

Hidrojen Sülfid Donörü Sodyum Hidrojen Sülfür'ün *In Vitro* Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Aysun ÖZBAY ÖNAL¹, Mustafa ÖNAL²

¹ İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Yara iyileşmesi sürecinde büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri mevcuttur. Gazotransmitterler yara iyileşme sürecinde etkinliği gösterilmiş sinyal molekülleridir. Gazotransmitter ailesinin bir üyesi olan H₂S'in in vivo çalışmalarda yara iyileşmesinde düzenleyici bir molekül olarak görev aldığı bildirilmektedir. H₂S'in yara iyileşme sürecinde çeşitli sinyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla indirekt etkisinin olduğu görülmektedir. Bu çalışmada H₂S'in indirekt etkisinden ziyade direkt etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu bağlamda H₂S donörü olan NaHS'in in vitro yara iyileşmesinde fonksiyon gösteren çeşitli genlerin ekspresyon düzeylerine olan etkisi değerlendirilmiştir. İmmortalize insan keratinosit hücreleri 50µg, 25µg, 10µg, 5µg, 1µg konsantrasyonda NaHS ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiş ve MTS analizi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. TGF-β1, TGF-β3, VEGF ve K17 gen ifadelerindeki değişimler qRT-PCR yöntemiyle belirlenerek elde edilen veriler ΔΔCT metodu ile hesaplanmıştır. Hücre canlılığı açısından farklı konsantrasyonlarda uygulanan NaHS'in 1µg'lık dozunun toksik olmayan doz olduğu belirlenmiştir. NaHS uygulamasının K17 mRNA ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırırken TGF-β1, TGF-β3 ve VEGF ekspresyonunda anlamlı değişikliğe yol açmadığı saptanmıştır. NaHS'in in vitro yara iyileşmesi üzerine direkt etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: H₂S, NaHS, Yara iyileşmesi.

Investigation of the Effect of Hydrogen Sulfide Donor Sodium Hydrogen Sulfide on *In Vitro* Wound Healing

ABSTRACT

In the wound healing process, various biological activities such as cell proliferation, cell differentiation, and cell death are mediated by growth factors. Gasotransmitters are signaling molecules that have been shown to be effective in the wound healing process. H₂S, a member of the gasotransmitter family, is reported to function as a regulatory molecule in wound healing in in vivo studies. The indirect effect of H₂S in the wound healing process is observed through the activation of various signaling pathways. This study investigates whether H₂S has a direct effect rather than an indirect effect. In this context, the impact of NaHS, an H₂S donor, on the expression levels of various genes involved in in vitro wound healing has been evaluated. Immortalized human keratinocyte cells were incubated with NaHS at concentrations of 50 µg, 25 µg, 10 µg, 5 µg, and 1 µg for 24, 48, and 72 hours and cell viability was determined by MTS analysis. Changes in the expression of TGF-β1, TGF-β3, VEGF and K17 genes were determined using qRT-PCR, and the data were calculated using the ΔΔCT method. In terms of cell viability, it was determined that the 1µg dose of NaHS is a non-toxic dose. While NaHS application significantly increased K17 mRNA expression, it didn't cause significant changes in TGF-β1, TGF-β3 and VEGF expression. It was concluded that NaHS doesn't have a direct effect on in vitro wound healing.

Keywords: H₂S, NaHS, Wound healing.

Geliş Tarihi: 14.Kasım.2023

Kabul Tarihi: 13.Aralık.2023

Aysun ÖZBAY ÖNAL
İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Beşyol, İnönü Cd. No:38, 34295,
Küçükçekmece
İstanbul
Tel: 0531 212 83 82
E-posta: ozbaysun@gmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:

Aysun ÖZBAY ÖNAL: 0000-0003-4904-316X
Mustafa ÖNAL: 0000-0003-4703-856X

Yara, canlı bir dokunun anatomik ve işlevsel bütünlüğünün bozulması sonucu mevcut fizyolojik faaliyetlerinin ortadan kalktığı bir durumdur. Yara iyileşmesi, çeşitli sebeplerden ötürü yaralanmanın hemen ardından başlayan fizyolojik, biyokimyasal ve hücrel olaylar ile doku bütünlüğünün yeniden kazanıldığı bir süreçtir.

Yara iyileşme sürecinde keratinosit, fibroblast, endotel, makrofaj ve trombositler gibi çeşitli hücreler görev almaktadır. Bu süreçte doku bütünlüğünün onarımı 3 aşamada gerçekleşir: 1) hemostaz ve inflamasyon 2) proliferasyon, 3) maturasyon ve dokunun yeniden yapılanması¹. Hemostatik süreçte, vasküler kontraksiyon, trombosit tıkaçı oluşumu,

fibrin oluşumu ve fibrinolizis olmak üzere 4 ana mekanizma işlemektedir. Hemostazı takiben artmış vasküler geçirgenlik, kemotaktik faktörlerin salınımı ile hücrelerin yara bölgesine göçü, sitokin ve büyüme faktörlerinin ortama salınması ve göç eden hücrelerin aktive olmasıyla inflamasyon başlar. İnterlökin-1 (IL-1), Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) salınımı nötrofillerin göçünü uyarır. Keratinositlerde, makrofaj kemoatraktan proteini (MCP-1) indüklenir. Makrofajların yara alanına gelmesiyle Matris Metalloproteinaz-1,2,3 ve 9 (MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MMP-9) proteazları salgılanır. Beraberinde makrofajlar TGF- β , Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) ile hücre proliferasyonunu, matris sentezini ve anjiyogenezi sağlar. Lenfositler yara en son infiltrat olmakla birlikte, interlökin-2 (IL-2) ekspresyone ederek fibroblastların aktivasyonunda rol oynar. Proliferasyon evresi; fibroblast göçü, kollajen sentezi, anjiyogenezis ve epitelizasyondan oluşur. Doku devamlılığının tekrardan sağlandığı bu evrede trombositler ve aktive makrofajlar tarafından salgılanan sitokinler ve büyüme faktörlerinin etkisiyle yara bölgesindeki fibroblast ve endotel hücreleri çoğalır. Endotel hücrelerinin çoğalması anjiyogenezi başlatır. Matürasyon ve dokunun yeniden yapılandırıldığı son evrede ise kollajen birikimi gerçekleşir. Yara bölgesinde sentezlenen fibronektin ve tip 3 kollajen erken matris iskeletini oluşturur. Ardından glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar matris bileşenlerini oluşturur. Tip 1 kollajen ise son matristir. Yeniden yapılanma sürecinde aşırı sentezlenen kollajenin metalloproteinazlar tarafından yıkımı gerçekleşir. Kollajen sentezi ve yıkımı dengeye ulaşır. İç içe geçmiş olan bu evrelerde bir aşamadan diğerine ilerleme, inflamatuvar araçlar (sitokinler, büyüme faktörleri, proteazlar vb.), gazotransmitterler (nitrik oksit ve hidrojen sülfid) ve hücre elementleri tarafından düzenlenmektedir².

Hidrojen sülfid (H₂S), nitrik oksit (NO) ve karbon monoksitle (CO) birlikte gazotransmitter ailesinin üçüncü üyesidir. Fizyolojik olarak H₂S, 3 enzim; sistiyonin-gama-liyaz (CSE), sistiyonin-beta-sentaz (CBS) ve 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz (3-MST) tarafından katalize edilen reaksiyonlarda amino asit L-sisteinden üretilir³. H₂S, fizyolojik koşullarda üçte biri ayrılmamış, üçte ikisi hidrojen iyonu (H⁺) ve hidrojen sülfid (HS⁻) iyonu şeklinde ayrılmış halde bulunur. Deneysel çalışmalarda gaz halinde bulunan H₂S'in kullanılabilirliğini kolaylaştırmak amacıyla katı formda H₂S donörleri üretilmiştir. NaHS (sodyum hidrojen sülfür) ve Na₂S (sodyum sülfid) biyolojik çalışmalarda en sık kullanılan sülfid tuzlarıdır ve donör olarak adlandırılmaktadır. NaHS fizyolojik koşullarda Na⁺ ve HS⁻ olarak ayrışır ve HS- ortamdaki H⁺ ile birleşerek H₂S oluşur. Bu nedenle

NaHS iyi bir H₂S donörü olarak kabul edilmektedir. Sentetik donörlerle kıyaslandığında NaHS fosfat tamponunda 10 saniyede serbestleşir. Ayrıca konsantrasyon açısından bakıldığında NaHS 40 kat daha fazla konsantrasyona sahiptir⁴.

H₂S'in vazodilatasyon, kardiyomiyositlerde ve vasküler endotel hücrelerde apoptozun inhibisyonu, anjiyogenezi uyarma, anti-inflamatuvar etki ve oksidatif strese bağlı doku hasarını hafifletme gibi birçok fizyolojik aktivitesi bulunmaktadır^{5,6}. Bununla birlikte H₂S'in yara iyileşmesinde düzenleyici bir molekül olduğu görülmektedir. Özellikle CSE'nin yara sürecinde önemli olan damar sistemindeki H₂S üretiminde rol oynayan ana enzim olduğu görülmektedir. H₂S'in mide ülseri iyileşmesini ve derideki yanık yaralarının iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmektedir^{7,8}. H₂S'in diyabetik yara dokusundaki endotel progenitor hücrelerin (EPC) bozulmuş olan fonksiyonlarını düzelttiği de bildirilmektedir⁹. Bununla birlikte H₂S salınan hidrojenlerin diyabetik yara iyileşmesinde inflamasyonu azalttığı, anjiyogenezi ve kollajen birikimini stimüle ederek yara iyileşmesini hızlandırdığı ortaya konulmuştur¹⁰. Ayrıca H₂S gazının inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını baskıladığı, anjiyogenezi uyardığı, kutanöz yaraların in vivo iyileşme sürecini hızlandırdığı bildirilmektedir¹¹. H₂S'in yara iyileşmesinde rol oynayan VEGF ve TGF- β gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu modüle edebildiği çalışmalarda ortaya konulmuştur¹²⁻¹⁵.

Yara iyileşme sürecinde, VEGF ekspresyonunun izlenmesi anjiyojenik tepkinin anlaşılmasına imkan sağlar. Anjiyogenez yara bölgesine besin ve oksijen sağlanması, hücre proliferasyonu ve göçünün desteklenmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte TGF-beta ailesi üyeleri de hücre göçünü, hücre dışı matris birikimini ve genel doku onarımını etkiler¹⁶. Diğer yandan K17 ekspresyonunun incelenmesi, yara kapanması sırasında epidermisteki ana hücre türü olan keratinositlerin aktivasyonunun ve göçünün değerlendirilmesine yardımcı olur¹⁷. Dolayısıyla in vivo çalışmalarda H₂S'in yara iyileşmesinde ki indirekt etkileri göz önüne alındığında, bu çalışmada; in vitro yara modelinde H₂S donörü olan NaHS'in yara iyileşmesinde fonksiyon gösteren çeşitli genlerin (TGF- β 1, TGF- β 3, VEGF ve K17) ekspresyon düzeylerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

Immortalize insan keratinosit hücreleri (HaCaT) Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden temin edilmiştir. Hücreler %10 FBS (Gibco, A.B.D), %1 antibiyotik antimikotik (penisilin, streptomisin, amfoterisin) (Gibco, A.B.D) içeren

NaHS'in in Vitro Yara İyileşmesine Etkisi

yüksek glikozlu DMEM (Gibco, A.B.D) besiyeri ile çoğaltılarak %5 CO₂ içeren nemli ortamdaki 37 °C'lik inkübatörde kültüre edilmiştir.

Ticari olarak satın alınan NaHS (Sigma-Aldrich, USA) serum fizyolojik içerisinde 250 µg/mL olacak şekilde hazırlanmış olup, 0.22 µm filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

Sitotoksikite Testi

NaHS'in hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla, hücreler 96 kuyucuklu mikrolakalara 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde 100 µl besiyeri içerisinde ekim yapılmıştır. Hücrelerin mikrolakaya yüzeyine tutunabilmesi için ekim yapılan mikrolakalar 24 ± 2 saat süre ile inkübatörde (37 °C'de %5 CO₂) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılıp, son hacim 100 µl olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NaHS (50µg, 25µg, 10µg, 5µg, 1µg) kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol grubundaki hücreler %20'lik DMSO ile, negatif kontrol grubundaki hücreler sadece besiyeri ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonların ardından hücre canlılığı MTS testi [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, Promega, A.B.D] ile ölçülmüştür. Toz halinde bulunan MTS'nin stok solüsyonu (5mg/ml) PBS içerisinde hazırlanmıştır. Stok MTS solüsyonu PBS/Glikoz ile 1:10 oranında seyreltilerek son hacim 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. İki saatlik inkübasyonun ardından (37 °C'de %5 CO₂) mikrolakalar 490 nm dalga boyunda mikrolakaya okuyucu (BioRad, A.B.D) ile ölçülmüştür. Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

In vitro Yara Modeli Oluşturma

Yara modeli NaHS'in direkt olarak yara kapanması üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılmıştır. Hücreler 1x10⁶ olacak şekilde 6 kuyucuklu plakaya ekilmiş olup, tutunmaları için 24 saat inkübatörde (37 °C'de %5 CO₂) inkübasyona bırakıldıktan sonra in vitro yara modeli ve deney grupları oluşturulmuştur. Ertesi gün hücre üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücreler PBS (Gibco, A.B.D) ile yıkanmıştır. Hücreler üzerine 500 µl PBS eklenerek 1000 µl pipet ucu ile her bir kuyucuğa dikey çizik atılarak in vitro yara modeli oluşturulmuştur. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra besiyeri içerisinde toksik olmayan NaHS konsantrasyonu (1µg) hücre üzerine eklenmiştir. Görüntüler canlı hücre görüntüleme sistemi (Carl Zeiss Microscopy, ABD) ile 48 saat boyunca kaydedilmiştir. Boşluk kapatma aşağıdaki denkleme göre yara kapanma oranını belirlemek için Image J yazılımı ile ölçülmüştür:

$$\text{Yara Kapanma Yüzdesi} = [1 - (Gi - Gf) / Gi] \times 100$$

Gi kenarlar arasındaki başlangıç boşluğunu, Gf ise kenarlar arasındaki son boşluğu temsil etmektedir.

RT-PCR Analizi

NaHS'in HaCaT hücrelerinde VEGF, TGF-β1, TGF-β3 ve K17'nin mRNA ekspresyon seviyelerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Normalizasyon amaçlı housekeeping olarak GAPDH kullanılmıştır. Genlere ait primer dizileri Tablo I'de yer almaktadır. Primerler BLAST online kullanılarak tasarlanmıştır. Ulusal Biyoteknoloji Enstitüsü Merkezi'nden (NCBI, Bethesda, MD, ABD) ve Sentegen (Ankara, TR) tarafından sentezlenmiştir. Doz ve kontrol gruplarından Trizol Reagent (Sigma A.B.D) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinden üretici firmanın (Roche, İsviçre) talimatları doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi tamamlandıktan sonra VEGF, TGF-β1, TGF-β3 ve K17 için zincir reaksiyonu amplifikasyonları, SYBR Green temelli reaksiyon karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon amaçlı GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır. GAPDH mRNA'nın normalizasyonundan sonra, örneklerin gen ekspresyon seviyelerini ölçmek için karşılaştırmalı eşik (CT) metodu (ΔΔCT metodu) kullanılmıştır. Gen ekspresyonundaki oransal değişiklikler 2^{-ΔΔCT} denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo I. Genlere ait primer dizileri.

Gen Adı	Primer Dizisi
TGFβ1	F 5' CAAGTGGACATCAACGGGT 3' R 5' CCGTGGAGCTGAAGCAATA 3'
TGFβ3	F 5' TGGCTGTTGAGAAGAGAGTCC 3' R 5' TCATCCTCATTGTCCACGCC 3'
K17	F 5' CATGCAGGCCTTGGAGATAGA 3' R 5' CACGCAGTAGCGTTCTCTGT 3'
VEGF	F 5' CACCATGCAGATTATGCGGA 3' R 5' GTTGTGCTGTAGGAAGCTCA 3'
GAPDH	F 5' GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG 3' R 5' ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA 3'

İstatistiksel Analiz

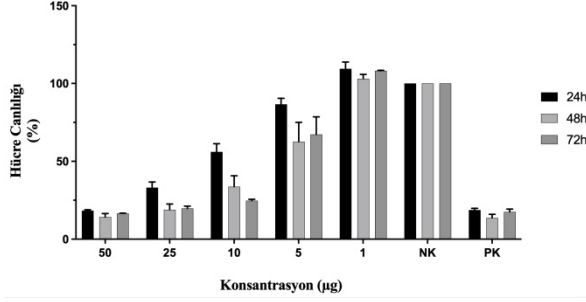
Deney grupları arasındaki karşılaştırmalarda Bonferroni testi ile çift yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış olup çoklu karşılaştırmalar GraphPad Prism 9.0 istatistik programı (GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) ile yapılmıştır. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

NaHS'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

HaCaT hücreleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NaHS (50µg, 25µg, 10µg, 5µg, 1µg) ile 24, 48 ve 72

saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben NaHS'in zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisi MTS yöntemi ile değerlendirilmiştir. Hücre proliferasyonu açısından 48. ve 72. saatler arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı için yara modeli analizinde 48 saatlik uygulama yapılmıştır. (Şekil 1). Analiz sonucunda 1µg NaHS toksik olmayan doz olarak belirlenmiştir.

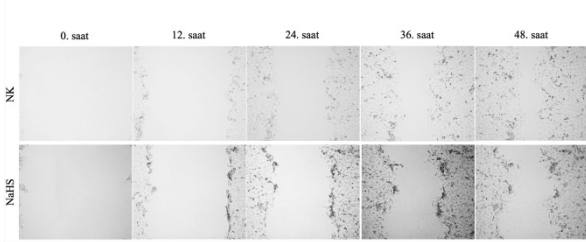


Şekil 1.

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan NaHS'in HaCaT hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonundaki hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MTS analizi ile gösterilmesi (NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol).

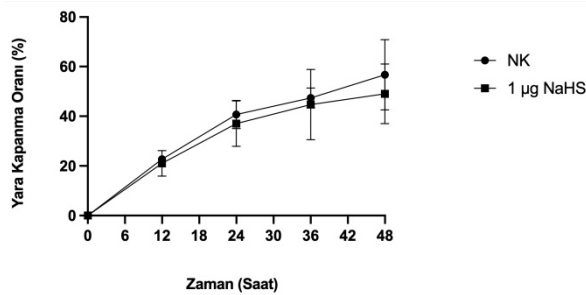
NaHS'in İn Vitro Yara Modeli Üzerine Etkisi

Pipet ucu yardımı ile oluşturulan yara alanlarının kapanma oranları hesaplanmıştır. 48 saat boyunca 1 µg NaHS uygulamasının negatif kontrol ve deney grubu arasında yara kapanması açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir (Şekil 2, Şekil 3).



Şekil 2.

NaHS uygulaması sonrası HaCaT hücrelerinde yara kapanma alanlarının inverted mikroskopik görüntüleri, 10X (NK: negatif kontrol).

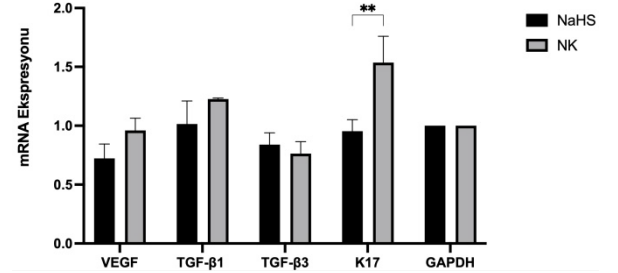


Şekil 3.

İN vitro yara modeli analiz ile HaCaT hücrelerinde toksik olmayan NaHS (1 µg) uygulaması grafiği.

NaHS'in VEGF, TGF-β1, TGF-β3 ve K17 mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkisi

NaHS'in HaCaT hücrelerinde VEGF, TGF-β1, TGF-β3 ve K17'nin mRNA ekspresyon seviyelerine olan etkisi RT-PCR analizi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada HaCaT hücrelerinde 1 µg NaHS uygulamasının gruplar arasında K17 mRNA ekspresyonunu arttırdığı, VEGF, TGF-β1 ve TGF-β3 mRNA ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4.

NaHS'in 1 µg konsantrasyonda 48 saat boyunca uygulandığı HaCaT hücrelerinde gen ekspresyon seviyelerindeki değişim ($p < 0.05$) (NK: negatif kontrol).

Tartışma ve Sonuç

Yara iyileşmesi, hücre içi ve hücre dışı matris olmak üzere çeşitli hücrel etkileşimleri içerir. Bu süreçte başta keratinositler olmak üzere fibroblastlar, endotel hücreleri, büyüme faktörleri, sitokinler, proteazlar ve eikosanoidler faaliyet gösterir¹⁸. Yapılan çalışmalarda yara iyileşme sürecine dair bazı noktalar detaylı olarak belirtilmiş olsa da hala tam olarak açıklanamayan bölümleri mevcuttur. Bu noktada yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla tıbbi ilaçlar ve alternatif yeni ürünler araştırılmaya devam edilmektedir. Bu açıdan kullanılan ve araştırılan pek çok ajanın ana hedefi hücre proliferasyonunu, kollajen sentezini, anjiyogenezi arttırmak ve epitelizasyonu hızlandırmaktır⁹. Bu çalışmada in vitro ortamda NaHS etkisinde TGF-β1, TGF-β3, VEGF ve K17'nin HaCaT hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

TGF-beta ailesi üyeleri; hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve yara iyileşmesinde rol oynayan çok işlevli sitokinlerdir. Özellikle TGF-β1 ve TGF-β3'ün hücre göçünde, hücre sinyalizasyonunda ve dokunun yeniden şekillenmesinde rol oynadığı bilinmektedir¹⁹. TGF-β1'in ana depolama yeri trombositler olup, yaralanmaya akut yanıtta TGF-β1 salınımı gerçekleşir. TGF-β1 salınımı, fibroblast hücrelerinden kollajen sentezinin artmasına ve keratinosit hücrelerinin migrasyonunu artırarak epitelizasyonun yeniden oluşmasına katkıda bulunur. TGF-β1, yara iyileşmesinde epitelizasyon başladıktan sonra yüksek seviyelerde bulunurken, TGF-β3 sürecin başlarında,

NaHS'in in Vitro Yara İyileşmesine Etkisi

özellikle göç eden epidermiste yüksek seviyelerde görülür²⁰. TGF- β 1, ekstrasellüler matris birikimine yol açarak skar dokusu oluşumunu uyarır. TGF- β 3'ün ise skar dokusu oluşumunu azalttığına dair çalışmalar bulunmaktadır^{21,22}. TGF- β 3'ün epitelizasyonun yeniden oluşmasını etkilemeden keratinosit proliferasyonunu yavaşlattığı bildirilmektedir²³. Bu noktada epitelizasyonun belirleyici etkisinin proliferasyon değil, keratinosit göçü olduğu görülmektedir. Keratinositler dışındaki hücrelerden salgılanan TGF- β 1, yara iyileşmesinin erken dönemlerinde önemli olmakla birlikte, keratinositlerdeki azalmış ekspresyonu kronik yaralara katkıda bulunabilir. TGF- β 3'ün yara iyileşmesinin sonraki aşamalarında hücre göçünün kontrol edilmesinde de önemli olduğu görülmektedir. Dolayısıyla TGF- β 1 ve TGF- β 3'ün ifadesinin analiz edilmesi yara kapanmasına katkılarının anlaşılmasına yardımcı olur. Literatürde NaHS ve TGF- β ile ilgili yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. NaHS'in TGF- β 1 ekspresyonunu azaltarak böbrek dokusu fibrozunu iyileştirdiği bildirilmektedir²⁴. Başka bir çalışmada diyabetik nefropatide NaHS'in TGF- β 1 ekspresyonunda azalmaya sebep olarak vasküler kalsifikasyonu inhibe ettiği görülmektedir¹². Farklı bir çalışmada NaHS'in TGF- β 1/Smad3 sinyal yolağını inhibe ederek insan kardiyak miyofibroblastların proliferasyonunu, migrasyonunu ve hücre siklusunun ilerlemesini baskıladığı bildirilmektedir²⁵. Ayrıca NaHS'in sistemik skleroz ile ilişkili deri ve akciğer fibrozisi üzerine etkisini değerlendiren bir çalışmada da yüksek dozdaki NaHS'in TGF- β 1 ekspresyonu dahil olmak üzere çeşitli fibrozis biyobelirteçlerinde belirgin bir azalmaya yol açtığı, bu etkisinin düşük doz NaHS uygulanan gruplarda anlamlı etkilere yol açmadığı görülmektedir²⁶. Bununla birlikte NaHS'in hipoksi altındaki sıçanların pulmoner arterlerinde TGF- β 3 ekspresyonunda azalmaya yol açarak hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonu önleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir¹³. Çalışmamızda RT-PCR analizi ile NaHS'in HaCaT hücrelerinde TGF- β 1 ve TGF- β 3 mRNA ekspresyon seviyelerine olan etkisi değerlendirilmiştir. HaCaT hücrelerinde H₂S donörü 1 μ g NaHS uygulamasının TGF- β 1 ve TGF- β 3 mRNA ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir.

VEGF, yara iyileşmesinde etkili olan önemli bir büyüme faktörüdür. Anjiyogenezi, kollajen birikimini ve epitelizasyonu indüklemeye gibi etkileri bulunmaktadır. VEGF'in, endotel hücrelerinde CSE ekspresyonunu up regüle ederek H₂S sentezini artırıcı yönde etki gösterdiği bildirilmektedir. Hem endojen hem de eksojen H₂S'in (in vitro: <200 μ M; in vivo: <200 μ mol/kg/gün), K_{ATP} kanalları, PI3K/AKT yolağı ve mitojenle aktive olan protein kinaz yolağı aracılığıyla pro-anjiyojenik etki gösterdiği görülmektedir^{14,15}. Farklı çalışmalarda NaHS'in in vitro ortamda endotel hücrelerinde proliferasyonu,

migrasyonu ve tübül benzeri yapı oluşumunu hızlandırdığı da bildirilmektedir¹⁴. CSE'in farmakolojik olarak inhibisyonu sonrasında VEGF ile indüklenen anjiyogenezin bloke olduğu bildirilmektedir^{8,27}. Bu anlamda farklı çalışmalara bakıldığında NO, sentezinin inhibe edildiği durumda yara iyileşme sürecinin bozulmasıyla VEGF düzeylerinde azalma olduğu görülmektedir²⁸. Yara iyileşme sürecinde olumlu etkileri bulunan polisakkarit hidrojel, EGF düzeylerini arttırırken, VEGF düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmektedir²⁹. NaHS'in pro-anjiyojenik etkilerinin olduğunu bildiren çalışmaların aksine bu çalışmada NaHS ile inkübe edilen HaCaT hücrelerinde, büyüme faktörlerinden VEGF mRNA ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılığa yol açmadığı belirlenmiştir.

Yaralanmayı takiben epidermisi yeniden dolduran keratinositler, değişen keratin profillerini eksprese ederler³⁰. K17, bir hücre iskeleti proteini olup insan epitelial hücre çoğalmasının bir belirteçidir^{31,32}. Yüksek K17 ekspresyonu, hücre migrasyonunun desteklenmesinde ve yara bölgesinde epitel tabakasının yeniden oluşmasında aktif bir rol oynamaktadır. Yara iyileşmesinde K17 eksprese eden hücrelerin cilt yüzeyine göçü 48 saatte gerçekleşmektedir³³. H₂S'in yara iyileşmesinde inflamatuvar, anjiyojenik ve epitelizasyon süreçlerinde önemli bir hücre tipi olan keratinosit çoğalması ve farklılaşması üzerine etkisi olduğu görülmektedir. Artan dozlarda ekzojen olarak uygulanan H₂S'in, keratinosit farklılaşmasını tetiklediği bildirilmektedir⁹. Cilt yaralanmasında aktifleşen keratinositler bir dizi alarmin proteini salgılayarak hızlı ve spesifik bir immün yanıt oluştururlar. Son yapılan çalışmalarda K6/16/17 temel erken bariyer alarminleri olarak tanımlanmıştır. Bu keratinlerin epidermal bariyerdeki değişime bağlı olarak ekspresyonlarının arttığı, keratinositlerin hiperproliferasyonuna ve immün aktivasyonuna katkıda buldukları bilinmektedir¹⁷. Çalışmamızda kullanılan hücreler keratinosit hücreleridir. Bu nedenle ekspresyon seviyesinde oluşan farklılık hücrelerin kendi mekanizmalarından da kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca in vitro çalışmalarda nükleer faktör eridroid-2 (Nrf2)'nin hem primer insan keratinositlerinde hem de HaCaT hücrelerinde K6, K16 ve K17 ekspresyonunu arttırdığı, keratinosit proliferasyonunu desteklediği bildirilmektedir^{34,35}. H₂S, Nrf2'nin doğrudan bir aktivatörü olduğuna dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır³⁶⁻³⁸. NaHS'in tek başına Nrf2'yi aktive ettiği görülmektedir³⁶. Bu anlamda NaHS'in K17 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirildiğinde 1 μ g NaHS uygulanan grupta K17 mRNA ekspresyonunda ki artış Nrf2 aktivasyonundan kaynaklanıyordaki olabilir.

Sonuç olarak H₂S'in toksik etkilerinin de olduğu göz önüne alındığında HaCaT hücrelerinde NaHS'in

toksik olmayan dozu 1 µg olarak belirlenmiştir. 48 saat boyunca uygulanan 1 µg NaHS dozunun in vitro yara modelinde olumlu bir etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu durum in vivo çalışmaların aksine NaHS'in yara iyileşmesine direkt olarak etki etmediğini göstermektedir. Çalışmamızda NaHS'in yara iyileşmesi üzerindeki etkisi iki boyutlu hücre kültüründe değerlendirilmiştir. Bu açıdan hücre seviyesinde yapılan in vitro çalışmalar gerçek kompleks doku yapılarını, hücre-toksin etkileşimlerini veya sistemik etkileri birebir yansıtmayabilirler. Ayrıca in vitro kültürlerde oluşturulan hücresel ortamlar kompleks doku içerisindeki hücresel mekanizmalardan farklılık gösterebileceğinden yara iyileşme sürecini göstermekte kısıtlı kalabilirler. Bu nedenle laboratuvar ortamında elde edilen sonuçlar klinik uygulamalar için doğrudan uyarlanamayabilir ancak bir ön veri oluşturabilir. Bununla birlikte deney koşullarında NaHS'e bağlı toksik gaz çıkışı sebebiyle yüksek konsantrasyonların ve uzun sürelerin değerlendirilememesi çalışmayı sınırlayan faktörlerden biri olmuştur. Bu limitasyonlar göz önüne alındığında, NaHS'in yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini daha geniş bir bağlamda anlamak için in vitro ortamda daha korunaklı çalışma şartları oluşturulması, daha uzun zamanda gözlem yapılması, farklı hücreler üzerinde analiz edilmesi ve üç boyutlu kültür modellerinde yara modellerinin çalışılması NaHS'in etkinliğinin değerlendirilmesinde pozitif katkı sağlayacaktır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Hücre kültürü çalışması olduğundan dolayı etik kurul izni gerekmemektedir.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: A.Ö.Ö., M.Ö.; Veri toplama ve işleme: A.Ö.Ö., M.Ö.; Analiz ve verilerin yorumlanması: A.Ö.Ö., M.Ö.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: A.Ö.Ö., M.Ö.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Makale Yazarlarının destek ve teşekkür beyanı yoktur.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V, J. Int. Med. Res. 2009; 37, 1528–1542.
2. Broughton G.I.I, Janis J.E, Attinger C.E, Plast. Reconstr. Surg. 2006;117.
3. Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N. & Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. J. Biochem 2009;146, 623–626.
4. Li L, Rose P and Moore P. K. Hydrogen sulfide and cell signaling. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2011;51,169-167.
5. S.A. Coavoy-Sánchez, S.K. Costa, M.N. Muscará, Hydrogen sulfide and dermatological diseases, Br. J. Pharmacol. 2019;177 (4),857–865.
6. R.M. Osipov, M.P. Robich, J. Feng, Y. et. al.Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myo- cardiac ischemia-reperfusion: comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection, J. Cardiovasc. Pharmacol. 2009;54 (4),287–297.
7. Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Martin GR. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. FASEB J 2007;21:4070–4076
8. Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106: 21972–21977.
9. Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, et al. Topical Simvastatin Accelerates Wound Healing in Diabetes by Enhancing Angiogenesis and Lymphangiogenesis. Am J Pathol 2012;181:2217- 24.
10. Liu X, Han X, Shang Y, et. al. Hydrogen sulfide releasing poly(γ -glutamic acid) biocomposite hydrogel with monitoring, antioxidant, and antibacterial properties for diabetic wound healing. International Journal of Biological Macromolecules 253 (2023) 127053.
11. Zhang Y, Yue T, Gu W, et. al. pH-responsive hierarchical H₂S-releasing nano-disinfectant with deep-penetrating and anti-inflammatory properties for synergistically enhanced eradication of bacterial biofilms and wound infection. Journal of Nanobiotechnology (2022) 20:55.
12. Wang F-Z, Zhou H, Wang H-Y. et. al. Hydrogen sulfide prevents arterial medial calcification in rats with diabetic nephropathy. BMC Cardiovasc Disord 2021;21:495
13. Hongfang J, Ying S, Chaoshu T. et.al. Effects of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary vascular structural remodeling Life Sciences 2006;78,1299–1309 .
14. Cai WJ, Wang MJ, Moore PK et. al. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. Cardiovasc Res 2007;76: 29–40.
15. Wu D, Li M, Tian W. Et. al. Hydrogen sulfide acts as a double-edged sword in human hepatocellular carcinoma cells through EGFR/ ERK/MMP-2 and PTEN/AKT signaling pathways. Sci Rep 2017;7: 5134.
16. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585– 601.
17. Zhang X, Yin M and Zhang L-J. Keratin 6, 16 and 17—Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. Cells 2019, 8, 807.
18. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Loeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:35-41.
19. 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.
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.
21. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralising antibody to TGF- β 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *Journal of Cell Science* 1994;107:1137-1157.
22. Shah M, Foreman DM, Ferguson MWJ. Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell Science* 1995;108: 985-1002
23. Le M, Naridze R, Morrison J, Biggs LC, Rhea L, Schutte BC, et al. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. *PLoS One* 2012; 7: e48040.
24. Li L, Xiao T, Li F. et. al. Hydrogen sulfide reduced renal tissue fibrosis by regulating autophagy in diabetic rats *Molecular Medicine Reports* 2017;16: 1715-1722.
25. Zhang Y, Wang J, Li H. et. al. Hydrogen sulfide suppresses transforming growth factor- β 1-induced differentiation of

NaHS'in in Vitro Yara İyileşmesine Etkisi

- human cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Sci China Life Sci* November 2015;58,1126-1134.
26. Wang Z, Yin X, Gao Y, et. al. The protective effect of hydrogen sulfide on systemic sclerosis associated skin and lung fibrosis in mice model. *SpringerPlus* 2016; 5:1084.
 27. Pupo E, Pla AF, Avanzato D. Hydrogen sulfide promotes calcium signals and migration in tumor- derived endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2011;51: 1765– 1773.
 28. Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growthfactor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J* 1999;13:2002-14.
 29. Luo Y, Diao H, Xia S, Dong L, Chen J, Zhang J. A physiologically active polysaccharide hydrogel promotes wound healing. *J Biomed Material Res A* 2010;94:193-204.
 30. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 2011;30(2):127–138.
 31. Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 1996;132:381–97.
 32. Paladini RD, Coulombe PA. Directed expression of keratin 16 to the progenitor basal cells of transgenic mouse skin delays skin maturation. *J Cell Biol* 1998;142:1035–5
 33. Ishikawa K, Sumiyoshi H, Matsuo N. Epiplakin accelerates the lateral organization of keratin filaments during wound healing. *Journal of Dermatological Science* 60 2010;95–104.
 34. Kerns ML, Hakim JM, Lu RG, Guo Y, Berroth A, Kaspar RL, et al. Oxidative stress and dysfunctional NRF2 underlie pachyonychia congenita phenotypes. *J Clin Invest* 2016;126:2356e66.
 35. Lessard JC, Coulombe PA. Keratin 16-null mice develop palmoplantar keratoderma, a hallmark feature of pachyonychia congenita and related disorders. *J Invest Dermatol* 2012;132:1384e91.
 36. Calvert J. W, Jha S, Gundewar S, et. al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ. Res.* 2009;105, 365–374.
 37. Vaamonde-García C, Burguera E.F, Vela-Anero A, et. al. Intraarticular Administration Effect of Hydrogen Sulfide on an In Vivo Rat Model of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7421.
 38. Testaia L, Citia V, Martellia A, Brogia S, Calderone V. Role of hydrogen sulfide in cardiovascular ageing *Pharmacological Research* 160 (2020) 105125.

