



T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ
ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ASİDİK DERİ
YANIKLARINDA UYGULANAN EKSOZOM TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Arş. Gör. Dr. Berker UÇAR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğretim Üyesi Salih KAVUNCU

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK

CERRAHİ ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR 2025

T.C.

AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ASİDİK DERİ
YANIKLARINDA UYGULANAN EKSOZOM TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. BERKER UÇAR

DANIŞMAN

Dr. Öğretim Üyesi SALİH KAVUNCU

**Bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 25.TUS.009 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

2025–AFYONKARAHİSAR

KABUL ONAY SAYFASI

T.C.

AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı: Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Asidik Deri Yanıklarında Uygulanan Eksozom Tedavisinin Etkinliğinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Arş. Gör. Dr. Berker UÇAR

Tez Savunma Tarihi: 23.12.2025

Tez Kabul Tarihi: 23.12.2025

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Salih KAVUNCU

İş bu çalışma jürimiz tarafından PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Salih KAVUNCU

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Arif YILMAZ

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Necip BECİT

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimde tecrübelerini benimle paylaşan, desteklerini esirgemeyen ve yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM ve Dr. Öğr. Üyesi Salih KAVUNCU'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda desteğiyle hep yanımda olan, yardımseverliği ve bilimsel bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Mahmud Mustafa ÖZKUT ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mustafa Volkan YAPRAKÇI'ya teşekkür ederim.

Bazen çok zorlandığım bazen de çok eğlendiğim asistanlık sürecimde beni yarı yolda bırakmayan, dertlerimi kendi derdi gibi görüp çözüm arayan, hem mesleki hem insani anlamda bana çok şey katan değerli meslektaşım Dr. Kaan DERİNDERE'ye teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Arş. Gör. Dr. BERKER UÇAR

2025

RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ASİDİK DERİ YANIKLARINDA UYGULANAN EKSOZOM TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Arş. Gör. Dr. Berker UÇAR

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik,

Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık Tezi

2025

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Salih KAVUNCU

ÖZET

Giriş ve Amaç: Bu çalışmada ratlarda hidroflorik asit (HF) ile oluşturulan kimyasal deri yanıklarında adipoz kökenli mezenkimal hücre kaynaklı eksozomların (ADSC-Exo) erken doku iyileşmesine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. HF yanıkları derin penetrasyonu, progresif nekroz oluşturmaları ve mevcut tedavilerin çoğunda sınırlı etkinlik görülmesi nedeniyle klinik açıdan zorlu lezyonlardır. Güncel nötralizan ajanlar (kalsiyum glukonat ve magnezyum sülfat) lokal toksisiteyi azaltmakla birlikte, doku bütünlüğünü hızla geri kazandıran, inflamasyonu kontrol eden ve apoptozu sınırlayan güçlü bir biyoterapötik seçenek halen bulunamamıştır. Çalışmanın ana hipotezi, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve rejeneratif özellikler taşıyan adipoz kaynaklı eksozomların HF yanığında iyileşmeyi anlamlı biçimde hızlandırabileceğidir.

Gereç ve Yöntemler: Çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nde gerçekleştirilmiştir. Yaşları 6–8 hafta arasında değişen, 250–350 g ağırlığında toplam 40 rat, her grupta on hayvan olacak şekilde dört gruba ayrılmıştır: Grup 1 (Sham), Grup 2 (Magnezyum Sülfat), Grup 3 (Kalsiyum glukonat), Grup 4 (ADSC-Exo). Tüm hayvanlarda sırt bölgesine standart hacimde %37 HF uygulanarak derin kimyasal yanık modeli oluşturulmuştur. Anestezi için 87 mg/kg ketamin ve 13 mg/kg ksilazin kullanılmıştır. Makroskopik ölçümler her gün yapılmış; 1., 3. ve 7. günlerde doku biyopsileri alınarak histopatolojik, immünohistokimyasal (PCNA, VEGF, TNF- α) ve apoptotik değerlendirmeler yapılmıştır.

Bulgular: Başlangıç yanık alanları tüm gruplarda benzer bulunmuştur. Eksozom uygulanan Grup 4'te yanık, eritem ve nekrotik doku alanları diğer gruplara göre erken dönemde daha hızlı küçülmüş ve iyileşme eğilimi belirgin şekilde öne çıkmıştır. Histolojik incelemelerde 7. günde Grup 4'te epitel bütünlüğünün yeniden oluştuğu, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve hemorajinin azaldığı, hipodermal bağ dokuda daha düzenli bir mimari geliştiği görülmüştür. Apoptoz analizlerinde ADSC-Exo grubunda hem 3. hem 7. günlerde apoptotik hücre sayısı diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Kalsiyum glukonat ve magnezyum sülfat uygulanan Grup 2 ve Grup 3'te iyileşme izlenmekle

birlikte, eksozom tedavisinin sağladığı hız ve doku bütünlüğündeki toparlanma düzeyine ulaşamamıştır.

Sonuç: ADSC-Exo tedavisi, HF kimyasal yanıklarında inflamasyonu azaltarak, apoptozu sınırlayarak ve epitelizasyonu hızlandırarak iyileşmeyi belirgin biçimde desteklemiştir. Bu çalışma eksozomların kimyasal yanık yönetiminde yeni ve etkili bir biyoterapötik ajan olarak kullanılmaya aday olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hidroflorik asit, Kimyasal yanık, Eksozom, ADSC-Exo, Doku iyileşmesi, Apoptoz



INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF EXOSOME THERAPY IN EXPERIMENTALLY INDUCED ACIDIC SKIN BURNS IN RATS

Arş. Gör. Dr. Berker UÇAR

Afyonkarahisar Health Sciences University Faculty of Medicine
Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery Medical
Specialization Thesis

2025

Advisor: Dr. Öğretim Üyesi Salih KAVUNCU

ABSTRACT

Introduction and aim: This study aimed to investigate the effects of adipose-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes (ADSC-Exo) on early tissue healing in a rat model of hydrofluoric acid (HF)-induced chemical skin burns. HF burns represent a major clinical challenge due to their deep penetration, progressive necrosis, and the limited efficacy of current treatment options. Although commonly used neutralizing agents (calcium gluconate and magnesium sulfate) can reduce local toxicity, there is still no potent biotherapeutic capable of rapidly restoring tissue integrity, controlling inflammation, and limiting apoptosis. The central hypothesis of this study was that ADSC-Exo, with their anti-inflammatory, anti-apoptotic, and regenerative properties, would significantly accelerate healing in HF burns.

Materials and Methods: The study was conducted at the Afyon Kocatepe University Experimental Research Unit. A total of 40 rats aged 6-8 weeks and weighing 250–350 g were randomly allocated into four groups of ten animals each: Group 1 (Sham), Group 2 (Magnesium Sulfate), Group 3 (Calcium gluconate), and Group 4 (ADSC-Exo). A standardized volume of 37% HF was applied to the dorsal skin of all animals to induce a deep chemical burn model. Anesthesia was achieved with 87 mg/kg ketamine and 13 mg/kg xylazine. Macroscopic measurements were recorded daily, and tissue biopsies were obtained on days 1, 3, and 7 for histopathological, immunohistochemical (PCNA, VEGF, TNF- α), and apoptotic assessments.

Results: Baseline burn areas were similar among all groups. In the ADSC-Exo group (Group 4), burn, erythema, and necrotic tissue areas decreased more rapidly compared with the other groups, demonstrating an early and pronounced healing pattern. Histological evaluation on day 7 showed restoration of epithelial integrity, reduced inflammatory cell infiltration and hemorrhage, and a more organized hypodermal connective tissue structure in the ADSC-Exo group. Apoptosis analysis revealed significantly lower apoptotic cell counts on both days 3 and 7 in Group 4 compared with

the other treatment groups. Although the calcium gluconate and magnesium sulfate groups showed improvement, they did not achieve the accelerated and comprehensive tissue recovery observed with ADSC-Exo.

Conclusion: ADSC-Exo therapy markedly enhanced healing in HF-induced chemical burns by reducing inflammation, limiting apoptosis, and promoting epithelialization. These findings suggest that exosomes represent a promising and effective novel biotherapeutic option in the management of chemical burns.

Keywords: Hydrofluoric acid, Chemical burn, Exosome, ADSC-Exo, Tissue healing, Apoptosis



İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
GRAFİKLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Derinin Yapısı	2
2.1.1. Epidermis	2
2.1.2. Bazal Hücreler ve Bazal Membran	5
2.1.3. Dermis	6
2.1.4. Deri Ekleri	8
2.2. Derinin Görevleri	9
2.3. Yara İyileşmesinin Evrensel Süreçleri	10
2.3.1. Hemostaz Fazı	10
2.3.2. İnflamatuvar Faz	10
2.3.3. Proliferatif Faz	11
2.3.4. Matürasyon ve Yeniden Şekillenme (Remodeling) Fazı	11
2.4. Yara İyileşmesi Şekilleri	11
2.5. Yanık	12
2.5.1. Tarihçe ve İnsidans	12

2.5.2 Yanıkların Tanımı ve Sınıflandırılması	13
2.5.3. Yanık Zonları	16
2.5.4. Yanık Patofizyolojisi	18
2.5.5. Yanık Tedavisi	18
2.6. Kimyasal Yanık	20
2.6.1. Genel Bakış	20
2.6.2. Kimyasal Yanıkların Özellikleri	20
2.6.3. Asit ve Alkali	21
2.6.4. Hidroflorik Asit (HF)	21
2.6.4.1. Tanım, Üretim ve Kimyasal Özellikler	21
2.6.4.2. Toksisite, Klinik Etkiler ve Güvenlik	22
2.6.4.3. HF Maruziyetinde Tedavi Yaklaşımları	22
2.7. Eksozom	23
2.7.1. Eksozom Biyosentezi	23
2.7.2. Eksozomların Fonksiyonları	25
2.7.2.1 Adipoz Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Fonksiyonları	25
2.7.3. Eksozom İzolasyon Metodları	28
2.7.3.1. Ultrasantrifüjleme	28
2.7.3.2. Polimer Çöktürme	29
2.7.3.3. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC)	29
2.7.3.4. Ultrafiltrasyon	30
2.7.3.5. İmmünoafinitif Kromatografi (IAC)	30
2.7.3.6. Diğer Teknikler	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Deney Hayvanları	32
3.2. Kullanılan Malzemeler	32
3.3. Yöntem	36
3.3.1. Cerrahi Yöntem	36
3.3.2. Histopatolojik İnceleme	40
3.3.3. İmmünohistokimya	41
3.3.4. Tunel	41
3.4. İstatistik	42
4. BULGULAR	43
4.1. Makroskopik Bulgular	43
4.2. Histopatolojik Bulgular	64
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	71

5.	TARTIşMA.....	81
6.	SONUÇLAR.....	89
7.	KAYNAKLAR.....	90



TABLÖLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Grup 1 ratların yanık alanı verileri (cm ²).....	53
Tablo 2. Grup 2 ratların yanık alanı verileri (cm ²).....	53
Tablo 3. Grup 3 ratların yanık alanı verileri (cm ²).....	54
Tablo 4. Grup 4 ratların yanık alanı verileri (cm ²).....	55
Tablo 5. Deri biyopsilerinin gruplararası hematoxilen-eosin boyama sonuçları istatistiksel analizi	76
Tablo 6. Deri biyopsilerinin gruplararası TUNEL boyama sonuçları istatistiksel analizi	79
Tablo 7. Deri biyopsilerinin gruplararası TNF- α antikorlu immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi.....	83
Tablo 8. Deri biyopsilerinin gruplararası VEGF antikorlu immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi	86
Tablo 9. Deri biyopsilerinin gruplararası PCNA antikorlu immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Derinin tabakaları ve içerdği yapılar	12
Şekil 2. Epidermisin katmanları	13
Şekil 3. Histolojik kesitte stratum granulosum	14
Şekil 4. Dermo-epidermal bileşkenin histolojik kesiti	15
Şekil 5. Derinin katmanları ve elemanları	16
Şekil 6. Pilosebase Ünite	18
Şekil 7. Yara iyileşmesinin şekilleri	21
Şekil 8. Yanık derecelendirmesi	23
Şekil 9. Wallace'ın 9'lar kuralı	23
Şekil 10. Lund ve Browder'ın şeması	24
Şekil 11. Yanık zonları	25
Şekil 12. Eksozom biyosentezi	32
Şekil 13. Mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların fonksiyonları	34
Şekil 14. Eksozomların yara iyileşmesinde dinamik düzenleyici rolü	36

GRAFİKLER LİSTESİ

Sayfa

Grafik 1. Gruplara göre eritem alanı değişimi	55
Grafik 2. Gruplara göre nekroz alanı değişimi	56
Grafik 3. Gruplara göre yanık alanı değişimi	56
Grafik 4. 0. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	57
Grafik 5. 0. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	58
Grafik 6. 0. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	58
Grafik 7. 24. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	59
Grafik 8. 24. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	60
Grafik 9. 24. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	60
Grafik 10. 48. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	61
Grafik 11. 48. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	62
Grafik 12. 48. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	62
Grafik 13. 72. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	63
Grafik 14. 72. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	64
Grafik 15. 72. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	64
Grafik 16. 96. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	65
Grafik 17. 120. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	66
Grafik 18. 144. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	66
Grafik 19. 96. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	67
Grafik 20. 120. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	67
Grafik 21. 144. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	68
Grafik 22. 96. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	68
Grafik 23. 120. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	69
Grafik 24. 144. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	69
Grafik 25. 168. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması	70
Grafik 26. 168. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması	71
Grafik 27. 168. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması	71

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa

Resim 1-2. Hayvan üzerinde yanık alanlarının oluşturulması ve oluşan yanık alanının görüntüsü.....	46
Resim 3. Yanık alanının her bir kenarına yapılan subkütan ilaç enjeksiyonları.....	46
Resim 4-6. Grup 1'in sıfırıncı saatte eritem, nekroz ve yanık alanı (cm ²) hesaplarından örnekler	47
Resim 7. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait hematoksilen-eosin boyamaları.....	75
Resim 8. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait TUNEL boyamaları	77
Resim 9. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait TNF- α boyamaları	82
Resim 10. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait VEGF boyamaları	85
Resim 11. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait PCNA boyamaları	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP : Adenozin trifosfat
cm² : Santimetrekare
CO₂ : Karbondioksit
CXCL4 : Platelet faktör-4
DMEM-LG : Dulbecco's Modified Eagle Medium – Low Glucose
DMSO : Dimetilsülfoksit
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ECM : Ekstrasellüler Matrix (Hücre dışı matriks)
E : Eritem alanı
FBS : Fetal Bovine Serum
g : Gram
HF : Hidroflorik asit
H&E : Hematoksilen-eozin
IL : Interlökin
KCl : Potasyum klorür
kg : Kilogram
L : Litre
mg : Miligram
mL : Mililitre
mm : Milimetre
MKH (MSC) : Mezenkimal kök hücre
miRNA : Mikro Ribonükleik Asit
N : Nekroz alanı
PBS : Fosfat tamponlu solüsyon (Phosphate Buffered Saline)
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
S : Sham
SPSS : Statistical Package for the Social Sciences
TGF-β : Transforming Growth Factor–Beta
TNF-α : Tümör nekroz faktörü alfa
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
μL : Mikrolitre
μm : Mikrometre
% : Yüzde
x g : Santrifüj kuvveti (relative centrifugal force)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yanık yaralanmaları, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, sağlık sistemlerinin önemli bir bölümünü meşgul etmeye devam eden ciddi bir halk sağlığı problemidir (1). Dünya genelindeki epidemiyolojik veriler, her gün on binlerce kişinin tıbbi müdahale gerektiren yanıklarla karşılaştığını ve bu durumun yılda milyonlarca bireyi etkilediğini ortaya koymaktadır (2). Sıklıkla alev ve sıcak temas yaralanmaları ilk sırada yer alsa da; kimyasallara, elektrik akımına veya endüstriyel süreçlere bağlı yanıklar da morbidite ve mortalite açısından benzer derecede önem taşımaktadır. Yanık sonrası oluşan izlerin görünür olması, hastaların psikososyal durumunu ve toplumsal adaptasyon sürecini olumsuz etkileyerek tedavinin yalnızca fiziksel değil, aynı zamanda psikolojik yönünün de önemini göstermektedir (3).

Kimyasal ajanlarla oluşan yanıklar, özellikle ev ortamlarında ve iş yerlerinde kolay ulaşılabilir maddelere maruz kalınması nedeniyle ayrı bir risk grubu oluşturmaktadır (4). Ev içindeki temizlik ürünleri çoğu zaman çocukların erişebileceği konumlarda bulunabilmekte; iş yerlerinde ise bireyler kimi zaman farkında olmadan yüksek toksisiteye sahip maddelerle temas edebilmektedir. Bu tür maruziyetler yalnızca lokal doku hasarıyla sınırlı kalmayıp sistemik toksisiteye, elektrolit dengesizliklerine ve yaşamı tehdit edebilen komplikasyonlara yol açabilmektedir (5).

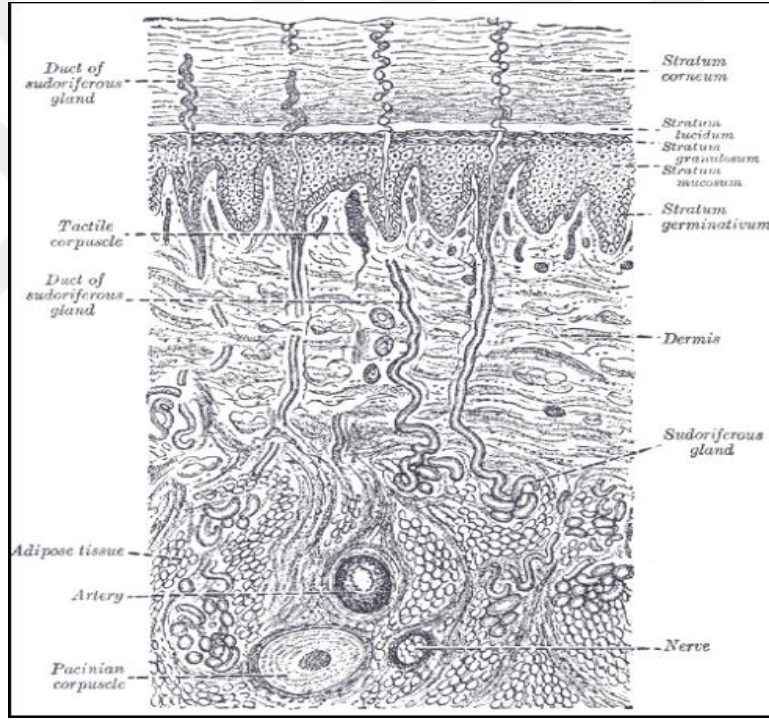
Eksozomlar, hemen tüm hücre tipleri tarafından salınan ve hücreler arası biyokimyasal iletişimin gerçekleşmesinde kritik rol oynayan nano boyutlu veziküllerdir (6). İçerdikleri proteinler, lipidler ve genetik materyaller aracılığıyla hedef hücrelerin davranışlarını modüle edebilme özellikleri, onları doku yenilenmesi ve yara iyileşmesi süreçlerinde biyolojik açıdan son derece değerli bir konuma taşımaktadır. Mevcut çalışmalar, eksozomların inflamasyonun düzenlenmesinden damar oluşumunun desteklenmesine, fibroblast aktivitesinin modülasyonundan yeniden epitelizasyonun hızlandırılmasına kadar yara iyileşmesinin pek çok aşamasına etki ettiğini göstermektedir (7). Bu bulgular, yanık yaraları gibi karmaşık iyileşme süreçleri gerektiren durumlarda eksozomların terapötik potansiyelini güçlü biçimde desteklemektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, kimyasal yanık modeli oluşturulan deri dokusunda adipoz kökenli mezenkimal hücrelerden elde edilen eksozomların erken dönem iyileşme üzerine etkilerini değerlendirmektir. Ayrıca bu etkinliğin mevcut konvansiyonel yaklaşımlarla karşılaştırılmasıyla literatüre yeni veriler sunulması hedeflenmiştir. Böylelikle kimyasal yanıkların tedavisinde eksozom temelli biyoterapötiklerin klinik uygulamalara uyarlanabilirliği konusunda bilimsel bir temel oluşturulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı

Deri, vücudu dış çevreyle temas halinde koruyan en geniş organ olup çok katmanlı ve yüksek derecede uzmanlaşmış bir bariyer sistemi olarak görev yapar (8). Yapısal olarak epidermis, dermis ve subkutan yağ dokusu olmak üzere üç temel bölümden oluşur (9). Bu tabakalar, mekanik travmalara, mikroorganizmalara, kimyasal ajanlara ve çevresel stres faktörlerine karşı koordineli bir savunma sağlar. Ayrıca deri; metabolik denge, ısı düzenlenmesi, terleme yoluyla sıvı-elektrolit kontrolü ve UV ışınlarına karşı koruma gibi yaşamsal işlevlere sahiptir (10).

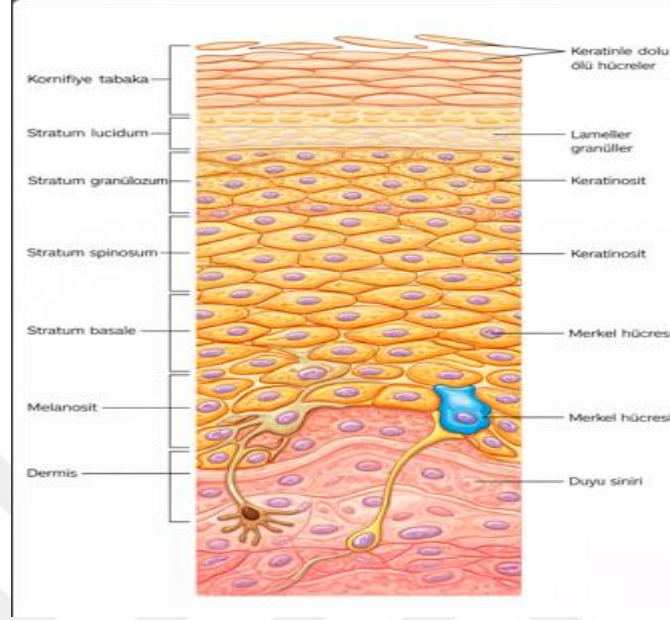


Şekil 1: Derinin tabakaları ve içerdiği yapılar (11)

2.1.1. Epidermis

Epidermis, keratinositlerin baskın olduğu avasküler bir epitel tabakasıdır ve stratum basale'den stratum corneum'a uzanan hücresel yapı ardışık farklılaşma basamaklarıyla düzenlenmiştir. Bu organizasyon, epidermisin dış çevreden gelen fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı

ilk savunma hattını oluşturmasını sağlar. Ayrıca melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri gibi yardımcı hücre tipleri, epidermin pigmentasyon ve immün yanıt süreçlerine önemli katkılar sunar (12).



şekil 2: Epidermin katmanları (13)

(Uyarlanmıştır: Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016.)

Bazal tabaka (stratum basale/germinativum)

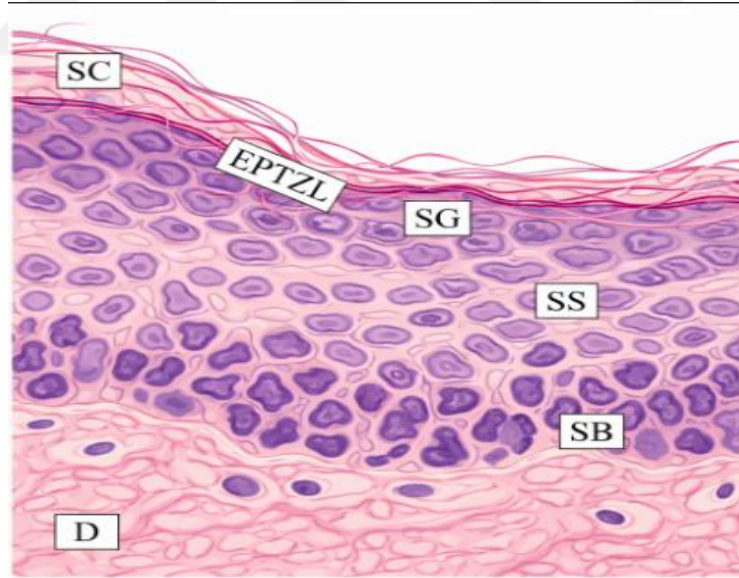
Mitotik bölünmeden sorumlu olup epidermin en alt tabakasında yer alan bazal tabaka aynı zamanda germinatif tabaka olarak adlandırılmaktadır. Bunun sebebi hücre üreten tabaka olup epidermis yüzeyinde sürekli dökölmekte olan hücreleri yenilemek üzere sürekli çoğalmasıdır. Yeni hücrelerin bazal tabakadan epidermis yüzeyine göçü 6-8 hafta kadar sürmektedir. Tek katlı küboidal epitelle örtölüdür ve dermoepidermal bileşkedeki bazal membran tabakasıyla direkt temas halindedir. Bu tabakada diğer tabakalara göre daha ökromatik çekirdekli keratinosit hücreleri, melanin üreterek deriye has rengi veren melanosit hücreleri ve merkel hücreleri yer almaktadır (14).

Spinal tabaka (stratum spinosum)

Dikensi tabaka olarak da bilinen spinal tabaka, keratinositleri birbirine bağlayan desmozom adı verilen hücreleri içerir. Bu yapı hücreler arası bağlantı mevcut bağların güçlenmesine katkıda bulunur. Tabakanın içerdiği keratin filamentler sebebiyle dikensi bir görünüm almıştır. Bu katman antijen sunucu hücreler(APC) olan dendritik hücreler ve langerhans hücrelerini de içermektedir. Derinin birincil savunmasında görevli olan bu hücreler immünolojik etki ile derinin önemli bir fonksiyonunu yerine getirmektedir (15).

Granüler tabaka (stratum granulosum)

Bu tabakadaki hücreler organellerini kaybedip daha kompakt hale gelerek keratinize tabakaya ulaşırlar. Bu hücreler tırnak, saç gibi deri eklerini meydana getirir. Keratinizasyon sürecine büyük katkısı olan granüler hücrelerden oluşan bu tabaka keratohyalin granülleri içerir (16).



Şekil 3: Histolojik kesitte stratum granulosum (17)

(Şekil, Wheater's Functional Histology (Young B, O'Dowd G, Woodford P., 2013) temel alınarak yeniden çizilmiştir.)

Saydam tabaka (stratum lucidum)

Sıkı şekilde paketlenmiş ve düzleşmiş hücrelerden oluşan bu tabaka sadece avuç içleri ve ayak tabanlarında bulunur. Cildin esneme, su geçirmezlik ve sürtünme gibi fonksiyonlarında rol alır. Kalınlığı vücudun farklı bölgelerinde değişkenlik gösterebilmektedir.

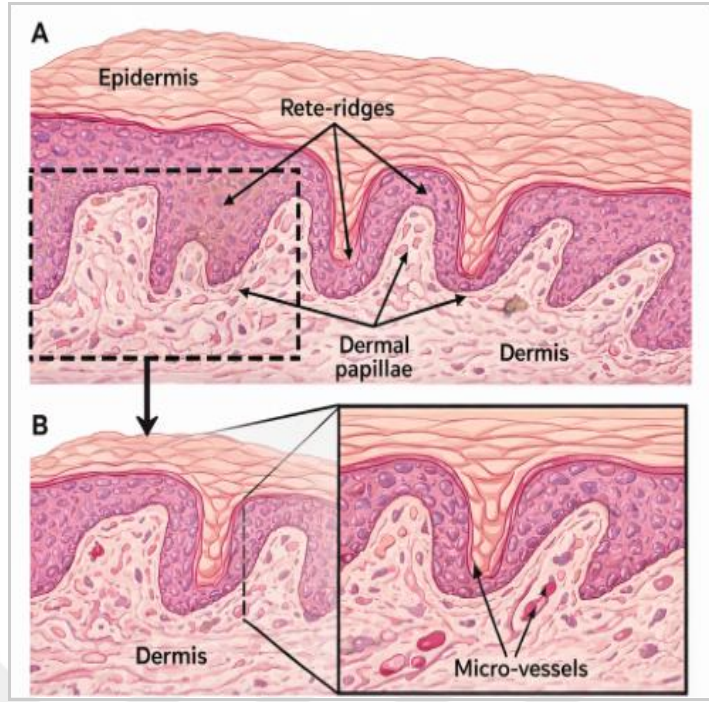
Keratinize tabaka (stratum corneum)

Epiderminin en dış tabakası olan keratinize tabaka keratinositlerin gelişimini tamamladığı ve olgunlaştığı tabakadır. Bazal tabakada çoğalan keratinositler olgunlaşmalarını tamamladıkça çoğalma kapasitelerini kaybederek epidermal yüzeyde programlanmış yıkıma uğrarlar. Oluşmuş olan çekirdeğini kaybetmiş keratinositler korneosit olarak adlandırılır ve yalnızca matrikse gömülü keratin filamanlarını korurlar. Stratum corneum, vücudu dış ortama karşı koruyan ilk bariyer görevi görür. Çekirdeğini kaybetmiş korneositler; epidermal kurumayı önlemek dışında mitotik olarak aktif hücreleri UV ışınlarından koruma, sitokin aracılı inflamasyonu başlatma ve hidrasyonu koruma gibi görevlere sahiptir. Mevcut ekstrasellüler lipid matriks, hücrel geçirgenliği sağlar. Epidermis, özellikle stratum corneum aracılığıyla toksik maddelerin ve mikroorganizmaların dokuya girişini engelleyen güçlü bir bariyer oluşturur ve aynı zamanda seçici kimyasal geçirgenlik sağlar (18).

2.1.2. Bazal Hücreler ve Bazal Membran

Epidermis ve dermisi birbirinden ayıran çeşitli hücre dışı matriks bileşenlerinden meydana gelir.

Epitelyal hücrelerin alttaki bağ dokuyla etkileşimi bazal membran aracılığıyla sağlanır. Hücre yüzey reseptörleri ile ekstrasellüler matriks bileşenleri arasında etkileşimi sağlayarak hücrel farklılaşma ve organizasyonda rol alır. Permeabilitenin düzenlenmesinde etkindir (19).

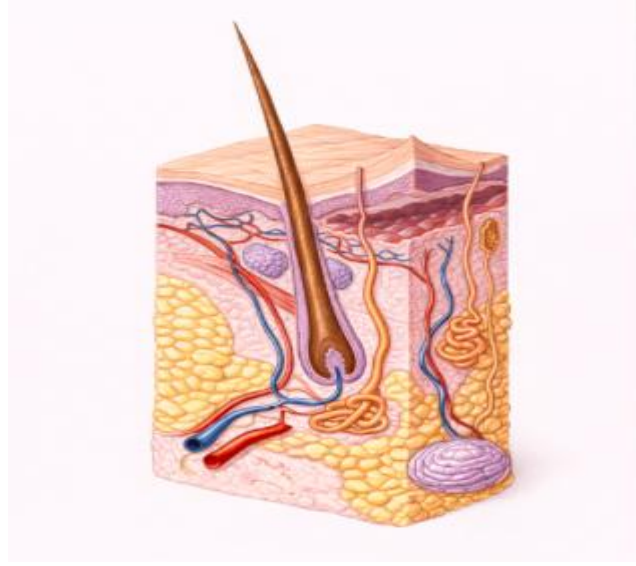


Şekil 4: Dermo-epidermal bileşkenin histolojik kesiti (20)

(Şekil, Burgeson ve Christiano (1997) temel alınarak yeniden çizilmiştir.)

2.1.3. Dermis

Dermis, bağ dokusundan zengin bir stromal ortam içinde fibroblastlar, immün hücreler ve damar ağından oluşan daha kalın bir tabakadır. Kollajen lifleri, elastin ve proteoglikanlar deriye dayanıklılık ve esneklik kazandırır (21). Tip I kollajen bu yapının büyük kısmını oluştururken, tip III kollajen elastikiyet ve yara iyileşmesindeki yeniden yapılanma sürecinde önemli rol oynar (22).



Şekil 5: Dermisin katmanları ve elemanları (23)

(Şekil, Shimizu's Textbook of Dermatology (Shimizu, 2007) temel alınarak yeniden çizilmiştir.)

Papiller Dermis

Nörovasküler ağı bulunduran daha gevşek üst bölümdür.

Retiküler Dermis

Daha sağlam bağlantılara sahip kollajenden yoğun alt bölümdür (24).

Subkütan Doku

Subkutan yağ dokusu, enerji depolanması, travmadan korunma ve ısı yalıtımı gibi temel işlevleriyle deriye yapısal destek sağlayan bir tabaka görevi görür. Ayrıca bu doku, hormonal düzenleme ve immün yanıt süreçlerine katkıda bulunan aktif bir metabolik bileşen olarak tanımlanmaktadır (25).

2.1.4. Deri Ekleri

Adneksler olarak adlandırılan deri ekleri, deri sisteminin eklentilerini ifade eder. Deri ekleri; ter bezleri, yağ bezleri ve kıl folikülleriyle ilişkili olmayan bezleri içermektedir (göz kapaklarında karşılaştığımız gibi) (26).

Epidermin bazal tabakasında bulunan bazal hücrelerde kıl folikülü gelişimi olmaktadır. Bu hücreler yukarı doğru uzanarak kıl kanal açıklığını oluşturur, hem de aynı zamanda aşağı dermise doğru uzanır ve bir epitel kolonu oluştururlar. Hücrelerin büyümesiyle subkütan yağ tabakasına kadar uzanım gerçekleşir ve alt kısımda ovalleşme olur. Bu da oluşacak olan kıl folikülünün dermal papillasını oluşturmuş olur. Buradaki epidermal hücreler farklılaşarak kılın iç kök kılıfını oluşturur. Epidermisten aşağı yönlü büyüme ile dış kök kılıfı oluşturulur. Adneksiyal hücrelerin kök hücre fonksiyonu, vücut ısısının düzenlenmesi, kıl büyümesi, koruyucu epitelyal fonksiyon gibi pek çok farklı işlevleri de mevcuttur (27).

Ekrin Ter Bezleri

Primer olarak vücut sıcaklığının dengelenmesi ve homeostazisin sürdürülmesinde görev alırlar. Ekrin ter bezleri vücut genelinde yaygın olarak bulunur ve uygun fizyolojik koşullarda ter sekresyonu yoluyla ısı düzenlenmesine katkı sağlar (28).

Apokrin Bezler

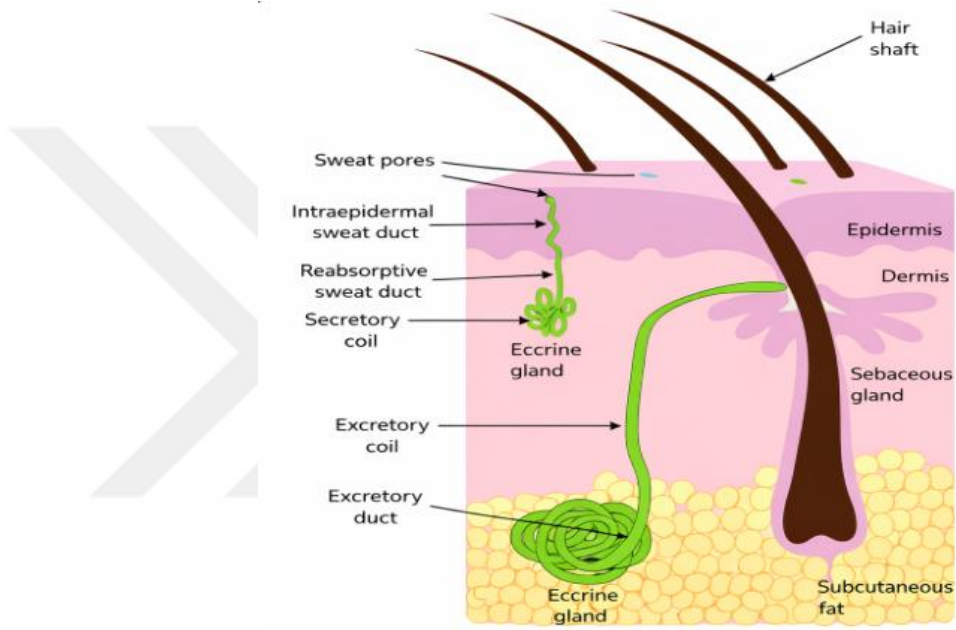
Ekzokrin salgı bezlerinin bir türü olan apokrin bezler; temel olarak aksilla, areola ve anogenital bölgede bulunur. Duktal ve sekretuar komponentleri bulunur, genellikle dermin derin kısmı ve subkütan yağ dokuda konumlanır (29).

Sebase Bezler

Bir tür holokrin gland olup yalnızca avuç içinde ve ayak tabanlarında bulunmaz.

Pilar Yapı ve Pilosebace Ünite

Pilosebace ünite, sebace bez ve kıl follikülü başta olmak üzere arrector pili kası ile ilişkili yapıları içeren ve hormon sentezi ile hormon reseptörleri bulundurması nedeniyle fonksiyonel olarak endokrin bir ünite gibi davranan bir sistemdir. Steroid hormonlar, retinoidler ve çeşitli nükleer reseptör ligandlarının bu ünitenin gelişiminde rol oynadığı; özellikle sebace bez gelişimi ve kıl büyüme döngüsünün kontrolünde önemli işlevler üstlendiği bildirilmektedir (30).



Şekil 6: Pilosebace Ünite (31)

(Gravitz (2018) temel alınarak yeniden çizilmiştir.)

2.2. Derinin Görevleri

Derinin temel görevleri olarak; iç dokuları UV ışık, çeşitli mikrobiyal ajanlar, termal, kimyasal dış etkenlere karşı korumak sayılabilir. Ayrıca vücudu su kaybına karşı korumak, homeostazı düzenlemek ve bir takım metabolik fonksiyonları da vardır (32).

İmmün sistemde antijen sunucu hücrelere yardımcı olarak görev yapmaktadır. Çevresel uyaranları algılar, sıcak havalarda ve ortamlarda ter salgılama ve evaporasyon yoluyla soğumada etkindir. D vitamini biyosentezi

ile birlikte, özellikle apokrin bezler aracılığıyla koku oluşumu ve buna bağlı sosyal etkileşimlerde rol oynayan çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır (33).

2.3. Yara İyileşmesinin Evrensel Süreçleri

Yara iyileşmesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme olmak üzere ardışık şekilde ilerleyen dört temel fazdan oluşan dinamik bir süreçtir (34). Bu süreçte fibroblast aktivitesi, kollajen sentezi, anjiyogenez ve epitelizasyon gibi hücrel ve moleküler olaylar temel rol oynar (35). Söz konusu biyolojik mekanizmaların doğru zamanda ve uyum içinde gerçekleşmesi, iyileşmenin hızını ve dokusal bütünlüğün kalitesini belirleyen en önemli faktörlerdendir (36). Bu aşamalara ait düzenleyici süreçlerde meydana gelen aksaklıklar, iyileşmenin gecikmesine veya patolojik doku oluşumuna yol açabilmektedir (37). Dolayısıyla yara iyileşmesi, çok sayıda hücrel bileşen ve mediyatörün koordineli işleyişini gerektiren kompleks bir biyolojik olay olarak kabul edilmektedir (38).

2.3.1. Hemostaz Fazı

Yaralanmaya verilen en erken tepki, lokal kan damarlarında oluşan hasar sonucu oluşur. Bu kanamayı hemen durdurmak elzemdir, çözünmeyen fibrin fiberlerinin oluşturduğu ağ sayesinde fibrin tıkaçı oluşturur ve sonucunda trombosit agregasyonu ve aktivasyonu gerçekleşir. Oluşan pıhtı, damarı tıkaması dışında çeşitli büyüme faktörlerinin bağlanabildiği ve hücre içine geçebildiği geçici bir matris görevi görür. Kendisinin de önemli bir büyüme faktörü (PDGF, CXCL4, FGF, TGF-beta, VEGF vb.) kaynağı olduğu bilinen aktive trombositler bu büyüme faktörü salınımı yoluyla onarım sürecinin anjiyogenez, inflamasyon, keratinosit ve fibroblast göçü gibi bir dizi olayı başlatır (39).

2.3.2. İnflamatuar Faz

Yaralanma sonrası ilk 72 saat içinde meydana gelen inflammatuar faz; esas olarak gereksiz oluşacak doku hasarını önlemek, patojenik organizmalar ve yabancı kalıntıları ortadan kaldırmak amacıyla ortama nötrofil ve monosit infiltrasyonunu kolaylaştıran bir dizi karmaşık moleküler sinyal yolağı olarak ifade edilebilir (40).

Erken inflammatuar fazda temelde nötrofillerin salgıladığı proteolitik enzimlerle ölü dokular ve mikroorganizmalar fagositozla elimine edilir.

İlerleyen süreçte nötrofil sayılarında azalma ile beraber fagositik aktivite ve apoptotik aktivitede azalma meydana gelir. Geç inflamatuvar fazda ise makrofajlar baskındır; PDGF, LT B4, PF4 ve TGF-beta gibi büyüme faktörleri ile monositlerin aktive edilmesiyle oluşurlar (41).

2.3.3. Proliferatif Faz

Yara iyileşmesinin 4. gününden itibaren başlayıp yaklaşık 2 hafta kadar süren bu fazın asıl önemi, oluşmuş olan geçici fibrin tıkaçın mevcut dokuya yapı ve işlevini geri kazandırmak amacıyla kollajen, proteoglikanlar ve fibronektin gibi moleküllerin üretilmesidir. Bir diğer önemli amaç ise hasar görmüş damarları değiştirip yeni kılcal damar oluşumunun yani anjiyogenezin indüklenmesidir. Ayrıca granülasyon dokusunun oluşumu ve epitelizasyon da bu aşamada gerçekleşir. Bu fazın anahtar hücresi fibroblastlardır (42).

2.3.4. Matürasyon ve Yeniden Şekillenme (Remodeling) Fazı

Matürasyon ve yeniden şekillendirme fazı yaklaşık 1 yıl kadar sürebilen diğer yara iyileşmesi fazlarıyla iç içe geçmiş ve net bir ayrımın yapılamadığı dönemdir. Bu dönemde inflamatuvar süreç yerini kollajen çapraz bağlarının olduğu, dokunun sağlamlığının artırıldığı ve skar matürasyonunun izlendiği döneme bırakır (43).

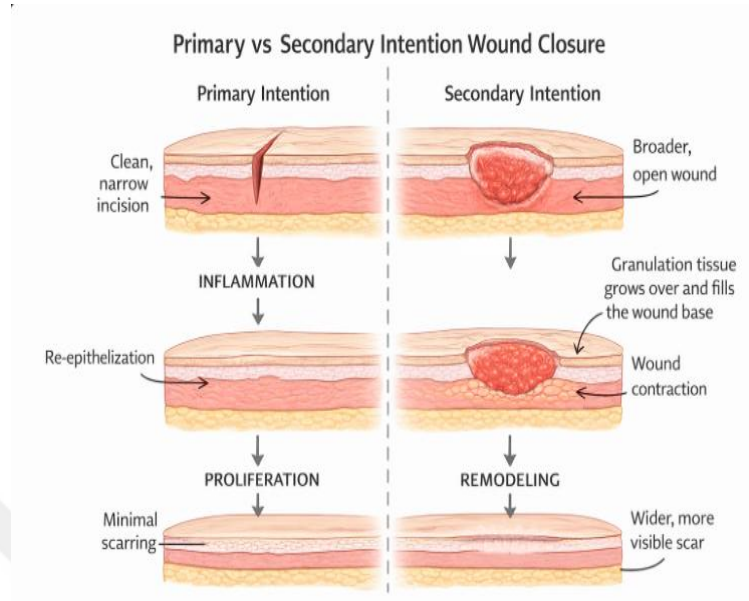
2.4. Yara İyileşmesi Şekilleri

Kapatılma şekillerine göre yara iyileşmesi primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere üç grupta incelenir.

Primer (Birincil) İyileşme: Travmanın meydana geldiği erken dönemde yara dudaklarının stapler, sütur veya adeziv bantlama ile kapatılmasıdır.

Sekonder (İkincil) İyileşme: Yaranın iyileşmesi epitelizasyon veya kontraksiyon yoluyla spontan olarak gerçekleşir. Yarada granülasyon dokusu oluşumu gözlenir.

Tersiyer (Geç Birincil) İyileşme: Yara oluşumu sonrası birkaç gün veya hafta beklenmesi sonrası primer kapamanın gerçekleştirilmesidir.



Şekil 7: Yara iyileşmesinin şekilleri (44)

(Şekil, Eming ve ark. (2014) esas alınarak yeniden çizilmiştir.)

2.5. Yanık

Yanık; alev, donma, kimyasal, elektrik ve radyasyon veya sürtünme gibi sebeplerden kaynaklanan bir yaralanma türüdür. Etkilediği doku, etkileme şiddeti ve ortaya çıkabilecek komplikasyonlar ile birlikte oldukça değişken derecede sonuçlar doğurabilir. Epidermis, dermis, damar sistemleri, kas ve kemik gibi dokuların hepsini etkilemiş olabilir, sinir yapılarına verilen hasar sebebiyle ağrıya sebep olabilir. Hastada şok, enfeksiyon, elektrolit yetersizliği, solunum yetmezliği gibi bir çok potansiyel ölümcül komplikasyona sebep olabilir. Bu komplikasyonların yanı sıra; uzun süreli hastanede kalma, iz ve oluşan deformiteler sebebiyle ciddi emosyonel ve ruhsal problemlere sebep olabilmektedir (45).

2.5.1. Tarihçe ve İnsidans

Yanığa bağlı hasarların tarihsel sürecine bakıldığında genellikle kötü prognoza sahip olduğu görülmüştür. Sıvı kaybının resüsitasyonundaki

gelişmeler (46) ve yara bakımının erken dönemde yapılması ile prognozda iyileşmeler görülmeye başlamıştır. Cilt biyomühendisliğindeki ilerlemelerle birlikte yara izinin iyileştirilmesi konusunda atılan adımlar, geleceğe dair psikososyal ve fonksiyonel sonuçlar açısından umut vadetmektedir.

Yanıkların %55' i alev yanıklarından kaynaklanırken bunu %40 ile haşlanma yanıkları takip etmektedir. Alev yanıklarına sıklıkla solunum yolu veya diğer sistem yaralanmaları eşlik etmektedir. Hafif yanıkların toplumda sık görüldüğü, buna karşın ağır ve ciddi yanıkların yıllık insidansının yaklaşık 5/100.000 kişi olduğu bildirilmektedir (47).

2.5.2. Yanıkların Tanımı ve Sınıflandırılması

Yanık yaralanmaları, ısı, elektrik ve kimyasal ajanlar gibi dış etkenlere bağlı olarak deride ve derin dokularda meydana gelen hasar ile karakterize edilen klinik tablolardır (48). Yanıkların sınıflandırılmasında temel belirleyici unsur, hasarın dokudaki derinliğidir ve modern klinik yaklaşım bu ilkeye dayanır (49).

Birinci Derece Yanıklar

Bu yanık türünde epidermis yüzeysel olarak etkilenir; eritem ve ağrı tipik klinik bulgulardır (50). Genellikle kısa sürede, iz bırakmadan iyileşme eğilimindedir (51).

İkinci Derece Yanıklar

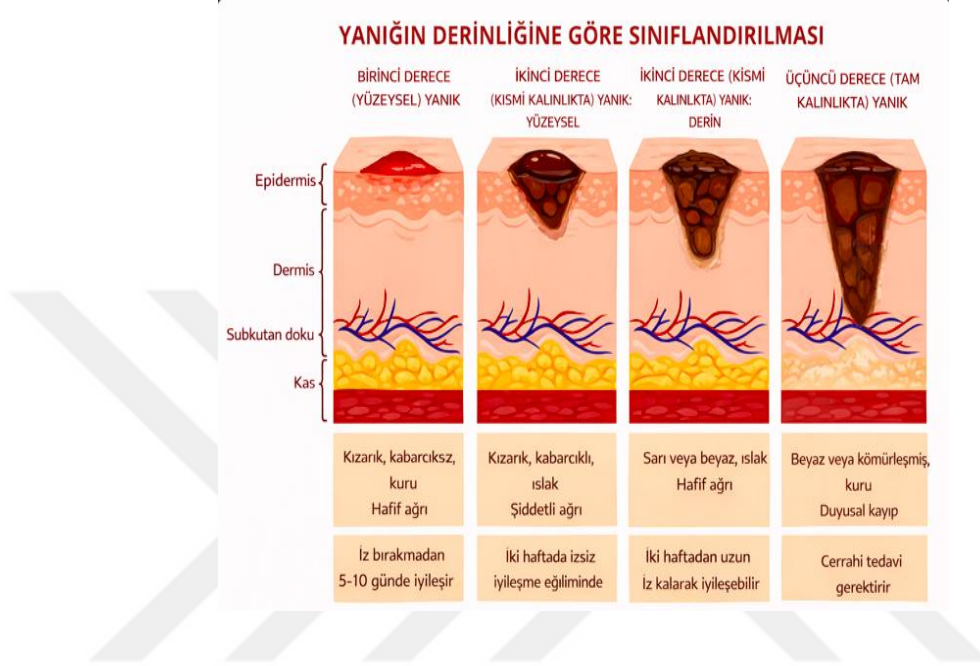
Epidermin tamamının ve derminin bir bölümünün etkilendiği bu yanıklarda büller oluşabilir ve ağrı belirgindir (52). Yüzeysel tiplerde iyileşme hızlıdır; daha derin tiplerde skar gelişimi görülebilir (53).

Üçüncü Derece Yanıklar

Bu yanık tipinde epidermis ve derminin tüm tabakaları hasarlanır ve doku kaybı subkutan tabakalara kadar ilerleyebilir (54).

Dördüncü Derece Yanıklar

Kas, tendon ve kemik gibi daha derin dokuların da hasar gördüğü en ağır yanık formudur. Fonksiyon kaybı ve amputasyon gerekliliği sık karşılaşılan sonuçlardır.



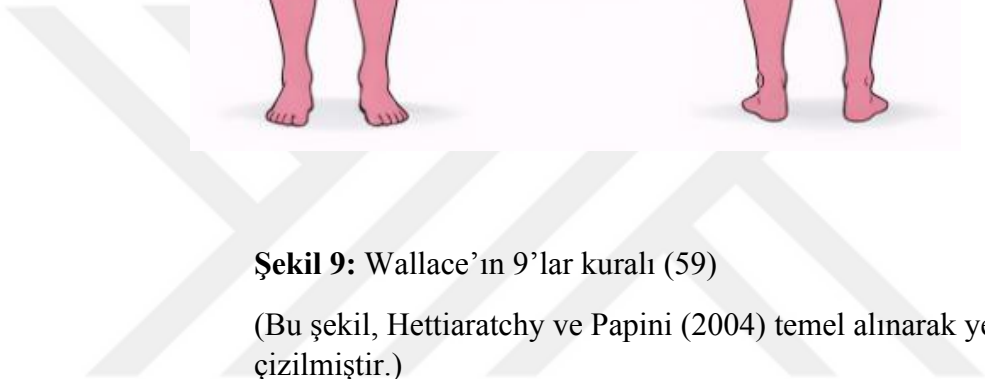
Şekil 8: Yanık derecelendirmesi (55)

(Bu şekil, Hettiaratchy ve Dziewulski (2004) esas alınarak yeniden çizilmiştir.)

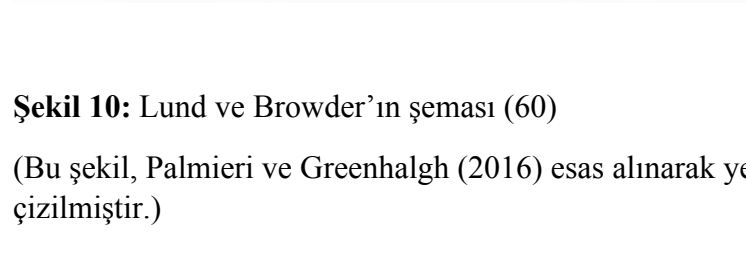
Yanık alanının yüzdesel genişliği ise, yanık bölgesinin tüm vücut yüzey alanına oranlanması ile hesaplanmaktadır. Bu hesaplama 1. derece yanıklar genellikle dahil edilmemektedir. Bu hesaplama yapılırken en sık Wallace'ın dokuzlar metodu kullanılmaktadır (56).

Çocuklarda başın büyük ve ekstremitelerin kısa olması nedeniyle daha hassas hesaplamayı Lund ve Browder'in şeması vermektedir (57).

Boyut olarak daha küçük yanıklarda kişinin el ayası yaklaşık olarak %1 olarak kabul edilir ve ona göre hesaplama yapılır (58).



(Bu şekil, Hettiaratchy ve Papini (2004) temel alınarak yeniden çizilmiştir.)



(Bu şekil, Palmieri ve Greenhalgh (2016) esas alınarak yeniden çizilmiştir.)

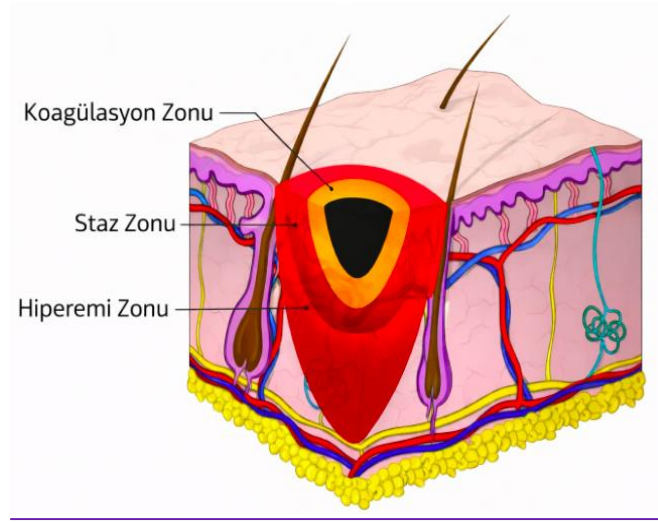
Optimum bir yanık bakımı sağlamak için uzmanlaşmış bir yanık ekibi, bilgi ve ekipman gerekmektedir. Uzun süreli hospitalizasyon ve rehabilitasyon ihtiyacı, kapsamlı yanık merkezi gereksinimini doğurmuştur (61).

Amerikan Yanık Derneği' nin yanık merkezlerine sevk için endikasyonları aşağıda sıralanmıştır (62).

- ◆ 10 yaş altı ve 50 yaş üzeri hastalarda %10' dan fazla 2. derece ve üzeri yanık
- ◆ Bütün hastalarda %20'den fazla 2. derece ve üzeri yanık
- ◆ Herhangi bir yaş grubunda 3. derece yanıklar
- ◆ Perine bölgesi, major eklemler, genital bölge, ayak, yüz veya eklem bölgesini içeren yanıklar
- ◆ Kimyasal yanıklar
- ◆ İnhalasyon yanıkları
- ◆ Elektrik yanığı
- ◆ Yanığın yönetimini güç kılan, morbidite ve mortaliteyi artıran medikal sorunların bulunması
- ◆ Yanığa ilaveten hastada mortaliteyi artırabilecek ek travmaların bulunması
- ◆ Ruhsal ve sosyal bakıma ihtiyaç duyan bazı hastalar
- ◆ Çocuk hasta grubuna bakımı kısıtlayan ekipman ve personel yetersizliği

2.5.3. Yanık Zonları

Yanık dokusunda nekroz, skar dokusu veya fonksiyonel doku durumunu belirleyen ve fizyopatolojik sürecin devam ettiği 3 zon bulunmaktadır. Bunlar Jackson tarafından tarif edilmiş olan hiperemi zonu, staz zonu ve nekroz zonudur. Tedaviye yanıtı değerlendirmede öncül belirteçlerden olan bu zonlardan asıl kurtarılması gereken staz zonudur. Bu zonun kurtarılmasıyla beraber canlı ve fonksiyonel doku miktarı artmaktadır (63).



Şekil 11: Yanık zonları (64)

(Bu şekil, Singer & Dagum (2008) esas alınarak yeniden çizilmiştir.)

Koagülasyon (Nekroz) Zonu

Merkeze en yakın bölgeyi ifade eden nekroz zonundaki tüm dokularda ölü dokular hakimdir.

Uygulanacak herhangi bir tedaviyle bu bölgenin kurtarılması söz konusu değildir.

Staz Zonu

Nekroz zonu dışında kalan bölgeyi ifade eder ve bu bölgede dolaşımın yavaşlaması sebebiyle iskemi hakimdir.

Uygun tedavi zamanında yapılmazsa nekroz zonuna ilerleyebilmektedir. Yapılacak tedaviyle kurtarılma şansı mevcuttur.

Hiperemi Zonu

Yanık bölgesinde staz zonundan daha uzakta bulunan bölgedir. Bu bölgeye olan kan akımı artmıştır, buna bağlı kızarıklık ve şişlik gözlenir. İyileşme olasılığı en yüksek olan bölgedir.

2.5.4. Yanık Patofizyolojisi

Yanık yaralanmalarında lokal ve sistemik düzeyde geniş biyokimyasal ve immünolojik değişiklikler ortaya çıkar. Hasarlı bölge Jackson tarafından tanımlanan üç farklı zon yapısı ile açıklanır: koagülasyon zonu, staz zonu ve hiperemi zonu (65). Staz zonunun korunması, iyileşmenin en kritik aşamasını oluşturur. Lokal doku hasarını takiben vücutta sitokin salınımı artar, kapiller geçirgenlik yükselir ve yaygın inflamatuvar yanıt tetiklenir (66).

2.5.5. Yanık Tedavisi

Yanık ile maruziyet sonrası bir tıbbi müdahale uygulansın ya da uygulanmasın hastalar ciddi bir hipotermi ve dehidratasyon riski içerisindedir. İlk müdahalede travma yönetimiyle ABC' yi oluşturan solunum, dolaşım ve solunum yolu açıklığının sağlanması hedeflenmelidir. Yanık sonrası solunum yolu açıklığının sağlanmasıyla hastanın hayati fonksiyonlarını sürdürmesi ve normal solunum yapabilmesine imkan verilmesi amaçlanır. Ayrıca eşlik eden diğer sistem travmalarının incelenmesi ve belirlenmesi kritik öneme sahiptir (67).

Yanık yaralarının hidrojel battaniyeler ve oda ısısındaki suya batırılmış bir gaz ile soğutulması da ilk tedavide fayda sağlayabilir. 20 dakikalık bir uygulamanın yararlı olduğu görülmüştür. Ayrıca daha geniş yanıklarda hipotermi ve sistemik hipotansiyonun düzeltilmesi gereklidir. Bu uygulamaların vakit kaybetmeden yapılması önerilse de üzerinden 30 dakika geçmiş olan yanıklarda da uygulanabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (68).

Sıvı Tedavisi

Yanık yüzey alanının yetişkinde %20, çocuklarda %10'u aşması durumunda acil sıvı tedavisine başlanması gerekmektedir. Büyük yanıklarda sıvı kaybının replase edilmesi ve mevcut sıvı dengesinin muhafaza edilmesi son derece önemlidir (69).

Kullanımı en uygun olan solüsyon Ringer Laktat'tır. Metabolik ve fizyolojik asidozu dengelemesi sebebiyle bu solüsyon tercih edilmektedir. Gereken sıvı miktarı Parkland Formülü ile hesaplanabilmektedir.

Parkland formülü= 4 ml x vücut ağırlığı (kg) x toplam yanık yüzey alanı

Hesaplanan sıvı miktarının %50'si ilk 8 saat içerisinde, kalan %50'si ise takip eden 16 saatlik süre içerisinde verilmelidir. Parkland formülüne ek olarak Brooke ve Evans formülleri de sıvı resüsitasyonunda kullanılabilir (70).

Tedavi sırasında hastanın bilinci, nabızı ve kan basıncı, idrar çıkışı ve idrar dansitesi, kan gazı ve santral venöz basınç(CVP) değerlerinin takip edilmesi son derece önemlidir (71).

İdrar çıkışı yetişkinde 30-50 cc/saat, çocuk hastada 0,5 ml/kg/saat olacak şekilde ayarlanmalı; elektrik yanığı veya inhalasyon yanığıysa bu değerler 2 katına çıkarılacak şekilde takip edilmelidir (72).

Yara Bakım Tedavisi

Primer tedavide yanık alanlarının genişliği belirlenmeli, nekrotik dokular ve yabancı cisimler temizlenmeli ve oluşacak buharlaşmaya bağlı sıvı kaybı önlenerek bakteriyel kontaminasyonun önüne geçilmelidir. Ayrıca kullanılacak topikal mikrobiyal ajanın seçimi, yapılacak pansuman biçimi, atel uygulanıp uygulanmayacağını belirlenmesi ve gerekli cerrahi müdahalelerin belirlenmesi son derece önemlidir (73). Son 2 yıl içerisinde tetanoz aşısı yaptırmayan hastalara aşılama yapılmalıdır.

Topikal ajan olarak günümüzde yaygın bir şekilde gümüş sülfadiazin, gümüş nitrat, nitrofurazon ve mafenid asetat kullanılmaktadır. Ayrıca yanık pansumanında çeşitli yara bakım örtüleri de kullanılabilir. Bunlar; kompozit örtüler, hidrokolloidler, antibakteriyel örtüler, aljinat örtüler, hidrojel örtüler ve silikon pansumanlar olarak sayılabilir (74). Bütün bu bahsedilen yöntemler yanık yara bakım tedavisini optimize etmek ve oluşan enfeksiyöz durumları azaltmak amacıyla kullanılabilir.

Cerrahi Tedavi

Akut yanık yaralarının tedavisinde başlıca zorluklardan biri yara yeri enfeksiyonunu önlemek olduğundan, eskarın erken çıkarılması ve yaranın kapatılması kritik hale gelmektedir. Canlı olmayan nekrotik doku ilk agresif cerrahi ile çıkarılmalıdır. Oluşacak yara defektini kapatmak için birçok tedavi seçeneği mevcuttur ama kısmi kalınlıkta deri greftlemesi hala tam kalınlıktaki yanık yaralarının kapatılmasının tedavisinde standart tedavi olmaya devam etmektedir (75).

Yapılacak olan debridman tanjansiyel eksizyon olarak planlanır ve sağlıklı dokulara ulaşınca kadar devam edilir (76).

Erken ve agresif uygulanacak cerrahi tedavi ile hastanede kalış süresi kısılacak, erken yara kapatılması ile lokal yara yeri bakımıyla ilişkili ağrının önüne geçilecek ve sonrasında uygulanması gerekecek cerrahi prosedür sayısı azalacaktır. Ayrıca hipertrofik skarlaşma, oluşabilecek eklem kontraktürünün sertliği ve şiddetinde azalma ile rehabilitasyon sürecini destekleyecektir (77).

Bütün bunlara rağmen tedaviye yönelik yaklaşım ve uygulanacak tedavi yanığın özelliğine ve hastanın durumuna göre değişebilmektedir.

2.6. Kimyasal Yanık

2.6.1. Genel Bakış

Kimyasal yanıklar, asit veya alkali bir ajana maruziyet sonucu oluşmaktadır. Bu maddeler arasında Hidroflorik Asit (HF), fenol, formik asit, çimento ve anhidroz amonyak sayılabilir. Diğer spesifik kimyasal ajanlar ise beyaz fosfor, nitrat, hidrokarbonlar, katran ve elemental metaller örnek gösterilebilir. Önceden masum olduğuna inanılan, şimdi ise potansiyel tehlike olarak görülen çimento, benzin gibi ajanlar pek çok ciddi yaralanmalara ve hastalıklara yol açabilmektedir.

2.6.2. Kimyasal Yanıkların Özellikleri

Kimyasal yanıklar asidik veya alkali maddelerle temas sonrası ortaya çıkar ve korozyf ajanların doku penetrasyon derinliği, özellikle alkali yanıklarda, termal yanıklardan daha ciddi olabilir; bu yüzden bu tür yanıklar etkili tanı ve tedavi gerektirir (78). Özellikle hidroflorik asit (HF) içeren yanıklarda doku yıkımı yalnızca lokal değil, sistemik elektrolit bozuklukları ile de seyreder. HF'nin hücre içine hızla diffüze olması kalsiyum ve magnezyumla bağlanmasına, buna bağlı olarak ciddi hipokalsemi ve aritmilere yol açabilir. Bu nedenle erken dönemde dekontaminasyon ve kalsiyum içerikli tedaviler kritik öneme sahiptir.

2.6.3. Asit ve Alkali

Kimyasal yanıklara neden olan ajan inaktive edilmediği müddetçe dokulara hasar vermeye devam etmektedir (79).

Hidroterapiye erken başlanması bu sebeple çok önemlidir. Erken tedavi pH'ı normale döndürür. Düşük basınç ile yapılacak olan hidrasyon ortamdaki mevcut ajani dilüe etmekte ve ciltten uzaklaştırmaktadır. Ayrıca hastanın giysileri çıkarılacak kontakt süresi ve miktarını azaltarak sürece katkıda bulunur. Asit ve alkali yanıklarını dekontamine etmede su tercih edilmesi gereken ajandır. Asit ve alkali yanık ile yapılan hayvan deneylerinde, su ile yapılan irrigasyonun doku hasarını sınırlamada kimyasal ajan nötralizanları ile yapılan tedaviden daha etkili olduğu bildirilmiştir (80). Çünkü nötralizasyon sonrası oluşan ısı ve ek travmalar, su ile yapılan nötralizasyonun bu ekzotermik reaksiyonu sınırlaması sebebiyle oldukça düşüktür.

2.6.4. Hidroflorik Asit (HF)

2.6.4.1. Tanım, Üretim ve Kimyasal Özellikler

Hidroflorik asit (HF), hidrojen florürün sulu çözeltisi olup flor içeren birçok endüstriyel ve farmasötik bileşiğin prekürsörüdür. Son derece koroziv bir ajan olarak pek çok materyali çözebilme, özellikle cama karşı yüksek reaktivite göstermesi nedeniyle genellikle plastik kaplarda saklanmaktadır. HF, endüstride cam pürüzlendirilmesi, metal temizliği, rafine petrol sanayii, organik florürlü bileşik ve inorganik florür üretimi gibi pek çok alanda kullanılmakta; evsel ortamda ise bazı pas sökücüler ve alüminyum içeren temizlik ürünlerinin bileşiminde yer almaktadır (81).

Endüstriyel ölçekte HF, mineral floridin (kalsiyum florür, CaF_2) konsantre sülfürik asit ile reaksiyonu sonucu elde edilir :



HF, güçlü mineral asitlerle kıyaslandığında daha düşük çözünürlük sabitine sahip olması nedeniyle zayıf asitler sınıfında değerlendirilmekle birlikte, sudaki çözeltisinde iyonizasyonu klasik asitlere benzer şekilde gerçekleşir (82). Çözeltide $\text{HF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{F}^-$ ve $2\text{HF} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{FHF}^-$ dengeleri söz konusudur; FHF^- anyonu, güçlü hidrojen-flor bağları ile stabilize olur (83). Kimyasal olarak “zayıf” sayılmasına karşın dokuya yüksek

penetrasyon kapasitesi, HF'yi klinik açıdan oldukça agresif bir ajan hâline getirmektedir.

2.6.4.2. Toksisite, Klinik Etkiler ve Güvenlik

HF'nin gaz formu solunum yolu için güçlü bir toksin olup, maruziyette kalıcı akciğer ve kornea hasarı gelişebildiği bildirilmiştir. Deri ve göz yoluyla ya da inhalasyonla maruziyette, belirgin lokal ve sistemik toksisite ortaya çıkabilmektedir. Florür iyonunun kalsiyum (Ca^{2+}) ve magnezyum (Mg^{2+}) ile yüksek afiniteli şekilde reaksiyona girerek çözünmeyen kompleksler (örneğin kalsiyum florür) oluşturması, serum kalsiyum düzeylerinde azalma, şiddetli ağrı, elektrolit dengesizlikleri ve kardiyak disritmilere yol açabilmektedir (84). Bazı olgularda belirgin sistemik hipokalsemi ve buna bağlı EKG'de QT aralığında uzama bildirilmiştir. HF, aynı zamanda sinir uçlarını da etkileyebildiği için erken dönemde ağrı hissinin silik veya gecikmiş olması, maruziyetin ciddiyetinin fark edilmesini güçleştirmekte ve tedavinin gecikmesine bağlı doku kaybını artırabilmektedir (85).

2.6.4.3. HF Maruziyetinde Tedavi Yaklaşımları

HF maruziyetinde ilk basamak, hastanın hızla kaynaktan uzaklaştırılması, kontamine giysilerin çıkarılması ve derinin dekontaminasyonudur (86). Deri ve göz teması sonrası mümkün olan en kısa sürede bol miktarda su veya serum fizyolojik ile irrigasyona başlanmalı ve nakil gerekiyorsa bu irrigasyon en az 30 dakika sürdürülmelidir. Göz maruziyetinde, 1 litre izotonik solüsyon ile irrigasyonun, epitel hasarı ve korneal inflamasyonda azalma sağladığı, irrigasyona kalsiyum glukonat eklenmesinin de yararlı olabildiği bildirilmektedir (87).

Deri lezyonlarında ilk basamak bol su ile irrigasyon olup (88), bazı protokollerde bunu sodyum bikarbonat ile irrigasyonun izlemesi önerilmektedir. Ardından florür iyonunun nötralizasyonu için lokal kalsiyum uygulamalarına geçilir. Sınırlı, yüzeysel yanıklarda topikal %2,5'lik kalsiyum glukonat jel tedavisi ilk tercih olup, deriye kalsiyum geçişinin sınırlı olması nedeniyle bu yaklaşım daha çok erken ve yüzeysel lezyonlarla sınırlıdır. Daha derin ve ağırlı yanıklarda, %10'luk kalsiyum glukonatin yaklaşık 0,5 mL/cm² olacak şekilde subkütan infiltrasyonu önerilmektedir. Geniş veya el gibi fonksiyonel açıdan kritik alanlardaki ciddi maruziyetlerde, lezyonun anatomisine uygun arterden (örneğin radyal, ulnar, brakial) yerleştirilen kateter aracılığıyla kalsiyum solüsyonlarının intraarteriyel infüzyonu da uygulanabilmektedir (89).

Inhalasyon yoluyla maruziyette hastanın pulse oksimetre ile yakından monitörizasyonu, gerekirse nemlendirilmiş oksijen verilmesi ve laringeal ödem,

pulmoner ödem, pnömoni gibi komplikasyonlar açısından tekrarlayan klinik değerlendirme gereklidir. Florürün Ca^{2+} ve Mg^{2+} ile bağlanmasına bağlı gelişen hipokalsemi ve olası kardiyak ritim bozuklukları nedeniyle HF maruziyeti olan tüm hastaların hastaneye yatırılması, EKG ile izlenmesi ve elektrolit düzeylerinin takip edilmesi önerilmektedir. Hipokalsemi tedavisinde, klinik durum ve laboratuvar bulgularına göre intravenöz yolla %10'luk kalsiyum glukonat uygulanır; gerekirse infüzyon tekrarlanabilir (90). Böylece hem lokal doku hasarının ilerlemesi hem de potansiyel olarak ölümcül sistemik florür toksisitesinin önüne geçilmesi amaçlanmaktadır.

2.7. Eksozom

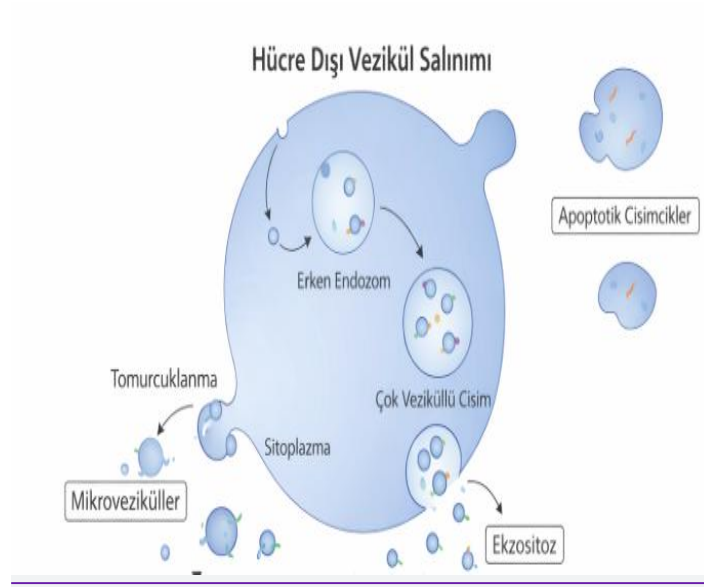
1983' te Pan ve arkadaşları tarafından retikülosit olgunlaşması sırasında tanımlanan eksozomlar (91), çeşitli mezenkimal kök hücrelerden köken alan yaklaşık 30–150 nm boyutunda nanoveziküllerdir. Eksozomlar; immünositler, nöronlar, çeşitli kanser hücreleri, epitelyal hücreler, osteositler, miyositler gibi çok çeşitli memeli hücre tiplerinden salgılanabilmektedir. Ayrıca eksozomlar; tükürük, plazma sıvısı, lenf sıvısı, idrar, semen ve anne sütü gibi vücut sıvılarına dağılmış olarak bulunabilmektedir (92).

Hücre içinde multiveziküler cisimciklerde üretilen eksozomlar, ekzositoz yoluyla hücre dışına salınırlar.

2.7.1. Eksozom Biyosentezi

Eksozomlar; multiveziküler cisim (MVB) membranının içe doğru tomurcuklanmasıyla oluşan geç endozomlardan sürekli olarak üretilmektedir. Geç endozomal membranın içeri doğru kıvrılması, büyük multiveziküler (MVB) cisimcikler içerisinde intralüminal veziküllerin (ILV) oluşmasıyla sonuçlanır. Bu süreç içerisinde belirli proteinler içeri doğru kıvrılan (invajinasyon) membrana dahil edilirken, geride kalan sitozolik bileşenler ise intralüminal veziküller (ILV) tarafından sarılır ve çevrelenir. Bu intralüminal veziküllerin (ILV) plazma membranıyla füzyonu sonrasında hücre dışı boşluğa salınması meydana gelir ve bu yapılara eksozom adı verilmektedir. Alternatif olarak ise bu bileşenler bozunma amaçlı lizozomlara taşınabilmektedir (93).

Bahsedilen bu süreçler 2 şekilde gerçekleşebilir. Birincisi çeşitli molekülleri intralüminal veziküllere (ILV) taşımak ve kapsüle etmek amacıyla taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (ESCRT) bağımlı yoldur. Bir diğeri ise bu yolağa ihtiyaç duymayan taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (ESCRT) bağımsız yoldur (94).



Şekil 12: Eksozom biyosentezi (95)

(Bu şekil, Kowal ve ark. (2014) esas alınarak yeniden çizilmiştir.)

Ubiquitinlenmiş proteinleri tanıyan en iyi tanımlanmış ve karakterize edilmiş yolak taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (ESCRT) bağımlı yolak olmuştur. ESCRT, 4 farklı protein kompleksinden oluşmaktadır: ESCRT 0-3 ve ilişkili AAA ATPase Vps4 kompleksi. ESCRT-0 alt birimi ubiquitin bağımlı bir şekilde kargo kümelenmesinden sorumludur. Bu alt birim internalizasyonu sağlamak için ubiquitinlenmiş proteinlere ve klatrine ihtiyaç duymaktadır. İntralüminal vezikül (ILV) oluşumundan önce ESCRT-1 ve ESCRT-2 alt birimleri invajinasyon sürecini tetikler ve kargo proteinlerinin enzimatik deubiquitinasyonunu artırır. ESCRT-3 alt birimi ise vezikül bölünmesini modüle etmekte ve diğer aksesuar proteinler (VPS4 ATPase gibi) ESCRT makine sistemini ayırmak ve geri dönüştürmek üzere hareket etmektedir (96).

Bir diğer yol ise ECRT bağımsız yolaktır. Bazı önemli ESCRT bileşenlerinin ortadan kaldırılması, multiveziküler cisimlerin (MVB) hatalı oluşmasına sebep olur fakat bu hatalı cisimler tamamen ortadan kalkmaz. Bu da ESCRT bağımsız bir başka yolak olduğunun göstergesidir. Bu süreçte lizobisfosfatidik asit (LBA), seramidler, tetraspaninler ve ısı şok proteinleri (HSP) gibi çeşitli lipid içerikli moleküller yer alır. Bu yolda oluşan veziküller, lipid ve kargo bölgelerinin kendi kendine organize olmasıyla oluşmaktadır. Proteolipid protein (PLP), kolesterol, fosfolipaz D2 (PLD2) gibi lipidler, ECRT inhibisyonu sonrası eksozom membranlarını zenginleştirmektedir. ESCRT-bağımsız yolakta eksozom biyogenezi sürecinde belirli lipidlerin ve

membran bileşenlerinin rol oynadığı, bu bileşenlerin farklı hücre tiplerinde eksozom oluşumuna katkıda bulunabildiği bildirilmiştir (97).

2.7.2. Eksozomların Fonksiyonları

Eksozomlar, bağışıklık cevabında kolaylaştırıcı etki gösterme ve antijen sunucu rolde önemli etkileri olduğu anlaşılmış molekülüdür. Ayrıca pıhtılaşma, inflamasyon ve anjiyogeneze de rol aldığı bilinmektedir. Trombositlerin aktivasyonu sonrası, eksozomlar ve diğer mikroveziküler moleküller ortama salgılanır. Eksozomların pıhtılaşma üzerine direkt rol oynamamakla birlikte çeşitli hücrelerin göçünde kemoatraktan sinyaller üreterek etkili olduğu görülmüştür. Emzirme dönemindeki insan sütünde bulunan ve immün regülasyonda önemli bir rol oynayan eksozomlardaki mi-RNA seviyelerinde ilk 6 aylık dönemlerde belirli artış, sonrasında ise azalma gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda eksozomların sadece sinyal molekülü olarak görev yapmakla kalmayıp çeşitli alıcı hücreleri özel olarak hedef alarak protein alışverişinde bulunduğu gözlenmiştir.

Eksozomların ayrıca çeşitli nükleik asit moleküllerin iletimi ve kargosunda görev aldığı bilinmektedir. Özellikle vücuttaki uzak mesafelerde hücreden hücreye iletişimde kilit rol almaktadır. Buna benzer şekilde virüs ve prion gibi çeşitli patojenlerin vücuda yayılmasında rol almaktadır.

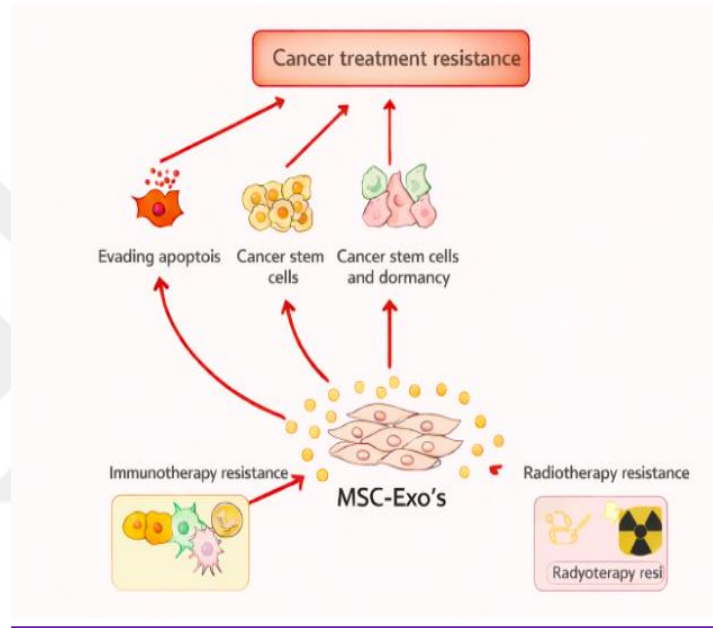
Eksozomlar; tanısal biyobelirteçler olarak kullanılabilme potansiyelleri, terapötik ajanların hedef hücrelere taşınması, immün yanıtların düzenlenmesi ve kanser ile inflamatuvar hastalıklar başta olmak üzere çeşitli patolojik süreçlerde olası tedavi yaklaşımları açısından değerlendirilmektedir (98).

Özellikle adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerden üretilen eksozomların (ADSC-Exo) cilt yaralarının tedavisinde ve onarımında etkin rol aldığı son dönemde popüler hale gelen konulardandır. İmmün cevabın regülasyonu ve inflamasyonda, anjiyogenezin indüklenmesinde, proliferasyonun ve deri hücrelerinin reepitelizasyonunun hızlandırılmasında, kollajen remodelinginin regülasyonunda ve skar dokusunun hiperplazisinin inhibe edilmesinde bu tip eksozomların önemli rol oynadığı bilinmektedir (99).

2.7.2.1. Adipoz Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Fonksiyonları

Çeşitli kök hücrelerin arasında, adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerin (ADSC) bolluğu ve yağ hücrelerinden elde edilme verimliliğinin yüksek olması; ayrıca kemik iliği aspirasyonu gibi zahmetli işlemlere gerek duymadan elde edilebilmesi sebebiyle ve daha basit, zahmetsiz ve daha az invaziv metodlarla elde edildiğinden en umut verici tip olarak kabul görmektedir. Ve dahası adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerin birden fazla

hücre tipine farklılaşma yeteneği, potansiyelini artırmakta ve çeşitli rejeneratif uygulamalarda kullanılabilmesine imkan sağlamaktadır. Rejeneratif özelliklerini; anjiyogenezi ve doku iyileşmesini indükleyen çeşitli büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınmasıyla gösterebilmektedir. Adipoz dokudan elde edilen kök hücreler (ADSC) ayrıca allojenik transplantasyonları mümkün kılan, bağışıklık reddi gibi durumların riskini azaltan düşük immünojenik özelliği ile immünomodülatör etki gösterebilmektedir. Düşük maliyetle in-vitro kolayca kültürlenebilen, uzun süre genetik stabilitesini koruyabilen ve olgun dokulardan elde edildiği için etik sorun teşkil etmeden çeşitli rejeneratif süreçlerde etkin bir şekilde kullanılabilen hücrelerdir (100).



Şekil 13: Mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların fonksiyonları (101)

(Bu şekil, Gimble ve ark. (2007) esas alınarak yeniden çizilmiştir.)

İyileşme sürecinde dokuların yeterli perfüzyona sahip olması çok önemlidir. Anjiyogenezi; FGF, TGF ve VEGF-A gibi anjiyojenik faktörler tarafından aracılık edilen, yara iyileşmesinin erken aşamalarında optimum perfüzyonu sağlamak için gerekli olan olaydır. Eksozomların, miR-30b gibi kargolarla anjiyogenezi kolaylaştıran, pro- anjiyomiRNA miktarını artıran ve bu sayede anjiyogenetik sinyallerin ve hücreye kan akımının artırılmasını sağlayan etkileriyle anjiyogeneizde büyük rol oynadığı düşünülmektedir (102).

Buna ek olarak insan adipoz kök hücre kaynaklı eksozomunda bulunan lncRNA MALAT1, yarada lokal olarak kullanıldığında FGF-2' ye benzer etki

göstermekte ve insan dermal fibroblast (HDF) aktivitesini ve göçünü artırarak iyileşmeyi uyaran bir etki göstermektedir (103).

Ayrıca MALAT1 adipoz kök hücre kaynaklı eksozomların bir diğer etkisi de Wnt/Beta katenin yolağı üzerinden hücre göçü, proliferasyonu, epitelizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillendirilmesi gibi birden fazla fonksiyon üzerinde rol oynamasıdır.

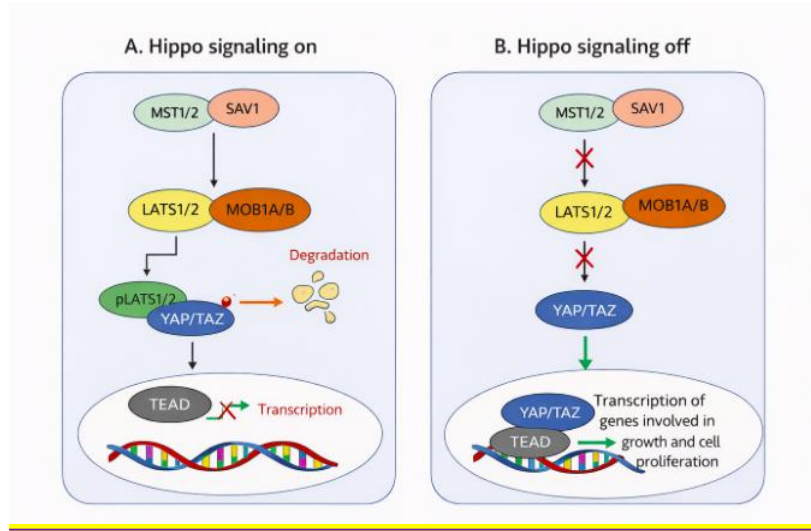
Adipoz kök hücre kaynaklı eksozomların rekonstrüktif plastik cerrahiye bir diğer katkısı da flep sağkalımı ve perfüzyonunu artırmakla ilgilidir. Hidrojen peroksit (H₂O₂) içeren ortamlarda yetiştirilen adipoz kök hücre kökenli eksozomların iskemi/reperfüzyon hasarına uğrayan fleplerde IL-6 ekspresyonunu uyarak flep hayatta kalmasına katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (104).

Umblikal kord kök hücre kaynaklı eksozomlarda yapılan bir diğer çalışmada ise bu hücrelerin makrofaj polarizasyonunda değişiklik yaratarak; M1 hücre tipi sayısında azalma ve M2 hücre tipinde artma ve bunun aşırı inflamatuvar yanıtta azalmayla sonuçlanabileceği gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada makrofaj fenotipinin değiştirilmesi dışında bu eksozomların TNF-alfa, MIP-1alfa, Interferon Gama ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin down regülasyonu yoluyla yara iyileşmesini iyileştirebilme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır (105).

Ek olarak, mezankimal kök hücre kaynaklı eksozom ve secretome bileşenlerinin taşıdığı büyüme faktörleri (ör. FGF-2, VEGF-A, HGF ve PDGF-BB) parakrinal mekanizmalarla keratinosit göçü, hücre dışı matriks yeniden şekillenmesi ve fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşması dahil olmak üzere yara iyileşmesi süreçlerini olumlu yönde etkileyebilir (106).

Weaver ve Patton'un raporunda Argonaute-2 (AGO2)'nin miRNA hedeflerine bağlanmasında kritik bir RISC bileşeni olduğu ve hücre dışı veziküllerle ilişkili olabileceğinin tartışıldığı belirtilmiştir; bu durum eksozomal kargoların seçilimi ve fonksiyonel etkileri üzerine ileride yapılacak çalışmalarda önemli bir hipotez oluşturabilir (107).

Yara iyileşmesinin erken evrelerinde hücreler düşük yoğunlukta iken eksozomal Wnt4' ler cilt hücrelerindeki Beta-Katenini aktive eder ve bu da proliferasyon ve migrasyonu artırır. Aynı zamanda vasküler endotelial hücreleri uyarak anjiyogenezi stimüle eder. Yara iyileşmesinin ilerlemesiyle beraber hücre yoğunluğu yükselir, hücre-hücre etkileşimleri Hippo sinyalini tetikleyerek hücreleri p-LATS molekülüyle doldurur. Eksozomlardan salınan 14-3-3 Zeta molekülü YAP ve LATS moleküllerinin birleşmesini tetikleyen bir masa görevi görür. YAP molekülünün fosforilasyonu gerçekleşince, fosforile olmuş YAP nükleer translokasyondan ziyade hücre içinde artarak gen ekspresyonunu azaltıp hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu azaltır. Eksozomlar yara iyileşmesinin farklı evrelerinde dinamik bir düzenlemeye aracılık ederler. Erken evrelerde yara iyileşmesini hızlandırıcı etki gösterip, geç evrede aşırı proliferasyonu ve yara izini önleyen bir fren görevi görmektedir.



Şekil 14: Eksozomların yara iyileşmesinde dinamik düzenleyici rolü (108)

(Bu şekil, Piccolo ve ark. (2014) esas alınarak yeniden çizilmiştir.)

2.7.3. Eksozom İzolasyon Metodları

Eksozomların günümüzde klinik kullanım alanlarının yaygınlaşması ve potansiyel etki gücünün öneminin anlaşılması, bu moleküllerin çoğaltılabilir izolasyonu ve fonksiyonel işlevlerinin belirtilebilmesi tedavi edici çerçevede daha etkin bir kullanım sunacaktır. Eksozomların boyut, içerik, işlev ve kaynak açısından farklılıkları onların izole edilmesinde büyük güçlük yaratmaktadır. Eksozomları izole etmekteki geleneksel teknikler ultrasantrifüjleme, boyuta dayalı yaklaşımlar, polimer çökeltme ve immünoafinitif yakalama teknikleri olarak sıralanabilir (109).

2.7.3.1. Ultrasantrifüjleme

Günümüzde en yaygın kullanılan teknoloji ultrasantrifüjlemedir ve araştırmaların yarısında bu metod kullanılmaktadır. Ultrasantrifüjlemenin prensibinde eksozom numuneleri arasındaki boyut ve yoğunluk farklılıklarından yararlanılarak sıralama yapmaktır. Fakat ultrasantrifüjleme yalnızca yakın boyut ve yoğunluktaki molekülleri ayırt edebildiği, eksozomları net bir şekilde ayırt edemediği unutulmaması gereken bir bilgidir. En yaygın metod olarak ultrasantrifüjleme; oturmuş teknolojisi, çok sayıda numuneyi ayırabilme özelliği ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptir. Ancak tüm

ayırma aşaması uzun sürmektedir (>4 saat) ve tekrarlanabilme özelliği zayıftır. Aynı zamanda birkaç tur santrifüjlemeye rağmen mevcut çökeltide hala saflık düşüktür(protein agregatları, virionlar, hücre içi organeller vb bulunur) ve bu da sonraki yapılacak olan kütre spektrometrisi ve protein kantitasyonu sonuçlarını etkileyebilmektedir. Son olarak yüksek hızda yapılacak santrifüjleme eksozomlara zarar verip biyolojik aktivitelerini azaltabilmektedir (110).

2.7.3.2. Polimer Çöktürme

Çözülebilirliklerini ve dağılılırliklerini değiştirerek, eksozomların biyolojik sıvılarda çöktürülmesini amaçlayan metottur. Bu amaçla Polietilen Glikol (PEG) gibi suyu dışlayan polimerler kullanılmaktadır. Suyu dışlayan polimerler, su moleküllerini bağlayarak diğer daha az çözünen maddeleri çözeltiden dışarı atar. Numuneler genellikle 8000 Da moleküler ağırlığa sahip PEG molekülleriyle inkübe edilirler. 4 santigrat derecede bir gecelik inkübasyon sonrası eksozomları içeren bu çökelti düşük hızlı santrifüjleme veya filtrasyon yoluyla izole edilirler. Eksozom polimer çöktürmesi kullanımı kolay, herhangi bir özel ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir. Bu klinik kullanımda mevcut diğer teknolojileri kullanarak daha kolay entegrasyonu sağlar ve büyük örneklem sayılarında kullanılabilir. Polimer bazlı çöktürmenin büyük dezavantajı ise proteinler ve büyük polimerik materyallerin eksozom dışı kontaminan olarak çökmesidir. Bu da saflık ve yeniden kazanım oranlarını düşürmekte ve yanlış pozitif oranlarını artırabilmektedir. Ayrıca üretilen polimerin çıkartılma işlemi zahmetlidir ve sonraki deneyler için kullanışlı olmayabilir (111).

2.7.3.3. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC)

Boyut dışlama kromatografisinde (SEC), farklı boyuttaki proteinleri sınıflandırır gibi eksozomların diğer ekstrasellüler veziküllerden (EV) izole edilmesi hedeflenmektedir. Bu bir kolonun küçük partiküllerin geçebileceği bir sabit fazla doldurulması ve bu küçük partiküllerin tüp boyunca hareketini yavaşlatarak daha büyük partiküllerden daha sonraki bir gradiyente temizlenmesine (elüe edilmesine) sebep olur. Tipik olarak boyut dışlama kromatografisi (SEC), eksozom ekstraktının ultrasantrifüjleme ile zenginleştirildikten sonra yeniden süspanse edilmesi ve daha sonra SEC kullanılarak daha fazla saflaşmanın sağlanması şeklinde uygulanır. SEC metodu vezikülün yapısını, bütünlüğünü ve biyolojik aktivitesini korumakla birlikte kolay ölçeklendirilebilir değildir ve daha yüksek verimli uygulamalarda kullanılamamaktadır(verimi düşüktür). Uygulaması hızlı, kolay ve maliyeti düşüktür (112).

2.7.3.4. Ultrafiltrasyon

Boyuta dayalı izolasyon tekniklerinden bir tanesi de ultrafiltrasyondur. Belirli büyüklükte gözeneklere sahip bir filtreden sıvıların filtrelmesi şeklinde bir prosedürdür. 0.8 , 0.45 , 0.22 ve bazen 0.1 mikrometre boyutundaki gözenek çaplı filtrelerden eksozom çözeltisinin birkaç ardışık aşamada filtrelmesini içerir ve bu filtrelenen sıvıdan daha büyük partiküllü moleküllerin kademeli olarak uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Ultrafiltrasyon metodu; morfoloji ve parçacık sayısı, eksozomal olmayan proteinlerle kontaminasyon olasılığı ve eksozom markerlarının prezentasyonu gibi özellikleri açısından ultrasantrifüjleme tekniğine benzer özellikler gösterir. Bu tekniğin avantajı; prosedürün özel ekipman ve beceri gerektirmeyecek şekilde basit olması, kısa süre içerisinde çok fazla sayıda numunenin incelenebilmesi ve saflaştırılmasına olanak sağlaması ve eksozomları kontamine edecek ek reaktiflerin oluşmasına izin vermemesidir. Tekniğin dezavantajı ise, eksozomları deforme edebilmesi ve filtrenin eksozomdan daha küçük boyuttaki sıvılarla kirlenme olasılığının olmasıdır. Ek olarak bazı eksozomal veziküller bu membran sebebiyle emilebilir, ki bu da düşük volümlerdeki numuneler için önem arz etmektedir. Kontamine edici moleküllerin filtrasyon sırasında kademeli olarak yoğunlaşması ve bu moleküllerin filtre gözeneklerini tıkaması sebebiyle saflık oranları düşebilir bu da eksozomların bir kısmının kaybedilmesine neden olabilir (113).

2.7.3.5. İmmünoafinitif Kromatografi (IAC)

Bazı spesifik proteinler, lipidler ve polisakkaritler eksozomların yüzeyinde bulunabilmektedir. Bu nedenle eksozomlar antijen-antikor spesifik tanıma ve bağlanma ilkesine göre ayrılabilirler. Eksozomların immünoafinite düzeyine göre etkili bir şekilde ayırabilmek için antikorun katı bir yüzeyde immobilize edilmesi gerekir. Bu amaçla manyetik boncuklar kullanılabilir. Ultrasantrifüjleme ile karşılaştırıldığında, immünoafinite tekniğiyle izole edilen eksozomlar en az iki kat daha fazla eksozomal marker ve protein içermekte ve bu da immünoafinite tekniğiyle izole edilen eksozomların daha yüksek verimlilikte ve spesifivitede olduğunu göstermektedir. Ultrasantrifüjlemenin tersine bu yöntem daha katı bir izolasyona yol açmaktadır, örneğin CD9+ eksozomların izolasyonu CD9- eksozomun dışlanmasına yol açabilir ve bu da verimi azaltabilmektedir. Ancak bu katı dışlama, daha yüksek bir saflık içerdiğinden ebeveyn hücrelerinin incelenmesinde elverişlidir ve bu durum bazı spesifik hastalıkların teşhisinde kolaylık sağlamaktadır. Genellikle antikor kullanımı neticesinde izolasyon süresi kısalmış, eksozom saflığı iyileşebilir ve bazı spesifik eksozomal bileşenlerin edinilmesini sağlayabilir. Ancak izolasyonun verimliliği antikorların spesifikliğı ve kalitesiyle ilişkilidir, ticari olarak kullanılan

immünoafinitif antikorların çoğu spesifik değildir. Ayrıca daha büyük örneklemde çalışılmak için daha pahalı antikorlar gerektiğinden yalnızca küçük örneklemli çalışmalarda kullanılması uygun görülmektedir.

2.7.3.6. Diğer Teknikler

Piyasada ticari olarak ExoQuick-TC , MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS, Minute™ Hi-Efficiency Exosome Precipitation Reagent, exoEasy Maxi kiti gibi izolasyon metodlarına dayanan kitler mevcuttur. Çeşitli firmaların ürettiği eksozom izolasyon kitleri sayesinde belli bir standardizasyona ulaşmak hedeflenebilir ve klinik kullanımda daha gerçekçi sonuçlara ulaşmayı sağlayabilir (114).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel tez çalışması için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 26.05.2025 tarih ve 49533702/326 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayını takiben Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'nden destek alınmıştır. Proje no: 25.TUS.009 çalışmaya, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı katkılarını sağlamıştır. Deney aşaması Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleşmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, 3-4 aylık ve 250-350 gram erkek Wistar-Albino rat (40 adet) kullanılmıştır. Deney süresince polikarbonat kafeslerde (her kafeste 12 adet olmak üzere), 12 saat aydınlık/12 saat karanlık odalarda ve 22 ± 0.5 °C sıcaklıkta ve uygun nemde barındırılmıştır. Ratlar, bazal rat besini ile beslenmiş deneklere ad libitum su verilmiştir. Bir haftalık adaptasyonu takiben çalışmaya başlanmıştır. Aşağıda yazılan şekilde denekler arasında rastgele 4 çalışma grubu oluşturulmuştur.

- ◆ 1.Grup Sham grubu (Serum Fizyolojik enjeksiyonu) (n=10)
- ◆ 2.Grup Magnezyum Sülfat uygulanan grup (n=10)
- ◆ 3.Grup Kalsiyum Glukonat uygulanan grup (n=10)
- ◆ 4.Grup Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom uygulanan grup (n=10)

3.2. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri ve ilaçlar;

- ◆ Temel cerrahi aletler (bistüri, bistüri sapı, portegü, penset vs)
- ◆ Steril cerrahi eldiven
- ◆ Steril enjektör
- ◆ Steril gazlı bez
- ◆ Tıraş makinesi

- ◆ Flaster
- ◆ Milimetrik cetvel
- ◆ Çizim kalemi
- ◆ Povidone-iodine
- ◆ Ketamin
- ◆ Ksilazin
- ◆ Hidroflorik Asit (HF)
- ◆ Serum fizyolojik
- ◆ Magnezyum Sülfat
- ◆ Kalsiyum Glukonat
- ◆ Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom
- ◆ Dijital kamera (Iphone 13 Pro-max)

Kullanılan İlaçlar

Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom İzolasyonu:

Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi'nden temin edilen rat adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH) 37°C su banyosunda çözündürülerek 75cm² 'lik hücre kültür kaplarına (TPP, İsviçre) ekildi. AD-MKH'ler, %1 antibiyotik (Biological Industries, ABD), %1 stabil L-glutamin (Biological Industries, ABD) ve %10 serum (Foetal Bovine Serum, Biological Industries, ABD) içeren bazal besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose, Biological Industries, ABD) içerisine 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo, Japonya) kültüre edildi.

AD-MKH'ler, %90'ın üzerinde yoğunluğa ulaşınca eksozom üretimi için hücrelerin besiyeri bir serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Serum içermeyen besiyeri eklenerek 24 saat sonunda hücrelerin sekretomları toplandı.

Toplanan sekretomdan ExoQuick-TC (#EXOTC50A-1, System Bio sciences, ABD) kiti kullanılarak eksozom üretimi gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre; toplanan sekretomlar 3000 x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek hücreler ve hücrelerden gelen atıklar dibe çöktürüldü. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve süpernatant hacminin 1/5'i olacak şekilde eksozom izolasyon solüsyonu eklendi. Vorteks yardımı ile homojenize edildi. Ardından +4°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hazırlanan karışım, 1500x g'de 30 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı ve pellet PBS ile resüspanse edildi.

Elde edilen eksozomların miktarı, deney hayvanlarına verilmeden önce, mikrovezikül ölçüm kiti (EXOCET Exosome Quantitation Assay- EXOCET96A-1 SBI, Amerika) yardımı ile belirlendi. Miktar tayini kit protokolüne uygun olarak çalışıldıktan sonra, Glomax Multi ELISA (Promega, ABD) absorbands okuyucuda 450 nm' de absorbands değerleri okundu. Standartlara göre eksozom miktarı hesaplandı.

Deney hayvanlarına uygulanacak miktar $0,9 \times 10^{10}$ partikül/ ml olarak belirlendi.

Kalsiyum Glukonat %10 (Adeka):

Etken Madde(ler): Kalsiyum glukonat monohidrat 225 mg/10 mL, Kalsiyum levulinat dihidrat 572 mg/10 mL'dir. Kalsiyum kas, sinir, iskelet sistemlerinin; hücre çeperi ve kapiller geçirgenliğinin fonksiyonel tamlığını sağlamada temel bir gereksinim maddesidir. Kalsiyum katyonu, birçok enzimatik reaksiyonlarda önemli aktivatördür. Ayrıca kan koagülasyonunda, solunumda, böbrek fonksiyonlarında, düz kasların, kalp ve iskelet kaslarının kasılmalarında, sinir uyarılarının iletilmesi gibi birçok süreçlerde gerekli olan bir maddedir. Kalsiyum ayrıca, sinir iletimlerinde, hormon salgılamada ve depolanmasında da; aminoasitlerin ve siyanokobalamin'in absorbe edilmesinde önemli bir rol oynar.

Piyasa Şekilleri: 10 mL'lik 50 ampul, 10 mL'lik 5 ampul içeren ambalajlarda.

Magnezyum Sülfat %15 (Biofarma):

Her 10 mL ampulde; Magnezyum sülfat 7 H₂O.1,5 g (12 mEq Magnezyum) Enjeksiyonluk su k.m.10 mL ihtiva eder. Magnezyum iyonu (Mg²⁺) intrasellüler sıvıda en çok bulunan ikinci katyondur. Birçok enzimin fonksiyonuna ko-faktör olarak katılır. Nörokimyasal impuls transmisyonu ve kas eksitabilitesinde önemli rol oynar. Etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Magnezyum miyotonik kramp, asetilkolin salıverilmesini inhibe ederek, nöromusküler iletimi baskılayabilir. Ayrıca düz kaslar üzerinde depresan etkisi olabileceği gibi, santral sinir sistemini de deprese edebilir. Antikonvülzan olarak terapötik serum konsantrasyonları 4-7 mEq/L'dir. Eliminasyonu plazma konsantrasyonuna ve glomerüler filtrasyon hızına bağlıdır. Magnezyum adenosintrifosfat (ATP) ve diğer nükleotid

trifosfatları substrat olarak kullanan enzimlerde ko-faktördür. mRNA'nın ribozomlara bağlanması ve ribozomların integritesi Mg^{2+} iyonu gerektirir. Total vücut magnezyumu (70 kg için) 100 mmol (2000 mEq) kadardır. Bunun % 50'si kemikte, % 45'i intrasellüler sıvıda, % 5'i de plazmada bulunur. Plazmadaki Mg^{2+} konsantrasyonu 1,6-2,6 mEq/L (0,8-1,2 mmol/L) arasında olup, bunun 2/3'ü iyonize (serbest), 1/3'ü proteine bağlıdır.

Piyasa Şekilleri: 10 mL'lik 100 ampul, 10 mL'lik 10 ampul içeren ambalajlarda

Serum Fizyolojik % 0,9 (Biofarma):

Sodyum klorür ampul diğer ilaçların rekonstitüsyonu için steril, stabil, apirojen ve izotonik olarak hazırlanmıştır. Çözücü olarak hemolize neden olmaz. Steril enjeksiyonluk su ile hazırlanır. pH 4,5-7,0 arasındadır. Koruyucu içermez.

Piyasa Şekilleri: Her 5 mL ampulde; Sodyum klorür 0.045 gr enjeksiyonluk su k.m. 5 mL ihtiva eder.

Ketamin HCl %5 (Pfizer):

Ketamin barbitürat türevi olmayan bir anesteziktir. İntravenöz ve intramusküler enjeksiyona uygun, hafif asidik (pH 3,5-5,5) steril bir solüsyon şeklinde formüle edilmiştir. Koruyucu olarak benzetonyum klorür içerir. Ketamin hızlı etkili bir genel anesteziktir. Derin analjezi, normal yutak-gırtlak refleksleri ve normal ya da hafif artmış iskelet kas tonusu ile karakterize bir anestezi hali meydana getirir. Kalp ve solunum sisteminde hafif uyarılma ve arasıra solunum depresyonu oluşur.

Piyasa Şekilleri: 1 mL'de 50 mg ketamin baza eşdeğer miktarda ketamin hidroklorür bulunan 10 mL'lik flakonlarda.

Ksilazin HCl %2 (Bayer):

Ksilazin, α 2-adrenerjik agonist etki gösteren bir sedatif, analjezik ve kas gevşeticidir. Barbitürat türevi değildir ve özellikle veteriner anesteziğinde premedikasyon amacıyla yaygın şekilde kullanılır. İntramusküler ve intravenöz uygulamaya uygun, hafif asidik karakterde (pH 4,5–5,5) steril bir enjeksiyon solüsyonu şeklinde formüle edilmiştir. Preparat koruyucu olarak genellikle metilparaben veya üreticiye özgü başka bir antimikrobiyal ajan içerebilir.

Ksilazin, orta derecede sedasyon, belirgin kas relaksasyonu ve analjezi sağlayan farmakolojik bir etki profiline sahiptir. Solunum hızında hafif azalma, bradikardi ve periferik vazodilatasyon görülebilir. Anestezik ajanlarla kombine edildiğinde indüksiyon ve idameyi kolaylaştırır, ketamin ile birlikte kullanıldığında dengeleyici ve tamamlayıcı bir etki modeli oluşturur.

Piyasa Şekilleri: 1 mL'de genellikle 20 mg ksilazin içeren %2'lik steril enjeksiyon solüsyonları, 10 mL veya 50 mL'lik flakonlarda bulunur.

3.3. Yöntem

Deneklerin Gruplandırılması

Toplamda 40 adet olan deneklerde, % 37 HF uygulandıktan 1 dk sonra, 50 cc SF ile 5 dakika boyunca irrigasyon sağlanmıştır. Sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır. İlk gruba (Grup 1-Sham) subkütanöz olarak (0,1 mL/cm²) serum fizyolojik enjekte edilmiştir. İkinci gruba (Grup 2) subkütanöz olarak % 15'lik magnezyum sülfat (0,1 mL/ cm²) enjekte edilmiştir. Üçüncü gruba (Grup 3) subkütanöz olarak kalsiyum glukonat (0,1 mL/ cm²) enjekte edilmiştir. Dördüncü gruba (Grup 4) subkütanöz olarak adipoz mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozom (0,1 mL/ cm²) enjekte edilmiştir.

3.3.1. Cerrahi Yöntem

Cerrahi öncesi anestezi amacıyla sıçanlara intramusküler yolla 13mg/kg Ksilazin HCl ve 87 mg/kg Ketamin HCl verildi. Wistar-Albino cinsi, ortalama

250-350 gr ağırlıkta, erişkin erkek sıçanlarda, genel anestezisi sağlandıktan 5 dk sonra deneysel aşamaya geçildi. Sıçanların sırt bölgelerinde 2x2 cm'lik alan jilet makinesi ile tıraş edildi. Bunu takiben kıllardan arındırılmış olan bu bölge derisine % 37'lik HF doğrudan damlatıldıktan sonra, pipetle kılsız alana yayıldı. 2x2 cm boyutunda plastik kapak yara yerini sınırlandırmak için kullanıldı. 5 dakika süre ile asidin etki etmesi beklendikten sonra, gruplarda planlanan işlemler her gruba ayrı ayrı sırası ile gerçekleştirildi. Tedavi sonrası herhangi bir topikal madde içermeyen kuru gazlı bezler ile yara yeri kapatılmıştır. Deneklerin yara yerlerinin 10 cm uzaklıktan, günlük planimetrik olarak çekilen fotoğraflar ile herbir denekteki yanık alanı analiz edilmiştir. Dikdörtgen biçiminde 0,5x1 cm 24-72-168. saatlerde insizyonel biyopsi alınmıştır. Bu dokular 24-72-168. saatlerde histopatolojik değerlendirmeye alınmıştır. Deri dokusu %4 paraformaldehit ile fikse edildikten sonra, standart işlemler sonrası, hemotoksilen-eozin ile boyanmış ve ışık mikroskobu altında 10x4, 10x10, 10x20, 10x100'lük büyütmelemlerle bütün preparatlar; derideki yara yeri iyileşmesi bulguları açısından histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Görüntü Analizi

Yanık lezyonlarının değerlendirilmesi ImageJ yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Tüm fotoğraflar sabit ışık altında, sabit kamera mesafesi korunarak ve referans ölçek içerecek şekilde kaydedilmiştir. Görüntüler programa aktarıldıktan sonra piksel-santimetre dönüşümü için ölçek ayarı yapılmıştır. Nekrotik alan, eritem alanı ve toplam yanık alanı her görüntüde serbest çizim aracı ile sınırlandırılmış ve ölçümler santimetrekare cinsinden elde edilmiştir. Her fotoğraf üç kez ölçülmüş ve ortalama değerler analizlerde kullanılmıştır.





Resim 1-2: Hayvan üzerinde yanık alanlarının oluşturulması ve oluşan yanık alanının görüntüsü



Resim 3: Yanık alanının her bir kenarına yapılan subkütan ilaç enjeksiyonları



Resim 4-6: Grup 1'in sıfırıncı saatte eritem, nekroz ve yanık alanı (cm²) hesaplarından örnekler

3.3.2. Histopatolojik İnceleme

Histolojik Doku Takibi

Operasyon sırasında alınan deri biyopsileri, formalin solüsyonu içine alındı. Fiksasyonun ardından, deri biyopsileri ikiye ayrılarak kasetlere yerleştirildi. Histolojik işlem için otomatik doku işleme cihazı (Leica TP1050) kullanılarak doku işleme yapıldı ve dokular parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler, hematoksilin-eozin boyaması için standart lamalar üzerine yerleştirildi. İmmünohistokimya ve TUNEL metodlarının uygulanması amacıyla polilizin kaplı lamalar üzerine alındı.

Histokimyasal Boyama

Normal lam üzerine alınan kesitler Hematoksilin Eozin boyama ile boyandı. Bu boyama için aşağıdaki işlemler uygulandı. Deparafinizasyon. Dokular parafinden temizlenmeleri için bir gece 65 0C lik etüvde bekletildi. 2 saat Xylene solüsyonunda bekletilerek preparatlar temizlendi. Rehidratasyon. Saf alkolde 1 dakika. Sırasıyla %90, %80, %70 alkolde 1 dakika bekletildi. Çeşme suyunda yıkama yapıldı. Hematoksilinle 4 dakika boyandı. Akarsuda bolca yıkandı. .Eozin 1,5 dakika boyandı. Dehidratasyon işlemi sırasıyla %70 alkolde yıkama, %80 alkolde yıkama, %90 alkolde yıkama yapıldı. Saf alkolde yıkama. Ksilen solüsyonunda bekletildi. Ve son olarak Entellan ile kapatıldı. Görüntüler (Olympus BX53; Olympus, Tokyo, Japan) mikroskobu altında analiz edilecek. 10 farklı alanda histopatolojik skor verilecek. Bu skora 0: hasar yok, 1: az hasarlı, 2: orta şiddetli, 3: çok hasarlı olarak değerlendirilecek. Skora kriterlerinde hücresel inflamasyon, hemoraji ve nekrotik alanlar kriter olarak alındı.

3.3.3. İmmünohistokimya

Deri; TNF- α (sc-52746), VEGF (sc-152) ve PCNA (sc-56) immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin- peroksidaz yöntemi immünohistokimyasal olarak uygulandı. Parafin bloklardan alınan 5 μ m kalınlığındaki kesitler 1 gece 60 ° C' de etüvde bekletildi daha sonra ksilen ve azalan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra distile su ile yıkandıktan sonra sitrat tamponu ile antijen geri kazanımı için muamele edildi. PBS ile yıkandıktan sonra Hidrojen peroksit uygulaması yapıldı. Bundan sonraki işlemler Large Volume Detection System kiti kullanılarak yapıldı. Bundan sonra 5 dakika serum blok uygulaması yapıldı. Serum bloktan sonra Primer Antikor olarak TNF- α , VEGF ve PCNA + 4 ° C' de bir gece uygulandı. Primer antikor uygulamasından sonra Biotinli sekonder streptavidin- HRP ve DAB kromojeni uygulandı, sonra Gill Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Son olarak dereceli artan alkol serilerinden ve ksilenden geçirip entellan ile kapatıldı. Prepratlerden alınan görüntülerden 10 farklı alandan immünreaktivite ölçümü için skor verildi. Bu skorlama şu şekilde yapıldı ;

- 0: boyanma yok
- 1: az boyanma var
- 2: orta şiddetli boyanma var
- 3: şiddetli boyanma var

3.3.4.Tunel

Apoptozu saptamak için in situ apoptoz saptama kiti (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore, S7101, ABD, Burlington MA) kullanıldı. 5 grubun deri örneklerinin parafin bloklarından kesitler (5 μ m) kesildi. Kesitler ksilende deparafinize edildi, rehidre edildi ve 20 μ g/mL proteinaz K ile 10 dakika inkübe edildi ve distile su ile durulandı. Endojen peroksidaz aktivitesi %3 hidrojen peroksit ile inhibe edildi. Kesitler, 10-15 saniye denge tamponu ve TdT enzimi ile nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra 10 dakika oda sıcaklığında önceden ısıtılmış çalışma gücünde durdurma/yıkama tamponuna konuldu ve 45

dakika antistreptavidin-peroksidaz ile inkübe edildi. Boyama, DAB ile yapıldı ve çekirdekler, Mayers hematoxilen ile karşıt boyandı.

3.4. İstatistik

Tüm istatistiksel analizler Mac için GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA) kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normalliği D'Agostino–Pearson Omnibus testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerde gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile incelendi; anlamlılık saptandığında çoklu karşılaştırmalar Tukey post-hoc testi ile yapıldı. Tüm veriler normalleştirilmiş ölçümlerin ortalaması $\pm$ ortalamanın standart sapması şeklinde sunuldu. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Yanık Alanı Analiz Sonuçları:

Grup 1 (Sham), grup 2 (Magnezyum Sülfat), grup 3 (Kalsiyum Glukonat), grup 4 (Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom)'te bulunan tüm denekler (n=32) her grupta 8'er adet olacak şekilde bölündü. ImageJ programı yardımıyla 0. saat, 24. saat, 48. saat, 72. saat, 96. saat, 120. saat, 144. saat ve 168. saatte planimetrik olarak 10 cm mesafeden çekilen fotoğraflar ile yanık alanının boyutu, eritem ve nekroz verileri toplandı (Tablo 1-4).

Deney süreci boyunca hiçbir grupta bül oluşumu gözlenmemiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, her gruptan ikişer hayvanın anesteziye bağlı komplikasyonlar nedenlerle kaybedildiği tespit edilmiştir. Bu kayıplar, deneysel protokolün genel seyrini etkilemeyecek şekilde değerlendirilmiş ve analizler kalan örneklem üzerinden tamamlanmıştır.

Hayvan	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Rat 1	E:1.13	E:1.11	E:1.11	E:1.09	E:1.08	E:1.07	E:1.06	E:1.05
	N:1.29	N:1.34	N:1.36	N:1.34	N:1.31	N:1.27	N:1.24	N:1.21
	A:4.03	A:4.07	A:4.04	A:4.02	A:4.00	A:3.97	A:3.94	A:3.92
Rat 2	E:1.10	E:1.08	E:1.07	E:1.06	E:1.05	E:1.04	E:1.03	E:1.02
	N:1.32	N:1.35	N:1.37	N:1.35	N:1.31	N:1.28	N:1.25	N:1.22
	A:4.12	A:4.11	A:4.08	A:4.06	A:4.04	A:4.01	A:3.99	A:3.96
Rat 3	E:1.17	E:1.16	E:1.15	E:1.14	E:1.13	E:1.12	E:1.10	E:1.10
	N:1.26	N:1.30	N:1.32	N:1.30	N:1.27	N:1.25	N:1.21	N:1.19
	A:3.98	A:3.96	A:3.95	A:3.94	A:3.92	A:3.90	A:3.88	A:3.86
Rat 4	E:1.09	E:1.08	E:1.07	E:1.06	E:1.05	E:1.04	E:1.03	E:1.02
	N:1.34	N:1.38	N:1.40	N:1.37	N:1.33	N:1.30	N:1.26	N:1.24
	A:4.23	A:4.21	A:4.18	A:4.17	A:4.14	A:4.12	A:4.09	A:4.07
Rat 5	E:1.21	E:1.20	E:1.19	E:1.17	E:1.16	E:1.15	E:1.14	E:1.13
	N:1.28	N:1.31	N:1.33	N:1.31	N:1.28	N:1.25	N:1.22	N:1.19
	A:4.00	A:3.98	A:3.96	A:3.95	A:3.94	A:3.92	A:3.90	A:3.87
Rat 6	E:1.14	E:1.13	E:1.12	E:1.11	E:1.10	E:1.09	E:1.08	E:1.07
	N:1.35	N:1.38	N:1.40	N:1.38	N:1.34	N:1.30	N:1.27	N:1.24
	A:4.19	A:4.17	A:4.14	A:4.12	A:4.10	A:4.07	A:4.04	A:4.02

Rat 7	E:1.09 N:1.23 A:3.89	E:1.08 N:1.25 A:3.88	E:1.07 N:1.27 A:3.86	E:1.06 N:1.25 A:3.85	E:1.05 N:1.23 A:3.83	E:1.04 N:1.20 A:3.81	E:1.03 N:1.18 A:3.79	E:1.02 N:1.15 A:3.77
Rat 8	E:1.19 N:1.30 A:4.06	E:1.17 N:1.34 A:4.04	E:1.16 N:1.36 A:4.03	E:1.15 N:1.33 A:4.01	E:1.14 N:1.30 A:4.00	E:1.13 N:1.26 A:3.98	E:1.12 N:1.24 A:3.96	E:1.11 N:1.21 A:3.94
Ortalama	E:1.14 N:1.30 A:4.06	E:1.13 N:1.33 A:4.05	E:1.12 N:1.35 A:4.03	E:1.11 N:1.33 A:4.01	E:1.10 N:1.30 A:4.00	E:1.09 N:1.26 A:3.97	E:1.07 N:1.23 A:3.95	E:1.07 N:1.20 A:3.93

E: eritem , N: nekroz , A: yanık alanı (cm²)

Tablo 1: Grup 1 ratların yanık alanı verileri (cm²)

Hayvan	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Rat 1	E:1.12 N:1.28 A:4.05	E:1.09 N:1.30 A:4.01	E:1.07 N:1.29 A:3.98	E:1.05 N:1.26 A:3.94	E:1.03 N:1.22 A:3.90	E:1.02 N:1.18 A:3.87	E:1.00 N:1.15 A:3.83	E:0.99 N:1.11 A:3.80
Rat 2	E:1.10 N:1.26 A:4.02	E:1.07 N:1.29 A:3.99	E:1.05 N:1.28 A:3.96	E:1.03 N:1.25 A:3.93	E:1.02 N:1.21 A:3.90	E:1.00 N:1.18 A:3.87	E:0.99 N:1.15 A:3.83	E:0.98 N:1.11 A:3.80
Rat 3	E:1.16 N:1.24 A:3.95	E:1.14 N:1.27 A:3.92	E:1.11 N:1.26 A:3.90	E:1.09 N:1.24 A:3.87	E:1.08 N:1.20 A:3.84	E:1.06 N:1.17 A:3.81	E:1.05 N:1.14 A:3.79	E:1.03 N:1.10 A:3.76
Rat 4	E:1.13 N:1.27 A:4.08	E:1.10 N:1.30 A:4.04	E:1.08 N:1.29 A:4.01	E:1.06 N:1.26 A:3.98	E:1.05 N:1.22 A:3.95	E:1.03 N:1.19 A:3.92	E:1.02 N:1.16 A:3.88	E:1.00 N:1.12 A:3.85
Rat 5	E:1.15 N:1.30 A:4.10	E:1.12 N:1.32 A:4.06	E:1.10 N:1.31 A:4.03	E:1.08 N:1.28 A:3.99	E:1.06 N:1.25 A:3.96	E:1.05 N:1.22 A:3.93	E:1.03 N:1.19 A:3.90	E:1.02 N:1.16 A:3.87
Rat 6	E:1.14 N:1.29 A:4.06	E:1.11 N:1.31 A:4.02	E:1.09 N:1.30 A:3.99	E:1.07 N:1.27 A:3.96	E:1.06 N:1.24 A:3.93	E:1.04 N:1.20 A:3.90	E:1.03 N:1.17 A:3.88	E:1.01 N:1.14 A:3.85
Rat 7	E:1.11 N:1.25 A:4.00	E:1.08 N:1.28 A:3.97	E:1.07 N:1.27 A:3.94	E:1.05 N:1.24 A:3.92	E:1.03 N:1.21 A:3.89	E:1.02 N:1.17 A:3.86	E:1.00 N:1.14 A:3.83	E:0.99 N:1.11 A:3.80
Rat 8	E:1.12 N:1.27 A:4.04	E:1.09 N:1.30 A:4.00	E:1.07 N:1.29 A:3.97	E:1.05 N:1.26 A:3.94	E:1.04 N:1.22 A:3.91	E:1.02 N:1.19 A:3.88	E:1.01 N:1.16 A:3.85	E:0.99 N:1.12 A:3.82
Ortalama	E:1.13 N:1.27 A:4.04	E:1.10 N:1.30 A:4.00	E:1.08 N:1.29 A:3.97	E:1.06 N:1.26 A:3.94	E:1.05 N:1.22 A:3.91	E:1.03 N:1.18 A:3.88	E:1.02 N:1.15 A:3.85	E:1.00 N:1.12 A:3.82

E: eritem , N: nekroz , A: yanık alanı (cm²)

Tablo 2: Grup 2 ratların yanık alanı verileri (cm²)

Hayvan	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Rat 1	E:1.12 N:1.26 A:4.05	E:1.08 N:1.28 A:4.00	E:1.06 N:1.27 A:3.97	E:1.04 N:1.24 A:3.93	E:1.03 N:1.20 A:3.89	E:1.01 N:1.17 A:3.86	E:1.00 N:1.14 A:3.83	E:0.98 N:1.10 A:3.79
Rat 2	E:1.10 N:1.25 A:4.01	E:1.07 N:1.27 A:3.98	E:1.06 N:1.26 A:3.96	E:1.04 N:1.23 A:3.92	E:1.02 N:1.19 A:3.90	E:1.01 N:1.16 A:3.87	E:0.99 N:1.12 A:3.83	E:0.98 N:1.09 A:3.81
Rat 3	E:1.16 N:1.23 A:3.94	E:1.12 N:1.25 A:3.90	E:1.10 N:1.25 A:3.88	E:1.08 N:1.22 A:3.85	E:1.07 N:1.18 A:3.83	E:1.05 N:1.15 A:3.80	E:1.04 N:1.12 A:3.77	E:1.02 N:1.09 A:3.75
Rat 4	E:1.14 N:1.25 A:4.02	E:1.11 N:1.27 A:3.98	E:1.09 N:1.26 A:3.96	E:1.07 N:1.23 A:3.93	E:1.05 N:1.20 A:3.90	E:1.04 N:1.16 A:3.87	E:1.02 N:1.13 A:3.85	E:1.01 N:1.10 A:3.82
Rat 5	E:1.15 N:1.26 A:4.07	E:1.12 N:1.28 A:4.04	E:1.10 N:1.27 A:4.00	E:1.08 N:1.24 A:3.98	E:1.06 N:1.21 A:3.94	E:1.05 N:1.17 A:3.92	E:1.03 N:1.14 A:3.88	E:1.02 N:1.11 A:3.85
Rat 6	E:1.14 N:1.25 A:4.05	E:1.11 N:1.28 A:4.02	E:1.09 N:1.27 A:3.99	E:1.07 N:1.24 A:3.96	E:1.06 N:1.21 A:3.93	E:1.04 N:1.17 A:3.90	E:1.03 N:1.14 A:3.87	E:1.01 N:1.11 A:3.85
Rat 7	E:1.11 N:1.24 A:4.00	E:1.09 N:1.26 A:3.97	E:1.07 N:1.25 A:3.94	E:1.05 N:1.22 A:3.92	E:1.04 N:1.19 A:3.89	E:1.02 N:1.15 A:3.86	E:1.01 N:1.12 A:3.83	E:0.99 N:1.09 A:3.81
Rat 8	E:1.12 N:1.24 A:4.03	E:1.09 N:1.26 A:4.00	E:1.08 N:1.25 A:3.97	E:1.06 N:1.23 A:3.94	E:1.04 N:1.19 A:3.91	E:1.03 N:1.16 A:3.88	E:1.01 N:1.13 A:3.85	E:1.00 N:1.10 A:3.83
Ortalama	E:1.13 N:1.25 A:4.02	E:1.10 N:1.27 A:3.99	E:1.08 N:1.26 A:3.96	E:1.06 N:1.23 A:3.93	E:1.05 N:1.19 A:3.90	E:1.03 N:1.16 A:3.87	E:1.02 N:1.13 A:3.84	E:1.00 N:1.10 A:3.81

E: eritem , N: nekroz , A: yanık alanı (cm²)

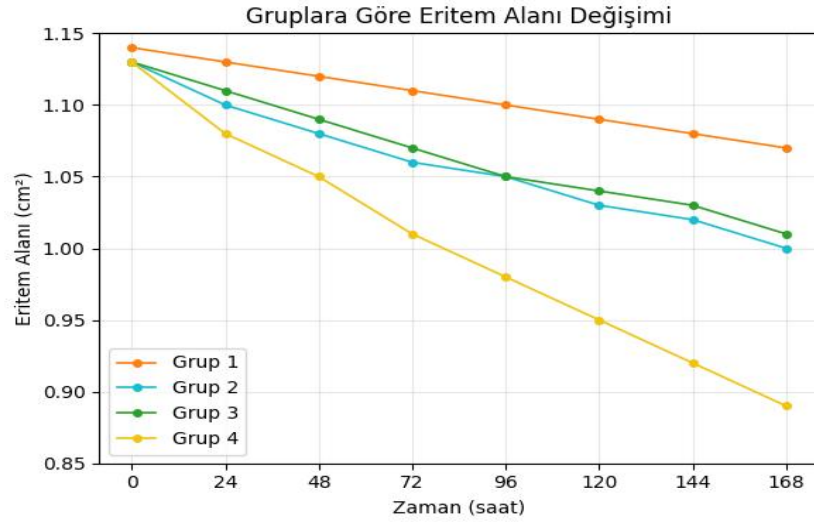
Tablo 3: Grup 3 ratların yanık alanı verileri (cm²)

Hayvan	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Rat 1	E:1.12 N:1.26 A:4.04	E:1.07 N:1.24 A:3.98	E:1.04 N:1.20 A:3.91	E:1.00 N:1.15 A:3.83	E:0.96 N:1.08 A:3.76	E:0.93 N:1.01 A:3.69	E:0.90 N:0.94 A:3.62	E:0.86 N:0.88 A:3.54
Rat 2	E:1.11 N:1.25 A:4.01	E:1.06 N:1.23 A:3.96	E:1.03 N:1.18 A:3.88	E:0.99 N:1.13 A:3.81	E:0.95 N:1.06 A:3.73	E:0.92 N:0.99 A:3.66	E:0.89 N:0.93 A:3.58	E:0.86 N:0.87 A:3.52
Rat 3	E:1.14 N:1.23 A:4.02	E:1.08 N:1.21 A:3.95	E:1.04 N:1.16 A:3.88	E:1.00 N:1.11 A:3.80	E:0.95 N:1.04 A:3.73	E:0.92 N:0.98 A:3.65	E:0.89 N:0.91 A:3.57	E:0.86 N:0.84 A:3.50
Rat 4	E:1.15 N:1.24 A:4.06	E:1.09 N:1.21 A:3.99	E:1.06 N:1.17 A:3.92	E:1.01 N:1.11 A:3.84	E:0.97 N:1.05 A:3.76	E:0.94 N:0.98 A:3.69	E:0.91 N:0.92 A:3.62	E:0.88 N:0.86 A:3.54
Rat 5	E:1.12 N:1.26 A:4.05	E:1.07 N:1.23 A:3.98	E:1.04 N:1.19 A:3.91	E:1.00 N:1.14 A:3.83	E:0.96 N:1.07 A:3.76	E:0.93 N:1.00 A:3.69	E:0.90 N:0.94 A:3.61	E:0.87 N:0.88 A:3.54

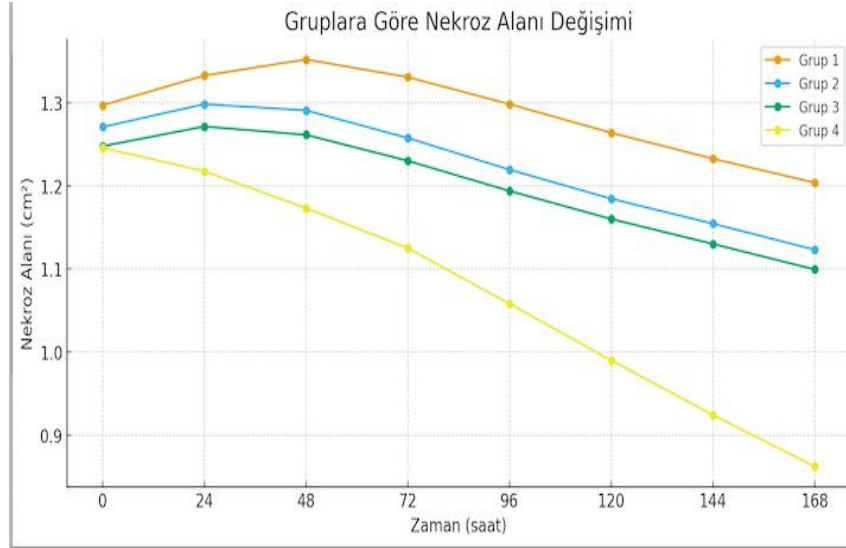
Rat 6	E:1.13 N:1.24 A:4.04	E:1.08 N:1.21 A:3.97	E:1.04 N:1.17 A:3.90	E:1.00 N:1.12 A:3.83	E:0.96 N:1.05 A:3.75	E:0.93 N:0.98 A:3.67	E:0.90 N:0.92 A:3.60	E:0.86 N:0.85 A:3.52
Rat 7	E:1.11 N:1.24 A:4.03	E:1.06 N:1.21 A:3.96	E:1.03 N:1.16 A:3.88	E:0.99 N:1.11 A:3.81	E:0.95 N:1.04 A:3.73	E:0.92 N:0.98 A:3.66	E:0.89 N:0.92 A:3.58	E:0.85 N:0.85 A:3.51
Rat 8	E:1.14 N:1.25 A:4.05	E:1.09 N:1.22 A:3.98	E:1.05 N:1.17 A:3.90	E:1.01 N:1.12 A:3.83	E:0.97 N:1.06 A:3.75	E:0.94 N:0.99 A:3.67	E:0.90 N:0.93 A:3.60	E:0.87 N:0.86 A:3.52
Ortalama	E:1.13 N:1.25 A:4.04	E:1.08 N:1.22 A:3.97	E:1.04 N:1.17 A:3.90	E:1.00 N:1.12 A:3.82	E:0.96 N:1.06 A:3.75	E:0.93 N:0.99 A:3.67	E:0.90 N:0.92 A:3.60	E:0.87 N:0.86 A:3.52

E: eritem , N: nekroz , A: yanık alanı (cm²)

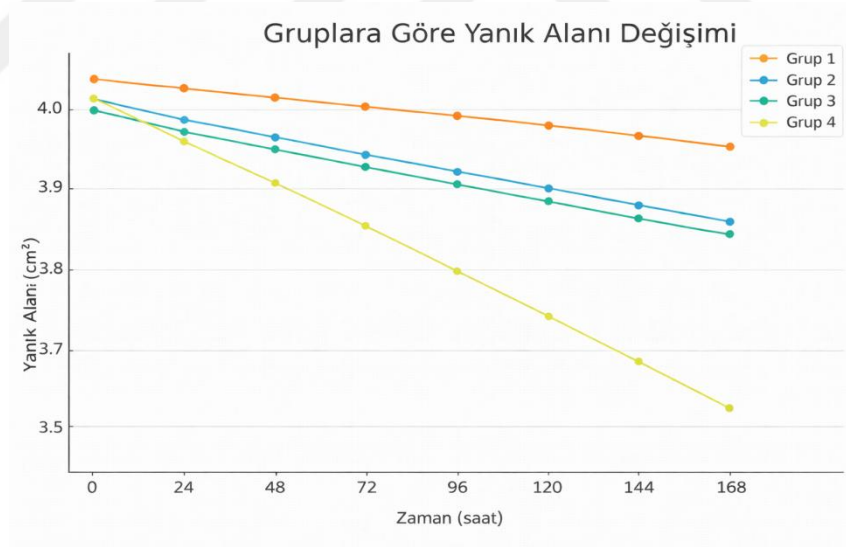
Tablo 4: Grup 4 ratların yanık alanı verileri (cm²)



Grafik 1: Gruplara göre eritem alanı değişimi



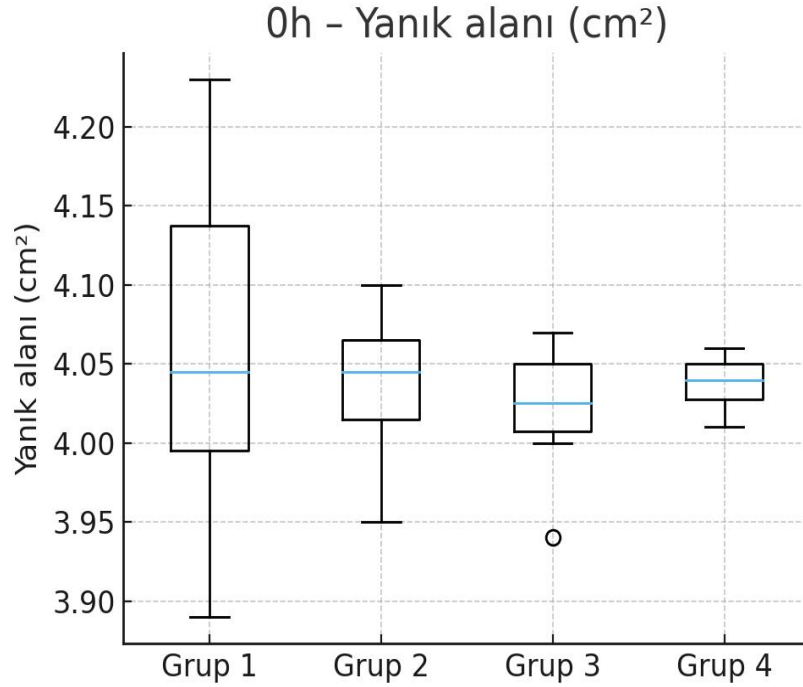
Grafik 2: Gruplara göre nekroz alanı değişimi



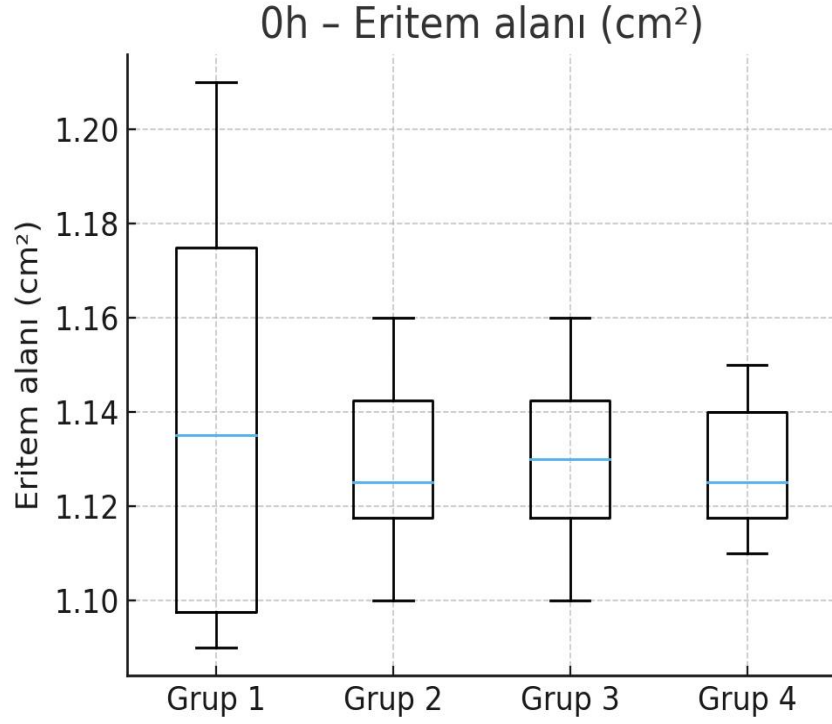
Grafik 3: Gruplara göre yanık alanı değişimi

Sıfırncı Saat Ölçümleri

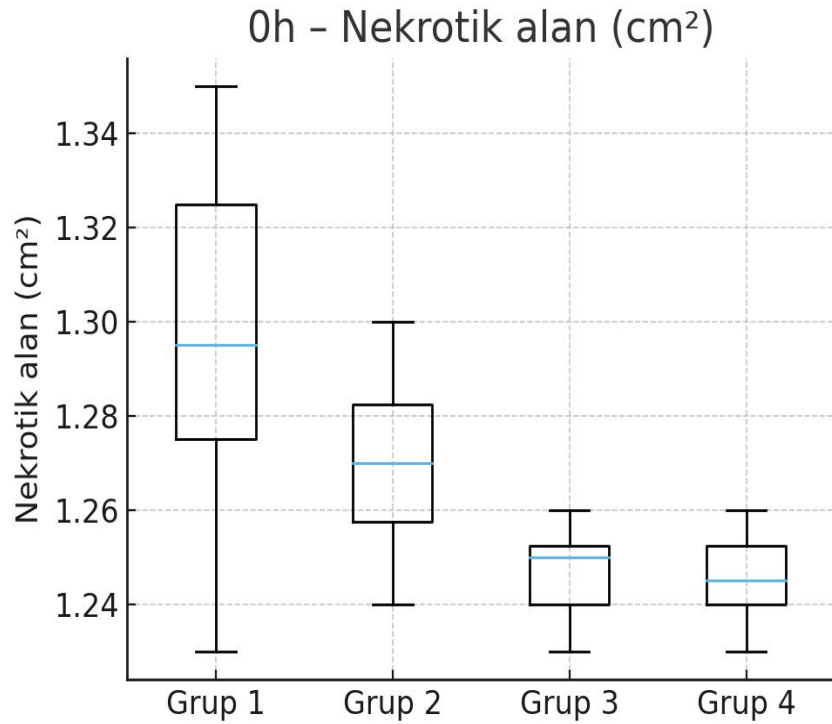
Başlangıç ölçümlerinde yanık alanı, eritem alanı ve nekrotik doku alanı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (ANOVA, $p>0.05$). Yanık alanı Grup 1’de 4.0621 cm², Grup 2’de 4.0375 cm², Grup 3’te 4.0213 cm² ve adipoz mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozom uygulanan Grup 4’te 4.0375 cm² olarak kaydedilmiştir. Başlangıç eritem ve nekrotik alan ölçümleri de tüm gruplarda benzer düzeylerde seyretmiştir (**Grafik 4-6**).



Grafik 4: Sıfırncı saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



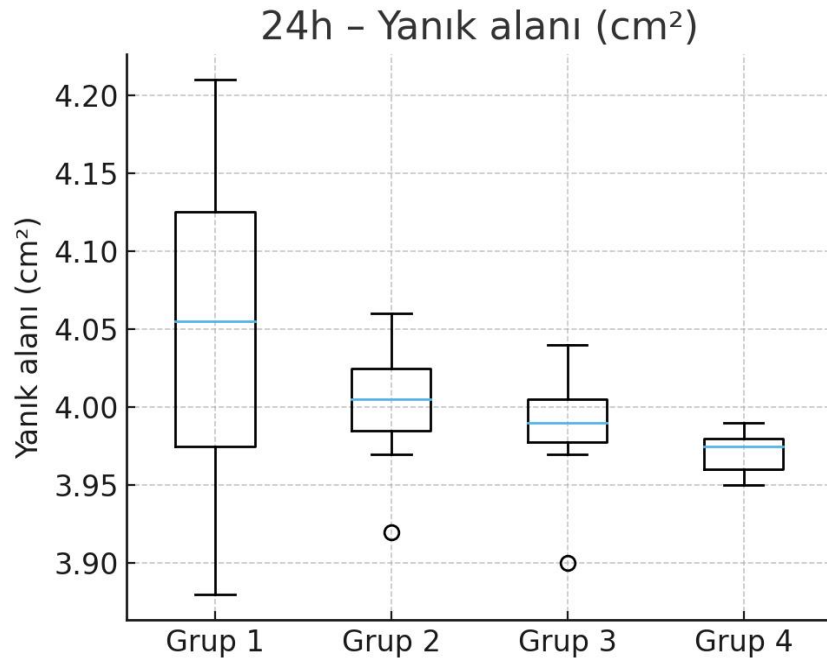
Grafik 5: Sıfırinci saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



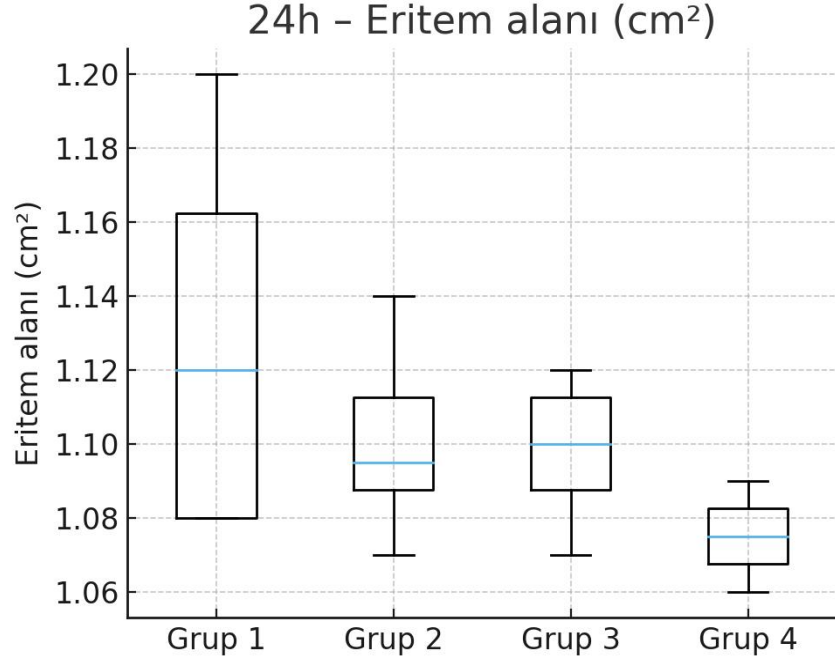
Grafik 6: Sıfırinci saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırılması

24. Saat Ölçümleri

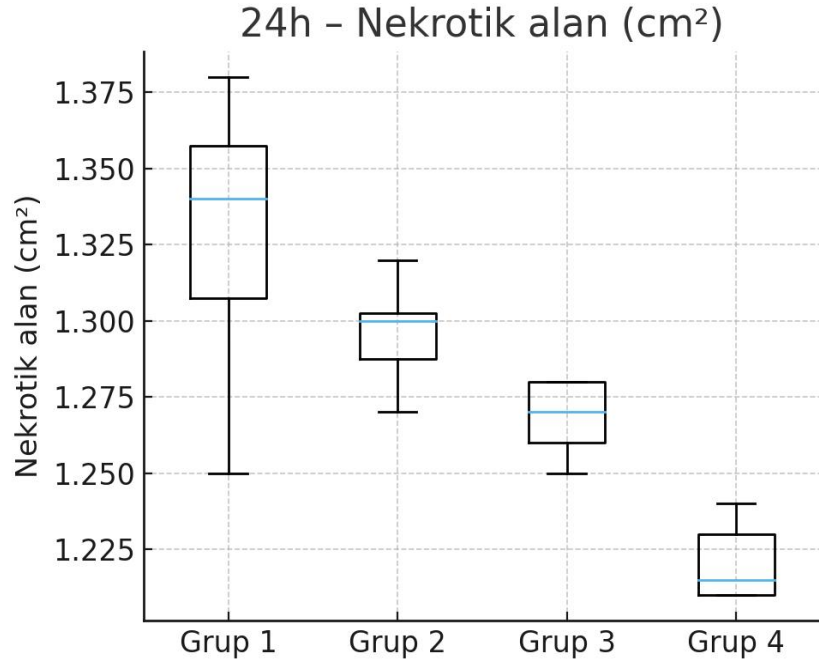
24. saatte Grup 4'te yanık alanı, eritem alanı ve nekrotik alan değerlerinin diğer gruplara kıyasla düşme eğiliminde olduğu gözlenmiştir; ancak bu farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı değildir (ANOVA, $p>0.05$) (**Grafik 7-9**) .



Grafik 7: 24. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



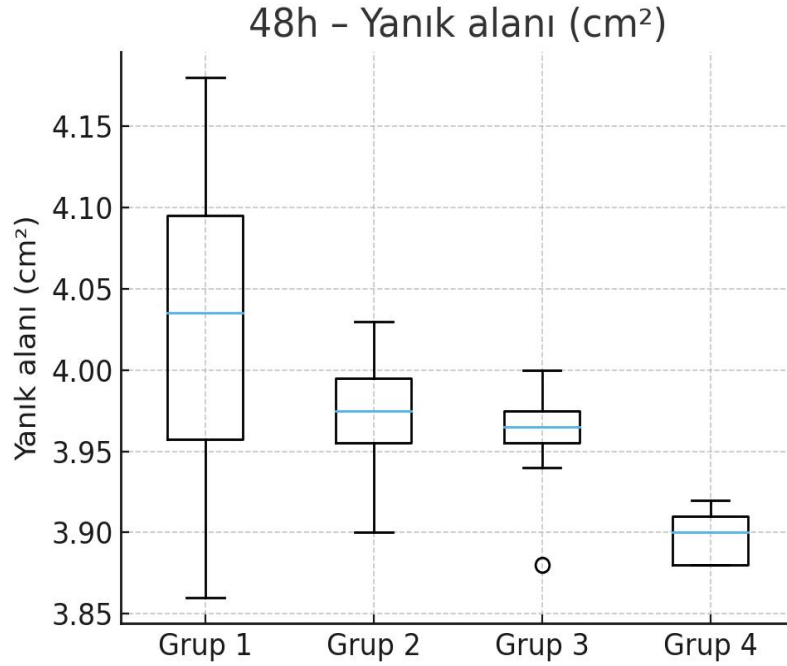
Grafik 8: 24. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



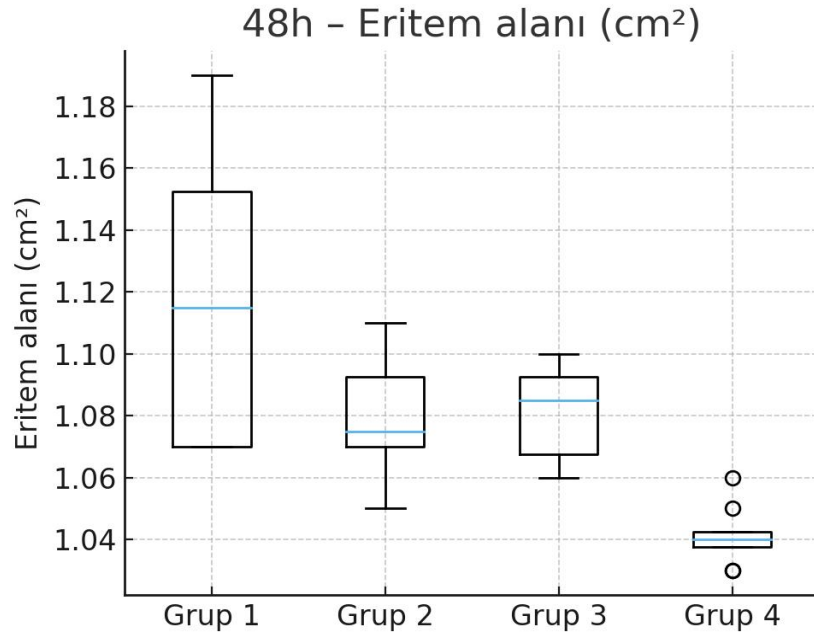
Grafik 9: 24. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması

48. Saat Ölçümleri

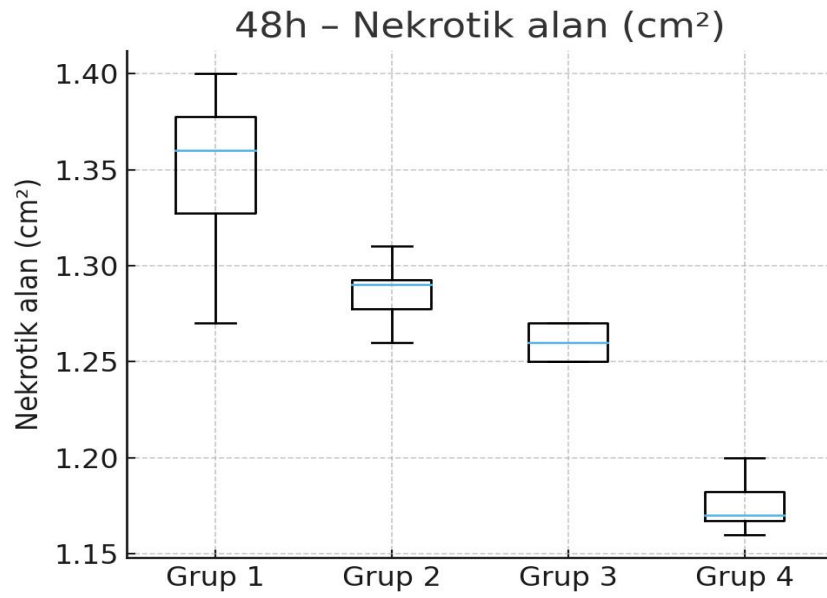
48. saatten itibaren gruplar arası farklılıklar belirginleşmiştir. Grup 4, yanık alanı, eritem alanı ve nekrotik doku alanı bakımından diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede daha düşük ölçümler vermiştir (ANOVA, $p<0.01$). Tukey post-hoc analizinde Grup 4 ile Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı fark saptanırken; Grup 1-2 ve Grup 1-3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (**Grafik 10-12**).



Grafik 10: 48. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



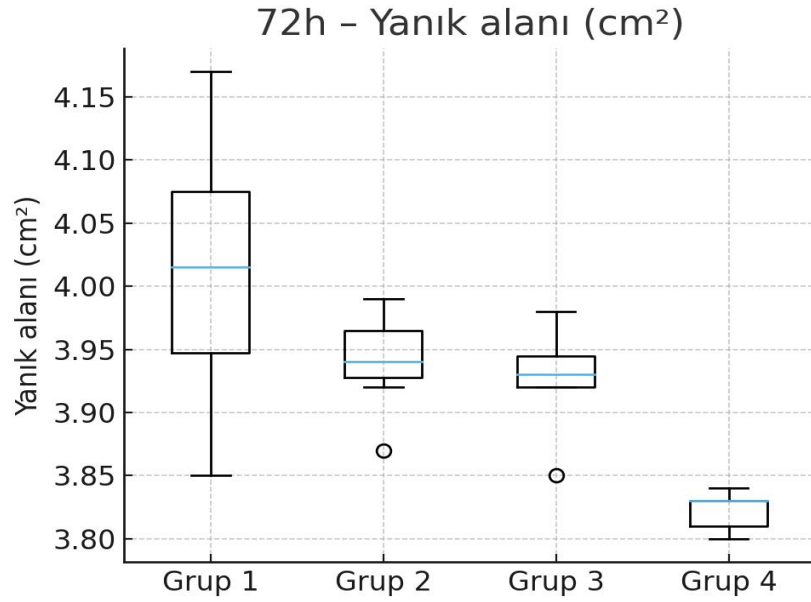
Grafik 11: 48. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



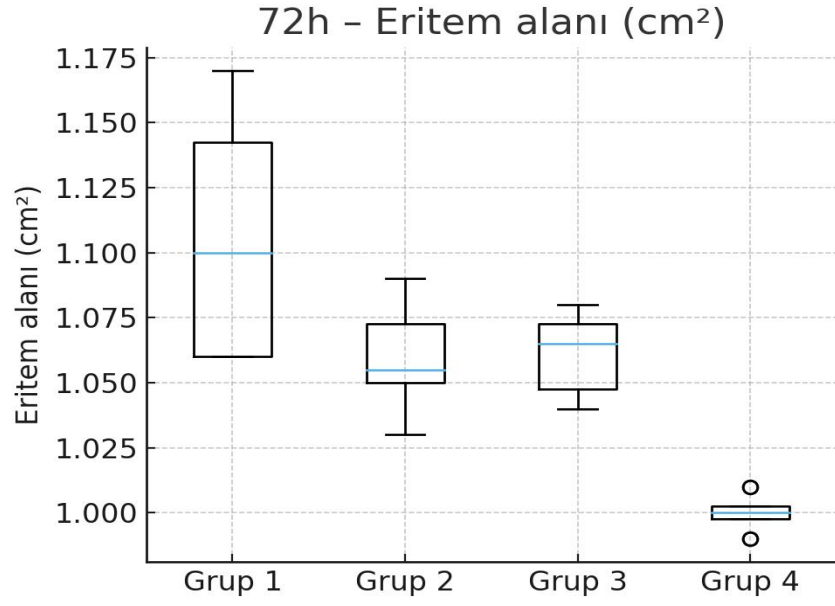
Grafik 12: 48. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması

72. Saat Ölçümleri

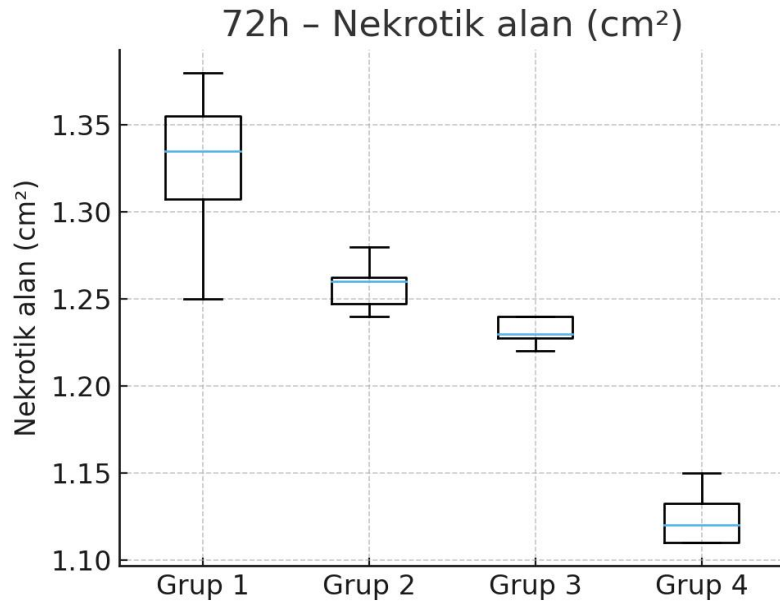
72. saatte, her üç parametre (yanık alanı, eritem alanı, nekrotik alan) bakımından gruplar arasında anlamlı fark belirlenmiş (ANOVA, $p<0.001$) ve Grup 4'ün en düşük değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Post-hoc testlerde Grup 4, tüm diğer gruplardan anlamlı derecede ayrılmaktadır. Buna karşılık Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0.05$) **(Grafik 13-15).**



Grafik 13: 72. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



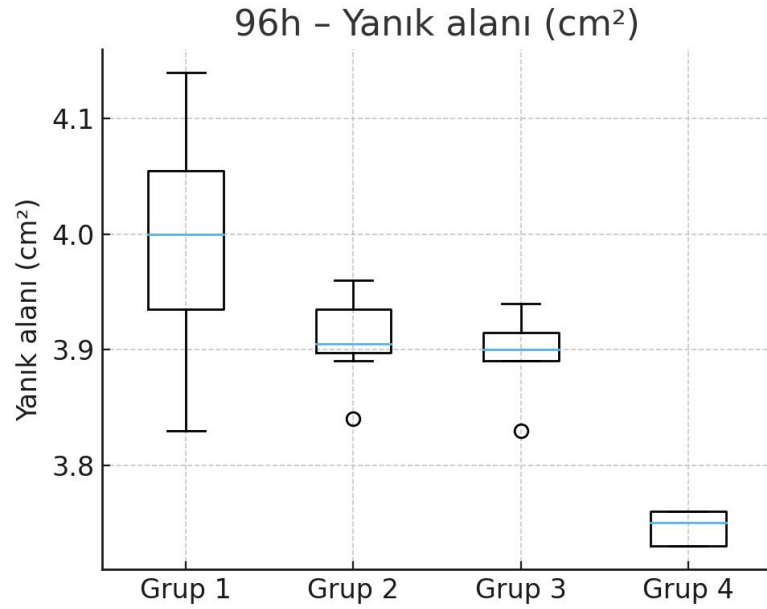
Grafik 14: 72. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



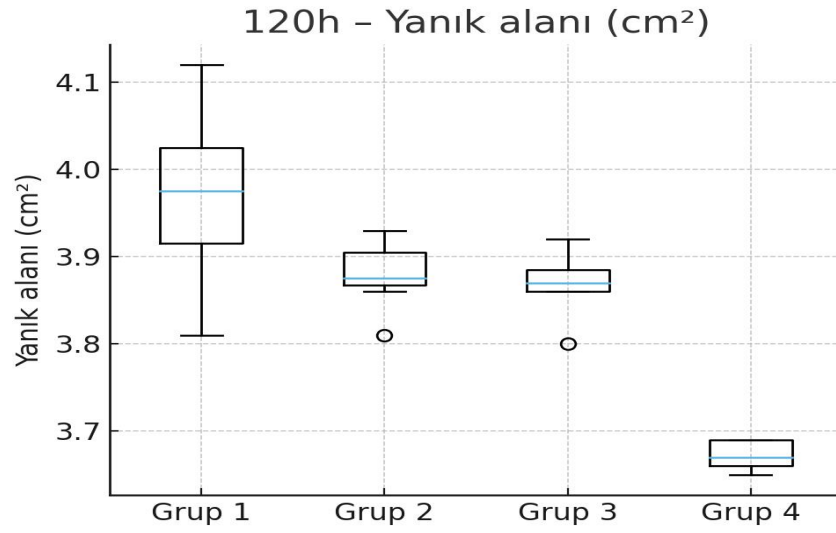
Grafik 15: 72. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması

96. , 120. ve 144. Saat Ölçümleri

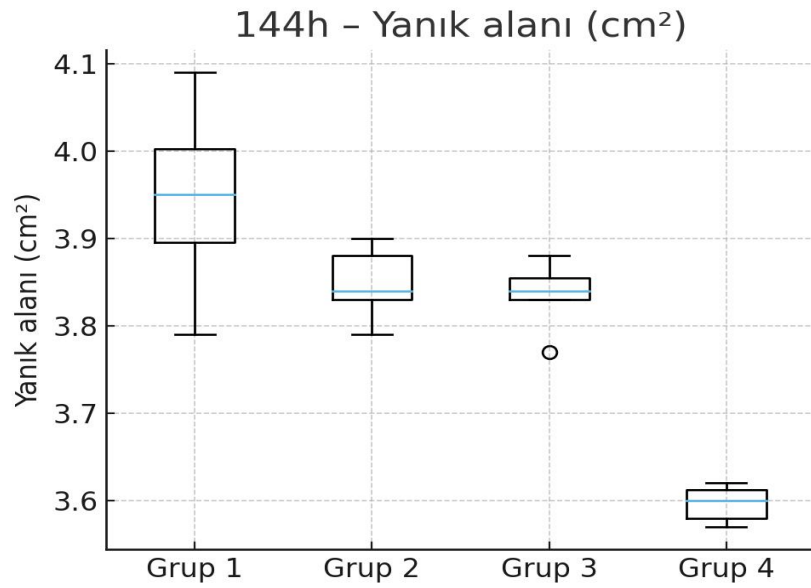
96. , 120. ve 144. saat değerlendirmelerinde Grup 4'ün yanık, eritem ve nekrotik doku alanları açısından açık şekilde en düşük değerlere sahip olduğu görülmüştür. Her üç zaman noktasında da ANOVA sonuçları gruplar arasında anlamlı farklılık bulunduğunu göstermiştir ($p<0.001$). Tukey post-hoc analizlerinde Grup 4 ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı fark saptanırken; Grup 1-2 ve Grup 1-3 arasında anlamlı fark belirlenmemiştir ($p>0.05$) (**Grafik 16-24**).



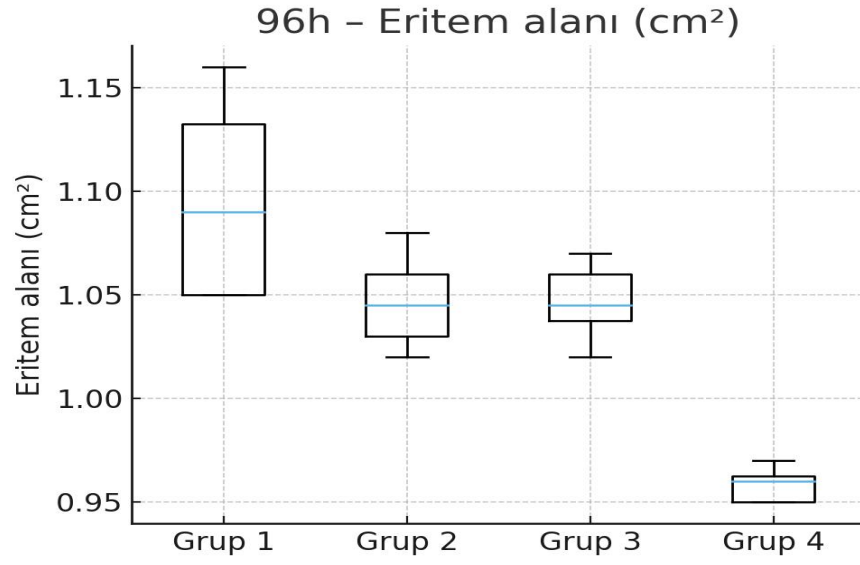
Grafik 16: 96. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



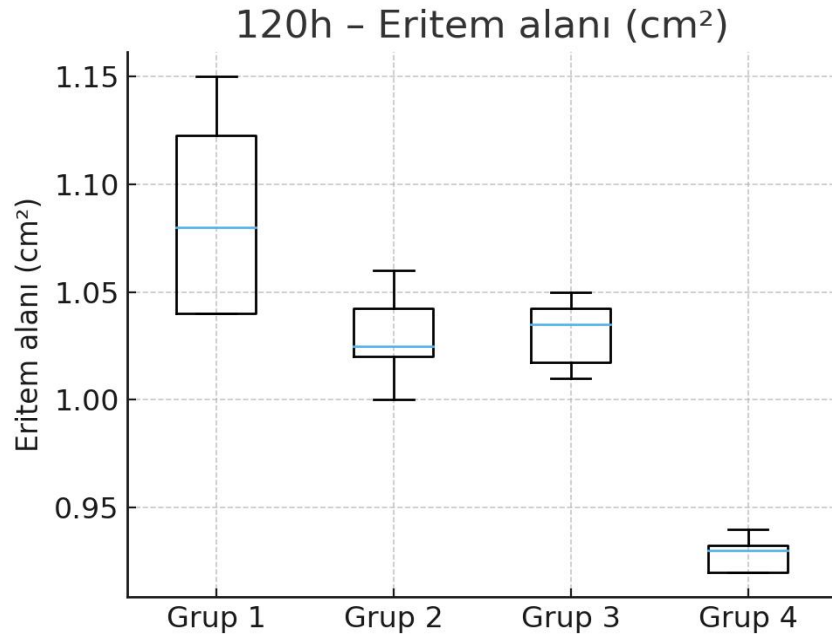
Grafik 17: 120. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



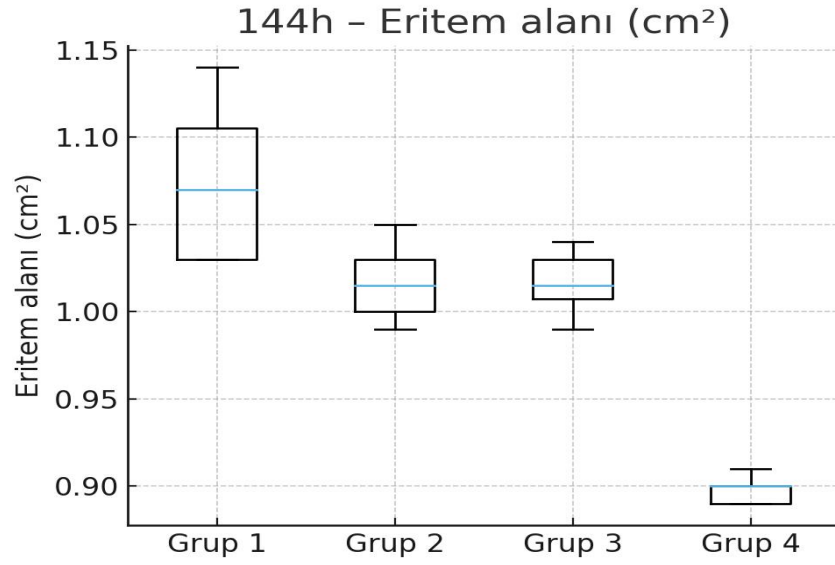
Grafik 18: 144. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



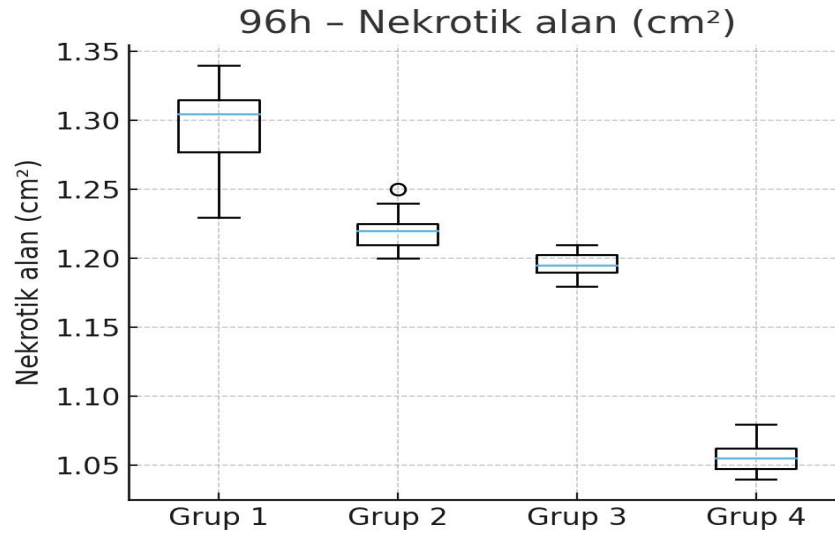
Grafik 19: 96. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



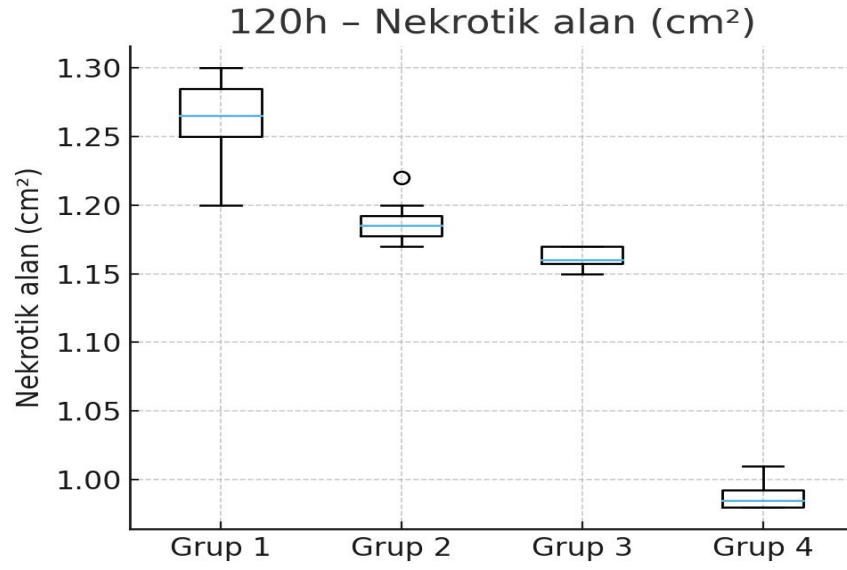
Grafik 20: 120. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



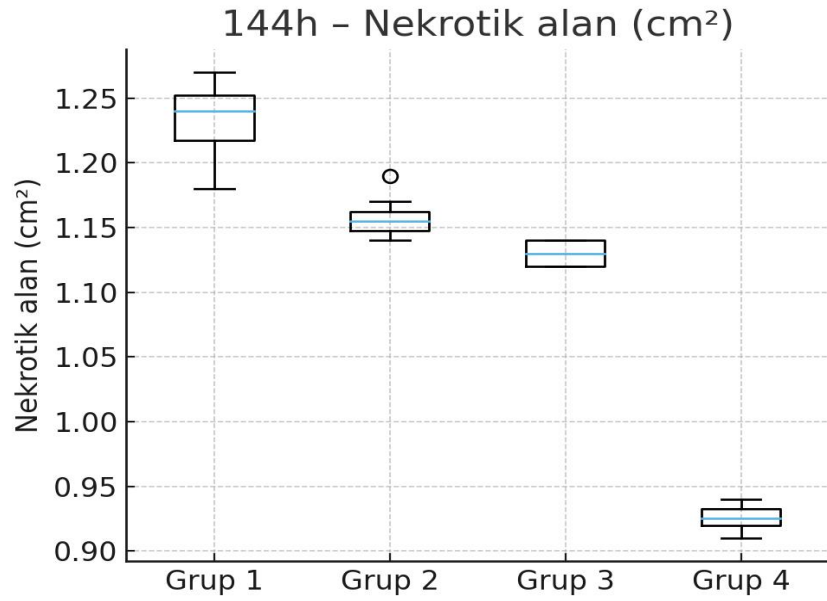
Grafik 21: 144. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



Grafik 22: 96. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması



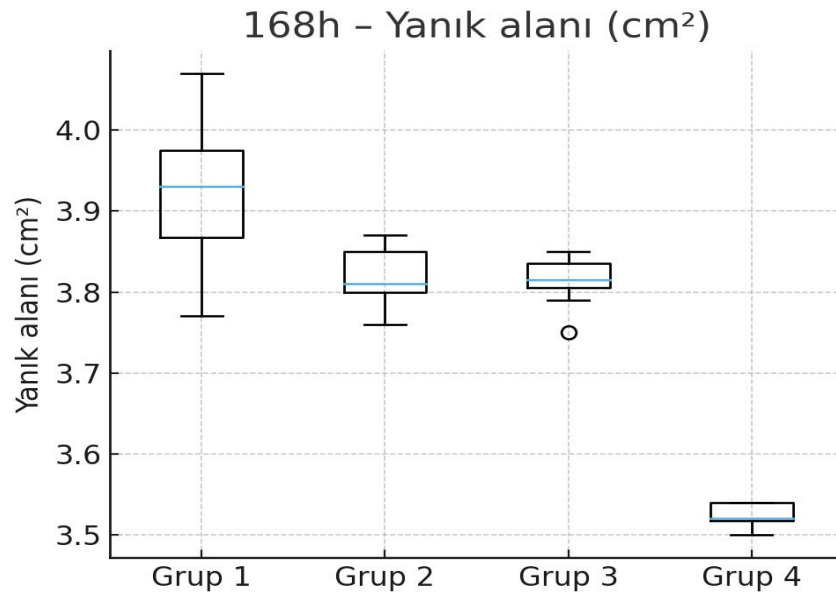
Grafik 23: 120. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması



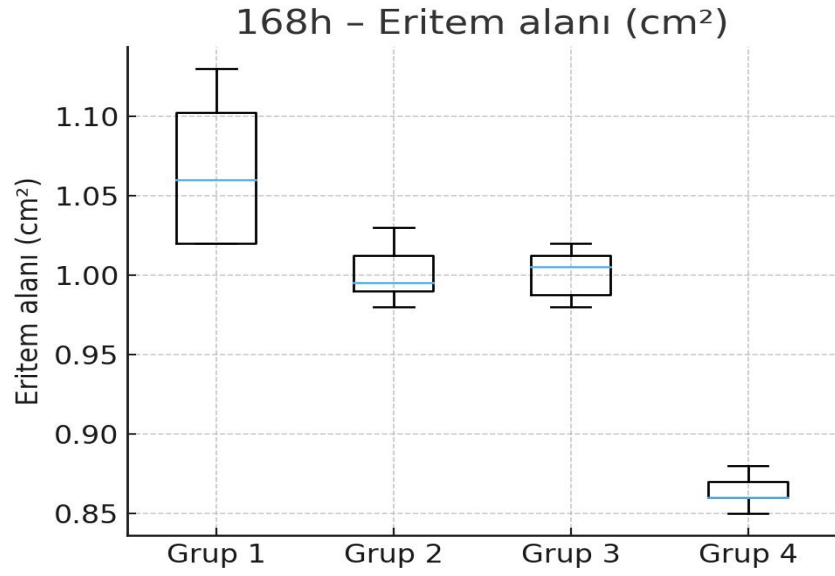
Grafik 24: 144. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması

168. Saat Ölçümleri

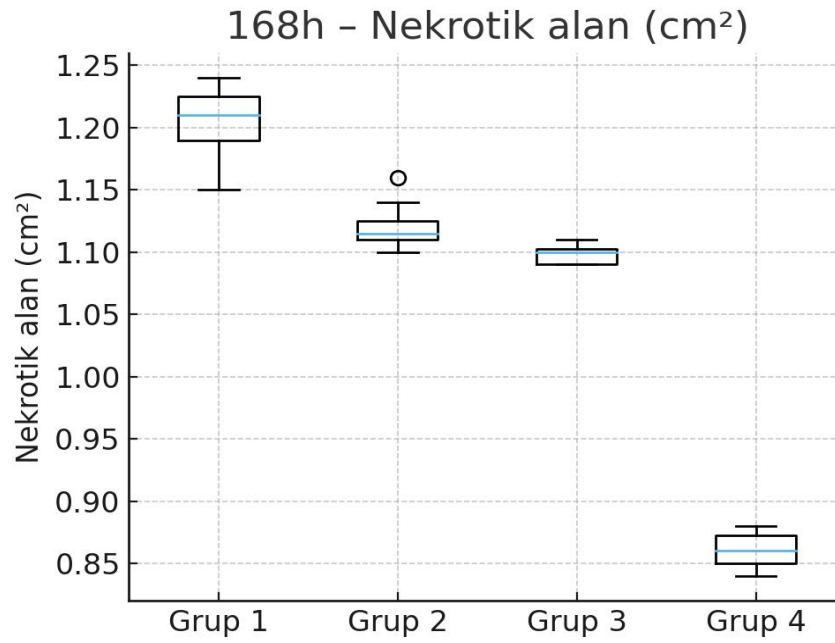
168. saat sonunda Grup 4, yanık alanı, eritem alanı ve nekrotik doku alanı açısından en düşük değerlere sahip olmayı sürdürmüştür. Yanık alanı bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (ANOVA, $p<0.001$) ve çoklu karşılaştırmalarda Grup 4'ün tüm diğer gruplardan anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlenmiştir. Eritem ve nekrotik doku değerlendirmelerinde de Grup 4 ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı fark mevcuttur. Bu zaman noktasında Grup 1-2 ve Grup 2-3 arasında anlamlı fark bulunmazken, Grup 1-3 arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) (**Grafik 25-27**).



Grafik 25: 168. saat grupların yanık alanlarının karşılaştırması



Grafik 26: 168. saat grupların eritem alanlarının karşılaştırması



Grafik 27: 168. saat grupların nekroz alanlarının karşılaştırması

Gruplar başlangıçta homojen özellikler sergilemiş olup, 0. ve 24. saat değerlendirmelerinde yanık alanı, eritem alanı ve nekrotik doku alanı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (ANOVA, $p>0.05$). Bununla birlikte, 48. saatten itibaren adipoz kaynaklı eksozom uygulanan Grup 4'te tüm parametrelerde belirgin bir iyileşme paterni ortaya çıkmış ve bu grup, Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük değerler göstermiştir ($p<0.01$). Tukey çoklu karşılaştırma analizlerinde Grup 4 ile diğer üç grup arasındaki fark anlamlı bulunurken, Grup 1-2 ve Grup 1-3 arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0.05$).

Bu eğilim 72., 96., 120. ve 144. saat ölçümlerinde de devam etmiş; söz konusu zaman noktalarının tümünde Grup 4, yanık, eritem ve nekrotik alan ölçümleri bakımından diğer gruplardan anlamlı derecede ayrılmıştır ($p<0.001$). Buna karşılık bu dört zaman noktasında Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

168. saat ölçümünde de Grup 4 en düşük değerleri korumuş ve tüm gruplara kıyasla anlamlı biçimde üstün bulunmuştur ($p<0.001$). Bu zaman noktasında yalnızca Grup 1 ile Grup 3 arasında anlamlı bir fark tespit edilmiş ($p<0.05$); Grup 1-2 ve Grup 2-3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmemiştir.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Deri Histolojik Değerlendirme

Kesitler Hematoksilen&Eozin ile boyandı. Görüntüler (Olympus BX53; Olympus, Tokyo, Japan) mikroskobu altında analiz edildi. 10 farklı alanda histopatolojik skor verildi. Bu skora 0: hasar yok, 1: az hasarlı, 2: orta şiddetli, 3: çok hasarlı olarak değerlendirildi. Skora kriterlerinde hemoraji, hücresel dökülme, epitel bozulması gibi değişimler olarak alındı. Bu değerlendirme 10 farklı alan içinde yapıldı.

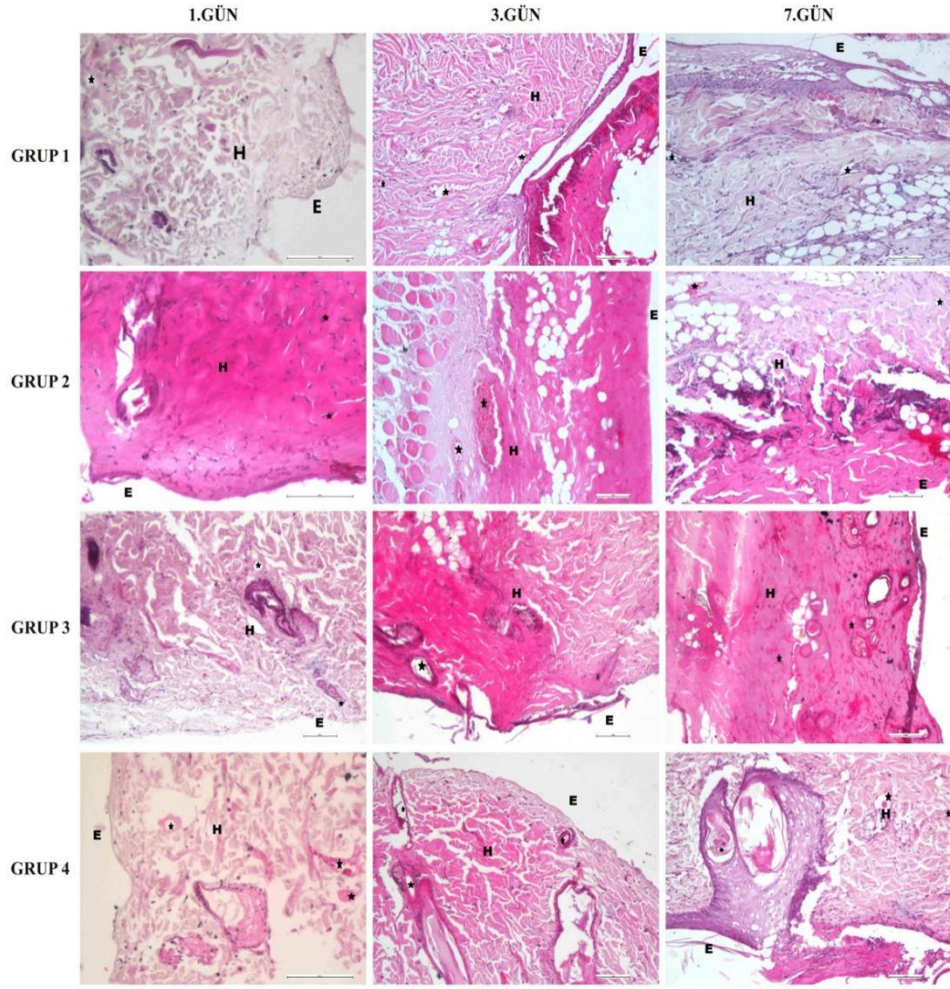
Grup 1'e ait hematoksilen boyalı deri kesitlerinde 1. ve 3. günlerde belirgin epitel bütünlüğü kaybı, yüzeysel tabakalarda epitelizasyonun belirgin şekilde bozulduğu izlendi. Dermal vasküler yapılarda konjesyon ve yeni damar oluşumunu düşündüren artış mevcuttu. Bu dönemlerde hemorajik alanların yaygın olduğu dikkati çekti. 7. günde, epitel tabakasında kısmi yeniden yapılanmanın başladığı, subkutan yağ dokusunun ise bazı alanlarda daha belirgin hale geldiği gözlemlendi. Hemorajinin bu dönemde daha düşük yoğunlukta olduğu saptandı. Hipodermal düzeyde 1. ve 3. günlerde belirgin dağınıklık, kollajen lifler arasında ayrışmalar ve düzensiz organizasyon dikkati çekti. 7. güne gelindiğinde, hipodermal komponentlerde toparlanma eğilimi izlendi. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu özellikle 1. gün kesitlerinde yoğun olup, ilerleyen günlerde azalma eğilimi gösterdi. Bağ doku elemanları 1. ve 3. günlerde düşük yoğunlukta iken, 7. günde fibroblastik aktivite ve hücresel yoğunlukta artış, epitelizasyon sürecinin yeniden başladığını destekler nitelikteydi.

Grup 2'nin hematoksilen boyamalarında 1. ve 3. günlerde hemorajinin belirgin derecede arttığı, damar duvarlarında hemorajiye bağlı göllenme alanları ve perivasküler inflamatuvar infiltrasyon saptandı. Epitel tabakasında 3. günden itibaren epitelizasyonun başladığı, bu sürecin 7. günde daha belirgin hâle geldiği gözlemlendi. Hücresel düzeyde özellikle eozinofilik sitoplazmik boyanma artışı dikkat çekti. 7. gün kesitlerinde, epitel tabakasının yapısal bütünlüğünün gelişim gösterdiği, ancak dermal vaskülaritedeki artışın devam ettiği görüldü. Bu bulgular, iyileşme sürecinin 7. gün itibarıyla halen aktif olarak sürdüğünü göstermekteydi.

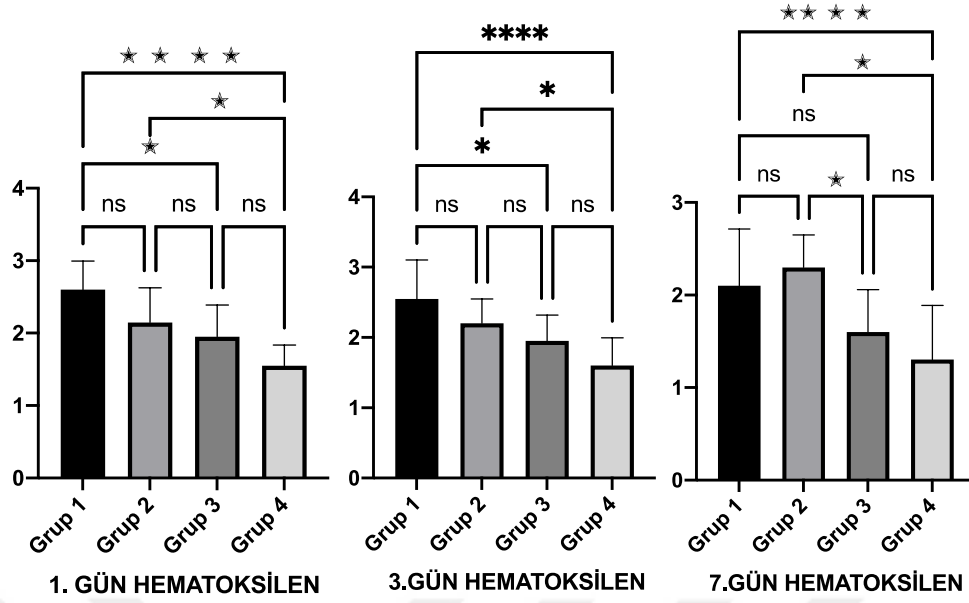
Grup 3'te 1. ve 3. günlerde epitel tabakası izlenemedi; yüzeysel alanlarda tam kat epitel kaybı bulundu. Buna karşın dermal matriste bağ doku hücrelerinin belirgin artışı dikkat çekti. Hemorajik alanlar 1. gün en yoğun düzeyde saptandı; 3. ve 7. günlerde giderek azalma eğiliminde olduğu izlendi.

Damarlanmanın iyileşme süreciyle uyumlu şekilde arttığı ve epitelizasyonun ilk kez 7. günde izlenebilir hâle geldiği görüldü. Hücrel eozinofilik boyanma bu grupta da belirgindi. Hipodermal düzeyde damar yoğunluğundaki artış, dokuda reparatif süreçlerin aktif olduğunu düşündürdü. Ayrıca kollajen lif yoğunluğunun 7. gün itibarıyla belirgin şekilde arttığı gözlemlendi.

Grup 4'e ait kesitlerde 1. gün hemorajik alanlar mevcut olmakla birlikte, 3. günde bu alanların belirgin şekilde azaldığı, 7. günde ise neredeyse tamamen kaybolduğu gözlemlendi. Diğer gruplarda yaygın olarak izlenen eozinofilik hücrel boyanmanın bu grupta minimal düzeyde olması dikkat çekicidir. 7. gün kesitlerinde epitelizasyonun ileri düzeyde olduğu, epitel tabakasının “ belirgin şekilde organize bir görünüm kazandığı “ izlendi. Damarlanma 1. ve 3. günlerde artmış olmakla birlikte, 7. günde normalizasyon eğilimi göstermiştir; bu durum doku iyileşmesinin ileri evrelere ulaştığını desteklemektedir. Ayrıca, 7. gün kesitlerinde kıl foliküllerinin belirgin şekilde izlenmesi, deri bütünlüğünün fizyolojik yapıya doğru yeniden şekillendiğini göstermektedir. Hipodermisi oluşturan gevşek ve sıkı bağ doku komponentlerinin organizasyon kazanması, bu grupta reparatif sürecin en etkin şekilde ilerlediğini ortaya koymaktadır **(Resim 7)**.



Resim 7: Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait hematoksilin-eosin boyamaları (E: Epitel, H: Hipodermis, *: Damar)

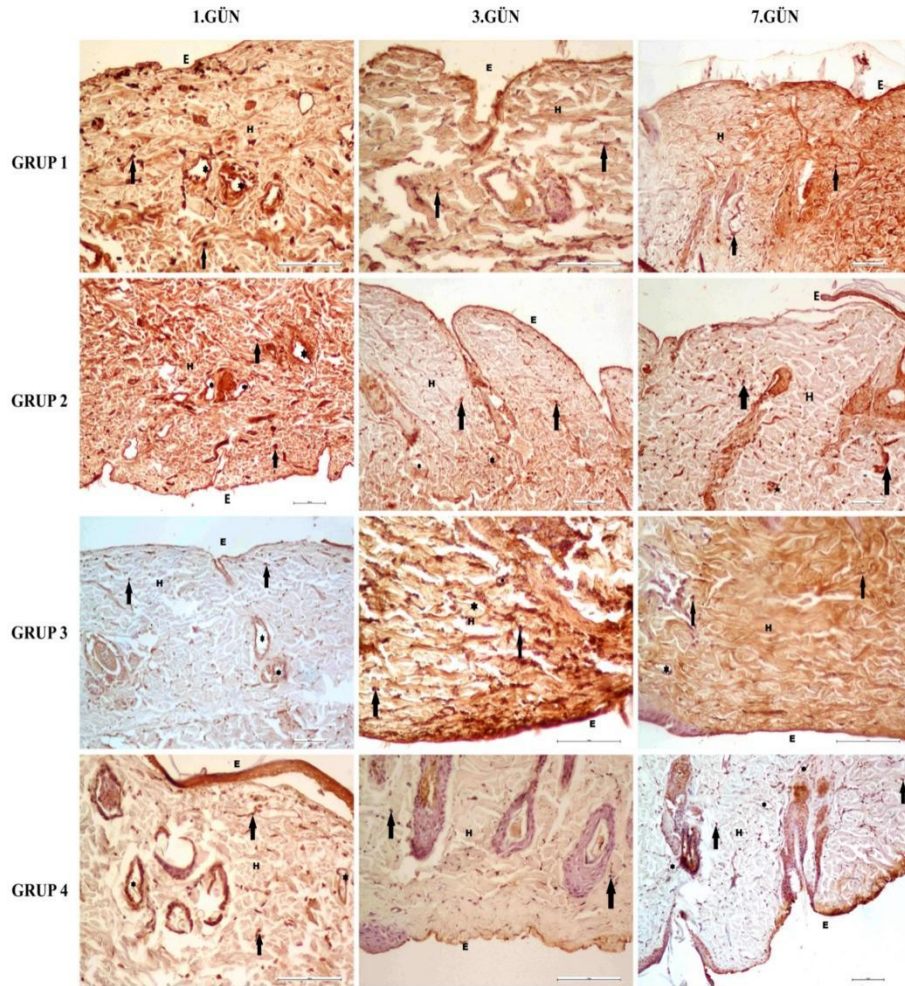


Tablo 5: Deri biyopsilerinin gruplararası hematoksin-eosin boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p < 0.05$). (ns: anlamlı fark yok, *: anlamlı fark var, yıldız: anlamlı fark var)

Tunel Değerlendirme

Apoptozu tespit etmek için in situ apoptozis tespit kiti (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore, S7101, ABD, Burlington MA) kullanıldı. Histolojik inceleme Olympus BX53 marka mikroskop ile yapıldı.

Preparatlardan alınan görüntülerden 10 farklı alandan 100 adet hücre sayılarak yapıldı. Hücreler apoptotik olup olmadıklarına göre sayıldı (**Resim 8**).



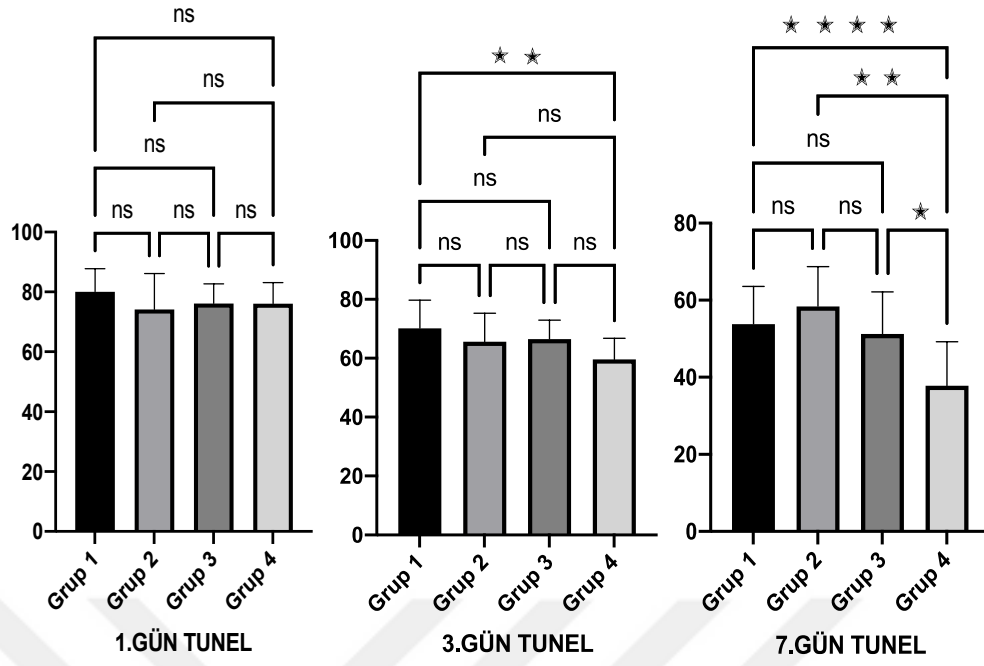
Resim 8: Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait TUNEL boyamaları (E: Epitel, H: Hipodermis, *: Damar, ↑: Pozitif Hücre)

Grup 1'e ait TUNEL boyamalarında 1. ve 3. günlerde belirgin apoptotik hücre artışı izlendi. Bu artış özellikle kahverengi nükleer boyanmanın yoğunlaştığı epidermal ve hipodermal alanlarda dikkat çekiciydi. Ayrıca bazı damar duvarlarında da TUNEL pozitif hücreler görülerek vasküler yapılarda da apoptozun sürdüğü anlaşıldı. 7. günde apoptotik hücre sayısında hafif bir azalma olmakla birlikte, bu azalma sınırlı düzeydeydi. Epitel tabakasında gözlenen erken epitelizeasyon başlangıcının, apoptozun gerilemesine katkı sunduğu değerlendirildi.

Grup 2'ye ait TUNEL boyamalarında 1. günde belirgin apoptotik hücre artışı izlendi. Bu artış, özellikle epidermal ve hipodermal alanlarda yoğun kahverengi nükleer boyanma ile karakterizeydi. 3. ve 7. günlerde apoptotik hücre sayısında azalma eğilimi görülmekle birlikte, bu azalma epitelizeasyon sürecinin güçlü bir şekilde başladığını gösterecek düzeyde değildi. Hipodermisteki bağ doku hücrelerinde ve inflamatuvar hücre popülasyonunda apoptoz varlığı dikkati çekti. Hipodermisteki bağ doku ve inflamatuvar hücrelerde apoptoz varlığı 7. günde devam etmekle birlikte, toplam apoptotik hücre yoğunluğunda azalma eğilimi gözlemlendi. Bu bulgular, doku onarım sürecinin bu grupta yavaş ilerlediğini ve tam organizasyonun henüz sağlanamadığını düşündürmektedir.

Grup 3'e ait TUNEL kesitlerinde 1. ve 3. günlerde apoptotik hücre yoğunluğu oldukça yüksek bulundu. 7. günde bu yoğunluk azalmış olsa da, apoptozun devam eden varlığı dokudaki iyileşme sürecinin tamamlanmadığını ve sürecin hâlen aktif olduğunu göstermektedir. Hipodermal bağ dokusunda ve özellikle damar duvarlarında TUNEL pozitif hücrelerin varlığı, vasküler yapılarda devam eden hücresel hasar ve remodeling sürecini desteklemektedir.

Grup 4'te 1. gündeki apoptotik hücre yoğunluğu diğer gruplarla benzer düzeyde olmakla birlikte, 3. günden itibaren belirgin bir düşüş izlendi. 7. günde ise apoptotik hücre sayısı dramatik biçimde azalmış, bu durumun tedavinin özellikle hipodermisteki bağ doku ve perivasküler hücre canlılığını artırdığını işaret ettiği değerlendirildi. Epitel tabakasında TUNEL pozitif hücrelerin izlenmemesi, verilen tedavinin hem epitel dokuda hem de stromal bileşenlerde hücresel bütünlüğü ve rejeneratif yanıtı desteklediğinin bir göstergesi olarak yorumlandı (**Tablo 6**).



Tablo 6: Deri biyopsilerinin gruplararası TUNEL boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p < 0.05$). (ns: anlamlı fark yok, *: anlamlı fark var, yıldız: anlamlı fark var)

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Histolojik inceleme Olympus BX53 marka mikroskop ile yapıldı. Preparatlardan alınan görüntülerden 10 farklı alandan immünoreaktivite ölçümü için skor verildi. Bu skora şu şekilde yapıldı;

- 0: boyanma yok
- 1: az boyanma var
- 2: orta şiddetli boyanma var
- 3: şiddetli boyanma var

Hücrel değerlendirme HS-SCORE yapılarak belirlendi ve çıkan değerler istatistiksel olarak analiz edildi.

TNF- α İmmünoreaktivitesi

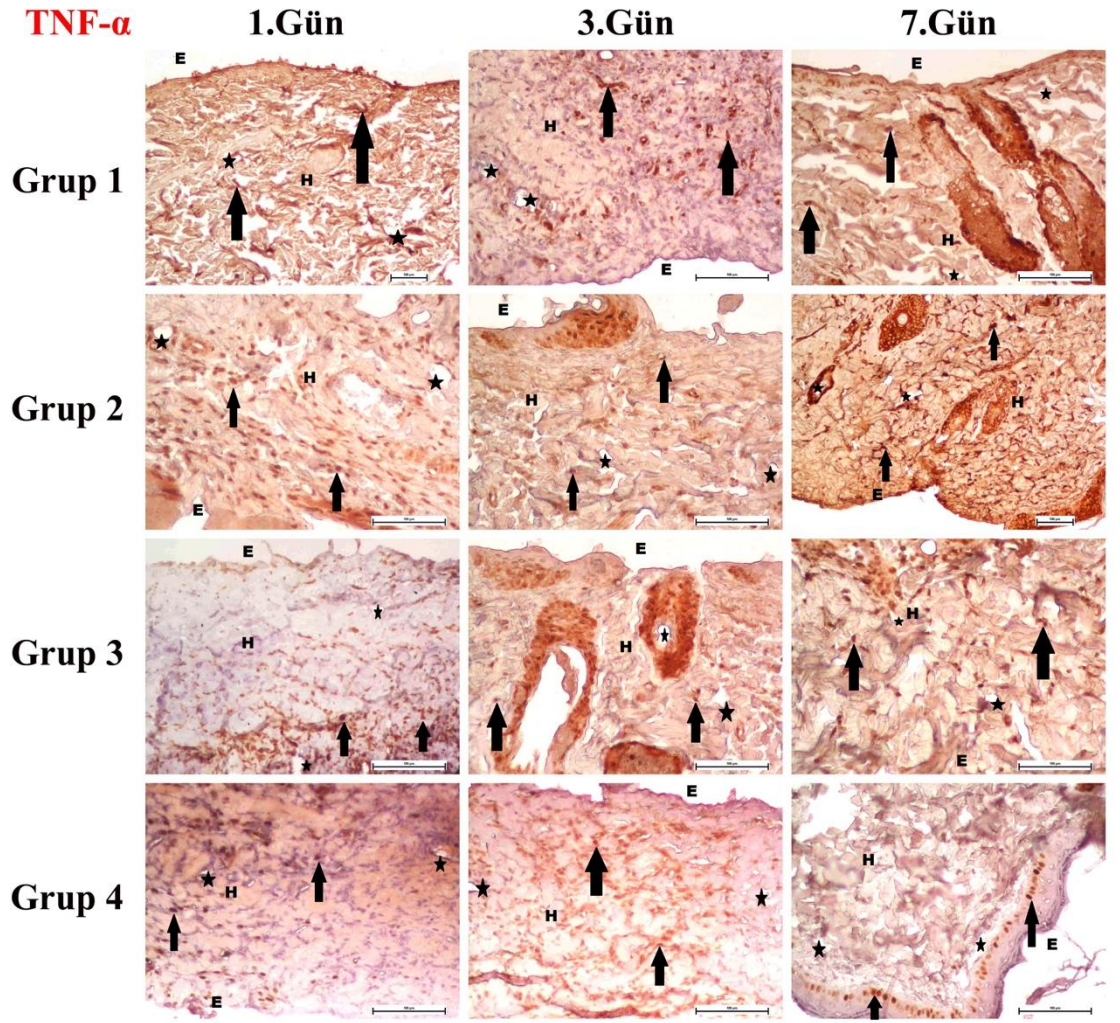
1. gün deri örneklerinde TNF- α immünoreaktivitesi tüm gruplarda belirgin düzeyde izlenmiştir. Boyanmanın özellikle hipodermal bölgelerde yoğunlaştığı dikkati çekmiştir. Gruplar arasında TNF- α immünoreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu dönemde gözlenen yaygın TNF- α pozitifliği, akut inflamatuvar yanıtın erken fazda tüm gruplarda benzer şekilde aktive olduğunu göstermektedir. İnflamatuvar hücrelerin gevşek ve sıkı bağ doku alanlarına yoğun göç ettiği, bu hücrelerin TNF- α açısından pozitif boyandığı izlenmiştir. Ayrıca bağ doku stroması içerisindeki hücrel elemanlarda da immünopozitiflik gözlenmiş olup, bu bulgular inflamasyonun ilk günde yüksek düzeyde seyrettiğini desteklemektedir.

3. gün örneklerinde TNF- α immünoreaktivitesi Grup 1 ve Grup 3'te büyük ölçüde benzer düzeylerde seyrini sürdürürken, Grup 2'de artış göstermiştir. Buna karşın Grup 4'te TNF- α immünoreaktivitesinde belirgin bir azalma izlenmiştir. Özellikle Grup 2 ile Grup 4 arasında TNF- α immünoreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Grup 2'de immünopozitifliğin artmış olması, uygulanan tedavinin üçüncü günde inflamatuvar yanıtı baskılamada yeterli etki oluşturmadığını düşündürmektedir. TNF- α pozitif hücrelerin ağırlıklı olarak epitel altı bölgelerde ve bağ doku içerisindeki kollajen lifler çevresinde lokalize olduğu gözlenmiştir.

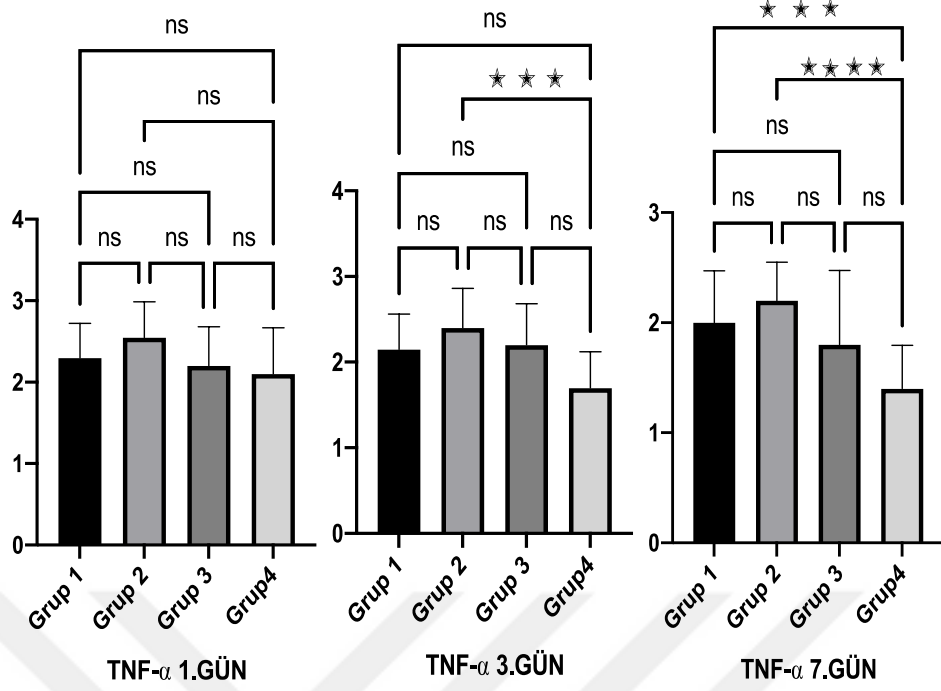
7. gün deri örneklerinde TNF- α immünoreaktivitesinin Grup 1 ve Grup 2'de arttığı, Grup 3'te azalma eğilimi gösterdiği ve Grup 4'te

belirgin şekilde azaldığı izlenmiştir. İstatistiksel analizlerde Grup 1 ile Grup 4 ve Grup 2 ile Grup 4 arasında TNF- α immünoaktivitesi açısından anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Özellikle Grup 4'te TNF- α düzeyindeki belirgin azalma, inflamatuvar sürecin baskılandığını ve iyileşme sürecinin ilerlediğini göstermektedir. Diğer gruplar değerlendirildiğinde, inflamasyonun Grup 3'te kısmen azaldığı, ancak Grup 1 ve Grup 2'de devam ettiği gözlenmiştir. Grup 4'te immünpozitif hücre sayısının belirgin şekilde azalması ve epitelizasyon bulgularının ortaya çıkması dikkat çekmiştir. Ayrıca hipodermal kollajen liflerde boyanmanın azalması, doku iyileşmesinin hızlandığını ve inflamatuvar yanıtın gerilediğini desteklemektedir (**Resim 9**) (**Tablo 7**).





Resim 9: Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait TNF- α boyamaları (E: Epitel, H: Hipodermis, *: Damar, $\uparrow$: Pozitif Hücre)



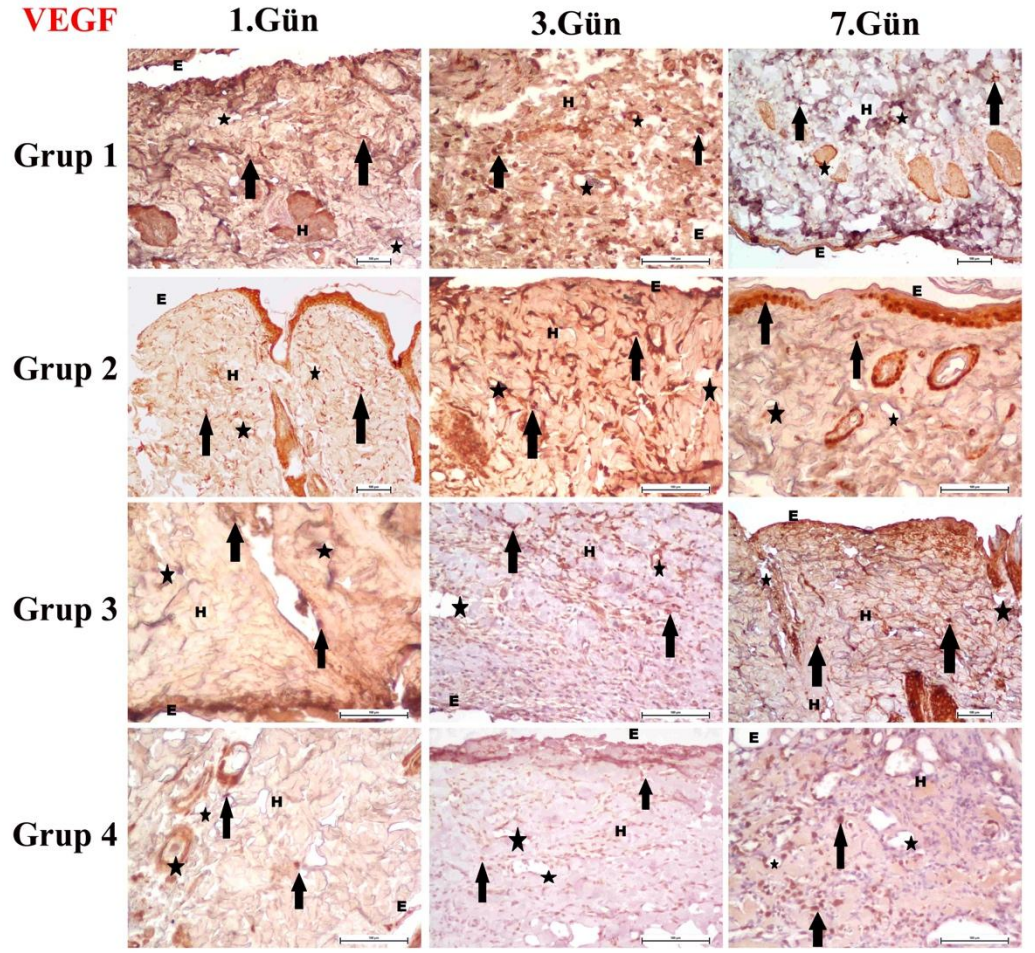
Tablo 7: Deri biyopsilerinin gruplararası TNF- α antikoru immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p < 0.05$). (ns: anlamlı fark yok, *: anlamlı fark var, yıldız: anlamlı fark var)

VEGF İmmünoaktivitesi

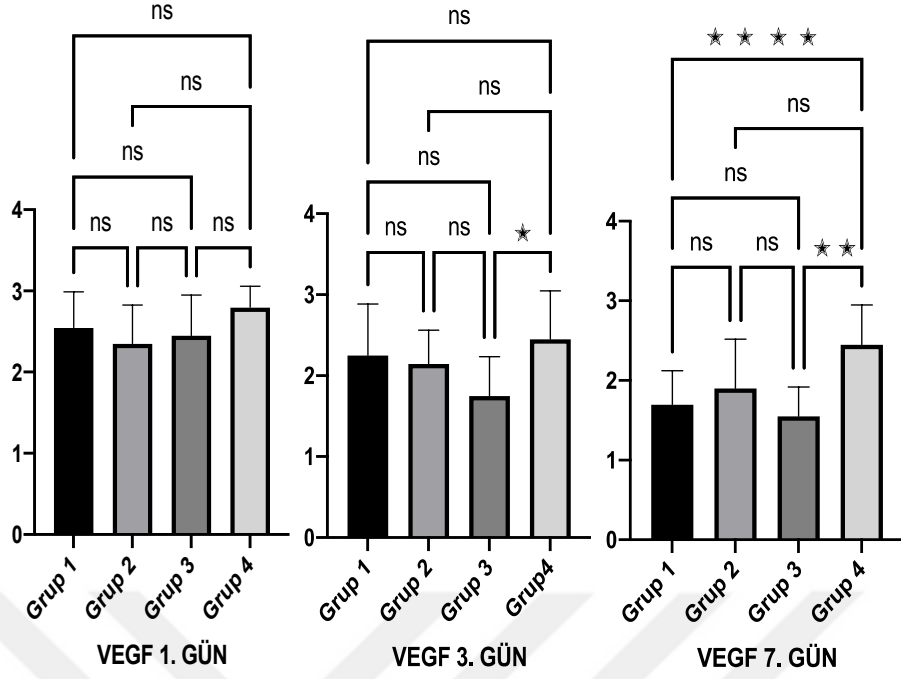
1. gün deri örneklerinde VEGF immünoaktivitesinin tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı izlenmiştir. Gruplar arasında VEGF ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). VEGF pozitifliğinin özellikle epitel altı bağ doku ve hipodermal bölgelerde yoğunlaştığı, artmış damar sayısı ve damar duvarı hücrelerindeki immünopozitif boyanma ile kendini gösterdiği gözlenmiştir. Bu bulgular, akut inflamatuvar yanıtın erken fazında tüm gruplarda benzer düzeyde anjiyogenik aktivasyonun gerçekleştiğini düşündürmektedir.

3. gün deri örneklerinde VEGF immünoaktivitesi açısından yalnızca Grup 3 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. Bu dönemde VEGF immünoaktivitesinin Grup 4'te bir miktar artış gösterdiği, buna karşın Grup 1 ve Grup 3'te azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Pozitif damar duvarı sayısında ve bağ doku stroması içerisindeki VEGF boyanmasında görülen azalma, bazı gruplarda anjiyogenik yanıtın sınırlı kaldığını düşündürmektedir. Bu durum, uygulanan tedavilerin erken dönemde damarlanma sürecine olan etkilerinin gruplar arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

7. gün deri örneklerinde VEGF immünoaktivitesinin özellikle Grup 4'te belirgin şekilde arttığı izlenmiştir. İstatistiksel analizlerde Grup 4 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 3 arasında VEGF immünoaktivitesi açısından anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Grup 4'te epitel altı bağ doku ve hipodermal bölgelerde artmış VEGF pozitifliği ve belirgin damarlanma dikkati çekmiştir. Buna karşın diğer gruplarda VEGF ekspresyonunun görece azaldığı gözlenmiştir. Grup 4'te izlenen VEGF artışı, hızlanmış anjiyogenez ve buna paralel olarak epitelizasyon sürecinin desteklendiğini düşündürmektedir (**Resim 10**) (**Tablo 8**).



Resim 10: Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait VEGF boyamaları
(E: Epitel, H: Hipodermis, *: Damar, $\uparrow$: Pozitif Hücre)



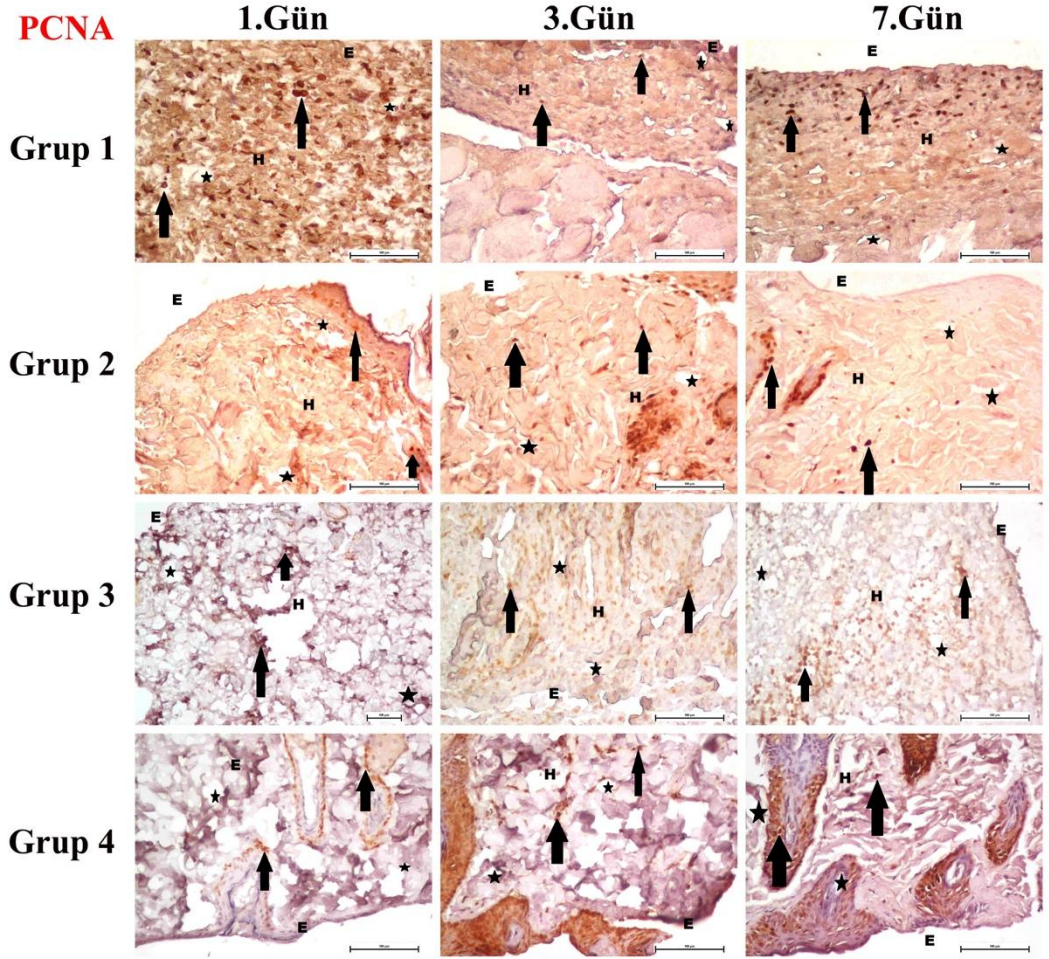
Tablo 8: Deri biyopsilerinin gruplararası VEGF antikoru immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p < 0.05$). (ns: anlamlı fark yok, *: anlamlı fark var, yıldız: anlamlı fark var)

PCNA Immünoreaktivitesi

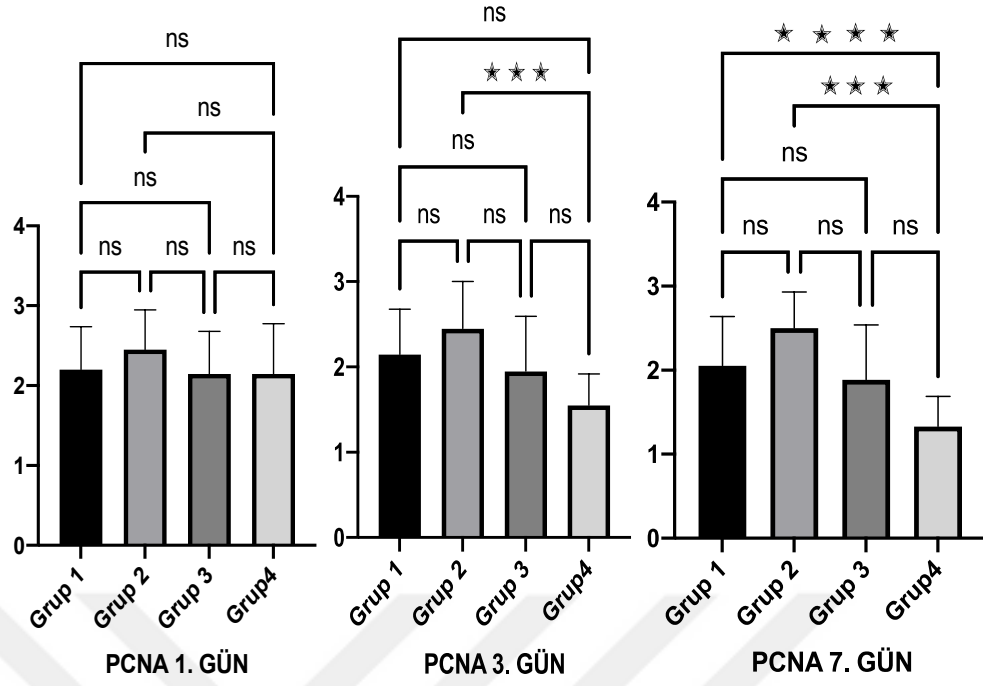
1. gün deri örneklerinde PCNA immünoreaktivitesi tüm gruplarda belirgin düzeyde izlenmiş olup, gruplar arasında PCNA pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Boyanmanın ağırlıklı olarak bağ doku hücrelerinde yoğunlaştığı, özellikle kollajen lifler arasındaki hücresel elemanlarda belirgin PCNA pozitifliği gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca epitel altı bölgelerde sınırlı sayıda PCNA pozitif hücre varlığı dikkat çekmiştir. Bu bulgular, yanık sonrası erken dönemde tüm gruplarda benzer düzeyde hücresel proliferatif aktivasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

3. gün deri örneklerinde PCNA immünoreaktivitesi açısından yalnızca Grup 2 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.05$). Grup 2’de PCNA pozitifliğinde artış izlenirken, Grup 4’te immünoreaktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Grup 1 ve Grup 3’te ise PCNA pozitifliğinin sınırlı düzeyde arttığı dikkati çekmiştir. Grup 4’teki azalmış PCNA immünoreaktivitesinin özellikle hipodermal bölgelerde yoğunluk gösterdiği, diğer gruplarda ise hipodermiste belirgin PCNA pozitifliği izlendiği görülmüştür. Tüm gruplarda kollajen lifler arasındaki hücresel elemanlarda değişen oranlarda PCNA pozitifliği saptanmıştır.

7. gün deri örneklerinde PCNA immünoreaktivitesi açısından Grup 4 ile Grup 1 ve Grup 4 ile Grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Grup 4 dışındaki gruplarda PCNA pozitif hücrelerin ağırlıklı olarak hipodermiste lokalize olduğu izlenmiştir. Buna karşın Grup 4’te, epitelizasyon süreciyle uyumlu olarak epidermal tabakada PCNA pozitif hücre varlığı belirginleşmiştir. Bu bulgu, proliferatif hücre aktivitesinin hipodermal bölgeden epidermise doğru yönlendiğini düşündürmektedir. Grup 4’te uygulanan tedavinin, özellikle yedinci günde hücresel proliferasyonu epitelizasyon yönünde desteklediği ve doku onarım sürecini hızlandırdığı görülmüştür. Diğer gruplarda ise PCNA ekspresyonunun büyük ölçüde hipodermal bağ doku hücreleri ve kollajen liflerle sınırlı kaldığı saptanmıştır (**Resim 11**) (**Tablo 9**).



Resim 11: Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait PCNA boyamaları
(E: Epitel, H: Hipodermis, *: Damar, ↑: Pozitif Hücre)



Tablo 9: Deri biyopsilerinin gruplararası PCNA antikoru immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p < 0.05$). (ns: anlamlı fark yok, *: anlamlı fark var, yıldız: anlamlı fark var)

5. TARTIŞMA

Hidroflorik asit (HF) yanıkları, kimyasal travmalar içerisinde hem dokuya hızlı penetrasyonu hem de iyonik toksisitesi nedeniyle ciddi lokal ve sistemik komplikasyonlara yol açan, klinik açıdan yüksek riskli yaralanmalar olarak kabul edilmektedir (115). Florür iyonlarının biyolojik dokular üzerindeki derin ve progresif etkisi, HF yanıklarını diğer mineral asit yanıklarından ayıran temel özelliklerden biridir (116). Florürün kimyasal özellikleri, cilt bariyerini hızla aşarak subkutan dokulara ve hatta periosta kadar nüfuz etmesine imkân tanır; bu durum temas sonrası klinik bulguların gecikmeli ortaya çıkmasına ve doku hasarının müdahale edilmedikçe ilerleyici karakter kazanmasına neden olmaktadır (117). HF'nin endüstride cam gravürü, metal yüzey temizliği, yarı iletken üretimi ve kimya laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılması ise özellikle iş kazalarına bağlı kimyasal yanık insidansının artmasıyla sonuçlanmaktadır (118).

HF'nin toksisitesinin temelinde florür iyonlarının kalsiyum ve magnezyum gibi iki değerlikli katyonlarla güçlü şelasyon eğilimi göstermesi yatmaktadır (119). Bu bağlanma sonucunda hücre dışı ve hücre içi kalsiyum düzeylerinde hızlı düşüş meydana gelmekte; kardiyak ileti bozuklukları, kas spazmları, metabolik asidoz ve ağır elektrolit dengesizlikleri ortaya çıkabilmektedir (120). Lokal düzeyde ise kalsiyuma bağımlı enzim ve proteinlerin fonksiyonları bozulur; fibroblast, keratinosit ve endotel hücrelerinde belirgin disfonksiyon gelişir (121). Bu hücre popülasyonlarının florür iyonlarına duyarlılığı, hem bağ dokusunun hem de epidermal tabakanın yapısal bütünlüğünün hızla bozulmasına ve buna paralel olarak nekroz alanlarının genişlemesine neden olmaktadır (122).

HF yanıklarında yara iyileşmesi, termal yanıklardan farklı bir biyolojik seyir izler (123). Normal yara iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon ve remodelleme şeklinde birbirini takip eden fazlardan oluşur ve bu süreçte immün hücreler, fibroblastlar, keratinositler ve endotel hücreleri arasındaki etkileşim son derece düzenlidir (124). HF maruziyeti sonrasında florür iyonlarının hücresel kalsiyum homeostazını bozması ve buna bağlı sistemik etkiler pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, TNF- α vb.) salınımını artırabilir; bu da inflamasyon fazının hem süresini uzatmakta hem de şiddetini artırmaktadır (HF toksisitesi kaynakları). Normal yara iyileşmesinde inflamatuvar yanıtın moleküler düzenlenmesi, özellikle IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin rolü ile karakterizedir (125). Uzamış inflamasyon, yara yatağında proteaz aktivitesinin yükselmesine, ekstrasellüler matriks (ECM) yıkımının hızlanmasına ve fibroblastların dokuya zamanında göç edememesine yol açar (126). Aynı zamanda keratinosit proliferasyonundaki azalma ve migrasyonun baskılanması epidermal tabakanın yeniden oluşumunu geciktirerek reepitelizasyon sürecini belirgin biçimde yavaşlatır (127). Bu nedenle HF yanıklarında iyileşme süreci genellikle uzamış seyirli, geniş skar dokusu ve fonksiyonel kayıpla sonuçlanan bir tabloya dönüşebilmektedir (128).

Klinik uygulamada HF yanıklarının yönetiminde tedavinin ilk basamağını, kontamine giysilerin hızla uzaklaştırılması ve etkilenen bölgenin bol su veya uygun irrigasyon solüsyonlarıyla yıkanması oluşturmaktadır (129). Bunu takiben, florür iyonlarının nötralizasyonu için kalsiyum glukonat veya magnezyum tuzlarının kullanımı önerilmektedir; deneysel hayvan modellerinde magnezyum sülfat ve kalsiyum tuzlarının subkutan enjekte edilmesinin HF yanık hasarını azalttığı ve doku iyileşmesini desteklediği bildirilmiştir (130).

Kirkpatrick ve Burd, HF yanıklarının tedavisinde algoritmik bir yaklaşım önererek özellikle derin doku tutulumunda subkütanöz kalsiyum ve magnezyum uygulamalarının florürün bağlanmasını hızlandırdığını ve klinik sonuçları iyileştirdiğini bildirmişlerdir (131).

Bentur ve arkadaşları, göz ve cilt üzerine uygulanan HF yanıklarında kalsiyum glukonatın nekroz progresyonunu sınırlayıcı etkisini deneysel modellerde ortaya koymuştur (132).

Davidson'ın klasik çalışması ve onu izleyen deneysel veriler, DMSO'nun anti-inflamatuvar özellikleri ve hidroflorik asit yanıklarında uygulanan kalsiyum glukonat ile birlikte florür iyonlarının nötralizasyonuna katkı sağlayabileceğini öne sürmüştür; bu bağlamda DMSO'nun serbest radikal süpürücü etkileri de tartışılmıştır. Bununla birlikte, hidrojelde enkapsüle edilen HUCMSC kaynaklı eksozomların fare derin ikinci derece yanık modelinde fibroblastları, endotelyal hücreleri ve makrofajları düzenleyerek doku rejenerasyonunu ve skar oluşumunu engellediği gösterilmiştir (133).

Hao ve Nourbakhsh, deneysel yanık modellerindeki son ilerlemeleri özetlemiş olup, yanık patofizyolojisi ve tedavi stratejilerinin moleküler ve mekanistik temellerini incelemiştir; bununla birlikte hidroflorik asit yanıklarına özgü tedavi yöntemleri hakkında doğrudan klinik öneriler sunmamaktadır (134).

Anderson ve Anderson, hidroflorik asit yanıklarının mekanizmasını ve tedavisinde kalsiyum glukonatın önemini ayrıntılı şekilde tartışmış olup, özellikle etkilenen bölgede kalsiyum glukonat jel uygulanmasının ve gerektiğinde subkütanöz enjeksiyonlarının faydasını vurgulamıştır (135). Benzer şekilde, son yıllarda yayımlanan derleme ve olgu serileri, HF yanıklarında birden fazla tedavi modalitesinin kombine kullanımının tek başına topikal uygulamalara göre daha başarılı sonuçlar verebileceğini ortaya koymaktadır (136).

Öte yandan, hücresiz rejeneratif tedavilere yönelik ilgi, özellikle mezenkimal kök hücre secretome gibi hücresel olmayan biyolojik ürünlerin yara iyileştirme ve doku rejenerasyonunu modüle etme potansiyeli nedeniyle kimyasal yanıkların yönetiminde yeni bir boyut kazandırmıştır (137). Mezenkimal kök hücre (MKH) türevli hücre dışı veziküller, özellikle eksozomlar; proteinler, lipidler, mRNA, mikroRNA ve çeşitli biyoaktif moleküller taşıyarak hücresel iletişimde önemli rol oynamaktadır (138). Eksozomların biyogenezi, hücre içi endozomal yollar üzerinden gerçekleşmekte; bu veziküller hedef hücrelerin fenotipini ve fonksiyonel

özelliklerini değiştirebilen karmaşık bir moleküler kargo taşımaktadır (139). Eksozomların immün yanıtın düzenlenmesi, inflamasyonun modülasyonu, anjiyogenez, fibroblast aktivasyonu ve ECM yeniden yapılanması gibi süreçlerde çok yönlü etkilere sahip olduğu çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarla ortaya konmuştur (140).

Adipoz doku, MKH elde edilmesi açısından kolay erişilebilir, nispeten düşük invaziv girişim gerektiren ve yüksek proliferatif kapasiteye sahip bir kaynak olarak öne çıkmaktadır (141). Adipoz kaynaklı mezenkimal hücrelerden türetilen eksozomların özellikle cilt yaralanmalarında doku onarımı ve immün modülasyon üzerine belirgin etkiler gösterdiği bildirilmiştir (142).

Zuk ve arkadaşlarının klasik çalışması, insan adipoz dokusunun multipotent kök hücreler için önemli bir kaynak olduğunu göstermiş; bunu takiben yayımlanan pek çok çalışma, bu hücrelerden türeyen eksozomların rejeneratif tıptaki yerini güçlendirmiştir (143).

An ve arkadaşları, adipoz kökenli kök hücrelerden elde edilen eksozomların cilt yaralanmalarında epitelizasyonu hızlandırdığını, fibroblast proliferasyonu ve migrasyonunu artırdığını ve anjiyogenezi desteklediğini göstermiştir (144).

Cooper ve arkadaşları, adipoz kök hücre koşullu medyası ve eksozomlarının insan dermal fibroblast göçünü ve iskemik yara iyileşmesini artırdığını rapor ederek eksozom aracılı sinyal iletiminin klinik önemini vurgulamıştır (145).

Hoang ve ekibi ise farklı kaynaklardan (kemik iliği, adipoz, umbilikal kord) elde edilen MKH-eksozomlarının yara iyileştirici kapasitesini karşılaştırmış ve adipoz kaynaklı eksozomların cilt yaralarında dikkat çekici bir potansiyel taşıdığını bildirmiştir (146).

Eksozomların doku rejenerasyonundaki etkileri yalnızca hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile sınırlı değildir (147). Bu veziküllerin makrofaj polarizasyonunu M1'den M2 fenotipine yönlendirdiği (148), böylece inflamatuvar fazın kısaldığı ve proliferatif faza daha hızlı geçiş sağlandığı gösterilmiştir (149).

Wang Y ve arkadaşları, adipoz kökenli eksozomların makrofajlardan IL-33 salınımını artırarak inflamasyon-proliferasyon dengesini düzenlediğini ve ilk hafta içinde epitelizasyonu belirgin biçimde hızlandırdığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, eksozomların yalnızca hücre proliferasyonunu artıran pasif taşıyıcılar değil, aynı zamanda yara mikroçevresini yeniden şekillendiren aktif immünomodülatör ajanlar olduğunu göstermektedir (150).

Hidrojellerle kombine edilen eksozom tedavisi, kontrollü salınım sağlayarak yara yatağında optimal konsantrasyonun korunmasını hedefleyen güncel bir yaklaşımdır (151).

Zhou Y ve arkadaşları, adipoz kaynaklı MKH-eksozomlarının hem sistemik-topikal kombinasyonla hem de Pluronic F127 hidrojel matriksi içerisinde kontrollü salınım şeklinde uygulanmasının erken epitelizasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunu artırdığını göstermiştir (152).

Zhuo H ve arkadaşları, hipoksi ile ön koşullandırılmış adipoz kök hücre eksozomlarını içeren hidrojellerin diyabetik yara modellerinde anjiyogenezi ve granülasyon dokusu oluşumunu belirgin derecede artırdığını bildirmiştir (153).

Amengual-Tugores AM ve ekibi, derin termal yanık modelinde adipoz kökenli eksozom yüklü hiyalüronan hidrojelin epitelizasyonu hızlandığını, fibroblast aktivitesini artırdığını ve skar kontraksiyonunu azalttığını ortaya koymuştur (154).

Benzer şekilde Xu ve arkadaşları, çapraz bağlı kitosan- β -gliserofosfat termosensitif hidrojel ile kombine edilen eksozomların derin yanık modellerinde hem epitelizasyonu hızlandığını hem de dermal matriks organizasyonunu iyileştirdiğini rapor etmişlerdir (155).

Kuncorojakti ve arkadaşlarının sıçanlarda derin parsiyel kalınlıkta yanık modelinde gerçekleştirdikleri çalışmada ise adipoz kökenli sekreton ve eksozom içeren hidrojellerin epitelizasyonu hızlandığı, inflamatuvar yanıtı azalttığı ve skar oluşumunu sınırladığı bildirilmiştir (156).

Eksozomların yanık yaraları üzerindeki rolü, son yıllarda yayımlanan derlemelerle daha da netleşmiştir (157). Farooq N ve ekibi, eksozomların yanık yaraları da dâhil olmak üzere nanomedisin alanında giderek daha fazla araştırıldığını ve özellikle adipoz ve diğer mezenkimal kökenli eksozomların termal yanıklarda güçlü bir hücre dışı terapötik ajan potansiyeli taşıdığını vurgulamıştır (158).

Wang M ve arkadaşları da hücre dışı veziküllerin yanık hasarındaki rolleri, mekanizmaları ve potansiyel klinik uygulamaları üzerine kapsamlı bir derleme sunmuş; inflamasyon, proliferasyon ve remodelleme fazlarında eksozomların özgün roller üstlendiğini, ancak HF gibi kimyasal ajanlarla oluşan yanıklarda henüz sistematik eksozom çalışmalarının bulunmadığını belirtmiştir (159).

Bu literatür birikimi, HF yanıklarının kompleks patofizyolojisi ile adipoz kaynaklı eksozomların immünmodülatör ve rejeneratif özellikleri arasında teorik ve deneysel bir kesişim alanı olduğunu göstermektedir (160). Kalsiyum ve magnezyum temelli klasik tedavilerle florür nötralizasyonu sağlanırken, eksozom temelli hücre dışı yaklaşımlar ile doku rejenerasyonunun desteklenmesi; HF yanıklarının tedavisinde multimodal, biyolojik temelli yeni bir strateji ortaya koyma potansiyeline sahiptir (161). Bu nedenle adipoz mezenkimal kökenli eksozomların HF yanıklarında, özellikle parsiyel kalınlıktaki lezyonlarda klasik tedavilere ek veya alternatif bir biyolojik tedavi modalitesi olarak değerlendirilmesi literatürde önemli ve henüz büyük ölçüde boş olan bir alanı temsil etmektedir (162).

Bu çalışmada elde edilen makroskopik bulgular, adipoz mezenkimal kök hücresi kaynaklı eksozom uygulamasının asidik (hidroflorik asit – HF) kimyasal deri yanığı modelinde doku bütünlüğünün korunması ve iyileşme dinamiklerinin hızlandırılması üzerinde anlamlı ve sürdürülebilir bir etki oluşturduğunu göstermektedir.

Başlangıç ölçümlerinde tüm grupların benzer yanık, eritem ve nekrotik alan değerlerine sahip olması, oluşturulan kimyasal yanık modelinin

homojenliğini doğrulamış ve tedavilerin karşılaştırılabilirliğini sağlamıştır. Bu durum, deneysel kimyasal yanık modellemelerinde başlangıç homojenliğinin sonuç güvenilirliği açısından kritik olduğunu vurgulayan literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumludur. Benzer şekilde HF yanığı progresyon mekanizmalarını tanımlayan güncel derlemeler de, farklı gruplar arasında başlangıç homojenliğinin model geçerliliği açısından zorunlu olduğunu belirtmiştir.

HF yanıkları, derin dokuya hızla penetre olabilme, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarını bağlayarak hücrel metabolizmayı bozma ve yaygın nekroz yaratma eğilimleri nedeniyle diğer kimyasal yanıklardan daha agresif seyretmektedir (163). Deneysel ve klinik çalışmalarda HF'nin yüksek difüzyon kapasitesinin klasik asit yanıklarına kıyasla daha derin ve progresif doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir. HF yanıkları gibi kimyasal toksisite durumlarında dokuların metabolik dengesi bozulurken, eksozom temelli hücresiz yaklaşımların doku rejenerasyonunu destekleme potansiyeli, klasik tedavilere ek veya alternatif bir strateji olarak araştırılmaktadır (164).

Literatürde konvansiyonel Ca^{2+} veya Mg^{2+} bazlı tedavilerin yalnızca florür iyonunun kısmi nötralizasyonu ve ağrı kontrolü açısından etkili olduğu, fakat inflamasyon, doku rejenerasyonu ve nekrotik progresyonun engellenmesi gibi karmaşık biyolojik süreçlerde sınırlı kaldığına dair bulgular mevcuttur. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda bu tedavilerin geç faz iyileşme üzerine sınırlı etkiler gösterdiği bildirilmiştir.

Bu bağlamda çalışma bulgularımız, konvansiyonel tedavilerden bağımsız olarak biyolojik temelli bir terapinin daha derin ve çok yönlü etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Özellikle 48. saatten itibaren eksozom uygulanan grupta gözlenen belirgin iyileşme paterni; eksozomların yalnızca florür iyonunun toksisitesini azaltmadığını, aynı zamanda inflamatuvar yanıtı modüle eden ve fibroblast aktivasyonunu tetikleyen mikroRNA ve protein içerikleriyle biyolojik onarımı hızlandırdığını düşündürmektedir. Deneysel çalışmalarda eksozomal mikroRNA'ların inflamasyonu baskıladığı ve proliferatif sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Benzer şekilde MSC-Exo uygulamalarının oksidatif stres belirteçlerini azalttığı bildirilmiştir.

Orta ve geç dönem ölçümlerde (72–144. saatler) Grup 4'ün sürekli olarak en düşük yanık, eritem ve nekroz alanına sahip olması, eksozom tedavisinin iyileşmeye ilişkin alt biyolojik süreçleri desteklediğini göstermektedir. Bazı deneysel çalışmalarda MSC-Exo'ların keratinosit proliferasyonunu artırdığı ve epitelizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Shao ve arkadaşları eksozom tedavisinin anjiyogenezi artırarak dermal vasküler stabilizasyonu güçlendirdiğini raporlamıştır.

Çalışmanın 168. saat değerlendirmesinde Grup 4'ün üstünlüğünü sürdürmesi, eksozom tedavisinin yalnızca erken dönemde değil, iyileşmenin geç fazında da sürdürülebilir bir biyoterapötik etki sağladığını göstermektedir. Kimyasal yanık modellerinde yapılan deneysel çalışmalarda biyolojik ajanların

progresif nekrozu sınırlayabildiği bildirilmiştir. 2024 yılında yayımlanan güncel derlemeler, florür kaynaklı geç faz doku hasarının yalnızca iyon nötralizasyonu ile tam olarak kontrol altına alınamayacağını vurgulamaktadır.

Bu çalışmada hematoksilen boyalı kesitler, adipoz kökenli eksozom uygulamasının HF ile oluşturulan kimyasal deri yanığı modelinde doku mimarisinin korunması ve rejeneratif sürecin hızlandırılması açısından belirgin üstünlük sağladığını göstermektedir. Erken dönemde (1. ve 3. günler) tüm gruplarda epitel bütünlüğünün bozulması, hemorajik alanların ve yoğun inflamatuvar infiltrasyonun izlenmesi, HF yanığının literatürde tanımlanan agresif ve progresif doku hasarıyla uyumludur. Ancak Grup 4'te hemoraji ve inflamasyonun 3. günden itibaren belirgin şekilde azalması, 7. günde ise epitel tabakasının daha düzenli ve sürekli bir görünüm kazanması; eksozom tedavisinin epitelizasyonu hızlandıran ve dermal organizasyonu destekleyen biyolojik bir yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda Grup 4'te 7. günde kıl foliküllerinin yeniden izlenebilmesi ve hipodermisi oluşturan gevşek-sıkı bağ dokunun daha fizyolojik bir organizasyon göstermesi, ADSC-Exo uygulamasının dermal matriks yeniden yapılanmasını optimize ettiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, adipoz dokuya ait ürünlerin ve ADSC-Exo'nun kollajen remodelling, fibroblast fonksiyonları ve skarsız iyileşme üzerine olumlu etkilerini bildiren çalışmalarla uyumludur.

Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te 7. güne kadar inflamasyonun ve bağ doku düzensizliğinin devam etmesi, HF yanıklarında tanımlanan geç faz inflamasyon ve nekrotik progresyon dinamiklerini yansıtmaktadır. Bu gruplarda kollajen liflerin dağınık yerleşimi, hipodermal damar çevresindeki ödem ve persistan hemorajik odaklar, kimyasal yanıklarda klasik kalsiyum/magnezyum temelli yaklaşımların yalnızca erken nötralizasyon ve ağrı kontrolü sağlayabildiği; doku rejenerasyonu ve inflamatuvar yanıtın çözülmesi üzerinde sınırlı kaldığına dair verilerle paralellik göstermektedir. Buna karşılık, eksozom tedavisi uygulanan grupta 7. günde hem epitel hem de stromal bileşenlerin belirgin ölçüde organize hale gelmesi, son yıllarda yayımlanan yanık ve kronik yara modellerinde ADSC-Exo'nun doku rejenerasyonu, inflamasyon kontrolü ve vasküler stabilizasyon üzerine çok yönlü faydalar sunduğunu vurgulayan çalışmalarla örtüşmektedir.

TUNEL boyaması sonuçları, HF yanık modelinde apoptozun erken dönemde tüm gruplarda belirgin şekilde arttığını ve eksozom tedavisinin bu süreci zaman içinde anlamlı ölçüde modüle ettiğini göstermektedir. Çalışmanın 1. gününde tüm gruplarda epidermal, hipodermal ve damar duvarı düzeyinde yoğun apoptotik hücre birikimi gözlenmesi, HF'nin yüksek penetrasyon kapasitesi ve florür iyonuna bağlı hücresel toksisite nedeniyle erken dönemde yaygın hücre ölümü oluşturduğu yönündeki verilerle uyumludur. Grup 2 ve Grup 3'te 7. günde dahi TUNEL pozitif hücrelerin belirgin düzeyde devam etmesi, kimyasal yanıklarda inflamasyon ve apoptozun geç faza kadar sürebildiğini ve biyolojik modülatör kullanılmadığında doku kaybının derinleştiğini bildiren çalışmalarla paralellik göstermektedir. Buna karşın,

eksozom uygulanan Grup 4'te 3. günden itibaren apoptotik hücre sayısında belirgin düşüş ve 7. günde diğer gruplara kıyasla dramatik azalma izlenmesi, ADSC-Exo'nun hücrel bütünlüğü koruyucu ve antiapoptotik bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu bağlamda TUNEL boyamasında Grup 4'te epitel tabakasında apoptotik hücrelerin neredeyse hiç izlenmemesi, eksozom tedavisinin yalnızca stromal komponentlerde değil, epitel dokuda da koruyucu bir etki gösterdiğini ve rejeneratif yanıtı güçlendirdiğini desteklemektedir.

İmmünohistokimyasal boyama sonuçları, TUNEL bulgularını destekler nitelikte olup, ADSC-Exo uygulamasının inflamasyonun baskılanması, anjiyogenez ve hücrel proliferasyonun düzenlenmesi üzerinde çok yönlü etkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır. TNF- α immünoaktivitesi değerlendirildiğinde, HF yanığı sonrası erken dönemde (1. gün) tüm gruplarda belirgin artış izlenmiş, bu durum akut inflamatuvar yanıtın tüm deney gruplarında benzer şekilde aktive olduğunu göstermiştir. Ancak 3. günden itibaren eksozom uygulanan Grup 4'te TNF- α immünoaktivitesinin anlamlı düzeyde azalması ve 7. günde bu azalmanın daha da belirgin hale gelmesi, ADSC-Exo'nun inflamatuvar sürecin çözülmesini hızlandığını düşündürmektedir. Buna karşılık Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te TNF- α pozitifliğinin 7. güne kadar devam etmesi, HF yanıklarında tanımlanan persistan inflamasyon paterni ile uyumludur.

VEGF immünoaktivitesi incelendiğinde, erken dönemde tüm gruplarda artmış VEGF ekspresyonu izlenmiş olup, bu durum HF yanığı sonrası erken anjiyogenik yanıtın aktive olduğunu göstermektedir. Ancak zaman içerisinde gruplar arasında belirgin farklılıklar ortaya çıkmıştır. Özellikle 7. günde ADSC-Exo uygulanan Grup 4'te epitel altı bağ doku ve hipodermal bölgelerde belirgin VEGF artışı ve yoğun damar yapılarının izlenmesi, eksozom tedavisinin anjiyogenezi destekleyici etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Diğer gruplarda VEGF immünoaktivitesinin azalması ise, klasik tedavilerin damarlanma sürecini sürdürmede sınırlı kaldığını düşündürmektedir. Grup 4'te artmış VEGF ekspresyonunun, hızlanmış epitelizasyon ve doku bütünlüğünün yeniden kazanılması ile paralel seyretmesi dikkat çekicidir.

Bu çalışmada hücrel proliferasyonun göstergesi olarak değerlendirilen PCNA immünoaktivitesi, yanık sonrası erken dönemde tüm gruplarda benzer düzeylerde izlenmiş olup, bu bulgu akut doku hasarını takiben gelişen ortak proliferatif yanıtı yansıtmaktadır. Üçüncü ve yedinci gün değerlendirmelerinde ise gruplar arasında belirgin farklılıkların ortaya çıktığı görülmüştür. Üçüncü günde ADSC-Exo uygulanan grupta PCNA pozitifliğinin özellikle hipodermal bölgelerde göreceli olarak azalması, proliferatif aktivitenin erken dönemde daha kontrollü bir seyir izlediğine işaret edebilir. Buna karşılık diğer gruplarda hipodermiste devam eden PCNA ekspresyonu, onarım sürecinin daha çok stromal düzeyde sürdüğünü düşündürmektedir. Yedinci günde ADSC-Exo grubunda PCNA pozitif hücrelerin epidermal tabakada belirginleşmesi, proliferatif yanıtın epitelizasyon süreciyle ilişkili

olarak yeniden dağıldığını göstermektedir. Bu mekânsal farklılaşma, hücresel proliferasyonun zamansal düzenlenmesine katkı sağlayan bir etkiyi düşündürmekle birlikte, söz konusu bulgunun doğrudan neden-sonuç ilişkisi kuracak şekilde yorumlanabilmesi için ileri mekanistik çalışmalara ihtiyaç vardır. Diğer gruplarda PCNA ekspresyonunun ağırlıklı olarak hipodermal bağ doku ile sınırlı kalması, epitelizasyon sürecinin daha yavaş veya sınırlı bir şekilde ilerlediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, hematoksilen, TUNEL ve immünohistokimyasal boyama sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, ADSC-Exo temelli tedavinin HF kaynaklı kimyasal deri yanıklarında klasik yaklaşımlara kıyasla daha bütüncül ve etkin bir iyileştirici etki sağladığı görülmektedir. Eksozom uygulaması; inflamasyonun erken dönemde baskılanması (TNF- α), hücresel kaybın ve apoptozun sınırlandırılması (TUNEL), anjiyogenez ve vasküler stabilitenin desteklenmesi (VEGF) ile hücresel proliferasyonun ve doku yenilenmesinin hızlandırılması (PCNA) ekseninde çok yönlü bir biyolojik yanıt oluşturmaktadır. Bu çok katmanlı etki, hem epitel hem de stromal bileşenlerde daha düzenli bir doku mimarisinin yeniden kazanılmasına olanak sağlamaktadır.

Genel olarak elde edilen bulgular, ADSC-Exo uygulamasının HF yanıklarının agresif ve progresif patofizyolojisine karşı inflamasyon–apoptoz–anjiyogenez–proliferasyon ekseninde etkili bir biyolojik modülatör olarak görev yapabildiğini göstermektedir. Bu bulgular, MSC ve MSC-Exo temelli yaklaşımların kimyasal yanık modellerinde iyileşme süresini anlamlı biçimde kısalttığını bildiren çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (165). Bu yönüyle eksozom temelli biyoterapötik yaklaşımlar, HF yanıklarının deneysel ve klinik yönetiminde umut vadeden bir tedavi alternatifi olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, farklı doz, uygulama zamanlaması ve kombinasyon protokollerinin değerlendirildiği daha geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma, hidroflorik asit ile oluşturulan kimyasal deri yanığında adipoz kökenli eksozom uygulamasının erken doku iyileşmesini belirgin biçimde hızlandığını göstermiştir. Başlangıç ölçümlerinin tüm gruplarda benzer olması, oluşturulan modelin güvenilirliğini doğrulamıştır.

Eksozom uygulanan grupta 48. saatten itibaren yanık, eritem ve nekrotik alanların belirgin şekilde küçüldüğü ve bu iyileşme eğiliminin 168. saate kadar sürdüğü görülmüştür. Kalsiyum glukonat ve magnezyum sülfat uygulanan gruplarda iyileşme olmakla birlikte, bu tedaviler eksozom uygulamasının sağladığı doku onarım hızına ve sürekliliğine ulaşamamıştır.

Eksozom uygulanan hayvanlarda 7. günde hemorajinin ve inflamatuvar hücre yoğunluğunun azalması, epitel bütünlüğünün yeniden oluşması ve hipodermal bağ dokunun daha düzenli bir yapı kazanması dikkat çekmiştir. Diğer gruplarda aynı dönemde inflamasyonun ve doku düzensizliğinin devam ettiği izlenmiştir. Ayrıca apoptotik hücre sayısı eksozom uygulanan grupta 3. ve 7. günlerde belirgin şekilde azalmış; epitel tabakasında apoptotik hücrelerin oldukça düşük düzeyde seyrettiği görülmüştür.

İmmünohistokimyasal değerlendirmeler bu bulguları destekler nitelikte olup, eksozom tedavisinin doku iyileşmesinin farklı biyolojik basamaklarını eş zamanlı olarak modüle ettiğini ortaya koymuştur. TNF- α immünoaktivitesinin eksozom uygulanan grupta erken dönemde baskılandığı, buna karşılık kontrol ve diğer tedavi gruplarında inflamatuvar aktivitenin daha uzun süre devam ettiği izlenmiştir. VEGF immünoaktivitesinin özellikle 7. günde eksozom uygulanan grupta belirgin şekilde artması, anjiyogenez ve vasküler stabilitenin bu grupta daha etkin biçimde desteklendiğini düşündürmektedir. Hücrel proliferasyonun göstergesi olan PCNA ekspresyonunun ADSC-Exo grubunda zamana bağlı olarak epidermal tabakada belirginleşmesi, epitelizasyon süreciyle ilişkili daha organize bir onarım yanıtını düşündürmektedir.

Genel olarak eksozom tedavisi, inflamasyonu ve apoptozu azaltarak doku hasarının ilerlemesini sınırlamış; epitelizasyonu ve bağ doku rejenerasyonunu hızlandırarak klasik nötralizan tedavilere kıyasla daha bütüncül ve etkili bir onarım yanıtı oluşturmuştur. Bu bulgular, adipoz kökenli eksozomların HF yanıklarında umut vadeden bir biyoterapötik seçenek olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Yakupu A, et al. The epidemiological characteristic and trends of burns globally. BMC Public Health. 2022;22:13887.
2. Peck MD. Epidemiology of burns throughout the world. Burns. 2011;37(7):1087-1100.
3. Uyar B, Akkoç MF, Bülbüloğlu S, Yilmaz R. Examining perceived stress and body image in burn patients: a cross-sectional study. Int Wound J. 2023;20(5):1369–1375. doi:10.1111/iwj.13983
4. Hall AH, Mathieu L, Maibach HI. Acute chemical skin injuries in the United States: a review. Crit Rev Toxicol. 2018;48(7):540–554. doi:10.1080/10408444.2018.1493085
5. Fang H, Liu X, Tang J, et al. Potentially fatal electrolyte imbalance caused by severe hydrofluoric acid burns: A case report and literature review. Medicine (Baltimore). 2019;98(14):e15025.
6. Petroni D, Pimentel F, De Santi G, de Paula Lobo M, Vecchi M, Crescitelli R. Extracellular vesicles and intercellular communication. Cells. 2023;12(16):2034. doi:10.3390/cells12162034.
7. He X, Dong Z, Cao Y, Wang H, Liu S, Liao L, Jin Y, Yuan L, Li B. MSC-derived exosome promotes M2 polarization and enhances cutaneous wound healing. Stem Cells Int. 2019;2019:7132708. doi:10.1155/2019/7132708. PMID: 31582986
8. Barry BW. Structure and function of the skin. In: Walters KA, ed. Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 19–58.
9. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text and Atlas. 13th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2017.
10. Esmer TŞ. Derinin Yapısı ve Anatomisi. Türkiye Klinikleri Gen Surg Spec Top. 2021;14(4):1–7.
11. Gray H. Anatomy of the Human Body. 20th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1918.
12. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clin Dermatol. 2012;30(3):257–62.
13. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016.

14. Eroschenko VP. DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 12th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2013.
15. Nguyen AV, Soulika AM. The dynamics of the skin's immune system. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1811. doi:10.3390/ijms20081811
16. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007.
17. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Wheater's Functional Histology. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
18. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003;121(2):231–241.
19. Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(2):a004911. doi:10.1101/cshperspect.a004911.
20. Burgeson RE, Christiano AM. The dermal–epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(5):651–658.
21. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002 Jul-Aug;12(4):390-399.
22. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314–321. doi:10.1038/nature07039.
23. Shimizu H, editor. Shimizu's Textbook of Dermatology. Hokkaido University Press; 2007. ISBN: 4521679218, 9784521679211.
24. Meigel WN, Silva KA, Vest CD, Kempson SA. Dermal architecture and collagen type distribution. *J Invest Dermatol*. 1977;69(2):153–158.
25. Pond CM. An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 1992 Dec;51(3):367–377. doi:10.1079/pns19920050.
26. Griffiths CEM, Barker J, Bleiker TO, Hussain W, Simpson RC, editors. Rook's Textbook of Dermatology. 10th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2024. ISBN: 9781119709213.
27. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:339–373. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104357.
28. Cui CY, Schlessinger D. Eccrine sweat gland development and sweat secretion. *Exp Dermatol*. 2015;24(9):644–50.
29. Montagna W, Parakkal PF. The Structure and Function of Skin. 3rd ed. New York: Academic Press; 1974. ISBN: 0-12-505263-4.

30. Chen WC, Zouboulis CC. Hormones and the pilosebaceous unit. *Dermatoendocrinol.* 2009;1(2):81–6.
31. Gravitz L. Skin. *Nature.* 2018;563(7732):S83. doi: 10.1038/d41586-018-07421-8
32. İnözü E. Derinin Anatomisi, Görevleri ve Yara İyileşmesi. *Türkiye Klinikleri Pediatr Surg Spec Top.* 2024;14(1):8–13.
33. Baker LB. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and thermoregulation. *Auton Neurosci.* 2019;214:1–9. doi:10.1016/j.autneu.2018.11.001.
34. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35–43.
35. Leoni G, Neumann PA, Sumagin R, Denning TL, Nusrat A. Wound repair: role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):959–68.
36. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):9–18.
37. Azamat İF, Kulle CB, Yanar F. Yara İyileşmesi. *Türkiye Klinikleri Gen Surg Spec Top.* 2019;12(4):40–8.
38. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2018;81(2):94–101.
39. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(18):3209–13.
40. Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of wound healing. *Curr Dermatol Rep.* 2018;7(4):350–8.
41. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. *J Clin Invest.* 1989;84(2):640–646. doi:10.1172/JCI114210. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2788174/>
42. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado ARAP. Wound healing — a literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2016;91(5):614–620. https://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962016000500614
43. Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599–610.
44. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):265sr6.
45. Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. The biology of burn injury. *Exp Dermatol.* 2010;19(9):777–83.

46. Baxter CR, Shires T. Physiological response to crystalloid resuscitation of severe burns. *Ann N Y Acad Sci.* 1968 Aug 14;150(3):874–894. doi:10.1111/j.1749-6632.1968.tb14738.x.
47. Ehrl D, Heidekrueger PI, Ninkovic M, Broer PN, Giunta RE, Mutschler W, et al. Effect of primary admission to burn centers on outcomes of severely burned patients. *Burns.* 2018;44(3):524–530.
48. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care.* 2015;19:243.
49. Noorbakhsh SI, Ahmadi A, Mohammadi S, Saghafi M. Classification of thermal burn injury by depth. *Arch Trauma Res.* 2021;10(3):143–148. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8637691/>
50. O'Brien SP, Billmire DA. Prevention and management of outpatient pediatric burns. *J Craniofac Surg.* 2008;19(4):1034–9.
51. Ji S, Xiao S, Xia Z, Chinese Burn Association Tissue Repair of Burns and Trauma Committee. Consensus on the treatment of second-degree burn wounds (2024 edition). *Burns Trauma.* 2024;12:61.
52. McCauley RL. Reconstruction of the burned patient. In: Neligan PC, ed. *Plastic Surgery.* 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 567–612.
53. Pan SC. Burn blister fluids in the neovascularization stage of burn wound healing: A comparison between superficial and deep partial-thickness burn wounds. *Burns Trauma.* 2013;1(1):27–31. doi:10.4103/2321-3868.113332. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4994503/>
54. Papini R. Management of burn injuries of various depths. *BMJ.* 2004;329(7458):158–160.
55. Hettiaratchy S, Dziwulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ.* 2004;328(7453):1427–1429.
56. Wallace AB. The exposure treatment of burns. *Lancet.* 1951;1(6653):501–4.
57. Lund CC, Browder NC. The estimation of areas of burns. *Surg Gynecol Obstet.* 1944;79:352–358.
58. Kagan RI, Warden GD. Care of minor burn injuries: an analysis of burn clinic and emergency room charges. *J Burn Care Rehabil.* 2001;22(5):337–40.
59. Hettiaratchy S, Papini R. Initial management of a major burn: I—overview. *BMJ.* 2004;328(7455):1555–1557.
60. Palmieri TL, Greenhalgh DG. Burn resuscitation. *Crit Care Clin.* 2016;32(4):547–558.

61. Procter F. Rehabilitation of the burn patient. *Indian J Plast Surg.* 2010;43(Suppl):S101–S113. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3038404/>
62. Church D, Elsayed S, Reid O, et al. The evaluation and management of thermal injuries: 2014 update. *J Burn Care Res.* 2014;35(3):e1–e8. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5052819/>
63. Jackson DM. The diagnosis of the depth of burning. *Br J Surg.* 1953;40:588–596.
64. Singer AJ, Dagum AB. Current management of acute cutaneous wounds. *N Engl J Med.* 2008;359(10):1037–1046.
65. Atiyeh BS, Gunn SW, Hayek SN. State of the art in burn treatment. *World J Surg.* 2005;29(2):131–148.
66. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):514–525. doi:10.1038/sj.jid.5700701.
67. Schoenbrunner A, Banda W, Gosman AA. Global burn care: education and research. *Clin Plast Surg.* 2017;44(3):485–493. doi:10.1016/j.cps.2017.02.006.
68. Nguyen NL, Gun RT, Sparnon AL, Ryan P. The importance of immediate cooling: a case series of childhood burns in Vietnam. *Burns.* 2002;28(2):173–6.
69. Cartotto R. Fluid resuscitation of the thermally injured patient. *Clin Plast Surg.* 2009;36(4):569–81.
70. Indrasena BSH. Brooke formula revisited. *Burns.* 2014;40(8):1818–1819. doi:10.1016/j.burns.2014.09.016.
71. Cancio LC. Initial assessment and fluid resuscitation of burn patients. *Surg Clin North Am.* 2014;94(4):741–54.
72. Haberal M, Sakallioglu AE, Karakayali H. Fluid management in major burn injuries. *Indian J Plast Surg.* 2010;43(Suppl):S29–S36. doi:10.4103/0970-0358.70715.
73. Atiyeh BS, Hayek SN, Gunn SW. New technologies for burn wound closure and healing: review of the literature. *Burns.* 2005;31(8):944–56.
74. Surowiecka A, et al. Hydrogels in burn wound management—a review. *PMC Articles.* 2022. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8872485/>
75. Gacto-Sanchez P. Surgical treatment and management of the severely burn patient: review and update. *Med Intensiva (Engl Ed).* 2017;41(6):356–64.
76. Mosier MJ, et al. Surgical excision of the burn wound. *Clin Plast Surg.* 2009;36(3):383–399. PMID: 19793556. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19793556/>

77. Greenhalgh DG. Management of burns. *N Engl J Med*. 2019;380(24):2349–2359.
78. Walsh K, Hughes I, Dheansa B. Management of chemical burns. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2022 Mar 2;83(3):1–12. doi:10.12968/hmed.2020.0056.
79. Rodeheaver GT, Hiebert JM, Edlich RF. Initial treatment of chemical skin and eye burns. *Compr Ther*. 1982;8(5):37–43. PMID:7094559.
80. Palao R, Monge I, Ruiz M, Barret JP. Chemical burns: Pathophysiology and treatment. *Burns*. 2010;36(3):295–304. doi:10.1016/j.burns.2009.07.009. PMID:19864073. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19864073/>
81. Aigueperse J, Mollard P, Devilliers D, Chemla M, Faron R, Romano R, et al. Fluorine Compounds, Inorganic. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH; 2000. (Article No: a11_307).
82. Bertolini JC. Hydrofluoric acid: a review of toxicity. *J Emerg Med*. 1992;10(2):163–168.
83. Holleman AF, Wiberg E. *Inorganic Chemistry*. San Diego: Academic Press; 2001.
84. Yamashita M, Yamashita M, Suzuki M, Hirai H, Kajigaya H. Iontophoretic delivery of calcium for experimental hydrofluoric acid burns. *Crit Care Med*. 2001;29(8):1575–8.
85. Nelson LS, Howland MA, Lewin NA, Smith SW, Goldfrank LR, Hoffman RS, eds. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. 11th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2019.
86. Stuke LE, Arnoldo BD, Hunt JL, Purdue GF. Hydrofluoric acid burns: a 15-year experience. *J Burn Care Res*. 2008;29(4): 631–636. doi: 10.1097/BCR.0b013e31817db2d3 PMID: 18535470
87. Beiran I, Ziser A, Lifshitz T, Weinbroum AA. The efficacy of calcium gluconate in ocular hydrofluoric acid burns. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1997;17(4):155–160. doi:10.1177/096032719701600412.
88. Matsuno K. The treatment of hydrofluoric acid burns. *Occup Med (Lond)*. 1996;46(4):313–317. doi:10.1093/occmed/46.4.313.
89. Siegel DC, Heard JM. Intra-arterial calcium infusion for hydrofluoric acid burns. *Burns*. 1992;18(4):285–288.
90. Henry JA, Hla KK. Intravenous regional calcium gluconate perfusion for hydrofluoric acid burns. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1992;30(2):203–7.
91. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967–978. doi:10.1016/0092-8674(83)90040-5.

92. Hong P, Yang H, Wu Y, Li K, Tang Z. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):242. doi:10.1186/s13287-019-1358-y.
93. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019;9:19. doi:10.1186/s13578-019-0282-2.
94. Araldi RP, D'Amelio F, Vigerelli H, de Melo TC, Kerkis I. Stem cell-derived exosomes as therapeutic approach for neurodegenerative disorders: from biology to biotechnology. *Cells.* 2020;9(12):2663.
95. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;29:116–125.
96. Rahmati S, Shojaei F, Shojaeian A, Reza khani L, Dehkordi MB. An overview of current knowledge in biological functions and potential theragnostic applications of exosomes. *Chem Phys Lipids.* 2020;226:104836.
97. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.
98. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373–383.
99. Fu Y, Xie JL, Zhang XL, Xie GM, Zhang XM, Han YT, Xu MM, Zhang J, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes induce epithelial remodeling and anti-scar healing revealed by single-cell RNA sequencing. *J Nanobiotechnology.* 2025;23:Article number (online). doi:10.1186/s12951-025-03548-y.
100. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the IFATS and ISCT. *Cytotherapy.* 2013;15(6):641–648. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006
101. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249–1260.
102. Gong M, Yu B, Wang J, Wang Y, Liu M, Paul C, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget.* 2017;8(28):45200–12.
103. Pi L, Yang L, Fang B-R, Meng X-X, Qian L. LncRNA MALAT1 from human adipose-derived stem cell exosomes accelerates wound healing via miR-378a/FGF2 axis. *Regen Med.* 2022;17(9):627-641. doi:10.2217/rme-2021-0170. PMID:35822640.

104. Pu CM, Liu CW, Liang CJ, Yen YH, Chen SH, Jiang-Shieh YF, et al. Adipose-derived stem cells protect skin flaps against ischemia/reperfusion injury via IL-6 expression. *J Invest Dermatol.* 2017;137(6):1353–62.
105. Sun G, Li G, Li D, Huang W, Zhang R, Zhang H, et al. hucMSC-derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation. *Mater Sci Eng C.* 2018;89:194–204.
106. Ghetu DM, Raymond K, Titorencu I, Simionescu M. Innovative strategies: use of stromal cell-derived secretome for chronic wound therapy. *Int J Mol Sci.* 2025;26(12):5609. doi:10.3390/ijms26125609. PMID: (open access) <https://doi.org/10.3390/ijms26125609>
107. Weaver AM, Patton JG. Argonautes in extracellular vesicles: artifact or selected cargo? *Cancer Res.* 2020;80(3):379–81.
108. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1287–1312.
109. Manzoor T, Farooq N, Sharma A, Shiekh PA, Hassan A, Dar LA, et al. Exosomes in nanomedicine: a promising cell-free therapeutic intervention in burn wounds. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1):19.
110. Chen J, Li P, Zhang T, Xu Z, Huang X, Wang R, et al. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;9:811971.
111. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics.* 2017;7(3):789–804.
112. Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells.* 2019;8(7):727. doi:10.3390/cells8070727. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/727>
113. Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and problems of exosome isolation from biological fluids. *Biochemistry (Mosc Suppl A Membr Cell Biol).* 2022;16(2):115–126. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35730027/>
114. Liu WZ, Ma ZJ, Kang XW. Current status and outlook of advances in exosome isolation. *Anal Bioanal Chem.* 2022;414(24):7123–41.
115. Hatzifotis M, Williams A, Muller M, Pegg S. Hydrofluoric acid burns. *Burns.* 2004;30(2):156–159. doi:10.1016/j.burns.2003.09.031.
116. Bajraktarova-Valjakova E, Korunoska-Stevkovska V, Georgieva S, Ivanovski K, Bajraktarova-Misevska C, Mijoska A, Grozdanov A. Hydrofluoric acid: Burns and systemic toxicity, protective measures, immediate and hospital medical treatment. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(11):2257–2269. doi:10.3889/oamjms.2018.429. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30559898/>

117. Burgher F, Mathieu L, Lati E, Gasser P, Peno-Mazzarino L, Blomet J, Hall AH, Maibach HI. Experimental 70% hydrofluoric acid burns: histological observations in an established human skin explants ex vivo model. *Cutan Ocul Toxicol.* 2011;30(2):100-107. doi:10.3109/15569527.2010.533316. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3116716/>
118. Lim HS, Cheong HK, Kim JY, Lee K, Kim K, Hwang HS. Occupational hydrofluoric acid burns in a hydrofluoric acid manufacturing factory. *J Prev Med Public Health.* 2004;37(2):181-186. Available from: <https://www.jpmph.org/journal/view.php?number=590>
119. MacKinnon MA. Hydrofluoric acid burns. *Dermatol Clin.* 1988;6(1):67–74. PMID: 3383459. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3383459/>
120. Stremski ES, Grande GA, Ling LJ. Survival following hydrofluoric acid ingestion. *Ann Emerg Med.* 1992;21(11):1396-1399. doi:10.1016/S0196-0644(05)81910-9.
121. Lippert J, Desai B, Falgiani M, Ganti L. Management of hydrofluoric acid burns in the emergency department. *Cureus.* 2020;12(3):e7152. doi:10.7759/cureus.7152.
122. Boink AB, ten Berge WF, van den Berg G, Leusink JA, Banga JD. The mechanism of fluoride-induced hypocalcaemia. *Hum Exp Toxicol.* 1994;13(3):149–155. doi:10.1177/096032719401300302.
123. Mayer TG, Gross PL. Fatal systemic fluorosis due to hydrofluoric acid burns. *Ann Emerg Med.* 1985;14(2):149–153. doi:10.1016/S0196-0644(85)81078-7.
124. Wang L, Hu L, Zhou X, Xiong Z, Zhang C, Shehada HMA, et al. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. *Sci Rep.* 2017;7:12919.
125. Weiliang Z, Xiaoyan L, Li L, Rui Z, Chenguang Z, Qiang Z, et al. Research advances in the application of adipose-derived stem cells and their exosomes in skin wound healing. *Ann Dermatol.* 2021;33(4):309–18.
126. Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 1996;4(2):234–239. doi:10.1046/j.1524-475X.1996.40211.x.
127. Zhou Y, Zhang XL, Lu ST, Zhang NY, Zhang HJ, Zhang J, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):407. doi:10.1186/s13287-022-03088-0.

128. Barillo DJ, Cancio LC, Goodwin CW. Treatment of white phosphorus and other chemical burn injuries at one burn center over a 51-year period. *Burns*. 2004 Aug;30(5):448–452. doi:10.1016/j.burns.2004.01.032.
129. Makarovsky I, Markel G, Dushnitsky T, Eisenkraft A. Hydrogen fluoride—the protoplasmic poison. *Isr Med Assoc J*. 2008;10(5):381–385.
130. Seyb ST, Caywood DD, Ross PB. A study to determine the efficacy of treatments for hydrofluoric acid burns: comparison of magnesium and calcium salts in an animal model. *J Burn Care Rehabil*. 1995;16(Suppl 3 Pt 1):253. PMID:7673304. doi:10.1097/00004630-199507000-00065. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7673304/>
131. Kirkpatrick JJR, Burd DAR. An algorithmic approach to the treatment of hydrofluoric acid burns. *Burns*. 1995;21(7):495–499.
132. Bentur Y, Tannenbaum S, Yaffe Y, Halpert M. The role of calcium gluconate in the treatment of hydrofluoric acid eye burn. *Ann Emerg Med*. 1993;22(9):1488–90.
133. Yang YL, Vinod Kumar GS, et al. Exosome-encapsulated hyaluronic acid macroporous hydrogel for enhanced burn wound healing in a mouse model. *Int J Biol Macromol*. 2025;290:138712. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.138712. PMID:39710019
134. Hao D, et al. Recent Advances in Experimental Burn Models. *Biology (Basel)*. 2021;10(6):526.
135. Anderson WJ, Anderson JR. Hydrofluoric acid burns of the hand: mechanism of injury and treatment. *J Hand Surg Am*. 1988;13(1):52–57.
136. McKee D, Thoma A, Bailey K, Fish J. A review of hydrofluoric acid burn management. *Can J Plast Surg*. 2014;22(2):95–98. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4116323/>
137. Prado-Yupanqui JW, Ramírez-Orrego L, Cortez D, Vera-Ponce VJ, Chenet SM, Tejedo JR, Tapia-Limonchi R. The Hidden Power of the Secretome: Therapeutic Potential on Wound Healing and Cell-Free Regenerative Medicine—A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2025;26(5):1926. doi:10.3390/ijms26051926.
138. Asgarpour K, et al. Exosomal microRNAs derived from mesenchymal stem cells and their role in regenerative medicine. *Cell Commun Signal*. 2020;18:102. doi:10.1186/s12964-020-00650-6.
139. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977.
140. Ju C, et al. Exosomal microRNAs from mesenchymal stem cells regulate inflammation response and promote wound healing: current insights. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2023. PMID: 37131016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37131016/>

141. Huynh TD, et al. Exosomes from adipose tissue mesenchymal stem cells: mechanisms and therapeutic applications. *Biomolecules*. 2025;12(10):1129. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-5354/12/10/1129>.
142. Feng H, Gong S, Liu J, Aghayants S, Liu Y, Wu M, Song J. Adipose-derived stem cell exosomes: mechanisms and therapeutic potentials in wound healing. *Biomarker Research*. 2025;13:88. Available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-025-00801-2>
143. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–228. doi:10.1089/107632701300062859.
144. An Y, Lin S, Tan X, Wu J, Li D, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells and application to skin wound healing. *Cell Prolif*. 2021;54:e12993. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7941238/>
145. Cooper DR, Wang C, Patel R, Trujillo A, Patel NA, Prather J, Gould LJ, Wu MH. Human adipose-derived stem cell conditioned media and exosomes containing MALAT1 promote human dermal fibroblast migration and ischemic wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018;7(8):299–308. PMID:30263873.
146. Hoang DH, Nguyen TD, Nguyen HP, Nguyen XH, Do PTX, Dang VD, et al. Differential wound healing capacity of mesenchymal stem cell-derived exosomes originated from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord under serum- and xeno-free condition. *Front Mol Biosci*. 2020;7:119. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.00119/full>
147. Jo CB, et al. Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Exosomes in Tissue Regeneration and Wound Healing. *Cells Tissues Organs*. 2025;10(8):546. Available from: <https://www.mdpi.com/2313-7673/10/8/546>
148. Yin D, Chen Y, Zhou K, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells regulate macrophage polarization and accelerate diabetic wound healing via the circ-Rps5/miR-124-3p axis. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2024;12(4):e888. doi:10.1002/iid3.888.
149. Kim H, Wang SY, Kwak G, et al. Exosome-guided phenotypic switch of M1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing. *Adv Sci (Weinh)*. 2019;6(19):1900513. doi: 10.1002/advs.201900513
150. Wang Y, Ding H, Bai R, Li Q, Ren B, Lin P, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells accelerate wound healing by increasing the release of IL-33 from macrophages. *Stem Cell Res Ther*. 2025;16(1):80. doi: 10.1186/s13287-025-04203-x

151. Wang C, Wang M, Xu T, Zhang X, Lin C, Gao W, et al. Hydrogel-mediated sustained release of MSC-derived exosomes accelerates wound healing. *Bioact Mater*. 2021;6(12):4461–73.
152. Ye S, Zhou Y, Zhao Q, Chen Y, Sun Z, Zhong H, et al. Pluronic-based controlled release system for exosome delivery in skin regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;118:111387. doi: 10.1016/j.msec.2020.111387
153. Zhuo H, Chen Y, Zhao G. Advances in application of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1446050. doi: 10.3389/fcell.2024.1446050
154. Amengual-Tugores AM, Ráez-Meseguer C, Forteza-Genestra MA, Monjo M, Ramis JM. Extracellular vesicle-based hydrogels for wound healing applications. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4104. doi: 10.3390/ijms24044104 Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms24044104>
155. Xu L, Liu D, Yun HL, Zhang W, Ren L, Li WW, et al. Effect of adipose-derived stem cells exosomes cross-linked chitosan- $\alpha\beta$ -glycerophosphate thermosensitive hydrogel on deep burn wounds. *World J Stem Cells*. 2025;17(2):102091. doi: 10.4252/wjsc.v17.i2.102091 Available from: <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v17/i2/102091.htm>
156. Kuncorojakti S, Pratama AZA, Antujala CA, Harijanto CTB, Arsy RK, Kurniawan PA, et al. Acceleration of wound healing using adipose mesenchymal stem cell secretome hydrogel on partial-thickness cutaneous thermal burn wounds: An in vivo study in rats. *Vet World*. 2024;17(7):1545–1554. doi: 10.14202/vetworld.2024.1545-1554
157. Ye H, Wang F, Xu G, Shu F, Fan K, Wang D. Advancements in engineered exosomes for wound repair: current research and future perspectives. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1301362. doi: 10.3389/fbioe.2023.1301362
158. Farooq M, Manzoor T, Shiekh PA, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes in burn wound management: an updated review. *Burns Trauma*. 2023;11:tkad045.
159. Wang M, Zhao X, Cui Y, Gui H, Wang S, Liu Z, Wang X. Extracellular vesicles in burn injury: roles, mechanisms, and applications. *Burns Trauma*. 2025;13:tkaf006. doi:10.1093/burnst/tkaf006.
160. Caravati EM. Acute hydrofluoric acid exposure. *Am J Emerg Med*. 1988;6(2):143–150. PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3281684/>
161. Wang X, Duan J, Han Z, Zhang Y, Zhao J, Zhang Y. Treatment strategies for hydrofluoric acid burns: current status and future prospects. *Burns*. 2014;40(8):1447–1457.

162. Strausburg M, Travers J, Mousdicas N. Hydrofluoric acid exposure: a case report and review on the clinical presentation and management. *Dermatitis*. 2012;23(5):231–236. PMID: 23010832.

163. Holla R, Howland MA, Ruan W, Hoffman RS. Hydrofluoric acid burns: dermal contact results in deep tissue necrosis and severe systemic toxicity. *J Burn Care Res*. 2016;37(1):e41–e46. PMID: 27189091.

164. Azaryan E, Duan M, Zhang Y, Zhang H, Meng Y, Qian M, et al. Cell-free therapy based on stem cell-derived exosomes: clinical potential in wound management. *Wound Repair Regen*. 2022;30(4):615-629. doi: 10.1111/wrr.13043

165. Zhu D, Hu Y, Kong X, Luo Y, Zhang Y, Wu Y, et al. Enhanced burn wound healing by controlled-release 3D adipose-derived mesenchymal stem cell-exosome hydrogel. *Regenerative Biomaterials*. 2024;11:rbae035. PMID: 38628545.

