

T. C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLARAK
DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
YARA MODELİ ÜZERİNE
PERİFERİK MONONÜKLEER KÖK HÜCRE VE
BUNLARDAN FARKLANDIRILMIŞ
LANGERHANS HÜCRE UYGULAMASININ
İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Pınar KILIÇASLAN SÖNMEZ

Danışman Öğretim üyesi
Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

MANİSA
2018

ÖNSÖZ

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, asistanı olmaktan gurur duyduğum bana yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya,

Asistanlığım süresince her zaman desteğini hissettiğim bana yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Seda VATANSEVER'e, ihtiyaç duyduğum tüm konularda bilgisi ve desteği ile bana yardımcı olan Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN'e, her zaman örnek aldığım ve bana her daim destek olan Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e

Zamanla kardeş gibi olduğum, tüm üzüntü ve sevinçlerimi paylaştığım asistan arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında, her zaman beni destekleyen, zor günlerimde hep yanımda hissettiğim, beni sevgi ile büyütüp yetiştiren sevgili anneme, babama ve canım abime,

Hayattaki zorlukları beraber paylaştığım, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, hayatımın anlamı, çok sevdiğim biricik eşime ve hayatıma anlam katan en değerli varlığım olan kızıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Pınar KILIÇASLAN SÖNMEZ

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİL, RESİM ve TABLO LİSTESİ	VI
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kök Hücre	5
2.1.1. Kök Hücrenin Tanımı	5
2.1.2. Kök Hücrenin Farklı Hücre Tiplerine Dönüşmesi	5
2.1.3. Kök Hücre Çeşitleri Ve Kaynakları	7
2.1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması	14
2.1.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzole Edilmesi Ve Çoğaltılması	21
2.1.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanım Açısından Avantaj Ve Dezavantajları	22
2.1.7. Periferik Kan Mononükleer Hücreler (PKMH)	23
2.1.7.1. Dendritik Hücreler	24
2.1.7.1.1. Dendritik Hücre Fenotipi, Dağılımı Ve Alt Çeşitleri	25
2.1.7.1.2. Dendritik Hücre Morfolojisi ve İşlevsel Özellikleri	28
2.1.7.1.3. Dendritik Hücrelerin Bağışıklık Sistemindeki Rolü ve Yaşam Döngüsü	29
2.2. Deri Morfolojisi	31
2.2.1. Deri Embriyolojisi	32
2.2.2. Deri Histolojisi	33
2.3. Yara ve İyileşmesi	38
2.3.1. Yara Tipleri	38
2.3.2. Yara İyileşmesi	38
2.3.2.1. Evreleri	38
2.3.2.2. Şekilleri	44
2.3.2.3. Etkileyen faktörler	45

2.4. Diyabet ve Yara İyileşmesi	46
2.5. Deneysel Diyabet	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1. Hücre Kültürü Deneyleri	52
3.1.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi ve karakterizasyonu	52
3.1.2. Kök hücreden farklandırılmış Langerhans hücrelerinin (fLH) eldesi ve karakterizasyonu	53
3.2. Hayvan Deneyleri	53
3.2.1. Deneysel Diyabet Modeli ve Deney Grupları	53
3.3 Morfolojik inceleme	56
3.3.1. Histopatolojik Değerlendirme	56
3.3.2. Histokimyasal Boyama	57
3.3.3. SEM Analizi	58
3.3.4. İstatistiksel Analiz	58
4. BULGULAR	60
4.1. PKMH ve fLH Kültürü	60
4.1.1. PKMH ve fLH Eldesi	60
4.1.2. PKMH ve fLH Karakterizasyonu	61
4.1.3. PKMH ve fLH SEM Analizi	62
4.2. Morfolojik Sonuçlar	64
4.1.1. Makroskobik sonuçlar	
4.1.1.1. Deride PKMH ve fLH uygulamalarının makroskobik sonuçları	64
4.1.2. Mikroskobik Sonuçlar	66
4.2.2.1. Mikroskobik Histokimyasal Sonuçlar	66
4.2.2.2. Mikroskobik İmmunohistokimyasal Sonuçlar	80
5. TARTIŞMA	108
6. SONUÇLAR	125
7. KAYNAKLAR	126

KISALTMALAR

ATP: Adenosin Trifosfat

bFGF: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü

BMP-4: Kemik Morfogenetik Proteini 4

CC: Beta Kemokinler

CCR: Beta Kemokin Reseptörü

c-kit: Sitokin Reseptörü

CXCR: Alfa Kemokin Reseptörü

CO₂: Karbondioksit

DAB: Diaminobenzidine

DMEM: Dulbecco' s modified Eagle' s medium

D: Dalton

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EDTA: Etilendiamintetraasidik asit

FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü

FBS: Fötal Sığır Serumı

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FGFR: Fibroblast büyüme faktör reseptörü

HE: Hematoxilen Eozin

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

I.P: İntraperitoneal

I.V: İntravenöz

IL-1: İnterlökin-1

IL-4: İnterlökin-4

IFN- γ : İnterferon Gama

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL: İnterlökin

IL-8: İnterlökin-8 **I.M:**İntramuskuler **K:** Keratin

KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü
LDGF: Lökosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
LIF: Lökemia İnhibitor Faktör
Mig: İnterferon Gama ile İndüklenen Monokin
mRNA: Haberci Ribonükleik asit
M: Molar
MHC: Major Histokompatibilite Kompleks
MMP: Matrix Metalloproteinaz
NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NO: Nitrik Oksit
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu
PNL: Polimorf Nüveli Lökosit
RNA: Ribonükleik Asit
SF: Serum Fizyolojik (‰ 9 NaCl)
S.C: Subkutan
SSEA: Evreye Spesifik Embriyonik Antijen
TGF-β: Transforming büyüme faktörü-Beta
TXA2: Tromboksan A2
TNF -α: Tümör nekroz faktör- alfa
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Şekil 2.1. Embriyonik ve yetişkin kök hücre

Şekil 2.2 Kök hücre kaynakları

Şekil 2.3. Kök hücre differansiyasyonu

Şekil 2.4. Kemik iliği kökenli MKH'ler ile hematopoetik kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin şematik gösterimi

Şekil 2.5. MKH'lerin kültür ortamında plastik adherens ve fenotipik özellikleri

Şekil 2.6. Baksh ve arkadaşlarının önerdiği farklılaşma modeli

Şekil 2.7. Mezenkimal Kök Hücre Üretim Aşamaları

Şekil 2.8. Dendritik hücre alt tipleri ve etkileşimde bulundukları T hücre çeşitleri

Şekil 2.9. Derinin katmanları

Şekil 2.10. Deri ve ekleri.

Şekil 2.11. Langerhans ve melanosit

Şekil 2.12. Deri ve immün sistem

Şekil 2.13. Derinin tabakaları

Şekil 2.14. Dermoepidermal bileşke

Şekil 2.15. Keratin filamanlar

Şekil 2.16. Sağlıklı Deri ile Kısmi kalınlıkta yara ve epitelizasyon

Şekil 2.17. Dünya genelinde diyabet prevalansı

Şekil 3.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi

Şekil 3.2. Deney hayvanı sırt bölgesinde yara modeli oluşturma

Şekil 4.1. Kültür kabındaki PKMH ve FLH yapışmasının morfolojik görünüşleri.

Şekil 4.2. PKMH ve FLH karakterizasyonu.

Şekil 4.3. Kültürdeki deri greftlerinin üzerindeki PKMH ve FLH davranışının SEM analizi.

Şekil 4.4. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının makroskopik analizi.

Şekil 4.5. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının makroskopik analizi.

Şekil 4.6. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının H-E analizi.

Şekil 4.7. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının H-E analizi.

Şekil 4.8. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının MT analizi.

Şekil 4.9. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının MT analizi.

Şekil 4.10. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının PAS analizi.

Şekil 4.11. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının PAS analizi.

Şekil 4.12 Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması

Şekil 4.13. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması X400

Şekil 4.14. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması X400

Şekil 4.15. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması X400

Şekil 4.16. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması X400

Şekil 4.17. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması X400

Şekil 4.18. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması X400

Şekil 4.19. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması X400

Şekil 4.20. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması X400

Şekil 4.21. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması X400

Şekil 4.22. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması X400

Şekil 4.23. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması X400

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmasında kullanılan kriterler

Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri-1

Tablo 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri-2

Tablo 2.4. Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları adezyon molekülleri

Tablo 2.5. Ana Ekstrasellüler Matriks Proteinleri

Tablo 2.6. Hücresel olaylar ve yara iyileşmesinin biyobelirteçleri

Tablo 2.7. İyileşmeyen-Kronik Yaralarda Biomarkerlar

Tablo 2.8. Farklı hayvan türlerinde STZ' nin doz aralıkları

Tablo 2.9. Tip 1 ve Tip 2 Diyabet oluşturmak için fare ve sıçanlarda STZ' nin kullanım şekilleri ve dozları

Tablo 2.10. STZ uygulaması sonrasındaki kan şeker değişimi.

Tablo 4.1. Kültür kabındaki PKMH ve FLH yapışmasının morfolojik görünüşleri.

Tablo 4.2. PKMH ve FLH karakterizasyonu.

Tablo 4.3. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.4. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.5. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının H-E Damar sayısı imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.6. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının H-E Epitel kalınlığı imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.7. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının MT Kollajen imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.8. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının MT Kollajen imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.9. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının pas bez sayısı imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.10. Deri greftlerinin transferi sonrasında 7. GÜN PKMH ve FLH davranışının pas bez sayısı imageJ ile morfolojik analizi.

Tablo 4.11. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması h-skor.

Tablo 4.12. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması h-skor

Tablo 4.13. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması h-skor

Tablo 4.14. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması h-skor

Tablo 4.15. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması h-skor

Tablo 4.16. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması h-skor

Tablo 4.17. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması h-skor

Tablo 4.18. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması h-skor

Tablo 4.19. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması h-skor

Tablo 4.20. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması h-skor

Tablo 4.21. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması Apoptotik İndeks

Tablo 4.22. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması Apoptotik İndeks

ÖZET

Deride yara iyileşmesi özellikle kronik ve diyabetik olanlarda maliyetli ve hasta yaşam kalitesini azaltan zor durumlardır. Bu konuda son zamanlarda kök hücre tedavisi giderek artan önem kazanmış ve değişik kaynaklardan elde edilen hücresel ürünler klinik kullanımda tedavide yerini almıştır. Periferik Mononükleer Kök Hücre (PKMH) periferik dolaşımdan kolaylıkla elde edilen ve uygulanabilecek bir KH türüdür. PKMH ile yara iyileşmesinde çok az yayın olup bunlardan farklanan langerhans hücreleri (FLH) ile tedavideki etki bilinmemektedir. Bu çalışmada, PKMH ve FLH deneysel diyabetik greft yara modelinde iyileşmeye etki açısından incelendi ve karşılaştırılarak olası mekanizmalar için değerlendirildi.

Alınan kan örneklerinde PKMH izolasyonu, kültürde çoğaltılması ve FLH farklılaştırılması sağlandı. Erişkin Wistar albino sıçanların sırt bölgesi traşlanarak 1x1 cm boyutunda karşılıklı yer değiştirmek suretiyle dört adet tam kat deri grefti yapıldı. Kültür ortamında greftler üzerine kök hücreler ekilerek yara bölgesine uygulandı. Sıçanlar diyabetli olanlar (DG) beş ve olmayanlar (NDG) beş grup olarak 10 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece greft yara modeli yapılacak, sham grubuna sadece besiyeri uygulanacak ve diğer gruplara ise, besiyeri içerisinde PMHK, FLH ve birlikte olacak şekilde greft üzerinde yara bölgesine uygulandı. Hücresel tedavi 7 gün boyunca her bir yaraya 1×10^6 hücre uygulandı. Sırttaki greftlerden 3. ve 7. günlerde biyopsi ile örnekler incelendi. Histokimyasal (HK) olarak H-E, masson trichrome (MT) ve PAS, immunohistokimyasal (İHK) olarak oksidatif stres için e-NOS ve i-NOS, çoğalma belirteci olarak PCNA, damarlanma belirteci olarak VEGF, inflamasyon belirteci olarak IL-1 ile apoptoz için TUNEL boyaması yapıldı. Mikroskop altında alınan görüntüler dijital ortama aktarılıp imageJ ile morfometrik ve H-skor ile değerlendirilip gruplar arasında farkın istatistiği bulundu. Kültür ortamında deri üzerine ekilen hücrelerin SEM analizi yapıldı.

PMHK ve FLH izolasyonu kolay olmasına rağmen çoğalmadıkları gözlemlendi. Yapılan karakterizasyonlarında KH belirteçlerini pozitif ve negative olarak ifade ettikleri izlendi. Hücrelerin SEM analizinde deri üzerinde kaldıkları ve deri ile etkileşimde oldukları saptandı. Yapılan greft uygulamalarından iyileşmenin hızlı gerçekleştiği ve NDG için 2 ile 4 gün ve DG

için ise 4 ve 7 günler arasında yaranın kapandığı izlendi. 3. günde arasında ve HK olarak H-E, masson trichrome (MT) ve PAS boyamalarında DG için daha da belirginleşen ve etkinleşen histopatolojik düzelmeler görüldü. Morfometrik analizde epitel kalınlığı (EK), Fibroblast sayısı (FS), yeni damar oluşumu (YDO), kollajen (KOL), matriks ve fibril dağılımının anlamlı olarak iyileştiği bulundu. İHK olarak yine DG için belirgin ve etkin belirteç değişiklikleri saptandı. Oksidatif stres için e-NOS ve i-NOS, çoğalma belirteci olarak PCNA anlamlı olarak artmadığı, damarlanma belirteci olarak VEGF artışı, inflamasyon belirteci olarak IL-1 azalışları ile apoptoz için TUNEL boyamasında anlamlı azalma izlendi. Mikroskop altında alınan görüntüler dijital ortama aktarılıp imageJ ile morfometrik ve H-skor ile değerlendirildiğinde görüntülerde izlenen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlılığı ortaya kondu.

KH uygulamasının tek uygulamalarındaki anlamlı katkı ve başarı birlikte uygulamalarında daha da belirginleşti. Daha dengeli, olgun ve komplikasyonsuz yara iyileşmesi oluştu. Kültür ortamında deri üzerine uygulanan bu yeni hücresel teavinin başarılı ve etkin greftlemesi diyabetik zor yara iyileşmesinde greft etkinliğinin ve başarının artırılmasını sağlayacağı bulundu. İleri düzeyde mekanizmalarının araştırılmasının bilime katkı sağlayacağı ve faz çalışmalarında insan klinik uygulamasında maliyetleri azaltarak hasta yaşam kalitesini arttıracacağı düşünüldü.

Anahtar kelimeler; Diyabet, Greft, Yara İyileşmesi, Periferik Mononükleer Kök Hücre, Langerhans hücre farklılaşması

ABSTRACT

Chronic injuries that are difficult to heal, such as diabetes, are a problem in medical treatment. Seeking new treatment protocols is an important issue that has begun to be used in stem cell clinics. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) is a good source of stem cells that can easily be obtained from peripheral circulation and can be easily applied to patients under good production conditions. Our study aimed to compare PBMC and Langerhans cells alone and in combination to determine whether these two stimuli were stimulating each other and to apply them to skin grafts in an experimental animal model to demonstrate their benefit in the treatment of chronic wounds.

Diabetes Mellitus is now becoming an increasingly international health problem. Diabetic complications include numerous accompanying problems, including severe wound healing, chronic ulceration, and severe complications of the resulting limb amputation. Cellular products have begun to be used in an increasingly broad spectrum of disease treatments in recent years. Among these cellular products, PBMC is used in the treatment of various diseases, especially hematological malignancies. It is also known that langerhans cells, which play an active role in wound healing, especially in the inflammatory phase, have important immunological functions. In addition, in vivo experiments have shown that Langerhans cells play an important role in epidermal homeostasis and wound healing is particularly beneficial in early stages. The specificity of this study is to investigate the effects of the langerhans cells differentiated from the root cell in difficult-to-heal wounds and the mechanisms of their action in the treatment unknown in the literature.

In this study, PBMC isolation, culture propagation and differentiation of langerhans cells (dLC) will be provided. These cells will be applied on the grafts in the culture medium and applied to the wound area. The back region of Wistar albino rats will be cut and four (four) full fold skin grafts of 1 x 1 cm size will be reciprocally replaced. Then the rats will be divided into 10 groups; only the graft wound model will be applied to the control group, only the feeder will be applied to the sham group and the other groups will be applied to the wound area on the PBMC and dLC grafts in the feeder. Cellular therapy will be repeated intradermally in a single dose for 14 days. On the 3rd and 7th days from the grafts on the back,

samples will be taken with biopsy. In cellular therapy, 1×10^6 cells will be administered to the side of each wound of PBMC and dLC. During the wound healing process, cell application will be repeated to the biopsied areas.

Also histochemically, hematoxylin-eosin, PAS and masson trichrome staining,; immunohistochemically, e-NOS, i-NOS for oxidative stress, PCNA as proliferative marker, VEGF marker for vascularization, IL-1 as inflammation markers and TUNEL staining for apoptosis will be performed. The images taken under the microscope will be transferred to the digital platform and evaluated by morphometric and H-score. The difference between the groups will be statistically analyzed.

Success will be achieved when our study shows that PBMC and dLC contributes to supportive care in the treatment of chronic wounds such as diabetic foot. This success is thought to be an application that reduces costs and increases patient quality of life. It is expected that it will contribute to the literature by publishing the quality journal and be an effective product in clinical use

1. GİRİŞ

Yara iyileşmesi kompleks bir süreç olup derinin yeniden organizasyonunu gerektirir. Özellikle Tip 2 Diyabet olmak üzere kronik yara olarak bilinen iyileşmeyen yaralarda hastanın yaşam kalitesi ve maliyetler önemli sorunlardır (1).

Diabetes mellitus (DM) olan insan sayısı giderek artmakta olup diyabetik ayak ülseri (DAÜ), DM hastalarının% 2'sinden fazlasını etkilemektedir. DAÜ, duyu ve mikrosirkülasyonun azalmasına neden olan DM kaynaklı nöral ve vasküler lezyonlardan kaynaklanmaktadır. DAÜ prevalansındaki artış, araştırmacıları DAÜ'nun tedavisi için yeni terapiler bulmaya yönlendiriyor.

Kök hücre son zamanlarda klinik kullanımda yerini almaya başlamış bir ürün olarak etkinliğini kanıtlamıştır. Güncel çalışmalarda kök hücre kullanımının özellikle iskemik veya DAÜ modellerinde olduğu saptanmıştır. İmmunsupresyon, anjiogenik stimülasyon ve skar azaltılması ana konulardır. Çalışmaların çoğunluğunda kronik yarada kök hücre etkisi için matriks benzeri bir taşıyıcı ile uygulanması gerektiği düşünülmüştür (2).

Rejeneratif tedavi için uygun bir hücre kaynağı olan mezenkimal kök hücreler (MKH), DAÜ'nde önemli rol oynamaktadır. Güncel kanıtlar MKH uygulamasının yara iyileşmesini hızlandırabileceğini ve klinik parametreleri düzeltebileceğini göstermiştir. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH'ler), diğer dokulardan türetilen MKH'ler ile karşılaştırıldığında DFU'yu tedavi etmek için kolay, etkili ve uygun maliyetli transplantasyon sağlayabilen uygun bir hücre türü olabilir (2).

MKH'ler, kondrositler, adipositler, osteositler, miyositler, endotel hücreleri ve keratinositler gibi çeşitli hücre türlerine ayrılabilirler. MKH'lerin yara iyileşmesinde anjiyogeneze ile pro-anjiyogenik faktörlerin salgılanması ve endotel hücreleri ve / veya perisitlere farklılaşma, M2 makrofaj polarizasyonu, endojen kök / progenitör hücrelerin toplanması, ekstrasellüler matriks üretimi, yeniden şekillenme, immunsupresyon gibi birçok mekanizma tanımlanmıştır. Bu nedenle, MKH'lerin düzenleyici faktörleri, terapötik bir hedef olabilir ve hem yara iyileşmesi hem de tümörler için yeni terapötik yaklaşımların kurulmasına yol açabilir (3).

Birçok farklı kaynaktan elde edilmesine karşılık periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) eldeleri, çoğaltılmaları ve kök hücre olarak kullanılmalarındaki kolaylıklar nedeni ile potansiyel bir ürün olarak gözükmektedir. Yara iyileşmesinin tüm aşamalarında anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve hücre göçü ile çoğalmasını tetikleyerek epitelin yeniden yapılanmasını sağlamaktadır. Hücre tabanlı tedaviler ile biyotaşıyıcıların geliştirilmesi iyileşmeyen yaralar için bir umut olmaktadır (4,5,6,7).

Diyabet, zayıf dolaşım ve bozulmuş anjiyogenez ile karakterizedir. Dolaşımı iyileştirmeye yönelik tedaviler, diyabetik hastalarda yara iyileşmesini genel olarak iyileştirir. PKMH'lerin, fare diyabet modellerinde tam kat deri yaralarında yeniden damarlanma ve iyileşmeyi hızlandırma potansiyeli araştırılmıştır. Yaralara insan CD34 + veya CD34-PKMHler enjekte edildiğinde veya hücre verilmediğindeki çeşitli zamanlarda vaskülarite ve iyileşme açısından analiz edilmiştir. CD34 + zenginleştirilmiş hücrelerle yapılan muamele kontrollerle karşılaştırıldığında, tedaviden 4 gün sonra yara boyutunun azaldığı, epidermal iyileşmenin ve revaskülarizasyonun hızlandığı görülmüştür (4).

Yara bölgesinde PKMH için immunmodulasyon etkisinin çok önemli bir faktör olduğu düşünülmüştür. İnflamasyon ve fibroziste etkili görünmekle birlikte özellikle dokudaki T hücre çoğalmasını baskılaması anahtar bir aktivitedir. Doğal T hücreleri ve makrofajlarda IL-10 ve TGF-b aktivitesine bağlı olduğu düşünülmüştür. TNF alfa üretimi, NK hücre fonksiyonunda IFN gama aktivitesini azaltması bilinmektedir. Allojenik PKMH'ler için de bu etkilerin varlığı gösterilmiştir. Allojenik hücrelerin immuntoleransa uğradığı ancak farklılaşma ile beraber bu toleransı kaybettikleri gösterilmiştir. PKMH uygulaması ile özellikle damarlanmanın arttığı ve gerekli büyüme faktörü desteğinin sağlandığı görülmüştür. Skar formasyonunun oluşmasını da azaltan PKMHler derideki tüm hücrelerin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Skar oluşumunun azaltılmasında PGE2 ile IL-10 üzerinden T hücrelerle ve makrofajlarla önemli miktarda antiinflamatuar sitokinler yara yatağında oluşturulur.

Greft, vücuttaki herhangi bir dokunun, kendisine ait sinir ve damar bağlantıları olmaksızın alınarak başka bir vücut bölgesine nakledilmesi işlemidir. Böylelikle kapillerlerden difüzyon ile beslenen greft, yaşamını sürdürmek için alıcı bölgenin vaskülarizasyonuna ihtiyaç duyar.

Vücutta greft olarak en çok kullanılan dokulardan biri deridir. Deri greftleri, öncelikle kapatılamayan kusurları kapatmak için standart bir seçenek olup epidermis ve dermisin bir kısmı veya tamamından oluşur. İçerilen dermisin miktarına bağlı olarak, parsiyel kalınlıkta veya tam kat olarak sınıflandırılır. Parsiyel kalınlıkta deri greftleri değişik miktarlarda dermiş içerirken, tam kat deri grefti tüm dermişi içerir.

Deri greftinin başarısı, greftin beslenme yeteneğine ve daha sonrasında alıcı yatağın içeriye doğru vaskülarizasyonuna bağlıdır. Deri greftinin alıcı bölge tarafından kabulü için yatağa yapışması gerekir. Bu yapışma iki aşamada meydana gelir. Birincisi, graftın fibrin birikimi nedeniyle yapıştığı alıcının yatağı üzerine yerleştirilmesi ile başlar. Bu yaklaşık 72 saat sürer. İkinci evre ise, fibröz doku ve damarların greft içine doğru çekilmesini içerir.

Graft başarısızlığı, greftin altında kan veya serum toplanması, greftin yatakta revaskülarizasyonu kesintiye uğratmaya neden olabilecek şekilde mobilizasyonu ve enfeksiyon gibi nedenlerden kaynaklanır. Enfeksiyon riski, alıcı bölgenin dikkatli bir şekilde hazırlanması ve kontamine yataklara uygulanan greftlerin erken gözlenmesi ile azaltılabilir. Ek olarak, greft verici bölgedeki bir enfeksiyon, kısmi kalınlıktaki bir dermal kaybı tam kat cilt kaybına dönüştürebilir. Parsiyel kalınlıkta bir deri grefti reepitelyalizasyonla ve genellikle 7 gün içinde iyileşir (7).

Derinin rejeneratif onarımı, tedavi şekli ve yeni terapilerin ortaya çıkışı konusunda gelişmeler kaydedilmesine rağmen, derin ve kronik yaraların iyileşmesi problem olmaya devam etmektedir. Fare modellerinde yara iyileşmesinde yara bölgesine fetal deri ve PKMH transferi yapıldığında fetal derinin inflamatuvar faktörler üreterek inflamatuvar yanıtı arttırdığı, bunun da iyileşme hızında ve yara oluşumunda bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu nedenle, eksojen PKMH'lerin, yara iyileşmesi için gerekli olan çevresel immün yanıtı değiştirebileceği düşünülmektedir (8).

Diyabet sonucunda gelişen hiperglisemi ve hipergliseminin tetiklediği mekanizmalar ile diyabette yara gelişimi kolaylaşmakta ve yara iyileşmesinde sorunlar yaşanmaktadır. PKMH pluripotent özellikte olup ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin diferansiyasyonu da sağlanabilmektedir. Bu çalışmada PKMH diyabetik yara modeline greft ile transferi sonrasında yara iyileşmesine ve yara iyileşmesinin moleküler düzeyine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu

amaçla çalışmada erişkin sıçan örnekleri kullanıldı. Streptozosin ile diyabet oluşumu sağlandı. Kontrol, FLH, PKMH ile FLH+PKMH hücre tedavi grupları oluşturuldu. Yara modeli oluşumunun 3., 7. ve 14. Gününde doku örnekleri alındı. Doku örnekleri histomorfolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Çalışma sonucunda PKMH ile diyabetik yara modeli graft iyileşmesi üzerine etkisinin moleküler düzeyde olumlu katkıda bulunduğu görüldü.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

2.1.1. Kök hücrenin tanımı

Canlıda uzun süre bölünmeyi sürdürerek kendini yenileme, ortamında uygun şartlar sağlandığında özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeli olan, farklılaşmamış hücrelere kök hücre denmektedir (18).

Kendi karakteristik özelliklerini kaybetmeden bölünebilme ve kendini sınırsız yenileyebilme yeteneği kök hücreleri vücuttaki diğer hücrelerden ayıran temel özellikler arasında bulunmaktadır. Kromozomların uç kısmında bulunan ve telomer adı verilen DNA zincirlerinin uzunluğu ile hücrelerin bölünme kapasitesi doğru orantılıdır. Kök hücreler, telomerlerin uzun kalmasını ve dolayısıyla çok sayıda bölünme gerçekleştirebilmelerini sağlayan yoğun telomeraz enzim aktivitesi gösterirler (21). Fare hematopoetik kök hücreleri ile yapılan çok sayıda çalışmada, telomeraz aktivitesindeki azalmanın, hücrelerin kendini yenileyebilme kapasitesini azalttığı gösterilmekle birlikte, enzim aktivitesindeki artışın, rejenerasyon kapasitesini arttırmaması Wnt, TGF β , MAPK-ERK, PI3K, LIF-STAT3 vb sinyal yolları; Oct4, Nanog, Sox2 vb transkripsiyon faktörleri ile p53 gibi hücre döngüsünde görev alan bazı moleküllerin de rejenerasyonda rol oynuyor olabileceğini göstermiştir.

2.1.2. Farklı Hücre Türlerine Dönüşme:

Bir hücrenin farklılaşması, gen ekspresyonlarında değişiklikler ve hücrenin fenotipik özelliklerinde ortaya çıkan değişimler olarak adlandırılır. Sitokinler, büyüme ve farklılaşma faktörleri, hücrelerarası iletişim ve hücre dışı matriks proteinleri farklılaşma sürecinde rol oynamaktadırlar. Farklılaşan hücrede morfoloji, enzim aktivitesi ve protein kompozisyonu değişir (21,22). Kök hücreler belli bir fonksiyonu gerçekleştirmek için gereken spesifik yapıları içermeyen özelleşmemiş hücrelerdir ve gerekli durumlarda özelleşmiş olan hücrelere farklılaşabilirler (21).

Kök hücreler kendi köken aldıkları dokuların hücrelerine farklılaşabildiği gibi, farklı dokularda bulunan hücrelere de differansiye olabilirler. Kök hücrelerin kendi soyu dışında farklı dokularda bulunan hücrelere dönüşebilme yeteneğine plastisite veya transdifferansiyasyon adı verilmektedir. Sinir hücrelerine dönüşen kan

hücreleri, kalp hücrelerine dönüşen hematopoetik kök hücreler plastisiteye örnek verilebilir (22).

Kemik iliği stromal hücrelerin hasar görmüş kalp dokusuna enjekte edilmesi sonucu kardiyomiyositlere dönüşmesi örneğinde olduğu gibi kök hücreler hasarlı dokuya verildiğinde bu dokuyu tekrar oluşturabilirler (21,144).

Bir kök hücrenin nakledilen doku içinde farklılaştığını gösterebilmek için, onun bir donörden alındığı transgenler, kromozomlar veya retroviral enfeksiyonlar yardımıyla kanıtlanmalıdır. Bunun dışında nakledilen dokunun hücrelerine benzer özellik göstermesi ve fonksiyonel olması da farklılaşmanın gerçekleştiğinin anlaşılması için gereklidir (21).

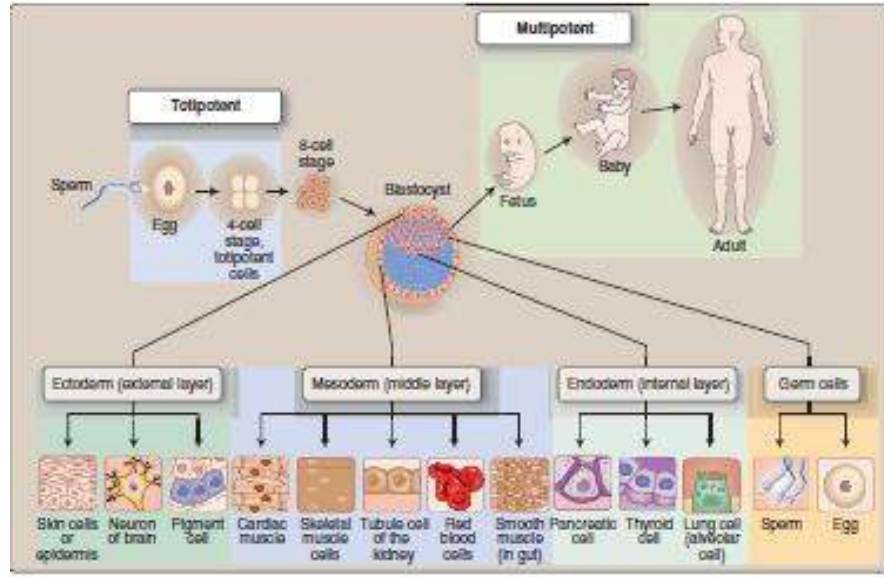
Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere 3 farklı hücre tipine ayrılır(Şekil 2,1).

Totipotent: Her üç germ yaprağına ait tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Yumurta ve sperm hücresinin birleşmesi sonucu meydana gelen zigot oluşumunu takip eden 1-4 gün içinde, bölünme ile erken embriyo hücreleri oluşur. Bu hücreler sekiz hücrelik blastomerdeki hücreler olup, totipotent özelliktedirler.

Pluripotent: Fertilizasyonun 5. Gününde meydana gelen blastosistin iç tabakasındaki (endoderm) hücreler pluripotent özellikte olup, hemen hemen tüm hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahiptir ancak totipotent olmadıkları için plasentayı oluşturamazlar, dolayısıyla tam bir organizmayı meydana getiremezler.

Multipotent: Sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Yetişkin kök hücreleri, kendi uzmanlaşma potansiyeli bir veya daha fazla hücre çizgisi ile sınırlı olduğu için, multipotent olarak kabul edilir. Bununla birlikte, mezenkimal kök hücre olarak bilinen bir multipotent kök hücre, birkaç hücre türüne farklılaşabilir.

Unipotent: Yalnızca bir soy boyunca farklılaşabilen hücrelerdir. Progenitör hücreler, kendi kendini yenileyebilme kabiliyeti olmayan; sadece spesifik hatlara farklılaşma eğilimi gösteren hücrelerdir. Farklılaşma potansiyelleri sınırlı olmakla birlikte, yaralanmaları ve hastalıkları tedavi etmek için geniş bir terapötik potansiyele sahiptirler.



Şekil 2.1. Embriyonik ve yetişkin kök hücre
(Cell and molecular biology, Richard A., 2010)

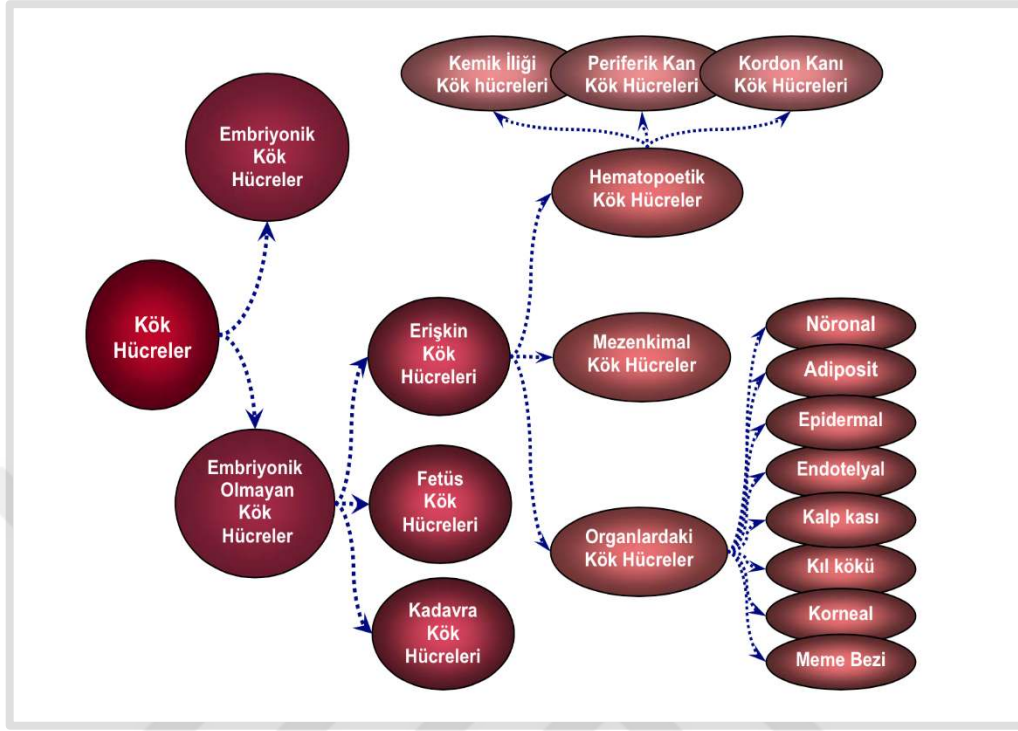
Kök hücreler kendilerini somatik hücrelerden ayıran kendini yenileyebilme ve farklılaşma özellikleri sayesinde günümüzde malignite, çeşitli sinir sistemi hastalıkları, diyabet gibi metabolik hastalıklar, kalp problemleri, kemik patolojileri ve deri kaybına neden olan patolojiler (travma, yanık, dermatolojik hastalıklar) gibi klinik olgularda kullanılmaya başlanmıştır.

2.1.3. Kök Hücre Çeşitleri Ve Kaynakları

Doku mühendisliğinde hücre nakli amacıyla kullanılan kök hücreler, kaynaklarına göre otolog, allojenik ve ksenogenik olmak üzere üçe ayrılırlar. Otolog kök hücreler hastanın kendisinden, allojenik kök hücreler, aynı türe ait bir vericiden, ksenogenik kök hücreler ise farklı bir türe ait vericiden elde edilirler (22).

Diğer kök hücre türlerine göre minimum immunolojik reaksiyona yol açması gibi pek çok avantajının bulunması otolog kök hücrenin doku mühendisliğinde daha yaygın kullanımına sebep olmuştur.

Öte yandan köken aldıkları kaynaklara göre de embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak ikiye ayrılırlar (Şekil 2.2).



Resim 2.2. Kök Hücre Kaynakları

Embriyonik Kök Hücreler: Embriyonik kök hücreler, embriyonel gelişim sırasında blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen ve ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen, sınırsız üreme potansiyeline sahip hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler pluripotent hücrelerdir; ancak plasenta gibi embriyon dışı destek dokuları oluşturmazlar (23).

Embriyonik kök hücreler, kök hücre belirteçleri olan Oct-3/4(Pou5f1), Sox2, KLF4, Nanog, Rex1(Zfp42), FoxD3, ZFX, TBN, HMGA2, NAC1, GCNF, Stat3, UTF1 gibi transkripsiyon faktörlerini; TERF1, CHK2, DNMT3 gibi DNA modifiye edicileri; ECAT11, Ecat1, GDF3 gibi nükleer transkripsiyon faktörlerini; SSEA-1 (CD15/Lewis x), SSEA-3/4, Frizzled5, Cripto (TDGF-1), TRA1-60, TRA1-81, TG-30, TG-343 gibi antijenleri; alkalen fosfataz(ALP), telomeraz gibi bazı proteinleri eksprese ederler (22).

Embriyonik kök hücreler in vitro ortamda farklılaşmadan çoğalma kapasitesine sahiptirler. Embriyonik kök hücrelerin farklılaşmalarını sağlamak için gen aktarımı, transkripsiyon faktörlerinin kullanılması, kültür ortamına sitokin ve büyüme faktörlerinin eklenmesi gibi yöntemler ve çeşitli hücre-ekstrasellüler matriks sistemlerinden yararlanılabilir(23).

Embriyonik kök hücreler yüksek telomeraz aktivitesine sahip olması nedeniyle bazen teratom oluşumuna yol açabilir bu nedenle embriyonik kök hücrelerin kullanımında birçok etik sorunla karşılaşmaktadır. Aynı zamanda immunolojik uyumsuzluk, seçici bir farklılaşmanın sağlanmasının güç olması gibi nedenler biz ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede kısıtlanmıştır(23).

Embriyonik Olmayan Kök Hücreler: Farklılaşmış (özelleşmiş) kaynaklardan elde edilir. Multipotenttirler. Köken aldıkları özelleşmiş doku ve ilişkili diğer dokular gelişir.

Fetüs kök hücreleri: Fetal kök hücreler fetal kan, kemik iliği, karaciğer ve böbrek dahil olmak üzere fetal dokulardan izole edilebilir. Fetal kan, kordon kanı veya yetişkin kemik iliğinden daha hızlı çoğalan zengin bir hemopoietik kök hücresi kaynağıdır. Fetal kök hücrelerin, yetişkin kök hücrelerden daha fazla görünür ancak embriyonik kök hücrelere göre etik açıdan daha tartışmalı olması ve teratokarsinoma oluşturma riski nedeniyle fetüs kök hücreleriyle ilgili yapılan çalışmalar eski hızını kaybetmiştir.

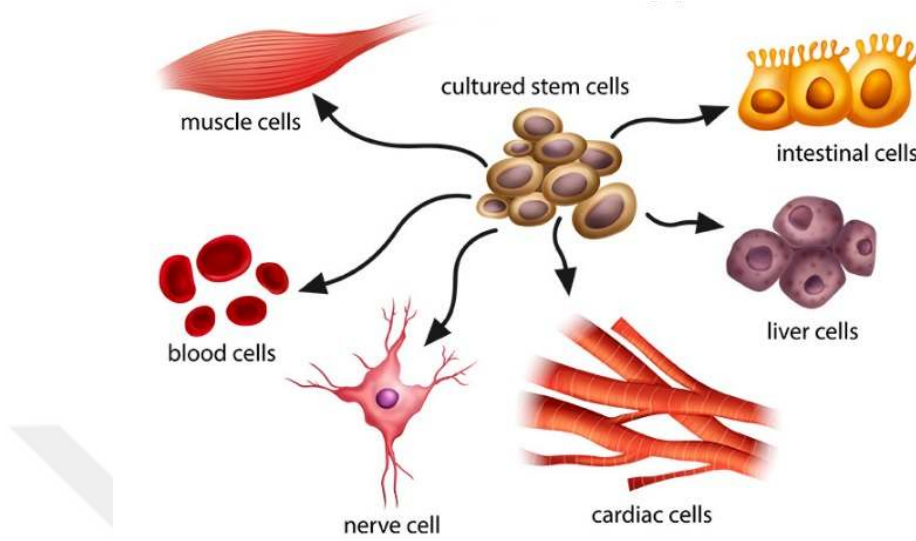
Kadavra kök hücreleri: Kadavralardan elde edilen kök hücreler olup, bu hücrelerin proliferasyon hızları ölen kişinin yaşıyla ters orantılıdır (21).

Embriyonik olmayan kök hücrelerden günümüzde en sık kullanılanı erişkin kök hücreleridir.

Erişkin kök hücreler: Erişkin kök hücreler, doğum sonrası dokularda kendini yenileyebilme ve sınırlı farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu kök hücreler şimdiden insan kemik iliği, kan, beyin, yağ, karaciğer, kas, pankreas ve göbek kordonu kanından türetilmiştir. Erişkin kök hücreleri nihai olarak vücudun her dokusundan türetilbilirken, izolasyon, kullanılabilirlik veya potens özelliğine dayanan ve rejeneratif tıbbı katkıda bulunması muhtemel alt kümeleri bulunmaktadır. Bunlardan kemik iliği ve kan kökenli kök hücrelerin izole edilmesi oldukça kolaydır ve kapsamlı şekilde araştırılmıştır. Her ikisi de kan hücrelerine köken olan hematopoietik kök hücreleri (HKH) ve endotel progenitör hücreleri (EPH) içerir. Başka bir otolog erişkin kök hücre kaynağı yağdır. Lipoaspirat kökenli bu kök hücrelerin multipl fenotiplere farklılaştığı gösterilmiştir(Şekil 2.3).

Erişkin kök hücrelerinin yasayan organizmadaki esas görevleri, bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Organizma yaşlandıkça sahip olduğu progenitor ve kök hücre sayısında azalma meydana gelir. Böylelikle

erişkin dokuda daha az oranda kök hücre bulunması, organizmada yaşla birlikte doku rejenerasyonu ve bazı organ yenilenmelerinde azalma gerçekleşmektedir.



Şekil 2.3. Kök hücre differansiyasyonu

Erişkin kök hücreleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

1. Hematopoietik Kök Hücreler

Kemik İliği Kök Hücreleri

Periferik Kan Kök
hücreleri

Umbilikal Kord Kanı Kök Hücreleri

2. Mezenkimal (Stromal) Kök Hücreler

3. Organlarda yerleşmiş olan diğer erişkin kök hücreleri

Çoğu dokuda erişkin kök hücre bulunmasına rağmen, bu hücrelerden üzerinde en sık çalışılanlar **hematopoietik kök hücreler** ve **non-hematopoietik kök hücrelerdir**.

Hematopoietik Kök Hücreler: Kaynağı kemik iliği, kordon kanı, fetal karaciğer ve periferik kan olan, tüm matür kan hücrelerine farklılaşabilen hücrelerdir. Kendilerini yenileme özellikleri sayesinde, yaşam boyu gerekli olan kan hücresi ihtiyacını karşılarlar. Bu hücreler hematopoietik kök hücreleri tanımlamakta kullanılan Lin, CD38, CD43, CD45RA, CD45RO, CD90, CD59, CD109, CD117, CD166, CD45, CD14, CD133, HLA-DR ve CD34'ü eksprese ederler. İnsan

hematopoetik kök hücreleri için CD34 VE CD90'ın birlikte eksprese edilmeleri yüksek oranda saflık sağlamaktadır (10,26,28,31,69).

Hematopoetik kök hücrelerin kendini yenileme ve differansiye olma özellikleri yanında, migrasyon yapabilme ve apoptoza uğrama özellikleri de vardır. Tüm bu özellikler sayesinde vücutta bulunan hematopoetik kök hücre sayısı dengelenmektedir (82).

Hematopoetik kök hücreler bulundukları doku dışında, diğer dokularda bulunan kök hücre tiplerine de farklılaşabilirler. Bu hücrelerin kas (kalp ve iskelet kası), karaciğer, akciğer, deri, böbrek, beyin, bağırsak, pankreas, kemik, kırıkta ve endotel hücrelerine differansiye olabildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4,82).

Hematopoetik kök hücrelerde proliferasyon, rejenerasyon ve farklılaşma, intrinsek ve ekstrinsek sinyaller tarafından yönlendirilir. Yapılan çalışmalarda Notch sinyal yolağı, kemik morfogenetik protein (BMP), Wingless (Wnt) sinyal yolağı, fibroblast büyüme faktörü (FGF), sonic hedgehog geni, damarsal ve osteoblastik mikroçevrenin rejenerasyon ve farklılaşma mekanizmalarını kontrol ettiği gösterilmiştir. Bunlardan Wnt sinyal yolağı, sonic hedgehog geni ve FGF hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonunda ana görevi üstlenirken, Notch sinyal yolağı ve BMP hücrelerde rejenerasyonu artırıcı rol oynarlar, ancak aynı zamanda hücrelerin proliferasyonunu inhibe ederler. Son yapılan çalışmalarda hücrelerin transdifferansiasyonunun, kendisinin değişimi yerine başka bir non-hematopoetik hücre ile füzyonu sonucu oluştuğu yönünde veriler de elde edilmiştir (82).

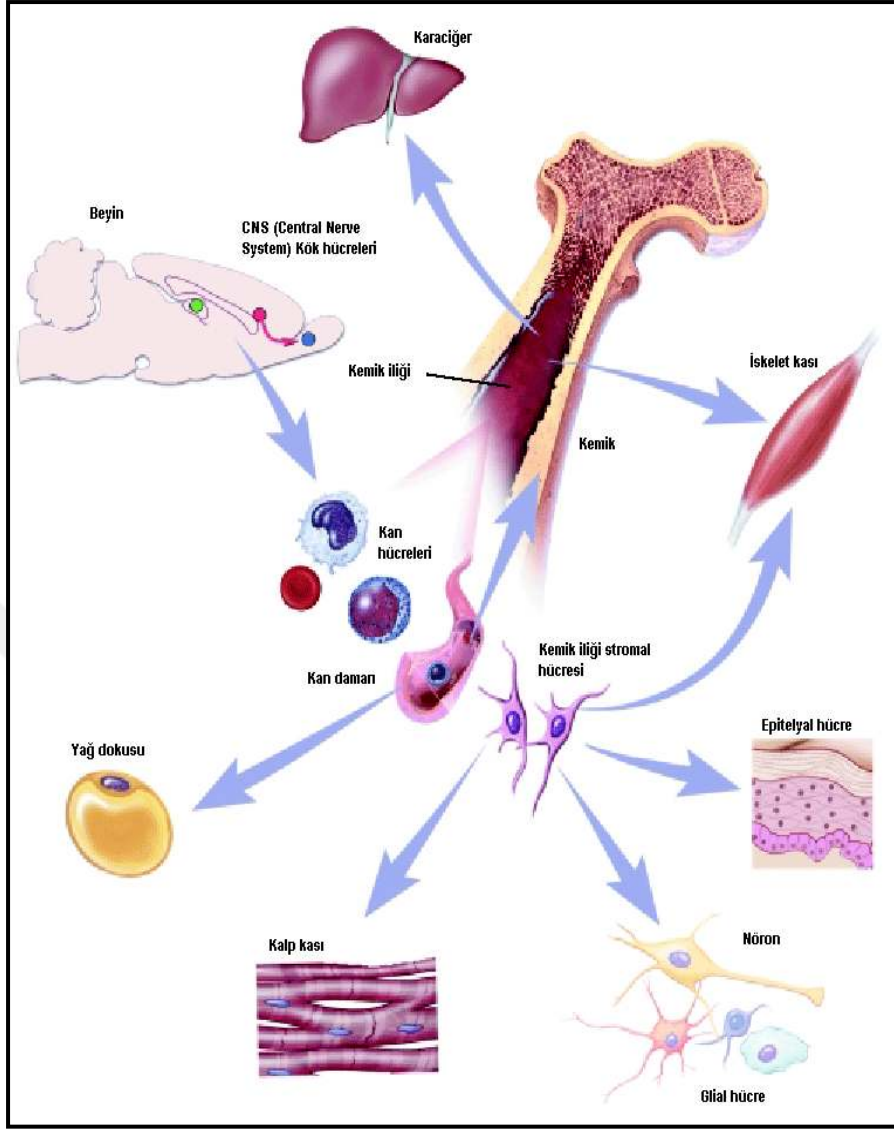
Non-Hematopoetik Kök Hücreler: Bu kategori altında bulunan hücreler mezenkimal kök hücreler ve organlarda bulunan kök hücrelerdir. Nöral kök hücre, adipozit kök hücresi, epidermal kök hücre, sindirim epiteli kök hücresi ve kardiyomyosit kök hücresi gibi hücreler organlarda bulunan kök hücrelerdir. Son yıllarda bu gruba kanserin başlamasından sorumlu kanser kök hücresi de dahil edilmiştir (16).

Günümüzde rejeneratif dişhekimliğinde en yaygın kullanılan kök hücre çeşitleri, non-hematopoetik kök hücre grubunda yer alan mezenkimal kök hücrelerdir (MKH).

Mezenkimal Kök Hücreler: Mezenkimal kök hücreler, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan, multipotent, uzantılı fibroblast benzeri hücrelerdir (16,21,28). Mezenkimal kök hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır (29). Bu hücreler birçok dokudan elde edilebilen, in vitro ortamda çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücrelerdir. Tüm dokularda stromal hücrelerin kökenini bu hücreler oluşturduğu için destek hücresi olarak da adlandırılabilirler (22).

Mezenkimal kök hücrelerin ana kaynağı kemik iliği olmakla birlikte bu hücreler kordon kanı, kordon stroması, yağ dokusu, maksillofasiyal dokular, karaciğer, diş pulpası, kemik trabeküler dokusu, tendonlar, sinoviyal membran, plasenta, lipoaspirasyon materyalleri, amniyon sıvısı, periost, kas ve Wharton jeli gibi birçok farklı dokudan elde edilirler (16,21,22,28,29,126). Yapılan çalışmalarda periferik kandan da mezenkimal kök hücre karakterinde non-hematopoetik kök hücreler izole edilmiştir (21). Bu hücreler bulundukları dokularda genellikle prevasküler nişlerde yer alırlar.

Kemik iliği 3 temel elemandan oluşmaktadır. Bunlar mezenkimal kök hücreler, hematopoetik elemanlar ve endotelial hücreler (angiogenik prekürsör hücreler - angioblastlar) olarak belirtilmiştir (28). Mezenkimal kök hücreler kemik iliği stromasını oluşturan hücrelerdir (131). Bu hücreler CD34+ hematopoetik progenitör hücrelerin differansiasyonunu desteklerler. Endotelial hücreler dolaşımda da bulunan ve damarlardaki olgun endotel hücrelerini oluşturan hücrelerdir (146). Kemik iliğinde aynı zamanda non-hematopoetik hücrelerden fibroblastlar, osteoblastlar, adipositler ve kemiğin diğer hücresel elemanları da bulunmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kemik iliği kökenli MKH'ler ile hematopoetik kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin şematik gösterimi

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik, yağ dokusu, ligament, tendon, kıkırdak, iskelet kaslar ve bağ dokusu stromalarını oluşturan hücrelere differansiye olma yeteneğine sahiptirler (28). Uygun laboratuvar şartları sağlanırsa, epitelyal hücrelere ve nöroektoderm kökenli hücrelere de farklılaşabilirler (29).

MKH'ler, ekstraselüler ve intraselüler matriks ile yakın ilişkide bulunurken aynı zamanda immunojenik ve rejeneratif olaylarda rol almasını sağlayan çok çeşitli biyoaktif makromolekül ve sitokin, kemokin, büyüme faktörleri gibi çözünür faktörler sentezlemektedirler. Kök hücreler hasarın olduğu bölgeden salınan monosit kemoatraktan protein (MCP-1), stromal kökenli faktör-1 (SDF-1) gibi faktörler aracılığı ile nişlerinden çıkıp hasarlı bölgeye göç edebilir ve hasarlı hücre ile füzyon yapabilirler.

Bağ dokusunda oluşan herhangi bir hasar sonrası, onarım mekanizmasında etkin role sahip MKH'lerin sayısı, bölünme kapasitesi ve fonksiyonel genlerin çeşidi yaşla ve sağlık durumu ile değişmektedir (24).

MKH'lerin fenotipik özelliklerini tanımlamak için yapılan çalışmalarda, farklı laboratuvarlarda bu hücrelerin dokulardan izolasyonu, çoğaltılması ve farklılaştırılması ile ilgili farklı yöntemler izlenmektedir. Bunların sonucu olarak kültür ortamında antijenik özelliklerde bazı değişimler olduğu, in vivo ortam ile kültür ortamında birbirinden farklı oldukları saptanmıştır (27).

Kök hücrelerin terapötik kullanımı için, farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları bilinmeli ve hastaya en uygun tedavi belirlenmelidir.. Bu amaçla Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği, insan mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için bazı kriterler belirlemiştir (21).

2.1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması

MKH'ler kültür ortamında, ışık mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu ile incelendiklerinde, hücrelerin iğ şeklinde morfolojiye sahip oldukları olduğu gözlenmiştir. Bu hücreler fibroblastlara benzemekle birlikte, nükleuslarının yerleşimleri fibroblastlar gibi asimetric değil, simetridir (143). Kültür ortamında çoğaltılmış olan mezenkimal kök hücreler kas, epitel ve endotel hücrelerine benzer bir fenotipte de görülebilirler. MKH'ler yüksek telomeraz aktivitesine sahip hücreler olmakla birlikte, hücrelerin telomer uzunlukları kısadır (143).

MKH'lerin tanımlanmasında kullanılan başlıca kriterler aşağıda görölmektedir (Tablo 2.1):

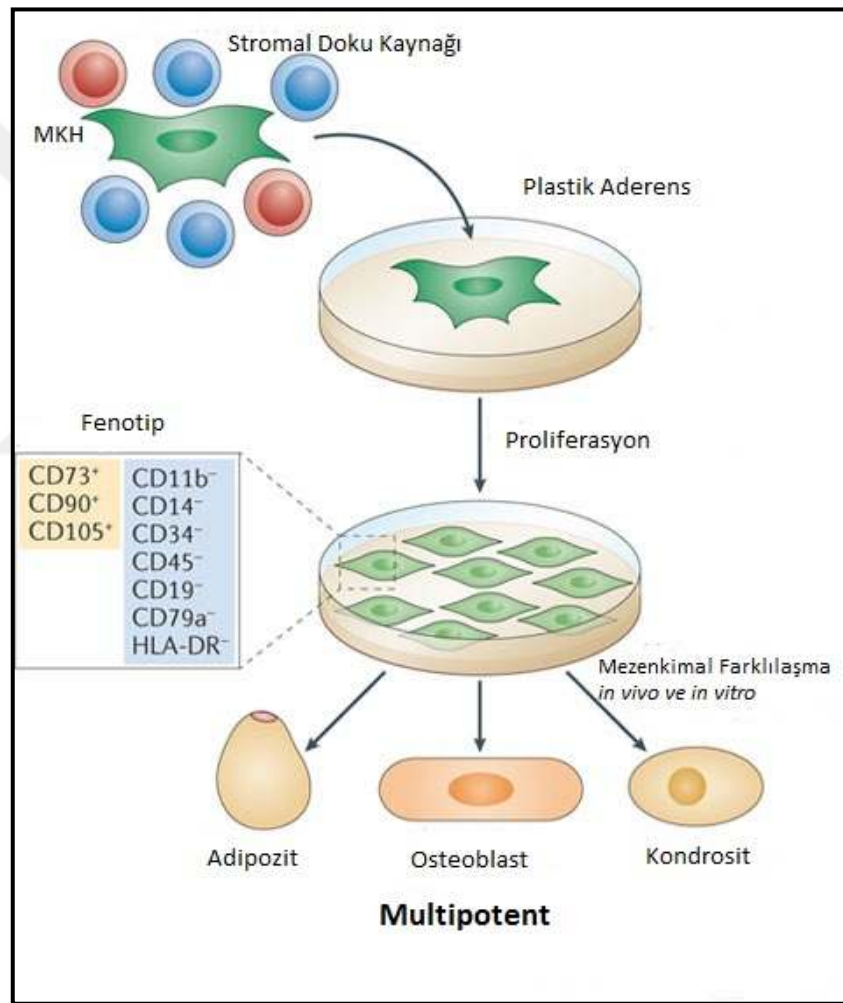
Tablo 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmasında kullanılan kriterler

1. Standart kültür şartlarında plastik adherensi olması		
2. Fenotip	Pozitif ($\geq 95\% +$)	Negatif ($\leq 2\% +$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 veya CD11b
		CD79 α veya CD19
		HLA-DR

3. İn vitro differansiasyon: osteoblast, adipozit, kondroblast

1. Plastik Adherens:

MKH'lerin izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin bazılarının plastik hücre kültür kaplarına adhezyon özelliklerinin olduğu, bazılarının ise bu özelliğe sahip olmadığı gözlenmiştir (21,143). Mezenkimal kök hücreler plastik adherens özelliğine sahip oldukları için standart kültür şartlarında plastik kültür doku kaplarına yapışırlar; ancak özel koşullar sağlanırsa, kültür ortamında yapışma olmadan da çoğalabilirler (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. MKH'lerin kültür ortamında plastik adherens ve fenotipik özellikleri

2. Spesifik Yüzey Antijenlerinin Ekspresyonu:

Bir kök hücrenin kimliğini belirlemek için intraselüler adezyon ve sinyal yolağı molekülleri gibi hücre yüzeylerinde bulunan belirteçlerden yararlanılmaktadır. Farklanma kümeleri (Clusters of differentiation, CD), enzimler,

büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörleri bu belirteçler arasında yer alırlar. (146)

MKH tanımlanmasında en sık kullanılan belirteçler CD44, CD13, CD29, CD51, CD71 (transferrin reseptör), CD73 (SH3/4), CD105 (SH2), DD106, CD166, CD54 (ICAM-1), CD39, CD49a, STRO-1, Nanog, beta2 integrin, CD117 ve CD90 (thy-1)'dir. Bu hücreler miyofibroblastlar gibi α -SMA (α -Smooth Muscle Actin) ve vimentini de eksprese ederler. Farklı dokulardan elde edilen MKH'ler fenotipik olarak benzerlik göstermekle birlikte, yüzey antijenleri açısından bazı farklılıklara sahip olabilirler. Örneğin kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin yüzeyinde CD106 bulunurken, bu hücreler CD49d açısından negatiftir. Yağ dokusu kaynaklı MKH'lerde ise bunun aksine CD49d pozitif, CD106 negatiftir.

Mezenkimal kök hücreler, hematopoetik kök hücre antijeni taşımazlar. Bu hücre grubunda CD14, CD34, CD45, CD79 α , CD11b, HLA sınıf II ve CD19 gibi hematopoetik kök hücre belirteci varlığının %2'den az olması rekmetedir. Mezenkimal kök hücreler ayrıca endotelyal hücre belirteci CD31 ve lenfosit hücre belirteci olan CD11a/LFA-1'e karşı da negatiftir (143,146).

Mezenkimal kök hücreler dokularda destek hücresi görevi görürler. Bu nedenle çok sayıda enzim, sitokin, kemokin, ekstrasellüler matriks proteinleri ve biyoaktif molekül salgırlarlar. Salgıladıkları ekstrasellüler matriks proteinleri fibronektin, laminin, kollajen ve proteoglikanlardır. Salgıladıkları sitokinler ise İnterlökin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, Flt-3 ligand, Kök Hücre Faktörü-Stem Cell Factor (SCF) ve Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF)'dir. Bu hücrelerin bulundukları kültür ortamlarına IL-1 α ilave edilirse, Lösemi İnhibisyon Faktörü (LIF), IL-1, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) ve Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) salgılama kabiliyeti (21,22,143) kazanırlar (Tablo 2.2-2.4).

Mezenkimal kök hücrelerin komşu hücelere ve hücre dışı matriks elemanlarına adhezyon özellikleri çeşitli adhezyon molekülleri ile sağlanır. Bu adhezyon molekülleri; Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü-1 [VCAM-1 (CD-106)], Hücreler Arası Adhezyon Molekülü-1 [ICAM-1 (CD54)] ve L-Selektin (CD2L)'dir (21,22,143).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy, ISCT) mezenkimal kök hücre popülasyonunda, bu hücreleri tanımlamada kullanılan belirteçlerden CD90 (thy-1), CD105 (Endoglin) ve CD73 (ekto-5-

nükleotidaz)'ün pozitiflik oranının %95 ve üzerinde olması gerektiğini bildirmiştir (21,22,143).

Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri-1

Antijen	CD Numarası	Ekspresyon
Hematopoietik kök hücre belirteci	CD34	Negatif
Leukocyte common antigen	CD45	Negatif
LPS Reseptör	CD14	Negatif
T lenfosit belirteci	CD3	Negatif
B lenfosit belirteci	CD19	Negatif
HLA-DR		Negatif
Lewis X	CD15	Negatif
T6	CD1a	Negatif
Endoglin (SH2)	CD105	Pozitif
5' terminal nükleotidaz	CD73	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif
Thy-1	CD90	Pozitif

Tablo 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri-2

Büyüme faktörü ve sitokin reseptörleri	CD Numarası	Ekspresyon
Interleukin-1 reseptör	CD121	Pozitif
Interleukin-2 reseptör	CD25	Negatif
Interleukin-3 reseptör	CD123	Pozitif
Interleukin-4 reseptör	CD124	Pozitif
Interleukin-6 reseptör	CD126	Pozitif
Interleukin-7 reseptör	CD127	Pozitif
Interferon γ reseptör	CDw119	Pozitif
Tümör nekroz faktör alfa reseptör	CD120	Pozitif
Fibroblast büyüme faktör reseptör		Pozitif
Platelet kaynaklı büyüme faktör reseptör	CD140a	Pozitif
Transferrin reseptörü	CD71	Pozitif

Tablo 2.4. Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları adezyon molekülleri

Adezyon Molekülü	CD Numarası	Ekspresyon
ALCAM	CD166	Pozitif
ICAM-1	CD54	Pozitif
ICAM-2	CD102	Pozitif
E-Selektin	CD62E	Negatif
P-Selektin	CD62P	Negatif
L-Selektin	CD62L	Pozitif
VCAM	CD106	Pozitif
Hyaluronate Reseptör	CD44	Pozitif
NCAM	CD56	Pozitif
LFA-3	CD58	Pozitif
LFA-1 α	CD11a	Negatif
LFA-1 β	CD18	Negatif
Cadherin 5	CD144	Negatif
PECAM-1	CD31	Negatif
VLA- α 1	CD49a	Pozitif
VLA- α 2	CD49b	Pozitif
VLA- α 3	CD49c	Pozitif
VLA- α 4	CD49d	Negatif
VLA- β	CD29	Pozitif
Beta 4 integrin	CD104	Pozitif

ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
ICAM	Intercellular adhesion molecule
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late antigen
LFA	Lymphocyte function-associated antigen-1
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
NCAM	Neural cell adhesion molecule

3. Multipotent Farklılaşma Kapasitesi:

Mezenkimal kök hücreler, uygun çevre koşullarında kendileri gibi mezoderm kökenli olan adipozit, fibroblast, osteoblast, kondroblast ve iskelet myoblastlarının yanı sıra endotel, nöroektoderm ve endoderm kökenli hücrelere de farklılaşabilirler ve hematopoetik stroma oluşturabilirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin hepatosit, epiteloid, pankreas beta hücreleri, kardiyak ve nöronal hücrelere (nöron, glial hücre, astrosit) de farklılaşabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle bu hücreler multipotent hücre sınıfında yer almaktadırlar (21,138,143,145,).

Kök hücre plastisitesini, hücre içi ve hücre dışı sinyaller belirlemektedir. Hücre dışı sinyaller kök hücre nişinde bulunan moleküller, diğer hücrelerden salgılanan biyokimyasallar ve komşu hücrelerle olan fiziksel temastır. Hücre içi sinyaller ise hücrenin DNA'sı üzerinde bulunan ve hücrenin işlevleri için gerekli olan bilgileri taşıyan genlerdir (22).

Yapılan çalışmalarda ekstrasellüler matriks molekülleri (kollajen, proteoglikanlar gibi), aktin sitoskeleton ve hücre içi transkripsiyon faktörleri (Cbfa1/Runx2, PPAR γ , Sox9 ve MEF2), hücrelerden salgılanan moleküller ve onların reseptörlerinin (dönüştürücü büyüme faktörü- β gibi) kök hücre plastisitesinde rol oynadıkları gösterilmiştir (126).

Bir kök hücrenin plastisitesini açıklayan 5 farklı mekanizma bulunmaktadır:

- 1. Transdifferansiasyon:** Farklılaşmış bir hücrenin, başka dokuya ait farklılaşmış bir hücrenin fenotipik özelliklerini kazanmasıdır.
- 2. Dediferansiasyon:** Olgunlaşmış bir hücrenin progenitör bir hücreye farklılaşmasının ardından, bu progenitör hücrenin farklı bir hücre dizinine differansiye olmasıdır.
- 3. Transdeterminasyon:** Bir kök hücrenin, başka bir dokuya ait kök hücreye differansiye olmasıdır.
- 4. Hücre füzyonu:** Kök hücrelerin, yönlenmiş hücre dizileriyle birleştirilmesi sonucu hücrede yeni bir programlama gerçekleşir ve yönlenmiş yeni hücre serileri meydana gelir.
- 5. Totipotent veya pluripotent bir kök hücreden, multipotent bir doku hücresinin gelişmesidir.**

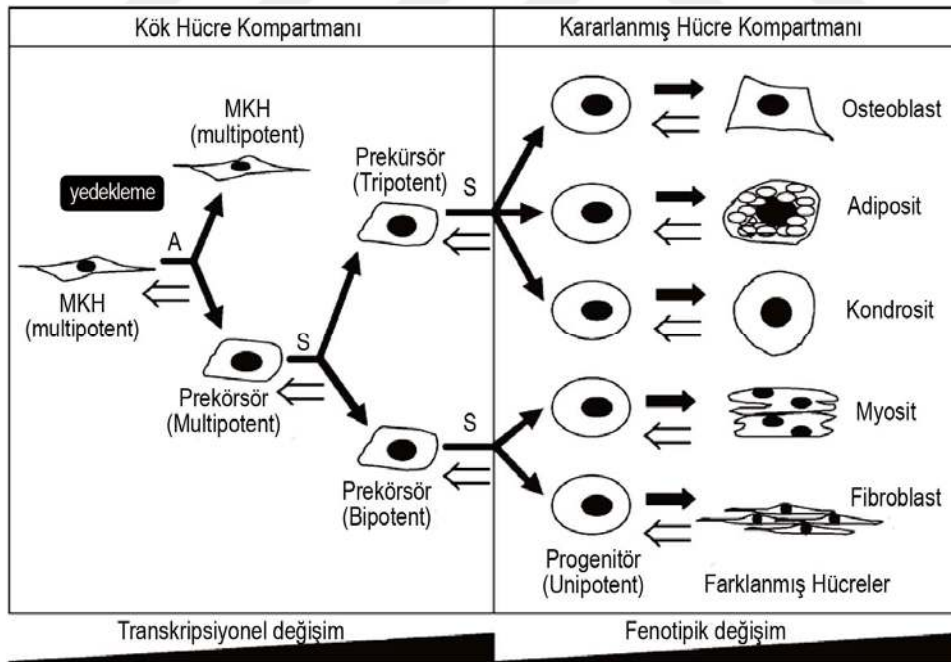
Kök hücre nişi, kök hücrelerin bölünerek çoğaldığı, kök hücre özelliklerini sürdürdükleri ve farklılaşma aşamalarına girdikleri heterojen hücre toplulukları,

ekstrasellüler matriks ve çözünebilir faktörlerin bulunduğu mikroçevre olarak tanımlanmaktadır (126).

Mezenkimal kök hücreler, farklılaşma uyarısından sonra, nişlerinden çıkarak differansiasyona uğrarlar. Bu durumu açıklayan iki model bulunmaktadır. Bir modele göre, MKH'lerin farklılaşması kök hücre nişinde başlar. Hücre uyarının etkisiyle birlikte transkripsiyonel değişim sonrası asimetrik bölünme ile bir adet multipotent prekürsör hücre, bir adet de kendisinin aynısı kök hücre oluşur.

Transkripsiyonel değişim sırasında hücrelerin fenotip ve rejenerasyon kapasitelerinde değişiklik görülmez. Daha sonra gerçekleşen bölünmeler, hücre kompartmanında ileri doğru farklılaşmalardır. Bu sürecin sonunda matür yapıdaki hücreler oluşur. Tüm bu süreç, ters yönde de gerçekleşebilir, yani geriye doğru gidebilir. Bu olaya dedifferansiasyon adı verilir. (22,138)

Fenotipik değişimler, farklılaşma süreçlerinin son aşamasına kadar sabit kalmakla birlikte, son aşamada oldukça belirgin hale gelir; gen transkripsiyonu ise süreç boyunca giderek artmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Baksh ve arkadaşlarının önerdiği farklılaşma modeli

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'ne göre bir hücrenin mezenkimal kök hücre olarak tanımlanabilmesi için standart in vitro kültür koşullarında osteoblast, adiposit ve kondroblastlara differansiye olması gerekmektedir. Osteoblastlara

farklılaşma Alizarin Red veya Von Kossa boyamaları ile, adipozitlere farklılaşma Oil Red O boyaması ile, kondroblastlara farklılaşma ise Safranin-O, Alcian mavisi veya immunohistokimyasal kollajen tip II boyası ile gösterilir (21,22,138,146).

2.1.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzole Edilmesi ve İn Vitro Ortamda Çoğaltılması

Dokularda bulunan MKH'lerin sayısal azlığı ve adhezyon özellikleri nedeniyle elde edilmeleri zordur. Bu nedenle mezenkimal kök hücrelerin hem araştırmalarda, hem de tedavi amacıyla kullanımları öncesi, in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Mezenkimal kök hücreler, in vitro ortamda çoğaltıldıklarında, kendini yenileme ve başka hücelere differansiye olma özelliklerini kaybetmezler (33,44,59).

Heterojen hücre topluluklarından mezenkimal kök hücrelerin izole edilebilmesi için 4 yöntem kullanılmaktadır:

1. Floresanla aktive hücre ayırma (FACS): Günümüzde büyük bir hücre grubu içinde yer alan çok az sayıdaki kök hücreyi tanımlamada 'Floresanla aktive hücre ayırma (FACS)' yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde hücre yüzey proteinleri, akım sitometrisi kullanılarak, floresan boyalarla işaretli monoklonal antikorlar yardımıyla tanımlanırlar (22).

2. İmmünomanyetik ayırma yöntemi

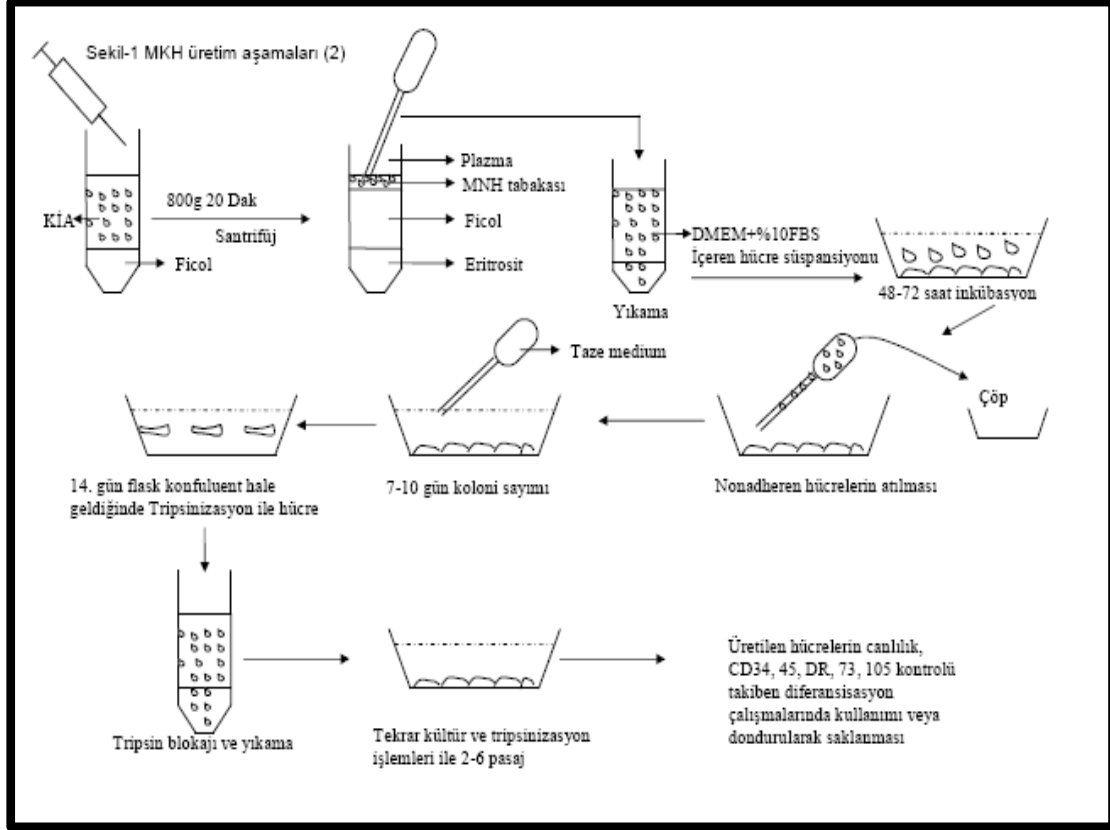
3. İmmunohistokimyasal boyama

4. Fizyolojik ve histolojik kriterler: Fenotip, kemotaksis, proliferasyon, differansiasyon, mineralizasyon aktivitesi gibi özelliklerdeki farklılıklar yardımıyla hücreleri ayırma (22).

Mezenkimal kök hücrelerin çoğaltılmasında besiyeri olarak DMEM-LG veya alfa-MEM kullanılmaktadır (21,22). Solid bir doku kullanılacaksa hücre süspansiyonu hazırlanır. Hücrelerin çoğaltılması için serum içeren bir ortam yeterli olmakta, ayrıca büyüme faktörlerinin eklenmesine gerek olmamaktadır (138).

Mezenkimal kök hücreler, standart kültür koşullarında, plastik kültür doku kaplarının tabanına saatler içinde yapışmaya başlarlar. 24-48 saat içinde yapışmayan hücreler ortamdan uzaklaştırılır ve çoğalan hücreler %0,2 trypsin-EDTA

ile muamele edilerek yapıştıkları yerden kaldırılır, düşük konsantrasyonlarda yeni kültür kaplarına ekilirler. İstenen hücre sayısını elde edebilmek için hücreler 10 günde bir pasajlanırlar, bu sırada gün aşırı taze besiyeri eklenir. Elde edilen hücrelerin daha sonra kullanılmaları gerekiyorsa, bu hücreler dondurularak saklanabilirler (21,24,144)(Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Mezenkimal Kök Hücre Üretim Aşamaları

2.1.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanım Açısından Avantaj ve Dezavantajları

Mezenkimal kök hücreler, bireyin kendisinden elde edildiklerinden, tedavi için kaynak bulma sorunu yoktur. Bu hücrelerin kullanımında etik sorun olmaması nedeniyle araştırmaya yönelik kullanım kısıtlaması bulunmamaktadır. Bu hücreler elde edildikten sonra sıvı nitrojen tanklarında dondurularak saklanabilir (kriyoprezervasyon) ve gerekli koşullarda tekrar kullanılabilirler(22).

Birçok biyoaktif makromolekül ve sitokin, kemokin, büyüme faktörleri gibi kimyasallar salgılayan bu hücrelerin, dokudaki hasarlı hücrelerle füzyon kabiliyetleri vardır. Bu nedenlerle doku tamir mekanizmalarında önemli rol oynamaktadırlar (22).

Mezenkimal kök hücrelerin immünojeniteleri düşüktür. Bu hücreler B lenfositleri inhibe edip, hücre-hücre etkileşimi veya salgıladıkları faktörler yoluyla T lenfosit aktivasyonunu engellerler; ancak regülatör T lenfositleri uyarırlar. Bu sayede lenfositlerin çoğalması engellenir ve immünsüpresif etki ortaya çıkar. Alıcıda gelişebilecek olan enflamasyon ve immünolojik olaylar baskılanır. Mezenkimal kök hücrelerin, HLA tip-II reseptörlere sahip olmadıklarından dolayı, in vitro ortamda doğal öldürücü hücreler ve sitotoksik T hücreleri tarafından ortadan kaldırılamadıkları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (138,144,146).

Mezenkimal kök hücrelerin kullanımının birçok avantajları olmasının yanı sıra, bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu hücreler, dokudan elde edildiklerinde sayıları oldukça azdır. Bu nedenle kültür ortamında çoğaltılma işlemleri için haftalar geçmesi gerekmektedir. Bu durum ciddi bir zaman kaybına yol açar ve önemli bir maliyet gerektirmektedir. Aynı zamanda hücrelerin çoğaltılması için alt yapı ve deneyimli personele ihtiyaç vardır (18).

Kök hücreler elde edilmeleri sırasında vücut dışına çıkarıldıkları için dış etkenlere açık hale gelmektedirler. Kültür işlemleri sırasında hücrelerin büyüme ve farklılaşma mekanizmalarında değişiklikler olabilmekte ve buna bağlı olarak hücrelerin karakterlerinde de birtakım sapmalar ortaya çıkmaktadır (144).

Hücrelerin çoğaltılmaları sırasında pasaj sayılarının artması, hücrelerde strese yol açmaktadır. Buna bağlı olarak hücrelerin multipotent özelliklerinde ve kendini yenileme kapasitelerinde azalma görülür. Bununla birlikte, diğer kültür çalışmalarında olduğu gibi kontaminasyon riski bu tip çalışmalarda da bulunmaktadır. Bakteri, virüs ve diğer patojenler ile kontaminasyon sonucu, hücrelerin nakledildiği alıcı dokularda enfeksiyon oluşabilmektedir. Hücrelerin kültür ortamında yaşlanması, kanser gelişimi, kök hücrelerin eldesi sırasında gerçekleştirilen cerrahi işlem sonrası donör bölgede enfeksiyon gelişimi riski, tedavi amacıyla kullanımları için ideal olan hücre dozu, uygulama zamanı, şekli ve yeri gibi konuların tam olarak açığa kavuşmuş olmaması gibi durumlar da dezavantajlar arasında sayılabilir (21,138,144,146).

2.1.7. Periferik Kan Mononükleer Hücreler (PKMH)

İnsan periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) periferik kandan izole edilir ve yuvarlak bir çekirdek (yani, lenfositler, monositler, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) veya dendritik hücreler) bulunan herhangi bir kan hücresi olarak

tanımlanır. Kırmızı kan hücrelerine ve granüositlere (nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller) karşılık gelen hücre fraksiyonu yoğunluk gradyanı santrifüjüyle tam kandan çıkarılır. 1.077 g / ml yoğunluğa sahip bir degrade ortam, tüm kanı iki fraksiyona ayırır; PKMH'ler, düşük yoğunluk fraksiyonunda (üst fraksiyon) kalan hücrelerin popülasyonunu oluştururken, kırmızı kan hücreleri ve PKMH'ler daha yüksek bir yoğunluğa sahiptir ve daha düşük fraksiyonda bulunur(62).

PKMH'ler, lenfositleri (T hücreleri, B hücreleri ve NK hücreleri), monositleri ve dendritik hücreleri içerir. İnsanlarda bu popülasyonların oranı bireyler arasında değişir, ancak dendritik hücreler % 1-2'lik bir oranda bulunurken, tipik olarak lenfositler% 70-90 arasında, monositler de %10-20 arasında bulunurlar. Lenfosit popülasyonu içindeki hücre tiplerinin frekansları %70-85 CD3 + T hücreleri, % 5-10 B hücreleri ve % 5-20 NK hücreleri içerir. CD3 + lenfositleri yaklaşık 2: 1 oranında CD4 + ve CD8 + T hücrelerinden oluşur. Aktivasyon sonrası CD4 + T hücre alt kümesi, Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, folliküler yardımcı (Tfh) hücreleri ve farklı düzenleyici hücre türleri de dahil olmak üzere çeşitli efektör hücre alt gruplarına dönüşebilir (153-156). CD4 + yardımcı T hücreleri immün homeostazın ve inflamasyonun vazgeçilmez araçlarıdır(157).

2.1.7.1. Dendritik Hücreler

Ralph Steinman ve Zanvil Cohn tarafından 1970'lerin sonunda keşfedilen dendritik hücreler (DH), immün yanıtın düzenlemesinde önemli rolü olan kemik iliği kökenli antijen sunan hücreler(ASH) olup primer immün yanıtı meydana getirmek üzere henüz farklılaşmamış T lenfositleri ve humoral immünitinin aktivasyonu için B lenfositleri uyarır (89).

Yapılan çalışmalarda DH'lerin antijen sunumunda başlıca mekanizma olduğu bilinen MHC molekülünü yüksek oranda taşıdıkları 1978 yılında T lenfositler ile "karışık lenfosit reaksiyonu" yapılarak doğrulanmıştır. Karışık lenfosit reaksiyonu DH'lerin MHC molekülünü kullanarak T hücrelerine antijen sunumu yapabilme ve özgün antijeni tanıyan T hücreleri aktive edebilme yeteneklerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (86).

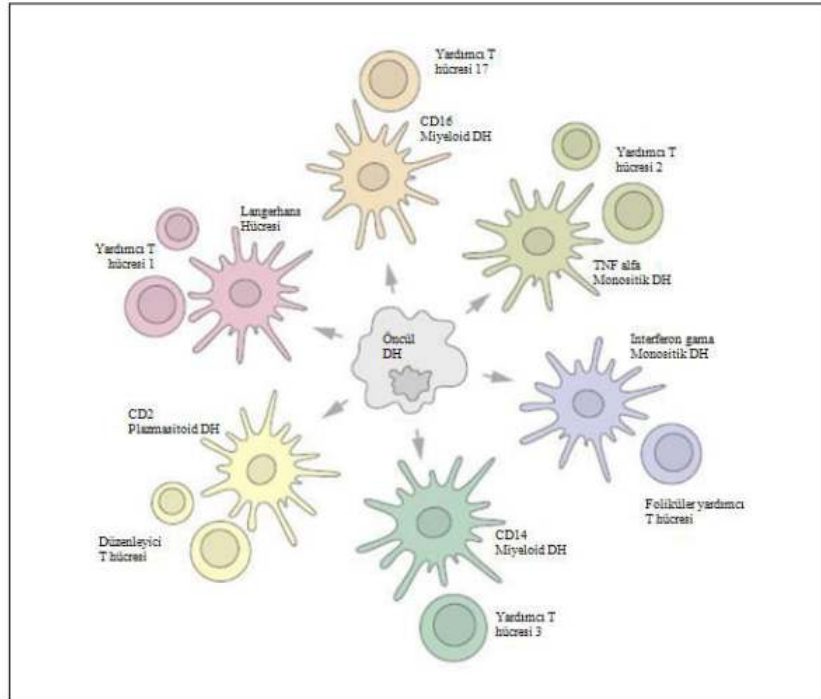
DH'ler yabancı antijenlere karşı immune yanıtı başlatabilen ve düzenleyen özel bir yeteneğe sahiptir. DH'ler aynı zamanda vücudun kendi antijenlerine karşı T hücre toleransında da önemli bir role sahip olup böylece otoimmün reaksiyonların indüksiyonunu engellemektedir (91). DH'ler, kemik iliğinde CD34+

hematopoetik kök hücrelerden köken almaktadır. CD34+ hücreler lenfoid öncül hücreleri (CLP) ve miyeloid öncül hücrelerine (CMP) farklılaşmaktadır(19). Miyeloid öncül hücrelerinin farklılaşması ile deri dermisinde yerleşik olgunlaşmamış CD11c+/CD1a- DH alt tipi, veya CD11c+/CD1a+ deri epidermisinde yerleşik Langerhans hücreleri oluşmaktadır(149). Miyeloid öncül hücreleri, DH öncül hücre alternatifi olarak görev yapan monositleri de oluşturmaktadır. Lenfoid öncül hücreleri ise plazmasitoid DH (pDH) alt tipini oluşturmaktadır(19). DH'ler oldukça heterojen bir gruptur. Birçok organın bağ dokusunda bulunmaktadır.

Lenfoid organlarda DH'lerin tanımlanmasından kısa süre sonra epidermal Langerhans hücrelerinin (ilk olarak 1868 yılında Paul Langerhans tarafından tanımlanmıştır) DH'lerle çeşitli immünojenik özellikleri paylaştığının farkedilmesi, DH ailesine ait birden fazla şube bulunabileceği fikrine yol açtı.

2.1.7.1.1. Dendritik Hücre Fenotipi, Dağılım ve Alt Çeşitleri

Dendritik hücreler Flt3L ve GM-CSF gibi büyüme ve farklılaştırma faktörlerine cevap olarak kemik iliğinde üretilen heterojen bir hücre grubudur. Dendritik hücrelerin alt tiplerinin şematize edilmiş hali Şekil 2.8'de görülmektedir.



Şekil 2.8. Dendritik hücre alt tipleri ve etkileşimde bulundukları T hücre çeşitleri

DH'ler insan kanında taşıdıkları CD11, CD1 β ve langerin seviyelerine göre miyeloid ve plazmasitoid olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadırlar (53). Miyeloid ve plazmasitoid DH'ler fenotipik özellikleri, farklı öncüllerden türev almaları ve taşıdıkları TLR tiplerine göre birbirlerinden ayrılmaktadır, (56,57). Fenotipik olarak pDH'ler genellikle küçük, küresel ve plazma hücresine benzer özelliktedir, konvansiyonel DH'ler ise birçok sitoplazmik çıkıntıya sahip olmaları ile karakterizedir. Miyeloid DH'ler miyeloid seriden pDH'ler ise lenfoid seriden köken alırlar (65).

Periferik kan DH-öncül alt tipleri GM-CSF ve IL-4 etkisi altında konvansiyonel miyeloid DH'lere farklılaşabilmektedir. Miyeloid DH'lerin monosit, makrofaj ve granülositler ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kandaki tüm DH alt tiplerini oluşturabilen ortak bir DH öncülünün olduğunu savunan alternatif bir hipotez de bulunmaktadır (73). Fakat, genel kanı kan monositlerinin dokular arası hareket ederek bir uyarı ile DH'lere farklılaştığı üzerinedir.

Makrofajlar da GM-CSF uyarısı ile yüksek oranda üretilebilen hücrelerdir ve güçlü yapışan özellikleri sayesinde DH'lerden kolayca ayırt edilebilmektedirler. DH'ler düşük oranda yapışan hücrelerdir. KiDH'leri kolay elde edilebildikleri ve kültüre edildikleri için çalışmalarda tercih edilmektedirler (70).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalara göre, monosit kökenli DH'ler (moDH) DH ağının gerçek bileşenleri olarak tanımlanmaktadır fakat sadece inflamasyon bölgelerinde görülmektedir. Bu da, moDH'lerin enfeksiyon olgularında immün yanıt etkili bir biçimde yöneterek iltihaplanmada önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak moDH'lerin DH topluluğu içerisinde antijen sunabilen ve koruyucu bir bağışık yanıt sağlayacak antijen özgün T hücreler oluşturabilen DH tipi olduğu ortaya koyulmuştur (76).

İnsan kanında çeşitli tiplerde DH tipleri tanımlanmıştır, CD34(+), CD16(+), BDCA1 (+), BDCA3 (+) ve CD123(+) plazmasitoid DH'leri olarak en az beş alt tip sayılabilmektedir, (80).

Langerhans Hücreleri (LH):

Periferden vücudun kendi antijenleri ve yabancı antijenleri içeren antijenleri yakalayarak lenf düğümlerine göç etmek ve T hücrelerine antijen sunmak üzere özelleşmiş antijen sunan hücrelerdir (82).

Langerhans hücreleri yaklaşık olarak 12-15 μ m çapta, düzensiz şekilli nukleusa sahip berrak sitoplazmalı hücrelerdir. HE boyasında ve anti S-100

immünohistokimyasal incelemesinde, epidermiste bazal tabakanın üstünde, melanositlerden çoğunlukla ayırt edilebilecek bir pozisyonda yer alırlar. Ayrıca pilosebase ünitede, folikülün infundibular bölgesinde de bulunurlar (101). Langerhans hücreleri ayrıca oral kavite, gastrointestinal kanal, solunum yolu, timüs, kadın genital traktında tespit edilmiştir. Elektron mikroskopik olarak Langerhans hücreleri pek çok organel içerir, bunlardan en tipik olanı; çubuk veya tenis raketi şekilli değişik boyutlardaki Birbeck granülleridir. Bu granüller ilk defa 1961 yılında Birbeck tarafından tanımlanmış ve onun adını almıştır. Langerhans hücreleri CD1a, S-100 protein, CD45, CD33, CD68, CD101, HLA- DR gibi antijenler eksprese ederler. Birbeck granülleri monoklonal bir antikör olan anti- Lag (Langerhans ilişkili granül) ve anti- Langerin ile tespit edilebilir.

Langerin (CD207), ligandı hücre yüzeyinden Birbeck granülüne aktaran endositik bir reseptör olarak davranır. Bu durum Birbeck granülünün antijen işlemede fonksiyonel bir işlevi olduğunu gösterir. Yeni çalışmalar dermiste; epidermisteki Langerhans hücrelerinde bağımsız olarak çalışan Langerin pozitif dendritik hücreler olduğunu göstermektedir.

İnterstisyel DH'ler:

Tüm olgunlaşmamış DH'leri kapsamaktadır ve organların mukozal yüzeyleri gibi hayati önem taşıyan organ ve dokuların interstisyel boşluklarında bulunmaktadır. Dermal interstisyel DH'ler, LH'ler ile birçok ortak fenotipe sahip olmalarına rağmen LH'lerinin aksine DH'lere özgün interselüler yapışma molekülü taşımaktadır (106). Ayrıca hematopoietik öncül hücre türevli dermal interstisyel DH'lerin doğrudan olarak NK hücre çoğalmasını ve sitotoksitesini uyarırken LH'leri bunu yapabilmek için dışarıdan IL-2 ve IL-1 β 'ye gereksinim duymaktadır, (107). Bir diğer fark ise LH'lerinin viral antijenlere karşı sitolitik T lenfosit aktivitesini dermal interstisyel DH'lerine kıyasla çok daha yüksek oranda uyarmasıdır (109).

Kapalı DH'ler:

Antijeni periferden lenf düğümlerine taşıyan, getirici lenfatiklerin arasında yer almaktadırlar(106). Kağıt şeklinde LH ve interstisyel DH'ler gibi heterojen bir hücre grubunu temsil ederler.

Plazmasitoid DH'ler: (pDH)

Fenotip ve işlevine bağlı olarak CD11c(-) DH'ler olan ve doğal interferon üreten bu hücreler, DH alt birimidir, (70). Kandaki DH'lerin toplamının yaklaşık %30'sini tonsillerdeki DH'lerin ise %50'sini oluşturmaktadırlar. İzolasyonlarını

kolaylaştıran iki adet pDH'ye özel belirteç tanımlanmıştır, c-tip lektin ve antijen almaç BDCA2 ve BDCA4 (81,83). Viral uyarılara karşı kan miyeloid DH'lerin aksine pDH'leri yüksek miktarda interferon alfa ve interferon beta üretmektedirler (84, 85).

Interdigitating DH'ler (iDH):

Özellikle timusda yer almaktadırlar. Lenf nodunun T- hücre zonunda bulunmaktadırlar. T-hücelere antijen sunmaktadırlar. İkincil lenfoid organların T hücre bölgelerinde yer almaktadırlar. İmmunohistolojik analizler dendritik hücre lizozomal ilişkili membran proteini (DC-LAMP)'in iDH için özel bir belirteç olduğunu göstermiştir. Deriye temas eden antijeni alan Langerhans hücreleri dermal lenfatikler yoluyla bölgesel lenf nodlarının T hücre zonlarına geçerek antijeni interdigitating hücre vasıtasıyla T hücrelerine sunmaktadırlar. İnterdigitating hücreler immün işaretlemeye CD1a ile boyanmaktadırlar(101).

Germinal Merkez DH'leri (GMDH):

Foliküler dendritik hücreler dışında B hücre folikülünde bulunan tek DH alt tipidir. Akım sitometri ile ayrıştırmada CD40 azalması ile CD4(+),CD11c(+),CD3(-), CD20(-),CD1a(-), profili kullanılmaktadır. Bu izolasyon prosedürü GMDH'lerin iDH'ler ile benzer oranda CD40 taşımalarından dolayı, tonsillerde miyeloid DH'lerin zenginleşmesine sebep olabilmektedir (99). İmmunohistolojik olarak GMDH'lere özgül bir belirteç henüz belirlenmemiştir, bu nedenle GMDH'lerin germinal merkezde ayrı bir DH alt tipi olduğuna dair düşük kanıtlar bulunmaktadır (100, 102, 103).

Foliküler DH'ler (fDH):

Bellek B hücre farklılaşması, sürekliliği ve seçilimi üzerine etkilerine ek olarak germinal merkez oluşumunda önemli bir role sahip, mezenkimal öncüllerden köken alan, bağ dokunun stromal hücreleridir. Antijen sunma ve fagositoz yapma özelliği bulunmayan bu hücreler kemik iliğinden köken almamaktadır ve yüzeylerinde immün yanıtın düzenlenmesi için önemli role sahip olan, B hücreleri tarafından üretildiği düşünülen, MHC sınıf II mikrokesecekler taşımaktadırlar (92). CD45 taşımazlar; CD21 ve CD35 ise pozitifdir. İmmünolojik hafızanın devamına katkıda bulunan foliküler dendritik hücreler immün işaretlemeye CD1a (-) izlenmektedir. (97).

2.1.7.1.2. Dendritik Hücrelerin Morfolojisi ve İşlevsel Özellikleri

DH'ler psödopod ve lamellipodia gibi uzantılara ve çıkıntılara sahip düzensiz bir şekle sahiptir. Oval hücre çekirdekleri bulunmaktadır. Sitoplazmalarında birçok oval mitokondri, otofagozom ve iyi gelişmiş endoplazmik retikulum yer almaktadır (104).

DH'lerin işlevleri arasında antijen sunumu ve T hücreleri aktive etme özellikleri bulunmaktadır. İnflamasyon oluşması halinde DH'ler bu bölgeye çekilerek antijenleri yakalar, hücre içinde işlemek ve T hücrelerine sunmak üzere uyarmaktadırlar (105).

Bazı DH alt sınıflarının immun toleransı indüklediği ve devamlılığını sağladığı ileri sürülmüştür. Karşılıklı olarak düzenleyici T hücreler ise DH gelişimini etkileyebilme, maturasyonu önleyebilme ve bağışıklık baskılayıcı molekülleri indükleyebilme özelliklerine sahiptir. Tüm bu veriler tolerans mekanizmasının DH ve düzenleyici T hücreler arasında karşılıklı bir iletişim ile desteklendiğini ortaya koymaktadır (109). DH'ler lenf nodlarının T hücre bölgelerinde ve germinal merkezlerde B hücreleri uyarabilmektedirler. Foliküler DH'ler B hücre belleğinin devamlılığında önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir. Yabancı antijenlere karşı antikor cevabının başlamasının ardından foliküler DH'ler, B hücrelerine devamlı uyarılmanın kaynağı olarak işlev görmektedir (109).

2.1.7.1.3. Dendritik Hücrelerin Bağışıklık Sistemindeki Rolü ve Yaşam Döngüsü

DH'ler vücudun değişik bölgelerinde bağışıklık sisteminin nöbetçileri olarak dokularda immatür formda bekleme halindedirler. Genellikle stres altındaki bölgesel hücreler tarafından oluşturulan nükleotidler, interferon, ürik asit, bradikinin, ısı-şok proteinleri, reaktif oksijen ara ürünleri ve yıkılmış ekstraselüler matriks bileşenlerini içeren tehlike sinyalleri ile immatür dendritik hücreler farklılaşma sürecine girerler (95,96).

DH'ler bu tehlike sinyallerini aldıklarında antijen alımı düşerken MHC ekspresyonu ve CD86, CD80, CD83 kostimulatuar faktörleri yukarı doğru düzenlenmektedir (98). İmDH'ler kendilerine özel CXCR3, CXCR4, CCR1-6 gibi kemokin reseptörlerini de taşımaktadırlar (94). Tehlike sinyallerine maruz kalan DH'ler CXCR4 dışında birçok kemokin almacını aşağı doğru düzenlemekte bunun yanı sıra bir inflamatuvar almacı olan CCR7'yi ise yukarı doğru düzenlemektedir, (93). Matur DH'ler son derece hareketlidir ve çevresel lenfoid organlara göç

etmektedirler. Sekonder lenfoid organa ulaşan DH'ler edinsel bağışıklığı düzenleyen uzmanlaşmış hücreler haline gelir (87,88). DH'ler, antijen işleme ve taşıdıkları yüksek seviyede kostimulatuar faktörleri nedeniyle bağışıklık sisteminin en etkin ASH'leri olarak bilinmektedirler(79).

Hematopoez sürecinde DH üretimi antijenden bağımsız olarak gerçekleşmektedir (136). Çeşitli DH öncülleri kemik iliğinden seyrek bir topluluk oluşturdukları kan dolaşımına geçmektedir. Lenfoid olmayan dokularda bulunan DH'lerin seçici göçünde etkili olan kemotaktik faktörler arasında platelet aktive edici faktör (PAF), makrofaj enflamatuar protein 3 alfa (MIP-3 alfa), β - defensin, CCR6 ve CCL22 sayılabilir.

Periferde bulunan DH'lerin bakteri ya da viral ürünler gibi tehlikeli sinyalleri ile aktivasyonu ve maturasyonu bölgesel lenf düğümlerinde bağışıklığı uyarır, (137) DH'lerin çevresel dokulardan lenf düğümlerine geçiş için kullandıkları göç mekanizması sadece maturasyon durumuyla ilgili değil aynı zamanda özelleşmiş DH alt tiplerine de bağlıdır. CXCL9 ve E-selektine bağlı yolla, pDH'leri getirici lenfatik veya direkt olarak yüksek endotelyal venülleri kullanarak lenf düğümlerine girebilmelerine karşın ne imDH ne de matur miyeloid DH'ler lenf düğümlerine girerken yüksek endotelyal venülleri kullanamaz. (150). Monositlen farklılaşmış DH'ler deriden lenf düğümlerine geçerken CCR7 ve CCR8 yollarını kullanmaktadır, (152). CCL21 kemokini, her ikisi de CCR7 almacı taşıyan naif T hücrelerinin ve antijen ile uyarılmış DH'lerin çevresel lenfoid organlardaki T hücre bölgesine girişini yönetmektedir (99). Lenf düğümü içerisindeki T hücre bölgesinde bulunan DH'ler naif CCR7(+)/CD4(+) T hücreleri için güçlü bir kemotaktik olan CCL19 üretmektedirler, (107).

DH'lerin antijen özgün T hücrelerine temas ederek görevini tam olarak yerine getirdikten sonra lenfoid dokularda apoptoza uğradıklarına inanılmaktadır, (108). Bu durum T hücreler için antijen ulaşabilirliğini sınırlı kılarak, immün yanıt indüksiyonunun kontrol edilmesini sağlamaktadır.

İmmatur DH'ler (imDH)

İmDH'ler yüzeylerinde bulunan almaçlar sayesinde tehlike sinyalleri ve apoptotik hücreler tarafından üretilen güvenlik sinyallerine karşı hassastır, (109). Bu sinyaller imDH'lerin farklılaşmasının son durumunu belirlemektedir. Gerekli

uyarı olmadığı sürece imDH'ler T hücrelerine antijen sunumunu yapamaz ve aktivasyon gerçekleşemez (103).

Matür DH'ler

Antijen sunabilen ve T hücreleri uyaraabilen DH'lerdir. DH'ler tehlike sinyallerinin etkisi ile antijen toplar ve lenf düğümüne ulaşmaktadırlar. Göç sırasında olgunlaşmamış DH'lerin morfolojileri değişerek daha geniş yüzey alanına sahip olmalarını sağlayan sitoplazmik çıkıntılara sahip olurlar. Ayrıca matur DH'lerin en önemli özellikleri T hücre aktivasyonunu uyaran, inflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β 'yi üretmeleridir. Matur DH'ler antijen sunumunun gerçekleşmesini sağlayan bir diğer faktör olan kositimulatuar molekülleri de üretebilmektedirler (93).

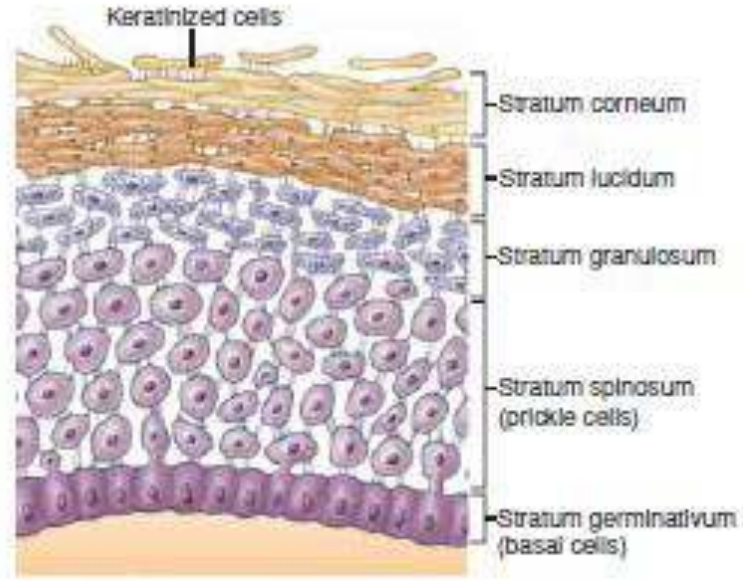
Semi-Matür DH'ler

Morfolojik olarak matur DH'lere çok benzerler, antijen sunabilme yeteneğine de sahiptirler fakat T hücreleri uyaramamaktadırlar. Olgun DH'lerin ürettiği gibi IL-12 üretmek yerine güvenlik sinyallerinin alınmasından sorumlu IL-10 sitokinini üretmektedirler. Antijenlere karşı aşırı reaksiyonu durdurmak için gelişmiş doğal bir mekanizmadır (100).

2.2. Derinin Morfolojik Yapısı ve Fonksiyonu

Deri, vücuttaki ağırlık ve yüzey alanı olarak en büyük organdır. Dış vücut yüzeyini oluşturan deri mekanik, sıvı kaybı, biyolojik, ultraviyole ve kimyasal içeren çok çeşitli dış tehditlere karşı koruma sağlar. Kalınlık, elastikiyet ve deri ekleri açısından kişiler arasında farklılık gösterir.

Deri ektoderm kökenli epiteliyal bir tabaka olan epidermis, mezoderm kökenli bir bağ dokusu tabakası olan dermis ve en içte hipodermis tabakalarından meydana gelir. Bu tabakaların dışında kıl folikülleri, sebace bezler ve ter bezleri gibi deri ekleri ile immün hücreler, damar ve sinirler derinin yapısında yer alırlar(47). Cerrahi işlemlerin ilk aşamasında deri insizyonu olduğu düşünülürse, bu yapının anatomisinin özellikle plastik cerrahi açısından önemi daha iyi anlaşılır.

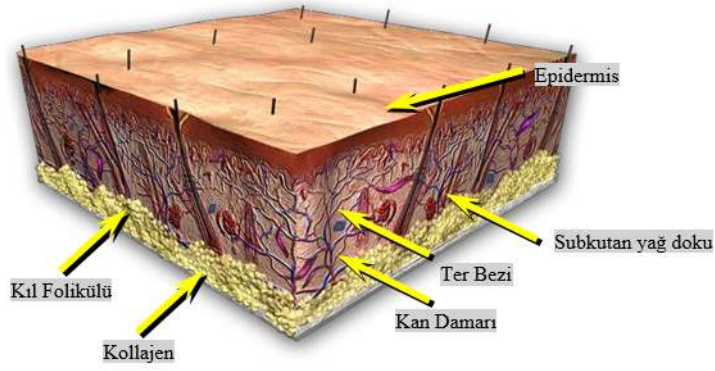


Şekil 2.9. Derinin katmanları (Essentials of Pathophysiology, Carol Mattson Porth, 2011)

2.2.1. Deri Embriyolojisi

Epidermis başlangıçta embriyonun dış yüzeyini tek sıralı bir ektodermal hücre tabakasıyla örter. İkinci ayın başında, bu epitelyum ikiye bölünür ve embriyonun dış yüzeyi periderm veya epitrikiyum adı verilen yassı hücrelerle kaplanır. Bazal tabakadaki hücrelerin daha ileri proliferasyonu ile üçüncü bir ara bölge oluşur. Dördüncü ayın sonunda, epidermis son ve kesin şeklini alır ve artık dört tabaka ayırt edilebilir hale gelir(39)(Şekil 2.9).

Dermis lateral plak mezodermi ve somitlerden gelen dermatomlardan köken alır. Üçüncü ve 4. aylar süresince, *korium* adı verilen bu doku, epidermis içine doğru uzanan çok sayıdaki düzensiz papiller yapıları, dermal papillaları oluşturur. Bu papillalar genellikle, küçük bir kapiller veya duyu sinir uçlarını içerirler. Dermisin daha derin tabakası olan *subkorium* önemli miktarda yağ dokusu içerir. Doğumda deri, sebace bezlerin salgıları, dejenere olmuş epidermal hücre ve kıllardan oluşan beyazımsı bir tabaka verniks kazeoza ile örtülüdür. Bu tabaka deriyi, amniyotik sıvının zedeleyici etkisinden korur. Deri, yara iyileşmesinde önemli rolleri olan temel anatomisini oluşturan iki tabakadan oluşur(Şekil 2.10).

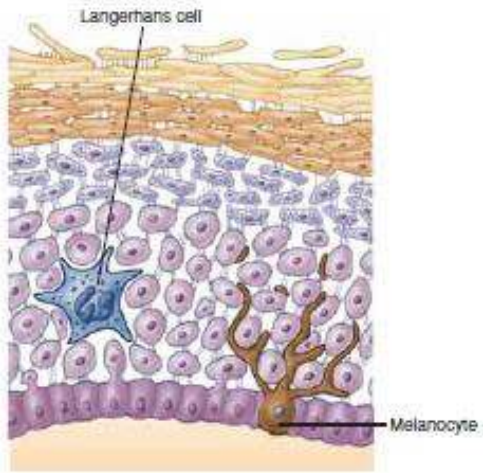


Şekil 2.10 Deri ve ekleri.

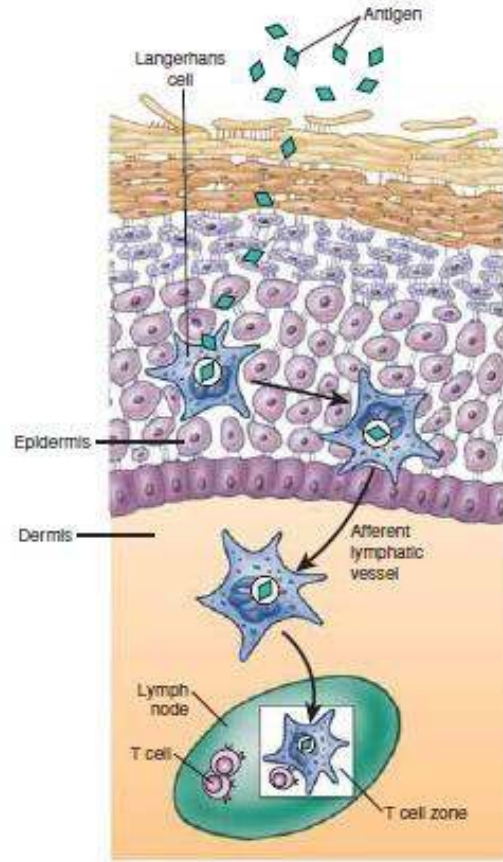
2.2.2. Deri Histolojisi

Epidermis

Dış ile temas halinde olan yüzey tabakası epidermis olup, protein, keratin bakımından zengindir ve sert ve koruyucu olan ve kısmen suya dirençli olmayan canlı olmayan bir yüzey oluşturan oldukça kendini özel olarak rejenere eden tabakalandırılmış yassı epiteldir. Epidermis ayrıca epitelyal olmayan hücreler de içerir: melanositler UV ışığına karşı melanin pigmenti üretirler, Langerhans hücreleri kemik iliği kaynaklı antijen sunan hücrelerdir ve yeni antijenlere karşı bağışık yanıtlar üretirler ve Merkel hücreleri ise dokunmatik reseptörler gibi davranan mekanoreseptörlerdir (110)(Şekil 2.11; Şekil 2.12).



Şekil 2.11. Langerhans ve melanosit

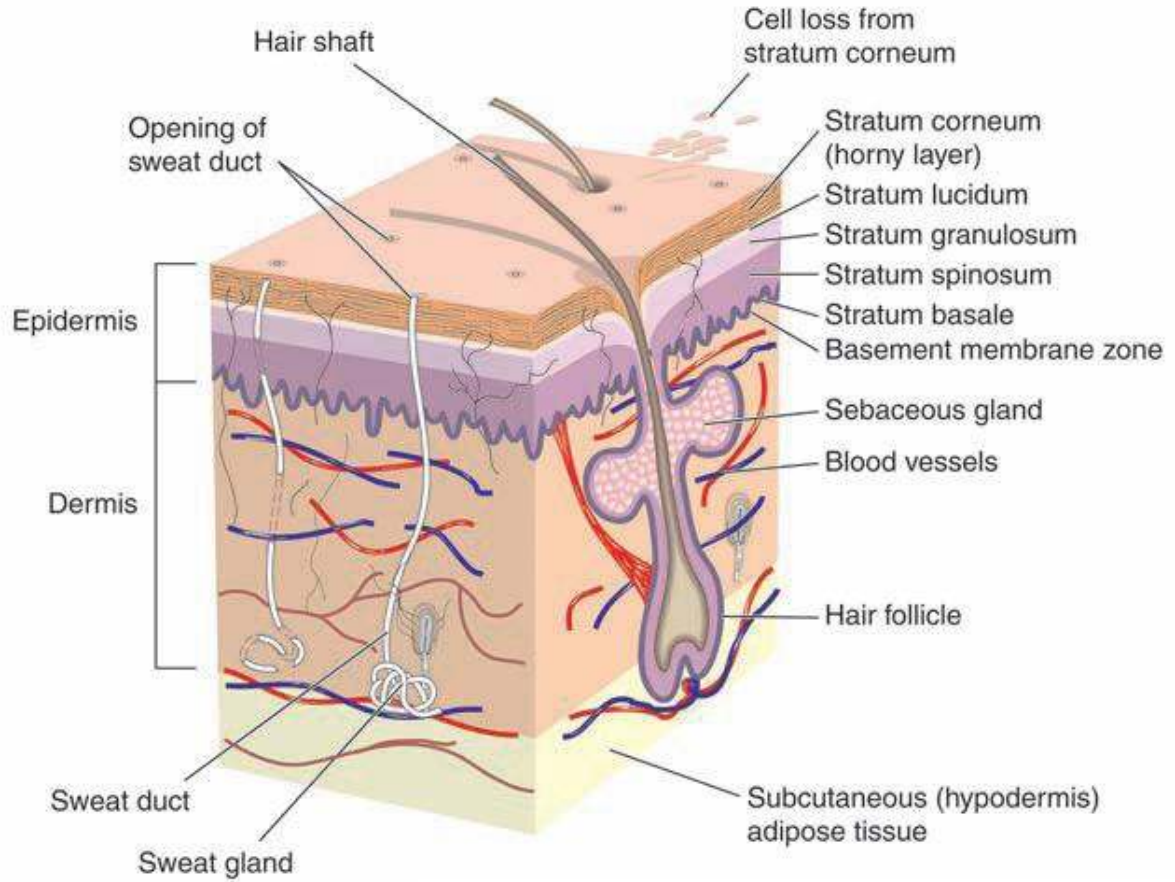


Şekil 2.12. Deri ve immun sistem

Essentials of Pathophysiology, Carol Mattson Porth, 2011

Epiderminin çok katlı yassı epitel tabakası içten dışa doğru 5 tabakadan oluşur (Şekil 2.13);

- 1) Stratum korneum
- 2) Stratum lusidum
- 3) Stratum granülozum
- 4) Stratum spinozum
- 5) Stratum bazale



Şekil 2.13. Derinin tabakaları Douglas Light, Cell, Tissues and Skin, 2004

Stratum Bazale (germinativum): Tek tabaka halinde bazal lamina üzerine üzerine oturmuş silindirik veya yüksek kübik keratinositlerden oluşur. Keratinosit sitoplazmaları içinde bulunan ara flamanlar dezmozomlar ve hemidezmozomalar ile bağlantılıdır (Şekil 2.6). Bu tabakadaki hücreler epitelin yenilenme ihtiyacı olduğunda mitoz geçirirler, mitoz geçiren hücre topluluklarının bir kısmı bazal tabakada ki kök hücreleri oluştururken diğer bölümü üst tabakalara göç edip diğer hücrelere farklılaşarak epitelin yenilenmesini sağlarlar.

Stratum spinozum sitoplazmasında küçük granüller bulunan yassı poligonal şekilli ve belirgin bir oval nukleusu olan keratinositlerden zengindir. Bu tabakadaki hücreler birbiriyle sitoplazmik çıkıntılar ve yüzeyi delerek hücreye dikenlerle kaplı bir görünüm veren desmozomlar ve tonofilaman adı verilen ara filamanlarla sıkıca bağlanmıştır.

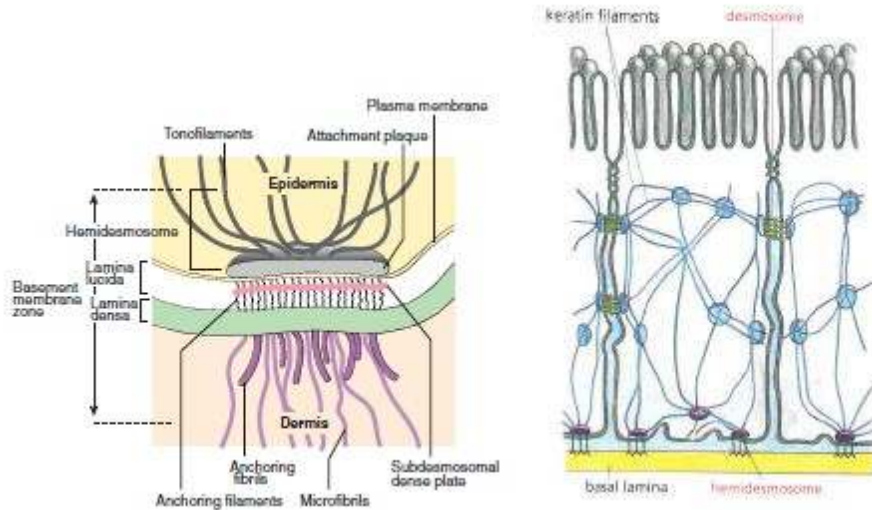
Stratum Granulozum birkaç sıra yassı çekirdekli keratinositlerden meydana gelir. Bu tabakadaki keratinositlerin başlıca ürünü, ara filaman yapısında olmayan bir protein, *filaggrindir*. Filaggrin keratinlerin kümeleşmesini uyarır. Sitoplazmalarında, tipik keratohiyalin granülleri ve tonofilamanlar bulunur.

Stratum lucidum kalın deride daha belirgin olan oldukça yassı eozinofilik hücrelerin oluşturduğu yarı saydam ince bir tabakadır. Organeller ve çekirdekler artık belirgin değildir ve sitoplazma öncelikle elektron yoğun bir matriks içine gömülü sıkıca paketlenmiş filamanlardan meydana gelir. Komşu hücreler arasındaki desmozomlar hala belirgindir.

Stratum korneumdaki keratinositler farklılaşmanın son aşamasına gelmiştir ve yassı yapılar şeklindedir. Buradaki keratinositler epidermis yüzeyinden dökülmeye başlar ve alt tabakalardan gelen keratinositler ile sürekli olarak yenilenmeye devam ederler.

Dermis

Derinin elastikiyeti ve dayanıklılığını sağlayan tabakadır. Deri kanlanması çoğunu alan tabakadır. Dermis, sınırları net belirgin olmayan ince ve yüzeysel papiller dermis ile kalın ve derinde bulunan retiküler dermis olarak iki kısımdan oluşur(Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Dermoepidermal bileşke Şekil 2.15. Keratin filamanlar Molecular Biology of Cell, Bruce Albert, 2008

Bağ doku hücreleri, lifler ve ara madde olmak üzere 3 komponentten oluşur.

Hücreler : Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan bağ dokusu hücrelerinden olan **fibroblastlar**, hücreler arası matriks depolanmasını, yenilenmesini ve hücreler arası iletişim için gerekli olan büyüme faktörlerini de salgırlar. Bunun dışında histiyositler, lenfositler, plazma ve mast hücreleri de bulunmaktadır.

Lifler (kollajen, elastin ve retikulum) Yara iyileşmesinde en önemli rolü oynayan protein lifi **kollajendir**. Kollajen insan vücudunda en fazla bulunan proteindir. Sağlam ve yaralanmış dokuda en fazla bulunan lifler tip I ve tip III kollajendir. Olgun deride ve skar dokusunda yaklaşık olarak %80 tip I kollajen ve %20 tip III kollajen bulunmaktadır. Yara iyileşme sürecinin başlangıcında tip III kollajen fazla bulunur(50,52). Kollajen biyosentezi yara iyileşmesi süreci dışında yavaş ilerleyen bir düzenektir.

Temel madde: Derinin yapısında temel madde olarak fibronektin, glikozaminoglikan, hyaluronik asit, kondroidin sülfat ve dermatan sülfat bulunmaktadır.

Hipodermis

Deri altı yağ dokusu ve fibröz trabeküllerden oluşur. İçerisinde *pannikulus adipozus* denilen yağ hücre toplulukları bulunmaktadır. Damar ve sinir yönünden çok zengin olan bu tabaka ısı kayıplarını önleme, travmalardan koruma ve ek besin deposu olarak işlev görür.

Deri ekleri

Kıllar ve tırnakları içeren keratinize deri ekleri ve salgı yapan sebace bezler (pilosebace ünite), ter bezleri (ekrin, apokrin) olarak iki yapısal gruptan oluşur.

Derinin innervasyonu

Duyusal sinirler; ağrı, ısı, basınç ve proprioseptif duyuları alır. Ayrıca dokunma duyusunu alan Merkel hücreleri, ince dokunma duyusunu alan Meissner korpuskülleri ile basınç ve vibrasyonu alan Pacinian korpuskülleri de deride bulunurlar. Efferent sinirler ise kan damarları ve deri eklerini uyarırlar.

Derinin damarları

Deride biri yüzeysel diğeri derin olmak üzere 2 ayrı kapiller pleksus vardır. Subdermal pleksus; subkutan doku ile dermis arasında, dermal pleksus papiller dermiste bulunur. Epidermiste damar bulunmaz(46,47)

Derinin lenfatikleri

Derinin lenfatik sistemi stratum spinosum tabakasındaki intraselüler boşluktan başlar. Papiller tabakada, ilk lenf damarları görülmeye başlar, daha

sonra büyük damarlara dönüşerek subkutan tabaka altında genel lenf sistemine ulaşır. Lenf damarları, kan damarlarına paralel şekilde uzanır.

2.3. Yara ve İyileşmesi

Doku hasarına organizmanın onarım için verdiği yanıt hasarlı dokunun yapı ve fonksiyonunun düzeltilmesidir. İyileşme süreci, yaralanma anında başlayan süregelen aktif dinamik bir süreçtir (39-42,52). Yaranın farklı bölgelerinde iyileşmenin farklı fazları yer alabilir(48). İyileşmenin doğal seyrini bozan herhangi bir durum, sonraki fazları da etkileyerek anormal iyileşme, kronik yara ve skar oluşumuyla sonuçlanabilir(49).

2.3.1. Yara Tipleri

Yaralar tiplerine ve etiyolojilerine göre akut ya da kronik olarak ikiye ayrılır.

Akut yaralar:

Geçici bir etkenin neden olduğu ve üç aydan kısa bir sürede iyileşen yaralardır.

Kronik yaralar

Genellikle üç ay içinde iyileşmeyen ya da tekrarlayan yaralardır. İnflamatuvar evrenin uzamasıyla karakterizedir. Kronik yaralarda anabolik ve katabolik fazlar arasındaki denge kaybolmuştur ve katabolizma ön plandadır. Bu yaraların büyük bir kısmı ya tam olarak iyileşmez veya iyileşme süreci uzun süre devam eder.

2.3.2. Yara iyileşmesi

2.3.2.1. Yara İyileşmesinin Evreleri

Yara iyileşmesi birbiriyle bağlantılı üç faza ayrılır;

Hemostaz ve inflamasyon fazı

Proliferatif faz (Fibroblastik Evre)

Maturasyon ve yeniden şekillenme evresi (Remodeling Evresi)

Hemostaz ve inflamasyon

Hemostaz ve inflamasyon doku hasarına karşı verilen ilk yanıttır. Hemostaz evresi, travmadan sonra hasarlanmış damarlardan oluşan kanamaya yanıt olarak katekolamin salınımını takiben geçici vazokonstriksiyon ile başlar. Damar duvar bütünlüğünün bozulmasıyla ortaya çıkan subendotelyal kollajenler zorunlu olarak trombositlerle temas eder ve Hageman faktörünü (faktör XII) aktive eder. Bu da

trombositlerin sekresyonuna yol açar ve sitokinlerin, büyüme faktörlerinin salgılanmasına yol açar(39-42,52). Aktive olmuş hageman faktörü(faktör XII) dört ana biyokimyasal sistemi harekete geçirir. Bunlar pıhtılaşma, kompleman, kinin sistemi ve plazmin yapımı şeklinde sıralanabilir(39,52). Trombositler onarımı başlatacak mekanizmayı harekete geçirirler. Açığa çıkan Tromboksan A2 (TXA2), vazokonstrüksiyon ve trombosit agregasyonuna neden olarak trombosit tıkaçını oluştururlar. Bu süreçte ortaya çıkan fibrin, hem bir örgü oluşturarak bariyer oluşturur, hem de inflamatuvar hücre ve fibroblast göçü için uygun bir yer hazırlar(40,41).

Pıhtı oluşumu ile kanama durdurulduktan sonra, endotel hücrelerinden salgılanan histamin, prostoglandin E2, prostosiklin ve endotelyal büyüme faktörü ile vazodilatasyon gelişir ve damar geçirgenliği artar(54,55). Yara bölgesinde bulunan mast hücreleri de salgıladıkları aktif aminler aracılığıyla çevre kan damarlarından yara alanına hücre göçünü hızlandırırlar. Polimorf nüveli lökositler(PNL) ve plazma, damar yatağından dışarıya çıkıp yara bölgesine göç ederler. Yara bölgesine gelen lökositler inflamasyon araçlarını serbestleştirirler(40,41). İnflamasyon evresi, kapiller geçirgenlik artışıyla başlamış olur. Trombositlerin damar endoteli bazal membranına yapışıp fosfolipaz A2'yi aktive etmesiyle ekstrasellüler aralığa araşidonik asit serbestlenir.

Prostoglandin E1 ve E2 özellikle artar (40,41). Artan kan akımı ve trombositlerden salınan kemotaktik faktörler aracılığı ile bölgeye yoğun inflamatuvar hücre göçü olur. Trombositlerden salınan 2 önemli kemotaktik faktör trombosit kaynaklı büyüme faktörü(PDGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü betadır(TGF-beta). İnflamasyonun neden olduğu artmış damar geçirgenliği, kompleman faktörler, interlökin-1, Tümör nekroz faktör- alfa(TNF- α), Transforming growth faktör- β , Trombosit Faktör 4 (PF-4) gibi kemotaktik maddeler, nötrofil kemotaksisini uyarır(40,41). Nötrofiller yara yerine damar genişlemesi ve kemotaktik uyarılar sonucunda ilk gelen ve inflamasyonun erken fazında baskın olan hücrelerdir. Bu olaya *Diapedez* denir. Nötrofiller travmayı takiben 6 saat sonra yarada görülürler ve ilk iki gün boyunca baskın olan hücrelerdir. Nötrofillerin yara alanındaki esas görevi, yabancı cisimler ile bakterilerin fagositozu ve proteaz salınımı ile travma sonrası hücre kalıntılarının yara alanından temizlenmesidir(39-41,54,55). Yarada 2-3. günlerde monosit yoğunluğu başlar. Nötrofil sayısının azalmasıyla beraber monosit/makrofaj sayısı da artar. Makrofajlar 3-5. günlerde

yarada hakim hücre olurlar. Aktif makrofajların yara bölgesinde bulunması yara iyileşmesi için esastır. Makrofajların yara alanında ki varlığı yangısal evrenin sona ermeye başladığı ve çoğalma evresinin başlayacağına işarettir. Makrofajların yara iyileşmesindeki temel görevleri ana hatları ile fagositoz ve antimikrobiyal etki, yara debridmanı, matriks sentez regülasyonu, hücre aktivasyonu ve anjiogenezdır(40-42).

Yara yüzeyinin hemen altında nötrofiller ve makrofajlar band paterni göstererek güçlü şekilde interlökin-8(İL-8) eksprese edilir. İL-8 salınımı hipoksi, interlökin-1, Tümör nekroz faktör alfa ve bakteriyel ürünler ile situmule edilir. Yara yüzeyinde pick düzeye ulaşan İL-8 yara kenarından keratinosit çoğalmasını ve proliferasyonunu situmule eder. Makrofajlar sadece fagositoz yapmakla kalmaz, aynı zamanda antijen sunumu ve çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımını gerçekleştirir(1). Keratinosit ve fibroblast aktivasyonunu arttırmaları(58). Ayrıca nötral proteazlar yardımıyla bir taraftan plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize ederken, diğer taraftan kompleman ve pre-hageman faktörü aktive eder(40-42). Yara bölgesine lenfositlerin gelişi makrofajlarla beraber olur ve aktive olmalarından ve yara alanına göçlerinden makrofajlar sorumludur. Lenfositlerden salınan lenfokinler fibroblast proliferasyonunu, migrasyonunu ve kollajen sentezini kontrol eder. Lenfositler interferon gama ile indüklenen monokin ve interferon ile uyarılabilir protein 10 selektif olarak lenfositlerin göçünü artırır. Lenfositlerde immunolojik hücreler olmasının yanında bFGF(FGF 2) ve lökosit kaynaklı büyüme faktörlerine (LDGF) sahiptir.

Monosit-makrofaj atraktan kemokin(MCP-1) keratinosit, makrofaj ve endotel hücrelerince salınırlar. Yara alanına makrofaj, lenfosit ve mast hücre göçünü arttırmaları. MCP-1 ekspresyonu yaralanmadan sonraki 1. haftada sınırlı kalır. İlk gün endotel hücre, mononükleer hücre kaynaklı iken 2. günden itibaren bazal tabaka kaynaklı keratinositler tarafından salınırlar. Yara iyileşmesinin bu safhasında mast hücre sayısı proliferasyondan çok göç mekanizması ile 5 kat artar. Mast hücrelerinden salınan interlökin-4(IL-4) fibroblast proliferasyonunu artırırken MCP-1 ve İL-8 salınımını sınırlayarak inflamasyonu azaltır. İnflamatuvar fazın sonlarına doğru ortamdaki sitokin düzeylerinin düşmesiyle monosit/makrofajların ağırlıkta olduğu hücre infiltrasyonu giderek azalır. İnflamatuvar faz, yaranın derinliğine ve genişliğine göre değişmekle beraber ortalama 3-5 gün devam eder(51,59).

Proliferasyon (Fibroplazi, epitelizasyon, angiogenez, ekstrasellüler matriks sentezi)

Bu evrede trombosit ve aktive makrofajlardan salınan sitokin ve büyüme hormonlarının etkisi ile fibroblast ve endotelial hücrelerin göçü ve çoğalması ön plandadır (Şekil 2.16). Travmadan sonraki ilk 36-72. saatler içinde fibroblastların TGF beta etkisinde yara alanına göçüyle oluşur. Fibroblastları yaraya göçünü uyaran ana sitokinler, makrofaj ve trombositlerden salgılanan, PDGF, TGF- β , EGF ve fibronektin'dir(54). PDGF; nötrofillerin, makrofajların ve düz kas hücrelerinin kemotaksisini de uyarır. Fibroblast ve düz kas hücre mitojenesini stimule eder. TGF- β makrofajları etkileyerek bFGF, PDGF, TNF alfa ve İnterlökin-1 gibi sitokinlerin salınımını stimule eder. Yara bölgesindeki nekrotik dokuları geçip yaralanma bölgesine fibroblastların ulaşabilmesi için fibroblastlar, TGF- β 'nın uyarımı ile ortama proteolitik enzimler salgırlar(54). Bu enzimler matrix metalloproteinazlardır(MMP).

Fibroblast yoğunluğu, yara yerinde 6. günde maksimum düzeye ulaşır. Fibroplazi safhası, fibroblastların aktivite gösterdiği ve zemin maddesi ile bağ dokunun sentezlendiği dönemdir. Yara gerilim gücünde belirgin bir artış meydana gelir. Bu fazda; fibroblastlar ile epitel ve endotel hücreleri baskındır.

Fibroblastların ana fonksiyonu kollajen sentezidir(39,42). Kollajen sentezini uyaran sitokinlerin başında ise TGF- β , PDGF ve EGF gelmektedir(53). Kollajen sentezi yaralanmanın 5-7. günlerinde maximum seviyededir. Fibroblastlar aynı zamanda fibronektin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar gibi proteinler de sentezler(53). Bu maddeler kollajen fibrillerinin kümelenmesi esnasında çapını ve büyüklüğünü etkileyerek bağ dokusunun fiziksel özelliklerinin oluşmasında rol oynarlar(39,42). Fibroblastlar kollajenin sentez ve birikimi yanında bağ dokusunun yapısal ve fonksiyonel olarak uygun şekil almasında da görev alırlar. Ekstrasellüler matriks sentezi 2-3. günlerde başlayıp, 15-20. güne kadar devam eder. Bu dönemin en önemli hücre ürünü kollajendir. Kollajen tüm vücut proteinin %30'unu oluşturmaktadır ve vücut ısısında proteolitik enzimlerin etkisine dayanıklıdır(39,42). Sağlam deride %80-90 tip-I kollajen geri kalan %10-20'lik kısmı ise tip-III kollajen oluştururken, granülasyon dokusunun %30'unu tip-III kollajen oluşturmaktadır(54).

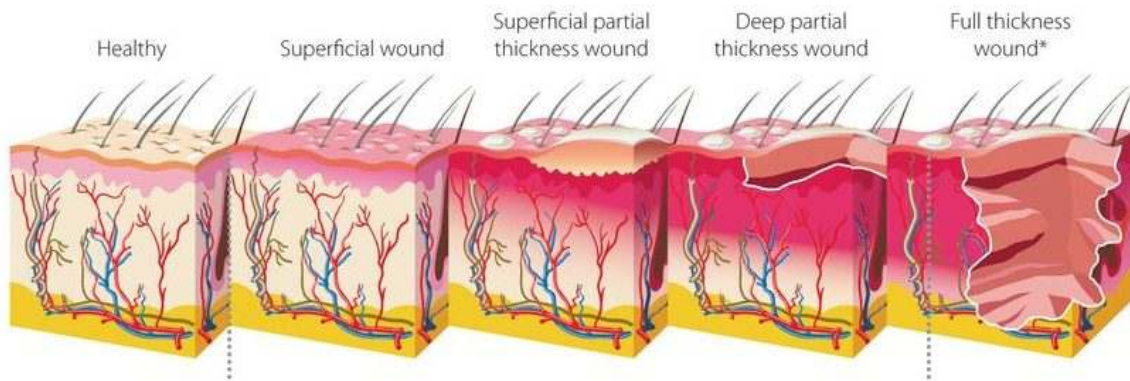
Epitelizasyon, insizyonel yaralarda, yaralanmadan hemen sonra başlar ve 24-48 saat içinde tamamlanır(54). Epitelizasyonun tamamlanmasında, EGF, TGF-

α , platelet kaynaklı EGF ve keratinosit growth faktör (KGF diğer adı FGF-7) etkili olan sitokinlerdir.

Onarım bölgesinde bulunan damarların tomurcuklanması yoluyla yeni damarların oluşumuna *anjiogenezis veya neovaskülarizasyon* denir(60). Dördüncü günde belirginleşir ve yara iyileşmesinin sonuna kadar devam eder. Primer uyarıcısı vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve FGF-2(1-4,27). Erken dönemde trombositlerce salgılanan transforming büyüme faktörü-Beta (TGF- β) ve PDGF de dolaylı olarak anjiogenezi uyarır(40,41,60). Makrofajlar salgıladıkları TNF- α ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleriyle anjiogeneizde de anahtar rol oynarlar ve NO sentezini sağlarlar(39,61).Yeni kan damarlarının yanında makrofaj, fibroblast ve gevşek bağ dokusu içerir.

Yara kontraksiyonu insizyonel yaralar için daha az önemli olmakla beraber açık yaralar için büyük önem arz etmektedir. Bu evrenin ileri aşamalarında makrofajlar tarafından stimüle edilerek yara kenarından veya kemik iliğinden gelen fibroblastların bazıları miyofibroblasta dönüşür(45). Granülasyon dokusunun gelişimi ile eş zamanlı olarak yara kontraksiyonu gerçekleşir(39,42,54). Doku kaybı olan yaralanmalarda, aktin filamentlerinden zengin miyofibroblastlarca başlatılan kontraksiyon hareketi, yaranın lokalizasyonuna bağlı olmakla beraber günlük 0,6-0,7mm lik kontraksiyona uğrayarak yara kenarlarını yaranın geometrik merkezine doğru çeker(54).

İlerleyen kontraksiyon yara boyutunu küçültür ve epidermis sonuçta granülasyon dokusunu tamamen örter. İnsizyonel yaralarda myofibroblastlar, yaralanmanın 4-6. günlerinde yaranın santral bölgesinde ortaya çıkar ve 2-3 hafta sonra kaybolur (54).Yara kontraksiyonu hücre aracılı bir durum olup kollajen sentezine ihtiyaç duymaz. Yara kontraksiyonunda TGF- β anahtar rol oynar.



Şekil 2.16. Sağlıklı Deri ile Kısmi kalınlıkta yara ve epitelizasyon

Epitelizasyon(Şekil 2.16), aktive yara makrofajları, trombositler ve keratinositlerden salgılanan epidermal büyüme faktörü (EGF), FGF, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- α (transforming growth factor- α : TGF- α) tarafından stimüle edilir(47). Bunlar, keratinositlerin migrasyonu, proliferasyonu ve hayatta kalmasını, aktivasyonu ile stimüle eden tirozin kinaz reseptörünün ligandlarıdır (45).

Maturasyon ve Yeniden Yapılanma (8. gün-1 yıl)

Bu fazda, inflamatuvar hücreler azalmaya başlar, bunu anjiogenezin ve fibroplazinin sonlanması takip eder. Yaralanma sonrası 2. haftada başlayarak ile yaklaşık bir yıl kadar devam eder. Yaralanmanın ilk haftasında sentezlenen kollajen, yeniden şekillenme fazında yerini kovalent bağların arttığı stabil kollajene bırakır. İlk etapta rastgele dizilmiş kollajen lifleri, mekanik güçlerin etkisiyle kademeli şekilde organize olurlar. Maturasyon evresinde kollajen sentez-yıkım dengesi nedeniyle kollajen miktarında artış gerçekleşmez. Kollajen liflerinin dizilimi yarada daha fazla gerilim meydana getirir. Çinko içeren metalloproteaz bir enzim ve aynı zamanda tip I, II, III kollajeni yıkan major enzim olan kollajenaz ile kollajen yıkımı gerçekleşir.

Maturasyon evresinde depo edilen yeni kollajen lifleri stabil çapraz bağlar ile kalıcı hale gelirler. Bu çapraz bağlar yaraya sağlamlık ve bütünlük kazandırır. Maturasyon evresinde diğer değişiklikler, hücre içi matriks moleküllerinde olur. Hyaluronik asit, kondroidin-4-sülfat gibi GAG'ların ve proteoglikanların miktarı dermiste bulunan normal düzeylerine iner, dokunun su içeriği zamanla azalıp normale döner (Tablo 2.5). Kollajen kalınlaşır, yoğunlaşır ve kan damarları giderek konstrüksiyona uğrayıp kaybolur. Yeniden yapılanma fazı yaranın kapanmasından sonra aylarca devam edebilmektedir.

Tablo 2.5. Ana Ekstrasellüler Matriks Proteinleri

ANA EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİNLERİ(9)
Kollajen
Laminin

Fibronektin
Vitronektin
Matriks proteinleri; Trombospondin, Tenaskin, SPARC(Secreted protein acidic and rich in cysteine)

Yara iyileşmesinde bütün bu safhaların sonunda yaralarda morfolojik olarak üç ana özellik olan yara kontraksiyonu, epitelizasyon ve bağ dokusu birikimi sağlanarak yara iyileşmesi tamamlanmış olur (39-42).

Tablo 2.6. Hücresel olaylar ve yara iyileşmesinin biyobelirteçleri

Tablo 2.2. SİTOKİN VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ			
	SINIF	ÜRETİM	ETKİNLİK
İL 1,6,8	Sitokin	Makrofaj, keratinosit	Proinflamatuvar (fibroblast ve
İL 2	Sitokin	T lenfosit	Fibroblast kemotaktik
TNF	Sitokin	Makrofaj	Proinflamatuvar ve kollajen sentezi
İL 4	Büyüme Fak.	T lenfosit	TNF, İL 1, İL 6, Fibroblast proliferasyon inhibisyonu
FGF A-B	Büyüme Fak.	Fibroblast, Makrofaj, T lenfosit, endotelial hücre	Fibroblast kemotaksis ve proliferasyonu, Anjiogenez
KGF 1, 2	Büyüme Fak.	Fibroblast	Keratinosit bölünmesi ve diferansiyasyonu
PDGF AA, BB, AB,	Büyüme Fak.	Fibroblast, Makrofaj, trombosit, endotelial hücre	Nötrofil-fibroblast kemotaksisi, anjiogenez uyarılması, MMP upregülasyonu
TGF ALFA -	Büyüme Fak.	Fibroblast, Makrofaj, trombosit, keratinosit, T lenfosit	Nötrofil-keratinosit kemotaksisi, anjiogenez, TIMP upregülasyonu, MMP inhibisyonu, keratinosit
VEGF	Büyüme Fak.	Fibroblast, Makrofaj, trombosit, endotelial hücre, keratinosit	Anjiogenez, endotelial hücreler için mitojenik etki
TIMP	Büyüme Fak.	Mezenkimal hücrelerin çoğunluğu	MMP's inhibisyonu
MMP's	Büyüme Fak.	Monosit, makrofaj, endotelial hücre	Ekstrasellüler matriks degrade edilmesi
EGF	Büyüme Fak.	Makrofaj, keratinosit	Keratinosit ve fibroblast proliferasyonu, keratinosit migrasyon uyarılması, skar doku

(Indian J Plast Surg.2012 May;45(2):220-8.Shah JM, Omar E, Pai DR, Sood S.)

2.3.2.2. Yara İyileşme Şekilleri

Primer iyileşme

Epitelial ve bağ doku kaybının minimal olduğu, epitelial bazal membranın düzgün olarak zedelendiği ve yara kenarlarının cerrahi yöntemler kullanılarak (sütür, stapler veya yapışkan bantlarla vs) kapatılması esasına dayanan yara iyileşmesidir(39). Primer iyileşmede insizyona komşu epidermis bazal tabakasında proliferen olan keratinositler önemli rol oynar (39,42,64). 3. günden itibaren makrofajların yara ortamında görülmesi ile kollajen sentezi başlar. 5. günde kollajen sentezi yoğunlaşır ve her iki yara marjini arasındaki kollajen liflerde köprüler oluşur. Epitelin maturasyonu ile 4 hafta sonunda üzeri intakt epidermis ile döşeli, inflamatuvar hücre içermeyen, yara hattı boyunca deri eklerinin bulunmadığı skar doku meydana gelir. **Sekonder iyileşme**

İnflamatuvar ülserasyon, abse oluşumu ve fazla miktarda doku kaybı varlığında sekonder iyileşme gerçekleşir. Sekonder iyileşme süreci daha karmaşık ve uzun sürelidir. Kontraksiyon ve yüzey epitelizasyonu temelinde yara iyileşmesi gerçekleşir. Primer iyileşmeden farkı olarak ortamdaki uzaklaştırılması gereken nekrotik doku ve eksuda varlığı nedeniyle inflamatuvar yanıt daha şiddetlidir, İnflamasyonun şiddetli olması, parankimal hücrelerde rejenerasyonun olmaması ve doku defekti nedeniyle granülasyon dokusu daha fazla miktardadır (39,42).

Tersiyer iyileşme (Gecikmiş primer iyileşme)

Sekonder iyileşmeye bırakılan yaranın şartlar uygun hale geldiğinde yani yeterli granülasyon dokusu oluştuğunda primer olarak kapatılmasıdır. Bu tip iyileşmede kollajen metabolizması bozulmaz ve sonunda primer kapanmada ulaşılan gerilme kuvvetine eşit değerler elde edilir.

2.3.2.3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Cerrahide yara iyileşmesini etkileyen birçok lokal ve sistemik faktörlerin varlığı bilinmektedir.

Lokal faktörler, Cerrahi alanının doku kan akımı (oksijenizasyon), İskemi Enfeksiyon (nekrotik doku, yara lokalizasyonu), Yabancı cisimler, Ödem/artmış doku basıncı (doku gerginliğinin artması, vs.), Yara yerinde hematoma ve seroma gelişimi, Cerrahi teknikte yetersizlik ve yanlış sütür materyali, Çok baskılı pansuman

Sistemik faktörler, Doku perfüzyonunu etkileyen kardiyovasküler sistem hastalıkları, Kan oksijenizasyonunu etkileyen respiratuvar sistem hastalıkları, Obezite, Metabolik hastalıklar (üremi, kronik anemi), Endokrin hastalıklar (**Diyabet**, hipotroidizm), Renal ve hepatik hastalıklar, Yaşlılık, Hipotermi, Gut, Ağrı, Sepsis, Beslenme bozuklukları (protein-kalori eksikliği, vitamin eksikliği, eser element eksikliği vs.) ve dehidratasyon, Sigara (nikotin), Kortikosteroid, İyonize radyasyon, Kemoterapotik ilaçlar (kolşisin, metotreksat, 5-florourasil, siklofosfamid), Nonsteroid anti-enflamatuvar ilaçlar, Bağ doku metabolizma bozukluğu yapan genetik hastalıklar (Kutis laxa, Ehler- Danlos, Osteogenezis İmperfekta, Marfan Sendromu) (39-42, 48, 64).

Uygun bir yara iyileşmesi için, tedavi yöntemlerinin uygulanmasının yanı sıra yara iyileşmesini olumsuz etkileyebilecek faktörlerin de en aza indirgenmesi gerekmektedir. Bu faktörlerin arasında sıklıkla karşımıza çıkan diyabet, yara iyileşmesini etkileyen önemli hastalıklardan biridir (43). Dolayısıyla bozuk yara iyileşmesine örnek teşkil eden diyabetin, yara iyileşme modellerinde kullanılması klinikle uyumludur.

2.4. Diyabet ve yara iyileşmesi

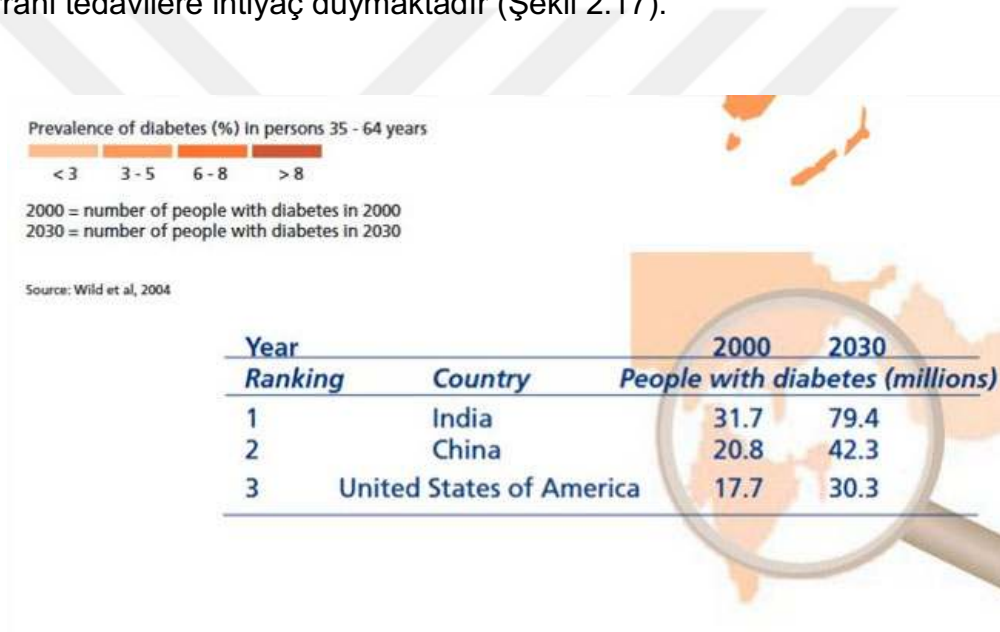
Diyabet, günümüzde en sık görülen kronik hastalıklardan biridir. Hastalık, kalıtsal ve edinsel faktörlerin etkileşimi ile oluşan insülin hormon aktivitesindeki yetersizliğe bağlı olarak gelişen hiperglisemi ve yetersiz insülin aktivitesine bağlı olarak dokularda oluşan metabolik anomaliler ile karakterizedir (63,66).

Diyabetes Mellitus Komplikasyonları

Diyabetin komplikasyonları akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır. Akut komplikasyonlar diyabetik ketoasidoz, hiperozmolar nonketotik koma, laktik asidoz ve hipoglisemidir. Kronik komplikasyonlar da kendi içerisinde makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır. Makrovasküler komplikasyonlar hipertansiyon, serebrovasküler hastalık ve koroner arter hastalığı; mikrovasküler komplikasyonlar ise retinopati, nefropati, nöropatidir.

DM'un etiyolojisi tam bilinmemektedir. Suçlanan birçok etiyolojik faktör vardır. Bununla beraber, Tip 1 diyabet ve Tip 2 diyabet için öne sürülen etiyolojik faktörler arasında major farklılıklar mevcuttur(63). Tip 1 Diyabette çeşitli nedenlere bağlı pankreas-hücrelerinin yıkımı söz konusu iken Tip 2 diyabette genetik faktörler ve obeziteye bağlı reseptörlerde insülin direnci söz konusudur(63). Tipi ne olursa olsun sonuçta tüm diyabetlilerde benzer sorunlar gelişmektedir.

Diyabetik hastalarda diyabetik olmayan hastalara göre gangren gelişme riski 17 kat daha fazladır. Diyabetik hastaların %15'i yaşamlarında diyabetik ayak ülseri ile karşılaşmakta ve bunların %6-40 amputasyon dahil cerrahi tedavilere ihtiyaç duymaktadır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Dünya genelinde diyabet prevalansı (WHO)

Diyabet ve Metabolik Patolojiler

Deneyisel ve klinik gözlemler, diyabetin tüm komplikasyonlarının metabolik bozukluklarla ve hiperglisemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Fizyopatolojik süreçlerin temelinde birkaç biyokimyasal olay yatmaktadır: Enzimatik olmayan glikozilasyon, Polioli yolu, Protein kinaz C aktivasyonu, Hekzosamin yolu artmış aktivitesi, Mitokondrial elektron taşıma zincirinde süperoksit anyonu oluşumu (66).

Mitokondride oluşan ROS'ların mitokondrial DNA hasarına neden olduğu ve böylece bu DNA tarafından kodlanan elektron transport elemanlarından bazılarının yapılarının ve fonksiyonlarının bozulmasına yol

açtığı gösterilmiştir. Hasarlı elemanlar normoglisemide bile süperoksit oluşumunun artmasına neden olur. Günümüze kadar gelen araştırmalar yukarıdaki mekanizmalarla oluştuğu düşünülen yara iyileşmesini sekteye uğratan komplikasyonlar arasında diyabetik ayak ülserli hastaların % 60'ında periferik nöropati, % 20'sinde iskemi, % 20'sinde nöropati ve periferik arter hastalığı birlikte bulunur. Yara iyileşmesinde görülen aksaklıklar, yetersiz insülin salınımı ve artan kan glikoz miktarı sebebi ile olabilir çünkü hiperglisemi hücrelerin davranışlarını etkilemektedir(66).

Diyabetik insan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, inflamasyon, kollajen birikimi, hücrelerarası matriks farklılaşması, fibroblast çoğalması ve yara kontraksiyonu gibi yara iyileşme sürecinde anormallikler olduğunu göstermektedir(67). Diyabetlilerde görülen yetersiz yara iyileşmesinin inflamatuvar faz sırasındaki anormal doku cevapları ile ilgili olduğu düşünülmektedir(63,67). Yara iyileşmesinin ilk evresi olan inflamatuvar fazın tipik özellikleri, diyabetli hastaların yaralarında anormallikler gösterir. Yara bölgesinde hücre birikiminin azalması, inflamatuvar hücre yoğunluğunun azalmasına ve böylece inflamatuvar mediyatörlerin azalmasına yol açmaktadır. Bu da fibroblast göçünün yavaşlamasına ve kollajen sentezinde azalmaya neden olur ve bu da yara geriliminin azalmasıyla sonuçlanır. Azalmış anjiogenezin yol açtığı hipoksi ve enfeksiyon riskinde artışın haricinde diyabetik yara iyileşmesinde bahsedilen problemlerin çoğunluğu inflamasyon periyodunda yer almaktadır. Bu da bu periyodun dengesinin yara iyileşmesinin temelini oluşturduğunu gösterir(44).

Diyabetik hastaların %98'inde kapiller endotelinin bazal membranın fonksiyon bozukluğu sebebiyle vazodilatasyon cevabı bozuktur(68). Bu sertliğin sebebi protein glikolizasyonudur(66). Hasar görmüş endotel tamir edilirken hücre içi yüksek glikoz endotel hücrelerince bazal membran sentezini uyarır. Aşırı protein birikimi ile yeni oluşan bazal membran kalınlaşır ve kapiller geçirgenlik azalır. Sonuç olarak lökosit ve eritrosit göçü azalır(68). Ayrıca yara bölgesine gelen inflamatuvar hücrelerin yara alanını terk etmeleri gecikir ve kronik inflamasyon oluşur(67,69). Diyabette yara iyileşmesinin erken evrelerinde lökosit aktivitesinin bozulması daha sonraki evrelere de etki eder(38) ve fibroblast çoğalması ve kollajen sentezini de önler(71). Bozuk granülasyon dokusu oluşur(71,72).

Diyabette yara iyileşmesinin bozukluğunun bir başka nedeni de kollajen sentezinin seçici inhibisyonudur(74). Farmakolojik olarak diyabet oluşturulmuş hayvanlarda kontrol grubuna göre % 30 daha az kollajen içeriği saptanmıştır (75). Diyabet, kollajen oranına olduğu gibi kalitesine de etki eder. Kollajenin çapraz bağlanma oranını karbohidrat metabolizması belirler(77). Yapılan bir çalışmada diyabette insan kollajeninin daha çabuk yaşlandığı gösterilmiştir(78). Diyabette kollajenin glikolizasyonu da diyabetik olmayanlara göre daha fazla artış göstermiştir(112). Kollajen sentezindeki azalmaya bağlı olarak diyabette yaranın kopma kuvvetinde azalma belirlenmiştir. Bu durum özellikle tedavi edilmemiş hayvanlarda gösterilmiştir. İnsülin tedavisi azalmış yara gerim gücünü geriye çevirmez (113).

Artmış ateroskleroz ve nöropati nedeniyle azalmış perfüzyon, diyabetik hastalarda enfeksiyon için artmış risk teşkil etmektedir. Bunun yanında uzun süren immun fonksiyon bozukluğu ve azalmış anjiogenez de bu anormal iyileşmeye katkıda bulunur(48). Yara yerinde açılma, hipertrofik skar, keloid ve kronik ülser dönüşüm de diyabetik yaralarda görülebilen problemlerdendir (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. İyileşmeyen-Kronik Yaralarda Biomarkerlar

İYİLEŞMEYEN-KRONİK YARALARDA BİOMARKERLAR
MMP seviyelerinde artış
MMP/TIMP oranında artış
Sitokin seviyesinde artış
Prokalsitonin seviyesinde artış
Artmış bakteriyal housekeeping gen ekspresyonu Azalmış konakçı housekeeping

2.5. Deneysel Diyabet

Günümüzde çeşitli hastalıklara tanı konması, patogenezinin aydınlatılması, hastalıktan korunma ve tedavi olanaklarının incelenebilmesi için deneysel hayvan modellerinin kullanımı oldukça yaygındır. Diyabet hayvan modelleri diyabet araştırmalarında, insan deneklerinde gereksiz ve etik açıdan zorlayıcı araştırmalardan kaçınmaya ve bu hastalığın kapsamlı bir bilimsel görüşünü elde etmemize yardımcı olan önemli bir araçtır.

Diyabet hayvan modelleri de temsil ettikleri diyabet türüne göre sınıflandırılabilir. Hem alloxan hem de streptozotosin, tip 1 ve tip 2 diyabetin indüksiyonu için kullanılabilir. Yine de, bu kimyasal maddeler tip 1 diyabetin indüksiyonu için en yaygın şekilde kullanılır, çünkü insülin direncini doğrudan indükleyemezler.

Streptozosin (STZ)

STZ (2-Deoxy-2-([(methylnitrosoamino) carbonyl] amino)-D-glucopyranose) streptomyces achromogenes tarafından sentezlenen neoplastik, antineoplastik ve diyabetojenik özelliklere sahip nitrozüre analogu geniş spektrumlu bir antibiyotiktir(116-120). Nötral pH'da hızla dekompanse olmasından dolayı stabil halde olduğu pH 4- 4,5'de sitrat tampon içerisinde hazırlanması gerekir. Uygulamadan hemen önce hazırlanması gereken STZ, -20 C'de karanlık ortamda muhafaza edilmelidir (114).

Etki Mekanizması STZ, yapısında içerdiği glukoz molekülü sayesinde pancreas adacıklarının beta hücrelerine GLUT2 aracılığı ile alınır((Tablo 2.7). Bu nedenle GLUT2 düzeyinin azaldığı durumlarda diyabetojenik etkisinin azaldığı ve aynı zamanda çoklu dozlarda uygulanmasının da GLUT2 üretimini azalttığı gösterilmiştir(111,121).

STZ'nin ilk etkisi beta hücrelerinin glukozu yanıtını ortadan kaldırılması olup bunu kalıcı beta hücre hasarı takip eder.STZ'nin glukoz oksidasyonunu (122) ve insulinin biyosentezi ve sekresyonunu azalttığı da bildirilmektedir.

Çeşitli hayvanlarda STZ'nin diyabetojenik etkilerinin ortaya çıktığı gözlenen doz aralıkları Tablo 2.9 ve Tablo 2.10'da verilmiştir.

Tablo 2.8. Farklı hayvan türlerinde STZ' nin doz aralıkları

SIÇAN	40-80 mg/kg i.v. 35*-150 mg/kg i.p. 60-
FARE	60-200 mg/kg ** i.v. 50-180

Tablo 2.9. Tip 1 ve Tip 2 Diyabet oluşturmak için sıçanda STZ kullanım şekli ve dozları

DENEY HAYVANI	Tip 1 diyabet	Tip 2 diyabet
SİÇ AN	Erişkinde; 35-80 mg/kg tek doz i.v., i.p., s.c. 100 mg/kg tek doz i.v., i.p., s.c. 40 mg/kg tek doz i.m.	Yenidoğanda; 35-80 mg/kg tek doz i.v., i.p., s.c. 100 mg/kg tek doz i.v., i.p., s.c. Erişkinde; 65 mg/kg i.v. + 110-230 mg/kg i.p. NAD 35 mg/kg tek doz i.p., + 2 hafta süreli yüksek yağlı diyet 30 mg/kg iki doz i.p., + 4 hafta süreli yüksek yağlı diyet 60 mg/kg i.v. + 2 hafta süreli yüksek yağlı diyet

STZ uygulaması ile Tip II diyabetin erişkin hayvanlarda oluşturulmasının bir diğer yolu ise belli bir süre yüksek yağlı ya da yüksek fruktozlu(124) diyetle besleme sonrası STZ enjeksiyonudur. Tip II diyabetin gelişmesinde yüksek fruktoz tüketiminin önemli bir çevresel faktör olduğu bilinmektedir (124).

STZ veya alloksan enjeksiyonu sonrası hayvanların diyabet olup olmadıklarının belirlenmesi için sıklıkla 2-3 gün içerisinde kan glukoz düzeylerine (>200 mg/dl ya da > mmol/L) bakılmakla birlikte, düşük kan insulin düzeyi, günlük fazla idrar çıkışı (>25 ml/gün) ve glikozuri (>%2)(15) varlığı da değerlendirilmektedir.

STZ benzeri kimyasallarla oluşturulan diyabet modellerinin, diğer deneysel modeller ile karşılaştırıldığında daha ucuz olması, daha kolay geliştirilebilmesi, pancreas adacık beta hücrelerini tahrip etmesine rağmen diğer hücrelere zarar vermemesi, ketoasidoz ve mortalite oranının nispeten daha az olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (114,115).

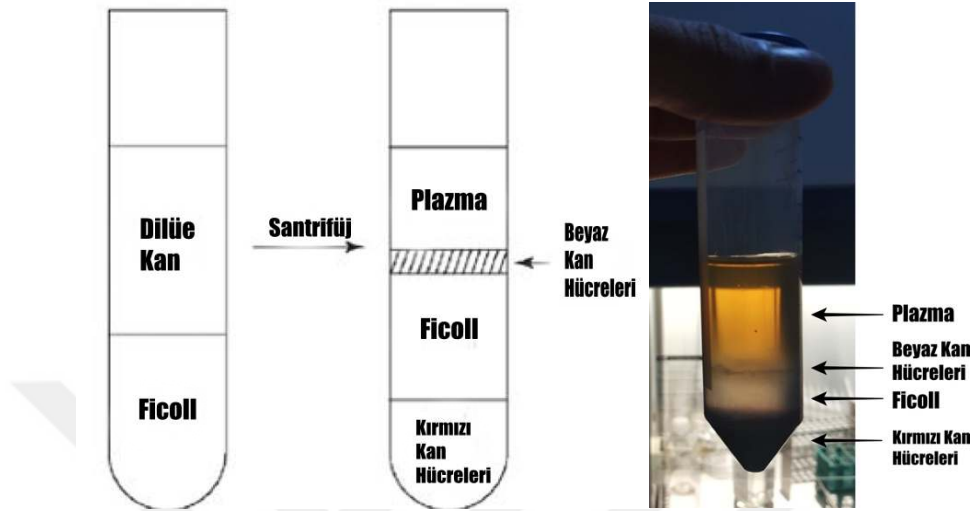
3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde(DEHAM) yapılacak olup 70 adet, ağırlıkları 250 $\pm$ 50 gr arasında değişen 12 haftalık erişkin erkek sıçanlar kullanılacaktır. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi (M.C.B.Ü.T.F.) Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı ile bu çalışma yürütülmüştür. Çalışma 70 adet ağırlıkları 250 $\pm$ 50 gr arasında değişen Wistar Albino suşu 12 haftalık erişkin erkek sıçanlar üzerinde yapıldı. M.C.B.Ü.T.F. Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanan hayvanlar aynı labarotuvarda 'M.C.B.Ü.T.F. Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usül ve İşleyiş' esasları doğrultusunda bakıldı. Sıçanlar 3 gün boyunca adaptasyon için herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletildi. Sıçanlar 3 gün boyunca adaptasyon için her hangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletilecektir. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar olan 22⁰C sıcaklık, % 30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat tutulacaktır. Kuru pelletler ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ

3.1.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi:

Çalışmamızda kullandığımız PKMHler sıçanlardan elde edilen tam kandan fikol dansite gradient metodu ile izole edilmiştir. 50 ml'lik konik tabanlı bir adet falkon tüpüne 10 ml fikol eklenmiştir. Başka bir 50 ml'lik konik tabanlı falkon tüpüne serolojik pipetle 10 ml kan ve üzerine tam kan miktarına eşit olarak 10 ml PBS eklenerek karıştırıldı. PBS ile karıştırılmış olan periferik kan konik tüpün kenarından yavaşça sızdırılarak fikol üzerine yayılması, iki sıvının birbirine karışmadan tabaka oluşturmaları sağlanmıştır. Daha sonra falkon tüpü 2700 RPM hızında 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda Orta tabakada meydana gelen PKMH hücreleri içeren bulutsu tabaka serolojik pipetle dikkatlice çekilerek başka bir 50 ml 'lik falkon tüpüne alındı. Elde edilen hücreler hacminin yaklaşık 3 katı kadar PBS eklenerek 1800 RPM hızında 15 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Üzerinde oluşan supernatant atılarak tekrar yıkamak amacıyla 6-8 ml PBS ile 1800 RPM hızında 10 dakika kadar santrifüj edildi ve sonrasında supernatant tekrar atılarak hücreler DMEMF12 besiyeriyle süspanse edilerek kültür kabına alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi

3.1.2 Kök Hücreden Farklandırılmış Langerhans Hücre Eldesi

Fikolden arındırılan hücreler medium eklenerek 5 ml'lik hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan 1 ml alınıp Tripan mavisi ile hücre sayı ve canlılığı belirlenmiştir. Daha sonra bu hücreler %10 ısıyla inaktive edilmiş FBS, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin eklenerek hazırlanan alpha-MEM besiyerine 50ng/mL GM-CSF (Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör) ve 50ng/mL IL-4 ilavesiyle 5 gün boyunca gūnaşırı sitokin içeren besiyeri değıştirilerek farklılaştırma yapılmıştır.

3.2. Hayvan Deneyleri

3.2.1. Deneyisel Diyabet Modeli ve Deney Grupları

Deneyisel greft yara modeli diyabetli olan ve diyabet olmayan sağlıklı erkek sıçanlarda genel anestezi altında oluşturuldu. Daha sonra sıçanlar diyabet olan ve olmayan her grupta beş olarak toplam 10 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece greft yara modeli yapılacak, sham grubuna sadece besiyeri uygulandı ve diğer gruplara ise, besiyeri içerisinde PKMH yara bölgesine uygulandı. Greftler kültür ortamına alınıp üzerlerine hücreler ekilde. Hayvanların sırt bölgesinde dört adet 1X1 cm tam kat deri grefti karşılıklı olarak yer değıştirdi. Sırttaki greftlerden 3., 7 ve 14. günlerde biyopsi ile örnek

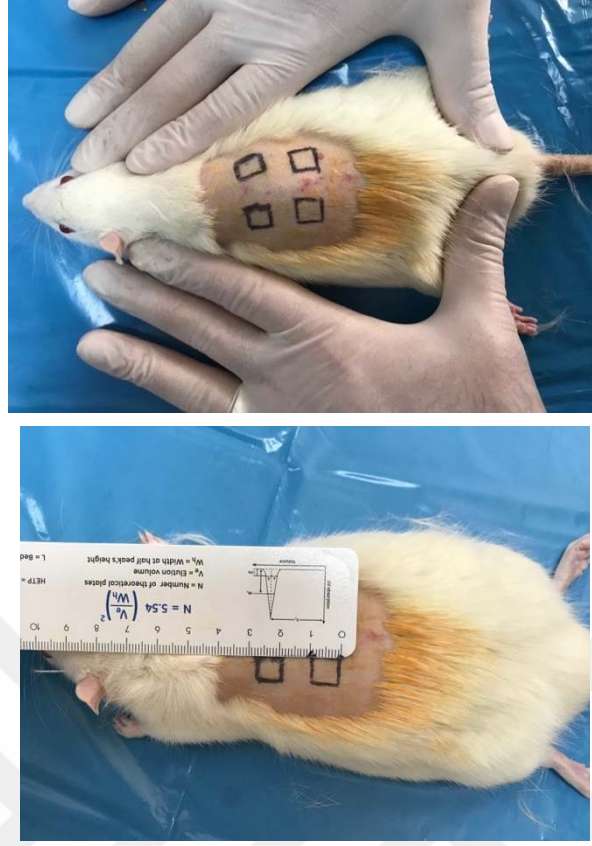
alınıp incelemeler yapıldı. Hücresel tedavide her bir yara kenarına 1×10^6 hücre uygulandı. PKMH ve FLH uygulamalar 14 gün boyunca tek doz yapıldı.

Cerrahi prosedür uygulanacak sıçanlara 90-100 mg/kg ketamin (Ketalar®) ve 7-10 mg/kg xylazin (Alfazyne®) olacak şekilde intraperitoneal olarak işlem öncesi uygulandı. Deney hayvanlarının birbirlerine zarar vermelerini engellemek amacıyla herbiri ayrı standart plastik kafeslerde tutuldu. Hayvanlar, çalışma boyunca stabil koşullar olan 23°C sıcaklık, % 30-70 nemli ortamda tutuldu. Sabah 07:00' den akşam 19:00'a kadar 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsü sağlandı. Sıçanlar standart kuru pelletler ve çeşme suyu ile beslenmiştir. Diyabet oluşturulacak olan deney hayvanları işlem öncesi aç bırakılmadı.. Bu amaçla diyabetik gruptaki hayvanlara tek doz şeklinde, taze hazırlanmış % 0.9 izotonik tuz solusyonunda çözdürülen 50 mg/kg Streptozotocin (STZ) intraperitoneal olarak verilerek diyabet oluşturuldu. STZ uygulandıktan üç gün sonra açlık kan şekeri 250 mg/dL ve üzeri olanlar diyabet kabul edildi (Tong ve ark. 2016).

Çalışmanın 1., 3. ve 7. günlerinde doku biyopsisi yapıldığı sırada kuyruk veninden kan şekeri düzeyi yeniden değerlendirilerek kan şekeri düzeyinin 250 mg/dl üzerinde olduğu görüldü.

Diyabet oluşturmak için STZ enjeksiyonu yapılan deney hayvanları başlangıç tarihinden deneyin sonlandırılacağı 14. güne kadar hergün vücut ağırlığı, idrar çıkışı ve beslenme açısından takip edildi. Bu takiplerde elde edilen değerler de diyabetik durumun oluştuğunu ve bu süre boyunca devam ettiğini gösterdi. Takipler sırasında hiperglisemi kaynaklı sıvı ve ağırlık kaybı yaşayan deney hayvanlarına gereğinde 0,1 ml SF ile s.c. volüm replasmanı yapıldı.

Cerrahi Prosedür: Deney hayvanları, deney öncesinde sırt bölgesi tüyleri tıraş makinesi ile deriye hasar vermemeye özen gösterilerek tıraşlandı (Şekil 3.2.). Tüyler uzaklaştırıldıktan sonra, deney alanı steril SF ile temizlendi. Tüm gruptaki deneklerde steril cerrahi set kullanılarak sıçanın tüylerden uzaklaştırılan sırt bölgesinde 15 numara bistüri eşliğinde dört adet 1x1 cm boyutlarında epidermis ve dermisi içeren tam kat deri grefti karşılıklı olarak yer değiştirildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Deney hayvanı sırt bölgesinde yara modeli oluşturma

Deneysel greft yara modeli DG ve NDG sağlıklı erkek sıçanlarda genel anestezi altında oluşturuldu. Daha sonra sıçanlar toplam 10 gruba ayrıldı; kontrol grubuna sadece greft yara modeli yapıldı, sham grubuna sadece besiyeri uygulandı ve diğer gruplara ise, besiyeri içerisinde PKMH veya FLHyara bölgesine uygulandı. Uygulamalar 14 gün boyunca tekrarlandı.

Yara yerleri günlük olarak epitelizasyon, enfeksiyon ve inflamasyon açısından takip edildi. Hiçbir deney hayvanına yara yeri enfeksiyonu nedeniyle topikal ve sistemik antibiyotik verilmedi.

In vivo deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

GRUPLAR	Diyabet olmayan gruplar	Diyabet olan gruplar
Kontrol grubu	Sadece deneysel greft yara modeli oluşturuldu, n:6.	Sadece deneysel greft yara modeli oluşturuldu, n:6.

Sham grubu	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve yara bölgesine sadece besiyeri uygulandı, n:6.	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve yara bölgesine sadece besiyeri uygulandı, n:6.
PKMH grubu	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve yara bölgesine periferik mononükleer hücre uygulandı, n:6.	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve yara bölgesine periferik mononükleer hücre uygulandı, n:6.
FLH grubu	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve farklıdırılmış langerhans hücreleri yara bölgesine uygulandı, n:6.	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve farklıdırılmış langerhans hücreleri yara bölgesine uygulandı, n:6.
FLH + PKMH grubu	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve periferik mononükleer hücreler farklıdırılmış langerhans hücreleriyle birlikte yara bölgesine uygulandı, n:6.	Deneyisel greft yara modeli oluşturulacak ve periferik mononükleer hücreler farklıdırılmış langerhans hücreleriyle birlikte yara bölgesine uygulandı, n:6.

3.3. MORFOLOJİK İNCELEME

3.2.1. Histopatolojik Değerlendirme

Deney süresince zaman bağımlı olarak yaranın tam ortasından alınacak biyopsi örneklerinde süreç canlı olarak izlendi ve örnekler değerlendirildi. Deneyin sonlandırılmasından sonra sıçanlardan genel anestezi altında 10 mg/kg ksilazin ve 75 mg/kg Ketamin ile ötenazileri yapıldıktan sonra yaralı ve sağlam deri bölgelerini içeren örnekler çıkarılarak %10' luk formalin içerisinde 24–72 saat tespit edildi. Akarsuda formalinden kurtarıldıktan sonra örnekler rutin doku takip prosedürünü takiben parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler her bir adezivli lamda 3–4 adet olacak şekilde dizildi. Kesitler 560C derecede de etüv içinde deparafinize edildikten sonra çeşme suyunda yıkanıp histopatolojik inceleme için Hemotoksilen–Eozin boyası ve Masson Trichrome, PAS ile boyandı. Morfometrik olarak Image Pro Express (Ver.4.5.1.3, Media Cybernetics Inc., 2002) USA ile

canlılık değerlendirildi ayrıca histokimyasal boyamalarda inflamasyon, fibrozis ve granülasyon değerlendirildi.

3.3.2. Histokimyasal boyama:

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. 2 dakika hematoksilen ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkanan kesitler 30 saniye eozin ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Ayrıca Masson Trichrome ve PAS boyamaları yapılarak kollajen ve matriks değerlendirildi.

İndirekt immunohistokimya boyaması:

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika kadar bekletildi. Dakopen ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Phosphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar e-NOS, i-NOS, PCNA, Ki67, VEGF, Fibronectin, Col1, Col3, Laminin, Langerin, CD1a, C IL-1, IL-6 ve IL10 ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu ile kapatıldı.

TUNEL boyaması:

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) boyama yöntemi kullanıldı. Alınan 5 µm'lik kesitler deparafinizasyon işlemini takiben önce distile suda daha sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Yıkandıktan sonra 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml Proteinaz-K 370C'de 15 dak. uygulandı. 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkamayı takiben 5 dak. % 3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra yeniden 5'şer dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dak. Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 370C de 60 dak. plastik slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dak. bekletildikten sonra Antidioksigenin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dak. muamele edilen örnekler 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kez distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanarak apoptotik indeks belirlendi ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.3.3. SEM analiz:

Her deney grubundan 3 adet greft örneği kültür ortamına alınarak üzerine PKMH, FLH, PKMH+FLH hücreleri ekilerek inkübe edildi. 7. gün deney sonlandırılarak örnekler SEM fiksasyonu için PBS ile birer defa yıkama sonrası dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanmış 0,16 gram Kakodilat + 0,5 ml Gluteraldehit içeren çözeltide +4 C'de 2 saat bekletildi. Daha sonra 100 ml dH₂O içerisinde 1,6 gram kakodilat bulunan tampon çözeltisinde 3 defa 10'ar dakika süreyle bekletildi. Örnekler SEM görüntülemesi öncesinde dehidratasyon için %30, %50, %70, %80, %90, %95 etanolde 15'er dk %100 etanolde 3 defa 30 dakika boyunca bekletildi. Örneklerden İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında Carl Zeiss 300VP SEM Cihazı ile taramalı elektron mikroskopik görüntüler elde edildi.

3.3.4. İstatistiksel analiz:

İmmunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi ve 0 = hücrelerin %1'den azında boyanma; 1+ = hücrelerin %1- 10'unda boyanma; 2+ = hücrelerin %11-50'sinde boyanma; 3+ = hücrelerin %51-80'inde boyanma; 4+ = hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma ile boyanma şiddeti de 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Daha

sonra “ $(1 + \text{boyanma şiddeti}/3) \times \text{boyanma oranı}$ ” formülü ile toplam skor hesaplandı. Elde edilen bulgular ile gruplar arasındaki farklılık Tek yönlü-ANOVA testi ile saptandı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

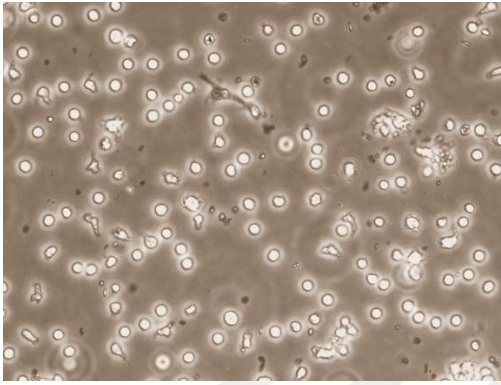


4.BULGULAR

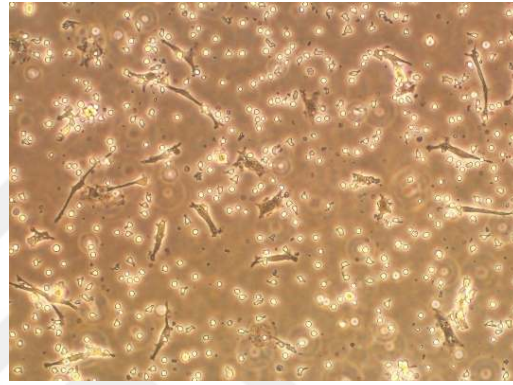
4.1. PKMH ve fLH Kùltürü

4.1.1. PKMH ve fLH Eldesi

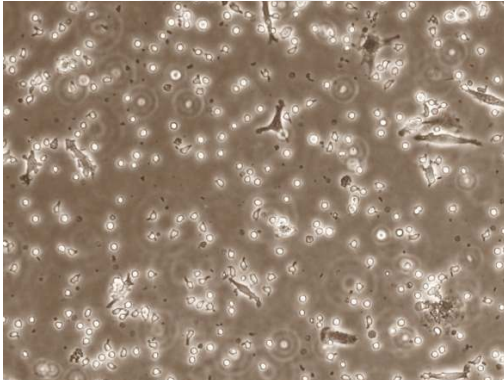
Kùltürün birinci gününden beşinci gününe kadar hücrelerin yuvarlak biçimli oldukları gözlemlendi. Maturasyon sitokinlerinin eklendiğı kùltürün beşinci gününden itibaren kùltür kabında bir çok hücrenin sitoplazmik çıkıntılar oluşturdukları ve yedinci günde tipik morfolojisine sahip oldukları gözlenmiştir (**Şekil 4.1**).



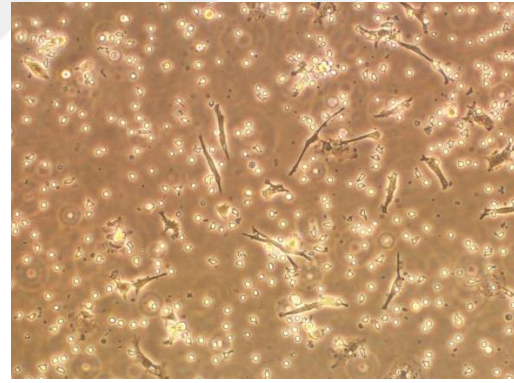
PKMH G3



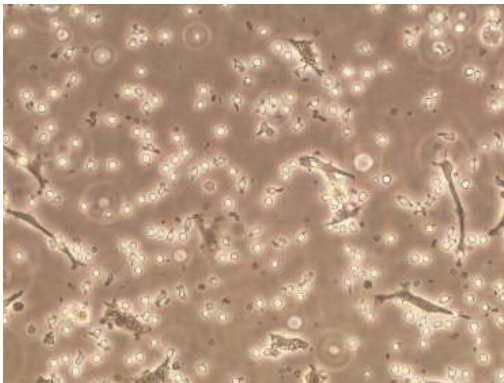
FLH G3



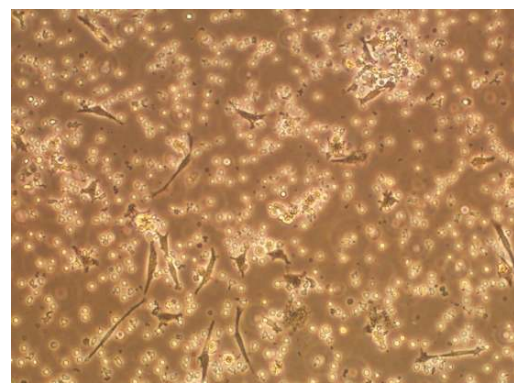
PKMH G5



FLH G5



PKMH G7



FLH G7

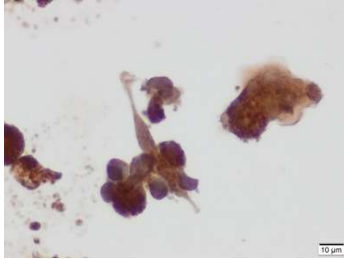
Şekil 4.1. Kùltür kabındaki PKMH ve FLH yapışmasının morfolojik görünümüleri.

Tablo 4.1. Kültür kabındaki PKMH ve FLH yapışmasının morfolojik görünümleri.

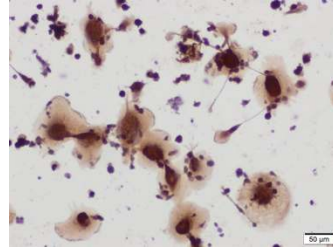
	Giriş H�cre Sayısı	�ıkış H�cre Sayısı	Canlılık
3. G�n PKMH (PKMH Besiyeri)	2X10 ⁶	1,7X10 ⁶	% 95�
3. G�n fLH (IL4 + GM-CSF)	2X10 ⁶	0,9X10 ⁶	% 85�
5. G�n PKMH (PKMH Besiyeri)	2X10 ⁶	1,5X10 ⁶	% 91�
5. G�n fLH (IL4 + GM-CSF)	2X10 ⁶	0,84X10 ⁶	% 83�
7. G�n PKMH (PKMH Besiyeri)	2X10 ⁶	1,34X10 ⁶	% 77�
7. G�n fLH (IL4 + GM-CSF)	2X10 ⁶	0,76X10 ⁶	% 95�

4.1.2. PKMH ve fLH Karakterizasyonu

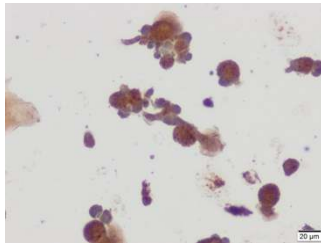
Yedinci günde kültür sonlandırılmasından sonra PKMH ve FLH alınan örnekler ile hücrelerin İHK incelemeleri gerçekleştirildi. CD45, CD34, IL-1a belirteçlerinin ifadesine bakıldı (şekil 4.2).



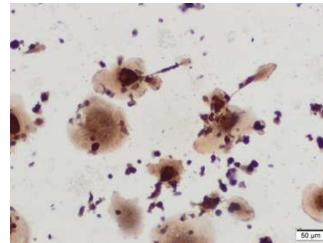
PKMH CD45



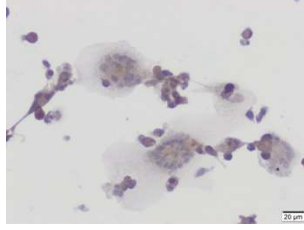
FLH CD45



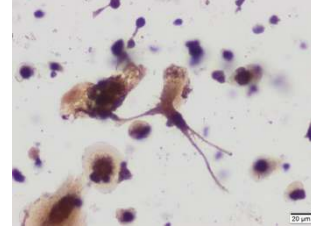
PKMH CD34



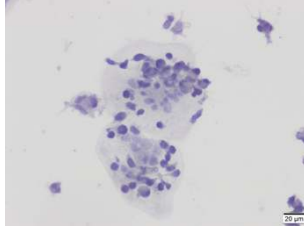
FLH CD34



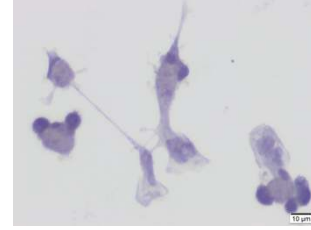
PKMH IL1a



FLH IL1a



PKMH CD14



FLH CD14

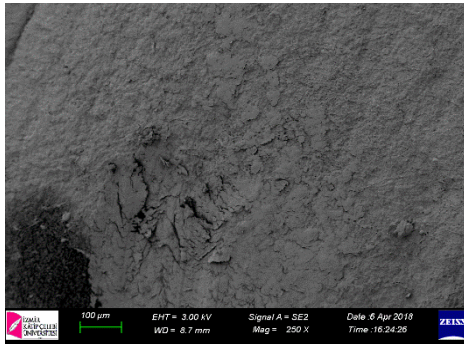
Şekil 4.2. PKMH ve FLH karakterizasyonu.

Tablo 4.2. PKMH ve FLH karakterizasyonu.

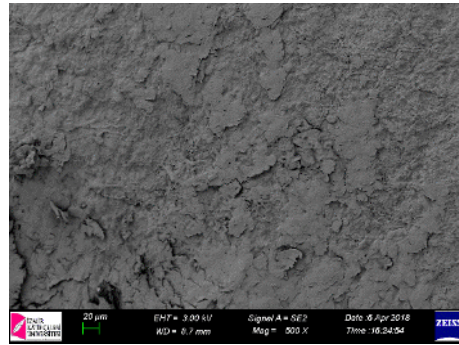
Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Mean
PKMH CD45	6	92,550	4.450	1.980
PKMH CD34	6	84.550	6.350	2.596
PKMH IL1a	6	18.440	2.330	2.992
PKMH CD14	6	8.360	8.650	3.531
FLH CD45	6	82.270	7.340	1.898
FLH CD34	6	85.660	3.880	1.584
FLH IL1a	6	90.880	9.330	2.596
FLH CD14	6	9.220	2.580	3.944

4.1.3. PKMH ve fLH SEM Analizi

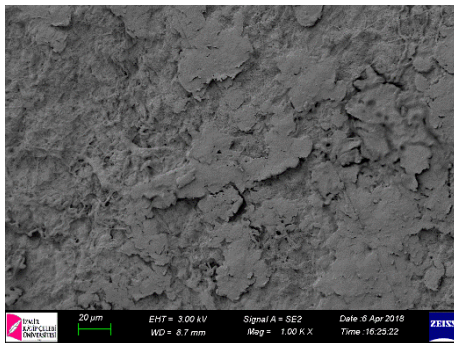
Yedinci günde kültür sonlandırılmasından sonra PKMH ve FLH alınan greftler üzerine yerleştirilerek bir gecelik inkübasyon sonrasında fikse edilip SEM ile incelendi. MKH ler yapışıp, yayılıp etkin bir şekilde deri ile etkileşirken PKMH ve fLH yuvarlak şeklide kalıp canlılıklarını sürdürdü ve çoğalma davranışında oldukları izlendi (Şekil 4.3).



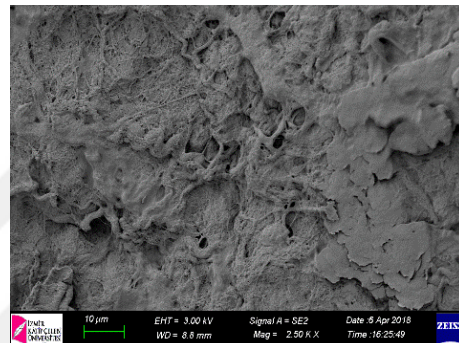
NDG - KG



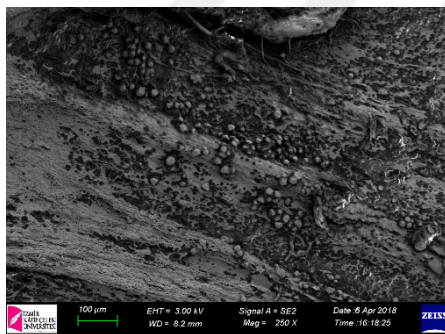
DG - KG



NDG - SH



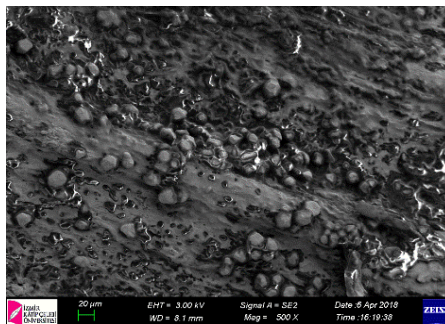
DG - SH



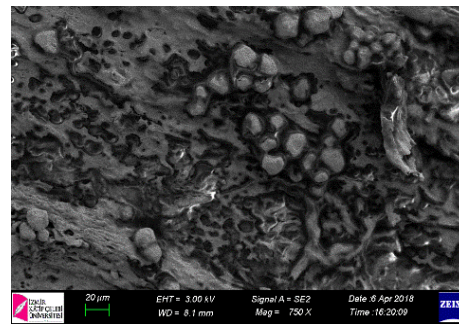
NDG - PKMH



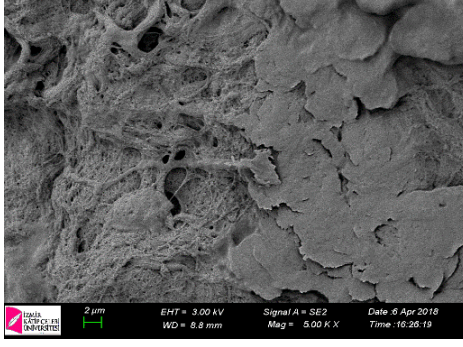
DG - PKMH



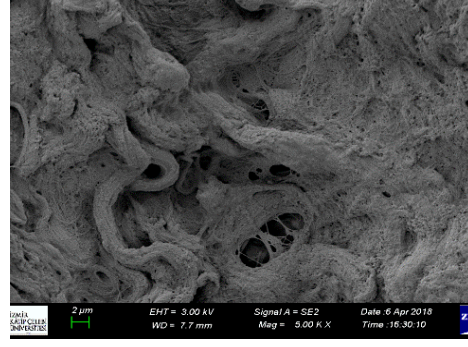
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.3. Kültürdeki deri greftlerinin üzerindeki PKMH ve FLH davranışının SEM analizi.

4.2. Morfolojik Sonuçlar

4.2.1. Makroskobik Sonuçlar

4.2.1.1. Deride PKMH ve fLH uygulamalarının makroskobik sonuçları

Makroskobik değerlendirmede amacı ile yapılan inceleme sonrasında tüm gruplarda 3. gün ve 7. gün sonuçları arasında fark olduğu gözlemlendi. Yara oluşturulan gruplarda 3. günde iyileşmenin az da olsa daha iyi olduğu ve diyabetik gruplarda da var olduğu saptandı (Şekil 4.4)

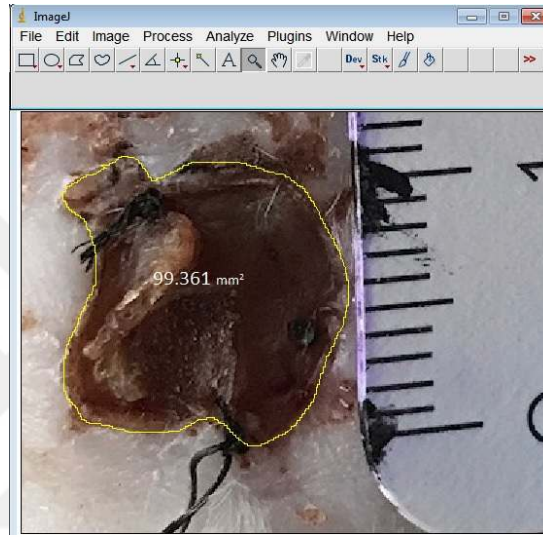
	KONTROL GRUBU	SHAM GRUBU	PKMH GRUBU	FLH GRUBU	PKMH + FLH GRUBU
DG					
NDG					

Şekil 4.4. Deri greftlerinin transferi sonrasında **3. GÜN** PKMH ve fLH davranışının makroskobik analizi.

Örneklerin morfometrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 3. Gün incelemelerinde diyabetik olmayan gruplarda kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,05$) iyileşmede etkili oldukları görüldü. Uygulamaların

PKMH ve FLH için anlamlı ($p<0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p<0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Deri greftlerinin transferi sonrasında **3. GÜN** PKMH ve FLH davranışının imageJ ile **morfometrik** analizi.



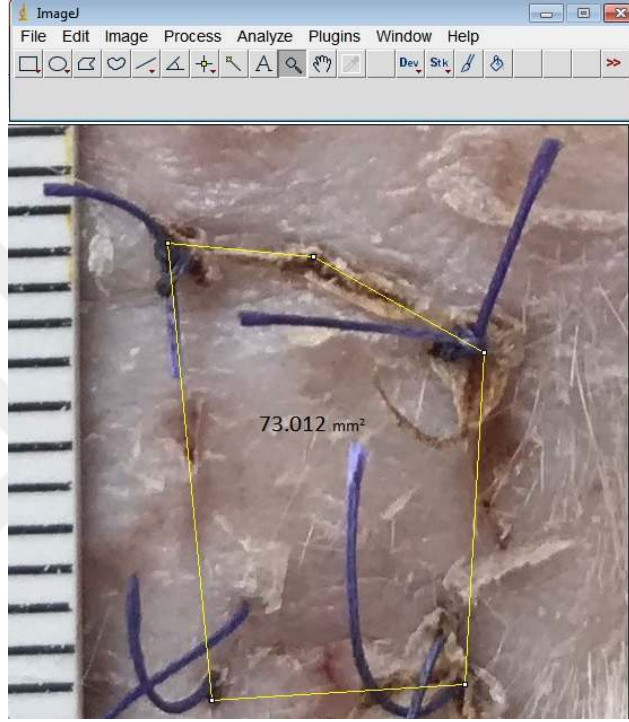
Çalışmanın **7. gününde** alınan makroskopik örneklerde DG ile karşılaştırıldığında NDG makroskopik olarak iyileşmenin daha hızlı gerçekleştiği görüldü (**Şekil 4.5**).

	KONTROL GRUBU	SHAM GRUBU	PKMH GRUBU	FLH GRUBU	PKMH + FLH GRUBU
DG					
NDG					

Şekil 4.5. Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının makroskopik analizi.

Örneklerin morfometrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 7. Gün incelemelerinde uygulamaların PKMH ve FLH için anlamlı ($p<0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p<0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının imageJ ile **morfometrik** analizi.



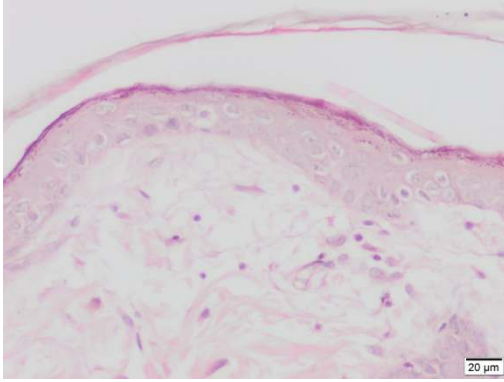
4.2.2. Mikroskopik Sonuçlar

4.2.2.1. Mikroskopik Histokimyasal Sonuçlar

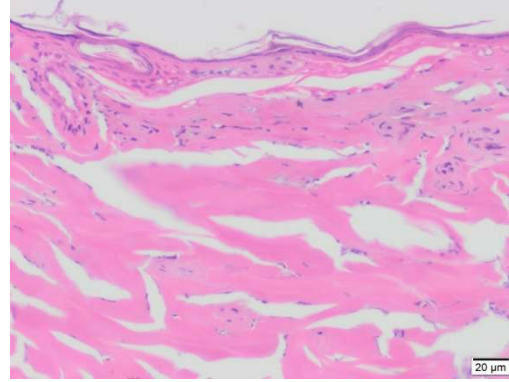
H-E Boyama Sonuçları

STZ ile diyabet oluşturulmuş denekler diyabet modelinin oluşturulmasından sonraki 3. gün ve 7. gün oluşturulan yara modeli üzerine PKMH ve FLH ile birlikte olan transferi gerçekleştirildi. H-E boyamalarda yara iyileşmesinin değişik düzeylerde gerçekleştiği bulundu

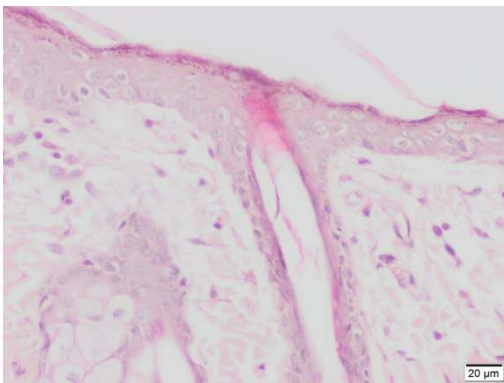
Doku morfolojisi değerlendirilmesi amacı ile yapılan inceleme sonrasında tüm gruplarda 1. gün sonuçları arasında fark olmadığı gözlemlendi. 3. günde yara oluşturulan bölgelerde epitel kaybının olduğu, granül dokusunun bulunduğu gözlemlendi ve erken dönemde gruplar arasında fark olmadığı saptandı. Diyabetik grupta uygulamaların etkili olduğu görüldü (Şekil 4.6)



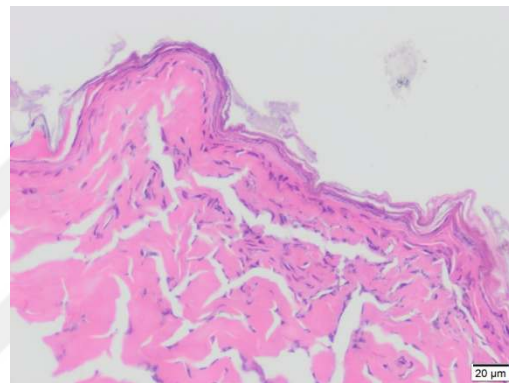
NDG - KG



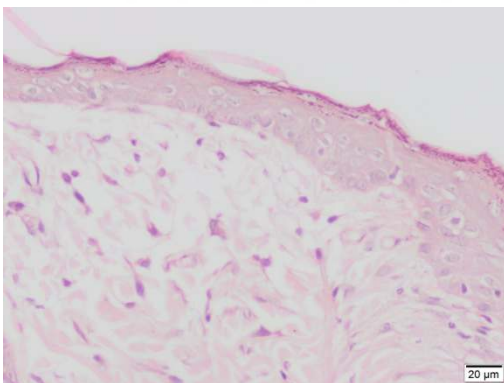
DG - KG



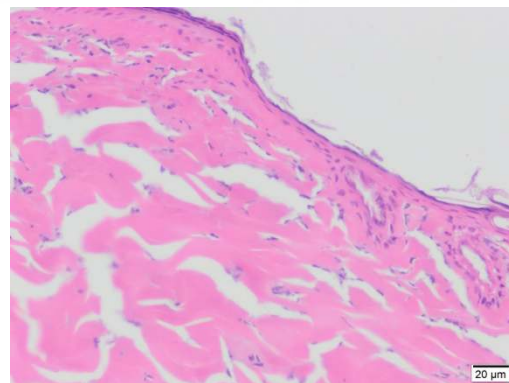
NDG - SH



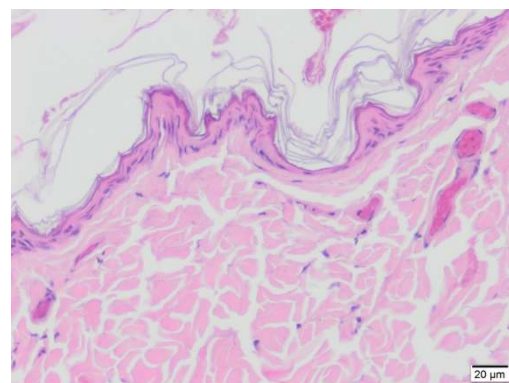
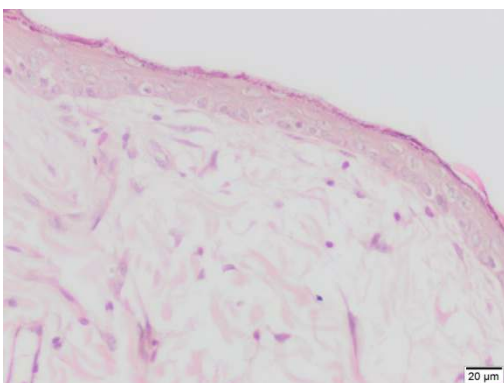
DG - SH



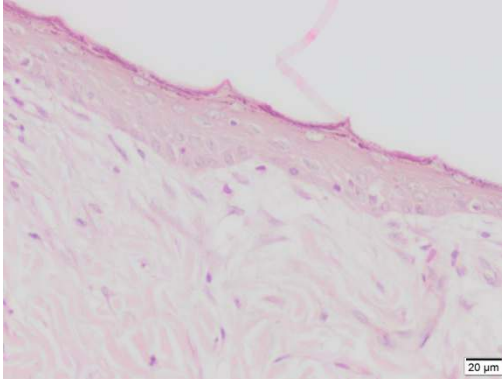
NDG - PKMH



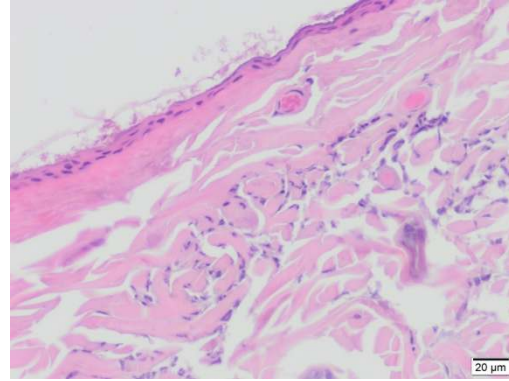
DG - PKMH



NDG - FLH



DG - FLH



NDG-PKMH+FLH

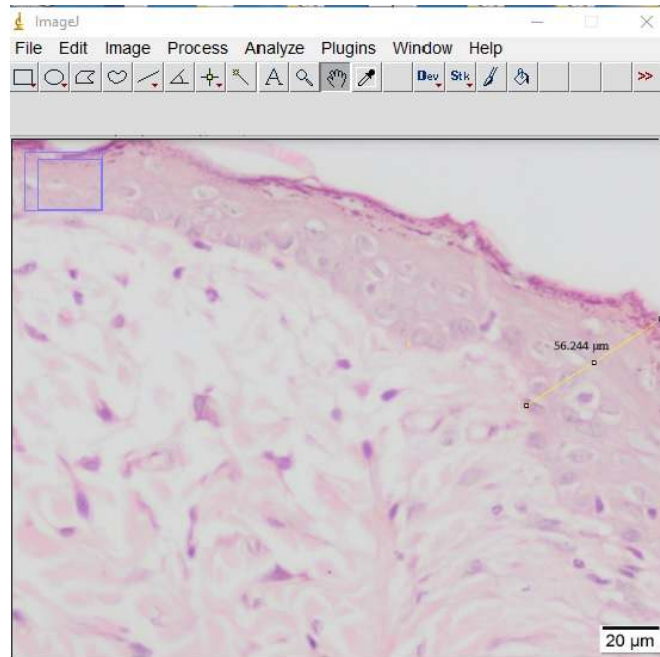
DG-PKMH+FLH

Şekil 4.6. Deri greftlerinin transferi sonrasında **3. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **H-E** analizi.

Örneklerin morfometrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 3. Gün incelemelerinde diyabetik olmayan gruplarda kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,05$) iyileşmede etkili oldukları görüldü. Uygulamaların

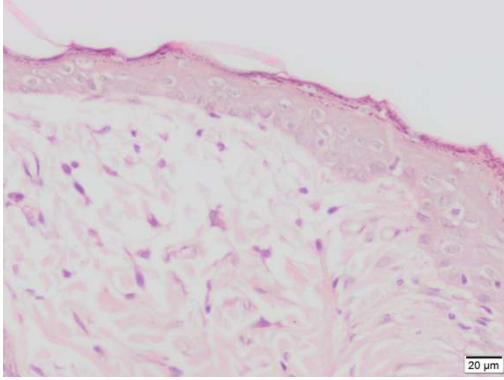
PKMH ve FLH için anlamlı ($p<0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p<0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Deri greftlerinin transferi sonrasında **3. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **H-E Damar sayısı** imageJ ile **morfometrik** analizi.

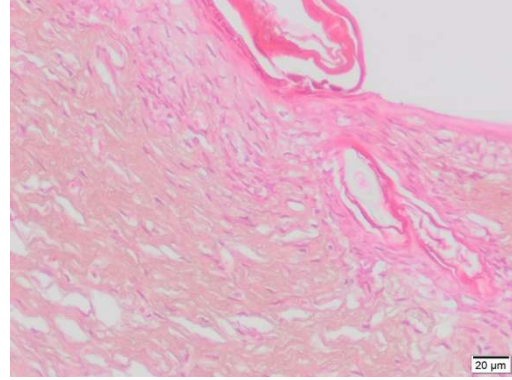


Çalışmanın **7. gününde** alınan örneklerde DG ile karşılaştırıldığında NDG için daha iyi olan epitelizasyonun sağlandığı bulundu. Bu durum hücre

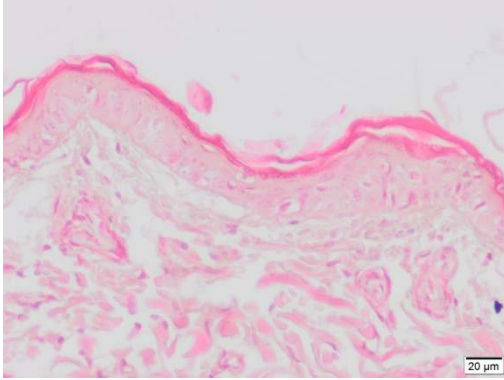
uygulamalarının bireysel olanlarında anlamlı ($p<0,05$) iken birlikte verilmelerinin oldukça anlamlı ($p<0,001$) etki yaptığı görüldü (**Şekil 4.7**).



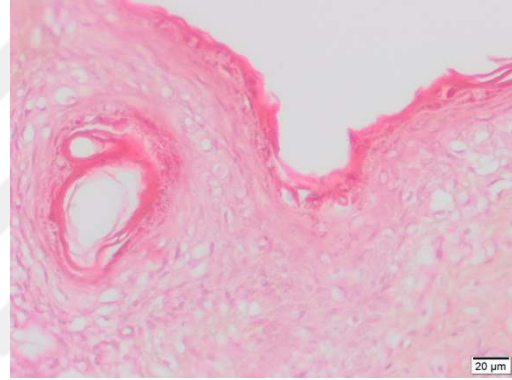
NDG - KG



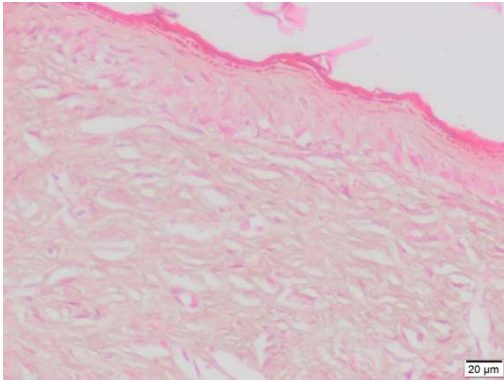
DG - KG



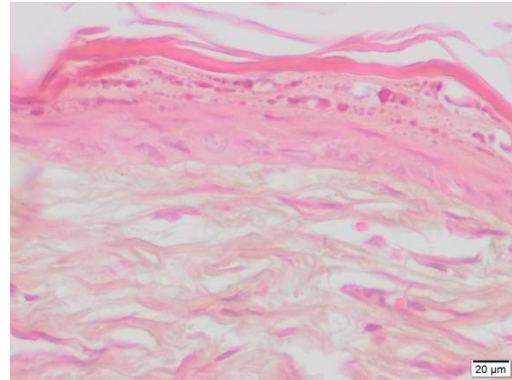
NDG - SH



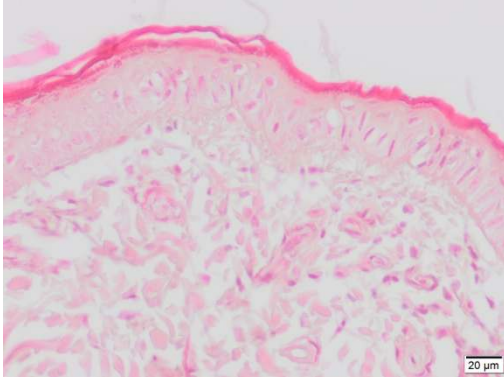
DG - SH



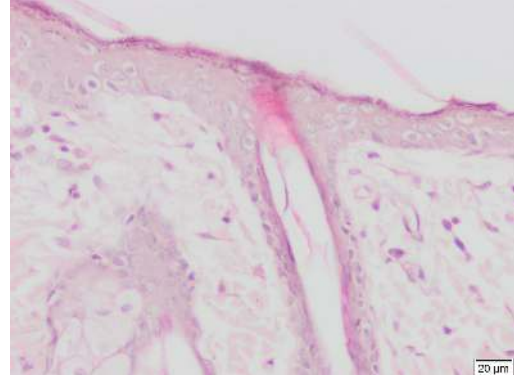
NDG - PKMH



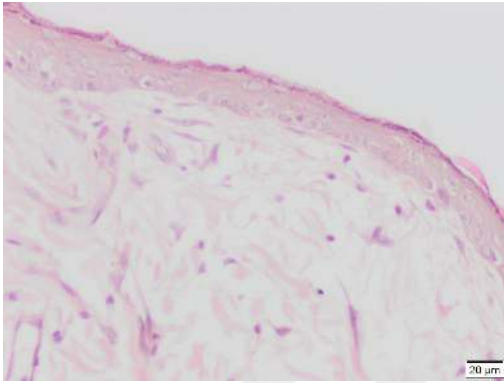
DG - PKMH



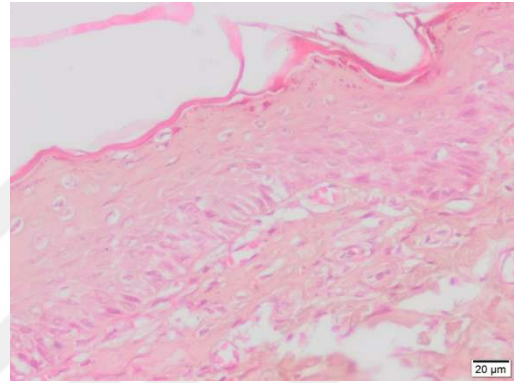
NDG - FLH



DG - FLH



NDG-PKM+FLH

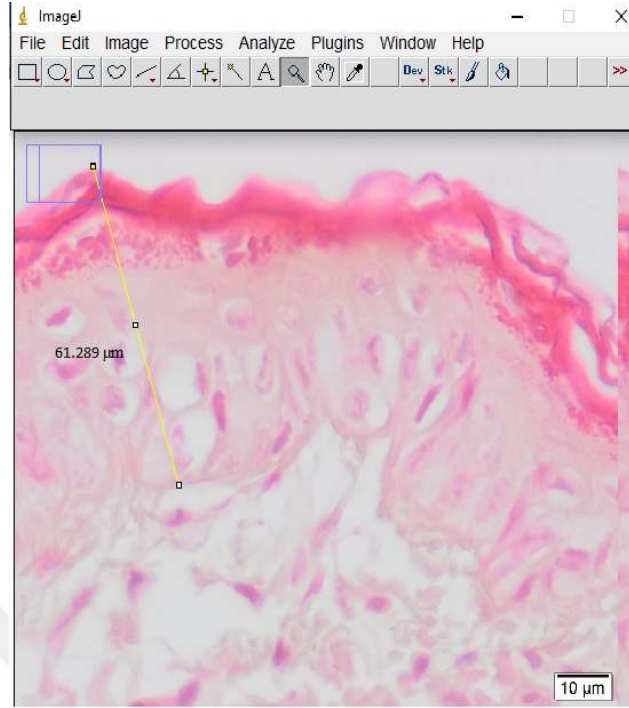


DG-PKM+FLH

Şekil 4.7. Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **H-E** analizi.

Örneklerin morfometrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 7. Gün incelemelerinde uygulamaların PKMH ve FLH için anlamlı ($p<0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p<0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.6).

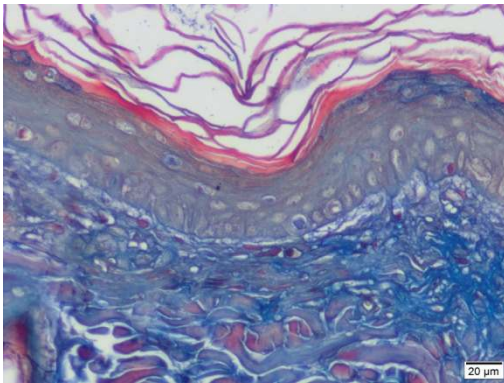
Tablo 4.6. Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **H-E Epitel kalınlığı** imageJ ile **morfometrik** analizi.



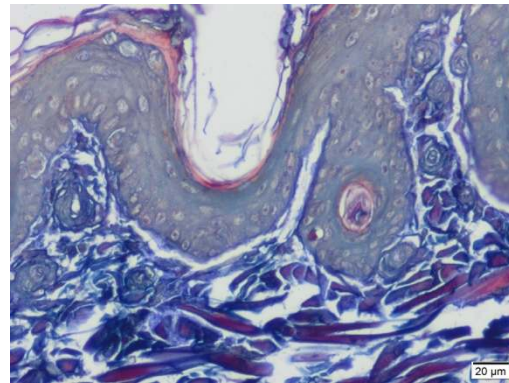
Masson Trikrom Boyama Sonuçları

STZ ile diyabet oluşturulmuş denekler diyabet modelinin oluşturulmasından sonraki 3. gün ve 7. gün PKMH ve FLH ile birlikte olan transferinin etkisi izlendi. MT boyamalarda yara iyileşmesinin değişik düzeylerde gerçekleştiği bulundu.

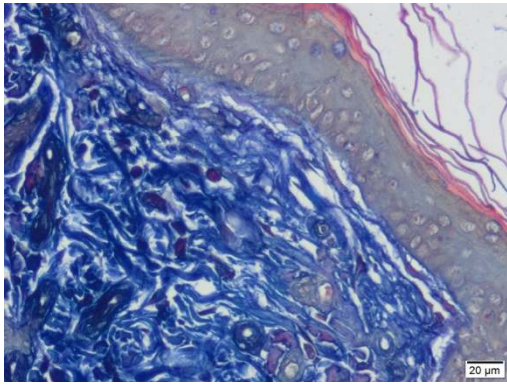
Doku morfolojisi değerlendirilmesi amacı ile yapılan inceleme sonrasında tüm gruplarda 1. gün sonuçları arasında fark olmadığı gözlemlendi. 3. günde yara oluşturulan bölgelerde epitel kaybının olduğu, granül dokusunun bulunduğu gözlemlendi ve erken dönemde gruplar arasında az bir fark olduğu saptandı. Diyabetik grupta uygulamaların etkili olduğu görüldü (Şekil 4.8).



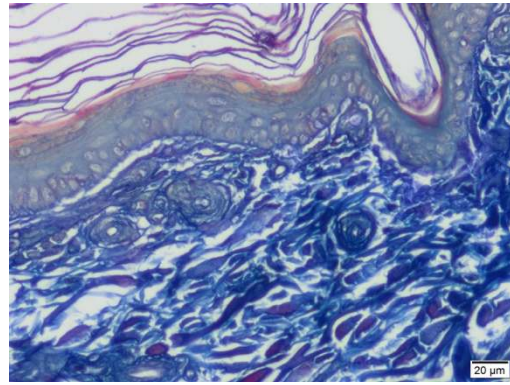
NDG - KG



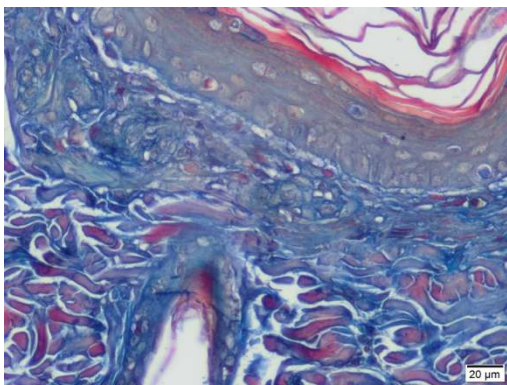
DG - KG



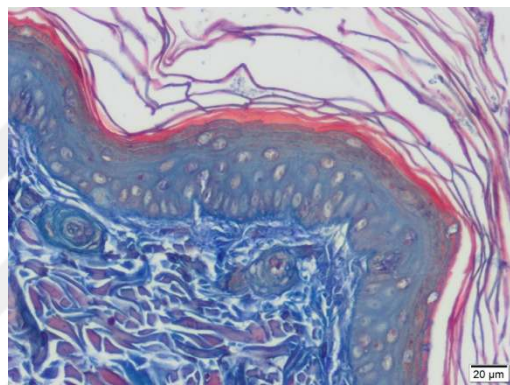
NDG - SH



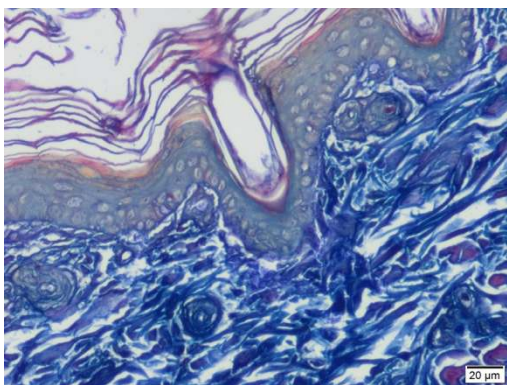
DG - SH



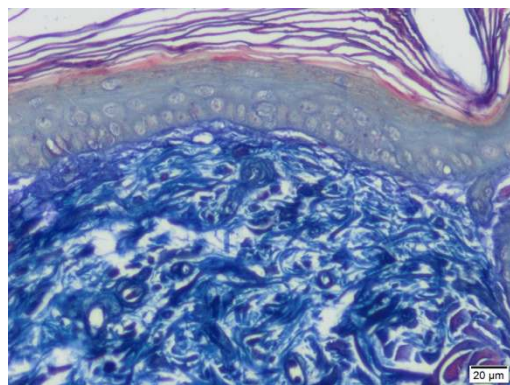
NDG - PKMH



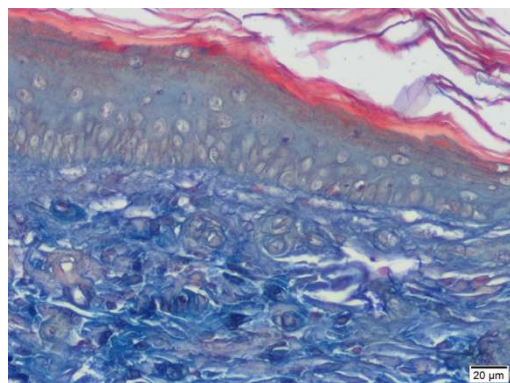
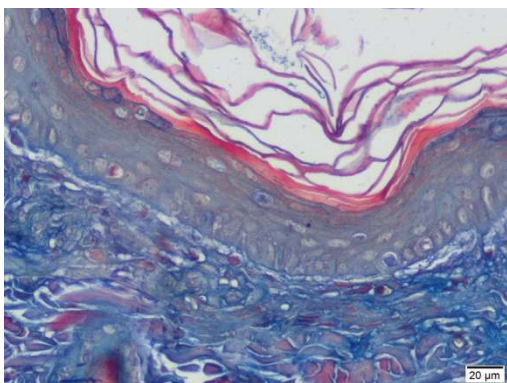
DG - PKMH



NDG - FLH



DG - FLH



NDG – PKMH+FLH

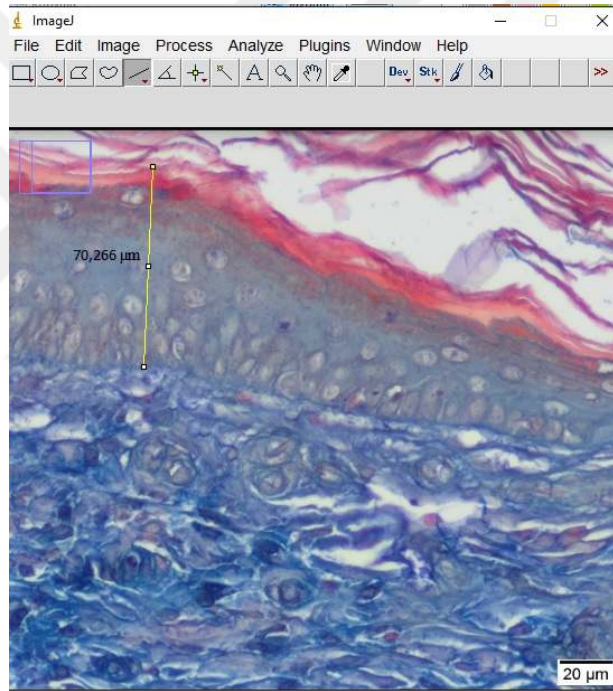
DG - PKMH+FLH

Şekil 4.8. Deri greftlerinin transferi sonrasında **3. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **MT** analizi.

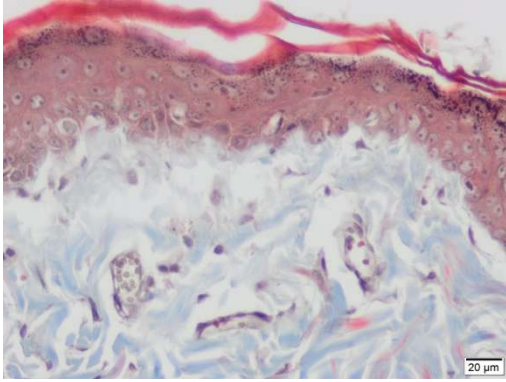
Örneklerin morfometrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 3. Gün incelemelerinde diyabetik olmayan gruplarda kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,05$) iyileşmede etkili oldukları görüldü. Uygulamaların

PKMH ve FLH için anlamlı ($p<0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p<0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.7).

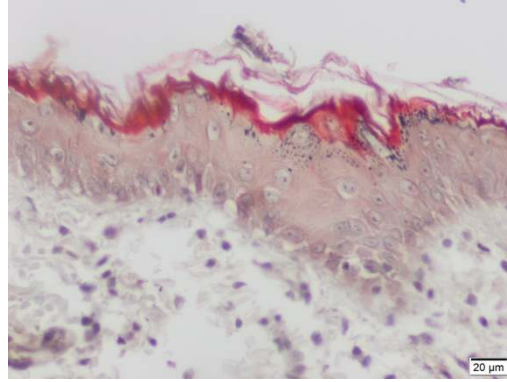
Tablo 4.7. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının MT Kollajen imageJ ile morfometrik analizi.



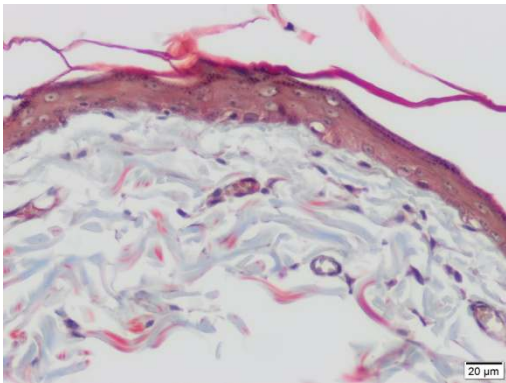
Çalışmanın **7. gününde** alınan örneklerde DG ile karşılaştırıldığında NDG için daha iyi olan epitelizasyonun sağlandığı bulundu. Bu durum hücre uygulamalarının bireysel olanlarında anlamlı ($p<0,05$) iken birlikte verilmelerinin oldukça anlamlı ($p<0,001$) etki yaptığı görüldü (**Şekil 4.9**).



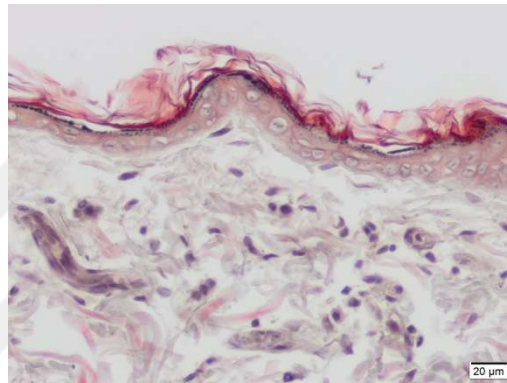
NDG - KG



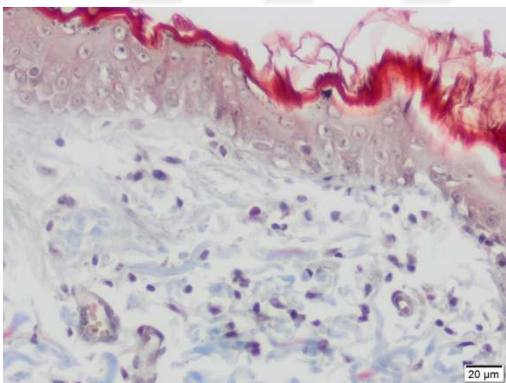
DG - KG



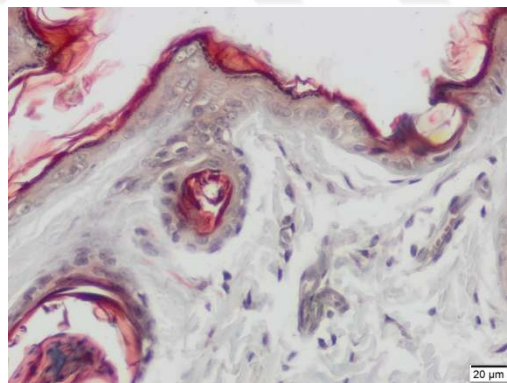
NDG - SH



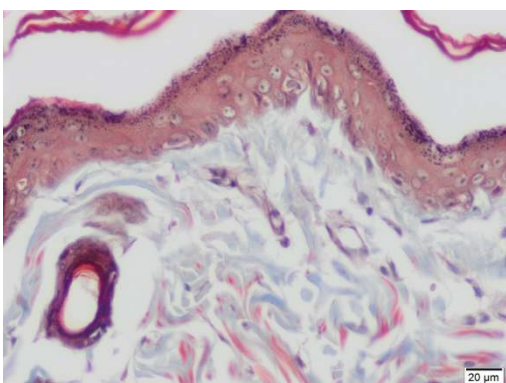
DG - SH



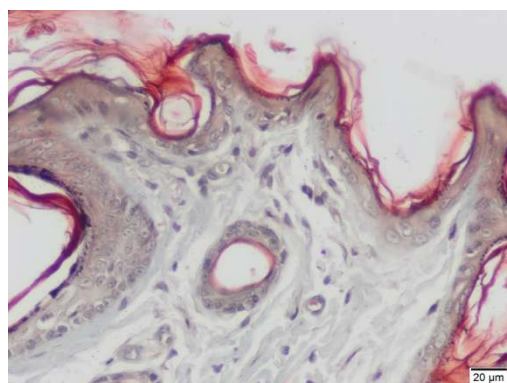
NDG - PKMH



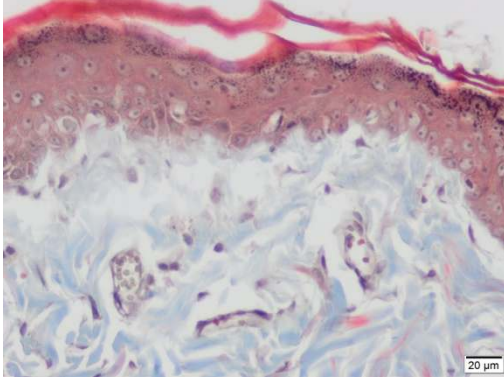
DG - PKMH



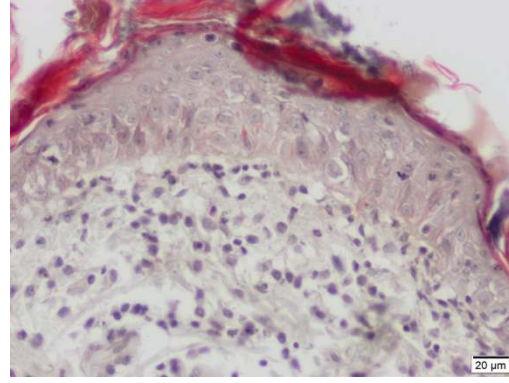
NDG - FLH



DG - FLH



NDG – PKMH+FLH

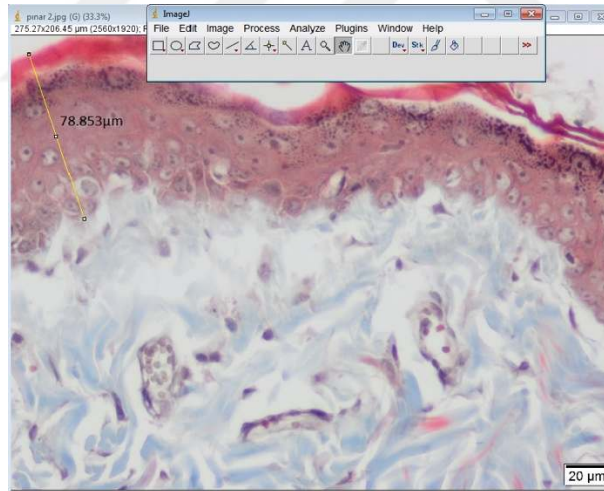


DG - PKMH+FLH

Şekil 4.9. Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **MT** analizi.

Örneklerin morфометrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 7. Gün incelemelerinde uygulamaların PKMH ve FLH için anlamlı ($p < 0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p < 0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **MT Kollajen** imageJ ile **morfometrik** analizi.

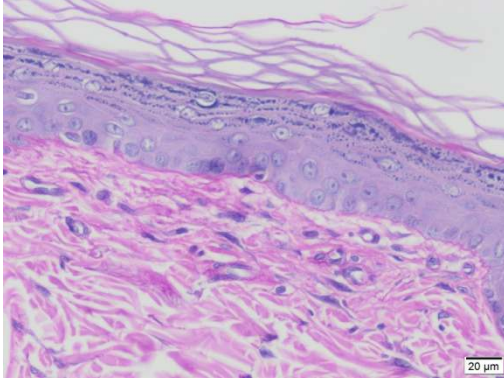


PAS Boyama Sonuçları

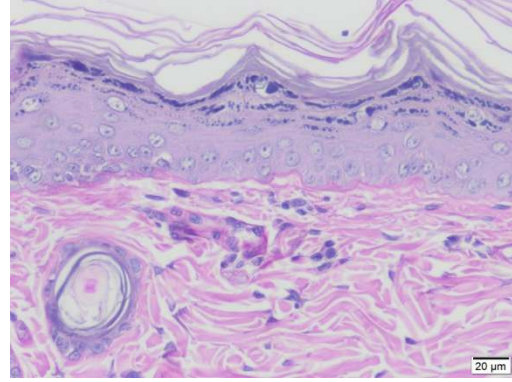
STZ ile diyabet oluşturulmuş denekler diyabet modelinin oluşturulmasından sonraki 3. gün ve 7. gün PKMH ve FLH ile birlikte olan transferinin etkisi izlendi. PAS boyamalarda yara iyileşmesinin değişik düzeylerde gerçekleştiği bulundu.

Doku morfolojisi değerlendirilmesi amacı ile yapılan inceleme sonrasında tüm gruplarda 1. gün sonuçları arasında fark olmadığı gözlemlendi. 3. günde yara

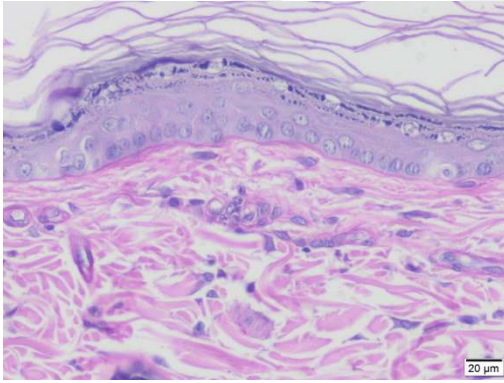
oluşturulan bölgelerde epitel kaybının olduğu, granül dokusunun bulunduğu gözlemlendi ve erken dönemde gruplar arasında az bir fark olduğu saptandı. Diyabetik grupta uygulamaların etkili olduğu görüldü (Şekil 4.10).



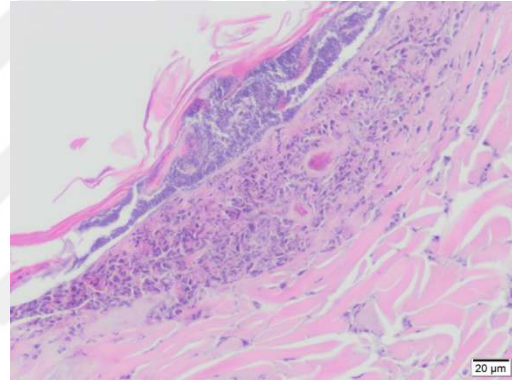
NDG - KG



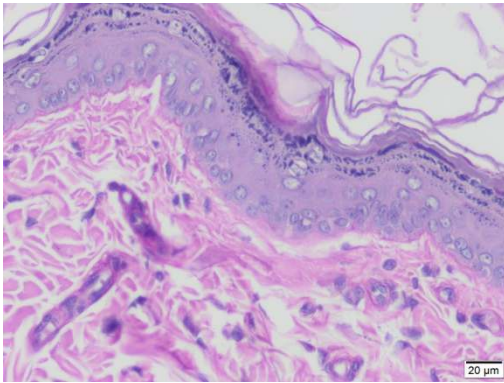
DG - KG



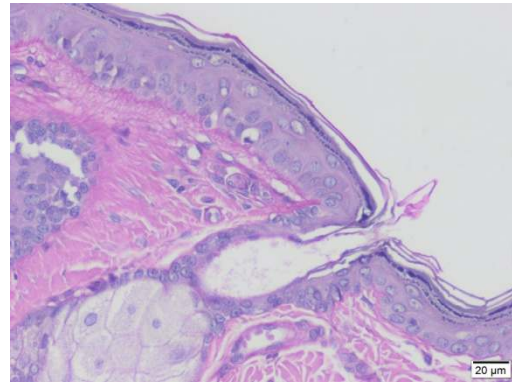
NDG - SH



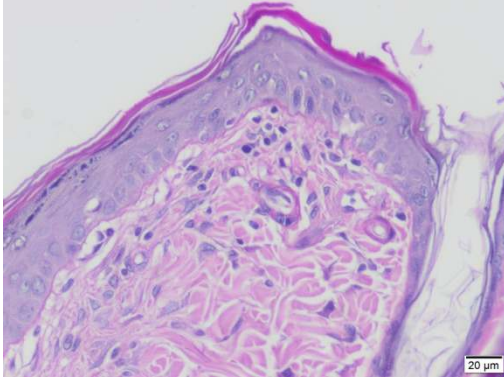
DG - SH



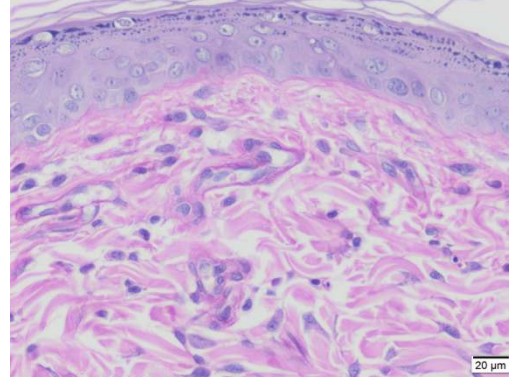
NDG - PKMH



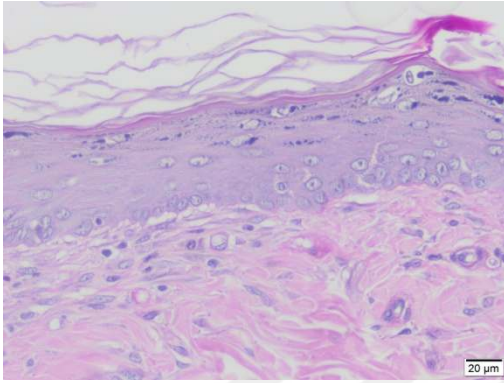
DG - PKMH



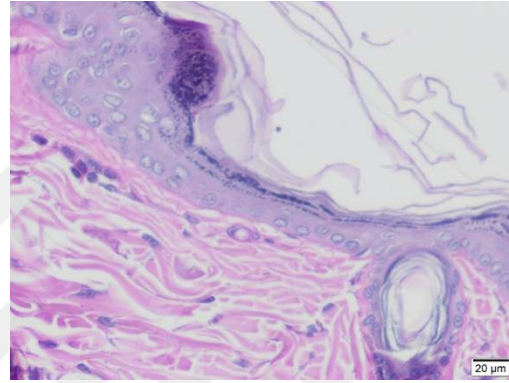
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



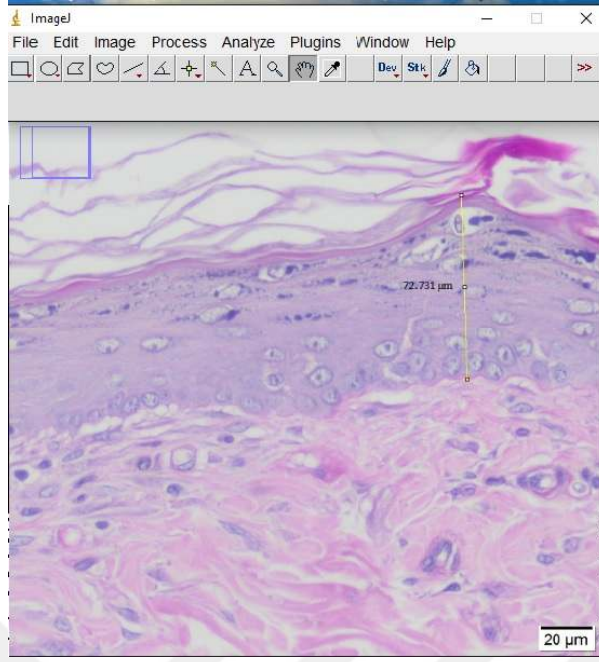
DG - PKMH+FLH

Şekil 4.10. Deri greftlerinin transferi sonrasında **3. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **PAS** analizi.

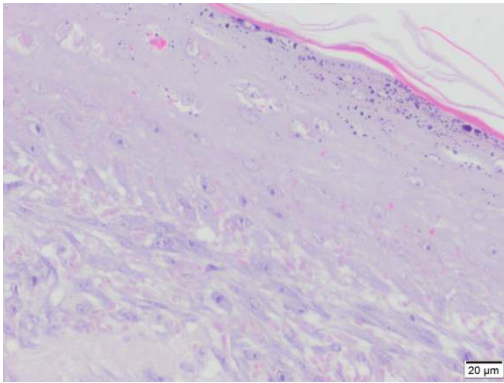
Örneklerin morfometrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 3. Gün incelemelerinde diyabetik olmayan gruplarda kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,05$) iyileşmede etkili oldukları görüldü. Uygulamaların

PKMH ve FLH için anlamlı ($p<0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p<0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.9).

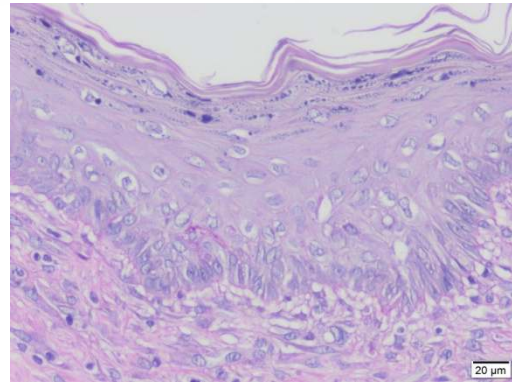
Tablo 4.9. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. GÜN PKMH ve FLH davranışının PAS BEZ SAYISI imageJ ile morfometrik analizi.



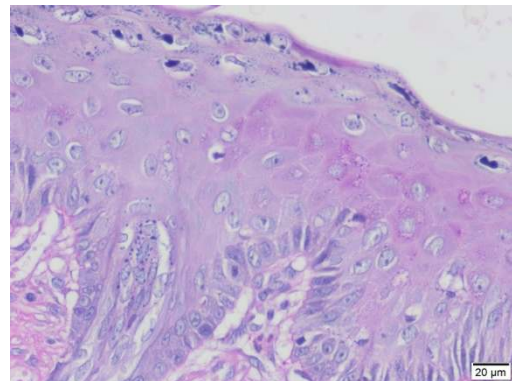
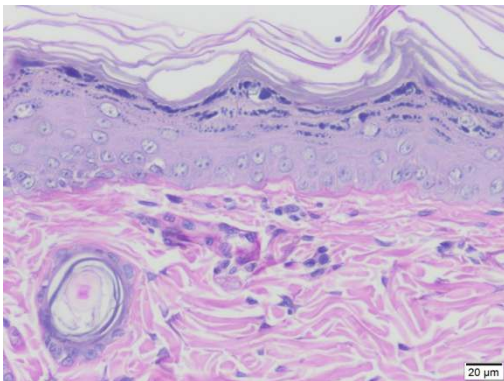
Çalışmanın **7. gününde** alınan örneklerde DG ile karşılaştırıldığında NDG için daha iyi olan epitelizasyonun sağlandığı bulundu. Bu durum hücre uygulamalarının bireysel olanlarında anlamlı ($p<0,05$) iken birlikte verilmelerinin oldukça anlamlı ($p<0,001$) etki yaptığı görüldü (**Şekil 4.11**).



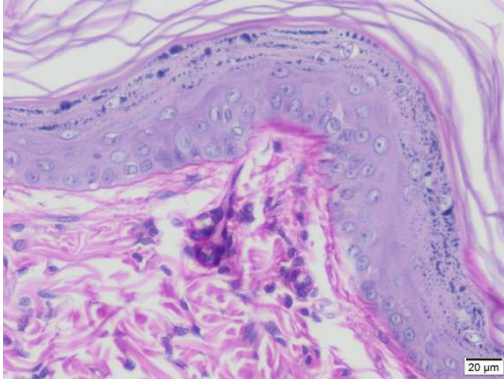
NDG - KG



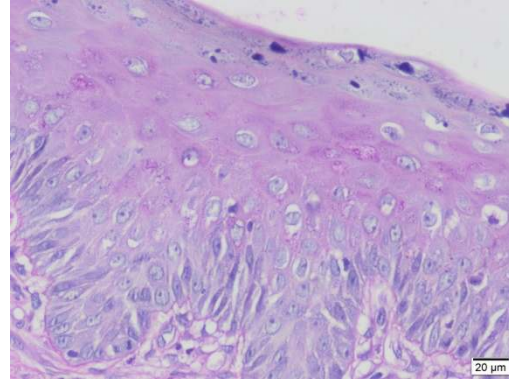
DG - KG



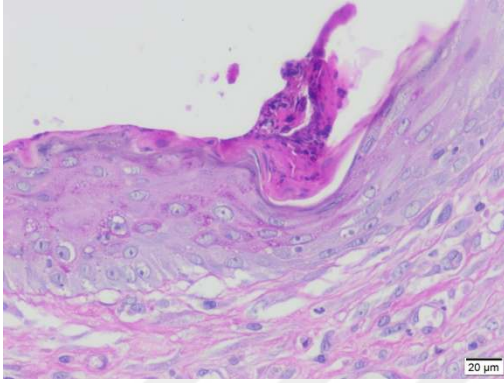
NDG - SH



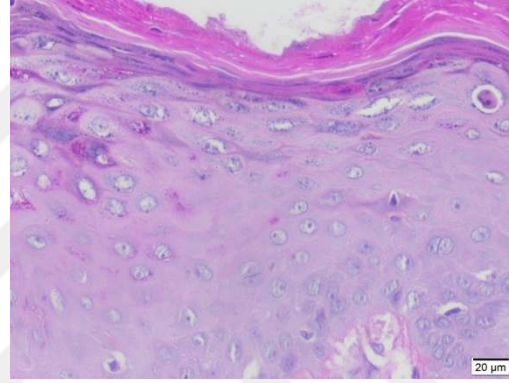
DG - SH



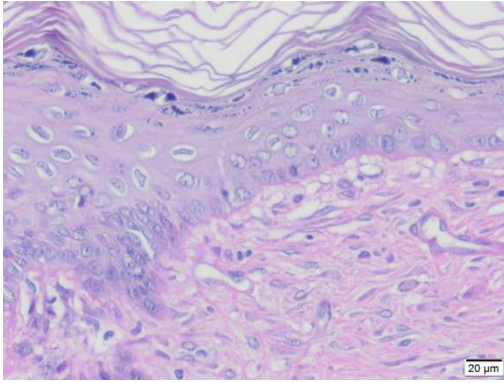
NDG - PKMH



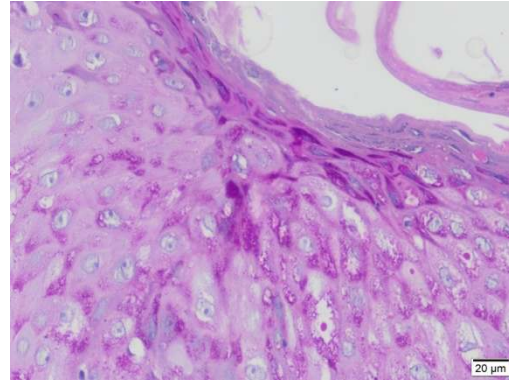
DG - PKMH



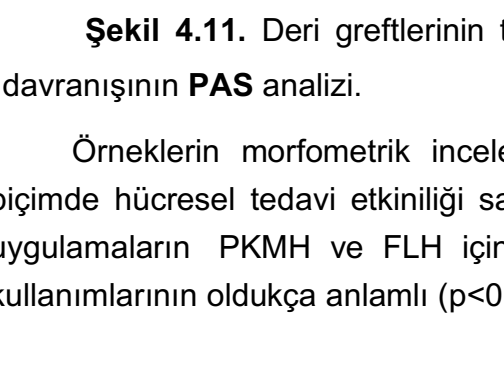
NDG - FLH



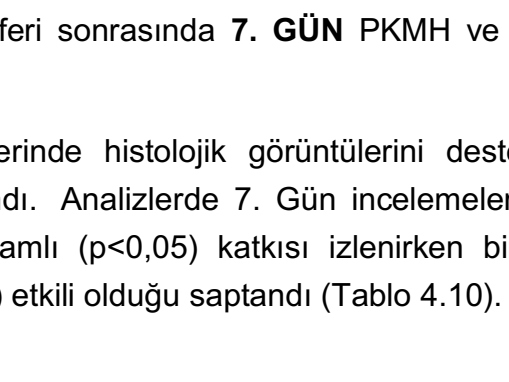
DG - FLH



NDG – PKMH+FLH



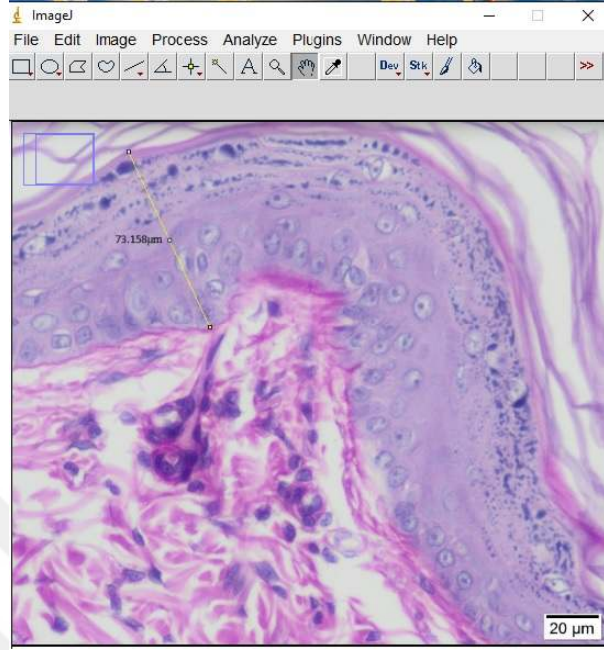
DG – PKMH+FLH



Şekil 4.11. Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **PAS** analizi.

Örneklerin morfometrik incelemelerinde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde 7. Gün incelemelerinde uygulamaların PKMH ve FLH için anlamlı ($p<0,05$) katkısı izlenirken birlikte kullanımlarının oldukça anlamlı ($p<0,001$) etkili olduğu saptandı (Tablo 4.10).

Tablo 4.10 Deri greftlerinin transferi sonrasında **7. GÜN** PKMH ve FLH davranışının **PAS BEZ SAYISI** imageJ ile **morfometrik** analizi.



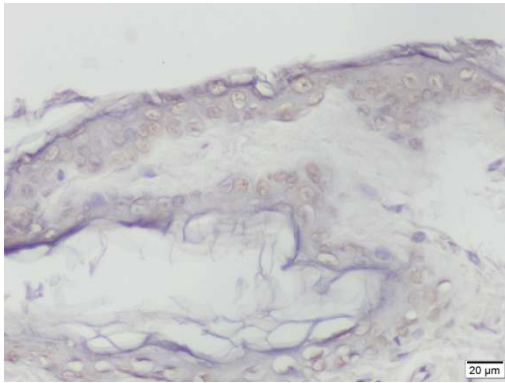
4.2.2.2. Mikroskopik İmmunohistokimyasal Sonuçlar

İmmunohistokimyasal sonuçlar için çalışma grubunda 3. Gün ve 7. gün e-NOS, i-NOS, PCNA, VEGF, IL-1 dağılımları indirekt immunohistokimya yöntemi ile incelendi.

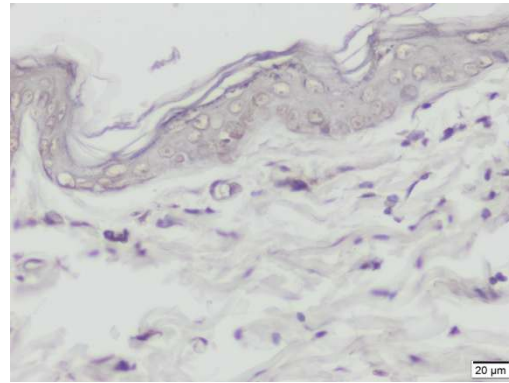
STZ ile diyabet oluşturulmuş denekler diyabet modelinin oluşturulmasından sonraki 1. haftada oluşturulan yara modeli üzerine PKMH ve FLH ile birlikte olan transferi gerçekleştirildi. **İHK** boyamalarda yara iyileşmesinin değişik düzeylerde gerçekleştiği bulundu.

PCNA Sonuçları

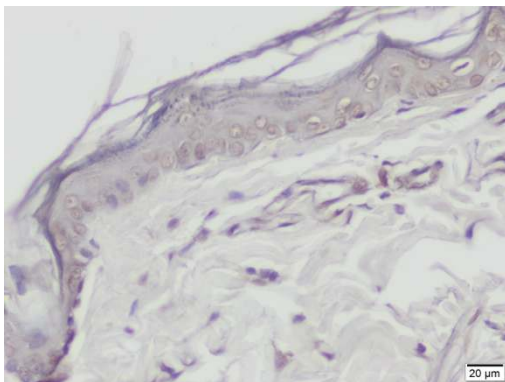
PCNA, prolifere olan hücrelerde hücre siklusunun özellikle S fazında çekirdekte bulunan bir proliferasyon belirleyicisidir. PCNA immunoreaktivitesinin tüm gruplarda 3. ve 7. günlerde immunoreaktivitenin uygulanan gruplarda pozitif olduğu izlendi. Uygulamalar ile anlamlı artışlar elde edildi. Özellikle PKMH+FLH birlikte verilen gruplarda immünoreaktivitede diğer gruplara göre çok daha anlamlı bir fark görüldü (Şekil 4.12).



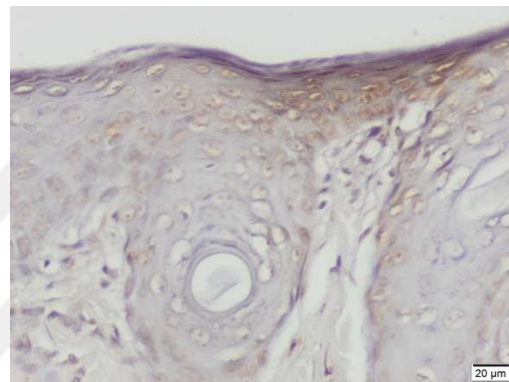
NDG - KG



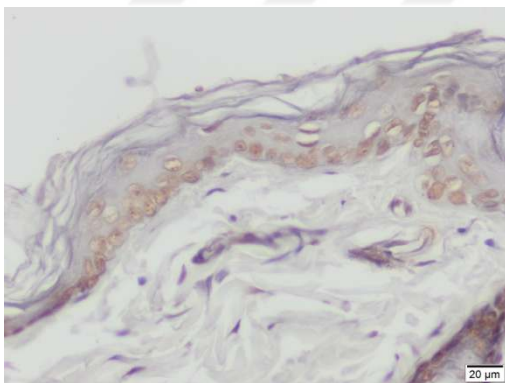
DG - KG



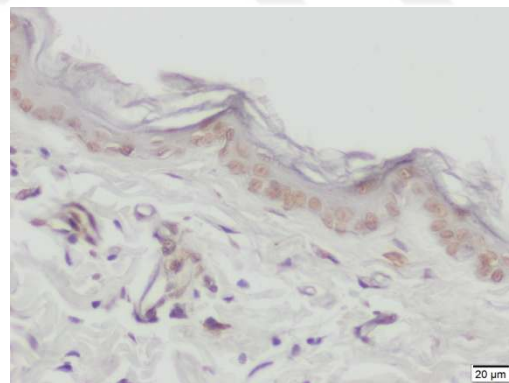
NDG - SH



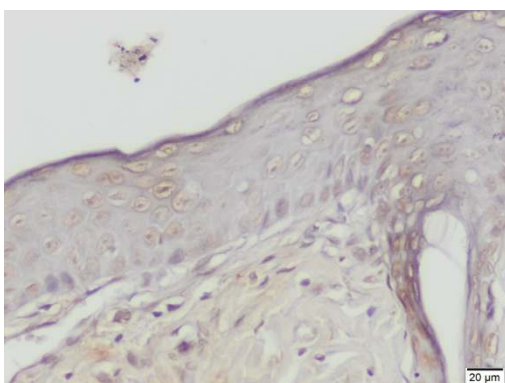
DG - SH



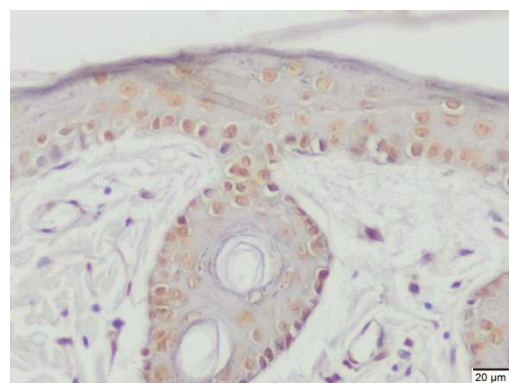
NDG - PKMH



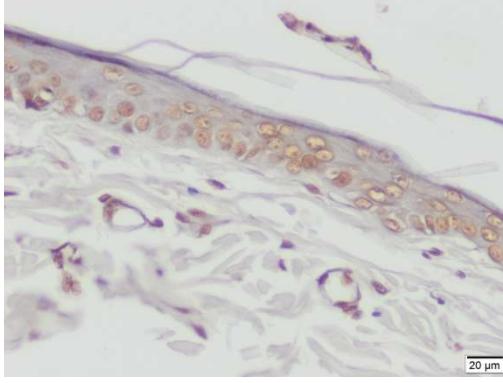
DG - PKMH



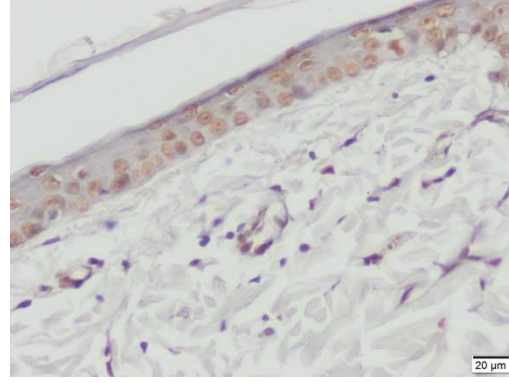
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.12. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması X400

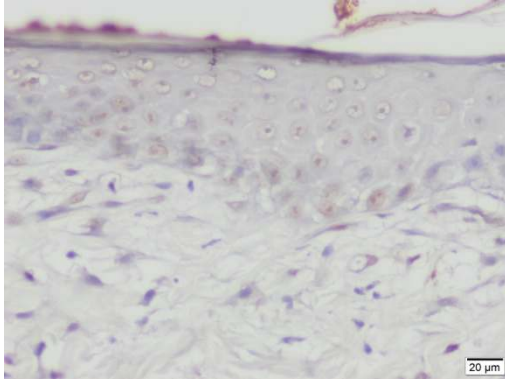
Tablo 4.11 Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması h-skor.

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-KR	6	58.560	14.650	5.981
ND-SH	6	102.45	32.680	13.342
ND-PM	6	222.55	49.980	20.404
ND-LH	6	155.87	38.320	15.644
ND-PL	6	266.65	30.250	12.350
D-KR	6	44.250	18.320	7.479
D-SH	6	95.360	28.360	11.578
D-PM	6	212.32	46.330	18.914
D-LH	6	205.36	38.660	15.783
D-PL	6	255.36	44.330	18.098

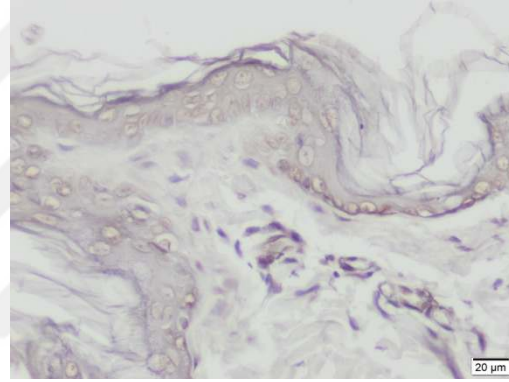
Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-KR vs ND-PM	-163.99 11.180 ***	P<0.001
ND-KR vs ND-LH	-97.310 6.634 ***	P<0.001
ND-KR vs ND-PL	-208.09 14.186 ***	P<0.001
ND-KR vs D-PM	-153.76 10.482 ***	P<0.001
ND-KR vs D-LH	-146.80 10.008 ***	P<0.001
ND-KR vs D-PL	-196.80 13.416 ***	P<0.001
ND-SH vs ND-PM	-120.10 8.188 ***	P<0.001
ND-SH vs ND-PL	-164.20 11.194 ***	P<0.001
ND-SH vs D-PM	-109.87 7.490 ***	P<0.001
ND-SH vs D-LH	-102.91 7.016 ***	P<0.001
ND-SH vs D-PL	-152.91 10.424 ***	P<0.001
ND-PM vs D-KR	178.30 12.155 ***	P<0.001
ND-PM vs D-SH	127.19 8.671 ***	P<0.001
ND-LH vs ND-PL	-110.78 7.552 ***	P<0.001
ND-LH vs D-KR	111.62 7.609 ***	P<0.001

ND-LH vs D-PL	-99.490	6.782	***	P<0.001
ND-PL vs D-KR	222.40	15.162	***	P<0.001
ND-PL vs D-SH	171.29	11.677	***	P<0.001
D-KR vs D-PM	-168.07	11.458	***	P<0.001
D-KR vs D-LH	-161.11	10.983	***	P<0.001
D-KR vs D-PL	-211.11	14.392	***	P<0.001
D-SH vs D-PM	-116.96	7.973	***	P<0.001
D-SH vs D-LH	-110.00	7.499	***	P<0.001
D-SH vs D-PL	-160.00	10.908	***	P<0.001

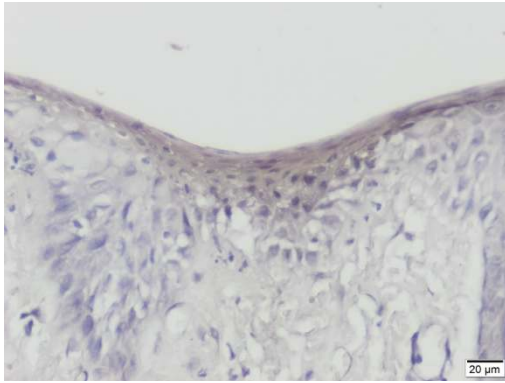
Geç dönem immunoreaktivitesinin KH uygulanan gruplarda kuvvetli pozitif olması, kültür ortamında farklılaştırılan hücrelerin yara yerine transfer edildikten sonrada canlılıklarını devam ettiklerini desteklemektedir (**Şekil 4.13**)



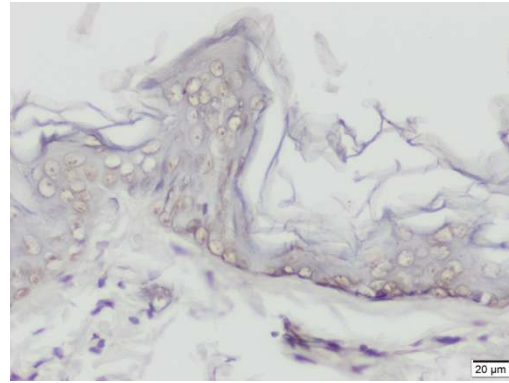
NDG - KG



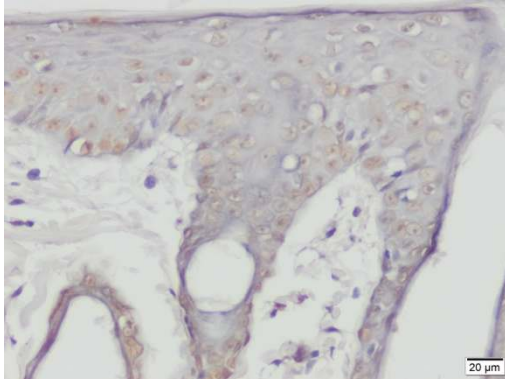
DG - KG



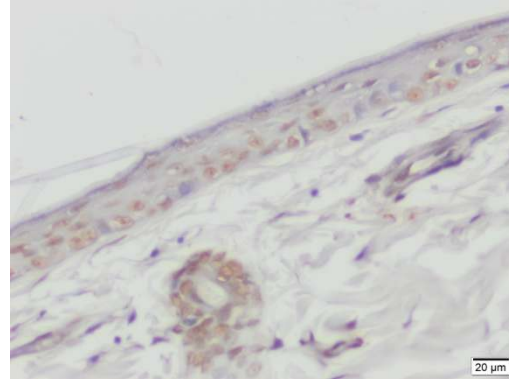
NDG - SH



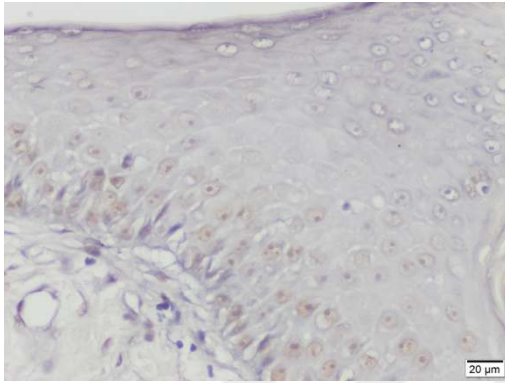
DG - SH



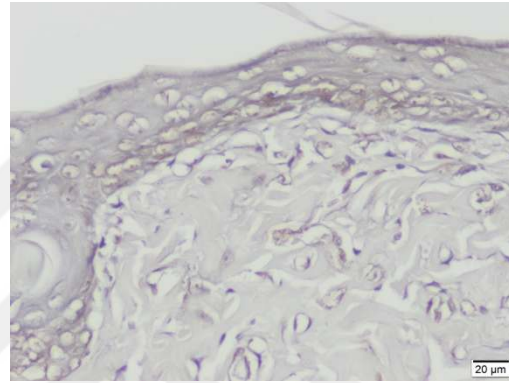
NDG - PKMH



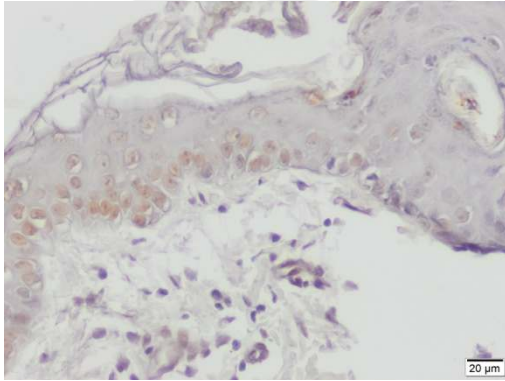
DG - PKMH



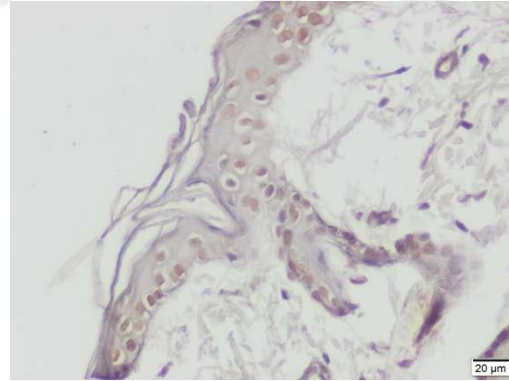
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.13. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması X400

Tablo 4.12 Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-PCNA boyaması h-skor

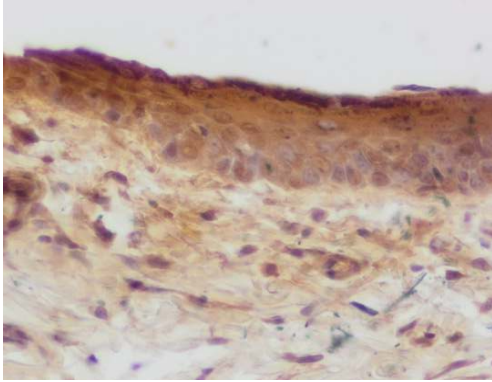
Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama	Median
ND-KR	6	55.760	16.340	6.671	
ND-SH	6	62.870	22.440	9.161	
ND-PM	6	167.98	34.770	14.195	

ND-LH	6	112.32	26.670	10.888
ND-PL	6	198.36	44.550	18.187
D-KR	6	46.360	13.650	5.573
D-SH	6	89.360	26.330	10.749
D-PM	6	146.36	36.340	14.836
D-LH	6	112.36	33.260	13.578
D-PL	6	205.36	38.660	15.783

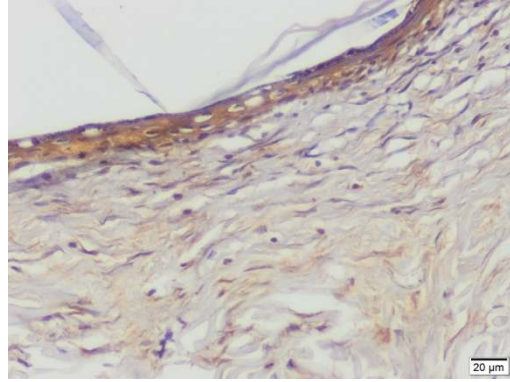
Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-KR vs ND-PM	-112.22 8.929 ***	P<0.001
ND-KR vs ND-PL	-142.60 11.347 ***	P<0.001
ND-KR vs D-PM	-90.600 7.209 ***	P<0.001
ND-KR vs D-PL	-149.60 11.904 ***	P<0.001
ND-SH vs ND-PM	-105.11 8.364 ***	P<0.001
ND-SH vs ND-PL	-135.49 10.781 ***	P<0.001
ND-SH vs D-PM	-83.490 6.643 ***	P<0.001
ND-SH vs D-PL	-142.49 11.338 ***	P<0.001
ND-PM vs D-KR	121.62 9.677 ***	P<0.001
ND-PM vs D-SH	78.620 6.256 **	P<0.01
ND-LH vs ND-PL	-86.040 6.846 ***	P<0.001
ND-LH vs D-KR	65.960 5.248 *	P<0.05
ND-LH vs D-PL	-93.040 7.403 ***	P<0.001
ND-PL vs D-KR	152.00 12.095 ***	P<0.001
ND-PL vs D-SH	109.00 8.673 ***	P<0.001
ND-PL vs D-LH	86.000 6.843 ***	P<0.001
D-KR vs D-PM	-100.00 7.957 ***	P<0.001
D-KR vs D-LH	-66.000 5.252 *	P<0.05
D-KR vs D-PL	-159.00 12.652 ***	P<0.001
D-SH vs D-PL	-116.00 9.230 ***	P<0.001
D-PM vs D-PL	-59.000 4.695 *	P<0.05
D-LH vs D-PL	-93.000 7.400 ***	P<0.001

eNOS Sonuçları

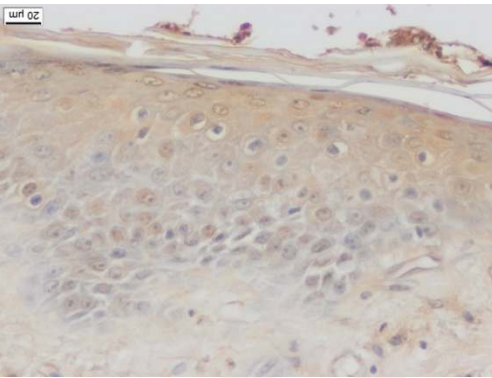
Oksidatif stress belirteci olarak iNOS immunoreaktivitesinin tüm gruplarda 3. ve 7. günlerde pozitif olduğu izlendi. Erken dönemde yoğun görülen oksidatif stresin PKMH+FLH verilen gruplarda azaldığı gösterildi (Şekil 4.14).



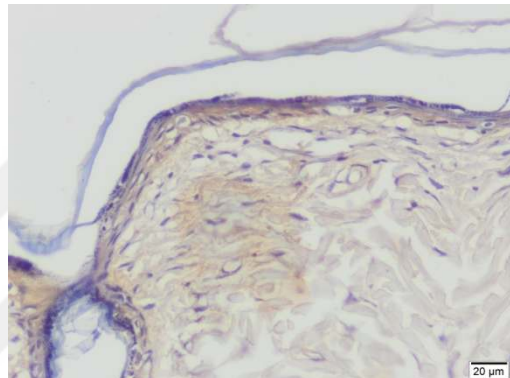
NDG - KG



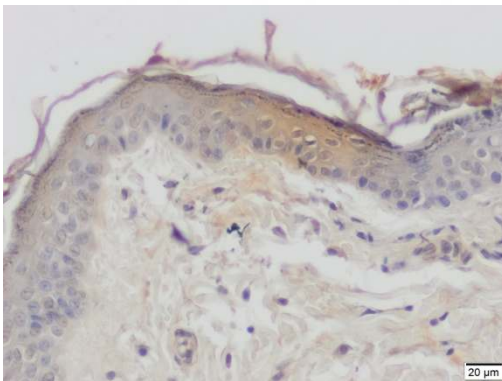
DG - KG



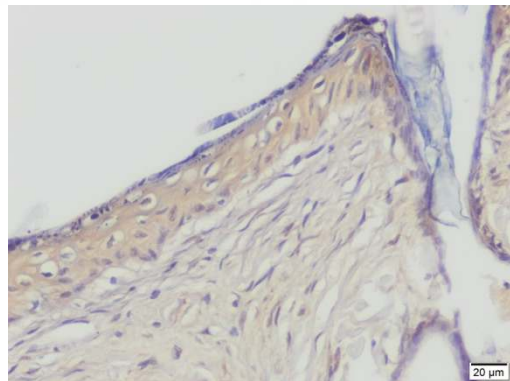
NDG - SH



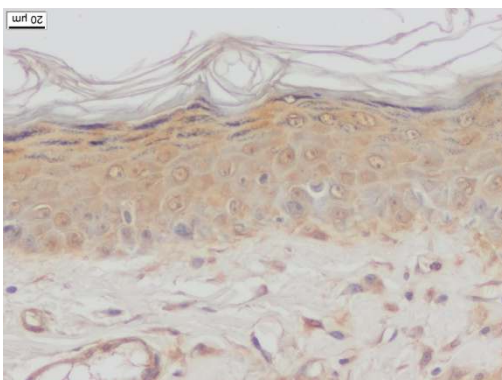
DG - SH



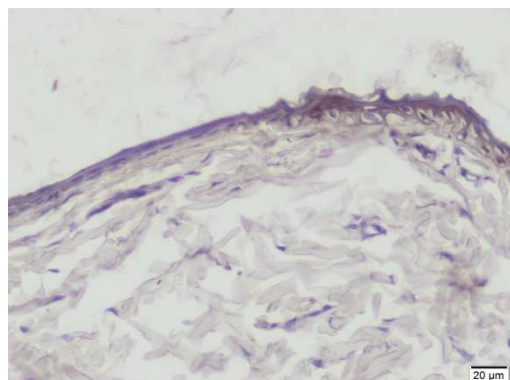
NDG - PKMH



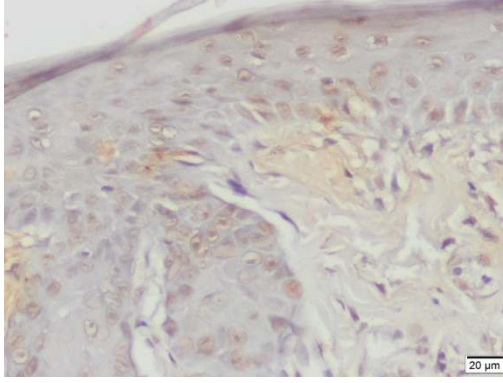
DG - PKMH



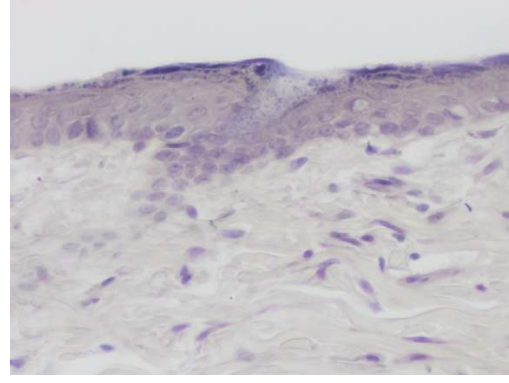
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.14. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması X400

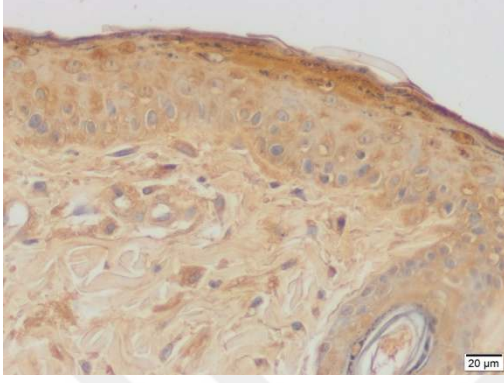
Tablo 4.13. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması h-skor

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-KR	6	62.360	18.550	7.573
ND-SH	6	178.36	36.250	14.799
ND-PM	6	122.36	28.690	11.713
ND-LH	6	105.36	35.360	14.436
ND-PL	6	95.320	33.330	13.607
D-KR	6	102.36	32.360	13.211
D-SH	6	205.36	42.480	17.342
D-PM	6	145.36	35.340	14.427
D-LH	6	112.38	36.740	14.999
D-PL	6	88.360	42.450	17.330

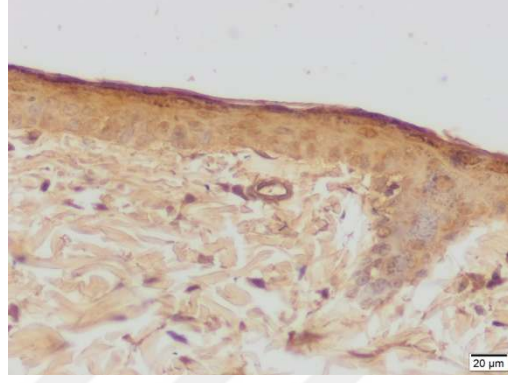
Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-KR vs ND-SH	-116.00 8.170 ***	P<0.001
ND-KR vs D-SH	-143.00 10.072 ***	P<0.001
ND-KR vs D-PM	-83.000 5.846 **	P<0.01
ND-SH vs ND-LH	73.000 5.142 *	P<0.05
ND-SH vs ND-PL	83.040 5.849 **	P<0.01
ND-SH vs D-KR	76.000 5.353 *	P<0.05
ND-SH vs D-PL	90.000 6.339 **	P<0.01
ND-PM vs D-SH	-83.000 5.846 **	P<0.01
ND-LH vs D-SH	-100.00 7.043 ***	P<0.001
ND-PL vs D-SH	-110.04 7.750 ***	P<0.001
D-KR vs D-SH	-103.00 7.255 ***	P<0.001
D-SH vs D-LH	92.980 6.549 **	P<0.01
D-SH vs D-PL	117.00 8.241 ***	P<0.001

Geç dönemde yara iyileşmesinde inflamatuvar fazın sonlanması ile dokuda oluşan oksidatif stresin azaldığı, bununla birlikte PKMH + fLH birlikte verilen

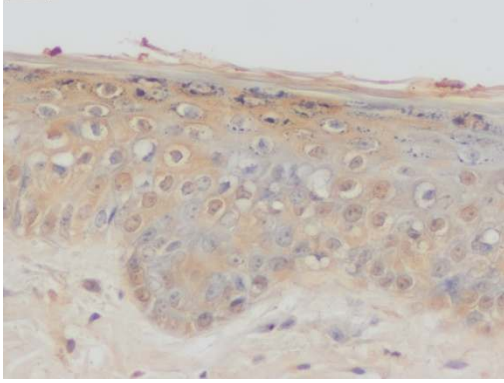
gruPlarda oksidatif stresin çok daha anlamlı olarak azaldığının doğrular şekilde iNOS immunoreaktivitesinin azaldığı gözlendi (Şekil 4.15).



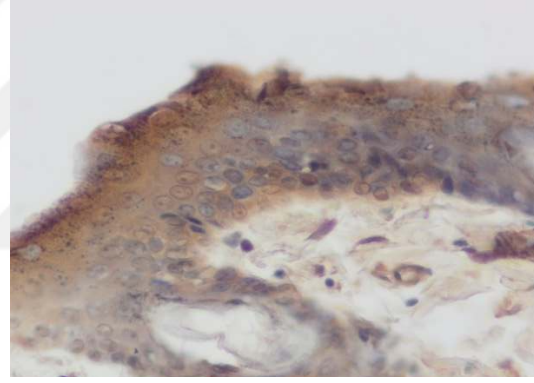
NDG - KG



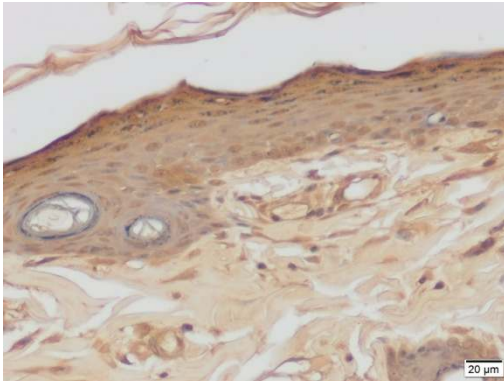
DG - KG



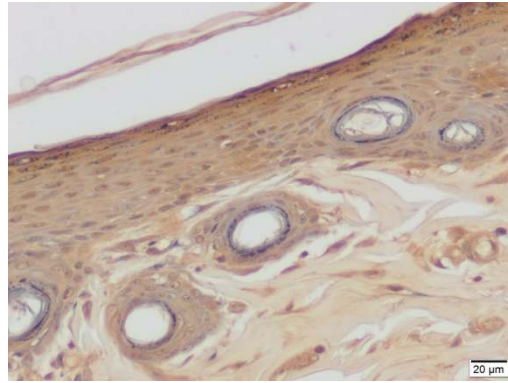
NDG - SH



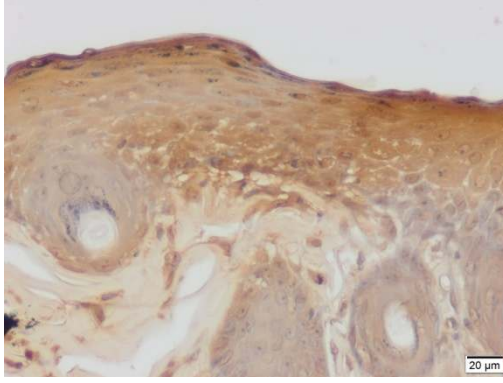
DG - SH



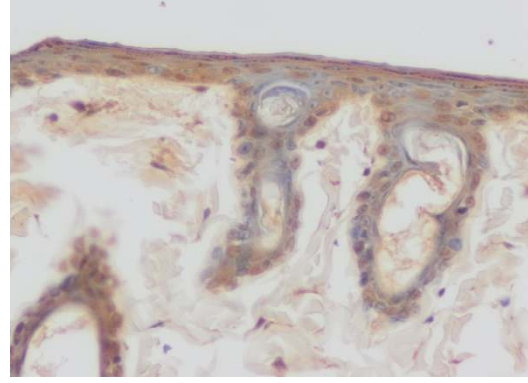
NDG - PKMH



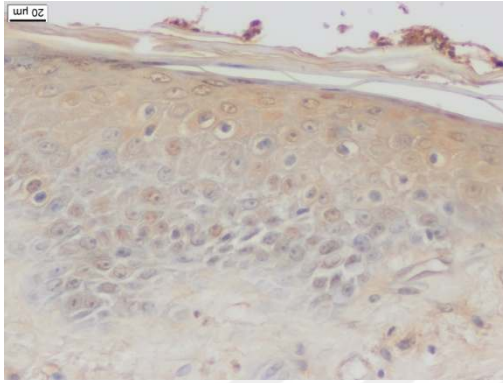
DG - PKMH



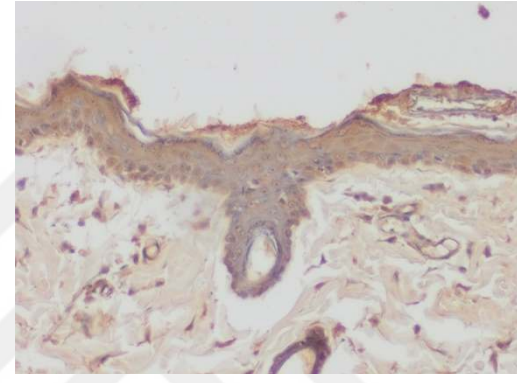
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.15. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması X400

Tablo 4.14. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS boyaması h-skor

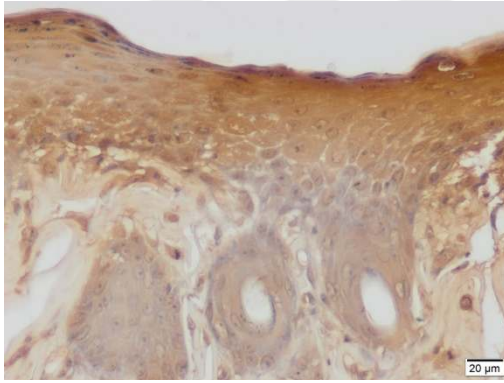
Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-SH	6	156.36	29.360	11.986
ND-PM	6	105.36	32.670	13.337
ND-LH	6	98.360	22.550	9.206
ND-PL	6	88.360	18.320	7.479
D-KR	6	89.360	23.360	9.537
D-SH	6	166.22	34.320	14.011
D-PM	6	122.33	33.660	13.742
D-LH	6	102.36	26.320	10.745
D-PL	6	84.330	23.360	9.537

Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-SH vs ND-LH	58.000 5.143 *	P<0.05
ND-SH vs ND-PL	68.000 6.029 **	P<0.01

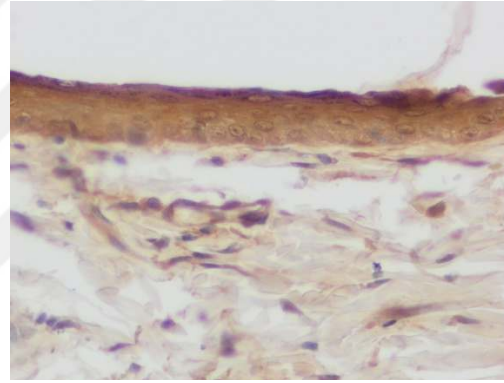
ND-SH vs D-KR	67.000	5.941	**	P<0.01
ND-SH vs D-LH	54.000	4.788	*	P<0.05
ND-SH vs D-PL	72.030	6.387	**	P<0.01
ND-PM vs D-SH	-60.860	5.396	*	P<0.05
ND-LH vs D-SH	-67.860	6.017	**	P<0.01
ND-PL vs D-SH	-77.860	6.904	***	P<0.001
D-KR vs D-SH	-76.860	6.815	***	P<0.001
D-SH vs D-LH	63.860	5.662	**	P<0.01
D-SH vs D-PL	81.890	7.261	***	P<0.001

iNOS Sonuçları

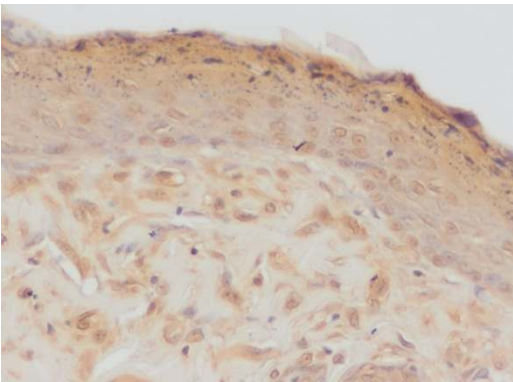
Oksidatif stress belirteci olarak iNOS immunoreaktivitesinin tüm gruplarda 3. ve 7. günlerde pozitif olduğu izlendi. Erken dönemde yoğun görülen oksidatif stresin PKMH+FLH verilen gruplarda azaldığı gösterildi (Şekil 4.16).



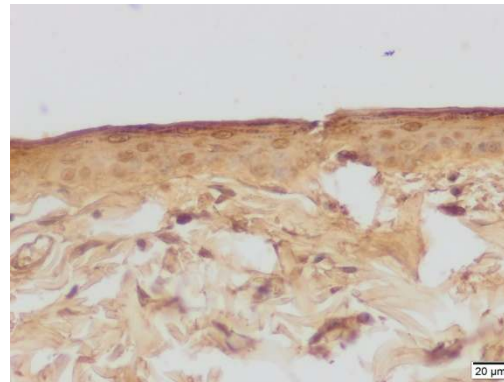
NDG - KG



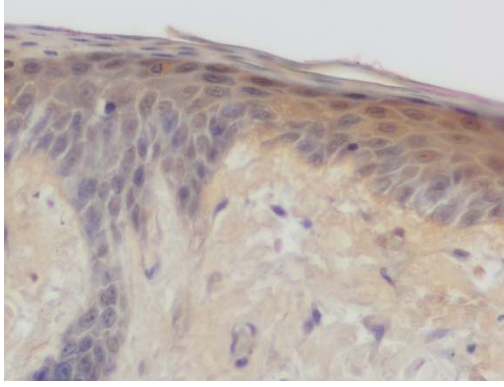
DG - KG



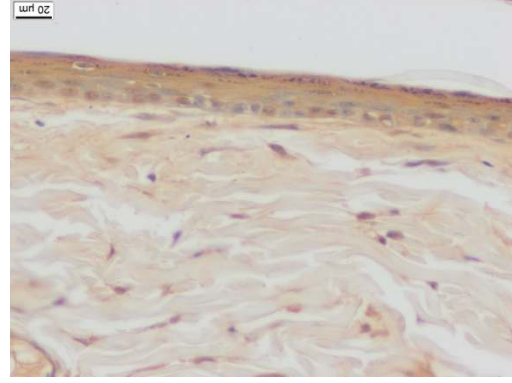
NDG - SH



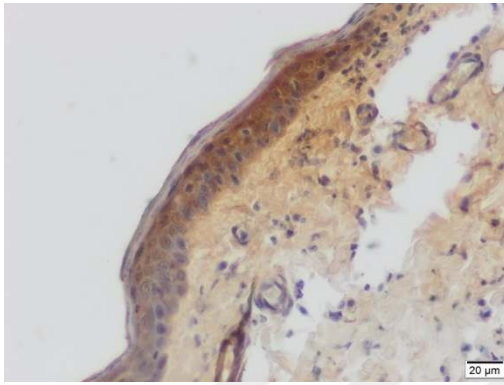
DG - SH



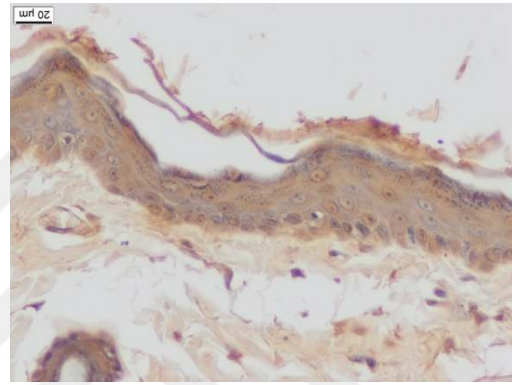
NDG - PKMH



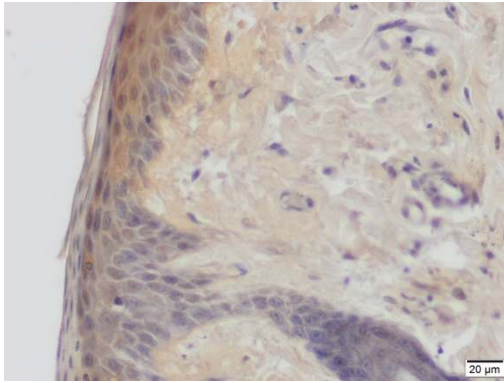
DG - PKMH



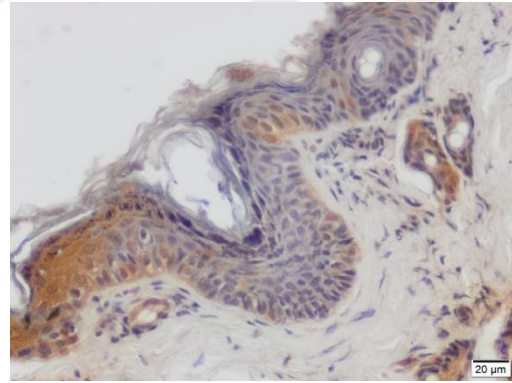
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.16. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması X400

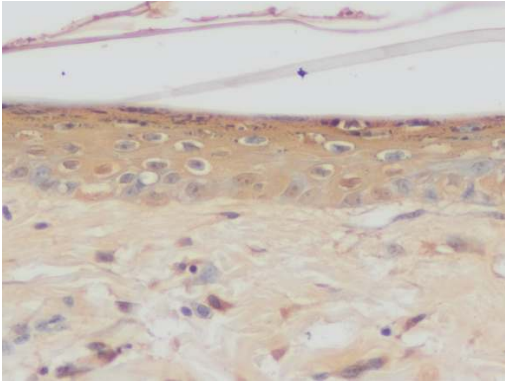
Tablo 4.15. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması h-skor

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-SH	6	147.87	36.240	14.795
ND-PM	6	98.640	26.360	10.761

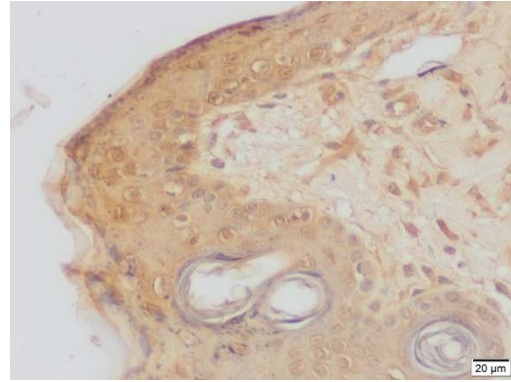
ND-LH	6	86.360	26.580	10.851
ND-PL	6	72.350	16.880	6.891
D-KR	6	42.360	16.330	6.667
D-SH	6	136.32	36.380	14.852
D-PM	6	112.33	32.360	13.211
D-LH	6	104.25	25.850	10.553
D-PL	6	86.360	24.360	9.945

Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-SH vs ND-LH	61.510 5.442 *	P<0.05
ND-SH vs ND-PL	75.520 6.682 ***	P<0.001
ND-SH vs D-KR	105.51 9.335 ***	P<0.001
ND-SH vs D-PL	61.510 5.442 *	P<0.05
ND-PM vs D-KR	56.280 4.979 *	P<0.05
ND-PL vs D-SH	-63.970 5.660 **	P<0.01
D-KR vs D-SH	-93.960 8.313 ***	P<0.001
D-KR vs D-PM	-69.970 6.191 **	P<0.01
D-KR vs D-LH	-61.890 5.476 **	P<0.01

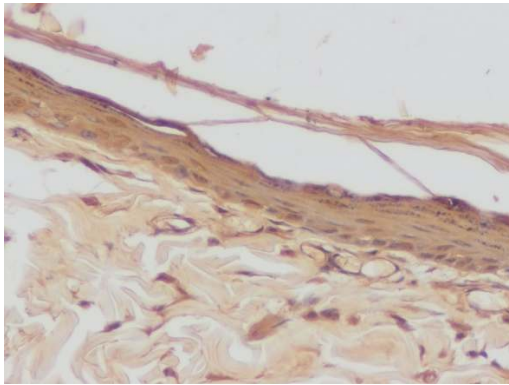
Geç dönemde yara iyileşmesinde inflamatuvar fazın sonlanması ile dokuda oluşan oksidatif stresin azaldığı, bununla birlikte PKMH + fLH birlikte verilen gruplarda oksidatif stresin çok daha anlamlı olarak azaldığının doğrular şekilde iNOS immunoreaktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.17).



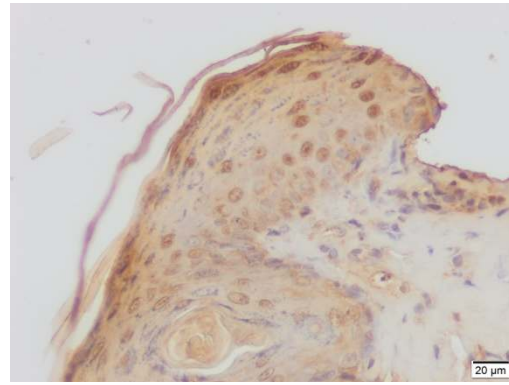
NDG - KG



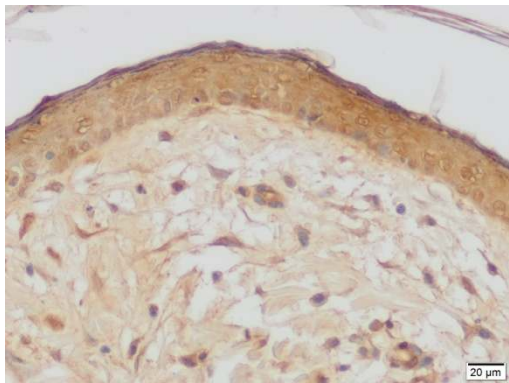
DG - KG



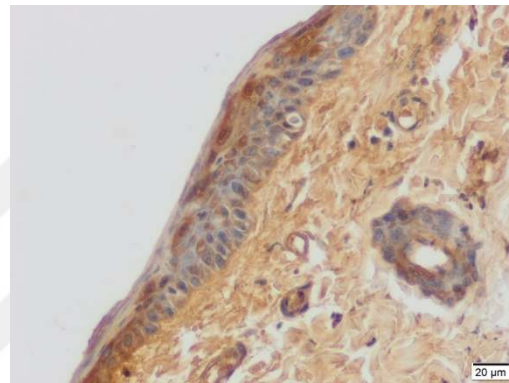
NDG - SH



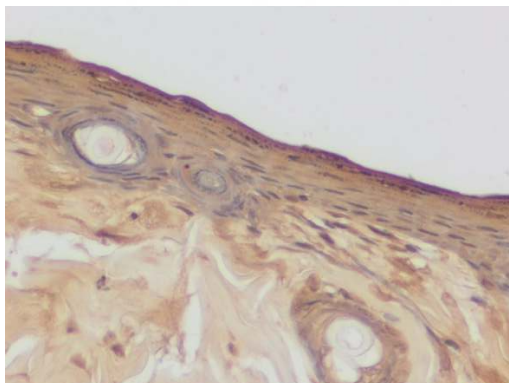
DG - SH



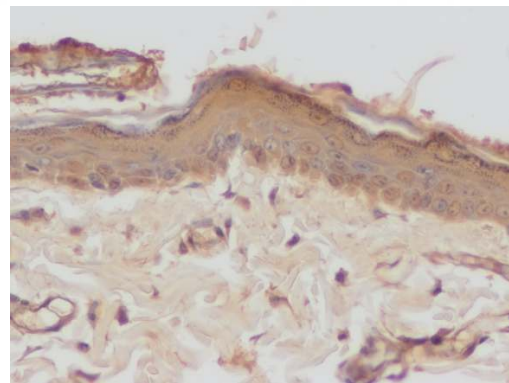
NDG - PKMH



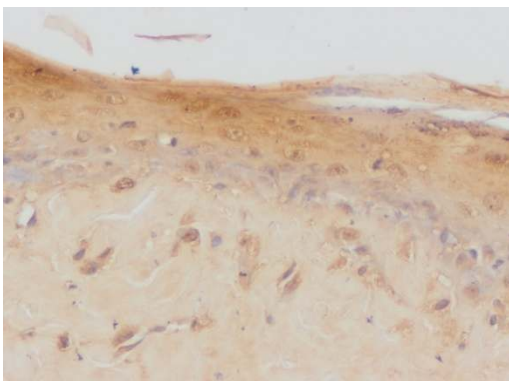
DG - PKMH



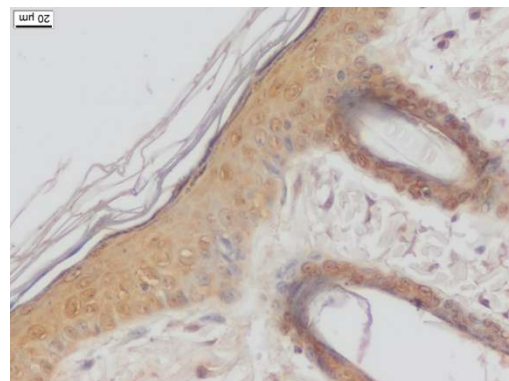
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.17. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması X400

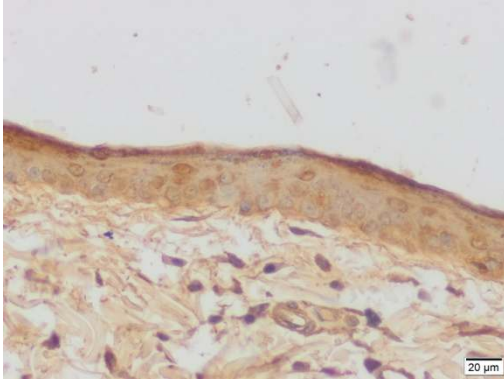
Tablo 4.16. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-iNOS boyaması h-skor

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-SH	6	122.36	32.360	13.211
ND-PM	6	94.560	24.660	10.067
ND-LH	6	86.340	28.330	11.566
ND-PL	6	68.360	28.560	11.660
D-KR	6	33.660	18.240	7.446
D-SH	6	118.36	32.360	13.211
D-PM	6	94.560	32.880	13.423
D-LH	6	80.360	20.360	8.312
D-PL	6	62.330	23.320	9.520

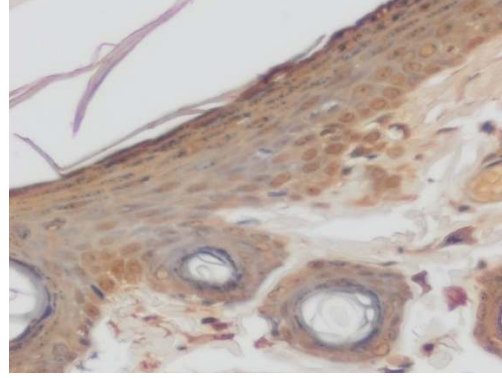
Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-SH vs ND-PL	54.000	4.850 * P<0.05
ND-SH vs D-KR	88.700	7.967 *** P<0.001
ND-SH vs D-PL	60.030	5.392 * P<0.05
ND-PM vs D-KR	60.900	5.470 ** P<0.01
ND-LH vs D-KR	52.680	4.732 * P<0.05
D-KR vs D-SH	-84.700	7.608 *** P<0.001
D-KR vs D-PM	-60.900	5.470 ** P<0.01
D-SH vs D-PL	56.030	5.033 * P<0.05

4.4.4.2 VEGF Sonuçları

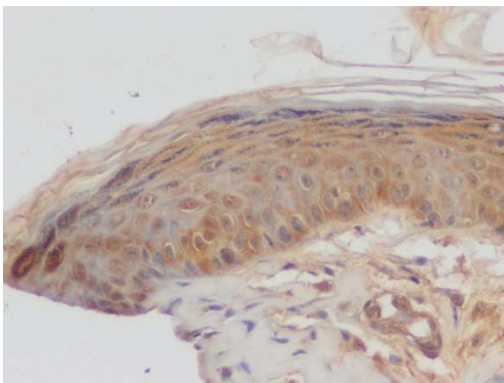
VEGF, bir endotel hücre mitojeni, kemotaktik ajan ve vasküler geçirgenlik indükleyicisi olarak işlev gören büyüme faktörüdür. VEGF immunoreaktivitesinin tüm gruplarda 3. ve 7. günlerde pozitif olduğu erken gruplar arasındaki farkın çok az anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.18).



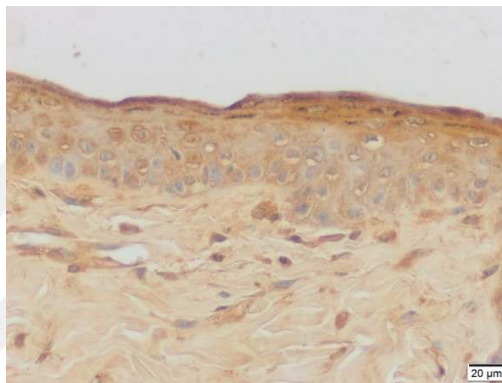
NDG - KG



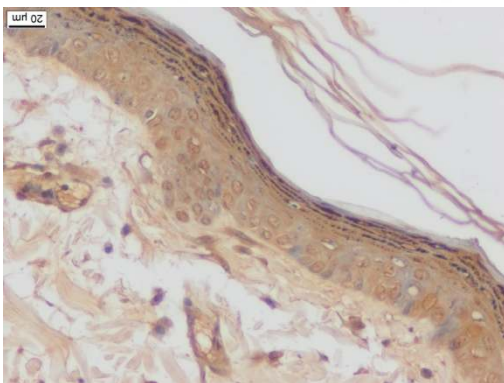
DG - KG



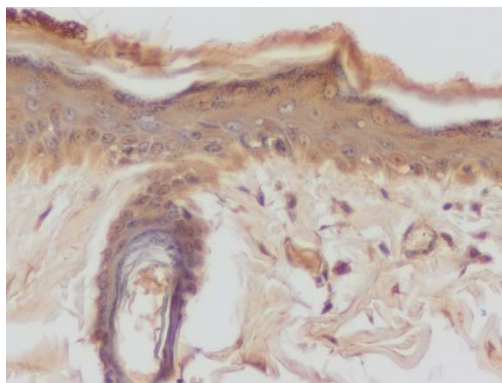
NDG - SH



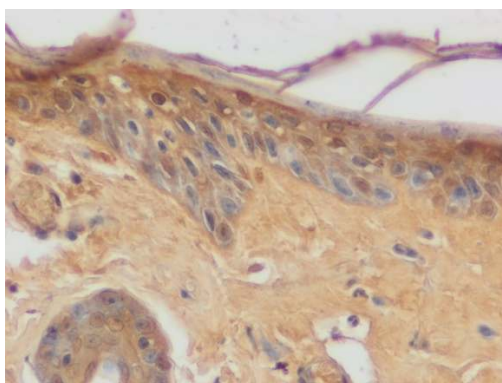
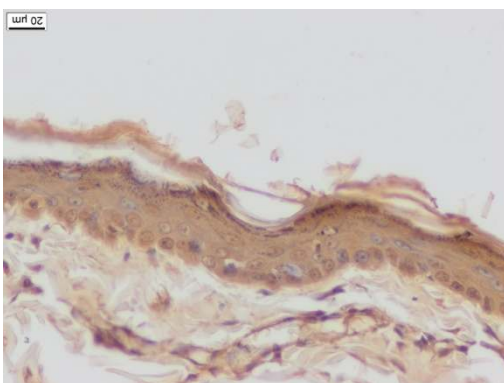
DG - SH

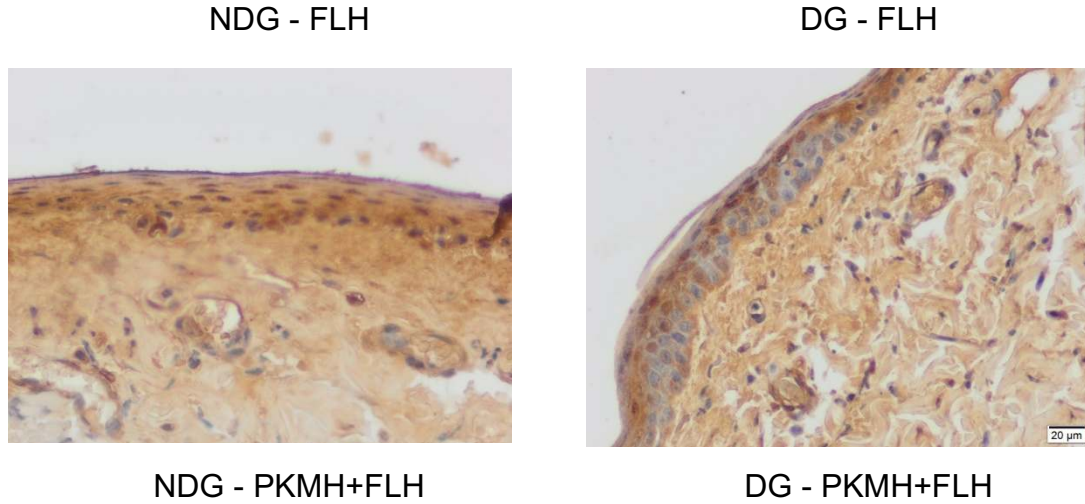


NDG - PKMH



DG - PKMH





Şekil 4.18 Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması X400

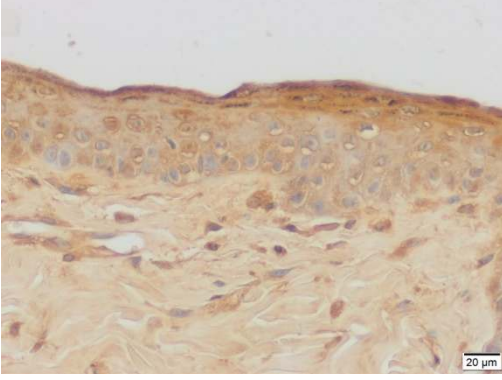
Tablo 4.17. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması h-skor

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama	
ND-SH	6	102.36	28.690	11.713	
ND-PM	6	112.36	35.450	14.472	
ND-LH	6	122.33	32.360	13.211	
ND-PL	6	128.36	36.750	15.003	
D-KR	6	105.55	26.340	10.753	
D-SH	6	98.360	26.360	10.761	
D-PM	6	144.36	32.660	13.333	
D-LH	6	166.36	36.880	15.056	
D-PL	6	178.36	38.440	15.693	

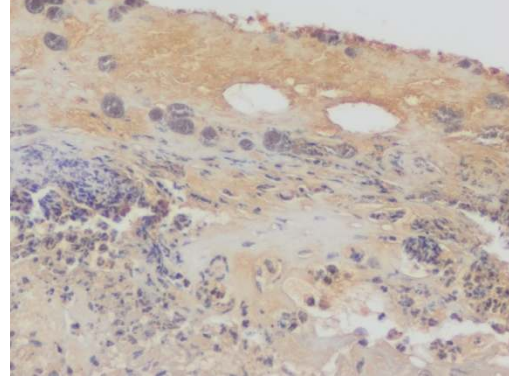
Karşılaştırma	Farklılık	q	P değeri
ND-SH vs D-LH	-64.000	4.758 *	P<0.05
ND-SH vs D-PL	-76.000	5.650 **	P<0.01
ND-PM vs D-PL	-66.000	4.907 *	P<0.05
D-KR vs D-PL	-72.810	5.413 *	P<0.05
D-SH vs D-LH	-68.000	5.055 *	P<0.05
D-SH vs D-PL	-80.000	5.947 **	P<0.01

Geç dönemde VEGF immünoreaktivitesine baktığımızda kontrol ve sham gruplarına göre hücre verilen gruplarda anlamlı bir şekilde arttığını, PKMH ve FLH birlikte verildiği gruplarda ise bu immünoreaktivitenin belirgin olarak daha yüksek olduğu görüldü. Yara iyileşmesinin geç döneminde PKMH+FLH

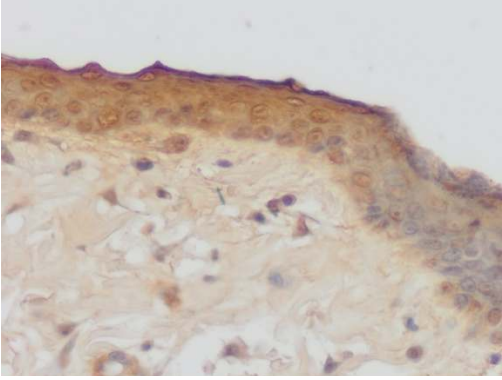
verilmesinin damarlanmayı anlamlı bir şekilde arttırdığı VEGF ekspresyonu ile gösterildi(Şekil 4.19).



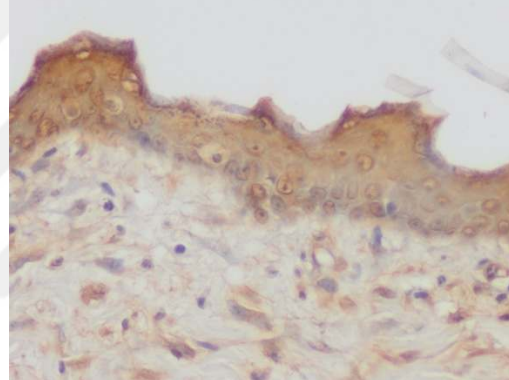
NDG - KG



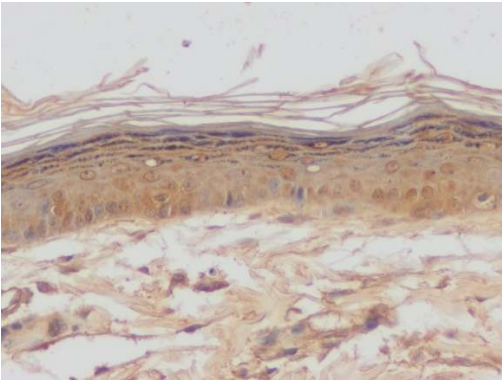
DG - KG



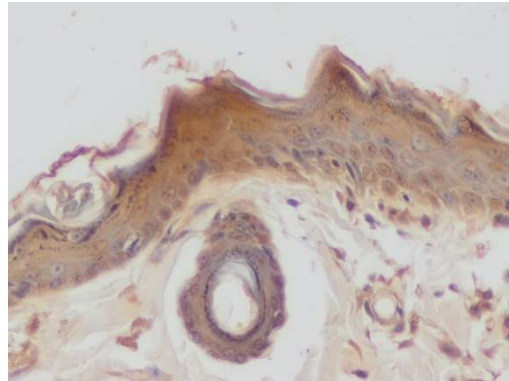
NDG - SH



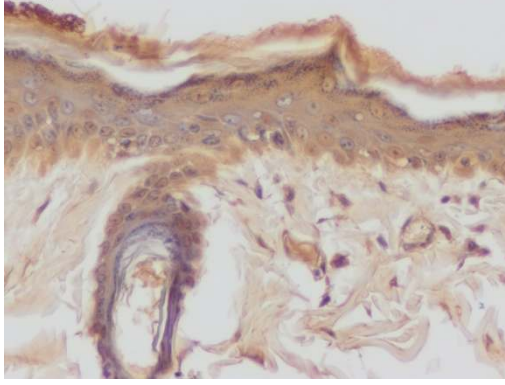
DG - SH



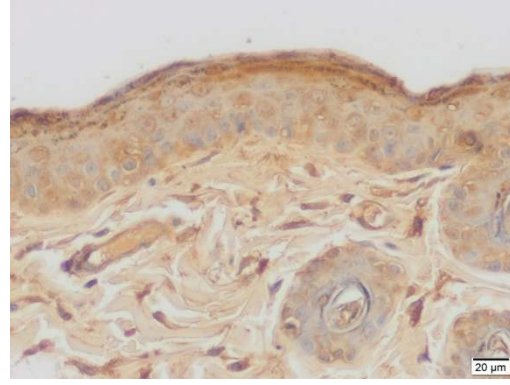
NDG - PKMH



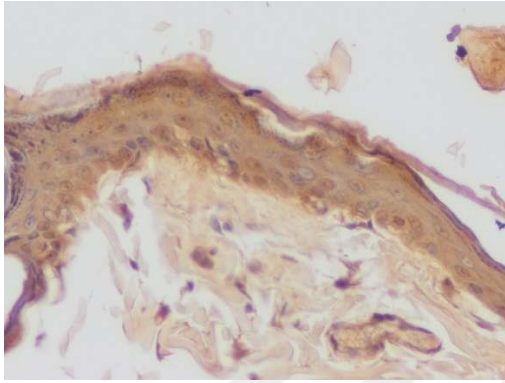
DG - PKMH



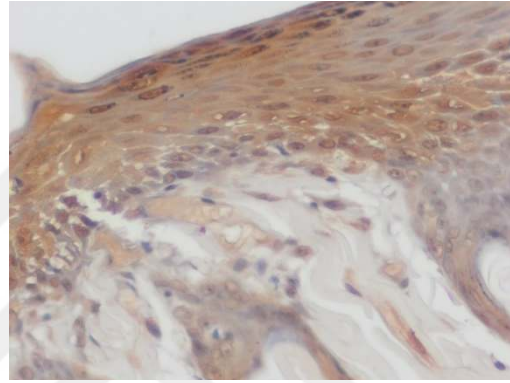
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.19 Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması X400

Tablo 4.18. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-VEGF boyaması h-skor

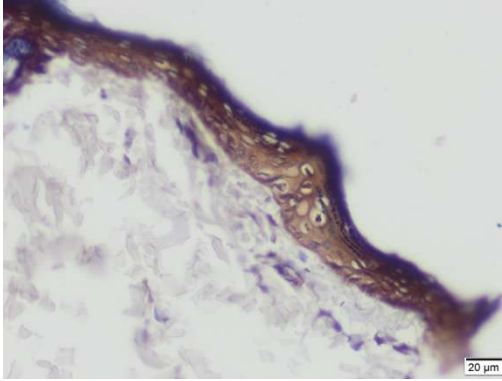
Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-SH	6	89.360	24.560	10.027
ND-PM	6	146.36	34.880	14.240
ND-LH	6	155.36	34.570	14.113
ND-PL	6	167.89	38.320	15.644
D-KR	6	102.36	22.880	9.341
D-SH	6	68.360	19.320	7.887
D-PM	6	136.36	28.360	11.578
D-LH	6	145.36	41.880	17.097
D-PL	6	158.36	38.240	15.611

Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-SH vs ND-LH	-66.000	5.002 * P<0.05
ND-SH vs ND-PL	-78.530	5.952 ** P<0.01

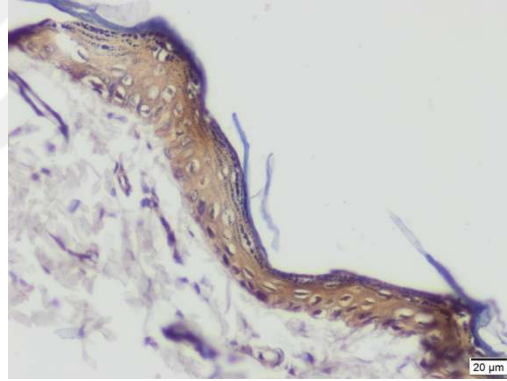
ND-SH vs D-PL	-69.000	5.230	*	P<0.05
ND-PM vs D-SH	78.000	5.912	**	P<0.01
ND-LH vs D-SH	87.000	6.594	***	P<0.001
ND-PL vs D-SH	99.530	7.544	***	P<0.001
D-SH vs D-PM	-68.000	5.154	*	P<0.05
D-SH vs D-LH	-77.000	5.836	**	P<0.01
D-SH vs D-PL	-90.000	6.821	***	P<0.001

4.4.4.2 IL-1 Sonuçları

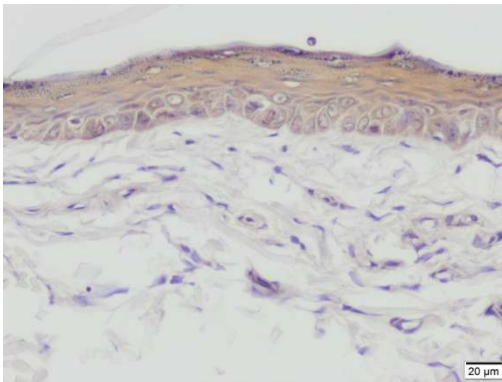
IL-1 inflamatuvar yanıtta merkezi rol oynayan bir mediyatördür. Yara iyileşmesinin hem inflamasyon fazında hem de fibroziste rol oynadığı bilinmektedir. IL-1 immunoreaktivitesinin tüm gruplarda 3. ve 7. Günlerde pozitif olduğu izlendi. Ancak yara iyileşmesinin erken fazı olan 3. Günde ve NDG grup ile karşılaştırıldığında diyabetik gruplarda anlamlı olarak ($p<0,05$) yüksek IL-1 ekspresyonu olduğu, PKMH + FLH verilen gruplarda immunreaksiyonun oldukça anlamlı ($P<0,001$) olarak daha az olduğu görüldü. (Şekil 4.20).



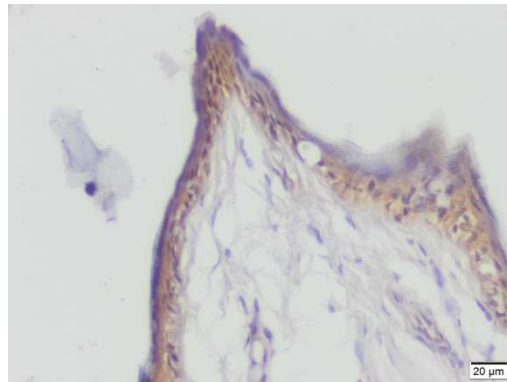
NDG - KG



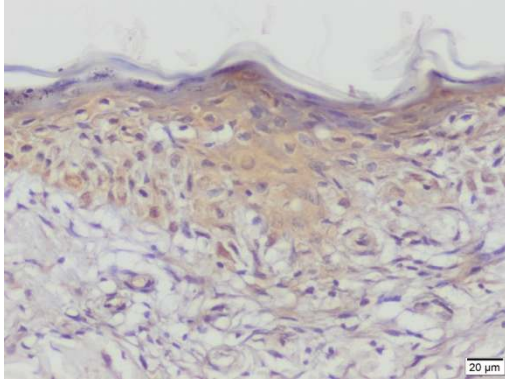
DG - KG



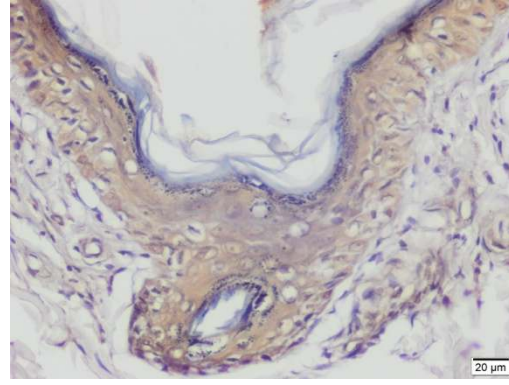
NDG - SH



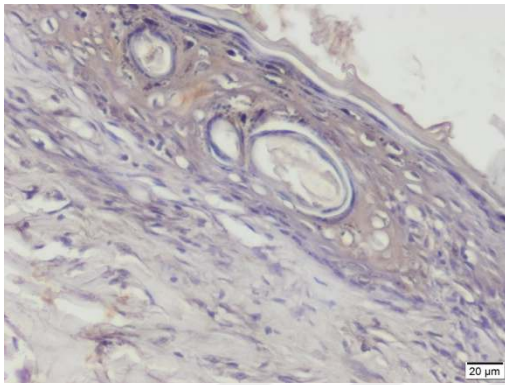
DG - SH



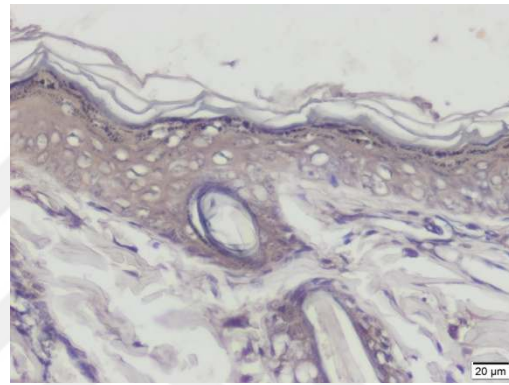
NDG - PKMH



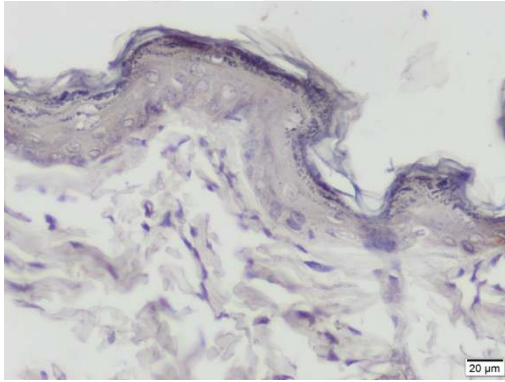
DG - PKMH



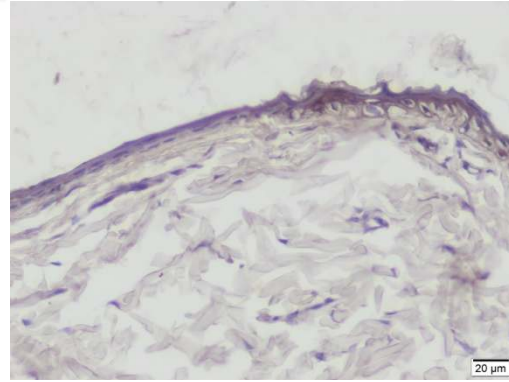
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.20. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması X400

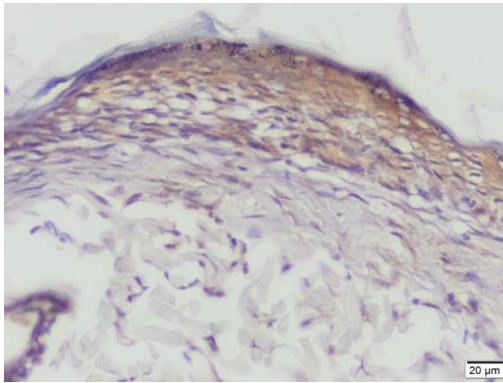
Tablo 4.19. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması h-skor

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama	Median
ND-SH	6	96.450	32.360	13.211	
ND-PM	6	88.360	24.560	10.027	

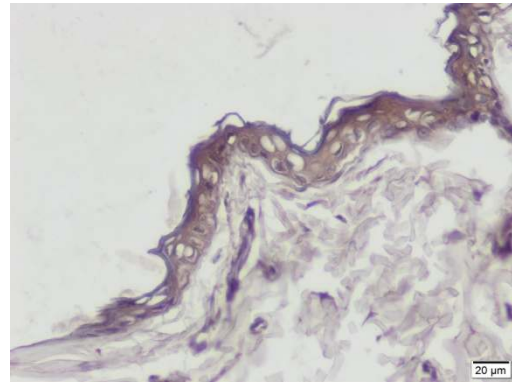
ND-LH	6	82.360	26.980	11.015
ND-PL	6	55.850	16.350	6.675
D-KR	6	235.66	58.360	23.825
D-SH	6	188.54	42.360	17.293
D-PM	6	136.34	33.660	13.742
D-LH	6	102.34	26.360	10.761
D-PL	6	63.990	19.320	7.887

Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-SH vs D-KR	-139.21 10.206 ***	P<0.001
ND-SH vs D-SH	-92.090 6.751 ***	P<0.001
ND-PM vs D-KR	-147.30 10.799 ***	P<0.001
ND-PM vs D-SH	-100.18 7.344 ***	P<0.001
ND-LH vs D-KR	-153.30 11.239 ***	P<0.001
ND-LH vs D-SH	-106.18 7.784 ***	P<0.001
ND-PL vs D-KR	-179.81 13.182 ***	P<0.001
ND-PL vs D-SH	-132.69 9.728 ***	P<0.001
ND-PL vs D-PM	-80.490 5.901 **	P<0.01
D-KR vs D-PM	99.320 7.281 ***	P<0.001
D-KR vs D-LH	133.32 9.774 ***	P<0.001
D-KR vs D-PL	171.67 12.586 ***	P<0.001
D-SH vs D-LH	86.200 6.320 **	P<0.01
D-SH vs D-PL	124.55 9.131 ***	P<0.001
D-PM vs D-PL	72.350 5.304 *	P<0.05

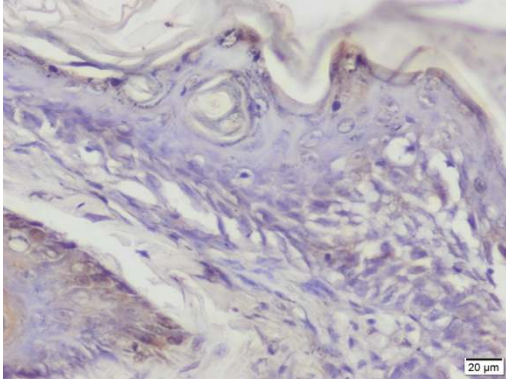
7. Günde ise immünoaktivitenin azalarak devam ettiği, PKMH + FLH verilen gruplarda immunreaksiyonun anlamlı olarak daha az olduğu görüldü(Şekil 4.21).



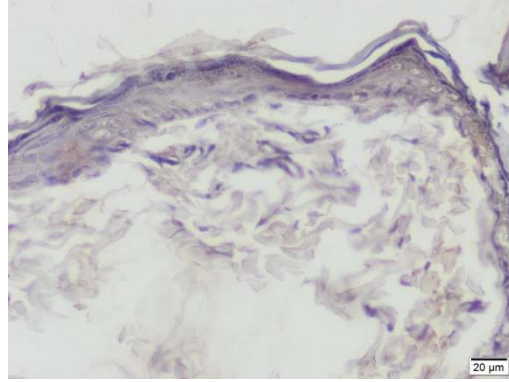
NDG - KG



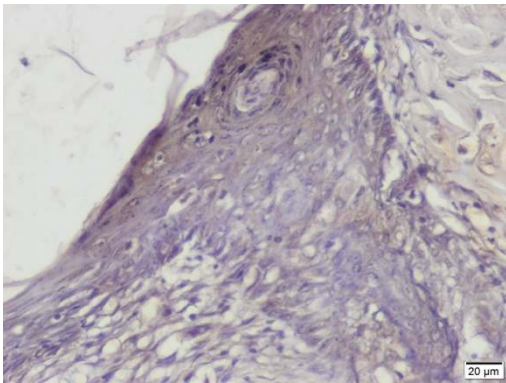
DG - KG



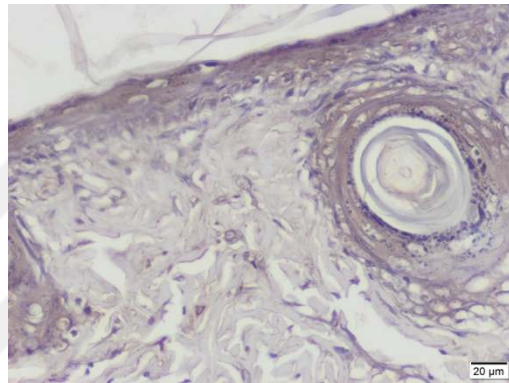
NDG - SH



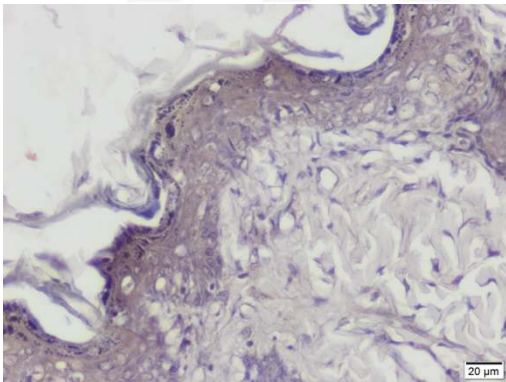
DG - SH



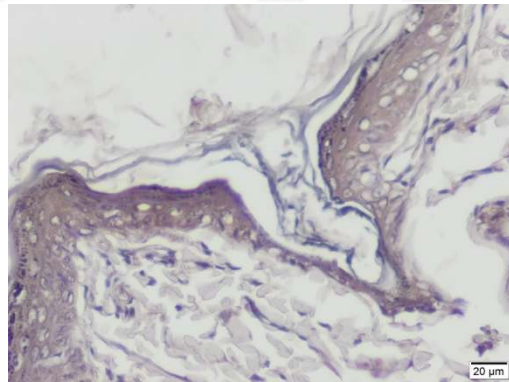
NDG - PKMH



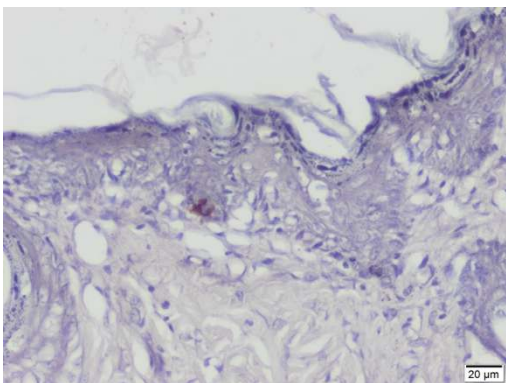
DG - PKMH



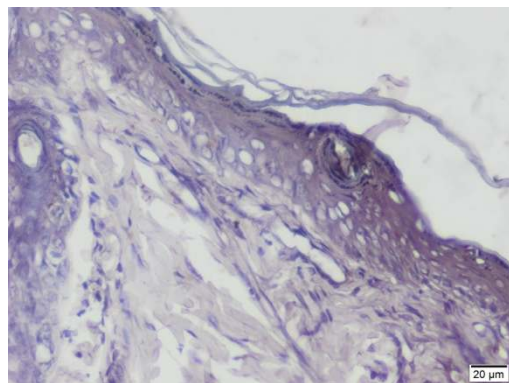
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.21. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması X400

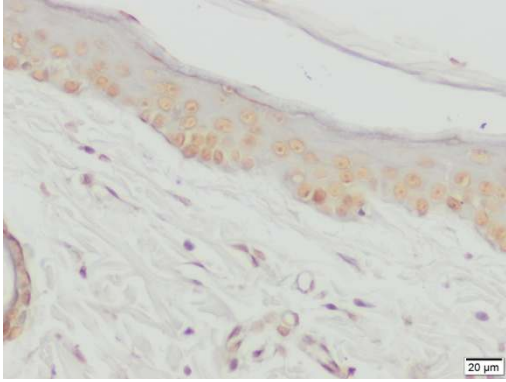
Tablo 4.20. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin anti-IL-1 boyaması h-skor

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-SH	6	158.68	32.880	13.423
ND-PM	6	141.36	28.360	11.578
ND-LH	6	136.36	28.280	11.545
ND-PL	6	118.36	38.360	15.660
D-KR	6	244.28	40.250	16.432
D-SH	6	211.32	30.580	12.484
D-PM	6	164.38	38.450	15.697
D-LH	6	133.66	30.670	12.521
D-PL	6	98.360	24.660	10.067

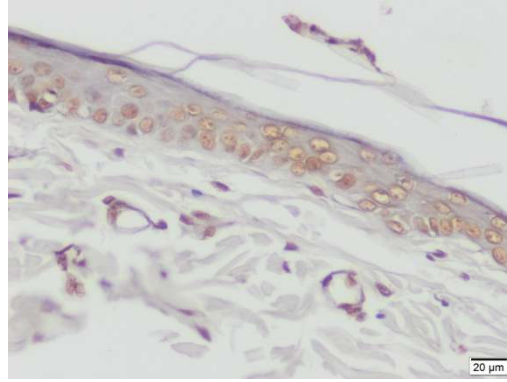
Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-SH vs D-KR	-85.600 6.374 **	P<0.01
ND-PM vs D-KR	-102.92 7.664 ***	P<0.001
ND-PM vs D-SH	-69.960 5.209 *	P<0.05
ND-LH vs D-KR	-107.92 8.036 ***	P<0.001
ND-LH vs D-SH	-74.960 5.582 **	P<0.01
ND-PL vs D-KR	-125.92 9.376 ***	P<0.001
ND-PL vs D-SH	-92.960 6.922 ***	P<0.001
D-KR vs D-PM	79.900 5.950 **	P<0.01
D-KR vs D-LH	110.62 8.237 ***	P<0.001
D-KR vs D-PL	145.92 10.866 ***	P<0.001
D-SH vs D-LH	77.660 5.783 **	P<0.01
D-SH vs D-PL	112.96 8.411 ***	P<0.001
D-PM vs D-PL	66.020 4.916 *	P<0.05

4.4.4.2 TUNEL Sonuçları

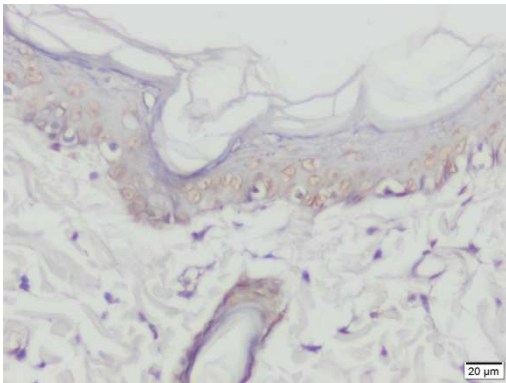
TUNEL testi, apoptozisin geç evrelerinde yaygın DNA yıkımına uğrayan apoptotik hücreleri saptamak için tasarlanmıştır. TUNEL işaretlemesinin tüm gruplarda 3. ve 7. günlerde pozitif olduğu izlendi. TUNEL pozitifliğinin özellikle sham grubunda anlamlı olarak yüksek olması hücre verilen gruplarda apoptozisin azaldığına işaret etmektedir. (Şekil 4.22).



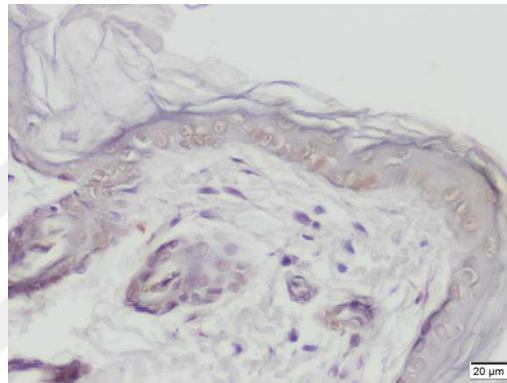
NDG - KG



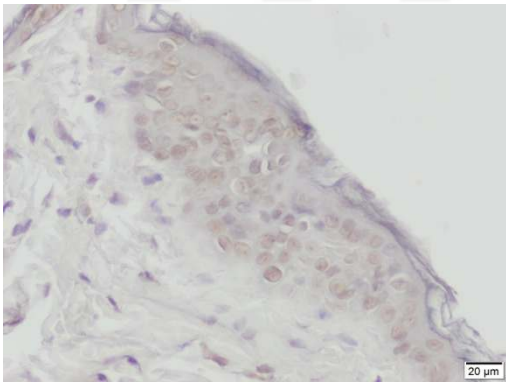
DG - KG



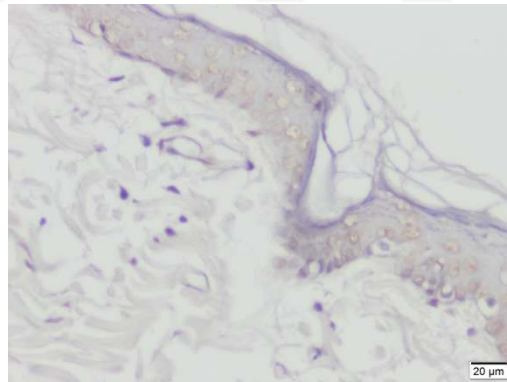
NDG - SH



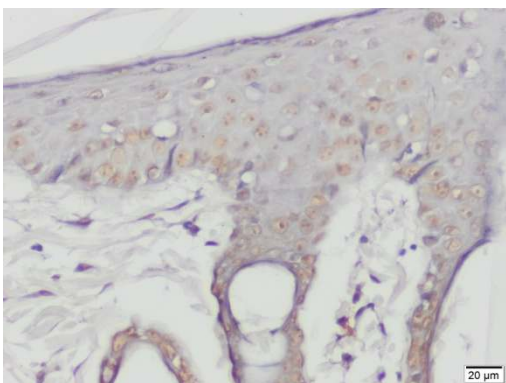
DG - SH



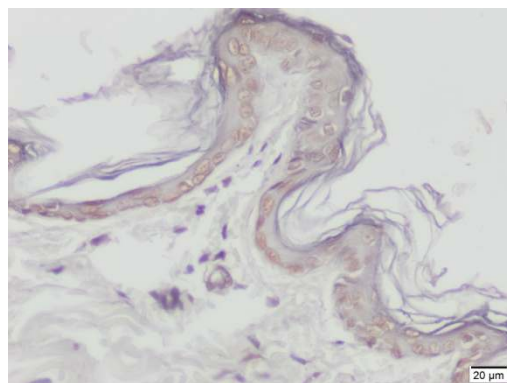
NDG - PKMH



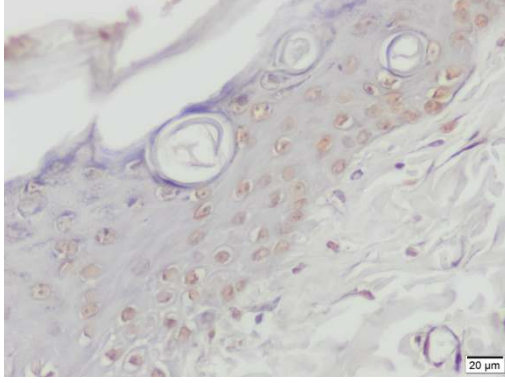
DG - PKMH



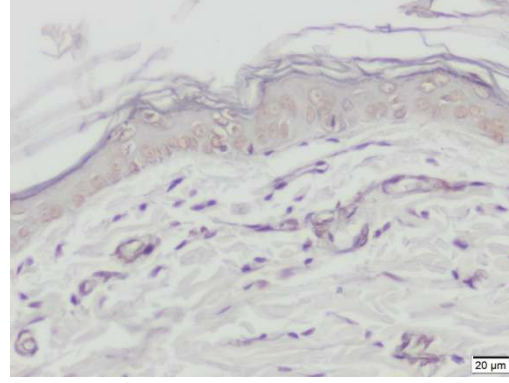
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

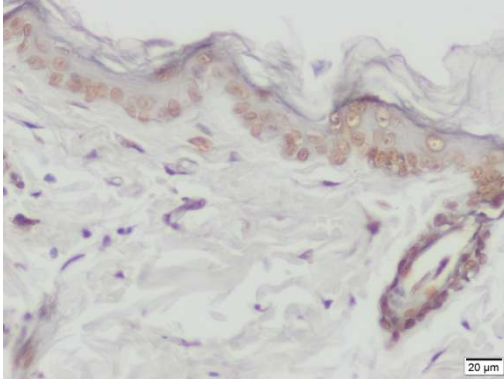
Şekil 4.22. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması X400

Tablo 4.21. Grupların erken dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması Apoptotik İndeks

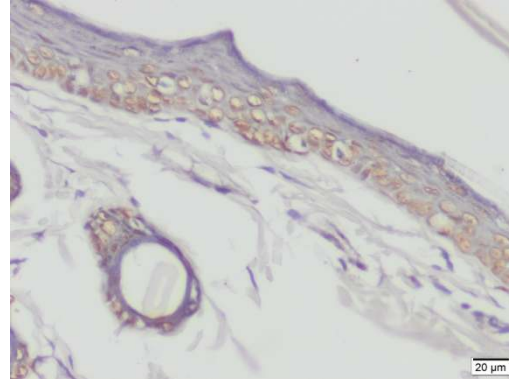
Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Mean
ND-SH	6	45.880	15.660	6.393
ND-PM	6	37.330	11.250	4.593
ND-LH	6	32.550	9.360	3.821
ND-PL	6	25.360	6.360	2.596
D-KR	6	25.660	8.440	3.446
D-SH	6	66.330	22.880	9.341
D-PM	6	54.330	12.550	5.124
D-LH	6	48.360	10.360	4.229
D-PL	6	42.330	8.360	3.413

Karşılaştırma	Farklılık	q	P değeri
ND-PM vs D-SH	-29.000	5.637	** P<0.01
ND-LH vs D-SH	-33.780	6.566	*** P<0.001
ND-PL vs D-SH	-40.970	7.963	*** P<0.001
ND-PL vs D-PM	-28.970	5.631	** P<0.01
D-KR vs D-SH	-40.670	7.905	*** P<0.001
D-KR vs D-PM	-28.670	5.573	** P<0.01
D-SH vs D-PL	24.000	4.665	* P<0.05

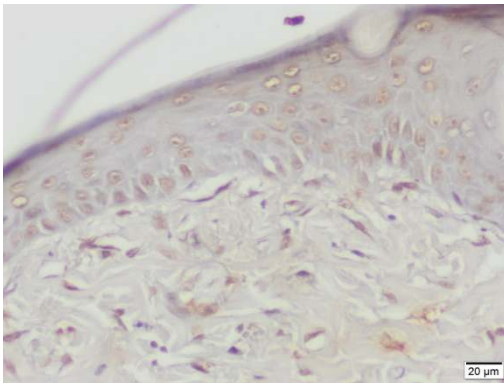
Geç dönemde PKMH+FLH verilen gruplarda TUNEL pozitifliğinin anlamlı olarak azalması, transfer edilen hücrelerin yara bölgesinde apoptozisi azalttığını düşündürdü(Şekil 4.23).



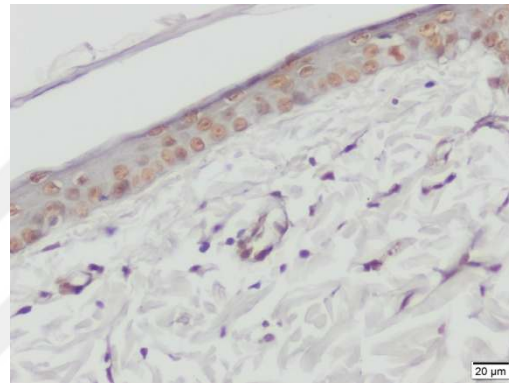
NDG - KG



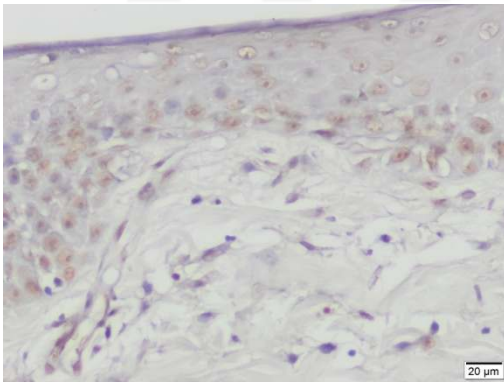
DG - KG



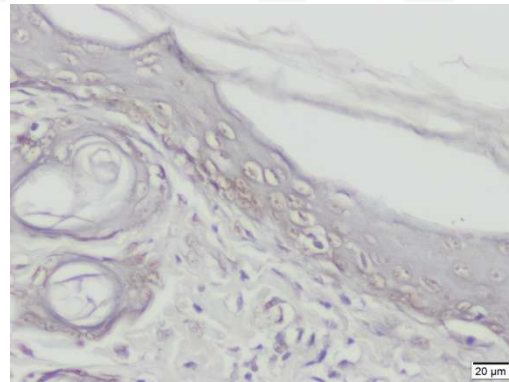
NDG - SH



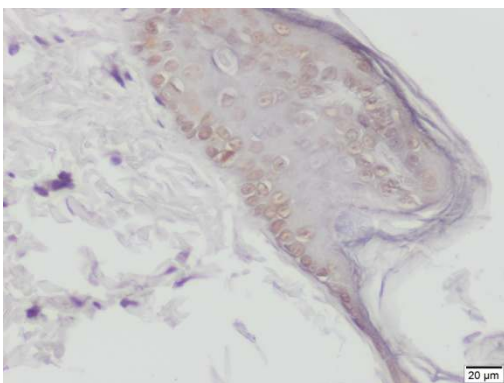
DG - SH



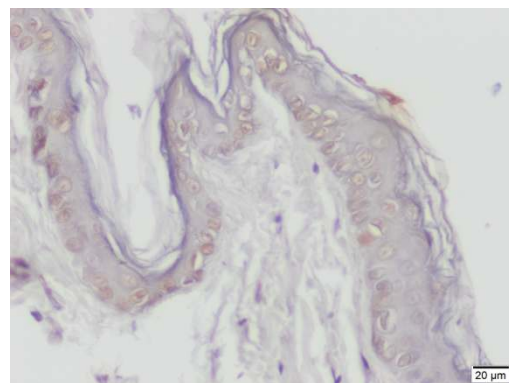
NDG - PKMH



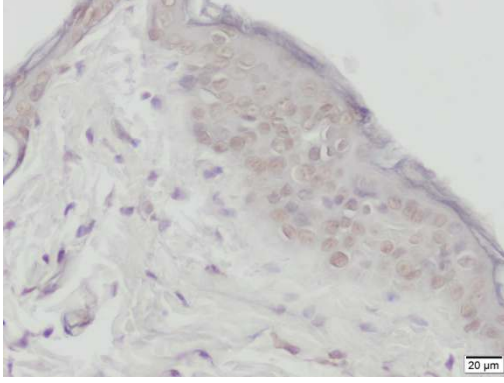
DG - PKMH



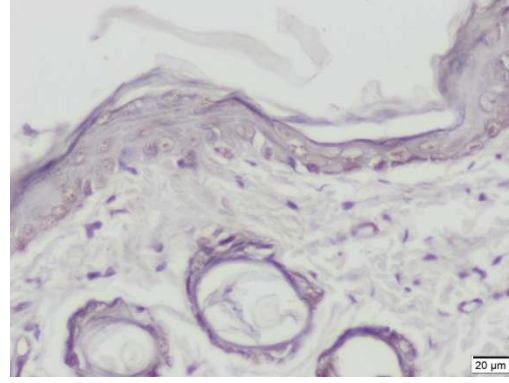
NDG - FLH



DG - FLH



NDG - PKMH+FLH



DG - PKMH+FLH

Şekil 4.23. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması X400

Tablo 4.22. Grupların geç dönem deri biyopsi örneklerinin TUNEL boyaması Apoptotik İndeks

Grup	Sayı	Ortalama	Sapma	Ortalama
ND-PM	6	51.230	23.660	9.659
ND-LH	6	42.880	28.330	11.566
ND-PL	6	34.360	12.360	5.046
D-KR	6	33.660	11.880	4.850
D-SH	6	72.360	26.340	10.753
D-PM	6	56.440	16.340	6.671
D-LH	6	46.380	16.780	6.850
D-PL	6	38.360	18.770	7.663

Karşılaştırma	Farklılık	P değeri
ND-PL vs D-SH	-38.000 4.662 *	P<0.05
D-KR vs D-SH	-38.700 4.748 *	P<0.05

5.TARTIŞMA

Diyabetik yara gibi zor iyileşen kronik yaralar tıbbi tedavide problem oluşturmaktadır. Yeni tedavi protokolleri arayışları içerisinde kök hücre klinikte kullanılmaya başlanmış önemli bir üründür. PKMH periferik dolaşımdan kolaylıkla elde edilip iyi üretim koşullarında hastalara kolaylıkla uygulanabilecek iyi bir kök hücre kaynağıdır. Çalışmamızda PKMH ve FLH başarılı bir şekilde izole edilip karakterizasyonu yapıldı. Greftler kültür ortamına alındı ve hücreler üzerine ekildi.

SEM analizlerinde bir gecelik inkübasyon sonrasında deride kaldıkları ve etkileştikleri bulundu. Bu greftler karşılıklı yer değiştirilerek deneklere transfer edildiklerinde üzerlerindeki hücrelerin yara iyileşmesine katkıda bulundukları izlendi. PKMH ve FLH tek başlarına taklit ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde etkili oldukları ancak bu iki hücresel tedavi ürününün birlikte uygulamanın anlamlı ve birbirini stimüle edici etkisi olduğu görüldü. Makroskobik görüntülerde imageJ ile yaranın daha hızlı kapandığı ve daha iyi iyileşmenin gerçekleştiği saptandı. Histokimyasal boyamalarda mikroskobik olarak artan hücre sayısı, kollajen miktarı, damarlanma, bez ve kıl folikülü ile azalan enflamasyon ve fibrozis görüldü. İmmunohistokimyasal sonuçlarda PCNA ile hücre çoğalmasının arttığı, e-NOS ve i-NOS ile oksidatif stresin azaldığı, VEGF ile damarlanmanın arttığı, IL10 ile inflamasyonun azaldığı, TUNEL yöntemi ile apoptotik indeksin azaldığı belirlendi.

Sağlıklı bir deri bütünlüğü, insan vücudunun fizyolojik homeostazının korunmasında hayati bir rol oynar. Deri, vücudun en büyük organ sistemidir. Bu nedenle, mekanik kuvvetlere, enfeksiyonlara, sıvı-elektrolit dengesizliğine ve termal disregülasyona karşı korunmada önemli rol oynar. Aynı zamanda, vücudun bazı bölgelerinde eklem fonksiyonunu sağlamak için esneklik sağlar ve avucun veya ayak tabanının yer değiştirmesini engellemek için daha güçlü sabitleme sağlar (20). Onarım ve yenileme özelliği derinin tüm bu fonksiyonlarının merkezinde yer alır (21).

Diabetes Mellitus günümüzde giderek artan uluslararası bir sağlık sorunu haline gelmektedir. Diyabet komplikasyonları, kötü yara iyileşmesinin, kronik ülserasyonun ve sonuçta oluşan ekstremité amputasyonunun ciddi komplikasyonları da dahil olmak üzere sayısız eşlik eden problemleri içerir. Belirli ve düzenli fazlara sahip olan deri yara iyileşmesinde diyabet, her aşamada olumsuz etkiye neden olur (14). Hücresel ürünler son yıllarda giderek artan geniş bir hastalık yelpazesi tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu hücresel ürünler içerisinde PKMH, özellikle hematolojik maligniteler başta olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

KH son zamanlarda önem kazanmış ve klinik uygulamalarda birçok farklı hastalıklarda özellikle de derideki plastik veya cerrahi amaçlı yara iyileşmesinde kullanılan bir hücre olmuştur. Bu hücrelerin izolasyonu, karakterizasyonu ve farklılaşması rutin olarak yapılmakta ve klinikte kullanılmaktadır (22). Bir çalışmada bir kök hücre ürünü olan trombosit zengin plazma kullanılarak 3x2

cm ebatlı tam kat doku defekti uygulamasında hem yara iyileşmesinin hem de mikrodializ yöntemiyle metabolizmanın yapılan uygulamaya bağlı daha iyi bir şekilde iyileştiği bulunmuştur. Bir başka çalışmada yağ doku mezenkimal kök hücreleri kültür ortamında damarlanma üzerine CD31, CD34, vWF, CD146 ve SMA belirteçleri üzerinden anlamlı bir şekilde artışa neden olmuştur (24). Biyomühendislik yolu ile doku iskeleleri üzerinde yapılan kök hücre uygulamalarının reepitelizasyonu arttırdığı, kollajen birikimini azalttığı, yeniden damarlanmayı çoğalttığı, kıl folikülü ve yağ bezlerini daha çok ürettiği ayrıca parakrin faktörler yolu ile yara iyileşmesini hızlandırarak istenilen iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (25). Dekametazon ile immunosuprese edilmiş sıçanlarda MKH transplantasyonunun daha hızlı bir iyileşmeye neden olduğu ve bunu özellikle kollajen fibril formasyonunu arttırarak yaptığı saptanmıştır (26). Ayrıca bir başka çalışma ile kök hücre uygulamasının derinin birçok değişik hücrelerine farklılaşarak bu hücreler yolu ile de yara iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (27). Kök hücreyle yapılan birçok çalışmanın sonucu olarak uygun doz ve uygulama şekli, verilirken kullanılacak doku iskelesi ve iskele üzerinde eklenebilecek adhezyon, matriks ve büyüme faktörü özellikleri ayrıca verildikten sonraki hücrenin yönlendirilmesi ve farklılaştırılması gibi özellikleri iyi anlaşıldığı takdirde hücresel tedavinin kronik yaraların sorun olmaktan çıkarılacağını düşündürmektedir (21,28,29). Radyoterapi ile deride oluşan hasara yapılan yağ grefti uygulamasında sıçanlarda toraks ön duvarında 4x6 cm²lik yara alanında radyoterapi sonrası 0. ve 20. günlerde yapılan ölçümlerde epitelyum kalınlığının arttığı inflamasyona bağlı lenfosit ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu kapiller sayısı ve kollajen miktarı artarken fibrozisin azaldığı erken ve geç uygulamanın bir fark oluşturmadığı saptanmıştır.

MKH'ler, farklılaşma potansiyelleri nedeniyle iyileşmeyen ülserlerde ve doku rejenerasyonunda terapötik uygulama için büyük umut vaat etmektedir. MKH'ler, yara bölgelerine göç edebilir ve anjiyogenezi uyarak revaskülarizasyonu teşvik ederek yara iyileşmesini iyileştirebilir. Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) insidansı dünya çapında artmaktadır. Periferik nöropati ve periferik arteriyel tıkalı hastalık (PAOD) ile ilişkilidir, bu da hastaları minör travma sonrası iyileşmeyen ayak ülseri geliştirmeye yönlendirir. Geliştirilen yeni tedavi protokollerine rağmen toplum için önemli bir problem olan iyileşmeyen ayak ülserleri nedeniyle diyabetik hastalar arasında yüksek oranda amputasyon görülmektedir. Son yıllarda, kök hücre nakli,

DAU için yeni bir tedavi seçeneği olarak düşünülmüştür. MKH'lerin rejenerasyon potansiyeli deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (125). Yara onarımında plasenta kaynaklı MKH hidrojelinin etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek ve yara iyileşme oranını arttırmak için, PDMSC'leri hidrojelin (hücre sayısı: 1 x 10 / hücre / cm) topikal olarak yara bölgesine uygulandığı bir çalışmada hastanın ayak ülseri iyileşmiş ve yürüyüşte ayak fonksiyonu iyi korunmuştur. Hiçbir komplikasyon gözlenmemiştir. Takip eden 6 ayda nüks görülmemiştir (126).

Plantar deri üzerinde bir DFU kemirgen modeli ve bu modelde KİMKH terapötik etkinliğini değerlendirmek için yapılan başka bir çalışmada yeniden epitelizasyon, plantar deride iyileşme sürecini başlatmıştır ve KİMKH'ler diyabetik sıçanlarda iyileşmeyi hızlandırmıştır. MKH şartlı medyumunu ile kültüre edilen keratinositlerde, yüksek glukoz durumundaki azalmış pFAK seviyeleri geri kazanılmış ve MMP2, EGF ve IGF-1 seviyeleri artmıştır. Bu iyileşme, keratinosit fonksiyonlarının modifikasyonu ile açıklanabilmektedir (127).

İyileşmeyen diyabetik ülselerde merkezi patoloji bozulmuş kan akımıdır. MKH'lerin kollajen iskeleler içine ekilerek yara yerine verildiği bir çalışmada tedavi edilmeyen yaralarla karşılaştırıldığında artmış anjiyogenez ile sonuçlanmıştır. Yara iyileşmesinde yüzde yara kapanması ile değerlendirilen bir iyileşme sadece en yüksek hücre dozunda gözlenmiştir. Bu hücre bazlı tedavinin, yara kapanmasını arttırmak ve anjiyogenezi güçlendirmek için yeni bir terapötik strateji sağladığı düşünülmüştür (128).

Obez Olmayan Diyabetik (NOD) farelerde, deri yara iyileşmesinde fare kemik iliği kaynaklı allojenik MKH'lerin (allo-fKİ-MKH) ve bunların aselüler türevlerinin (allo-ast-fMKH'ler) intradermal olarak enjekte edilerek yararlı etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada allo-ast-fMKH'lere kıyasla, allo-fKİ-MKH'lerin uygulanmasının, diyabetik farelerde yara iyileşmesi için yetersiz olduğu ve terapötik etkiyi geciktirdiği görülmüştür. Bu durum, MKH'ler tarafından salgılanan trofik faktörlerin, cildin yenilenmesi için kritik olduğu gerçeği ile açıklanabilir ve MKH'lerin, uygulamadan sonra bu faktörleri salgılamak için biraz zamana ihtiyaç duyabileceğini düşündürmektedir (129).

İnsan adipoz kökenli kök hücrelerin (iADSC) lokalizasyonunun ve bu hücrelerin diyabetik sıçanlarda ayak ülserli dokunun onarımında rolünün araştırılmasının amaçlandığı bir çalışmada iADSC'lerin, diyabetik sıçanlarda, 15. günde ülser alanında önemli ölçüde azalmış olan, tam kat kalınlıkta ayak dorsal

deri yaraları üzerinde olumlu etkisi görülmüştür. Daha fazla granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez, hücresel proliferasyon ve daha yüksek büyüme faktörü ekspresyonları da yara yerinde tespit edilmiştir (130).

DAU ile yapılan başka bir çalışmada KİMKH'ler intramüsküler ve subkutan enjeksiyon olmak üzere iki farklı yolla verilerek sonuçlar karşılaştırıldığında, proliferasyon belirteci olan Ki67 ekspresyonlarında iki grup arasında fark olmadığı ancak VEGF ekspresyonunun, subkutan KİMKH uygulanan grupta daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Her iki MKH verilmiş yolu da sıçanlarda DAU'ların yara iyileşmesini desteklemektedir. Bacak içine yapılan intramüsküler transplantasyon, daha sonraki aşamalarda yara dokularında daha iyi bir kalıcılığı ve daha yüksek bir VEGF ekspresyon seviyesini göstermiştir (131).

Hücresel ürünler son yıllarda giderek artan geniş bir hastalık yelpazesi tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu hücresel ürünler içerisinde PKMH, özellikle hematolojik maligniteler başta olmak üzere çeşitli hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun dışında yara iyileşmesinin özellikle inflamatuvar fazında etkin rol oynayan LH için önemli immünolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (132) Literatürde PKMH ve LH için yara iyileşmesindeki rolüyle ilgili in vivo çalışmalar sınırlı sayıdadır. Ayrıca LH için epidermal homeostaziste önemli bir rol oynadığı ve yara iyileşmesinin özellikle erken aşamalarında yararlı olduğu in vivo deneylerle gösterilmiştir (13,133). PKMH hücrelerinin bakteri ile uyarılma durumlarında IL-6-10-17-23, IFN- γ , TNF- α TGF- 1β düzeylerinin elisa ile incelendiğinde arttırdığı ve bunun TGF- β için anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu durum PKMH için immunregülatuar ve antiinflamatuvar etkinin varlığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda PKMH verilen gruplarda morfolojik olarak iyileşmenin daha hızlı gerçekleştiği, immünohistokimyasal boyamalarda ise IL-1 ekspresyonunun azalması ile yara iyileşmesinin inflamatuvar fazını etkilediğini gördük. PKMH+FLH verilen gruplarda ise bu fark daha belirgindi.

LH'ler, makrofajlar ile ortak bir ontogeni paylaşan fakat DC'ler olarak işlev gören epidermis-yerleşik antijen sunan hücrelerdir. Epidermiste gelişimi, toplanması ve tutulması, birçok mekanizma yoluyla keratinositlerle etkileşimleriyle düzenlenir. LH ve dermal DH alt kümeleri sıklıkla fonksiyonel fazlalık gösterir, ancak antijen epidermiste yoğunlaştığı zaman spesifik adaptif bağışıklık yanıtları için LH'ler gereklidir (134). LH, derinin epidermisi boyunca bir hücre ağı oluşturan, fakat epidermisten drenaj lenf düğümlerine göç etme

kabiliyetine sahip olan, dokuya yerleşik makrofajların eşsiz bir popülasyonudur. Deri bariyerlerindeki konumları bağışıklık sistemi olarak önemli bir rol oynar. Ancak, onlarca yıllık araştırmaya rağmen, LH'nin deri bağışıklığında oynadığı rol belirsizdir; LH'nin ablasyonu, immün regülasyon eksikliği nedeniyle ne deri enfeksiyonuna ne de ölümcül otoimmüniteye neden olan ölümcül sonuçlara yol açmaz. İmmün süreçler hakkındaki anlayışımız geleneksel olarak lenfosit priming ve diferansiasyon bölgeleri olarak ikincil lenfoid organlar üzerinde merkezlenmiştir, bu da başlangıçta LH ile olgunlaşarak LN'nin matürasyon üzerine LN'ye göç eden doku dendritik hücreleri için bir paradigma olarak tanımlanmıştır. Ancak, yakın zamanda, efektör bağışıklığını şekillendirmede doku ortamının önemi hakkında bir farkındalık ortaya çıkmıştır (135).

Oral mukozaya antijen maruziyetinin genellikle immün tolerans indüksiyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, insan oral mukozasından göç eden DH alt kümesinin bileşimi ve işlevi hakkında çok az şey bilinmektedir. Sağlıklı insan dişeti eksplantlarından kaynaklanan göçmen DH'nin, insan derisinden göç eden DH ile aynı frekans dağılımındaki aynı fenotipik alt kümelerden oluştuğu gösterilmiştir. Gingival CD1a+ LH ve interstisyel DC alt kümeleri, cX-4 ekspresyonu, kutanöz muadillerinin aksine, farklı göç mekanizmalarına işaret etmektedir. Dikkat çekici bir şekilde, gingival eksplantlar daha yüksek DH migrasyon hızları ve göç etmiş DH'nin allojenik T hücrelerini prime etme ve tip-1 efektör T hücresi farklılaşmasını indüklemeye ile sonuçlanan daha yüksek inflamatuvar sitokin seviyeleri sağlamaktadır. Bu gözlemlerden yola çıkarak, T hücre toleransını indüklemek için içsel bir kabiliyetten ziyade, oral mukozadan göç eden DH'nin efektör T hücresi bağışıklığını indüklemeye eğilimi gösterebileceği ve kararlı durumdaki olası patojenik davetsiz misafirlere karşı yüksek bir uyanıklık durumunu koruyabileceği düşünülmektedir (136).

Kanser hastalarında DH farklılaşması ve maturasyonun yaygın sistemik baskılanması, aşılama etkinliğini engelleyebilir. Bir çalışmada, insan derisinden göç eden DH alt kümeleri kapsamlı olarak tanımlanmış, göç ve T hücresi uyarıcı yeteneklerinin, kanserle ilişkili baskılayıcı sitokinler aracılığıyla dermal mikroçevresinin şartlandırılmasından nasıl etkilendiği incelenmiştir. Karmaşık bir doku yapısı bağlamındaki etkileri değerlendirmek için, yakın fizyolojik bir cilt eksplant modeli kullanılan çalışmada 4-renk akış sitometrisi ile, maturasyonun farklı durumlarında göç etmiş LH ve beş dermis kaynaklı DH popülasyonunu

tanımlanmıştır. Bilinen tümörle ilişkili baskılayıcı sitokinlerden oluşan bir panelden IL-10, düşük seviyelerde eş-uyarıcı moleküller içeren immatür bir CD14 (+) CD141 (+) DC-SIGN (+) DH alt kümesinin baskın göçünü indüklemek için eşsiz bir yetenek göstermiştir. Benzer şekilde immatür bir alt grup kompozisyonu, deride meme tümörlerinden alınan eksplantlardan göç eden DH için gözlenmiştir. Matür CD1a (+) alt kümelerinin baskın göçü, IL-12p70 salınımı, Th1 profili ile etkin Th hücre yayılımı ve fonksiyonel MART-1-spesifik CD8 (+) T hücrelerinin genişlemesi, immatür CD14'ün migrasyonu ile ilişkili olarak görülmüştür. Th yanıtlarının, koordineli FoxP3 ve IL-10 ekspresyonu ve düzenleyici T hücresi farklılaşması ve büyümesi lehine eşlik ettiği gözlenmiştir. Böylelikle, yüksek IL-10 seviyeleri, cilt göç etmiş DH alt-kümelerinin bileşimini etkilediği ve M2-benzeri immatür DH'nin T hücre toleransına yol açan işlevsel niteliklerle göçünü desteklediği düşünülmektedir (137). Biz bu çalışmada yara iyileşmesinde inflamatuvar fazı kısaltmak amacıyla PKMH'leri IL4 ve GM-CSF ile indüksiyonu ile dendritik hücrelere farklılaştırdık. Elde ettiğimiz hücreleri deney modellerinde tek başına fLH olarak veya PKMH ile birlikte yara bölgesine intradermal olarak uyguladık.

Yapılan çalışmalarda allojenik olarak uygulanmış kök hücrenin diyabetik sıçanlarda immunosupresif etki gösterdiği, benzer şekilde PKMH ile aynı etkinin görüldüğü, hücrelerin uygulama sonrasında dokularda kaldığı ve fonksiyonel olduğu saptanmıştır. Ayrıca yara iyileşmesinin özellikle inflamatuvar fazında etkin rol oynayan langerhans hücrelerinin önemli immünolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. LH epidermal homeostaziste önemli bir rol oynadığı ve yara iyileşmesinin özellikle erken aşamalarında yararlı olduğu in vivo deneylerle gösterilmiştir. Bu çalışmanın özgünlüğü zor iyileşen yaralarda kök hücreden farklandırılmış langerhans hücrelerinin literatürde bilinmeyen tedavideki etkinliklerinin ve etki mekanizmalarının ortaya konmasıdır. Çalışmamızda yapılan literatür araştırması sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda yaygın bir toplum sağlığı problemi olan özellikle diyabet gibi kronik hastalıkların sebep olduğu kötü yara iyileşmesinde periferik kandan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin ve bunların farklılaştırılması ile elde edilen bir dendritik hücre olan Langerhans hücresinin yara iyileşmesi üzerindeki etkisi araştırıldı.

Sıçan sırtında flep olarak yapılan deneysel bir çalışmada MKH veya MKH + VEGF besiyerine emdirilen jelâtin matriks ile 7 gün sonrasında nekroz alanının azaldığı, CD31 ile gösterilen kök hücre sayısının anlamlı bir şekilde arttığı ayrıca

kıl kökü ve iskelet kası sayısının olumlu yönde etkilendiği bulunmuştur. Kritik hacimli yapılan fleplerde yara iyileşmesinin zorlaşması nedeni ile curcumin kullanılan bir çalışmada histopatolojik olarak PKMH de azalma, damar ve kollajen yoğunluğunda artış olduğu saptanmıştır. 3x9cm²lik yaranın 2. günde nekroza gittiği 7. günde nekroz alanlarının oturduğu ve 7. günde yapılan histopatolojik incelemede iyileşmenin başladığı görülmüştür. 2.5 x 2.5 cm²lik tam kat cilt defekti oluşturulan sıçan deneysel yara iyileşmesinde kollajen-GAG dermal matriks veya kollajen-elastin dermal matriks (matriderm) karşılaştırmasında 14. ve 30. günlerde dermis ve epidermis kalınlaşması, granülasyon dokusu, kollajen depolanması, elastin lifler, inflamatuvar hücreler ve miyofibroblastik hücreler değerlendirilmiştir. Kontrole göre her 2 dermal analog makroskobik kontraksiyonu azaltmıştır. Diğer parametrelerde de olumlu etki saptanmıştır. 1.5 x 1.5 cm²lik oluşturulan sıçan deri yarasında MKH ile bGF birlikte verildiğinde integrin-alfa-3 artışıyla görülen anlamlı bir iyileşmenin olduğu görülmüştür (140). 2x2 cm²lik tam kat cilt defekti yapılan sıçan derilerinde fibrin matriks, fibrin matriks üzerinde keratinosit, keratin matriks üzerinde YKMKH ve bunların birlikte olduğu uygulaması yapılmıştır. Yaranın kenarlarından kontrakte olduğu ve merkezde bir ülserasyon bulunduğu saptanmış sadece 2 hücre birlikte kullanıldığında kontraksiyonun azaldığı ve normal deriye benzer şekilde epitelizasyonun olduğu, kollajen miktarının arttığı ve damarlanmanın çoğaldığı görülmüştür. Ayrıca fibroblastik farklılaşmanın ve matriks sentezinin, endotelial farklılaşmanın, yeni damarlanmanın ve uygulanan keratinositlerden oluşan epitelin varlığı izlenmiştir.

Deri yaralanmalarında tedavi olasılıkları içerisinde otograft şeklinde deri nakli klasik bir yöntemdir. Deriye paralel bir şekilde ince bir tabaka donörden alınıp epidermisi tamamen, dermisi kısmen içeren bir şekilde yara yerine yerleştirilir. Yanık şeklindeki büyük yaralarda alanı büyütme amaçlı gerdirilebilir ve bu durumda daha fazla dermis içeren deri nakli oldukça avantajlıdır. Kalınlaşan deri greftinin daha hızlı ve daha iyi iyileştiği bilinmektedir. İkinci olasılık allograft veya ksenograft deri naklidir. Donör bulmanın sorun olduğu ancak bulunamadığında rejeksiyonu göze alınarak bir hafta zaman kazanılabilen deri nakil tipidir. Allograftın salgıladığı büyüme faktörleri sebebiyle otograft bulunana kadar zaman kazanılabileceği düşünülmektedir. Ksenografta örnek olarak da domuz derisinden yapılan nakiller bulunmaktadır. Bunların dışında doku mühendisliği ile üretilen deri benzeri ürünler bulunmaktadır. Biyoçözünür matriks materyallerin üzerinde

çoğaltılan keratinositler ile deriye naklin yapıldığı türdür. İntegra denilen ilk satılan ürün mühendislik ürünü çapraz bağlı kollajenler ile konroidin-6-sülfatın karışımı olarak bulunduğu dermal matrikstir. Büyük yanıklar gibi durumlarda geçici epidermal yanıklar olarak kullanılan bu matriks hastanın hücreleri ile dolup çoğalma ile dermal rejenerasyonu sağlar iken yara kontraksiyonunu da azaltır. Bir diğer ürün alloderma olup deselülerize edilmiş donör derisini kullanır. Hücre içermeyip sadece protein bulundurduğundan immun reaksiyonlara neden olmadığı gibi hastalık bulaşına da sebep olmaz. Diğer bir ürün de hücre tabanlı olanlardır. Hastalardan alınan keratinositlerin kültürde çoğaltılmasıyla ilk olarak “Epicel” piyasaya sürülmüştür. Son zamanlarda kulak arkasından alınan biyopsilerle birkaç hücre tabakası kalınlığında ürünler elde edilebilmektedir. Bir diğer ürün yeni doğan fibroblastlarının poliglaktin mesh üzerinde üretildiği ve matriks oluşturan ürünlerdir. İlk olarak dermagraft ismi ile diyabetik ayak ülserlerinde kullanılmıştır. Her durumda rejeksiyon olmasına rağmen dermisin yeniden yapılanmasına ve yara yerine keratinosit göçünü sağlamaktadır. Bir diğer ürün ise fibroblast ve keratinositlerin birlikte kullanılarak dermis ve epidermisin oluşturulduğu apligrafttır. Yeni doğan derisinden alınan fibroblastların kollajen-1 ile güçlü bir matriks oluturması ile çok katlı bir yapı elde edilir. Ancak yara yerinde kontraksiyon ve rejeksiyon kaçınılmazdır. Yeni bir yaklaşım olarak da yara kenarlarından alınan tam kat derilerin bir hidrojel yardımı ile karıştırılması ve tekrardan yara yerine kullanılmasıdır. Böylelikle hücre çoğalması ile yara iyileşmesi sağlanır (139). Tam kat deri grefti yapılan bir başka çalışmada MKH kullanılarak sistemik ve lokal etkisi incelendiğinde kitosan kullanımının kontrol ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu görülmüştür. Buna sistemik ve lokal verilen MKH oldukça anlamlı bir iyileşmeye neden olmuş epidermis ve dermisin yanı sıra hipodermis ve altındaki kas dokusundaki kıl follikülü ve yağ bezlerinin de sayısal olarak arttığı bir iyileşme görülmüştür. Masson trikrom ile kollajen fibrillerin yüzdesi ve CD31 ile gösterilen dermal kök hücre miktarı anlamlı bir şekilde artmıştır. Doku mühendisliğinin kültür ortamında deri yapımı ile ilgili ümit veren çalışmaların olduğu ve tam kat derinin oluşturularak yara yerlerinde kullanılabileceği düşünülmüştür (141). Bununla ilgili değişik modeller önerilmektedir (142). Diyabetik ayak ülserleri için endotelial progenitör hücrelerden yeni damar oluşumunun gerçekleştiği gösterilmiş ve bunun klinik olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Deri yara iyileşimine son yaklaşım KH tedavisidir. Dolaşan kanda bulunan hematopoetik ve MKH nedeni ile yara yerinde kök hücre bulunması çok şaşırtıcı değildir. GFP ile işaretlenmiş KİMKH fare yara modeline transplante edilmesi sonrasında orada kaldıkları ve birçok farklı hücreye dönüştükleri gösterilmiştir. Allojenik MKH için çok az immunreaktif olduğu ve anlamlı katkılar sağladığı saptanmıştır. KİMKH için derinin doğal fibroblastlarından daha fazla kollajen, büyüme faktörü ve angiogenik büyüme faktörü salgıladığı saptanmıştır. Birçok skafoldlar ile verilen KİMKH ların hem fare hem de insan da yara iyileşmesine anlamlı katkılar sağladığı gösterilmiştir. Birkaç gün içerisinde dermal kanlanma ve kalınlık artışı sağlamaktadır. Radyasyon yanığına uğramış bir teknisyende 11 aylık KİMKH tedavisinin şaşırtıcı sonuçları olmuştur. Özellikle yara yerinin kritik hacme ulaştığı durumlarda KİMKH daha da anlamlı etkiler sağlamaktadır. Birçok sınırlamaları olmasına rağmen embriyonik KH ve iPKH tedavilerinin de oldukça etkili olduğu gösterilmektedir (139). Bir başka çalışmada tam kat deri yarasında topikal ve sistemik KİMKH karşılaştırılmış ve topikal kullanımının daha etkili olduğu düşünülmüştür (138).

MKH deri içinde damarların dış kısmına perivasküler hücrelere ve perisitlere lokalize olabilmektedir. Damar duvarında olanları yara dokusunun tamiri için göç edebilmektedir. İster intravenöz ister intradermal olsun MKH enjeksiyonu zor iyileşen yaralarda bile etkili olmaktadır. Bu etkinin proangiogenik faktörlerin sekresyonu ile damarlanmanın artışı, endotel ve perisit hücrelere farklanmanın olması, M2 makrofaj polarizasyonunun sağlanması, matriks üretimi ve immunosupresif etki ile gerçekleşmektedir. Bu faktörler içerisinde MFG-E8 yeni bir hedefe bağımlı tıropatik olabilir (143). Obez olmayan diyabetik farelerde 1×10^6 allojenik KİMKH aselüler membran üzerinde verildiğinde reepitelizasyon, dermaepitel bileşke, yara iyileşmesi, lökosit infiltrasyonu, damarlanma, granülasyon dokusu oluşumunda ve dermisteki fibrillerin yoğunluğu incelendiğinde 16 gün sonrasında oldukça olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bunlarda inflamasyon ve granülasyon dokusu oluşumunda oldukça anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Yara yeri incelendiğinde IGF-1, KGF, HGF, VEGF, ANG-2, MMP1, KOL1 ve PGE-2 proteinlerinin anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır (129). Asellüler dermisin yanık tedavilerinde de başarılı bir şekilde kullanıldığı düşünülmüştür.

Diyabetik yara iyileşmesinde önemli bir problem yeni damarlanmanın inhibisyonu, makrofajlara bağlı fagositozun disfonksiyonudur. Buna bir çözüm olarak MKH uygulaması diyabetik farelerde önemli miktarda MFG-E8 üretimine neden olmuştur. Yara alanındaki yeni damarlanma inflamasyon ve apoptotik hücre sayısı İHK ve rtPCR ile değerlendirilmiş, fagositoz yöntemi ile incelenmiştir. Diyabetik olmayan farelerde granülasyon dokusunda MFG-E8 önemli ölçüde azalırken subkutan yapılan MKH ile diyabetik farelerde de bu azalma sağlanmıştır. MKH enjeksiyonu sonrasında CD31 pozitif EC ler ve NG2 pozitif perisitler ve aynı zamanda M2 tipi makrofajlar anlamlı bir şekilde azalmıştır. Ayrıca apoptotik hücre sayısında ve TNF-alfa sayısında baskılanma olmuştur. MKH nişi verilmiş derilerde de diyabetik farede peritoneal makrofajlar ile fagositoz edilen apoptoz hücre sayısında artma olmuştur (9,145). Epidermal rejenerasyon ve tamirde apoptozun Caspas-8 üzerinden gerçekleştiği de gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda dermisteki damarlanma artışını göstermek amacıyla deney modellerinde elde ettiğimiz dokuları immünohistokimyasal olarak VEGF ile boyadık. Boyama sonucunda VEGF ekspresyonundaki en anlamlı artışın non diyabetik hayvanlarda PKMH+FLH verilen grupta gerçekleştiğini, bunun dışında hücre verilen gruplarda kontrol ve sham grubuna göre yine damarlanmada anlamlı fark olduğunu saptadık.

KH için derideki birçok hücreye dönüştüğü gösterilmiştir. En önemli hücre olarak keratinosit farklılaşması çalışılmıştır. Ekzojen sitokinler, büyüme faktörleri, kimyasallar ve matriks karışımı ile yönlendirilen KH belli oranda keratinosite dönmektedir. Büyüme faktörlerinden BMP4, askorbat, ve matriks keratinosite döndürmede önemli faktörlerdir. Genetik modülasyon ile de keratinosit farklılaşması sağlanabilir. Transfekte edilen KH için WNT grubundaki transkripsiyon faktörlerinin daha etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle GATA-3 hem T hücre farklılaşmasını hem de KH farklılaşmasını sağlamada en fazla çalışılan transkripsiyon faktörüdür. İnsan uygulamasında oluşabilecek riskleri yüzünden gen tedavisi hala birçok soru içermektedir. Bir diğer yaklaşımda bazı transkripsiyon faktörlerin hücreler arası sinyal molekülleri üzerine parakrin etki ile farklılaşmayı yönetmesidir. Araştırma aşamasında olana bu düşüncenin gelecekte önemli bir tedavi ürünü olması beklenmektedir (144).

Derideki epitelyal kök hücreler interfolliküler epidermal ve kıl follikülü olmak üzere ikiye ayrılır. İnterfolliküler epidermal olanlar, epidermin bazal tabakasında

olup yara iyileşmesine katılır. Kıl follikülünde olan KH bulge bölgesinde bulunur. Epidermal ve yağ hücrelerine farklılaşır. KH parakrin etki ile neovaskülarizasyon, göç ve immunmodülasyonu gerçekleştirir. MKH salgıladığı VEGF ile NO ile endotel hücre proliferizasyonu ve vasküler permeabiliteyi artırır. Ayrıca MMP ler üzerinden de bu etkiyi gerçekleştirir. İnsan derisinden elde edilen çoğalan MKH için VEGF ekspresyonunun sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonda olduğu ve ikisi arasındaki etkileşimin damarlanmayı artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı düşünülmüştür (146).Çoğalma üzerine olan etkileri dermal fibroblastlar üzerinde yaptıkları parakrin etkidendir. MKH nişinde yüksek düzeyde bulunan sitokin ve kemokinler yara iyileşmesinde hücre çoğalmasını gerçekleştirir. MKH ayrıca immun hücrelerin ve endotelyal hücrelerin göçünü sağlar. CCL2, 5, 7, 20, 26, CX3CL1, 8 ve 10 önemli faktörlerdendir. Ayrıca monositler inflamatuvar hücreler natural killer hücreler dendritik hücreler de bu faktörlerden etkilenir. MKH orta derecede mayor histocompatibility kompleks class 1 eksprese ederken 2'yi eksprese etmez. Bu nedenle immunolojik reaksiyona neden olmaz. Yara yerinden salgılanan proinflamatuvar sitokinler MKH ları yara yerine çağırarak immunmodülasyonu yapmasını isterler. Aktive lenfositler tarafından salgılanan TNF-alfa ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler ile SD1 in inflamasyonlu dokuda artmasını sağlar (144).

Sadece deri değil ekleri açısından da hücre tabanlı tedavinin yeri önemlidir. Saç follikülü, yağ ve ter bezleri, epidermis ile ilişkide olan ancak derminin derinliklerine kadar uzanan oluşumlardır. Kıl follikülünün anajen dönemdeki aktif büyümesine, katajen dönemdeki yıkımına ve telojen denen sessiz dönemdeki durumlarına etki edebilmektedir. Buralara uygulanan kök hücrelerin her bir farklı hücre için değişik bir yaklaşımda bulunduğu ayrıca bu eklerin sağlıklı olması durumunda deri yara iyileşme durumunun da sağlıklı olduğu gösterilmiştir. Kıl follikülünün epidermal KH içerdiği bulgede melanosit KH nın bulunduğu saptanmıştır. Buralardaki farklı KH izole edilip yara iyileşmesi için kullanıldığında aktif bir şekilde fibroblast gibi fonksiyon göstermektedirler. Derideki nöral hücrelerinde izole edilip tekrar deriye verildiğinde hem nöral hem de mezodermal hücrelere dönüştükleri saptanmıştır (139).

Mekanik olarak oluşturulmuş insan randomize faz I/II klinik denemesinde normalde gerçekleşmeyen rekonsriksiyonun 38 erişkin hastada yapılan Kİ mononükleer hücreler ile intradermal uygulama sonrası deri yara alanının

küçülmesi ve deri kalınlığının ölçülmesi ile gösterilen yara iyileşmesinin 1. ayda anlamlı ve 4. ayda oldukça anlamlı tedavi etkisi saptanmıştır. 2. yıl sonunda plaseboya göre 4 katına çıkan deri alanı otolog KH için mükemmel bir sonuç olmuş ve hiçbir yan etki görülmemiştir (147). Bir başka insan randomize faz I/II klinik denemesinde insan dermal fibroblastlardan oluşturulmuş biyolojik olarak aktif epidermisten yapılmış natural killer hücrelerden oluşan stratagraft deri dokusu kullanılmış ve kadavrik allograftlar ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiş 15 hastanın yara yerine geçici allograft olarak verilmiştir. Yara yerinden 1 hafta sonra kaldırıldığında allojenik immun reaksiyon in vitro lenfosit proliferasyon yöntemi, krom salgılama yöntemi ve antikör gelişimi ile incelenmiştir. Kadavra ile karşılaştırıldığında stratagraft B ve T lenfosit veya LH hücrelerinde bir değişiklik oluşturmamıştır. Ayrıca hastaların PKMH sayısında veya keratinosite farklanmada bir artışa neden olmamıştır (148).

Sıçan deri örneklerinin SEM ile incelendiği bir çalışmada tüm derinin kullanılması durumunda in vivo ile karşılaştırıldığında değişen birçok gen ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir.

Kronik yaralar, kesintisiz bir tamir süreci sergiler; burada genellikle 3 ay olarak kabul edilen uygun bir süre içinde anatomik ve fonksiyonel sonuca ulaşamaz. Deri yaralandıktan sonra, inflamasyon süreci yara iyileşmesini başlatır (32). Düzenli iyileşme safhaları boyunca ilerleme kaydedilmemiş ancak kendi kendine devam eden bir inflamatuvar aşamada kalmış ve yeterli yara yönetimine rağmen bu duruma devam etmişlerdir. Kronik hastalık, vasküler yetmezlik, diyabet, malnutrisyon, yaşlanma, basınç, enfeksiyon ve ödem gibi lokal faktörlerin sebep olduğu kronik yaralarda meydana gelen doku hasarı, ROS ve destrüktif enzimler ile yarayı bol miktarda nötrofil infiltrasyonu ile karakterize, uzun süren ve artmış bir inflamatuvar durumda hapseder (33).

Yara onarımı, öngörülebilir hücre tipleri ve mikroçevre hazırlıkları olan homeostaz fazı, inflamatuvar faz, proliferasyon fazı ve remodeling fazı olmak üzere bir dizi faz ile koordine edilir. Yara iyileşmesi inflamatuvar fazda kanamayı sınırlayan ve sitokin sinyalizasyonunu başlatan trombosit tıkaçının oluşmasıyla başlar. Bu olay koagülasyon kaskadını başlatır ve canlı olmayan dokunun debridmanı için hücrelerin çoğalmasını ve biraraya gelmesini teşvik eder. Trombosit agregasyonuna, kanda nötrofiller için kemotaktik olan PDGF ve TGF- β salınımı eşlik eder. Nötrofiller, PDGF'ye yanıt olarak trombosit tıkaçına çekilerek

ölü dokuyu ve bakteri partiküllerini fagosite eder, reaktif oksijen ürünleri (ROS) ile de antibakteriyel ortam yaratır. Nötrofiller ayrıca proinflamatuvar bir sitokin ve keratinositlerin çoğalması için bir uyarıcı olarak çift etkiye sahip olan IL-1 sunar. Lokal mikroçevre değişmeye başlar ve katekolaminlere yanıt olarak vazokonstriksiyon meydana gelir. Bu vazokonstriksiyon kısa süre içinde giderek azalır ve dolaşımdaki mast hücrelerinden histamin salınımına yanıt olarak daha sonra vazodilatasyon meydana gelir. İnflamatuvar faz ilerledikçe, makrofajlar 24 ila 72 saat içinde baskın hücre türü haline gelir. Yara iyileşmesinin düzenlenmesindeki rolü kritiktir ve yara iyileşmesi ilerledikçe değişiklikler meydana gelir. Makrofajların yara iyileşmesinde merkezi bir rol oynadığı, yara içinde homeostazı meydana getirdiği ve patolojik inflamasyonu önlemek için inflamatuvar durumu azalttığı yaygın olarak kabul edilmektedir (30). Deride immun yanıt katılan antijen sunan hücreler (APC) olan epidermal dendritik hücrelerin özelleşmiş bir alt grubu olan Langerhans hücreleri (LH) derinin epidermal tabakasında sofistike bir gözetim ağı oluşturur ve ilk sıra konak savunucusu olarak işlev gören epidermis ve mukozal epitelde bulunan ve deri immünitesinin düzenlenmesi için kritik olan özel bir dendritik hücre alt tipidir (15). LH'ler kararlı durum koşulları altında deride bulunan miyeloid öncüllerden yenilenirken, patolojik koşullar altında da kan dolaşımından toplanan monositlerle yenilenirler. LH'leri, akut yara iyileşmesinin ilk aşamalarında immünitenin önemli bir hücresel bileşenini temsil eder. LH'leri ile epidermin repopülasyonunun, fare ve domuz modellerinde yara re-epitelyalizasyonu sırasında meydana geldiği gösterilmiştir (13). Güncel kanıtlar, LH'lerinin anormal yara iyileşmesinde ve hipoksik bir çevreyle karakterize olan hipertrofik yara ve kronik yaraların oluşumunda yer aldığını göstermektedir (15) Bu hücreler immünolojik bariyerin esas hücrelerinden birini temsil eder ve akut yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında önemli bir rol oynamaktadır (13). İnflamasyon gerçekleşmiş veya yaralanmış derilerde, çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen inflamatuvar sinyaller, LH aktivasyonunu ve olgunlaşmayı teşvik edebilir. Aktive edilmiş LH'leri daha sonra lokal lenf nodlarına doğru göç ederek primer bir immün yanıt ortaya çıkarmaktadır. Fonksiyonlarının, yabancı molekülleri fagosite etmesinden naif T hücrelerini tetiklemeye kadar değiştiği bilinmektedir. Yine de yara iyileşmesi sırasında bu immatür dendritik hücrelerin işlevi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca LH sıklığının keratinosit proliferasyonu ile ters orantılı olduğu bilinmektedir. Artmış LH sayısı bazal

keratinositlerin proliferasyon oranı ile ters korelasyona sahip olduğu için, iyileşen diyabetik yaralarda LH varlığının artması nedeniyle keratinositlerin çoğalmasını durdurduğu ve normal, ayırt edici bir fenotipe dönüştüğü söylenebilir. Kronik yaraların iyileşmeyen kenarlarındaki keratinositler, sağlıklı muadillerinden önemli ölçüde farklıdır. Deney hayvanı modelinde yara iyileşme sürecinde damarlanma, epitel kalınlığı, fibroblast çoğalması, keratinosit sayısı birçok çalışmada ortak kullanılan kriterler olmuştur (31).

LH histiyositozisi denilen hastalıkta insan deri lezyon örneklerinde lökosit hücre adezyon moleküllerinin incelemesi yapılmıştır. Tüm hastalarda CD11c, 44, 54 ve 58 in pozitif olduğu 3 hastada CD11a ve b nin pozitif olduğu ve CD58 Lökosit Fonksiyon antijen-3 için epidermis LH lerinde pozitif olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin aktif bir şekilde migrasyon yaptığı da saptanmıştır(13). Deri yaşlanmasında kullanılan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bunlardan bir tanesi dendritik hücre ailesinin bir üyesi olan LH olup epidermise yerleşerek antijen prezentasyonu ve T hücre cevabını indüklemeye ile immun sistemi modüle etmektedir. Yaşlı deride LH sayısal ve hareketsetel olarak azalmaktadır. Dolaşan kandaki monosit öncüllerinden LH benzeri hücreler izole edilerek flowsitometrik analizi ile oluşan değişiklikler incelenmiştir. IL-1 ve retinoik asit etkisi ile bu değişikliklerin düzeltilebilecekleri düşünülmüştür (15). LH için yara iyileşmesinde 2 gün içerisinde yeni oluşan epitelde bulunduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada artmış fizyolojik stresin anlamlı bir şekilde makrofaj ve LH hücrelerini azalttığı ve yara iyileşmesini kötü yönde etkilediği bulunmuştur (135). Yaranın oluşmasından sonraki ilk saatte epidermal ve dermal MHC-2 pozitif hücrelerin geçici olarak arttığı görülmüş, CD-1a pozitif hücrelerden iyi farklılaşmış LH lerin de arttığı görülmüştür. MHC-2 pozitif hücrelere perivasküler alanda DH, CD-11 negatif hücreler eklenmiştir. Ayrıca sayıca artan mast hücrelerin degranüle olduğu ve bunun LH ile ilişkili olduğu bulunmuştur (152). Bir başka çalışmada CD-14 pozitif DH prekürsörlerinin CXCL14 kemokinine duyarlı oldukları ve bunların suprabazal yerleşenlerinin LH benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterilmiştir (150). Mononükleer fagositer sistemde DH makrofajlar fenotip ontogeni transkripsiyon paterni epigenetik adaptasyon ve fonksiyonuna göre sınıflandırılır. FLT-3L bağımlı dendritik hücrelerin monositlerden köken alanlardan farklı olduğu ve monosit kökenlilerin periferik kandaki CD-14 (+) hücrelerden üretildiği bilinmektedir. Makrofaj genellikle bu hücrelere benzerken embriyolojik olarak yolk sak ve fetal

karaciğer ile LH benzeri orijini gösterir. (150). Yapılan bir çalışmada PDGF reseptörlerinin damar düz kasında ve endotel hücrelerinde var olduğu ve epidermisteki LH tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca yaraya infiltre olan makrofajlarda bu büyüme faktörünü eksprese etmişlerdir.

Son zamanlarda kök hücre temelli tedaviler cilt yenileme için kullanılmıştır ve deneysel olarak da birtakım hastalıklarda etkili olduğu gösterilmiştir. Parakrin sinyalizasyon, kök hücrelerin terapötik etkilerinin arkasındaki altta yatan ana mekanizmalardan biri olarak düşünülmüştür (32). MSC'lerin başlıca işlevlerinden birisi hasarlı dokuların onarımını desteklemektir. İnflamasyona cevap olarak, MSC'ler yaralı bölgelere doğru göç eder, farklı hücrelere (çoğunlukla fibroblastlar) differansiye olur ve sitokinler (yani, PGE2, GM-CSF, interlökin [IL] -1, RA, IL-7, IL-8, IL-10 ve IL-11 gibi), büyüme faktörleri ve kemokinler gibi doku rejenerasyonuna katılan moleküllerin salınması yoluyla çalışırlar. Ek olarak MKH'ler doku iyileşmesini pro-anjiyojenik, anti-fibrotik ve anti-apoptotik yollarla değiştirir. MKHler inflamatuvar fazda tümör nekroz faktörü- α üretimini ve düşük NK hücresi fonksiyonunu modifiye eder ve böylece interferon- γ aktivitesini düşürür. Bu etkilere kollajen üretiminde ve fibroziste bir düşüş eşlik eder. Yine ek olarak MSC'ler, antimikrobiyal proteinlerin salgılanması veya immün modüle edici faktörler yoluyla antimikrobiyal aktiviteler de gösterirler (34).

Örneklerde yara iyileşmesinde oksidatif stres durumunu belirlemek için NOS immunohistokimyası yapıldı. Önceki bir çalışmada flap modelinde dimetil arginin artışına bağlı damarsal endotelyal NO üretiminin ve buna bağlı oksidatif stresin iskemi ile arttığı görülmüştür (10). Artan nitrik oksit ve oksidatif stresin bazal kan akımını etkileyerek iyileşme alanında kanlanmayı azalttığı düşünülmüştür (11). Artan NOS ekspresyonunun dermisin intimasındaki mikrodamarlarda, saç foliküllerinde, ter bezlerinde ve inflamatuvar hücrelerde olduğu saptanmıştır ve L-name tedavisinin oksidatif stresi azalttığı görülmüştür. İskemiye bağlı endotelyal ve indüklenebilir NOS aktivitesinin artmasının mikrodolaşımın artması ile paralel olduğu ve endotel hücrelerinde membranlarda katlanmalar, şişmeler ve hücre kayıplarının eşliğinde gerçekleştiği bulunmuştur. (12). Diyabetik sıçan yara iyileşmesinde yağ kökenli mezenkimal kök hücre (YKMKH) kullanımının hidrojel ile uygulanması sonrasında CD31 belirteci ile gösterilmiş artmış yeni damar oluşumu ve Ki67 ile gösterilmiş artmış hücre proliferasyonu yara kenarında gösterilmiştir (35). Bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda eNOS ve iNOS

immünoreaktivitesinin kontrol ve sham grubunda hücre verilen gruplara göre anlamlı derecede artmış olması, özellikle PKMH+FLH verilen gruplarda ise anlamlı bir azalma olması bu hücrelerin yara onarımına PKMH+FLH tedavisinin yaralanma sonrası ortaya çıkan oksidatif stresi azaltarak iyileşmeye katkı sağladığını göstermektedir.

Örneklerde yara iyileşme sürecinde damarlanmanın incelenmesi için VEGF boyaması yapılmış olup yeni damarlanma, morfometrik analize ek olarak immunohistokimya ve H-Score ile gösterildi (36). Sıçan modeli deri flap canlılığında artmış süperoksit dismutaz aktivitesi ile VEGF düzeyi damarlanma ve oksidatif stres için anlamlı bulunmuştur (37).

Bir başka çalışmada tam kat deri greft modelinde sıçanlarda YKMKH uygulanarak dolaşım doppler kan akımı cihazı ile damarlanma ve VEGF ile oksidatif stres İNOS ile inflamasyon IL-1,IL-6,IL-10, TGF-b, TNF-alfa ile değerlendirilmiş kök hücre uygulamasının iNOS, IL1b ve TNF-alfayı anlamlı şekilde düşürdüğü, IL-10 ve Arg-1 ise daha sonra düşürdüğü anlaşılmıştır. Hem antiinflamatuvar etki hem de makrofaj polarizasyonunun greft iyileşmesinde kök hücre etkisini göstermiştir (38). Polarize makrofajlar tarafından yaratılan kültür ortamının kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin hücresel davranışlarına etkisinin incelendiği bir çalışmada makrofajlar tarafından koşullandırılmış besiyerinin fibronectin, Col 1 ve integrin b1 gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (16). Yine bir başka çalışmada adipoz doku kökenli kök hücrelerden salınan eksozomların hücre göçü, çoğalması ve kollajen sentezini doza bağımlı bir şekilde stimüle etmek için fibroblastlar tarafından içeri alınabileceği N-cadherin, siklin-1, PCNA ve kollajen I, III artışı ile gösterilmiştir. Histolojik analizler, yara iyileşmesinin erken safhasındaki eksozomların sistemik uygulamasıyla kollajen I ve III üretiminin arttığını, ancak geç evrede eksozomların skar oluşumunu azaltmak için kollajen ekspresyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir (17). Plasental mezenkimal kök hücrelerin (PKMH) dermal fibroblastta farklılaşma olasılığını ve kutanöz yara iyileşmesinde kullanılan PKMH'lerin potansiyelini araştırmak için yapılan bir çalışmada bağ doku büyüme faktörü indüksiyonundan sonra, PKMH'ler belirgin fibroblast morfolojisine dönüşerek, Vimentin, FSP-1, kollajen I, kollajen III ve Lamininin artışı göstermesi, dermal fibroblastlara spesifik proteinler ile desmin ifade etmeye başlaması, osteojenik ve adipogenik diferansiyasyon yeteneği azalma sergilemesi

PKMH'lerin deri yara iyileşmesinde potansiyel bir terapötik ajan olduğunu göstermiştir (18). Porokeratoz gelişiminin altında yatan mekanizmaları açıklamak için yapılan bir çalışmada lezyondan alınan örneklerde CD1a, langerin, Ki67, CD3, CD4, CD8, FOXP3 ve RANKL (nükleer faktör κB ligand reseptör aktivatörü) antikorları ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda epidermisdeki CD1a + Langerhans hücrelerinin sayısı azaldığı gözlenmiştir. Çeşitli lenfosit altkümeleri, Langerhans hücreleri ve dermal dendritik hücreler gibi immün hücrelerin dağılımındaki bu değişikliğin epidermal keratinizasyon bozukluğuyla karakterize olan porokeratozun patomekanizmalarında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür (19). Çalışmamıza ait örneklerde hücre çoğalmasını göstermek için immünohistokimyasal olarak PCNA immünoreaktivitesine baktığımızda yaralanmanın erken döneminde tüm gruplarda immünoreaktivitenin anlamlı olarak daha fazla olduğunu, hücre verilen gruplarda kontrol ve sham grubuyla karşılaştırıldığında çok daha anlamlı olduğunu her iki hücre tipinin birlikte verildiği gruplarda ise en anlamlı immünoreaktivite artışının olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar PKMH+FLH birlikte uygulamasının hücre çoğalmasını artırarak yara iyileşmesini olumlu etkilediğini düşündürmektedir.

Kullandığımız PKMH ve FLH, diyabetik ayak gibi kronik yaraların iyileşmesinde destekleyici tedavinin yapılmasına katkı sağladığı gösterildi. Kronik deri yaralarının tedavisinde kullanılmalarına yönelik katkı sağlayacak olan bu çalışmanın tedavi maliyetlerini azaltarak ve iyileşme süresini kısaltarak hastaların yaşam kalitesini arttıracakını düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmada amacımız; PKMHlerin ve bunlardan farklılaştırılan langerhans hücrelerinin diyabet oluşturulan deney hayvanlarında yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinin moleküler düzeyine etkisinin araştırılmasıydı.

Doku örnekleri 3. ve 7. günlerde alınarak yara iyileşmesinin erken ve geç dönem sonuçlarını görme şansımız oldu. Çalışma sonucunda deneysel diyabet modelinde PKMHleri ve farklılaştırılmış langerhans hücrelerinin yara iyileşmesine histomorfolojik ve immünohistokimyasal olarak olumlu katkı sunduğu görüldü.

Periferik kan mononükleer hücrelerin uygulanan protokol ile langerhans hücresi gibi özelleşmiş dendritik hücrelere diferansiye edilebildiğini gözlemledik.

Diferansiyasyon, çalışmamızda histolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda görüldü.

PKMHleri ve bunların langerhans hücrelerine diferansiye edilmesi bu yönde protokoller geliştirilmesi sayesinde; yara iyileşmesi araştırmaları, gen çalışmaları, deri ile ilişkili biyomateryal ve ilaçların klinik kullanım öncesi çalışmalarına da yardımcı olacaktır.

PKMHleri eldesi kolay ve etik sakıncaları olmaması nedeniyle klinik ve deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır. Ancak PKMHlerin stimülüs yokluğunda kültür ortamında proliferate olamaması deneysel çalışmalara kısıtlamalar getirmektedir.

PKMHlerinin farklandırılmış langerhans hücreleri ile birlikte kullanımında diyabet modelinde yara iyileşmesine etkisinin görülmesi bu hücresel ürünlerin bu alanda yeni tedavi modalitesi geliştirebileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Adegghate J, Nurulain S, Tekes K, et al. Novel biological therapies for the treatment of diabetic foot ulcers. *Expert Opin Biol Ther.* 2017 Aug;17(8):979-987.
2. Cao Y, Gang X, Sun C et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *J Diabetes Res.* 2017;2017:9328347.
3. Rodgers K, Jadhav SS. The application of mesenchymal stem cells to treat thermal and radiation burns. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018 Jan 1;123:75-81.
4. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, et al. CD34+ blood cells accelerate

vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res.* 2003 Jul-Aug;40(4):368-77.

5. Asai J, Takenaka H, Ichihashi K, et al. Successful treatment of diabetic gangrene with topical application of a mixture of peripheral blood mononuclear cells and basic fibroblast growth factor. *J Dermatol.* 2006 May;33(5):349-52.
6. Huang SM, Wu CS, Chao D, et al. High-glucose-cultivated peripheral blood mononuclear cells impaired keratinocyte function via reduced IL-22 expression: implications on impaired diabetic wound healing. *Exp Dermatol.* 2015 Aug;24(8):639-41.
7. Charles HM Thorne, Geoffrey C. Gurtner, Kevin Chung, et al. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, Wolters Kluwer 2013
8. Yu G, Li Y, Ye L, et al. Exogenous peripheral blood mononuclear cells affect the healing process of deep-degree burns. *Mol Med Rep.* 2017 Dec;16(6):8110-8122.
9. Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, et al. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep.* 2016 Jun 22;6:28538.
10. Aydemir Işıl, *Endometrium ve Kök Hücre*, 2016
11. *Diş Hekimi*,
12. Gribbe O, Lundeberg T, Samuelson UE, et al. Dexamethasone increases survival and attenuates induction of inducible nitric oxide synthase in experimental skin flaps. *Ann Plast Surg.* 1999 Feb;42(2):180-4.
13. Stojadinovic O, Yin N, Lehmann J, et al. Increased number of Langerhans cells in the epidermis of diabetic foot ulcers correlates with healing outcome. *Immunol Res.* 2013 Dec;57(1-3):222-8.
14. Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 3;18(7). pii: E1419.
15. Pierobon D, Raggi F, Cambieri I, et al. Regulation of Langerhans cell functions in a hypoxic environment. *J Mol Med (Berl).* 2016 Aug;94(8):943-55.
16. He XT, Li X, Yin Y, et al. The effects of conditioned media generated by polarized macrophages on the cellular behaviours of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2018 Feb;22(2):1302-1315.
17. Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose menseschymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep.* 2016 Sep 12;6:32993.

18. Yang WX, Ouyang X, Song YQ, et al. Connective tissue growth factor induced differentiation of placenta mesenchymal stem cell into dermal fibroblast. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2013 Jul;29(4):268-72.
19. Matsuyama K, Mizutani Y, Takahashi T, et al. Enhanced dendritic cells and regulatory T cells in the dermis of porokeratosis. *Arch Dermatol Res*. 2017 Nov;309(9):749-756.
20. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res*. 2017;58(1-2):81-94.
21. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, et al. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int*. 2015;2015:831095.
22. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, et al. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009 Nov;132(5):533-46.
23. Kasap Ş, Barutçu A, Güç H, et al. Effects of Keratinocytes Differentiated from Embryonic and Adipogenic Stem Cells on Wound Healing in a Diabetic Mouse Model. *Wounds*. 2017 Nov;29(11):297-305.
24. Vishnubalaji R, Manikandan M, Al-Nbaheen M, et al. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC Dev Biol*. 2012 Jan 27;12:7.
25. Formigli L, Paternostro F, Tani A, et al. MSCs seeded on bioengineered scaffolds improve skin wound healing in rats. *Wound Repair Regen*. 2015 Jan-Feb;23(1):115-23.
26. Monteiro, Betânia Souza, Faria, et al. Mesenchymal stem cell infusion on skin wound healing of dexamethasone immunosuppressed wistar rats. *Ciência Rural*, 46(10), 1824-1829. Epub July 21
27. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2581-7.
28. Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis*. 2014 Jan 1;10(1):29-37.
29. Sabapathy V, Sundaram B, Mankuzhy P, et al. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e93726.

30. Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am.* 2017 Feb;97(1):189-207.
31. Kerem H, Bali U, Sönmez E, et al. The cranially based contralateral nasolabial flap for reconstruction of paranasal and periorbital surgical defects. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014 May;67(5):655-61.
32. Wang PH, Huang BS, Horng HC, et al. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2017 Nov 21. pii: S1726-4901(17)30308-8.
33. Zhao R, Liang H, Clarke E, et al. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 11;17(12). pii: E2085. Review
34. Prodinge CM, Reichelt J, Bauer JW, et al. Current and Future Perspectives of Stem Cell Therapy in Dermatology. *Ann Dermatol.* 2017 Dec;29(6):667-687.
35. Kaisang L, Siyu W, Lijun F, et al. Adipose-derived stem cells seeded in Pluronic F-127 hydrogel promotes diabetic wound healing. *J Surg Res.* 2017 Sep;217:63-74.
36. Yucel E, Alagoz MS, Eren GG, et al. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Increase Viability of Composite Grafts. *J Craniofac Surg.* 2016 Jul;27(5):1354-60.
37. Wang LR, Cai LY, Lin DS, et al. Effect of Electroacupuncture at The Zusanli Point (Stomach-36) on Dorsal Random Pattern Skin Flap Survival in a Rat Model. *Dermatol Surg.* 2017 Oct;43(10):1213-1220.
38. Wang J, Hao H, Huang H, et al. The Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Full-Thickness Skin Grafts. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1464725.
39. Gurtner, Geoffrey C. Wound Healing: Normal And Abnormal. In: Charles H.Thorne, et al. *Grabb and Smith's Plastic Surgery 6th Edition.* Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins, 2007, s. 15-22. (§1)
40. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North.Am.* 1997, Cilt 77, 509-28. (§2)
41. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: An overview. *Plast. Recons. Surg.* 2006, Cilt 117, 1-31. (§3)
42. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast.Recons. Surg.* 2006, Cilt 117 (Suppl), 12-34 (§4)
43. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1219-22. Review. (§6)
44. *Indian J Plast Surg.* 2012 May;45(2):220-8. doi: 10.4103/0970-0358.101282. Cellular events and biomarkers of wound healing. Shah JM, Omar E,

Pai DR, Sood S. (§9)

45. Wound repair and regeneration. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21. Review (§11)
46. Ferner H. Sobotta İnsan Anatomi Atlası. 3. Cilt. Berlin 1974. pp 191 (§12)
47. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Diegelmann RF, Evans MC. *Front Biosci*. 2004 Jan 1;9:283-9. Review (§14)
48. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: Histology and physiology of wound healing. *Clin Plastic Surg*. 2012;39:85-97. (§15)
49. Hom DB. Wound healing in relation to scarring. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 1998;6:11. (§16)
50. Charles K. Management of acute wounds. *Clin Plastic Surg* 2007;34(4): 685-95 (§17)
51. Krizek TJ, Harries RHC. Biology and tissue injury and repair. In: Georgiade Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery. 3. Edition Ed: Georgiade GS, Williams and Wilkins 1997;1-9. (§18)
52. Hunt TK, Knighton DR, Goodson WH. Yara iyileşmesi Çev: Olcay I. Çağdaş Cerrahi Tanı ve Tedavi Ed. Hikmet Akgül 1985;1:125-38. (§19)
53. Barchet W, Krug A, Cella M, et al. Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. *Eur J Immunol*. 2005 Jan;35(1):236-42.
54. Joan L. Monaco W. Thomas Lawrence. Acute wound healing. *Clinics in plastic surgery*, 2003;30(1):1-12 (§22)
55. Paul J. Leahy, W. Thomas Lawrence. Biologic Enhancement of Wound Healing. *Clin Plastic Surg* 2007; 34(4): 659-671 (§23)
56. del Hoyo GM, Martín P, Vargas HH, et al. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*. 2002 Feb 28;415(6875):1043-7. Erratum in: *Nature*. 2004 May 13;429(6988):205.
57. MacDonald AS, Straw AD, Dalton NM, et al. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. *J Immunol*. 2002 Jan 15;168(2):537-40.
58. Rook JM, Hasan W, McCarson KE. Temporal effects of topical morphine application on cutaneous wound healing. *Anesthesiology* 2008; 109: 130-6. (§24)
59. Browder W, Williams D, Lucore P. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*. 1988; 104:224-229. (§25)
60. Akhavan M.A, Sivakumar B., Palelog E.M., Kang N. Angiogenesis and plastic surgery *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008;61(12): 1425–37. (§27)

61. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair *The American Journal of Surgery* 2002; 183(7): 406–412. (§28)
62. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):609-18. Epub 2006 Jul 10. Review.
63. Elena Tsourdi, Andreas Barthel, Hannes Rietzsch, Andreas Reichel, and Stefan R. Bornstein¹, *Current Aspects in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Wounds in Diabetes Mellitus*, BioMed Research International, 2013 (§34)
64. Lorenz HP, Longaker MT. Wound healing: Repair biology and wound and scar treatment. In: *Mathes Plastic Surgery 2. Edition*. Ed: Mathes SJ. Saunder Elsevier 2006; 1: 209-234. (§33)
65. Shortman K, Heath WR. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):18-31.
66. Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, et al. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast. *Am J Pathol*. 2003; 162 (1): 303-312.63 (§35)
67. Komesu MC, Tanga MB, Buttros KR, et al. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*. 2004; 11: 63-67. (§36)
68. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*, Harold Brem and Marjana Tomic-Canic, Volume 117 Number 5, 2007 (§37)
69. Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pr*. 2005; 67: 3-21. (§38)
70. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, et al. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001 Nov;31(11):3388-93.
71. Spanheimer RG. Direct inhibition of collagen production in vitro by diabetic rat serum. *Metabolis* 1988; 37(5): 479-485. (§39)
72. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, et al. Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. *J Clin Invest*. 1985; 76: 2323-2329 (§40)
73. Ovali E, Dikmen T, Sonmez M, et al. Active immunotherapy for cancer patients using tumor lysate pulsed dendritic cell vaccine: a safety study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2007 Jun;26(2):209-14.
74. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes* 1988; 37: 371-376. (§41)

75. *Andreassen TT, Seyer-Hansen K, Oxlund H. Biomechanical changes in connective tissues induced by experimental diabetes. Acta Endocrinol (Copenh).1981; 98(3):432-6. (§42)*
76. *Romani N, Holzmann S, Tripp CH, et al. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. APMIS. 2003 Jul-Aug;111(7-8):725-40. Review.*
77. *Seifter E, Rettura G, Padawer J, et al. Impaired wound healing in streptozotocin diabetes. Prevention by supplemental vitamin A. Ann Surg. 1981;194(1):42-50. (§43)*
78. *Hamlin CR, Kohn RR, Luschin JH. Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus. Diabetes. 1975; 24: 902. (§44)*
79. *Steinman L, Tzehoval E, Cohen IR, et al. Sequential interaction of macrophages, initiator T lymphocytes and recruited T lymphocytes in a cell-mediated immune response to soluble antigen. Eur J Immunol. 1978 Jan;8(1):29-34.*
80. *Münz C, Dao T, Ferlazzo G, et al. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. Blood. 2005 Jan 1;105(1):266-73.*
81. *Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S, et al. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. Int Immunol. 2004 Jun;16(6):877-87. Epub 2004 Apr 27.*
82. *Ratzinger G, Baggers J, de Cos MA, et al. Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. J Immunol. 2004 Aug 15;173(4):2780-91. Erratum in: J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3818.*
83. *Moser M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? Immunity. 2003 Jul;19(1):5-8. Review.*
84. *Brière F, Bendriss-Vermare N, Delale T, et al. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. Hum Immunol. 2002 Dec;63(12):1081-93. Review.*
85. *Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. Hum Immunol. 2002 Dec;63(12):1133-48. Review.*
86. *Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol.*

2000 Dec 1;165(11):6037-46.

87. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 1999 Aug;5(8):919-23.
88. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999 Jun 11;284(5421):1835-7.
89. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev*. 1997 Apr;156:25-37. Review.
90. Summers KL, Hock BD, McKenzie JL, et al Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):285-95.
91. Lindhout E, Vissers JL, Hartgers FC, et al. The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes. *J Immunol*. 2001 Mar 1;166(5):3284-9.
92. Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, et al. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*. 2000 Aug 1;165(3):1259-65.
93. Shi G, Partida-Sánchez S, Misra RS, et al. Identification of an alternative G α q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. *J Exp Med*. 2007 Oct 29;204(11):2705-18. Epub 2007 Oct 15.
94. Aliberti J, Viola JP, Vieira-de-Abreu A, et al. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol*. 2003 Jun 1;170(11):5349-53.
95. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med*. 1999 Nov;5(11):1249-55.
96. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52. Review. PubMed PMID: 9521319.
97. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol*. 1998 Aug 1;161(3):1083-6.
98. Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, et al. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol*.

1998 Sep 15;161(6):3096-102.

99. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):617-28. Review.
100. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):769-79.
101. Weiss JM, Renkl AC, Maier CS, et al. Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes. *J Exp Med.* 2001 Nov 5;194(9):1219-29.
102. Qu C, Edwards EW, Tacke F, et al. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med.* 2004 Nov 15;200(10):1231-41.
103. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med.* 1999 Feb 1;189(3):451-60.
104. Ngo VN, Tang HL, Cyster JG. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med.* 1998 Jul 6;188(1):181-91.
105. Matsue H, Takashima A. Apoptosis in dendritic cell biology. *J Dermatol Sci.* 1999 Jul;20(3):159-71. Review.
106. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002 Sep;23(9):445-9.
107. Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.* 2005 Feb;6(2):163-70.
108. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001 Nov;1(2):135-45. Review.
109. Williams MA, Cheadle C, Watkins T, et al. TLR2 and TLR4 as Potential Biomarkers of Environmental Particulate Matter Exposed Human Myeloid Dendritic Cells. *Biomark Insights.* 2007 May 30;2:226-40.
110. Barbara Young Geraldine O'DowdPhillip Woodford. *Wheater's Functional Histology.* Churchill Livingstone. November 2013
111. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005

Apr;22(4):359-70. Review.

112. Hennessey PJ, Ford EG, Black CT, et al. Wound collagenase activity correlates directly with collagen glycosylation in diabetic rats. *J Pediatr Surg.*1990;25(1):75-78. (§45)
113. Andreassen TT, Oxlund H. The influence of experimental diabetes and insulin treatments on the biomechanical properties of rat skin incisional wounds. *Acta Chir Scand.* 1987; 153:405-409. (§46)
114. İrer SV, Alper G. Deneysel diyabet modelleri. *Turk Klinik Biyokimya Derg* 2004;2:127-36. (§49)
115. Bliss M. *The Discovery of Insulin.* 25. edition. Chicago: University of Chicago Press, 2007. (§50)
116. Szhudelsky T. The mechanism of alloxan and STZ action in beta cells of rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46. (§52)
117. Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, Kirkpatrick J, McLetchie NG. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. *J Physiol* 1944;103:233- 43. (§53)
118. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 1963;29:91-8. (§54)
119. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51:216-26. (§55)
120. Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus physiology and pathology. *J Surg Res* 1983;35:433-60. (§56)
121. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998;47:50-6. (§58)
122. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 1996;52:344-7. (§60)
123. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96. Review.
124. Leung JY, Kwok EW, Liu GY, et al. Attenuated alpha-adrenoceptor-mediated arterial and venous constrictions in rat models of diabetes. *Eur J Pharmacol* 2010;642:128-33. (§82)
125. Dash SN1, Dash NR, Guru B, et al. Towards reaching the target: clinical application of mesenchymal stem cells for diabetic foot ulcers. *Rejuvenation*

Res. 2014 Feb;17(1):40-53.

126. Zeng X, Tang Y, Hu K, et al. Three-week topical treatment with placenta-derived mesenchymal stem cells hydrogel in a patient with diabetic foot ulcer: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Dec;96(51):e9212.
127. Kato J, Kamiya H, Himeno T, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats. *J Diabetes Complications*. 2014 Sep-Oct;28(5):588-95.
128. O'Loughlin A, Kulkarni M, Creane M, et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2588-94
129. de Mayo T, Conget P, Becerra-Bayona S, et al. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. *PLoS One*. 2017 Jun 8;12(6):e0177533.
130. Shi R, Jin Y, Cao C, et al. Localization of human adipose-derived stem cells and their effect in repair of diabetic foot ulcers in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Oct 22;7(1):155.
131. Wan J, Cai Q, Liu Y. Effect of different transplantations with bone-marrow derived mesenchymal stem cells on diabetic foot ulcers in rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2013 Apr;38(4):347-55.
132. Yanez DA, Lacher RK, Vidyarthi A, et al. The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflugers Arch*. 2017 Apr;469(3-4):455-463.
133. Nuutila K, Singh M, Kruse C, et al. Wound Healing from Dermal Grafts Containing CD34+ Cells Is Comparable to Wound Healing with Split-Thickness Skin Micrografts. *Plast Reconstr Surg*. 2017 Aug;140(2):306-314.
134. Kaplan DH. Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells. *Nat Immunol*. 2017 Sep 19;18(10):1068-1075.
135. West HC, Bennett CL. Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. *Front Immunol*. 2018 Jan 5;8:1941.
136. Kosten IJ, van de Ven R, Thon M, et al. Comparative phenotypic and functional analysis of migratory dendritic cell subsets from human oral mucosa and skin. *PLoS One*. 2017 Jul 13;12(7):e0180333.
137. Lindenberg JJ, Oosterhoff D, Sombroek CC, et al. IL-10 conditioning of human skin affects the distribution of migratory dendritic cell subsets and functional T cell

- differentiation. *PLoS One*. 2013 Jul 18;8(7):e70237.
138. Basiouny HS, Salama NM, Maadawi ZM, et al. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on healing of induced full-thickness skin wounds in albino rat. *Int J Stem Cells*. 2013 May;6(1):12-2
 139. Chen M, Sun X, Jiang R, et al. Role of MEF feeder cells in direct reprogramming of mousetail-tip fibroblasts. *Cell Biol Int*. 2009 Dec;33(12):1268-73.
 140. Nakagawa E, Sakimoto T, Inada N, et al. [Histopathological study of lattice corneal dystrophy with L 527 R mutation of transforming growth factor-beta induced gene]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2004 Feb;108(2):118-23.
 141. Lönnqvist S, Briheim K, Kratz G. Non-occlusive topical exposure of human skin *in vitro* as model for cytotoxicity testing of irritant compounds. *Toxicol Mech Methods*. 2016 Feb;26(2):82-7.
 142. Denman PK, McElwain DL, Harkin DG, et al. Mathematical modelling of aerosolised skin grafts incorporating keratinocyte clonal subtypes. *Bull Math Biol*. 2007 Jan;69(1):157-79.
 143. Motegi SI, Ishikawa O. Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *J Dermatol Sci*. 2017 May;86(2):83-89.
 144. Strong AL, Neumeister MW, Levi B. Stem Cells and Tissue Engineering: Regeneration of the Skin and Its Contents. *Clin Plast Surg*. 2017 Jul;44(3):635-650.
 145. Uchiyama A, Motegi SI, Sekiguchi A, et al. Mesenchymal stem cells-derived MFG-E8 accelerates diabetic cutaneous wound healing. *J Dermatol Sci*. 2017 Jun;86(3):187-197.
 146. Salvolini E, Lucarini G, Zizzi A, et al. Human skin-derived mesenchymal stem cells as a source of VEGF and nitric oxide. *Arch Dermatol Res*. 2010 Jul;302(5):367-74.
 147. Zhou SB, Zhang GY, Xie Y, et al. Autologous Stem Cell Transplantation Promotes Mechanical Stretch Induced Skin Regeneration: A Randomized Phase I/II Clinical Trial. *EBioMedicine*. 2016 Nov;13:356-364.
 148. Centanni JM, Straseski JA, Wicks A, et al. StrataGraft skin substitute is well-tolerated and is not acutely immunogenic in patients with traumatic wounds: results from a prospective, randomized, controlled dose escalation trial. *Ann Surg*. 2011 Apr;253(4):672-83.
 149. Juhász I, Simon M Jr, Herlyn M, et al. Repopulation of Langerhans cells during

- wound healing in an experimental human skin/SCID mouse model. *Immunol Lett.* 1996 Sep;52(2-3):125-8.
150. Lutz MB, Strobl H, Schuler G, et al. GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family. *Front Immunol.* 2017 Oct 23;8:1388.
151. Schaerli P, Willmann K, Ebert LM, et al. Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity.* 2005 Sep;23(3):331-42.
152. Bacci S, Defraia B, Cinci L, et al. Immunohistochemical analysis of dendritic cells in skin lesions: correlations with survival time. *Forensic Sci Int.* 2014 Nov;244:179-85.
153. Akdis M, Palomares O, van de Veen W et al (2012) TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 129:1438–1449, quiz 1450–1431
154. Crotty S (2011) Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29:621–663
155. Tan C, Gery I (2012) The unique features of Th9 cells and their products. *Crit Rev Immunol*
156. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T et al (2008) Regulatory T cells and immune tolerance.
157. Hirahara K, Poholek A, Vahedi G et al (2013) Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol* 131:1276–1287
158. Karaaslan O, Sonmez E, Kankaya Y, et al. Monitorization of asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in an experimental ischemia-reperfusion flap model: a preliminary report. *J Reconstr Microsurg.* 2013 Jul;29(6):417-20.
159. Gribbe O, Samuelson UE, Wiklund NP. Effects of nitric oxide synthase inhibition on blood flow and survival in experimental skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007;60(3):287-93.



