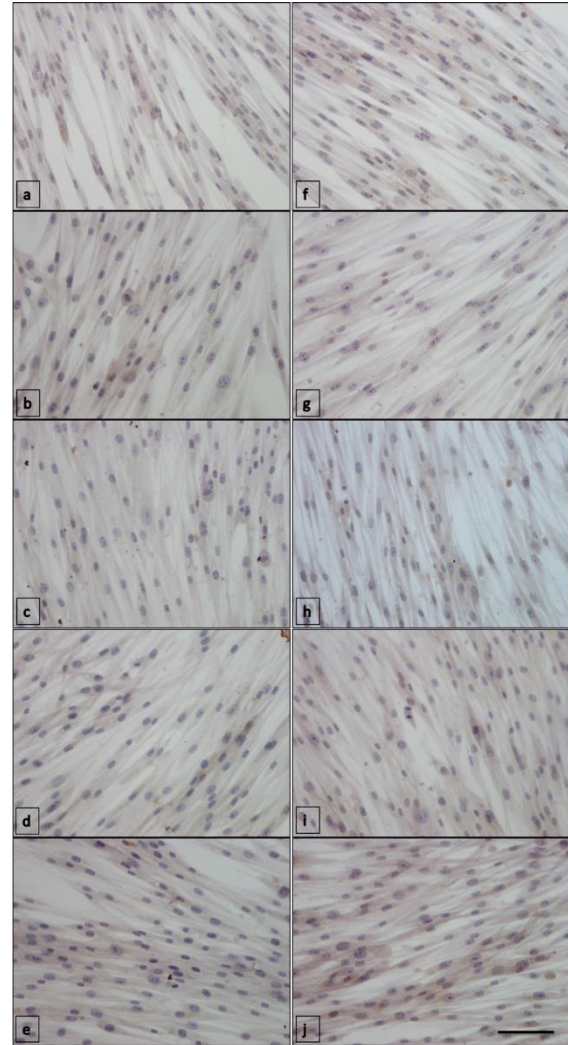
Antikor	Deney Grupları	H-Skor değerleri	
		24 saat	48 saat
FGFR2	Kontrol	254.2 \pm 18.86	227 \pm 7.58
	100 ng/mL Leptin	254.2 \pm 16.38	227 \pm 7.58
	200 ng/mL Leptin	298.6 \pm 4.16*	303.2 \pm 1.79**
	400 ng/mL Leptin	303.6 \pm 0.55*	306 \pm 5.34**
	800 ng/mL Leptin	304.2 \pm 2.28*	309.6 \pm 1.67**
KGF	Kontrol	199 \pm 2.92	204.6 \pm 1.14
	100 ng/mL Leptin	201.4 \pm 1.95	202.8 \pm 4.38
	200 ng/mL Leptin	193.2 \pm 14.03	203.8 \pm 0.84
	400 ng/mL Leptin	202 \pm 1	202.2 \pm 0.95
	800 ng/mL Leptin	201.2 \pm 1.304	209 \pm 2.24*
TGF- α	Kontrol	220 \pm 21.21	221 \pm 27.93
	100 ng/mL Leptin	237 \pm 19.88	241.8 \pm 8.59
	200 ng/mL Leptin	246 \pm 11.40*	247 \pm 10.96*
	400 ng/mL Leptin	290.2 \pm 20.44**	295 \pm 4.36**
	800 ng/mL Leptin	295.6 \pm 4.34**	302 \pm 7.58**
TGF- β 1	Kontrol	110 \pm 1.87	111 \pm 4
	100 ng/mL Leptin	116 \pm 1.58	118 \pm 4.74
	200 ng/mL Leptin	115 \pm 4.30	131.2 \pm 9.96*
	400 ng/mL Leptin	120.6 \pm 9.15**	131.8 \pm 7.98**
	800 ng/mL Leptin	149.8 \pm 7.16**	139.2 \pm 8.87**
Ki-67	Kontrol	108.2 \pm 3.83	107.4 \pm 1.52
	100 ng/mL Leptin	169.4 \pm 15.37**	164.4 \pm 28.57**
	200 ng/mL Leptin	171.6 \pm 21.56**	190.4 \pm 36.15**
	400 ng/mL Leptin	209.2 \pm 15.22***	216 \pm 42.64***
	800 ng/mL Leptin	259.4 \pm 60.62***	230.6 \pm 27.59***



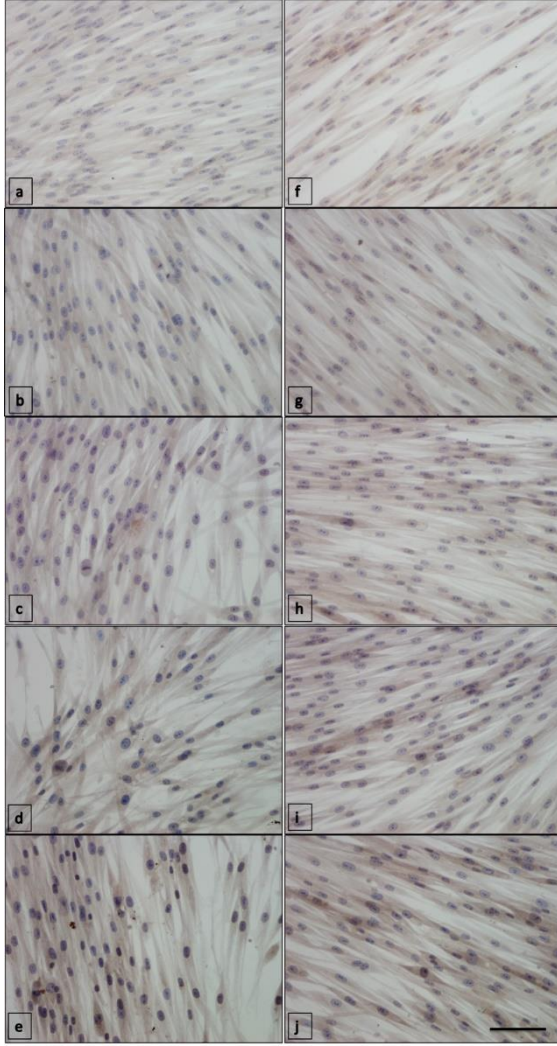
Resim 5. Fibroblast hücrelerinin FGFR2 dağılımları. Kontrol grubu 24 saat (a), 100 ng/mL leptin 24 saat (b), 200 ng/mL leptin 24 saat (c), 400 ng/mL leptin 24 saat (d), 800 ng/mL leptin 24 saat (e); kontrol grubu 48 saat (f), 100 ng/mL leptin 48 saat (g), 200 ng/mL leptin 48 saat (h), 400 ng/mL leptin 48 saat (i), 800 ng/mL leptin 48 saat (j). Ölçek: 20 µm.

Literatürde, leptin ve fibroblast hücreleri ile ilgili yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada leptinin insan gingival fibroblastlarında belirli matris metaloproteinazların ekspresyonunu ve salgılanmasını seçici olarak arttırdığı belirtilmektedir (28). Başka bir çalışmada ise dental pulpa fibroblastlarının leptin etkisinde IL-6 ve IL-8 üretimini arttırdıkları belirtilmiştir (29). In vitro yara iyileşmesi ve MTT metotları kullanarak leptinin (0, 10, 50, 100, 200, ve 400 ng/mL) etkilerini inceleyen başka bir çalışmada sıçan kütanöz fibroblast hücre proliferasyonunun ve kollajen sentezinin leptin tarafından desteklenebileceği ve leptinin cilt yaralarının iyileşmesinde rol oynayabileceğinin düşünüldüğü söylenmektedir (30). Ayrıca leptinin iyileştirici etkisinin doku onarımı sırasında neovaskülarizasyonu indüklemeye kabiliyetinin bir sonucu olabileceği de düşünülmektedir. Bu konuda

yapılan bir çalışmada FGF-2, TGF- α , TGF- β , TNF- α ve VEGF gibi çeşitli çözünür faktörlerin, yara dokusunda leptin tarafından indüklenebileceği bildirilmiştir (31). Çalışmamızda, in vitro yara modeli analizi ile fibroblast hücrelerinde en yüksek yüzde kapanma oranı 48 saat 800 ng/mL leptin uygulanan grupta tespit edildi ve WST-1 analizi ile de hücre canlılığının kontrol grubuna göre fibroblast hücrelerinde en yüksek canlılık oranının da aynı grupta olduğu belirlendi. Cresyl Violet boyamaları sonucunda fibroblast hücrelerinde çalışılan farklı doz ve sürelerle sahip leptin uygulamalarının hücreler üzerinde morfolojik değişikliklere sebebiyet vermediği de gösterildi.



Resim 6. Fibroblast hücrelerinin KGF dağılımları. Kontrol grubu 24 saat (a), 100 ng/mL leptin 24 saat (b), 200 ng/mL leptin 24 saat (c), 400 ng/mL leptin 24 saat (d), 800 ng/mL leptin 24 saat (e); kontrol grubu 48 saat (f), 100 ng/mL leptin 48 saat (g), 200 ng/mL leptin 48 saat (h), 400 ng/mL leptin 48 saat (i), 800 ng/mL leptin 48 saat (j). Ölçek: 20 µm.

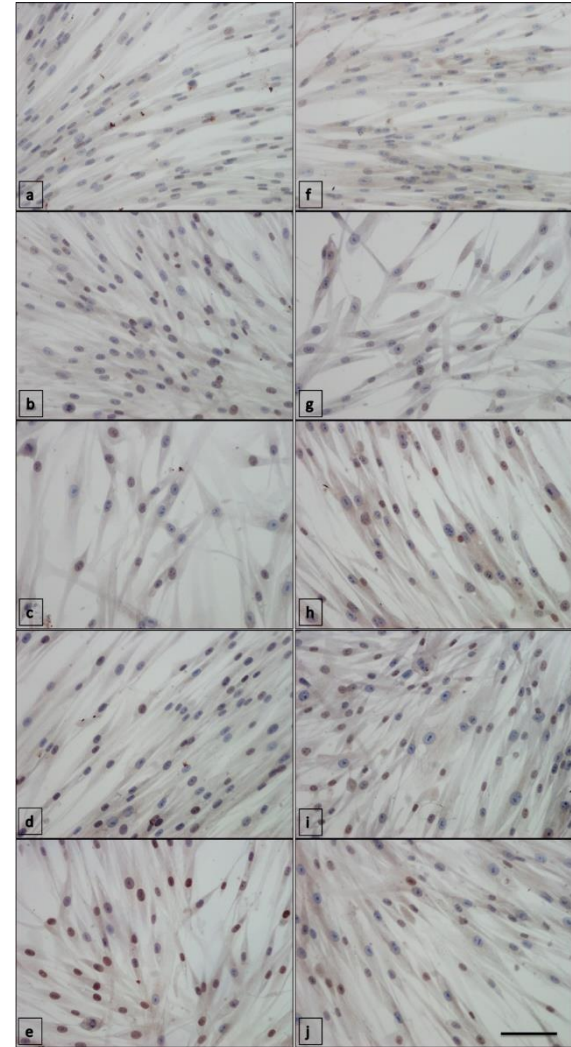


Resim 7. Fibroblast hücrelerinin TGF- α dağılımları. Kontrol grubu 24 saat (a), 100 ng/mL leptin 24 saat (b), 200 ng/mL leptin 24 saat (c), 400 ng/mL leptin 24 saat (d), 800 ng/mL leptin 24 saat (e); kontrol grubu 48 saat (f), 100 ng/mL leptin 48 saat (g), 200 ng/mL leptin 48 saat (h), 400 ng/mL leptin 48 saat (i), 800 ng/mL leptin 48 saat (j). Ölçek: 20 μ m.

FGFR ailesi, FGF ligandlarına bağlanarak aktivite gösteren dört yüksek oranda korunmuş transmembran tirozin kinaz reseptörü (FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4) içermektedir. FGFR'ler, ligandlara bağlandıktan sonra hücrelerde çoğalma, farklılaşma, hayatta kalma ve migrasyon yollarını aktive ederler (32). FGFR seviyelerinin kanser hücrelerinde değiştiği gösterilmiştir ve FGFR'lerin sinyal yollarında meydana gelen düzensizliklerin birçok kanserin ilerlemesinde anahtar rol oynadığı belirtilmektedir (33). FGFR2 geninin amplifikasyonunun veya mutasyonunun melanoma, akciğer kanseri, mide kanseri, endometriyal kanser, meme kanserinde görüldüğü bildirilmektedir (34-39). KGF (FGF7), FGFR2 için yüksek afiniteli bir ligandır (40). Fakat literatürde FGFR2 ile yara iyileşmesi ve fibroblastlar arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma

leptin varlığında fibroblast hücrelerinde ifade edilen FGFR2 seviyesinin doza ve süreye bağlı olarak arttığını gösteren ilk çalışma olmuştur.

KGF, epitel hücreleri üzerinde mitojenik etkileri olan oldukça spesifik bir sitokindir (41). İnsan deri hücrelerinde zayıf bir şekilde ifade edilirken, ekspresyonunun yaralanmalardan sonra kuvvetli bir şekilde yukarı doğru düzenlendiği ve yara iyileşmesinde anahtar bir faktör olduğu bildirilmektedir (42-43). Çalışmamızın sonuçları 800 ng/mL leptine 48 saat maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde KGF ifadesinin istatistiksel olarak arttığını göstermektedir.



Resim 8. Fibroblast hücrelerinin TGF- β 1 dağılımları. Kontrol grubu 24 saat (a), 100 ng/mL leptin 24 saat (b), 200 ng/mL leptin 24 saat (c), 400 ng/mL leptin 24 saat (d), 800 ng/mL leptin 24 saat (e); kontrol grubu 48 saat (f), 100 ng/mL leptin 48 saat (g), 200 ng/mL leptin 48 saat (h), 400 ng/mL leptin 48 saat (i), 800 ng/mL leptin 48 saat (j). Ölçek: 20 μ m.

TGF- α , doku rejenerasyonu ve kemik homeostazında rol oynadığı bilinen ayrıca kanser gelişimi de teşvik eden epidermal büyüme faktörü

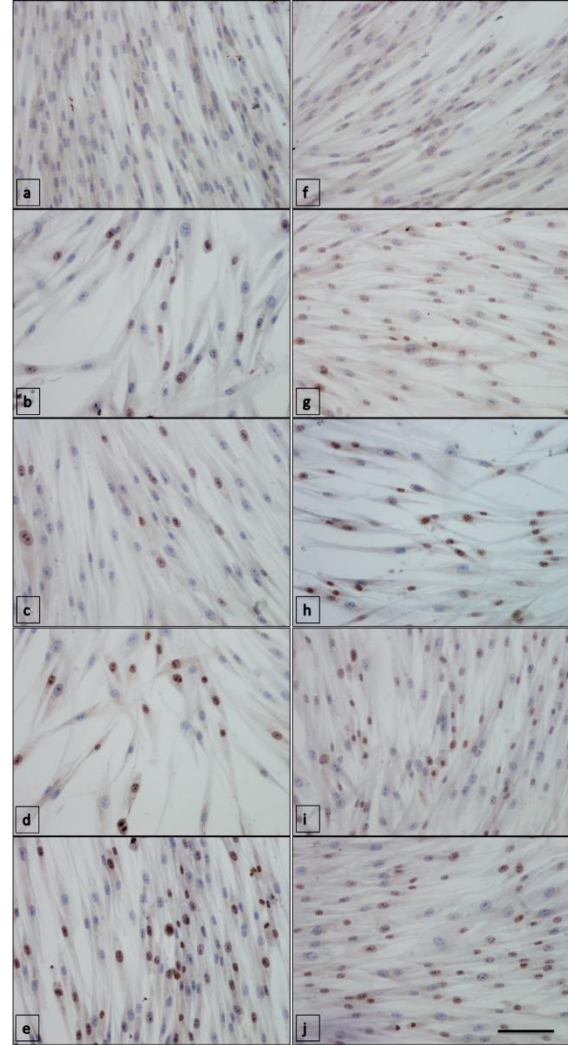
reseptörü (EGFR) için bir liganddır (44). Yüksek TGF- α seviyelerinin meme ve mide kanserleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (45). TGF- α 'nın embriyonik gelişim sırasında ve erişkin çağda homeostazın korunmasında hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve göçü gibi çoklu hücrel davranışlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Epitel hücreleri ile TGF- α gibi büyüme faktörlerinin aracılık ettiği stromal mezenkimal hücreler arasındaki çift yönlü etkileşim, doku onarımı sırasında morfogenezde önemli rol oynamaktadır (46). Bununla birlikte, TGF- α 'nın yara iyileşmesi sırasında fibroblast hücrelerinde ifade edilmediği belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışma artan süre ve dozlarda leptin uygulamasının fibroblast hücrelerinde TGF- α ekspresyonunu artırdığını göstermektedir.

TGF- β 1, yara iyileşme süreci boyunca önemli bir büyüme faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Ana depolama yeri trombositlerdir ve yaralanmaya akut yanıt sırasında ani TGF- β 1 salınımı gerçekleştirilerek, yara alanına makrofaq ve fibroblast kemotaksisini sağlarlar (47). TGF- β 1'in fibroblast hücrelerini uyurarak kollajen sentezini artırdığı (47) ve keratinositlerin migrasyonunu artırarak yeniden epitelizasyonu sağladığı bilinmektedir (48). Buna rağmen, literatürde leptin etkisinde TGF- β 1 ekspresyonunun kültür ortamındaki fibroblast hücrelerindeki değişimi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızın sonuçları fibroblast hücrelerinin artan dozlarda leptine maruz bırakılmasının hücrelerde TGF- β 1 artışına neden olduğu belirlemiştir.

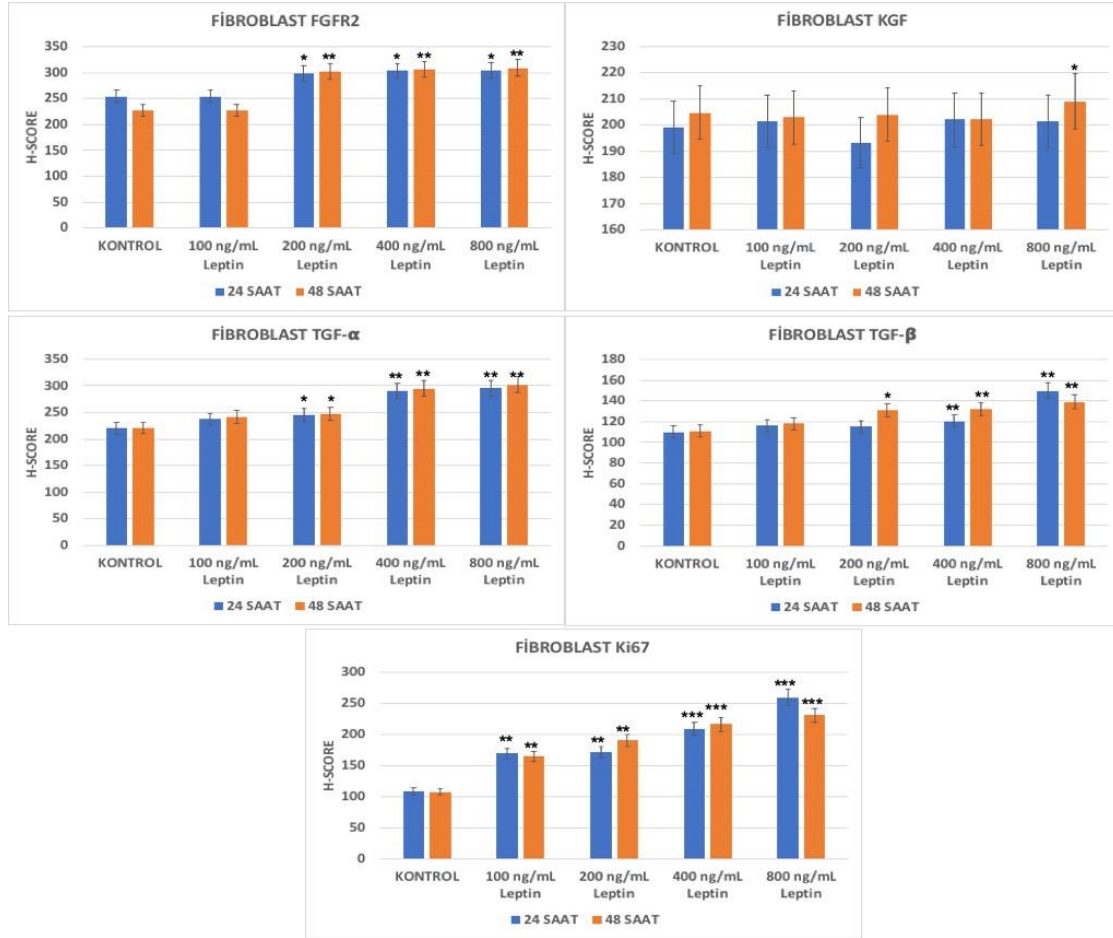
Yara iyileşmesi sürecinde artan hücre proliferasyonu, genel olarak iyileşmenin çok önemli bir basamağıdır ve Ki-67 proteini hücre büyümesinin bir göstergesi olduğundan bu hücrel olayın önemli bir belirteçidir (49). Çalışmamızda leptin uygulaması yapılan bütün gruplarda doza ve süreye bağlı olarak doğrusal bir şekilde anlamlı Ki-67 artışına sebep olduğu belirlenerek kültür ortamında leptin uygulamasının fibroblast hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu artış hücre in vitro yara modeli ve hücre proliferasyon analizi bulguları ile de uyumlu sonuçlar sergilemektedir.

Çalışmamızda fibroblast hücrelerinde leptinin in vitro yara iyileşmesini sağlayan en etkili dozunun 800 ng/mL olduğu belirlenmiştir. Ayrıca TGF- α , TGF- β 1, KGF, FGFR2 ve Ki67 ekspresyonlarının

leptin dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak hücrelerde arttığı ve hem 24 hem de 48. saatlerde en yüksek artışın 800 ng/mL leptin uygulanan dozda ortaya çıktığı gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçlarının hem in vitro hem de in vivo yara modeli çalışmalarında leptin kullanımına dikkat çekeceğini düşünmekteyiz.



Resim 9. Fibroblast hücrelerinin Ki-67 dağılımları. Kontrol grubu 24 saat (a), 100 ng/mL leptin 24 saat (b), 200 ng/mL leptin 24 saat (c), 400 ng/mL leptin 24 saat (d), 800 ng/mL leptin 24 saat (e); kontrol grubu 48 saat (f), 100 ng/mL leptin 48 saat (g), 200 ng/mL leptin 48 saat (h), 400 ng/mL leptin 48 saat (i), 800 ng/mL leptin 48 saat (j). Ölçek: 20 μ m.



Resim 10. Fibroblast hücrelerinin H-Skor değerlerine (ortalama ± standart sapma) ait grafikler. (Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Etik Kurul Onayı: Çalışmamızda ticari insan hücre hattı kullanılmıştır, etik kurul onayına gerek yoktur.

Kaynaklar

- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-9.
- Monavarian M, Kader S, Moeinzadeh S, et al. Regenerative scar-free skin wound healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25(4):294-311.
- Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: A cellular perspective. *Physiol Rev.* 2019;99(1):665-706.
- Yazar H, Karaca İ. Yumuşak dokuda yara iyileşmesi, etkileyen faktörler ve skar revizyonu. *Atatürk Üniv Dış Hek Fak Derg.* 2016;15:152-161.
- Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2006;89:219-29.
- Smith PC, Martínez C, Cáceres M, et al. Research on growth factors in periodontology. *Periodontology.* 2015;67:234-50.
- Steefos HH. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1994;28:95-105.
- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;1:283-9.
- Bonifant H, Holloway S. A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. *Br J Community Nurs.* 2019;24(Sup3):S28-33.
- Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
- Ethridge RT, Leong M, Philips LG. *Sabiston Textbook of Surgery: 19 ed.* Philadelphia: 2008. p. 191-216.
- Gilliver SC, Ashcroft GS. Sex steroids and cutaneous wound healing: the contrasting influences of estrogens and androgens. *Climacteric.* 2007;10:276-88.
- Hatch NE, Hudson M, Seto ML, et al. Intracellular retention, degradation, and signaling of glycosylation-deficient FGFR2 and craniosynostosis syndrome-associated FGFR2C278F. *J Biol Chem.* 2006;281(37):27292-305.
- Muhammed I, Sproul EP, Ligler FS, et al. Fibrin nanoparticles coupled with keratinocyte growth factor enhance the dermal wound-healing rate. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(4):3771-80.
- Zhang L, Yuan Y, Yeh LK, et al. Excess transforming growth factor- α changed the cell properties of corneal epithelium and stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(8):20.
- Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen.* 2016;24(2):215-22.
- Graefe C, Eichhorn L, Wurst P, et al. Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation. *Mol Biol Rep.* 2019;46(4):4631-43.
- Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* 2003;3:05-713.
- Friedman JM. Role of leptin and its receptors in the control of body weight. In: (Blum WF, Kiess W & Rascher W eds.) *Leptin-the voice of adipose tissue.* Johann Ambrosius Barth Verlag, Germany;1997;3-22.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, et al. Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269:546-9.

21. Maffei M, Fei H, Lee GH, et al. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:6957-60.
22. Sinha MK. Human leptin: the hormone of adipose tissue. *Eur J Endocrinol*. 1997;36:461-4.
23. Muoio DM, Lynis Dohm G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002;16:653-66.
24. Lord GM, Matarese G, Howard JK, et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394:897-901.
25. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68(4):437-46.
26. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil H.A. Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniv Tıp Fak Derg*. 2004;30:113-8.
27. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015;173(2):370-8.
28. Williams RC, Skelton AJ, Todryk SM, et al. Leptin and pro-inflammatory stimuli synergistically upregulate MMP-1 and MMP-3 secretion in human gingival fibroblasts. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148024.
29. Wei L, Chen Y, Zhang C, et al. Leptin induces IL-6 and IL-8 expression through leptin receptor Ob-Rb in human dental pulp fibroblasts. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(3):205-12.
30. Li P, Jin H, Liu D, et al. Study on the effect of leptin on fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro in rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005;19(1):20-2.
31. Murad A, Nath AK, Cha ST, et al. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J*. 2003;17(13):1895-7.
32. Carter EP, Fearon AE, Grose RP. Careless talk costs lives: fibroblast growth factor receptor signalling and the consequences of pathway malfunction. *Trends Cell Biol*. 2015;25(4):221-33.
33. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(2):116-29.
34. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, et al. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(4):727-32.
35. Davies H, Hunter C, Smith R, et al. Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res*. 2005;65(17):7591-5.
36. Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene*. 2007;26(50):7158-62.
37. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet*. 2007;39(7):870-4.
38. Gartside MG, Chen H, Ibrahim OA, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res*. 2009;7(1):41-54.
39. Carter JH, Cottrell CE, McNulty SN, et al. FGFR2 amplification in colorectal adenocarcinoma. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2017;3(6):a001495.
40. Knights V, Cook SJ. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*. 2010;125(1):105-17.
41. Chen B, Kao HK, Dong Z, et al. Complementary effects of negative-pressure wound therapy and pulsed radiofrequency energy on cutaneous wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg*. 2017;139(1):105-17.
42. Beer HD, Gassmann MG, Munz B, et al. Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):34-9.
43. Wang LL, Zhao R, Liu CS, et al. A fundamental study on the dynamics of multiple biomarkers in mouse excisional wounds for wound age estimation. *J Forensic Leg Med*. 2016;39:138-46.
44. Xian CJ. Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocr Rev*. 2007;28(3):284-96.
45. Sun J, Cui H, Gao Y, et al. TGF- α overexpression in breast cancer bone metastasis and primary lesions and TGF- α enhancement of expression of pro-cancer metastasis cytokines in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6565393.
46. Zhang L, Yuan Y, Yeh LK, et al. Excess transforming growth factor- α changed the cell properties of corneal epithelium and stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(8):20.
47. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen*. 2016;24(2):215-22.
48. Peplow PV, Chatterjee MP. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine*. 2013;62:1-21.
49. Pereira Beserra F, Sérgio Gushiken LF, Vieira AJ, et al. From inflammation to cutaneous repair: Topical application of lupeol improves skin wound healing in rats by modulating the cytokine levels, NF- κ B, Ki-67, growth factor expression, and distribution of collagen fibers. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):4952.