

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDEN
FARKLILAŞTIRILAN KERATİNOSİTLERİN TEK DOZ STEROİD
UYGULANAN FARELERDE YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Araştırma Görevlisi: Dr.Erdem OBUZ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Hasan Aydede

Manisa, 2016

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, asistanlığım süresince her zaman desteğini hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Yavuz Kaya'ya, eğitime 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 ve Doç. Dr. Elgin Türköz Uluer'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. Erdem OBUZ

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
KISALTMALAR	
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kök Hücre	2
2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri Ve Kaynakları	3
2.1.1.1. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	4
2.1.1.1.1. Erişkin Kök Hücreleri	4
2.1.1.1.2. Fötal Kök Hücreler	4
2.1.1.1.3. Partenogenezis	5
2.1.1.1.4. Kadavradan Elde Edilen Kök Hücreler	5
2.1.1.2. Embriyonik Kök Hücreler	5
2.1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Farklılaşma Potansiyeli	6
2.2. Deri ve Deri Ekleri	9
2.2.1. Epidermis	9
2.2.1.1. Keratinosit	12
2.2.1.2. Melanositler	13
2.2.1.3. Langerhans hücreleri	14
2.2.1.4. Merkel hücreleri	14
2.2.2. Dermis	14
2.2.3. Derinin Damarlanması	15
2.2.4. Hipodermis	16
2.3. Steroidler	16
2.3.1. Glukokortikosteroidlerin Fizyolojik ve Farmakolojik Etkileri	17
2.3.1.1. Glukoz Metabolizması	17
2.3.1.2. Protein Metabolizması	18
2.3.1.3. Yağ Metabolizması	18
2.3.1.4. Antiinflamatuvar Etki	19
2.3.1.5. İmmunsupresif Etki	20
2.3.1.6. Hematopoietik Sistem Üzerine Etki	21

2.3.1.7. Santral Sinir Sistemi (SSS) Üzerine Etki	22
2.3.1.8. Kardiovasküler Sistem Üzerine Etki	22
2.3.1.9. Kemikler ve Kalsiyum Metabolizmasına Etki	22
2.3.1.10. Çizgili Kaslar Üzerine Etki	23
2.3.1.11 Büyümenin İnhibisyonu	23
2.3.2. Glukokortikosteroid İlaç Türleri ve Kullanım Şekilleri	23
2.3.2.1. Doğal Glukokortikosteroidler	23
2.3.2.2. Sentetik Glukokortikosteroidler	24
2.3.3. Glukokortikosteroidlerin Klinik Farmakolojisi	25
2.3.3.1. Glukokortikosteroidlerin Adrenal Fonksiyon	25
Bozukluklarında Kullanımı	
2.3.3.2. Glukokortikosteroidlerin Endokrin Nitelikte Olmayan	26
Hastalıklarda Kullanımı	
2.3.4. Glukokortikosteroidlerin Kullanımının Kontrendikasyonları	28
2.4. Yara İyileşmesi	28
2.4.1. Primer Yara İyileşmesi	29
2.4.2. Sekonder Yara İyileşmesi	30
2.4.3. Sekonder Yara İyileşmesinin Primer Yara İyileşmesinden	30
Farkları	
2.4.4. Yara İyileşmesinin Evreleri ve Genel İlkeleri	31
2.4.4.1. Hemostaz ve İnflamasyon	32
2.4.4.2. Proliferasyon	35
2.4.4.3. Maturasyon ve Yeniden Yapılanma	36
2.4.5. Yara Kontraksiyonu	37
2.4.6. Yara İyileşmesini Etkileyen Lokal ve Sistemik Faktörler	38
2.4.6.1. Lokal Faktörler	38
2.4.6.2. Sistemik Faktörler	39
III. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması ve Kültürü	41
3.1.1. Jelatinle Kaplı Kültür Kaplarının Hazırlanması	41
3.1.2. STO Hücrelerinin Kültürü	41
3.1.3. STO hücrelerinin Mitomisin-C ile Muamele Edilmesi	42

3.2. Embriyonik Kök Hücre Kültürü	43
3.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Pasajlanması	43
3.2.2. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması	44
3.3. Embriyoblastlardan Keratinosit Kültürü	45
3.3.1. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması	45
3.3.2. Keratinositlerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile Tanımlanması	46
3.3.3. Keratinositlerin Vaseline Gauze Üzerinde Kültüre Edilmesi	47
3.4. Keratinositlerin Yara Yerine Transferi	48
3.5. Işık Mikroskopik İnceleme	50
3.5.1. Parafin Doku Takibi	51
3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması	52
3.5.3. İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi	54
 IV. BULGULAR	 58
4.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü	58
4.2. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması	60
4.3. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması	61
4.4. Keratinositlerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile Tanımlanması	62
4.5. Yara Yerine Transfer Edilen Keratinositlerin Işık Mikroskopik İncelenmesi	64
4.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Değerlendirmesi	64
4.5.2. İndirekt İmmunohistokimya Uygulamasının Değerlendirilmesi	65
4.5.2.1. MMP2 Dağılımı	66
4.5.2.2. MMP9 Dağılımı	67
4.5.2.3. IL1 β Dağılımı	68
4.5.2.4. TNF α Dağılımı	69
4.5.2.5. MCP1 Dağılımı	70
4.5.2.6. HIF1 α Dağılımı	71

4.5.2.7. FGF2 Dağılımı	72
4.5.2.8. EGF Dağılımı	73
4.5.2.9. COL1A Dağılımı	74
4.5.2.10. IL10 Dağılımı	75
V. TARTIŞMA	76
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER	89
VII. ÖZET	90
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	91
IX. KAYNAKLAR	92

KISALTMALAR

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP-4: Kemik Morfogenetik Proteini 4
CTAP3: Kemokin Bağ Doku Aktive Edici Peptid 3
DAB: Diaminobenzidine
DMEM: Dulbecco' s modified Eagle' s medium
EDTA: Etilendiamintetraasidik asit
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
EKH: Embriyonik Kök Hücre
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
GRO: Büyüme ile ilişkili onkogen
H-E: Hematoksilen-Eozin
HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü
IFN- δ : İnterferon Gama
IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL: İnterlökin
IP-10: İnterferon İndüklenebilir Protein-10
KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü
LDGF: Lökosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
LIF: Lökemia İnhibitor Faktör
MCP1: Monosit-Makrofaj Kemoatraktan Protein 1
MHC: Major Histokompatibilite Kompleks
NAP-2: Nötrofil Aktive Edici Peptid-2
NEAA: Non-essential amino asid
PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu
PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PNL: Polimorf Nüveli Lökosit
SF: Serum Fizyolojik
SSEA: Evreye Spesifik Embriyonik Antijen
STO: Fare SIM embriyo fibroblast

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TGF: Dönüştürücü Büyüme Faktörü

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Ig: İmmünglobulin

RM: Rotary mikrokrom

MMP: Matriks metalloproteinaz

HIF: Hipoksi ile induklenen faktör

ACTH: Adrenokortikotropik hormon

cAMP: Siklik adenosin mono fosfat

DHEA: Dehidroepiandrostenoidon

CRH: Kortikotropin salıcı hormon

MR: Mineralokortikoid reseptörü

GR: Glukokortikoid reseptörü

CBG: Kortikosteroid bağlayıcı globulin

PTH: Parathormon

I. GİRİŞ

Vücutun en büyük organı olan deri vücut kütlesinin % 12-20'sini oluşturur (1). Derinin oluşturduğu bariyerin yanık, travma veya herhangi bir dermatolojik hastalığa bağlı akut veya kronik kaybı organizmanın bütünlüğü için basit doku onarım işlemini gerektirir (2).

Steroidler; antiinflamatuvar, immünsupresan ve antiallerjik etkileri nedeniyle en yaygın kullanılan ilaçlar arasındadır. Steroid kullanımı; inflamatuvar cevabı bozarak, kollajen lizisini arttırarak, enfeksiyona normal direnci inhibe ederek ve epitelizasyonu bozarak yara iyileşmesini olumsuz etkiler.

Fare embriyonik kök hücreleri pluripotent kök hücreler olup blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir. Uygun kültür ortamı sağlandığında bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin farklılaşması da sağlanabilir.

Günümüzde sistemik kronik ilaç kullanımının giderek artmasına bağlı kronik sistemik ve lokal faktörlerin etkisi nedeniyle yara iyileşmesinde bozulma, yara yeri enfeksiyonu sıklığında artma, kapanmayan kronik yaralar oluşmaktadır. Bu durum hastanın hastanede kalış süresini arttırmakta, hastanın morbidite ve mortalitesinde artışı ile birlikte maliyetlerin artmasına da yol açmaktadır. Yara iyileşme sürecinin desteklenmesi ve problemsiz yara iyileşmesinin sağlanması yukarıda sıralanan negatif sonuçların engellenmesini sağlayacaktır.

Bu çalışmada, keratinositlere farklılaştırılan fare embriyonik kök hücrelerinin, steroid baskısı altındaki farede oluşturulan cerrahi yara modeline transfer edilerek yara iyileşmesi ve moleküler düzeydeki farklılıklarının araştırılması planlandı.

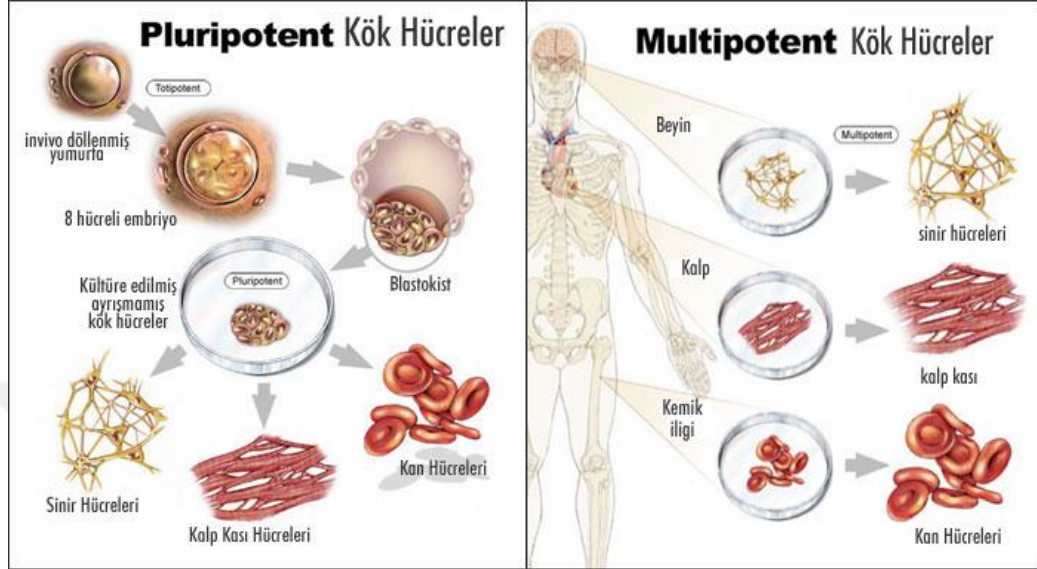
II. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler, bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, farklılaşabilen (potens), hasar gören bir dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen, in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile hücrelerin farklılaşmalarını sağlayabilen hücrelerdir (3, 4, 5). Kök hücreler vücudumuzda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücreler olup henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir (6). Bu özellikleri bakımından kök hücreler hastalıkların tedavisinde veya doku tamirinde kullanılabileceğinden yola çıkılarak birçok alanda deneysel modellerde ve klinik olgularda kullanılmaya başlanmıştır (7). Ancak, organ veya doku nakli gerektiren hastaların çokluğu, uygun organ ve dokunun her zaman bulunamaması, immünorejeksiyon gibi sorunlarla karşılaşmaktadır (8). Bilim ve teknolojiye son gelişmeler doğrultusunda kök hücrelerin bu alanda kullanılması gündeme gelmiştir.

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, multipotent ve pluripotent olarak sınıflandırılırlar (Resim 2.1) (5). Totipotent hücreler, sınırsız farklılaşma ve farklı dokulara yönlenebilmelerinden dolayı vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip embriyonik hücrelerdir (3, 8). Totipotent hücrelere 4 hücreden 8 hücreye kadar ki tüm blastomerler örnek olarak verilebilir (3). Totipotent hücreler gelişmenin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilirler. Pluripotent hücreler, totipotent hücreler gibi vücudun bütün hücrelerine dönüşmezler, fakat vücudun birçok hücresine dönüşebilecek yetenektedirler. Pluripotent hücreler embriyonun blastokist evresinden itibaren ve fötusta bulunabilen hücrelerdir. Multipotent hücreler

gelişmenin daha ileri evresine ait hücrelerdir ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler. Multipotent hücreler kemik iliği stromal ve mezenkimal kök hücreler gibi yetişkin kök hücrelerdir (7, 8).



Resim 2.1: Kök hücre tipleri ve farklılaşabildikleri hücreler(39)

2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri Ve Kaynakları

Kök hücreler iki farklı kaynaktan elde edilebilirler;

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

Embriyonik Kök Hücreler (EKH): Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir (3,5 günlük embriyo). Pluripotenttirler. Embriyonik gelişim sürecinde dokuların temel kaynağıdır. Geliştikleri 200' den fazla farklı hücre tipi tanımlanmıştır.

2.1.1.1. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

- Erişkin kök hücreleri
- Fötüs kök hücreleri
- Kadavradan elde edilen kök hücreler
- Partenot hücreleri (partenogenezis)
- Göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri

2.1.1.1.1. Erişkin Kök Hücreleri

Erişkin kök hücreleri, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücreler olup, kendini yenileyip köken aldığı organın spesifik hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir. Erişkin bir kök hücrenin bir dokudan diğerine dönüşme özelliğine plastisite denir (5). Uygun çevresel şartlar sağlandığında erişkin kök hücreleri genetik olarak yeniden programlanarak diğer dokuların karakteristik özelliğini kazanabilirler.

Erişkin kök hücreleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

- I – Hematopoietik Kök Hücreler
- II – Stromal (Mezenkimal) Kök Hücreler
- III – Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri

2.1.1.1.2. Fötal Kök Hücreler

Kök hücreler, sonlandırılmış gebeliklerin sonuç olan fötuslardan elde edilir (3). Bu tip kök hücreler nöral kök hücrelere, hematopoietik kök hücrelerine ve pankreas adacık öncül hücrelerine farklılaşabilirler (9) .

2.1.1.1.3. Partenogenezis

İnsan olmayan primatlarda yumurta hücresinin hiç döllenenmeden bölünmesi sağlanmıştır. Partenot denilen ve sonuçta elde edilen hücreler atalarının kopyasıdır. Primat partenotlarının embriyonik kök hücrelerden daha kolay bir şekilde geliştikleri belirtilmiştir. Yaklaşık olarak 50-200 hücreden oluşmuş bir doku elde edilebilmiştir (3).

2.1.1.1.4. Kadavradan Elde Edilen Kök Hücreler

Kadavradan elde edilen kök hücreler; fibroblast, kemik iliği kök hücreleri, korneal epitelyal kök hücreler, nöral kök hücrelerdir. Yine hücrenin özelliğine göre kültüre edilerek farklı hücreler elde edilebilir (3).

2.1.1.2. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler vücuttaki her hücre ve doku tipine farklılaşabilme kapasitesine sahiptirler. Farklılaşma kapasiteleri ile de doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında büyük bir potansiyele sahiptirler (10). Fare embriyonik kök hücreleri blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (5, 10, 11, 12, 13, 14). Uygun kültür ortamı sağlandığında bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin farklılaşması da sağlanabilir (Resim 2.2). (5, 10, 14, 15).

Embriyonik kök hücrelerin çeşitli hücrelere farklılaşabilme özelliklerinden yararlanılarak doku hasarında daha hızlı iyileşmenin sağlanması veya sinir hücresi gibi rejenerasyonu mümkün olmayan hücrelere

farklılaştırılarak yara onarımlarında kullanılması önemli araştırma konularındandır.

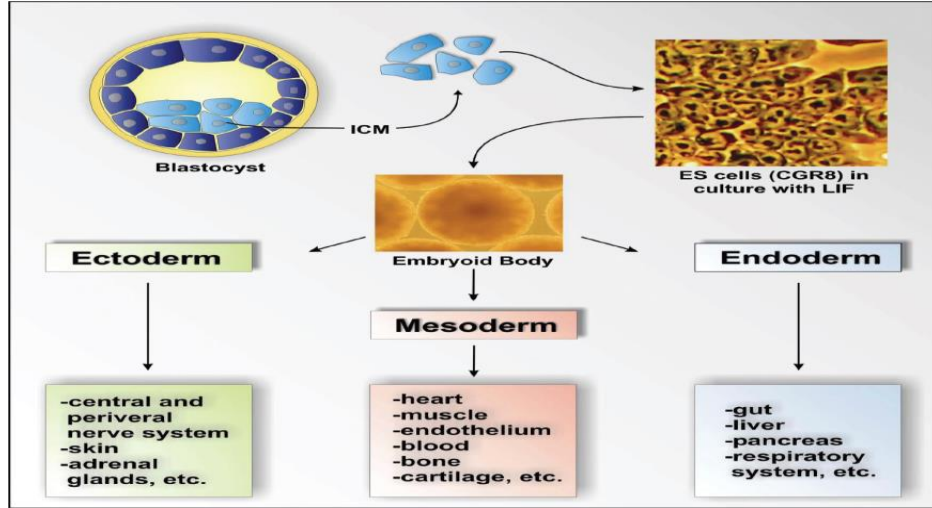
Embriyonun ilk hücresele farklılaşması morulayı oluşturan hücrelerin blastokist hücrelerine farklılaşmasıdır. Morulanın dış tarafında bulunan hücreler sıvı transportunu sağlayan ve blastoselin oluşmasında rol oynayan trofoblast epitel hücrelerine farklılanır. İçte bulunan morula hücreleri ise blastokistin iç hücre kitlesini oluşturur. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent kök hücreler olup embriyoyu oluşturacak olan tüm dokuların esas kaynağıdır (Resim 2.2). İç hücre kitlesini oluşturan hücreler onların esas kaynağı olan totipotent morula hücreleri gibi artık totipotent değildirler (10).

Post-natal dönemdeki deneklere, fare veya insan embriyonik kök hücreleri transplante edildiğinde deri, saç ve kas gibi farklı tipteki dokuları içeren tümörler (teratom) oluşturabildikleri gözlenmiştir. Bu tümörlerde üç germ tabakasının hücrelerinin varlığı onların pluripotent olduklarını kanıtlar (5).

2.1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Farklılaşma Potansiyeli

Farklı kök hücre tiplerine göre kültür şartları değişmektedir. Genel olarak kök hücrelerin kültüre edilmelerinin amaçları:

- 1- Kendini yenileyebilme özelliklerini desteklemek,
 - 2- Farklılaşma yeteneklerini sürdürmek,
 - 3- Elde edilmiş serileri sürdürmek için kriyopreservasyonu güçlendirmektir
- (5).



Resim 2.2: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve pluripotensisi (33).

Kendini yenileme yeteneği ile ilgili belirteçlerin tanımlanması, bunu sürdürmek için ilk önemli sorunu oluşturmaktadır (5). Fare ve insan embriyonik kök hücreleri; besleyici tabaka olarak, farklılaşmaları ve çoğalmaları durdurulmuş fare embriyonik fibroblastları kullanılarak elde edilmiş serum içeren kültür vasatı içinde kültüre edilirler (5). Fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin pasajlanması birbirinden farklıdır. Fare embriyonik kök hücreleri 2- 3 günde bir subkültüre edilir. Tek hücre elde etmek için koloniler tripsinle enzimatik olarak ayrıştırıldıktan sonra fare embriyonik fibroblastlarının bulunduğu ortama alınır. İnsan embriyonik kök hücreleri ise 6- 7 günde bir subkültüre edilir ve küçük hücre grupları şeklinde pasajlanır. İnsan embriyonik kök hücreleri tek tek hücrelerden ziyade koloniler şeklinde çoğalma yeteneğine sahiptir ve genellikle mekanik (manual) ayrıştırma tercih edilir (5).

Fare embriyonik kök hücrelerinin morfolojileri tipiktir ve kolaylıkla alttaki fibroblast tabakasındaki hücrelerden ayırt edilebilir. Hücrelerdeki çekirdeğin sitoplazmaya oranı daha fazladır ve çekirdekçik belirgindir (16). Transkripsiyon faktörleri; oct-4, nanog ve rex-1 ve hücre yüzey belirteçleri SSEA-1 farede, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81 insanlarda bulunur (16, 17).

Kendini yenilemeyi destekleme ve farklılaşmayı önleme yeteneğine sahip olan faktör; altta bulunan besleyici hücreler tarafından oluşturulur . Bu faktör, lösemi inhibe edici faktör (LIF) olarak tanımlanmıştır (14, 16, 17). LIF, IL-6 sitokin ailesinin bir üyesidir. LIF sayesinde embriyonik kök hücrelerin besleyici hücreler olmaksızın da jelatinli doku kültür kaplarında serumlu ortamda üremeleri sağlanmıştır. Bununla beraber embriyonik kök hücreler kültürde LIF' e bağlı olarak ürerken, LIF veya LIF reseptörü eksik olan embriyoların da gerekli normal gelişmeyi gösterdikleri saptanmıştır (16). LIF' in fare embriyonundaki fizyolojik rolünün; embriyonik gelişimin yavaşlaması sırasında iç hücre kitlesinin yaşayabilirliğini sürdürmek olduğu düşünülmektedir (16).

Fare modelinde, embriyonik kök hücreler spontan olarak üç boyutlu agregatlar oluştururlar ve LIF' in kültür ortamından uzaklaştırılması ile farklılaşırlar (5, 10). Bu üç boyutlu agregatlara embriyoblast denir. Fare embriyonik kök hücrelerinden embriyoblast oluşumu kolonilerin tek hücre haline getirilmesi ve hücrelerin kümeler oluşturmalarını sağlayacak ortama konması ile elde edilir. Bununla beraber aynı büyüklükte embriyoblastlar elde edilebilen ve hücre sayısının kontrollü olarak yapılabildiği damla (hanging drop) metodu en sık kullanılan yöntemlerdendir (5, 10). İnsan embriyonik kök hücreleri için embriyoblast oluşumu, daha çok tercih edilen mekanik yolla elde edilen kolonilerin uygun ortama konması ile sağlanmaktadır (5). Enzimatik (kollajenaz) veya kimyasal ayırma (EDTA) yolları ise hücrelere zarar verebileceği düşünüldüğünden çok tercih edilmez. Kök hücreler kullanılarak yapılan hücre replasman tedavisi uygulamalarının birçoğu diabet için β hücreleri veya Parkinson için dopaminerjik nöronlar gibi spesifik hücre tiplerinin üretimini gerektirir (5). Tek hücre tabakası veya embriyoblast şeklinde spontan farklılaşma kontrolsüz olarak farklı tiplerdeki hücrelerin karışık popülasyonuna yol açar. Embriyonik kök hücrelerin spesifik bir yöne farklılaşmasını sağlamak için farklılaşmayı, proliferasyonu veya spesifik hücre tiplerinin hayatta kalımını indükleyecek büyüme faktörlerinin gereksinimine ihtiyaç vardır (5, 10, 14, 17). Büyüme faktörlerinin kullanımı,

istenilen hücre popülasyonunu sağlamayı güçlendirse de farklılaşmış hücrelerin karışık popülasyonu hala bulunmaktadır (5).

2.2. Deri ve Deri Ekleri

Deri toplam vücut ağırlığının %15-20'sini kaplayan en geniş organdır. Kalınlığı 1-5 mm olan, üstte epidermis, altta dermis tabakalarından oluşan derinin hemen altında ise hipodermis denen yağ dokusu bulunur (1).

- a) Epidermis, çok katlı yassı epitel tabakasıdır. Boynuzsu çok katlı yassı epitelin vücutta bulunduğu tek yerdir.
- b) Dermis, mezenşimden gelişmiş sıkı, düzensiz bağ dokusundan oluşan daha derin bir tabakadır.

2.2.1. Epidermis

Epidermis, bazal lamina üzerine oturan tek sıra epitel hücrelerinin bölünerek çoğalmasıyla ortaya çıkan keratinosit tabakalarından oluşur. Bu hücreler bazal tabakadaki hücrelerin zaman içinde yukarıya doğru farklılaşarak itilmesiyle birbirinden farklı özelliklerde tabakalar yaparlar (Resim 2.3). Keratinositler epidermisteki tüm hücrelerin %95'ini oluşturur. Bu tabakada dört ayrı hücre tipi bulunur:

- 1) Esas hücre tipi keratinositlerdir. Bu hücreler, başlıca ürünleri olan ara filaman proteini keratin nedeniyle bu ismi almışlardır.
- 2) Melanositler, melanin üretiminden sorumlu nöral krista kökenli hücrelerdir (Resim 2.3).

- 3) Langerhans hücreleri, kemik iliği kökenli dendritik hücrelerdir. T lenfositlere antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar (Resim 2.3).
- 4) Merkel hücreleri, dokunma duyusunda rol alan nöral krista kökenli hücrelerdir (Resim 2.3).

Epidermisin katmanlar:

Derinin gelişmesinde dışı bakan ektoderm ve bunun altındaki mezoderm işbirliği içindedir. Gastrülasyondan sonra tek sıralı hücre tabakası olan ektoderm, aldığı sinyaller doğrultusunda sinir sistemine veya epitel dokusuna dönüşür (1).

Bazal tabaka bazal lamina üzerine dizilmiş tek sıralı kübik, alçak prizmatik hücrelerden oluşur. Desmozom adı verilen hücre-hücre bağlantı birimleriyle birbirlerine ve hemidesmozomlarla bazal laminaya tutunurlar. Bu tabakaya stratum germinativum da denir. Bazal tabakadaki hücreler epidermisteki keratinositlerin kökenidir, yani keratinosit kök hücresi olarak değerlendirilir.

Dikensi tabaka(Stratum spinozum) bazal tabakada çoğalan hücrelerin hücre döngüsünden çıktıktan sonra yukarı doğru hareket ederek oluşturdukları tabakadır. Çok yüzlü ve hafifçe yassılaşmaya başlamış hücre şeklini kazanırlar. Bu hücre tabakasında da az sayıda mitoz görülür. Epidermisin mekanik sağlamlığı bu tabakadaki hücrelerden kaynaklanır.

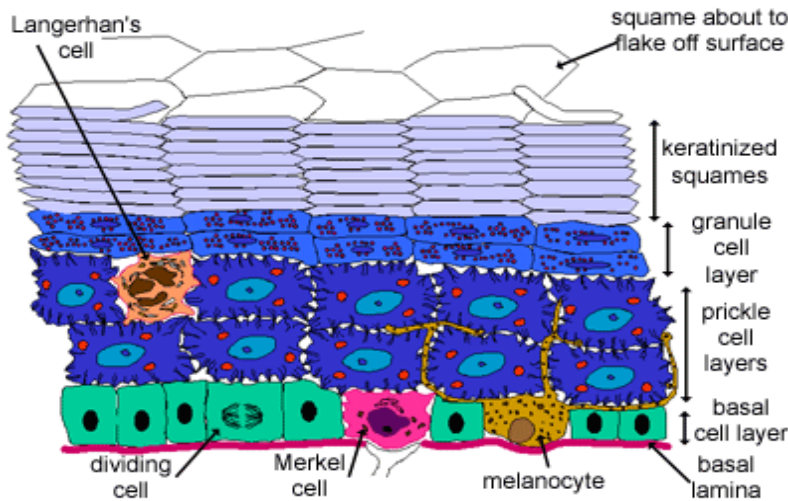
Granüler tabaka, yassılaşmaya yüz tutmuş üç-beş hücre tabakasıdır. Bu hücrelerin sitoplazmasında bol sitokeratin filamanlarının yanı sıra keratohiyalin granülleri vardır. Bu tabakadaki hücreler çeşitli lipid moleküllerini de sentezlerler ve lipid lamelleri biçiminde sitoplazmalarında biriktirirler. Lipidlerin hücreler arası boşluğa atılımı ile hücrelerin üzerinde

lipid içeren ince bir tabaka oluşur, bu tabaka derinin su geçirmezliğinde en önemli faktördür.

Şeffaf tabaka (Stratum lusidum), sedef gibi parlak görünen, ince bir tabakadır. Sadece palmopantar epidermiste görülür.

Boynuzsu tabaka (Stratum korneum) keratinizasyonun son aşamasıdır; hücre yapısı görülmez, yumuşak keratin adı verilen ve mikroskop altında parlak görünümdeki filaman benzeri boynuzsu tabakalanma oluşur. Ayak tabanı ve el ayası gibi fiziksel etkenlere açık bölgelerde çok kalındır.

Gelişimin ilk üç ayı süresince, epidermis nöral krest kökenli hücreler tarafından işgal edilir. Bu hücreler, dendritik uzantılar yoluyla epidermin diğer hücrelerine de transfer edilebilen, melanin pigmentini sentezlerler. Melanosit adıyla bilinen bu hücreler doğumdan sonra derinin pigmentasyonunu sağlarlar (Resim 2.3).



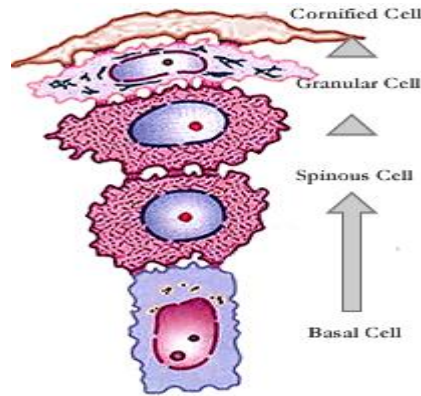
Resim 2.3: Epidermisi oluşturan tabakalar ve bazal tabakada yer alan melanosit.(40)

2.2.1.1. Keratinosit

Stratum spinozumdaki keratinositler, yassı poligonal şekilli ve belirgin oval bir çekirdeğe sahip hücrelerdir. Sitoplazmada içinde lamelli bir yapı bulunduran küçük granüller izlenir. Ara filaman demetleri olan tonofilamanlar dikensi görünümlü sitoplazmik çıkıntılar içinde ilerleyerek bir desmozomun yoğun plağına tutunurlar (18). Filamanlar hücreler arasındaki yapışmada ve yıpranma etkilerine karşı dayanıklılıkta önemli bir rol oynarlar. Sürekli sürtenmeye ve basınca maruz kalan bölgelerde epidermis daha bol tonofibril ve desmozom içeren daha kalın bir stratum spinozuma sahiptir (19).

Stratum granülozum, birkaç sıralı yassı çekirdekli keratinositlerden meydana gelir. Bu tabakadaki keratinositlerin başlıca ürünü, ara filaman yapısında olmayan bir protein, filaggrindir. Filaggrin keratinlerin kümeleşmesini uyarır. Sitoplazmada, bir zarla çevrili olmayan düzensiz şekilli tipik keratohiyalin granülleri ve bunlara eşlik eden tonofilamanlar izlenir. İlk olarak stratum spinozumdaki keratinositlerde görülen lipidlerden oluşan lamelli cisimcikler, stratum granülozumda sayıca artarlar ve granül içeriği olan glikolipid açılglukozilseramit hücreler arası boşluğa salınır (Resim 2.4).

Hücreler arası aralıkta bu lamelli materyal çok tabakalı geniş bir kılıf halinde düzenlenir. Bu yapı, bir üst tabaka olan stratum lusidumda keratinositlerin yüzeyini kaplayarak epidermise su bariyeri özelliği kazandırır (18).



Resim 2.4: Keratinositin farklılaşması (41).

Stratum lusidum, kalın deride daha belirgin olan oldukça yassı eozinofilik hücrelerin oluşturduğu yarı saydam ince bir tabakadır. Organeller ve çekirdekler artık belirgin değildir ve sitoplazma öncelikle elektron yoğun bir matriks içine gömülü sıkıca paketlenmiş filamanlardan meydana gelir. Komşu hücreler arasındaki desmozomlar hala belirgindir (19).

Stratum korneum, birkaç sıra halinde dizilmiş çekirdek içermeyen yassılaştırmış keratinize hücre tabakasından meydana gelir. En dış tabakadır. Sitoplazmada, transglutaminazlarca katalizlenen bir reaksiyonla filaggrinle birbirlerine çapraz bağlanan keratin ara filamanlarına ait yığınlar bulunur. Keratin- filaggrin kompleksi, hücre zarının hemen altında birikerek, hücre kapsülü olarak adlandırılan boynuzsu bir yapı oluşturur. Hücre dışında, lamelli cisimciklerden salınan lipidler hücre kapsüllerini birbirine bağlayarak birleşik hücre kapsülünü meydana getirir. Birleşik hücre kapsülü, sıvıların hücre zarından geçişini engeller.

Farklılaşmanın en son noktasında bulunan stratum korneumdaki keratinositler, oldukça dirençli birleşik hücre kapsülü ile çevrelenmiş yassı yapılar şeklindedir. Bunlar, epidermis yüzeyinden dökülürler ve alt tabakalardan gelen keratinositler tarafından sürekli olarak yenilenirler (18).

2.2.1.2. Melanositler

Melanositler, epiderminin stratum bazale tabakasına yerleşmiş uzantılı hücrelerdir (Resim 2.3). Melanositler, nöral kristadan göç eden öncü hücreler olan melanoblastlardan köken alırlar. Melanositler, melanin granülleri içinde paketlenmiş olarak melanin üretirler. Bu granüller de, dallanan hücre uzantıları aracılığıyla, sitokrin salınımıyla keratinositlere aktarılır.

2.2.1.3. Langerhans hücreleri (Dentritik Hücreler)

Langerhans hücreleri, epidermiste bulunan kemik iliği kökenli hücrelerdir. Bu hücreler, immün cevapta, özellikle derinin aşırı duyarlılık reaksiyonlarının başlangıcında, T lenfositlere antijen sunumunda rol oynarlar.

2.2.1.4. Merkel Hücreleri

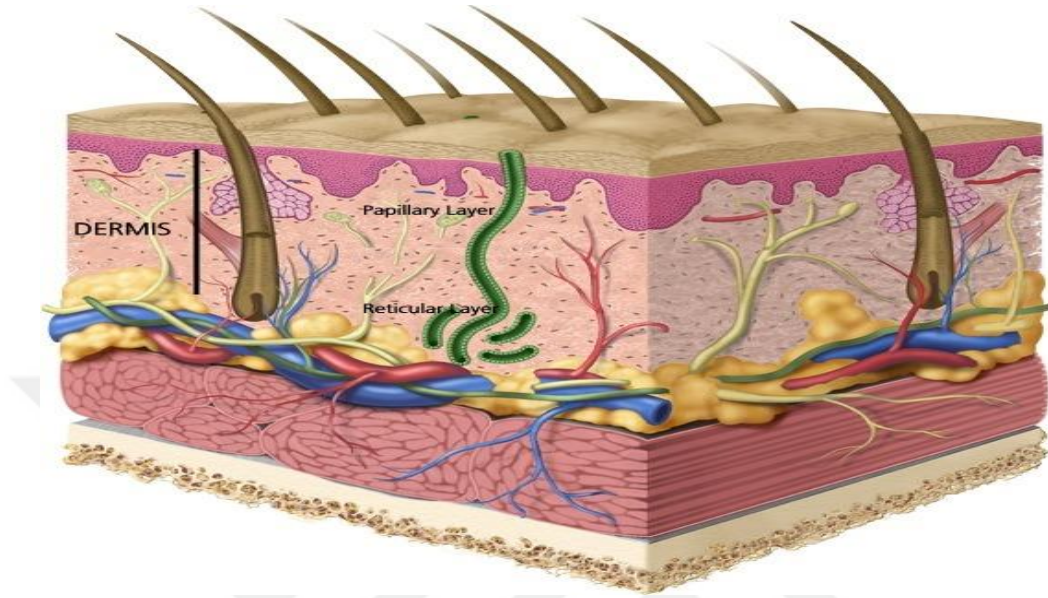
Merkel hücreleri, stratum bazalede bulunan ve modifiye keratinositlere benzeyen hücrelerdir. Parmak uçlarında daha çok bulunurlar. Merkel hücreleri, komşu keratinositlere dezmozomlarla bağlı bulunan ve dermisten epidermise uzanan miyelinli afferent sinir lifleriyle irtibatlı mekanoreseptör hücrelerdir.

2.2.2. Dermis

14-21. haftalar arasında mezodermden gelişmekte olan dermis içinde fibroblastlar, perinöral hücreler, perisitler ve melanoblastlar ortaya çıkar. Merkel hücreleri ve mast hücreleri de bu dönemde ortaya çıkar. Ter bezleri, kıl folikülleri ve tırnaklar 9. haftada oluşmaya başlar (1).

Dermis lateral plak mezodermi ve somitlerden gelen dermatomlardan köken alır Üçüncü ve 4. aylar süresince, korium adı verilen bu doku, epidermis içine doğru uzanan çok sayıdaki düzensiz papiller yapıları, dermal papillaları oluşturur. Bu papillalar genellikle, küçük bir kapiller veya duyu sinir uçlarını içerirler. Dermisin daha derin tabakası olan subkorium önemli miktarda yağ dokusu içerir.

Doğumda deri, sebase bezlerin salgıları, dejenere olmuş epidermal hücre ve kıllardan oluşan beyazımsı bir tabaka verniks kazeoza ile örtülüdür. Bu tabaka deriyi, amniyotik sıvının zedeleyici etkisinden korur (20).



Resim 2.5: Dermisi oluşturan tabakalar (42)

Dermis, sınırları belirgin olmayan iki tabakadan meydana gelir: 1) papiller tabaka epidermisle temasta olan gevşek bağ dokusu (fibroblastlar, kollajen lifler ve ince elastik lifler) yapısındadır ve 2) retiküler tabaka, kalın kollajen lif demetleri ve kaba elastik lifler içerir (Resim 2.5). Kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri, dermisin çeşitli seviyelerinde bulunan epidermal türevlerdir.

Stratum bazaledeki keratinositlerin bazal yüzlerinde bulunan hemidezmozomlar epidermisi bazal membrana bağlayıcı filamanlarla; dermisin papillalı tabakasına ise bağlayıcı liflerle bağlarlar.

2.2.3. Derinin Damarlanması

Deride, birbirleriyle bağlantılı üç şebeke bulunur:

- 1) Subpapiller pleksus, dermisin papillalı tabakasında seyredir.

- 2) Kütanöz pleksus, dermisin papillalı ve retiküler tabakaları arasındaki sınırda gözlenir.
- 3) Hipodermik veya subkütanöz pleksus, hipodermiste veya subkütanöz yağ dokusunda bulunur.

Subpapiller pleksus, her bir dermal papilla içine kapiller yumak birimleri gönderir. Subpapiller pleksustaki venöz kan, kütanöz pleksustaki venlere boşalır.

Hipodermik ve kütanöz pleksusların dalları, hipodermisin yağ dokusunu, ter bezlerini ve kıl foliküllerinin derin kısımlarını besler.

Arteriyel ve venöz dolaşımlar arasında bulunan arteriyovenöz anastomozlar, retiküler ve hipodermik bölgelerde yaygın olarak bulunur ve vücut ısının düzenlenmesinde rol oynarlar.

2.2.4. Hipodermis

Hipodermis veya derinin subkütanöz tabakası, dermisin derindeki devamıdır. Vücuttaki lokalizasyonuna bağlı olarak değişen kalınlıklarda bir tabaka oluşturan, gevşek bağ dokusu ve yağ hücrelerinden meydana gelir (18).

2.3. Steroidler

Kortikosteroidler, sürrenallerde adrenokortikotrop hormon (ACTH) kontrolü altında kolesterolden sentezlenen ve kana salınan hormon yapısında maddelerdir. ACTH, cAMP ve adenilat siklaz üzerinden etki ederek ve kolesterolden pregnanolon oluşumunu sağlayarak sürrenal sentezi başlatır. Zona glomeruloza, sürrenal bezlerin en dış kısmında yer alır ve vücudun sıvı-elektrolit dengesini düzenleyen mineralglukokortikosteroid hormonları

salgılar. Sürrenal bir hormon olduğu halde, bu mekanizmada son ürün olan aldosteronun salınımı ACHT'dan çok, renal fonksiyonla ve renin-anjiyotensin sistemiyle düzenlenir ve vücudun sodyum-potasyum dengesine bağlı olarak salınımı değişir. Sürrenal bezin orta kısmı olan zona fasikulatada insan vücudu için hayati öneme sahip glukokortikosteroidler sentezlenir. Zona retikülaris ise en iç kısımda yer alır ve kadınlarda üretilen androjenin en büyük kaynağı olan DHEA (dehidroepiandrosteron) gibi androjenlerin sentezi buradan yapılır. Tüm bu tabakalardan salınım hipotalamo-hipofizer eksen tarafından kontrol edilmektedir. Hipotalamustan vücut dengesine uygun olarak günün belli zamanlarında kan düzeyi değişecek şekilde salınan kortikotropin salınım hormonu (Corticotropine Releasing Hormon (CRH)) hipofizden ACTH salgılatarak surrenal aktiviteyi oluşturur.

Steroid hormonlar, hedef hücrede kendilerine özgü sitoplazmik reseptöre bağlanırlar. Hedef hücrelerde birbirinden ayrı mineraloglukokortikosteroid reseptörü (MR) ve glukokortikosteroid reseptörü (GR) vardır. Oluşan reseptör-hormon kompleksleri nükleusda transkripsiyon ve protein sentezini başlatarak farklı hücre ve dokularda farklı işlevler görürler(21, 22). Plazmada kortizol büyük oranda (%90) transkortin (ya da corticosteroid binding globulin = CBG) ve bir miktar da (% 16) albümine bağlı olarak bulunur. Bu bağlanma hipoalbüminemi, gebelik ve östrojen tedavisi durumlarında değişiklik gösterir (21).

2.3.1. Glukokortikosteroidlerin Fizyolojik ve Farmakolojik Etkileri

2.3.1.1. Glukoz Metabolizması:

Glukokortikosteroidler glikoneojenezi, diğer bir deyişle aminoasit ve yağlardan glukoz üretimini arttırır ve kan şekerinin yükselmesini sağlarlar. Bu özellikleri nedeniyle insülinle zıt etkiye sahip hormonlar olarak bilinirler (22). Akut stres durumlarında plazma glikozunu arttırarak vücutta artan enerji

ihtiyacının karşılanması sağladıkları için , adrenal yetmezliklerde endojen steroid miktarı yetersizdir ve strese tolerans azalmıştır. Ayrıca, glukokortikosteroidler yağ dokusu hücrelerine, fibroblastlara ve timositlere glukoz girişini azaltırlar. Glukoneojenezin artması ve glukoz kullanımının azalması sonucunda gliseminin yükselmesi kaçınılmaz olur (23).

2.3.1.2. Protein Metabolizması:

Kortizolun vücut metabolik sistemlerine en önemli etkilerinden biri, karaciğer dışındaki tüm vücut hücrelerinde, protein depolarını azaltmasıdır. Hücrelerde protein sentezinin azalması, katabolizmasının ise artmasıyla ortaya çıkan bu etki, ekstrahepatik dokulara aminoasit transportunun azalmasına bağlı olabilir. Serum kortizol düzeyi arttığında, kasların güçsüzlüğü nedeniyle hastanın duruşu / yürüyüşü bozulur. Ayrıca kortizolun karaciğer ve plazma proteinlerini arttıran etkisi vardır (24).

2.3.1.3. Yağ Metabolizması:

Glukokortikosteroidler, yağ hücresine glukoz girişini yukarıda belirtildiği gibi azaltırlar ve lipolitik hormonların yaptığı lipolizi hızlandırırlar. Glukokortikosteroidlerin aşırı salgılanmaları durumunda veya ilaç olarak yüksek dozda verildiğinde insülin düzeyini yükseltmeleri ve iştahı artırmaları nedeniyle lipojenik etki yaparlar. Lipolitik ve lipojenik etkiler sonucu yağın vücutta dağılımı değişir ve Cushing sendromu ve benzeri durumlarda yağ enseye ve supraklaviküler bölgeye birikir (buffalo hörgücü). Aynı şekilde, yüzde cilt altı yağ dokusu artar (aydede yüzü), buna karşılık ekstremitelerde cilt altı yağ dokusunu ve kasları eritirler (22).

Kortizol kaslardan aminoasit mobilizasyonunu arttırdığı gibi, yağ dokusundan da yağ asitlerinin mobilizasyonunu sağlar. Böylece serbest yağ asitlerinin plazma konsantrasyonları ve enerji için kullanımı artar. Yağların mobilizasyonun artması , hücredeki oksidasyonlarının hızlanmasıyla birlikte, hücre metabolitik sistemlerinde enerji için glikoz kullanımı yerine, yağ kullanımının başlamasına yardım eder (24).

2.3.1.4. Antiinflamatuvar Etki:

Glukokortikosteroidler fizyolojik konsantrasyonlarının üzerindeki düzeylerde akut ve özellikle kronik inflamasyonu inhibe ederler. İnflamasyon hangi etkene bağlı olursa olsun (mikroorganizma, kimyasal etkenler, mekanik etkenler, iradiyasyon, ısı , immunolojik saldırı) , inhibe edilebilir. İnflamasyonun ortak makroskopik özelliklerini oluşturan belirtiler tumor (şişlik/ödem), rubor (kızarıklık), calor (sıcaklık), dolor (ağrı) ve functio laesa (fonksiyon kısıtlanması) bu ilaçlar tarafından ortadan kaldırılır. Kapiller dilatasyonu, damar çeperinde fibrin çökmesi, serodiapedez ve lokal ödem, lökositlerin inflamasyon alanına migrasyonu ve fagositik etkinlik artması gibi iltihabın erken histolojik belirtileri olan olayları ve fibrozis, kapillerlerin proliferasyonu, kollagen birikmesi ve nedbeleşme gibi geç histolojik belirtilerini oluşturan olayları inhibe ederler. Ancak hastalığın altında yatan ve inflamasyonu tetikleyen patolojik olayları etkilemezler. Glukokortikosteroidler, inflamasyonun yaralı bir savunma mekanizmasından çok zararlı bir engel oluşturduğu durumlarda ilaç olarak tercih edilirler. Bununla birlikte, yerine koyma tedavisi için kullanılan ufak dozlarda antienflamatuvar etkinlikleri belirgin değildir (23). Glukokortikosteroidlerin antienflamatuvar etkileri aşağıda belirtilen etkilerden ileri gelmektedir:

-kapiller geçirgenliği inhibe ederek, enflamatuvar reaksiyonu bloke ederler.

-makrofajların ve granülositlerin lezyonlu kapiller endotelyuma adezyonunu zayıflatırlar; böylece ödem ve çeşitli vazoaktif maddelerin dokularda serbestlenmesi de azalır.

-makrofajlar tarafından antijenlerin fagositozu ve onların intrasellüler sindirimi ile etkileşirler (21).

Antienflamatuvar etkinin ortaya çıkmasındaki kesin mekanizma ne olursa olsun, kortizol romatoid artrit, romatizmal ateş ve akut glomerulonefrit gibi ağır lokal inflamasyon esaslı bazı hastalıkların tedavisinde çok önemli rol oynar. Bu hastalıklarda hastaya kortizol ya da öteki glukokortikosteroidler verildiği zaman, 24-48 saat içinde inflamasyon geriler, hatta kortizol temel hastalık durumunu düzeltmese bile sadece inflamasyonun dokuyu haraplayıcı etkilerini önleyerek hayat kurtaran bir rol oynar. Kortizol, öteki tip inflamasyon cevaplarını önleyici şekilde, alerjide de inflamasyon cevabını bloke eder ve astım, Quincke ödemi, subglotik ödemli larenjitler ve çeşitli allerjik cilt hastalıklarında uygulanırlar (21, 24). Antijen ile antikor arasındaki temel allerjik cevap kortizolden etkilenmez, hatta histamin serbestlenmesi gibi allerjik reaksiyonun sekonder etkileri aynı şekilde görülmeye devam eder. Bununla beraber inflamasyon allerjik reaksiyonun bazı ciddi, hatta öldürücü etkisinden sorumlu olduğu için kortizol verilmesi, özellikle anafilaksi durumunda hayat kurtarıcı olabilir (24)

2.3.1.5. İmmunsupresif Etki :

Glukokortikosteroidler fizyolojik dozun üzerindeki dozlarda, immün sistemin etkin hücreleri arasında çok sayıda sitokinler tarafından sağlanan iletişimi, otokrin, parakrin ve endokrin nitelikte etkinlikler gösteren bu faktörlerin üretimini ve/veya onların etkilerini inhibe ederek bozarlar.

Glukokortikosteroidlerin immünosupresif etkileri monositlerin, makrofajların ve endotel hücrelerinin immün saldırı sonucu aktive edilmelerinin ve sitokin salgılamalarının inhibisyonuna dayanmaktadır ve mekanizma bakımından

antienflamatuvar etkilerine benzer. Glukokortikosteroidler antijen saldırısına bağılı sıvısal immün yanıtı (IgE, IgO, IgM oluşumunu) ancak yüksek dozlarda uygulandıklarında bozarlar, fakat asıl etkilerini T lenfositlerin rol oynadığı hücresele immün yanıtı baskılayarak gösterirler (23). Yüksek dozda kortizol alınması vücuttaki tüm lenfoid dokularda önemli ölçüde atrofiye yol açar, böylece lenfoid dokulardan T hücreleri ve antikor oluşumu azalır. Sonuçta, vücudun bağıışıklık düzeyi düşer ve daha önce öldürücü olmayan kontrol altına alınmış tüberküloz gibi bazı hastalıklar ağırlaşarak ölümle sonuçlanabilir. Öte yandan kortizol ve diğer glukokortikosteroidlerin bağıışıklığı baskılama yetenekleri nedeniyle böbrek, kalp ve öteki dokuların transplantasyonlarında doku reddini reaksiyonlarını önlemek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (24).

2.3.1.6. Hematopoietik Sistem Üzerine Etki:

Steroidler, kan tablosu üzerinde önemli etkileri olması nedeniyle günümüzde ekzojen steroid tedavisinde oldukça sık kullanılmaktadır. Otoimmün ve allerjik hastalıklarda ve malignitelerde kan tablosu üzerine olan etkilerinden yararlanılır. Bu etkilere kısaca değinmek gerekirse; glukokortikosteroidler, kemik iliğinde hemoglobin, eritrosit, polimorfonukleer lökosit ve trombosit yapımını arttırırlar ve kandaki düzeylerini yükseltirler. Öte yandan kanda eozinofil ve bazofil lökositlerin, monositlerin ve lenfositlerin sayısını azaltırlar. Bu etki, insanda adı geçen hücrelerin yapımının azaltılmasına değil, kandan dokulara geçişinin arttırılmasına bağılıdır. Kortizolun bu etkisi IV. yoldan verilışinden sonra 4-6 saat içinde belirginleşir ve 24 saatte geçer. Glukokortikosteroidlerin insanda lenfoblastik lösemi dışında lenfolitik (lenf düğümleri. dalak ve diğer lenfoid yapıları küçültücü) etkileri yoktur (23).

2.3.1.7. Santral Sinir Sistemi (SSS) Üzerine Etki:

Glukokortikosteroidler, SSS 'i üzerinde genellikle hafif uyancı etki yaparlar. Bunun sonucunda hastalarda öfori, iştah artması, uykusuzluk, huzursuzluk ve motor etkinlikte artma görülebilir. Ayrıca yapılan araştırmalarda glukokortikosteroidlerin beyinde konvülsiyon eşiğini düşürdüğü ve epilepsi hastalarında nöbetleri sıklaştırdığı saptanmıştır (22).

2.3.1.8. Kardiovasküler Sistem Üzerine Etki:

Glukokortikosteroidler, damar düz kaslarının ve myokardın adrenerjik sinir uyarısına ve anjiotensin gibi vazokonstriktör hormonlara verdiği cevabı artırırlar. Bu nedenle, kalp debisi ve damar tonusunu arttırabilirler ve endotoksin şokunda gelişen damar bozukluklarını ortadan kaldırır (22).

2.3.1.9. Kemikler ve Kalsiyum Metabolizmasına Etki:

Glukokortikosteroidlerin aşırı salgılanma durumunda veya dozları arttırıldığında kemikler ve kalsiyum metabolizması üzerinde olumsuz etkileri vardır. Bu etkilerini kemiklerde protein matriksinin sentezini inhibe ederek, osteoblastik etkinliği azaltarak ve kalsiyumun barsaktan absorpsiyonunu azaltıp, böbreklerden itirahını arttırarak gösterirler. Osteoklastik etkinlikleri ise ya direkt etkilerine, ya da PTH saliverilmesini arttırmalarına bağlanmaktadır. Kemik oluşumunun azalması ve kemik rezorpsiyonunun artması sonuçta osteopeni veya osteoporoza yol açar. Yaşlı hastalarda ve postmenopozal kadınlar gibi osteoporoz eğilimi fazla olan hastalarda, uzun süren glukokortikosteroid ilaç tedavisi sırasında osteoporoz gelişmesi olasılığı

oldukça fazladır. Osteoporoz özellikle kostalarda ve vertebralarda oluşur; spontan kompresyon kırığı gözlenebilir (22).

2.3.1.10. Çizgili Kaslar Üzerine Etki:

Yüksek dozda ve uzun süren glukokortikosteroid tedavisinin protein metabolizması üzerindeki olumsuz etkisi (hücre içine aminoasitlerin geçişinde. azalma ve kan dolaşımına aminoasit akışında artış) sonucunda çizgili kaslarda erimeler görülür. Kas kütlelerinde atrofiye varan önemli azalmalar meydana gelir, hastada halsizlik ve çabuk yorulma gibi lokomotor bozukluklar gelişir (22).

2.3.1.11. Büyümenin İnhibisyonu:

Düşük dozlar hariç glukokortikosteroidlerin çocuklarda ve adolesanlarda uzun süre kullanılması epifizeal kıkırdağın metabolizmasını bozarak büyümeyi yavaşlatır. Bu sebeple çocuklarda glukokortikosteroid kullanımı sırasında büyümenin izlenmesi gerekmektedir (22).

2.3.2. Glukokortikosteroid İlaç Türleri ve Kullanım Şekilleri

2.3.2.1. Doğal Glukokortikosteroidler

Hidrokortizon (Kortizol): İnsandaki doğal glukokortikosteroidlerin en önemlisidir. Bitkisel steroidlerden sentezlenerek hazırlanan kortizol, gastrointestinal kanaldan iyi absorbe edilir. Tablet şeklinde oral yoldan kullanılır ve ağızdan alındığında etkisi 12- 14 saat sürer. Krem, losyon,

merhem, kulak-burun damlası şeklinde lokal uygulamaya özgü preparatları da vardır.

Hidrokortizon Asetat: Sudaki steril süspansiyonu, eklem içine injeksiyon veya doku içine infiltrasyon suretiyle uygulanır. Lokal uygulama preparatları da vardır. Cilt ve mukoza uygulamalarında hidrokortizona göre daha az absorbe edilir; ancak, lokal etkisi daha uzun sürer.

Kortizon Asetat: Lokal olarak uygulandığında etkisizdir, fakat gastrointestinal kanaldan iyi absorbe edilir. Oral olarak alındığında hidrokortizona göre etkisi daha çabuk başlar.

2.3.2.2. Sentetik Glukokortikosteroidler

Prednizon: Karaciğerde prednizolona dönüşnek suretiyle etkinlik kazanan prednizon, oral yoldan kullanılır. Lokal uygulandığında etkili değildir.

Prednizolon: Tablet şeklinde oral kullanılan prednizolonun genellikle % 0.25 veya % 0.5 oranında ilaç içeren lokal uygulamaya özgü krem, pomad ve losyon şeklinde preparatları da vardır.

Prednizolon Asetat: Genelde ağız yolundan kullanılmasına rağmen, sudaki steril süspansiyonları kas veya eklem içi yolla da uygulanır. Ayrıca prednizolon butilasetat ve prednizolon pivalat, prednizolon sodyum fosfat, prednizolon sodyum hemisüksinat, metilprednizolon asetat, triamsinolon, deksametazon, dezoksikortikosteron, fludrokortizon olarak adlandırılan sentetik glukokortikosteroidler vardır.

2.3.3. Glukokortikosteroidlerin Klinik Farmakolojisi

Glukokortikosteroidler fizyolojik olarak organizmanın dokularında önemli ve çok sayıda hücrel fonksiyonları kontrol altında tutmaktadırlar. Glukokortikosteroidlerin etkileri bu kadar çok olmasına karşın hücre düzeyinde temel etki mekanizmaları aynıdır ve tüm steroid yapılı hormonlar için ortaktır. Bu nedenle tedavide geniş endikasyonları ve buna karşın da o denli çok yan etkileri olan ilaçlardır.

Glukokortikosteroidlerin; yerine koyma tedavisi (replasman) şeklinde kullanıldıkları adrenal fonksiyon bozuklukları, adrenal veya başka bir endokrin bozukluk söz konusu olmayan durumlar, hipotalamus-hipofiz-adrenal korteks ekseninin bozukluklarında teşhis aracı olarak kullanımları söz konusudur.

2.3.3.1 Glukokortikosteroidlerin Adrenal Fonksiyon Bozukluklarında Kullanımı

Adrenal korteksin primer, sekonder veya tersiyer yetmezliği durumlarında yerine koyma tedavisi yapılır ve glukokortikosteroid / mineraloglukokortikosteroid etkinlik dengesi uygun olan hidrokortizon ve kortizon tercih edilir. Duruma göre bunların yerine prednizolon ve prednizon kullanılabilir (21).

2.3.3.2 Glukokortikosteroidlerin Endokrin Nitelikte Olmayan Hastalıklarda Kullanımı

Endokrin nitelikte olmayan hastalıklarda glukokortikosteroidler, genellikle antienflamatuvar, antiallerjik, immünosüpresif ve hematopoetik sistem üzerindeki etkileri nedeniyle kullanılırlar. Bu tip durumlarda süpresif özellikleri ön planda yer alır; diğer bir deyişle ilaç uygulandığı sürece hastalık belirtileri hafifler veya ortadan kalkar.

Artritler: Romatoid artrit, osteoartrit ve ankilozan spondilitte hastayı günlük işlerini yapmaktan ve çalışmaktan alıkoyan ağır olgularda kullanılırlar. Romatoid artritte uzun süreli tedavinin riskleri yararından fazla olduğu için rutin olarak kullanılmazlar. Ağır akut nöksler aspirin benzeri ilaçlarla kontrol altına alınmamışsa geçici bir süre için veya altın, penisilamin, metotreksat gibi etkisi aylarca süren uygulamadan sonra geç başlayan ilaçların etkisini beklerken ara sürede kullanılabilirler. Kural olarak, elverdiğince minimal bir doz düzeyde kullanmak ve bütün belirtileri geçirecek bir doz düzeyini hedeflemek gerekir (23). Romatolojide glukokortikosteroidler eklem içi yolla olduğu gibi, bolus ve perfüzyon şeklinde intravenöz yolla yüksek dozlarda gün aşırı verilebilir; ancak glukokortikosteroidler artritli hastalarda çoğunlukla oral olarak kullanılırlar (21).

Vaskülitler: Sistemik lupus eritematosus, poliarteritis nodosa, dermatomyozitis ve granülomatoz-poliarterit gibi immün vaskülitlere bağlı romatizmal hastalıklarda glukokortikosteroidler yararlı olabilir. Gerekğinde dozun azaltılmasına veya gün aşırı tedaviye dönülmesine daha elverişli olması sebebiyle prednizon ve metilprednizolon gibi kısa etkili ilaçlar tercih edilirler (22).

Romatoid kardit: Salisilat tedavisine iyi cevap vermeyen olgularda ve kalp yetmezliğine girmiş ağır olgularda genellikle salisillatlara ilave olarak glukokortikosteroidler kullanılır (22).

Cilt hastalıkları: Allerjik dermatitler, kontakt dermatitler, alopesi, seboreik dermatit, liken, sklerozis v.b hastalıklarda topikal (pomad, krem, losyon ve solusyon gibi farmasötik şekiller) pemfigus, eksfoliyatif dermatit gibi ciddi hastalıklarda ise sistemik olarak uygulanırlar (22).

Göz hastalıkları: Glukokortikosteroidler, göz ve çevresindeki dokuların iltihabi hastalıklarına karşı en etkili ilaçlardır (22).

Allerjik ve anafilaktik reaksiyonlar: Glukokortikosteroidler güçlü anti-allerjik etkinlik gösterirler. Allerjinin ciltteki çeşitli yüzeyel belirtilerine karşı (ürtiker, anjiyo ödem ve temas dermatiti gibi) lokal olarak kullanılırlar. Akut anafilaktik şok, bronkospazm ve glottis ödemi gibi ciddi durumlarda önce erişkinlerde adrenalın verildikten sonra intravenöz yoldan bir glukokortikosteroid enjekte edilebilir. Mevsimsel allerjik rinit veya ev ve işyerlerindeki allerjenlerin yaptığı allerjik rinite bağlı hapşırma, burun kaşınması, rinore ve burun tıkanıklığı gibi belirtilere karşı ise intranazal damla ve aerosol şeklinde kullanılır (22).

Şok: Hemorajik ve travmatik veya cerrahi şokta diğer tedavi yöntemleri ile birlikte, yüksek dozda ve parenteral yoldan glukokortikosteroid uygulanması (örneğin günde 300mg hidrokortizon i.v şeklinde) yaşam kurtarıcı olabilir (22).

Bronşiyal astım: Glukokortikosteroidlerin aerosol şekillerinin çıkarılması sonucu astırnda nöbet profilaksisi ve tedavisi için kullanılması yaygınlaşmıştır. Astımın akut alevlenmelerinde kısa süreli olarak ağızdan da glukokortikosteroid verilebilir (22).

İnflamasyona karşı: Steroidler inflamasyonun tetiklenmesini önleyici etkileri nedeniyle günümüzde etkin olarak kullanılmaktadır. Nonsteroid antienflamatuvar ilaçların kullanılmasına rağmen kontrol edilemeyen kronik inflamatuvar durumlar ve bunların akut alevlenmelerinin tedavisinde şikayet ve semptomların azaltılmasında etkilidirler, fakat bu türden kronik-ilerleyici hastalıklarda steroidler kesilir kesilmez semptomlar şiddetlenir.

İmmunosupresif olarak: Organ transplantasyonu, allograft reddi, aplastik anemi, serum hastalığı, minimal lezyon hastalığı gibi immün sistemin organizma aleyhine çalıştığı durumlarda sistemin baskılanmasında yüksek

dozda ve primer olarak glukokortikosteroidler kullanılmaktadır. En çok kullanılan preparat ise prednizondur.

Ayrıca; malign tümörler, hematolojik hastalıklar (trombositopeni, kronik agranülositoz, ağır anemiler, otoimmün hemolitik anemiler), hiperkalsemi durumları (myolema, sarkoidoz ve D vitamini zehirlenmesi), nörolojik hastalıklar, ağızdaki aftöz durumlar, bakteriyel menenjit, aspirasyon pnömonisi, ağır tifo, enflamatuvar bağırsak hastalıkları (Crohn, kronik ülseratifkolit) glukokortikosteroidlerin kullanıldığı diğer durumlardır (21).

2.3.4. Glukokortikosteroidlerin Kullanımının Kontrendikasyonları

İlaça kişisel duyarlılığı olanlarda, spesifik bir tedaviyle kontrol altına alınamayan bakteriyel (özellikle aktif tüberküloz), viral (herpes, oftalmik zona, hepatit) ya da mantar enfeksiyonları varlığında, gastroduodenal ülser hastalarında, asidi alkol sirozu olanlarda, canlı aşılarla aşılama yapıldığında, kardiovasküler hastalıklar (hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği), diyabet, psikoz, osteoporoz ve glokom varlığında, oluşacak yan etkiler göz önünde tutularak, glukokotrikosteroid tedavisi uygulanmamaktadır.

2.4. Yara İyileşmesi

Vucudun herhangi bir yerindeki dokunun travma, ameliyat veya başka nedenlerle devamlılığının bozulmasına yara denir. Yara iyileşmesi primer ve sekonder yara iyileşmesi olarak ikiye ayrılır.

2.4.1. Primer Yara İyileşmesi

Cerrahi insizyon ve suture alanlarındaki, epitelyal ve konnektif doku kaybının minimum olduğu, epitelyal bazal membranın düzgün olarak zedelendiği yara iyileşmesine primer yara iyileşmesi denir (25). Primer yara alanı birkaç saniye içinde fibrin ve kan hücreleri içeren kan tıkaçı ile dolar; yüzeydeki tıkaç dehidratasyonla yara üzerini örten kabuğu (krut) oluşturur.

İlk 24 saat içerisinde, insizyon kenarında fibrin tıkaçı doğru hareket eden nötrofiller görülür. Kesi kenarında epidermis bazal tabaka hücreleri mitoz ile çoğalarak kalınlaşmaya yol açar.

24- 48 saat içerisinde, yara dudaklarından başlayan mitoz ve migrasyon sonucu yara yüzeyi iki yandan epitelyum hücreleri ile kaplanmaya başlar. Her iki yandan gelen bu ince epitel tabakası orta hatta birleşerek yaranın üzerini örter. Ayrıca bazal membran yapılarının sentez ve birikimi de oluşur.

Üçüncü günde, nötrofillerin yerini büyük ölçüde makrofajlar alır. İnsizyon alanını granülasyon dokusu doldurmaya başlar. İnsizyon kenarında kollajen lifler oluşmaya başlar. Bu erken dönemde sentezlenen kollajen vertikal düzenlenimli olup yara kenarları arasında köprüler oluşturmaz. Epitel tabakasında proliferasyon ve kalınlaşma devam eder.

Beşinci günde, insizyon alanı granülasyon dokusu ile dolar ve neovaskülarizasyon en üst seviyeye ulaşır. Kollajen lifler daha artar ve insizyon kenarları arasında köprüler oluşturur. Epidermis normal kalınlığına ulaşır ve yüzey epiteli matür keratinize epitele dönüşür.

İkinci haftada, lökosit infiltrasyonu, ödem ve vaskülarite kaybolmaya başlar. Fibroblast çoğalması ve kollajen artışı devam eder.

Birinci ayın sonunda, üzeri sağlam epidermis ile kaplı, iltihap hücresi içermeyen skar dokusu oluşur. Deri ekleri insizyon hattında kalıcı olarak

kaybolur. Gerilmeye karşı direnç (dayanıklılık) artmaya başlar. Direnç artışı kollajen sentezi ile oluşur. Gerilmeye karşı tam dayanıklılık oluşması aylarca sonra oluşur. Bu son aşamaya matürasyon evresi de denir ve yara iyileşmesinin en uzun süre devam eden aşamasıdır (25).

2.4.2. Sekonder Yara İyileşmesi

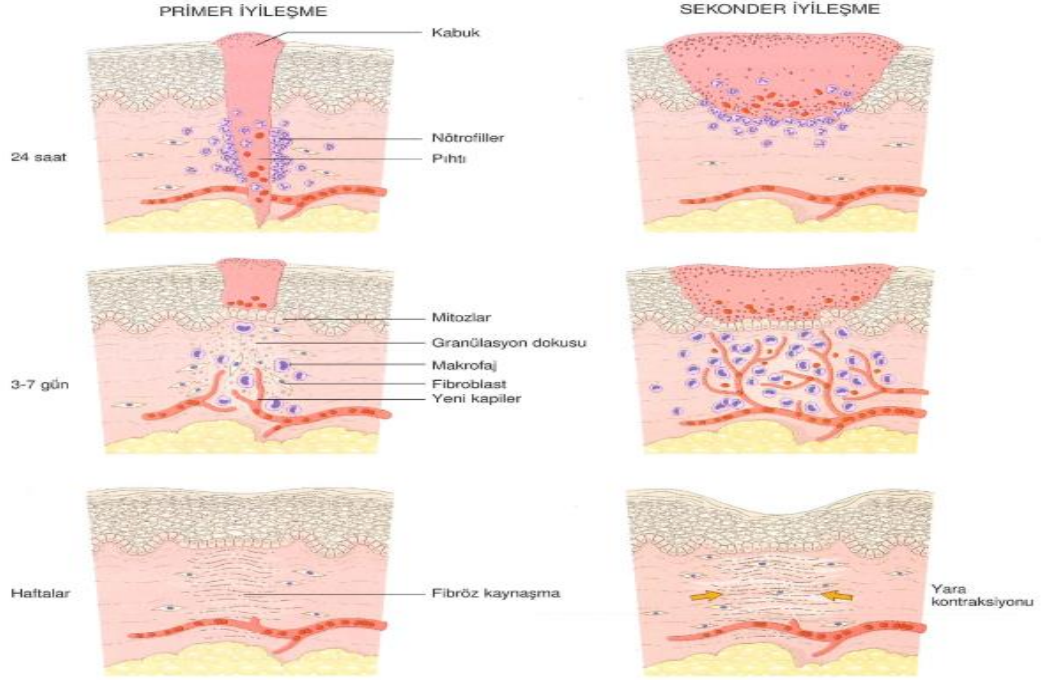
İnfarktüs, iltihabi ülserasyon, apse oluşumu ve büyük doku kaybı olan yüzey yaraları gibi daha fazla hücre ve doku kaybı varsa onarım olayı daha komplikedir. Bunların tümünde de doldurulması gereken büyük doku kaybı vardır. Parankim hücrelerinin rejenerasyonu tam anlamıyla orijinal yapıyı sağlamaz. Oluşan doku defekti alanları erken dönemde aşırı granülasyon dokusu, geç dönemde ise skar dokusu ile doldurularak iyileşme oluşur. Bu tip yara iyileşmesine sekonder yara iyileşmesi denir (25).

2.4.3. Sekonder Yara İyileşmesinin Primer Yara İyileşmesinden Farkları

Sekonder yara iyileşmesinde doku kaybı fazla olup, iyileşme daha geç olur. Uzaklaştırılması gereken daha çok nekrotik doku artıkları ve eksuda vardır. İltihabi yanıt daha şiddetlidir. Daha fazla granülasyon dokusu oluşur. Büyük yüzey yaralarında görülen yara kontraksiyonu sekonder yara iyileşmesinde yara yüzeyini küçültmek amacı (% 5-10) ile yaklaşık 3- 30. günler arasında oluşur. Yara kontraksiyonu miyofibroblastlara dönüşen fibroblastlar tarafından gerçekleştirilir (25).

Parenkimal hücrelerle iyileşmenin (rejenerasyon) oluşmadığı durumlarda fibrozis ya da skatrisle iyileşme oluşur. Rejenere olmamış parenkimal hücreler 24 saat içerisinde fibroblast ve vasküler endotel hücreleri

ile yer deęiřtirir. Granölasyon dokusu 3- 5. günde olur. Granölasyon dokusunda progresif olarak kollajen birikir (Resim 2.7) (25).

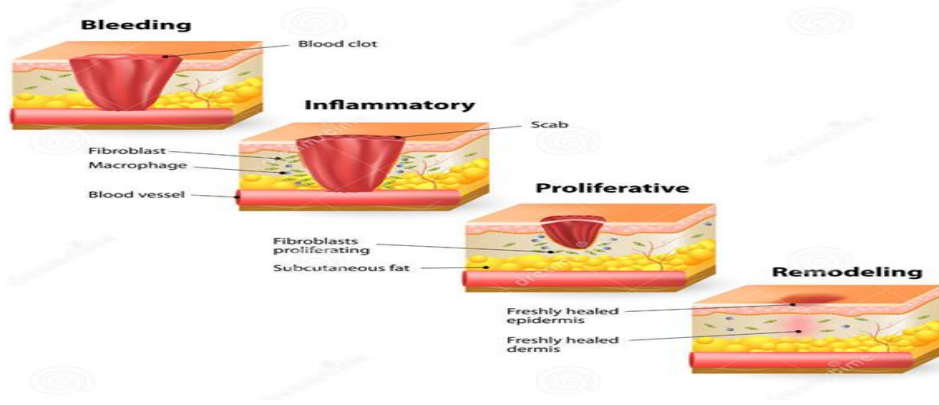


Resim 2.7: Primer ve sekonder yara iyileşmesi (44).

2.4.4. Yara İyileşmesinin Evreleri ve Genel İlkeleri

Yara iyileşmesi üç ayrı, ama iç içe geçmiş evreye ayrılır:

- 1) Hemostaz ve İnflamasyon
- 2) Proliferasyon
- 3) Matürasyon ve Yeniden yapılanma (olgunlaşma ve yeniden şekillenme) (Resim 2.8) (26).



Resim 2.8: Yara iyileşmesinin evreleri; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, matürasyon ve yeniden yapılanma (43).

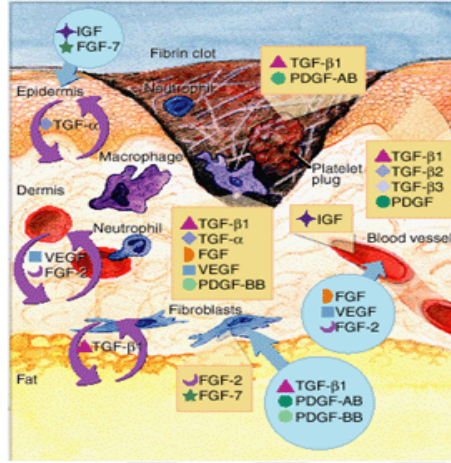
2.4.4.1. Hemostaz ve İnflamasyon

Temel özellikleri vasküler permeabilite artışı, dolaşımdan yaraya hücre kemotaksisi, sitokinlerin ve büyüme hormonlarının yerel olarak açığa çıkması ve hücre göçünün aktivasyonu olan inflamasyon süreci, iyileşmenin temel mekanizmalarıdır. Bu süreçte hemostazın sağlanması ile ortaya çıkan subendotelial kollajene yapışan trombositler çeşitli faktörler salgılayarak pıhtılaşmanın ekstrensek basamağını aktive eder (26).

Yara alanında oluşan pıhtı, nötrofil, monosit, fibroblast ve endotelial hücreler için bir iskelet oluşturur; bu süreçte hemostaz başarısız olursa yetersiz pıhtı oluşumuyla hücrelerin inflamatuvar alana kemotaksisi ve adezyonu azalır ve iyileşme olumsuz etkilenir (26).

Yara alanında ilk saptanan hücrelerden olan nötrofillerin göçü inflamasyonla artan vasküler permeabilite ve prostoglandinler, interlökin-1 (IL-1), tümör nekrozis faktörü- α (TNF- α), kompleman sistemi gibi faktörlerin etkisi ile uyarılır (26). Trombositler tarafından salgılanan iki en önemli faktör, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor: PDGF) ve

dönüştürücü büyüme faktörü- β (transforming growth factor: TGF- β)' dir (Resim 2.9) (27).



Resim 2.9: Yara alanında bulunan hücreler ve hücrelerden salgılanan moleküller (28).

Yara yüzeyinin hemen altında nötrofiller ve makrofajlar tarafından bir band paterni göstererek güçlü bir şekilde eksprese edilen interlökin-8 (IL-8), yüksek sayıda nötrofilin yara yerine göçüne aracılık eder. Yara yüzeyinin altında IL-8' in güçlü bir şekilde ekspresyonu, IL-1 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler, bakteriyel ürünler ve hipoksi tarafından indüklenir. Buna ek olarak yara yüzeyinin altında en yüksek seviyeye ulaşmış olan IL-8 düzeyleri, yara kenarında keratinositlerin migrasyonunu ve proliferasyonunu stimüle edebilir (29). Makrofajlar, lenfositler ve fibroblastlar da daha sonra benzer uyarılarla bölgeye gelerek aynı faktörlerin etkisiyle aktive olur (26). Makrofajlar, nötrofiller ve lenfositlerle birlikte mast hücreleride yara iyileşme sürecinde önemli bir mediatör kaynağıdır ve yara yerinde yaralanmamış derinin tersine yüksek düzeylerde saptanır. Normal yara iyileşmesi için makrofajlar esastır. Makrofajlar, antijen sunucu hücre ve fagosit olarak immünolojik görevleri vardır ve büyüme faktörlerinin önemli bir kaynağıdır.

Monosit- makrofaj atraktan kemokin (MCP-1), yerleşik hücreler (yara kenarındaki keratinositler ve endotel hücreleri) ve inflamatuvar hücreler

(makrofajlar) tarafından salgılanır ve yara iyileşmesi sırasında farklı evrelerde monosit, mast hücreleri ve lenfositlerin yara yerine göçlerinde önemli rol alır (29). MCP-1 ekspresyonu özellikle yaralanmadan sonraki bir haftayla sınırlıdır. Yaklaşık olarak bütün hücrelerin (yerleşik ve infiltre olan mononükleer hücreler) % 20' si yaralanmadan sonraki 1. günde MCP- 1 mRNA' sını eksprese ederler. Özellikle 2. günden sonra MCP- 1, oldukça yüksek proliferasyon kapasitesine sahip ve yara yüzeyini kapatmak için göç eden keratinositler için hücre kaynağı olan bazal keratinositler tarafından eksprese edilir. MCP-1 sadece monositlerin değil mast hücrelerinde de yara yerine göç etmesini sağlar (29). Mast hücrelerinden salgılanan granüller, yara kenarı etrafındaki inflamasyonun karakteristik bulgularından sorumlu olan, enzimler, histamin ve diğer aktif aminler ve bunların mediatörlerini içerir. Mast hücrelerinden salgılanan aktif aminler, çevredeki damarların geçirgenliğini arttırarak yara alanına mononükleer hücrelerin hızlı geçişine izin verir (27). Yara iyileşmesi sırasında mast hücre sayısındaki beş kat artış proliferasyondan ziyade mast hücrelerinin yara yerine gelmesinden kaynaklanır. Mast hücrelerinden salgılanan interlökin-4 (IL-4) fibroblast proliferasyonunu stimüle ederken MCP-1 ve IL-8 gibi bazı kemokinlerin ekspresyonunu azaltır, böylece inflamatuvar reaksiyon sınırlanır (29).

Yara alanında erken dönemde nötrofillerin bakterilere karşı fagositoz görevini daha sonra makrofajlar devralır (26). O nedenle, ortamda bulunan hücre artıklarının fagositozu yanı sıra makrofajlardan salınan sitokinler anjiyogenezi ve fibroplaziyi uyarır (26).

Makrofajlar, inflamatuvar sitokinleri ve büyüme faktörleri salgılama kapasitesinden dolayı yara tamirinde merkezi bir role sahiptir (27, 29).

Aktive makrofajlar, açığa çıkan sitokinlerle uyarılan lenfositlerin salgıladıkları lenfokinler yara alanında fibroblast migrasyonunu, proliferasyonunu ve kollajen sentezini düzenler (26).

IFN- δ ile indüklenen monokin (monokine induced by IFN- δ : Mig) ve interferon ile uyarılabilir protein 10 (Interferon-inducible Protein-10: IP-10)

selektif olarak lenfositleri yara alanına çekerler. Lenfositler, efektör immunolojik hücreler olmalarının yanı sıra, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF=FGF-2) ve lökosit kaynaklı büyüme faktörü (LDGF) gibi büyüme faktörlerini de salgılama yeteneğine sahiptir (50).

2.4.4.2. Proliferasyon

Bu evrede, trombositlerden ve aktive olmuş makrofajlardan salınan sitokinlerin ve büyüme hormonlarının etkisiyle fibroblastlar ve endotelial hücrelerin yara alanında çoğalması ön plandadır (26). Trombositlerden ve aktive makrofajlardan, PDGF ve TGF- β salgılanır (27, 31). PDGF, nötrofillerin, makrofajların, düz kas hücrelerin ve fibroblastların kemotaksisini başlatır. Buna ek olarak fibroblastların ve düz kas hücrelerinin mitogenezini stimüle eder. TGF- β makrofajları etkileyerek bFGF, PDGF, TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerin salgılanmasını stimüle eder. Ayrıca TGF- β fibroblast ve düz kas hücre kemotaksisini artırarak kollajen ve kollajenaz ekspresyonunu düzenler (27). Fibroblastlar çevre dokudan yaraya doğru göç eder. Yara alanına yakın sağlam venüllerden çoğalan endotelial hücreler bölgeye gelerek anjiyogenezi başlatarak yeni kapiller ağı oluşturur (26). Anjiyogenezin en önemli pozitif mediatörleri vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA) ve FGF-2' dir (30). Kemokinler, IL-8, büyüme ile ilişkili onkogen- α (GRO- α), GRO- β , GRO- γ , kemokin bağ doku aktive edici peptid 3 (chemokine-connective tissue-activating peptide 3: CTAP3), β - tromboglobulin ve nötrofil aktive edici peptid-2 (NAP-2) in vitro endotelial hücre proliferasyonunu ve in vivo anjiyogenezi indükler (29). Bu evrenin ileriki aşamalarında makrofajlar tarafından stimüle edilerek yara kenarından veya kemik iliğinden gelen fibroblastların bazıları miyofibroblasta dönüşür (30). Epitel kaybı oluşan yaralanmalarda fibroblast ve endotelial hücrelere ek olarak epitel hücreleride sıvı kayıplarına ve enfeksiyona karşı yeniden bir engel oluşturmak üzere çoğalır. Yaralanmadan bir iki gün sonra epitel hücreleri yara kenarındaki

hasarsız epitel adacıklarından çoğalarak yara alanına doğru göç etmeye başlar (26). Epitelizasyon, aktive yara makrofajları, trombositler ve keratinositlerden salgılanan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- α (transforming growth factor- α : TGF- α) tarafından stimüle edilir (27). Epitelizasyonu pozitif olarak düzenleyen diğer faktörler, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi, epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi ve hepatosit büyüme faktörü (HGF)'dür. Bunlar, keratinositlerin migrasyonu, proliferasyonu ve hayatta kalmasını, aktivasyonu ile stimüle eden tirozin kinaz reseptörünün ligandlarıdır (30).

2.4.4.3. Matürasyon ve Yeniden Yapılanma

Endotel hücrelerinin büyük bir kısmı, makrofajlar ve miyofibroblastlar, birkaç hücre ve daha çok kollajenden ve diğer ekstrasellüler matriks proteinlerinden oluşan bir artık bırakarak, programlı hücre ölümü olan apoptozise giderler veya yara yerinden ayrılırlar (30). Bu evrenin temel özelliği yara alanına kollajen depolanmasıdır. Kollajen depolanmasının miktarı, oranı ve kalitesinin yara gerilme kuvveti üzerine olan etkileri nedeniyle bu süreç klinik açıdan en önemli evredir. İyileşmeden sonra doku bütünlüğünü devam ettiren bağ dokusunu oluşturan hücre dışı makromoleküler ara madde kollajen, elastin, fibronektin, laminin, proteoglikanlar ve hiyalüronik asitten oluşur.

Kollajenin sentez ve birikiminin yanında, oluşturulan bağ dokusunun anatomik ve fonksiyonel olarak en uygun şekli almasında önemli rol oynayan diğer faktörler kollajenazlar ve bazı proteazlardır. Yaralanmadan sonra tüm hücresel kollajen sentez ve depolanmasıyla birlikte yaradaki kollajen miktarının sabit kalması, yarada aynı anda kollajen yıkımının da olduğunun bir göstergesidir. Fibroblastlar, epitel hücreleri ve aktive makrofajlar tarafından salgılanan kollajenazlar yara alanında depolanan kollajeni yıkıp yeniden şekillendirerek yara skarının oluşmasını sağlar. Deri ve deri altını

içeren bir yarada bir yıldan fazla süren matürasyon ve yeniden yapılanma aşamasından sonra son şeklini almış yara skarındaki kollajen fibrilleri hiçbir zaman orijinal derideki gibi düzenli dağılım gösteremez (26).

Yara iyileşmesi sürecinde gelişen tüm hücresel ve biyokimyasal olayların en önemli sonucu, yara gerilim kuvvetinin maksimuma ulaşmasıdır. İyileşmenin erken döneminde gerilme kuvvetine katkıda bulunan önemli faktörler epitel hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri ve fibrin- fibronektin kompleksi arasındaki kohezyon kuvvetidir.

Kollajen fibrillerin ortaya çıkması ile yara gerilim kuvvetinin artışı hızlanır. Yara gerilim kuvveti, yara kenarındaki santimetre kare alana kilogram olarak uygulanan kuvvetle ölçülür. Deri yaralarında yara gerilme kuvveti birinci haftada % 3 iken, üçüncü hafta sonunda % 20 olur. Üç ay sonra da orijinal derinin % 80' ine ulaşır ve daha fazla artmaz. Yaranın içerdiği kollajen kadar, kollajen iç bağlarının çoğalması da yara gerilim kuvvetinin artmasında önemli rol oynar.

2.4.5. Yara Kontraksiyonu

Doku kaybı olan ve sekonder iyileşmeye bırakılan yaralarda, yarayı çevreleyen dokunun merkeze doğru hareket etmesiyle yara alanı küçültülmeye çalışılır. Yara oluşumunun 7. gününde başlayan bu hareket dört hafta kadar devam eder. Nadiren yaranın spontan kapanmasını sağlayan kontraksiyon, genellikle açık yara alanının % 80' ini kapatabilir. Yara kontraksiyonunun kontraktıl bir protein olan aktin filamentlerinden zengin miyofibroblastlar tarafından sağlandığı bilinmektedir.

2.4.6. Yara İyileşmesini Etkileyen Lokal ve Sistemik Faktörler

2.4.6.1. Lokal Faktörler:

Doku Kan Akımı (Oksijenizasyon): Yara iyileşmesini etkileyen en önemli faktördür. İyi vaskülarize olup oksijenizasyon sorunu olmayan yaralarda iyileşme hızlıdır. (32,34).

Yara yerinde hematoma ve seroma gelişimi: Yara uçlarında ayrışmayı artırması ve bakteri üremesi için ortam yaratmasından dolayı yara iyileşmesini geciktirir.(34).

Enfeksiyon

Çok Baskılı Yara Pansumanı: Yaranın kanlanması ve oksijenizasyonuna engel olacak şekilde baskılı pansuman yapılması yara iyileşmesini geciktirecektir(35).

Cerrahi Teknik: Çok sık suture koyma, suturelerin sıkı bağlanması, aşırı suture gerginliği hem yara iyileşmesini geciktirecek hem de kötü skar ve nedbe dokusuna yol açacaktır(36).

Yabancı Cisimler

Nekrotik Doku

Lokal Steroid Kullanımı

Doku Ödemi

Radyoterapi: Endotel hasarlanması (oblitere tip endarterit gelişir) yaparak, dokuda atrofi gelişimine neden olarak, yoğun fibroze neden olarak, hücre bölünmesi bozarak yara iyileşmesini yavaşlatır. Radyoterapi almış dokuda yara iyileşmesinin eski halinde iyileşebilmesi için gerekli latent periyod 6 ay- bir yıldır(34).

2.4.6.2. Sistemik Faktörler:

Yaş: Yaşın 70'i aşmış olması yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Bunun nedeni olarak kollojen dışı ekstrasellüler matriks protein yapımı azalması ve ek hastalıkların oranının artması suçlanır. Bu hasta grubunda postoperatif evisserasyon ve insizyonel herni sık görülür(33).

Anemi

Beslenme: Özellikle majör cerrahi girişimlerde metabolizma hızlanacağından yara iyileşmesi açısından beslenmenin önemi artar. Operasyon öncesi son 6 ayda vücut ağırlığının %15-25 kaybı yara iyileşmesini bozar. Hipoalbüminemi ($Alb < 3 \text{ gr/dl}$) varlığı yara ayrışma riskini artırır. Kollajen sentezinde rol oynayan C vitamini eksikliği yara iyileşmesini ve yara kontraksiyonunu olumsuz etkileyecektir. Postoperatif ideal yara iyileşmesi için gerekli C vitamini alımı 1 gr/gün 'dür. Çinko, Bakır, Mg eksikliği durumlarında ise; yara epitelizasyonu kötüdür. Kronik iyileşmeyen yaralar gelişir(33, 34).

Steroidler: Preoperatif dönemde steroid kullanımı yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Bunun nedenleri ise; - İnflamatuar cevabı bozarlar

- Kollojen lizisini arttırırlar
- Enfeksiyona normal rezistansı inhibe ederler
- Epitelizasyonu bozarlar(32, 33).

Sitotoksik ilaçlar: Özellikle methotrexate, 5FU, siklofosfamid, nitrojen mustard fibroblast çoğalmasını süprese ederek, kollojen sentezi bozarak yara iyileşmesini olumsuz etkilerler(33).

Sepsis

Diabetes mellitus: Diabetik kişilerde yara iyileşmesi kötüdür. Kontrolsüz diabette inflamasyon, anjiyogenezis ve kollajen sentezi bozulur.

Diabetin anjiyopati ve nöropatik etkileri yara yeri kan dolaşımını olumsuz etkiler (33).

Üremi: Kollojen sentezi bozarak yara iyileşmesini negatif etkiler.

Ağrı: Özellikle postoperatif ciddi ağrı adrenal ve noradrenalin deşarjı yapar. Buda vazokonstriksiyona yol açarak yara yeri beslenmesini olumsuz etkiler (33, 34).

Konnektif doku metabolizma bozukluğu yapan genetik hastalıklar: Osteogenezis İmperfekta, Ehler Danlos Sendromu, Marfan Sendromu, Epidermolizis Bülloza

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız üniversitemiz Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi (Proje No:2014-157) tarafından desteklenmiştir

3.1. STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması Ve Kültürü

3.1.1. Jelatinle Kaplı Kültür Kaplarının Hazırlanması

Jelatin (G-9391, Sigma, St. Louis, USA) % 0.1 oranında distile su ile hazırlandıktan sonra otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığındaki jelatin hava akışlı kabin içerisinde her bir 10 cm' lik steril doku kültür kaplarına 5' er ml jelatin solüsyonu konarak, tüm yüzeyin jelatin ile kaplanması sağlandı. 37° C % 5 CO₂' li inkübatörde 2 saat bekletildikten sonra hava akışlı kabin içerisinde jelatin solüsyonu steril pipet yardımı ile aspire edildi. Bu şekilde hazırlanan kültür kapları sterilitesi bozulmadan sarılarak +4° C' de kullanılıncaya kadar tutuldu. En fazla 15 gün bekletilen kültür kapları ihtiyaca göre tekrar yapıldı.

3.1.2. STO Hücrelerinin Kültürü

Stok fare fibroblast hücreleri (STO, 86032003, ECACC) sıvı azot tankından alındıktan sonra hücreler direkt olarak 37° C sıcak su banyosu içerisinde çözülmesi sağlandı. Stok hücre (1 ml), 5 ml STO kültür vasatı [4500mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco' s modified Eagle' s

medium (DMEM, BE12-614F, Lonza, Basel, İsviçre) , % 15 fotal sıır serumu (FBS, FBS-12B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), % 1 L- glutamin (BE,17-605E, Lonza, Basel, İsviçre), % 1 Penisilin/streptomisin (PS-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya)] ierisine alındı. Hücreler 15 ml' lik falkon tüpleri ierisinde 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi ve üstte kalan kısım atılarak hücre peletine 3 ml yeni hazırlanmış STO költür vasatı ilave edildi. Hücreler pipetaj yapılarak 3 költür kabına dağıtıldı, 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde her iki günde bir költür vasatı değiştirilerek hücreler konfluent oluncaya kadar költüre edildi (yaklaşık 1 hafta). Konfluent olan STO hücreleri 2 ml tripsin/EDTA (03-052-1B, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) solüsyonu ile 5 dk. 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin költür kabından kaldırılması sağlandı. Hücrelerin kalktıkları kontrol edildikten sonra her bir költür kabının ierisine 2 ml STO költür vasatı ilave edildi. Hücreler toplanarak 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi ve hücrelerin üst kısmında bulunan költür vasatı atılarak 3 ml yeni STO költür vasatı ilave edildi. Bir költür kabından elde edilen hücreler 3 adet yeni költür kabına bölünerek STO hücrelerinin költürü sağlandı. Her hafta STO hücreleri konfluent olduktan sonra bu şekilde költüre edilerek yeterli sayıda hücre elde edilmeye kadar STO hücrelerinin költürüne devam edildi.

3.1.3. STO Hücrelerinin Mitomisin-C İle Muamele Edilmesi

STO hücreleri konfluent olduktan sonra, költür kabındaki vasatın yarısı alındı ve her bir költür kabında 20 µg/ml mitomisin-C (A2190,0002, Applichem, Darmstadt, Germany) olacak şekilde ilave edilerek 1,5 saat 37° C' de % 5 CO₂ ' li ortamda inkübe edildi. Mitomisin-C ieren költür vasatı aspire edildi ve hücreler steril fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution, L1825, Biochrom AG, Berlin, Germany) ile 2 defa yıkandı. Daha sonra 5 ml STO költür vasatı ilave edildi. Mitomisin-C ile inkübe edilmiş STO hücreleri embriyonik kök hücre költürleri ile eş zamanlı yapıldı.

3.2. Embriyonik Kök Hücre Kültürü

Embriyonik kök hücre hattı (CGR8, 07032901, ECACC) kuru buz üzerinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra hücreler bekletilmeden 37° C sıcak su banyosu içerisinde çözülmesi sağlandıktan sonra 1 ml hücre 5 ml embriyonik kök hücre (EKH) kültür vasatı [4500 mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM, BE12-614F, Lonza, Basel, İsviçre) , % 15 fetal sıgır serumu (FBS, FBS-12B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), % 1 L-glutamin (BE,17-605E, Lonza, Basel, İsviçre), % 1 Penisilin/streptomisin (PS-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), 0.1 mM Non-essential amino asid (NEAA, BE13-114E, Lonza, Basel, İsviçre), 10⁻⁶ M β-mercaptoethanol (M7522, Sigma, St. Louis, USA), 2 mM L-glutamine ve 1000 U/ml lökemia inhibitor faktör (LIF, L5158, Sigma, St. Louis, USA)] içerisinde alındı. Hücreler 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım atılarak hücre peletine 3 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek pipetaj yapıldı ve hücrelerin eşit miktarda dağılımı sağlandıktan sonra mitomisin-C ile muamele edilmiş STO hücreleri üzerine konularak kültüre edildi. Her iki günde bir kültür vasatları değiştirilerek oluşan koloniler inverted mikroskobu (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) altında değerlendirildi.

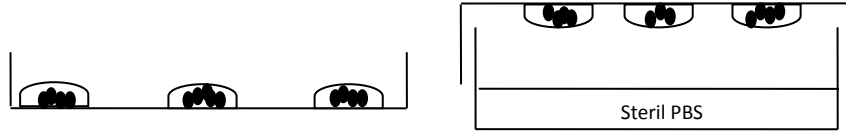
3.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Pasajlanması

Mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri üzerinde koloni oluşturmuş embriyonik kök hücrelere 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu konarak 5 dk. 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kültür kabından kalktıkları kontrol edildikten sonra üzerine 2 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek tripsin/EDTA etkisinin durdurulması sağlandı. Hücreler 15 ml' lik tüplere toplanarak 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi. Hücrelerin üst kısmında

bulunan kültür vasatı atılarak 3 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek pipetaj yapıldı ve hücrelerin eşit miktarda dağılımı sağlandıktan sonra daha önce hazırlanmış 3 adet mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri üzerine eşit miktarda hücreler dağıtıldı. EKH' ler 7 günde bir olmak üzere 6 kez pasajlandı.

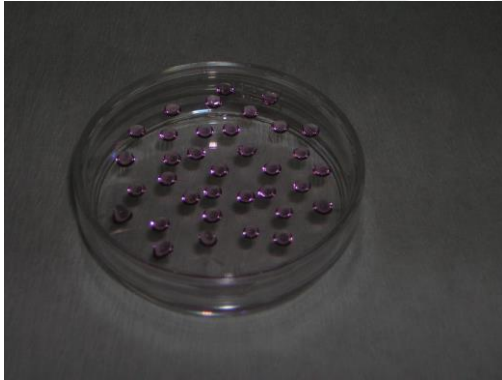
3.2.2. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması

Mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri üzerinde koloni oluşturmuş embriyonik kök hücrelere 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu konarak 5 dk. 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde bekletildi. Bu aşamada kültür kabından kalkan hücrelerin üzerine 2 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek tripsin/EDTA etkisinin durdurulması sağlandı. Hücreler 15 ml' lik tüplere toplanarak 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi. Hücrelerin üst kısmında bulunan kültür vasatı atılarak tekrar 5 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 ml embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasını önleyen lökemia inhibitor faktörü içermeyen EKH farklılaştırma kültür vasatı (DMEM, %15 FBS, 0,1 mM NEAA, 2 mM L-glutamine, 10⁻⁶ M β-mercaptoethanol ve % 1 Penisilin/streptomisin) ilave edilerek pipetaj ile hücrelerin eşit dağılımı sağlandı. Embriyonik kök hücrelerden embriyoblastların oluşturulmasında hanging drop yöntemi kullanıldı. Hanging drop yönteminde 2 cm' lik kültür kabının kapağı üzerinde 1 ml' sinde 5x10⁴ farklılaşmamış hücre bulunan farklılaştırma kültür vasatından 10 µl' lik damlalar oluşturuldu (Şekil 3.1, Resim 3.1). Kültür kabı içerisine steril PBS konularak, damlalar oluşturulmuş kültür kabı kapağı kapatılarak embriyonik kök hücrelerinin farklılaştırılması sağlandı.



Şekil 3.1: Hanging Drop Yönteminin Çizimsel Açıklaması

Hanging drop yöntemi kullanılarak oluşturulan damlalar 2 gün 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde bekletildikten sonra farklılaştırma kültür vasatı ilave edilerek embriyoblastlar toplandı. Embriyoblastlar jelatin ve STO fare fibroblast hücreleri içermeyen kültür kabına aktararak kültüre devam edildi. Kültür kaplarına aktarıldıktan sonra 4 gün kültüre edilerek yeterli büyüklüğe ulaşmaları sağlanan embriyoblastlar keratinosit farklılaştırma kültür vasatına alındı.



Resim 3.1: Hanging Drop Yöntemi ile oluşturulan kültür ortamı. X100

3.3. Embriyoblastlardan Keratinosit Kültürü

3.3.1. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması

Steril edilmiş 12 mm çapında yuvarlak lameller (0111520, Marienfeld Lab., Königshofen, Germany) 24 gözlü kültür kabına yerleştirildi. Matrijel

(354234, BD Biosciences, Massachusetts, USA) benmari usulü eritilerek, DMEM ile 1/100 oranında dilüe edildi (Resim 3.2). Dilüe edilen matrijel, 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözünde 500 µl olacak şekilde daha önce yerleştirilen yuvarlak lamellerin üzerine ilave edildi. Oda sıcaklığında ve steril ortamda 1 saat bekletildikten sonra kültür kaplarındaki matrijel fazlası alınarak, 4. günün sonunda yeterli büyüklüğe ulaşan embriyoblastlar transfer edildi. Embriyoblastların 2 gün matrijele yapışması beklendi ve kültürün 3. gününden itibaren 24 gözlü kültür kabının her bir gözüne 0.5 nM kemik morfogenetik proteini-4 (BMP-4, B2680, Sigma, St. Louis, USA) olacak şekilde 10 gün boyunca her gün BMP-4 ilave edilerek hücrelerin keratinosite farklılaşmaları sağlandı.



Resim 3.2: Matrijel ve hazırlanışı. X10

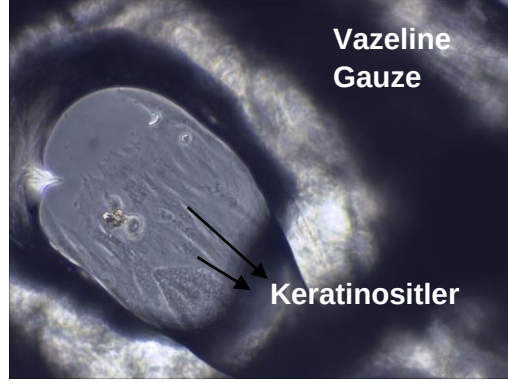
3.3.2. Keratinositlerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile Tanımlanması

Farklılaştırılan hücrelerin keratinosit olduklarının belirlenmesi amacı ile hücrelerden bir kısmının kültür vasatı uzaklaştırılarak bir defa steril PBS ile yıkandıktan sonra % 4' lük paraformaldehit ile 30 dk. tespit edildi. Tespit işleminden sonra 3 kez 5 dk. PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk. % 3' lük hidrojen peroksit (H_2O_2 , K31355100, Merck, Darmstadt, Germany) uygulandıktan sonra, hücreler 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için hücreler % 0,1 Triton-X 100 (A4975,0100, Applichem,

Darmstadt, Germany) ile 15 dk. buz üstünde inkübe edildi ve 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra 1 saat bloklama solüsyonu (85-9043, Invitrogen, California, USA) konarak bekletildi. 1/ 25 dilüsyonda monoklonal anti-sitokeratin-8 (sc-101459, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) ve monoklonal anti-sitokeratin-14 (sc-53253, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) antikorları ile bir gece +4 C⁰ de inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkanan hücreler anti-mouse ve anti-rabbit biotinlenmiş ikincil antikor (85-9043, Invitrogen, California, USA) ile 30 dk. inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5' er dk. yıkanan hücreler streptavidin hidrojen peroksidaz (85-9043, Invitrogen, California, USA) ile 30 dk. bekletildikten sonra tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere diaminobenzidine (DAB, 002014, Invitrogen, California, USA) kromojeni 5 dk. uygulandı ve distile su ile 15 dk. yıkandı. Mayer's Hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile 5 dk. boyama yapıldıktan sonra hücreler distile su ile 15 dk. yıkanarak direkt olarak kapatma medyum (DMM-125, Spring Bioscience, Fremont, CA) ile kapatıldı ve Olympus marka BX 40 mikroskop ile incelendi.

3.3.3. Keratinositlerin Vaseline Gauze Üzerinde Kültüre Edilmesi

Yara yerine hücrelerin transfer edilebilmesinde kullanılan mesh, steril vazeline gauze (8884423600, Tyco Healthcare, Mansfield, USA), hava akışlı kabin içinde steril makasla 24 gözlü kültür kaplarının gözlerine uyacak şekilde kesilerek önceden 1 ml kültür vasatı konmuş kültür kabının gözlerine yerleştirildi. Her bir gözdeki vazelin gauze üzerinde 5×10^3 hücre/ml olacak şekilde hücreler ilave edildi. Vazelin gauze üzerindeki hücreler 5 gün süre ile inkübe edildi ve inverted mikroskop altında incelendi (IX71 Olympus, Tokyo, Japan) (Resim 3.3).



Resim 3.3: Vaseline Gauze üzerindeki keratinositler. X400

3.4. Keratinositlerin Yara Yerine Transferi

Bulb C tipi 64 adet fare Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Her bir grupta 16 adet fare olacak şekilde ayrıldı.

Gruplar:

Grup 1: Steroid + Hücre Grubu (Cerrahi işlemden 3 gün önce steroid uygulandı ve cerrahi yara oluşturulduktan sonra mesh+hücre uygulandı)

Grup 2: Yara + Hücre Grubu (Sadece cerrahi yara oluşturulduktan sonra mesh+hücre uygulandı)

Grup 3: Steroid + Yara (Cerrahi işlemden 3 gün önce steroid uygulandı ve cerrahi yara oluşturulduktan sonra pansuman uygulandı)

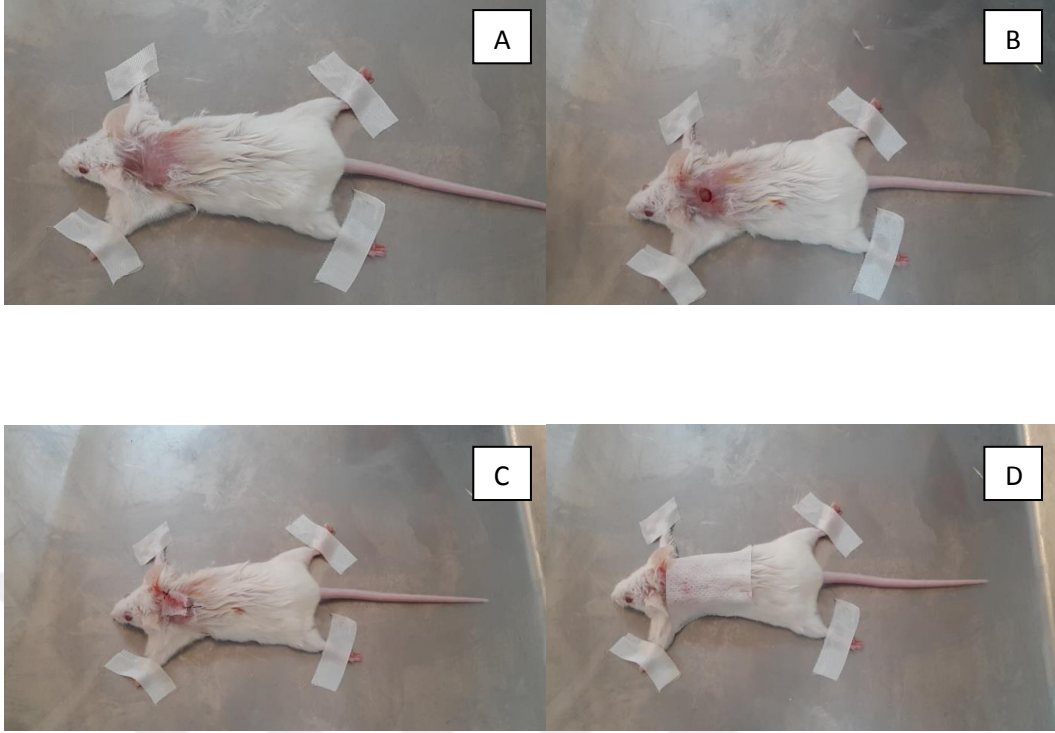
Grup 4: Yara (Sadece cerrahi yara oluşturuldu)

Her bir gruptan 1, 5, 10, ve 21. günlerde örnekler alındı. O nedenle her bir grup için gün bazında 4 denekten örnek alındı.

Grup 1 ve Grup 3 teki fareler cerrahi işlemden 3 gün önce 2 mg/kg dekzametazon (Dekort, Deva Holding A.Ş. İstanbul, Türkiye) intramuskuler

olarak uygulandı. Cerrahi işlem uygulanacak farelere 80-100 mg/kg ketamin (Ketalar, 002038, Eczacıbaşı Sağlık Ürünleri Sanayi ve Ticaret AŞ., Lüleburgaz, Türkiye) ve 5-10 mg/kg xylazin (Alfazyne, 0804125-11, Alfasan, Woerden, Holland) olacak şekilde intramuskuler olarak işlemden hemen önce uygulandı. Farelerin ense bölgesi traş bıçağı ile kıllar uzaklaştırıldıktan sonra, steril % 0.9 serum fizyolojik (SF) ile temizlendi (Resim 3.4 A). Tüm gruptaki deneklerde steril cerrahi set kullanılarak farenin kıllardan uzaklaştırılan ense bölgesinde 0.5x0.5 cm boyutlarında epidermis ve dermisi içeren yara yeri oluşturuldu (Resim 3.4 B). Grup 3 ve Grup 4' deki deneklere cerrahi işlemden sonra ve sadece vazeline gauze konarak kapatıldı. Grup 1 ve Grup 2' deki deneklerde yara yerine üzerinde kültüre edilen keratinositler bulunan vazeline gauze konarak kapatıldı. Keratinositler yara yeri üzerine gelecek şekilde vazeline gauze konduktan sonra saat 6 ve 12 yönünde sağlam deri ile birlikte suture edildi (Resim 3.4 C). Yara yerleri steril SF' li gazlı bez konarak betafix (5502, Betasan, Kocaeli, Türkiye) ile tespit edilerek kapatıldı (Resim 3.4 D).

Tüm gruptaki deneklerden 1., 5., 10. ve 21. günlerde yara bölgesi ve sağlam deriyi içeren biyopsi örnekleri alınarak ışık mikroskopik inceleme için % 10 formalin solüsyonuna kondu.



Resim 3.4: Uygun anestezi uygulandıktan sonra ense bölgelerindeki kıllar tüy dökücü krem ile uzaklaştırılan ve tespit edilen denek (A), yara yeri oluşturulduktan sonra (B), yara yerine mesh+hücrelerin transfer edilip denek cildine tespit edildikten sonra (C), pansumanı yapılarak betafix ile kapatıldıktan sonra (D).

3.5. Işık Mikroskopik İnceleme

Denekler her gün pansumanları yapıldıktan sonra 1., 5., 10. ve 21. günlerde örnek alındıktan sonra sakrifiye edildi. Yara yeri ve sağlam deriyi içeren örnekler % 10' luk formalin solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm' lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilen-eozin (H-E) boyaması yapıldı. Yara iyileşmesinin moleküler analizi için, EGF (sc-1343, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), FGF-2 (sc-79, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), IL-1 β (sc-7884, Santa Cruz

Biotechnology, Heidelberg, Germany), MCP-1(sc-1785, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), kollajen-1A1 (sc-25974, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), MMP-2 (sc-13595, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), MMP-9 (sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), IL-10 (sc-1783, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), HIF-1 α (sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), TNF α (sc-52746, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany),dağılımları indirekt immunohistokimya yöntemi ile incelendi.

3.5.1. Parafin Doku Takibi

Tespit edilen deri örnekleri, tespit solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30' ar dakika % 60' dan % 80' e artan etil alkol serilerinden geçirildi. % 95 alkol içerisinde 1' er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1' er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dakika 60° C' lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo 3.1). Alınan 5 μ m' lik kesitlere histokimyasal inceleme için hematoksil-eozin, immunohistokimyasal inceleme için indirekt immunoperaksidaz boyaması yapıldı.

Tablo 3.1 Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece

Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 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	

3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm' lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95' den % 60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk. boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk. Akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk. akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk. eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter

Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk. akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilenle tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	30 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika

Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.5.3. İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Alınan deri kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95' ten % 60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Dakopen (008877, Invitrogen, California, USA) ile sınırlandırılan % 0,5' lik tripsin (00-3008, Invitrogen, California, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidadını inhibe etmek amacıyla 5 dk. % 3' lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solüsyonu (85-9043, Histostain plus kit, Invitrogen, California, USA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-EGF (sc-57088, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-IL-8 (sc-73321, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-FGF-1 (sc-1884, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-FGF-2 (sc-79, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), MCP-1(NB110-2000, Novus Biologicals, Littleton, USA) ve anti-kollajen-1 (sc-59772, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (Tablo 3.6) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidad ikincil antikor (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 30' ar dakika boyandı. Yine üç defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, 002014,

Invitrogen, California, USA) ile 5 dk. boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk. yıkanan kesitler kapatma medyumunu (DMM-125, Spring Bioscience, Fremont, CA) ile kapatıldı (Tablo 3.5)

İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 3.5 İndirek İmmunohistokiya Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	15 dakika
	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika

Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	10 dakika
Antikor ile inkübasyon	MMP2, MMP9, IL1 β , TNF α , MCP1, HIF1 α . FGF2, EGF, COL1A, IL10	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Zıt Boyama	Mayer' s hematoksilen	15 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Kapama	Kapatma mediumu	

Tablo 3.6: Çalışmada Kullanılan Primer Antikorlar

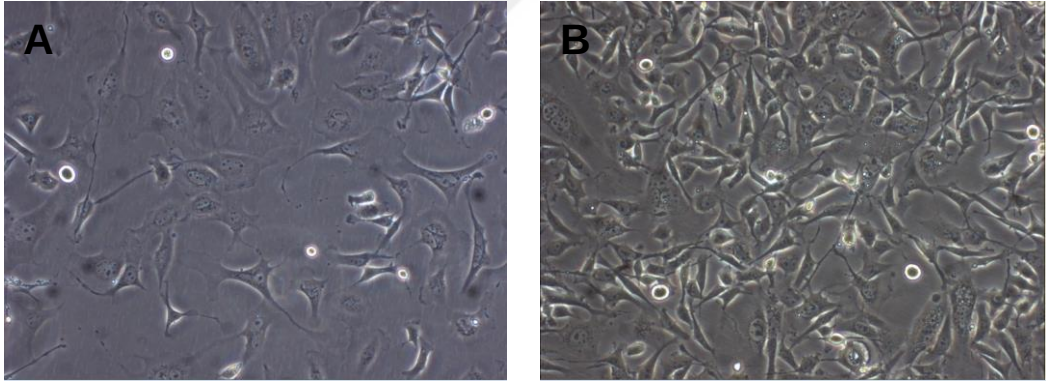
Antikor Adı	Katalog No	Türü	Firma	Dilasyon
Sitokeratin-8	sc-101459	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
Sitokeratin-14	sc-53253	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
EGF	sc-1343	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
TNF α	sc-52746	Goat Poliklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
FGF-2	sc-79	Rabbit Poliklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
MCP-1	sc-1785	Rabbit Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
Kollajen-1A1	sc-25974	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
IL-1 β	sc-7884	Rabbit Poliklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
IL-10	sc-1783	Goat Poliklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
MMP-9	sc-6840	Goat Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
HIF-1 α	sc-53546	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100
MMP-2	sc-13595	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/100

¹ Heidelberg, Germany

IV. BULGULAR

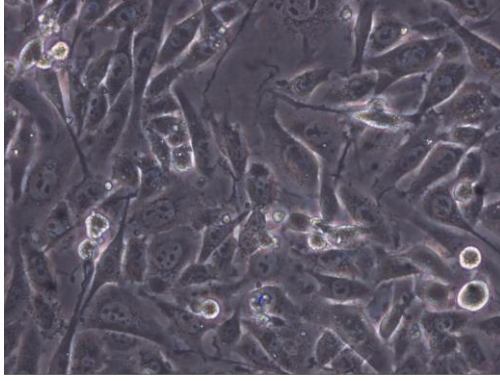
4.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü

Fare fibroblast hücreleri, stoktan alınarak STO kültür vasatı içinde iki günde bir kültür vasatı değiştirilerek konfluent oluncaya kadar kültüre edildi (Resim 4.1 A). STO hücrelerinin fibroblast benzeri hücreler olmasından dolayı, fuziform şekilli ve ökromatik çekirdeğe sahip oldukları gözlemlendi. Hücreler kültüre edildiklerinde hızla çoğaldıkları ve kültür kabının tabanını tamamen kapladıkları izlendi. Konfluent olan STO hücreleri (Resim 4.1 B) 7 günde bir pasajlanarak yeterli sayıda hücre elde edilinceye kadar kültüre devam edildi.



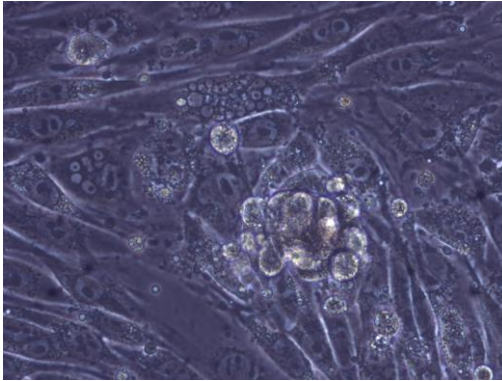
Resim 4.1: Kültürün 2. gününde (A) ve 7. gününde (B) fare fibroblast hücreleri. X100

Konfluent olan STO hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe etmek amacı ile mitomisin-C uygulanmasından sonra hücrelerin canlılıklarını korudukları ve konfluent olarak kaldıkları saptandı (Resim 4.2).

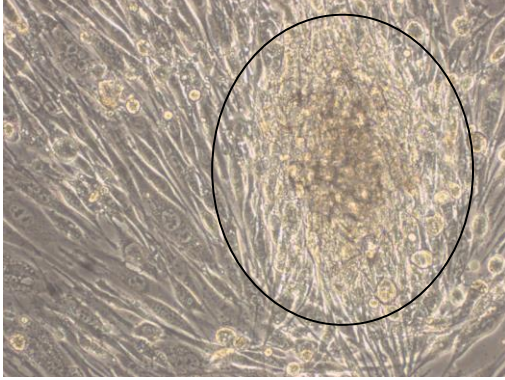


Resim 4.2: Mitomisin-C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri (kültürün 7. günü). X200

Embriyonik kök hücreler mitomisin-C uygulanmış fare fibroblast hücreleri üzerinde kültüre edildi. İki günde bir kültür vasatları değiştirildikten sonra incelenen hücrelerin alttaki fibroblast hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilen, küçük koloniler oluşturmaya başladıkları izlendi (Resim 4.4). Embriyonik kök hücreler kültür kabının yüzeyine doğru çoğaldıkları için oluşan kolonilerin, fare fibroblast hücrelerinden keskin sınırlarla ayrıldıkları ve sıkıca birbirine yapışmış oldukları gözlemlendi (Resim 4.5).



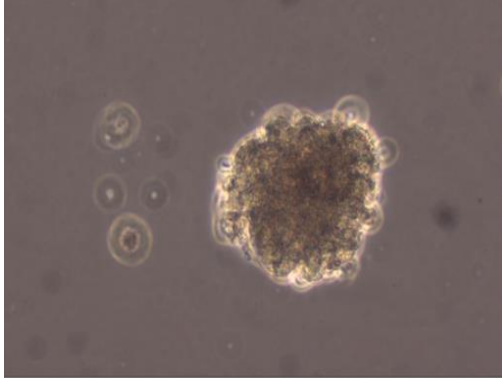
Resim 4.4: Mitomisin-C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerinde kültürün 1. günündeki embriyonik kök hücre kolonileri. X200



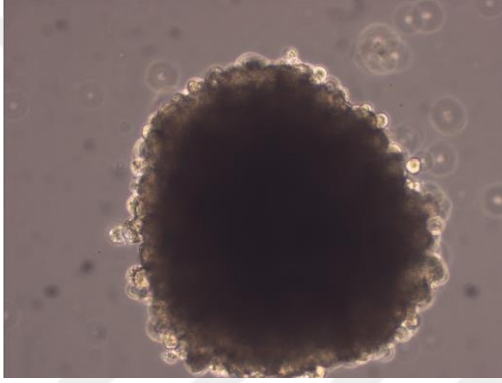
Resim 4.5: Kültürün 5. gününde mitomisin-C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerindeki embriyonik kök hücre kolonileri. X100

4.2. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması

Embriyonik kök hücrelerden hanging drop yöntemi kullanılarak elde edilen embriyoblastların, tek tek hücrelerden ziyade hücrelerin bir araya gelmesinden oluşan, k lt r vasatı içerisinde yüzen, yuvarlak şekilli, düzensiz kont rlere sahip oldukları izlendi (Resim 4.6). Embriyoblastlar 4 gün süre ile kültüre edilerek yeterli büyüklüğe ulaşmaları sağlandı (Resim 4.7). Oluşan embriyoblastlarda hem d   hem de i  tabakayı oluşturan hücreler ayırt edilmekteydi (Resim 4.7). D   tabakadaki hücrelerin belirgin biçimde küboidal şekilli yüzey ektodermine benzer tek tabakalı hücrelerden oluştuğu gözlendi (Resim 4.7).



Resim 4.6: Hanging drop yöntemi ile oluşturulan embriyoblast. X100

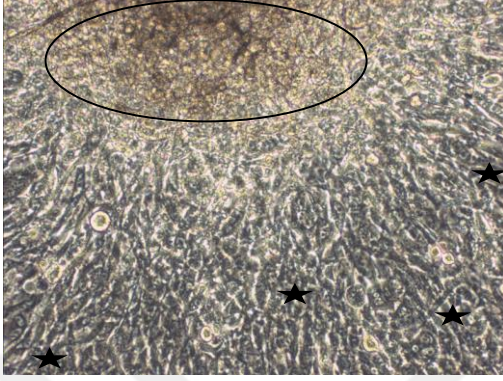


Resim 4.7: Hanging drop yönteminden sonra kültürün 5. günündeki embriyoblast. X100

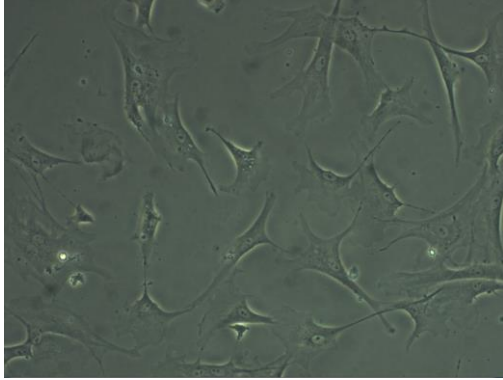
4.3. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması

Matrijel ile kaplı kültür kaplarına elde edilen embriyoblastlar transfer edildi. Embriyoblastların matrijele yapışması için 2 gün beklendi. Kültürün 3. gününden itibaren kültür ortamına BMP-4 ilave edilerek hücrelerin ektodermal seriyeye farklılaşması sağlandı. Hücrelerin BMP-4 ilavesi ile bir kısmı fuziform şeklinde izlenirken, diğer hücrelerin epitelooid şekilde oldukları gözlemlendi (Resim 4.9). Farklılaşan hücreler tekrar yeni matrijel üzerinde kültüre edilerek çoğalmaları sağlandı (Resim 4.10) ve epitelooid şeklindeki hücrelerin fuziform şekilli hücrelere göre sayıca artmış olduğu saptandı

(Resim 4.10). Fuziform hücrelerin farklılaşmamış hücreler olabilecekleri, epitelooid şekilli hücrelerin ise farklılaşmış keratinositler olduğu düşünüldü (Resim 4.10).



Resim 4.9: Matrijel üzerinde BMP-4 içeren ortamda kültüre edilen embriyoblast ve farklılaşan hücreler (). X100

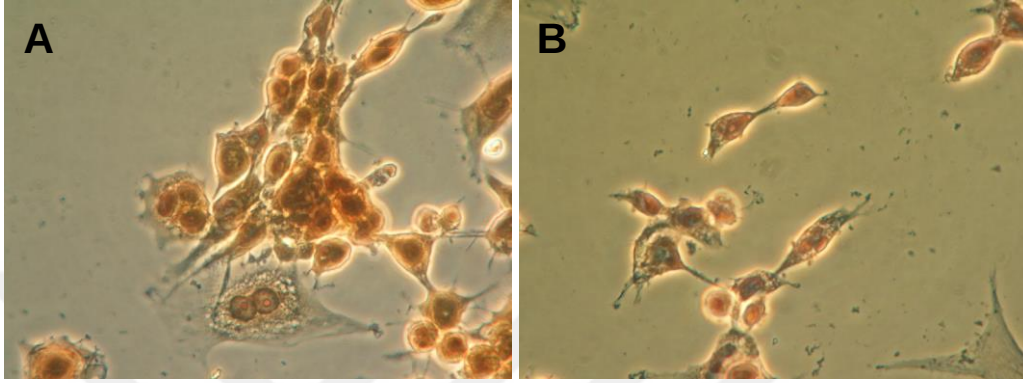


Resim 4.10: BMP-4 içeren ortamda kültüre edilmiş embriyoblastlardan oluşturulan yeni pasaj. X100

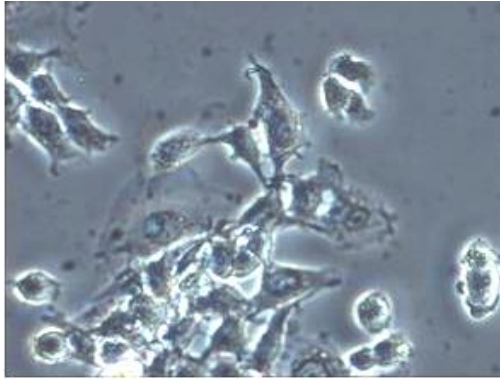
4.4. Keratinositlerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi İle Tanımlanması

Embriyonik kök hücrelerinin BMP-4 ilavesi ile keratinositlere farklılaştırılması ile elde edilen hücrelerin karakterizasyonu için, erken dönem

keratinosit farklılaşma belirteci olan sitokeratin-8' in esas olarak farklılaşmaya başlamış hücrelerde pozitif olduğu gözlemlendi (Resim 4.11 A). Geç dönem keratinosit farklılaşma belirteci sitokeratin-14' ün dağılımının zayıf, ama özellikle epiteloid şekildeki hücrelerde pozitif olduğu saptandı (Resim 4.11 B). Kontrol immunohistokimya boyaması negatif idi (Resim 4.12).



Resim 4.11: Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerde sitokeratin-8 (A) ve sitokeratin-14 (B) immunoreaktivitesi. X400

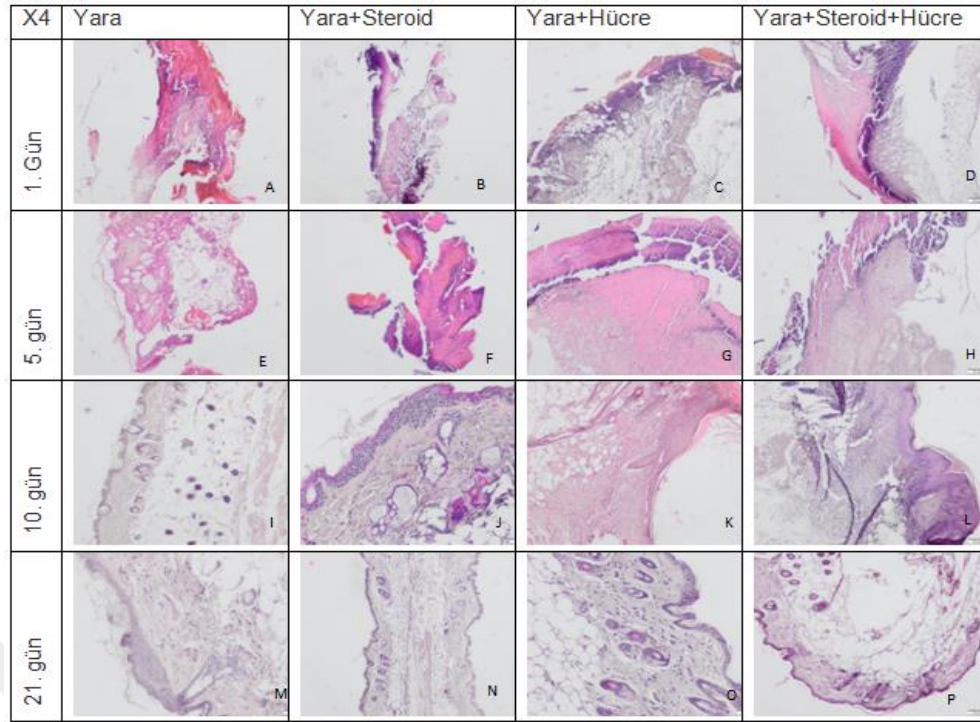


Resim 4.12: Kontrol immunohistokimya boyaması. X200

4.5. Yara Yerine Transfer Edilen Keratinositlerin Işık Mikroskopik İncelenmesi

4.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Değerlendirmesi

Örnekler temel histolojik yapının değerlendirilmesi amacıyla hematoksilen-eozin boyası yapılarak incelendi. Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında, cerrahi yara oluşturulduktan sonraki 1. günde yara oluşturulan bölgede, epidermisin kaybı ile birlikte polimorf nüveli lökosit (PNL) infiltrasyonu, trombosit ve fibrin pıhtısını içeren eksudanın oluşumu gözlemlendi (Resim 4.13A-D). Cerrahi yaranın bittiği yerden ise epidermisin devam ettiği, deri eklerinin ve dermisin korunduğu izlendi (Resim 4.13 A-D). Yara oluşumundan sonraki 1. ve 5. günde Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında polimorf nüveli lökositlerin yara yerine hakim olduğu (Resim 4.13A-H)., 10. günde ise makrofajların yara yerinde esas hücreler olduğu belirlendi (Resim 4.13I-L). Ayrıca yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında 5. ve 10. günlerde sağlam doku ile yara yeri sınırında mast hücreleri ve 5. günden itibaren yara yüzeyinin altında vaskülaritede artış saptandı (Resim 4.13E-L). Yara yeri kenarında yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre grubunda 10. günde sağlam epidermisin bazal hücrelerinin proliferasyon olarak yara kenarındaki epidermisin kalınlaştığı ve bazal hücrelerin krut altında epitelizasyonu sağlamak üzere göç ettiği izlendi (Resim 4.13I-L). Tüm gruplarda 21. günde yara yerinde epitelizasyonun tamamlandığı, epidermisin çok katlı yassı epitel özelliğinde ve dermisin ekleri ile birlikte histolojik olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi (Resim 4.13M-P)



Resim 4.13: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerin hematoksilin-eozin boyaması.

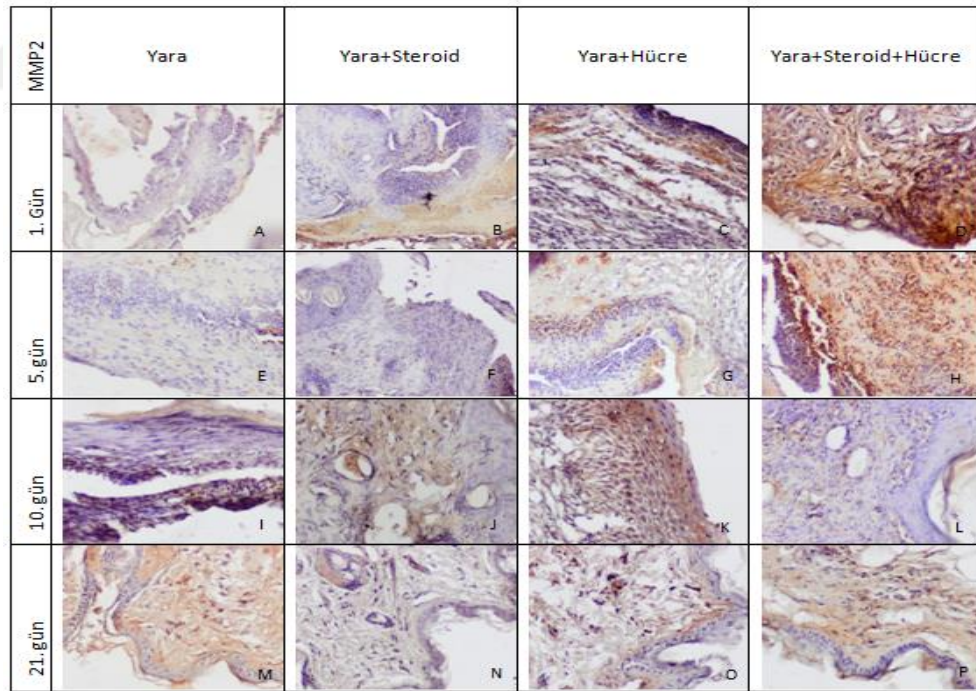
4.5.2. İndirekt İmmunohistokimya Uygulamasının Değerlendirilmesi

Embriyonik kök hücreden farklılaştırılan keratinositlerin farede oluşturulan cerrahi yaraya implantasyonundan sonra 1., 5., 10. ve 21. günlerde alınan örneklerin MMP2 (matriks metalloproteinaz 2), MMP9 (matriks metalloproteinaz 9), IL1 β (İnterlökin 1 beta), TNF α (Tümör nekrozis faktör alfa), MCP1 (Monosit kemoatraktan protein), HIF1 α (Hipoksi ile induklene faktör 1 alfa), FGF2 (Fibroblast growth faktör 2), EGF (Epidermal growth faktör), COL1A (Kollajen 1 A), IL10 (İnterlökin 10) dağılımı indirekt immunohistokimya tekniği kullanılarak değerlendirildi.

4.5.2.1. MMP2 Dağılımı:

MMP2 immunoreaktivitesi 1. gün yara+steroid+hücre grubunda en fazla iken, 5., 10. ve 21 günlerde immunoreaktivitenin giderek azaldığı saptandı. Yara+hücre grubunda, MMP2 immunoreaktivitesinin, yara+steroid+hücre grubundakine nazaran daha az olmakla beraber yara ve yara+steroid grubuna oranla tüm günlerde daha fazla olduğu izlendi. Bununla beraber sadece yara oluşturulan grupta MMP2 immunoreaktivitesi 1 ve 5. günlerde zayıf iken 10. ve 21. günlerde diğer günlere nazaran arttığı en fazla 21. günde olduğu saptandı. MMP2 immunoreaktivitesinin, yara+steroid+hücre, yara+steroid ve yara+hücre gruplarında ise gün bazında azaldığı görüldü (Resim 4.14).

Yara yerine hücre ilave edilen gruplarda erken dönemde ilave edilen hücrelerin MMP2' nin salınımını tetiklediği düşünüldü.

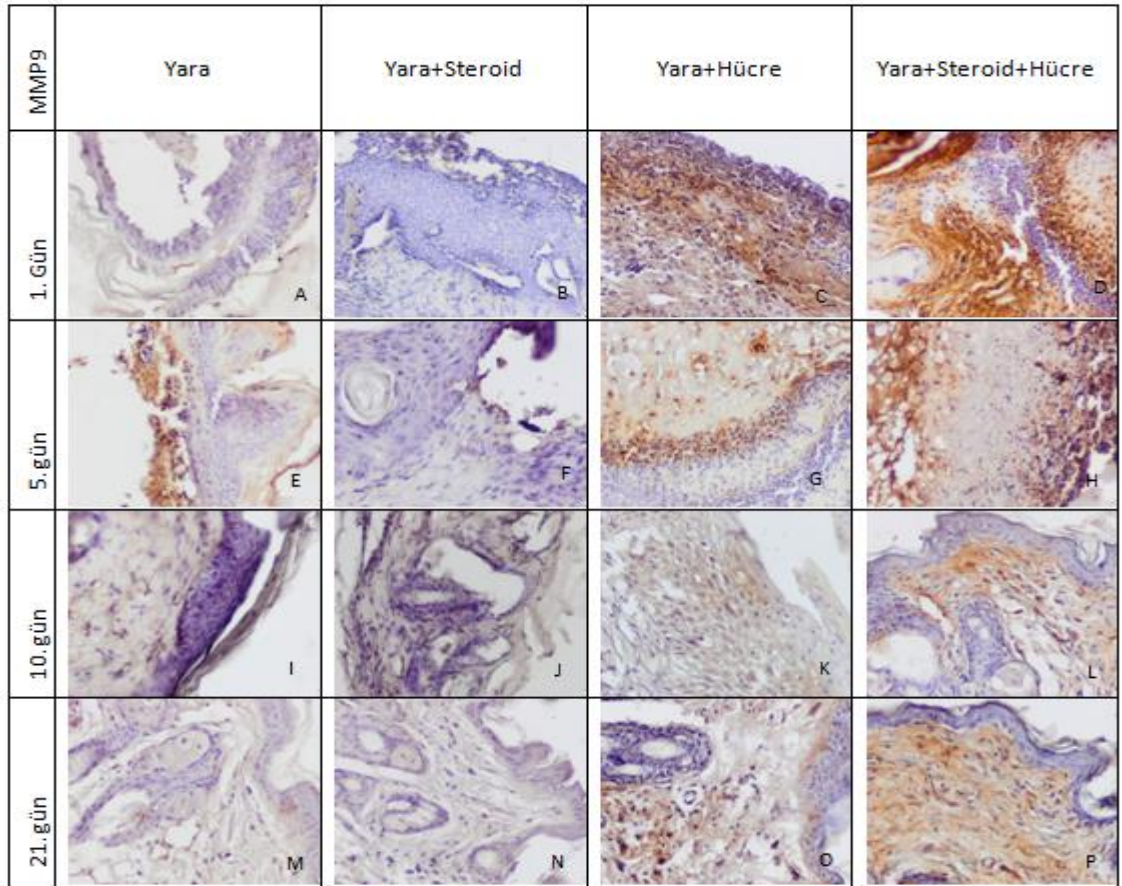


Resim 4.14: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara + steroid + hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki MMP2 immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.2. MMP9 Dağılımı:

MMP9 immunoreaktivitesinin, yara ve yara+steroid gruplarında tüm günlerde zayıf veya negatif iken yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında 1. günde MMP9 immunoreaktivitesinin olduğu ve diğer gruplara nazaran daha şiddetli olarak gözleendiği, gün bazında ise immunoreaktivitenin azalarak devam ettiği saptandı (Resim 4.15).

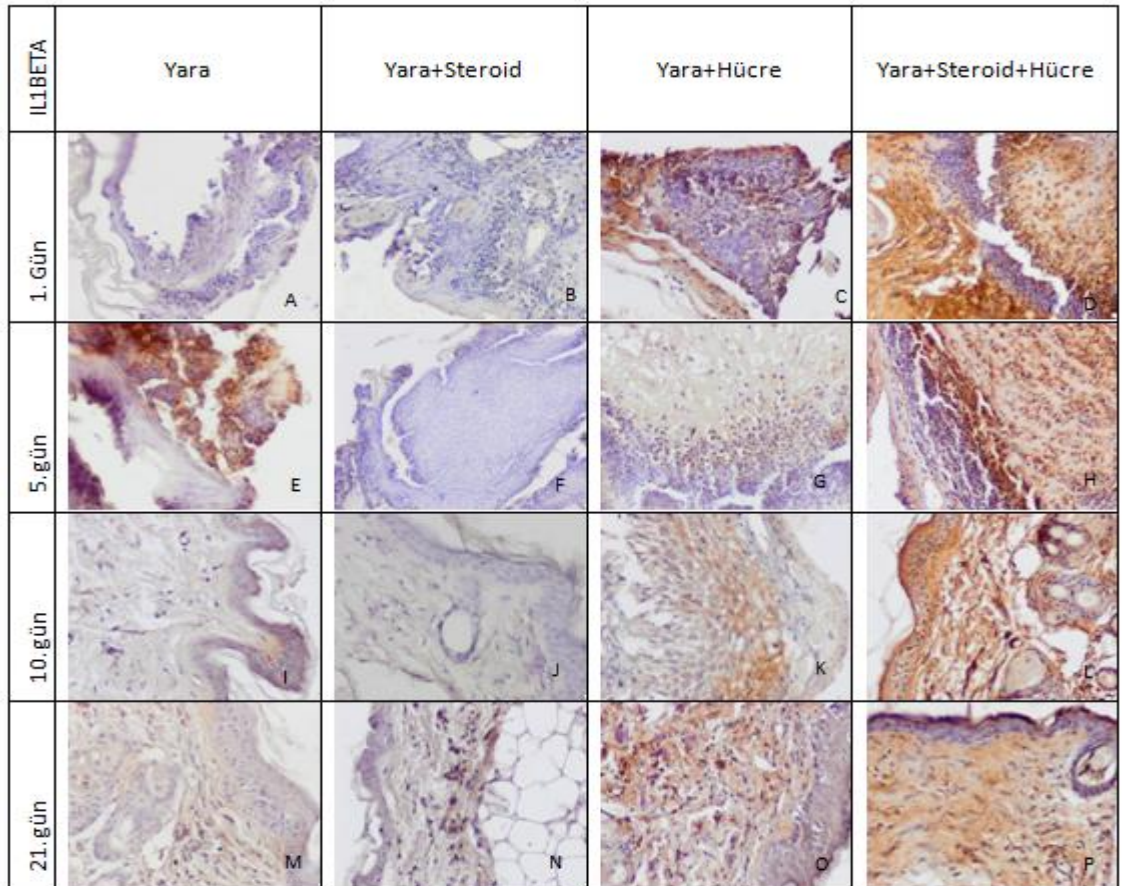
MMP9 dağılımının MMP2 dağılımı ile uyumlu olduğu izlendi.



Resim 4.15: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki MMP9 immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.3. IL1 β dağılımı:

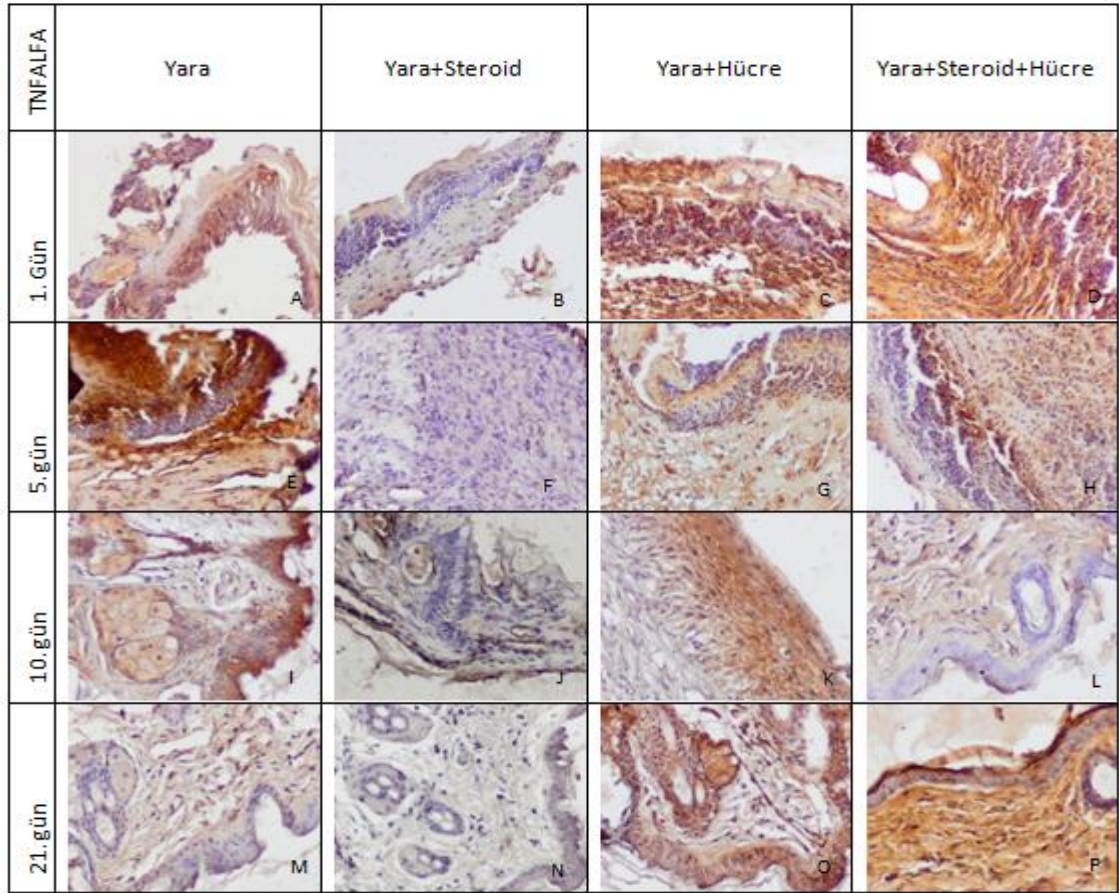
IL1 β immunoreaktivitesinin, yara grubunda 1. ve 10. günlerde zayıf, 5. günde şiddetli 21. günde ise orta şiddette olduğu izlendi. Yara+steroid grubunda ise steroid uygulamasının IL1 β immunoreaktivitesini baskıladığı 1, 5 ve 10. günlerde negatif 21. günde zayıf şiddette olduğu izlendi. Yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında ise IL1 β immunoreaktivitesinin 1. günden itibaren olduğu ve 5, 10 ve 21. günlerde de devam ettiği ve IL1 β immunoreaktivitesinin şiddetinin yara+steroid+hücre grubunda yara+hücre grubuna göre daha fazla olduğu saptandı (Resim 4.16).



Resim 4.16: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki IL1 β immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.4. TNF α Dağılımı:

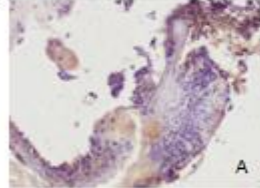
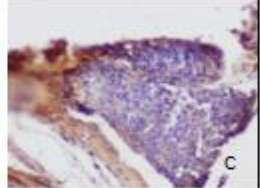
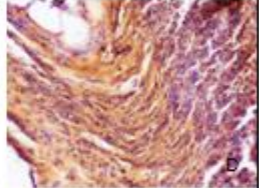
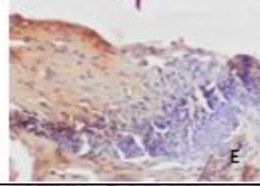
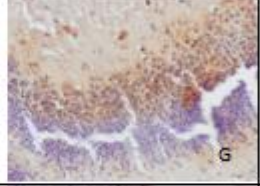
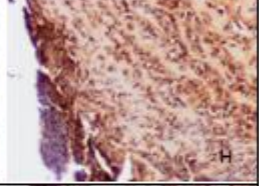
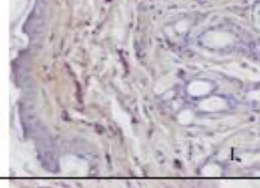
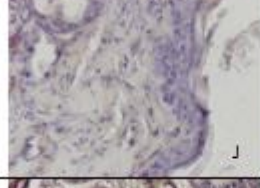
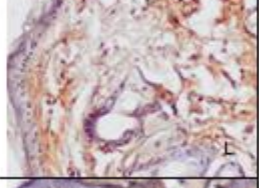
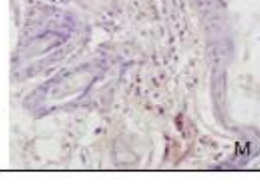
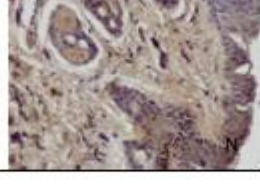
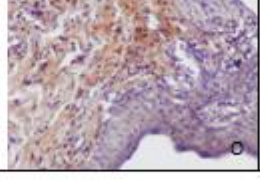
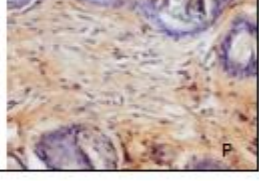
TNF α immunoreaktivitesinin tüm gruplarda olduğu fakat yara+steroid grubunda en az olduğu gözlemlendi. Yara grubunda TNF α immunoreaktivitesinin giderek azaldığı fakat yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında immunoreaktivitenin benzer şekilde devam ettiği saptandı (Resim 4.17).



Resim 4.17: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki TNF α immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.5. MCP1 Dağılımı:

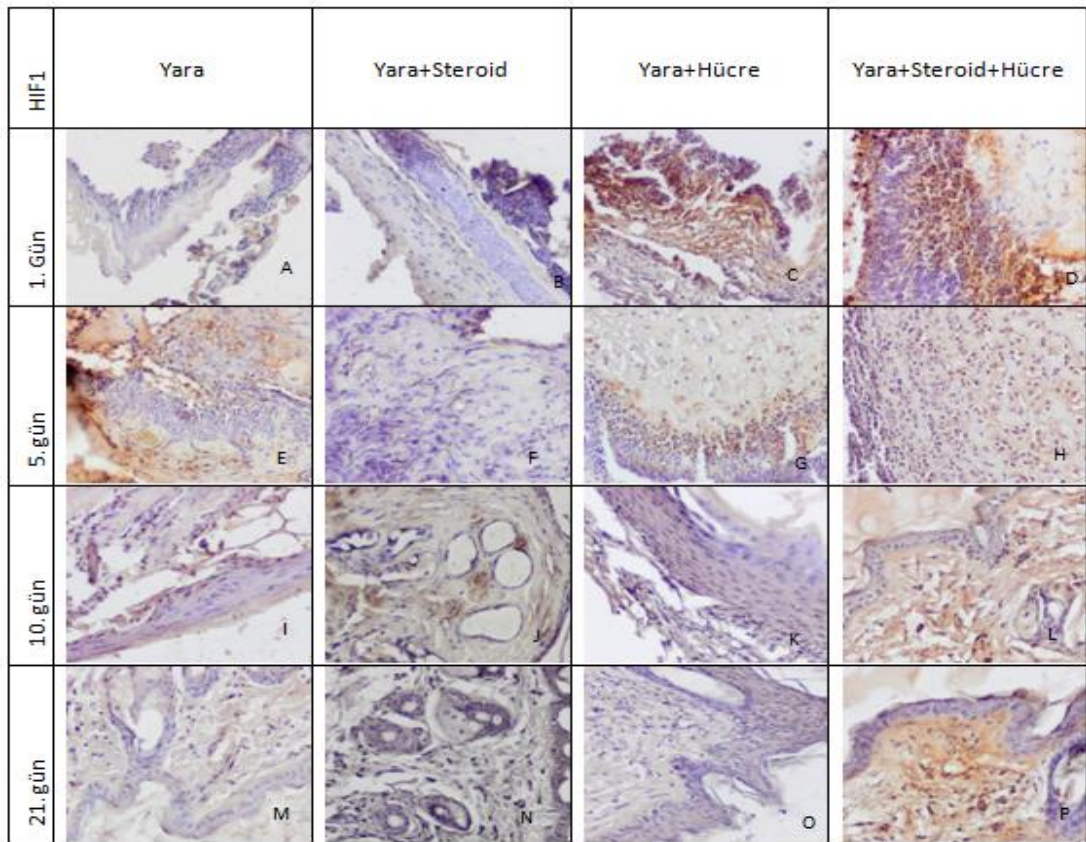
MCP1 immunoreaktivitesi yara grubunda makrofajların yara yerine göç etmesiyle uyumlu olarak 1, 5 ve 10. günlerde saptanır iken, 21. günde diğer günlere kıyasla azaldığı saptandı. Yara+steroid grubunda ise MCP1 immunoreaktivitesinin 1, 5 ve 10. günlerde zayıf olmakla birlikte 21. günde de devam ettiği ve hatta diğer günlere oranla immunoreaktivite şiddetinin artmış olduğu saptandı. Yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında MCP1 immunoreaktivite şiddetinin diğer iki gruba oranla daha fazla olduğu fakat en fazla immunoreaktivitenin yara+steroid+hücre grubunda olduğu görüldü (Resim 4.18).

MCP1	Yara	Yara+Steroid	Yara+Hücre	Yara+Steroid+Hücre
1. Gün				
5. gün				
10. gün				
21. gün				

Resim 4.18: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki MCP1 immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.6. HIF1 α Dağılımı:

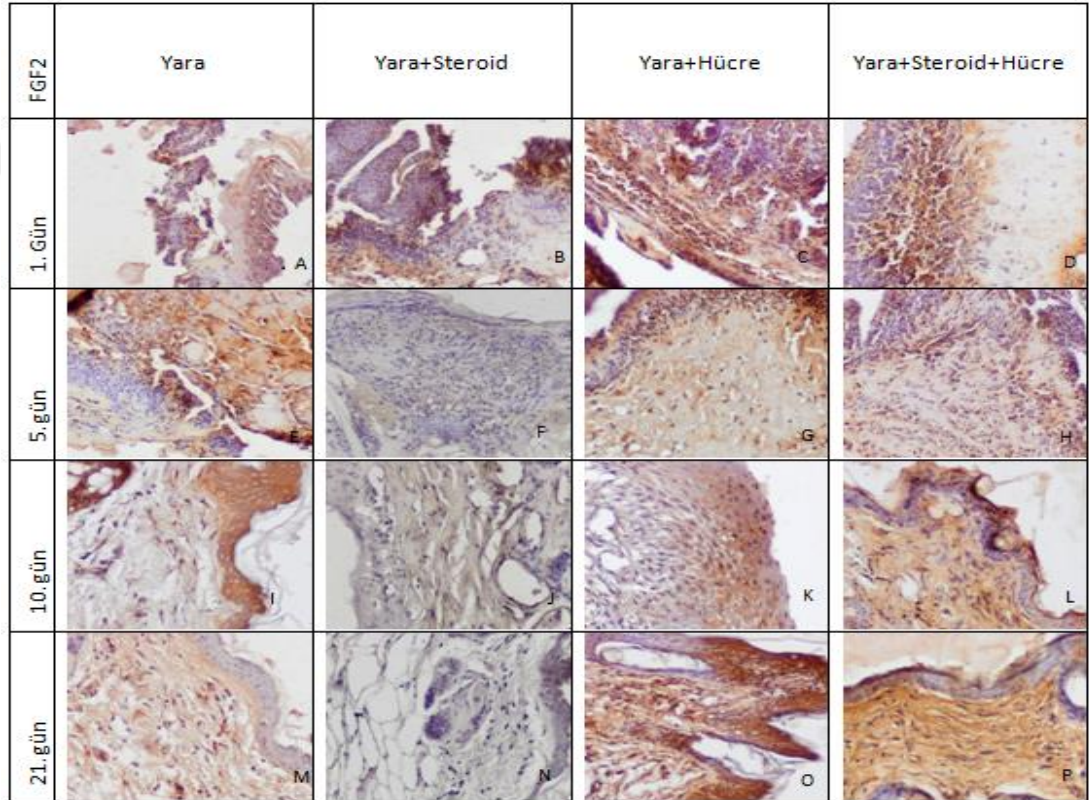
HIF1 α immunoreaktivitesinin, yara+steroid+hücre ve yara+ hücre gruplarında 1. günden itibaren gözlemlendiği, yara grubunda 5. günde, yara+steroid grubunda ise 10. günde olduğu saptandı. HIF1 α immunoreaktivitesinin 21. günde ise yara+steroid+hücre grubunda devam ettiği fakat yara+ hücre grubunda ise negatif olduğu izlendi (Resim 4.19).



Resim 4.19: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki HIF1 α immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.7. FGF2 Dağılımı:

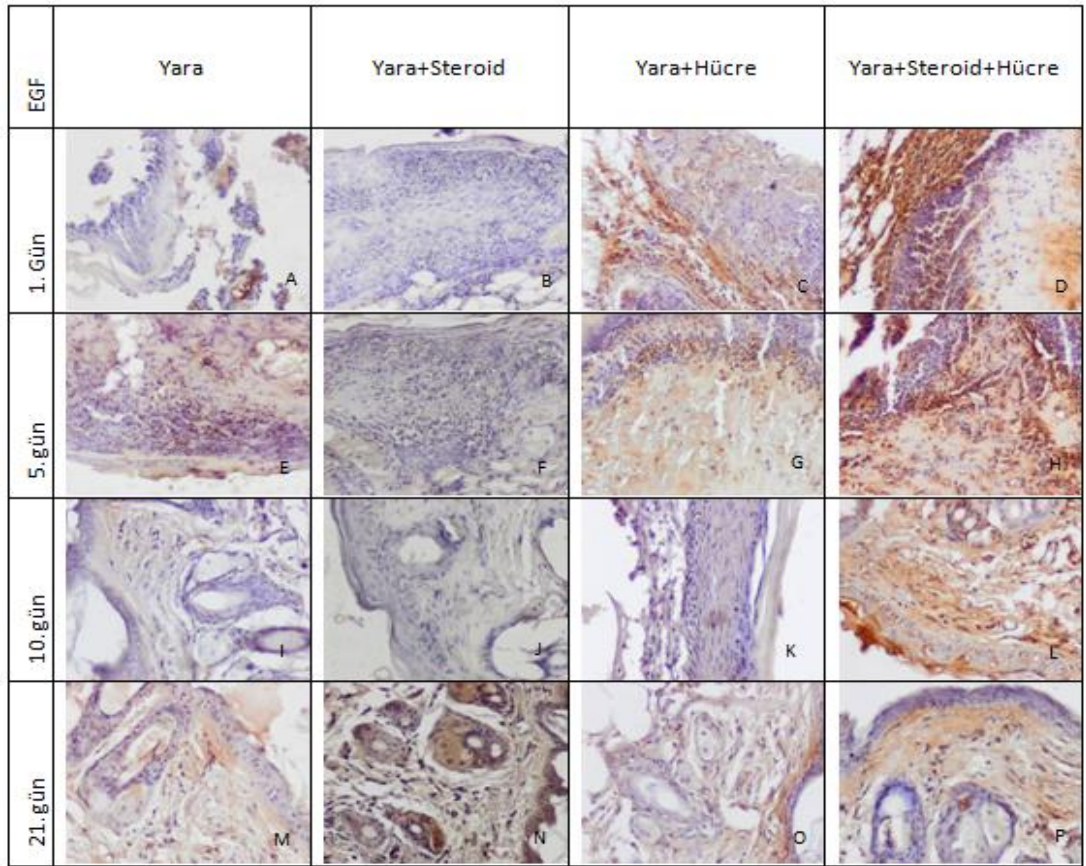
FGF2 immunoreaktivitesi tüm gruplarda 1. günden itibaren pozitif olmakla beraber yara+steroid grubunda 5. günden itibaren azaldığı ve 21. günde negatif olduğu izlendi. Diğer tüm gruplarda tüm günlerde FGF2 immunoreaktivitesi şiddetli pozitif olduğu saptandı (Resim 4.20).



Resim 4.20: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki FGF2 immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.8. EGF Dağılımı:

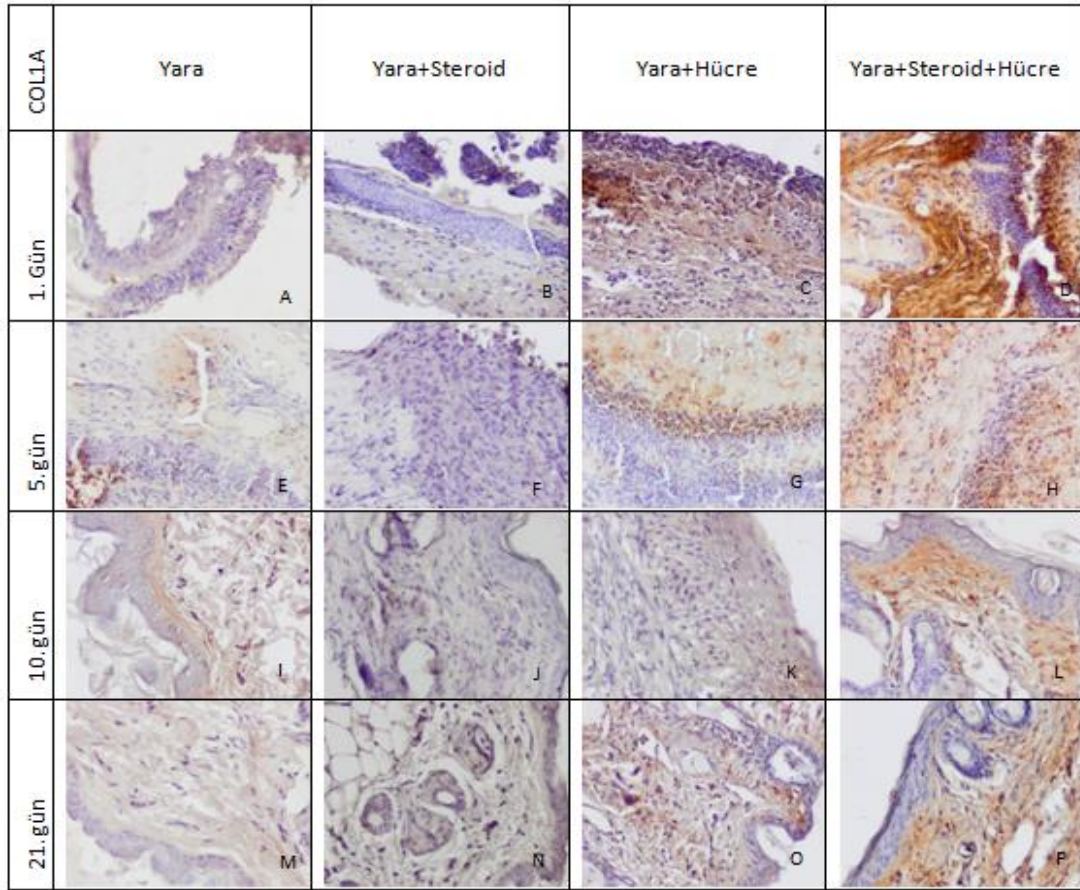
EGF immunoreaktivitesinin tüm gruplarda pozitif olduğu fakat yara+steroid grubunda 21. günde esas immunoreaktivitenin olduğu diğer günlerde zayıf veya yer yer negatif olduğu görüldü. Yara ve yara+hücre gruplarındaki EGF immunoreaktivitesi benzer iken, yara+steroid+hücre grubunda tüm günlerde şiddetli pozitif olarak diğer gruplardan farklılık saptandı (Resim 4.21).



Resim 4.21: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki EGF immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.9. COL1A Dağılımı:

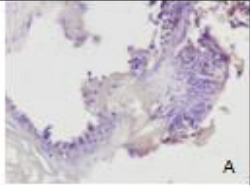
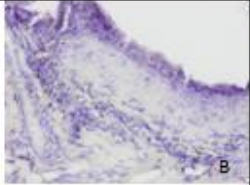
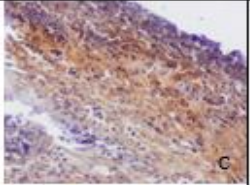
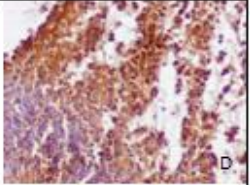
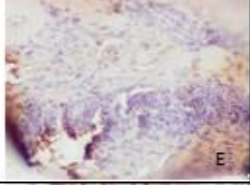
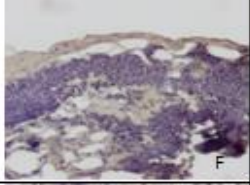
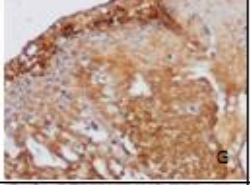
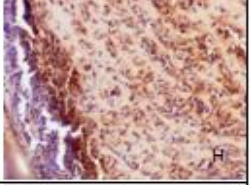
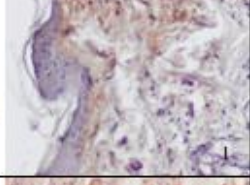
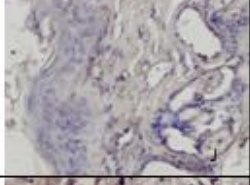
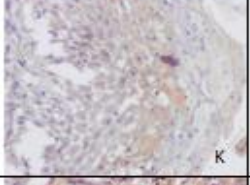
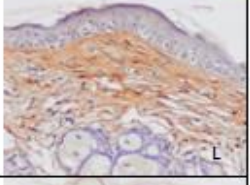
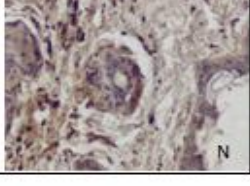
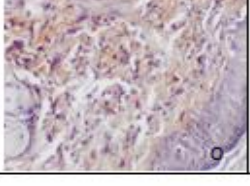
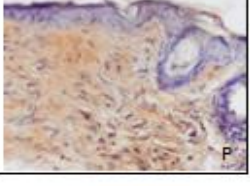
COL1A immunoreaktivitesi yara grubunda 5. günde zayıf, 10. günde orta şiddette olduğu gözlenirken yara+steroid grubunda tüm günlerde çok zayıf yer yer negatif olarak izlendi. Yara+hücre grubunda COL1A immunoreaktivitesinin 1. günden itibaren olduğu fakat yara+steroid+hücre grubunda immunoreaktivitenin tüm günlerde diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlendi (Resim 4.22).



Resim 4.22: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki COL1A immunoreaktivitesinin dağılımı.

4.5.2.10. IL10 Dağılımı:

IL10 immunoreaktivitesinin yara grubunda 5. günden itibaren orta şiddette olduğu, yara+steroid grubunda 1, 5 ve 10. günlerde zayıf iken 21. günde diğer günlere göre daha fazla olduğu saptandı. Yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında IL10 immunoreaktivitesinin 1 ve 5. günlerde şiddetli pozitif iken 10. günden itibaren immunoreaktivitenin azaldığı izlendi (Resim 4.23).

IL10	Yara	Yara+Steroid	Yara+Hücre	Yara+Steroid+Hücre
1. Gün				
5. gün				
10. gün				
21. gün				

Resim 4.23: Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarından alınan örneklerde 1, 5, 10 ve 21. günlerdeki IL10 immunoreaktivitesinin dağılımı.

V. TARTIŞMA

Yara iyileşmesi, inflamasyon, granülasyon dokusunun oluşumu, re-epitelizasyon, matriks oluşumu ve yeniden yapılanmayı içeren iç içe geçmiş evrelerden oluşan kompleks bir süreçtir (44). Bu süreçte ekstrasellüler matriks bileşenleri ile birlikte keratinosit, fibroblast, endotelial hücreler, sinir hücreleri ve yara yerine göç eden lökositler yer alır (29). Bu dönemde salgılanan büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerin ve hücrelerel işlevleri koordine eden sinyallerin miktarı yara iyileşmesinin başarısı ile doğru orantılıdır (44). Bu ajanlar yara yerine hücrelerin göçünü, başta keratinositler olmak üzere hücrelerel farklılaşmayı, granülasyon dokusunun oluşumunu ve reepitelizasyonun başlamasını tetikleyerek metabolizma değişimini etkileyen aktif polipeptitlerdir (44).

Glukokortikosteroidlerin; replasman şeklinde kullanıldıkları adrenal fonksiyon bozuklukları, adrenal veya başka bir endokrin bozukluk söz konusu olmayan durumlar, hipotalamus-hipofiz-adrenal korteks ekseninin bozukluklarında teşhis aracı olarak kullanımları söz konusudur. Endokrin nitelikte olmayan hastalıklarda glukokortikosteroidler, genellikle antienflamatuvar, antiallerjik, immünosüpresif ve hematopoetik sistem üzerindeki etkileri nedeniyle kullanılırlar. Bu tip durumlarda süpresif özellikleri ön planda yer alır; diğer bir deyişle ilaç uygulandığı sürece hastalık belirtileri hafifler veya ortadan kalkar (21). Steroid kullanımı; kollajen lizisini artırarak, enfeksiyona direnci inhibe ederek ve epitelizasyonu bozarak yara iyileşmesini olumsuz etkiler (32, 33).

Deride oluşan yaralanma ile epidermal bariyer bozulur ve bariyer hasarına karşı ilk olarak keratinositlerde depo halinde bulunan IL-1 salgılanır (44). Ardından kan komponentlerinin yara yerine gelişi ile pıhtılaşma mekanizması aktive olarak pıhtı oluşumu hemostazı indükler. Kan damarlarının geçirgenliğinin artışı ile inflamatuvar hücrelerin yara yerine migrasyonu matriks içerisindeki trafiği başlatır (44,45). İşte bu süreçte hem göç eden hücreler hem de hali hazırda yara yeri etrafında bulunan hücreler

tarafından salgılanan birçok büyüme faktörü, sitokinler, kemokinler ve ekstrasellüler matriks bileşenleri ile birlikte tamir mekanizması başlar (45). O nedenle son yıllarda, hızlı ve fizyolojik yara tamirini sağlamak için yara iyileşmesinin mekanizmalarının ve rol alan sitokinler, kemokinler gibi büyüme faktörlerinin farklı yara iyileşme modellerinde incelenmesi gündemde olup, özellikle büyük deri kaybına yol açan durumlarda yara yeri tedavisinin etkin olabilmesi ve infeksiyon oluşumunun engellenerek tamirin gelişebilmesi için alternatif tedavi yöntemleri denenmektedir. Bu yüzden rejeneratif tıptaki araştırmaların büyük bir kısmını doku mühendisliğinde ve deri greftlerinde erişkin ve embriyonik kök hücrelerin kullanımı oluşturmaktadır.

Hücre terapisi, lokal veya sistemik infüzyon şeklinde otolog veya allojenik hücrelerin hasarlı dokulara transplantasyonudur (46). Doku mühendisliği tarafından allojenik deri greftlerinin oluşturulmasında blastokist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler veya keratinosit serisine yönlendirilmiş kıl folikülünde bulunan epidermal kök hücreler veya kemik iliği ve periferel kan gibi epidermal olmayan fakat keratinositlere farklılaştırılan erişkin kök hücreleri kullanılabilir (47).

Kök hücreler, kendini yenileyebilme yeteneği ve farklılaşmış hücreleri oluşturabilme potansiyeli nedeniyle hücre terapisi için en iyi seçenektir (46). Kök hücre kaynakları embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere temel olarak ikiye ayrılır. Embriyonik olmayan kök hücre grubunda sayılan erişkin kök hücreleri, embriyonik kök hücrelerine oranla farklılaşma ve çoğalma potansiyelleri daha sınırlı olan hücrelerdir. Erişkin kök hücrelerin ölümsüz ve kendini yenileme kapasiteleri belirsiz ve tartışmalı bir konudur (47). Birçok çalışma, deri, kemik iliği veya periferel kan kaynaklı erişkin kök hücrelerin kendini yenileme ve çoğalma kapasitelerinin sınırlı ve yaşla birlikte azaldığını göstermektedir. Bununla birlikte bu çalışmaların çoğunda erişkin kök hücrelerin saf homojen bir topluluğu temsil etmedikleri de belirtilmiştir (47). Embriyonik kök hücreler, ölümsüz ve kendini yenileyebilme kapasiteleri ile farklılaşma sürecinde progenitör ve olgun hücre oluşturma potansiyelleri

açısından önemli bir kaynaktırlar (47). Bu nedenle, embriyonik kök hücreler erişkin kök hücrelere oranla doku mühendisliğince üretilen allojenik doku greftlerin oluşturulmasında önceliklidir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda cerrahi yara modelinde kullanılacak olan keratinositlerin erişkin kök hücre kaynaklarından ziyade, embriyonik kök hücre kaynağından farklılaştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Kök hücrelerden keratinositlerin farklılaştırılması için kullanılan farklı yöntemler bulunmaktadır (47). Öncelikle ilk olarak embriyonik kök hücrelerin çoğaldıktan sonra farklılaşma için yönlendirilmesi indüklenmelidir. Keratinosit farklılaştırılması için kültür ortamına, BMP-4 (47, 48, 49, 50, 51), askorbik asit (47, 49), ekstrasellüler matriks (Matrijel) (52), matrijel yerine fibroblast kaynağının kullanımı (47, 48, 49, 50, 51, 53), büyüme faktörleri (FGF, EGF, Epiregulin, IGF, KGF, TGF, GM-CSF vb.) ve sitokinlerin (TNF- α , IL-1 vb.) (47, 53) ilaveleri gerekmektedir. Kollajen-1 içeren kültür ortamlarında farklılaştırılan keratinositlere ait Troy ve Turksen çalışmalarında, embriyoblastların kollajen-1' e kolaylıkla yapıştıkları ve 6. günün sonunda epitelyal morfolojiye sahip hücrelerin embriyoblastın merkezinden dışarıya doğru göç ettiğini saptamışlardır. Bununla beraber bazal membran matriksi (matrijel) üzerinde kültüre edilen hücrelerin ise, kollajen-1 üzerinde kültüre edilen hücrelere göre matrijele daha hızlı yapıştıkları ve 6. günün sonunda daha fazla sayıda hücrenin göç ederek epitelyal toplulukları oluşturduklarını göstermişlerdir. Ayrıca kültürün 10. gününde sitokeratin-8 ve daha az oranda sitokeratin-14 ve 17 immunoreaktivitelerinin pozitif olduğunu göstermişlerdir (52).

BMP-4, TGF- β süperailisinin bir üyesidir (48, 50). BMP-4 embriyonik kök hücrelerde nöral farklılaşmayı inhibe ederken, keratinositlere farklılaşmayı indükler (50, 54). Başka bir çalışmada, BMP-4' ün nöral yolak ile ilişkili olan hücrelerin apoptozisi ile nöral farklılaşmayı inhibe ederek keratinosit farklılaşmasını arttırdığını destekleyici sonuçlar verilmiştir (51). Coraux ve arkadaşları, BMP-4 ilavesi ile embriyonik kök hücrelerden

keratinosit farklılaşmasının arttığını ve bu etkinin zaman bağımlı olup kültürün 4. ile 8. günü arasında en etkili olduğunu göstermişlerdir (49).

Çalışmamızda embriyonik kök hücrelerden hanging drop metodu ile oluşturulan embriyoblastların matrijel üzerinde BMP-4 ilavesi yapılarak kültüre edilmesi sonucunda, embriyoblastlardan çoğalan hücrelerin matrijel üzerinden dışarıya doğru göç ederek prolifer edindikleri ve kültürün 10. gününden itibaren sitokeratin-8 ve 14 immunoreaktivitelerinin pozitif olduğu saptandı. Sitokeratin-8 erken keratinosit farklılaşma belirteci iken, sitokeratin-14 geç dönem belirteci olarak kullanılmaktadır (48, 50, 52, 53, 55). Sitokeratin-8 ve 14 seviyelerinin veya dağılımlarının tespit edilmesi, hücrelerin keratinosit benzeri hücreler olduğunu desteklemektedir. Çalışmamızda matrijel kullanılması hücrelerin farklılaşması için ekstrasellüler matriks benzeri bir ortam oluşmasını, BMP-4 kullanımı ise farklılaşmamış hücrelerden keratinositlerin farklılaştırma sürecinin birinci basamağı olan hücre yönlendirilmesini sağlamaktadır. Diğer çalışmalarda farklı kültür ortamı veya kültür vasatı içerisinde farklı kültür kokteylleri kullanılarak keratinosit farklılaşması elde edilmiş olmasına rağmen, çalışmamızda embriyoblastların oluşmasından sonra matrijel ve BMP-4 içeren ortamda hücrelerin keratinosite yönlendirildikleri ve farklılaştıkları sitokeratin-8 ve 14 immunoreaktivite pozitifliği ile tanımlanmıştır. Embriyonik kök hücrelerden keratinositlere indüksiyonun moleküler temeli henüz kesinlik kazanmadığından dolayı farklı kültür ortamları denenmektedir. Sonuç olarak embriyonik kök hücrelerden keratinosit farklılaştırılmasında farklı kültür ortamları olmasına rağmen, elde edilen hücrelerin in vivo olarak ta devamlılığı ve kullanılabilirliğinin test edilmesi önemlidir.

Keratinositler kültür ortamında yönlendirildikten sonra, hücrelerin saflaştırılması ve ayırımı ikinci basamağı oluşturur (47). Bu aşamanın belirlenebilmesi için farklılaşmış keratinositlerden salgılanan endojen yüzey belirteçleri veya yeşil floresan proteini ile işaretlenmiş hücrelerin tanımlanması gerekmektedir. Genellikle tercih edilen erken ve geç dönem keratinosit farklılaşma belirteçleri olan sitokeratin dağılımlarının

immunohistokimyasal, akış sitometrisi, western blotting, RT-PCR vb. teknikler kullanılarak belirlenmesidir. Yapılan çalışmalarda sitokeratin-1, 8, 14, 17, 19 dağılımları kültürün farklı evrelerinde incelenmiştir (47, 48, 49, 50, 52, 53). O nedenle çalışmamızda in vitro ortamda sitokeratin-8 ve 14 dağılımlarının immunohistokimyasal olarak incelenmesi yapılmıştır.

Kültürdeki son basamak ise proliferasyon ve terminal farklılaşmanın sağlanmasıdır (47). Bu amaç için genellikle yukarıda verilen büyüme faktörleri ve sitokinlerin yer aldığı kültür kokteylleri kullanılmaktadır. Bizde çalışmamızda embriyoblastların matrijel üzerine alındıktan sonraki 3. günden itibaren BMP-4 ilavesi her gün yapılarak farklılaşmanın devamlılığı sağlanmıştır.

İn vitro olarak farklılaştırılan keratinositlerin hücresel terapi için herhangi bir yara yerine konduğunda canlılığını devam ettirmesi, proliferasyonu, re-epitelizasyona katılımı açısından uygulanabilirliği önemli konulardan biridir. Bu nedenle in vitro olarak deneysel cerrahi yara modelleri kullanılarak farklılaştırılmış keratinositlerin bu özelliklerini belirlemek için yapılan çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Epidermal kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin in vitro yara yeri modeline uygulanmasında elde edilen sonuçlara göre büyük cilt defektleri olan hastalara transfer edildiğinde üretilen bu epitelin dermal komponentleri içermediğinden sonuçlar çok yüz güldürücü olmamıştır (56). Üretilen bu epidermal greftlerin fibrin yapıştırıcıları ile birlikte kullanılması bir miktar efektif olsa da fibrin yapıştırıcıların yara yerindeki etkisi tam olarak bilinmediği için kullanılabilirliği tartışmalıdır (57). O nedenle çalışmamızda üretilen keratinositlerin bir mesh üzerinde üretimlerine devam edilmesi ve kültür ortamından direkt yara yerine transfer edilerek çevresel ortamın bozulmaması amaçlanmıştır. Vazeline gauze yara yeri tedavisinde kullanılan içeriğinde petrolatum bulunan bir meshdir (58). O nedenle çalışmamızda daha önce yara yerinde kullanılabilirliği test edilmiş olan vazeline gauze kullanıldı. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler vazeline gauze üzerinde kültüre edilerek cerrahi yara modeline transfer edildi. Kültür ortamına konulan vazeline gauze mesh özelliğinde

olduğundan dolayı kültür ortamında keratinositlerle birlikte kültüre edilmesi bir sorun oluşturmadi. Daha önceki çalışmalarda kollajen tip 1, kollajen tip IV, ekstrasellüler matriks komponentleri, poliprolin vb. içeren meshler hem hücre kültürü ortamında hem de cerrahi müdahaleler sırasında kullanıldığı gösterilmiştir (65). Mesh üzerinde 5 gün kültüre edilen hücrelerin canlılığını devam ettirdikleri gözlemlendikten sonra yara yerine transfer edildi. Yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında, cerrahi yara oluşturulduktan sonraki 1. günde yara oluşturulan bölgede, epidermisin kaybı ile birlikte polimorf nüveli lökosit (PNL) infiltrasyonu, trombosit ve fibrin pıhtısını içeren eksudanın oluşumu gözlemlendi. Cerrahi yaranın bittiği yerden ise epidermisin devam ettiği, deri eklerinin ve dermisin korunduğu izlendi. Yara oluşumundan sonraki 1. ve 5. günde yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında polimorf nüveli lökositlerin yara yerine hakim olduğu, 10. günde ise makrofajların yara yerinde esas hücreler olduğu belirlendi. Ayrıca yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında 5. ve 10. günlerde sağlam doku ile yara yeri sınırında mast hücreleri ve 5. günden itibaren yara yüzeyinin altında vaskülaritede artış saptandı. Yara yeri kenarında yara, yara+steroid, yara+hücre ve yara+steroid+hücre grubunda 10. günde sağlam epidermisin bazal hücrelerinin proliferasyon olarak yara kenarındaki epidermisin kalınlaştığı ve bazal hücrelerin krut altında epitelizasyonu sağlamak üzere göç ettiği izlendi. Tüm gruplarda 21. günde yara yerinde epitelizasyonun tamamlandığı, epidermisin çok katlı yassı epitel özelliğinde ve dermisin ekleri ile birlikte histolojik olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi.

Yara oluşuktan sonra veya deride epitelizasyon kaybı meydana geldiğinde alttaki bağ dokusu içerisinde bulunan hücreler ile birlikte yara yeri kenarında bulunan keratinositler tarafından salgılanan birçok faktör ile iyileşme süreci başlar. Trombositlerin α granüllerinden EGF, PDGF ve TGF- β gibi büyüme faktörleri salgılanır (44, 59). Fibroblast ve yara yerine göç eden makrofajlardan salgılanan EGF ekspresyonu artarak re-epitelizasyonun başlaması için ilk sinyal verilmiş olur (44). EGF ile birlikte TGF- α ve FGF, keratinositlerin migrasyonu ve proliferasyonunda önemlidir. Yara iyileşme

sürecinde yara yerinde öncelikle göç eden nötrofil, makrofaj, mast vb. hücreler ile granülasyon dokusu oluşturulur ve epitelizasyon daha sonra gerçekleşir. Matriksin formasyonu da FGF ailesi üyeleri tarafından sağlanarak granülasyon dokusuna katılır. EGF trombosit, fibroblast ve makrofaj hücrelerinden salgılanır ve keratinositlere parakrin olarak etki eder (60) iken keratinositler EGF salgılamazlar (44). Çalışmamızda EGF immunoreaktivitesinin tüm gruplarda pozitif olduğu fakat yara+steroid grubunda 21. günde esas immunoreaktivitenin olduğu diğer günlerde zayıf veya yer yer negatif olduğu görüldü. Yara ve yara+hücre gruplarındaki EGF immunoreaktivitesi benzer iken, yara+steroid+hücre grubunda tüm günlerde şiddetli pozitif olarak diğer gruplardan farklılık saptandı. EGF ekspresyonu özellikle re-epitelizasyonda artar ve keratinosit migrasyonu ve proliferasyonunu sağlar (44). Yara+steroid grubunda zayıf yer yer negatif olarak gözlenen EGF immunoreaktivitesinin, steroid tarafından baskılandığını fakat steroid uygulamasının olmadığı diğer gruplarda EGF immunoreaktivite şiddetinin daha fazla olduğu izlendi. Sadece yara oluşturulan grupta EGF immunoreaktivitesi zayıf şiddette pozitif iken yara+ hücre grubunda EGF immunoreaktivitesinin 1. ve 5. günlerde sadece yara oluşturulan gruba kıyaslandığında artmış olması transfer edilen keratinositlerin yara iyileşmesine EGF ekspresyonunu erken dönemde arttırdığını göstermiştir. EGF immunoreaktivitesinin yara+steroid+hücre grubunda diğer gruplara oranla daha fazla gözlenmesi, keratinositlerin proliferasyonunun sağlanması amacı ile makrofaj, fibroblast ve trombosit hücrelerinden salgılanan faktörlerin diğer gruplara oranla daha önce aktive olduğu ve böylece yara+steroid+hücre grubunda re-epitelizasyonun erken başlamasından sorumlu olduğu düşünüldü.

FGF ailesi üyeleri yara iyileşmesinin tüm evrelerinde keratinositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücrelerinden salgılanırlar (44, 61, 62). Fakat erken ve geç dönem evrelerde salgılanan FGF tipleri farklıdır. FGF ailesi üyelerinden esas olarak FGF-2, FGF-7 ve FGF-10 yara iyileşmesinde görev alır (44). FGF-7 ve FGF-10, keratinosit büyüme faktörü 1 ve 2 olarak da adlandırılır ve akut

yaralanmalarda parakrin etki ile keratinositin migrasyonunu ve proliferasyonunu sağlarlar (60, 63, 64). FGF-2 akut yaralarda artarak granülasyon dokusunun oluşumunda, re-epitelizasyonda ve dokunun yeniden yapılanmasında rol oynar (65). In vitro çalışmalar, FGF-2' nin çeşitli ekstrasellüler matriks komponentlerinin sentezini ve depolanmasını düzenlediğini, re-epitelizasyon sırasında keratinosit motilitesini, fibroblastların göçünü ve kollajenaz üretimini arttırdığını göstermektedir (66). FGF-1 epitelizasyonda FGF-2' ye oranla daha az etkindir. FGF2 immunoreaktivitesi tüm gruplarda 1. günden itibaren pozitif olmakla beraber yara+steroid grubunda 5. günden itibaren azaldığı ve 21. günde negatif olduğu ve steroid uygulaması ile baskılandığı izlendi. Diğer tüm gruplarda tüm günlerde FGF2 immunoreaktivitesi şiddetli pozitif olduğu saptandı. Özellikle hücre uygulanan gruplarda FGF2 immunoreaktivitesinin şiddetinin sadece yara oluşturulan gruba göre daha fazla olduğu saptandı. FGF-2 mast hücresi, fibroblast, endotelial hücreler, düz kas hücresi ile keratinositlerden salgılanır (44). Hücre uygulanan gruplarda erken dönemde artmış FGF-2 immunoreaktivitesinin bağ dokusu hücreleri yanı sıra transfer edilen keratinositlerden de salgılandığını düşündürdü. Bununla beraber yara iyileşmesi sürecinde artmış olan FGF-2 immunoreaktivitesinin keratinositler üzerinde parakrin ve otokrin etki ile keratinositlerin migrasyonunu ve proliferasyonunu desteklediği düşünüldü.

Kemokinler, özellikle inflamatuvar hücreler olmak üzere birçok hücre tipinin yara bölgesine göçünü stimüle ederek, yara iyileşmesi sürecinde aktif rol oynarlar (44). Buna ek olarak, yara bölgesindeki daimi hücrelerde kemokin reseptörlerinin bulunması re-epitelizasyon, dokunun yeniden yapılanması ve anjiogenezin düzenlenmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (44, 67). MCP-1 bir kemokin olarak, yaralanmanın özellikle ilk 7 gününde keratinositlerden, endotel hücrelerinden ve makrofajlardan salgılanır (29). MCP-1 monosit/ makrofajlar, T lenfositler ve mast hücreleri için kemoatraktandır (68). MCP-1 eksikliği, fare yara iyileşmesi modellerinde re-epitelizasyon, anjiogenez ve kollajen sentezinde iyileşmede gecikmeye yol açarken, kronik yara iyileşme sürecinde MCP-1' in ekspresyonunun devam

ettiği ve uzamış inflamatuvar cevaba katkıda bulunmak üzere nötrofil ve makrofajların yara yerinde kalmasını sağladığı gösterilmiştir (69, 70). Çalışmamızda MCP1 immunoreaktivitesi yara grubunda makrofajların yara yerine göç etmesiyle uyumlu olarak 1, 5 ve 10. günlerde saptanır iken, 21. günde diğer günlere kıyasla azaldığı saptandı. Yara+steroid grubunda ise MCP1 immunoreaktivitesinin 1, 5 ve 10. günlerde zayıf olmakla birlikte 21. günde de devam ettiği ve hatta diğer günlere oranla immunoreaktivite şiddetinin artmış olduğu saptandı. MCP1 immunoreaktivitesinin yara+steroid grubunda 21. günde diğer günlere göre artmasının steroid uygulamasının tek doz olarak yapılmasına bağlı olabileceğini düşünüldü. Yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında MCP1 immunoreaktivite şiddetinin diğer iki gruba oranla daha fazla olduğu fakat en fazla immunoreaktivitenin yara+steroid+hücre grubunda olduğu görüldü. Bu artışın yara yerine transfer edilen hücrelere karşı hücrel bir cevap olarak MCP-1 salgısının devam ettiğini düşündürdü.

Matürasyon ve yeniden yapılanma evresinin temel özelliği yara alanına kollajen depolanmasıdır (45). Kollajen depolanmasının miktarı, oranı ve kalitesinin yara gerilme kuvveti üzerine olan etkileri nedeniyle bu süreç klinik açıdan en önemli evredir. Fibroblastlar içinde kollajen intrasitoplazmik filamanlar halinde sentezlenip hücreler arası bölgeye verilir. Yara iyileşmesi sürecinde salgılanan FGF, TGF- β ve PDGF fibroblast infiltrasyonuna izin verir ve fibroblastların miyofibroblastlara çevrilmesini indükler (44). Matriksin yeniden yapılanması sürecinde kollajen ve elastin liflerinin salgılanarak matriksde depolanması, granülasyon dokusunun yerini alarak yara yeri altında bulunan dermisin tamirini sağlar. Bu dönemde özellikle TGF- β ' nın aracılığıyla yeni kollajen sentezi ve PDGF tarafından eski kollajenin yıkımı gerçekleşir (44). O nedenle yeni oluşan kollajenin matriksde depolanması yara iyileşmesi sürecinin geç evresinde olur. COL1A immunoreaktivitesi yara grubunda 5. günde zayıf, 10. günde orta şiddette olduğu gözlenirken yara+steroid grubunda tüm günlerde çok zayıf yer yer negatif olarak izlendi. Yara+hücre grubunda COL1A immunoreaktivitesinin 1. günden itibaren olduğu fakat yara+steroid+hücre grubunda immunoreaktivitenin tüm günlerde

diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda yara+steroid+hücre grubunda steroid uygulamasına rağmen transfer edilen hücrelerin yara yerine hemen adapte olarak kollajen-1 sentezinin erken dönemde başlaması ve diğer günlerde de giderek azalan şiddette devam etmesi yara iyileşmesi açısından etkili olduğunu düşündürdü.

Yara alanında ilk saptanan hücrelerden olan nötrofillerin göçü inflamasyonla artan vasküler permeabilite ve prostoglandinler, interlökin-1 (IL-1), tümör nekrozis faktörü- α (TNF- α), kompleman sistemi gibi faktörlerin etkisi ile uyarılır (26). IL-1 ve TNF- α , IL-8' in güçlü bir şekilde ekspresyonunu uyarak yara kenarında keratinositlerin migrasyonunu ve proliferasyonunu stimüle edebilir (29). Makrofajlar, lenfositler ve fibroblastlar da daha sonra benzer uyarılarla bölgeye gelerek aynı faktörlerin etkisiyle aktive olur (26). Bizim çalışmamızda IL1 β immunoreaktivitesinin, sadece yara oluşturulan grupta 1. ve 10. günlerde zayıf, 5. günde şiddetli 21. günde ise orta şiddette olduğu izlendi. Yara+steroid grubunda ise steroid uygulamasının IL1 β immunoreaktivitesini baskıladığı 1, 5 ve 10. günlerde negatif 21. günde zayıf şiddette olduğu izlendi. IL1 β immunoreaktivitesinin yara+steroid grubunda 21. günde diğer günlere göre artmasının tek doz steroid uygulamasına bağlı olabileceğini düşündürdü. Yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında ise IL1 β immunoreaktivitesinin 1. günden itibaren olduğu ve 5, 10 ve 21. günlerde de devam ettiği saptandı. Çalışmamızda TNF α immunoreaktivitesinin tüm gruplarda olduğu fakat yara+steroid grubunda en az olduğu gözlemlendi. Yara+steroid grubunda ise steroid uygulamasının TNF α immunoreaktivitesini baskılayarak yara iyileşmesini olumsuz etkilediğini düşündürdü. Yara grubunda TNF α immunoreaktivitesinin giderek azaldığı fakat yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında immunoreaktivitenin benzer şekilde devam ettiği saptandı. Bu sonuçlar hem yara + hücre hem de yara + steroid + hücre gruplarında transfer edilen hücrelerin IL1 β ve TNF α immunoreaktivitesini arttırarak yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini düşündürmektedir.

Normal fizyolojik koşullarda, MMP' lar embriyonik büyüme, doku morfogenezisi ve büyümenin devamlılığı için bağ dokusunda üretilmektedir. Bu üretim, trofoblast implantasyonu, menstürel siklus, ovulasyon, doku hasarının tamiri ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde oldukça önem taşımaktadır (71, 72). MMP2, insülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor, IGF) bağlayıcı proteinleri yıkarak IGF' lerin salınımına yol açmaktadır. Bu da hücre proliferasyonu ve apoptozunun modülasyonunu sağlamaktadır. MMP2 ve MMP9 temel olarak kollajen ve jelatinin denaturasyonundan sorumludur. Bunlar ayrıca elastin, laminin, fibronectin, vitronektin gibi çeşitli ekstrasellüler matriks kollojen tiplerinin ve pro-TNF, TGF-beta, pro IL1 beta ve pro IL8 gibi ekstrasellüler matrikse özgü olmayan yapıların parçalanmasından sorumludur. Ayrıca bunlar özellikle yara iyileşmesi sürecinin ilk evrelerinde çeşitli pro ve antianjiojenik faktörlerin işlenmesini sağlarlar. MMP2 ve MMP9 fibroblastlar, keratinositler, endotel hücreleri, polimorfonükleer lökositlerin ve monositler dahil bir çok hücre tarafından sentezlenirler(71, 72). Bizim çalışmamızda MMP2 immunoreaktivitesi 1. gün yara+steroid+hücre grubunda en fazla iken, 5., 10. ve 21 günlerde immunoreaktivitenin giderek azaldığı saptandı. Yara+hücre grubunda, MMP2 immunoreaktivitesinin, yara+steroid+hücre grubundakine nazaran daha az olmakla beraber yara ve yara+steroid grubuna oranla tüm günlerde daha fazla olduğu izlendi. Bununla beraber sadece yara oluşturulan grupta MMP2 immunoreaktivitesi 1 ve 5. günlerde zayıf iken 10. ve 21. günlerde diğer günlere nazaran arttığı en fazla 21. günde olduğu saptandı. MMP2 immunoreaktivitesinin, yara+steroid+hücre, yara+steroid ve yara+hücre gruplarında ise gün bazında azaldığı görüldü. Yara yerine hücre ilave edilen gruplarda erken dönemde ilave edilen hücrelerin MMP2' nin salınımını tetiklediği düşünüldü. Salo ve arkadaşları Yara iyileşmesi sürecinin her aşamasında yara kenarındaki bağ dokusu, fibroblastlar ve endotelde MMP2 ekspresyonun arttığını göstermişlerdir. (73) MMP2 nin bazal membranın bir bileşeni olan laminin-5'i parçalayarak epitel hücresi migrasyonunu indüklediği varsayılmaktadır. MMP2 aktivitesi reepitelizasyon evresine kadar stabil biçimde devam eder. (74, 75) Bizim çalışmamızda da

yara + steroid + hücre grubunda ilk günlerde artmış MMP2 ekspresyonu giderek ilk günlere kıyasla azalmasına rağmen diğer gruplara karşılaştırıldığında artmış immunoreaktivite sergilemektedir.

MMP9' un makrofajlarda ve endotel hücrelerinde indüklenerek, neovaskülarizasyonu arttırdığı bildirilmiştir(78). Ayrıca invitro koşullarda ekzojen MMP9' un hücre büyümesini arttırdığı bilinmektedir (78). MMP9 keratinosit migrasyonunu ve kemik iliğinden endotelial progenitör hücrelerin mobilizasyonunu sağlayarak yara iyileşmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda MMP9 immunoreaktivitesinin, yara ve yara+steroid gruplarında tüm günlerde zayıf veya negatif iken yara+steroid+hücre ve yara+hücre gruplarında 1. günde MMP9 immunoreaktivitesinin olduğu ve diğer gruplara nazaran daha şiddetli olarak gözlemlendiği, gün bazında ise immunoreaktivitenin azalarak devam ettiği saptandı. MMP9 dağılımının MMP2 dağılımı ile uyumlu olduğu ve hücre transferinin MMP9 immunoreaktivitesinde artışa yol açtığı izlendi. Yara iyileşmesi fare modelinde MMP9 eksikliğinin endotelial progenitör hücre ve vaskulogenezde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (76). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak Tarlton ve arkadaşları MMP9'un yara kenarlarında ilk 24 saatte maksimum düzeye eriştiğini ve 48. saatte önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir (77).

IL-10 monositler, B lenfositler ve T lenfositler tarafından üretilir; endotoksinler ve ardışık olarak onların proinflamatuvar sitokin kaskadı tarafından uyarılırlar. IL- 10'un in vitro olarak multipl proinflamatuvar sitokinlerin (TNF α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi) sentezinin supresyonu ve in vivo olarak da hücrel immünitenin supresyonu gibi birçok antiinflamatuvar özellikleri vardır (79, 80). Bizim çalışmamızda IL10 immunoreaktivitesinin yara grubunda 5. günden itibaren orta şiddette olduğu, yara+steroid grubunda 1, 5 ve 10. günlerde zayıf iken 21. günde diğer günlere göre daha fazla olduğu saptandı. Yara+hücre ve yara+steroid+hücre gruplarında IL10 immunoreaktivitesinin 1 ve 5. günlerde şiddetli pozitif iken 10. günden itibaren immunoreaktivitenin azaldığı izlendi. Gordon ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada IL 10 un ekstrasellüler matriks birikimini organize ederek biyomekanik doku direncini yarasız dokularla benzer seviyeye getirdiği, IL 10 eklenmesinin yara iyileşmesinin normal fizyolojik doku bütünlüğü ile gerçekleşmesine olanak sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca yara oluşumundan doksan gün sonra IL 10 overekspresyonunun doz bağımlı bir biçimde skar formasyonunu azaltarak iyileşen dokunun sağlam doku ile benzer özellikler göstermesini sağladığı gösterilmiştir (81). Bizim çalışmamızda yara+steroid+hücre grubunda yaranın ilk günden itibaren şiddetli pozitif immunoreaktivite göstermesi ve diğer günlerde de bir miktar azalmasına rağmen yüksek seyretmesi skar oluşumunun azalmasına katkıda bulunabileceğini düşündürdü.

HIF1 proteinleri hücre ve dokularda düşük oksijen basıncına adaptasyon, hücre sağ kalımı ve çoğalması, anjiyogenez, eritropoez, glukoz alınımı ve demir metabolizması gibi olaylara bağlı birçok genin hipoksiye transkripsiyonel aktivasyon cevaplarının anahtar regülatörüdür(82, 83, 84). HIF1 proteini, hücrede sürekli olarak eksprese edilen HIF1 β altünitesi ile HIF1 α altünitesinin bir araya gelmesi ile oluşan bir heterodimerdir. HIF1 α altünitesi, ortamda oksijen konsantrasyonunun azalmasına bağımlı olarak aktive olmaktadır (85). Bizim çalışmamızda HIF1 α immunoreaktivitesinin, yara+steroid+hücre ve yara+ hücre gruplarında 1. günden itibaren gözlemlendiği, yara grubunda 5. günde, yara+steroid grubunda ise 10. günde pozitif olduğu saptandı. HIF1 α immunoreaktivitesinin 21. günde ise yara+steroid+hücre grubunda devam ettiği fakat yara+ hücre grubunda ise negatif olduğu izlendi. Fitsialos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; mekanik yaralanmalarda keratinositlerin güçlü bir şekilde HIF1 transkripsiyonunu uyardığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada HIF1 α upregulasyonunun yara iyileşmesi sırasında keratinosit migrasyonda önemli bir rol oynadığı, HIF1 α inhibisyonunun yara kapanmasını geciktirdiği saptanmıştır(86). Bizim çalışmamızda yara+steroid+hücre grubunda HIF1 α immunoreaktivitesinin 21. günde dahi devam etmesi transfer edilen keratinositlerin HIF1 α salgıladığını ve yara iyileşmesine steroid uygulamasına rağmen pozitif etki ettiği görülmüştür.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın amacı, embriyonik kök hücreden farklılaştırılan keratinositlerin tek doz steroid uygulaması sonrası yara iyileşmesine etkisinin araştırılması olup, elde edilen hücrelerin steroid kullanılan olgularda yara iyileşmesini olumlu etkilediği sonuca varıldı.

Yara tamiri sırasında ise, transfer edilen keratinositler sayesinde tamir mekanizması sürecinin daha erken başladığı ve yara tamirinde rol alan moleküllerin salgısının da yara + steroid ve yara gruplarına oranla yara + hücre ve yara + steroid + hücre gruplarında tamir sürecini iyi yönde etkileyecek şekilde olması, keratinositlerin klinik uygulamalarda özellikle steroid kullanan olgularda kullanılabileceğini desteklemektedir. Bununla beraber farklılaştırılan keratinositlerin bir mesh üzerinde transfer edilmesi, hücre transferi sırasında hücre kaybını önlemesi yanısıra, keratinositlerin ortama adapte olmasını da kolaylaştırdığını düşünmekteyiz. Ancak farklılaştırılan keratinositlerin farklı uygulama metodlarının denenmesi klinik uygulamalarda daha efektif sonuçlar alınabilmesi açısından yararlı olacaktır.

İn vitro olarak üretilen keratinositlerin, sadece steroid kullanan olgularda değil yara iyileşmesini lokal ya da sistemik olarak negatif yönde etkileyen diğer faktörlerin bulunduğu olgulardaki etkinliklerinin araştırılarak klinik uygulamalar için ön çalışmalar planlanması gerektiği düşünülmektedir.

VII. ÖZET

Günümüzde kronik ilaç kullanımının artmasına bağlı kronik sistemik ve lokal faktörlerin etkisi ile yara iyileşmesinde bozulma, kronik kapanmayan yaralar oluşma sıklığında artışlar ortaya çıkmaktadır. Bu tezin amacı embriyonik kök hücreden farklılaştırılan keratinositlerin yara iyileşmesini bozan faktörlerden steroid kullanımı söz konusu olduğunda yara iyileşmesine etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmamızda fare embriyonik kök hücrelerinden immunohistokimyasal yöntemler ile keratinositler elde edildi. Toplam 64 adet fare 4 eşit gruba ayrıldı. Bu gruplar; sadece cerrahi yara oluşturulan yara grubu, cerrahi yara oluşturulmadan önce steroid uygulanan yara + steroid grubu, cerrahi yara oluşturulduktan sonra embriyonik kök hücreden farklılaştırılmış keratinositlerin uygulandığı yara + hücre grubu ve cerrahi yara oluşturulması öncesi steroid uygulanan, cerrahi yara oluşturulduktan sonra da kök hücreden farklılaştırılmış keratinositlerin transfer edildiği yara + steroid + hücre grubu olarak sınıflandırıldılar. Deneklerden yara oluşturulması sonrası 1., 5., 10., ve 21. günlerde biyopsiler alınarak yara iyileşme süreçleri izlendi ve grupların birbirleriyle karşılaştırılması yapıldı. Alınan biyopsi örnekleri; hematoksilin-eozin boyaması, MMP2, MMP9, IL1 β , TNF α , MCP1, HIF1 α , FGF2, EGF, COL1A, IL10 dağılımları açısından değerlendirildi.

Çalışmamızın sonucunda steroid uygulamasının yara iyileşmesini olumsuz etkilediği, embriyonik kök hücreden farklılaştırılan keratinositlerin uygulandığı gruplarda keratinosit uygulanmayan gruplara göre yara iyileşmesinin olumlu olarak etkilendiği görüldü.

VIII. SUMMARY

In today's world, chronic systemic and local factors depending on increase of chronic drug use, cause impaired wound healing. Also frequency of chronic non-healing wounds is getting higher. The aim of this thesis is to analyze the effect of embryonic stem cells differentiated keratinocytes to wound healing in the use of steroid use which impairs wound healing.

In this study, keratinocytes was obtained from mouse embryonic stem cells by immunohistochemistry study. In total, 64 mice were divided into 4 equal groups. These groups were; only surgical wounds group; steroid given wound before the creation of the surgical wound + steroid group; embryonic stem cells differentiated keratinocytes implemented wound after the surgical wound created + cell group and the last one is surgical wounds that are steroid administered previously, then after surgical wound stem cells differentiated keratinocytes transferred to this wound + steroids + cell group. After creation of wounds, wound healing processes followed by taking a biopsy from subjects in 1, 5, 10, and 21 days and these groups were compared with each other.

The biopsy samples was evaluated in terms of H & E stain and distributions of MMP2 , MMP9 , IL1 β , TNFa , MCP1 , HIF1 α , FGF2 , EGF, COL1, IL10.

In the result of our study we conducted that: application of steroids adversely affect wound healing, wound healing affected positively in the groups which we applied embryonic stem cells differentiated keratinocytes compared to the group without keratinocyte application.

VII. KAYNAKLAR

1. Prof. Dr. Can İ; "Kök Hücre; Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları", Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara, 2014
2. Horch RE, Kopp J, Kneser U, et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. J Cell Mol Med 2005; 9: 592-608.
3. Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. 2004
4. Sue O'Shea K. Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. Biol Reprod 2004; 71: 1755- 65.
5. Montoya FU, Verfaillie CM, Hu WS. Culture Systems for Pluripotent Stem Cells. J Of Bioscience and Bioengineering. 2005;100: 12- 27.
6. Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. J Anat 2002; 200: 277- 82.
7. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 745-53.
8. Vats A, Tolley NS, Polak JM et al. Stem cells: sources and applications. Clin Otolaryngol 2002; 27: 227- 32.
9. Şenel F. Kök Hücreler. Bilim ve Teknik Dergisi 2002; 1- 15.
10. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. Cell Prolif 2004; 37: 23- 34.
11. Gadue P, Huber TL, Nostro MC, et al. Germ layer induction from embryonic stem cells. Experimental Hematology 2005; 33: 955- 64.
12. Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? Development 2005; 132: 227- 33.
13. Loebel DAF, Watson CM, Young AD et al. Lineage choice and differentiation in Mouse embryos and embryonic stem cells. Developmental Biology 2003; 264: 1- 14.

14. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. J Cell Mol Med 2004; 8: 465- 73.
15. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. Trends in Cell Biology 2002; 12: 432- 38.
16. Friel R, Van Der Sar S, Mee PJ. Embryonic stem cells: Understanding their history, cell biology and signalling. Advanced Drug delivery Reviews 2005; 57: 1894- 1903.
17. Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. Cardiovascular Research 2003; 58: 324-35.
18. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 299- 319.
19. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1998: 346- 58.
20. Sadler TW. Langman' s Medikal Embriyoloji. Ankara: Palme Yayıncılık, 2005: 417- 22.
21. Prof. Dr. Dökmeci İ; "Farmakoloji, Temel Kavramlar", Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000: 496-507
22. Prof. Dr. Kayaalp O; "Tıbbi Farmakoloji" , İstanbul, 2000: 1286-1313
23. Prof. Dr. Kayaalp O. S; İmmun Sistem Bozuklukları ve İmmunomodulator İlaçlar; Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı, Editör Kayaalp S. O, Ankara Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti 2002: 416- 426
24. Guyton A. C. md; "The Text Book Of Medical Pyhsiology 7. th Edition" Merk Yayıncılık, İstanbul, 1986, 1311-1331
25. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1995: 53- 58.

26. Yararbaş Ö, Aydede H. Yara İyileşmesi ve Yara Bakımı. Çelik Ö, ed; Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. İzmir: Asya Tıp Kitabevi, 2007: 1039- 48.
27. Diegelmann RF, Evans MC. Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9: 283- 89.
28. http://www.rndsystems.com/DAM_public/5187.gif
29. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 69: 513- 21.
30. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314- 21.
31. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, et al. Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and Mig Are Sequentially and Differentially Expressed During Phase-Specific Infiltration of Leukocyte Subsets in Human Wound Healing. *Am J Pathol* 1998; 153: 1849- 60.
32. Barbul A. Wound healing. *Schwartz's Principles of Surgery*. Mc Graw Hill Eight edition. 2005; 223.
33. Sherris DA, Kern EB. The Wound. In *Basic Surgical Skills*, Mayo Foundation for medical Education and research, Rochester, 1999:8-12
34. Onat DA. Yara İyileşmesi. *Temel Klinik Bilimler*. Saraçoğlu F(ed), cilt2, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, 1989:635-636.
35. *Masters of Surgery*. Lippincott Williams/Wilkins. 5. ed. Vol 1. 2007.
36. Sherris DA, Kern EB. Sutures and Knots. In *Basic Surgical Skills*, Mayo Foundation for medical Education and research, Rochester, 1999.

37. Wenzel PR. Preoperative antibiotic prophylaxis. N Eng J Med 1992; 326:337- 339.
38. Mangram, A., Horan, T. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, National Center for Infectious Diseases, US Department of Health and Human Services, 1999; 20 (4):.247278.
39. www.kokhücredernegi.org.tr
40. www.histology.leeds.ac.uk/skin/epidermis_layers.php
41. http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/lecture.f04/integument.f04/skinlayer.jpg
42. www.woundeducators.com
43. <http://www.shieldhealthcare.com/>
44. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair and Regeneration 2008; 16: 585-601.
45. Coulombe PA. Towards a Molecular Definition of Keratinocyte Activation after Acute Injury to Stratified Epithelia. Biochemical And Biophysical Research Communications 1997; 236: 231- 38.
46. Shi C, Zhu Y, Su Y, et al. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. Trends in Biotechnology 2006; 24: 48- 52.
47. Heng BC, Cao T, Liu H, et al. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. Experimental Dermatology 2005; 14: 1- 16.
48. Aberdam D. Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells. Int J Dev Biol 2004; 48: 203- 6.
49. Coraux C, Hilmi C, Rouleau M. Reconstituted Skin from Murine Embryonic Stem Cells. Current Biology 2003; 13: 849- 53.
50. Aberdam D, Gambora K, Medawar A, et al. Embryonic stem cells as a cellular model for neuroectodermal commitment and skin formation. C R Biologies 2007; 330: 479- 84.
51. Gambaro K, Aberdam E, Virolle T, et al. BMP-4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of Mouse embryonic stem cell-derived neural precursors. Cell Death and Differentiation 2006; 13: 1075- 87.

52. Troy TC, Turksen K. Commitment of Embryonic Stem Cells to an Epidermal Cell Fate and Differentiation in Vitro. *Developmental Dynamics* 2005; 232: 293- 300.
53. Haase I, Knaup R, Wartenberg M, et al. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells into keratinocyte-like cells. *European Journal of Cell Biology* 2007; 86: 801- 5.
54. Kawasaki S, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity. *Neuron* 2000; 28: 31- 40
55. Bagutti C, Wobus AM, Fassler R, et al. Differentiation of Embryonal Stem Cells into Keratinocytes: Comparison of Wild- Type and β_1 Integrin- Deficient Cells. *Developmental Biology* 1996; 179: 184- 96.
56. Inoue H, Oshima H, Matsuzaki KI, et al. Application for regenerative medicine of epithelial cell culture-vistas of cultured epithelium. *Congenital Anomalies* 2006; 46: 129- 34.
57. Horch RE, Bannasch H, Kopp J, et al. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplant* 1998; 7: 309-17.
58. Greenberg S, Margulis A, Garlick JA. In Vivo Transplantation of Engineered Human Skin. In: Turksen K, eds. *Epidermal Cells Methods and Protocols*, Humana Press, 2005: 423-37.
59. Engin A. Yara İyleşmesi. Sayek İ, ed; *Temel Cerrahi*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 320- 25.
60. Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends in Cell Biology* 2001; 11: 143- 46.
61. Wu L, Pierce GF, Galiano RD, et al. Keratinocyte growth factor induces granulation tissue in ischemic dermal wounds. Importance of epithelial-mesenchymal cell interactions. *Arch Surg* 1996; 131: 660- 6.
62. Ceccarelli S, Cardinali G, Aspite N, et al. Cortactin involvement in the keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 promotion of migration and cortical actin assembly in human keratinocytes. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1758- 77.
63. Werner S, Peters KG, Longaker MT, et al. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6896- 900.

64. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996; 271: 15292- 7.
65. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 165- 97.
66. Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 457- 62.
67. Sivamani RK, Garcia MS, Isserof RR, Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 2849- 68.
68. DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, et al. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol* 1995; 146: 868- 75.
69. Wetzler C, Kampfer 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: 245- 53.
70. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, et al. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 457- 63.
71. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005;9:267-85.
72. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.* 2005;87:249–63.
73. Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest.* 1994;70(2):176–182.
74. Agren MS. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol.* 1994;131(5):634–640.
75. Caley MP, Martins VL, O'Toole EA. Metalloproteinases and wound healing. *Adv Wound Care.* 2015;4(4):225–234.
76. Balaji S, Han N, Moles C, et al. Angiopoietin-1 improves endothelial progenitor cell-dependent neovascularization in diabetic wounds. *Surgery.* 2015;158(3):846–856.

77. Tarlton JF, Vickery CJ, Leaper DJ, Bailey AJ. Postsurgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metalloproteinase-9. *Br J Dermatol*. 1997;137(4):506–516.
78. Ferreras M, Felborb U, Lenhard T, Olsen BR, Delaissé J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett*. 2000;486:247-51.
79. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, et al: IL10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220, 1991.
80. Matthes T, Werner-Favre C, Tang H, Zhang X, et al: Cytokine mRNA expression during an in vitro response of human B lymphocytes: kinetics of B cell tumor necrosis factor α , IL-6, IL-10 and transforming growth factor β 1 mRNAs. *J Exp Med* 178:521-528, 1993.
81. Gordon A, Kozin ED, Keswani SG, et al.: Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 70.
82. Torbett NE, Luna-Moran A, Knigh ZA, Houk A, Moasser M, et al. A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *Biochem J* 2008; 415 (1):97-110.
83. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119:203-10.
84. Yoo YG, Kong G, Lee MO. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase. *The EMBO Journal* 2006; 25(6):1231-41.
85. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ* 2008; 15(4):621-27.
86. Fitsialos G, Bourget I, Augier S, Ginouvès A, Rezzonico R, Odorisio T, Cianfarani F, Virolle T, Pouysségur J, Meneguzzi G, Berra E, Ponzio G, Buscà R. HIF1 transcription factor regulates laminin-332 expression and keratinocyte migration. *Journal of Cell Science* 121, 2992-3001 Published by The Company of Biologists 2008 doi:10.1242/jcs.029256