

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

UZUN SÜRELİ STEROİD BASKISI ALTINDAKİ
FARELERDE OLUŞTURULAN YARA MODELİNDE FARE
EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDEN
FARKLILAŞTIRILAN KERATİNOSİTLERİN YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Araştırma Görevlisi: Dr.İlayda GENÇER USLU

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Hasan AYDEDE

Manisa, 2023

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen hocam ve tez danışmanım Prof.Dr.Hasan Aydede'ye, eğitimime katkısı olan tüm hocalarıma, asistanlığım süresince çalıştığım bütün asistan, hemşire ve öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında bana yardımını esirgemeyen Prof.Dr. H.Seda Vatansever'e teşekkür ederim.

Projeme maddi destek sağlayan üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Yoğun tez ve asistanlık dönemimde bana her zaman destek olan aileme teşekkür ederim.

Dr. İlayda GENÇER USLU

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deri Embriyolojisi ve Histolojisi	3
2.1.1. Deri Kalınlığı	4
2.1.2. Embriyoloji	4
2.1.3. Epidermis	5
2.1.4. Dermis	10
2.1.5. Hipodermis	10
2.1.6. Kan Temini ve Lenfatik	10
2.2. Yaraların Sınıflaması	11
2.2.1. Akut yaralar	11
2.2.2. Kronik yaralar	12
2.2.3. Yara İyileşmesinin Evreleri ve Genel İlkeleri	13
2.2.4. Anormal Yara İyileşmesi	19
2.2.5. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	19
2.3. Yara İyileşmesi ve Keratinosit İlişkisi	21
2.3.1. Yara İyileşmesinde Keratinositlerin Bağışıklık Fonksiyonları	21
2.3.2. Keratinositlerde Patern Tanıma Reseptör Aracılı Sitokin ve Kemokin İfadesi	22
2.3.3. Deri Yarasının İyileşmesinde Keratinosit-İmmün Hücre Karışması	23
2.4. Yara İyileşmesi ve Steroid İlişkisi	23
2.4.1. Glukokortikoid Fizyolojisi	24
2.4.2. Glukortikoid Etki Mekanizması	24
2.4.3. Yara İyileşmesi Sırasında Glukokortikoid Aktivitesinin Mekanizması	25
2.4.4. Glukortikoidlerin Hemostaz Üzerine Etkisi	26

2.4.5. Glukokortikoidlerin epidermal bariyerin yenilenmesi veya yenilenmesi üzerindeki etkisi	27
2.5. Kök Hücre.....	28
2.5.1. Kök Hücre Sınıflaması.....	29
2.5.2. Kök Hücre Biyolojisi.....	30
2.5.3. Embriyonik Kök Hücrelerin Özellikleri.....	32
2.5.4. Embriyonik Kök Hücre Kültürü ve Farklılaşması.....	33
III.GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması ve Kültürü	35
3.2. Fare Embriyonik Kök Hücre Kültürü	36
3.3. Hücrelerin Analizi	37
3.3.1. İmmünositokimya ile Hücrelerin Karakterizasyonu	37
3.3.2. Akış Sitometrisi ile Hücrelerin Karakterizasyonu	38
3.4. Yara Modelinin Oluşturulması, Hücrelerin Transferi ve Analizi	39
3.4.1. Fare Yara Modelinin Oluşturulması	39
3.4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Hücrelerin Transferi	40
3.4.3. Dokuların Eldesi ve Takibi	43
3.4.4. Hematoksilen Eozin Boyaması	45
3.4.5. İmmünohistokimyasal Boyama	47
IV.BULGULAR.....	50
4.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü.....	50
4.2. Keratinositlerin Karakterizasyonu	53
4.2.1. İmmünositokimya.....	53
4.2.2. Akış Sitometrisi.....	54
4.3. Yara Yerine Transfer Edilen Keratinositlerin Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal İncelenmesi	55
4.3.1. Hematoksilen Eozin Boyaması	55
4.3.2. İmmünohistokimya.....	61
V. TARTIŞMA.....	75

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
VII. ÖZET.....	88
VIII. SUMMARY	90
IX. KAYNAKLAR.....	92



SİMGELER VE KISALTMALAR

11-βHSD	11 Beta hidroksisteroid dehidrogenaz
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AMP	Antimikrobiyal protein
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BMP-4	Kemik morfogenetik proteini-4
CGR8	Fare embriyonik kök hücre hattı
CNS	Santral sinir sistemi
COL1A1	Kollajen tip 1 alfa 1 zinciri
COL1A2	Kollajen tip 1 alfa 2 zinciri
COL4A1	Kollajen tip 4 alfa 1 zinciri
COX	Siklooksijenaz
DAB	Diaminobenzidine
DETC	Dendritik epidermal T hücreleri
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EC	Embriyoid cisim
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ESC	Embriyonik kök hücre
FBS	Fötal sığır serumu

GC	Glukokortikoid
GR	Glukortikoid reseptörü
GSK3-β	Glikojen sentaz kinaz 3-beta
hESC	İnsan embriyonik kök hücreleri
HNF	Mezenkimal kökenli insan normal fibroblastları
HPA	Hipotalamo-hipofiz-adrenal
HUVEC	Primer insan göbek damarı hücreleri
ICM	İç hücre kütlesi
IFN-γ	İnterferon gama
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-2	İnterlökin-2
IL-6	İnterlökin-6
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
KC	Karaciğer
Klf4	Kruppel benzeri faktör 4
LC	Langerhans hücreleri
LIF	Lösemi inhibe edici faktör
LPS	Bakteriyel lipopolisakkaritler
mbGR	Membrana bağlı glukokortikoid reseptörü
MIP-1α	Makrofaj İnflamasyon Proteini 1 alfa
MR	Mineralokortikoid reseptörünü

mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
Oct-4	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler modeller
PBS	Fosfat tamponlu solüsyon
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PFA	Paraformaldehit
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz
PRR	Model tanıma reseptörleri
RIG-I	Retinoik asit ile indüklenebilir gen I
Sox2	Cinsiyet belirleyici bölge Y
SSEA	Stage Spesifik Embriyonik Antijen
STO	Fare embriyonik fibroblastları
TA	Transaktivasyon
TE	Trofektoderm
TLR	Toll benzeri reseptörler
TR	Transrepresyon
TRA-1-81	Podokalsin antijeni
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
$\gamma\delta$	Gama delta

I. GİRİŞ

Deri, insan vücudunun en büyük organıdır ve toplam vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturur. Vücudu bir dizi çevresel stres etkeninden korumak ve düzensiz su ve elektrolit kaybını önleyerek homeostazı sürdürmek için bir bariyer görevi gören iç ve dış ortamlar arasındaki birincil arayüzdür **(1)**. Yanık, travma veya herhangi bir deri hastalığı nedeniyle cildin oluşturduğu bariyerin akut veya kronik kaybı organizmanın bütünlüğünü korumak için basit doku onarımı gerektirir **(2)**.

Steroid; antiinflamatuvar, immünosupresif ve antialerjik etkileri nedeniyle en çok kullanılan ilaçlardan bir tanesidir. Steroid kullanımı; inflamatuvar yanıtı bozarak, kollajenolizi artırarak, enfeksiyona karşı normal direnci engelleyerek ve epitelizasyonu zayıflatarak yara iyileşmesini negatif etkiler.

Fare embriyonik kök hücreleri, blastosistin iç hücre kütesinden türetilen pluripotent kök hücrelerdir. Uygun bir ortam sağlandığında, bu hücreler farklılaşma olmadan çoğalabilir ve bu hücrelerin farklılaşması ortam değiştirilerek de sağlanabilir.

Kronik, sistemik ve lokal faktörlerin etkisiyle sistemik kronik ilaç kullanımının giderek artması nedeniyle yara iyileşmesi kötüleştikçe ve yara enfeksiyonlarının sıklığı arttıkça iyileşmeyen kronik yaralar ortaya çıkar. Bu, hastanın hastanede yatış süresini uzatır ve yüksek morbidite ve mortalite ile yüksek maliyetlere yol açar. Yara iyileşme sürecinin desteklenmesi ve sorunsuz yara iyileşmesinin sağlanması yukarıda sayılan olumsuz sonuçların önüne geçecektir.

Bu uzmanlık tezinde fare embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin, uzun süreli steroid ile immün sistem baskısı oluşturulan fare modeline uygulanması sonrasında yara iyileşmesi sürecinde rol oynayan moleküllerin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

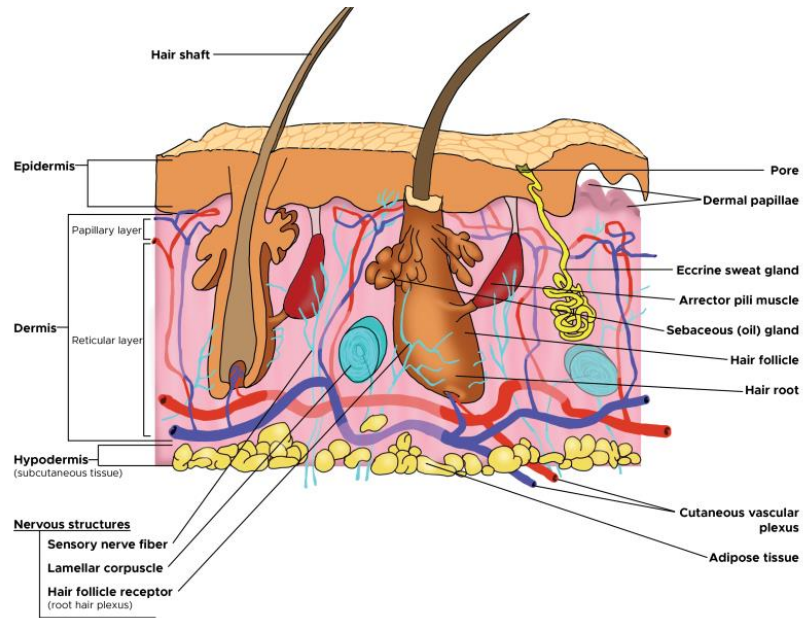
Bu çalışmamızda önceki çalışmalardan farklı olarak fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan keratinositlerin uzun süreli (tekrarlayan dozlarda) steroid baskısı altındaki yarada iyileşme üzerine olan etkisinin incelenecek olması ile birlikte klinik kullanılabilirliğinin de analizi önem taşımaktadır.



II. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Embriyolojisi ve Histolojisi

Deri vücuttaki en büyük organdır ve vücudun tüm dış yüzeyini kaplar. Epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç tabakadan oluşur ve bunların üçü de anatomileri ve işlevleri açısından önemli ölçüde farklılık gösterir (Şekil 1). Cildin yapısı, vücudun patojenlere, UV ışığına, kimyasallara ve mekanik yaralanmalara karşı ilk bariyeri görevi gören karmaşık bir ağdan oluşur. Ayrıca sıcaklığı ve çevreye salınan su miktarını da düzenler (3).



Şekil 1. Deri kesiti. Epidermis, Dermis (Papiller ve Retiküler Tabakalar) ve Hipodermis histolojik tabakaları. Epidermis ve dermis tabakaları boyunca kıl kökleri, arrector pili kası, yağ bezleri, ekrin ter bezleri ve adipoz doku (3).

2.1.1. Deri Kalınlığı

Deri kalınlığı vücudun farklı bölgelerinde değişiklik göstermekle birlikte epidermis kalınlığı ile paralel olarak el ayası ve ayak tabanı gibi bölgelerde kıl içermeyen ve keratinize olmuş kalın deri şeklinde iken diğer bölgelerde daha ince bir epidermise sahip, kıl folikülü ve yağ bezi içeren ince deri şeklindedir **(4)**.

2.1.2. Embriyoloji

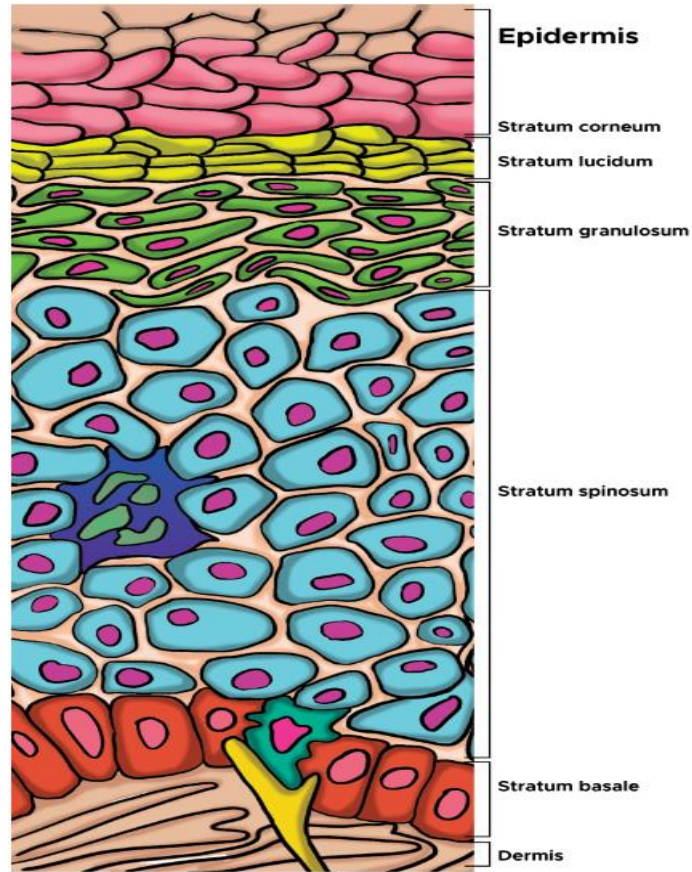


Epidermis yüzey ektoderminden köken alırken dermis mezenşim kökenlidir. Epidermis yüzey ektoderminin üzerinde yassı hücrelerden oluşan periderm tabakasının oluşmasından sonra bazaldaki hücrelerin çoğalarak 3. ara bir bölge oluşturmaları ile 4. ayda dört tabaka halini alır. Dermis lateral plak mezodermi ve somitlerden oluşan dermatomlardan köken almaktadır. 3. ve 4. aylarda korium adı verilen bu doku epidermisin içine uzanan dermal papillaları oluşturur **(5)** .

2.1.3. Epidermis

2.1.3.1. Epidermis Tabakaları

Epiderminin tabakaları arasında stratum bazale (epiderminin en derin kısmı), stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum ve stratum corneum (epiderminin en yüzeysel kısmı) bulunur (Şekil 2) (3).



Şekil 2. Epiderminin tabakaları. Stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum bazale, dermis (3).

Stratum germinativum olarak da bilinen stratum bazale, dermisten bazal membran (bazal lamina) ile ayrılan ve bazal membrana hemidesmozomlar ile bağlanan en derin tabakadır. Bu tabakada bulunan hücreler, sürekli keratinosit üreten küboidalden kolumnara mitotik olarak aktif kök hücrelerdir. Bu tabaka ayrıca melanositleri içerir **(3)**.

Dikenli hücre tabakası olarak da bilinen 8-10 hücreli tabaka olan **stratum spinosum**, dışa doğru uzanan ve komşu hücrelere desmozomlarla temas eden, bazen "dikenler" olarak adlandırılan sitoplazmik süreçlere sahip düzensiz, polihedral hücreler içerir. Dendritik hücreler bu tabakada bulunabilir **(3)**.

Stratum granulosum, 3-5 hücre tabakalı, keratohyalin granülleri ve lameller granüller içeren elmas şekilli hücreler içerir. Keratohyalin granülleri, sonunda bir araya gelen, çapraz bağlanan ve demetler oluşturan keratin öncüleri içerir. Lamellar granüller, hücrelerin yüzeyine salgılanan ve hücrelerin birbirine yapışmasını sağlayan bir yapıştırıcı görevi gören glikolipidleri içerir **(3)**.

Avuç içi ve ayak tabanlarında bulunan daha kalın deride bulunan 2-3 hücreli tabaka olan **stratum lucidum**, keratohyalinin bir transformasyon ürünü olan eleidinden oluşan ince ve şeffaf bir tabakadır **(3)**.

Stratum corneum, 20-30 hücre tabakası, çekirdeksiz skuamöz hücreler olarak bilinen keratin ve ölü keratinositlerden oluşan en üst tabakadır. Bu, özellikle nasırlı deride, kalınlığı en çok değişen tabakadır. Bu tabaka içinde, ölü keratinositler, ilk bağışıklık savunmamızın bir parçası olan defensinleri salgılar **(3)**.

2.1.3.2. Epidermisin Hücreleri

- Keratinositler
- Melanositler
- Langerhans hücreleri
- Merkel hücresi

2.1.3.2.1. Melanositler

Melanositler, nöral krest kökenlidir, stratum bazale hücreleri arasında bulunurlar ve esas olarak cildin pigmentinden sorumlu olan melanini üretirler. UVB ışığı, UV radyasyonuna karşı koruyucu olan melanin salgısını uyarır. Melanin, tirozinaz enzimi tarafından tirozinin DOPA'ya dönüştürülmesi sırasında üretilir. Melanin daha sonra melanositlerden komşu epidermal hücrelere uzanan uzun süreçlere dayanan bir süreçle hücreden hücreye gider. Melanositlerden gelen melanin granülleri, uzun süreçler yoluyla bazal keratinosit sitoplazmasına aktarılır **(3)**.

2.1.3.2.2. Langerhans Hücreleri

Langerhans hücreleri, dendritik hücreler, derinin ilk hat savunucularıdır ve antijen sunumunda önemli bir rol oynarlar. Bu hücrelerin görülebilmeleri için, öncelikle stratum spinosumda bulunan özel boyamalara ihtiyacı vardır. Bu hücreler, kemik iliğinin CD34 pozitif kök hücrelerinden türetilen mezenkimal kökenli hücrelerdir ve mononükleer fagositik sistemin bir parçasıdır. Birbeck granüllerini içerir. Bu hücreler hem MHC I hem de MHC II

moleküllerini eksprese eder, derideki antijenleri alır ve lenf düğümüne taşınır **(3)**.

2.1.3.2.3. Merkel Hücreleri

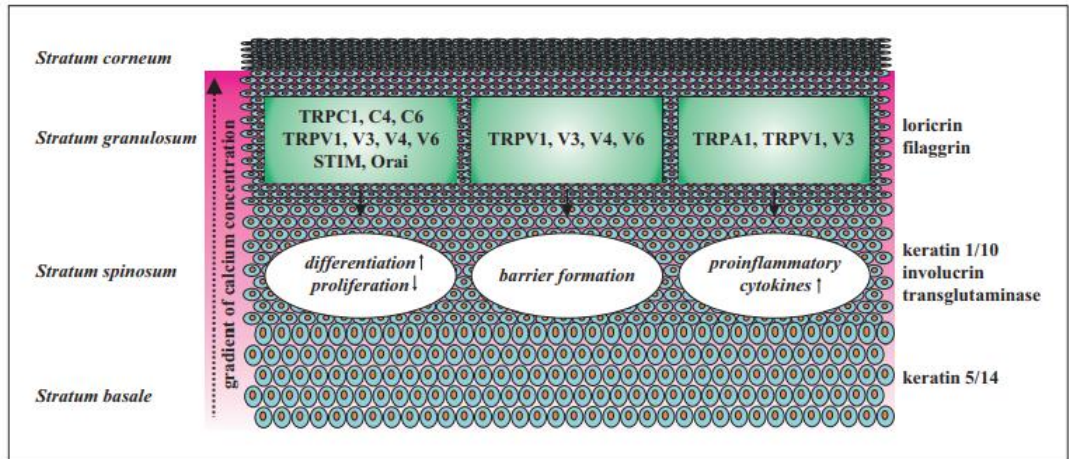
Merkel hücreleri, bazal membranın hemen üzerinde, stratum bazalede bulunan oval şekilli modifiye epidermal hücrelerdir. Bu hücreler, hafif dokunma için mekanoreseptörler olarak duyuşal bir işlev görür ve avuç içi, ayak tabanları, ağız ve genital mukozada da bulunsalar da en çok parmak uçlarında bulunurlar. Desmozomlarla bitişik keratinositlere bağlanırlar ve ara keratin filamentleri içerirler ve zarları derideki serbest sinir uçlarıyla etkileşime girer **(3)**.

2.1.3.2.4. Keratinositler

Keratinositler, epiderminin baskın hücre tipidir ve bazal tabakadan köken alır, keratin üretir ve lipidleri üretip salgılayarak epidermal su bariyerinin oluşumundan sorumludur. Keratinositler ayrıca, D vitamini oluşturmak için UVB ışığı ile kolesterol öncüllerinin aktivasyonu ile kalsiyum Emilimini de düzenler **(3)**.

Keratinosit farklılaşmasının yeri epidermistir **(6)**. Epidermiste, keratinosit proliferasyonu bazal hücre tabakalarıyla sınırlıdır **(7)**, oysa daha yüzeysel tabakalarda farklılaşır **(8)** ve sonunda ölür. Bazal tabakadaki mitozdan sonra, keratinositler epidermis boyunca stratum corneum'a doğru farklılaşır. Farklılaşma sırasında, epidermiste, stratum bazale ve ardından stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum corneum ile başlayarak, her farklılaşma aşamasında ayırt edici işaretleyici genleri ifade eden birkaç keratinosit tabakası gelişir (Şekil 3) **(9,10)**. Keratinler esas olarak bazal

(keratin 5 ve keratin 14) ve spinöz keratinositler (keratin 1 ve keratin 10) tarafından ifade edilir. Transglutaminaz ve involucrin spinöz keratinositlerde üretilirken granüler keratinositler lorikrin ve filagrin üretir (Şekil 3) (11). Bu proteinlerin yanı sıra, stratum granulosumdaki keratinositler, lameller gövdelerde depolanan sfingolipid öncüllerini sentezler. Bu lamellar gövdeler, farklılaşma süreci sırasında plazma zarı ile birleşir ve lipid öncülerini stratum granulozum ve korneumdaki hücre dışı boşluğa bırakır. Enzimatik işlemden sonra, geçirgenlik bariyerini oluşturan, kornifiye zarf keratin dolgulu korneositlerle birlikte gömülü olan lipid tabakalı membranlara dahil edilirler (12). Keratinosit farklılaşması için ana tetikleyici kalsiyumdur (11).



Şekil 3. Epiderminin farklı tabakalarında (stratum bazale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum corneum) diferansiyasyon belirteçlerinin gösterimi (keratin 1, 5, 10 ve 14, involucrin, transglutaminase, filaggrin ve loricrin) ve epidermal tabakalar arasındaki kalsiyum gradienti (11).

2.1.4. Dermis

Dermis, bazal membran seviyesinde epidermise bağlanır ve net bir sınır olmaksızın birleşen bağ dokusu, papiller ve retiküler tabakalardan oluşur. Epidermise papilar uzantılar yapan **papiller tabaka** üst tabakadır, daha incedir, gevşek bağ dokusu yapısındadır. **Retiküler tabaka** ise daha derindeki tabakadır, daha kalındır, daha az hücrelidir ve yoğun bağ dokusu/kollajen lif demetlerinden oluşan düzensiz sıkı bağ dokusu formundadır. Dermis ter bezlerini, kılları, kıl köklerini, kasları, duyu nöronlarını ve kan damarlarını içermektedir. (Şekil 1) **(3)**.

2.1.5. Hipodermis

Hipodermis, dermisten daha derindedir ve ayrıca subkutan fasya olarak da adlandırılır. Derinin en derin tabakasıdır ve kıl folikülleri, duysal nöronlar ve kan damarları gibi bazı deri ekleriyle birlikte yağ lobülleri içerir (Şekil 1) **(3)**.

2.1.6. Kan Temini ve Lenfatik

Derinin dermal tabakasında kan damarları ve lenf damarları bulunur. Cilde kan temini iki pleksusun bir düzenlemesidir, ilki dermisen papiller ve retiküler tabakaları arasında, ikincisi dermis ve deri altı dokuları arasında uzanır. Epidermise beslenme, yüzeysel arteriyovenöz pleksus (subepidermal/papiller pleksus) yoluyla. Kan akışı sıcaklık regülasyonu için önemlidir. Vücudun sıcaklığı deri yoluyla düzenlediği mekanizma çok etkilidir ve cilde artan kan akışıyla çalışır, ısıyı vücuttan çevreye aktarır. Kan akışındaki değişiklikler otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilir, sempatik

stimülasyon vazokonstriksiyona (ısı tutulması) neden olur ve vazodilatasyon ısı kaybına neden olur **(13,14)**.

2.2. Yaraların Sınıflaması

Yaralanan dokular, yaralanmadan sonra normal işlevlerini ve yapısal bütünlüklerini geri kazanmaya çalışırlar. Mekanik bütünlüğü sağlamaya, sıvı kaybına ve enfeksiyona engel oluşturmaya, normal kan ve lenfatik akış düzenlerini yeniden kurmaya yönelik girişimlere yara onarımı denir. Yara onarımı sırasında, normal işlevine geri dönmenin aciliyeti nedeniyle kusursuz onarımdan vazgeçilir. Buna karşılık, yara iyileşmesinin amacı olan rejenerasyon, önceden var olan doku mimarisinin skar oluşumu olmadan mükemmel bir şekilde restorasyonudur; rejenerasyon sadece embriyonik gelişim sırasında, örneğin, alt organizmalarda veya kemik ve karaciğer gibi belirli dokularda, elde edilebilir.

Tüm yaralar aynı temel onarım adımlarından geçer. Akut yaralar, yapı ve işlevin sürekli restorasyonunu sağlamak için düzenli ve zamanlı bir onarım sürecinde ilerler. Kronik bir yara, sürekli bir inflamatuvar faz sırasında durur ve iyileşmez **(15)**.

Yaralar akut veya kronik olarak sınıflandırılırlar.

2.2.1. Akut yaralar

Akut yaralar tahmin edilebilir bir düzen ve zaman diliminde iyileşirler. Süreç, varsa, nadir komplikasyonlarla gerçekleşir ve sonuç iyi iyileşmiş yaradır. Cerrahi yaralar birkaç yolla iyileşebilir. Temiz ve sütürlerle kapatılmış insize edilmiş bir yaranın primer kapanma ile iyileştiği söylenebilir. Genelde,

bakteriyel kontaminasyon veya doku kaybı nedeni ile bir yara granülasyon dokusu oluşumu ve kontraksiyon ile iyileşmek üzere açık bırakılır; bu sekonder kapanma ile iyileşmeyi teşkil eder. Gecikmiş primer kapanma veya tersiyer kapanma ile iyileşme ilk ikisinin kombinasyonudur, sütürlerin yerleştirilmesi, yaranın birkaç gün açık bırakılması ve takiben sütürlerin kapatılmasını kapsar.

Akut yaraların iyileşme spektrumu geniştir. İyileşme esnasında mekanik bütünlüğün ve kuvvetin edinilmesi incelendiğinde, normal süreç yaralanma sonrasındaki ile aynı seviyeye ulaşan sürekli ve kararlı bir artışla karakterizedir. Geç iyileşen yaralar normal oranda iyileşen yaralara kıyasla yara yıkım kuvvetinde azalma ile karakterizedir; ancak, sonunda her ikisi de normal iyileşen yaralarla aynı bütünlük ve kuvvete erişirler. Beslenme yetersizliği, enfeksiyonlar veya ciddi travma gibi durumlar altta yatan patofizyoloji düzeltildiğinde normale gelen gecikmiş iyileşmeye neden olabilir. Bozulmuş iyileşme, normal iyileşen yaralara eşit mekanik kuvvete erişmede yetersizlik ile karakterizedir. Diyabet, kronik steroid kullanımı veya radyoterapi nedeniyle doku hasarlanması gibi nedenlerle immun sistemi tehlikede olan hastalar bu tip bozulmuş iyileşmeye yatkındır. Olası komplikasyonlar olmaksızın iyileşme şansını maksimize etmek için insizyon yeri belirleme ve sütür seçimi, postoperatif bakım ve yardımcı tedaviler konusunda büyük dikkat göstermelidir.

Normal iyileşme hem sistemik hem lokal faktörlerden etkilenir. Yüksek riskli yaralarda oluşan komplikasyonlar iyileşmenin bozulmasına veya kronik iyileşmeyen yaralar gelişmesine neden olabilir **(16)**.

2.2.2. Kronik yaralar

Kronik yaralar, anatomik ve fonksiyonel bütünlüğü sağlayan işlemlerin uygun bir şekilde ilerletilemediği veya onarım işlemlerinin yeterli anatomik ve fonksiyonel sonuçları sağlayamadığı yaralar olarak tanımlanır. Üç ay içinde

iyileşmeyen yaraların büyük kısmı kronik olarak kabul edilir. Deri ülserleri, bunlar sıklıkla travmatize veya damarsal yetmezlikli yumuşak dokularda oluşur, yapısal olarak kronik kabul edilir ve kronik yaraların çoğunluğunu oluştururlar. Yara iyileşmesini geciktiren faktörlere ilaveten diğer nedensel mekanizmalar kronik yara etiyolojisinde rol oynayabilir. Tekrarlayan travma, zayıf perfüzyon veya oksijenasyon ve/veya aşırı inflamasyon yaranın kronikliğini süreklileştirir.

Normal regülatuar sinyallere yanıtsızlık da kronik yaralar için bir neden olabilir. Bu durum normal büyüme faktörü sentezinin eksikliği olarak ortaya çıkabilir. Bu nedenle büyüme faktörlerinin yara çevresinde aşırı yıkımı olur ki belirgin şekilde proteolitiklidir. Kronik yaralardaki fibroblastların çoğalma potansiyellerinin azaldığı bulunmuştur ve belki de büyüme reseptörlerinin uyuması veya azalmış sunumlarından kaynaklanmaktadır.

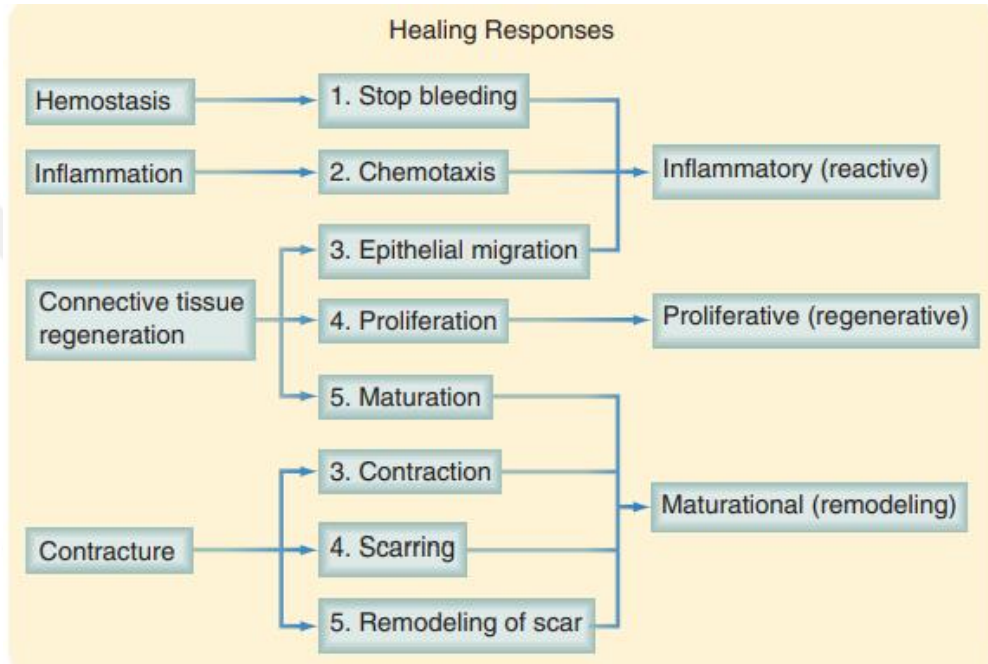
Kronik ülserlerin malign dönüşümleri herhangi bir uzun süreli yarada görülebilir (Marjolin ülseri). Uzun bir zaman diliminde iyileşmeyen herhangi bir yara malign dönüşüme yatkındır. Malign yaralar, malign olmayan yaralardan klinik olarak yara kenarlarında dışa dönmenin olup olmaması ile ayırt edilebilir. Kronik yaralardan kaynaklanan kanserler hem skuamöz hem de basal hücreli kanserleri içerir **(16)**.

2.2.3. Yara İyileşmesinin Evreleri ve Genel İlkeleri

Yara derinin ve alttaki yumuşak dokunun normal yapısının ve işlevinin kaybolmasıdır. Bu esnada doku bütünlüğünün bozulması söz konusudur. Yara iyileşmesi ise travma ile başlatılan hücresel ve biyokimyasal olayların yeni doku oluşumuyla sonuçlanmasıdır. Yara iyileşmesi doku hasarına hücresel bir yanıt olarak oluşur ve keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, makrofajlar ve trombositlerin aktivasyonunu içerir. Bu süreç, organize hücre göçünü ve anjiyogenez için endotel hücrelerinin işlev

görmesini içerir. Bu hücre tipleri tarafından salınan birçok büyüme faktörü ve sitokin, yara iyileşmesini koordine eder ve sürdürür.

Yara iyileşmesi hemostaz ve inflamasyon, proliferasyon ve remodeling (yeniden yapılanma) olmak üzere iç içe geçmiş 3 evreden oluşmaktadır (Şekil 4) (15).



Şekil 4. Yara iyileşme sürecinin şematik diyagramı (15).

2.2.3.1. Hemostaz ve İnflamasyon:

Hemostaz, damar yaralanmalarında kan kaybını sınırlayan kompleks bir süreçtir. Bu hemostatik sürece dört ana mekanizma katılır. Bunlar vasküler kontraksiyon, trombosit tıkaçı oluşumu, fibrin oluşumu ve fibrinolizistir. Kan damarı yaralanmalarında lokal arteriol ve kapillerdeki vazokontraksiyonu vazodilatasyon takip eder ve permeabilite artması sağlanır. Eritrosit ve trombositler hasar görmüş kapiller endoteline yapışır ve

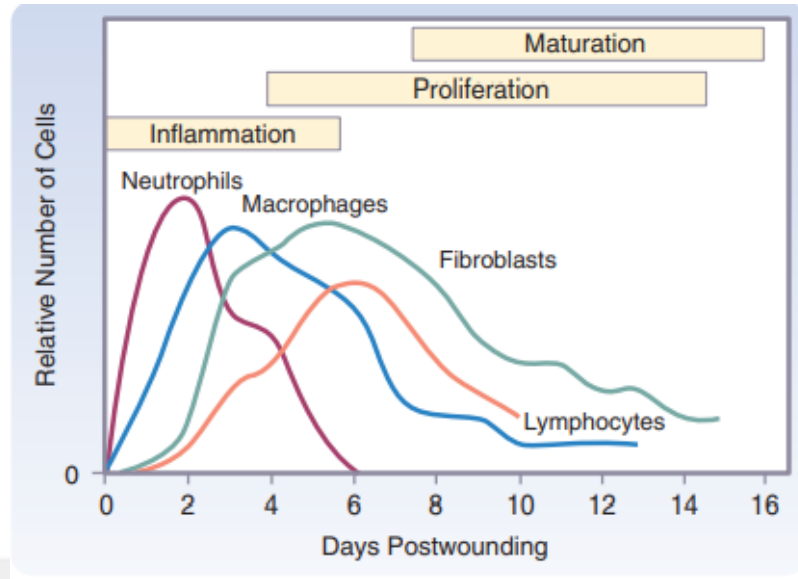
kapillerlerin tıkanmasını sağlayarak kanama durdurulur. Hemostazı sağlamak için oluşan fibrin pıhtısı polimorfonükleer lökositler ve monositler gibi inflamatuvar hücrelerin yara migrasyonu için bir iskele görevi yapar. Hemostazı takiben yara yatağından kemotaktik faktörlerin salınımı ile inflamasyon başlatılır. Bu aşamada kanama durdurulmakta; yara yüzeyi kapatılmakta ve nekrotik doku, yabancı kalıntılar ve mikroorganizmalar uzaklaştırılmaktadır. İnflamasyon ise; artmış vasküler geçirgenlik, hücrelerin kemotaksis ile yara bölgesine göçü, sitokin ve büyüme faktörlerinin ortama salınması, göç eden hücrelerin aktivasyonu ile karakterizedir. Yaralanmadan sonraki 24 saat içinde yara alanına ilk olarak nötrofil ulaşır (Şekil 5). Nötrofil migrasyonunu interlökin-1 (IL-1), Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) uyarır. Yaralanma sonrası keratinositlerde makrofaj kemoatraktan proteini (MCP-1) indüklenir. Monositler/makrofajlar, T lenfositler ve mast hücreleri için güçlü bir kemoçekicidir. Bu kemokinin ekspresyonu, kronik yaralarda devam eder ve polimorfonükleer hücrelerin ve makrofajların uzun süreli mevcudiyeti ile sonuçlanır, bu da uzun süreli inflamatuvar yanıtı yol açar. 48. saatten sonra ise makrofajlar yara alanına gelerek Matriks Metalloproteinaz-1,2,3 ve 9 (MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MMP-9) proteazlarını ekstraselüler matriksi (ECM) degrade etmek için salgırlar (Şekil 5). Bunun yanında makrofajlar IL-1 eksprese ederek hemostaz, vazodilatör salınımı ve koagülasyonda rol oynar. Ayrıca kollajenaz üretimi ile ilişkili olup adezyon moleküllerini düzenler. Makrofajlar hücre proliferasyonunu, matriks sentezini ve anjiyogenezi TGF- β , Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) ile sağlar. 120. saatten sonra ise lenfositler ulaşır. Lenfositler yara iyileşmesinin 7. gününde en yüksek seviyelerine ulaşır (Şekil 5). Lenfositler interlökin-2 (IL-2) eksprese ederek fibroblastları stimüle etmesiyle birlikte TGF- β , TNF- α ve İnterferon gama (IFN- γ) salınımı da yapar **(15,16)**.

2.2.3.2. Proliferasyon:

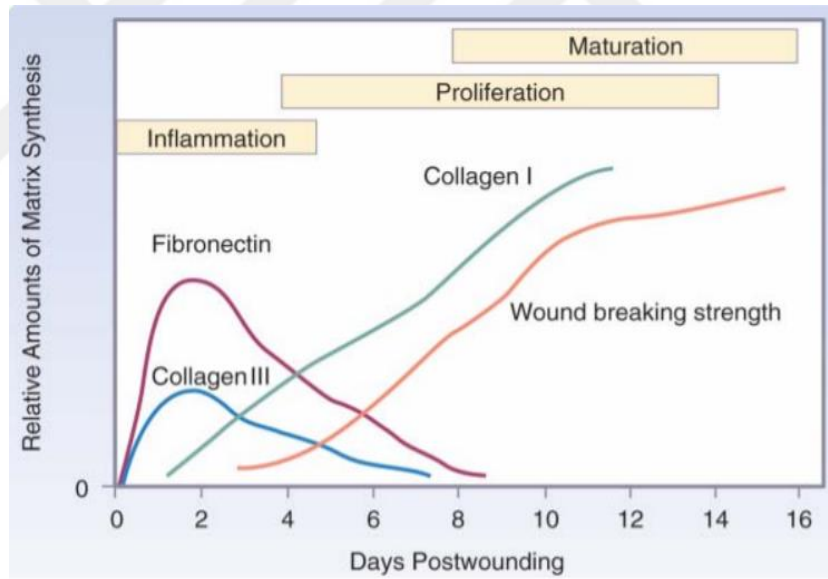
Bu evre anjiyogenez, kollajen sentezi, granülasyon doku formasyonu, ECM yeniden oluşumu, re-epitelizasyon ve yara kontraksiyonundan oluşur. Bu evre 4. günden 12. güne kadar sürer (Şekil 5). Doku devamlılığının tekrar sağlanması bu evrede olur. Bu aşamada trombositler ve aktive makrofajlar tarafından salınan sitokinler ve büyüme hormonlarının etkisiyle yara bölgesindeki fibroblast ve endotel hücrelerinin çoğalması ön plandadır. İyileşen yaraya en son infiltre olan hücreler fibroblastlar (Şekil 5) ve endotel hücrelerdir ve fibroblastlar için en kritik kemotaktik faktör Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF)'dür. Fibroblast proliferasyonunu takiben yara makrofajlarından salınan sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından matriks sentezi için aktivasyonu sağlanır. İyileşmenin bu evresinde endotel hücreleri intakt venüllerden göç ederler ve yoğun olarak proliferasyon geçirirler. Bu göç, replikasyon ve yeni kılcal damarların oluşumu, büyüme faktörleri ve TNF- α , TGF- β ve VEGF gibi sitokinlerden etkilenir. PDGF ve TGF- β , trombositler ve aktive makrofajlar tarafından salgılanır. PDGF, nötrofillerin, makrofajların, düz kas hücrelerinin ve fibroblastların kemotaksisini başlatır. Ayrıca fibroblastlarda ve düz kas hücrelerinde mitoz bölünmeyi uyarır. TGF- β makrofajları etkileyerek esansiyel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), PDGF, TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerin salgılanmasını uyarır. Fibroblastlar çevre dokudan yaraya göç eder. Yara bölgesine yakın sağlam venüllerden çoğalan endotel hücreleri bölgeye gelir ve anjiyogenezi başlatır ve yeni bir kapiller ağ oluşturur (15,16).

2.2.3.3. Maturasyon ve Yenilenme:

Skar dokunun maturasyonu ve remodelingi fibroblastik evrede başlar ve daha önce sentezlenen kollajenin reorganizasyonu ile karakterizedir. Kollajen MMP'lerce kırılır ve ECM'nin tekrar yapılanması, nispeten aselüler kollajenden zengin bir skardan oluşur. Bu aşamanın ana özelliği, yara bölgesinde kollajen birikmesidir. Bu süreç, kollajen birikiminin miktarı, oranı ve kalitesinin yara gerilme mukavemeti üzerindeki etkisinden dolayı klinik olarak en önemli aşamadır. Yara yatağında matriks birikimi karakteristik bir düzeni takip eder. Öncelikle fibronektin ve tip 3 kollajen erken matriks iskeletini oluşturur (Şekil 6). Daha sonra glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar matriks bileşenlerini oluşturur. Tip 1 kollajen son matrikstir (Şekil 6). Kollajen sentezi ve birikimine ek olarak, oluşan bağ dokusunun anatomik ve fonksiyonel optimal şeklinde önemli rol oynayan diğer faktörler kollajenazlar ve bazı proteazlardır. Fibroblastlar, epitel hücreleri ve aktive makrofajlar tarafından salgılanan kollajenaz, yara bölgesinde depolanan kollajeni parçalayıp yeniden şekillendirerek yara izlerinin oluşumuna yol açar. Yara iyileşmesi sırasında meydana gelen tüm hücresel ve biyokimyasal olayların en önemli sonucu maksimum yara gerilimidir. Yaralanmadan birkaç hafta sonra, yaradaki kollajen miktarı bir plato değere ulaşır, ancak gerilim kuvveti birkaç ay daha artmaya devam eder **(17)**. Yara maksimum gerilim kuvvetine 12. haftada ulaşır (Şekil 6) **(18,19,20)**. Fibroblastlardan salgılanan fibrillin, bağ dokuda bulunan elastik liflerin oluşumu için esansiyeldir. Yaralanma sonrası skar remodeling uzun süre (6-12 ay) devam eder, kademeli olarak matür, avasküler ve aselüler skar oluşur. Skarın mekanik kuvveti asla yaralanmamış dokununkine ulaşamaz **(15,16)**. Son yara izi, normal derinin gerilme mukavemetinin sadece %80'ini sergileyecektir **(18,19,20)**.



Şekil 5. Yara iyileşmesi evreleri ve baskın hücre grupları (15).



Şekil 6. Yara evrelerine bağlı matriks bileşenlerinin birikimi (15).

2.2.4. Anormal Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi gibi karmaşık bir dizi olayda, birçok faktör sonucu engelleyebilir. Kaybedilen veya hasar gören doku miktarı, yabancı madde veya bakteri aşılama miktarı ve toksik faktörlere maruz kalma süresi iyileşme süresini etkileyebilir. Yaş, kemoterapötik ajanlar, ateroskleroz, kalp veya böbrek yetmezliği ve vücuttaki konum gibi içsel faktörlerin tümü yara iyileşmesini etkiler. Sonuç olarak, skar tipi-yeterli, yetersiz veya çoğalma-kollajen birikimi miktarı tarafından belirlenir ve kollajen bozunma miktarı ile dengelenir (15).

2.2.5. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

2.2.5.1. Sistemik Faktörler

1. İleri yaş: Hastanede yatan cerrahi hastalarla ilgili çalışmalar ileri yaşın yara ayrışması ve insizyonel herni ile korele olduğunu göstermektedir. (21,22). Yapılan bir çalışmada sağlıklı insan gönüllülerde, genç gönüllülere kıyaslandığında 70 yaş üzeri olanlarda yüzeysel deri defektlerinin epitelizasyonunda 1.9 günlük belirgin bir gecikme mevcuttu (23).

2. Beslenme: Yara iyileşmesi ile daha yakından ilgili vitaminler, vitamin C ve A'dır. Vitamin C eksikliği, kollajen sentezinde ve çapraz bağlanmada yetersizlik yoluyla yara iyileşmesinde gecikmeye yol açar. Vitamin A lizozomal membranların labilitesini artırarak yara iyileşmesinde inflamatuvar cevabı artırır. Bunun sonucunda da makrofaj göçü artar ve kollajen sentezlenir. Yara iyileşmesinde en çok bilinen element çinkodur.

Eksikliğinde fibroblast proliferasyonunda azalma, tüm yara kuvvetinde bozulma ve epitelizasyonda gecikme olur **(16)**.

3. Travma

4. Metabolik hastalıklar: Yara enfeksiyonu ve yetmezliğine yol açan en iyi bilinen metabolik bozukluk diabetes mellitustur **(24)**. Kontrolsüz diyabet azalmış inflamasyon, anjiogenez ve kollajen sentezi ile sonuçlanır.

5. İmmunsupresyon (Steorid ve Kemoterapotik ilaçlar):

Steroidlerin yara iyileşmesinin bozulmasındaki temel etkisi inflamatuvar evreyi ve lizozomal enzim salınımını inhibe etmesidir. Yüksek doz ve kronik kullanımı kollajen sentezini ve yara kuvvetini azaltır. Kullanım zamanından bağımsız olarak epitelizasyonu ve kontraksiyonu inhibe eder ve artmış yara enfeksiyon oranlarına yol açar **(25)**. Tüm kemoterapotik ilaçlar erken hücre proliferasyonu, DNA ve protein sentezini engelleyerek yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Yaranma sonrası 2 hafta süre ile bu ilaçların kullanımının ertelenmesi ile yara iyileşme bozukluğunun azaldığı gözlenir **(26)**.

6. Bağ dokusu hastalıkları: Ehler- Danlos Sendromu, Marfan Sendromu, Osteogenezis İmperfekta, Epidermolizis Büllosa gibi hastalıklar kollajen, elastin veya mukopolisakkarid gibi bağ dokusunun elementlerinin birinin primer bozukluğudur **(16)**.

7. Sigara içme

2.2.5.2. Lokal Faktörler

1. Mekanik yaralanma

2. Enfeksiyon: En yaygın mikroorganizmalar sıklık sırasına göre *Staphylococcus* suşları, koagülaz negatif *Streptococcus* ve *Escherichia coli*'dir. Antibiyotik profilaksisi en çok insizyon anında dokularda yeterli konsantrasyonda olduğunda etkindir ve yeterli preoperatif antibiyotik dozlaması ve zamanlaması yapılmalıdır **(27)**.

3. Doku ödemi

4. Hipoksi, Anemi, Hipoperfüzyon: Düşük oksijen basıncı yara iyileşmesinin her aşamasında zararlı etkiye sahiptir. Cerrahi sırasında ve hemen takiben kısa aralıklarla solunan havanın solunan oksijeninin yükselmesi artmış kollajen birikimi ve elektif cerrahi sonrası azalmış yara enfeksiyonu oranlarına neden olur **(28,29)**.

5. İyonize radyasyon: Endotel hasarlanması yaparak, dokuda atrofi gelişimine, yoğun fibrozise neden olur ve hücre bölünmesi bozarak yara iyileşmesini yavaşlatır. Radyoterapi almış dokuda yara iyileşmesinin eski haline dönebilmesi için gerekli latent periyod 6 ay- 1 yıldır **(30)**.

6. Yabancı cisimler

7. Lokal steroid kullanımı

2.3. Yara İyileşmesi ve Keratinosit İlişkisi

2.3.1. Yara İyileşmesinde Keratinositlerin Bağışıklık Fonksiyonları

Epidermisi oluşturan en baskın hücre tipi olan keratinositler, deri onarımı için gerekli olan birçok görevde rol alır ve keratinleri salgılar. Keratinositler yeniden epitelizasyon sürecinde epidermal bariyeri oluşturmak için göç eder, çoğalır ve farklılaşırlar. Keratinositlerin bu dönüşümleri büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve MMP'ler dahil olmak üzere çevresel faktörler tarafından kontrol edilir **(31)**. Keratinositlerden türetilmiş sitokinler, kemokinler, antimikrobiyal peptidler ve hücre dışı veziküller, keratinositler ve hematopoietik immün hücreler arasındaki kapsamlı etkileşimlere aracılık eder ve yara iyileşmesini sağlamada önemli rol oynar **(32)**. Sitokeratinler epitelyal dokunun intrasitoplazmik hücre iskeletinde bulunan keratin proteinleridir.

Bunlar, hücrelerin mekanik strese direnmesine yardımcı olan ara filamanların önemli bir bileşenidir **(33)**.

2.3.2. Keratinositlerde Patern Tanıma Reseptör Aracılı Sitokin ve Kemokin İfadesi

İlk savunma hattı olarak keratinositler, patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler) olarak adlandırılan bakteri ve diğer mikroorganizmalar üzerinde bulunan spesifik küçük moleküler motifleri algılayabilir **(34)**. Bakteriyel lipopolisakkaritler (LPS), endotoksinler veya viral kaynaklı nükleik asitler gibi PAMP'ler, model tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından açıkça tanınır. Keratinositler, Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), C tipi lektin reseptörleri, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptörler ve retinoik asit ile indüklenebilir gen I (RIG-I) benzeri reseptörler dahil olmak üzere çeşitli PRR'leri eksprese eder **(35)**. Spesifik PRR'ler aracılığıyla ligand tanıma, farklı sinyal yollarının müteakip aktivasyonuna ve inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve konakçı antimikrobiyal moleküllerin üretimine yol açar **(36)**. Keratinositlerden salındıktan sonra, bu faktörler deride yerleşik bağışıklık hücrelerinin etkinleştirilmesinde ve dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinin yara bölgesine alınmasında önemli bir işlev görür **(34)**.

TLR aktivasyonu, deri yaralanmasından sonra iltihabı başlatmada ve güçlendirmede kritik bir unsurdur. Epidermisin ana bileşeni olarak keratinositler, TLR-1, -2, -4, -5 ve -6 dahil olmak üzere çoklu TLR'leri ve akut yaralarda seviyeleri önemli ölçüde yukarı düzenlenen endozomal TLR-3 ve -9'u eksprese eder **(37)**.

2.3.3. Deri Yarasının İyileşmesinde Keratinosit-İmmün Hücre Karışması

Keratinosit tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler, yaralanma bölgesine nötrofillerin ve makrofajların alınmasına katkıda bulunur. Nötrofil ve makrofajlar, hücre kalıntıları ortadan kaldırır ve fagositoz ve reaktif oksijen türlerinin, proteazların ve antimikrobiyal proteinlerin (AMP'ler) salınımı yoluyla istilacı patojenleri yok eder. Daha fazla bağışıklık hücresi toplamak için çeşitli pro-inflamatuvar sitokinler ve kemokinler salgılayarak inflamatuvar yanıtı daha da güçlendirirler. İnterlökin-1 beta (IL-1 β), TNF- α ve interlökin-6 (IL-6) gibi salgılanan bu faktörlerin bazıları, keratinosit proliferasyonunu ve immün yanıtları uyarır. Doku yaralanmasından sonra, Langerhans hücreleri (LC), karaciğerden (KC) türetilen faktörlere tepki verir ve T hücrelerini aktive etmek için drene olan lenf düğümüne göç eder, adaptif bir bağışıklık tepkisini tetikler. Karaciğerden türetilen sitokinler ve kemokinler, aktive edilmiş T hücrelerini yaraya almak için bir kemoatraktan görevi görür. Epidermal gama delta ($\gamma\delta$) T hücreleri (insan) ve dendritik epidermal T hücreleri (DETC'ler, fare) doku hasarına hızla yanıt verir ve karaciğer proliferasyonunu ve yeniden yara epitelizeasyonunu aktive etmek için büyüme faktörleri üretir **(33)**.

2.4. Yara İyileşmesi ve Steroid İlişkisi

Birçok hastalıkta ve travmada sistemik nonspesifik anti-inflamatuvar olarak sıklıkla kullanılan steroidler yara iyileşmesinde gecikmeye neden olabilmektedirler **(38,39)**.

2.4.1. Glukokortikoid Fizyolojisi

Steroid sentezinin esas yapım yeri adrenal bezin zona fasikulata tabakasıdır **(40)**. Plazma lipoproteinlerindeki kolesterol hammadde olarak subkapsüler pleksustan merkeze doğru dik kordonlar arasında uzanan arteriyel sistemle buradaki polihedral hücrelere ulaştırılır. Sonrasında mitokondrilerde hız kısıtlayıcı desmolaz enzimi ile pregnenolona dönüştürülmekte ve bir dizi işlem sonrası kortizol (hidrokortizon) sentezlenmektedir **(41)**.

Periferik dokulardaki enfeksiyon, travma, operasyon gibi stres halleri sonucu oluşan enflamasyon varlığında ortamda üretilip sistemik dolaşıma geçen IL-1, IL-6 ve interferon gibi sitokinler hipotalamo pituitar adrenal aksı uyarırlar. Ardından adrenokortikotropik hormona (ACTH) duyarlı diüurnal ritm kaybolmakta ve 48 saat içinde sonlanan fizyolojik adaptasyon ile sentez kapasitesi onlarca kat artabilmektedir **(42)**.

2.4.2. Glukortikoid Etki Mekanizması

Hücre içine giren steroid molekülü ısı şok proteini ayrılması sonrası ilgili reseptörüne bağlanarak nükleusa aktarılmaktadır. Özel deoksiribo nükleik asit (DNA) sekansları ile etkileşim sonrası ilgili genlerde transkripsiyon gerçekleşmekte ve çeşitli post-translasyonel ya da post-transkripsiyon basamaklar etkilenmektedir **(43)**. Neticede çeşitli enzim ve hormonal etkiler taşıyan proteinlerin yapım hızında değişim gerçekleşmektedir. Transkripsiyonu artan proteinler arasında başta lipokortin gelmektedir. Lipokortin membrana bağlı fosfolipidlerin araşidonik aside dönüşümünü sağlayan fosfolipaz A2 enzimi inhibe eder ve prostaglandin, lökotrien, interlökin, interferon α ve TNF- α gibi çeşitli sitokinlerin oluşumunu engeller. Sentezi artan diğer bir molekül inhibitör kappa β 'dir. Bu molekül

sayesinde transkripsiyon faktörü olan ve birçok enflamatuvar proteinin sentezini artıran nükleer faktör kappa β 'nin serbest hale geçişi engellenir. Bu etkiler sonucunda nötrofillerin endotele yapışması ve inflamasyon alanına kemotaksisi azalır. Ayrıca lizozomal membranları stabilize ederek proteolitik enzimlerin salınımı engellenmeye çalışılır **(44)**.

Glukokortikoidler (GC), siklooksijenaz-1 (COX-1) üzerine etkisizdir, ancak COX-2'yi baskılayarak kompleman sistemini inhibe ederler. Tüm bu aşamalar sonrasında birkaç saat içerisinde inflamasyon yolundaki çeşitli basamaklarda inhibisyon elde edilmektedir **(45)**.

Glukortikoidler genel olarak humoral bağışıklıktan ziyade hücresel bağışıklık üzerine etkindirler. B-hücre fonksiyonlarını fazla etkilemeden makrofaj ve T-lenfositlerde apoptoza yol açarlar ve bilhassa yüksek dozlarda T-hücre fonksiyonlarını baskırlar **(41)**.

Endotele etkisi sonucu damar geçirgenliği ve adezyon moleküllerinde ekspresyon azaltılmaktadır. Bu sayede inflamasyon bölgesindeki hücre proliferasyonu engellenebilmektedir. Özellikle yüksek doz kullanımda kronik inflamasyonda rolü olan fibroblastlar baskılanır. Neticede kollajen, elastin ve glikozamin oluşumu inhibe edilerek onarım süreci geciktirilir **(41)**.

2.4.3. Yara İyileşmesi Sırasında Glukokortikoid Aktivitesinin Mekanizması

Glukokortikoidlerin yara iyileşmesi üzerindeki inhibe edici etkileri beklenmesine rağmen, etki mekanizmasına ilişkin veriler oldukça yenidir. Spesifik olarak, bir dizi deney yoluyla, yazarlar, sentetik bir GC olan deksametazonun, yara bağlı GC reseptörlerine bağlandıktan sonra, glikojen sentaz kinaz 3b'nin inhibisyonu ile fosfolipaz C / protein kinaz C sinyal sistemini uyardığını ve bunun sonucunda β -katenin ve c-myc aktivasyona yol

açtığını gösterdiler. Bu sinyalleme devresinin son bir fenotipik sonucu, keratinosit göçünün ve yara kapanmasının engellenmesidir **(46)**.

2.4.4. Glukortikoidlerin Hemostaz Üzerine Etkisi

Deri, bazı yazarlar tarafından hipodermis olarak adlandırılan ve bütünleşmenin ayrılmaz bir parçası olarak kabul edilen deri altı yağ ile birlikte, sadece stres hormonlarının hedefi değildir, aynı zamanda onları üretme ve merkezi üretimlerini sofistike sistemler aracılığıyla başlatma yeteneğine de sahiptir **(47)**. İnsanlarda bir ana GC olan kortizol, ağırlıklı olarak adrenal korteks tarafından salınır ve hipotalamo-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin (sürekli strese ana vücut tepkisi) son adımını temsil eder. Kortizol, optimal homeostaz (östasis olarak adlandırılır) altında stres kaynaklı hasarı önler ve merkezi ve çevresel organlarda bir dizi pleiotropik aktivite uygular. Kortizol eksikliği veya fazlalığı, allostasis (kakostaz) adı verilen zararlı etkilere sahip olabilir **(48)**.

Östasis sırasında deride, endojen veya sistemik GC, lokal HPA eksen elemanları ve sitokinler gibi düzenleyicileri için optimal homeostatik aktiviteler üretmelidir, çünkü bunların etkileri allostasis sırasında zararlı olacaktır. Kutanöz kakostaz sırasındaki yetersiz homeostatik aktivite örnekleri arasında sedef hastalığı, alerjik reaksiyonlar ve otoimmün süreçler gibi inflamatuvar durumlar yer alır. Öte yandan, GC için aşırı kakostasis, epidermal bariyer fonksiyonunun inhibisyonunu **(49)**, yara iyileşmesinin inhibisyonunu **(46)** ve enfeksiyona yol açabilecek immünosupresyonu içerecektir. GC'nin derideki aşırı allostatik aktiviteleri, organizmayı enfeksiyona, harici fizikokimyasal ajanların zarar görmesine, su ve enerji kaybına karşı savunmasız hale getirecektir.

GC'nin homeostatik aktivitelerindeki bu ikilik için olası bir açıklama, HPA ekseninin (sHPA) bütünleşik kökenini öneren teoride bulunabilir **(50)**. Bu teori, sitokinlerin, kortikotropin salma faktörü, ürokortinler ve

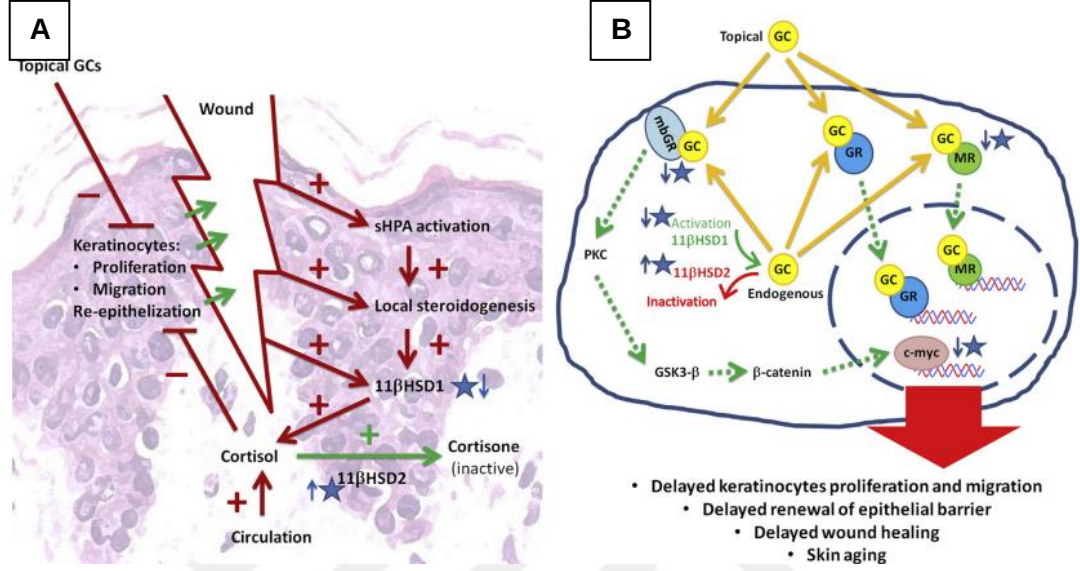
proopiomelanokortin türevli peptitler gibi ilgili peptitlerin, derinin bariyer ve koruyucu işlevlerinin geliştiricileri olarak GC'nin ise bu tepkilerin sonlandırıcıları olarak hareket ettiğini öne sürer. İlginç bir şekilde, son bulgular keratinosit farklılaşmasının indüklenmesinin sHPA elementlerinin ekspresyonunu düzenleyebileceğini göstermiştir **(51)**. Böylece, sHPA ekseninin ekspresyonu ve aktivitesi, epidermal bariyer fonksiyonunu düzenleyen mekanizmalarla sıkı bir şekilde bağlantılıdır **(39)**.

2.4.5. Glukokortikoidlerin epidermal bariyerin yenilenmesi veya yenilenmesi üzerindeki etkisi

Kortizol, topikal olarak uygulandığında, endojen olarak üretildiğinde veya dolaşımdan türetildiğinde, keratinosit proliferasyonunu ve migrasyonunu engelleyerek yara iyileşmesini bozar. Enfeksiyonda epidermal bariyere verilen hasar, HPA ekseninin deri eşdeğerini aktive eder ve lokal steroidogenez de 11- β HSD1'i uyarabilir. sHPA elementlerinin inhibisyonu, 11- β HSD1 aktivitesi ve 11- β HSD2 aktivitesinin uyarılması, özellikle GC alan hastalarda iyileşmesi zor yaraların tedavisi için potansiyel farmakolojik hedeflerdir (Şekil 7A).

Keratinositlerde, GC'nin klasik nükleer (GR) reseptörünün yanı sıra yakın zamanda açıklanan membrana bağlı GR'yi (mbGR) **(46)** ve mineralokortikoid reseptörünü (MR) aktive ettiği gösterildi **(52)**. GC'nin mbGR'ye bağlanmasıyla tetiklenen bu yeni yol, protein kinaz c (PKC)'nin aktivasyonuna, GSK3- β 'nin aşağı regülasyonu, ardından β -katenin ve son olarak c-myc'nin uyarılmasına yol açar. İkinci olarak, MR, GC'yi doğal ligandı aldosteron ile eşit güçte bağlar; bu nedenle, fazla GC, reseptörün sürekli aktivasyonu ile sonuçlanır. Son çalışmalar, mbGR veya MR'nin devre dışı bırakılmasının, GC ile tedavi edilen hastalarda deri atrofisini önleyebileceğini göstermektedir. sHPA'nın uyarılmasının ve/veya 11- β HSD1'in aşırı ekspresyonunun bir sonucu olarak artan endojen GC üretimi, aynı zamanda,

yaşa bağılı deri atrofisinin yanı sıra yara iyileşmesinde gecikmiş yeniden epitelizasyona da yol açabilir (Şekil 7B) (53).



Şekil 7. A.B. GC'nin epidermal bariyerin yenilenmesi veya yenilenmesi üzerindeki etkisi (39).

2.5. Kök Hücre

Kök hücreler, insan vücudunun özelleşmemiş hücreleridir. Bir organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilir ve kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Kök hücreler hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunur. Özelleşmenin birçok aşaması vardır. Gelişim potansiyeli her adımda azalır, bu da unipotent bir kök hücrenin pluripotent bir kök hücre kadar çok hücre tipine farklılaşamayacağı anlamına gelir (54).

2.5.1. Kök Hücre Sınıflaması

Totipotent kök hücreler, bölünebilir ve tüm organizmanın hücrelerine farklılaşabilir. Totipotens en yüksek farklılaşma potansiyeline sahiptir ve hücrelerin hem embriyo hem de ekstra embriyonik yapılar oluşturmaya izin verir. Bir totipotent hücre örneği, fertilizasyonun sonucu oluşan zigottur. Bu hücreler daha sonra ya üç germ tabakasından herhangi birine dönüşebilir ya da bir plasenta oluşturabilir. Yaklaşık 4 gün sonra blastosistin iç hücre kütlesi pluripotent hale gelir. Bu yapı pluripotent hücrelerin kaynağıdır (Şekil 8) **(54)**.

Pluripotent kök hücreler (PSC'ler), tüm germ katmanlarının hücrelerini oluşturur, ancak plasenta gibi ekstraembriyonik yapıları oluşturmaz. Embriyonik kök hücreler (ESC'ler) bir örnektir. ESC'ler, implantasyon öncesi embriyoların iç hücre kütlesinden elde edilir (Şekil 8). Başka bir örnek, implante edilmiş embriyoların epiblast tabakasından türetilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerdir (iPSC'ler) (Şekil 9) **(54)**.

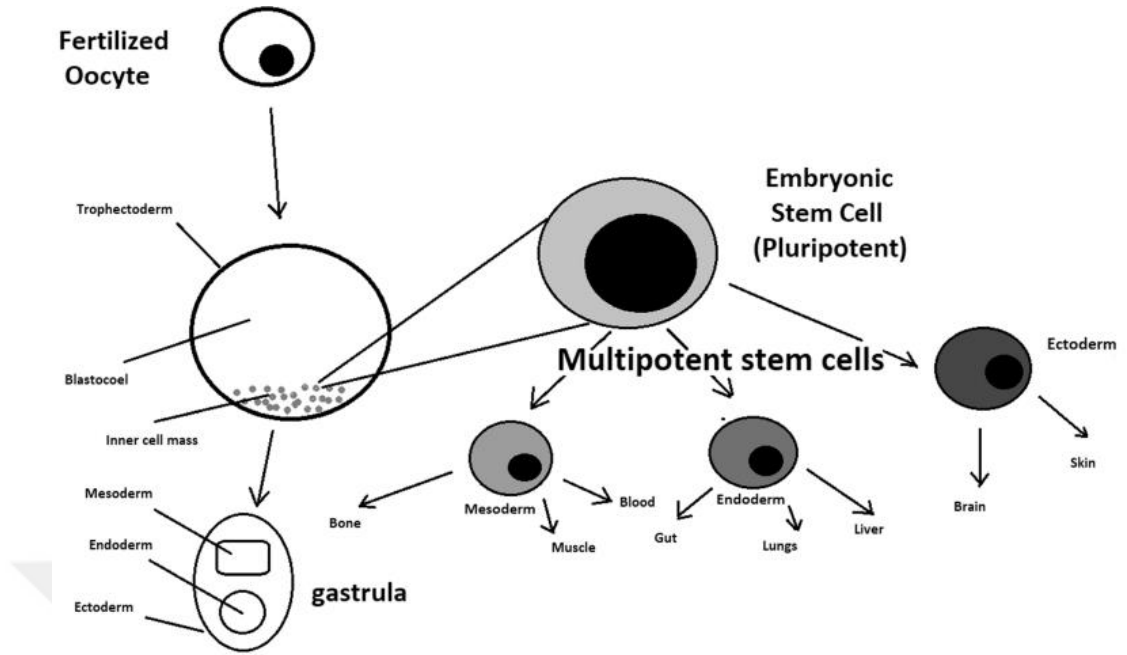
Multipotent kök hücreler, PSC'lerden daha dar bir farklılaşma spektrumuna sahiptir, ancak belirli hücre soylarının ayrı hücrelerinde uzmanlaşabilirler. Bir örnek, çeşitli kan hücrelerine dönüşebilen bir hematopoietik kök hücredir. Farklılaşmadan sonra hematopoietik bir kök hücre, oligopotent bir hücre haline gelir **(54)**.

Oligopotent kök hücreler birkaç hücre tipine farklılaşabilir. Bir miyeloid kök hücre, beyaz kan hücrelerine bölünebilen ancak kırmızı kan hücrelerine bölünemeyen bir örnektir **(54)**.

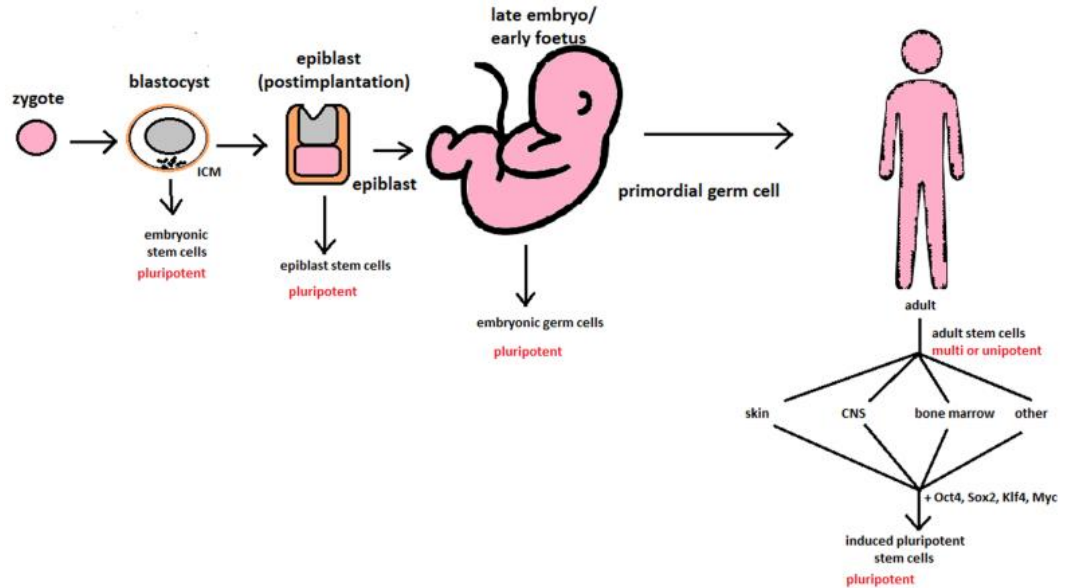
Unipotent kök hücreler, en dar farklılaşma yetenekleri ve tekrar tekrar bölünme özel bir özelliği ile karakterize edilir. İkinci özellikleri onları rejeneratif tıpta terapötik kullanım için umut verici bir aday yapar. Bu hücreler sadece bir hücre tipi oluşturabilir; dermatositler örnek olarak verilebilir **(54)**.

2.5.2. Kök Hücre Biyolojisi

Fertilizasyondan sonra implantasyondan önce oluşan blastosist iki farklı hücre tipine sahiptir: epiblastlara dönüşen ve bir fetüsün gelişimini indükleyen iç hücre kütlesi (ICM) ve trofektoderm (TE) hücreleri. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler kısa ömürlü embriyonik kök hücrelerdir (Şekil 8). Blastosist ICM mikroçevresinin düzenlenmesinden sorumludur. TE, plasenta gibi embriyonun başarılı bir şekilde orijini için gerekli olan ekstraembriyonik destek yapılarını geliştirmeye ve oluşturmaya devam eder. TE özel bir destek yapısı oluşturmaya başladığında, ICM hücreleri farklılaşmamış, tamamen pluripotent ve proliferatif olarak kalır **(55)**. Kök hücrelerin pluripotensi, organizmanın herhangi bir hücrelerini oluşturmalarına izin verir. İnsan embriyonik kök hücreleri (hESC'ler) ICM'den türetilir. Embriyogenez sürecinde hücreler, germ tabakalarını oluşturur: endoderm, mezoderm ve ektoderm. Her biri sonunda fetüsün farklılaşmış hücrelerine ve dokularına ve daha sonra yetişkin organizmaya yol açar (Şekil 8) **(56)**. hESC'ler germ tabakalarından birine farklılaştıktan sonra, potansi yalnızca germ katmanının hücreleriyle sınırlı olan multipotent kök hücreler haline gelirler. Bu süreç insan gelişiminde kısadır. Bundan sonra, pluripotent kök hücreler organizmanın her yerinde farklılaşmamış hücreler olarak ortaya çıkar ve temel yetenekleri, yeni nesil kök hücrelerin oluşumuyla çoğalma ve belirli fizyolojik koşullar altında özel hücrelere farklılaşmadır **(54)**.



Şekil 8. Fertilizasyon-Trilaminar Germ Diski Oluşumu sürecindeki Kök Hücreler (54).



Şekil 9. İnsan vücudunun gelişiminde kök hücrelerin potensindeki değişiklikler. Potens, blastosistin pluripotent hücrelerinden deri, CNS veya kemik iliği gibi bir insan vücudundaki belirli bir dokunun unipotent hücrelerine kadar değişir. Ters pluripotens, oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü (Oct4), cinsiyet belirleyici bölge Y (Sox2), Kruppel benzeri faktör 4 (Klf4) veya Myc geni kullanılarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin oluşturulmasıyla elde edilebilir **(54)**.

2.5.3. Embriyonik Kök Hücrelerin Özellikleri

Fare ESC'lerinin özellikleri, ESC özelliklerinin tanımlanmasında bir referans sağlar. Anahtar özellikler şunlardır; ESC'ler pluripotent hücre popülasyonundan elde edilmiş ve stabil olarak diploid olmalıdırlar. Primitif embriyonik durumunda sonsuz miktarda çoğaltılabilmeli ve kültürde ileri pasajları takiben normal karyotiplerini korumalıdırlar. Greftten sonraki teratomalarda ve *in vitro* uygun koşullar altında 3 germ yaprağının çeşitli hücre tiplerine, alıcı blastosistte kolonize olduğunda da vücuttaki herhangi bir hücre tipine farklılaşabilmelidirler **(57,58)**.

ESC'lerin pluripotentliği geleneksel olarak 3 farklı yaklaşımla saptanır. Fare ESC'leri fare embriyolarına transfer edilirler, kimerik embriyonun tüm somatik dokularını oluştururlar. İkinci yaklaşım ESClerin *in vivo* 3 germ tabakasının da türevlerine farklılaştığının gösterilmesidir. İnsan ESC'leri immün yetersiz farelere enjekte edildiklerinde teratomaları oluştururlar. Üçüncü yaklaşım ise *in vitro* farklılaşma sırasında ESC pluripotentliğini ortaya koyar. Hem fare hem de insan ESC'lerinin farklılaşmalarına izin verildiklerinde embriyoid cisim (EC) denilen 3 boyutlu hücre agregatları oluşturabilirler ki bu EC'ler ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli doku türevlerini içerirler **(59,60)**.

2.5.4. Embriyonik Kök Hücre Kültürü ve Farklılaşması

Kendini yenileme kapasitesine ilişkin belirteçlerin belirlenmesi, bu kapasitenin sürdürülmesi için ilk önemli sorunu yaratmaktadır **(61)**. Fare ve insan embriyonik kök hücreleri; besin tabakası olarak farklılaşması ve proliferasyonu inhibe edilen fare embriyolarının fibroblastlarından elde edilen serum içeren kültür ortamında büyütülürler **(61)**. Fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin pasajlanması farklıdır. Fare embriyonik kök hücreleri her 2-3 günde bir taze besi yerine ekilir. Tek hücre elde etmek için koloniler, tripsin ile enzimatik olarak ayrılır ve daha sonra fare embriyonik fibroblast ortamına transfer edilir. İnsan embriyonik kök hücreleri, her 6-7 günde bir taze besi yerine ekilir ve küçük hücre grupları şeklinde pasajlanır. İnsan embriyonik kök hücreleri, tek hücrelerden ziyade koloniler halinde çoğalabilir ve mekanik farklılaşma sıklıkla tercih edilir **(61)**.

Fare embriyonik kök hücrelerinin morfolojisi tipiktir ve alttaki fibroblast tabakasındakilerden kolaylıkla ayırt edilebilir. Hücrede çekirdek/sitoplazma oranı daha yüksektir ve çekirdekçik belirgindir **(62)**. Farelerde Octamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü-4 (Oct-4), Nanog ve Zinc Finger Proteini (Rex-1/Zfp-42) gibi transkripsiyon faktörleri ve hücre yüzeyi belirteçleri Stage Spesifik Embriyonik Antijen-1 (SSEA-1) bulunurken, insanlarda SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81 bulunur **(62, 63)**.

Kendini yenilemeyi teşvik etme ve farklılaşmayı inhibe etme kabiliyetine sahip olan lösemi inhibe edici faktör (LIF) , besleyici hücre toplulukları tarafınca meydana getirilir **(62, 63, 64)**. LIF yardımıyla embriyonik kök hücrelerin besleyici hücelere ihtiyaç duymadan serum ortamında, jelatinli bir doku kültürü kabında gelişebildiği gösterilmiştir. Ancak embriyonik kök hücreler LIF bazlı kültürlerde büyürken, LIF veya LIF reseptörlerinden yoksun embriyolar da gerekli normal gelişimi göstermektedir **(62)**. LIF'in fare embriyonundaki etkisinin; embriyonik gelişimin yavaşlaması sırasında iç hücre kitlesinin canlılığını devam ettirmek olduğu tahmin edilmektedir **(62)**.

Bir fare modelinde, embriyonik kök hücreler kendiliğinden üç boyutlu kümeler oluşturur ve LIF'nin kültür ortamından çıkarılmasıyla farklılaşır **(61, 65)**. Bu üç boyutlu kümelere embriyoblastlar denir. Fare embriyonik kök hücrelerinden embriyogenez, kolonilerin tek hücrelere dönüştürülmesi ve hücrelerin kümeler oluşturmaya izin veren bir ortama yerleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Ancak aynı büyüklükte embriyoblastların elde edilebildiği ve hücre sayımlarının kontrol edilebildiği damla yöntemi en sık kullanılan yöntemlerden biridir **(61, 65)**.

Mekanik yöntemle elde edilen koloniler uygun bir ortama yerleştirilerek insan embriyonik kök hücreleri için embriyoblast oluşumu sağlanır **(61)**. Enzim (kollajenaz) veya kimyasal ayırma yöntemlerinin (EDTA) hücrelere zarar verebileceği düşünüldüğünden tercih edilmez. Birçok kök hücre replasman tedavisi uygulaması, diyabet için β hücreleri veya Parkinson hastalığı için dopaminerjik nöronlar gibi spesifik hücre tiplerinin üretilmesini gerektirir **(61)**. Tek bir hücre sınıfına veya embriyoblastlara kendiliğinden farklılaşma, çeşitli tiplerde kontrolsüz bir karışık hücre popülasyonu ile sonuçlanır. Embriyonik kök hücrelerin belirli bir yönde farklılaşmasına izin vermek için, belirli hücre tiplerinin farklılaşmasını, çoğalmasını veya hayatta kalmasını sağlamak için büyüme faktörlerine ihtiyaç vardır. Büyüme faktörlerinin kullanılması, istenen hücre popülasyonunun mevcudiyetini arttırsa da, farklılaşmış hücrelerden oluşan karışık bir popülasyon varlığını sürdürür **(61, 63, 64, 65)**.

III.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız üniversitemiz Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi (Proje No: 2021-049) tarafından desteklenmiştir. Çalışmamız 16/02/2021 tarihinde 77.637.435 numaralı karar ile etik kurul tarafından onaylanmıştır.

3.1. STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması ve Kültürü

Fare embriyonik kök hücre hattı (CGR8, 07032901, ECACC) hücreleri kültürü için, fare embriyonik fibroblastları (STO, 86032003, ECACC) besleyici tabakasını oluşturmak amacıyla öncelikle %0,1 oranında jelatin (G9391-500G, SIGMA), distile su ile hazırlanarak otoklavlandı ve 6 gözlü kültür kaplarına her göze 1'er ml olacak şekilde eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 2 saat inkübe edildi. Eş zamanlı olarak STO hücrelerinin kültür ortamı [%10 fetal sıgır serumu (FBS, FBS-11B, CAPRICORN), %1 L-Glutamin (GLN-B, CAPRICORN), %1 Penisilin/Streptomisin (PS-B, CAPRICORN), 4500mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, DMEM-HXA, CAPRICORN)] hazırlandı. İnkübasyonun sonunda jelatin aspire edilerek Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD'da halihazırda Prof. Dr. H. Seda Vatansever'in laboratuvarındaki stoklarda bulunan STO hücrelerinin ekimi gerçekleştirildi. Her iki günde bir kültür ortamı değiştirilerek konfluent olana dek kültüre devam edildi. STO hücreleri konfluent olduktan sonra mitotik inaktivasyon için 20 µg/ml mitomisin-C içeren kültür ortamında 1,5 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda kültüre edilerek embriyonik kök hücrelerin kültürü için hazır hale getirildi.

3.2. Fare Embriyonik Kök Hücre Kültürü

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD'da halihazırda Prof. Dr. H. Seda Vatansever'in laboratuvarındaki stoklarda bulunan CGR8 (07032901, ECACC) hücreleri embriyonik kök hücre kültür vasatı [%15 fetal sıgır serumu (FBS, FBS-11B, CAPRICORN), %1 L-Glutamin (GLN-B, CAPRICORN), %1 Penisilin/streptomisin (PS-B, CAPRICORN), 0.1Mm MEM Non-essential amino asid (NEAA-B, CAPRICORN), 10^{-6} M β -mercaptoethanol (A1108,0100, APPLICHEM) 1000 U/ml lökemia inhibitör faktör (LIF, L9545-10UG, SIGMA), 4500mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, DMEM-HXA, CAPRICORN)] içerisinde STO hücrelerinden oluşan besleyici tabaka ile kültüre edildi. STO hücreleri üzerinde koloni oluşturmuş CGR8 hücreleri tripsin/EDTA (T4049-100ML, SIGMA) solüsyonu kullanılarak kaldırıldı ve ardından hücreler LIF içermeyen embriyonik kök hücre kültür vasatı içerisinde damla yöntemi ile 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 2 gün kültüre edildi (Resim 3.1). Daha sonra oluşan embriyoblastlar toplanarak matrijel (354234, CORNING) kaplı kültür kaplarına (Resim 3.2) aktratıldı ve 2 gün kültüre edildikten sonra 3. günden itibaren kültür ortamına her gün 0,5 nM kemik morfogenetik proteini-4 (BMP-4, 120-05ET, PEPROTECH) ilavesi ile keratinosite farklılaştırılma için 10 gün boyunca kültüre edildi. CGR8 hücrelerinden farklılaştırılan keratinositlerin karakterizasyonu için sitokeratin-8 ve sitokeratin-14 ekspresyonlarına akış sitometrisi ve immunositokimya yöntemleri ile bakıldı.



Resim 3.1. Embriyonik kök hücrelerin tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak kaldırıldıktan sonra LIF içermeyen embriyonik kök hücre kültür vasatı içerisinde yapılan damla yöntemine ait fotoğrafları.



Resim 3.2. Matrigel ile kaplanmış kültür kapları.

3.3. Hücrelerin Analizi

3.3.1. İmmünohistokimya ile Hücrelerin Karakterizasyonu

İmmünohistokimyasal analiz için hücreler fosfat tamponlu solüsyon ile (PBS, 404.100, BIOSHOP) ile yıkandıktan sonra %4'lük paraformaldehit

(PFA, 1.04004.0800, MERCK) ile 30 dk. tespit edildi. Tespit işleminden sonra 3x5 dakika PBS ile yıkanan hücreler endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (1.08597.2500, MERCK) ile inkübe edildi. Hücrelerin 3x5 dakika PBS ile yıkanma işleminden sonra permeabilizasyon için hücreler %0,1 Triton-X-100 (A4975,0100, APPLICHEM) ile 15 dakika buz üstünde bekletildi. Tekrar 3x5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra bloklama solüsyonu (TA-125-UB, THERMOFISHER) ilave edilerek 1 saat inkübasyonun ardından anti-sitokeratin 8 (SC-8020, SANTA CRUZ) ve anti-sitokeratin 14 (SC-53253, SANTA CRUZ) antikorumları ile bir gece +4C'de inkübe edildi. Ertesi gün 3x5 dakika PBS ile yıkanan hücreler anti-mouse ve anti-rabbit biotinlenmiş sekonder antikorumları (TP-125-BN, TS-125-HR, THERMOFISHER) ile 30'ar dakika inkübe edildi. Yıkanan hücrelerde immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere diaminobenzidine (DAB, TA-125-HD, THERMOFISHER) kromojeni uygulandı ve distile su ile yıkamanın ardından Mayer's Hematoksilen (TA-125-MH, THERMOFISHER) ile artalan boyama yapıldıktan sonra kapatma medyumunu ile kapatılarak Olympus marka BX40 mikroskop ile incelendi.

3.3.2. Akış Sitometrisi ile Hücrelerin Karakterizasyonu

Akış sitometrisi analizi için ise hücreler 1 defa PBS ile yıkandıktan sonra 300 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Ardından tüm hücreler PFA ile 20 dakika fikse edildi (1×10^6 hücre/ml) ve daha sonra 300 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılıp tekrar PBS eklenerek 10 dakika bekletilen hücreler tekrar santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra 50µl hücre süspansiyonundan alındı ve üzerine antikor karışımı (sitokeratin-8 (17514-1-AP, PROTEINTECH) ve sitokeratin-14 (10143-1-AP, PROTEINTECH)) eklenerek 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 1 ml PBS ile yıkayıp tekrar santrifüj edilen örnekler

500µl PBS ile süspanse hale getirilerek akış sitometrisi cihazı (Accuri C6, BD Bioscience) ile analiz yapıldı.

3.4. Yara Modelinin Oluşturulması, Hücrelerin Transferi ve Analizi

3.4.1. Fare Yara Modelinin Oluşturulması

Steroid uygulanacak gruplara (Grup 3 ve Grup 4) ait deneklere yara modeli oluşturulmadan önce 1 hafta süre ile günde 2 mg/kg dozunda deksametazon (Deva Holding A.Ş) intramusküler olarak uygulandı (Resim 3.3). Tüm fareler 90 mg/kg ketamin ve 100mg/kg ksilazin ketamin-ksilazin kombinasyonunun intraperitoneal (enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Ardından tüm gruplardaki deneklerde steril cerrahi set kullanılarak ense bölgesinde tüylerden temizlenen alana 0.5x0.5 cm boyutunda epidermis ve dermisi içeren yara modeli oluşturuldu (Resim 3.4).



Resim 3.3. İntramusküler deksametazon uygulaması



Resim 3.4. Yara Modeli Oluşturulması

3.4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Hücrelerin Transferi

48 adet 8 haftalık yaklaşık 20-30 gr. aralığında balb-C tipi erkek fare Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Her bir grupta 12 adet fare olacak şekilde 4 deney grubuna ayrıldı.

Grup 1 (yara grubu): Cerrahi yara oluşturulması (Başka herhangi bir uygulama yapılmamış)

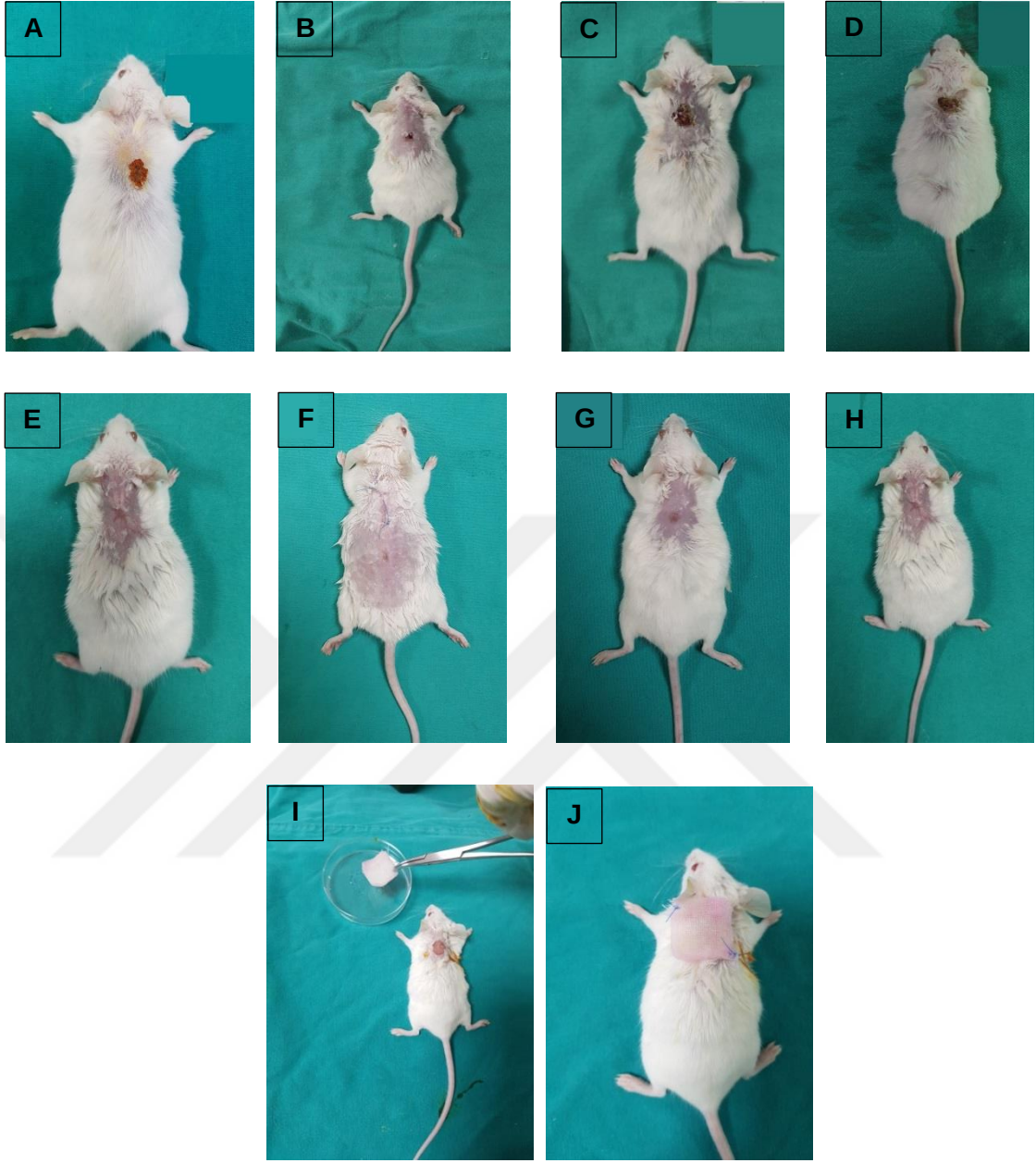
Grup 2 (hücre grubu): Cerrahi yara oluşturulması+ Farklılaştırılmış keratinosit uygulaması

Grup 3 (steroid grubu): Steroid uygulaması + Cerrahi yara oluşturulması

Grup 4 (steroid+hücre grubu): Steroid uygulaması + Cerrahi yara oluşturulması+ Farklılaştırılmış keratinosit uygulaması

Yara modeli oluşturulduktan sonra 3 hafta boyunca her gün Grup 3 ve Grup 4'e yukarıda belirtilen dozda deksametazon uygulamaya devam edildi. Grup 2 ve Grup 4'e ait deneklerin yara yerine üzerinde kültüre edilen keratinositler bulunan vazeline gauze konularak kapatıldı. Keratinositler yara yeri üzerine gelecek şekilde vaseline gauze konduktan sonra saat 5 ve 10 yönünde sağlam deri ile birlikte suture edildi (Resim 3.5 I-J). Her 2 günde bir yara yeri pansumanı yapıldıktan sonra transferden sonraki 10. ve 21. günlerde yara yerinden biyopsi örnekleri alındı (Resim 3.5 A- H).





Resim 3.5. Deney gruplarının oluşturulması ve biyopsi alınması. (A) Grup 1 10. Gün biyopsi, (B) Grup 2 10. Gün biyopsi, (C) Grup 3 10. Gün biyopsisi, (D) Grup 4 10. Gün biyopsi, (E) Grup 1 21. Gün biyopsi, (F) Grup 2 21. Gün biyopsi, (G) Grup 3 21. Gün biyopsi, (H) Grup 4 21. Gün biyopsi, (I-J) Grup 2 ve 4' e keratinosit uygulaması.

3.4.3. Dokuların Eldesi ve Takibi

Dokular %10'luk formalin solüsyonu (2014P6, OSTIM) içerisinde 48 saat tespit edildikten sonra rutin parafin takip prosedürüne uygun şekilde her bir doku etiketlenip kasetlenerek tespit solüsyonunun uzaklaştırılması için bir gece akarsu altında yıkandı. Ertesi sabah dokular, derecesi giderek artan etil alkol (1.00983.2511, MERCK) serileri ile (%60-70-80-96) dehidratasyonları yapıp, iki değişim ksilen (SURGIPATH) ile şeffaflaştırmaları sağlandıktan sonra, parafine emdirme aşaması uygulanıp etiketlenerek parafine gömüldü. Ardından rotary mikrotomla (RM-2245, LEICA) polilizin ile kaplı lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

Tablo 3.1. Parafin Doku Takibi

Yapılan İşlem	Madde	Zaman
Tespit	%10'luk formalin	48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	%60'lık etil alkol	30 dakika
	%70'lik etil alkol	30 dakika
	%80'lik etil alkol	30 dakika
	%96'lık etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme 60°C etüvde	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

3.4.4. Hematoksilen Eozin Boyaması

Alınan doku kesitleri öncelikle etüvde 60°C’de bir gece bekletildikten sonra, bir saat ksilenle deparafinizasyonu sağlanıp azalan etil alkol serilerinin (%96-80-70-60) her birinde ikişer dakika tutularak rehidratasyon işlemi yapıldı. Fazla alkolün uzaklaştırılması için beş dakika akarsu altında yıkandıktan sonra çekirdek boyaması için beş dakika hematoksilende (HISTO-MED MEDİKAL) bekletilen, fazla boyanın uzaklaştırılması için beş dakika akarsu altında yıkaması yapıp diferansiyasyon için bir saniye asit alkole batırılan kesitler tekrar akarsuda beş dakika yıkandıktan sonra sitoplazma boyaması için eozinde (05-11007/L, BIO-OPTICA) iki dakika bekletilip tekrar 5 dakika akarsu altında yıkama yapıp dehidratasyon için sırasıyla %80’lik ve %96’lık etil alkolde birer dakika bekletildikten sonra şeffaflaştırma işlemi için bir saat ksilende bekletilip entellan (107961.0500, MERCK) ile kapatılarak ışık mikroskopunda fotoğrafları çekildi ve gruplar arası değerlendirmeleri yapıldı.

Tablo 3.2. Hematoksilen Eozin Boyaması

Yapılan İşlem	Madde	Zaman
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	%96'lık etil alkol	2 dakika
	%80'lik etil alkol	2 dakika
	%70'lik etil alkol	2 dakika
	%60'lık etil alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	1 saniye
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	%80'lik etil alkol	1 dakika
Dehidratasyon	%96'lık etil alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.4.5. İmmünohistokimyasal Boyama

Alınan tüm örneklerden daha önce elde edilen polilizinli lamlara alınan doku kesitleri deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde bekletildikten sonra iki değişim ksilen ile muamele edildi. Rehidratasyon için, azalan etil alkol serilerinden (%96-80-70-60) geçirilip distile su ile 10 dakika yıkandıktan sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Permeablizasyon için %0,5'lik tripsin (TSS155, SCYTEK) solüsyonu içinde 37°C'de 10 dakika tutularak ve PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulandıktan sonra kesitler 3x5 dakika PBS ile yıkandı. Bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra anti-Sitokeratin 8 (SC-8020, SANTA CRUZ), anti-Sitokeratin 14 (SC-53253, SANTA CRUZ), anti-MCP1 (AB25124, ABCAM), anti-kollajen1 (SC-293182, SANTA CRUZ), anti-IL1 β (SC-52012, SANTA CRUZ), anti-VEGF (SC-7269, SANTA CRUZ) ve anti-TNF α (SC-52746, SANTA CRUZ) primer antikorları ile 18 saat +4°C'de inkübasyona bırakıldı. PBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitler 30 dakika sekonder antikor ile ardından PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra kesitlere 30 dakika biotinli sekonder antikor uygulanıp tekrar PBS ile 3x5 dakika yıkandı, ardından 30 dakika avidin-HRP sekonder antikor uygulanıp 3x5 dakika yıkama yapıldı. İmmunoreaktivitesi DAB ile sağlanıp 1x5 dakika PBS ile 2x5 dakika distile su ile yıkama yapıldıktan sonra, artalan boyaması ise Mayer's hematoksilen ile sağlanıp 3x5 dakika distile su ile yıkanan kesitlerin dehidratasyonu 1'er dakika sırasıyla %80 ve %96'lık alkollerde gerçekleştirildi. Şeffaflaştırma için 2x30 dakika ksilende tutulan kesitler entellan ile kapatılıp ışık mikroskopunda fotoğrafları çekildi ve gruplar arası değerlendirmeleri yapıldı.

Tablo 3.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Yapılan İşlem	Madde	Zaman
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	%96'lık etil alkol	2 dakika
	%80'lik etil alkol	2 dakika
	%70'lik etil alkol	2 dakika
	%60'lık etil alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Permeablizasyon	Tripsin	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Endojen peroksit bloklama	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	1 saat
Primer Antikor ile inkübasyon		1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Biotinli Sekonder Antikor ile inkübasyon	Biotinli Sekonder Antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Avidin-HRP ile inkübasyon	Avidin-HRP	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk.
Yıkama	PBS	1x5 dakika
Yıkama	Distile su	2x5 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Dehidratasyon	%80'lik etil alkol	1 dakika
	%96'lık etil alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	2x30 dakika
Kapama	Entellan	

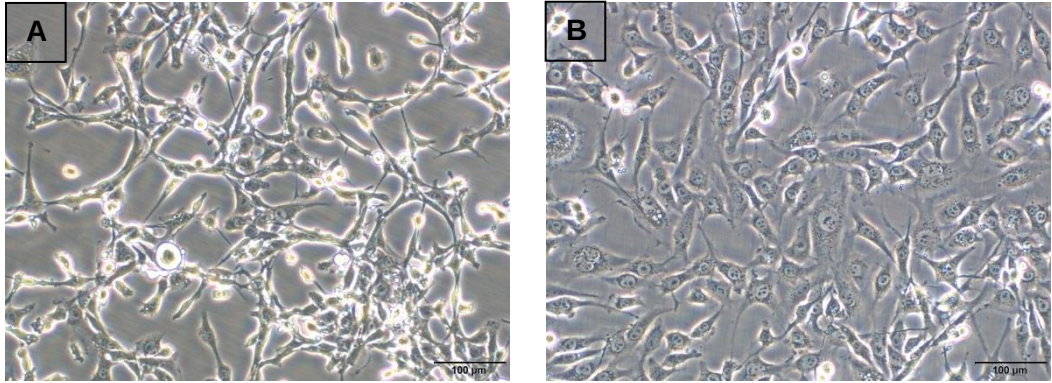
Tablo 3.6: Deneyde Kullanılan Antikorlar

Antikor Adı	Katalog No	Türü	Firma	Dilüsyon
Sitokeratin-8	sc-8020	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1/100
Sitokeratin-14	sc-53253	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1/100
MCP-1	ab25124	Rabbit Poliklonal	ABCAM	1/100
TNF α	sc-52746	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1/100
Kollajen-1A1	sc-293182	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1/100
IL-1 β	sc-52012	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1/100
VEGF	sc-7269	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1/100

IV.BULGULAR

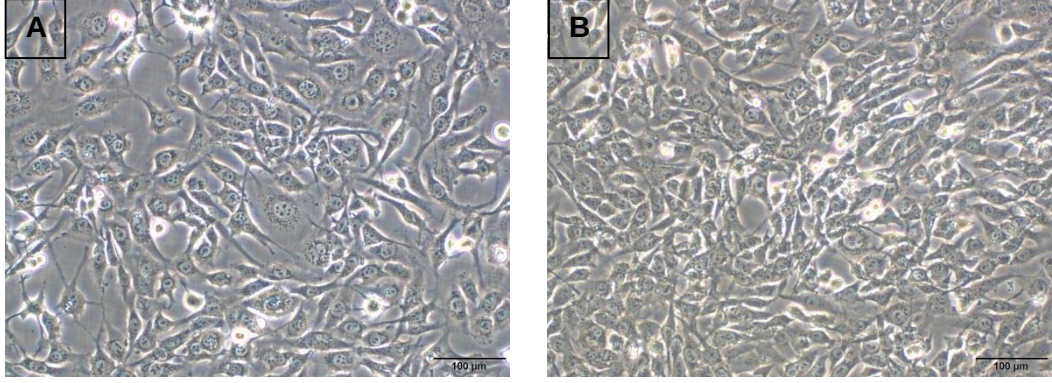
4.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü

CGR8 hücreleri için besleyici tabaka oluşturulacak STO hücreleri jelatin kaplı kültür kaplarına ekilerek konfluent oluncaya kadar kültüre edildi. Kültürün 3. ve 7. gününde STO hücrelerinin ökromatik çekirdeğe sahip ve fibroblastlara benzer fuziform şekilli oldukları gözlemlendi (Resim 4.1).



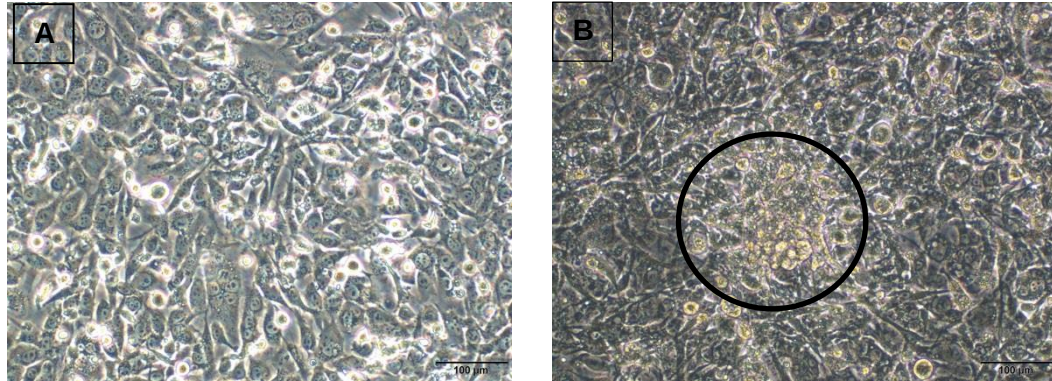
Resim 4.1. STO hücrelerinin hücre kültürünün 3. gün (A) ve 7. güne (B) ait fotoğrafları. Ölçek:100µm

STO hücreleri konfluent olunca (Resim 4.2A) mitotik inaktivasyonu için mitomisin-C uygulanması yapıldı ve sonuçta hücrelerin canlılıklarını korudukları ve konfluent olarak kaldıkları saptandı (Resim 4.2B)



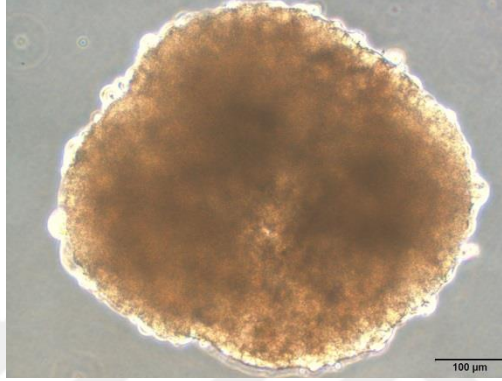
Resim 4.2. STO hücrelerinin mitomisin-C uygulaması öncesi (A) ve sonrasına (B) ait hücre kültürü fotoğrafları. Ölçek:100µm

Mitomisin-C uygulamasından sonra STO besleyici tabakası üzerine CGR8 hücreleri ekilerek birlikte kültüre edildi (Resim 4.3A), hücre kültürünün 7. gününde CGR8 hücrelerinin STO hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebildiği ve küçük koloniler oluşturmaya başladıkları gözlemlendi (Resim 4.3B).



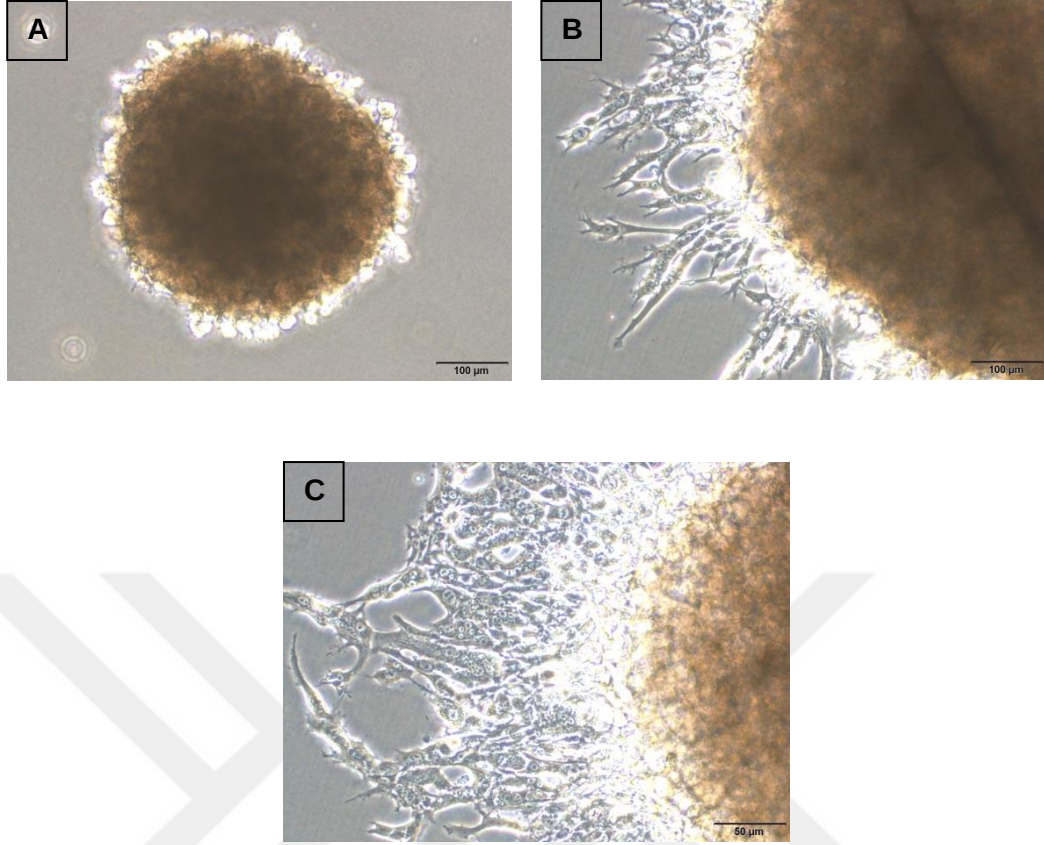
Resim 4.3. Mitomisin-C ile muamale edilmiş STO hücreleri üzerinde kültürünün 0. (A) ve 7. (B) günlerinde embriyonik kök hücre kolonileri (yuvarlak alan içerisinde). Ölçek:100µm

CGR8 hücrelerinin damla yöntemi kullanılarak embriyoblastlar elde edildi, kültür vasatı içerisinde yüzen, yuvarlak şekilli, düzensiz kontürlere sahip hücre kolonileri şeklinde olduğu gözlemlendi (Resim 4.4). Kùltüre devam edilerek embriyoblastların büyümesi sağlandı ve embriyoblastlar matrigel kaplı kùltür kaplarına transfer edildi.



Resim 4.4. Damla yöntemi sonrası elde edilen embriyoblast. Ölçek:100µm

Kùltürün ilk 2 günü embriyoblastların matrigel yapışması beklendikten sonra 3. günden itibaren kùltür ortamına BMP-4 ilave edilerek hücrelerin keratinositlere farklılaşması sağlandı (Resim 4.5A). Keratinosit benzeri hücreler fuziform şeklinden epiteloide farklılaşmasıyla ayırt ediliyordu (Resim 4.5B). Farklılaşan hücreler tekrar yeni matrijel üzerinde kùltüre edilerek çoğaltıldı. Her bir pasajda bir öncekine göre epiteloide hücre oranının fuziform şekilli hücrelere göre arttığı izlendi (Resim 4.5C).

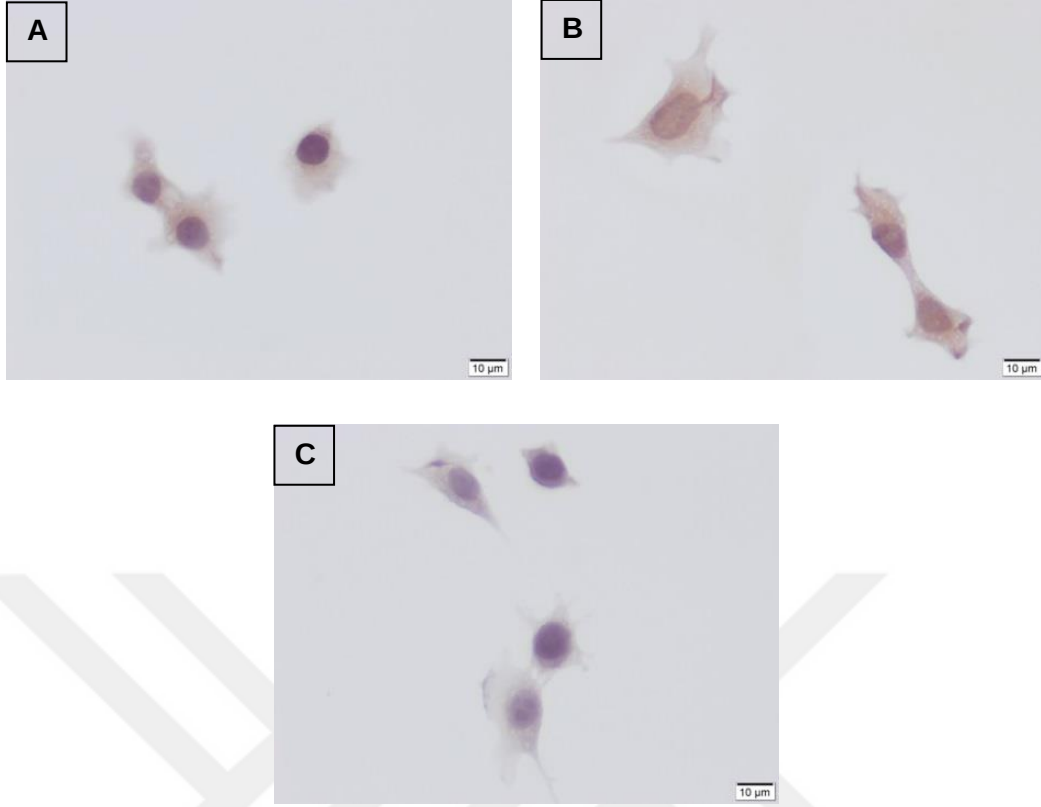


Resim 4.5. BMP-4 uygulanan embriyoblastların kültürünün 1. (A), 5. (B) ve 10. (C) günlerine ait keratinosit farklılaşma süreci. Ölçek:50µm.

4.2. Keratinositlerin Karakterizasyonu

4.2.1. İmmünositokimya

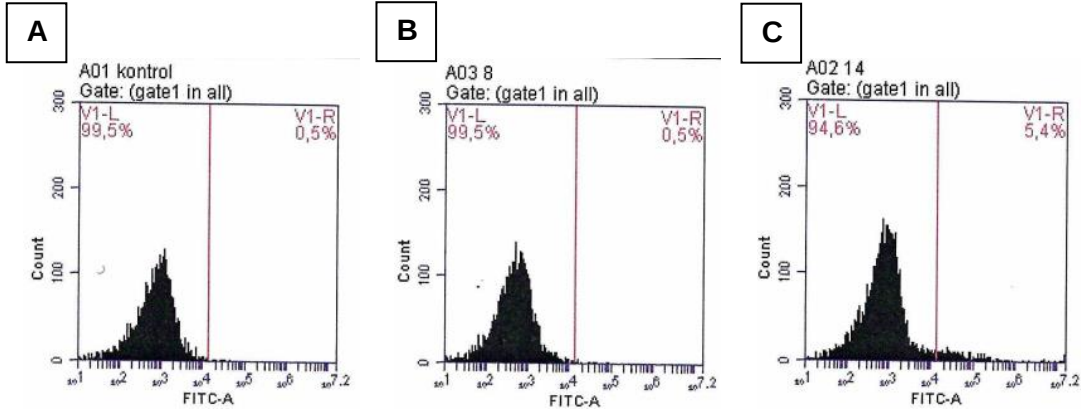
CGR8 hücrelerinin, STO besleyici tabakası üzerinde BMP-4 uygulaması ile keratinositlere farklılaştırılmasının 10. gününde erken dönem keratinosit farklılaşma belirteci olan sitokeratin-8 (Resim 4.6A) ve geç dönem keratinosit farklılaşma belirteci sitokeratin-14 (Resim 4.6B) immunoreaktivitesinin pozitif olduğu gözlemlendi. İmmünositokimya kontrol boyaması negatif (-) idi (Resim 4.6C).



Resim 4.6. Keratinositlerin immünohistokimyasal karakterizasyonu. (A) Sitokeratin-8, (B) Sitokeratin-14, (C) Kontrol. Ölçek: 10µm

4.2.2. Akış Sitometrisi

STO besleyici tabakası üzerinde BMP-4 uygulaması ile keratinositlere farklılaştırılan CGR8 hücrelerinin farklılaştırılmasının 10. gününde sitokeratin-8 (Resim 4.7B) ve sitokeratin-14 (Resim 4.7C) dağılımının pozitif olduğu ve erken dönem farklılaşma belirteci sitokeratin-8 dağılımının daha fazla olduğu gözlemlendi (Resim 4.7).



Resim 4.7. Keratinositlerin akış sitometrisi ile karakterizasyonu. (A) Kontrol, (B) sitokeratin-8, (C) sitokeratin-14.

4.3. Yara Yerine Transfer Edilen Keratinositlerin Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal İncelenmesi

4.3.1. Hematoksilen Eozin Boyaması

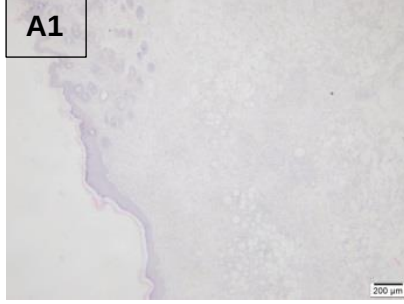
Deri doku kesitleri histopatolojik değerlendirme amacıyla hematoksilen eozin boyaması yapılarak ışık mikroskopunda fotoğrafları çekildi. Sadece yara modeli oluşturulan (yara grubu) deneklerden 10. günde alınan doku örneklerinde yara yerinin sağlıklı deri ile devamlılık gösterdiği gözlemlendi (Resim 4.8A1 ve A2). Yara iyileşmesi evrelerinden ilki olan hemostaz ve inflamasyon evresinin sağlıklı bir şekilde tamamlandığı, alınan doku örneklerinin proliferasyon evresinde olduğu, deri eklerinin gözlenmemesi ve yara bölgesinin epidermisinin epitelinin kalınlaşmaya başlaması ile doğrulandı (Resim 4.8A1 ve A2). Yara oluşumunun 21. gününde ise epidermis tamamen kalınlaşmış çok katlı yassı epitel şeklinde gözlenirken, deri eklerinin kaybolduğu ve yara yerinin tamamen sağlıklı deri ile

devamlılığını sağlamış olduğu gözlemlendi (Resim 4.8B1 ve B2). Yara modeli oluşturulduktan sonra keratinosit uygulanan deneklerin (hücre grubu) 10. gün doku örneklerinde yara grubu ile benzer şekilde iyileşme gözlemlenmiş; ek olarak yara bölgesinde eksuda oluştuğu (Resim 4.9C1 ve C2), 21. günde ise epiderminin tamamen çok katlı yassı epitele dönüşmüş ve dermis ile birlikte sağlıklı deri ile devamlılık gösteren, deri eklerinden yoksun bir yapıda olduğu izlendi (Resim 4.9D1 ve D2). Öncesinde steroid uygulandıktan sonra yara yeri oluşturulan ve steroid uygulamasına 21. güne kadar devam edilen deneklerin (steroid grubu) 10. gününe ait doku örneklerinde yara iyileşmesinde gecikmenin olduğu, krut varlığı ve vaskülarizasyonun devam ettiği izlenirken (Resim 4.10E1 ve E2); 21. günde yara iyileşmesinin devam ettiği epitiliazasyonun tamamlanmadığı izlendi (Resim 4.10F1 ve F2). Yara modeli oluşturulmadan önce steroid uygulanan; yara modeli oluşturulduktan sonra keratinosit uygulanan ve steroid uygulamasına devam edilen (steroid+hücre grubu) deneklerin 10. gününde yara iyileşmesinin (Resim 8.11G1 ve G2) yara (Resim 4.8A1 ve A2) ve hücre (Resim 4.9C1 ve C2) grubuna göre geciktiği ancak steroid grubuna göre (Resim 8.10E1 ve E2) yara iyileşmesinin daha yüksek olduğu, 21. günde (Resim 4.11H1 ve H2) steroid grubuna (Resim 4.10F1 ve F2) benzer şekilde olduğu epitiliazasyonun henüz tamamlanmadığı izlendi. Uzun dönem steroid uygulaması yapılan steroid ve steroid+hücre grubunda yara iyileşmesinin yara ve hücre grubuna göre hem 10. hem de 21. günde daha geç olduğu, keratinosit uygulanan hücre ve steroid+hücre grubunda ise iyileşmenin yalnızca hücre uygulandığında normal iyileşme sürecine benzer yönde etkilendiği, steroid varlığında gecikmeyi yavaşlattığı sonucuna varıldı.

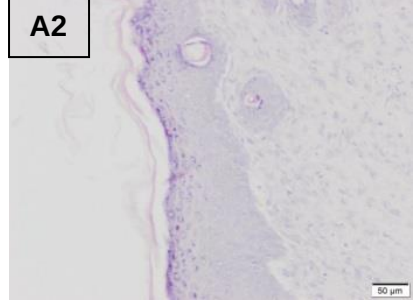
Grup 1
(yara grubu)

10. GÜN

A1

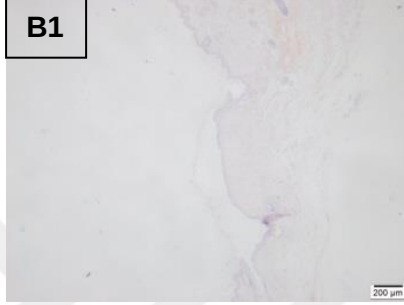


A2

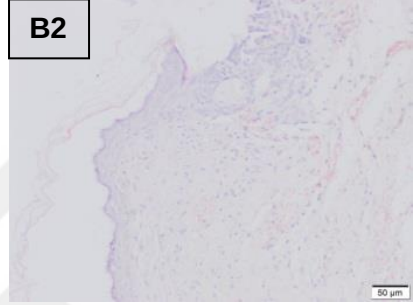


21. GÜN

B1



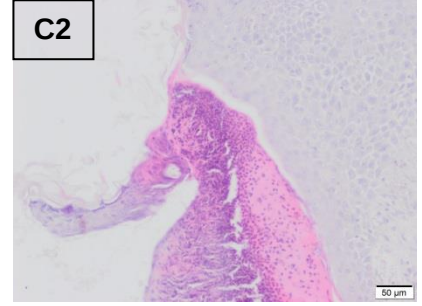
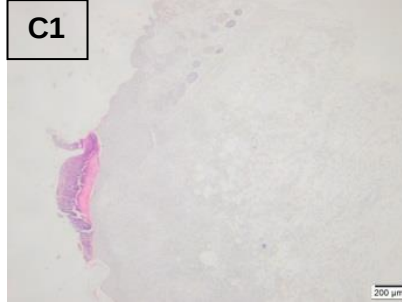
B2



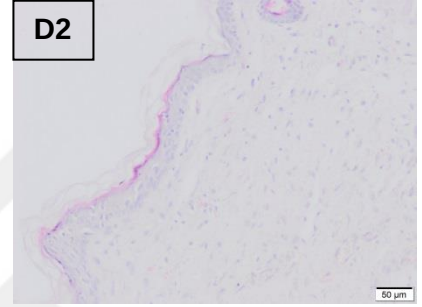
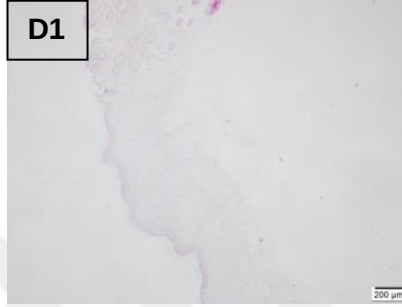
Resim 4.8. Yara grubuna ait 10. gün (A1 ve A2) ve 21. gün (B1 ve B2) hematoxilen eozin boyamaları. Ölçek: A1 ve B1: 200µm A2 ve B2: 50 µm

Grup 2
(hücre grubu)

10. GÜN



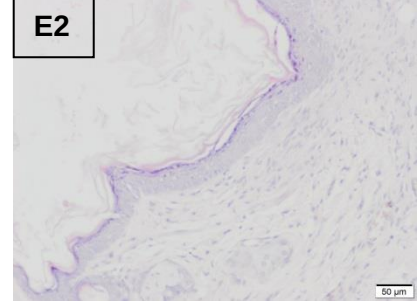
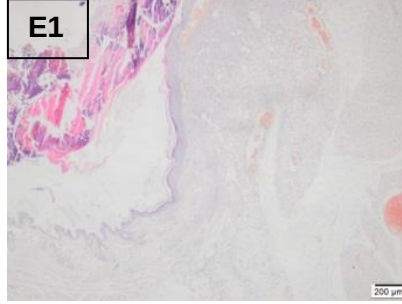
21. GÜN



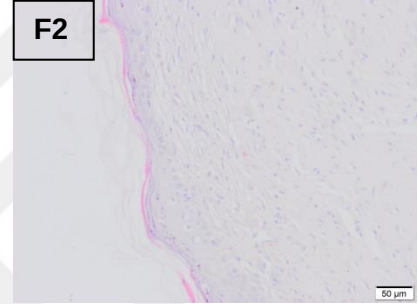
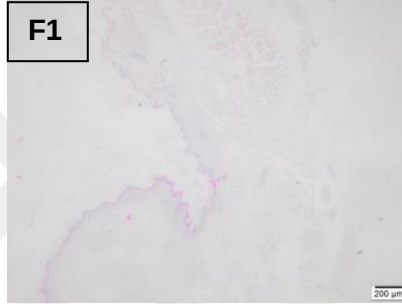
Resim 4.9. Hücre grubuna ait 10. gün (C1 ve C2) ve 21. gün (D1 ve D2) hematoxilen eozin boyamaları. Ölçek: C1 ve D1: 200µm C2 ve D2: 50 µm

Grup 3
(steroid grubu)

10. GÜN



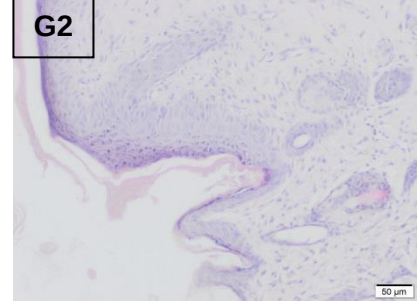
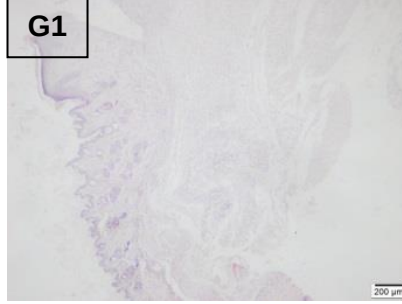
21. GÜN



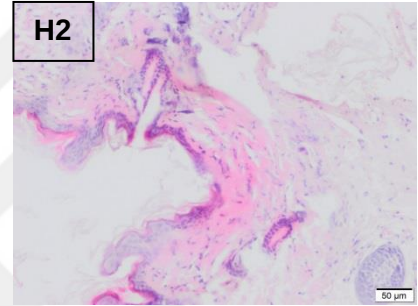
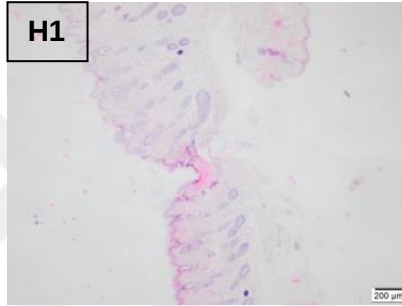
Resim 4.10. Steroid grubuna ait 10. gün (E1 ve E2) ve 21. gün (F1 ve F2) hematoxilen eozin boyamaları Ölçek: E1 ve F1: 200µm E2 ve F2: 50 µm

Grup 4
(steroid+hücre
grubu)

10. GÜN



21. GÜN



Resim 4.11. Steroid ve Hücre grubuna ait 10. gün (A1 ve A2) ve 21. gün (B1 ve B2) hematoksilin eozin boyamaları Ölçek: G1 ve H1: 200µm G2 ve H2: 50 µm

4.3.2. İmmünohistokimya

Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin farelerdeki yara modellerine uygulanmasının 10. ve 21. gününde elde edilen deri doku kesitlerinde sitokeratin-8, sitokeratin-14, MCP-1, TNF- α , VEGF, IL-1 β ve COL1A1 (kollajen tip 1 alfa 1 zinciri) 'in dağılımları immünohistokimyasal olarak değerlendirildi (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Tüm deney gruplarının 10. ve 21. gününe ait sitokeratin-8, sitokeratin-14, MCP-1, TNF- α , VEGF, IL-1 β ve COL1A1 dağılımları.

	10. Gün				21. Gün			
	Grup 1 (Yara Grubu)	Grup 2 (Hücre Grubu)	Grup 3 (Steroid Grubu)	Grup 4 (Steroid + Hücre Grubu)	Grup 1 (Yara Grubu)	Grup 2 (Hücre Grubu)	Grup 3 (Steroid Grubu)	Grup 4 (Steroid + Hücre Grubu)
Sitokeratin-8	++	+	+	-	+	++	+	++
Sitokeratin-14	++	+	+	+	+	++	+	++
IL-1 β	+	-	++	-	-	++	++	-
TNF- α	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VEGF	+++	++	+++	+	++	+++	+++	++
MCP-1/ CCL2	++	+	-	-	+	+	++	++
COL1A1	+++	+	++	+	++	+++	++	+++

4.3.2.1. Sitokeratin-8 Dağılımı

Sitokeratin-8 immünoaktivitesinin steroid grubunda 10. ve 21. günde aynı ve zayıf şiddette (+) (resim 4.12C ve 4.12G), yara grubunda 21. günde 10. güne (++) (Resim 4.12A) göre azaldığı ve zayıf şiddette (+) (Resim 4.12E) olduğu izlendi. Buna karşı hücre grubunda 21. günde (++) (Resim 4.12F) 10. güne (+) (Resim 4.12B) göre artan sitokeratin-8'in benzer şekilde steroid+hücre grubunda 10. günde negatif (-) (Resim 4.12D) iken 21. günde orta şiddette (++) (Resim 4.12H) gözlemlendi (Tablo 4.1).

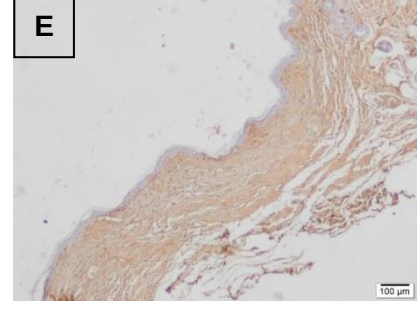
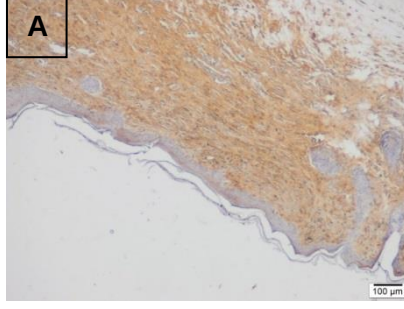


Sitokeratin-8

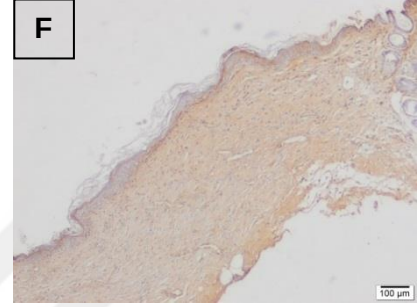
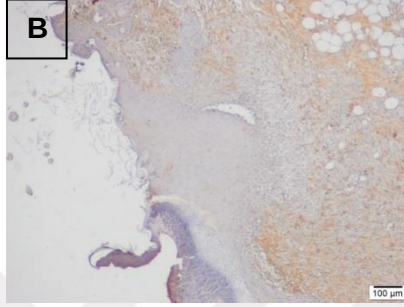
10. Gün

21. Gün

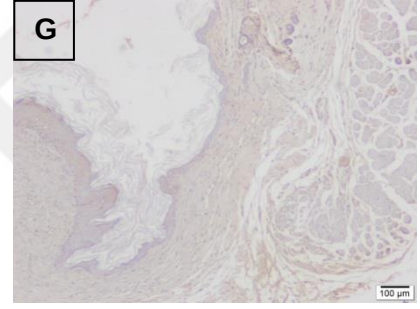
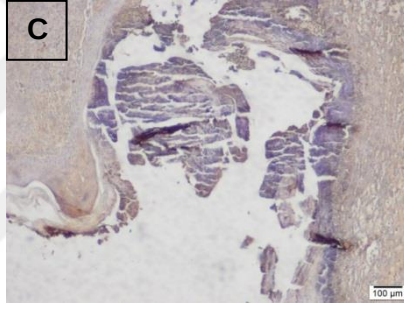
Grup 1
(yara grubu)



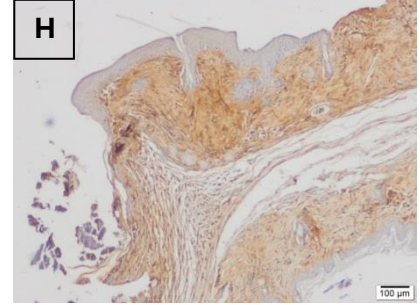
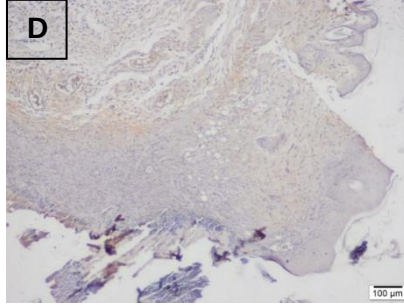
Grup 2
(hücre grubu)



Grup 3
(steroid grubu)



Grup 4
(steroid+hücre grubu)



Resim 4.12. Grup 1(A,E), Grup 2(B,F), Grup 3(C,G), Grup 4(D,H) sırasıyla 10.(A-D) ve 21. gün (E-H) sitokeratin-8 dağılımları. Ölçek: 100µm.

4.3.2.2. Sitokeratin-14 Dağılımı

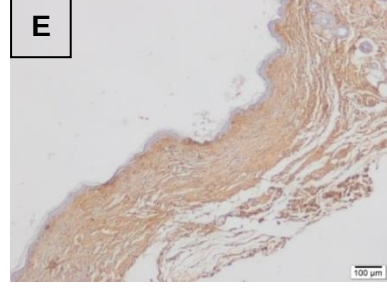
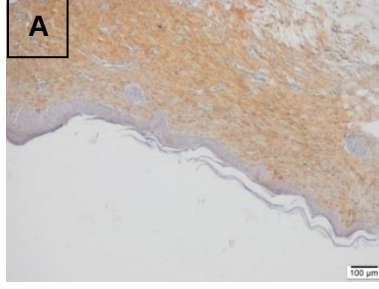
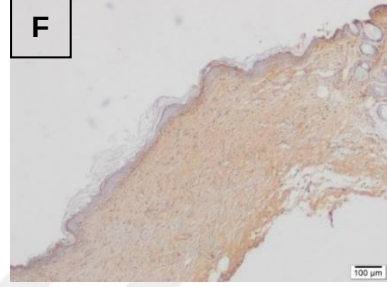
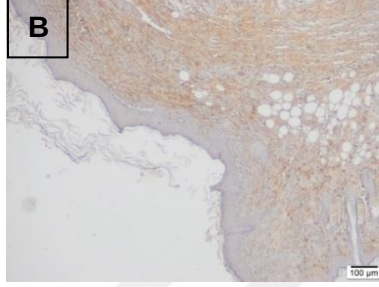
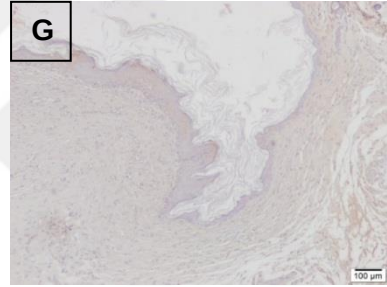
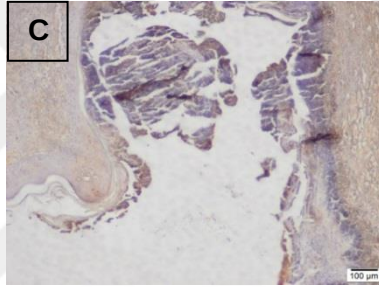
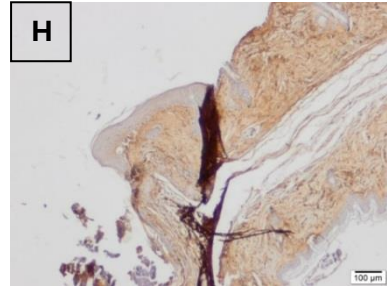
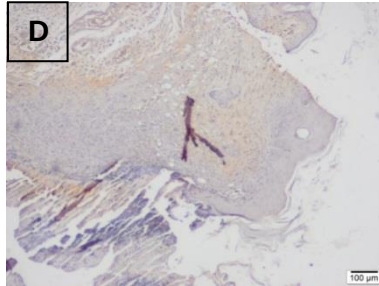
Sitokeratin-14 immünoreaktivitesi 10. günde yara grubunda orta şiddette (++) (Resim 4.13A) iken hücre, steroid ve steroid+hücre grubunda zayıf şiddette (+) (Resim 4.13B, C ve D) gözlemlendi. Yara grubunda 21. günde azalarak zayıf şiddette (+) (Resim 4.13E) olan sitokeratin-14 dağılımı, steroid grubunda 10. güne benzer şekilde zayıf şiddette (+) (Resim 4.13G) iken hücre ve steroid+hücre gruplarında orta şiddette (++) (Resim 4.13F ve H) olup arttığı izlendi (Tablo 4.1).



Sitokeratin-14

10. Gün

21. Gün

Grup 1
(yara grubu)Grup 2
(hücre grubu)Grup 3
(steroid grubu)Grup 4
(steroid+hücre grubu)

Resim 4.13. Grup 1(A,E), Grup 2(B,F), Grup 3(C,G), Grup 4(D,H) sırasıyla 10. (A-D) ve 21. gün (E-H) sitokeratin-14 dağılımları. Ölçek: 100µm

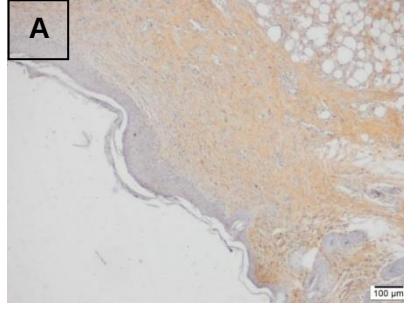
4.3.2.3. IL-1 β Dağılımı

IL-1 β 'nın 10. gün immünoaktivitesi, yara grubunda 10. günde zayıf şiddette (+) (Resim 4.17A) iken, 21. günde negatif (-) (Resim 4.17E) olduğu gözlemlendi. Hücre ve steroid+hücre grubunda 10. günde IL-1 β dağılımı negatif (-) (Resim 4.17B ve D) iken, 21. günde hücre grubunda orta şiddette (++) (Resim 4.17F) ve arttığı, steroid+hücre grubunda ise negatif (-) (Resim 4.17H) olduğu görüldü. Steroid grubunda ise hem 10. hem 21. günde benzer özellikte ve orta şiddette (++) (Resim 4.17C ve G) idi (Tablo 4.1).

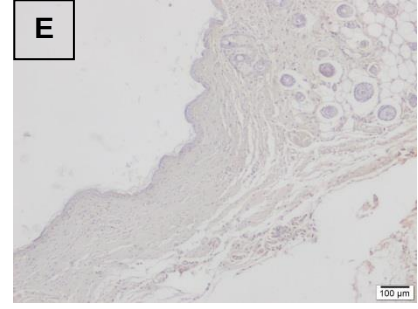
IL-1 β

Grup 1
(yara grubu)

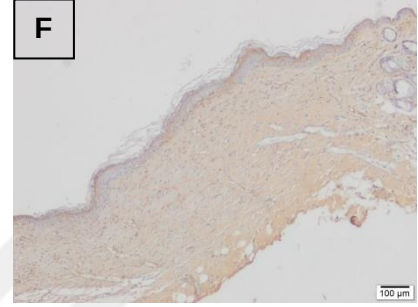
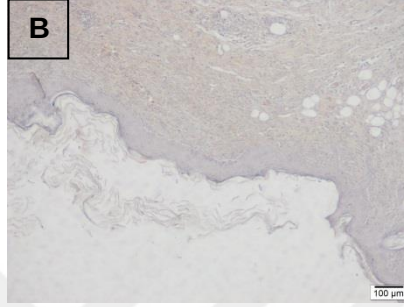
10. Gün



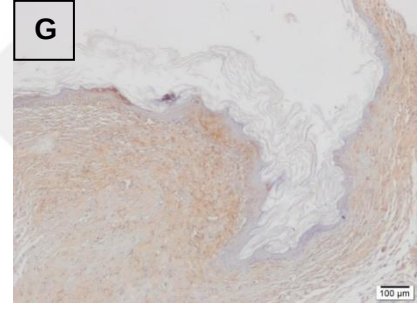
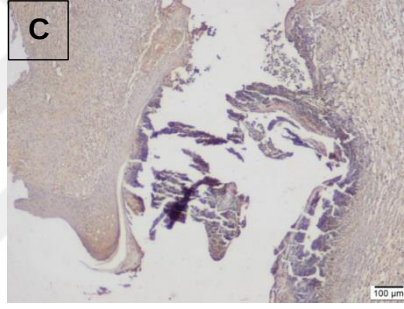
21. Gün



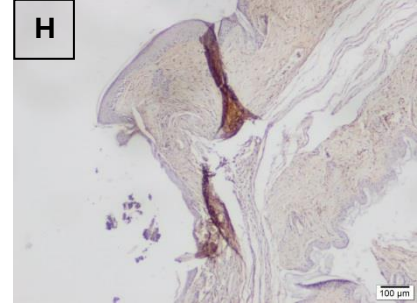
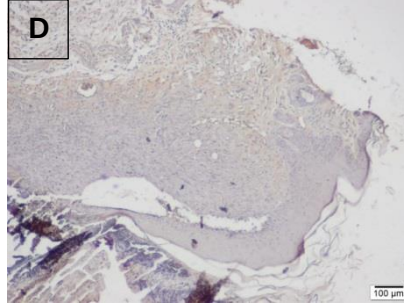
Grup 2
(hücre grubu)



Grup 3
(steroid grubu)



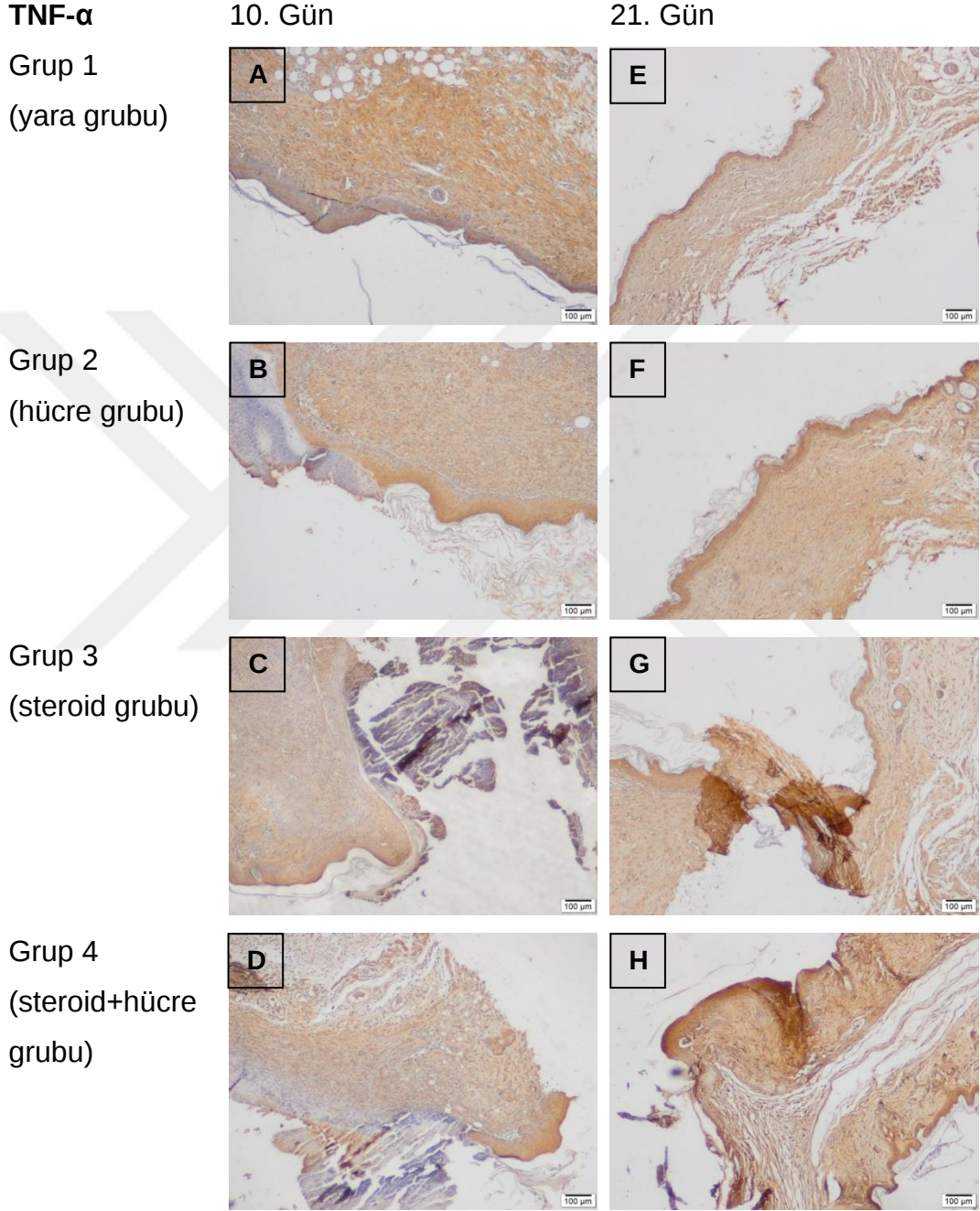
Grup 4
(steroid+hücre grubu)



Resim 4.14. Grup 1(A,E), Grup 2(B,F), Grup 3(C,G), Grup 4(D,H) sırasıyla 10. (A-D) ve 21. gün (E-H) IL-1 β dağılımları. Ölçek: 100 μ m

4.3.2.4. TNF- α Dağılımı

TNF- α immunoreaktivitesi tüm gruplarda ve günlerde benzer ve şiddetli (+++) olduğu gözlemlendi (Resim 4.15) (Tablo 4.1).



Resim 4.15. Grup 1(A,E), Grup 2(B,F) , Grup 3(C,G), Grup 4(D,H) sırasıyla 10. (A-D) ve 21. gün (E-H) TNF- α dağılımları. Ölçek: 100 μ m

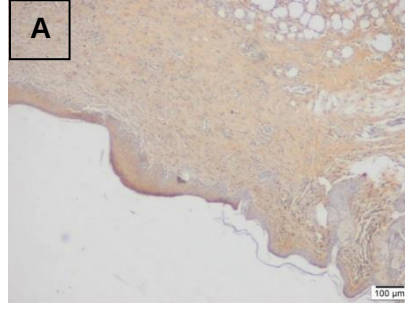
4.3.2.5. VEGF Dağılımı

VEGF immünoreaktivitesi steroid grubunda 10. ve 21. günlerde şiddetli (+++) (Resim 4.16C ve G), hücre grubunda 10. günde orta şiddette (++) (Resim 4.16B) ve steroid+hücre grubunda zayıf şiddette (+) (Resim 4.16D) iken 21. günde iki grupta da benzer miktarda artarak sırasıyla şiddetli (+++) (Resim 4.16F) ve orta şiddette (++) (Resim 4.16H) olduğu gözlemlendi. Yara grubunda ise 10. günde şiddetli (+++) (Resim 4.16A) izlenen VEGF, 21. günde orta şiddette (++) (Resim 4.16E) göstererek azalmıştı (Tablo 4.1).

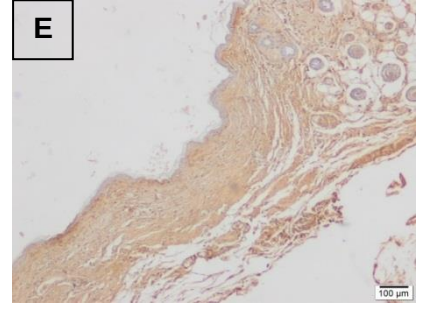
VEGF

Grup 1
(yara grubu)

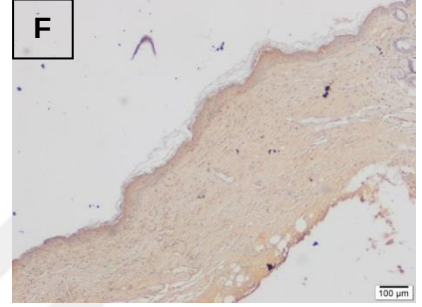
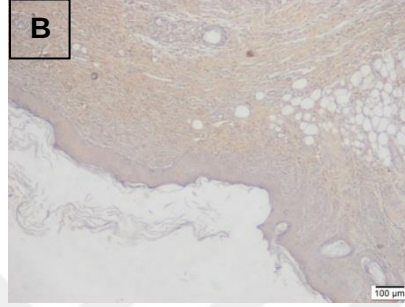
10. Gün



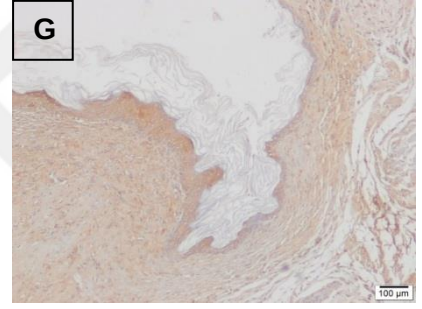
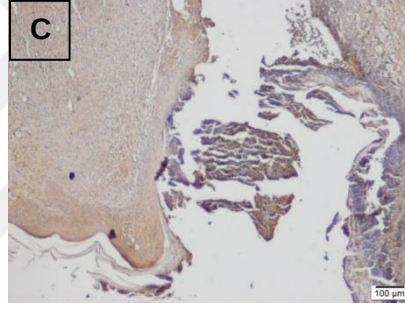
21. Gün



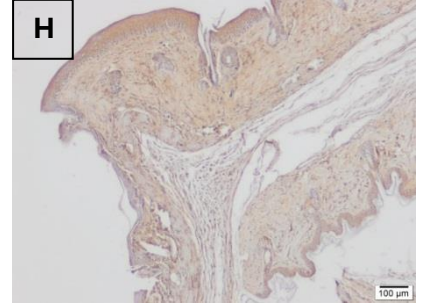
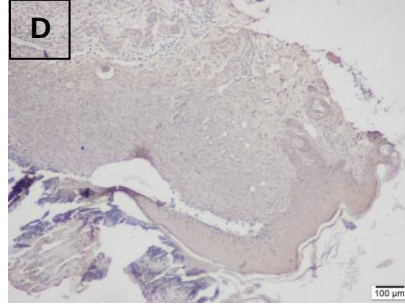
Grup 2
(hücre grubu)



Grup 3
(steroid grubu)



Grup 4
(steroid+hücre grubu)



Resim 4.16. Grup 1(A,E), Grup 2(B,F) , Grup 3(C,G), Grup 4(D,H) sırasıyla 10. (A-D) ve 21. gün (E-H) VEGF dağılımları. Ölçek: 100µm

4.3.2.6. MCP-1 Dağılım

MCP-1 immünoaktivitesi hücre grubunda 10. ve 21. günde benzer ve zayıf şiddette (+) (Resim 4.14B ve F) izlendi. Yara grubunda 10. günde orta şiddette (++) (Resim 4.14A) iken 21. günde azalarak zayıf şiddetteydi (+) (Resim 4.14E). Hem steroid hem de steroid+hücre grubunda 10. günde negatif (-) (Resim 4.14C ve D) olan MCP-1 dağılımı 21. günde artarak orta şiddette (++) (Resim 4.14G ve H) gözlemlendi (Tablo 4.1).

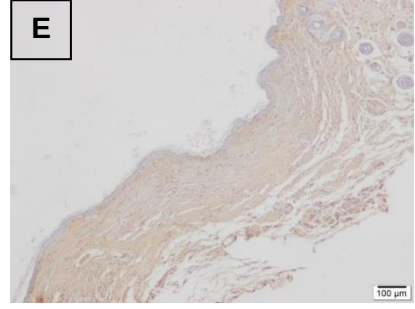
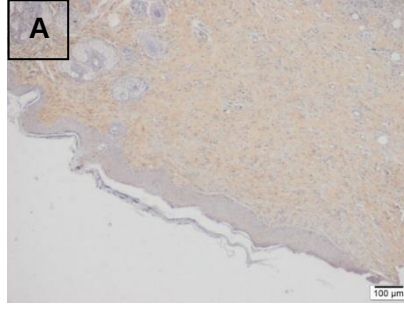


MCP-1

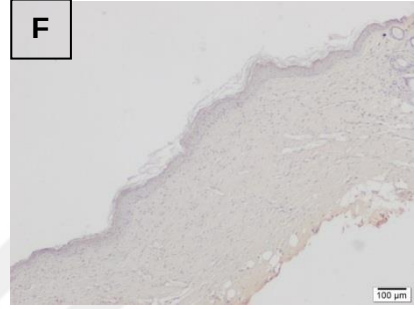
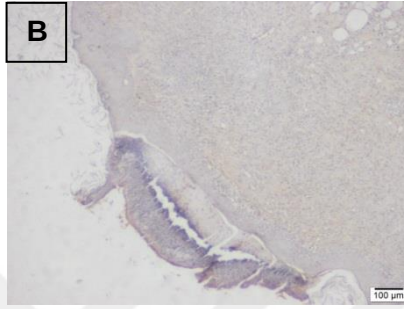
10. Gün

21. Gün

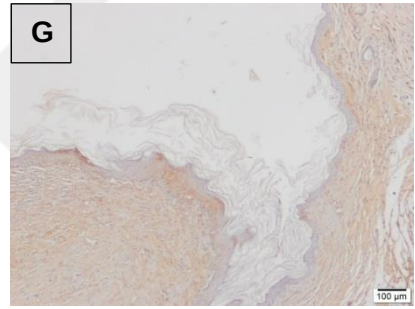
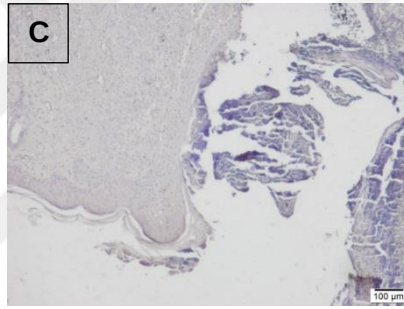
Grup 1
(yara grubu)



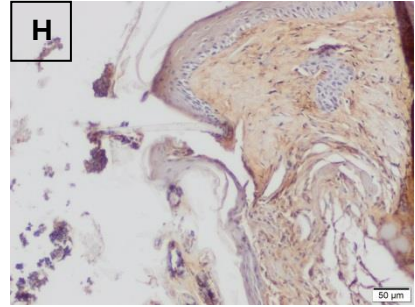
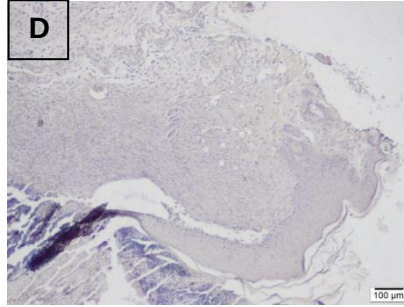
Grup 2
(hücre grubu)



Grup 3
(steroid grubu)



Grup 4
(steroid+hücre grubu)



Resim 4.17. Grup 1(A,E), Grup 2(B,F), Grup 3(C,G), Grup 4(D,H) sırasıyla 10. (A-D) ve 21. gün (E-H) MCP-1 dağılımları. Ölçek: 100µm

4.3.2.7. COL1A1 Dağılımı

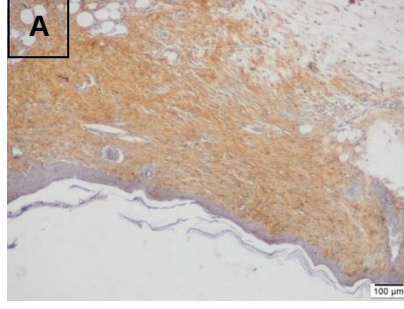
COL1A1 immünoreaktivitesi yara grubunda 10. günde şiddetli (+++) (Resim 4.18A) iken 21. günde azalarak orta şiddette (++) gözlendi (Resim 4.18E). Steroid grubunda hem 10. (Resim 4.18C) hem de 21. günde (Resim 4.18G) benzer ve orta şiddette (++) izlenen COL1A1, 10. günde hücre (Resim 4.18B) ve hücre+steroid grubunda (Resim 4.18D) zayıf şiddette (+) gözenirken 21. günde artarak benzer şekilde şiddetli (+++) izlendi.



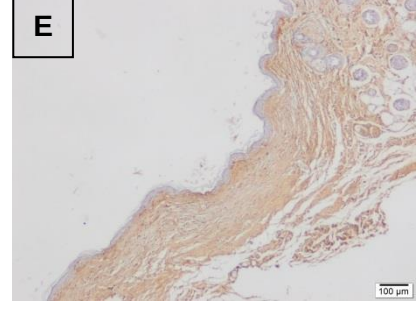
COL1A1

Grup 1
(yara grubu)

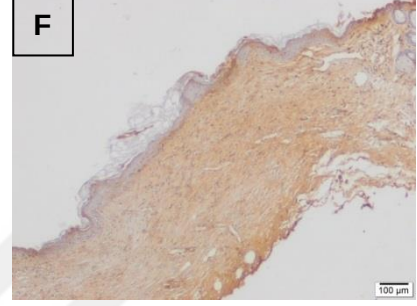
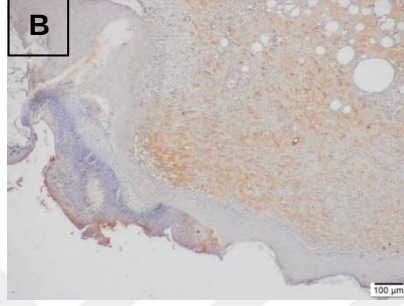
10. Gün



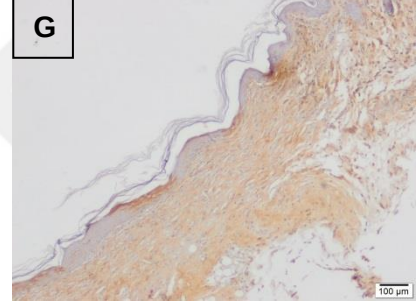
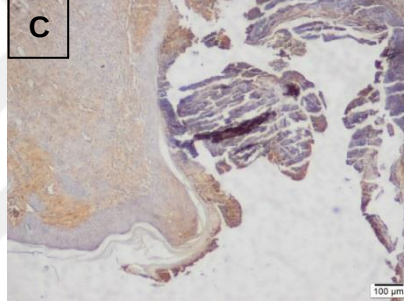
21. Gün



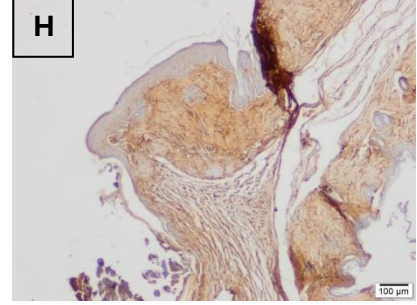
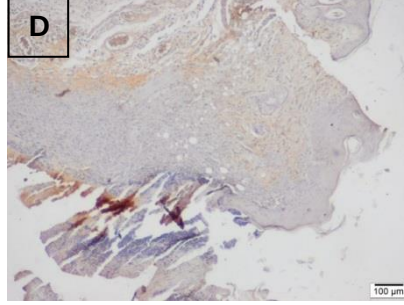
Grup 2
(hücre grubu)



Grup 3
(steroid grubu)



Grup 4
(steroid+hücre grubu)



Resim 4.18. Grup 1(A,E), Grup 2(B,F), Grup 3(C,G), Grup 4(D,H) sırasıyla 10. (A-D) ve 21. gün (E-H) COL1A1 dağılımları. Ölçek: 100µm

V. TARTIŞMA

Derinin temel işlevi, çevreye karşı koruyucu bir bariyer görevi görmektir. Yaralanma veya hastalık sonucu derinin büyük bölümlerinin bütünlüğünün kaybı, büyük sakatlıklara ve hatta ölüme neden olabilir. Deri-yara iyileşmesi yaralanmadan hemen sonra başlar **(66)**. Yara iyileşmesinin fizyolojik süreci dört adımdan oluşur: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma **(2,67)**. Büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler, iyileşme sürecinde çoklu hücre tiplerini koordine etmek için çok önemlidir ve kutanöz yara iyileşmesini mümkün kılar. Akut yarada iyileşme süreci, bu büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin mekansal-zamansal etkisiyle kontrol edilir ve iyileşmenin ilerlemesine yol açar ve derinin bariyer fonksiyonunun yeniden kurulmasına neden olur **(68)**. Deri yaralarının dünya çapında sağlık sistemleri ve ekonomi üzerinde muazzam bir olumsuz etkisi vardır. Son zamanlarda dünya çapında yaklaşık bir milyar insanın akut ve kronik yaralardan muzdarip olduğu bildirilmiştir **(67)**.

Glukokortikoidler (GC), ana stres sinyalleri olmanın yanı sıra, hem lokal hem de sistemik inflamatuvar bozuklukların tedavisinde yaygın olarak kullanılan terapötik ajanlardır. GC'lerin uzun süreli terapötik kullanımı, yara iyileşmesinin güçlü inhibisyonu dahil olmak üzere çok sayıda yan etkiye sahiptir **(46)**. GC'ler, insanlarda ve farelerde Nr3c1 adı verilen tek bir gen tarafından kodlanan, her yerde eksprese edilen hücre içi GC reseptörü (GR) aracılığıyla hareket eder. GC'leri bağladıktan sonra, GR sitoplazmik komplekslerden ayrışır, dimerize olur ve gen transkripsiyonunu modüle ettiği çekirdeğe yer değiştirir **(69)**. Jozic ve ark. (2017) tarafından yapılan bir *in vitro* çalışmada membrana bağlı glukokortikoid reseptörünün bir Wnt-benzeri

fosfolipaz (PLC)/protein kinaz C (PKC) sinyal kaskadını aktive ederek keratinosit göçünü ve yara kapanmasını engellediği bulundu **(46)**.

GR fonksiyonu, klasik olarak transaktivasyon (TA) ve transrepresyon (TR) olarak adlandırılan DNA bağlanma bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla uygulanır. Günümüzde hem TA hem de TR'nin GR'nin aracılık ettiği terapötik etkilere katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Sanchis ve ark. (2012), transgenik farelerde deri yara iyileşmesini, vahşi tip GR'nin keratinosit kısıtlı ekspresyonu veya TR'de TA-defektif ancak etkili olan mutant bir GR (sırasıyla K5-GR ve K5-GR-TR fareler) ile değerlendirdi. GR ve GR-TR'nin keratinosit hedefli aşırı ekspresyonunun erken reepitelizasyonu bastırmak için yeterli olduğunu gösterdiler **(69)**.

Çalışmalar, GC'lerin glukokortikoid reseptörünün aşağı regülasyonu ile anjiyogenez sürecini inhibe ettiğini ve VEGF'nin inhibisyonuna neden olduğunu göstermektedir. Langendorf ve ark. (2021), primer insan göbek damarı hücreleri (HUVEC) ile yaptığı çalışmada 10 µM deksametazonun hücre proliferasyonunu önemli ölçüde artırdığı, 100 µM'nin ise ters etkiye neden olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, yüksek deksametazon konsantrasyonlarının endotel hücre canlılığını ve proliferasyonunu baskıladığı ve anti-anjiyojenik etkisini doğruladığı ortaya koyulmuştur **(70)**.

Çalışmamızda ise diğer çalışmalara benzer şekilde hematoksilen eozin boyaması yapılarak bakılan örneklerde uzun dönem deksametazon uygulaması yapılan steroid ve steroid+hücre grubunda yara iyileşmesinin yara ve hücre grubuna göre hem 10. hem de 21. günde daha geç olduğu sonucuna varıldı.

ESC'ler ilk olarak 1981 yılında fare blastosistlerinin iç hücre kütesinden (ICM) elde edilmiş ve "embriyonik kök (ES) hücre" terimi literatüre dahil olmuştur. Preimplantasyon blastosistinin (35 günlük embriyo) iç hücre kütesinden türetilen ES hücreleri, farelerden, insanlardan ve insan olmayan primatlardan elde edilen pluripotent kök hücrelerdir. ES hücreleri, sinir hücreleri, kan hücreleri, adipositler, kondrositler, kas hücreleri ve deri hücreleri dahil olmak üzere hücre tiplerini ayırt etme yeteneğine sahiptir **(71)**.

Guenou ve ark. (2009), ESC'lerin olağanüstü rejeneratif potansiyelini kutanöz onarım için kullanma girişiminde, BMP-4 (kemik morfogenetik protein-4) ve askorbik asit içeren indüksiyon ortamında büyüyen insan embriyonik kök hücrelerinin, daha sonra farklılaşmış hücrelerin çoklu katmanlarından oluşan epidermisi yeniden oluşturmak için kullanılan bazal keratinositler arasında ayırım yapabileceğini göstermiştir. Bu dokular ayrıca yara iyileşmesini kolaylaştırmak için nude (immun yetersiz) farelere başarıyla nakledildi **(72)**.

Kök hücrelerin keratinosit soyuna *in vitro* olarak yönlendirilmesi muhtemelen üç farklı adımı gerektirir. Birinci adım ES hücrelerinin ve yetişkin kök hücrelerinin (epidermal kökenli olmayan) keratinosit progenitörlerine bağlanmasını indüklemektir. ES hücrelerini ve yetişkin kök hücrelerini (epidermal kökenli olmayan) *in vitro* keratinosit soyuna dahil etmek için bir yaklaşım, hücreleri bir süre boyunca eksojen sitokinler, büyüme faktörleri, kimyasallar ve hücre dışı matris (ECM) alt katmanlarından oluşan bir kokteyle maruz bırakmak olacaktır **(73)**. Böyle bir yaklaşımı kullanan Coraux ve ark. (2003), insan normal fibroblastlarından türetilen kemik morfogenetik protein-4 (BMP-4), askorbat ve mezenkimal kökenli insan normal fibroblastlarından (HNF) ve NIH-3T3 hücrelerinden türetilen ECM'nin bir kokteyl kombinasyonunun varlığında, murin ES hücrelerinin keratinosit soyuna bağlılığını ve ardından farklılaşmasını sağlamayı başardı **(74)**.

Keratinosit soyuna ES hücresi ve epidermal olmayan yetişkin kök hücre bağlılığını indükledikten sonraki adım, diğer soyların karışımından kararlı keratinosit progenitörlerini seçmek ve saflaştırmak olacaktır. Üçüncü adım ise keratinosit progenitörlerinin *in vitro* proliferasyonunu ve terminal farklılaşmasıdır. Bunu teşvik etmek için ideal kültür ortamı kimyasal olarak tanımlanmalı veya serumsuz olmalı ya da gerekirse spesifik rekombinant sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin olası takviyesi ile sentetik serum replasmanları kullanılmalıdır. TGF süper ailesinin üyeleri olan yapısal olarak ilişkili BMP'lerin de *in vitro* keratinosit farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir **(73)**. Epidermal doku, yapısal bütünlüğünü korumaya hizmet eden hücresiz bir ECM içine gömülü hücre tiplerinin (yani keratinositler, melanositler ve Langerhans hücreleri) heterojen bir karışımından oluşur. Bu

nedenle, *in vitro* kültür içine uygun ECM alt tabakasının eklenmesi, keratinosit soyuna bağlı kök hücrelerin terminal farklılaşmasını kesinlikle arttıracaktır **(73)**.

Epidermal ve nöronal öncüllerin ortak bir nöroektodermal öncülden türediği varsayılmaktadır. Erken gastrülasyon aşamasında, ventral ektodermal alan epidermise farklılaşırken, dorsal bölge sonunda nöralleşir. Bu ayrılma, hem ventral morfojen BMP-4'ün (TGF- β süper ailesi) hem de dorsallaştırıcı antagonist faktörlerinin (yani Noggin, Chordin, Follistatin) bir gradyanından kaynaklanmaktadır. *Xenopus* embriyolarında, embriyonik epidermal bağıllık, oositin ventral kısmında BMP-4 tarafından indüklenirken, dorsal kısımdaki yokluğu 'varsayılan nöral' bir farklılaşma sürecine yol açar. Memelilerde, BMP-4 epidermal bağıllıkta benzer bir kritik rol oynar ve nöral indüksiyon üzerinde inhibitör bir etki gösterir **(75,76)**. Aberdam ve ark. (2007) yaptığı bir çalışmada ES hücre kültürüne BMP-4 3. günden 5. güne kadar ortama eklendiğinde, nöral bağıllığın tamamen önlendiği, ektodermal hücreler (K8 / K18) çok sayıda üretilirken, bazılarının serum ilavesinden sonra keratinositler (K5 / K14) haline geldiği gösterilmiştir **(75)**.

Çalışmamızda embriyonik kök hücrelerden damla yöntemi kullanılarak embriyoblastlar elde edildi. Daha önce bildirilen hücre bazlı çalışmaların çoğu 2 boyutlu (2D) koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bir organizmadaki hücrelerin çoğu üç boyutlu (3D) bir mikro ortamda bulunur. 2D kültür yöntemi, dokuların gerçek fizyolojisini tam olarak yansıtmazken, 3D kültür, hücre büyümesi sırasında mikroçevrenin özgüllüğünü taklit eder **(77)**. Çalışmamızda embriyoblastlar 10 gün boyunca BMP-4 ilavesiyle matrijel üzerinde kültürlendi. Proliferasyon yapan hücrelerin bir kısmının göç ettiği gözlemlendi. Kök hücrelerin keratinositlere farklılaşması için hücre dışı matriks ortamı sağlayan Matrigel ve kök hücrelerin keratinositlere farklılaşmasını sağlayan BMP-4 kullandık; hücreler bu durumda 10 günlük kültürden sonra keratinositlere benziyordu. Sonuçlar, Matrigel ve BMP-4'ü kullanarak, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında ESC'yi kısa sürede farklılaştırabileceğimizi destekledi.

Birçok çalışma da sitokeratin-8 erken epidermal belirteç olarak, sitokeratin-14 ise olgun epidermal belirteç olarak kullanılmıştır **(74, 75, 76)**. Bu çalışmada da kültürün 10. gününde embriyonik kök hücrelerden keratinosit farklılaştırılan hücrelerin sitokeratin-8 ve 14 immünoreaktiviteleri pozitif. Embriyonik kök hücrelerden keratinosit benzeri hücrelerin farklılaştırılmasının değerlendirilmesi için *in vitro* çalışmalarda sitokeratin-8 ve 14'ün ekspresyonları önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır **(78, 79, 80)**. Çalışmamızın hücre karakterizasyonu aşamasında yapılan immünohistokimya sonuçları, sitokeratin-8 ve 14'ün ekspresyonunun pozitif olması nedeniyle farklılaşan hücrelerin keratinosit benzeri hücreler olduğunu desteklemiştir. Ayrıca erken epidermal belirteci olarak çalışılan sitokeratin-8 immünoreaktivitesi sitokeratin-14'e göre daha fazla gözlenmiştir.

Sitokeratin, genellikle dokuya özgü ve farklılaşmaya özgü paternlerde spesifik çiftler olarak birlikte eksprese edilen tip I (sitokeratin 9-23) ve tip II (sitokeratin 1-8) proteinlerinin heterodimerlerinden oluşur. Bir tip I keratin olan sitokeratin-14, epidermin bazal keratinositlerinde ve tabakalaşmış epitellerde ve kıl folikülünün dış kök kılıfında yapısal olarak bulunur. Normal fare derisinde, sitokeratin-14, tek ektodermal aşamanın erken evresinde ortaya çıkar ve tabakalaşmadan sonra bazal tabakada kalır. Sitokeratin-8 ve 18 tipik olarak birlikte eksprese edilir ve çeşitli parankimatoz epiteller de dahil olmak üzere basit epitel hücrelerinin birincil keratin çiftini oluşturur. İmplantasyon öncesi embriyolarda olduğu gibi embriyogenezde ortaya çıkan ilk keratinlerdir **(81)**. Laukka ve ark. (2020) farelerde preperitoneal yağ greflerinin karın içi adezyonlara etkisini inceledikleri çalışmada 7. ve 30. günde sitokeratin-8'i pozitif gözlemlemişlerdir **(82)**. Bunun dışında epitelyal-mezenkimal geçişte önemli rolleri bilinen transkripsiyonel regülatör Snai2 bulunmayan farelerde 6., 24., 48. ve 72. saatte yara reepitelizasyonu incelenmiş, sadece yara oluşturulan kontrol grubunda hem sitokeratin-8 hem de sitokeratin-14 ekspresyonu gözlenmiştir **(83)**. Benzer olarak çalışmamızda sitokeratin-8 ekspresyonunun steroid ve hücre grubunda negatif diğer günlerde ve gruplarda pozitif gözlenmiştir. Vatansever ve ark. (2013) fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırdıkları keratinosit benzeri hücrelerin

yara iyileşmesine etkilerine baktıkları çalışmada 3., 5., ve 7. günde hem sitokeratin-8 hemde 14 *in vitro* olarak eksprese edildiğini rapor etmişlerdir **(81)**. Bulgularımız yara yerine transfer edilen keratinosit benzeri hücrelerin yara yerinde *in vivo* olarak sitokeratinleri eksprese ettiğini desteklemiş, hücre gruplarının hem tek başına hem de steroid varlığında uzun dönemde sitokeratin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir.

Derinin yaralanması üzerine, epidermal bariyer bozulur ve keratinositler önceden depolanmış IL-1'i serbest bırakır. IL-1 ve TNF- α çevredeki hücreleri bariyer hasarına karşı uyarıcı ilk sinyaldir **(1, 3)**. IL-1 ailesi, hepsi insan epidermisinde eksprese edilen ve deri immünopatolojisinde iyi kurulmuş rollere sahip olan büyük bir sitokin grubudur. IL-1 β , vücutta daha özel bir ifade profiline sahiptir, ancak deride bulunan çoğu hücre tipi bu sitokini eksprese edebilir: özellikle keratinositler, fibroblastlar ve miyeloid hücreler **(84)**. IL-1 α ve IL-1 β düzeyleri doku hasarından hemen sonra artar, ilk 12-24 saatte zirveye ulaşır, alarmin fonksiyonlarını vurgular ve yara iyileşmesinin proliferasyon aşaması tamamlandıktan sonra normale döner. TNF- α 'ya benzer şekilde, hem IL-1 α hem de IL-1 β , fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu indükleyerek, hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinin (kollajenler, elastinler, fibronektinler ve lamininler), fibroblast kemotaksisin üretimini ve bozulmasını ve immün modülatör fonksiyonları uygulayarak yara iyileşmesini kolaylaştırır **(84)**. Proinflamatuvar sitokinler, özellikle IL-1 ve IL-6 ve TNF- α , yara iyileşmesinin enflamatuvar fazı sırasında yukarı regüle edilir **(3)**. İnflamatuvar sitokinler için RT-PCR ve in-situ hibridizasyon teknikleri ile mRNA ekspresyonları gösterilebilmektedir. Bu yöntem ile IL-6'nın 6 saat, IL-1 α ve IL-1 β ile TNF- α 'nın 48-72 saat arasında artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Tüm sitokin ekspresyonlarında 240 saat sonra normale dönüş gözlemlendiği belirtilmiştir **(85)**. Hübner ve ark. (1996) dişi balb-c tipi fareler ile yaptığı bir çalışmada, yüksek IL-1 β mRNA seviyeleri yaralanmadan 7 saat sonra tespit edildi ve maksimum seviyeler yaralanmadan 15-24 saat sonra bulundu. IL-1 β 'ye benzer şekilde, yara iyileşmesinin erken fazında (yaralanmadan 15-72 saat sonra) en yüksek TNF- α ve IL-1 α mRNA seviyeleri görüldü. Yaralanmadan

sonraki 5. günde tüm proinflatuar sitokinlerin ekspresyon seviyeleri azaldı. Yara iyileşmesinin proliferatif fazının tamamlanmasından sonra (yaralanmadan 13 gün sonra), ekspresyon seviyeleri bazal seviyeye dönmüştür **(86)**.

Çalışmamızda yara iyileşme süreciyle benzer olarak sadece yara oluşturulan grupta 10. günde IL-1 β düzeyi hafif şiddette iken 21. günde gözlenmemiştir. Al-Otaibi ve ark (2022) yara modeli oluşturdukları sıçanlara 21 günlük melatonin uygulanmış kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre tedavisi sonunda IL-1 β seviyesinin kontrole göre azaldığını rapor etmişlerdir **(87)**. Ancak çalışmamızda literatürden bağımsız olarak sadece hücre uygulanan grupta 10. günde IL-1 β immünoreaktivitesi gözlenmezken hücre uygulamasının 21. günde orta şiddette gözlenmesi keratinosit benzeri hücrelerin keratinositlere benzer şekilde IL-1 β salgıladığını düşündürmüştür.

Hübner ve ark. (1996) aynı çalışmada farelere 1 hafta deksametazon enjeksiyonu yapıldığında 3. günde bakılan örneklerde IL-1 β , IL-1 α ve TNF- α seviyelerinin önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir **(86)**.

Çalışmamızda sadece steroid uygulanan grupta hem 10. günde hem de 21. günde IL-1 β varlığı steroidin yara iyileşmesini geciktirdiğini ve yaranın proliferasyon fazında olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte hem steroid hem hücre uygulandığında IL-1 β seviyesinin negatif olması keratinosit benzeri hücrelerin steroid varlığında yara iyileşmesini desteklediğini düşündürmektedir.

Normal yara iyileşmesinde TNF- α en yüksek düzeyleri yaralanmadan 12 ila 24 saat sonra görülür. Yara iyileşmesinin proliferatif fazının tamamlanmasından sonra, TNF- α bazal seviyelere geri döner. Yara onarımının erken evresinde, ağırlıklı olarak polimorfonükleer lökositlerde ve daha sonra makrofajlar tarafından ifade edilir. Ayrıca yara kenarındaki hiperproliferatif epitelde de eksprese edilir. TNF- α , fibroblastların ve keratinositlerin uyarılmasına katkıda bulunur, büyüme faktörlerinin ekspresyonuna ve antimikrobiyal savunmaların yukarı regülasyonuna katkıda bulunur **(88)**.

Grover ve ark. (2021) sıçanlarla yaptığı bir çalışmada yara iyileşmesini hızlandırdığı düşünülen STS jelinin TNF- α ekspresyonunun aşağı regülasyonuna yol açtığı gözlenmiştir **(89)**. Ma ve ark. (2021) mezenkimal kök hücrelerin (MSC) yara iyileşmesine etkisini göstermek amacıyla sıçanlarla yaptığı çalışmada tedaviden sonraki 5. gün ve 14. günde pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6 ve TNF- α) seviyesini azaltmıştır **(90)**.

Çalışmamızda tüm gruplarda benzer seviyelerde TNF- α izlenmesi yara iyileşmesinin erken döneminde artarak sonrasında bazal seviyede seyrettiğini, aynı zamanda yara yerine transfer edilen keratinositlerin TNF- α salınımını destekleyerek yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini düşündürmüştür.

Yara iyileşmesinde proliferatif dönemde yeni granülasyon dokusu oluşur. Burada angiogenez temel olaydır. VEGF ve bFGF güçlü angiogenetik faktörlerdir. Takayami ve ark. (2003) fare derisinde VEGF ve bFGF'ün zamanla ilişkili ekspresyonunu göstererek yara yaşı değerlendirmesinde bu belirteçlerin yararlı olduğunu vurgulamışlardır **(85, 91)**. Hayashi ve ark. (2004) VEGF'ün makrofaj ve fibroblastlardan eksprese edildiğini göstermiştir. Bu çalışmada morfometrik analizle VEGF'nin %50 üzerinde gösterilmesinin yara iyileşme sürecinde 7-21 güne karşılık geldiğini saptamışlardır **(85, 92)**.

VEGF-C yara iyileşmesi sırasında yukarı regüle edilir. Bu büyüme faktörü öncelikle makrofajlar tarafından salınır ve yara iyileşmesinin enflamatuar aşamasında önemlidir. İn vitro çalışmalar, bu büyüme faktörünün, vasküler geçirgenliği artıran VEGFR-2'ye bağlanarak hem doğrudan hem de dolaylı olarak yara bölgesine hematopoetik ve inflamatuar hücre alımını kolaylaştırmada rol oynadığını göstermektedir **(3)**.

Mansoub ve ark. (2018) diyabetik sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, mezenkimal kök hücrelerden keratinosit benzeri hücreler (KLC) elde ederek yara yerine transfer etmişlerdir. Farklı zaman noktalarında (3., 7., 10. ve 14. günler) elde edilen örneklerde VEGF- α ekspresyonunun tedavi almayan gruba göre daha fazla olduğunu, 3., 7. ve 10. günlerde giderek arttığını, 14. günde azalmaya başladığını göstermişlerdir **(93)**. Sun ve ark.

(2017) farelerde yaptığı başka bir çalışmada yara bölgesine yağ dokusu türevli, enjekte edilebilir ekstraselüler matriks / stromal vasküler fraksiyon jeli (ECM / SVF-jel) uygulanmıştır. 2., 4., ve 7. günlerde deri örneklerinde VEGF ekspresyonunun giderek arttığını, 10. ve 14. günlerde giderek azaldığını ve tüm zamanlarda tedavi almayan gruba göre fazla olduğunu göstermişlerdir **(94)**.

Çalışmamızda sadece yara modeli oluşturulan grupta VEGF'in 10. günde şiddetli iken 21. günde azalmış olması ve uzun dönem steroid uygulanan grupta steroidin yara iyileşmesini geciktirici etkisine bağlı olarak şiddetli izlenmesi klinik vakalarla benzerlik göstermiştir. Bunun yanında hücre uygulamasının hem yalnız başına hem steroid grubunda uygulanmasında 10. güne göre 21. günde VEGF'te gözlenen artışın hücre uygulamasının uzun dönemde yara iyileşmesini desteklediği, aynı zamanda steroidin negatif etkisini baskıladığını düşündürmüştür.

Makrofaj kemoatraktan protein (MCP-1 veya CCL2), CC ailesi bir kemokindir. MCP-1, yaralanma üzerine keratinositlerde indüklenir. Monositler/makrofajlar, T hücreleri ve mast hücreleri için bir kemoatraktandır **(3)**. CCL2, monositlerin ve makrofajların göçünü ve infiltrasyonunu düzenleyen anahtar kemokinlerden biridir **(95)**. İlk yaralanma olayından sonraki ilk haftada bulunan CC-kemokinler, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 ve CCL7'yi içerir, böylece yarada yüksek miktarda makrofaj bulunur. Proliferasyon fazının ilk birkaç gününde, hücresel proliferasyon ve yaradaki migrasyondaki hızlı artışı desteklemek için birçok neodamar mevcuttur. Kemokinler CCL2 ve CCL3 bu aşamada yaralarda yüksek oranda eksprese edilir **(96)**.

Kondo ve ark. (2002) yaptığı bir çalışmada farklı yara yaşlarında IL-8, MCP-1 ve MIP-1 α (Makrofaj İnflamasyon Proteini) gibi kemokinler immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Her bir kemokinin 0-12 saat içindeki pozitif oranları çok düşük gözlenmiş ve 1- 4 gün içindeki pozitif oranlarının önemli derecede olduğu tespit edilmiştir. Bu kemokinlerin oranlarına göre yara yaşının en az bir günlük olduğunun söylenebileceği ifade edilmiştir **(97,98)**.

Wetzler ve ark. (2000) diyabetin yara iyileşmesini geciktirdiğini göstermek amaçlı diyabetik olmayan dişi C57BLKS / *J-m* ve BALB / C fareleri ve diyabetik olan dişi C57BLKS / *J-m* + / + *Leprdb* fareleri ile yaptıkları çalışmada MCP-1 kontrol ve diyabetik farelerde ilk 24 saatte mRNA ve protein seviyesinde güçlü bir şekilde indüklenmiştir. Doku onarımı ilerledikçe, MCP-1 mRNA ve protein, 7. günden itibaren kontrol farelerinde yaranın sonrasını tespit edilememiştir. Ancak diyabetik farelerde 13. günde bile belirgin şekilde artmış olarak tespit edilmiştir **(99)**.

Çalışmamızda MCP-1'in yara grubunda 10. günde orta şiddette gözlenmesi ile 21. günde azalması yara iyileşme sürecinde sırasıyla proliferasyon evresinin ve matürasyon evresinin yaşandığını desteklemektedir. Sadece hücre uygulanan grupta yara grubuna göre daha zayıf şiddette gözlenmesi proliferasyon evresinin daha erken tamamladığını, buna ek olarak steroid gruplarında 10. günde MCP-1 immünoreaktivitesi gözlenmemesi ile birlikte 21. günde yara grubunun 10. gününe benzer gözlenmesi steroid uygulamasının yara iyileşmesini geciktirdiğini düşündürmüştür.

Proliferasiyondan sonra, keratinositlerin göçünün meydana geldiği yerde epitelizasyon başlar ve sonuçta granülasyon dokusunun oluşumu gerçekleşir. Granülasyon aşamasında, yara bölgesine fibroblast göçü ve yaraya proliferasyonu meydana gelir. Göçten sonra, hidroksiprolin, COL1A1 ve COL4A1 (kollajen tip 4 alfa 1 zinciri) gibi kollajenlerin ve fibronektin sentezi gerçekleşir. Doku granüositler, makrofajlar, kan kılcal damarları, kollajen ve fibroblastlar içerir. Yara iyileşmesinin son aşaması, yeni dokunun oluşumu ve bozulması arasında uygun bir dengenin kurulduğu doku yeniden şekillenmesidir. Bu aşamada, granülasyon işlemi durur ve yaranın olgunlaşması başlar. Kollajen proteinlerinin sentezi bu aşamada COL1A1 ve COL4A1 etkisi altında devam eder ve TGF- β 1 etkisi altında hidroksiprolin ve yara kasılması başlar **(100)**.

Betz ve ark. (1993) yaptığı çalışmalarda, kollajen 3'ün yaranı olmadan sonra iki-üç günde, kollajen 5 ve 6'nın lezyonlarda üç günden daha sonra ve

kollajen 1'in beş günden sonra ortaya çıktığı tespit edilmiştir **(97, 101)**. Manşub ve ark. (2018) diyabetik sıçanlarda yaptığı çalışmada keratinosit benzeri hücreler ile tedavi edilen grupta Col1a2 ekspresyonunun 3. ve 7. günlerde kademeli olarak arttığı 10. ve 14. günde bakılan örneklerde ise giderek azaldığı gözlenmiş olup 3. gün hariç diğer günlerde tedavi almayan gruba göre miktarının daha fazla olduğu görülmüştür. Tedavi almayan grupta ise Col1a2 seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir **(93)**.

Meephansan ve ark. (2017) dişi balb-c tipi farelerle yaptığı çalışmada, en güçlü antioksidanlardan biri olarak kabul edilen astaksantin ile tedavi edilen farelerde ve kontrol grubunda dinamik gen ekspresyon profilleri 1-15. günlerde karşılaştırıldığında astaksantin ile tedavi edilen grupta COL1A1 ekspresyonunun, iyileşme süresi boyunca kontrol grubundakinden daha yüksek olduğu, her iki grupta da kollajen 1 mRNA ekspresyonu belirgin şekilde artmış ve yaralanma sonrası 6. günde maksimuma ulaştığı sonrasında kademeli olarak azaldığı tespit edilmiştir **(102)**.

Çalışmamızda sadece yara oluşturulan grupta yara iyileşmesinin evrelerine uygun olarak 21. günde 10. güne göre COL1A1 azalmıştır. Bununla birlikte steroid grubunda her iki günde de benzer gözlenmesi diğer sonuçlarla birlikte steroidin yara iyileşmesinin ileri evresini de baskıladığını göstermiştir. Hem hücre uygulanan hem de steroid ile birlikte hücre uygulanan gruplarda 10. günde COL1A1'in zayıf gözlenmesi yara iyileşme sürecinin stabil olarak devam ettiğini hücre uygulamasının ilk 10 günde kollajen sentezini negatif yönde etkilediğini sonrasında desteklediğini düşündürmüştür.

Tüm bu bulgular birlikte ele alındığında steroid varlığında yara yerine keratinosit transplantasyonunun yara iyileşmesini pozitif yönde etkileyeceğine dair kanıtlar sunmaktadır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda fare embriyonik kök hücrelerinden elde edilen keratinositlerin uzun dönemli steroid tedavisindeki yara iyileşmesine etkileri araştırılmış, bu süreçte *in vitro* olarak elde edilen ve karakterizasyonu tamamlanan keratinositlerin yara bölgesine transferi sonrası yara iyileşmesini pozitif yönde etkiledikleri sonucuna varılmıştır.

Deney gruplarından elde edilen biyopsi örnekleri ile yara yerine transfer edilen keratinositlerin sitokeratin-8 ve 14'ü eksprese etmeleri ve özellikle uzun süreli steroid uygulanan hücre grubunda daha yüksek gözlenmesi ile keratinositlerin yara iyileşme sürecinde keratinizasyonu desteklediklerini düşündürmüştür. Bununla birlikte tüm gruplarda TNF- α seviyelerinin benzer olmasının yanında steroid varlığında hücre uygulanan gruplarda 10. ve 21. günde bazal seviyelerini koruması keratinositlerin yara iyileşmesini pozitif yönde etkilediğini desteklemiştir. Benzer şekilde steroid ve hücre grubunda IL-1 β immünoreaktivitesinin gözlenmemesi yara yerine uygulanan keratinositlerin steroid varlığında yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini ve steroid varlığında hücre uygulanan grupta 10. güne göre 21. günde VEGF seviyelerindeki artış ile keratinositlerin uzun dönemde steroidin negatif etkisini baskılayarak yara iyileşmesini desteklediğini göstermiştir. Buna karşın steroid ve hücre grubunda MCP-1 immünoreaktivitesi erken aşamada yokken 21. günde gözlenmesi keratinosit transferinin steroidin neden olduğu yara iyileşmesi gecikmesine katkı sağlamadığı ancak COL1A1 seviyelerinin steroid ile tedavi edilen gruba hücre uygulamasının 10. günde zayıf olması yara iyileşme sürecinin stabil olarak devam ettiğini, 21. günde şiddetli olması ise kollajen sentezinin uzun dönemde yara iyileşmesine katkı sağladığını öne çıkarmıştır.

Bulgularımız klinikte uzun dönem steroid kullananlar başta olmak üzere yara iyileşmesi geciken hastalarda *in vitro* olarak elde edilen ve karakterizasyonu tamamlanan keratinositlerin yara yerine transplantasyonu ile yara iyileşme sürecini destekleme yönünde kullanılabileceğine dair sınırlı kanıtları ile bir ön çalışma sunmaktadır. Çalışmamızın birçok farklı nedenle yara iyileşmesi geciken hastalarda uygulanmak üzere farklı metot ve kaynaklarla yapılan yeni çalışmalarla desteklenerek klinik pratikte kullanılmak üzere geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.



VII. ÖZET

Kronik hastalıklara bağılı uzun dönem steroid kullanımı yara iyileşmesini geciktirerek kronik yaralara neden olmaktadır. Deksametazon sıklıkla kullanılan glukokortikoidlerden biridir. Bu uzmanlık tezinin amacı farelerde uzun dönem steroid kullanımında, fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan keratinosit benzeri hücrelerin yara iyileşmesine etkilerinin histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmesidir.

64 adet balb-c tipi erkek fare sadece yara modeli oluşturulan (yara grubu); yara modeli oluşturulduktan sonra keratinosit uygulanan (hücre grubu); 1 hafta günde 2 mg/kg dexametazon uygulandıktan sonra yara yeri oluşturulan ve dexametazon uygulamasına devam edilen (steroid grubu) ve yara modeli oluşturulmadan önce 1 hafta günde 2 mg/kg dexametazon uygulanan, yara modeli oluşturulduktan sonra keratinosit uygulanan ve dexametazon uygulamasına devam edilen (steroid+hücre grubu) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Yara yerine uygulanacak olan keratinosit benzeri hücrelerin, fare embriyonik kök hücrelerinin fare fibroblastları ile kültüre edilmesi ile çoğaltıldı, BMP-4 uygulaması ile farklılaştırıldı, sitokeratin-8 ve sitokeratin-14 seviyelerinin hem immünohistokimyasal hem de akış sitometrisi ile doğrulanmasıyla karakterizasyonları tamamlandı. Keratinosit benzeri hücreler sadece hücre ve hücre+steroid grubuna bir kez uygulandı, dexametazon uygulamasına steroid ve hücre+steroid grubunda yara oluşturulduktan sonra 21 gün boyunca devam edildi. Yara oluşturulması sonrası 10. ve 21. günlerde alınan deri doku kesitleri öncelikle hematoksil-eozin boyaması ile değerlendirildi. Sonrasında sitokeratin-8, sitokeratin-14, MCP-1, TNF- α , VEGF, IL-1 β ve COL1A1'in dağılımları immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek yara iyileşme süreçleri izlendi ve grupların birbirleriyle karşılaştırılması yapıldı.

Sonuçlar uzun dönem steroid varlığında (21 gün) histokimyasal olarak yara iyileşmesinin hücre uygulaması ile pozitif yönde etkilendiğini, immünohistokimyasal olarak keratinosit benzeri hücrelerin yara yerinde sitokeratin ekspresyonuna devam ettiğini, 21 gün boyunca bazal düzeyde kalan TNF- α 'ya karşın negatif izlenen IL-1 β 'ya ek olarak MCP-1, VEGF ve COL1A1 seviyelerindeki artış birlikte yara yerine hücre uygulamasının keratinizasyonu destekleyerek yara iyileşmesine katkı sağlandığını gösterdi. Bu uzmanlık tezi klinik pratik için bir n bilgi sağlamıştır, halen farklı gere ve yöntemlerle yapılanalışmalara ihtiyaç vardır.



VIII. SUMMARY

THE EFFECT OF KERATINOCYTES DIFFERENTIATED FROM MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS ON WOUND HEALING IN A WOUND MODEL CREATED IN MICE UNDER LONG-TERM STEROID PRESSURE

Long-term steroid use due to chronic diseases causes chronic wounds by delaying wound healing. Dexamethasone is one of the commonly used glucocorticoids. The aim of this specialization thesis is to examine the effects of keratinocyte-like cells differentiated from mouse embryonic stem cells on wound healing by histochemical and immunohistochemical methods in long-term steroid use in mice.

64 balb-c type male mice were divided into 4 groups: only the wound model was created (wound group); after the wound model was created, keratinocyte was applied (cell group); after applying 2 mg/kg dexamethasone per day for 1 week, the wound model was created and dexamethasone application was continued (steroid group); 2 mg/kg dexamethasone was applied daily for 1 week before the wound model was created, keratinocyte was applied after the wound model was created and dexamethasone application was continued (steroid group+cell group). Keratinocyte-like cells to be applied to the wound site were amplified by culturing mouse embryonic stem cells with mouse fibroblasts, differentiated by BMP-4 application, and their characterization was completed by confirming cytokeratin-8 and cytokeratin-14 levels both by immunocytochemical and flow cytometry. Keratinocyte-like cells were applied only once to the cell and cell+steroid group, and dexamethasone application was continued for 21 days in the steroid and cell+steroid group after the wound was created. Skin tissue sections taken on the 10th and 21st days after wound formation were first evaluated by hematoxylin-eosin staining. Afterwards, the distributions of

cytokeratin-8, cytokeratin-14, MCP-1, TNF- α , VEGF, IL-1 β and COL1A1 were evaluated immunohistochemically, the wound healing processes were monitored and the groups were compared with each other.

The results showed that histochemically wound healing was positively affected by cell application in the presence of long-term steroids (21 days), immunohistochemically, keratinocyte-like cells continued to express cytokeratin at the wound site, TNF- α remained at basal level for 21 days, but negative IL-1 β was observed. In addition, the increase in MCP-1, VEGF and COL1A1 levels showed that cell application to the wound site contributed to wound healing by supporting keratinization. This specialization thesis provided a preliminary information for clinical practice, there is still a need for studies with different materials and methods.

IX. KAYNAKLAR

1. Roger M, Fullard N, Costello L, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat.* 2019;234(4):438-455.
2. Horch RE, Kopp J, Kneser U, et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med.* 2005;9(3):592-608.
3. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. Treasure Island (FL): StatPearls. 2021:1-11.
4. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014: 488-525.
5. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Ankara: Palme Yayıncılık, 2005: 417- 22.
6. Marcelo CL, Kim YG, Kaine JL, et al. Stratification, specialization, and proliferation of primary keratinocyte cultures. Evidence of a functioning in vitro epidermal cell system. *J Cell Biol.* 1978;79(2 Pt 1):356-370.
7. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975;6(3):331-343.
8. Sun TT, Green H. Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. *Cell.* 1976;9(4 Pt 1):511-521.
9. Bikle DD, Xie Z, Tu CL. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2012;7(4):461-472.
10. Tu CL, Crumrine DA, Man MQ, et al. Ablation of the calcium-sensing receptor in keratinocytes impairs epidermal differentiation and barrier function. *J Invest Dermatol.* 2012;132(10):2350-2359.

- 11.** Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K. Calcium-a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol*. 2014;24(6):650-661.
- 12.** Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17(12):1063-1072.
- 13.** Denkler KA, Denkler C. The Direction of Optimal Skin Incisions Derived from Striae Distensae. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136(1):120e-121e.
- 14.** Schlader ZJ, Vargas NT. Regulation of Body Temperature by Autonomic and Behavioral Thermoeffectors. *Exerc Sport Sci Rev*. 2019;47(2):116-126.
- 15.** Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, et al. Sabiston textbook of Surgery, The biological basis of modern surgical practice. In: Leong M, Murphy DK, Phillips GL, eds. Wound Healing, 20 th ed. Amsterdam: Elsevier, 2017: 130-162.
- 16.** Brunicardi FC, Anderson DK, Billiar TR, et al. Schwartz Cerrahinin İlkeleri. Barbul A, Efron TD, Kavalukas LS, ed;Yara İyileşmesi (içinde), 10. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2017.
- 17.** Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, et al. The healing of rat skin wounds. *Ann Surg*. 1965;161(2):293-308.
- 18.** Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.
- 19.** Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008;359(9):938-949.
- 20.** Redd MJ, Cooper L, Wood W, et al. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359(1445):777-784.
- 21.** Halasz NA. Dehiscence of laparotomy wounds. *Am J Surg*. 1968;116(2):210-214.
- 22.** Mendoza CB, Postlethwait RW, Clarkstown, et al. II. Incidence of Wound Disruption Following Operation. *Arch Surg*. 1970;101(3):396-398.

- 23.** Holt DR, Kirk SJ, Regan MC, et al. Effect of age on wound healing in healthy human beings. *Surgery*. 1992;112(2):293-298.
- 24.** Cruse PJ, Foord R. A five-year prospective study of 23,649 surgical wounds. *Arch Surg*. 1973;107(2):206-210.
- 25.** Ehrlich HP, Hunt TK. Effects of cortisone and vitamin A on wound healing. *Ann Surg*. 1968;167(3):324-328.
- 26.** Ferguson MK. The effect of antineoplastic agents on wound healing. *Surg Gynecol Obstet*. 1982;154(3):421-429.
- 27.** Birkmeyer NJ, Birkmeyer JD. Strategies for improving surgical quality--should payers reward excellence or effort?. *N Engl J Med*. 2006;354(8):864-870.
- 28.** Jonsson K, Jensen JA, Goodson WH 3rd, et al. Tissue oxygenation, anemia, and perfusion in relation to wound healing in surgical patients. *Ann Surg*. 1991;214(5):605-613.
- 29.** Greif R, Akça O, Horn EP, et al; Outcomes Research Group. Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical-wound infection. *N Engl J Med*. 2000;342(3):161-167.
- 30.** Saraçoğlu ÖF. Temel Klinik Bilimler. Onat DA, ed; Yara İyileşmesi (içinde). Ankara: Güneş Kitabevi, 1989;635:636.
- 31.** Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(7):445-464
- 32.** Brazil JC, Quiros M, Nusrat A, et al. Innate immune cell-epithelial crosstalk during wound repair. *J Clin Invest*. 2019;129(8):2983-2993.
- 33.** Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8790.
- 34.** Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature*. 2018;553(7689):427-436.
- 35.** Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*. 2007;127(2):331-341.

- 36.** Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, et al. Cytokineocytes: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*. 2020;5(20):e142067.
- 37.** Miller LS, Modlin RL. Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol*. 2007;29(1):15-26.
- 38.** Kato T, Khanh VC, Sato K, et al. Corrigendum to "SDF-1 improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells" [Biochem. Biophys. Res. Commun. 493/2 (2017) 1010-1017]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(1):464-465.
- 39.** Slominski AT, Zmijewski MA. Glucocorticoids Inhibit Wound Healing: Novel Mechanism of Action. *J Invest Dermatol*. 2017;137(5):1012-1014.
- 40.** Aral Y. Adrenal korteks hastalıklarına giriş. İlicin G, Biberoglu K, Suleymanlar G, ve ark, ed; İç Hastalıkları (içinde), 3. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2012: 2028-50.
- 41.** Ahmet Çayakar. Klinik pratikte steroid kullanımı. *Ulus Romatol Derg*. 2021;13(2):73-84
- 42.** Williams DM. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. *Respir Care*. 2018;63(6):655-670.
- 43.** Adcock IM, Mumby S. Glucocorticoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;237:171-196.
- 44.** Ronchetti S, Ricci E, Migliorati G, et al. How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):4090.
- 45.** Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, et al. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*. 2004;50(11):3408-3417.
- 46.** Jozic I, Vukelic S, Stojadinovic O, et al. Stress Signals, Mediated by Membranous Glucocorticoid Receptor, Activate PLC/PKC/GSK-3 β / β -catenin Pathway to Inhibit Wound Closure. *J Invest Dermatol*. 2017;137(5):1144-1154.
- 47.** Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, et al. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2012;212:v-115.

- 48.** Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(7):374-381.
- 49.** Aberg KM, Radek KA, Choi EH, et al. Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3339-3349.
- 50.** Slominski A. A nervous breakdown in the skin: stress and the epidermal barrier. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3166-3169.
- 51.** Wierzbicka JM, Żmijewski MA, Antoniewicz J, et al. Differentiation of Keratinocytes Modulates Skin HPA Analog. *J Cell Physiol.* 2017;232(1):154-166.
- 52.** Maubec E, Laouénan C, Deschamps L, et al. Topical Mineralocorticoid Receptor Blockade Limits Glucocorticoid-Induced Epidermal Atrophy in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2015;135(7):1781-1789.
- 53.** Slominski AT, Zmijewski MA. Glucocorticoids Inhibit Wound Healing: Novel Mechanism of Action. *J Invest Dermatol.* 2017;137(5):1012-1014.
- 54.** Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, et al. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68.
- 55.** Sukoyan MA, Vatolin SY, Golubitsa AN, et al. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev.* 1993;36(2):148-158.
- 56.** Larijani B, Esfahani EN, Amini P, et al. Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Med Iran.* 2012;50(2):79-96.
- 57.** Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 1):5-10.
- 58.** Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005;19(10):1129-1155.
- 59.** Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* 1985;87:27-45.

60. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 2000;6(2):88-95.
61. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2005;100(1):12-27.
62. Friel R, van der Sar S, Mee PJ. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(13):1894-1903.
63. Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res*. 2003;58(2):324-335.
64. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):465-473.
65. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif*. 2004;37(1):23-34.
66. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):93-98.
67. Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, et al. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*. 2021;11(5):700.
68. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
69. Sanchis A, Alba L, Latorre V, et al. Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing. *PLoS One*. 2012;7(1):e29701.
70. Langendorf EK, Rommens PM, Drees P, et al. Dexamethasone Inhibits the Pro-Angiogenic Potential of Primary Human Myoblasts. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):7986.
71. Nourian Dehkordi A, Mirahmadi Babaheydari F, Chehelgerdi M, et al. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):111.

- 72.** Guenou H, Nissan X, Larcher F, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet*. 2009;374(9703):1745-1753.
- 73.** Heng BC, Cao T, Liu H, Phan TT. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. *Exp Dermatol*. 2005;14(1):1-16.
- 74.** Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, et al. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr Biol*. 2003;13(10):849-853.
- 75.** Aberdam D, Gambaro K, Medawar A, et al. Embryonic stem cells as a cellular model for neuroectodermal commitment and skin formation. *C R Biol*. 2007;330(6-7):479-484.
- 76.** Aberdam D. Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*. 2004;48(2-3):203-206.
- 77.** Huang SW, Tzeng SC, Chen JK, et al. A Dynamic Hanging-Drop System for Mesenchymal Stem Cell Culture. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4298.
- 78.** Haase I, Knaup R, Wartenberg M, et al. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells into keratinocyte-like cells. *Eur J Cell Biol*. 2007;86(11-12):801-805.
- 79.** Huang HJ, Gao QS, Tao BF, et al. Long-term culture of keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2008;44(7):193-203.
- 80.** Troy TC, Turksen K. Commitment of embryonic stem cells to an epidermal cell fate and differentiation in vitro. *Dev Dyn*. 2005;232(2):293-300.
- 81.** Vatansever HS, Uluer ET, Aydede H, et al. Analysis of transferred keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells on experimental surgical skin wounds of mouse. *Acta Histochem*. 2013;115(1):32-41.
- 82.** Laukka M, Hoppela E, Salo J, et al. Preperitoneal Fat Grafting Inhibits the Formation of Intra-abdominal Adhesions in Mice. *J Gastrointest Surg*. 2020;24(12):2838-2848.
- 83.** Hudson LG, Newkirk KM, Chandler HL, et al. Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *J Dermatol Sci*. 2009;56(1):19-26.

- 84.** Macleod T, Berekmeri A, Bridgewood C, et al. The Immunological Impact of IL-1 Family Cytokines on the Epidermal Barrier. *Front Immunol.* 2021;12:808012.
- 85.** PAKİŞ I. Yara Yaşı ve Canlılık Değerlendirmesinde Güncel Yaklaşım. *Adli Tıp Bülteni.* 2016; 21(3): 183 - 188.
- 86.** Hübner G, Brauchle M, Smola H, et al. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine.* 1996; 8(7):548-556
- 87.** Al-Otaibi AM, Al-Gebaly AS, Almeer R, Albasher G, Al-Qahtani WS, Abdel Moneim AE. Melatonin pre-treated bone marrow derived-mesenchymal stem cells prompt wound healing in rat models. *Biomed Pharmacother.* 2022;145:112473.
- 88.** Xu F, Zhang C, Graves DT. Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. *Biomed Res Int.* 2013;2013:754802.
- 89.** Grover P, Khanna K, Bhatnagar A, et al. In vivo-wound healing studies of sodium thiosulfate gel in rats. *Biomed Pharmacother.* 2021;140:111797.
- 90.** Bunnell BA. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2021;10(12):3433.
- 91.** Takamiya M, Saigusa K, Nakayashiki N, et al. Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination. *Int J Legal Med.* 2003;117:46–50.
- 92.** Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Forensic application of VEGF expression to skin wound age determination. *Int J Legal Med.* 2004;118:320–5.
- 93.** Hosseini Mansoub N, Gürdal M, Karadadaş E, et al. The role of PRP and adipose tissue-derived keratinocytes on burn wound healing in diabetic rats. *Bioimpacts.* 2018;8(1):5-12.
- 94.** Sun M, He Y, Zhou T, et al. Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel Secretes Angiogenic Factors and Enhances Skin Wound Healing in a Murine Model. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3105780.
- 95.** Lee BC, Song J, Lee A, et al. Erythroid differentiation regulator 1 promotes wound healing by inducing the production of C-C motif chemokine

ligand 2 via the activation of MAP kinases in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*. 2020;46(6):2185-2193.

- 96.** Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The Role of Chemokines in Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):3217.
- 97.** Açıkgoz HN, Kılınçarslan LE, Açıkgoz A, ve ark. Yara Yaşı Tahmininde RNA'nın Kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Foren Med*. 2012;9(1):37-41.
- 98.** Kondo T, Ohshima T, Mori R, et al. Immunohistochemical detection of chemokines in human skin wounds and its application to wound age determination. *Int J Legal Med*. 2002;116(2):87-91.
- 99.** Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, et al. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol*. 2000;115(2):245-253.
- 100.** Md S, Abdullah S, Alhakamy NA, et al. Development and Evaluation of *Ginkgo biloba*/Sodium Alginate Nanocomplex Gel as a Long-Acting Formulation for Wound Healing. *Gels*. 2022;8(3):189.
- 101.** Betz P, Nerlich A, Wilske J, et al. Analysis of the immunohistochemical localization of collagen type III and V for the time-estimation of human skin wounds. *Int J Legal Med* 1993;105(6):329-32.
- 102.** Meephansan J, Rungjang A, Yingmema W, et al. Effect of astaxanthin on cutaneous wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;10:259-265.