

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN ADİPOZ DOKU KÖK HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞTIRILAN
KERATİNOZİTLER VE PRP'NİN DİYABETİK SIÇANLARDA
OLUŞTURULAN DENEYSEL YANIK MODELİNDE KULLANILMASI**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN

Navid HOSSEINI MANSOUB

DANIŞMAN

PROF. DR. Gülinnaz ERCAN

İZMİR - 2016

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN ADİPOZ DOKU KÖK HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞTIRILAN
KERATİNOZİTLER VE PRP'NİN DİYABETİK SIÇANLARDA
OLUŞTURULAN DENEYSEL YANIK MODELİNDE KULLANILMASI**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN
Navid HOSSEINI MANSOUB

DANIŞMAN
PROF. DR. Gülinnaz ERCAN

İZMİR - 2016

TEZ DEĞERLENDİRME KURULU SAYFASI

Kurum Adı: Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Program: Doktora Tezi
Tez Konusu: Sıçan Adipoz Doku Kök Hücrelerinden Farklılaştırılan Keratinositler ve PRP'nin Diyabetik Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Yanık Modelinde Kullanılması

Danışman: Prof. Dr. Gülinnaz Ercan
Tezi Hazırlayan: Navid Hosseini Mansoub
Tezin Kabul Edildiği Tarih: 11.05.2016

Jüri Üyeleri:

İmza

Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Nevbahar TURGAN

Prof. Dr. Hafize Seda VATANSEVER

Prof.Dr. Sevinç İNAN

Doç. Dr. A. Mert ÖZGÖNÜL

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde ve tüm doktora sürecimde, tavsiyeleri ile yoluma ışık tutan danışman hocam Prof. Dr. Gülinnaz Ercan'a teşekkür ederim.

Çalışmamın birçok kısmında rehberlik eden ve çalışmaların doğru ve zamanında devam ettirilmesi konusunda özverili ve disiplinli bir sürecin geçmesini sağlayan değerli hocam Prof.Dr. H.Seda Vatansever'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve hayatımın her evresinde desteklerini hiç esirgemeyen tüm aileme teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda bana yardımcı olan Ege Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak bu projeyi gerçekleştirmemizde, desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonu'na, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına ve CBU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimizi sunarız.

İzmir-2016

Navid Hosseini Mansoub

ÖZET

Diyabet, her yıl giderek artan bir prevalans ile dünyadaki en önemli sağlık problemlerinden biridir. Diyabetik yara iyileşme sürecinde görülen problemler, ağır olgularda amputasyonlar ile sonlanabilen komplikasyonlara yol açar. Adipoz doku, otolog mezenkimal kök hücreler (MKH) için zengin bir kaynaktır. Bu hücrelerin terapötik uygulamalarda kullanımı ise diyabetik hastaların etkili tedavisi için büyük potansiyel taşımaktadır. Sıçan adipoz dokusunu eksize ettiğimiz, MKH'i izole edip kültüre ettiğimiz ve daha sonra keratinositlere farklılaştırdığımız bu çalışmada, adipoz dokuyu MKH kaynağı olarak kullandık. Farklılaştırılan hücreler daha sonra STZ ile diyabetik olan sıçanlarda oluşturulan termal yanık modeline transfer edildi. Ayrıca, termal yanıklı hayvan modelimizde, trombositlerden zengin plazma (PRP)'nin etkinliğini tek başına ve keratinositler ile kombinasyonda değerlendirdik.

Çalışmamızdaki deneysel yaklaşım, H&E boyaması ile yara alanının histolojik değerlendirilmesi, çeşitli büyüme faktörleri (EGF, PDGF, TGF- β 1, FGF-2, FGF-7, FGF-10, EGF), MCP-1 ve Kollajen-1'in RT-PCR ve immunohistokimyasal analizler ile değerlendirilmesini içermektedir. Ayrıca sitokeratin düzeyleri de immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Hücresel terapinin ve PRP'nin ikinci derece yanık iyileşmesi üzerine etkisi, tedavi verilen ve verilmeyen diyabetik sıçanlarda, tedavi sonrası 3., 7., 10. ve 14. günlerde sırttaki termal yanık alanından alınan biyopsi materyallerinde değerlendirilmiştir.

Sonuçlarımıza göre, yeniden epitelizasyon süreci, tedavi uygulanan gruplarda tedavisiz kontrol grubuna kıyasla daha erken başlamıştır. Keratinositler ve/veya PRP uygulanan tüm tedavi gruplarında, büyüme faktörlerinin ve Kollajen-1'in düzeyi artış gösterirken, MCP-1 düzeyleri farklı günlerde kontrol grubuna kıyasla düşüş göstermiştir. Ayrıca MKH'den elde edilen keratinositler ve PRP'nin kombine uygulaması, diyabetik sıçanlarda oluşturulan yara iyileşme modelinde en hızlı ve en iyi tedaviyi sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: yara iyileşmesi, yanık yarası, mezenkimal kök hücreler, PRP, keratinosit, diyabet, sıçan

Using Keratinocytes Differentiated from Rat Adipose Tissue Stem Cells and PRP in Experimental Burn Wound Model of Diabetic Rats

ABSTRACT

Diabetes is one of the most important health problems with a rising prevalence each year all around the world. The problems seen in diabetic wound healing process lead to complications which can even end up with amputations in severe cases. Adipose tissue is a rich source of autologous mesenchymal stem cells (MSCs). Use of these cells in therapeutic applications has a great potential for effective treatment of diabetic patients.

In this study, we used adipose tissue as the source of MSCs where we excised rat adipose tissue, cultured MSCs isolated from this tissue and then differentiated them into keratinocytes. The differentiated cells were then transferred to the thermal burn areas of STZ-induced diabetic rats. At the same time, we evaluated the effect of platelet rich-plasma (PRP) alone and in combination with keratinocytes in our thermal burn animal model.

The experimental approach in our study included histologic examination of the wound area by H&E staining, immunohistochemical and RT-PCR analysis of the various growth factors (EGF, PDGF, VEGF, TGF- β 1, FGF-2, FGF-7, FGF-10), MCP-1 and collagen-I. In addition, cytokeratins were analyzed by immunohistochemical analysis. The effect of cell therapy and/or PRP on secondary burn wound healing process was assessed in biopsy samples excised from the wound areas on the dorsal side of the treated/untreated rats on 3rd, 7th, 10th and 14th days after treatment. According to our results, re-epithelization started sooner in the treated groups in comparison with the untreated control group. In all treatment groups where we applied either keratinocyte-like cells or PRP, the level of growth factors and collagen-1 were found to be increased while MCP-1 levels decreased compared to the control group. Our data also indicated that the combined application of PRP and keratinocytes derived from MSCs showed the most accelerated healing process and was the best treatment for thermal wound healing model of diabetic rats.

Keywords: wound healing, burnwound, mesenchymal stem cell, PRP, keratinocyte, diabetes, Rat

İÇİNDEKİLER

TEZ DEĞERLENDİRME KURUL SAYFASI.....	I
ÖNSÖZ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
TABLolar.....	VII
ŞEKİLLER.....	VIII
GİRİŞ.....	1
1.GENEL BİLGİ.....	2
1.1 Diabetes Mellitus (DM).....	2
1.1.1 Tip 1 DM.....	2
1.1.2 Tip 2 DM.....	3
1.2 Deri Yapısı.....	3
1.2.1 Epidermis.....	4
1.2.2 Dermis.....	6
1.2.3 Subkutis.....	7
1.3 Yara İyileşmesinin 3 Fazı.....	8
1.4 Trombositten zengin plazma (PRP)	8
1.4.1 Yanıkta Trombositten zengin plazma kullanılması.....	9
1.5 Keratinositler.....	12
1.5.1 Keratinositlerin rolü.....	13
1.6 Büyüme Faktörleri.....	15
1.6.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF).....	16
1.6.2 Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF-β).....	16
1.6.3 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	17
1.6.4 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF).....	17
1.7 Sitokeratinler.....	18
2 Gereç ve Yöntem.....	20
2.1 Araştırmanın yeri ve zamanı.....	20
2.2 Sıçan adipoz doku kökenli MKH'lerin izolasyonu.....	20
2.3 Adipojenik MKH'lerin keratinositlere farklılaştırılması.....	21
2.4 Hücrelerin İmmunohistokimyasal Boyamaları.....	21
2.5 Trombosit Yönünden Zenginleştirilmiş Plazma (PRP) Hazırlanması	22

2.6	Çalışma Grupları.....	23
2.6.1	Hayvan Modelinin Oluşturulması.....	23
2.6.2	Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması.....	24
2.6.3	İkinci Derece Deneysel Yanık Yara Modeli (4'er) Oluşturulması	25
2.7	Biyopsi Alımı	26
2.8	Işık Mikroskopik İnceleme.....	27
2.9	Parafin Doku Takibi.....	27
2.10	Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	28
2.11	Yara Kapanmasının Yüzey Alanına Bağlı Hesaplanması.....	28
2.12	İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi.....	29
2.13	Gen Ekspresyon Analizi (Real Time PCR).....	31
2.13.1	Total RNA İzolasyonu.....	32
2.13.2	Real Time Online Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizi.....	32
2.14	Verilerin Analizi.....	32
3	BULGULAR.....	33
3.1	Deney Hayvanlarında Diyabet Belirteçlerinin İzlenmesi.....	33
3.2	Yara İyileşmesinin İzlem sonuçları.....	36
3.3	Hücre Kültürü Sonuçları.....	39
3.3.1	Adipojenik Kök Hücrelerden Elde Edilen Keratinosit Hücrelerinin Tanımlanması.....	39
3.4	Histolojik Sonuçlar	40
3.5	İmmunohistokimyasal Sonuçlar.....	46
3.6	Gen Ekspresyon Analizi.....	87
4	TARTIŞMA.....	95
5	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	102
6	KAYNAKLAR.....	103
7	HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU.....	113
	ÖZGEÇMİŞ.....	114

TABLÖLAR

Tablo 1. Deri tabakalarının özellikleri.....	4
Tablo 2. Büyüme Faktörleri	18
Tablo 3. Sitokeratinler	19
Tablo 4. Kemokinler	19
Tablo 5. PRP hazırlanması.....	22
Tablo 6. Parafin Doku Takibi.....	27
Tablo 7. Hematoksilen-Eozin Boyaması	29
Tablo 8. İmmunoperoksidaz Boyaması	30
Tablo 9. Primer tasarısı için kullanılan gen dizileri.....	31
Tablo 10. Diyabetik sıçanlarda kan glukozu değerlerinin zamana göre değişimi... 33	
Tablo 11. Diyabetik sıçanlarda vücut ağırlığının zamana göre değişimi.....	34
Tablo 12. Diyabetik sıçanlarda günlük yem tüketiminin zamana göre değişimi....	34
Tablo 13. Diyabetik sıçanlarda günlük ortalama su tüketiminin zamana göre değişimi.....	35
Tablo 14. Diyabetik sıçanlarda günlük idrar miktarının zamana göre değişimi....	36
Tablo 15. EGF immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi.....	46
Tablo 16. FGF2 immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi.....	47
Tablo 17. Kollajen-1 immunoreaktivitesi nin günlere göre değişimi	47
Tablo 18. MCP-1 immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi.....	48
Tablo 19. PDGF immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi	48
Tablo 20. TGF- β immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi	49
Tablo 21. VEGF immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi	49
Tablo 22. Sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi	50
Tablo 23. Sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin günlere göre değişimi	50

ŞEKİLLER

Şekil 1. Derinin 3 tabakası	4
Şekil 2a. Epidermisin yapısı	5
Şekil 2b. Epidermisin histolojik görüntüsü.....	6
Şekil 3. Dermisin papiller ve retiküler bölgeleri	7
Şekil 4. Adipojenik kök hücre eldesi	20
Şekil 5. Adipojenik doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kültürü.....	21
Şekil 6.Kan örneklerinin alımı	23
Şekil 7. Kan örneklerinin santrifüj sonrası görünümü.....	23
Şekil 8.Trombositçe zengin plazma (PRP)	23
Şekil 9.Kan sayım cihazı	23
Şekil 10 Normal kafesler.....	24
Şekil 11. STZ enjeksiyonu ile diyabetindüksiyonu	24
Şekil 12.Glukometre ve glukoz stripleri	25
Şekil 13. Metabolik kafesler.....	25
Şekil 14. Bakır çubuk.....	26
Şekil 15. Simetrik olarak oluşturulan 2.derece termal yanıklar.....	26
Şekil 16. Cilt altına hücre enjeksiyonu.....	26
Şekil .17 Yara boyutunda zaman ve tedaviye bağlı küçülme oranı.....	37
Şekil 18. PRP ve keratinosit uygulaması sonrası yanık yaralarının makroskopik izlemi	38
Şekil 19Adipojenik kök hücre kültürü ve keratinositlere farklılaştırılması.....	39
Şekil 20. Farklılaştırılan keratinositlerde sitokeratin-8 ve sitokeratin-14 boyamaları.....	40
Şekil 21.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinosit uygulanan gruptaHematoksilen-Eozin boyamaları.....	42
Şekil 22.PRP uygulanan gruptaHematoksilen-Eozin boyamaları.....	43
Şekil 23.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinosit + PRP uygulanan gruptaHematoksilen-Eozin boyamaları.....	44
Şekil 24.Kontrol (tedavisiz diyabet) grubunda Hematoksilen-Eozin boyamaları...	45
Şekil 25.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinosit uygulanan grupta EGF dağılımı.....	51

Şekil 26. PRP uygulanan grupta EGF dağılımı.....	52
Şekil 27. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta EGF dağılımı.....	53
Şekil 28: Kontrol grubunda EGF dağılımı.....	54
Şekil 29. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin uygulandığı grupta FGF2 dağılımı.....	55
Şekil 30. PRP uygulanan grupta FGF2 dağılımı.....	56
Şekil 31. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta FGF2 dağılımı.....	57
Şekil 32. Kontrol grubunda FGF2 dağılımı.....	58
ŞEKİL33. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin uygulandığı grupta kollajen1 dağılımı.....	59
ŞEKİL 34. PRP uygulanan grupta kollajen1 dağılımı.....	60
Şekil 35. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta kollajen1 dağılımı.....	61
Şekil 36. Kontrol grubunda kollajen1 dağılımı.....	62
Şekil 37. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta MCP-1 dağılımı.....	63
ŞEKİL38. PRP uygulanan grupta MCP-1 dağılımı.....	64
Şekil 39. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta MCP-1 dağılımı.....	65
Şekil 40. Kontrol grubunda MCP-1 dağılımı.....	66
Şekil 41. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta PDGF dağılımı.....	67
Şekil 42. PRP uygulanan grupta PDGF dağılımı.....	68
ŞEKİL 43. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta PDGF dağılımı.....	69
Şekil 44. Kontrol grubunda PDGF dağılımı.....	70
Şekil 45. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta TGFβ-1 dağılımı.....	71
Şekil 46. PRP uygulanan grupta TGFβ-1 dağılımı.....	72
Şekil 47. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan	73

keratinositler ve PRP uygulanan grupta TGF β -1 dağılımı.....	
Şekil 48. Kontrol grubunda TGF β -1 dağılımı.....	74
Şekil 49. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta VEGF dağılımı.....	75
Şekil 50. PRP uygulanan grupta VEGF dağılımı.....	76
Şekil 51. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta VEGF dağılımı.....	77
Şekil 52. Kontrol grubunda VEGF dağılımı.....	78
Şekil 53. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta sitokeratin8 dağılımı.....	79
Şekil 54. PRP uygulanan grupta sitokeratin8 dağılımı.....	80
Şekil 55. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta sitokeratin8 dağılımı.....	81
Şekil 56. Kontrol grubunda sitokeratin8 dağılımı.....	82
Şekil 57. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta sitokeratin14 dağılımı.....	83
Şekil 58. PRP uygulanan grupta sitokeratin14 dağılımı.....	84
Şekil 59. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta sitokeratin14 dağılımı.....	85
Şekil 60. Kontrol grubunda sitokeratin14 dağılımı.....	86
Şekil 61. EGF gen ekspresyonu.....	87
Şekil 62. Kollajen-I a2gen ekspresyonu.....	88
Şekil 63. MCP-1gen ekspresyonu.....	89
Şekil 64. TGF- β 1 gen ekspresyonu.....	90
Şekil 65. VEGFgen ekspresyonu.....	91
Şekil 66. FGF-2 gen ekspresyonu.....	92
Şekil 67. FGF-7 gen ekspresyonu.....	93
Şekil 68. FGF-10 gen ekspresyonu.....	94

GİRİŞ

2009 yıl sonu itibarı ile tüm dünyadaki diyabet nüfusu 285 milyon iken bu sayının 2030 yılında 438 milyona ulaşması beklenmektedir. Bu hastaların % 15'inde yaşamlarının bir döneminde iyileşmeyen kronik yaralara maruziyet söz konusudur. Genellikle diyabetik hastalarda iskemi, nöropati, travma ve enfeksiyon iyileşmeyen yaralara neden olmaktadır.

Yağ dokusu, akut ve kronik hasarlı dokuların onarım ve rejenerasyonu için çeşitli alanlarda terapötik uygulanabilirliği ile dikkati çeken zengin bir otolog erişkin mezenkimal kök hücreler (MKH) kaynağıdır. Ayrıca, trombositlerden salınan büyüme faktörleri hücrelerin onarım mekanizmasını devreye sokarak yaraların iyileşmesini sağlamaktadır. Trombositten zengin plazma (platelet rich plasma-PRP) uygulamasında, hedef bölgeye kan dolaşımıyla taşınabilenden çok daha fazla sayıda trombosit (platelet) ve içeriğinde bulunan büyüme faktörlerinin ulaştırılabilmesi mümkündür; bu nedenle de yara iyileşmesinde etkinliği kaçınılmazdır. Keratinosit ve PRP'nin birlikte uygulanmasının yara iyileşmesinde sinerjik etkileşimle daha da etkili olabileceği düşünülmektedir. Keratinositlerin özellikleri yara içindeki konumlarına ve çevresel koşullarına bağlı olarak değişmekle birlikte epitelizasyonun oluşması ve yara yerinin kapanması sürecinde bağ dokusu hücreleri ve bu hücrelerden salgılanan birçok faktör ile iyileşmenin hızlandırabilmesinde önemli etkileri mevcuttur. PRP, doku için nontoksik ve otolog olduğundan insanlarda güvenle kullanılabilir. Aktivasyon ile ilgili olarak, trombositler granüler içeriklerini çevresel ortamlarına bırakırlar. α -granüller trombositlerde en bol bulunan ve en önemli olanlardır çünkü iyileşme yanıtının başlaması ve sürdürülmesinden sorumlu büyüme faktörlerinden zengindirler. TGF- β , PDGF, VEGF ve FGF ürettikleri büyüme faktörlerinin sadece birkaçıdır. Bu büyüme faktörlerinin iyileşmenin tüm fazlarında etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilecek veriler bu tedavilerin klinikte hastalar için kullanılması açısından yol gösterici olacaktır. Diyabetiklerde uygulanması ile uzun süreli hastanede yatış, buna paralel olarak artan maliyet ve hastanın iyileşmesine olumsuz etkileri olan enfeksiyon, doku reddi, ruhsal travma vb. nin azaltılması ve hatta diyabetik ayakların amputasyonunu engelleyebilmek de mümkün olabilir.

1. GENEL BİLGİ

1.1 Diabetes Mellitus (DM)

2014 yılı itibarıyla tüm dünyada %90'ı Tip 2 DM olmak üzere 387 milyon diyabetli vardır ve bu rakam erişkin popülasyonunun %8,3'üne denk gelir, ancak, 2035 yılında bu rakamın 592 milyon olması beklenmektedir. Kadınlar ve erkekler için risk eşittir. Diyabetin global maliyeti ABD'de 2012 yılında 245 milyar dolar iken 2014 yılında bu rakamın tüm dünyada 612 milyar dolar olacağı tahmin ediliyordu.

Diabetes mellitus uzun süreli kan şekeri yüksekliğine bağlı olarak ortaya çıkan bir grup metabolik hastalıktır. Kan şekeri yüksekliği poliüri, polidipsi ve polifajjiye neden olur. Tedavisiz kalan diyabetiklerde akut ve kronik dönemde olmak üzere pek çok komplikasyon görülmesi beklenir. Diyabetik ketoasidoz, non-ketotik hiperozmolar koma diyabetin akut komplikasyonları; kardiyovasküler hastalıklar, inme, kronik böbrek yetmezliği, diyabetik ayak ve göz hasarı diyabetin ağır kronik komplikasyonları arasında yer alır. Pankreas beta hücreleri tarafından yeterli insülin üretilmemesi veya üretilen insüline hedef organlarda yanıtızsızlık diyabete yol açmaktadır (1-3).

Diyabet mellitus, Tip 1 DM, Tip 2 DM, gestasyonel diyabet olmak üzere 3 ana kategoride sınıflandırılabilir.

1.1.1 Tip 1 DM

Tip 1 diabetes mellitus insülin üretiminden sorumlu olan pankreas Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin kaybı ve insülin yetmezliğiyle karakterize bir tablodur. Beta hücrelerinin kaybı immun aracılıklı mekanizmalarla veya idiopatik olarak gerçekleşir. İmmun aracılıklı mekanizma daha sık görülmekte ve T hücrelerinin otoimmün olarak beta hücrelerine saldırmasıyla gerçekleşmektedir. Çoğunlukla diğer yönlerden sağlıklı ve obez olmayan kişilerde görülür. İnsüline duyarlılık ve verilen yanıt özellikle erken dönemlerde normaldir. Tip 1 DM, çoğunlukla çocuklarda görüldüğünden eskiden Juvenil Diyabet olarak isimlendirilmiş olsa da erişkinlerde de ortaya çıkabilen bir hastalık olduğundan bu isimlendirme artık kullanılmamaktadır.

"Kırılgan diyabet" terimi anstabil yani labil diyabet için kullanılır ve çoğunlukla tip 1 diyabette nedeni olmaksızın görülen kan glukoz düzeylerindeki büyük dalgalanmaları tanımlamak için kullanılan ve tarihsel önemi olan bir terimdir. Tip 1 DM'da kan glukoz düzeylerinde bazen beklenmeyen ani yükselme ve düşüşler

bazen de ketoasidoz görülmesine rağmen "kırılgan" terimi günümüzde terk edilmiştir. Tip 1 DM'da görülen diğer komplikasyonlar arasında insüline karşı yanıtın bozulması, enfeksiyonlara eğilim, gastroparezi ve Addison v.b. diğer endokrinopatiler yer almaktadır (4).

Tip 1 DM'un zemininde genetik bir yatkınlık söz konusudur. Bazı HLA genlerine sahip kişilerde diyabet riskinin daha yüksek olduğu ve bu kişilerde hastalığın diyet, viral enfeksiyonlar gibi çevresel faktörlerle tetiklenip ortaya çıktığı düşünülmektedir. Coxsackie B4 virüsü ile Tip 1 DM arasındaki ilişki bilimsel olarak gösterilmiştir. Tip 1 DM'da hastalığın gelişmesinde yaşam tarzı Tip 2 DM'da olduğu kadar etkin bir faktör değildir (5).

1.1.2 Tip 2 DM

Tip 2 DM insülin direnci ile karakterize, zamanla insülin yetmezliğinin de eklenebileceği bir hastalıktır. Spesifik olarak bilinmeyen bir nedenle insülin reseptörünün insüline verilen yanıtının bozuk olmasındankaynaklanır. Tip 2 DM tüm diyabet tipleri arasında en sık görülenidir.

Tip 2 DM'un erken döneminde temel sorun insülin duyarlılığındaki azalmadır. Bu dönemde yaşam tarzı değişiklikleri ve medikal tedaviyle insülin duyarlılığının artırılması ya da karaciğer tarafından glukoz üretiminin azaltılması amaçlanır.

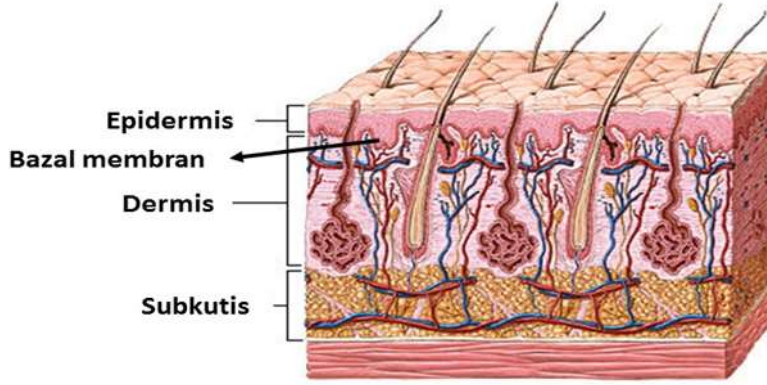
Tip 2 diyabet kişinin genetiği ve yaşam tarzıyla ilişkilidir. Obezite (BMI>30), yetersiz fiziksel aktivite, sağlıksız diyet, emosyonel stres ve şehir hayatı hastalığı tetikleyen yaşam tarzı faktörleri arasında yer alır. Obezite Çin ve Japon kökenli kişilerde Tip 2 DM'un %30'undan, Avrupa ve Afrika kökenli kişilerde %60-80'inden ve Pima yerlileri ve Pasifik kökenli kişilerde %100'ünden sorumludur. Obez olmayan Tip 2 DM'lerde bile bel/kalça oranı normale göre artmıştır.

Gestasyonel diyabet, diyabetin 3. bir klinik formudur. Geçmişinde diyabet öyküsü ya da kan şekeri yüksekliği olmayan gebede aniden kan şekerinin yükselmesi ve diyabet gelişmesi olarak tanımlanır (6).

1.2 Deri Yapısı

Vücutun dış yüzeyini kaplayan deri, vücut ağırlığının %16'sını oluşturan ve 1.8m²'lik bir yüzey alanına sahip olan vücutun en büyük organıdır. Çevreye karşı fiziksel bir koruyucu bariyer oluşturan deri, su, elektrolitler ve çeşitli maddelerin içeri ve dışarı geçişini kontrol etmek yanı sıra; mikroorganizmalar, UV ışınları, radyasyon ve toksik maddelere karşı koruma sağlama gibi çeşitli fonksiyonlara

sahiptir. Derinin embriyonik kaynağı ektoderm ve mezodermdir ve 3 farklı tabakadan oluşur; epidermis, dermis ve subkutis (hypodermis). Derinin 3 tabakası Şekil-1 ve Tablo-1' de gösterilmiştir (7,8).



Şekil 1. Derinin 3 tabakası.

Tablo 1. Deri tabakalarının özellikleri.

Deri Tabakası	Açıklama
Epidermis	Derinin en dış tabakasıdır. Temel hücre tipi keratinositlerdir. Keratinositler yanısıra melanositler, Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri de bu tabakada yer alır.
Bazal Membran	Dermo-epidermal birleşim yeridir. Düzensiz, kompleks ve çok katmanlı bir yapılanma ile karakterize deri tabakasıdır
Dermis	Epidermis ve subkutis arasında destekleyici bağ dokusudur. Ter bezleri, kıl kökleri, sinir hücreleri, lifler, kan damarları ve lenf damarlarını içerir.
Subkutis	Dermisin altında yer alan yumuşak bağ dokusudur ve lipid içerikli deri katmanıdır.

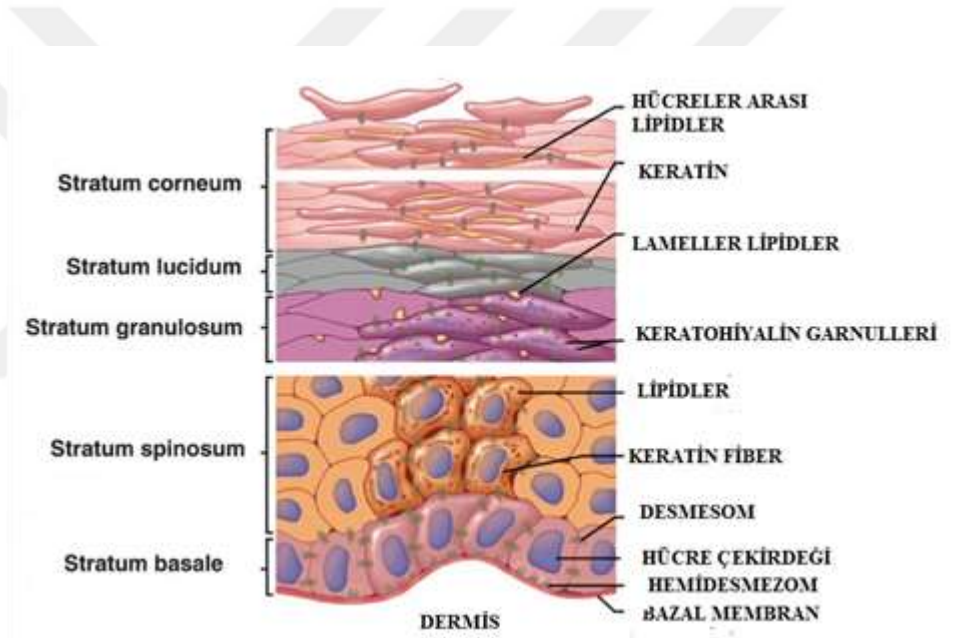
1.2.1 Epidermis

Çok katlı yassı epitel dokudan oluşan epiderminin ana hücre tipi keratinositlerdir. Skuamöz hücreler olarak da adlandırılan keratinositler, keratin sentezinden sorumludur. Protein köprüleri olan dezmozomlar, keratinositlere bağlanır ve böylece yüzeysel katmanlardan daha derin deri katmanlarına doğru geçiş yaparlar. Epidermisteki 4 ayrı tabakanın oluşumu (tabakalanma), keratinin matürasyonu aşamalarında gözlenir. Epidermis kalınlığı 0.05 mm (göz kapağı) ile

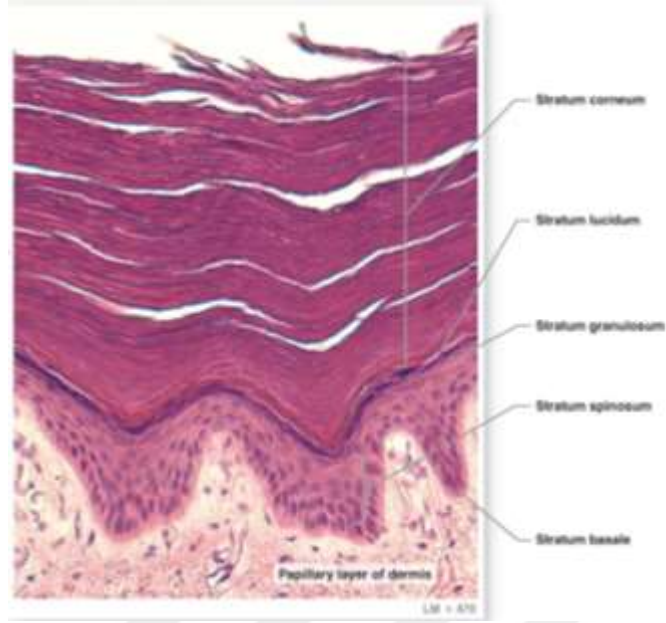
0.8 ± 1.5 mm (ayaktabanı ve avuç içi) arasında değişim gösterir. Epidermisin içten en dışa doğru yapılanmasındaki bu 4 tabaka aşağıdaki gibidir;

- Stratum Bazale (bazal veya germinativum hücreleri)
- Stratum Spinozum (Spinöz veya dikensi hücre tabakası)
- Stratum Granülozum (granüler hücre tabakası)
- Stratum Korneum (Boynuzsu Tabaka)

Stratum Lucidum, kalın epidermis tabakasında yer alan saydam hücrelerden oluşmuş bir tabakadır. Bu tabaka, stratum granülozum ve stratum korneum arasındaki geçişi oluşturur ve ince epidermis tabakasında genellikle görülmez. Epidermisin yapısı, Şekil-2a ve Şekil-2b'de gösterilmektedir (7,8).



Şekil 2a. Epidermisin yapısı.



Şekil 2b. Epidermin histolojik görüntüsü.

Dermoepidermal birleşim yeri / bazal membran

İki katmandan oluşan bazal membran, dermal papilla nedeniyle düzensiz ve kompleks bir yapıya sahiptir. Büllöz pemfigoid ve epidermolizis bulloza gibi deri hastalıkları, derinin bu katmanı ile ilgili patolojilere bağlı gelişen hastalıklardır. Epidermin besin alış-verişi yanısıra atıkların dışarı atılımı, difüzyon yoluyla bu katmanda gerçekleşir. Yaşlanma ile beraber bazal membran yapısında oluşan düzleşme, yaşlanmanın dışarıdan gözlenebilir belirtilerinden biridir (7,8).

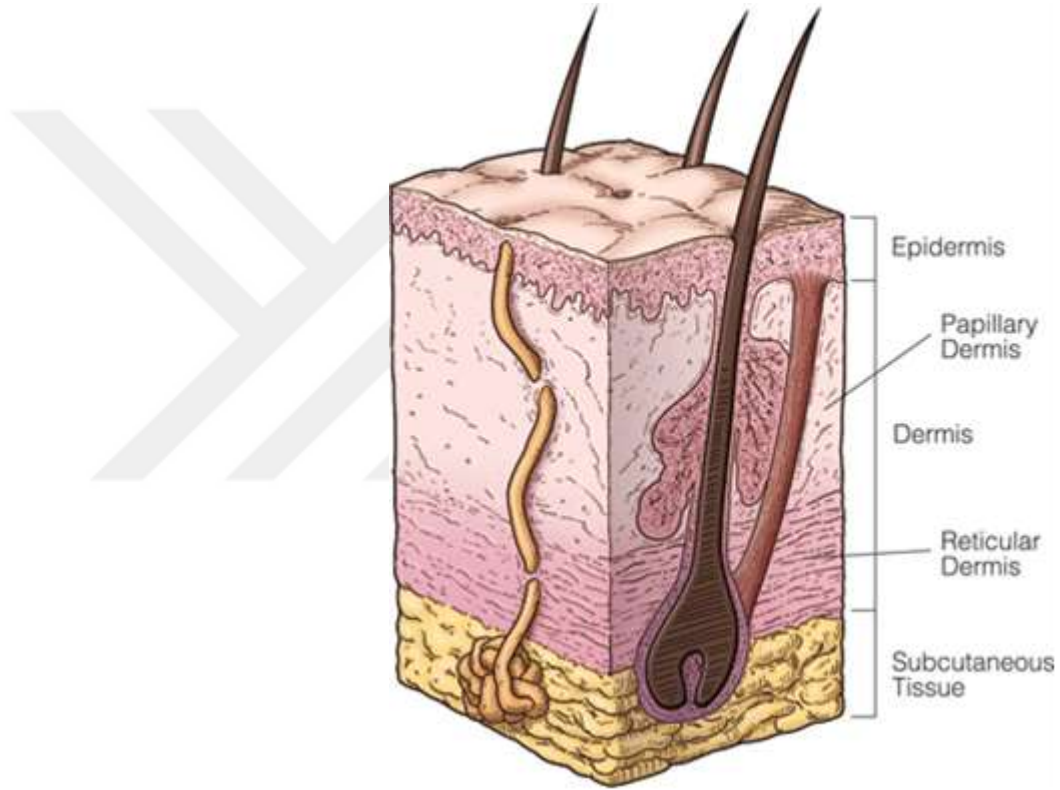
1.2.2 Dermis

Bu bölge ince kollajen lifleri içermektedir. Kalın kollajen demetleri derin retiküler tabakada. Dermis elastin ve epidermin altında yer alan, dayanıklı ve destekleyici hücre matriksinden oluşan iki tabakalı dermin kalınlığı göz kapaklarında 0.6 mm'den; sırt, avuç içi ve ayak tabanında 3 mm'ye kadar değişir. Dermisin iki tabakası;

- İnce papiller tabaka
- Kalın retiküler tabaka olarak sınıflandırılır.

Papiller dermis tabakası epidermis ile bağlantılı ve daha üstte yerleşik olan dermis tabakasıdır. İnce kollajen lif yapılanmasının görüldüğü gevşek bir şekilde düzenlenmiş olan papiller dermis tabakasının aksine, derin retiküler tabakada cilt yüzeyine paralel olarak yerleşmiş kalın kollajen demetleri bulunur ve bunlar papiller

tabakanın tabanından subkutis tabakasına kadar uzanmaktadır. Elastin, kollajen, ve yapısal proteoglikanları sentezleyen fibroblastlar, bağışıklığı sağlayan mast hücreleri ve makrofajlar, dermis tabakasını oluşturan hücrelerdir. Dermis yapılanmasının %70'lik kısmını oluşturan kollajen lifleri, dayanıklı ve sert bir yapı oluşturur. Elastin, elastiklik ve yapısal esneklik için gerekli matriks bileşenleridir. Proteoglikanlar ise vizkozite ve dermisteki hidrasyonu düzenler. Dermisin fibröz dokusunda dermal damar, lenfatikler, sinir hücreleri, sinir lifleri, ter bezleri, kıl folikülleri yanısıra az miktarda çizgili kas hücreleri de yer alır (7,8).



Şekil 3. Dermisin papiller ve retiküler bölgeleri

1.2.3 Subkutis

Abdomen bölgesinde kalınlığı 3 cm'ye kadar çıkabilen subkutis, gevşek bağ dokusu ve yağdan oluşur. Bu tabaka lipidlerle doludur ve lipositlerin bölünmesiyle oluşur. Subkutan dokunun yağ içeriğinden yoksun olduğu bölgeler ise, göz kapakları, penis ve skrotumdur (8).

1.3 Yara iyileşmesi

2009 yılı sonu itibari ile tüm dünyadaki diyabet nüfusu 285 milyon iken bu sayının 2030 yılında 438 milyona ulaşması beklenmektedir. Bu hastaların % 15'inde yaşamlarının bir döneminde iyileşmeyen kronik yaralara maruziyet söz konusudur. Genellikle diyabetik hastalarda iskemi, nöropati, travma ve enfeksiyon iyileşmeyen yaralara neden olmaktadır.

Yara iyileşmesi birbirini izleyen ve bazen de birbiriyle örtüşen fazlardan oluşmaktadır:

1. İnflamasyon fazı (1-4 gün)
2. Proliferasyon fazı (kollajen yapım fazı) (2-22 gün)
3. Yeniden yapılanma (remodelizasyon fazı) (6-12 ay)

Keratinositler, derideki epidermis tabakasının en alt kısmında yer alırlar. Epidermisten köken alan bu hücreler, epidermisteki kök hücrelerin diferansiye olmuş ve olgun hücre formudur. Dezmozomlar aracılığıyla birbirine, hemidezmozomlar ile de bazal membrana bağlanan bu keratinositler (stratum bazale içindeki hücre bölünmeleri ile birkaç tur çoğaldıktan sonra) epidermise doğru hareket ettikleri sırada bir yandan da değişime uğrarlar.

Yaraların iyileşmesindeki gecikmelerde özellikle yara ortamındaki aktif büyüme faktörlerinin düzeylerindeki azalma da sorumludur. Kronik yaraların akut yaralarla karşılaştırıldıklarında daha düşük düzeylerde trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) içerdikleri bilinmektedir. Büyüme faktörlerinin ekstrasellüler matriks molekülleriyle hapsedilebilecekleri veya proteazlarca aşırı derecede yıkılabilecekleri ve bunun da iyileşmemeye sonuçlanabileceği belirtilmektedir.

Diabetes mellitus, pek çok konnektif doku anormallikleriyle ilişkili bir hastalıktır. Azalmış kollajen biyosentezi ve / veya yeni sentezlenen kollajenin artmış proteaz aktivitesi nedeniyle hızlı yıkımı sonucu derideki kollajen içeriği azalmaktadır ve bu durum diyabette rastlanan yara iyileşmesinin bozulmasına katkıda bulunmaktadır (10,11).

1.4 Trombositten zengin plazma (PRP)

PRP trombositten zengin kan plazmasıdır. PRP'de kemik ve yumuşak dokunun iyileşmesini uyaran bazı büyüme faktörleri ve sitokinler bulunur.

1.4.1 Yanıkta Trombositten zengin plazma (PRP) kullanılması

Bozuk yara iyileşmesi, ağır yanıklarda uzun süreli tedavilere gereksinim duyulması ve kapanmayan yaralardan kaynaklanan sekonder komplikasyonların gelişmesi, yanıklı hastaların yara iyileşme sürecinin kısaltılmasını ve yeniden epitelizasyon sürecinin hızlandırılmasını sağlayan araştırmalara yönelmesine sebep olmuştur. Trombosit yönünden zenginleştirilmiş plazma (PRP)'nin otolog uygulanmasının cerrahinin birçok alanında yara iyileşmesini desteklediği gösterildiğinden, PRP uygulamasının yanıklardaki uygulamasının bilimsel bir dayanağı olup olmayacağı sorusu gündeme gelmiştir (11).

Trombositler doku hasarı sonrası hemostaz ve yara iyileşmesinde kilit bir rol oynarlar. Travma sonrası hızla fibrinojeni aktive ederek ve fibrin tıkaçları oluşturarak bir hemostatik ve doku adhezyon faktörü gibi davranırlar. Ayrıca doku tamirinin ileriki aşamalarında da önemli bir rol oynamaktadırlar. Trombosit aktivasyonunun bu uzun süreli etkileri, otuzdan fazla büyüme faktörünün salgılanmasından kaynaklanır. Trombositler kemotaktiktirler ve yara iyileşmesi sürecini düzenlemekte olan fibroblastlar, endotel hücreleri ve projenitör hücrelerin çoğalmasını uyarmaktadırlar. Salgılanan büyüme faktörleri arasında, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kökenli anjiogenez faktörü de denilen trombosit faktörü-4 (PF4) ve trombosit aktive edici faktör (PAF) bulunur. Buna ek olarak trombositler, bazal membran ve hücre dışı matriksin parçalanmasında rol alan diğer hücre tiplerinin proteolitik enzimlerinin salınmasını tetikleyen proteinazları da ekspres ederler (12-15).

Otolog PRP, bazalden/normalden fazla konsantrasyonda trombosit içeren plazmayı tanımlar. PRP içeriğinde bulunan trombosit miktarının ne kadar olması gerektiğini içeren bir tanım yoktur ancak çoğunlukla 3-5 kata kadar artış sağlanarak PRP elde edilir. PRP, eksternal olarak uygulanabilir, implant edilen materyale eklenebilir (örn. kemik iliği gibi) veya veya bir lezyonun içine rejenerasyon sağlayıcı matriks olarak enjekte edilebilir. Erken etki olarak PRP, hızlı bir hemostaz sağlayacak ve fibrin tıkaç oluşturarak doku adhezyonu sağlayacaktır. Salgılanan faktörlerin miktarı hasarlı bölgeye uygulanan trombosit miktarı ile doğru orantılı olarak artacağından, PRP'nin uygulanışı travmaya karşı oluşan fizyolojik yanıtı arttıracak ve protein ve büyüme faktörlerinin bölgedeki normal miktarını aşacağından daha hızlı bir etkiyi beraberinde getirecektir. Bütün bunlara dayanarak,

PRP terapisini savunan bilim insanları, doku rejenerasyonunda artışla ve enfeksiyon,ağrı ve kan kaybının görülme oranındaki azalmaylasağlanan yararları dile getirmektedirler (16-17).

PRP, antikoagulanla pıhtılaşması engellenmiş kanın santrifüj edilmesi ile elde edilir. Santrifüj sonrası ayrılan, trombosit ve beyaz kan hücrelerinin oluşturduğu “buffy coat” tabakasından PRP elde edilir. Geçmişte bir ünite kan gerektiren bu işlem günümüzde daha küçük hacimlerle dahi yapılabilir hale gelmiştir. PRP eldesi son yıllarda laboratuvarlar dışında, doktorların kişisel ofislerinde de elde edilebilir hale gelmiştir. Ofis-içi PRP hazırlanmasını sağlayan sistemler, ticari olarak satılmaktadır. Hazırlanmış ve pıhtılaşması önlenmiş olan PRP, yaklaşık 8 saat boyunca stabilitesini korur. Trombositlerdeki α -granüllerin degranülasyonu ile paketlenmiş durumdaki büyüme faktörleri salınır (18).

Bu sitokinlerin aktif salınımı, pıhtılaşma kaskadı ile uyarılır ve trombosit agregasyonunutakiben ilk 10 dakika içinde başlar. Bu indüklenme PRP’de, kalsiyum klorür (CaCl) ve trombin ilave edilmesi ile başlatılmaktadır. İlk bir saat içerisinde gerçekleşen salımda önceden sentezlenen büyüme faktörlerinin yaklaşık %95 kadarı serbest bırakılır. Canlılığın korunduğu bir haftalık süreçte trombositler ek büyüme faktörleri sentezler ve salgırlar. Makrofajlar, kemotaktik etkiyle ve trombositlerce uyarılarak dayaralı bölgeye çekilir. Burada tümör nekroz faktörü (TNF-a) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi ek büyüme faktörleri de salgılayarak yara iyileşmesini regüle etmeye devam ederler.

PRP’nin yanıklar, radyoterapi yanıkları, kozmetik cerrahi yaraları, plastik cerrahi, diş cerrahisi, ortopedik cerrahi ve kardio-torasik cerrahideki yanık yaralarını iyileştirici etkisi olduğu bilinmektedir. PRP’nin yanık iyileşmesi amacıyla kullanılması sırasında PRP’nin iki etkisi göz önünde bulundurulmalıdır; hızlı hemostatik ve dokuda adheran etkisi ile yara iyileşmesinde uzun süreli düzenleyici etkisi (19-27).

PRP’nin yanıklarda kullanımıyla ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan yalnızca üçü PRP’nin yanıklarda yara tedavisi üzerine etkilerini incelemiştir.

Marquez De Aracena ve ark., oküler yanığı bulunan 10 hastanın sonuçlarında önemli farklılıklar bulmuşlar ve PRP uygulamasının gözün ve korneanın daha hızlı epitelizasyonunusağladığını bildirmişlerdir. Otolog kanın

subkonjunktival enjeksiyonu, 3. dereceden yanık olgularında konjunktival iyileşme süresinde önemli bir kısalma sağlamıştır.

Kazakos, sürtünme yanıkları da dahil olmak üzere akut yaralara müdahalede PRP jelini etkisini incelemişler ve akut yaralara müdahalede PRP'nin etkili bir yardımcı olduğunu bildirmişlerdir. Beş domuz üzerinde yapılan bir çalışmada Henderson, otolog trombosit jelinin (trombosit yönünden zengin plazmakonsantresi), inflamatuvar yanıtı aşırı uyararak yara iyileşmesinde olumlu etki ettiğini göstermişlerdir. Re-epitelizasyona etkisi gözlenmemiştir ancak, ekstrasellüler matriks ve granülasyon dokusu üretiminde önemli bir artış vasküler büyüme, fibroblastik artış ve kollagen üretiminde hızlanma saptanmıştır (28-30).

PRP'nin yumuşak ve sert doku yaralarına uygulanmasını gösteren bazı klinik çalışmalar yapılmış ve destekleyici sonuçlar elde edilmiştir. Martinez Zapata PRP ile ilgili 20 klinik çalışmanın metaanalizini sunmuştur. Deri ülserleriyle ilgili veriler belirsiz iken, oromaksiller cerrahideki bazı uygulamalar olumlu sonuçlar göstermiştir. Ayrıca yazarlar birçok metodolojik sınırlamalar da saptamışlardır ve gelecekte iyi tasarlanmış, randomize kontrollü çalışmalar yapılması için çağrıda bulunmuşlardır. Mandibüler defektlerde PRP uygulanan kemik greftleriyle kemik depozisyonunun arttığı Marx tarafından gösterilmiştir. Simman, PRP'nin, kemik kırığı iyileşmesini TGF-1 ve BMP-2 modülasyonu yoluyla hızlandırdığını göstermiştir (31-33).

Kronik ve akut yaralarda PRP'nin etki mekanizması halen tartışılan bir konudur. Henderson yeniden epitelizasyon süreci üzerine destekleyici bir etki gözlemlerken diğer araştırmacılar farklı sonuçlar bildirmişlerdir.

Knighon ve ark. ve Ganio ve ark., yaraların 8-10 hafta boyunca kollagen tabanda (trombositten elde edilmiş, yara iyileştirici faktör) süspanse edilmiş trombosit lizati kullanılarak tedavi edildiği kronik alt ekstremitte ülserlerinin yeniden epitelizasyonunda PRP uygulaması ile artış olduğunu göstermişlerdir (34,35). Ek olarak, Vermeulen ve ark. PRP'nin bir biomatriks gibi davranarak, ekstrasellüler matriksi organize ettiğini, anjiyogenezi desteklediğini ve yeniden epitelizasyonu hızlandırdığını domuz modeli üzerinde göstermişlerdir (36).

Blanton tarafından, domuz üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise yara tedavisinde yeniden epitelizasyonda değil ama kozmetik açıdan ve mikrodamarlanma yoğunluğu açısından PRP ve adipoz doku kökenli kök hücre kombinasyonlarının yararlı olduğu gösterilmiştir. Yeni ortaya çıkan bir klinik

uygulamada Cervelli, aşığı bacak ülserleri için PRP ve yağ dokusu kombinasyonunun avantajlı sonuçlarını bildirmişlerdir (37,38). Fibrin yapıştırıcının yanıklarda kullanımı ile ilgili raporların neredeyse tümü kısmi kalınlıktaki deri greftlerinde fibrin yapıştırıcının kullanımının hasta konforu açısından karşılaştırılması ile ilgili bilgi içerir.

Örneğin, Gibran ve Mittermayer, kısmi veya tam (bütün tabakaların yandığı) yanıklar için levha şeklinde parçalarda fibrin yapıştırıcısı ile zımbayı karşılaştırdılar. Fibrin yapıştırıcısının “benzer etkide veya daha iyi” olduğunu kanıtladılar. Herhangi bir zımba çıkarılmasına gerek olmadığından dolayı hasta konforu arttı. Ayrıca Foster de yanık yaralanmalarında kısmi kalınlıktaki deri greftlerinde fibrin yapıştırıcısının etkinliğini ve güvenliğini benzer sonuçlarla açıklamışlardır ve yanık cerrahisinde fibrin yapıştırıcının kullanımının kan kaybının kontrolünde etkili olduğunu bildirmişlerdir (39-42).

Yaralarda doku yapıştırıcısı kullanımı sıklıkla tartışmalı sonuçlarla rapor edilmektedir. Fibrin yapıştırıcısının (Tisseel) ilk kez kullanımı 1990’da, estetik yüz uygulamalarında hemostazı ve deri yamalarının yapışmasını sağlamak için bildirilmiştir. 2005 yılında Marchac (43), 30 hasta üzerindeki prospektif bir çalışmada, bağlı olan ve bağlı olmayan taraflar arasında morarma, ödem ve hematoma insidansı açısından minimal farklılıklar bildirmişlerdir.

1994’teki merak uyandıran ilk raporundan sonra bu yazar, görüşlerini revize etmiştir ve fibrinin yüz gerdirmedeki teorik faydasının önceden düşünüldüğü kadar büyük olmadığı sonucuna vardığını açıklamıştır. Man tarafından yaralarda PRP ve fibrin jelinin beraber kullanımıyla alakalı, 20 hasta üzerindeki bir klinik çalışma bildirilmiştir. Otolog fibrin yapıştırıcısının ve trombosit jelin fleplerde, yüz ve boyun lifting/germelerinde, göğüs küçültme ve büyütmede kullanımı drenin azalması, postoperatif ağrı ve ödemde azalma ve yaranın daha hızlı iyileşmesi gibi avantajlar sağlamıştır. PRP’nin yanık hastalarında veya genel olarak yaralardaki yara izi (skatris) bırakmadaki etkisi henüz değerlendirilmemiştir (44).

1.5 Keratinositler

Keratinositler, kıl foliküllerinde ve epidermiste en fazla bulunurlar. Epidermisin %95’i keratinositlerden oluşmaktadır. Keratinositler stratum corneum ve kıl shaftındaki keratini sentezlerler. Keratinositler epidermisin bazal tabakasında bulunurlar ve bu tabakada bölünerek çoğalırlar. Deri yüzeyine doğru göç ettikleri

sırada, keratin ve lipid sentezlerler. Bu göç esnasında keratinositler düzleşir, çekirdeklerini kaybederler ve daha sonra da ölürlür. Bu aşamalardan sonraki evrelerde keratinosit hücrelerine korneosit denir.

1.5.1 Keratinositlerin rolü:

Keratinositlerin en önemli fonksiyonu; parazitler, virüsler, patojen bakteriler, mantarlar, UV radyasyonları, ısı ve su kaybı gibi hasar oluşturabilecek çevresel faktörlere karşı bir bariyer oluşturarak koruma sağlamaktır. Epidermin üst tabakası patojenler tarafından saldırıya uğradığı zaman, keratinositler proenflamatuvar mediatörler, özellikle CCL2 ve CXCL10 gibi kemokinler sentezleyerek lökositleri patojenlerin saldırdığı bölgeye çekerler. Keratinositler, dokudaki yaralanma sonucunda inflamasyonu uyararak Langerhans hücrelerini aktive ederler. Langerhans hücreleri, deride enfeksiyon oluşması sonucunda antijen-sunan (antigen-presenting) hücreler olarak görev yaparlar. Bu antijen-sunan hücreler deriye entegre olan patojenlerin antijenlerini işleyen ilk hücreler olarak rol oynarlar.

Yapısal proteinlerin bir kısmı (filagrin, keratin), lipidler, enzimler (proteazlar) ve antimikrobiyal peptidler (defensinler) derinin bariyer görevini yerine getirebilmesinde önemli bir katkı sağlarlar. Keratinizasyon (boynuzlaşma, ya da cornification) süreci, derinin temel fonksiyonlarından olan fiziksel bariyer oluşturma işlevinin gerçekleştirilmesinde yer alan temel süreçlerden biridir. Keratinizasyon sürecinde keratinositler daha çok miktarda keratin üretirler ve terminal farklılaşma geçirirler. Dış tabakayı oluşturan, tamamen boynuzlaşmış keratinositler sürekli dökülürler ve yerine yenileri yerleşir.

Keratinositler, fibroblastlar, endotel ve immun sistem hücreleri ve diğer tüm hücre tipleri arasındaki kompleks etkileşim ve çapraz iletişim ağı, başarılı bir yaranın kapanması ve tamirinin gerçekleşebilmesi için, yara iyileşmesinin her üç fazında da kritik önem taşımaktadırlar. Yaralanma sonrası yara bölgesine komşu lokasyonda bulunan keratinositler aktive olur ve böylece yara yatağının üzerine göç edebilme yeteneğini kazanmalarını sağlayacak şekilde bu hücrelerin gen ekspresyonları değişir. Bu hücreler, bir kez aktive olduktan sonra, otokrin ve parakrin mekanizmalarla çalışan sinyal moleküllerini üretirler ve farklı hücre tipleri üzerinde pleiotropik etki gösterirler. Buna yanıt olarak, etki gösterdikleri hücreler yara kapanması sürecinde keratinosit aktivasyonunu regüle eden birçok sinyal molekülünü üretirler.

İyileşmenin ilk fazında keratinositlerden depolanmış IL-1 salınımı gerçekleşir. IL-1, otokrin bir mekanizma ile çalışarak keratinosit göçünü ve proliferasyonunu hızlandırır ve yara bölgesine göç eden keratinositlerden K6 ve K16 ekspresyonunu indükler. Keratinositler üzerindeki etkisinin yanısıra, IL-1, yakın bölgedeki fibroblastları da keratinositleri aktive ettiği gibi aktive eder ve KGF salınımını artırır. KGF, keratinosit migrasyonunu ve proliferasyonunu artırır ve enflamatuvar yolakları harekete geçirir. Keratinosit aktivasyonunun bir diğer medyatörü proenflamatuvar sitokin olan, TNF- α 'dır.

IL-1' e benzer şekilde TNF- α , otokrin mekanizma ile keratinosit migrasyonunu uyarır ve parakrin yolla da fibroblastları aktive edip sinyal molekülleri olan FGF ailesine ait proteinlerin sekresyonunu artırır. Böylece, fibroblast göçü uyarılır ve yeniden epitelizasyon sürecinde keratinosit motilitesini arttıran ekstrasellüler matriks bileşenlerinin birikimi sağlanır (45-46).

Keratinositler ve fibroblastlarca üretilen bir diğer sinyal molekülü ise TGF- β 'dır. Ekspresyonu yaralanmaya bağlı olarak artar ve granülasyon dokusu oluşumunu sağlayarak ve miyofibroblast diferansiyasyonunu indükleyerek, kollajen matriksin kontraksiyonunu ve yara kapanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, TGF- β , bazal hücreye spesifik belirteçler olan K5 ve K14'ün ekspresyonunu indükleyerek ve proliferasyonu azaltarak, aktive olmuş keratinositlerin bazal hücre fenotipine geri dönüşümünü sağlayan önemli bir regülatör protein olarak da işlev görürler (47-50).

Ancak venöz ülserlerin epidermis tabakasında TGF- β sinyal yolağı baskılanmıştır ve bu durum diğer etki eden mekanizmalarla beraber göç etmeyen ve iyileştirici özelliği olmayan fenotipte kronik yara keratinositlerinin görülmesine yol açar (51). Yaralanmaya tepki oluşan erken yanıtta, keratinositlerden kemoatraktant olarak etki ederek immün hücrelerin yara bölgesine göçünü sağlayan kemokinler salgılanır. Nötrofiller yaralanmayı takiben ilk birkaç dakika içerisinde yara bölgesine gelirler ve yaralanma sonrasındaki ilk 2 gün boyunca o bölgedeki en baskın hücre tipi haline gelirler. Kan pıhtısının içerisinde bulunan nötrofiller ve trombosit hücreleri, agregasyon yanıtını çoğaltan, koagülasyon yolağını başlatan ve/veya enflamatuvar fazda işlev gören hücreler için kemoatraktant olarak çalışan birçok faktör salgırlar.

Diğer proenflamatuvar sitokinlerin içerisinde nötrofillerce salgılanan IL-6, iyileşme yanıtının başlatılmasında önemli bir faktör olarak gösterilmiştir; IL-6

keratinositler üzerinde hem mitojenik hem de proliferatif etkilere sahiptir ve aynı zamanda nötrofiller için kemoatraktant olarak da etki gösterir. Yara iyileşmesinin enflamatuvar fazı, keratinositlerce salgılanan büyüme faktörlerinin sinyalleri ve yabancı mikroorganizmaların epitoplari ile düzenlenir ve bu yolla kan damarlarından makrofajların aktif olarak yara bölgesine gelmesi ve yerleşmesi ile devam eder. CC kemokin ailesinin bir üyesi olan Makrofaj kemoatraktant protein (MCP-1), keratinositlerde indüklenir ve yara bölgesine hem makrofaj hem de T-hücresi göçüne neden olur (52-55). Bu kemokinin önemi, MCP-1-defektif farelerde re-epitelizasyonun güçlü inhibisyonu ile vurgulanmıştır.

Yaralanma sırasında keratinositlerden ve fibroblastlardan salınan sinyaller, aynı anda deri endotelial hücrelerini de hedefler. Büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre-hücre, hücre-matriks interaksyonları endotelial hücreleri aktive eder. Aktif endotelial hücreler, trombosit hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlar proanjyogenik sitokinler ve büyüme faktörleri salgılayarak, endotelial hücrelerin ekstrasell

üler matrikse (ECM) göçünü ve invazyonunu, endotelial hücrelerin proliferasyonunu ve yeni immatür vasküler yapıların oluşumunu sağlarlar. Yara oluşumunun başlangıç evresi, hipoksiye yanıt olarak trombosit hücreleri tarafından VEGF salınımı ile sonuçlanır. Anjyogenezdeki erken dönem prosesler, özellikle de endotelial hücre migrasyonu ve proliferasyonu, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) tarafından gerçekleştirilir. VEGF, yalnızca Endotelial hücreler üzerinde değil, keratinositler ve immun hücreler üzerinde de parakrin yolla etkili olur ve VEGF'in etkileri ile re-epitelizasyon sağlanır. Aynı zamanda, anjyogenez uyarılır ve oksijen perfüzyonunun yeniden oluşması sağlanır (56-58).

1.6 Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri hücrelerin kendi mikroçevreleri ile iletişimde yaşamsal öneme sahiptir (Tablo 1). Bu faktörler, sinyal iletimini sağlayarak, gelişimi ve fizyolojik büyümeyi düzenler. Bunu ise hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre göçü ve adezyonu gibi işlevleri uyararak ya da inhibe ederek gerçekleştirir. Bu hücrel işlevlerin başlaması, büyüme faktörünün hedef hücredeki reseptörüne bağlanmasıyla gerçekleşirken, bağlanma sonrası elde edilen yanıt, büyüme faktörünün kimyasal yapısı, konsantrasyonu ve aktivitenin uzunluğuna bağlıdır. Büyüme faktörleri birçok doku tipinde sentezlenebilir ve bu dokulardan salgılanabilir. Bu faktörlerin hücre bölünmesini başlattığı ve doku tamirinin aşamalarının devamlılığını sağladığı gösterilmiştir (59).

In vitro ortamda sessiz hücreleri mitoz bölünme için uyarabilme yeteneğine sahip büyüme faktörleri, bu özellikleri ile yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. Yara iyileşmesinde izlenen biyolojik yolda yer alan her büyüme faktörünün tek tek rollerinin daha iyi anlaşılması, ekzojen kaynaklı büyüme faktörlerinin iyileşmeyen yaralarda, iyileşmeyi hızlandırıcı olarak doğrudan uygulanmasına yardımcı olabilir. Giderek büyümekte olan biyolojik yara ürünleri alanı, enflamatuvar medyatörler arasındaki dengenin anlaşılması ve ayarlanmasını sağlayarak, iyileşme sürecinin hızlandırılmasını amaçlamaktadır (60,61).

1.6.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Epidermal büyüme faktörü, ilk olarak erkek bir farenin çene altı bezinden elde edilmiştir. Epidermal hücrelerin olgunlaşmasını sağlayan bir faktör ve potansiyel bir mitojen olduğu bulunmuştur. Daha sonraki çalışmalar, EGF'nin, hücre kültürü ortamında başka birçok hücre tipi için hücre bölünmesini uyarma yeteneği olduğunu göstermiştir. 1983 yılında, Oka ve Orth, EGF'nin trombositler ile ilişkili olduğunu ve pıhtılaşma sırasında salındığını bildirmişlerdir. Hayvan deneyleri, EGF tedavisinin farklı yara tiplerinde iyileşmeyi desteklediğini ve kesiklerde gerilmeye dayanıklılığı arttırdığını göstermiştir. Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda, fareden çene altı bezleri ve dilaltı bezlerinin çıkarılması, yara kontraksiyon zamanının yavaşlamasına neden olmuştur. Ancak yara iyileşme oranları, EGF'nin topikal uygulanması veya bu farelerin, sialektomize olmamış erkek farelerle aynı kafese konması sonrası kontrol grubu ile aynı düzeye yükselmiştir. EGF ile yapılan klinik çalışmalarda ise, topikal EGF uygulamasının, parsiyel kalınlıktaki deri greftlerinin donör uygulama bölgelerinde ve ikinci derece yanık bölgelerinde epidermal rejenerasyon oranını arttırdığı ve kronik yaraların iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir (62-64).

1.6.2 Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF- β)

Dönüştürücü büyüme faktörü, belki de tüm büyüme faktörü aileleri arasında en fazla etki alanına sahip olanıdır. Bu faktörler, trombositler, makrofajlar ve lenfositler de dahil olmak üzere, birçok farklı hücre tipi tarafından sentezlenir ve hemen hemen tüm hücrelerde TGF reseptörü bulunur. TGF ailesine ait proteinler, keratinositler ve lökositler gibi özellikle ektoderm orijinli hücreler olmak üzere bir grup hücre tipi için dönüşümlü büyüme inhibitörü olarak çalışabilme özelliğine sahiptirler. Yara iyileşmesinde de dönüştürücü büyüme faktörü, önemli faktörlerden biridir. Enflamatuvar hücrelerin kemotaksisini ve ekstrasellüler matris sentezini

uyarabilme özelliğine sahiptir. İlginç şekilde, fetal yaralanmaların TGF- β 1 'in farklı konsantrasyonları ile yapılan tedavi edilmesi, bu yaralarda görülebilir düzeyde skar oluşumuna sebebiyet vermiştir ve bu durum, TGF- β 1'in kutanöz skar oluşumundaki doğrudan etkisini göstermektedir (65).

1.6.3 Vasküler endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), *in vitro* ortamda vasküler endotelial hücreler için selektif ve potansiyel bir mitojendir ve *in vivo* olarak anjiyojenik etkili olduğu bulunmuştur. PDGF proteini ile yapısal homolojisi vardır. Enflamatuvar hücrelerin yaralanma bölgesine akışını sağlayarak ve var olan endotelial hücrelerin göçünü ve proliferasyonunu hızlandırarak vasküler geçirgenliği artırır ve böylece doku tamirini hızlandırır (66,67). Bu oluşumların tümü, yara iyileşmesinin karakteristik özellikleridir. Araştırmaların erken döneminde yapılan bir hayvan çalışmasında, günde toplamda 5 uygulama ile yapılan topikal VEGF uygulamasının, yazar tarafından oluşturulmuş özgün bir yara iyileşme modelinde yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Tedavi almayan diyabetik farelerde yara üzerinde yeniden yüzey oluşumu 25 gün alırken, tedavi uygulanan diyabetik farelerde yara üzerinde yeniden yüzey oluşumunun 12 gün aldığı gösterilmiştir (68).

1.6.4 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF, endotelial hücreler için potansiyel mitojenler olan 10 kadar heparin-bağlı büyüme faktörü dizisini tanımlar. Bu faktörler kapiller endotelial hücrelerin proliferasyonunu sağlayarak yeni kan damarlarının büyümesini uyarır ve böylece anjiyogenez faktörleri olarak işlev gösterirler. Aynı zamanda FGF, keratinositler gibi epitelial hücrelerin proliferasyonunu da uyarır. FGF faktörünün asidik FGF (aFGF) ve bazik FGF (bFGF) olmak üzere iki formu bulunur. FGF2'ye ek olarak, birçok çalışmada FGF7 ve onun reseptörü, FGFR2IIIb'nin kutanöz yara iyileşmesinde önemli bir rolü olduğunu gösteren kanıtlar öne sürülmüştür. Fibroblastlarda ve DETC'lerde, deri yaralanması sonrası bu FGF faktörünün güçlü şekilde ekspresyonunun artışı ve keratinositlerde reseptörünün eksprese edilmesi, FGF7'nin yaranın yeniden epitelizasyonunu parakrin sinyalizasyon ile uyardığını gösterir. BU hipotezi test etmek için epidermiste mutant ve dominant-negatif etkili FGF2 eksprese eden transgenik fareler oluşturulmuştur (69).

Tablo 2. Büyüme Faktörleri

Büyüme Faktörü	Hücre Kaynağı	Yara iyileşmesinde primer etki(ler)
EGF	Trombositler Makrofajlar Keratinositler	1. Epitel hücrelerin, fibroblastların ve vasküler endotel hücrelerin proliferasyonunu uyarır. 2. Yeniden modelleme fazında matrisin yıkımını sağlamak için fibroblastlardan kollagenaz sekresyonunu uyarır. Keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu uyarır. Topikal uygulandığında iyileşme süresini azaltır.
TGF- β 1	Makrofajlar Lenfositler, Keratinositler Trombositler Fibroblastlar	1. Keratinositler, endotel hücreler ve makrofajlar da dahil olmak üzere birçok hücre tipinin proliferasyonunu <i>in vitro</i> ortamda inhibe eder. Fibroblastlar için hem inhibisyon hem uyarı sağlayabilir. 2. Anjiyogenezi destekler, Kollajen üretimini destekler ve yıkımını inhibe eder, enflamatuvar hücrelerin kemotaksisini destekler.
FGF	Makrofajlar Nöral Doku Fibroblastlar Astrositler Endotel hücreler Kemik hücreleri Düz kaslar	1. Mezenkimal ve nöral orijinli dokular için mitojendir. 2. Anjiyogenezi, granülasyonu ve epitelizasyonu, sırasıyla, endotel hücrelerin, fibroblastların ve keratinositlerin göçünü sağlayarak destekler.
VEGF	Hipofizer hücreler Makrofajlar Keratinositler	1. Vasküler endotel hücreler için mitojendir, anjiyogenezi uyarır. 2. Doku hipoksisinde anjiyogenezi destekler.
PDGF	Keratinositler, Endotel hücreleri Trombositler Makrofajlar	1.Nötrofiller için kemokindir 2.Fibroblastlar için hem inhibisyon hem uyarı sağlayabilir. 3.Düz kas hücreleri için mitojendir.

1.7 Sitokeratinler

Sitokeratinler, epiteliyal dokunun intrasitoplazmik hücre iskeletinde lokalize keratin-içeren ara filamentlerdir. “Sitokeratin”, terimsel olarak 1970’li yılların geç dönemlerinde kullanılmaya başlanmıştır (Tablo 2,3). Sitokeratinler (CK), epidermal keratinositlerdeki tonofilamanların oluşumundan sorumlu ve moleküler ağırlıkları 40 – 70 kDa arasında değişen bir protein ailesidir. CK’lerin, keratinosit farklılaşmasının hassas belirteçleri olduğu gösterilmiş ve insan epidermisindeki dağılımının patolojik durumlarda ve deneysel şartlarda değişim gösterdiği gözlenmiştir (70-72).

Klasik büyüme faktörlerine ek olarak, birçok farklı sitokeratinin yara iyileşmesinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Sitokeratinler, birçok farklı hücre tipi ile beraber bağışıklık sistemi ilişkili hücrelerin davranışlarını etkilemek üzere salgılanan küçük proteinlerdir. Sitokinler, interlökinleri, lenfokinleri ve Tümör Nekroz Faktörü (TNF) gibi ilişkili sinyal moleküllerini ve interferonları içerir. Kemokinler (kemotaktik sitokinler), lökositlerin ekstrasvazasyonu ve kemotaksisini uyaran bir grup küçük sitokinlerdir.

Makrofaj kemotaktik Protein-1 (MCP-1/CCL2) makrofajlar/monositler için majör kemotaktik ajanlardan biridir ve T hücrelerinin bir alt grubu ve CCR3 reseptörü taşıyan mast hücreleri üzerinde de etkilidir (73).

Farede oluşturulmuş bir ekzisyonel yara iyileşme modelinde, MCP-1/CCL2'nin homolog proteini olan JE'yi kodlayan mRNA düzeyi yaralanma sonrası 6.-24. saatler arasında yüksek düzeylerde bulunmuş ve izleyen zaman içerisinde bu düzeylerde düşüş gözlenmiştir. JE transkriptlerinin birkaç fibroblast hücresinde ve diğer interstisyel hücrelerinde olmakla beraber, en yoğun olarak monositik hücreler ve makrofaj-benzeri hücrelerde olduğu, in situ hibridizasyon yöntemiyle bulunmuştur. Yapılan diğer iki çalışmada ise, yaradaki MCP-1/CCL2 mRNA'sının ya da proteininin majör kaynağı, hiperproliferatif yara epidermisinde lokalize keratinositler olarak tanımlanmıştır (74,75).

Tablo 3.Sitokeratinler

Sitokeratinler	Hücresel Kaynak	Yara İyileşmesinde Primer Etki
Sitokeratin-14	Keratin	Keratin 14, Dönüştürücü büyüme faktörünü (TGF- β 1) destekleyici etki gösterir (9)
Sitokeratin-8	Keratin	Nötrofiller ve fibroblastlar için kemotaktik etkilidir.

Tablo 4. Kemokinler

Kemokinler	Hücresel Kaynak	Yara iyileşmesinde Primer Etki
MCP-1	Makrofajlar Dendritik hücreler	MCP-1, birçok farklı enflamasyon modelinde ve hastalık modelinde monositlerin yeniden lokalizasyonunu yönlendirir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1 Araştırmanın yeri ve zamanı

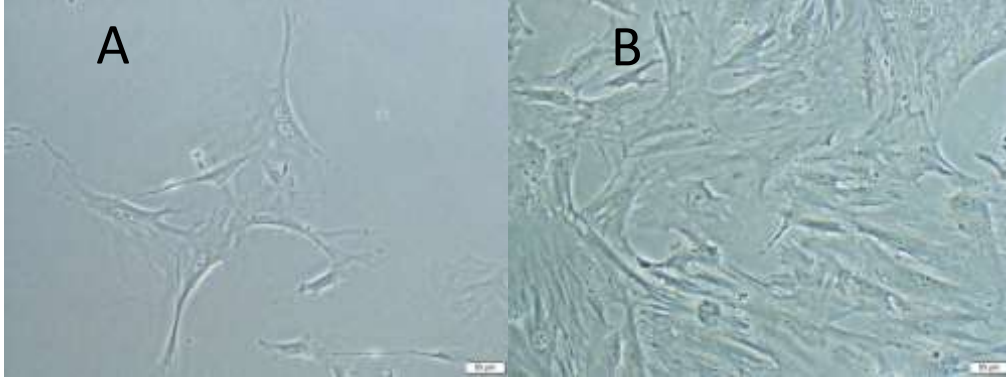
Araştırma, Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı (2014-090) alındıktan sonra Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Deneysel Hayvan Araştırmaları Laboratuvarı'nda 6.11.2015 -30.12.2015 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

2.2 Sıçan adipoz doku kökenli MKH'lerin izolasyonu

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin eldesi için retroperitoneal ve peritoneal yağ dokusu örnekleri alındı. Adipoz dokular eksizyonun ardından PBS ve %5 penisilin-streptomisin ile yıkandı. Örnekler %0.075 kollejenaz tip 1 'in olduğu α -MEM 37°C %5 CO₂ içeren ortamda 30 dakika inkübe edildikten sonra kültür vasatına (α -MEM, %20 FBS, %1 L-glutamin) alınarak en az 2 santrifüj işleminden sonra kültür kabına alınarak kültüre edildi (Şekil 4 A,B,C). Hücreler 2 hafta kültüre edilerek kök hücrelerin çoğalması sağlandı (Şekil 5).



Şekil 4. Adipojenik kök hücre eldesi. Adipojenik dokunun PBS içerisinde yıkanması (A), mekanik disseksiyon ile yağ dokusunun parçalanması (B), kollajenaz içerisinde alınarak sindirilmesi (C).



Şekil 5. Adipojenik kökenli mezenkimal kök hücrelerin kültürünün 3.günü (A) ve 7. günü (B).

2.3 Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Keratinosite Farklılaştırılması

Adipojenik MKH'ler matrijel ile kaplanmış kültür kapları içinde kültüre edildi. Besi ortamına 0.5 nM BMP-4 ilave edildi ve hücreler 2 hafta süresince keratinositlere farklılaştırılmaya bırakıldı.

Hücreler (1×10^6 hücre/ml) kültür kabında 0.5 nM kemik morfogenetik proteini-4 (BMP-4) ilave edilerek kültüre edildi. 10 gün boyunca her gün BMP-4 ilave edilerek hücrelerin keratinosite farklılaşmaları sağlandı.

Kültürün 10. gününde hücrelerin bir kısmı immunohistokimyasal boyama için ayrılır iken, kalan hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile toplanarak 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde adipojenik vasat içerisinde toplandı.

2.4 Hücrelerin İmmunohistokimyasal Boyamaları

Hücreler farklılaşma protokolünün 10. gününde kültür ortamından alındı, PBS ile yıkandıktan sonra % 4' lük paraformaldehit ile 30 dk. tespit edildi. Tespit işleminden sonra 3 kez 5'er dk. PBS ile yıkanan hücreler endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk. % 3' lük hidrojen peroksit içinde inkübe edildi. Hücrelerin 3 defa PBS ile yıkanma işleminden sonra permeabilizasyon için hücreler % 0,1 Triton-X 100 ile 15 dk. buz üstünde bekletildi. Tekrar 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra 1 saat bloklama solüsyonu ilave edilerek bekletildi.. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve üzerlerine anti- -sitokeratin-8 (sc-101459, Santa Cruz Biotechnology) ve anti-sitokeratin-14 (sc-53253, Santa Cruz Biotechnology) antikoları eklenerek bir gece $+4^0$ C'de inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkanan hücreler anti-mouse ve anti-rabbit biyotinlenmiş ikincil antikoru ile 30 dk.

inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5' er dk. yıkanan hücreler streptavidin hidrojen peroksidaz ile 30 dk. bekletildikten sonra tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) kromojeni 5 dk. uygulandı ve distile su ile 15 dk. yıkandı. Mayer's Hematoksilen ile 5 dk. boyama yapıldıktan sonra hücreler distile su ile 15 dk. yıkanarak direkt olarak kapatma medyumunu ile kapatıldı ve Olympus marka BX 40 mikroskop ile incelendi.

2.5 Trombositçe Zenginleştirilmiş Plazma (PRP) Hazırlanması

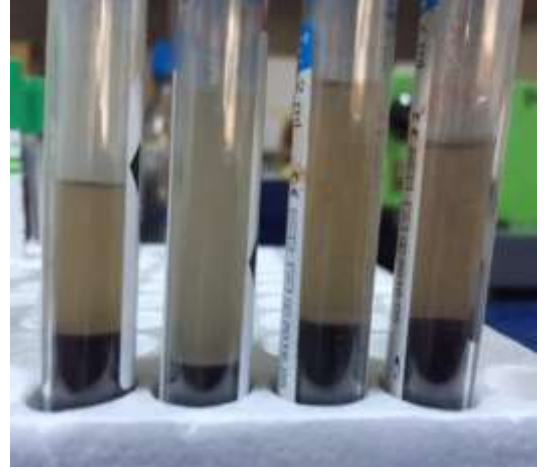
Trombosit Yönünden Zenginleştirilmiş Plazma (PRP) hazırlamak için, 80 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazine karışımı kullanılarak intraperitoneal anestezi uygulanan sıçanlardan intrakardiyak kan örnekleri alındı (Şekil 6). Alınan kan örnekleri, pıhtılaşmayı önlemek amacıyla %3,8 sodyum sitrat içeren vakumlu tüplere alındı. Kan örnekleri, önce 5,600 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi ve eritrositler tüpün dibinde, kan plazması üst kısımda ve trombositler orta fazda (buffy coat) toplanacak şekilde ayırılma sağlandı (Şekil 7). Süpernatantta bulunan plazma ve orta fazdaki, trombosit ve lökosit içeren kısım (buffy coat), ayrı tüplere alındı. 2,400 RPM'de 15 dakika santrifüj sonunda elde edilen pellet, trombositçe zengin plazma (PRP) içermektedir(Şekil 8). Tam kandan ve PRP'den elde edilen trombosit hücreleri, otomatik tam kan sayım cihazı ile sayıldı (Şekil 9). PRP'den elde edilen trombosit sayısı, tam kandan elde edilenden 4 kat fazla bulundu. Trombosit aktivasyonu için, PRP içeren buffy-coat kısmı, %10 CaCl içerisinde 100 U/ml trombin ile 1/0.15 oranında karıştırıldı.

Tablo 5. PRP hazırlamak için 5 sıçandan alınan tam kan ve PRP'de Trombosit sayım sonuçları ($\times 10^3/\mu\text{l}$)

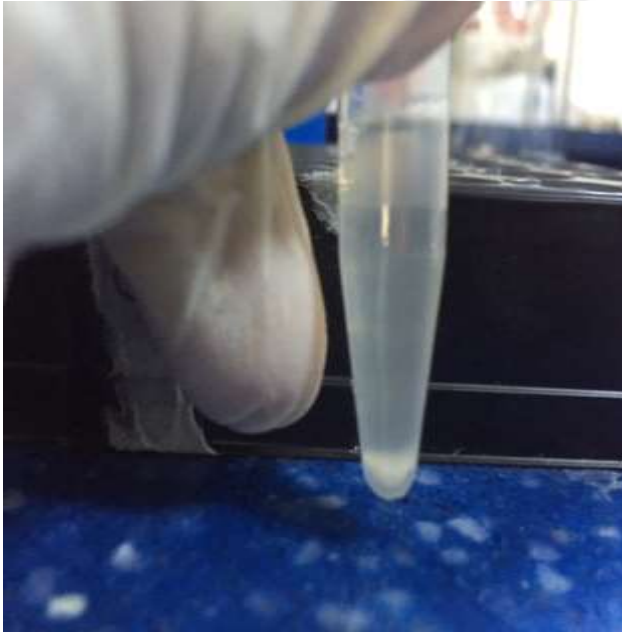
	1.sıçan	2.sıçan	3. sıçan	4. sıçan	5sıçan
Tam kan	238	225	226	225	235
PRP	989	912	1060	946	957



Şekil 6. Kan örneklerinin alımı



Şekil7. Kan örnekleri- santrifüj sonrası



Şekil 8. Trombositçe zengin plazma (PRP)



Şekil 9. Kan sayım cihazı

2.6 Çalışma Grupları

2.6.1 Hayvan Modelinin Oluşturulması

Araştırmanın örneklemini oluşturan sıçanlar, Dokuz Eylül Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Her biri yaklaşık 200 g (\pm 20 gr) olan Wistar Albino cinsi 24 adet sıçan, denek olarak kullanıldı. Cinsiyetler arası farkın ortadan kaldırılabilmesi amacıyla sadece erkek sıçanlar çalışmaya alındı. Tüm çalışma grupları standart ışık (12 saat günışığı/12 saat

karanlık) ve ısı koşullarında tutuldu (Şekil 10). Hayvanların ad libitum beslenme koşulları sağlandı.



Şekil 10. Normal kafesler



Şekil 11. STZ enjeksiyonu ile diyabetindüksiyonu

2.6.2 Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması:

Deneysel diyabet modelini oluşturmak üzere 60 mg/kg Streptozotosin (Sigma); taze ve soğuk sitrat tampon (% 3.8'lik, pH=4.5) içinde çözülerek, tek doz IP (İntra-peritoneal) olarak enjekte edildi (Şekil 11). STZ (Streptozotosin) enjeksiyonundan sonraki ilk 24 saat içinde hipoglisemi gelişimini önlemek amacıyla içme suyuna %10 glukoz eklendi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra glukometre (Accu-CHEK) ve glukoz stripleri kullanılarak kuyruktan alınan kan örneği ile hiperglisemi oluşumu belirlendi (Şekil 12) . Kan glukozu, 280 mg/dL ve üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Bütün sıçanlar için, STZ Enjeksiyondan 48 saat sonra ve en az haftada bir kez olmak üzere 6 hafta süreyle kuyruk veninden alınan kan örneklerinde kan glukoz düzeyi ölçüldü, ayrıca hayvanların vücut ağırlıkları, günlük olarak yem ve su tüketimleri ve idrar miktarı metabolik kafeslerde izlem yapılarak kaydedildi (Şekil 13).



Şekil 12. Glukometre ve glukoz stripleri



Şekil 13. Metabolik kafesler

STZ enjeksiyonundan bir ay sonra sıçanlar 4 gruba ayrıldı.

I: Tedavisiz diyabetik grup (DM).

II: Lokal PRP tedavisi alan grup (LOP).

III: Keratinosit hücre tedavisi alan diyabetik grup (KT).

IV: Keratinosit hücre tedavisi +Lokal PRP tedavisi alan diyabetik grup (KT+LOP).

2.6.3 Deneysel olarak 4 er adet ikinci derece yanık yara modeli oluşturulması

STZ enjeksiyonundan 4 hafta sonra 4 gruba ayrılan tüm sıçanların sırtlarında bilateral simetrik 4'er adet yanık yaraları oluşturuldu. Bunun için, sıçanlara önce ketamin (Alfazine /80 mg/kg IP) ve xylazin (Kepro /10 mg/kg IP) ile anestezi uygulandı. Sırt tüyleri traş edildikten sonra sıçanların sırtı % 70 etanol ve ardından steril serum fizyolojik ile temizlendi. 100°C ısılı 1 cm çaplı bakır çubuk (Şekil 14), sıçanların sırtlarına 20 sn süreyle temas ettirilerek 4 bölgede 2. derece termal yanık yaraları oluşturuldu. Yanık bölgeleri, sıçanların sırtındaki orta hattın 0.5 cm lateralde, çift taraflı ve simetrik olacak şekilde oluşturuldu. (Şekil 15).

Lokal PRP alan gruplardaki her bir deneğin oluşturulan yarasına 0.25 ml PRP lokal olarak uygulandı. Keratinosithücreleri (0.25 ml) grup III ve IV'e transfer edildi. Grup IV 'e keratinosit ve PRP uygulandı. Hücre ve PRP transferleri, deneysel yanık bölgesinde, cilt altına lokal olarak çoklu enjeksiyon yapılarak uygulandı.



Şekil 14. Bakır çubuk (100 °C'de ısıtılarak kullanıldı)



Şekil 15. Simetrik olarak oluşturulan 2.derece termal yanık yaraları



Şekil 16. Cilt altına hücre enjeksiyonu

2.7 Biyopsi Alımı

4. 7. 10. ve 14. günlerde her gruptan altı sıçanın yara bölgelerinden genel anestezi altında, sırayla sağ-üst, sağ-alt, sol-üst ve sol-alt bölgelerden kenarındaki sağlam dokuyu da içerecek şekilde biyopsi örnekleri alındı. Alınan biyopsi örneklerinin sağ yarısı total RNA izolasyonu için doğrudan RNAlater RNA stabilizasyon solüsyonu içeren eppendorf tüplere alınarak, -20 °C'da saklandı; örneklerin sol yarısı ise %10 formalin solüsyonu ile doku fiksasyonu yapılarak

saklandı. Çalışmanın 14. gününde genel anestezi altında biyopsi örnekleri ile birlikte glukoz ölçümleri için intrakardiyak kan örnekleri de alındı.

2.8 Işık Mikroskopik İnceleme

Deneklerden alınan 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 hematoksilin-eozin (H-E) boyaması yapıldı. EGF, FGF2, MCP-1, PDGF, VEGF, TGF-β1, Kollajen-1, sitokeratin-8 ve sitokeratin-14 dağılımları indirekt immunohistokimya analizi ile incelendi.

2.9 Parafin Doku Takibi

Fiksasyon ile sabitlenen doku örnekleri, örnek eldesinden sonra 1 gece boyunca sürekli akan su altında yıkandı. Dehidratasyon basamağı için her bir seride 30 dakika olacak şekilde, % 60- % 80 arası konsantrasyonu artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra %95 alkol içerisinde 1 saat süreli iki değişim ile muamele edilen örnekler, 30 dakika boyunca ksilen: alkol karışımına (1:1) ve şeffaflaştırma için 1 saatlik iki değişim, ksilene tabi tutuldu. Ksilen: Parafin (1:1) içerisinde 60° C' lik etüvde 30 dakika inkübe edilen örnekler, 1 saatlik, 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafine gömüldü (Tablo 6). Örneklerden alınan kesitler (5 µm) üzerinde, histokimyasal inceleme için hematoksilin-eozin, immunohistokimyasal inceleme için indirekt immunohistokimya boyaması yapıldı.

Tablo. 6:Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	Formalin % 10	24- 48 saat
	Akan 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	

2.10 Hematoksilen-Eozin Boyaması

Rotary Mikrotom (RM 2135, Leica) kullanılarak alınan parafin kesitler (5 µm),deparafinizasyon için 1 gece, 60°C'lik etüvde bırakıldı ve ardından, 30 dakikalık, iki değişim ksilene tabi tutuldu. Rehidratasyon basamağında, % 95- % 60 arasında azalan konsantrasyonlarda alkol serilerinden geçirilen kesitler, 5 dakika sürekli akan su ile yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk. boyanan örneklerden boyanın fazlasını uzaklaştırmak amacıyla örnekler, 5 dk. boyunca akan su ile yıkandı. Diferansiyasyon basamağında ise asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler, 5 dk. boyunca akan su ile yıkandı. Hematoksilen boyaması için örnekler, 2 dk. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile muamele edildi. Daha sonra 5 dk. boyunca akan su ile yıkanan örnekler, ilk olarak % 80 ve takibinde % 95 konsantrasyonda alkol serilerinden geçirildi. Hava ile kurutulan örnekler, şeffaflaştırma basamağında, 30 dakikalık, iki değişim ksilende tutuldu ve daha sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 7).

2.11 Yara Kapanmasının Yüzey Alanına Bağlı Hesaplanması

Yara Alanları 0., 3., 7., 10. ve 14. günde ölçüldü ve fotoğraflandı. Ölçümlerin yüzdesel hesabında aşağıdaki formül kullanıldı;

$$(Alan_1 - Alan_{t_g}) / Alan_1 \times 100\%$$

Bu formülde Alan₁ ile ifade edilen, yaranın oluşturduğu ilk gün ölçülen yara yüzey alanıdır. Alan_{t_g} ifadesinde t, tedavi sonrası alan hesaplarını ifade ederken, g ise tedavi sonrası ölçümün yapıldığı güne bağlı olarak sayısal bir ifade içerir.

Bu hesaplamalar ile tedavi günü ve tedavi şekline bağlı olarak yara alanında gözlenen iyileşme, yüzde cinsinden hesaplanarak ifade edildi (Şekil.17).

Tablo 7.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	

2.12 İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Örneklerden alınan kesitler, immunohistokimya boyaması için, bir gece boyunca 60° C etüvde inkübe edildi. Ardından, 30 dakikalık, iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, % 95 - % 60 arasında konsantrasyonu azalan alkol serilerinde rehidratasyon gerçekleştirildi. Rehidratasyon sonrası, distile su içinde 10 dakika bırakılan örnekler, Pap pen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5' lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde, standart oda ısısında, 15 dakika tutuldu. Doku endojen peroksidaz inhibisyonu için, 5 dk. H₂O₂(% 3) uygulandı. 3 kez 5 dakikalık sürelerle değiştirilen PBS tamponda yıkanan örnekler, bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile muamele edildi(10 dakika). Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve örnekler, primer anti-EGF,

anti-FGF2, anti-MCP-1, anti-PDGF, anti-VEGF, anti-TGF- β 1, anti-Kollajen-1, anti-sitokeratin-8 ve anti-sitokeratin-14 ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün, PBS ile 3 kez yıkanan örnekler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikoru (85-9043, Invitrogen) ile 30 dakika muamele edildi. Ardından üç kez 5 dakikalık PBS yıkaması yapıldı. Elde edilen immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak için diaminobenzidine (DAB, 71897, 71898, Milipore) ile 5 dk. Boyama yapıldı. Örneklerde artaalan boyaması, Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile yapıldı. Boyama sonrası distile su ile 10 dk. yıkanan kesitler, kapatma medyumunu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 8)

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

Tablo 8.İmmunoperoksidaz 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	PBS	10 dakika
Bloklama	Tripsin	15 dk (37°C)
Yıkama	PBS	3X5 dk
	%3 Hidrojen Peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Birincil Antikor Uygulaması	anti-Bax, anti-sitokrom-C, anti-kaspaz-3, anti-kaspaz-8, anti-inos, anti-enos, anti-nnos	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
İkincil antikor Uygulaması	Biotinlenmiş antimouse veya anti-rabbit	30 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
İkincil antikor Uygulaması	Streptavidin-peroksidaz uygulaması	30 dk
Kromojen	DAB	5 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dk.
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Distile su	10 dk
Dehidratasyon	Alkol (%80, %90, %100)	2 şer dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dk
Kapatma	Entellan	

2.13 Gen Ekspresyon Analizi (Real Time PCR)

Yöntem prensibi: DNA'nın çoğaltılması ile eş zamanlı artan floresan sinyalin artışının ölçülmesi ile sayısal sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresan bir sinyal veren boyalar (örneğin SYBR green) kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışının floresan miktarı ile ölçülmesidir. Ekspresyonu her hücrede aynı düzeyde olan housekeeping gen olarak çoklu gen kullanıldığında, bu genlerin Ct değerlerinin geometrik ortalaması alınarak normalizasyon yapılır.

Primer Tasarısı:

Primer dizileri Labgen firmasından satın alındı (tablo 9).

Tablo 9. Primer tasarısı için kullanılan gen dizileri ve gen fonksiyonu ile ilişkili tanımlar

Gen Adı	Gene Bank ID	Fonksiyon ile ilgili bilgiler
Rattusnorvegicus epidermal BüyümeFaktörü (Egf)	NM_012842	Wnt yolağı ile ilişkili, EGF reseptörüne bağlanır, Ca-iyonu bağlar, büyüme faktörü aktivitesi gösterir (GO)
Rattusnorvegicus transformedici büyüme faktörü, beta-1 (Tgfb1)	NM_021578	Sitokin aktivitesi, antijene bağlanma, sitokin aktivitesi, glikoprotein bağlama, serin/treonin kinaz aktivator aktivitesi (GO)
Rattusnorvegicus fibroblast büyüme faktörü 2 (Fgf2)	NM_019305	Kemoatraktan sitokin aktivitesi, fibroblast büyüme faktörü reseptörü bağlama, heparin bağlama, hücre migrasyonu, anjiyogenez
Rattusnorvegicus fibroblast büyüme faktörü 7 (Fgf7)	NM_022182	Hücre migrasyonu, anjiyogenez, kemoatraktan sitokin aktivitesi
Rattusnorvegicus fibroblast büyüme faktörü 10 (Fgf10)	NM_012951	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü bağlama, heparin bağlama, hücre migrasyonu, anjiyogenez
Rattusnorvegicus vasküler endotelial büyüme faktörü A (Vegfa)	NM_031836	Kemoatraktan, sitokin aktivitesi, büyüme faktörü aktivitesi, heparin bağlama, VEGF Reseptör bağlama (GO)
Rattusnorvegicus kemokin (Mcp11) ligandı 2 (Ccl2)	NM_031530	Kemokin aktivitesi, heparin bağlama, kemokin reseptör bağlama (GO)
Rattusnorvegicus Kollajen, tip I, alfa 2 (Col1a)	NM_053356	Ekstrasellüler matriks yapısal faktörü, SMAD bağlama, trombosit-kökenli büyüme faktörü bağlama, metal-iyonu bağlama, kan damarlarında gelişim ile ilişkili, deride morfogenez, kollajen fibril organizasyonu (GO)

Her bir grubun 3., 7., 10. ve 14. günlerdeki sonuçları ayrı olarak çalışıldı. Her bir grubun yara bölgesinden punch ile 3x3 mm² biyopsi örneği alındı. Alınan örnekler porselen havanda sıvı azot ile donduruldu ve ezildi. Ezilen doku örneği 300 µl lizis buffer ile karıştırılarak ependorf tüpe alındı. 12000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın 200 µl'sinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

2.13.1 Total RNA İzolasyonu

Çalışma gruplarından elde edilen doku örneklerinden elde edilen süpernatantın 200 µl' sinden total RNA izolasyonu, MagnaPure Compact cihazında Magna Pure Compact RNA Isolation Kit maneline göre gerçekleştirildi. RNA konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile ölçüldü. RNA kalitesi A260/A280 (referans değerler 1.80 – 2.00 arasındadır) ve A260/A230 (referans değerler 2.00 – 2.20 arasındadır) oranlarına bakılarak belirlendi.

2.13.2 Real Time Online Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizi

Çalışma gruplarından elde edilen 1µg total RNA'lardan cDNA sentezi transcriptor first strand cDNA synthesis kit ile kit maneline göre gerçekleştirildi.

Diyabette yara iyileşmesi ile ilgili olduğunu belirlediğimiz sıçan EGF, VEGFa, Tgfb1, MCP1 (Ccl2), Fgf2, Fgf7,Fgf10 ve Colla2 genlerine ait gen ekspresyon analiz kiti ticari olarak satın alındı. “House-keeping” gen olarak Tbp, B2m ve Actb kullanıldı. Gen ekspresyonu 20 µl cDNA, 120 µl 2x sybr green master mix ve 120 µl bidistile su olarak hazırlandı. Mikroplaklara 10 µl PCR karışımı olacak şekilde 24 kuyucuğa yüklendi. Lightcycler 2 cihazında sybr green protokolüne göre çalışıldı. Her bir reaksiyondan elde edilen Ct değerleri $\Delta\Delta C_t$ yöntemine göre analiz edildi. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüyle ekspresyon değişim miktarları hesaplanarak gen profilleri karşılaştırıldı. Gen ekspresyon karşılaştırmalarında kontrol grubu olarak diyabetli sıçan grubu (DM) alındı. İstatistiksel analizler Mann-Whitney U ile gerçekleştirildi. p değeri <0,05 anlamlı olarak alındı.

2.14 Verilerin Analizi

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS 18 paket programı ile değerlendirilmiştir. İkili gruplarda değişkenlerde t-testi ve gruplar arası farklılık için One-Way ANOVA ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

3. Bulgular

3.1 Deney Hayvanlarında Diyabet Belirteçlerinin İzlenmesi

Tüm sıçanlar polidipsi, poliüri ve kilo kaybı gibi diyabet belirtileri açısından gözlemlendi. STZ injeksiyonunun 48. saatinde yapılan kan glukoz düzeyi ölçümünde tüm sıçanların kan glukoz düzeylerinin ≥ 280 mg/dL olduğu bulundu ve diyabet oluşumu teyit edildi. Ayrıca STZ enjeksiyonu ile diyabet indüksiyonu yapıldıktan sonra 4 hafta boyunca sıçanlar diyabet belirteçleri açısından izlendi. Deney hayvanlarının diyabet indüksiyonu sonrası dönemde 4 hafta boyunca, kan glukoz düzeyleri, yem tüketimi, su tüketimi idrar miktarı ve vücut ağırlığı ölçümleri haftalık izleme kayıt altına alındı.

Tablo 10. Diyabetik sıçanlarda kan glukozu değerlerinin zamana göre değişimi

Ölçüm zamanı	Kan Glukozu(mg/dl)
Diyabet indüksiyonundan 2 gün önce (kontrol)	120.52
Diyabet indüksiyonu sonrası 1. Haftada	446.23*
Diyabet indüksiyonu sonrası 2. Haftada	434.13*
Diyabet indüksiyonu sonrası 3. Haftada	417.51*
Diyabet indüksiyonu sonrası 4. Haftada	394.07*

* Diyabet indüksiyonu sonrası 1-4. haftalardaki izlemlerde diyabet indüksiyonundan önceki kontrol değerine göre Kan Glukozu değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p < 0.05$).

Tablo-10'da diyabetik sıçanlarda kan glukoz değerlerinin zamana bağlı değişimi gösterildi. Kontrol (Diyabetik yapmadan önce ölçülen kan glukoz değeri) ile diyabetik hayvanların 1., 2., 3. ve 4. haftada ölçülen kan glukozu değerleri arasında anlamlı farklılık görülmektedir ($P < 0.05$).

Tablo 11. Diyabetik sıçanlarda vücut ağırlığının zamana göre değişimi

Ölçüm zamanı	Ağırlık (gr)
Diyabet indüksiyonundan 2 gün önce (kontrol)	233.5333
Diyabet indüksiyonu sonrası 1. Haftada	227.0333*
Diyabet indüksiyonu sonrası 2. Haftada	220.1667*
Diyabet indüksiyonu sonrası 3. Haftada	211.4667*
Diyabet indüksiyonu sonrası 4. Haftada	206.6071*

*Kontrol grubuna göre diyabet indüksiyonu sonrası vücut ağırlığı değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur. Normal sıçanlarda beklenen kilo artışı olmayıp, aksine diyabetik sıçanlarda ilerleyen zamanda kilo azalması bile gözlenmiştir.

Tablo-11’de Vücut ağırlığının zamana göre değişimi görülmektedir. Kontrol (Diyabetik yapmadan önce ölçülen Vücut ağırlığının değeri) ile diyabetik hayvanların 1., 2., 3. ve 4. haftada ölçülen ağırlık değerleri arasında anlamlı farklılık görülmektedir (**P<0.05**). Bu verilere göre, Diyabetik hayvanlarda STZ (streptozotosin) enjeksiyonunu takiben vücut ağırlığında azalma olduğu görülmektedir. Bu veriler ışığında, deney gruplarındaki tüm diyabetik hayvanlarda, diyabet belirtilerinden biri olan kilo kaybının olduğu gösterilmiştir.

Tablo 12. Diyabetik sıçanlarda günlük yem tüketiminin zamana göre değişimi

Ölçüm Zamanı	Yem Tüketimi (gr)
Diyabet indüksiyonundan 2 gün önce (kontrol)	18.06
Diyabet indüksiyonu sonrası 1. Haftada	48.11*
Diyabet indüksiyonu sonrası 2. Haftada	43.19*
Diyabet indüksiyonu sonrası 3. Haftada	44.51*
Diyabet indüksiyonu sonrası 4. Haftada	44.63*

* Diyabet indüksiyonu sonrası yem tüketimi değerlerinde Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı artış vardır.

Tablo-12’de Diyabetik hayvanlarda, günlük ortalama yem tüketiminin zamana göre değişimi görülmektedir. Kontrol (Diyabetik yapmadan önce ölçülen yem tüketiminin değeri) ile diyabetik hayvanların 1., 2., 3. ve 4. haftalarda ölçülen yem tüketimi değerleri arasında anlamlı farklılık görülmektedir (**P<0.05**). Kontrol

değerlerine göre ortalama yem tüketimi değerleri, 1., 2., 3. ve 4. haftalarda istatistiksel olarak artmıştır. Bu verilere göre, STZ (streptozotosin) enjeksiyonu sonrasında diyabet belirtilerinden biri olan polifajinin ortaya çıkışı ve devamlılığının sağlandığı gözlemlendi. Diyabetik modellerin, tüm deney boyunca aynı koşullarda tutulduğu göz önüne alındığında, yem tüketimindeki bu artışın “diyabet” durumunun devamlılığı ile paralellik gösterdiği düşünüldü.

Tablo 13. Diyabetik sıçanlarda günlük ortalama su tüketiminin zamana göre değişimi

Ölçüm Zamanı	Su Tüketimi (ml)
Diyabet indüksiyonundan 2 gün önce (kontrol)	32.51
Diyabet indüksiyonu sonrası 1. Haftada	52.98*
Diyabet indüksiyonu sonrası 2. Haftada	53.72*
Diyabet indüksiyonu sonrası 3. Haftada	53.89*
Diyabet indüksiyonu sonrası 4. Haftada	51.97*

* Diyabet indüksiyonu sonrası ilerleyen haftalarda su tüketimi değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlenmektedir.

Tablo 13’de diyabetik hayvanlarda günlük ortalama su tüketiminin zamana bağlı değişimi görülmektedir. Kontrol ile diyabetik hayvanların 1., 2., 3. ve 4. haftada ölçülen ortalama su tüketimlerinin arasında anlamlı farklılık görülmektedir ($P<0.05$).

Tablo 14. Diyabetik sıçanlarda günlük idrar miktarının zamana göre değişimi

Ölçüm Zamanı	İdrar miktarı (ml)
Diyabet indüksiyonundan 2 gün önce (kontrol)	14.87
Diyabet indüksiyonu sonrası 1. Haftada	22.01*
Diyabet indüksiyonu sonrası 2. Haftada	24.13*
Diyabet indüksiyonu sonrası 3. Haftada	25.32*
Diyabet indüksiyonu sonrası 4. Haftada	25.12*

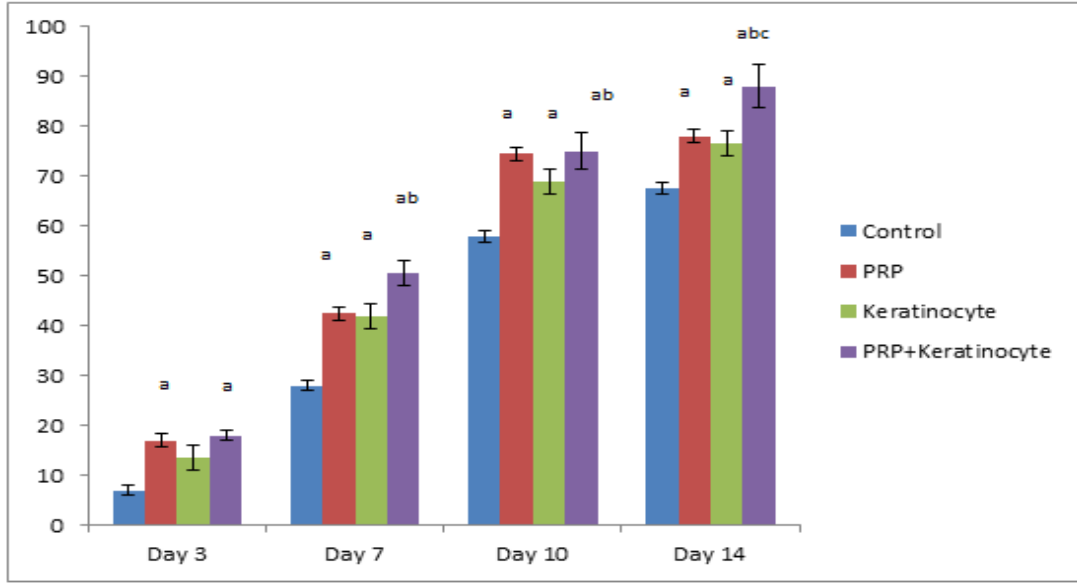
* Diyabet indüksiyonu sonrası ortalama günlük idrar miktarı değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlenmektedir.

Tablo-14’de diyabetik hayvanlarda, günlük ortalama idrar miktarının zamana bağlı değişimi görülmektedir. Kontrol ile diyabetik hayvanların 1., 2., 3. ve 4. haftada ölçülen idrar miktarları arasında anlamlı farklılık görülmektedir (**P<0.05**). Ortalama idrar miktarı, 1.,2., 3. ve 4. haftalarda kontrole göre anlamlı derecede artmıştır. Bu bilgiler ışığında, STZ enjeksiyonu sonrasında diyabet grubunda diyabet belirteçlerinden biri olan poliürinin oluşumu görülmektedir. Poliüri oluşumu ve devamlılığı, “diyabet” durumunun hayvan modellerinde sağlandığını gösteren bir diğer parametredir.

3.2 Yara İyileşmesinin İzlem sonuçları

Yara küçülmesi, iki hafta içinde tüm gruplarda gözlenebilir duruma gelmiştir. Ancak yara küçülmesinin oranı açısından zamana ve yapılan uygulamalara bağlı farklılıklar da oluşmuştur. Keratinosit uygulaması ile gözlenen yara küçülme oranı %77 ve PRP enjeksiyonu sonrası gözlenen yara küçülme oranı %79 dir. Bu oranlama orijinal yara boyutunun yüzey alanı esas alınarak yapılmıştır. Keratinosit ve PRP enjeksiyonunun beraber yapıldığı grupta ise ikinci hafta sonunda yara küçülme oranı %88 iken aynı zaman sonunda kontrol grupta gözlenen yara küçülme oranı %67.5 olmuştur. Kombine uygulamanın yapıldığı bu grupta gözlenen yara küçülmesi, kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha iyi gerçekleşmiş, aynı zamanda bu grupta gözlenen küçülme, diğer uygulama gruplarına kıyasla da daha iyi olmuştur. Gruplar

arasındaki bu değerlendirme, ikinci haftanın sonunda yüzey alanındaki değişimlerin yüzde cinsinden farklılıklarında da açıkça ortaya konmuştur (Şekil 17 ve 18).























Şekil 17. Yara boyutunda zaman ve tedaviye bağlı küçülme oranı

a Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı artış var.

b Keratinosit uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı artış var.

c PRP uygulanan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı artış var.

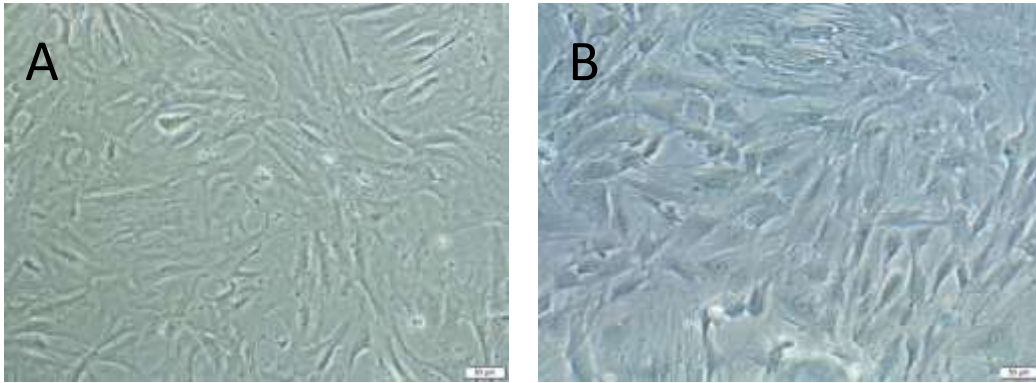
Groups	0.gün kontrol	3.gün	7.gün	10.gün	14.gün
DM					
LOP					
KT					
KT+LOP					

Şekil 18. PRP ve keratinosit uygulaması sonrası yanık yaralarının iyileşmesinin makroskobik izlemi tedavisiz diyabetik grup (DM). Lokal PRP tedavisi alan diyabetik grup (LOP). Keratinosit hücre tedavisi alan diyabetik grup (KT). Keratinosit hücre tedavisi + Lokal PRP tedavisi alan diyabetik grup (KT+LOP).

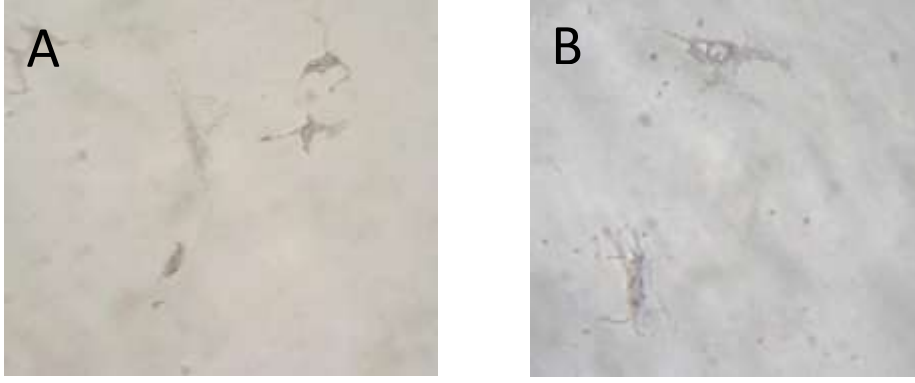
3.3 Hücre Kültürü Sonuçları

3.3.1 Adipojenik Kök Hücrelerden Elde Edilen Keratinosit Hücrelerinin Tanımlanması

Kültürün 1. ve 2. haftasında yapılan analizler sonrasında adipojenik kök hücrelerin fuziform yapıdan (Şekil 19 A) epiteloid yapıya dönüştükleri (Şekil 19 B) ve sayısının da kültürün 2. Haftasında daha fazla olduğu izlendi. Farklılaştırılan hücrelerin tanımlanması için kültürün 2. Haftasında hücreler toplanarak bir grup hücre immunohistokimyasal analiz için 24 gözlü kültür kaplarına kondu. Diğer hücreler ise transfer için kullanılmak üzere belirlenen matriderm üzerine pasajlanarak kültüre edildi. Hücrelerin karakterizasyonu için erken dönem keratinosit farklılaşma belirteci sitokeratin-8 ve geç dönem farklılaşma belirteci sitokeratin-14'ün immunoreaktiviteleri belirlendi. Her ikisinin de pozitif olduğu, fakat sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin sitokeratin-14'e oranla daha fazla şiddette boyandığı izlendi. (Şekil 20). Adipojenik kök hücrelerden kültür ortamında BMP ilavesi ile keratinositlere farklılaşmanın sağlandığı gözlemlendi. Özellikle erken dönem farklılaşma belirteci olan keratinosit-8 immunoreaktivitesinin daha fazla olması, hücrelerin keratinosit benzeri hücreler olduğunu destekledi.



Şekil 19. Adipojenik kök hücre kültürü (A) ve keratinositlere farklılaştırılması (B).



Şekil 20. Farklılaştırılan keratinositlerde sitokeratin-8 (A) ve sitokeratin-14 (B) boyamaları.

3.4 Histolojik Sonuçlar

Çalışma gruplarının Hematoksilen-Eozin boyaması sonrasında keratinosit uygulanan grupta, yara yerinde 3. günde epitelizasyonun başladığı, fakat yara yeri krutunun halen olduğu tespit edildi. Keratinosit uygulamasından sonraki 7. günde epitelizasyonun arttığı, yara yerinin küçüldüğü fakat krut yapısının devam ettiği, fakat 3. güne nazaran nispeten küçüldüğü görüldü. 10.günde ise kearatinosit uygulaması ile yara yerinin epitelizasyonunun gerçekleştiği alttaki bağ dokusunda normale benzer şekilde PNL infiltrasyonunun azaldığı izlendi. 14. günde ise yara yerinin tamamen kapandığı, epitelin devam ettiği bağ dokusunda fibrozisin olmadığı ve epitel altı bağ dokusu (retiküler ve papiller dermis)'nin normal yapıda olduğu saptandı.

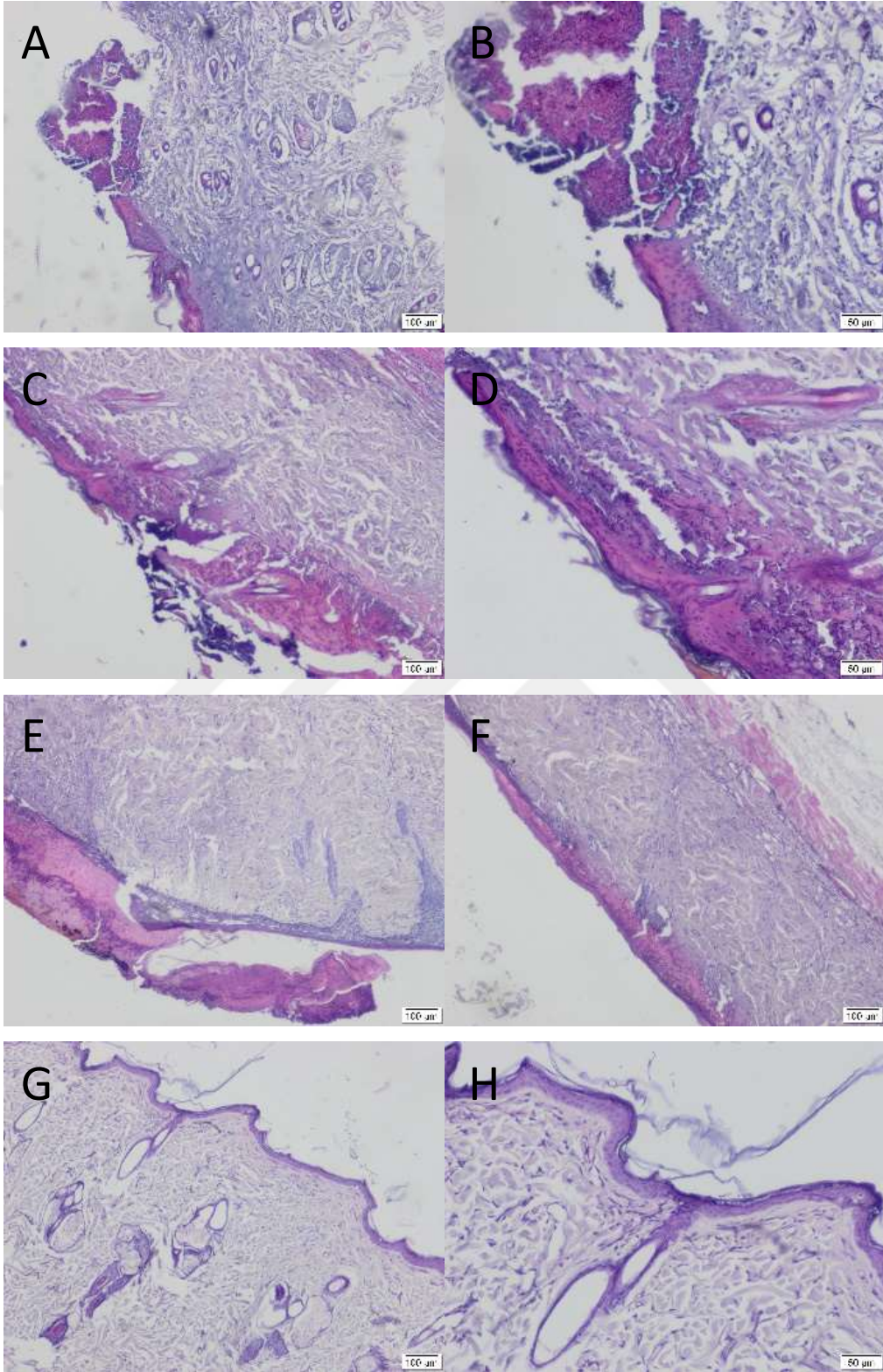
PRP uygulanan grupta ise yara yerinin tamamen açık olduğu, epitelizasyonun başlamadığı, yara yeri kenarlarında sağlam epitel dokusunun olduğu gözlenir iken, epitel altında bağ dokusu içerisinde çok sayıda PNL hücresinin olduğu izlendi. 7. Günde PRP tedavisi sonrasında epitelizasyonun başladığı fakat tamamen tamamlanmadığı, yara yerinin halen açık olduğu saptandı. 10. günde ise yara yerinin kapandığı, kurutun devam ettiği ve ayrıca alttaki bağ dokusundaki PNL hücrelerinin azaldığı izlendi. 14. günde ise yara yerinin tamamen kapandığı fakat epitelizasyonun keratinosit grubuna göre daha ince olduğu bağ dokusunun da normale benzer olduğu gözlemlendi.

Keratinosit+PRP uygulanan grupta ise epitelizasyonun 3. günde başladığı, yara yeri üzerindeki krutun sadece keratinosit veya sadece PRP uygulanan gruba oranla daha az olduğu gözlemlendi. Bağ dokusu içerisinde PNL lerin olduğu fakat sayıca

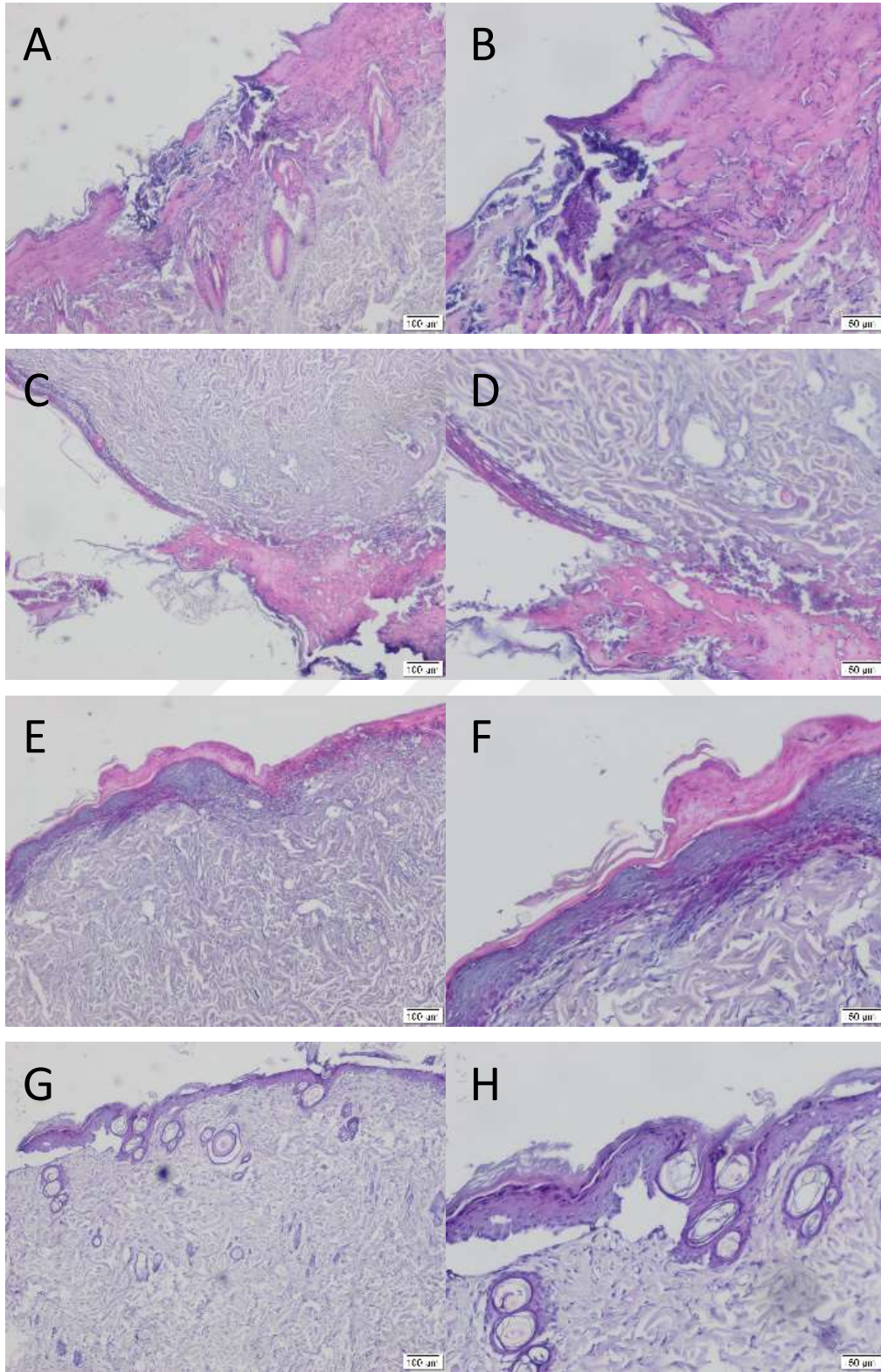
daha az olduğu saptandı. Uygulamanın 7. gününde ise epitelizasyonun tamamen tamamlandığı, krutun devam ettiği gözlemlendi. Ayrıca epitel altı bağ dokusunun normale benzer yapıda olduğu saptandı. Uygulama sonrası 10. ve 14. günlerde epitelin tamamen kapandığı ve iyileşmenin sağlandığı gözlemlendi. 14. gündeki görünüm özellikle normal epidermis ve dermis yapısına benzerdi.

Kontrol (tedavisiz diyabet) grubunda ise 3. günde yara yerinde epitelizasyonun olmadığı ve yara yeri derinliğinin de diğer gruplara nazaran daha fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca, bu bölgede PNL infiltrasyonunun fazlalığı ve krutun kalınlığı dikkat çekici idi. 7. günde ise epitelizasyonun başladığı ancak yara yeri dudaklarının etrafında sınırlı olduğu yara yeri altı derinliğinin de devam ettiği saptandı. 10. günde epitelizasyonun ilerlediği, fakat tam olarak bitmediği, epitel altı bağ dokusunda kollajen artışının olduğu izlendi. 14. günde ise iyileşmenin önceki günlere nazaran daha iyi olmasına rağmen, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha yavaş bir iyileşmenin olduğu belirlendi.

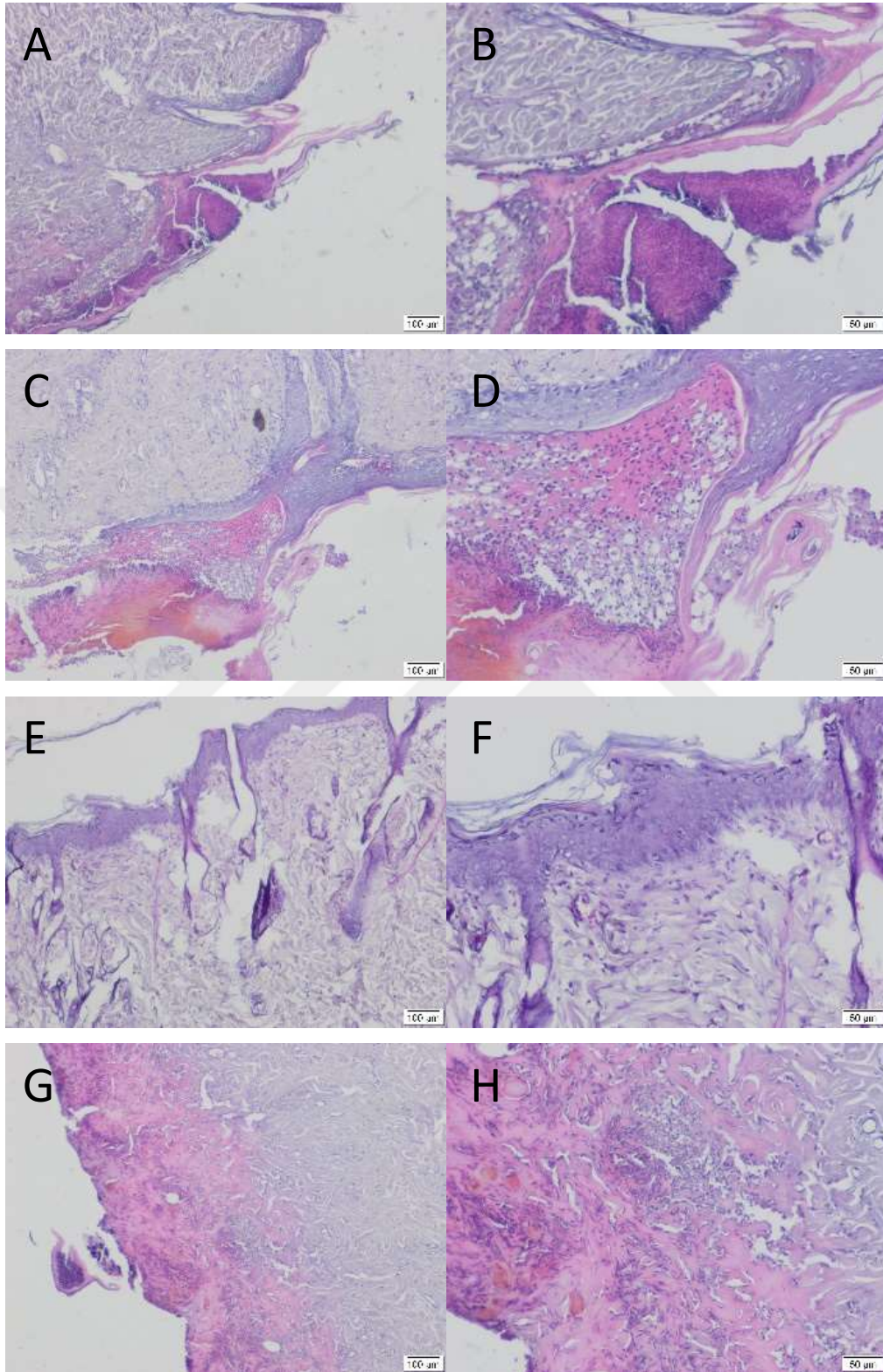
Sonuç olarak keratinosit uygulanmasının sadece PRP uygulanmasına oranla epitelizasyonu hızlandırdığı ve yara yeri iyileşmesini daha önce sağladığı sonucuna varıldı. Bununla beraber keratinosit+PRP uygulanan grupta ise iyileşmenin en fazla olduğunun görülmesi üzerine tedavi amaçlı olarak keratinosit ile birlikte PRP nin uygulanmasının yara yeri iyileşmesinde rol oynayan faktörlerin salgılanmasını tetikleyerek yara iyileşmesini daha fazla arttırabildiği düşünöldü (Şekil 21-24).



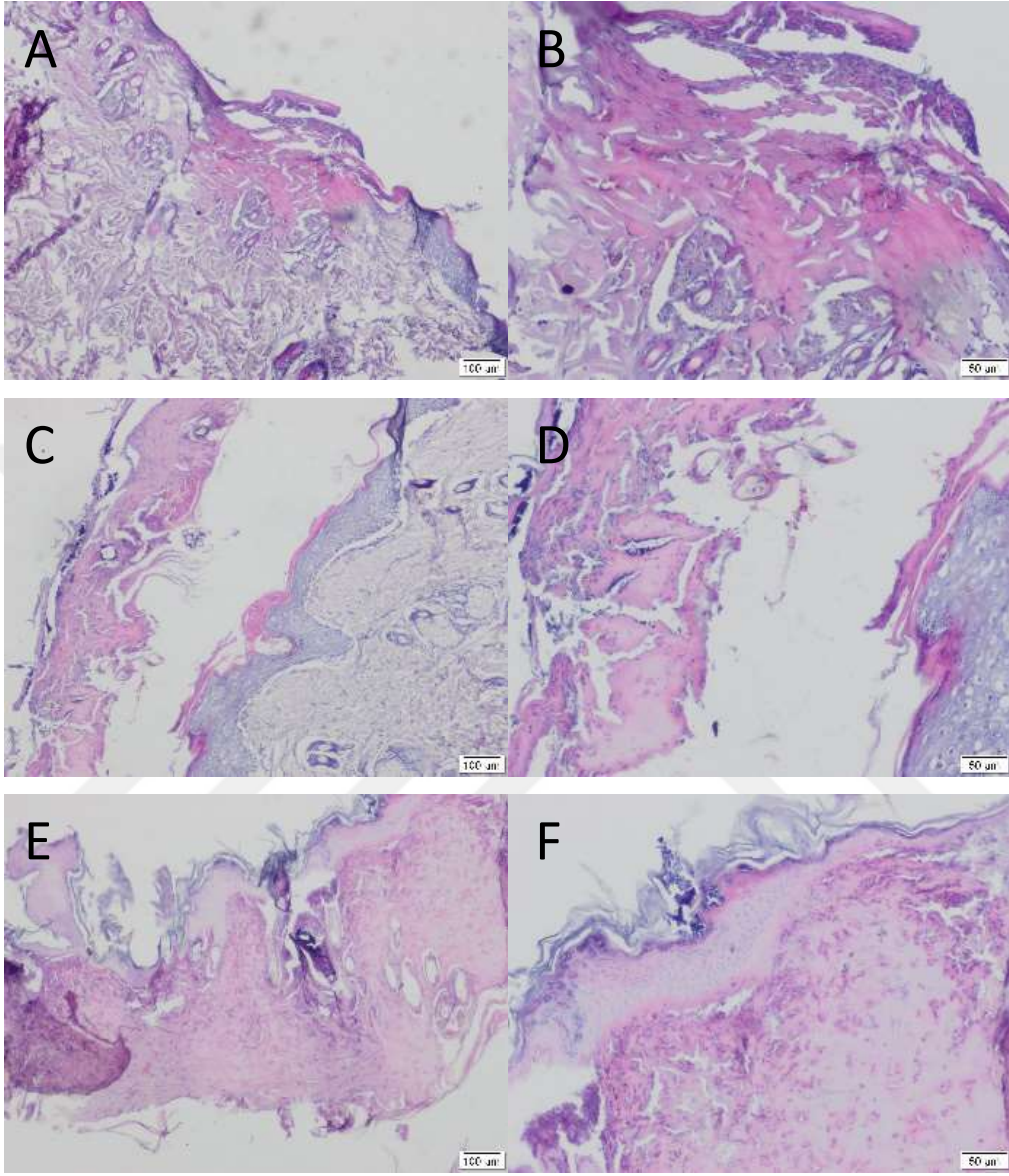
Şekil 21.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinosit uygulanan grupta, 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) günlerde alınan biyopsi örneklerinde Hematoksilen-Eozin boyamaları. A, C, E, G: 40X, B, D, F, H: 100 X



Şekil 22.PRP uygulanan grupta 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) günlerde alınan biyopsi örneklerinde Hematoksilen-Eozin boyamaları. A, C, E, G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



Şekil 23.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinosit + PRP uygulanan grupta 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) günlerde alınan biyopsi örneklerinde Hematoksilen-Eozin boyamaları. A, C, E, G: 40X, B, D, F, H: 100 X.



Şekil 24.Kontrol (tedavisiz diyabet) grubunda 3.(A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) günlerde alınan biyopsi örneklerinde Hematoksilen-Eozin boyamaları. A,C,E,G: 40x, B,D,F,H: 100 x

3.5 İmmunohistokimyasal Sonuçlar

EGF immunoreaktivitesi keratinosit uygulanan grupta tüm günlerde zayıf (+) şiddette olduğu görüldü. PRP uygulanan grupta ise EGF immunoreaktivitesi 3. günde orta şiddette (++) şiddette gözlenir iken, 7., 10. ve 14. günlerde zayıf (+) olduğu görüldü. Keratinosit+PRP uygulaması sonrasında 3. günde zayıf (+) , 7., 10. ve 14. günlerde orta şiddette (++) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise EGF immunoreaktivitesinin 3. ve 7. günde zayıf (+) şiddette iken, 10. gündelerdeyer yer zayıf (-/+) olduğu saptandı.14. gün kontrol örneklerie doku kurutlarının hala devam etmesinden dolayı boyama esnasında örneklerin dökülmesinden dolayı değerlendirilemedi (Tablo 15) (Şekil 25-28).

Tablo 15. Gruplar arası farklı günlerde EGF immunoreaktivitesi

EGF	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	+	++	+	+
7. gün	+	+	++	+
10.gün	+	+	++	-/+
14.gün	+	+	++	

FGF2 immunoreaktivitesi keratinosit uygulanan grupta 3., 10. ve 14. günlerde orta şiddette (++) ve 7.,günde yer yer kuvvetli (-/+) şiddette idi. PRP uygulanan grupta ise FGF2 immunoreaktivitesinin 3., 7. günlerde kuvvetli (+++) şiddette iken, 10. ve 14. günlerde orta (++) şiddette olduğu saptandı. Keratinosit+PRP uygulaması sonrasında ise FGF2 immunoreaktivitesinin 3. günden 14. Güne dek kuvvetli (+++) şiddette pozitif olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise FGF2 immunoreaktivitesinin 3. 7. ve 10 günlerde orta (++) şiddette pozitif olduğu saptandı. 14. gün kontrol örnekleri doku kurutlarının hala devam etmesinden dolayı boyama esnasında örneklerin dökülmesinden dolayı değerlendirilemedi (Tablo 16) (Şekil 29-32).

Tablo 16.Gruplar arası farklı günlerde FGF2 immunoreaktivitesi

FGF-2	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	++	+++	+++	++
7. gün	++/+++	+++	+++	++
10.gün	++	++	+++	++
14.gün	++	++	+++	

Kollajen-1 immunoreaktivitesi tüm grupların incelemesi sonrasında keratinosit uygulanan grupta 7. günde zayıf (+) diğer günlerde immunoreaktivite gözlenmedi. PRP uygulanan grupta 3., 7. ve 14. günlerde zayıf (+). Keratinosit+PRP uygulanan grupta 3. günde negatif (-) 7.,10. Ve 14 günlerde zayıf (+) idi. Kontrol grubunda ise 3. günde zayıf (+) olduğu izlendi ve 7., 10 . 14. günlerde negatif olduğu görüldü (Tablo 17) (Şekil 33-36).

Tablo 17. Gruplar arası farklı günlerde Kollajen-1 immunoreaktivitesi

Kollagen-1	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	-	+	-	+
7. gün	+	+	+	-
10.gün	-	-	+	-
14.gün	-	+	+	-

MCP-1 immunoreaktivitesi keratinosit uygulanan grupta 3. günde zayıf (+) ve 10. günde yer yer zayıf (-/+) şiddette iken, 7. Ve 14. günlerde boyanmaya rastlanmadı. PRP uygulanan grupta ise MCP-1 immunoreaktivitesi 7. günde zayıf (+) ve 10.günde yer yer zayıf (-/+) şiddette pozitif idi. Keratinosit+PRP uygulaması yapılan grupta ise MCP-1 immunoreaktivitesinin 3., 7. Ve 10. günlerde zayıf (+) ve 14. yer yer zayıf (-/+) şiddette olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise MCP-1 immunoreaktivitesi 3.,10. Ve 14. günde zayıf (+) şiddette iken, 7. günde yer yer zayıf (-/+) idi (Tablo 18) (Şekil 37-40).

Tablo 18. Gruplar arası farklı günlerde MCP-1 immunoreaktivitesi

MCP-1	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	+	-	+	+
7. gün	-	+	+	-/+
10.gün	-/+	-/+	-	+
14.gün	-	-	-/+	+

PDGF immunoreaktivitesi keratinosit uygulanan grupta 3., 7. ve 14. günlerde zayıf (+) şiddette iken, 10. günde orta (++) şiddette idi. PRP uygulanan grupta ise PDGF immunoreaktivitesi 3. ve 10. günlerde zayıf (+) şiddette pozitif iken, 7. günde yer yer kuvvetli (++)/+++ ve 14. günde orta (++) şiddette idi. Keratinosit+PRP uygulaması yapılan grupta ise PDGF immunoreaktivitesinin 3. Ve 7. günde zayıf (+), ve 10. günde orta (++) şiddette pozitif ve 14. günde kuvvetli (+++) olduğu izlendi. Kontrol grubunda ise PDGF immunoreaktivitesi 3. ve 7. günlerde zayıf (+) şiddette iken, 10. günde negatif (-) idi. 14. gün kontrol örnekleri doku kurutlarının hala devam etmesinden dolayı boyama esnasında örneklerin dökülmesinden dolayı değerlendirilemedi (Tablo 19) (Şekil 41-44).

Tablo 19. Gruplar arası farklı günlerde PDGF immunoreaktivitesi

PDGF	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	+	+	+	+
7. gün	+	++/+++	+	+
10.gün	++	+	++	-
14.gün	+	++	+++	

TGF-β1 immunoreaktivitesi keratinosit uygulanan grupta 3. günde zayıf (+), 7. ve 14. günlerde orta (++) şiddette iken, 10. günde yer yer kuvvetli (++)/+++ şiddette pozitif idi. PRP uygulanan grupta TGF-β1 immunoreaktivitesi 3.,7.,10 ve 14. günlerde orta (++) şiddette idi. Keratinosit+PRP uygulaması yapılan grupta ise TGF-β1 immunoreaktivitesinin 3., 10. ve 14. günlerde orta (++) , 7. günde yer yer

orat(+ /++)şiddette pozitif olduğu izlendi. Kontrol grubunda ise TGF-β1 immunoreaktivitesi 3., ve 7. günlerde zayıf (+) şiddette iken, 10. günde yer yer orta (+ /++) ve 14. gün kontrol örnekleri doku kurutlarının hala devam etmesinden dolayı boyama esnasında örneklerin dökülmesinden dolayı değerlendirilemedi (Tablo 20) (Şekil 45-48).

Tablo 20. Gruplar arası farklı günlerde TGF-β1 immunoreaktivitesi

TGF-β1	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	+	++	++	+
7. gün	++	++	+ /++	+
10.gün	++ /+++	++	++	+ /++
14.gün	++	++	++	

VEGF immunoreaktivitesi keratinosit uygulanan grupta 3.,7. ve 14. günlerde zayıf (+) şiddette iken, 10. günde yer yer orta (+ /++) şiddette pozitif idi. PRP uygulanan grupta VEGF immunoreaktivitesi 3. günde yer yer orta (+ /++), 7. günde orta (++) ve 10. ve 14. günlerde zayıf (+) şiddette pozitif idi. Keratinosit+PRP uygulaması yapılan grupta ise VEGF immunoreaktivitesinin 3.,7., 10. Ve 14 günlerde orta (++) şiddette pozitif olduğu izlendi. Kontrol grubunda ise VEGF immunoreaktivitesi 3. günde negatif (-), 7. günde zayıf (+) ve 10. günde yer yer zayıf (- /+) şiddette olduğu saptandı (Tablo 21) (Şekil 49-52).

Tablo 21. Gruplar arası farklı günlerde VEGF immunoreaktivitesi

VEGF	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	+	+ /++	++	-
7. gün	+	++	++	+
10.gün	+ /++	+	++	- /+
14.gün	+	+	++	

Keratinosit erken dönem belirteci **sitokeratin-8** ve geç dönem belirteci **sitokeratin-14** immunoreaktivitelerine bakıldığında, sitokeratin immunoreaktivitesinin keratinosit uygulanan grupta 3. Ve 7. günlerde orta (++) ve

10. ve 14. günlerde zayıf (+) şiddette pozitif görüldü. PRP uygulanan grupta sitokeratin-8 immunoreaktivitesi grupta 3. Ve 7. günlerde orta (++) ve 10. Ve 14. günlerde zayıf (+) şiddette pozitif izlendi. Keratinosit+PRP uygulanan grupta ise sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin 3. Ve 7. günlerde yer yer orta (+/++) ve 10. ve 14. günlerde zayıf (+) pozitif görüldü. Kontrol grubunda ise 3., 7. günlerde zayıf ve 10 günlerde sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin orta (++) görüldü. 14. gün değerlendirilemedi (Tablo 22) (Şekil 53-56).

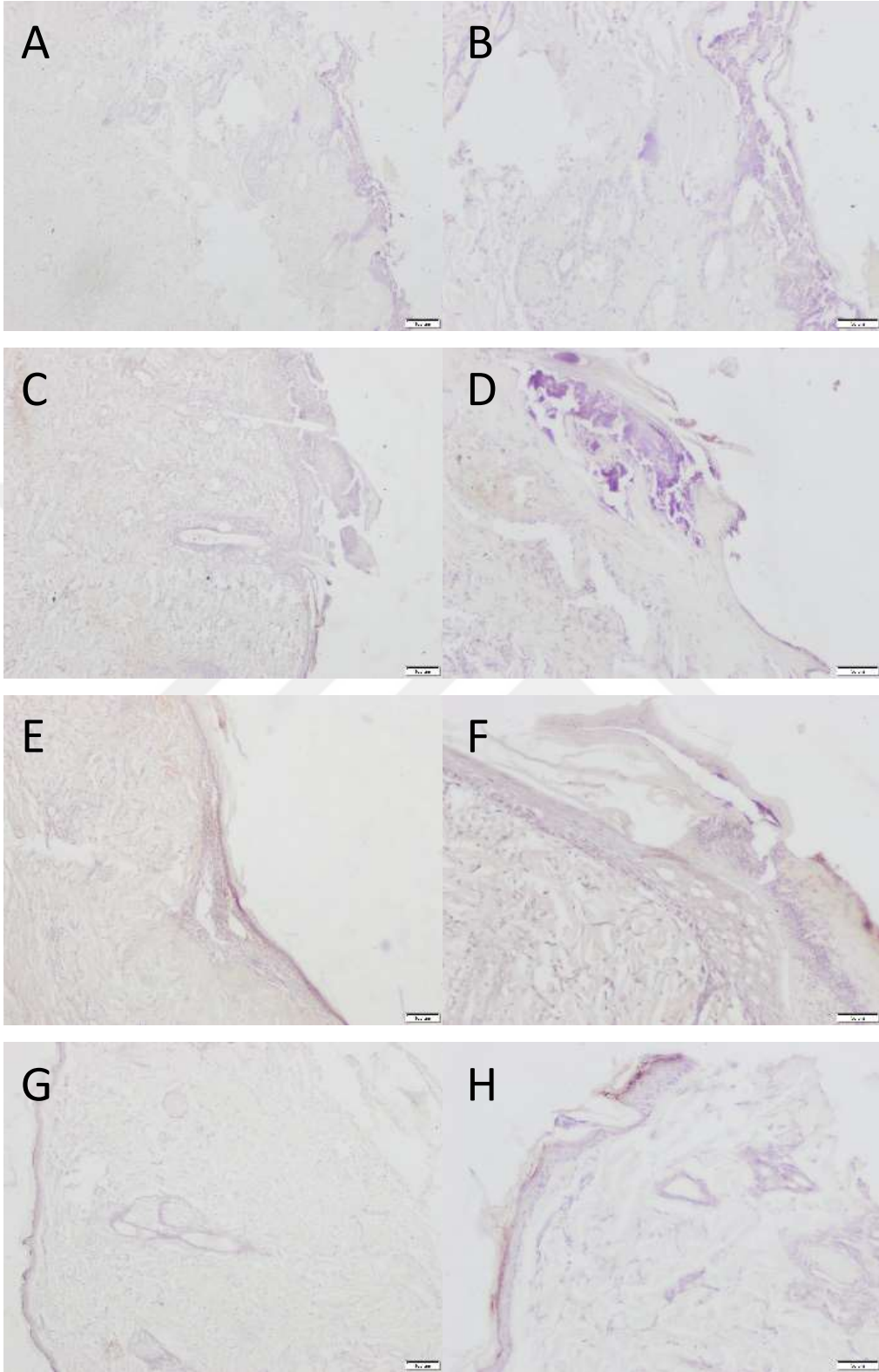
Tablo 22. Gruplar arası farklı günlerde sitokeratin-8 immunoreaktivitesi

Sitokeratin-8	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	++	++	+/++	+
7. gün	++	++	+/++	-/+
10.gün	+	+	+	++
14.gün	+	+	+	

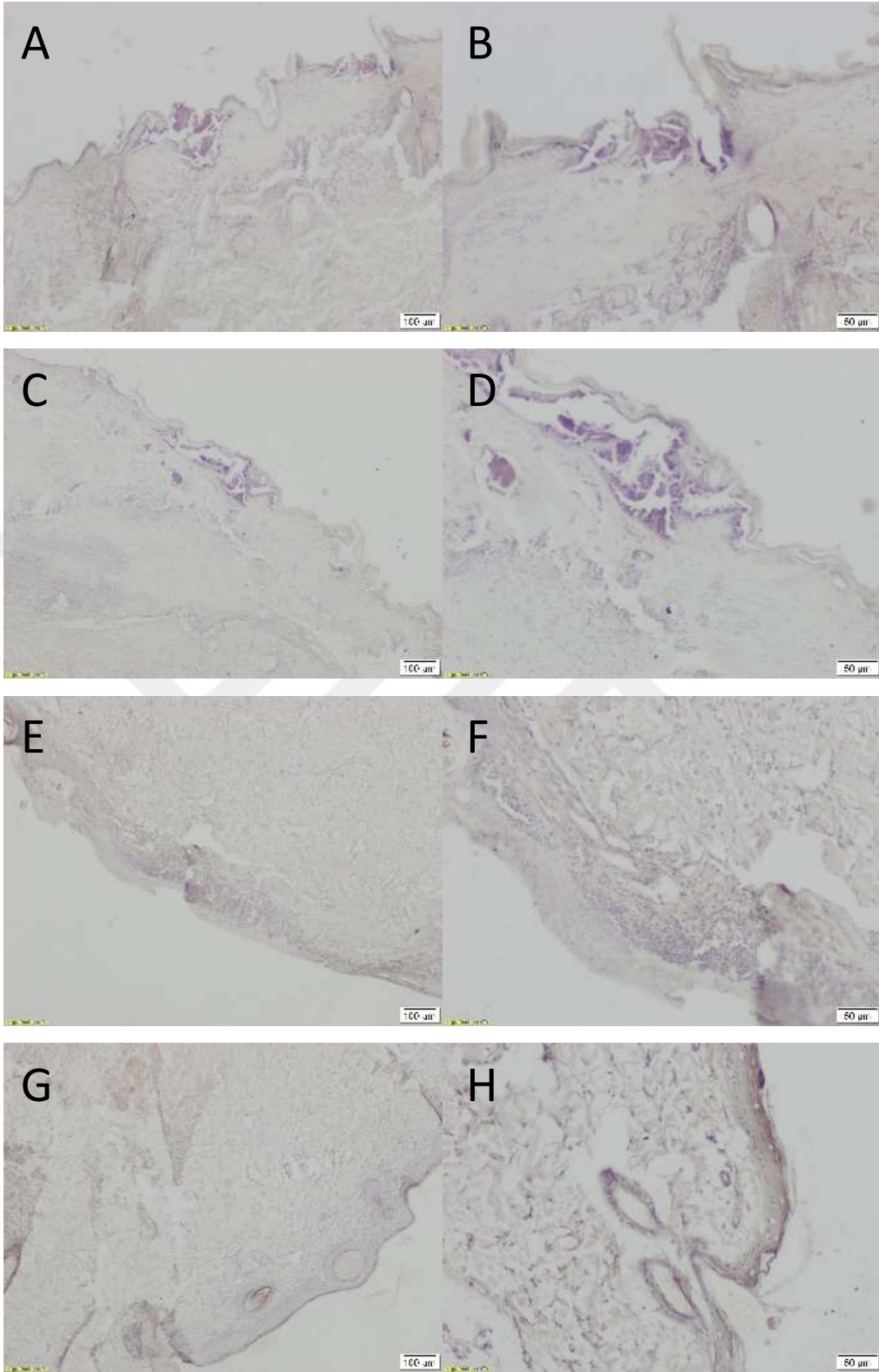
Sitokeratin-14 immunoreaktivitesi keratinosit uygulanan grupta 3.,7. ve 14. günlerde zayıf (+) şiddette pozitif ve 10. günde orta (++) idi. Bu durum transfer edilen keratinositlerin yara yerinde devamlılığını yada olgun keratinositlerin yara yerindeki devamlılığını göstermektedir. PRP uygulanan grupta sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin 3. ve 7. günlerde zayıf (+) şiddette ve 10. Ve 14. gününde ise orta (++) şiddette olduğunun görüldü. Keratinosit+PRP uygulanan grupta ise 3., 7. ve 10. günlerde sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin zayıf (+) şiddette olduğu, 14. günlerde ise orta (++) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise sitokeratin-14 immunoreaktivitesi 3. ve 7. günlerde zayıf (+) şiddette, 10. gününde ise negatif idi. 14. gün değerlendirilemedi (Tablo 23) (Şekil 57-60).

Tablo 23. Gruplar arası farklı günlerde sitokeratin-14 immunoreaktivitesi

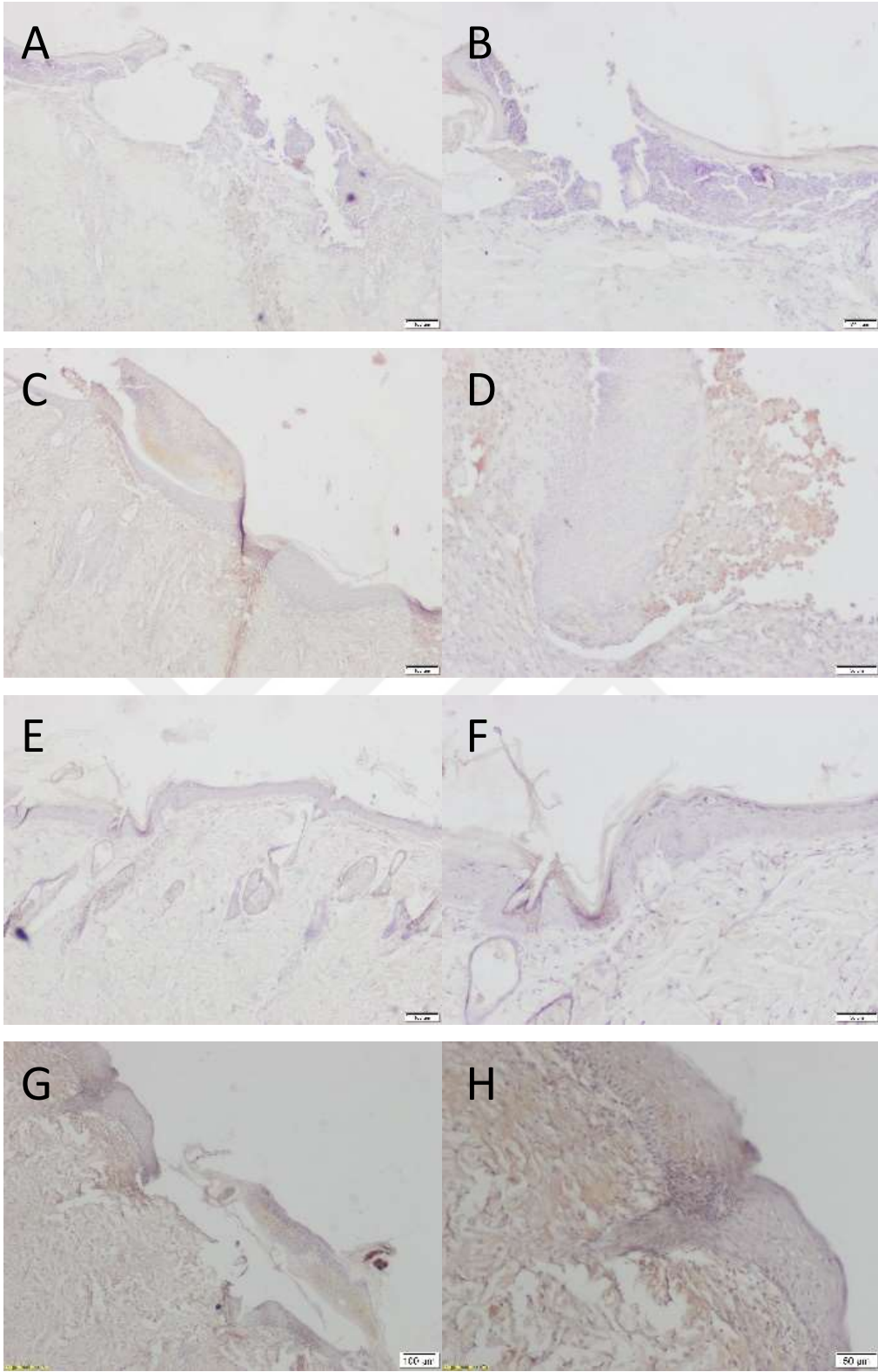
Sitokeratin-14	Keratinosit	PRP	Ker+PRP	Kontrol
3. gün	+	+	+	+
7. gün	+	+	+	+
10.gün	++	++	+	-
14.gün	+	++	++	



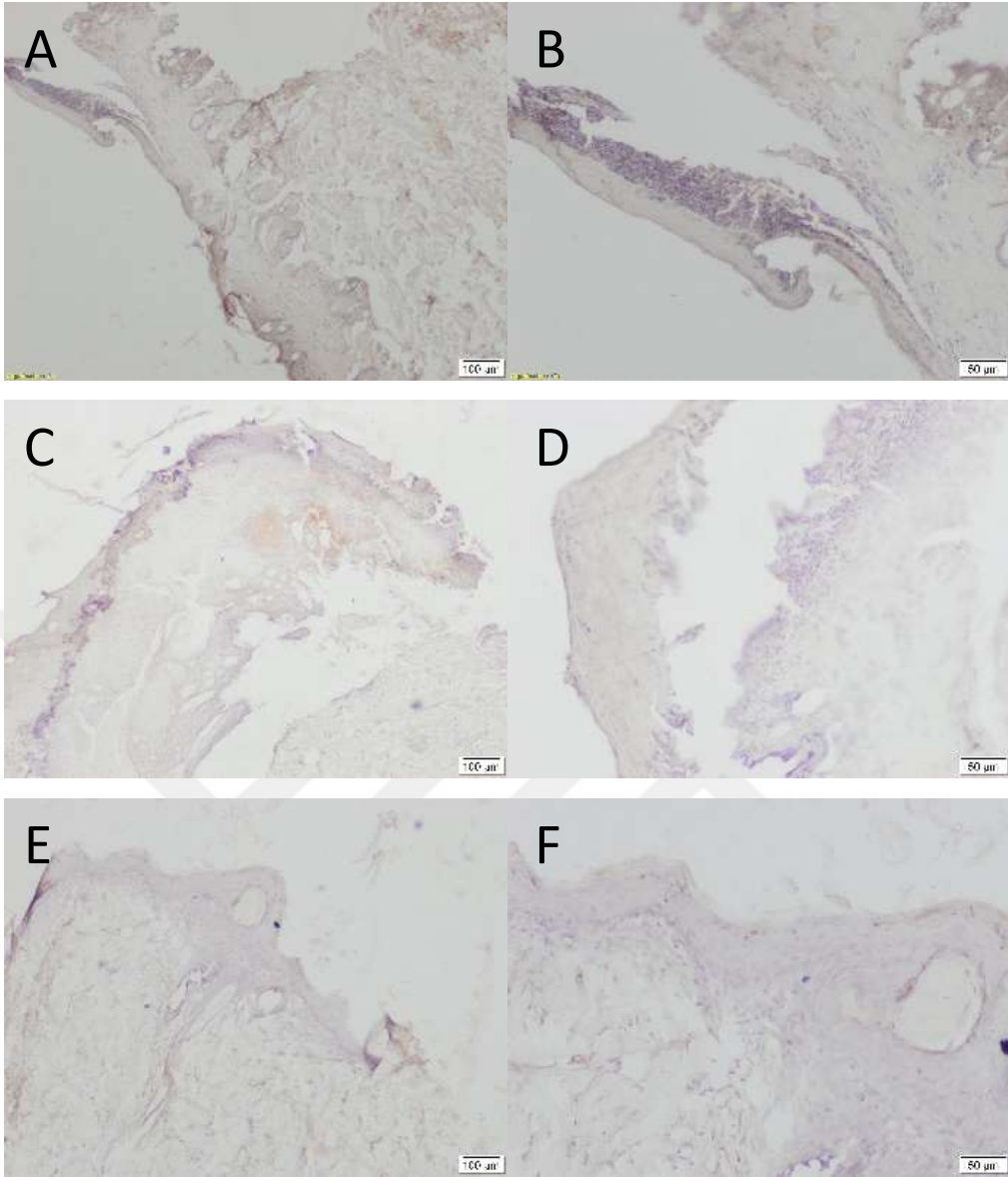
Şekil 25.Sıçan adipojenik kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinosit uygulanan grupta EGF dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A,C,E,G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



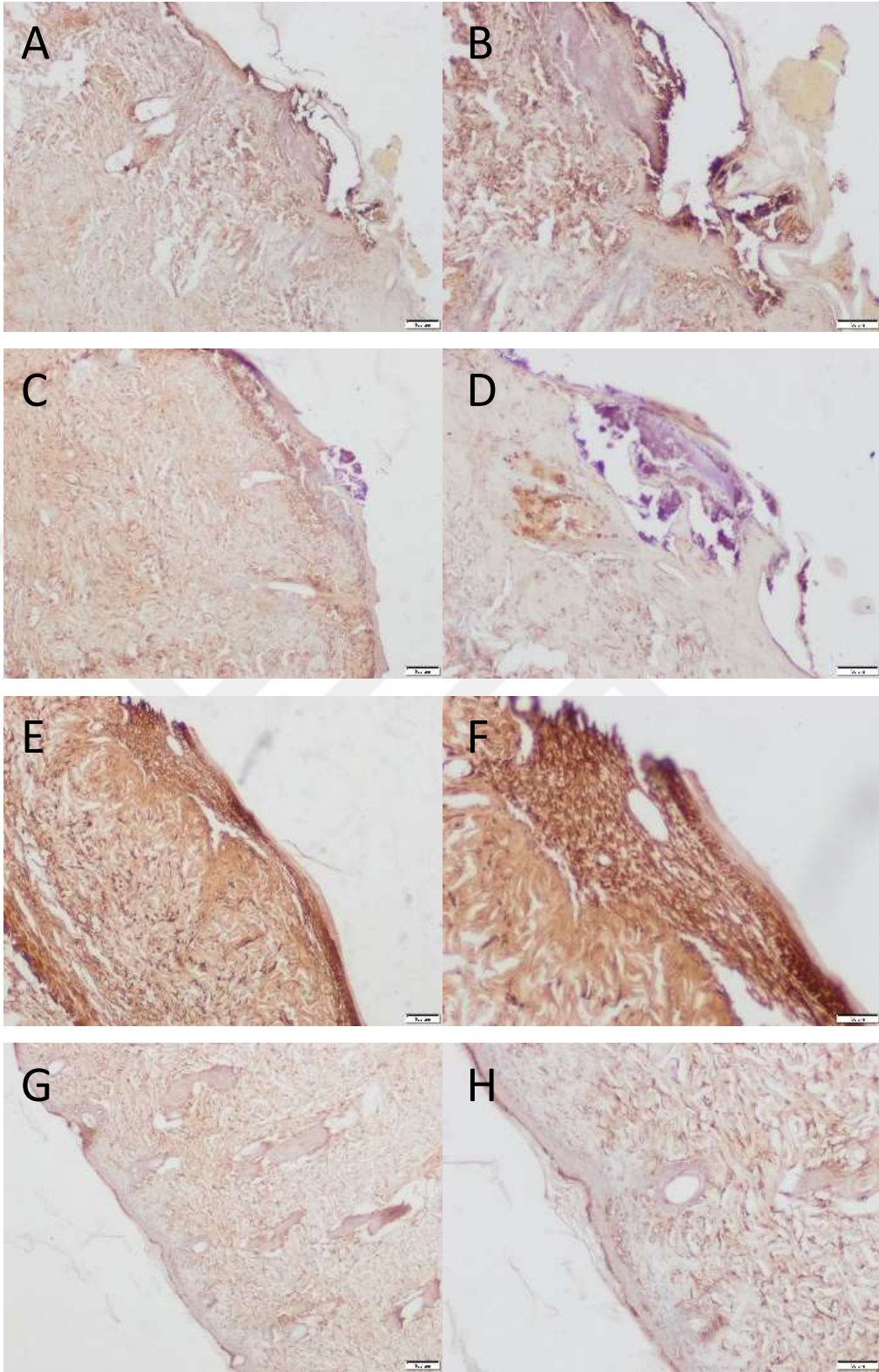
Şekil 26.PRP uygulanan grupta EGF dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A,C,E,G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



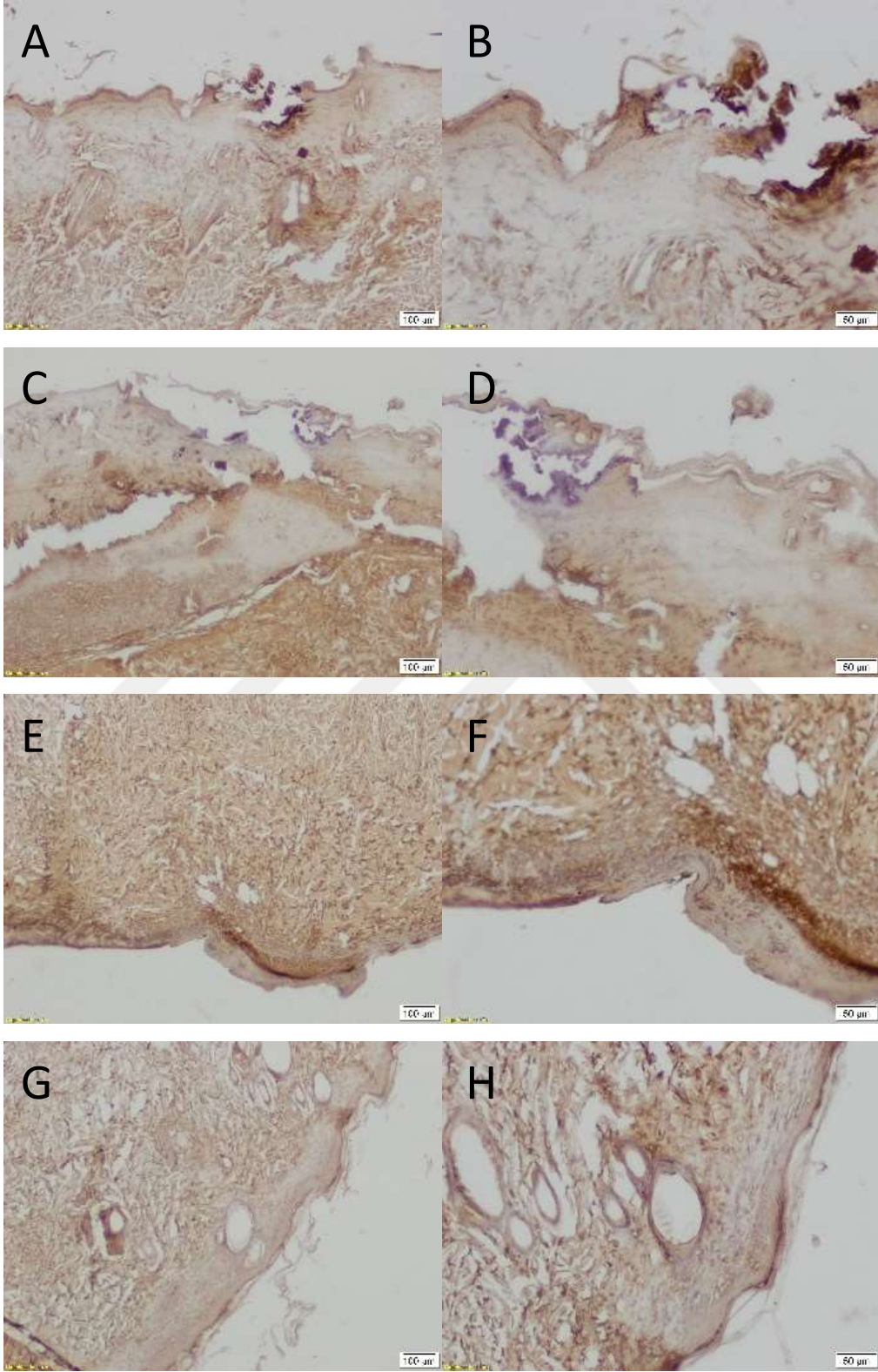
Şekil 27.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta EGF dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A,C,E,G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



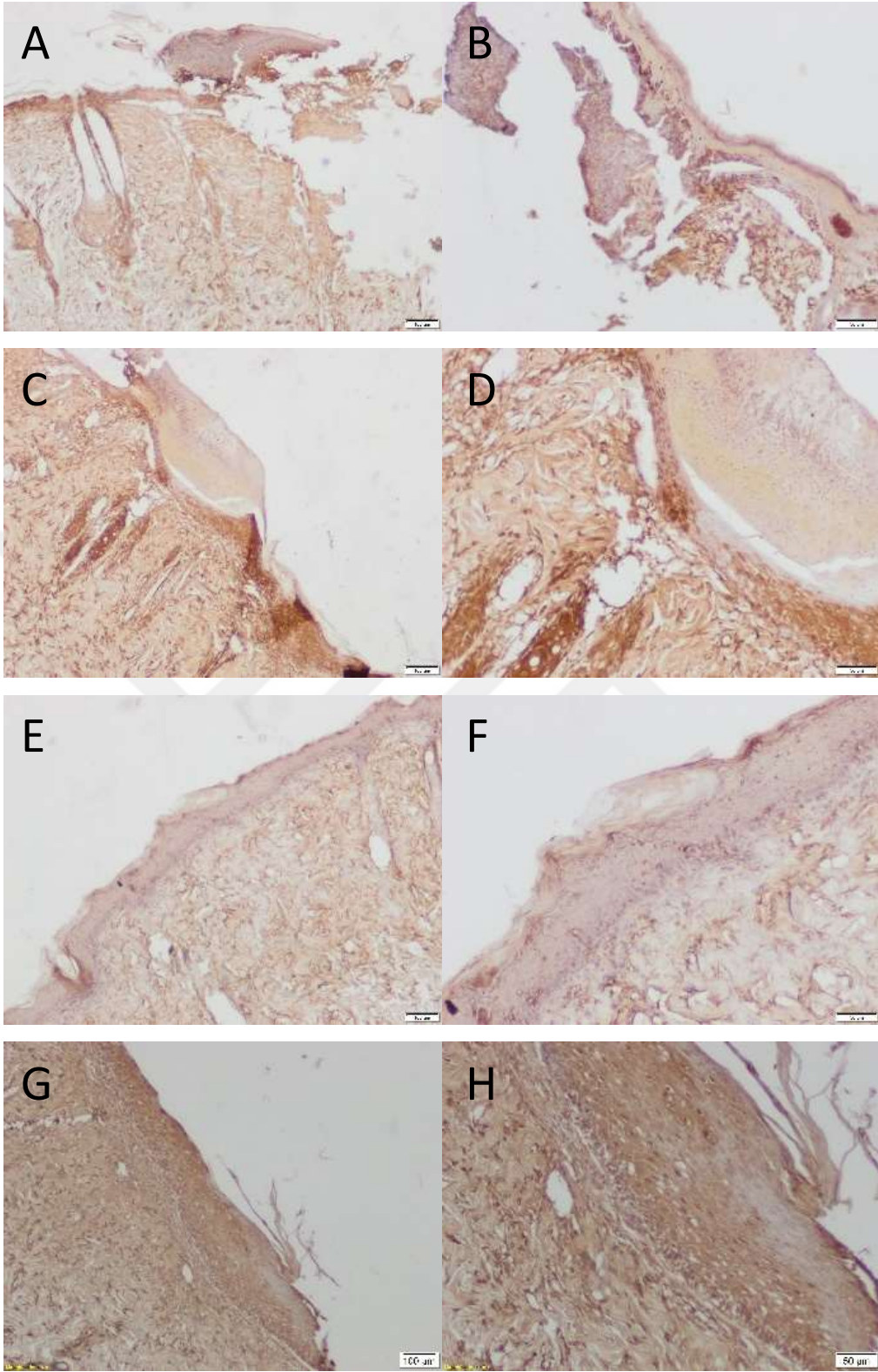
Şekil 28. Kontrol grubunda EGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C,D) ve 10. (E,F) gün boyamaları. A,C,E: 40X, B,D,F: 100 X.



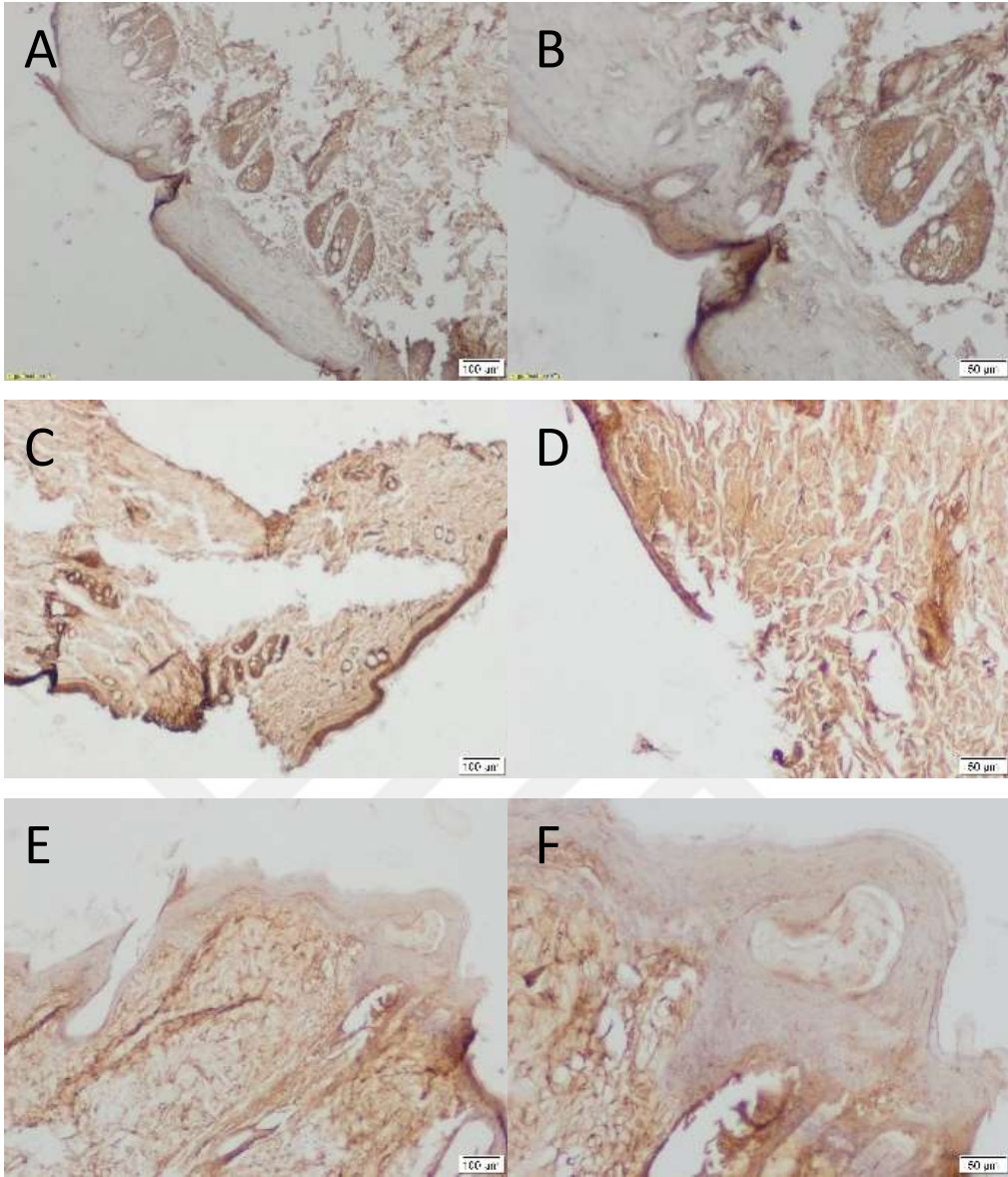
Şekil 29.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin uygulandığı grupta FGF2 dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A,C,E,G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



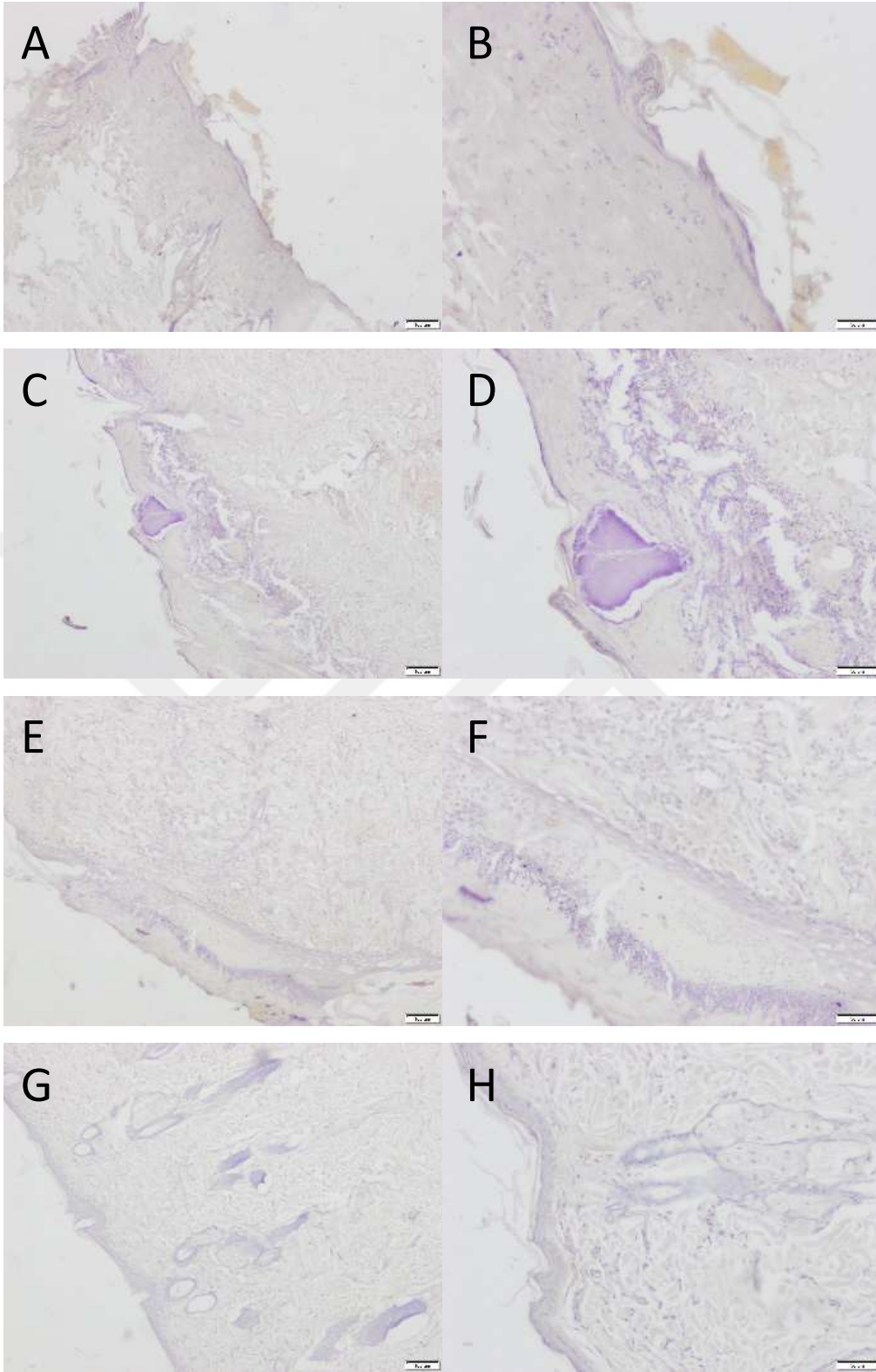
Şekil 30.PRP uygulanan grupta FGF2 dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A,C,E,G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



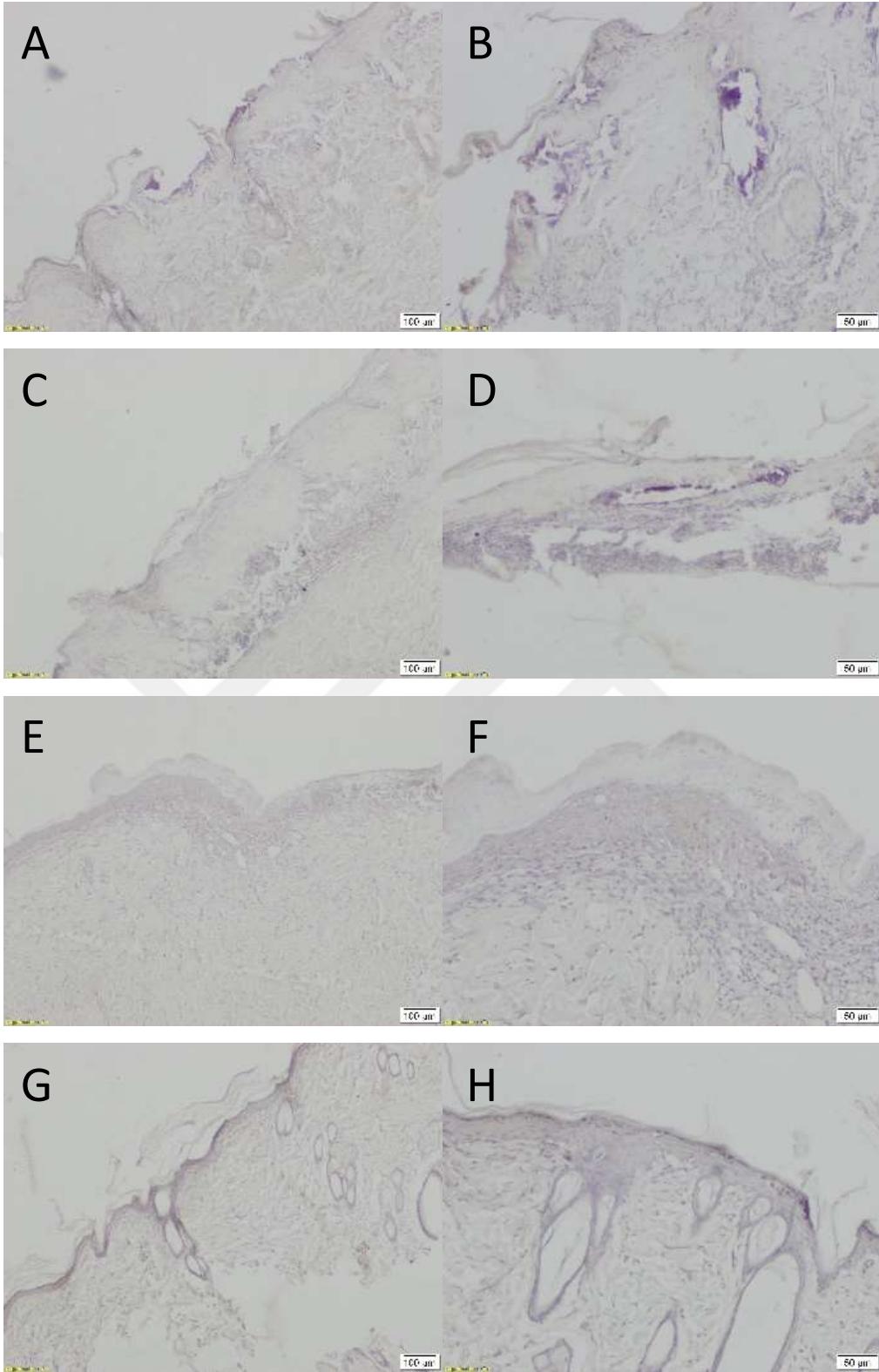
Şekil 31.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta FGF2 dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A,C,E,G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



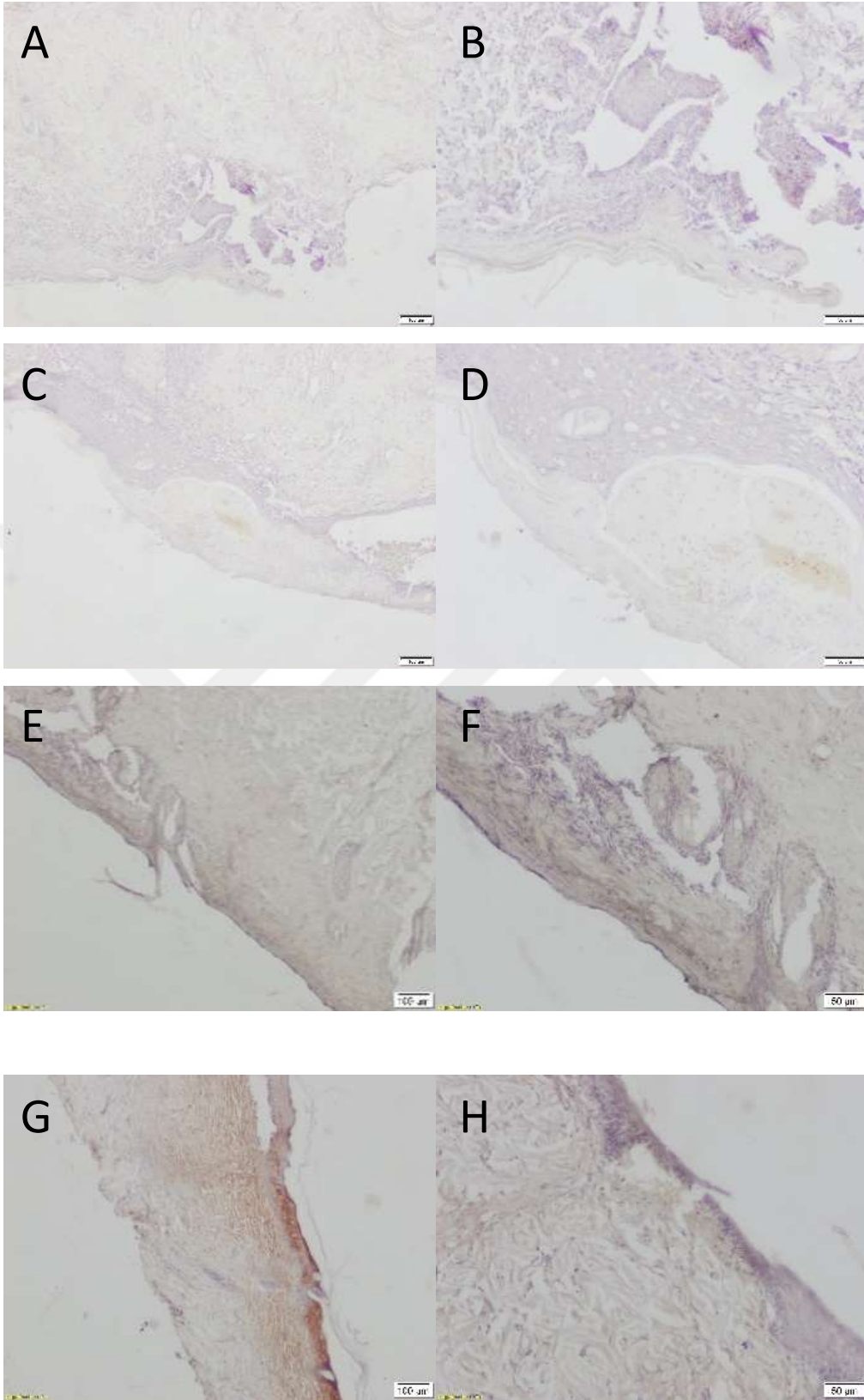
Şekil 32.Kontrol grubunda FGF2 dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D) ve 10. (E,F) gün boyamaları. A,C,E: 40X, B,D,F: 100 X.



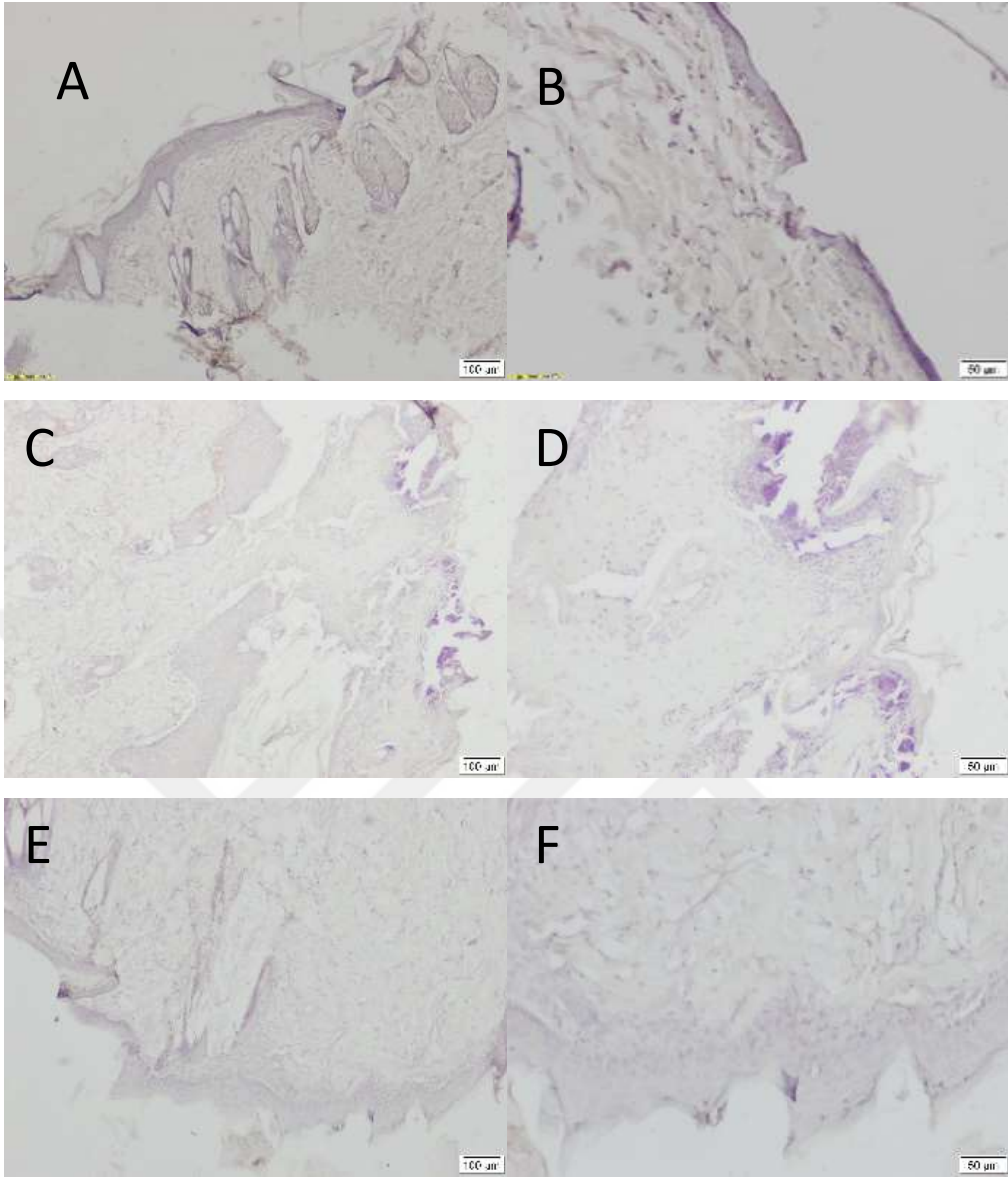
ŞEKİL 33.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin uygulandığı grupta KOLLAJEN1 dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A,C,E,G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



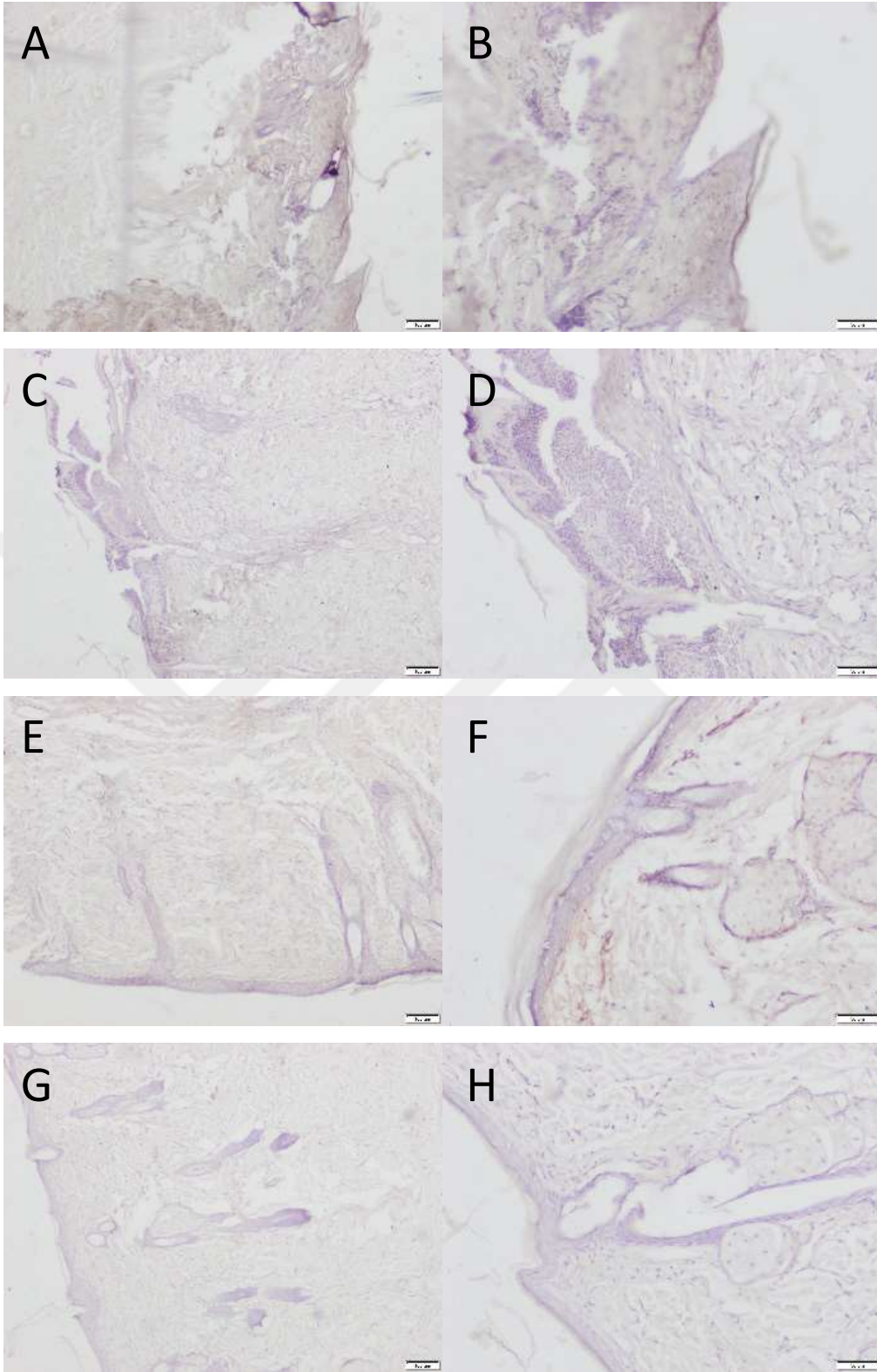
ŞEKİL 34.PRP uygulanan grupta kollajen1 (COL-1) dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40X, B,D,F,H: 100 X.



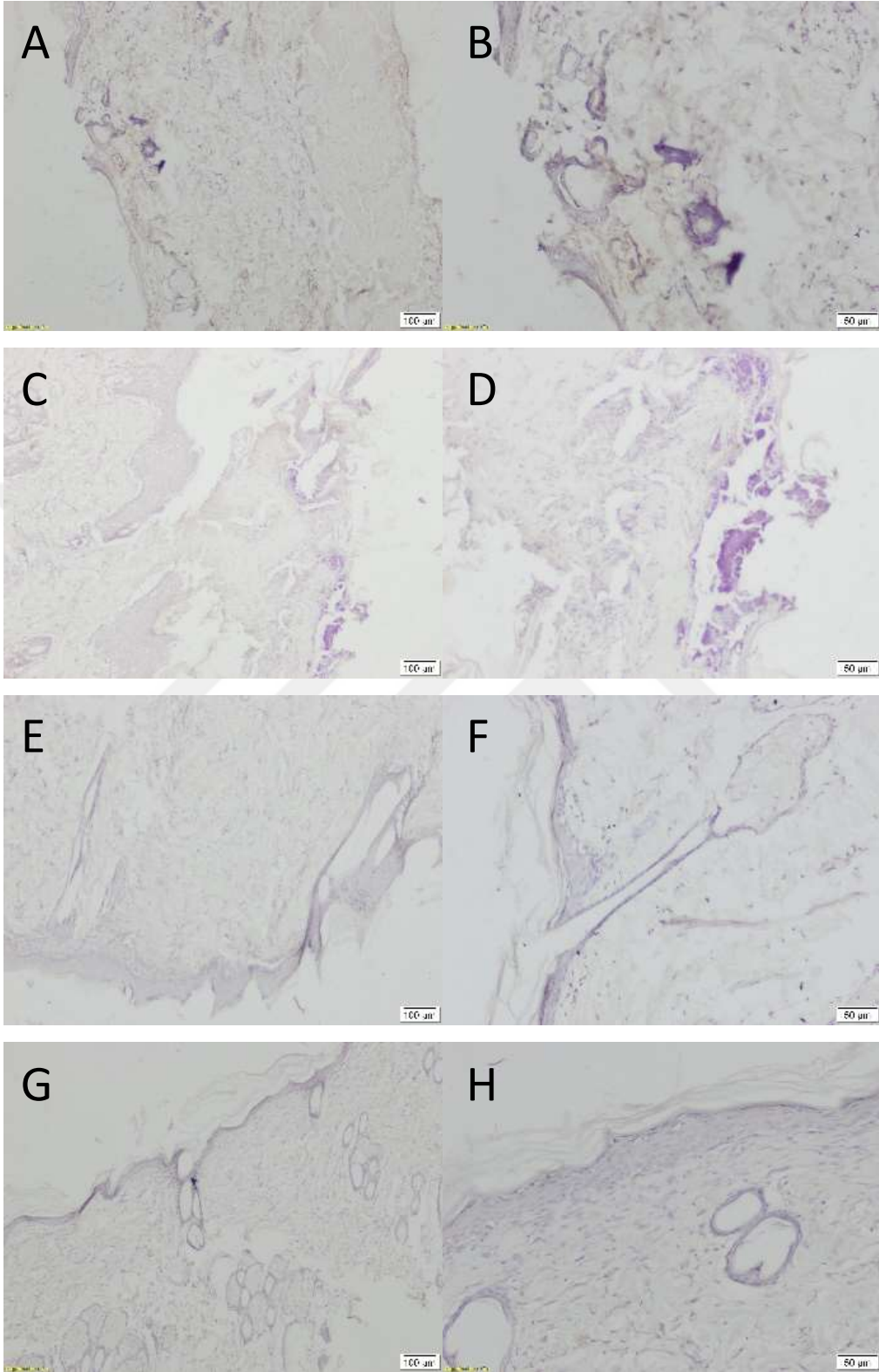
Şekil 35.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta KOLLAJEN1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40X, B, D, F, H: 100 X.



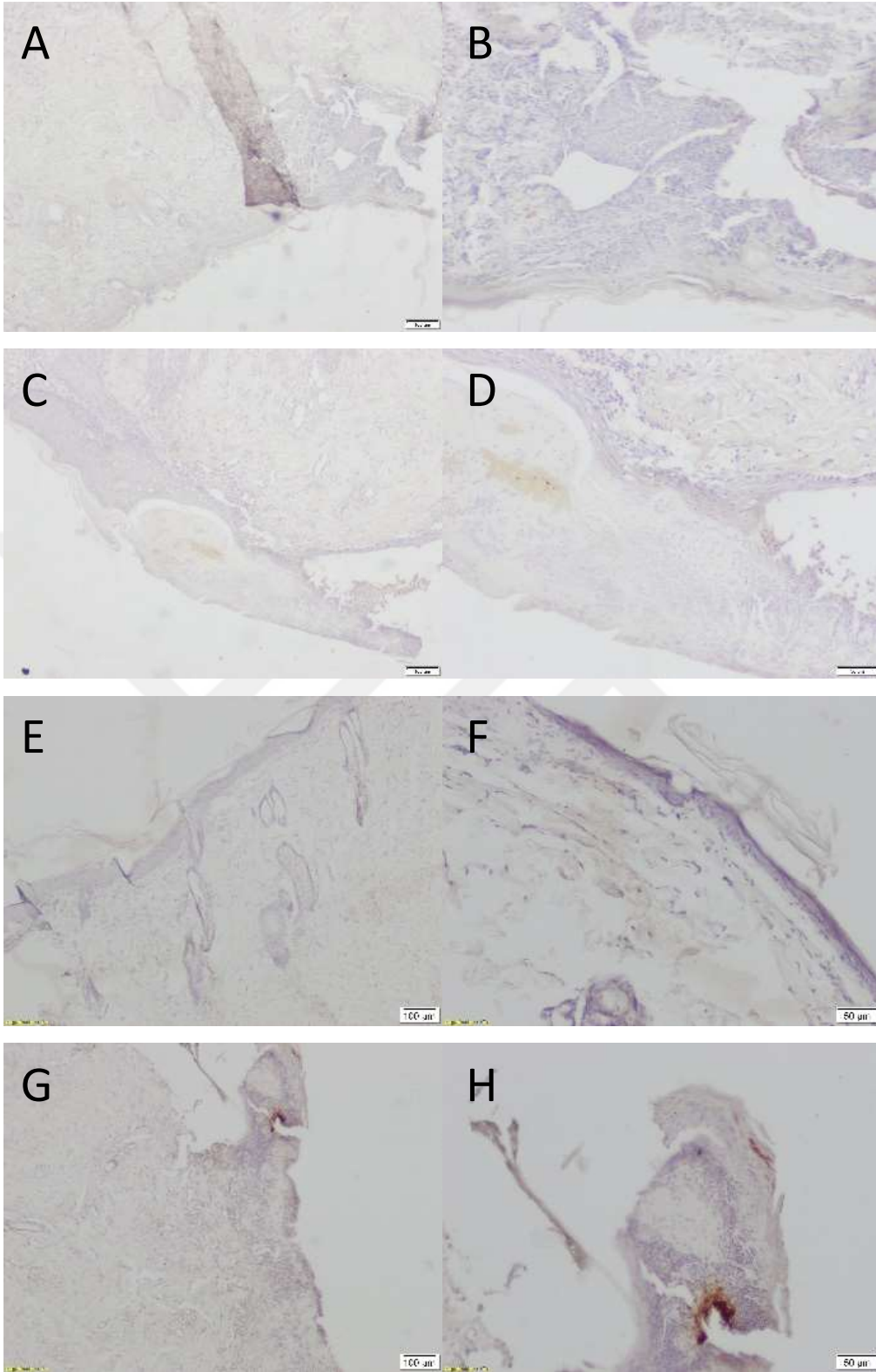
Şekil 36.Kontrol grubunda kollajen1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) gün boyamaları. A, C, E,: 40X, B, D, F : 100 X.



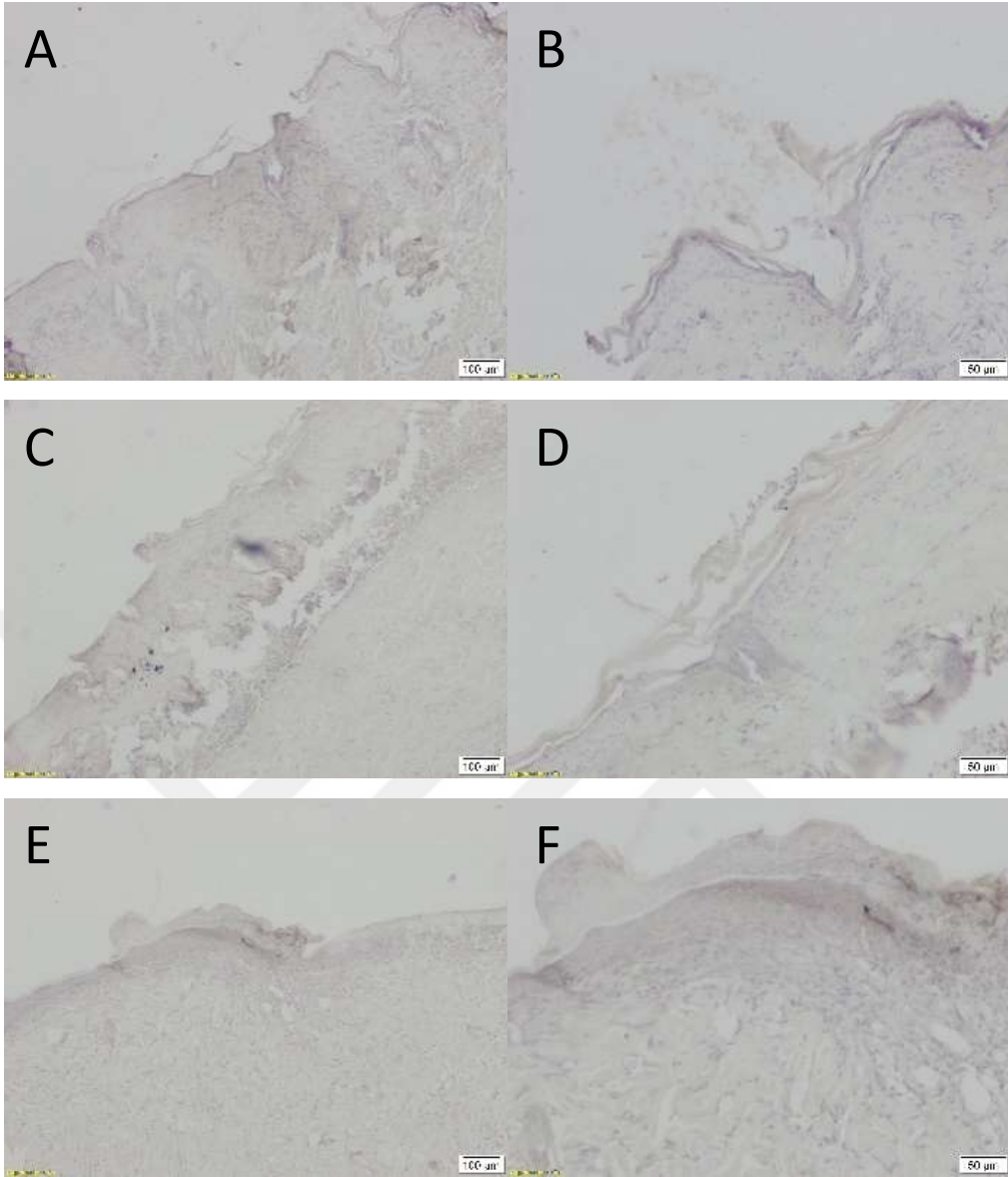
Şekil 37. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta MCP-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40X, B, D, F, H: 100 X.



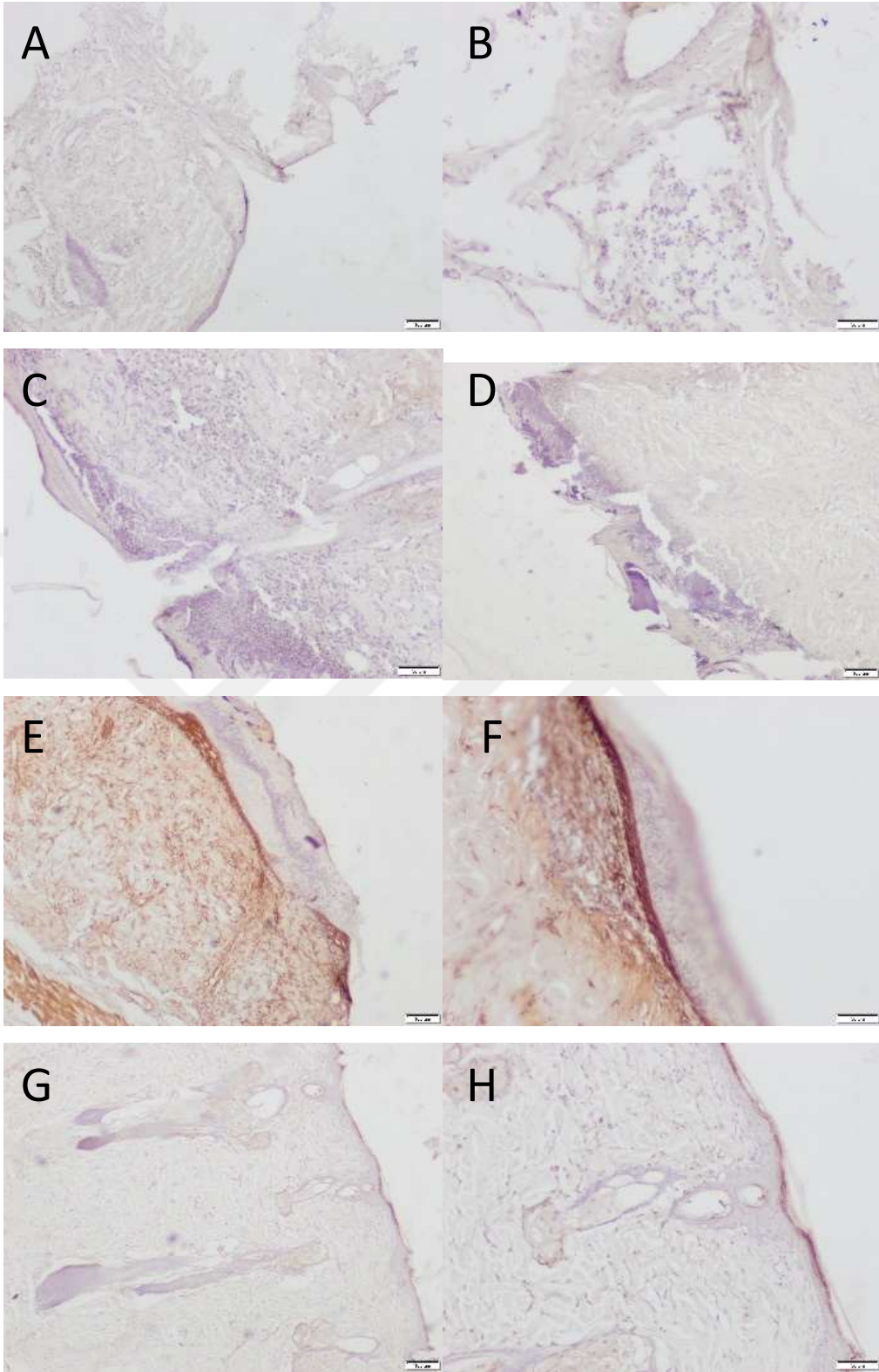
Şekil 38.PRP uygulanan grupta MCP-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40X, B, D, F, H: 100 X.



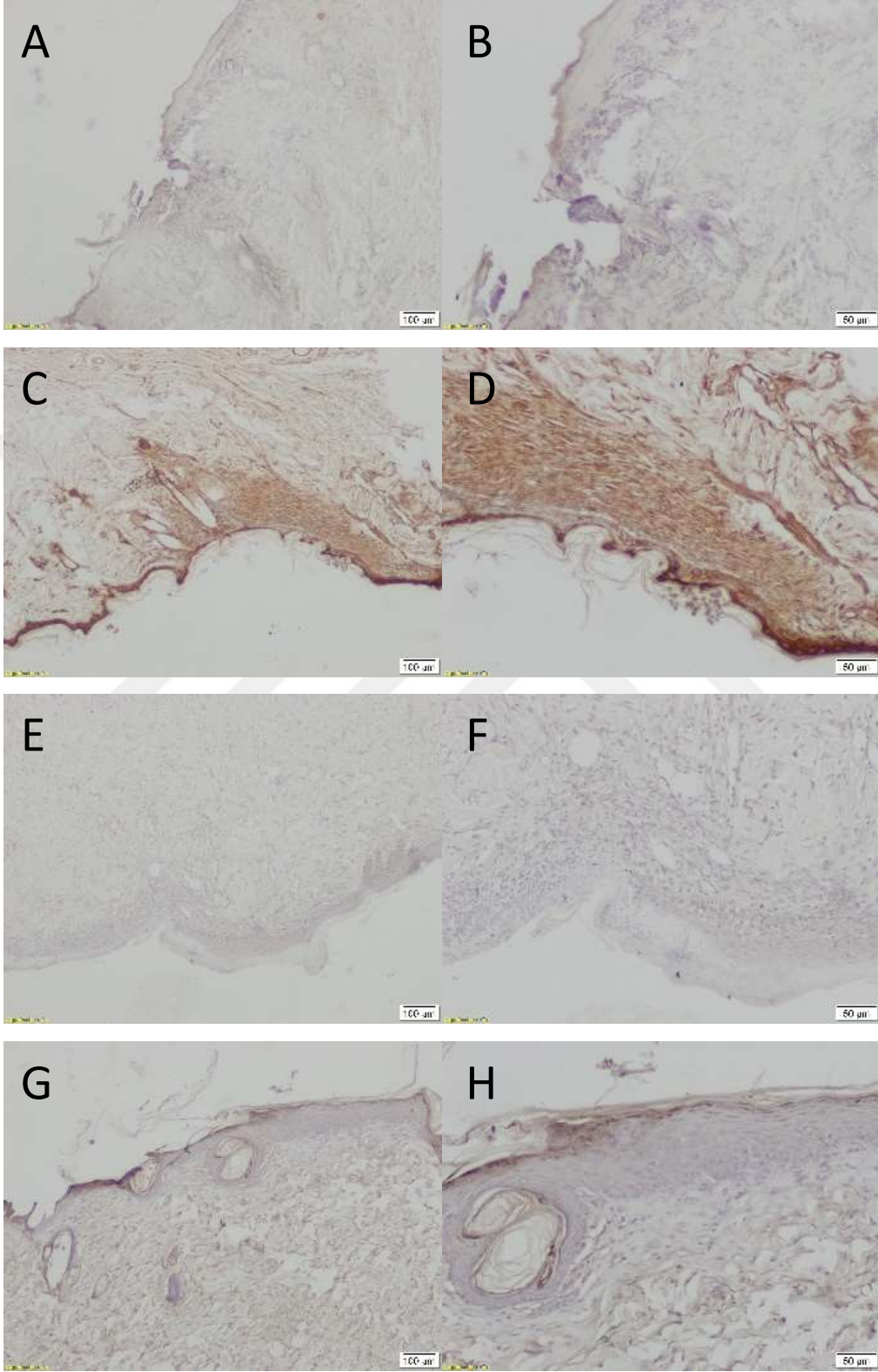
Şekil 39.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta MCP-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40X, B, D, F, H : 100 X.



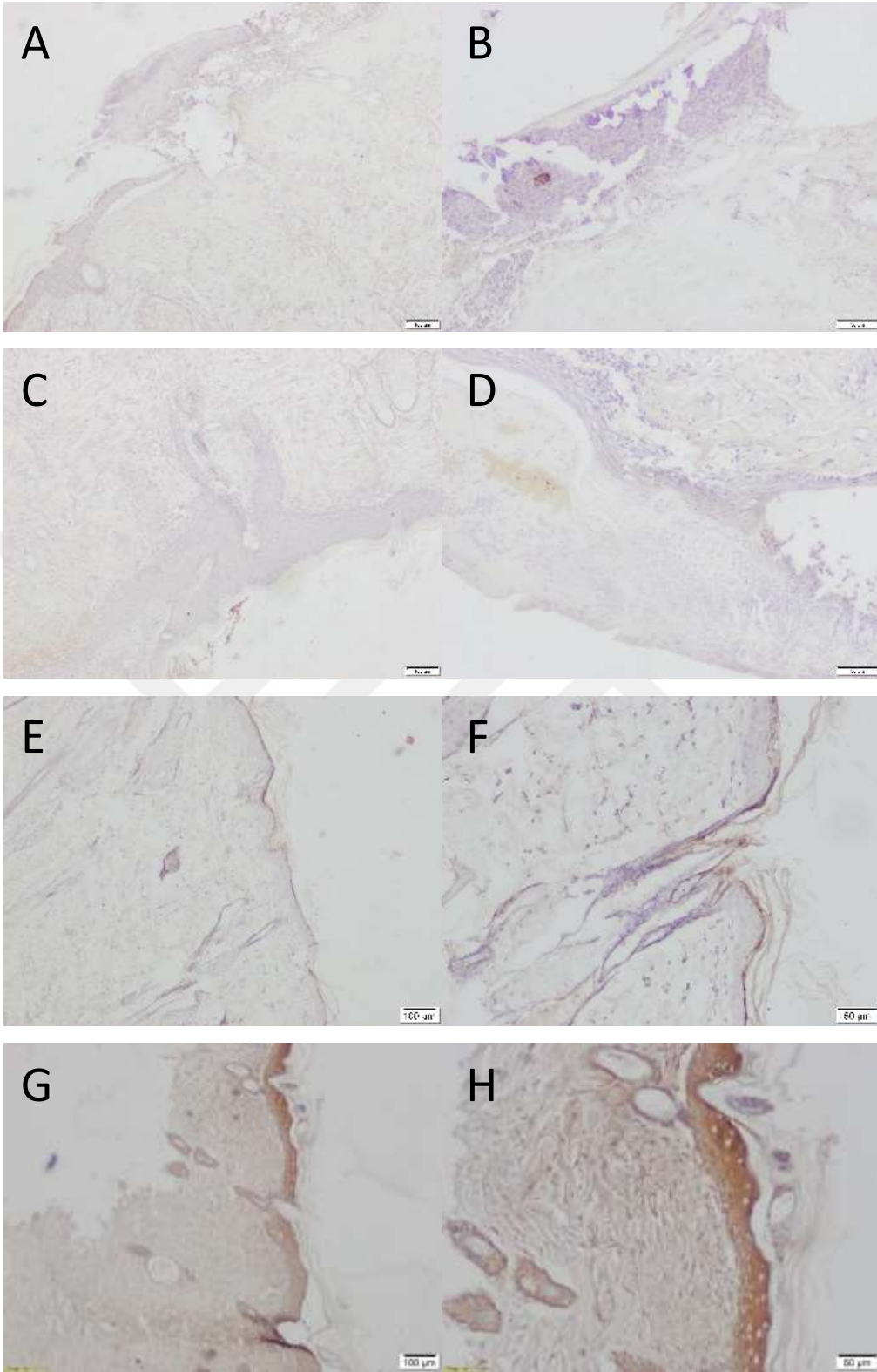
Şekil 40.Kontrol grubunda MCP-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D) ve 10. (E, F) gün boyamaları. A, C, E: 40X, B, D, F : 100



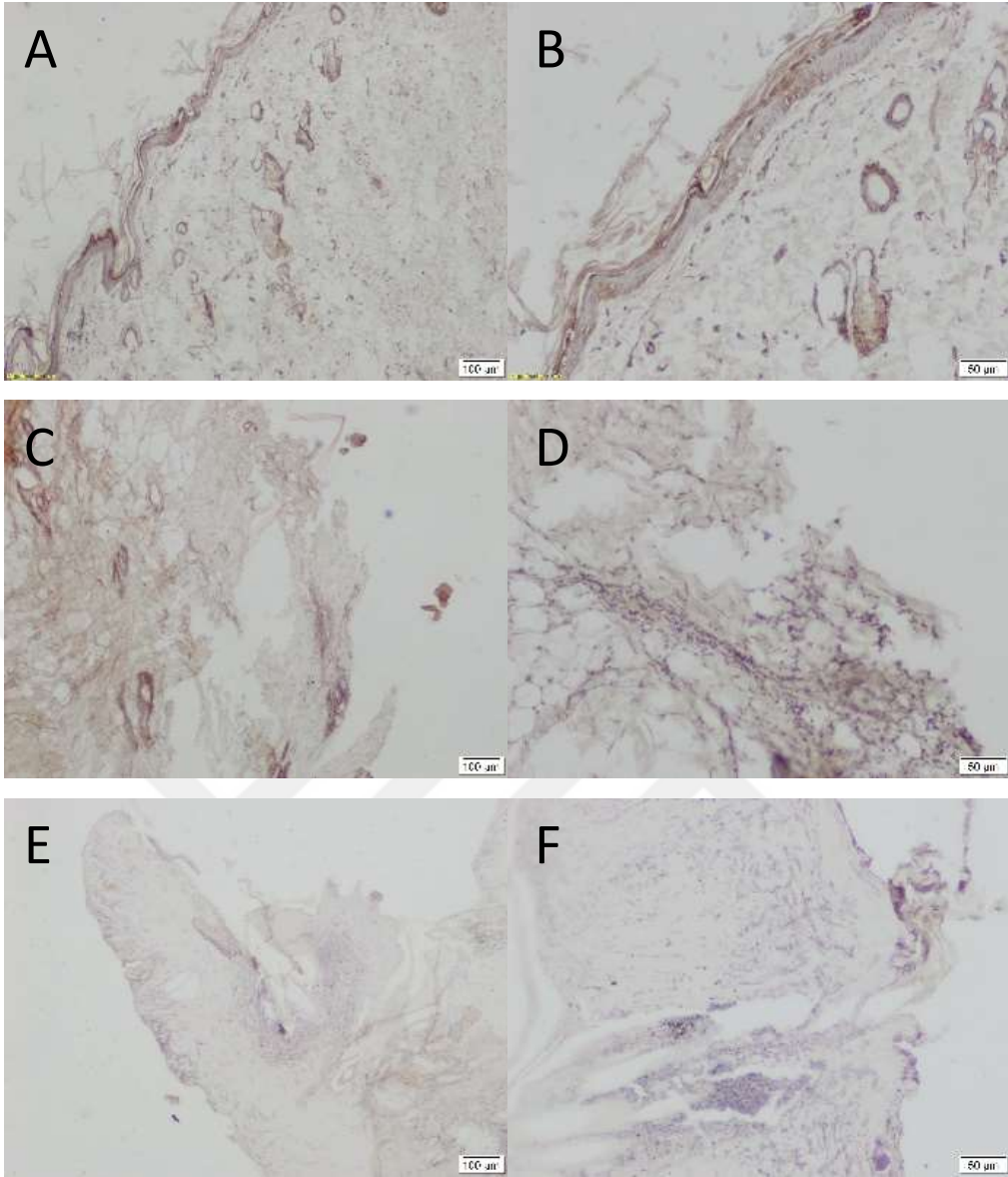
Şekil 41. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta PDGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40 X



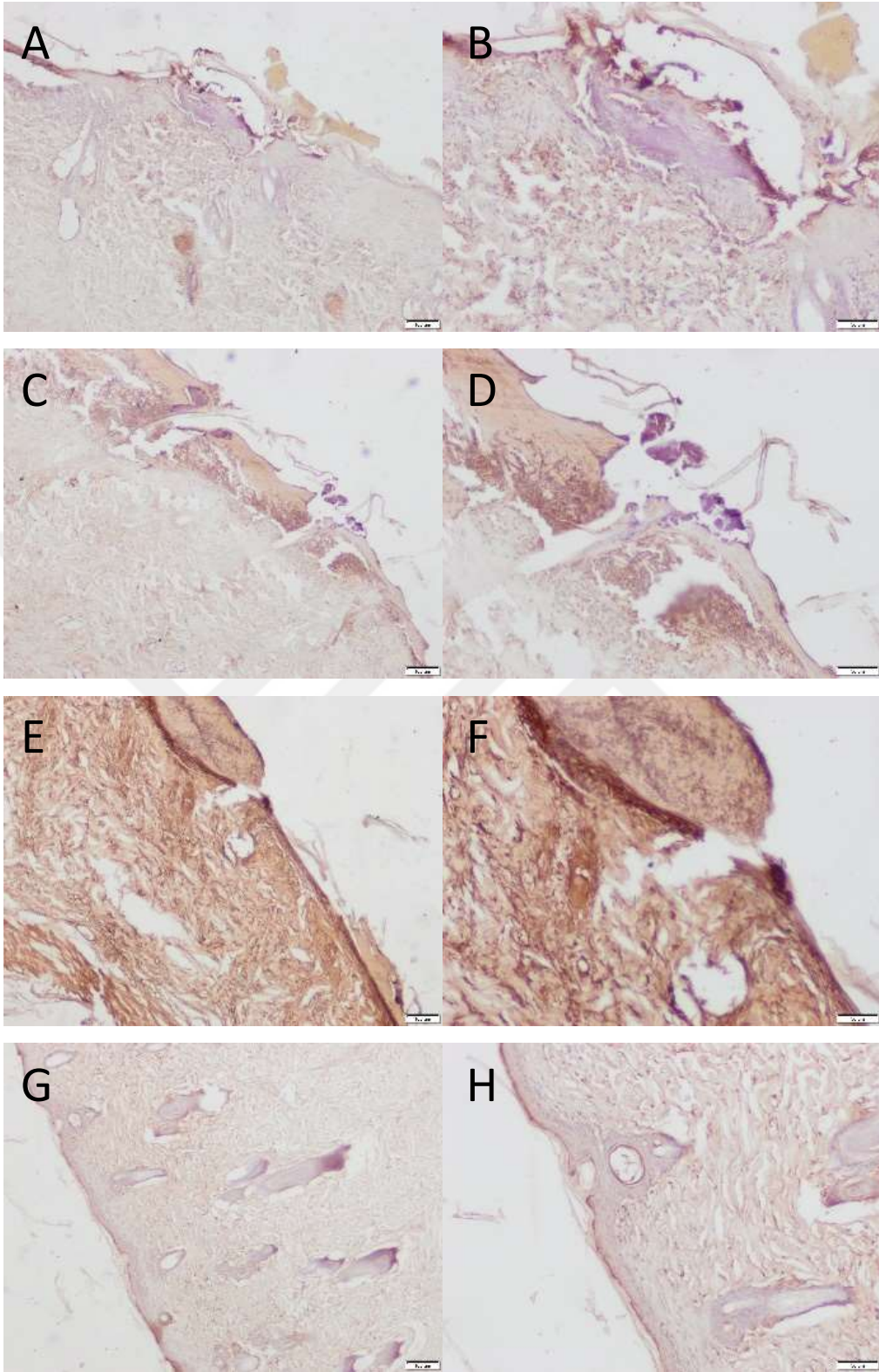
Şekil 42.PRP uygulanan grupta PDGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40X, B, D, F, H : 100 X



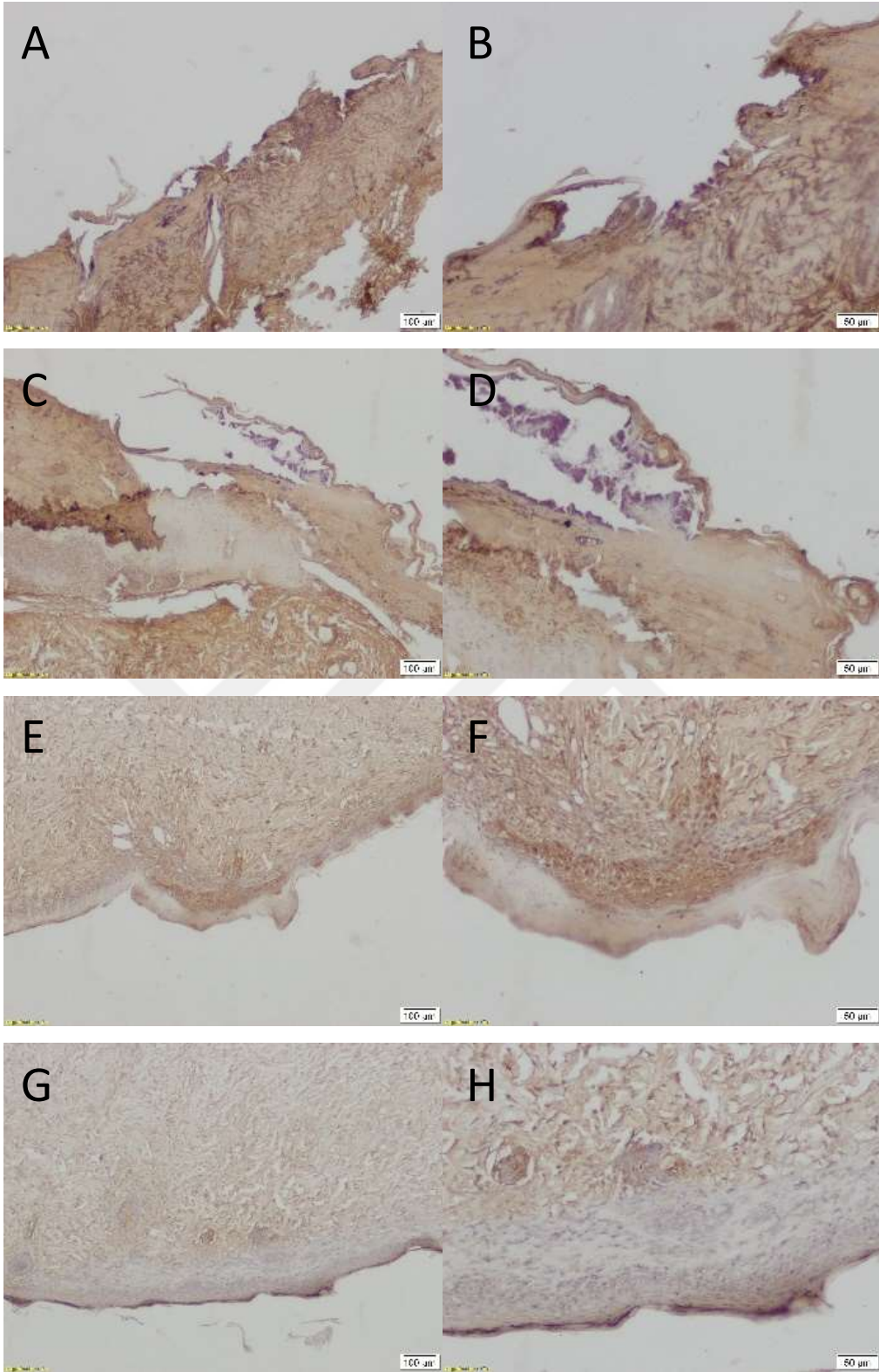
ŞEKİL 43.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta PDGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G: 40 X, B, D, F, H : 100



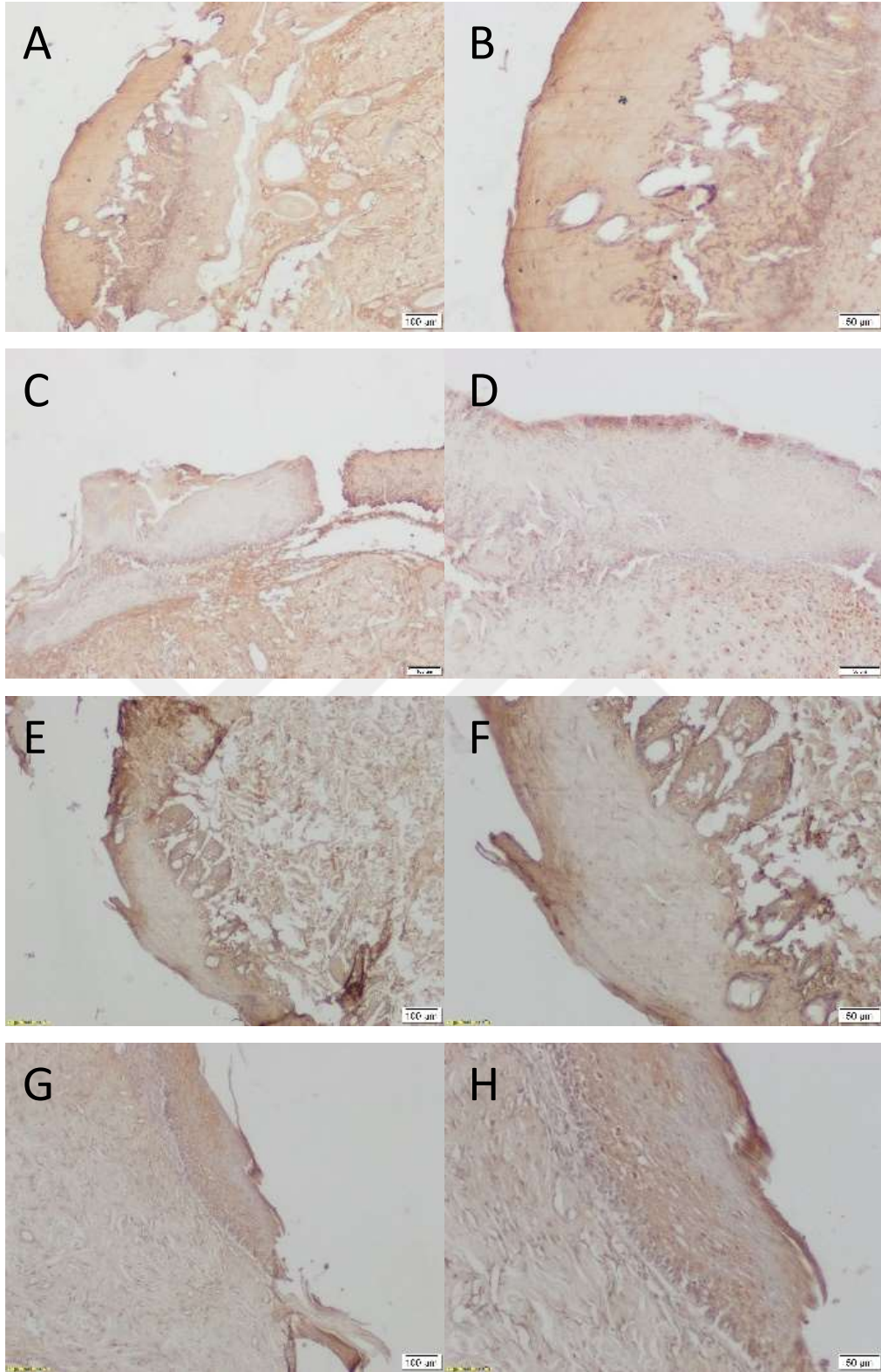
Şekil 44. Kontrol grubunda PDGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) gün boyamaları. A, C, E : 40X, B, D, F : 100 X



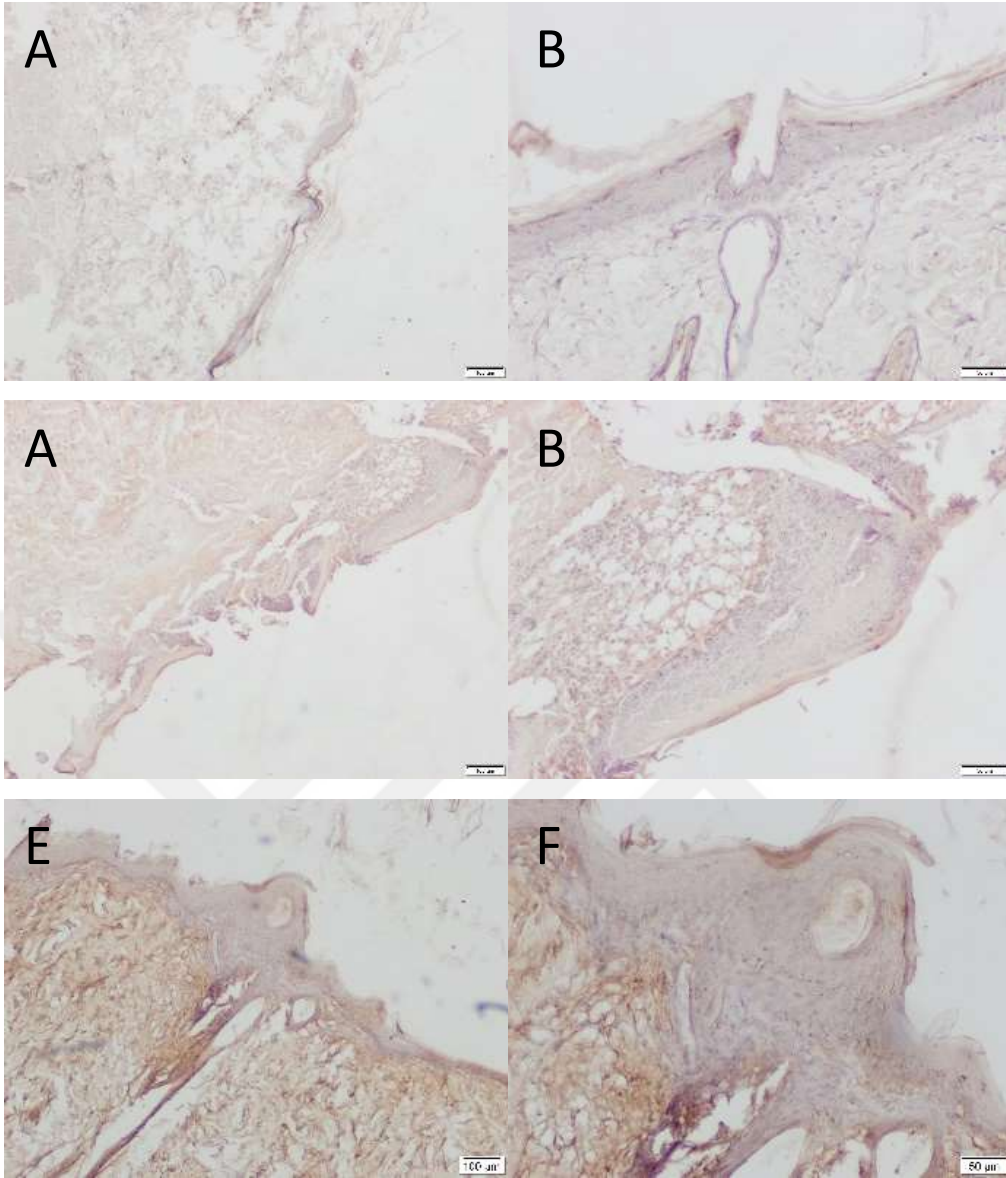
Şekil 45.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin uygulandığı grupta TGFβ-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



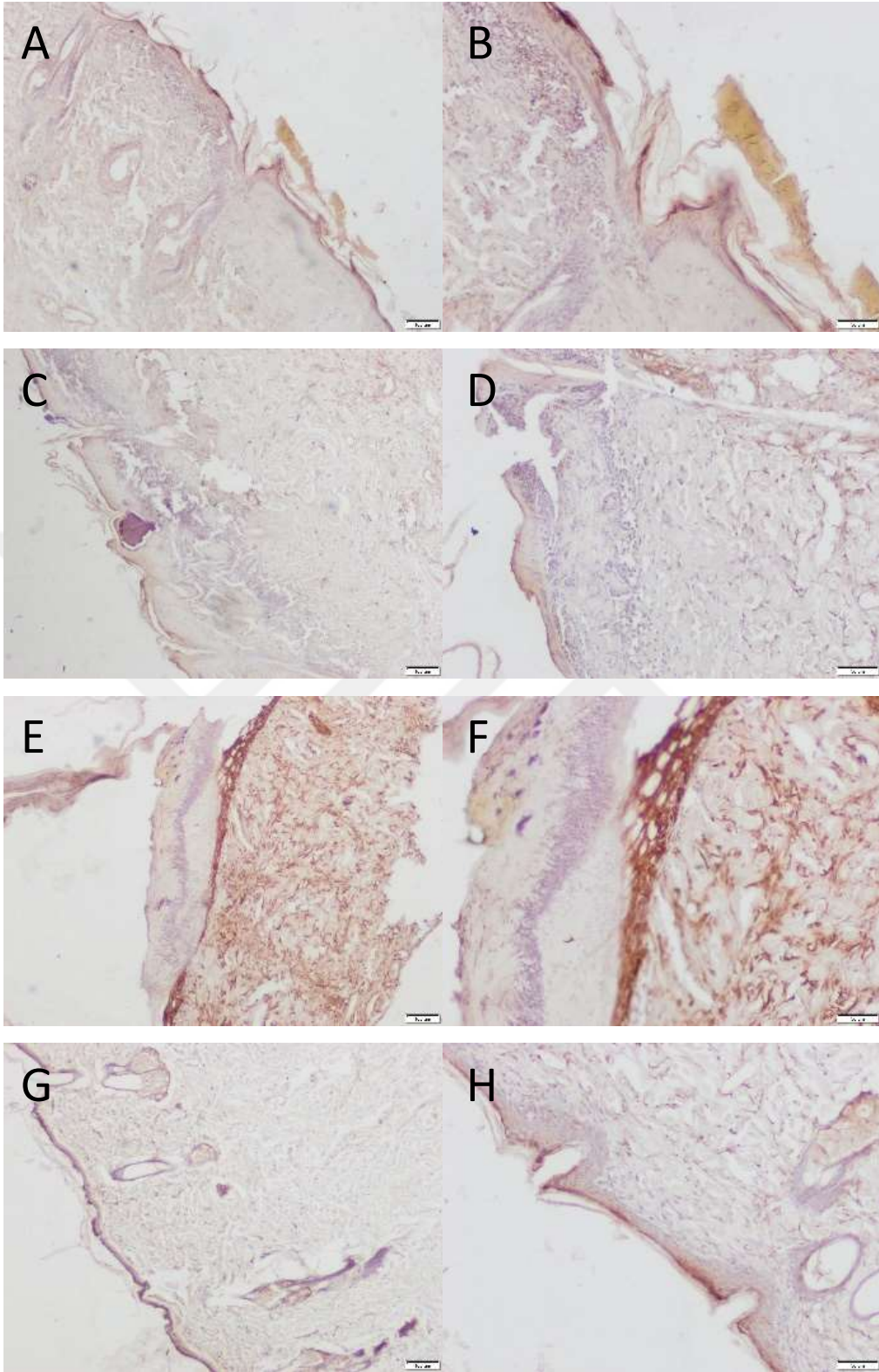
Şekil 46. PRP uygulanan grupta TGFβ-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



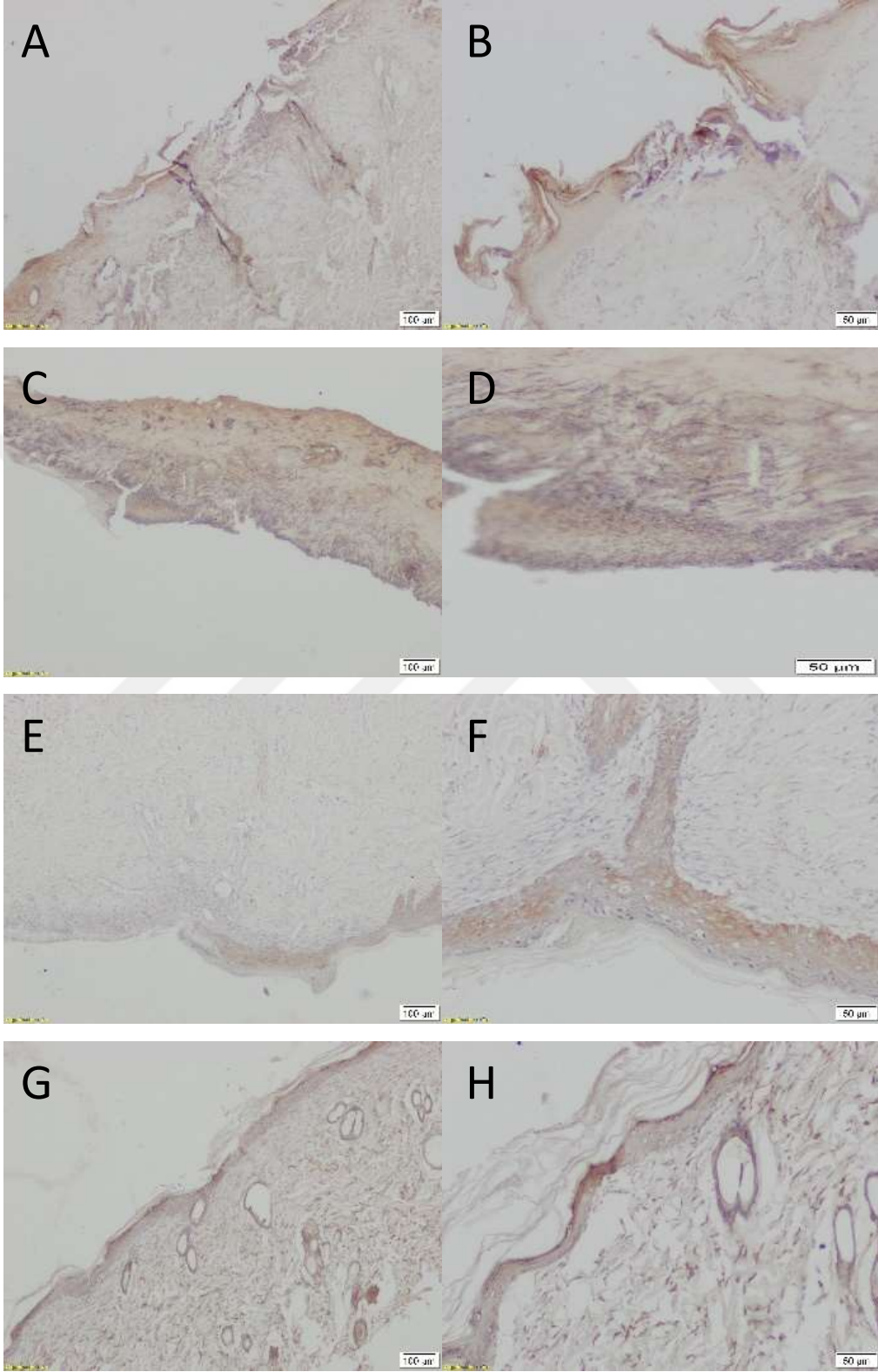
Şekil 47.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta TGFβ-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



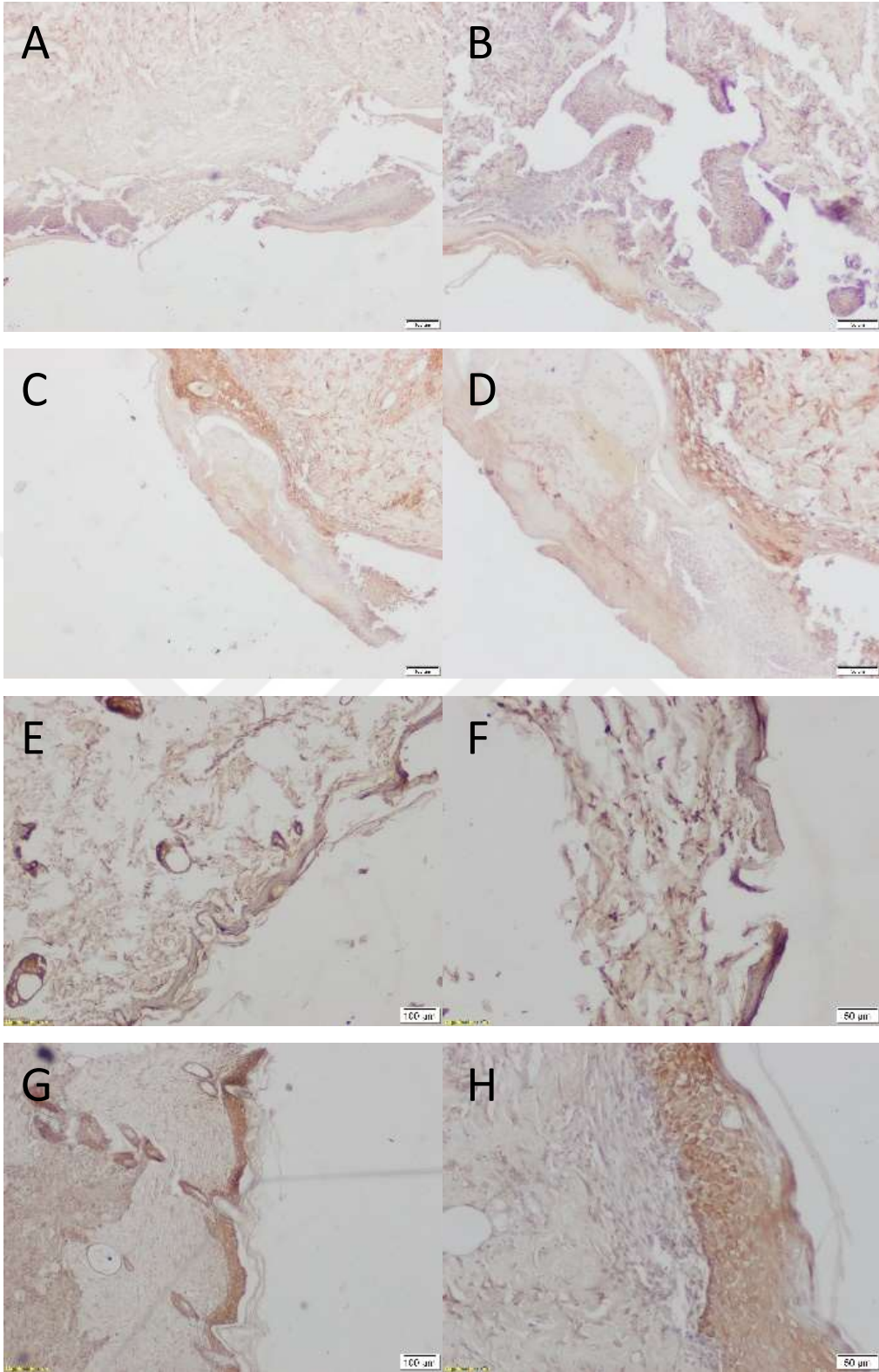
Şekil 48.Kontrol grubunda TGFβ-1 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D) ve 10. (E, F) gün boyamaları. A, C, E : 40 X, B, D, F : 100 X



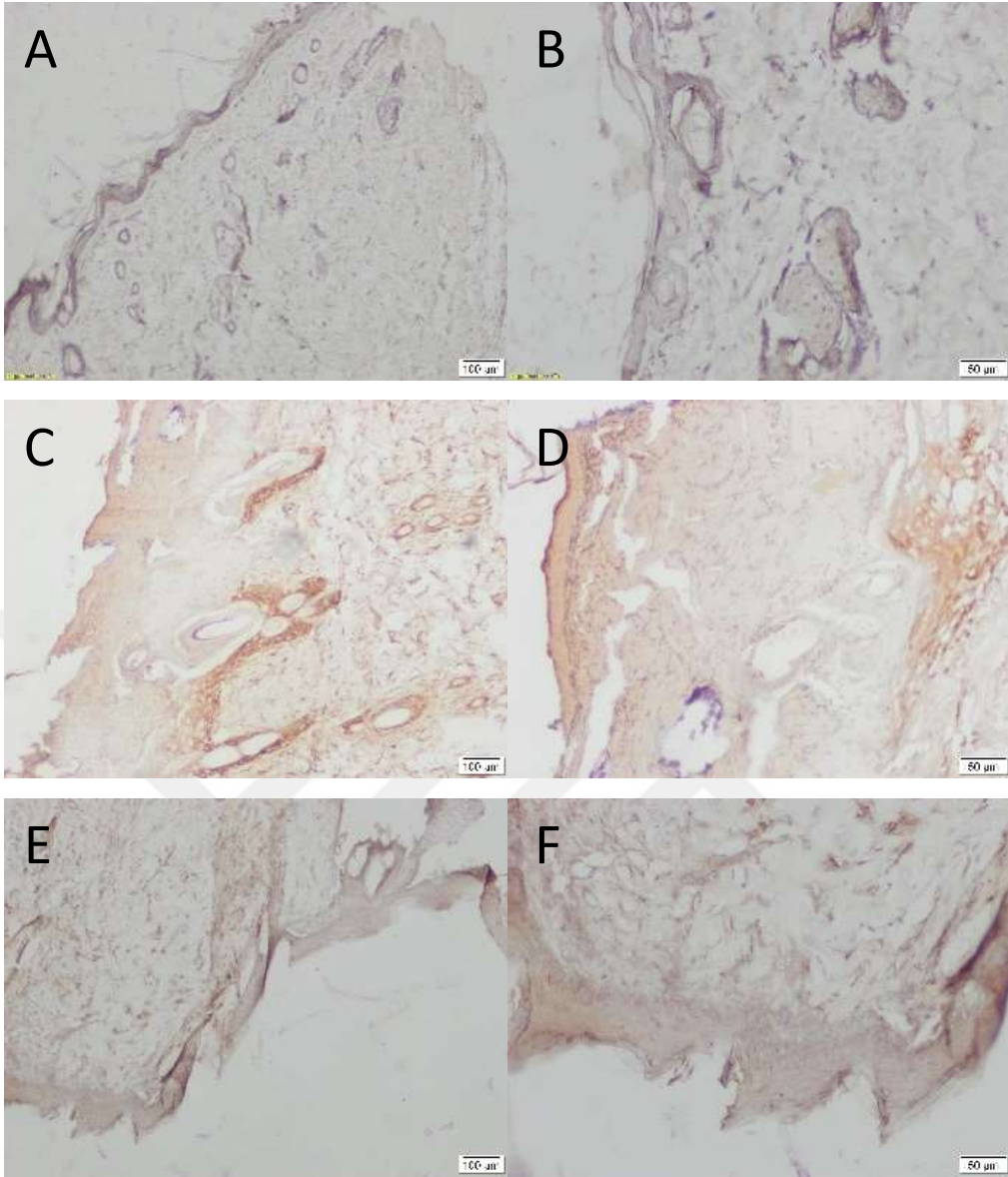
Şekil 49.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta VEGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



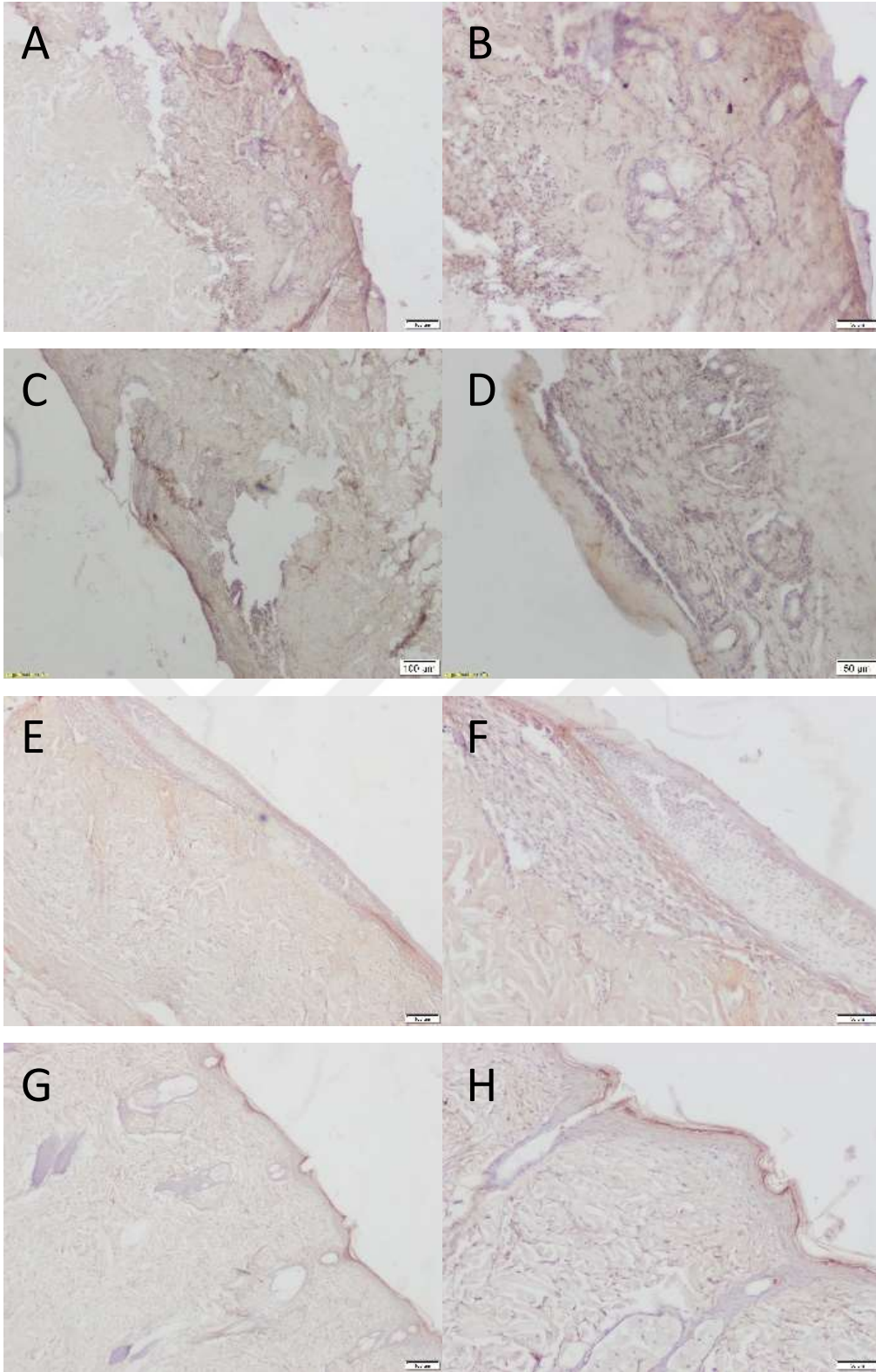
Şekil 50. PRP uygulanan grupta VEGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



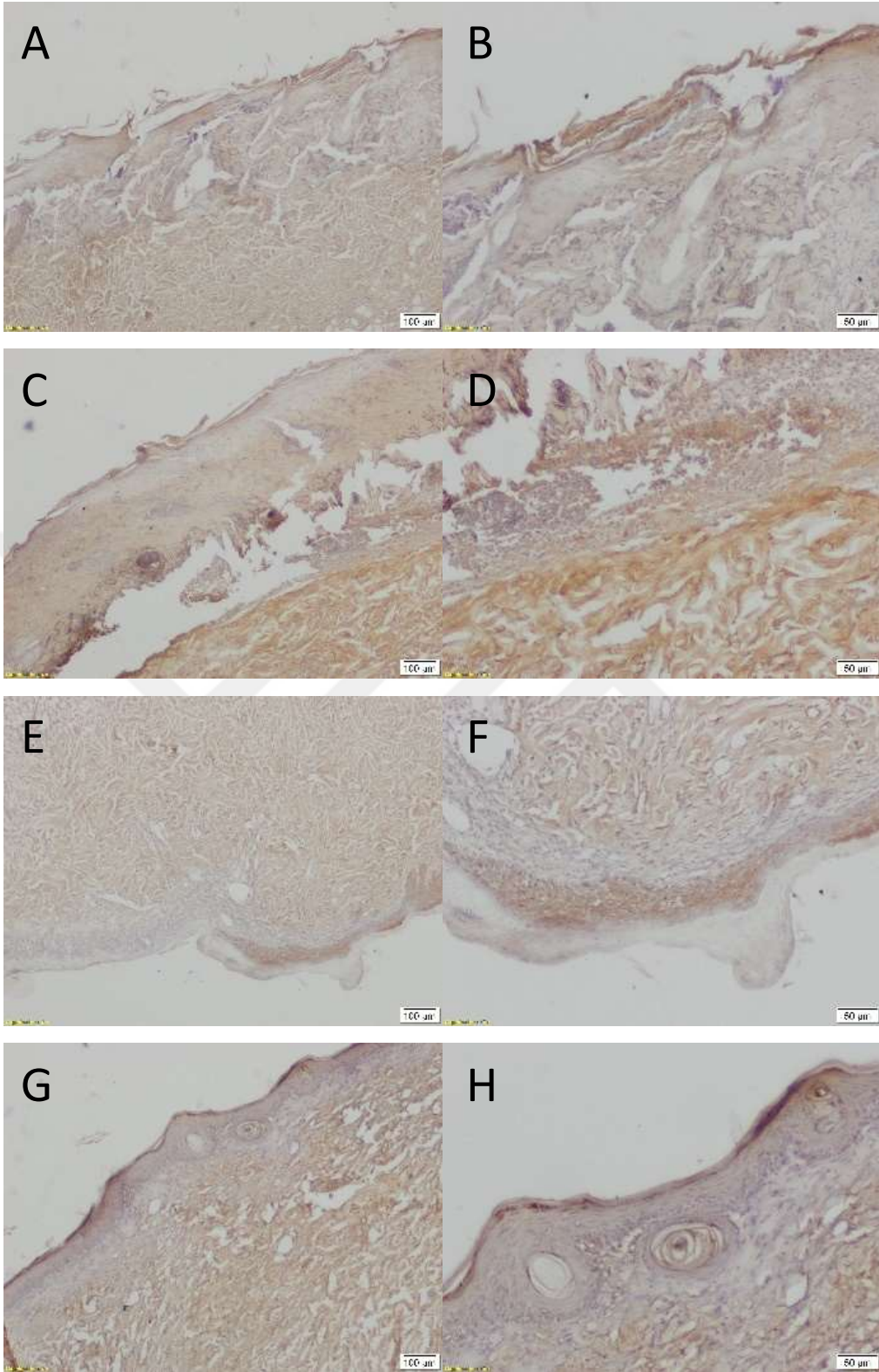
Şekil 51. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta VEGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



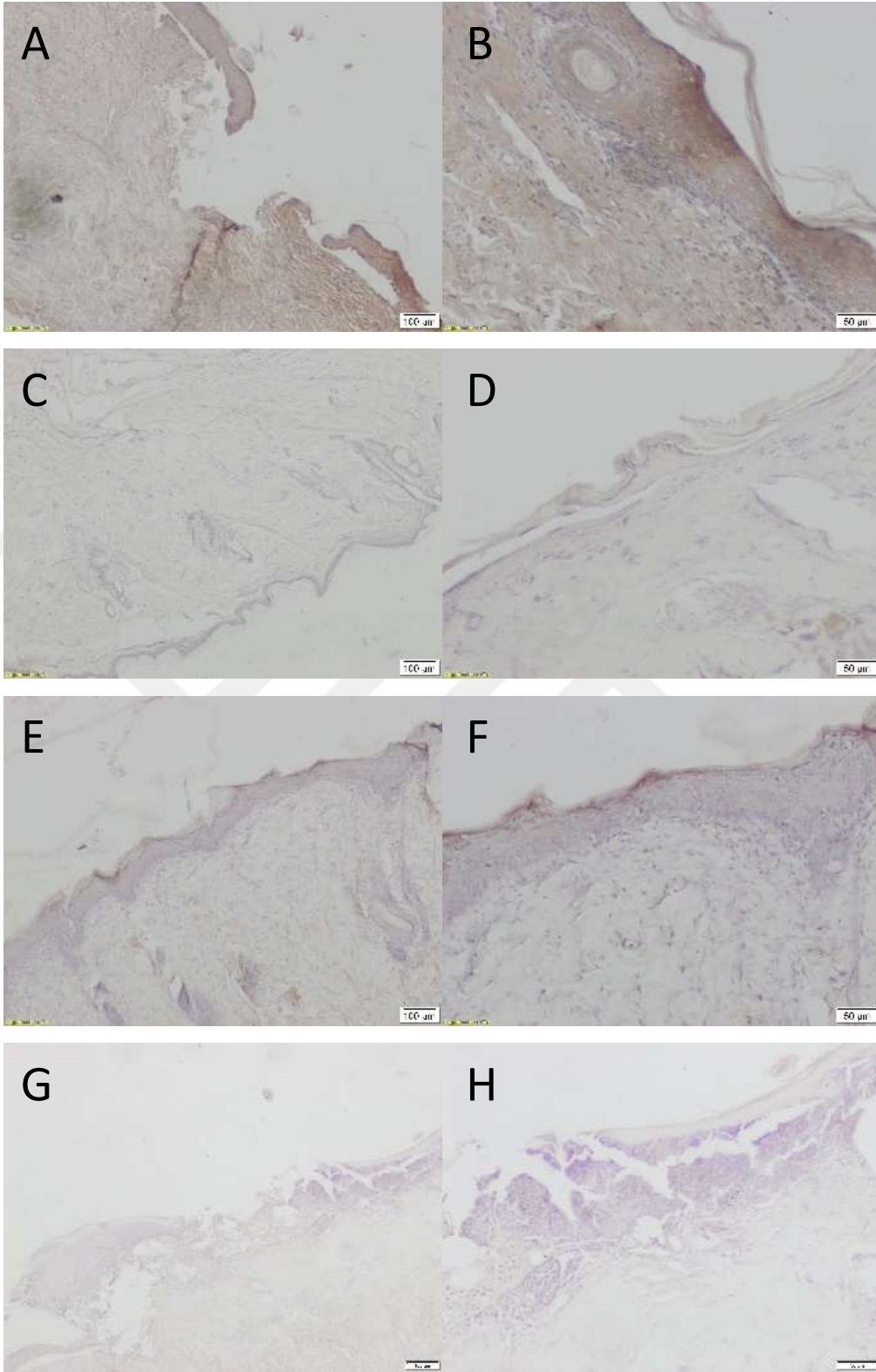
Şekil 52.Kontrol grubunda VEGF dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D) ve 10. (E, F) gün boyamaları. A, C, E : 40 X, B, D, F : 100 X



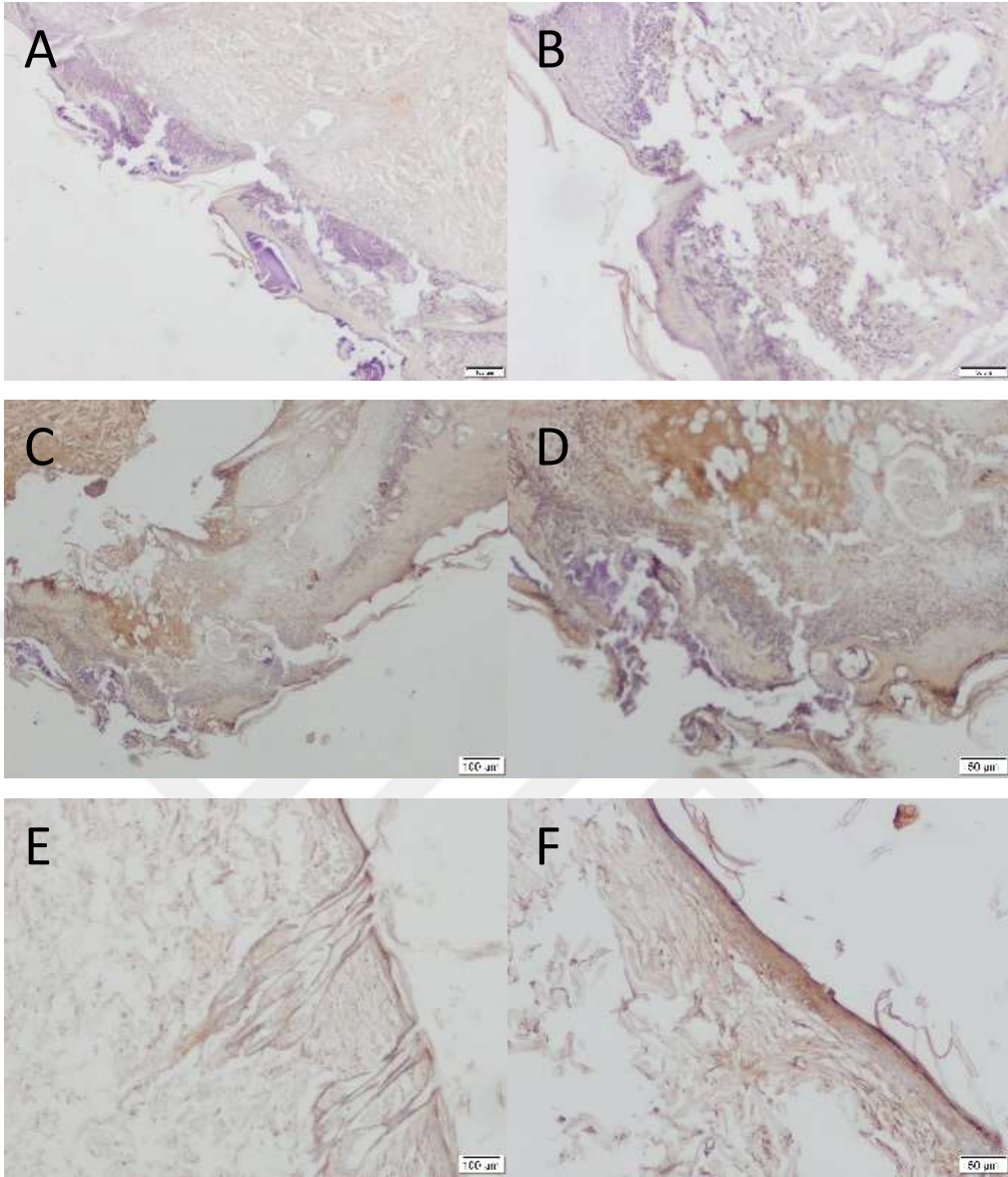
Şekil 53. Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler uygulanan grupta SİTOKERATİN-8 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



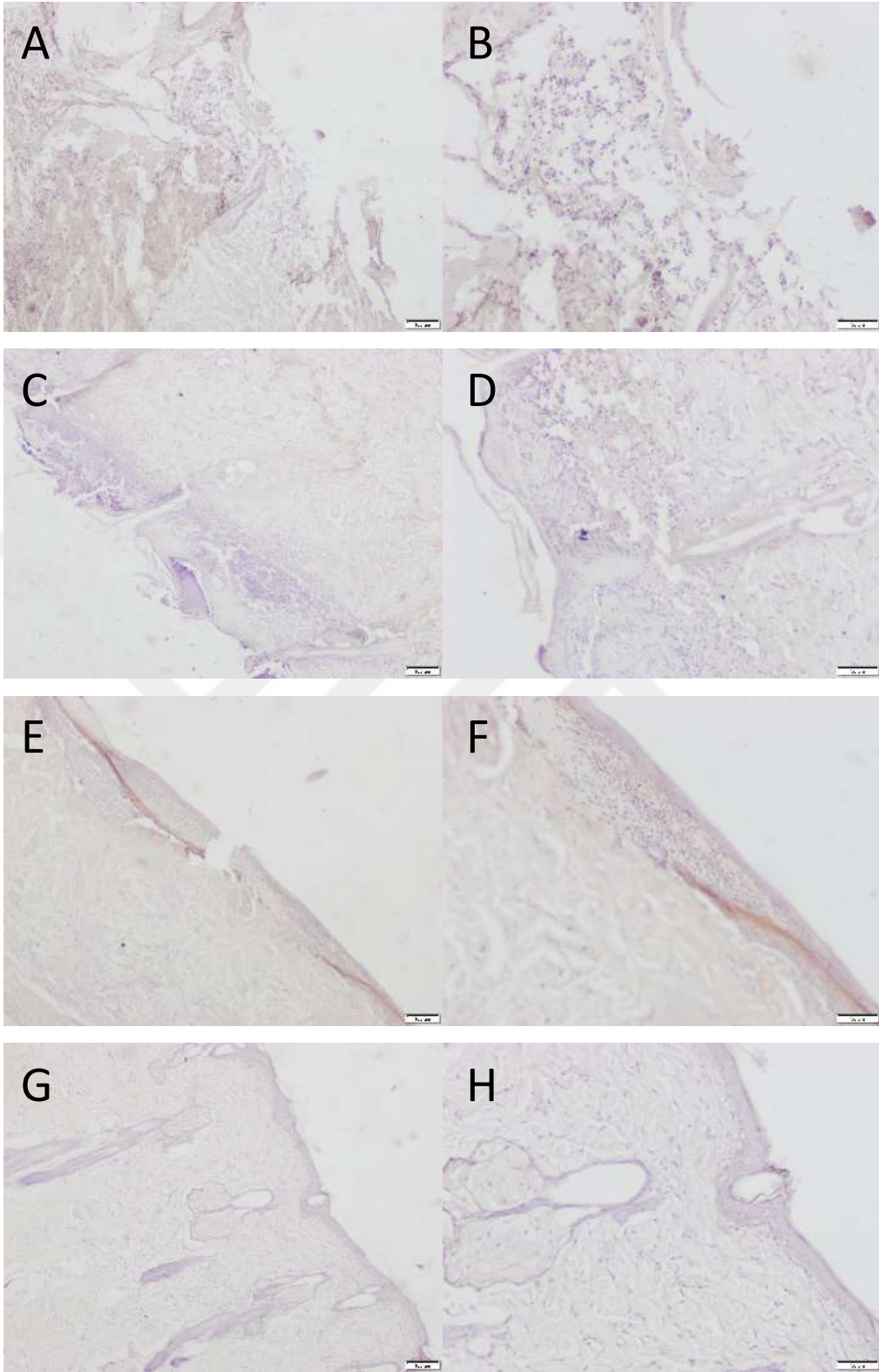
Şekil 54. PRP uygulanan grupta sitokeratin-8 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



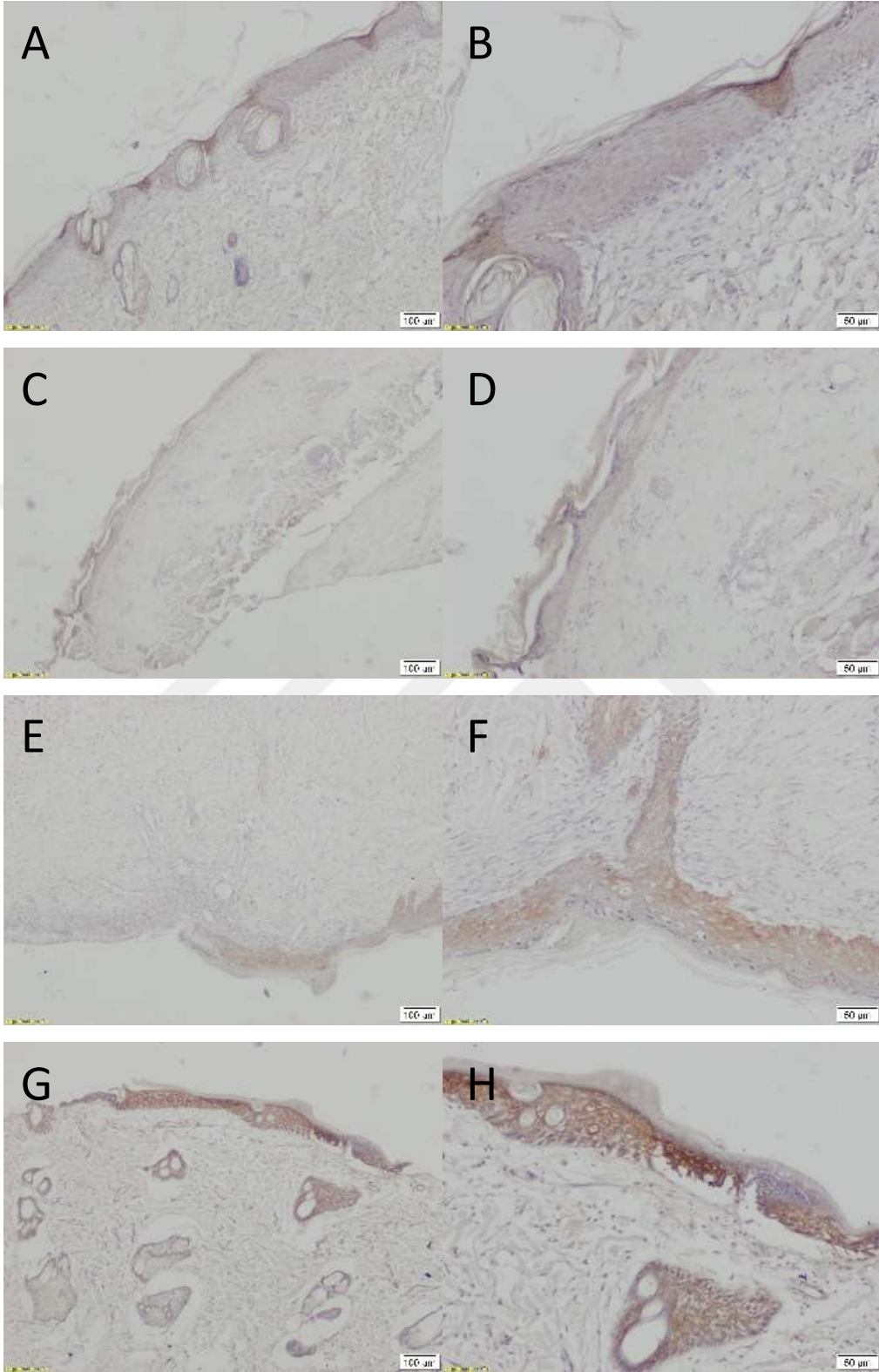
Şekil 55.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler ve PRP uygulanan grupta sitokeratin8 dağılımının 3.(A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



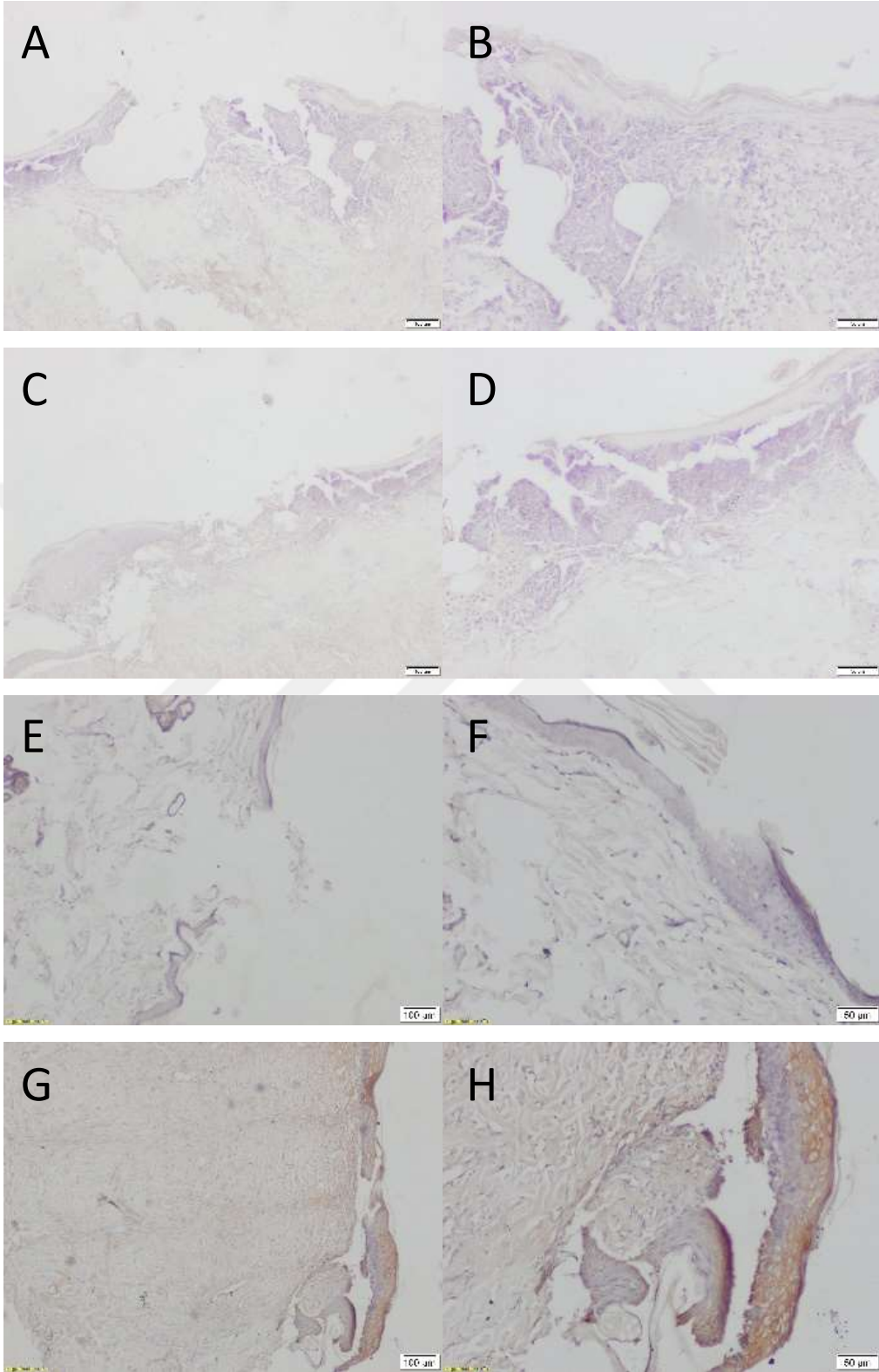
Şekil 56. Kontrol grubunda sitokeratin-8 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D) ve 10. (E, F) gün boyamaları. A, C, E : 40 X, B, D, F : 100 X



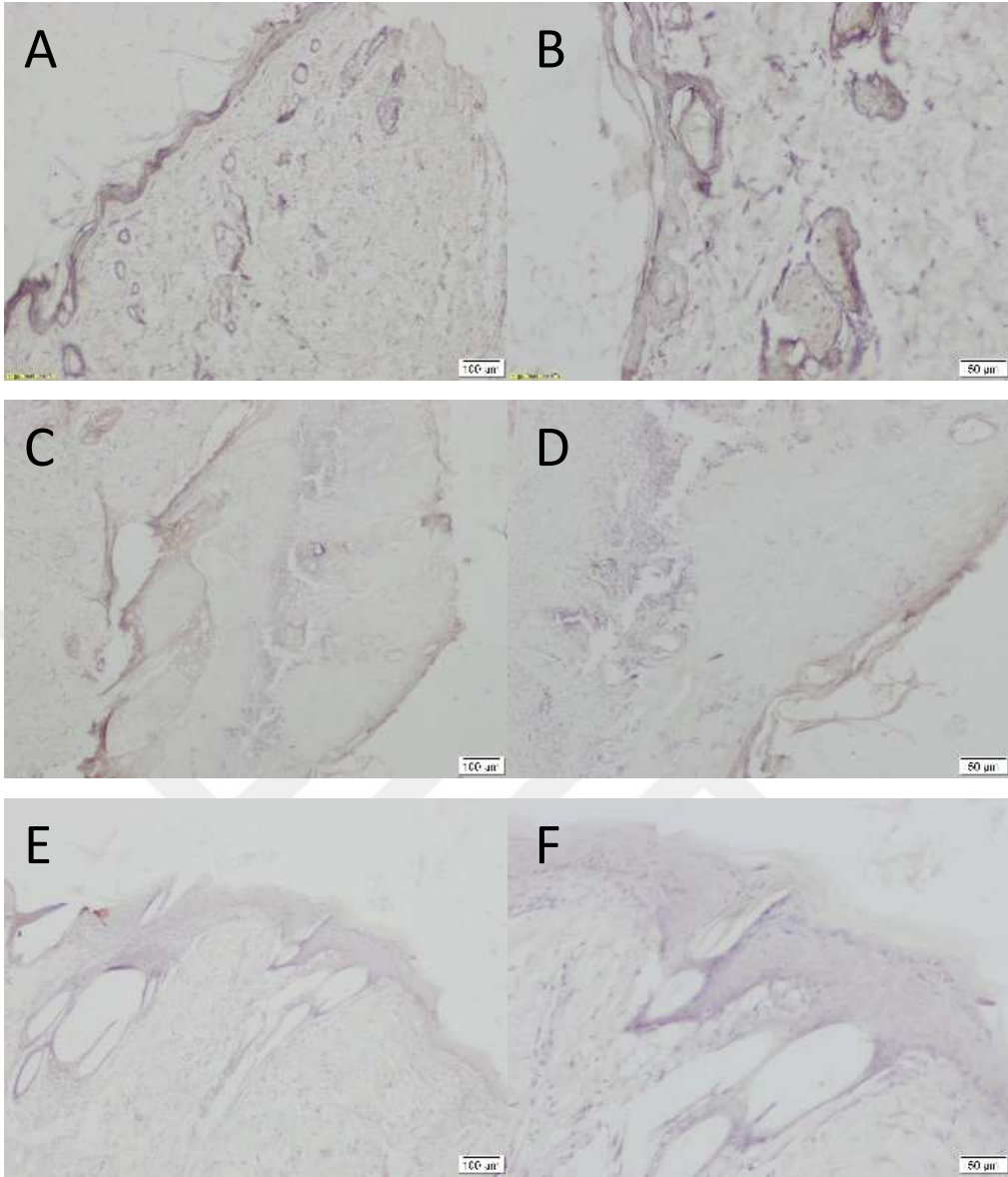
Şekil 57.Sıçan adipojenik doku kökenli kök hücrelerden farklılaştırılan keratinosit uygulanan grupta sitokeratin-14 dağılımının 3.(A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



Şekil 58.PRP uygulanan grupta sitokeratin-14 dağılımının 3.(A, B), 7. (C,D), 10. (E,F) ve 14. (G,H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



Şekil 59. PRP uygulanan grupta sitokeratin-14 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D), 10. (E, F) ve 14. (G, H) gün boyamaları. A, C, E, G : 40 X, B, D, F, H : 100 X



Şekil 60. Kontrol grubunda sitokeratin-14 dağılımının 3. (A, B), 7. (C, D) ve 10. (E, F) gün boyamaları. A, C, E : 40 X, B, D, F : 100 X

3.6 Gen Ekspresyonu Analizi

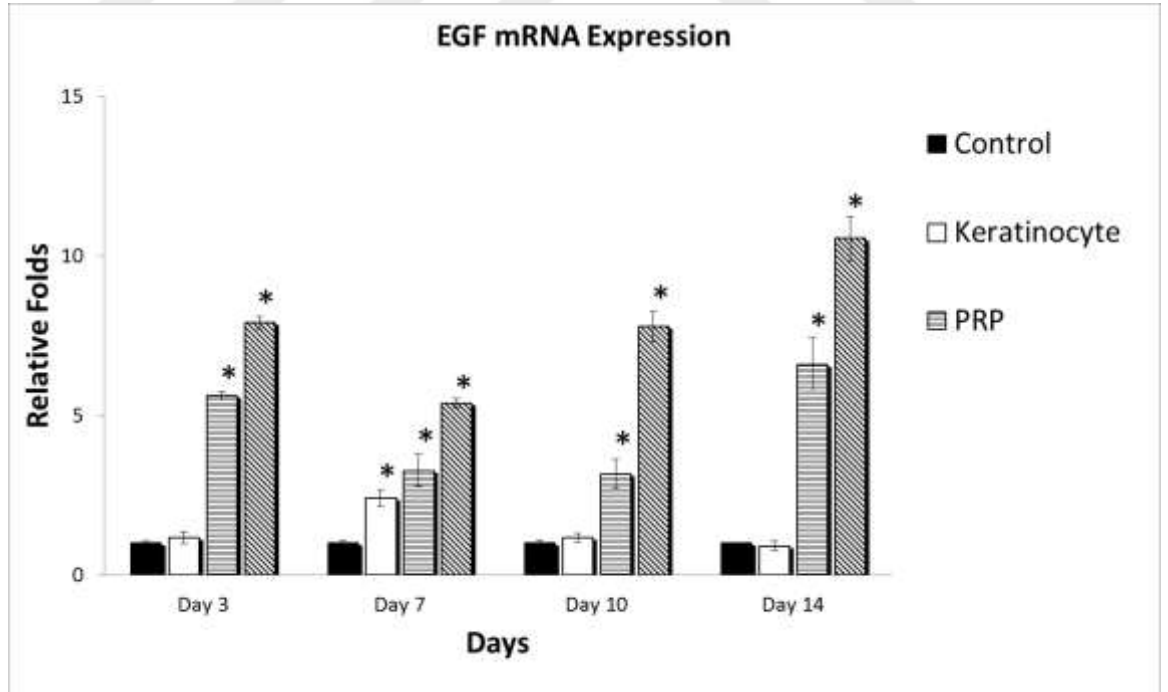
Kontrol gruba göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda, EGF geninin anlatımının $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 3. post-operatif günde, keratinosit uygulanan gruplarda EGF geninin anlatımında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

7. post-operatif günde keratinosit, PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda EGF geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

10. post-operatif günde PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda EGF geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 10. post-operatif günde keratinosit uygulanan grupta EGF geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.

14. post-operatif günde PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda EGF geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 14. post-operatif günde Keratinosit uygulanan grupta EGF geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 61. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında EGF geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi. (Ort \pm Standart Hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, * $p < 0,05$ düzeyinde)

istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için).

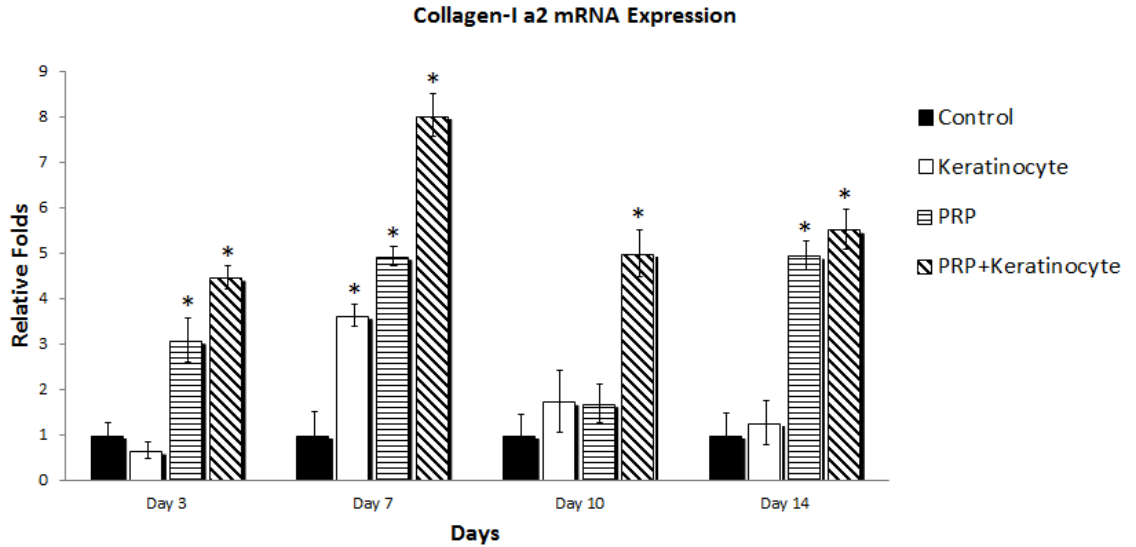
Kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde Keratinosit, PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda Kollajen-Ia2 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

7. post-operatif günde Keratinosit, PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda Kollajen-Ia2 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

10. postoperatif günde PRP+Keratinosit uygulanan grupta Kollajen-Ia2 geninin anlatımının $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 10. postoperatif günde Keratinosit, PRP uygulanan gruplarda Kollajen-Ia2 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

14. post-operatif günde PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda Kollajen-Ia2 geninin anlatımlarının sırasıyla $p < 0.050$, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 14. post-operatif günde Keratinosit uygulanan grupta Kollajen-Ia2 geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 62. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında Kollajen-Ia2 geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi (Ort± Standart Hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, * $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve

bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için).

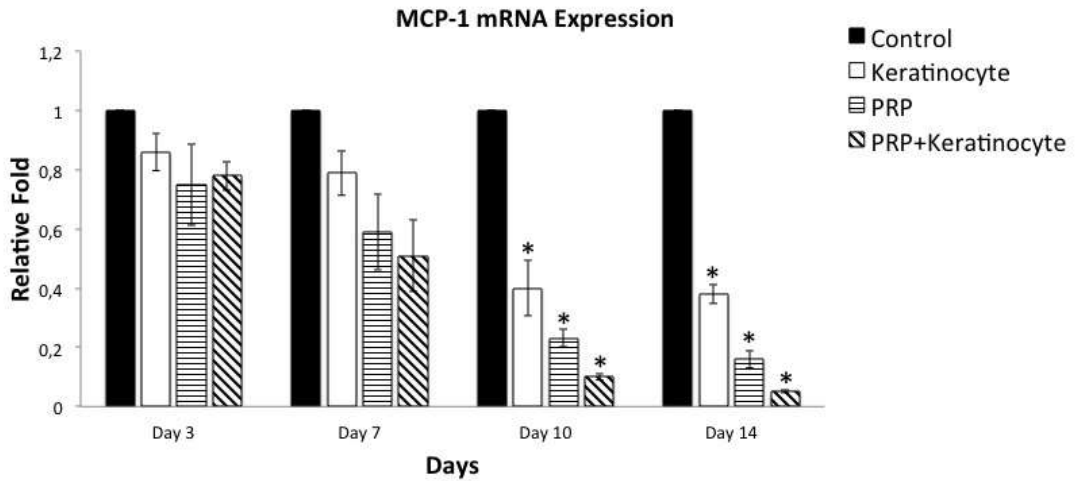
Kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda MCP-1 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

7. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda MCP-1 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

10. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda MCP-1 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.

14. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda MCP-1 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.



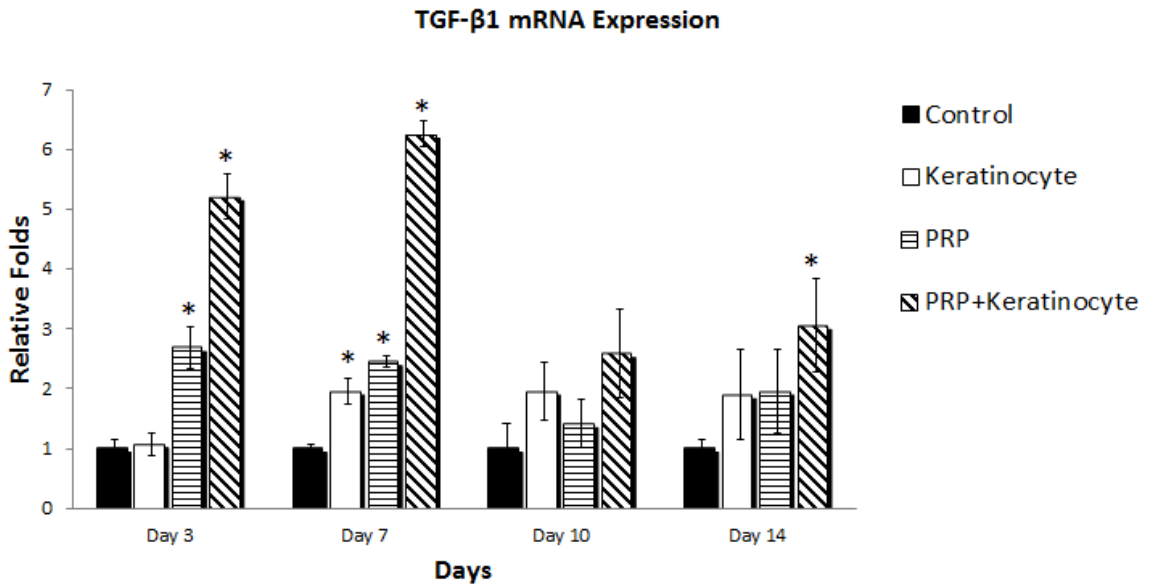
Şekil 63. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında mcp-1 geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi. (ort± standart hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, * $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için)

Kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda TGF- β 1 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 3. post-operatif günde Keratinosit uygulanan grupta TGF- β 1 geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.827$). 7. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda TGF- β 1 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

10. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda TGF- β 1 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

14. post-operatif günde Keratinosit, PRP uygulanan gruplarda TGF- β 1 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 14. post-operatif günde PRP+Keratinosit uygulanan grupta TGF- β 1 geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 64. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında TGF- β 1 geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi. (Ort± Standart Hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, * $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için $n = 3$ 'tür).

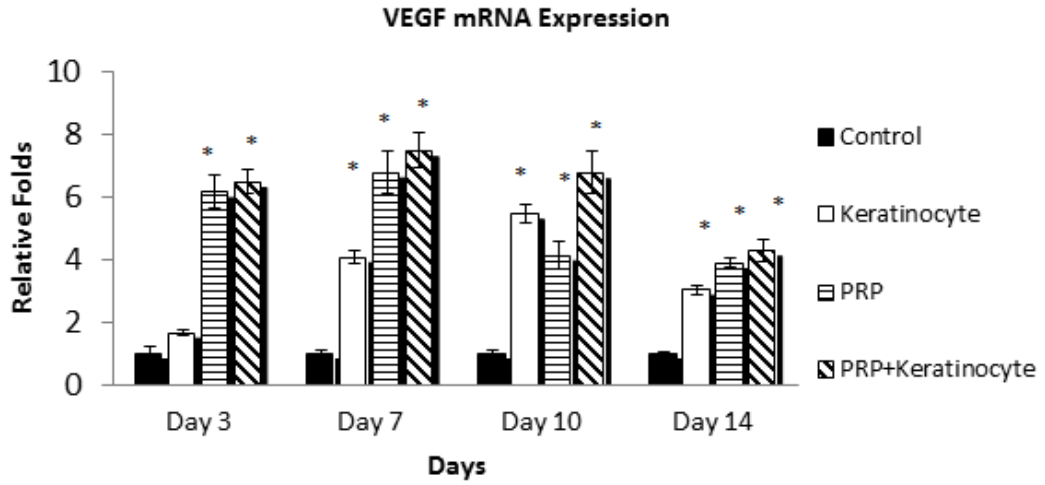
Kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda VEGF geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

7. post-operatif günde keratinosit, PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda VEGF geninin anlatımlarının sırasıyla $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 7. post-operatif günde Keratinosit uygulanan grupta VEGF geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.513$).

10. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda VEGF geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

14. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda VEGF geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.



Şekil 65. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında vegf geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi. (Ort± Standart Hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, * $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için $n = 3$)

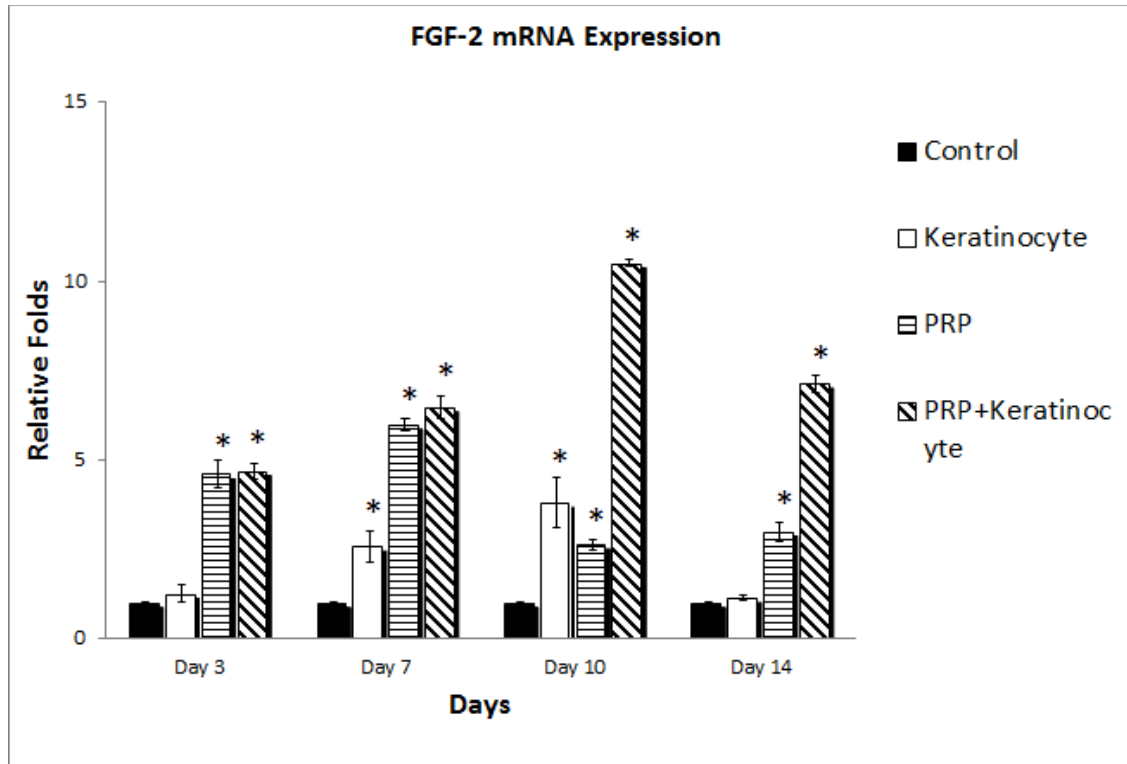
Kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-2 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 3. post-operatif günde Keratinosit uygulanan grupta FGF-2 geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.

7. post-operatif günde Keratinosit, PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-2 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

10. post-operatif günde Keratinosit, PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-2 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

14. post-operatif günde PRP, PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-2 geninin anlatımlarının, $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. 14. post-operatif günde Keratinosit uygulanan grupta FGF-2 geninin anlatımında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 66. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında FGF-2 geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi. (Ort± Standart Hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, * $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için)

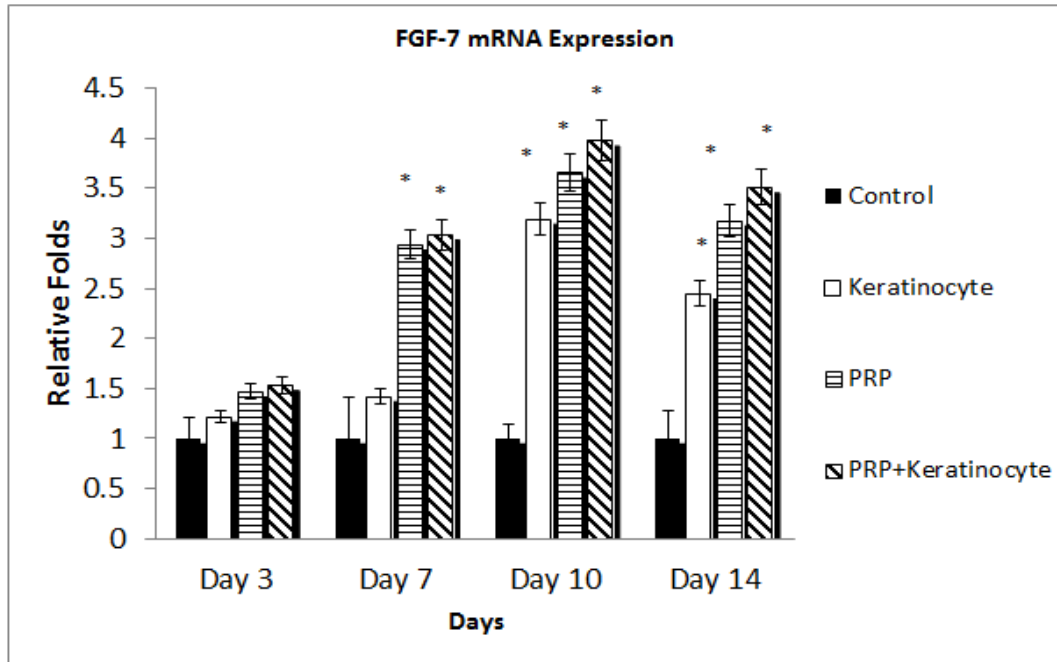
Kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-7 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

7. post-operatif günde PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-7 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır $p < 0.050$.

10. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-7 geninin anlatımlarının $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

14. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-7 geninin anlatımlarının $p < 0.050$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.



Şekil 67. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında FGF-7 geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi. (Ort± Standart Hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, *p< 0.05 düzeyinde istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için)

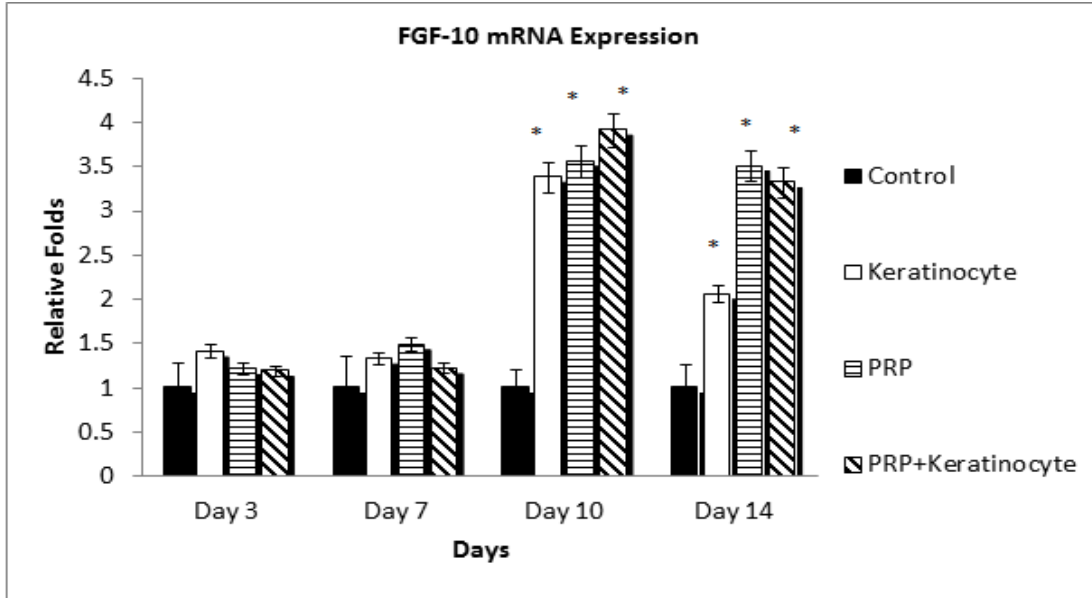
Kontrol grubuna göre diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında:

3. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-10 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

7. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-10 geninin anlatımlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir

10. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-10 geninin anlatımlarının p< 0.050, düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

14. post-operatif günde Keratinosit, PRP ve PRP+Keratinosit uygulanan gruplarda FGF-10 geninin anlatımlarının p< 0.050 düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.



Şekil 68. Keratinosit, PRP ve PRP+keratinosit uygulanan grupların yara dokularında FGF-10 geninin anlatımlarının kontrol grubuna göre değişimi. (Ort± Standart Hata, Mann-Whitney U istatistiksel testi uygulanmıştır, * p< 0.05

düzeyinde istatistiksel anlamlılık, kontrol grubu: STZ ile diyabet geliştirilmiş ve bunun dışında başka ilaç uygulanmamış hayvanlardan alınan dokunun örneği, her bir grup için).

4. TARTIŞMA

Yara iyileşmesinde “Hücre Tedavisi” uygulamaları yeni ve heyecan verici güncel tedavi yaklaşımlarındandır. Bu güne kadar, kronik yara tedavisi için kök hücrelerin potansiyelinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Ancak, diyabetlilerde kök hücre uygulamaları ile ilgili yapılan çalışmalar nispeten sınırlıdır. Sağlıklı insanlara göre enfeksiyon ve amputasyon gibi komplikasyonlara daha yatkın olan diyabetik hastaların yanık, travma vb. sonrası yara iyileşmelerini hızlandırmak ve hastanede kalış sürelerini azaltmak, bakım ve tedavi maliyetlerini düşürmek için diyabetik hayvan modelleri oluşturularak yanık yaralarında hücresel tedavi yaklaşımlarının uygulanmasına ve etkinliğinin araştırılmasına gereksinim vardır.

PRP, α -granüllerin degranülasyonu yoluyla lokal etkili büyüme faktörlerinin trombositlerce salınımını gerçekleştirip yara tamirini başlatarak, hem bir doku yapıştırıcısı hem de ilaç taşıma sistemi olarak görev alır (76-80). Trombositlerin α -granüllerinde taşınan sekretuar proteinler, trombosit-kökenli büyüme faktörü (PDGF-AA, BB ve AB izomerleri), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit faktörü-4, interlökin-1 (IL-1), trombosit-kökenli anjiyogenez faktörü (PDAF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit-kökenli endotelial büyüme faktörü (PDEGF), epitelial hücre büyüme faktörü (ECGF)'dir (81-85). Bu büyüme faktörleri, farklılaşmamış hücrelerin yeni oluşturulmuş matrikse doğru hareketini sağlayıp, hücre bölünmesini uyararak iyileşme sürecine yardımcı olurlar. PRP, kronik yaralarda, makrofajlarla etkileşime girerek sitokin salınımını inhibe edebilir ve enflamasyonu sınırlandırabilir ve böylece doku iyileşmesinin ve rejenerasyonunun hızlanmasına, yeni kapillerlerin büyümesine ve epitelizasyonun hızlanmasına yol açar. PRP içeriğindeki plateletler, makrofajları çeken sinyal proteinlerini üreterek, yara bölgesinin konakçı savunma mekanizmasında rol oynarlar. (86-90).

PRP içeriğindeki büyüme faktörleri, lokal etkide hücre sinyalizasyonlarını etkileyip, yara ortamındaki fizyolojik dengenin daha hızlı kurulmasında etkili olmuştur. Diyabette yara oluşumu sonrası, vaskülogenez ve anjiyogenez ile ilgili

medyatörlerin sinyalizasyonunda oluşan disfonksiyonun, iyileşmenin gecikmesinde etkili olduğu bilinmektedir. trombosit aktivasyonu ile salgılanan pro-anjiyojenik faktörler, VEGF, FGF-2 ve PDGF, yara iyileşmesinde normal sürece hızlandırıcı etki sağlamıştır. Yapılan son çalışmalarda endotelial progenitor hücrelerin, yara yatağına göç edip yeni damarlanma oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (91). PRP içeriğindeki VEGF, bu hücrelerin mobilizasyonunda rol oynayan etkin faktörlerdendir. Bizim çalışmamızda PRP uygulanan grupta VEGF ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak artış göstermiştir. Ekspresyon profilindeki bu farklılık, örneklemelerin alındığı tüm günlerde (3., 7., 10. Ve 14.) devamlılık göstermiştir. İmmunohistokimya sonuçlarında ise özellikle 3. ve 7. günde en fazla artış göstermiştir. PRP uygulama grubunda yapılan immunohistokimya sonuçları ile PDGF analizinde ise, 7., 10. ve 14. günde kontrole göre artış devam etmiştir.

Anjiyogenez, epitelizasyon ve granülasyon doku oluşumunda etkili olduğu bilinen bir diğer faktör FGF ailesi (FGF-2, FGF7, FGF10) olan PRP içeriğinde bulunur. FGF ailesi, ekstrasellüler matriks üzerinde etkili olup, doku iyileşmesi sırasında doku strüktürünün yeniden düzenlenmesinde pozitif regülatör olarak fonksiyon gösterir. PRP grubunda FGF-2 için mRNA ekspresyonunda kontrole göre artış, tüm günler için istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. İmmunohistokimya da ise 3. ve 7. günde mRNA ekspresyonunda gözlenen değişim, valide edilebilmiştir. 14. günde ise doku kurutları devam ettiği için örneklem yapılamamıştır. Doku kurutlarının devam etmesi ise iyileşme sürecinin kontrolde diğer tüm gruplara göre daha geç gerçekleşmekte olduğunun bir göstergesidir. FGF-7 ve FGF-10, her ikisi de 7. Ve 10. günlerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. Ayrıca FGF-10 mRNA ekspresyonunda kontrole göre 3. günde de istatistiksel anlamlılık gösteren bir artış izlendi.

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), trombositlerce salgılanan ve yara iyileşmesinde rolü olduğu bilinen bir başka faktördür. Anjiyogenez, hücre göçü ve proliferasyonu üzerinde stimülatör etkili EGF, keratinositlerde eksprese edilen ErbB1 reseptörü üzerinden MAPK/ERK1 sinyal yolağını aktifler ve proliferasyonun artışı ve keratinosit hücre göçünü sağlar. EGF protein ailesinin birçok farklı üyesinin de keratinosit hücreleri üzerindeki benzer fonksiyonları daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (91). EGF analizinde ise mRNA düzeyleri, PRP uygulandığında, tüm günlerde kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. İmmunohistokimya ile yapılan değerlendirmelerde ise EGF düzeyi, 3. ve 10. günde

kontrole göre artış göstermiş, ancak doku kurutlarının oluşumu kontrol örneklerinde devam ettiğinden, 14. Gün için protein düzeyinin belirlenmesi mümkün olmamıştır.

MCP-1 (CCL2), yara iyileşmesinde oluşan mikroçevrede salgılanan önemli faktörlerden bir tanesidir. Yara iyileşmesi sırasında, monositler, T-lenfositleri, mast hücreleri, keratinositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar üzerinde etkili olan bu faktör, yara bölgesinde enflamasyonun regülasyonu ve anjiyogenez üzerinde etkilidir. Enflamatuvar yanıt, yara oluşumu sonrası yara bölgesinde gözlenir. Ancak yara iyileşme ve rejenerasyon fazına geçildiğinde, enflamatuvar yangı da azalma gözlenir. PRP uygulanmasının, sitokin salınımını bu fazda azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da, PRP uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha hızlı bir iyileşme süreci gerçekleştiğinden, immunohistokimya sonuçlarında kontrole göre MCP-1 ekspresyonu, PRP uygulanan grupta daha azdır. Özellikle 10. ve 14. Günlerde kontrole göre oluşan farklılık, dramatik olarak artış göstermiş, PRP uygulanan grupta mRNA ekspresyonu anlamlı ölçüde azalmıştır.

PRP uygulanan gruptan alınan örneklerde yapılan immunohistokimya sonuçlarında ise MCP-1 düzeyindeki azalma, özellikle 10. ve 14. günlerde açıkça görülebilmektedir. İyileşme sürecini destekleyen PRP uygulaması ile enflamatuvar yanıtın baskılandığı ve rejeneratif fazın gerçekleşmesine bu uygulama ile hız verildiğinin iddia edildiği mekanizmanın, bizim çalışmamız açısından da doğrulanması söz konusu olabilir(92).

Daha önceki çalışmalarda PRP ile fibroblastların kollajen üretimi yönünde indüklendiği ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin yeniden şekillenmesinde PRP'nin etkili olduğu gösterilmiştir (93) Yaptığımız çalışmada da, kollajen-1 ekspresyonu, PRP uygulanan grupta, 3.,7. ve 14. günlerde artış göstermiştir. Immunohistokimya sonuçlarında ise 7. ve 14. günlerde artış gözlenmiştir.

Keratinositler, yara iyileşme sürecinin başlaması, sürdürülmesi ve tamamlanması sürecinde tüm aşamalarda yer alan en önemli hücre grubudur. Keratinositlerin özellikleri yara içindeki konumlarına ve çevresel koşullarına bağlı olarak değişmekle birlikte epitelizasyonun oluşması ve yara yerinin kapanması sürecinde bağ dokusu hücreleri ve bu hücrelerden salgılanan birçok faktör ile iyileşmenin hızlandırabilmesinde önemli etkileri mevcuttur.

Keratinositlerin yara iyileşmesindeki fonksiyonlarını regüle eden çok sayıda parametre bulunur. İntegrinler, EGF, makrofaj stimule edici protein, kemokin ve sitokinler, matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörleri, keratinosit üzerine etkili

sinyal ağlarında görevli proteinlerdir. Yaralanma sonrası sitokinler, IL-6 ve IL-1, hücre göçü için farklı bir keratinosit fenotipinin oluşmasında görevlidir. IL-6, STAT-3-bağımlı yolağı aktive ederek, IL-1 ise FGF ekspresyonunda artış sağlayarak hücre göçünü tetikler. Bunun dışında keratinositlerin otokrin modda proliferasyonu indükleyici özelliklerinin yanı sıra, çevredeki fibroblastlar üzerindeki etkisi de yeniden epitelizasyonda aktif rol oynar. Fibroblastlar üzerinden sağlanan ekstrasellüler matriks elemanlarının bölgede birikimi, yeniden epitelizasyonda keratinosit hareketini destekler (94,95).

Keratinositler yara iyileşme sürecinde önemli görevleri olan bazı sitokinleri bizzat kendileri üretebildikleri gibi aynı zamanda keratinositlerin proliferasyonunu uyaran bazı büyüme faktörlerinin sentezi için fibroblastları uyararak yada fibroblastların myofibroblast fenotipine dönüşümünü sağlayarak daha fazla kollajen ve α -SMA üretimini sağladıklarından, çifte parakrin etkiyle yanık yarası kontraksiyonunu ve iyileşme sürecini hızlandırabilecekleri düşünülmektedir. Yara mikroçevresinde salgılanan Kollajen-1 ekspresyonu, bizim çalışmamızda da ekstrasellüler matriks komponenti olarak değerlendirilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre Kollajen-1a2 mRNA ekspresyonu 7. günde kontrole göre artış göstermiştir. Kombine keratinosit ve PRP uygulanan grupta ise, mRNA artışı 3.,7.,10. ve 14. günlerde izlendi. immunohistokimya sonuçlarında keratinosit uygulanan grupta 7. gündeve keratinosit ve PRP uygulanan grupta 7. ve 10 günlerde anlamlı farklılık gözlemlendi.

Büyüme faktörleri ve sitokinler, yara iyileşmesi ile ilgili olayların regülasyonuna yardımcı olur. Bu moleküllerin hücre göçünü, proliferasyonu ve diferansiyasyonunu indükleyici özellikte sinyallerin karmaşık ve dinamik bir denge içerisinde olmasını sağlıyor olması, aynı zamanda, yara bölgesinde sinyallerin kompleks bir entegrasyon sistemi içerisinde organize olduklarının altını çizmektedir. Yapılan son derlemelerde büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin farklı hücrelerle yara alanındaki interaksiyonlarının detaylı anlatımına yer verilmiştir (96-100). Epitelial uzantıların migrasyonu ile yarayı kaplayan ilk tabaka oluşur ve keratinositler yaranın kapanması için gerekli olan hücre oranının sağlanması amacıyla proliferasyon fazına geçerler. Keratinosit proliferasyon fazının regülasyonu ise büyüme faktörlerinin yeterliliğine, hücre farklılaşmasının derecesine ve hücrelerin yüzeye bağlanma kapasitesine bağlıdır. Yalnızca bazal keratinositler proliferasyon kapasitesine sahipken, suprabazal tabakada yerleşmiş olan ve farklılaşmanın terminal fazındaki

keratinositler bu yeteneğe sahip değildir. HB-EGF, EGF, TGF- α ve KGF, epiteliyasyon sırasında gerçekleşen proliferasyonda önemli rol oynayan büyüme faktörleri arasında yer alır (101-103). Özetle, büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks ve integrinler arasındaki sinerji, yeniden epiteliyasyon sırasında gözlenen keratinosit proliferasyonunun regülasyonunda anahtar rol oynar (104-106). Ayrıca keratinositler, EGF, FGF-2, PDGF, TGF- β 1 ve VEGF faktörlerini salgılayarak, yara iyileşmesini hızlandırırlar.

Yaptığımız çalışmada, yara bölgesine keratinosit hücreleri ile uygulama yapılmış ve farklı büyüme faktörlerinin ekspresyonları, yara bölgesinde 4 farklı günde değerlendirilmiştir. RT-PCR ile izlenen mRNA ekspresyonlarında, EGF, FGF-2, FGF-7, FGF-10 ve VEGF faktörleri değerlendirilmiştir. Normal yara iyileşme sürecindeki kontrol doku örneklerine göre, keratinosit uygulaması sonrası, tüm büyüme faktörlerinin ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir. Yara iyileşme sürecinde sellüler proliferasyonun en hızlı oranda gerçekleştiği periyot, yaralanmadan sonraki 4.günden itibaren başlar (104-106). Buna uygun olarak, keratinosit uygulaması sonrasında kontrole göre büyüme faktörü ekspresyonlarının en yüksek ve anlamlı değişimleri, 7.günde ve sonrası alınan örneklerde gözlenmiştir. Sadece VEGF 3. günde anlamlı artış izlendi. İmmunohistokimya sonuçlarında ise EGF ve VEGF için beklenen artış, 10. günde gözlenebilmiştir.

Kombine keratinosit ve PRP uygulanan grupta, EGF için mRNA ekspresyonunda kontrole göre artış, 7., 10. ve 14. günlerde gözlenmiştir. İmmunohistokimya sonuçlarında da aynı günlerde artış devam etmiştir. Değerlendirilen bir diğer büyüme faktörü, PDGF olmuştur. İmmunohistokimya sonuçlarında, 10. ve 14. günlerde anlamlı artış gözlenmiştir. Kombine tedavi uygulanan grupta, VEGF ekspresyonlarında tüm günlerde artış gözlenirken, immunohistokimya sonuçlarında da aynı ekspresyon profili doğrulanmıştır. FGF-2 ekspresyonu da bu grupta tüm günlerde anlamlı yükseliş gösterirken, immunohistokimya sonuçları da ekspresyon profil sonuçlarını destekler nitelikte elde edilmiştir. FGF-10, 7. ,10. ve 14. gündelerde artış gözlenirken FGF-7 de 10. ve 14. günlerde artış izlendi.

Yara bölgesinde keratinosit hücreleri dışında farklı hücreler de büyüme faktörleri salgılar ve aynı zamanda keratinosit göçü tetiklenir. Alınan sonuçlar doğrultusunda, keratinosit uygulaması ile hücreler arasındaki etkileşimin daha hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştiği, yeterli sayıda keratinosit göçünün ve sinyalizasyon

ile yeniden epitelizasyon sürecinin kısaltıldığı çıkarımı yapılabilmektedir. Keratinosit uygulanan grupta kontrol grubuna oranla gözlenen hızlı epitelizasyon süreci, bu etki mekanizmalarının eksternal uygulama ile daha fazla desteklendiğini ve hızlandırıldığını düşündürmektedir.

MCP-1 geninin çift allelde ortadan kaldırıldığı double knock-out (MCP1^{-/-}) farelerde, yara iyileşme sürecinin bozulduğu ve geciktiği, anjiyogenez sürecinin ve kollajen yapımının da anlamlı ölçüde değiştiği ve kontrole göre azaldığı gösterilmiştir. Keratinositlerce indüklenen enflamatuvar yanıtta MCP-1 ekspresyonu, yara iyileşme sürecinde artış gösterip, immün sistem ilişkili hücrelerin yara bölgesine göçünü hızlandırır (107). Ancak keratinosit uygulaması yaptığımız grupta MCP-1 ekspresyonu PRP uygulanan gruba göre daha fazla ama kontrol gruba göre daha az orandadır. RT-PCR sonucunda, keratinosit uygulanan gruptaki mRNA ekspresyon azalışının kontrole göre en anlamlı değişimi, 10. gün ve 14. günde gözlenmiştir. İmmunohistokimya sonuçlarında ise MCP-1 için benzer profil gözlemlenebilmiştir. Bunun sebebi, uyguladığımız keratinositlerin, bölgeye keratinosit göçü üzerinde ve diğer immün sistem ilişkili sinyallerde değişiklik yaratması olabilir. Böylece bölgeye daha az keratinosit göçüne gerek olmuş ve immün sistem yanıtında da kontrole göre daha az bir aktivasyon gözlenmiş olabilir. İkinci bir bakış açısı, yara iyileşmesinin hızlanması üzerinden yapılabilir. Keratinosit uygulaması, PRP uygulaması gibi, yara iyileşmesinde kontrole göre daha hızlı bir sürece yol açmıştır. Yara iyileşme süreci kontrole göre daha hızlı ilerlemektedir. Bunun sonucunda, enflamatuvar yanıtın yeniden epitelizasyon sürecindeki düşüşü, ilişkili immün sistem medyatörlerine ait protein ve mRNA ekspresyonlarında kontrole göre daha düşük ölçümler olarak sonuçlarımıza yansımış olmaktadır.

MCP-1'in kombine keratinosit ve PRP tedavisi uygulanan gruptaki değerlendirmesinde ise düşüş gözlenmektedir, istatistiksel anlamlı azalış özellikle 10. ve 14. günlerde gözlenmiştir.

TGF- β , bir büyüme faktörü olmanın yanısıra, önemli bir immün sistem modülatörü olarak çalışır. Oldukça kompleks yapılanmada bir sinyal ağının parçası olan bu protein, "pleiotropik etkili" olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca konsantrasyon bağımlı değişimleri, farklı fizyolojik sonuçlar vermektedir. Düşük düzeyde ekspresyonu endotelial proliferasyon ve endotel hücre göçüne sebep olurken, daha yüksek düzeylerde matriks komponentlerinin üretiminde etkili olmaktadır (108). Yaptığımız bu çalışmada, PRP uygulanan grupta, TGF- β 1 ekspresyonu 3. ve 7.

günde artış gösterirken, yalnızca keratinosit uygulanan grupta 7. günlerde artış gözlenmiştir. Kombine keratinosit ve PRP uygulaması yapılan grupta ise 3., 7. ve 14. gün kontrole göre anlamlı artış olmuştur. İmmunohistokimya sonuçlarına göre ise, PRP uygulanan grupta 3., 7. ve 14. günde, keratinosit uygulanan grupta 7., 10. ve 14. günde, PRP ve keratinositin kombine uygulandığı grupta ise 3., 7. ve 14. günde artış gözlenmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, yaptığımız uygulamaların tümünün, yara iyileşmesi üzerine pozitif etkileri olduğu söylenebilir. Öncelikle, adipoz dokudan kök hücrelerin elde edilmesi ve farklılaştırılması aşamasında kullandığımız protokol ve uygulamalar başarılı olmuştur. İmmunoreaktivite ölçümleri ile belirlediğimiz keratinosit belirteçleri, elde edilen hücrelerin karakterizasyonunun başarılı olduğunu yani keratinosit elde edildiğini vurgulamıştır. İkinci bir aşamada ise, yara iyileşmesinde etkileri güncel olarak çalışılmakta olan PRP (platelet yönünden zenginleştirilmiş plazma) ve keratinosit uygulaması tek başına yada kombine yapılmıştır ve sonuçlar ekspresyon profil çalışmaları, histokimyasal çalışmalar ve immunohistokimya çalışmaları ve makroskobik inceleme ile tedavisiz kontrol grubuyla kıyaslamalı değerlendirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda, keratinosit uygulanan gruplarda ve PRP uygulanan gruplarda, yara yerinde epitelizasyonun kontrol grubuna göre daha erken başladığı ve yara yerinin daha erken küçüldüğü, yaranın kapanmasının da daha hızlı gerçekleştiği gözlenmiştir. İyileşme süreci açısından en hızlı, en etkili ve en iyi sonuçlar ise keratinosit hücrelerinin ve PRP'nin kombine uygulanması ile elde edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada PRP, mezenkimal kök hücrelerden elde edilen keratinositler ve her ikisinin kombinasyonu, diyabetik sıçan yanık modeli üzerinde çalışılmış, yara iyileşmesi üzerindeki etkileri tedavisiz diyabetik grupla kıyaslamalı değerlendirilmiştir. Her üç uygulama da fizyolojik iyileşme sürecinde bırakılan yani tedavisiz kontrol gruplarına göre daha hızlı bir iyileşme sağlamıştır. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde ise, kombine uygulamanın, en iyi ve en hızlı iyileşme sürecini sağlayan uygulama olduğu belirlenmiştir. Deneysel olarak yanık oluşturulan hayvan modellemesinde, yara iyileşmesinde rol oynayan faktörlerin bazıları incelenmiştir. Yapılan RT-PCR sonuçları, mikrodizin analizleri ile daha detaylı bir ekspresyon profillemesi yapılarak valide edilebilir ve böylece yara bölgesinde etkili diğer faktörler de değerlendirilebilir. İmmunohistokimya ile protein ekspresyonlarının in situ analizi de Western Blot analizleri ile desteklenebilir.

Ayrıca bu çalışmada, PRP'nin allojenik kullanımda yararlı olduğu da gösterilmiştir. 5 farklı sıçandan elde edilen PRP, yara bölgelerinde topikal olarak uygulandı. İyileşme sürecinin moleküler, immunohistokimyasal ve makroskopik değerlendirmeleri sonucunda PRP içeren tedavi yöntemlerinin uygulandığı gruplarda, kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmalarda en iyi sonuçlar elde edildi. Bu nedenle bu sonuçlara bakılarak, diyabetik yaraların tedavi yöntemlerine allojenik PRP kullanımının eklenmesi önerilebilir. Daha önceki çalışmalarda da farklı rejeneratif tedavi uygulamalarında allojenik PRP kullanımı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da allojenik PRP'nin bir tedavi ajanı olarak etkinliği gösterilmiştir ve in vivo sonuçlarla desteklenmiştir.

Aldığımız sonuçlar, yetişkin mezenkimal hücrelerin keratinositlere dönüştürüldüğü protokolün uygun hücre tipi oluşumu sağladığını göstermektedir. Çalışmada kullandığımız adipoz doku ile ilgili de yorumda bulunmak mümkündür. Bu çalışma sonuçları, yetişkin kök hücrelerin eldesi için zengin bir kaynak olarak, sağlık alanındaki hücresel terapilerde kullanım açısından adipoz dokunun uygun olduğunu ve kök hücreler kullanılarak oluşturulan farklı tedavi yaklaşımlarında kemik iliğine oranla daha pratik ve uygun olabileceğini desteklemektedir. Keratinosit uygulaması ve PRP uygulamalarının kronik ve kapanmayan yaralarda tedavi desteği olarak tek başına yada kombine kullanılabileceği, bu çalışmanın sonuçlarına dayanılarak önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. American Diabetes, Association. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care*,2013; 36 (4): 1033–46
2. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V; et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010-2012; *Lancet* 380 (9859): 2163–96.
3. Kitabchi A, Umpierrez G, Miles J, Fisher, J. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes.". *Diabetes Care*.2009; 32 (7): 1335–43.
4. Rother K. Diabetes treatment—bridging the divide. *The New England Journal of Medicine*.2007; 356 (15): 1499–501.
5. Dorner M, Pinget M, Brogard JM "Essential labile diabetes". *MMW Munch Med Wochenschr*.1977; 119 (19): 671–4.
6. Risérus U, Willett W, Hu F. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in Lipid Research*.2009; 48 (1): 44–51.
7. Ro BI, Dawson TL. The role of sebaceous gland activity and scalp micro oral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff . *J Investigative Dermatol SP*. 2005; 10(3): 194-7.
8. Gawkrödger DJ. *Dermatology, An Illustrated Colour Text*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
9. Silhi N. Diabetes and wound healing. *Journal of Wound Care*.1998; 7, (1) 47-51.
10. Clancy J, McVicar A. Wound healing: a series of homeostatic responses. *British Journal of Theatre Nursing*. 1997; 7 (4) 25-34.
11. Pierce G, Mustoe TA, Altröck BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem* 1991;45:319–26.
12. Everts PA, Brown Mahoney C, Hoffmann JJ, Schonberger JP, Box HA, van Zundert A, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 2006;38(2):174–87.
13. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;114(6):1502–8.

14. Sierko E, Wojtukiewicz M. Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:95–108.
15. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006;118(6):147e–59e.
16. Simon D, Maneul S, Geetha V, Naiket BR. Potential for osseous regeneration of platelet-rich plasma—a comparative study in mandibular third molar sockets. *Indian J Dent Res* 2004;15:133–6.
17. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005;16(6):1043–54.
18. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(6):638–46.
19. DelRossi AJ, Cernaianu AC, Vertrees RA, Wacker CJ, Fuller SJ, Cilley Jr JH, et al. Platelet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;100(2):281–6.
20. Man D, Plosker H, Winland-Brown J. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:229–37.
21. Ellis D, Shaikh A. The ideal tissue adhesive in facial plastic and reconstructive surgery. *Otolaryngol* 1990;19:68.
22. Carlson N, Roach Jr R. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc* 2002;133:1383–6.
23. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004;13:301–9.
24. Stuart J, Kenney JG, Lettieri J, Spotnitz W, Baker J. Application of single-donor fibrin glue to burns. *J Burn Care Rehabil* 1988;9:619–22.
25. Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:766–70.
26. Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato T, Kawase T, et al. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of

- intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *J Periodontol* 2005;76:890–8.
27. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:555–8.
 28. Henderson JL, Cupp CL, Ross EV, Shick PC, Keefe MA, Wester DC, et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J* 2003;82(8):598–602.
 29. Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, Tilkeridis K, Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury* 2008; ISBN/ISSN 1879-0267 (Electronic); doi:10.1016/j.injury.2008.05.002.
 30. Marquez-de-Aracena R, Montero-de-Espinosa I, Munoz M, Pereira G. Subconjunctival application of plasma platelet concentrate in the treatment of ocularburns. Preliminary results. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007;82(8):475–81.
 31. Simman R, Hoffmann A, Bohinc RJ, Peterson WC, Russ AJ. Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing. *Ann Plast Surg* 2008;61(3):337–44.
 32. Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal A, Sola I, Bolibar I, Angel Exposito J, Rodriguez L, et al. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion* 2009;49(1):44–56.
 33. Marx R. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489.
 34. Ganio C, Tenewitz FE, Wilson RC, Moyles BG. The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous plateletderived growth factors. *J Foot Ankle Surg* 1993;32(3):263–8.
 35. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous plateletderived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg* 1986;204(3):322–30.
 36. Vermeulen P, Dickens S, Degezelle K, Van den Berge S, Hendrickx B, Vranckx JJ. A plasma-based biomatrix mixed with endothelial progenitor cells and keratinocytes promotes matrix formation, angiogenesis, and reepithelialization in full-thickness wounds. *Tissue Eng Part A* 2008; ISBN/ISSN 1937-3341 (Print); doi:10.1089/ten.tea.2008.0246.

37. Cervelli V, Gentile P, Grimaldi M. Regenerative surgery: use of fat grafting combined with platelet-rich plasma for chronic lower-extremity ulcers. *Aesthetic Plast Surg* 2009; ISBN/ISSN 1432-5241 (Electronic): doi:10.1007/s00266-008-9302-z. Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, et al. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2009;123(Suppl. (2)):56–64.
38. Foster K. The use of fibrin sealant in burn operations. *Surgery* 2007;142(Suppl. (4)):50–4.
39. Gibran N, Luterman D, Herndon D, Lozano D, Greenhalgh G, Grubbs L, et al. Comparison of fibrin sealant and staples for attaching split-thickness autologous sheet grafts in patients with deep partial- or full-thickness burn wounds: a phase 1/2 clinical study. *J Burn Care Res* 2007;28(3):401–8.
40. Foster K, Greenhalgh RL, Gamelli D, Mozingo N, Gibran M, Neumeister S, et al. Efficacy and safety of a fibrin sealant for adherence of autologous skin grafts to burn wounds: results of a phase 3 clinical study. *J Burn Care Res* 2008;29(2):293–303.
41. Mittermayr R, Wassermann E, Thurnher M, Simunek M, Redl H. Skin graft fixation by slow clotting fibrin sealant applied as a thin layer. *Burns* 2006;32(3):305–11.
42. Marchac D, Greensmith A. Early postoperative efficacy of fibrin glue in facelifts: a prospective randomized trial. *Plast Reconstr Surg* 2005;115:911.
43. Jones B, Grover R. Avoiding hematoma in cervicofacial rhytidectomy: a personal 8-year quest. Reviewing 910 patients. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:381.
44. Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, and Williams LT: Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6896.
45. Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, et al.: Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBPbeta. *J Biol Chem* 2000; 275: 32077.

47. Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, and Van De Water L: The fibronectin synergy site modulates TGF-beta-dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 709.
48. Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, et al.: Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med* 2010; 16: 92.
49. Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, and Ishikawa O: Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 457.
50. Jiang CK, Tomic-Canic M, Lucas DJ, Simon M, and Blumenberg M: TGF beta promotes the basal phenotype of epidermal keratinocytes: transcriptional induction of K#5 and K#14 keratin genes. *Growth Factors* 1995; 12: 87.
51. Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF, Entero H, Lee B, Pastar I, et al.: Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement. *Mol Med* 2007; 13: 30.
52. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, et al.: Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 457.
53. Dovi JV, Szpaderska AM, and DiPietro LA: Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost* 2004; 92: 275.
54. DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, and Kovacs EJ: Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol* 1995; 146: 868.
55. Eming SA, Krieg T, and Davidson JM: Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 514.
56. Brem H, Kodra A, Golinko MS, Entero H, Stojadinovic O, Wang VM, et al.: Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2275.
57. Bauer SM, Bauer RJ, and Velazquez OC: Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovasc Surg* 2005; 39: 293.
58. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al.: Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77: 956.

59. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993;165(6):728–37.
60. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 1998;176(Suppl 2A):26S–38S.
61. Murphy PS, Evans GR. Advances in wound healing: a review of current wound healing products. *Plast Surg Int* 2012;2012:190436.
62. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555–62.
63. Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 1965;12:394407.
64. Oka Y, Orth DN. Human plasma epidermal growth factor/B-urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest* 1983;72:249–59.
65. SULLIVAN KM, LORENZ HP, MEULI M, LIN RY, AND ADZICK NS. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta. *J Pediatr Surg*. 1995;30: 198–203.
66. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84:1470–8.
67. Frank S, Hubner G, Breier G, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995;270: 12607–13.
68. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 2004;164(6): 1935–47.
69. WERNER S, SMOLA H, LIAO X, LONGAKER MT, KRIEG T, HOFSCHEIDER PH, AND WILLIAMS LT. The function of KGF in epithelial morphogenesis and wound re-epithelialisation. *Science*. 1994; 266: 819 – 822.
70. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R () The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. 1982; 31:11-24.

71. Schlegel R, Banks-Schlegel S, Pinkus GS. Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues. *Lab Invest.* 1980; 42:91-96.
72. Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. 1980; 19:1033-1042.
73. ROSSIE D AND ZLOTNIK A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18: 217–242.
74. JACKMAN SH, YOAK MB, KEERTHY S, AND BEAVER BL. Differential expression of chemokines in a mouse model of wound healing. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30: 201–207.
75. DIPIETRO LA, POLVERINI PJ, RAHBE SM, AND KOVACS EJ. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol* 1995;146: 868–875.
76. Lubkowska A , Dolegowska B, Banfi G. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012; 26(2 Suppl 1):3S-22S.
77. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1502-8.
78. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 1986;204(3):322-30.
79. Knighton DR, Doucette M, Fiegel VD, Ciresi K, Butler E, Austin L. The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. *Prog Clin Biol Res.* 1988;266:319-29.
80. Steed DL, Goslen JB, Holloway GA, Malone JM, Bunt TJ, Webster MW. Randomized prospective double-blind trial in healing chronic diabetic foot ulcers. CT-102 activated platelet supernatant, topical versus placebo. *Diabetes Care.* 1992;15(11):1598-1604.
81. Nikolidakis D, Jansen JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(3):249-58.
82. Henderson JL, Cupp CL, Ross EV, et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J.* 2003;82(8):598-602.
83. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7(1):52-62.

84. Millington JT, Norris TW. Effective treatment strategies for diabetic foot wounds. *J Fam Pract.* 2000;49(11 Suppl):S40-8.
85. Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2007;9(3):227-38.
86. Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin SportsMed.* 2009;28(1):113-25.
87. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002;18(1):27-33.
88. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(3):417-20.
89. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun.* 2002;70(12):6524-33.
90. Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2007;16(4):156-65.
91. Tatiana N, Demidova-Rice, Michael R, Hamblin and Ira M. Herman, Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 2: Role of Growth Factors in Normal and Pathological Wound Healing: Therapeutic Potential and Methods of Delivery, *Adv Skin Wound Care*, 2012; 25(8): 349-370
92. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *Journal of periodontology.* 2007;78(4):661-9.
93. Dae M, Young J, M, et al. Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Ann Dermatol.* 2011;23(4):424-31.
94. Sorensen R, Thapa K, Roupe E, Valore U, Sjobring A., Roberts, A. Schmidtchen & T. Ganz. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1878-1885.
95. Pilcher BK, Dumin J, Schwartz MJ, Mast BA, Schultz GS, Parks WC, et al. Keratinocyte collagenase-1 expression requires an epidermal growth factor

- receptor autocrine mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(15):10372-81.
96. Krampert M, Bloch W, Sasaki T, Bugnon P, Rulicke T, Wolf E, et al. Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(12):5242-54.
 97. Sorsa V, Uitto J. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res*. 1999; 251, 67-78.
 98. Wan Y, Belt A, Wang Z, Voorhees J, Fisher G. Transmodulation of epidermal growth factor receptor mediates IL-1 beta-induced MMP-1 expression in cultured human keratinocytes. *International journal of molecular medicine*. 2001;7(3):329-34.
 99. Pierre A. Coulombe, Raphael Kopan, and Elaine Fuchs, Expression of Keratin K14 in the Epidermis and Hair Follicle: Insights into Complex Programs of Differentiation, *The Journal of Cell Biology*, Volume 109, November. 1989; 6 (2) 2295-2312
 100. Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research*. 1997;2(1):41-8.
 101. Morasso MI and Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell* 2005; 97: 173.
 102. Gniadecki R. Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 619.
 103. Marikovsky M, Vogt P, Eriksson E, Rubin JS, Taylor WG, Joachim S, et al. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 616.
 104. Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, and Blessing M. Keratinocyte-derived granulocytemacrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1382.
 105. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, and Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the

cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 1997; 322 (Pt 3): 809.

106. Miranti CK and Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E83. Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, et al.: Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of betacatenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol* 2005; 167: 59.
107. DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, Kovacs EJ. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *The American journal of pathology*. 1995;146(4):868-75.
108. Finnon KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Advances in wound care*. 2013;2(5):195-214.

7. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2014-090
KONU: Onay

25.02.2015

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda "SIÇAN ADİPOZ DOKU KÖK HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞTIRILAN KERATİNOSİTLER VE PRP'NİN DİYABETİK SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSSEL YANIK MODELİNDE KULLANILMASI" isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Prof. Dr. Seda VATANSEVER, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dok. Öğr. Navid HOSSEİNİ MANSOUB, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Doç.Dr. Çığır Biray AVCI, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Yük. Lis. Öğr. Hilala KABADAYI, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurumunuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Rasih YILMAZ
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL

Prof. Dr. Uğur KAYA

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI

Özcan NALBANTOĞLU

Tingiz ÖZCAN

ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM:

- Doctor of veterinary medicine, 2001-2008. Faculty of veterinary medicine, urmia university, Iran.

TEZ ÇALIŞMASI:

Study of histological changes in pregnancy and non pregnancy uterine in first mid pregnancy period of buffalo

- Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı (MSC)

TEZ ÇALIŞMASI:

Farklı Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Ve Propolisin Diyabetik Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Yanık Modelinde Kullanılması

- Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Doktora Programı (Phd)

TEZ ÇALIŞMASI:

Sıçan adipoz doku kök hücrelerinden farklılaştırılan keratinositler ve PRP'nin diyabetik sıçanlarda oluşturulan deneysel yanık modelinde kullanılması

- Master of Business Administration (MBA) Asia higher education institution, Mashhad Iran 2011

YAYINLAR:

Kitap

Aviculture Consumption of Fish Oil: Healthy & Economic views with evaluation of fish oil on streptozotocin-diabetic rats, Lambert Academic Publishing, Germany. NavidHosseini-Mansoub, SaeidChekani-Azar ISBN: 978-3-8465-3899-9

ISI Kapsamında Basılan Makaleler:

1. Influence of dietary fish oil supplementation on humoral immune response and some selected biochemical parameters of broiler chickens., *Agrobiology journal*, 28(1):67-77. Navid Hosseini Mansoub* and Yadollah Bahrami.
2. Effects of Cobalt Radiation on the Rat Brain., *Global Veterinaria* 4 (4): 317-321, 2010 ISSN 1992-6197 IDOSI Publications, 2010., Ali Asghar Tehrani, Abas Siami, Mostaan Khosravi Manesh, Navid Hosseini Mansoub* and Sasan Mizban.
3. Influence of dietary vitamin E and zinc on performance, oxidative stability and some blood measures of broiler chickens reared under heat stress (35 °C)., *Agrobiology journal*, 27(2): 103–110, 2010, Navid Hosseini Mansoub*, Saeid, Chekani-Azar, Ali Asghar Tehrani.
4. Pathological Study of Androgen on the Musculoskeletal System of Male Rat., *Global Veterinaria*, 5 (1): 49-53, 2010 IDOSI Publications, 2010., Ali Asghar Tehrani, Syammak Asri, Navid Hosseini Mansoub*, Mohammad Ali Mohammad Nezhady and Mostafa Habibi.
5. Influence of Replacing Inorganic by Organic Selenium Source in Ration on Performance and Carcass Characteristics of Male Broilers. Navid Hosseini Mansoub, Saeid Chekani-Azar, Sasan Mizban, Mahdi Hamadani, Farhan Ahadi, Alireza Lotfi. *Global Veterinaria* 4 (4): 317-321, 2010
6. Pathological studies on the Incidence of Bracken-fern induced encephalomalacia in rat., Accepted in *Annals of Biological Research*., Ali Asghar Tehrani, Hamed Farajzadeh, Navid Hosseini Mansoub*, Yousef Khalili, Paria Mahboob, Mostafa Mohammadi.
7. Effect of garlic, thyme and yogurt compared to antibiotics on performance, immunity and some blood parameters of broiler chickens., *Indian Journal of Animal Sciences*., 2011, 81(12): 1197–1200, NAVID HOSSEINI MANSOUB* and MOHAMMAD ALI MOHAMMAD NEZHADY.
8. Effect of *Melissa officinalis* L., *Tanacetumbalsamita* L. and *Ziziphora clinopodioides* L. on Performance, Blood Biochemical and Immunity parameters of Laying Hens., *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* ,2012., 7 (1): 74-79, Ali Nobakht, Navid Hosseini Mansoub and Mohammad Ali Mohammad Nezhady.
9. Effect of Replacing Inorganic by Organic Selenium Sources in Diet of Male Broilers on Selenium and Vitamin E Contents and Oxidative Stability of Meat, *Journal of*

Animal and Veterinary Advances, 2010, 9 (10) 1501-1505. Saeid Chekani-Azar, Navid Hosseini Mansoub, Ali Asghar Tehrani, Fahime Valipoure Aghdam, Sasan Mizban

10. The Pathological study of prenatal use of Phenobarbital on the Rat Nervous and Muscular system., Journal of Applied Biological Sciences, 4 (3): 1-6, 2010., 2146-0108., Ali AsgharTehrani, NavidHosseiniMansoub*, Mina maghsoudlo, HakimehRasoolian and SeyedeLaleZabihi.
11. Effects of Probiotics and Food Restriction on Relative Growth and Serum Cholesterol and Triglycerides Contents in Broiler Chickens” Global Veterinaria. 5(6) : 307-311,2010 .Navid Hosseini Mansoub*and MagsoodKafshnochi.
12. Dietary Fish Oil improve performance and carcass characterizes of Broilers Immunized with Sheep erythrocyte, International Journal of Academic Research, Vol. 2. No. 5. September, 2010., SaeidChekani-Azar, Navid Hosseini Mansoub, Yadollah Bahrami, Farhan Ahadi, AlirezaLotfi.
13. Effect of Dietary Supplementation with Fish Oil with Selenium or Vitamin E on Oxidative Stability and Consumer Acceptability of Broilers Meat., Global Veterinaria 4 (3): 216-221, 2010 IDOSI Publications, 2010., FarhanAhadi, SaeidChekani-azar, Habib Aghdam Shahryar, AlirezaLotfi, Navid Hosseini Mansoub, Yadollah Bahrami.
14. Effects of Graded Fat/oil on Egg Production and Quality, Some Biochemical Parameters of Blood and Immunity in Laying Hens., Advances in Environmental Biology, 5(7): 1826-1831, 2011.Ali rasoulpour, Ali Nobakht, Saber Khodayi, Navid Hosseini Mansoub*.
15. The Pathological study of Pre-Natal use of Phenobarbital on The Bone and Brain in Rat, International Journal of Academic Research, Vol. 2. No. 5. September, 2010., Navid Hosseini Mansoub*, Ali AsgharTehrani, ImanEsmaelzadeh, Samayeh Vandghanooni, Alireza Lotfi
16. Effect of fish oil Fed a Low-protein Diet on performance, carcass characterizes and blood indices in Broiler chicks., Annals of Biological Research, 2011, 2 (3): 113-120 NavidHosseiniMansoub*
17. Effect of Carbamates Pesticide on Instar I-II larvae and Adult ArtemiaUrumiana,.Annals of Biological Research, 2011, 2 (3): 515-525. Ali AsgharTehrani, GoodarzSadeghi, Zahra Badamchi, Sonia Sanajou, Navid Hosseini Mansoub* and AfsanehAzhari.

18. Effect of probiotic bacteria utilization on serum cholesterol and triglycerides contents and performance of broiler chickens, *Global Veterinaria* 5 (3): 184-186, 2010, Navid Hosseini Mansoub*
19. Comparative effect of using *Zizaphora* (*Thymus vulgaris*), Garlic and Probiotic on Performance and serum composition of broiler chickens. *Annals of Biological Research*, 2011, 2 (4) : 373-378, Navid Hosseini Mansoub* and Mahmoud Pooryousef Myandoab.
20. Comparison of Effects of Using Nettle (*Urtica dioica*) and Probiotic on Performance and Serum Composition of Broiler Chickens. *Global Veterinaria* 6 (3): 247-250, 2011. Navid Hosseini Mansoub*

* Sorumlu yazar olarak görev aldım.

KONFERANSLARDA BASILAN BİLDİRİLER:

1. Feature of black disease and survey of evaluation of pathologic predisposing factors on the artemia, 16th Iranian Veterinary Congress, April 27-29,2010 Tehran-Iran, NavidHosseiniMansoub*, Mina Magsudlu.
2. Study of the placental pathology in swiss Mouse inoculated Intra Peritoneally with different dilution of *Brucellaabortus* Strain 544., 16th Iranian Veterinary Congress, April 27-29,2010 Tehran-Iran, NavidHosseiniMansoub*, Mina Magsudlu.
3. Effect of replacing inorganic by organic selenium sources in diet of male broilers on, selenium and vitamin E contents and oxidative stability of meat., 2nd International Veterinary Poultry Congress, February 20-21 2010,Tehran-Iran., NavidHoseiniMansoub* , Ali Asghar Tehrani, Mina Maghsoudlou, Moharramkamrani, Iman Izadpanah.
4. Effect of replacing inorganic by organic selenium sources in diet of male broilers onperformance and carcass traits., 2nd International Veterinary Poultry Congress, February 20-21 2010,Tehran-Iran., NavidHoseinimansoub* , SaeidChekani-Azar, Mina Maghsoudlou, MostaanKhosravimanesh.
5. A survey about the condition of buffalo infection to *Cryptosporidium* and *Giardia* species in urmia., Mina Magsudlu , NavidHosseiniMansoub*, Musa Tavassoli., The 1st National Conference on Livestock & Poultry Industry of Golestan Province 23-25 Dec 2008.
6. Study of histological changes in uterine cervix of buffalo in follicular and luteal phases of oestrus cycle for diagnosis of oestrus phase.,NavidHosseiniMansoub* and

Mina Magsudlu., The 1st National Conference on Livestock & Poultry Industry of Golestan Province 23-25 Dec 2008.

7. Measurement of blood and liver manganese in slaughter cows at maraghe., In Proceedings of the 1st International Congress of Large Animal Practitioners,23-24 February 2011, Tehran-Iran.,N.H.Mansoub *, L.zabihi ,S.Samie.
8. Histomorphology study of uterine horn of the river buffalo in the first 6 months pregnancy and comparing it with uterine horn of immature heifer and non pregnant mature buffalo., In Proceedings of the 1st International Congress of Large Animal Practitioners,23-24 February 2011, Tehran-Iran.,N.H.Mansoub* and L.zabihi.
9. Vatansever, H.S. and Kivanc, M. and Boz, E. and Cakir, S. and Cankorur, H. and Mansoub, N.H. and Samancioglu, S. and Ercan, G. "Differentiation of Epidermal and Hair Follicle Stem Cells in Rat Newborn Skin from Maternal Diabetes After Treated with Propolis or Olive Leaf Extract. Ultrastructural & Analytical Methods in Life Sciences, Regensburg, Germany, 25-30 August 2013.
10. Sevgin SAMANCIOĞLU, Aynur ESEN, Gülinnaz ERCAN, Navid Hosseini MANSOUB, Seda VATANSEVER "Diyabetik Yaralarda Oleuropeince Zenginleştirilmiş Zeytin Yaprağı Ekstresinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi: In Vivo Preklinik Çalışma" 15. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Hemşirelik Programı.
11. Deneysel Siroz Modelinde Yağ Dokusu ve Kemik İliğinden Elde Edilen Mezenşimal Kök Hücreler İle Karaciğer Dokusundan Elde Edilen Kök Hücrelerin Kullanım Potansiyelleri" 27-30 Mayıs 2014 tarihleri arasında Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği tarafından düzenlenen XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde Hafize Seda Vatansever, Büşra Akmaz, Canan Bilekyiğit, Elif Aslan, Sevtap Gökalp, Navid Hosseini Mansoub, Gülinnaz Ercan
12. The use of keratinocytes differentiated from rat adipose stem cells and PRP in experimental burn wound model of diabetic rat, Gordon Research Conferences, Tissue&Regeneration 07-12 August,colby-Sawyer, United States.

YABANCI DİL:

Türkçe: Ana Dili

Farsça: Ulusal Dili

İngilizce: IELTS

Arapça: İyi düzeyde

DERGİ HAKEMLİĞİ:

Online Journal of Animal and Feed Research (OJAFR)

VERDİĞİ DERSLER/ AKADEMİK TECRÜBE:

- Biyokimya, Islamic Azad Üniversitesi, Maragheh, 2011 -2012.
- Özel İngilizce, Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Üniversitesi, Maragheh. 2010 - 2012.
- Hayvan Gıdalarında Kalite Kontrol Süreci, Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Üniversitesi, Maragheh. 2010 -2012.
- Biyokimya, Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Üniversitesi, Maragheh. 2010 -2012.

ÇALIŞMA DENEYİMİ:

- Askerde 2008-2010 yıl binicilik kulübünde veterinerlik ve gıda kalite müfettişliği.
- 2010 yılından 2012 yılına kadar Genç Araştırmacılar Kulübü'nde Araştırmacı, İslami Azad Üniversitesi, Maragheh Birimi.
- 2010 yılından 2012 yılına kadar hayvan gıdaları fabrikasında kalite kontrol bölümü başkanı.

BAŞARILAR:

- Birincilik Ödülü "Diyabetik Yaralarda Oleuropeince Zenginleştirilmiş Zeytin Yaprağı Ekstresinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi: *In Vivo* Preklinik Çalışma" 15. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Hemşirelik Programı. Sevgin SAMANCIOĞLU, Aynur ESEN, Gülinnaz ERCAN, Navid Hosseini MANSOUB, Seda VATANSEVER
- İkincilik Ödülü "Deneysel Siroz Modelinde Yağ Dokusu ve Kemik İliğinden Elde Edilen Mezenşimal Kök Hücreler İle Karaciğer Dokusundan Elde Edilen Kök Hücrelerin Kullanım Potansiyelleri" 27-30 Mayıs 2014 tarihleri arasında Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği tarafından düzenlenen XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde Hafize Seda Vatansever, Büşra Akmaz, Canan Bilekyiğit, Elif Aslan, Sevtap Gökalp, Navid Hosseini Mansoub, Gülinnaz Ercan
- Birincilik Ödülü "Deneysel Siroz Modelinde Kök Hücre Tedavisinin Yeri" 28-29 Mart 2013, I.Ulusal Tıp Öğrencileri Proje Yarışması (Celal Bayar üniversitesi). Canan Bilekyiğit, Prof.Dr. Seda Vatansever, Prof.Dr.Gülinnaz Ercan, Navid Hosseini Mansoub, Sevtap Gökalp, Büşra Akmaz, Elif Aslan.

- İkincilik Ödülü “Diyabetik Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Cerrahi Ayak Yara Modelinde Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre ve Propolis Tedavisinin Yara İyileşme Sürecine ve Glisemik kontrole Etkileri” 28-29 Mart 2013, I.Ulusal Tıp Öğrencileri Proje Yarışması (Celal Bayar üniversitesi). Meriç Meriçli, Prof.Dr.Gülinnaz Ercan, Navid Hosseini Mansoub, Prof.Dr. Seda Vatansever, İpek Durmaz.

