



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**“YANIK MODELİNDE WHARTON JELİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
KAYNAKLI CONDITIONED MEDIUM’UN YARA İYİLEŞMESİ
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI”**

Nijat MAJİDOV

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zekeriya TOSUN**

Konya-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**“YANIK MODELİNDE WHARTON JELİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
KAYNAKLI CONDITIONED MEDIUM’UN YARA İYİLEŞMESİ
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI”**

Nijat MAJİDOV
TIPTA UZMANLIK TEZİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Zekeriya TOSUN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından **21122017** proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2023

1. GİRİŞ.....	7
1.1. Giriş ve Amaç	7
1.2. Genel Bilgiler	8
1.2.1 Derinin anatomisi	8
1.2.1.1. Epidermis Anatomisi	8
1.2.1.2. Dermis Anatomisi	9
1.2.1.3. Hipodermis Anotomisi.....	9
1.2.2 Yanık Epidemiyolojisi.....	9
1.2.3 Yanık Risk Faktörleri	9
1.2.4 Yanık Şiddetinin Sınıflandırılması.....	10
1.2.4.1. Yanık Derinliğine göre	10
1.2.4.2. Yanık Yüzey Alanının Genişliğine göre.....	11
1.2.5 Yanık İyileşme Mekanizması ve Patofizyolojisi.....	13
1.2.6 Yanık Yaralanma Tedavisi.....	14
1.2.7 Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Conditioned Medium.....	15
 2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	 16
2.1. Deney Protokolü.....	16
2.1.1. Deney Hayvanları.....	16
2.1.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi	16
2.1.3. Gümüş Sulfadiazin	18
2.1.4. PRP (Platelet Rich Plazma) Hazırlama Yöntemi	19
2.1.5. Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium'un Elde Edilmesi.....	20
2.1.5.1 Umbilikal Kord Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi	20
2.1.5.2 Conditioned Medium Hazırlama Yöntemi	21
2.1.6. Yanık Uygulaması.....	22
2.1.7. Anestezi.....	24
2.1.8. Cerrahi Sonrası Takip	25
2.1.9. Ötenazi Uygulaması.....	25
2.1.10. Değerlendirme Yöntemleri.....	25
2.1.10.1. Makroskopik Değerlendirme.....	25
2.1.10.2. Histopatolojik Değerlendirme	25

2.1.10.3. PCR Değerlendirme	26
2.1.10.4. Elde Edilen Sonuçların İstatistiki Analizi	28
2. BULGULAR.....	29
2.1. Makroskopik Değerlendirme Sonuçları	29
2.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	30
2.3. PCR Değerlendirme Sonuçları	39
3. TARTIŞMA.....	46
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
5. KAYNAKLAR.....	50
6. ÖZET	54
7. SUMMARY	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

TGF β : Dönüştürücü büyüme faktörü– β

IL-1: İnterlökin- 1

IL-8: İnterlökin- 8

TNF: Tümör nekroz faktörü

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

ECM: Ekstrasellüler matris

MMP: Matris metaloproteinaz

MSC: Mezenkimal kök hücre

FGF-2: Fibroblast büyüme faktörü-2

PRP: Platelet Rich Plasma/ Platelet Zengin Plazma

PPP: Platelet Poor Plasma/ Platelet Az Plazma

WJ-MSC: Wharton Jeli kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Dokuzlar kuralı

Tablo 1.2: Lund-Browder yanık tablosu

Tablo 2.1: deney grupları ve yapılan işlemler

Tablo 2.2: Real time PCR ısı protokolü

Tablo 3.1: 1. Grup (Kontrol grubu) 1. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.2: 1. Grup (Kontrol grubu) 2. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.3: 2. Grup (PRP grubu) 1. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.4: 2. Grup (PRP grubu) 2. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.5: 3. Grup (Gümüş sulfadiazin grubu) 1. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.6: 3. Grup (Gümüş sulfadiazin grubu) 2. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.7: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium)
1. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.8: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium)
2. hafta histopatolojik bulgular

Tablo 3.9: 1. Hafta histopatolojik bulguların istatistiki olarak karşılaştırılması

Tablo 3.10: 2. Hafta histopatolojik bulguların istatistiki olarak karşılaştırılması

Tablo 3.11: 1. Hafta real time PCR ile VEGF ve IL-1 seviyeleri istatistiki karşılaştırması

Tablo 3.12: 2. Hafta real time PCR ile VEGF ve IL-1 seviyeleri istatistiki karşılaştırması

ŞEKİLER LİSTESİ

Şekil 2.1: İntrakardiyak kan elde edilmesi

Şekil 2.2: PRP enjekte edilmesi

Şekil 2.3: Gümüş sulfadiazin uygulanması

Şekil 2.4: Conditioned Medyum hazırlanan Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal Kök Hücreler

Şekil.2.5: Yanık alanına Wharton Jeli kaynaklı Conditioned Medium verilmesi

Şekil2.6: Ratların sırtının traş edilmesi

Şekil 2.7: Yanık oluşturmak ve ısıyı ölçebilmek için düzenlenen alet

Şekil 2.8: Yanık oluşturma modeli

Şekil 3.1: Ratta oluşturulan yanık modeli (0. Saat)

Şekil 3.2: Ratta oluşturulan yanık modeli (1. Saat)

Şekil 3.3: 1.grup (kontrol) ratda bir hafta sonrasında, ödem, hiperemi, epidermiste vakuoller ile epidermiste ayrılma H.E. x100

Şekil 3.4: Kök hücre sıvısı grubunda 1 hafta sonrasında, ödem, hiperemi, epidermiste vakuoller ile anjiogenezis. H.E. x100

Şekil 3.5: Kök hücre sıvısı grubunda iki hafta sonrasında epitelizasyon. H.E. x100

Şekil 3.6: PRP grubunda iki hafta sonrasında PMNL infiltrasyonu. H.E. x100

Şekil 3.7: PRP grubunda iki hafta sonrasında epitelizasyon. H.E. x100

Şekil 3.8: 1. Grup (Kontrol) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.

Şekil 3.9: 2. Grup (PRP) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.

Şekil 3.10: 3. Grup (Gümüş Sulfadiazin) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.

Şekil 3.11: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.

Şekil 3.12: 1. Grup (Kontrol) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.

Şekil 3.13: 2. Grup (PRP) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.

Şekil 3.14: 3. Grup (Gümüş Sulfadiazin) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.

Şekil 3.15: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.

1.Giriş

1.1 Giriş ve Amaç

Yanık her bir insanın karşılaşılabileceği en önemli travmalardan biridir. Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre yanık yaralanmasına bağlı yıllık 180.000 ölüm gelişmektedir. Aynı zamanda çocuklarda öldürücü olmayan (non-fatal) yaralanmaların en sık 5. nedenidir [1]. Yanık yaraları hem hastalara hem de sağlık sistemine önemli zorluklar oluşturmaktadır. Yanık hastaları arasındaki ölüm oranının dünya genelinde yaklaşık %15 olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle derin yanıklarda ciltaltı yapıların (dermis, hipodermis ve kaslar) etkilenmesi ile uzamış yara iyileşme zamanı en önemli zorluklardan biridir.[2] Yanık sonrası geniş bir hücre ve doku kaybı oluşabilir [3]. Aynı zamanda yanık sonrası komplikasyonlar gelişebilir ki, bu da tedavi sürecinde zorluklara neden olabilmektedir [4]. Yanık yarası derinliğine göre sınıflandırılmaktadır. Derin 2.derece yanıklar retiküler dermise ulaşan, yüksek dermis inflamasyon riskine sahip ve hipertrofik skar ve keloid oluşumu ile karakterizedir [5]. Bu komplikasyonları önlemek için çeşitli pansuman malzemeleri ve ilaçlar geliştirilmiştir [6].

Günümüzde sıklığı giderek artan ve mortalite ve morbiditeye neden olan yanığın tedavisinde kök hücre uygulamaları günden güne artmaktadır. Literatürde yanık tedavisinde Kemik İliği Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium daha önce kullanılmıştır [7]. Fakat Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium'un (WJMKH-CM) yanık tedavisinde kullanımına literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada yanık sonrası Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Mediumun yanık iyileşmesine katkıda bulunup bulunmadığı ve yara iyileşmesi üzerinde etkisi varsa bunu hangi yolla gerçekleştirildiği araştırılmaktadır.

1.2 Genel Bilgiler

1.2.1 Derinin Anatomisi

Deri vücudun en geniş organı olup, vücudun dış yüzeyini örtmektedir. Epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarından oluşmaktadır. Her 3 tabakanın anatomi ve fonksiyonları farklılık göstermektedir. Cilt yapısı patojenler, UV ışınları, kimyasallar ve mekanik yaralanmalara karşı bariyer görevi görmektedir.

1.2.1.1 Epidermis Anatomisi

Epidermis 5 tabakadan oluşmuştur: bazal hücre tabakası (stratum bazale), dikenli hücre tabakası (stratum spinozum), granüler hücre tabakası (stratum granulozum), önleyici tabaka (stratum lusidum), boynuzsu tabaka (stratum korneum).

Bazal hücre tabakası (stratum bazale), 'stratum germinative' olarak da adlandırılmaktadır ve epidermin en derin tabakasıdır. Tek sıra bazal hücrelerden oluşmaktadır. Dermisten bazal membranla ayrılmaktadır ve bazal membrana hemidesmozomlar aracılığı ile tutunmaktadır. Bu tabakada keratinositler üretilmektedir. Aynı zamanda melanositler de bulunmaktadır.

Dikenli hücre tabakası (stratum spinozum) keratinosit hücrelerinden oluşmaktadır. Bu hücreler sınırlı çoğalma kapasitesine sahiptir. Bu tabakada aynı zamanda Langerhans hücreleri de bulunmaktadır. Bu hücreler immün sistem hücresi olarak görev yapmaktadırlar.

Granüler hücre tabakası (stratum granulozum) çoğalma kapasitesi olmayan keratinosit hücrelerinden oluşmaktadır. Bu hücrelerde keratin üretiminde rolü olan sitoplazmik granüller bulunmaktadır.

Önleyici tabaka (stratum lusidum) avuç içi ve taban gibi daha kalın derili alanlarda bulunmakta ve eleidin içermektedir.

Boynuzsu tabaka (stratum korneum) epidermin en dış tabakası olup aselüler keratin tabakası olarak bilinmektedir.

1.2.1.2 Dermis Anatomisi

Dermis epidermise bazal membran aracılığı ile bağlanmakta ve 2 tabakadan oluşmaktadır: daha üstte olan papiller tabaka, daha altta olan ve ter bezleri, kıl folikülleri, kas, sinir ve kan damarları içeren retiküler tabaka (ağsı tabaka).

1.2.1.3 Hipodermis Anatomisi

Hipodermis, kas tabakasının üzerinde dermisin altında bulunmaktadır. Yağ ve bağ dokusundan oluşmaktadır.

1.2.2 Yanık Epidemiyolojisi

Yanık yaralanmaları, ağrıya neden olarak ruh sağlığı ve yaşam kalitesini etkilemekte, ömür boyu sürecektir fiziksel ve psikolojik travmalara neden olmaktadır. DSÖ'ne göre dünya çapında her yıl 11 milyon yanık yaralanmasının meydana gelmekte ve bunların 180.000'i ölüme neden olmaktadır. Çocuklarda yanığa bağlı ölümler gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelere göre 7 ila 11 kat daha fazladır. [8]. Amerika Birleşik Devletleri'nde alev yanıklarının hala yaralanmaların çoğunluğunu oluşturduğunu (%41), haşlanmaların %31 ile ikinci sırada olduğunu bildirmektedir. Ülkemize ait istatistiksel veriler ise kısıtlı ve sınırlı sayıda olup, belli bir bölge ve yaş grubuna aittir.

1.2.3 Yanık Risk Faktörleri

Yanık yaralanmasının birçok nedeni bulunmaktadır. En sık yanık nedenleri: alev yanıkları, haşlanma yanıkları ve sıcak cisim ile temas yanıklarıdır [9]. Düşük sosyoekonomik düzey, nörolojik hastalıklar, madde kullanımı, yaşlılık, çocuk olma önemli yanık risk faktörleridir [10].

Parlama ve alev yanığı yaralanması, yanık merkezlerine yapılan başvuruların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Çoğunlukla, patlayan yakıtın miktarı ve türüyle orantılı olarak dermis tabakasına

ulaşmaktadır.

Sıcak su haşlanma yanıkları bir diğer yaygın yanık nedenidir. Haşlanma hasarının derinliği, suyun sıcaklığına, derinin kalınlığına ve temas süresine bağlıdır. Kaynar su, temas süresi çok kısa olmadıkça, genellikle derin bir dermal yanığa neden olur. Katı yağlar (gres yağı) ve kızgın yağlar genellikle derin dermal ve hatta tam kat yaralanmalara neden olur.

Temas yanıkları, sıcak metaller, plastikler, cam veya sıcak kömürlerle oluşmaktadır. Yaralanmanın genellikle çok derin olması nedeniyle temas yanıklarının tedavisi zordur.

Güçlü asitlerin veya alkalilerin neden olduğu kimyasal yanıklar, çoğunlukla endüstriyel kazaların sonucudur. Asit yanıkların alkali yanıklara göre kendini sınırlama kapasitesi daha yüksektir. Tam kalınlıkta bir kimyasal yanık, yüzeysel görünebilir ve klinik olarak ciltte yalnızca hafif bir renk değişikliğine neden olabilir. Kesinlikle emin olunmadıkça, kimyasal yanıklar aksi ispatlanana kadar derin dermal veya tam kat olarak kabul edilmelidir.

Bir diğer yüksek riskli yanık elektrik yanıklarıdır. Düşük voltaj yaralanmaları (440 volttan az), nadiren önemli hasara neden olmaktadır. Yüksek voltaj yaralanmaları (1000 voltun üzerinde) derin doku tahribatına neden olma eğilimindedir. Elektrik vücutta dolaşırken, elektrik enerjisi ısıya dönüştürülmektedir. Daha az yüzey alanına sahip organlarda daha az dağılma ile daha yoğun ısı üretilmektedir. Bu nedenle, parmaklar, eller, ön kollar, ayaklar ve alt bacaklar genellikle daha fazla hasar görürken, gövde genellikle daha az etkilenmektedir. Elektrik yanığı sonrası kas hasarı rabdomiyolize ve buna bağlı böbrek yetmezliğine yol açabilmektedir [11].

1.2.4 Yanık Şiddetinin Sınıflandırılması

Yanık şiddeti 2 parametreye göre sınıflandırılabilir: termal hasarın derideki derinliğine göre ve etkilenen total vücut yüzey alanının genişliğine göre [12].

1.2.4.1 Yanık derinliğine göre

Yanık yarasının, yanığın etkilediği deri derinliğine bağlı olarak 3 tipi mevcuttur.

Birinci derece yüzeysel yanıklar

Sadece epidermisi içermekte ve dokunulduğunda sıcak, ağrılı, kırmızı, yumuşak ve solgundur. Genellikle

kabarma olmamakta, tipik örneği güneş yanığıdır. Genel olarak 3 ile 5 günde iyileşirler. Ağrı şikayetlerinin giderilmesi için ağrıkesiciler (analjezikler) kullanılabilir.

İkinci derece kısmi kalınlıkta yanıklar

İkinci derece kısmi kalınlıkta yanıklar epidermisten dermise doğru uzanmaktadır. Yanığın dermiste derinliğine göre yüzeysel ve derin olarak sınıflandırılmaktadır. Papiller dermiste sınırlı kalan yanıklar 2. derece yüzeysel, retiküler dermise uzanan yanıklar ise 2. derece derin yanıklardır. 2. derece yanıklar tipik olarak çok ağrılı, kırmızı, kabarcıklı, nemli, yumuşak ve dokunulduğunda solgundur. Sıcak yüzeylelerden, sıcak sıvılardan veya alevden kaynaklanan yanıklar neden olmaktadır. 2 hafta içinde iyileşirler.

Üçüncü derece tam kat yanıklar

Üçüncü derece tam kat yanıklar hem epidermis, hem dermis, hem de derialtı yağ dokusunu içermektedir. Bu yanıklarda ağrı ya çok azdır ya da hiç yoktur. Alev, sıcak sıvı veya aşırı ısıtılmış gaz yanıkları üçüncü derece yanık oluşturabilmektedir. Derin yanıklar deri greftlemesi gerektirebilir.

1.2.4.2 Yanık yüzey alanının genişliğine göre

Geniş yanık yüzey alanı mevcut hastalar sıvı resüsitasyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. Verilecek sıvı miktarını belirlemek için yanık toplam vücut yüzey alanını (TVYA) temel alan çeşitli formüller geliştirilmiştir. Yanık toplam vücut yüzey alanını hesaplamak için en sık kullanılan ve en bilineni ‘Dokuzlar’ kuralıdır. Bu kurala göre her bir kol, kafa toplam vücut yüzey alanının %9’unu, her bir bacak, gövde ve arka gövdenin toplam vücut yüzey alanının %18’ini, oluşturduğu tahmin edilmektedir (Tablo 1.1). Fakat bu kural tüm yanık hastaları için geçerli değildir. Küçük çocukların orantısal olarak erişkinlerden daha büyük kafaları ve daha küçük bacakları vardır. Bu yüzden çoğu yanık merkezi yaşa göre farklılıkları ayarlayan Lund-Browder tablosunu kullanmaktadır (Tablo1.2) [13]. Sıvı resüsitasyonu için gerekli sıvı hacmi Parkland formülü ile hesaplanmaktadır. Sıvı resüsitasyonunun başlangıç hızı belirlendikten sonra, sıvılar idrar çıkışına göre ayarlanmalıdır.

Tablo 1.1: Dokuzlar kuralı

Vücut kısmı	Erişkin	Çocuk
Baş	%9	%18
Boyun	%1	—
Kol	%9	%9
Diğer kol	%9	%9
Gövde ön yüz	%18	%18
Gövde arka yüz	%18	%18
Bacak	%18	%14
Diğer bacak	%18	%14

Tablo 1.2: Lund-Browder yanık tablosu

	0-1 yaş	1-4 yaş	5-9 yaş	10-14 yaş	15 yaş	Erişkin
Baş	19	17	13	11	9	7
Boyun	2	2	2	2	2	2
Gövde, ön	13	13	13	13	13	13
Gövde, arka	13	13	13	13	13	13
Kol, sağ	4	4	4	4	4	4
Kol, sol	4	4	4	4	4	4
Önkol, sağ	3	3	3	3	3	3
Önkol, sol	3	3	3	3	3	3
El, sağ	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
El, sol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Genital	1	1	1	1	1	1
Gluteal, sağ	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Gluteal, sol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Uyluk, sağ	5,5	6,5	8	8,5	9	9,5
Uyluk, sol	5,5	6,5	8	8,5	9	9,5
Bacak, sağ	5	5	5,5	6	6,5	7
Bacak, sol	5	5	5,5	6	6,5	7
Ayak, sağ	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Ayak, sol	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

1.2.5 Yanık iyileşmesi mekanizması ve patofizyolojisi

Yaralanmadan hemen sonra, yanık yarası üç bölgeye ayrılabilir:

- Pıhtılaşma bölgesi (koagülasyon zonu) en fazla ısıya maruz kalan ve en fazla hasarın olduğu bölge. Proteinler 41 °C'nin üzerinde denatüre olmaktadır. Bu nedenle yaralanma bölgesindeki

aşırı ısı protein denatürasyonuna ve pıhtılaşmasına neden olarak doku nekrozuna yol açmaktadır. Geri dönüşümsüz hasar oluşmaktadır.

- İskemi bölgesi (staz zonu) kurtarılabılır bölge. Merkezi pıhtılaşma bölgesinin çevresinde, azalmış perfüzyon ve potansiyel olarak kurtarılabılır doku ile karakterize edilen iskemi bölgesi (staz zonu) bulunur. Bu bölgede hipoksi ve iskemi, müdahale edilmediği takdirde yaralanmadan sonraki 48 saat içinde doku nekrozuna yol açabilir.
- Hiperemi bölgesi artan enflamatuvar vazodilatasyon ile karakterize yaranın en dış bölgesi. Artmış kan akımı enfeksiyon veya diğer yaralanmaları engellemektedir. Bu zonda minimal hasar oluşmaktadır [14].

Yara iyileşmesinin 4 fazı bulunmaktadır.

Hemostaz, yaralanmadan hemen sonra meydana gelmektedir. Vazokonstriksiyon, trombosit aktivasyonu ve agregasyonu ile pıhtılaşma ve büyüme faktörlerinin (PDGF, EGF ve TGF β gibi) salınımını içermektedir. Monositler ve nötrofiller, lokalize vazodilatasyon nedeniyle yaralanma bölgesine toplanmakta ve inflamasyon fazını başlatmaktadır.

Enflamasyon, yaralanmadan sonraki 24 saat içinde başlar ve yaralanmanın ciddiyetine bağlı olarak haftalar ve aylarca sürer. Nötrofiller ve makrofajlar, sitokinler ve kemokinler (IL-1, IL-8 ve tümör nekroz faktörü (TNF) dahil) ve büyüme faktörlerini (TGF β , insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) dahil) salar ve patojenleri yaralanma bölgesinden çıkarır.

Bir sonraki aşama olan proliferasyon, fibroblastların ve keratinositlerin yara bölgesine alınmasını ve aktivasyonunu içerir. Keratinositler, yara iyileşmesi için hayati önem taşıyan hem epitelizasyona (yara yüzeyinin kapanması) hem de anjiyogeneze (kan akışının yeniden sağlanması) yardımcı olur. Endotel hücreleri, anjiyogenezi başlatmak için büyüme faktörleri (VEGF, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler)) tarafından aktive edilir.

Son aşama olan remodeling'de, granülasyon dokusu olgunlaşır ve ECM büyüme faktörlerinin, matris metaloproteinazların (MMP'ler) etkisi altında yeniden şekillenir. [8]

1.2.6 Yanık Yaralanma Tedavisi

Enflamasyon yanık iyileşmesinin en önemli aşamalarından biridir. Bu yüzden anti-inflamatuvar ilaç kullanmak yanık iyileşmesini bozmaktadır. Vazodilatasyon, damar dışı ozmotik aktivite, artmış damar

geçirgenliğine bağlı oluşan ödem enflamasyona eşlik etmektedir. Uzun süreli ödem ve yaygın enflamasyon ağrıyla artırmakta ve yara iyileşmesini bozmaktadır. Enflamasyonun yara iyileşmesi üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkilerinden dolayı yalnızca uzun süreli ve yaygın enflamasyon ve ödem varlığında anti-inflamatuar ilaçlar kullanılmaktadır [15]. Steroid kullanımının enflamasyonu ve ağrıyı azalttığı gösterilmiştir. Tam kat ve derin kısmi kalınlıkta yanıklarda erken eksizyon ve greft altın standarttır.

Yanık yaralarının enfeksiyona duyarlılığı ve sistemik antibiyotiklerin yara dokusuna ulaşımındaki zorluklar nedeniyle topikal anti-mikrobiyaller kullanılmaktadır. Sodyum hipoklorit ilk kullanılan anti-mikrobiyallerdendir. Bir diğer anti-mikrobiyal mafenid asetat 3. derece eskarlarda ve geniş spektrumlu patojenlere karşı son derece etkilidir. Sistemik asidoz, kompansatuar hiperventilasyon ve pulmoner ödem gibi sistemik toksisitesi nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Topikal yara tedavisinin önemli yapıtaşı gümüş içerikli uygulamalardır. Gümüş içerikli topikal tedaviler sepsis ve ölüm riskini önemli derecede azaltmaktadır. Gümüş sulfadiazin topikal yanık uygulamalarında en sık kullanılan ajandır [16]. Gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Gümüş iyonları bakteriyel DNA'ya bağlanarak bakterisidal aktiviteye önemli ölçüde katkı sağlarken, sulfadiazin kısmı ise bakteri metabolik süreçler üzerinde etkilidir. Tüm bunlardan dolayı da yanık tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir [17] [18]

1.2.7 Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik, kıkırdak ve yağ dokuları dahil olmak üzere birkaç farklı mezodermal hücreye farklılaşabilen, kendini yenileme kapasitesine sahip multipotent hücrelerdir. Bu hücreler birçok dokudan izole edilebilir. Bunlardan biri de umbilikal kord Wharton Jeli'dir. Çeşitli çalışmalar, MKH'lerin VEGF, TGF- β , FGF-2 gibi birkaç sitokin ve büyüme faktörü salgıladığını bildirmiştir. Bu biyolojik olarak aktif maddeler, MKH'lerin kültüre edildiği ortamda bulunmakta ve Conditioned Medium olarak adlandırılmakta. [19] Çok sayıda elde edilebilmesi ve hızlı çoğalabilmesi nedeni ile klinik uygulamada çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. [20]

2. Gereç ve Yöntem;

2.1 Deney Protokolü

2.1.1 Deney Hayvanları

SÜDAM tarafından 24/06/2022 tarihli 2022-24 numaralı etik kurul onayı olan, 22122017 proje numaralı çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Deneyde 300-350 gram ağırlığında 32 adet dişi, 32 adet erkek olmak üzere toplamda 64 adet Wistar Albino rat kullanıldı. Çalışmada 4 grup mevcuttu. Her grupta 8 erkek, 8 dişi olmak üzere toplamda 16 adet rat kullanıldı. Tüm prosedürler genel anestezi altında gerçekleştirildi. Ratlar ortama uyumlarının sağlanması için bir hafta standart laboratuvar şartlarında tutuldu: standart diyet, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusları, uygun ısı ve nem ortamı sağlandı.

2.1.2 Deney Gruplarının Belirlenmesi

64 adet rat randomize olarak 4 gruba ayrıldı (1. Grup 16, 2. Grup 16, 3. Grup 16, 4. Grup 16 olacak şekilde) Her grupta 8 adet dişi, 8 adet erkek rat bulundu. Her grup 2 alt gruba ayrıldı (Grup 1a 8, Grup 1b 8, Grup 2a 8, Grup 2b 8, Grup 3a 8, Grup 3b 8, Grup 4a 8, Grup 4b 8 olacak şekilde). Her alt grupta 4 adet erkek, 4 adet dişi rat bulundu.

1. gruba (kontrol) yanık sonrası herhangi bir uygulama yapılmadı.
2. gruba yanık sonrası 1. günde PRP (Platelet Rich Plazma) uygulandı.
3. gruba 1. günde Gümüş sulfadiazin uygulandı.
4. gruba yanık sonrası 1. günde Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium uygulandı. Grup 1 a, 2 a, 3 a ve 4 a 'daki ratlardan 7 gün sonra, grup 1 b, 2 b, 3 b, 4 b 'deki ratlardan ise 14 gün sonra örnekler alındı (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 deney grupları ve yapılan işlemler

Gruplar	0.gün	1. gün	7. Gün	14. Gün
Grup 1 a	Yanık oluşturulması	Herhangi bir uygulama yapılmadı	Biyopsiler alındı	—
Grup 1 b	Yanık oluşturulması	Herhangi bir uygulama yapılmadı	—	Biyopsiler alındı
Grup 2 a	Yanık oluşturulması	PRP (Platelet Rich Plazma) uygulandı	Biyopsiler alındı	—
Grup 2 b	Yanık oluşturulması	PRP (Platelet Rich Plazma) uygulandı	—	Biyopsiler alındı
Grup 3 a	Yanık oluşturulması	Gümüş sulfadiazin uygulandı	Biyopsiler alındı	—
Grup 3 b	Yanık oluşturulması	Gümüş sulfadiazin uygulandı	—	Biyopsiler alındı
Grup 4 a	Yanık oluşturulması	Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium uygulandı.	Biyopsiler alındı	—
Grup 4 b	Yanık oluşturulması	Wharton jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium uygulandı.	—	Biyopsiler alındı

2.1.3 PRP (Platelet Rich Plazma) Hazırlama Yöntemi

PRP literatürde daha önce belirtilen şekilde hazırlandı [21]. 2 adet ratın her birine 150 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin intraperitoneal olarak enjekte edilerek anestezi sağlandı. Her bir rattan 6 ml, toplamda 12 ml intrakardiyak kan elde edildi (Şekil 2.1).

Elde edilen kan 0.7 ml %10 sodyum sitrat içeren enjektöre alındı. Kan 160 g'de (gravite) 20 dakika santrifüjlendi. Alt kısımda kırmızı kan hücreleri, üst kısımdaki plazma tabakası atıldıktan sonra trombosit içeren tabaka elde edildi. Elde edilen tabaka 15 dakika boyunca 400 g'de (gravite) yeniden santrifüj edildi. 2 tabaka elde edildi: PPP (trombosit az tabaka), PRP (trombosit zengin tabaka). PPP atılarak saf PRP elde edildi. Yanık sonrası 1. günde 3. gruptaki her bir ratın yanık bölgesine 1 cc PRP enjekte edildi (Şekil 2.2).

Şekil 2.1: intrakardiyak kan elde edilmesi



Şekil 2.2: PRP enjekte edilmesi



2.1.4 Gümüş Sulfadiazin

Gümüş sulfadiazin (Silverdin krem %1) temin edildi. Yanık sonrası 1. günde 3. gruptaki ratların yanık alanına uygulandı. Yaralar herhangi bir örtü materyalleri ile kapatılmadı (Şekil 2.3)

Şekil 2.3: Gümüş sulfadiazin uygulanması

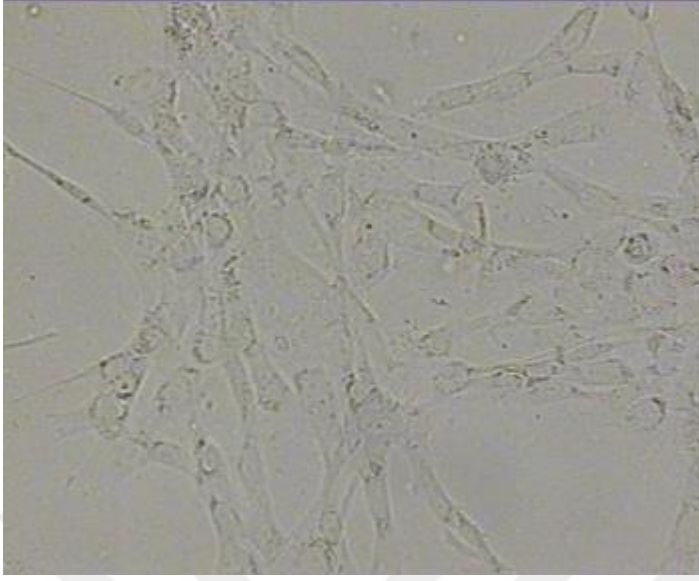


2.1.5 Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Mediumun Elde Edilmesi

2.1.5.1 Umbilical Cord Mezenimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

Çalışmamızda ATCC® (PCS-500-010, American Type Culture Collection, Manassas, USA) firmasından temin edilen ‘İnsan Umbilikal Kord Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre hattı’ ticari olarak temin edilmiş ve kullanılmıştır. Laboratuvarımıza hücreler P2 aşamasında geldi. Bu hücreler α MEM (Minimum Essential Medium α) mediumuna L-Glutamin, Penisilin, Streptomisin ve FBS (Fetal Bovine Serum) eklenerek kültüre edildi, kültürden kaldırma işlemi için tryple mediumu kullanıldı. Bizim çalışmamızda kullanılan hücreler bu medyumlar kullanılarak yapılan pasajlamalar sonucu elde edilen (confluence %70 civarında iken kaldırma işlemi yapıldı) Pasaj 6 (P6) hücrelerdi (Şekil 2.4).

Şekil 2.4: Conditioned Medium hazırlanan Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal Kök Hücreler



2.1.5.2 Conditioned Medium Hazırlama Yöntemi

P6 hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında kültüre edildi. Elde edilen kültür %70 confluence'a ulaşınca süpernatant kısmı ayrıldı. 1000 G'de santrifüj edildi ve 0.22 mm'lik filtreden geçirildi. Elde edilen Conditioned Medium -80°C'de saklandı. Hazırlanan Conditioned Medium yanıklar uygulandıktan sonraki gün çözülerek 16 enjektöre 500 mikrolitre olacak şekilde eşit dağıtıldı ve yanıklara enjekte edildi (Şekil 2.5)

Sekil.2.5: Yanık alanına Wharton Jeli kaynaklı Conditioned Medium verilmesi



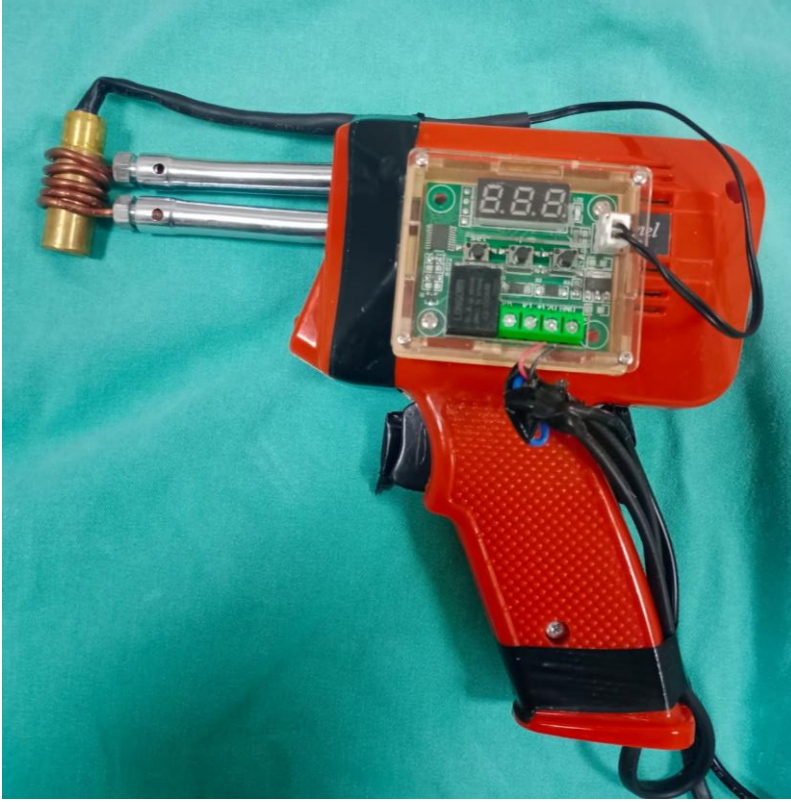
2.1.6 Yanık Uygulaması

Genel anestezi altında ratların sırt bölgeleri traş edildikten sonra 2. derece derin yanık modeli uygulanmaya başlandı (şekil 2.6). 2x2 cm² pirinç plak lehim makinesinin uç kısmına tespit edildi. Bu pirinç plağın içi delinerek ısı ölçmek için kablo yerleştirildi. Lehim makinesine sıcaklığı sabit tutabilmesi için ısı sabitleyici (termostat) monte edildi (şekil 2.7) Metal pirinç plak 100 °C'e kadar ısıtıldıktan sonra ratın sırtına baskı oluşturmayacak şekilde ortalama 6 saniye bekletilerek 2. derece derin yanık oluşturuldu (şekil 2.8) [22]. Yanık sonrası sıvı resüsitasyonu amacıyla 2 ml Laktatlı Ringer solüsyonu ve analjezi intraperitoneal olarak uygulandı.

Şekil2.6: Ratların sırtının traş edilmesi



Sekil 2.7: Yanık oluşturmak ve ısıyı ölçebilmek için düzenlenen alet



Şekil 2.8: Yanık oluşturma modeli



2.1.7 Anestezi

Aseptik şartlarda bütün ratlara intraperitoneal yolla ketamin hidroklorür (150 mg/kgKetalar®) ve xylazine hidroklorit (5 mg/kg-Rompun®) verilerek anestezi sağlanmıştır. Anestezinin etkinliği cilt ve parmak kısırtma yanıtları ile kontrol edilmiştir. Hayvanlar yanık oluşturmada önce gruplandırılmıştır.

2.1.8 Cerrahi sonrası takip

Yanık oluşturulması sonrası ratların anesteziden uyanması beklendi. Tüm ratlar anesteziden sorunsuz bir şekilde uyandı. Her rat ayrı bir kafese yerleştirildi. Ağrı kontrolü için içme suları yoluyla 2 mg/ml parasetamol verildi. Günlük olarak ratlar ameliyat sonrası, genel durum, vücut ağırlığı, malnütrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden yakın gözlemlendi.

2.1.9 Ötenazi uygulanması

32 adet rata deneyin 7. gününde, geriye kalan 32 adet rata ise deneyin 14. gününde genel anestezi altında servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı.

2.1.10 Değerlendirme yöntemleri

2.1.10.1 Makroskobik değerlendirme

Makroskobik değerlendirmede, yanık alanlarının 0, 7, 14 günlerde fotoğrafları çekildi. 14. günde yara kapanma iyileşmesi makroskobik olarak değerlendirildi.

2.1.10.2 Histolojik değerlendirme

Ratların yanık bölgesinden şerit şeklinde biyopsi örnekleri alındı. Alınan örnekler % 10 formaldehit içinde tespit edilerek rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitler histopatolojik inceleme için Hemotoksilen Eozin (H.E) ve Van Gieson (vG) yöntemleri ile boyandı. Mikroskobik muayenelerde hiperemi, PMNL infiltrasyonu, anjiyogenezis ve fibroblast miktarı ile epitelizasyon derecesine bakılarak yara iyileşmesi skorlandı. Histopatolojik Skorlama: 0 = Yok, 1 = Orta, 2 = Şiddetli olarak skorlandı.

2.1.10.3 PCR değerlendirme

PCR

Mezenkimal kök hücre kaynaklı Conditioned Mediumların vaskülarizasyonu arttırdığı ve enflamasyonu azalttığı bilinmektedir. Doku örneklerindeki VEGF, İL-1 gen ekspresyonları kantitatif olarak PCR ile değerlendirildi.

Real Time PCR analizleri:

Çalışmada Real Time PCR yöntemini kullanıldı. Ekspresyon çalışmalarında, RNA molekülü PCR ile çoğaltılamadığından, RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Real Time PCR ile çoğaltılan DNA miktarı aynı anda artış gösteren floresan probalar kullanılarak eş zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir. Eş zamanlı yapılabilmesiyle, Kişiler arası değişkenlik görülmez, standardize ve otomatize hızlı sonuç alınabilmesi, kontaminasyon riskinin az olması, daha üretken olması kullanılan yöntemin avantajları arasında yer almaktadır. İşlem aşağıda verilen sıra ile gerçekleştirilmiştir.

- -80 C de saklanan 50 mg doku örnekleri steril petrilerde steril bistüriler ile ufak parçalara ayrıldıktan sonra DNase, RNase free eppendorf tüplere aktarıldı.
- Doku örneği üzerine 500 µL Lysis Buffer (nükleosol) çözeltisi ilave edildi ve sonikatör cihazı ile doku parçalayıcı sıvı içinde homojen hale getirildi.
- Ardından karışımın üzerine 200 ul DNase RNase free su ilave edildi. Her örnek 15 saniye karıştırılıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15 dakika 12000 g de santrifüj edildi.
- Tüpte oluşan üst faz yeni steril tüpe aktarıldı. Üzerine %100 500 ul isopropanol ilave edilerek. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dakika 12000 g de santrifüj edildi.
- Oluşan üst faz atıldı. Pellete dokunulmadı. Bu aşamada total RNA yıkama işlemi gerçekleştirilerek. Pellet üzerine %75 lik etanolden 500 ul ilave edilerek ve 3 dakika 8000 g de santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edilerek. Bu aşamada pelletin kurumadan 50 ul DNase RNase free su eklendi. 3 dakika oda ısında vorteks edildi. Elde edilen RNA lar -80 C de saklandı.
- Elde edilen RNA'lar, cDNA sentez kiti ile komplementer DNA ya çevrildi.

- Kitin içeriğinde yer alan tüm birleşenler her bir örnek için talimatta belirtilen miktarlarda hazırlanarak. Son hacim 20 µl olacak şekilde kitin çalışma protokolüne uygun olarak çalışıldı.
- cDNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve hedef ve referans bölgeleri işaretlemek amacıyla master mix ticari kiti kullanıldı.

Çalışmada aşağıda dizilimleri verilen primerler kullanıldı

- Forward primer IL-1 CAGATGGGCTAACTAAGGGATAAG
- Reverse primer IL-1 AGAAGGTGCACAGTGAGATAAG
- Forward primer VEGF GTGTGGTCTTTCGTCCTTCTTA
- Reverse primer VEGF GTTTGTCGTGTTTCTGGAAGTG
- Forward primer GAPDH GCCACACTCAAGAATGGTTCG
- Reverse primer GAPDH TGGGGACACCCTTTAGCATC

- Hazırlanan referans gen real time PCR mix'leri ve hedef gen real time PCR mix'leri uygun cDNA'lar ile 96 kuyucuklu plate'ler üzerinde biraraya getirildikten sonra aşağıda verilen ısı protokolü uygulanarak real time PCR işlemi gerçekleştirildi (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Real time PCR ısı protokolü

Denaturasyon	95°C de 10 dk.
Amplifikasyon Bu döngü 40 kez sağlanır. (40 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	95°C de 20 sn. 60°C de 20 sn 72 °C de 20 sn Okuma
Melting Curve	95°C de 30 sn. 50 °C de 1 dk.

	90 °C de continue (Acquisitions 3 per/°C)
Cooling	40 °C de 1 dk.

2.1.10.4 Elde edilen sonuçların istatistiki analizi

Çalışma verilerin değerlendirilmesi SPSS 20.0 (Statistical Package for The Social Science) programı ile yapıldı. CT değerlerinin normal ve deneysel yanık oluşturulmuş dokudaki en düşük, en yüksek ve ortalama değerlerini belirlemek için betimsel istatistiklerden yararlanılmıştır. Araştırma problemi yanık oluşturulmuş dokuda VEGF ve IL-1 gen ekspresyonuna dayandığı için, yanık oluşturulmuş dokulardaki CT değerlerinin normallik sınaması Kolmogorov-Smirnov ile test edilmiştir. İncelenecek gruba göre varyansların homojenliği Levene testi ile sınanmıştır. Ayrıca moleküler sınıflandırmalar arasındaki ikili testler parametrik olmayan Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. Araştırma boyunca önem düzeyleri 0,05 olarak alınmıştır.

2. BULGULAR

Hiçbir ratta enfeksiyon, morbidite, mortalite veya hiçbir komplikasyon gözlenmedi.

Deneyssel olarak yanık oluşturulan dört grupta da makroskopik düzeyde derin ikinci derecede yanık oluştuğu tespit edildi.

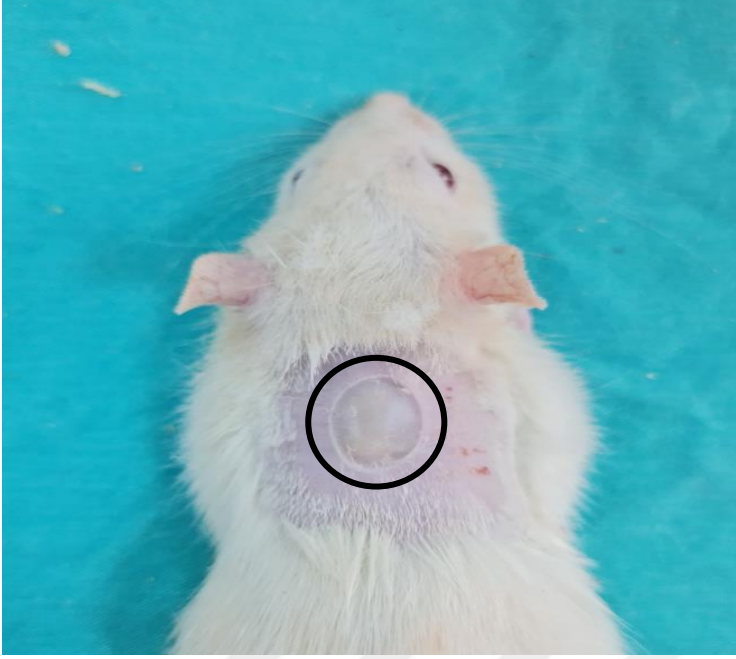
Yanık ilk oluşturulduğunda herhangi bir kızarıklık, bül, ödemle karşılaşılmadı (Şekil 3.1).

1. saatin sonunda yanık uygulanan bölgelerin çevre dokudan sınırları ayrılacak şekilde kendini sınırladığı, sağlam derideki pembe rengin yerine daha beyaz ve soluk görünümde olduğu izlendi (Şekil 3.2). 12 saatin sonunda yanık oluşturulan alanlar sağlam alanlara göre belirgin soluk görünümde olup çıplak gözle rahat ayırt edilebiliyordu. 24 saatin sonunda yanık bölgeleri çevre sağlam dokuya göre daha açık sarı renkte idi ve dokunmakla sertlik hissi veriyordu.

Şekil 3.1: Ratta oluşturulan yanık modeli (0. Saat)



Şekil 3.2: Ratta oluşturulan yanık modeli (1. Saat)



Çalışma süresince yapılan makroskobik muayenelerde Wharton Jel Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium ve gümüş sulfadiazin uygulanan gruplarda yara kabuğunun daha sağlam ve daha kısa sürede şekillendiği dikkat çekti. Çalışmada belirlenen histopatolojik bulguların dağılımı ve şiddeti aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 3.1, Tablo 3.2, Tablo 3.3, Tablo 3.4, Tablo 3.5, Tablo 3.6, Tablo 3.7, Tablo 3.8).

Tablo 3.1: 1. Grup (Kontrol grubu) 1. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
1. Grup (Kontrol Grubu) 1. hafta	2	2	2	0	0
	2	2	2	0	0
	2	1	2	1	1
	2	2	2	0	0
	1	1	2	0	1
	2	2	2	0	0
	2	2	2	0	0
	2	2	2	0	0

Tablo 3.2: 1. Grup (Kontrol grubu) 2. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
1. Grup (Kontrol Grubu) 2. hafta	2	1	2	1	1
	1	1	1	1	0
	2	1	2	1	1
	2	2	2	1	0
	1	1	1	1	0
	1	2	1	1	1
	2	2	2	1	1
	1	1	1	1	1

Tablo 3.3: 2. Grup (PRP grubu) 1. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
2. Grup (PRP Grubu) 1. hafta	2	1	2	0	1
	2	2	1	1	0
	1	1	2	1	1
	1	1	2	1	1
	2	1	1	0	1
	1	1	2	1	1
	1	2	2	0	0
	2	1	2	1	1

Tablo 3.4: 2. Grup (PRP grubu) 2. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
2. Grup (PRP Grubu) 2. hafta	1	1	1	1	2
	1	1	2	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	2
	2	2	2	1	1
	0	1	1	1	1
	1	1	2	1	2

Tablo 3.5: 3. Grup (Gümüş sulfadiazin grubu) 1. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
3. Grup (Gümüş Sulfadiazin Grubu) 1. hafta	2	2	2	0	0
	1	2	1	0	0
	1	1	1	0	1
	1	1	2	1	0
	1	1	1	0	1
	2	2	2	1	1
	1	2	2	0	0
	1	1	1	0	1

Tablo 3.6: 3. Grup (Gümüş sulfadiazin grubu) 2. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
3. Grup (Gümüş sulfadiazin grubu) 2. hafta	0	0	1	1	1
	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	0
	1	1	1	1	1
	1	2	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1

Tablo 3.7: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium)
1. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium) 1. hafta	1	2	1	0	1
	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1
	1	2	1	1	1
	1	2	1	1	1
	2	1	1	1	1

Tablo 3.8: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium)
2. hafta histopatolojik bulgular

Grup	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium) 2. hafta	1	1	1	1	2
	0	0	0	1	1
	0	1	1	1	2
	1	1	0	1	2
	1	1	1	1	2
	1	1	0	1	1
	0	1	1	1	2
	1	1	0	1	2

Çalışmada histopatolojik olarak belirlenen bulguların skorlarının istatistiki karşılaştırması aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 3.9, Tablo 3.10).

1. haftada hiperemi açısından grup 3 ve 4'ün, grup 1. ve 2'ye göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p<0.05$), grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

1. haftada PMNL açısından grup 3 ve 4'ün, grup 1. ve 2'ye göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p<0.05$), grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

1. haftada anjiyogenezis açısından grup 4'ün, grup 1, 2 ve 3'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$).

1. haftada fibroblast açısından grup 4'ün, grup 1, 2 ve 3'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$).

1. haftada epitelizasyon açısından grup 4'ün, grup 1, 2 ve 3'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$).

Tablo 3.9: 1. hafta histopatolojik bulguların istatistiki olarak karşılaştırılması

Birinci Hafta	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
1. grup	1,88±0,13 ^a	1,75±0,16 ^a	2,0±0,00 ^a	0,13±0,13 ^c	0,25±0,16 ^c
2. grup	1,5±0,19 ^{ab}	1,25±0,16 ^c	1,75±0,16 ^{ab}	0,63±0,18 ^{ab}	0,75±0,16 ^{ab}
3. grup	1,25±0,16 ^b	1,50±0,19 ^b	1,50±0,19 ^b	0,25±0,16 ^{bc}	0,50±0,19 ^{bc}
4. grup	1,25±0,16 ^b	1,50±0,19 ^b	1,0±0,00 ^c	0,75±0,16 ^a	1,0±0,00 ^a

Aynı sütunda farklı harf gruplar arası $P<0,05$ düzeyinde önemliliği belirtir.

2. haftada hiperemi açısından grup 3 ve 4'ün, grup 1. ve 2'ye göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p<0.05$), grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

2. haftada PMNL açısından grup 3 ve 4'ün, grup 1. ve 2'ye göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p<0.05$), grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

2. haftada anjiyogenezis açısından grup 4'ün, grup 1, 2 ve 3'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$).

2. haftada fibroblast açısından grup 2, 3 ve 4'ün, grup 1'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p<0.05$), grup 2, 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

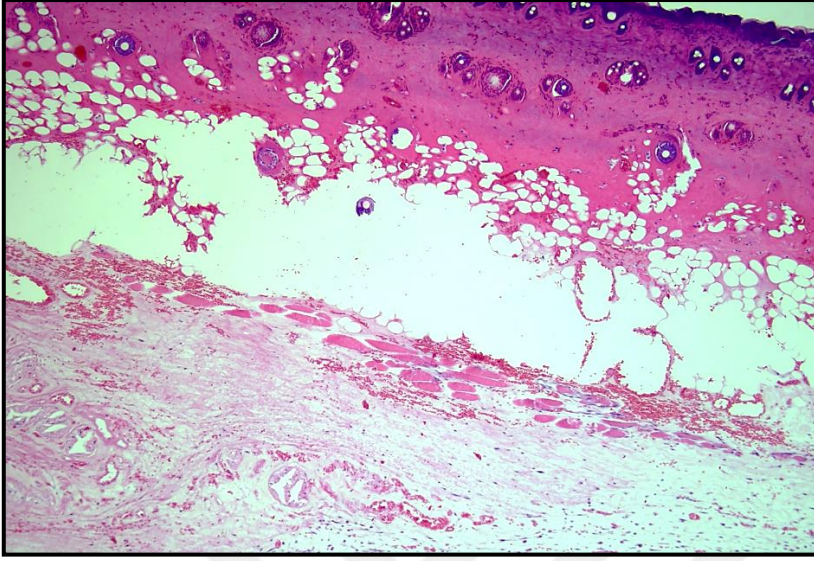
2. haftada epitelizasyon açısından grup 2 ve 4'ün, grup 1 ve 2'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p<0.05$), grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 3.10: 2. hafta histopatolojik bulguların istatistiki olarak karşılaştırılması

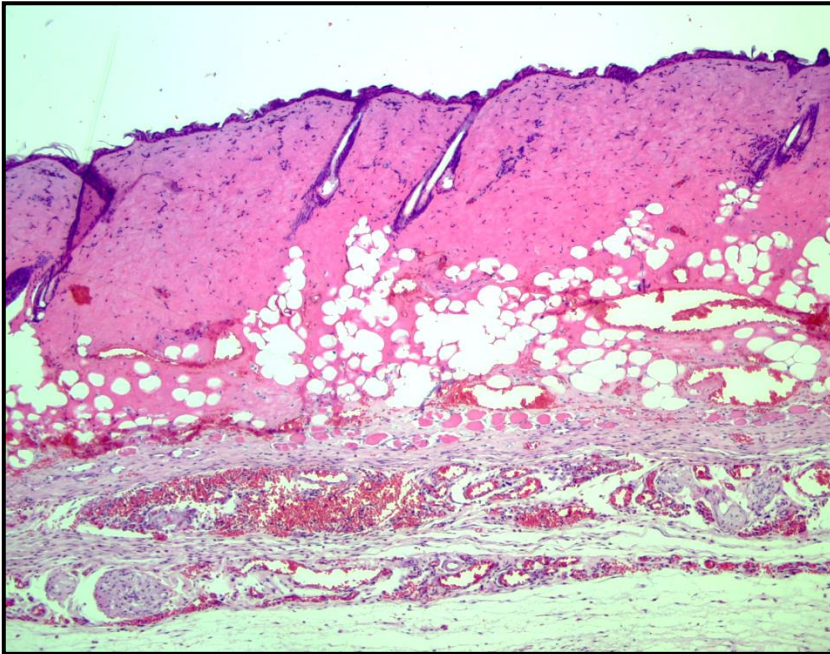
İkinci Hafta	Hiperemi	PMNL	Anjiyogenezis	Fibroblast	Epitelizasyon
1. grup	1,50±0,19 ^a	1,38±0,18 ^a	1,5±0,19 ^a	0,68±0,13 ^a	0,63±0,18 ^b
2. grup	1,00±0,19 ^{ab}	1,13±0,13 ^c	1,38±0,18 ^{ab}	1,00±0,00 ^b	1,38±0,18 ^a
3. grup	0,75±0,16 ^b	0,88±0,23 ^b	1,00±0,00 ^b	1,00±0,00 ^b	0,88±0,13 ^b
4. grup	0,63±0,18 ^b	0,88±0,13 ^b	0,50±0,19 ^c	1,00±0,00 ^b	1,75±0,16 ^a

Aynı sütunda farklı harf gruplar arası $P<0,05$ düzeyinde önemliliği belirtir.

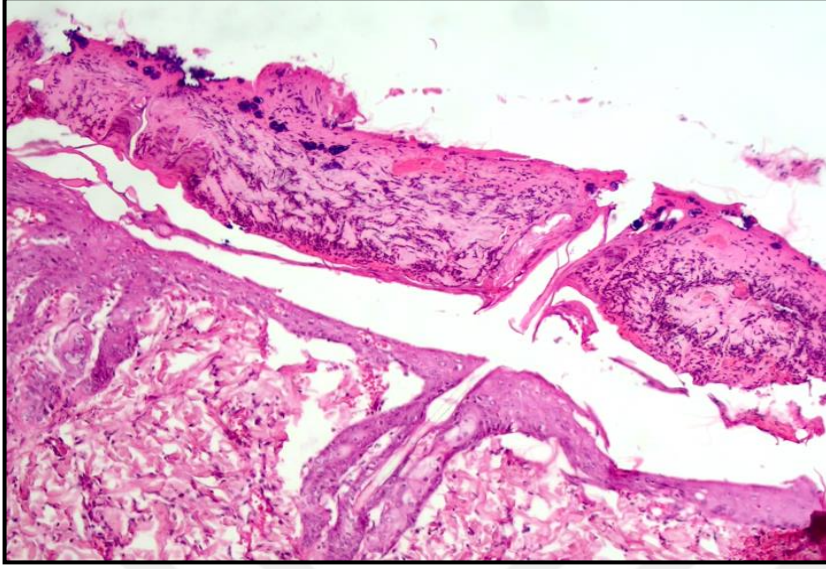
Şekil 3.3: 1.grup (kontrol) ratda bir hafta sonrasında, ödem, hiperemi, epidermiste vakuoller ile epidermiste ayrılma H.E. x100



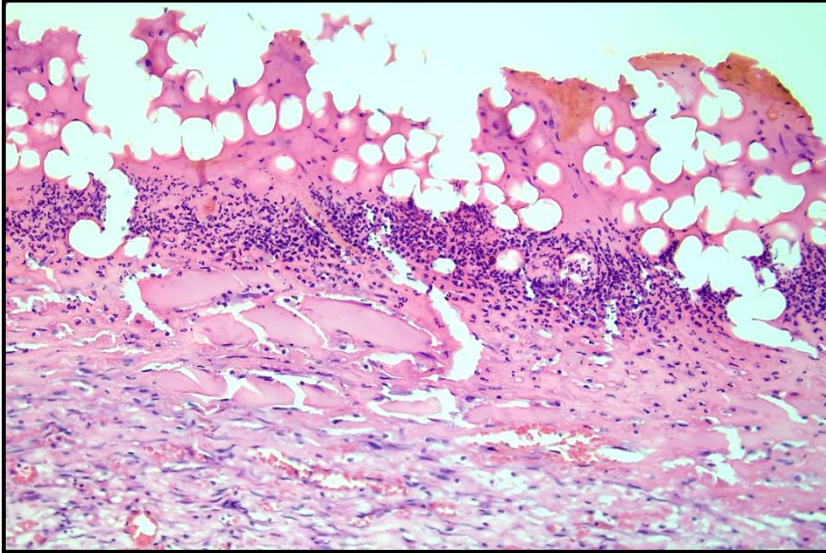
Şekil 3.4: Kök hücre sıvısı grubunda 1 hafta sonrasında, ödem, hiperemi, epidermiste vakuoller ile anjiogenezis. H.E. x100



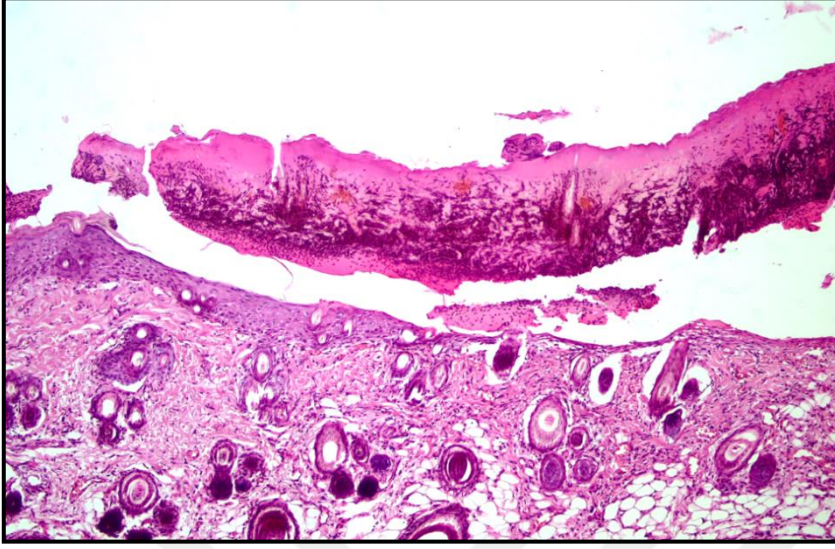
Şekil 3.5: Kök hücre sıvısı grubunda iki hafta sonrasında epitelizasyon. H.E. x100



Şekil 3.6: PRP grubunda iki hafta sonrasında PMNL infiltrasyonu. H.E. x100



Şekil 3.7: PRP grubunda iki hafta sonrasında epitelizasyon. H.E. x100



Çalışma gruplarında birinci hafta ve ikinci haftada real time PCR ile hesaplanan VEGF ve IL-1 seviyeleri ortalamaları ve istatistiki karşılaştırması aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 3.11 ve Tablo 3.12).

1. haftada VEGF değerleri kıyaslandığında Grup 2 ve 4'ün, grup 1 ve 3'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p < 0.05$), grup 2 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).

1. haftada IL-1 değerleri kıyaslandığında Grup 2, 3 ve 4'ün, grup 1'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken ($p < 0.05$), grup 2, 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Tablo 3.11: 1. hafta real time PCR ile VEGF ve IL-1 seviyeleri istatistiki karşılaştırması

Birinci Hafta	VEGF	IL-1
1. grup	26,74 ± 0,68 ^a	29,14 ± 0,62 ^a
2. grup	26,99 ± 0,36 ^b	27,40 ± 0,67 ^b
3. grup	27,13 ± 0,62 ^{ab}	28,00 ± 1,06 ^b
4. grup	26,25 ± 0,6 ^b	27,52 ± 1,84 ^b

Aynı sütunda farklı harf gruplar arası P<0,05 düzeyinde önemliliği belirtir.

2. haftada VEGF değerleri kıyaslandığında Grup 2 ve 4'ün, grup 1 ve 3'e göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken (p<0.05), grup 2 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p>0.05).

2. haftada IL-1 değerleri kıyaslandığında Grup 2, 3 ve 4'ün, grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanırken (p<0.05), grup 2, 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p>0.05).

Tablo 3.11: 2. hafta real time PCR ile VEGF ve IL-1 seviyeleri istatistiki karşılaştırması

İkinci Hafta	VEGF	IL-1
1. grup	26,97 ± 0,32 a	28,31 ± 1,19 a
2. grup	25,64 ± 0,22 b	25,48 ± 0,27 b
3. grup	26,23 ± 0,52 ab	26,06 ± 0,76 b
4. grup	25,40 ± 0,43 b	25,34 ± 0,45 b

Aynı sütunda farklı harf gruplar arası P<0,05 düzeyinde önemliliği belirtir.

Her 4 grupta ratların 1. hafta ve 2 hafta görüntüleri aşağıdadır (Şekil 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15)

Şekil 3.8: 1. Grup (Kontrol) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.



Şekil 3.9: 2. Grup (PRP) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.



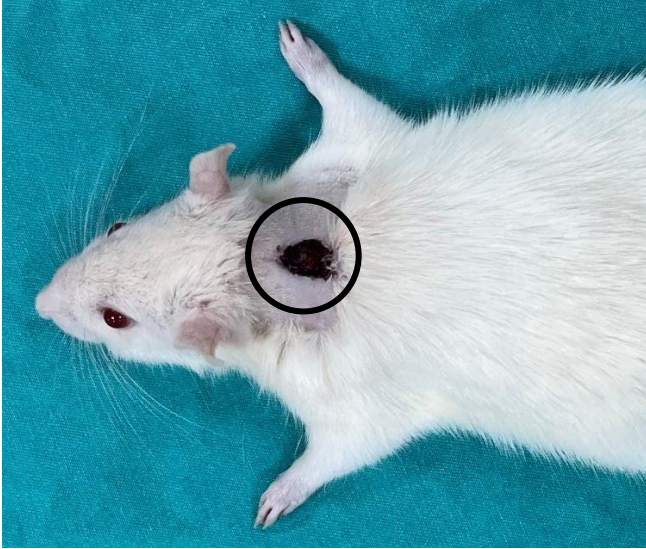
Şekil 3.10: 3. Grup (Gümüş Sulfadiazin) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.



Şekil 3.11: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium) farelerde oluşturulan yanığın birinci hafta sonundaki görünümü.



Şekil 3.12: 1. Grup (Kontrol) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.



Şekil 3.13: 2. Grup (PRP) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.



Şekil 3.14: 3. Grup (Gümüş Sulfadiazin) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.



Şekil 3.15: 4. Grup (Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium) farelerde oluşturulan yanığın ikinci hafta sonundaki görünümü.



3.Tartışma

Yanık yaralanmaları, hemen hemen her organ sistemini etkileyen ve önemli morbidite ve mortaliteye yol açan yaralanmalardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, yılda 180.000 ölüm yanık yaralanmasıyla ilişkilidir ve 2004'te dünya çapında yaklaşık 11 milyon insan ciddi şekilde yanmış ve tıbbi tedaviye ihtiyaç duymuştur [23].

Şiddetli yanıklarda enflamasyon, hipermetabolizma, kas kaybı ve insülin direnci görülebilmektedir ve bu değişikliklerin yaralanmayı takip eden birkaç yıl boyunca devam ettiği bilinmektedir [24].

Yanık yaralanması tedavisi son on yılda önemli derecede ilerleme sağlayarak mortaliteyi azaltırken, son çalışmalar yanık yaralanmasına bağlı morbiditelerin birçoğunun yanık iyileştikten çok sonra ortaya çıktığını göstermektedir. Yanık yaralanmaları artmış kanser, kardiyovasküler hastalık, sinir sistemi bozuklukları, diyabet, kas-iskelet sistemi bozuklukları, gastrointestinal hastalık, enfeksiyonlar, anksiyete ve depresyon riski ile ilişkilendirilmektedir [25]. Bu nedenlerden dolayı yanık yaralanması kronik bir hastalık olarak kabul edilmeli, tedavi ve bakımı buna göre yapılmalıdır.

Yanık yaralanmalarının büyük kısmı düşük sosyoekonomik toplumlarda görülmektedir. Bu nedenle yanık tedavisinin maliyeti hastalar, aileleri, sigorta şirketleri ve devlet için çok önemlidir. Yapılan çalışmalar yanık yaralanmalarının çok maliyetli olduğu yönündedir [26].

Bu kadar ölümcül ve sekel bırakan bir hastalığın birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Yara iyileşmesi süresini hızlandırmak için erken debridman ve cilt grefti ile onarım başarılı bir tedavi seçeneği olmakla beraber, cerrahiye uygun olmayan hastalar veya yeterli olmayan donör alan gibi zorluklar bu seçeneği kısıtlayabilmektedir [27].

Cerrahi olmayan tedavide sentetik yara örtüleri, büyüme faktörleri, asellüler dermal matriksler, kültüre edilmiş epitelyal hücreler yüksek maliyet nedeni ile yaygın kullanılamamaktadır [15].

Bir diğer tedavi seçeneği yara iyileşmesini hızlandırması, enfeksiyon oranını azaltması, kolay elde edilebilir olması nedeni ile PRP'dir [28]. PRP'nin yanık iyileşmesi üzerine etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir [21, 29, 30]. Fakat tüm bunlarla birlikte yanık hastalarında PRP uygulanmasının kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Yanık hastalarının fizyolojik durumlarının değişmesi, trombositlerin kalitesi ve büyüme faktörlerinin miktarının sağlıklı bireylere göre farklı olabilmesine yol açmaktadır [31]. Gümüş sulfadiazin yüzeysel yanık tedavisinde altın standart olduğu düşünülmektedir [32] [33] [34]. Yüzeysel uygulamada altın standart olmasına rağmen gümüş sulfadiazinin önemli yan etkileri de mevcuttur. Alerji, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliğinde hemoliz, immün kompleks oluşumu ve methemoglobinemi önemli yan etkilerindendir [35]. En sık görülen aplastik anemi, hemolitik anemi ve lökopeni gibi hematolojik yan etkileridir. Mutlaka anemi ve enfeksiyon durumları sorgulanmalıdır. Daha önce gelişmiş hipersensitivite, gebelik ve yenidoğan bebeklerde kullanmaktan kaçınılmalıdır [36].

Son 20 yılda kök hücreler, yanıklar da dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır [37]. Kendini yenileme ve multipotent farklılaşma kapasiteleri ile birçok dokudan elde edilebilen mezenkimal kök hücreler hasarlı dokuların iyileşmesi için önemli bir kaynaktır. İnsan Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücreler, diğer mezenkimal kök hücrelerle karşılaştırıldığında, bol ve ucuz bir hücre olması nedeni, kısa ikiye katlanma süresi, yüksek çoğalma kapasitesi, daha düşük immünojenite ve güvenlik gibi birçok avantaja sahiptir [38]. Wharton jeli mezenkimal kök hücreler tarafından besiyerinde çeşitli interlökinler, glukozaminglikanlar, hücre adezyon molekülleri, çeşitli büyüme faktörleri salınmaktadır ki bu da Conditioned Mediumu oluşturmaktadır [39, 40]. İnsan Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium'un kalp hastalığı, karaciğer hastalığı, diyabet, Crohn hastalığı, COVID-19 gibi birçok hastalık tedavisinde olumlu etkileri çalışmalarda gösterilmiştir [41]. Fakat ulaşılabilen literatürde yanık üzerinde İnsan Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium'un yanık üzerinde etkilerine ulaşılamamıştır.

Çalışmamızda histopatolojik olarak değerlendirildiğinde 1. haftada epitelizasyon açısından Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium grubunda daha iyi sonuçlanırken, 2 haftada da PRP ve Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium grubunun sonuçları gümüş sulfadiazin ve kontrol grubuna göre daha olumlu sonuçlandı. Literatürde gümüş sulfadiazinin yara epitelizasyonunu geciktirebileceği ile ilgili yayınlar mevcuttur [42].

Çalışmamızda histopatolojik olarak değerlendirildiğinde 1. haftada fibroblast aktivitesi Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium grubunda daha iyi sonuçlanırken, 2 haftada gümüş sulfadiazin, PRP ve Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium'da kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlanmıştır. Literatürde Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı CM un büyüme faktörleri, sitokinler aracılığı ile fibroblast, keratinosit migrasyonunu hızlandırabileceği gösterilmiştir [43].

Çalışmamızda histopatolojik olarak değerlendirildiğinde 1. Haftada PMNL açısından gümüş sulfadiazin ve Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium grubunda, PRP ve kontrol grubuna göre anlamlı fark saptandı. Kocaman ve ark. yaptığı çalışmada da PMNL açısından Gümüş Sulfadiazinin kontrol grubuna göre anlamlı fark saptandığı gösterilmiştir. [44].

Proliferasyon fazında (3-14. gün) büyüme faktörleri anjiyogenezi artırmaktadır [45]. Remodeling fazında (21. gün- 1. yıl) anjiyogenezis ve kan akımı azalmaktadır [46]. Mezenkimal kök hücre kaynaklı CM proliferasyon fazında VEGF, FGF, EGF gibi mediyatörler aracılığı ile anjiyogenezi düzenlemektedir. İnsan Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre, Kemik İliği Mezenkimal Kök hücrelerden daha anjiyogenik olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda İnsan Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium'un anjiyogenezis üzerinde diğer gruplardan daha etkili olduğu görülmüştür [47]. Bizim çalışmamızda 1. Haftada ve 2 haftada örnekler alındığından remodeling fazında değildir. Bu yüzden Conditioned Medium anjiyogenezis oranı diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksektir. Yapılan çalışmalarda Conditioned Mediumun anjiyogenezi arttırdığı saptanmıştır [48].

Laidling ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yanık sonrası PRP enjeksiyonunun VEGF düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükselttiği gösterilmiştir [49]. Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir

diğer çalışmada yine yanık dokuya otolog PRP enjeksiyonunun VEGF düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselttiği gösterilmiştir [50]. Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VEGF düzeylerinin PRP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıktığı saptanmıştır [51]. Bizim çalışmamızda da 1. ve 2. hatalarda VEGF düzeyleri PRP ve Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium grubunda kontrol ve Gümüş Sulfadiazin grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı. Yapılan çalışmalarda PRP ve mezenkimal kök hücre birlikte kullanılmasının yara iyileşmesine üzerine sadece mezenkimal kök hücre kullanılmasına nazaran daha etkili olduğu gösterilmiştir [52].

JY Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Mediumun PCR çalışmasında inflamatuvar genler olan IFN, TNF, IL-1, and IL-6 ekspresyonunu azalttığı, anjiogeneziste rol alan VEGF, EGF, bFGF ve KDR düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir [53]. Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada İL-1 düzeylerinin PRP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıktığı saptanmıştır [51]. Nitekim bizim çalışmamızda da VEGF düzeyleri CM verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmıştır. IL-1 düzeyleri ise çalışmamızda Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium grubunda kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanırken, diğer gruplarla anlamlı fark saptanmadı.

4. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak her 3 ilaç grubunun da yanık iyileşmesini indüklediği saptanmıştır. Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium hiperemiyi, PMNL düzeylerini, anjiyogenezi, fibroblast düzeylerini, epitelizasyonu, VEGF düzeylerini artırıp, IL-1 düzeylerini azaltarak yapmaktadır. Gümüş sulfadiazin hiperemiyi, PMNL düzeylerini artırıp, IL-1 düzeylerini azaltarak yanık iyileşmesine katkı sağlamaktadır. PRP ise fibroblast düzeylerini, epitelizasyonu, VEGF düzeylerini artırıp, IL-1 düzeylerini azaltarak etki etmektedir. Daha az yan etkilerinin olması, ucuz ve kolay eldeedilebilir olması, en az PRP ve altın standart olarak kabul edilen Gümüş sulfadiazin kadar yanık iyileşmesine etki edebilmesi nedeniyle Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium'un yanık tedavisinde yaygın olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



5. Kaynaklar

1. Jordan, K.C., et al., *Global trends in pediatric burn injuries and care capacity from the World Health Organization Global Burn Registry*. Frontiers in pediatrics, 2022. **10**.
2. Hussain, Z., et al., *Hyaluronic acid functionalization improves dermal targeting of polymeric nanoparticles for management of burn wounds: In vitro, ex vivo and in vivo evaluations*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022. **150**: p. 112992.
3. Aliabadi, A., et al., *Comparison between the effect of silymarin and silver sulfadiazine on burned wound healing in rats*. Bulgarian J Vet Med, 2016. **19**(3): p. 224-32.
4. Masood, R.A., et al., *Burn cases, their management and complications: A review*. International Current Pharmaceutical Journal, 2016. **5**(12): p. 103-105.
5. Ogawa, R., *Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(3): p. 606.
6. Berthet, M., et al., *Nanoparticle-based dressing: the future of wound treatment?* Trends in biotechnology, 2017. **35**(8): p. 770-784.
7. Aryan, A., et al., *Human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium promotes wound healing in deep second-degree burns in male rats*. Cells Tissues Organs, 2018. **206**(6): p. 317-329.
8. Jeschke, M.G., et al., *Burn injury*. Nature Reviews Disease Primers, 2020. **6**(1): p. 1-25.
9. Schiefer, J.L., et al., *Etiology, incidence and gender-specific patterns of severe burns in a German Burn Center—Insights of 25 years*. Burns, 2016. **42**(3): p. 687-696.
10. Song, D.H. and P.C. Neligan, *Plastic Surgery E-Book: Volume 4: Trunk and Lower Extremity*. 2017: Elsevier Health Sciences.
11. Keck, M., et al., *Pathophysiology of burns*. Wiener Medizinische Wochenschrift, 2009. **159**(13): p. 327-336.
12. Jahromi, M.A.M., et al., *Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing*. Advanced drug delivery reviews, 2018. **123**: p. 33-64.
13. Greenhalgh, D.G., *Management of burns*. New England journal of medicine, 2019. **380**(24): p. 2349-2359.
14. Rowan, M.P., et al., *Burn wound healing and treatment: review and advancements*. Critical care, 2015. **19**: p. 1-12.
15. Rowan, M.P., et al., *Burn wound healing and treatment: review and advancements*. Critical care, 2015. **19**(1): p. 1-12.
16. Liu, H.-F., F. Zhang, and W.C. Lineaweaver, *History and advancement of burn treatments*. Annals of plastic surgery, 2017. **78**(2): p. S2-S8.
17. Thakur, K., et al., *Implementation of Quality by Design (QbD) approach in development of silver sulphadiazine loaded egg oil organogel: An improved dermatokinetic profile and therapeutic efficacy in burn wounds*. International Journal of Pharmaceutics, 2020. **576**: p. 118977.
18. Ibrahim, N.I., et al., *The effects of aqueous extract of Labisia Pumila (Blume) Fern.-Vill. Var. Alata on wound contraction, hydroxyproline content and histological assessments in superficial partial thickness of second-degree burn model*. Frontiers in Pharmacology, 2022. **13**.
19. Bezerra, M., et al., *Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after short-term in vitro culture*. Theriogenology, 2019. **125**: p. 56-63.
20. Lin, H.D., et al., *Hypoxic Wharton's jelly stem cell conditioned medium induces immunogenic cell death in lymphoma cells*. Stem cells international, 2020. **2020**.
21. Venter, N.G., et al., *Use of platelet-rich plasma in deep second-and third-degree burns*. Burns, 2016. **42**(4): p. 807-814.

22. Xiao, M., et al., *Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats*. Academic Emergency Medicine, 2014. **21**(4): p. 383-391.
23. Wang, Y., et al., *Burn injury: challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring*. Advanced drug delivery reviews, 2018. **123**: p. 3-17.
24. Nielson, C.B., et al., *Burns: pathophysiology of systemic complications and current management*. Journal of Burn Care & Research, 2017. **38**(1): p. e469-e481.
25. Barrett, L.W., et al., *Understanding acute burn injury as a chronic disease*. Burns & trauma, 2019. **7**.
26. Latifi, N.-A., et al., *Economical burden of burn injuries in a developing country*. Journal of Burn Care & Research, 2017. **38**(6): p. e900-e905.
27. Ruiz, A., et al., *Early intervention in scar management and cutaneous burns with autologous platelet-rich plasma*. Journal of cosmetic dermatology, 2018. **17**(6): p. 1194-1199.
28. Zheng, W., et al., *Effectiveness of platelet rich plasma in burn wound healing: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Dermatological Treatment, 2022. **33**(1): p. 131-137.
29. Mansoub, N.H., et al., *The role of PRP and adipose tissue-derived keratinocytes on burn wound healing in diabetic rats*. BioImpacts: BI, 2018. **8**(1): p. 5.
30. Marck, R.E., et al., *The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: a randomized, double-blind, intra-patient controlled study*. Wound Repair and Regeneration, 2016. **24**(4): p. 712-720.
31. Marck, R.E., E. Middelkoop, and R.S. Breederveld, *Considerations on the use of platelet-rich plasma, specifically for burn treatment*. Journal of Burn Care & Research, 2014. **35**(3): p. 219-227.
32. Topical, S., *Silver sulfadiazine retards wound healing in mice via alterations in cytokine expression*. Journal of Investigative Dermatology, 2015. **135**: p. 1459-1462.
33. Gomes, M.T., et al., *Experimental burns: comparison between silver sulfadiazine and photobiomodulation*. Revista da Associação Médica Brasileira, 2017. **63**: p. 29-34.
34. Aziz, Z. and B.A.R. Hassan, *The effects of honey compared to silver sulfadiazine for the treatment of burns: A systematic review of randomized controlled trials*. Burns, 2017. **43**(1): p. 50-57.
35. Fuller, F.W., *The side effects of silver sulfadiazine*. Journal of burn care & research, 2009. **30**(3): p. 464-470.
36. Oaks, R.J. and R. Cindass, *Silver Sulfadiazine*. 2020.
37. Ahmadi, A.R., et al., *Stem cells in burn wound healing: A systematic review of the literature*. Burns, 2019. **45**(5): p. 1014-1023.
38. Pourfath, M.R., et al., *Monitoring wound healing of burn in rat model using human Wharton's jelly mesenchymal stem cells containing cGFP integrated by lentiviral vectors*. Iranian journal of basic medical sciences, 2018. **21**(1): p. 70.
39. Fong, C., et al., *Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo*. Journal of Cellular Biochemistry, 2012. **113**(2): p. 658-668.
40. Fong, C.Y., et al., *Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds*. Journal of cellular biochemistry, 2014. **115**(2): p. 290-302.
41. Mathen, C., et al., *Evaluation of potential application of Wharton's jelly-derived human mesenchymal stromal cells and its conditioned media for dermal regeneration using rat wound healing model*. Cells Tissues Organs, 2021. **210**(1): p. 31-44.
42. Barkat, M.A., et al., *Therapeutic intervention of aloe gel containing nano-sized and micron-sized silver sulfadiazine gel on second-degree burn: a comparative study*. The International Journal of Lower Extremity Wounds, 2018. **17**(3): p. 176-183.
43. Walter, M.N., et al., *Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing*:

- an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays*. Experimental cell research, 2010. **316**(7): p. 1271-1281.
44. Kocaman, N., Altun, S., Bal, A., Ozcan, E. C., Sarac, M., Artas, G., ... & Kuloglu, T. (2021). Effects of Carnosine, Ankaferd, and Silver Sulfadiazine on an Experimental Burn Model: Roles of Irisin and HSP70. *Journal of Burn Care & Research*, 42(3), 408-414.
 45. Bounds, K., et al., *The influence of a biofilm-dispersing wound gel on the wound healing process*. International Wound Journal, 2022. **19**(3): p. 553-572.
 46. Reinke, J. and H. Sorg, *Wound repair and regeneration*. European surgical research, 2012. **49**(1): p. 35-43.
 47. Zhou, P., et al., *A human umbilical cord mesenchymal stem cell-conditioned medium/chitosan/collagen/ β -glycerophosphate thermosensitive hydrogel promotes burn injury healing in mice*. BioMed research international, 2019.
 48. Laksmitawati, D.R., et al., *The effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium gel on burn wound healing in rat*. Veterinary World, 2022. **15**(4): p. 841.
 49. Laidding, S.R., et al., *Combination of platelet rich plasma and stromal vascular fraction on the level of vascular endothelial growth factor in rat subjects experiencing deep dermal burn injury*. Annals of Medicine and Surgery, 2021. **64**: p. 102254.
 50. Sun, Y., Cao, Y., Zhao, R., Xu, F., Wu, D., & Wang, Y. (2020). The role of autologous PRP on deep partial-thickness burn wound healing in bama pigs. *Journal of Burn Care & Research*, 41(3), 657-662.
 51. Zhu, X., Kazemi, A., Dong, Y., Pan, Q., Jin, P., Cheng, B., & Yang, Y. (2022). Effectiveness of Nano Bioactive Glass Fiber Loaded with Platelet-Rich Plasma on Thermal Wound Healing Process in Rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 18(2), 535-545.
 52. Hersant, B., et al., *Platelet-rich plasma improves the wound healing potential of mesenchymal stem cells through paracrine and metabolism alterations*. Stem cells international, 2019.
 53. Sun, J., Zhang, Y., Song, X., Zhu, J., & Zhu, Q. (2019). The healing effects of conditioned medium derived from mesenchymal stem cells on radiation-induced skin wounds in rats. *Cell transplantation*, 28(1), 105-115.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ

“YANIK MODELİNDE WHARTON JELİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI CONDITIONED MEDIUM’UN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI”

“Dr. Nijat MAJİDOV”

Tez danışmanı: Prof. Dr. Zekeriya TOSUN

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ / Konya, 2023

Yanık her bir insanın karşılaşılabileceği en önemli travmalardan biridir. Yanık yaraları hem hastalara hem de sağlık sistemine önemli zorluklar oluşturmaktadır. Derin yanıklarda ciltaltı yapıların (dermis, hipodermis ve kaslar) etkilenmesi ile uzamış yara iyileşme zamanı en önemli zorluklardan biridir. Yanık sonrası geniş bir hücre ve doku kaybı oluşabilir. Aynı zamanda yanık sonrası komplikasyonlar gelişebilir ki, bu da tedavi sürecinde zorluklara neden olabilmektedir.

Günümüzde sıklığı giderek artan ve mortalite ve morbiditeye neden olan yanığın tedavisinde kök hücre uygulamaları günden güne artmaktadır. Literatürde yanık tedavisinde Kemik İliği Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium daha önce kullanılmıştır. Fakat Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium’un (WJMKH-CM) yanık tedavisinde kullanımına literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada yanık sonrası Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Mediumun yanık iyileşmesine katkıda bulunup bulunmadığı ve yara iyileşmesi üzerinde etkisi varsa bunu hangi yolla gerçekleştirildiği araştırılmaktadır.

64 adet rat randomize olarak 4 gruba ayrıldı (1. Grup 16, 2. Grup 16, 3. Grup 16, 4. Grup 16 olacak şekilde) Her grupta 8 adet dişi, 8 adet erkek rat bulundu. Her grup 2 alt gruba ayrıldı (Grup 1a 8, Grup 1b 8, Grup 2a 8, Grup 2b 8, Grup 3a 8, Grup 3b 8, Grup 4a 8, Grup 4b 8 olacak şekilde). Her alt grupta 4 adet erkek, 4 adet dişi rat bulundu. 1. gruba (kontrol) yanık sonrası herhangi bir uygulama yapılmadı. 2. gruba yanık sonrası 1. günde PRP (Platelet Rich Plazma) uygulandı. 3. gruba 1. günde Gümüş

sulfadiazin uygulandı. 4. gruba yanık sonrası 1. günde Wharton Jeli Mezenkimal Kök hücre kaynaklı Conditioned Medium uygulandı. Grup 1 a, 2 a, 3 a ve 4 a 'daki ratlardan 7 gün sonra, grup 1 b, 2 b, 3 b, 4 b 'deki ratlardan ise 14 gün sonra örnekler alındı. Makroskopik, histolojik ve PCR değerlendirmeleri yapıldı.

Deneyssel olarak yanık oluşturulan dört grupta da makroskopik düzeyde derin ikinci derecede yanık olduğu tespit edildi. Çalışma süresince yapılan makroskopik muayenelerde Wharton Jel Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium ve Gümüş sulfadiazin uygulanan gruplarda yara kabuğunun daha sağlam ve daha kısa sürede şekillendiği dikkat çekti.

Her 3 ilaç grubunun da yanık iyileşmesini indüklediği saptanmıştır. Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium hiperemiyi, PMNL düzeylerini, anjiyogenezisi, fibroblast düzeylerini, epitelizasyonu, VEGF düzeylerini artırıp, IL-1 düzeylerini azaltarak yapmaktadır. Gümüş sulfadiazin hiperemiyi, PMNL düzeylerini artırıp, IL-1 düzeylerini azaltarak yanık iyileşmesine katkı sağlamaktadır. PRP ise fibroblast düzeylerini, epitelizasyonu, VEGF düzeylerini artırıp, IL-1 düzeylerini azaltarak etki etmektedir. Daha az yan etkilerinin olması, ucuz ve kolay eldeedilebilir olması, en az PRP ve altın standart olarak kabul edilen Gümüş sulfadiazin kadar yanık iyileşmesine etki edebilmesi nedeniyle Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı Conditioned Medium'un yanık tedavisinde yaygın olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Conditioned Medium, Kök Hücre, Yanık

7. SUMMARY

Burns are one of the most important traumas that every person can face. Burn wounds pose significant challenges to both patients and the healthcare system. Prolonged wound healing time is one of the most important challenges in deep burns, as the subcutaneous structures (dermis, hypodermis and muscles) are affected. Extensive cell and tissue loss may occur after burns. At the same time, complications may develop after burns, which can cause difficulties in the treatment process.

Stem cell applications are increasing day by day in the treatment of burns, the frequency of which is increasing day by day and causes mortality and morbidity. In the literature, Bone Marrow derived Mesenchymal Stem cell Conditioned Medium has been used before in the treatment of burns. However, the use of Wharton's Jelly derive Mesenchymal Stem cell Conditioned Medium (WJMSC-CM) in the treatment of burns has not been found in the literature. In this study, it is investigated whether Wharton's Jelly derive Mesenchymal Stem cell Conditioned Medium contributes to burn healing and if it has an effect on wound healing, in which way it is achieved.

64 rats were randomly divided into 4 groups (1. Group 16, 2. Group 16, 3. Group 16, 4. Group 16). There were 8 female and 8 male rats in each group. Each group was divided into 2 subgroups (Group 1a 8, Group 1b 8, Group 2a 8, Group 2b 8, Group 3a 8, Group 3b 8, Group 4a 8, Group 4b 8). There were 4 male and 4 female rats in each subgroup. In the 1. group (control), no application was made after the burn. PRP (Platelet Rich Plasma) was applied to the 2. group on the first day after the burn. Silver sulfadiazine was applied to the 3. group on the first day. Wharton's Jelly derive Mesenchymal Stem cell Conditioned Medium was applied to the 4. group on the first day after the burn. Samples were taken 7 days after the rats in group 1 a, 2 a, 3 a and 4 a, and 14 days later from the rats in group 1 b, 2 b, 3 b, and 4 b. Macroscopic, histological and PCR evaluations were performed.

It was determined that deep second degree burns occurred at the macroscopic level in all four groups with experimental burns. In the macroscopic examinations made during the study, it was noted that the scab was formed more robustly and in a shorter time in the groups treated with Wharton's Jelly derive Mesenchymal Stem cell Conditioned Medium and Silver sulfadiazine.

All three drug groups were found to induce burn healing. Wharton's Jelly derive

Mesenchymal Stem cell Conditioned Medium causes hyperemia, PMNL levels, angiogenesis, fibroblast levels, epithelialization, and VEGF levels by increasing IL-1 levels. Silver sulfadiazine contributes to burn healing by increasing hyperemia, PMNL levels and decreasing IL-1 levels. On the other hand, PRP acts by increasing fibroblast levels, epithelialization, VEGF levels and decreasing IL-1 levels. We think that Wharton's Jelly derive Mesenchymal Stem cell Conditioned Medium can be widely used in the treatment of burns, as it has fewer side effects, is cheap and easily available, and can affect burn healing at least as much as PRP and Silver sulfadiazine, which is considered the gold standard.

Keywords: Conditioned Medium, Stem cell, Burn