

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRESİNDEN FARKLILAŞTIRILAN
EPİDERMAL SERİ HÜCRELERİNDEN KERATİNOSİTLERİN
PRİMER YARA İYİLEŞİMİNDE KULLANIMI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ELGİN TÜRKÖZ ULUER**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. H. SEDA VATANSEVER**

MANİSA 2009

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tez çalışmamın her aşamasında tüm sabır ve fedakârlığı ile daima yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. H. Seda VATANSEVER' e, asistanlığım süresince her zaman desteğini hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN' e, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. V. Sevinç İNAN' a, ve Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU' ya ve tez çalışmamın deneysel modelinin oluşturulmasında emeği geçen Genel Cerrahi A.D. öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hasan AYDEDE' ye, asistanlığım süresince çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Elektron mikroskopik kesitlerin alınmasında yardımcı olan Işıl AYDEMİR' e ve elektron mikroskopik kesitlerin görüntülenmesinde yardımcı olan DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Alper BAĞRIYANIK' a teşekkür ederim.

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

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim annem, babam, kardeşim ve eşimle birlikte hayatıma dahil olan yeni aileme de teşekkür ederim.

Yoğun tez dönemimde bana her zaman destek olan ve moral veren sevgili eşime sabrından dolayı teşekkür ederim.

Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

İÇİNDEKİLER

Sayfa
No

RESİMLER DİZİNİ

TABLolar DİZİNİ

KISALTMALAR

I. GİRİŞ

1

II. GENEL BİLGİLER

2

2.1. Kök Hücreler

2

2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri Ve Kaynakları

4

2.1.1.1. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

4

2.1.1.1.1. Erişkin Kök Hücreleri

4

2.1.1.1.2. Fötal Kök Hücreler

12

2.1.1.1.3. Partenogenezis

13

2.1.1.1.4. Kadavradan Elde Edilen Kök Hücreler

13

2.1.1.2. Embriyonik Kök Hücreler

13

2.1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Farklılaşma

15

Potansiyeli

2.2. Deri ve Deri Eklerinin Gelişimi

18

2.2.1. Epidermis

19

2.2.2. Dermis

20

2.2.3. Deri Bezleri

21

2.2.3.1. Yağ Bezleri (Glandulae Sebaceae)

21

2.2.3.2. Ter Bezleri (Glandulae Sudoriferae)

23

2.2.4. Kılın Gelişimi

24

2.3. Derinin Histolojik Yapısı

25

2.3.1. Epidermis

27

2.3.1.1. Keratinosit

29

2.3.1.2. Melanositler

31

2.3.1.3. Langerhans Hücreleri (Dentritik Hücreler)	32
2.3.1.4. Merkel Hücreleri	33
2.3.2. Dermis	33
2.3.3. Derinin Damarlanması	34
2.3.4. Hipodermis	34
2.3.5. Deri Ekleri: Kıllar, Bezler ve Tırnaklar	34
2.3.5.1. Kıllar	34
2.3.5.2. Bezler	37
2.3.5.2.1. Yağ Bezi	37
2.3.5.2.2. Ter Bezi	38
2.3.5.3. Tırnaklar	40
2.4. Yara İyileşmesi	40
2.4.1. Primer Yara İyileşmesi	40
2.4.2. Sekonder Yara İyileşmesi	41
2.4.3. Sekonder Yara İyileşmesinin Primer Yara İyileşmesinden Farkları	42
2.4.4. Yara İyileşmesinin Evreleri ve Genel İlkeleri	43
2.4.4.1. Hemostaz ve İnflamasyon	45
2.4.4.2. Proliferasyon	47
2.4.4.3. Matürasyon ve Yeniden Yapılanma	49
2.4.5. Yara Kontraksiyonu	51
2.5. Çalışmada Kullanılan Belirteçler	52
2.5.1. Keratinler	52
2.5.2. Monosit- Makrofaj Kemoatraktan Protein-1 [MCP-1(CCL2)]	53
2.5.3. İnterlökin-8 (IL-8)	54
2.5.4. Fibroblast Büyüme faktörleri (FGF)	55
2.5.5. Epidermal Büyüme faktörü (EGF)	56
2.5.6. Kollajen-1	56
III. GEREÇ VE YÖNTEM	58

3.1. STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması ve Kültürü	58
3.1.1. Jelatinle Kaplı Kültür Kaplarının Hazırlanması	58
3.1.2. STO Hücrelerinin Kültürü	58
3.1.3. STO hücrelerinin Mitomisin-C ile Muamele Edilmesi	59
3.2. Embriyonik Kök Hücre Kültürü	60
3.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Pasajlanması	60
3.2.2. Embriyonik Kök Hücrelerin Dondurularak Saklanması	61
3.2.3. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması	61
3.3. Embriyoblastlardan Keratinosit Kültürü	63
3.3.1. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması	63
3.3.2. Keratinositlerin Dondurularak Saklanması	63
3.3.3. Keratinositlerin İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi İle Tanımlanması	64
3.3.4. Keratinositlerin Elektron Mikroskopi Takibi ve İncelenmesi	65
3.3.5. Keratinositlerin Brd-U İle İşaretlenmesi	66
3.3.6. Keratinositlerin Vaseline Gauze Üzerinde Kültüre Edilmesi	67
3.4. Keratinositlerin Yara Yerine Transferi	68
3.5. Işık Mikroskobik İnceleme	70
3.5.1. Parafin Doku Takibi	70
3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması	71
3.5.3. Masson Trikrom Boyaması	73
3.5.4. Brd-U İle İşaretlenmiş Keratinositlerin İncelenmesi	75
3.5.5. İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi	77
3.6. Deri Dokularının Elektron Mikroskopi Takip Yöntemi ve İncelenmesi	81
IV. BULGULAR	82
4.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü	82
4.2. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması	85
4.3. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması	86
4.4. Keratinositlerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi İle	88

Tanımlanması	
4.5. Keratinositlerin Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi	90
4.6. Yara Yerine Transfer Edilen Keratinositlerin Işık Mikroskopik İncelenmesi	91
4.6.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Değerlendirmesi	91
4.6.2. Masson Trikrom Boyaması Değerlendirmesi	95
4.6.3. Brd-U İle İşaretlenmiş Keratinositlerin İncelenmesi	99
4.6.4. İndirekt İmmünohistokimya Uygulamasının Değerlendirilmesi	103
4.6.4.1. Sitokeratin-8 Dağılımı	103
4.6.4.2. Sitokeratin-14 Dağılımı	107
4.6.4.3. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) Dağılımı	111
4.6.4.4. İnterlökin-8 (IL-8) Dağılımı	115
4.6.4.5. Fibroblast Büyüme Faktörü-1 (FGF-1) Dağılımı	119
4.6.4.6. Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2) Dağılımı	122
4.6.4.7. Monosit- makrofaj Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1) Dağılımı	126
4.6.4.8. Kollajen-1 Dağılımı	130
4.6.4.9. Deri Örneklerinin Yarı İnce Kesitlerinin Değerlendirilmesi	134
4.7. Deri Dokularının Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi	138
V. TARTIŞMA	142
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER	158
VII. ÖZET	160
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	163
IX. KAYNAKLAR	167

RESİMLER DİZİNİ	Sayfa No
Resim 2.1: Kök hücre tipleri ve farklılaşabildikleri hücreler	3
Resim 2.2: Bazı erişkin kök hücrelerinin buldukları yerler	5
Resim 2.3: Kemik iliği kaynaklı kök hücreleri ve farklılaşabildikleri hücreler	7
Resim 2.4: Hematopoietik kök hücrelerin tedavide kullanılması	8
Resim 2.5: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştığı dokular	10
Resim 2.6: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve pluripotensisi	14
Resim 2.7: Embriyonik kök hücrelerin kültüre edilmesi	16
Resim 2.8: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve kültürü	17
Resim 2.9: Deri oluşumu- A: 4. hafta, B: 7. hafta, C: 11. hafta	19
Resim 2.10: Kıl ve bağlantılı olan yağ bezi ve erekör pili kasının birbirini izleyen gelişme evreleri	22
Resim 2.11: Ter bezinin gelişiminde, birbirini izleyen evreler. A: 16. hafta, B: 20. hafta, C: 23. hafta, D: 28. hafta	24
Resim 2.12: Deriyi oluşturan tabakalar	26
Resim 2.13: A: İnce deri (H-E), B: Kalın deri (Masson Trikrom) örnekleri	27
Resim 2.14: Epidermisi oluşturan tabakalar ve bazal tabakada yer alan melanosit	28
Resim 2.15: Keratinositin farklılaşması	30
Resim 2.16: Lameller granüllerin sentezi epidermal sıvı bariyeri	31
Resim 2.17: Dermisi oluşturan tabakalar	33
Resim 2.18: Kılı oluşturan tabakalar	36
Resim 2.19: Yağ bezleri	37
Resim 2.20: Ektrin (merokrin) tip ter bezleri	39
Resim 2.21: Apokrin tip ter bezi	39
Resim 2.22: Primer ve sekonder yara iyileşmesi	43
Resim 2.23: Yara iyileşmesinin evreleri; a: inflamasyon, b: proliferasyon, c: matürasyon ve yeniden yapılanma	44
Resim 2.24: Yara alanında bulunan hücreler ve hücrelerden salgılanan moleküller	45
Resim 2.25: Bazal hücrelerin çoğalması ve göçü	49
Resim 2.26: Normal yara iyileşmesi	52
Resim 3.1: Hanging Drop Yöntemi ile oluşturulan kültür ortamı. X100	62
Resim 3.2: Matrijel ve hazırlanışı. X100	63
Resim 3.3: Vaseline Gauze üzerindeki keratinositler. X1000	67
Resim 3.4: Uygun anestezi uygulandıktan sonra ense bölgelerindeki kıllar tüy dökücü krem ile uzaklaştırılan ve tespit edilen denek (A), yara yeri oluşturulduktan	69

sonra (B), yara yerine mesh+hücrelerin transfer edilip pansumanı yapılarak betafix ile kapatıldıktan sonra (C). X100	
Resim 4.1: Kültürün 2. gününde (A) ve 7. gününde (B) fare fibroblast hücreleri. X100	82
Resim 4.2: Mitomisin- C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri (kültürün 7. günü). X200	83
Resim 4.3: Mitomisin- C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerine transfer edilen embriyonik kök hücreler (▼: Embriyonik kök hücreler). X200	84
Resim 4.4: Mitomisin- C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerinde kültürün 1. günündeki embriyonik kök hücre kolonileri. X100	84
Resim 4.5: Kültürün 4. gününde (A) ve 7. gününde (B) mitomisin- C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerindeki embriyonik kök hücre kolonileri. X100	85
Resim 4.6: Hanging drop yöntemi ile oluşturulan embriyoplast. X100	86
Resim 4.7: Hanging drop yönteminden sonra kültürün 5. (A) ve 7. (B) günündeki embriyoplastlar. A: X100, B: X200	86
Resim 4.8: Matrijele transfer edilen embriyoplast kültürü. X100	87
Resim 4.9: Matrijel üzerinde BMP-4 içeren ortamda kültüre edilen embriyoplastlar ve farklılaşan hücreler (A,B). X100	88
Resim 4.10: BMP-4 içeren ortamda kültüre edilmiş embriyoplastlardan oluşturulan yeni pasaj. X100	88
Resim 4.11: Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerde sitokeratin-8 (A) ve sitokeratin-14 (B) immunoreaktivitesi. X400	89
Resim 4.12: Kontrol immunohistokimya boyaması. X100	89
Resim 4.13: Embriyonik kök hücreden farklılaştırılan keratinositlerin yarı ince (A) ve ince kesitleri (B). A: X1000, B: X5000	90
Resim 4.14: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün histokimyasal örnekleri. H-E X100	92
Resim 4.15: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün histokimyasal örnekleri. H-E X100	93
Resim 4.16: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün histokimyasal örnekleri. H-E X100	94
Resim 4.17: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün histokimyasal örnekleri. Masson Trikrom X100	96
Resim 4.18: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün histokimyasal örnekleri. Masson Trikrom X100	97

Resim 4.19: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün histokimyasal rnekleri. Masson Trikrom X100	98
Resim 4.20: Deneş (A), kontrol (B) ve sham (C) grubuna ait 3. gün Brd-U işaretli örneklerde anti-Brd-U boyaması. X1000	100
Resim 4.21: Deneş (A), kontrol (B) ve sham (C) grubuna ait 5. gün Brd-U işaretli örneklerde anti-Brd-U boyaması. X1000	101
Resim 4.22: Deneş (A), kontrol (B) ve sham (C) grubuna ait 7. gün Brd-U işaretli örneklerde anti-Brd-U boyaması. X1000	102
Resim 4.23: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün Sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	104
Resim 4.24: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün Sitokeratin- 8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	105
Resim 4.25: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün Sitokeratin- 8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	106
Resim 4.26: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün Sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	108
Resim 4.27: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün Sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	109
Resim 4.28: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün Sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	110
Resim 4.29: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün EGF immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	112
Resim 4.30: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün EGF immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	113
Resim 4.31: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün EGF immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	114
Resim 4.32: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün IL-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	116
Resim 4.33: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün IL-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	117
Resim 4.34: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün IL-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400	118

Resim 4.35: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün FGF-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	119
Resim 4.36: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün FGF-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	120
Resim 4.37: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün FGF-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	121
Resim 4.38: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün FGF-2 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	123
Resim 4.39: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün FGF-2 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	124
Resim 4.40: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün FGF-2 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	125
Resim 4.41: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün MCP-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	127
Resim 4.42: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün MCP-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	128
Resim 4.43: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün MCP-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	129
Resim 4.44: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün Kollajen-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	131
Resim 4.45: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün Kollajen-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	132
Resim 4.46: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün Kollajen-1 immunoreaktivitesinin dağılımlı. X400	133
Resim 4.47: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait yarı ince kesitlerin 3. gün histokimyasal rneşleri. Toluidin Mavisi X100	135
Resim 4.48: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait yarı ince kesitlerin 5. gün histokimyasal rneşleri. Toluidin Mavisi X100	136
Resim 4.49: Deneş (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait yarı ince kesitlerin 7. gün histokimyasal rneşleri. Toluidin Mavisi X100	137

Resim 4.50: Deney (A, B), kontrol (C, D) ve sham (E, F) gruplarının 3. gün örneklerine ait mikrograflar. A, C, E: X800, B, D, F: X4000	139
Resim 4.51: Deney (A, B), kontrol (C, D) ve sham (E, F) gruplarının 5. gün örneklerine ait mikrograflar. A, C, E: X800, B, D, F: X4000	140
Resim 4.52: Deney (A, B), kontrol (C, D) ve sham (E, F) gruplarının 7. gün örneklerine ait mikrograflar. A, C, E: X800, B, D, F: X4000	141

TABLULAR DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 3.1 Parafin Doku Takibi	71
Tablo 3.2 Hematoksilen-Eozin Boyaması	72
Tablo 3.3 Masson Trikrom Boyaması	74
Tablo 3.4 Anti-Brd-U Boyaması	76
Tablo 3.5 İndirek İmmunohistokimya Boyaması	78
Tablo 3.6 Çalışmada Kullanılan Primer Antikorlar	80
Tablo 4.1 Deney, kontrol, sham ve sağlam deri gruplarının 3., 5. ve 7. günlere ait örneklerinin sitokeratin-8, sitokeratin-14, EGF, IL-8, FGF-1, FGF-2, MCP-1 ve kollajen-1 immünoreaktivitelerinin dağılımı.	135

KISALTMALAR

- AEC: 3-amino-9-ethylcarbazole
AFP: Alfa Feto Protein
B7: Hücre Yüzey Antijeni
bFGF: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP-4: Kemik Morfogenetik Proteini 4
Brd-U: Bromodeoksiüridin
CC: Beta Kemokinler
CCR: Beta Kemokin Reseptörü
CD: Farklılaşma Yığılım Molekülleri
CFU-F: Koloni Oluşturan Birim Fibroblastlar
CGR8: Embriyonik Kök Hücre Hattı
c-kit: Sitokin Reseptörü
CTAP3: Kemokin Bağ Doku Aktive Edici Peptid 3
CXC: Alfa Kemokinler
CXCR: Alfa Kemokin Reseptörü
DAB: Diaminobenzidine
DMEM: Dulbecco' s modified Eagle' s medium
DMP-30: 2,4,6-trisdimetilaminometil fenol
DMSO: Dimetilsulfoksit
DOPA: 3,4 dihidroksifenilalanin
EB: Embriyoplast
EDTA: Etilendiamintetraasidik asit
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
EKH: Embriyonik Kök Hücre
FBS: Fötal Sığır Serumumu
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü

GRO: Büyüme ile ilişkili onkogen
GFP: Yeşil Floresan Proteini
GM-CSF: Granülosit-Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör
H-E: Hematoksilen-Eozin
HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü
HKH: Hematopoietik Kök Hücreler
HLA: İnsan Lökosit Antijen
HTERT: İnsan Telomeraz Katalitik Alt Birimi
IFN- δ : İnterferon Gama
IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL: İnterlökin
IP-10: İnterferon İndüklenebilir Protein-10
kDa: Kilodalton
KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü
LDGF: Lökosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
LIF: Lökemia İnhibitor Faktör
MCP1: Monosit-Makrofaj Kemoatraktan Protein 1
MHC: Major Histokompatibilite Kompleks
Nanog: Homeobox Proteini
Mig: İnterferon Gama ile İndüklenen Monokin
mRNA: Haberci Ribonükleik asit
NAP-2: Nötrofil Aktive Edici Peptid-2
NEAA: Non-essential amino asid
NK: Doğal Öldürücü
NKH: Nöronal Kök Hücreler
Oct-4: Oktamer 4
PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu
PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
pH: Hidrojenin gücü
PKKH: Periferik Kan Kök Hücreleri

PNL: Polimorf Nüveli Lökosit

rER: Kaba Endoplazmik Retikulum

Rex-1: Kök Hücre Belirteci

RNA: Ribonükleik asit

RT-PCR: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SF: Serum Fizyolojik

SH3: Src homolog 3 birim

SOX2: Cinsiyet Belirleyici Bölüm Y Birim 2

SSEA: Evreye Spesifik Embriyonik Antijen

STO: Fare SIM embriyo fibroblast

Stro-1: Kemik İliği Stromal Hücre Antijeni

Thy-1: Hücre Yüzey Antijeni

TRA1: Kök Hücre Belirteci

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TGF: Dönüştürücü Büyüme Faktörü

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

I. GİRİŞ

Deri, vücudun iç ortamının bütünlüğünün korunmasında hayati bir rol oynar. İnsan vücudunun en geniş organıdır ve kaybı yaşamla bağdaşmaz (1). Dünya çapında artmış endüstriyel kazalar sonucu oluşan yanık veya deri yaralanmaları önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Derinin oluşturduğu bariyerin yanık, travma veya herhangi bir dermatolojik hastalığa bağlı akut veya kronik kaybı organizmanın bütünlüğü için basit doku onarım işlemini gerektirir (2). Rejeneratif tıbbın deri greft ve doku mühendisliği araştırmalarının büyük bir kısmını erişkin ve embriyonik kök hücrelerin kullanımı oluşturmaktadır.

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

Son 30 yılda deri yerine geçebilecek birçok materyal geliştirilmiştir. İdeal olan yara kapatici, sıvı kaybını ve infeksiyon riskini azaltmalı ve yara iyileşmesini kolaylaştırmalıdır (1). Bu nedenle embriyonik kök hücrelerin farklılaşabilme özelliklerinden yararlanılarak doku hasarında daha hızlı iyileşmenin sağlanması ve/veya yanık gibi birçok deri travmalarında keratinositlerin farklılaştırılması ile elde edilen otolog ve allojenik deri greftlerinin yara tamirinde kullanılması ile uygulanan tedavilere yönelik çalışmalar son yıllardaki en önemli araştırma konularındandır.

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

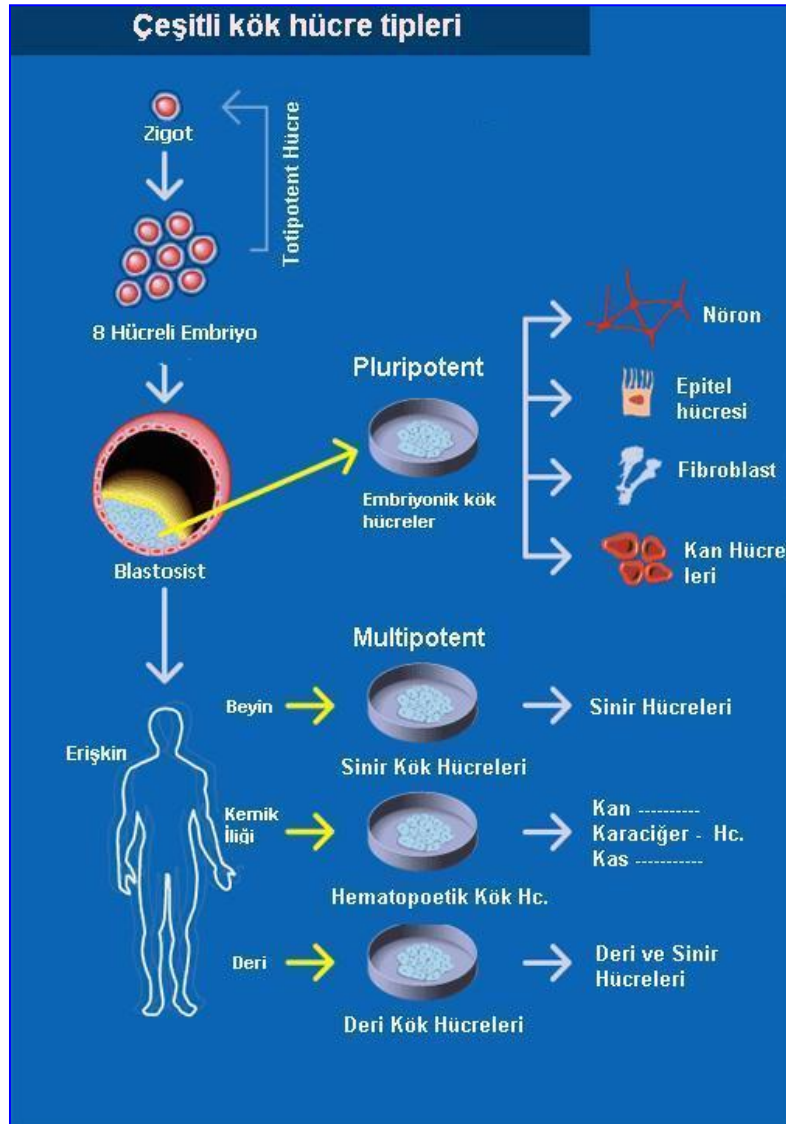
II. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler, bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, farklılaşabilen, hasar gören bir dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen, in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile hücrelerin farklılaşmalarını sağlayabilen hücrelerdir (3, 4, 5). Kök hücreler vücudumuzda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücreler olup henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir (6). Bu özellikleri bakımından kök hücreler hastalıkların tedavisinde veya doku tamirinde kullanılabileceğinden yola çıkılarak, kanser, sinir sistemi hastalıkları (Alzheimer, Parkinson vb.), metabolik hastalıklar (Diabet vb.), organ yetmezlikleri, romatizmal hastalıklar, kalp hastalıkları, kemik veya ortopedik hastalıklar, deri kaybına neden olan bir çok durum (travma, yanık, dermatolojik hastalıklar) gibi birçok alanda önce deneysel modellerde, günümüzde ise klinik olgularda kullanılmaya başlanmıştır (7). Ancak, organ veya doku nakli gerektiren hastaların çokluğu, uygun organ ve dokunun her zaman bulunamaması, immünorejeksiyon gibi sorunlarla sürekli karşılaşılmaktadır (8). Bilim ve teknolojiadaki son gelişmeler doğrultusunda kök hücrelerin bu alanda kullanılması gündeme gelmiştir.

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, multipotent ve pluripotent olarak sınıflandırılırlar (Resim 2.1) (5). Totipotent hücreler, sınırsız farklılaşma ve farklı dokulara yönlenebilmelerinden dolayı vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip embriyonik hücrelerdir (3, 8). Bu hücreler, embriyonik ve embriyo dışı yapıları oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Totipotent hücrelere 4 hücreden 8 hücreye kadar ki tüm blastomerler örnek olarak verilebilir (3). Totipotent hücreler gelişmenin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilirler. Pluripotent hücreler,

totipotent hücreler gibi vücudun bütün hücrelerine dönüşmezler, fakat vücudun birçok hücrelerine dönüşebilecek yetenektedirler. Pluripotent hücreler embriyonun blastokist evresinden itibaren ve fötusta bulunabilen hücrelerdir. Multipotent hücreler gelişmenin daha ileri evresine ait hücrelerdir ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler. Örneğin, multipotent bir kan hücresi diğer özelleşmiş kan hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Multipotent hücreler ise kemik iliği stromal ve mezenkimal kök hücreler gibi yetişkin kök hücrelerdir (7, 8).



Resim 2.1: Kök hücre tipleri ve farklılaşabildikleri hücreler (9).

2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri Ve Kaynakları

Kök hücreler iki farklı kaynaktan elde edilebilirler;

Embriyonik Olmayan Kök Hücreler: Farklılaşmış (özelleşmiş)

kaynaklardan elde edilir. Multipotenttirler. Köken aldıkları özelleşmiş doku ve ilişkili diğer dokular gelişir.

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

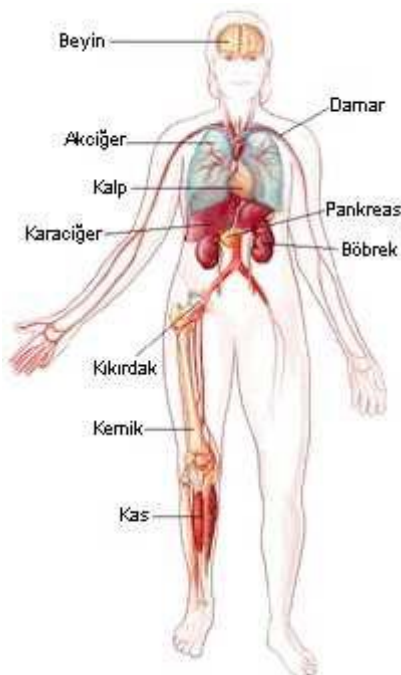
2.1.1.1. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

- Erişkin kök hücreleri
- Fötal kök hücreleri
- Partenot hücreleri (partenogenezis)
- Kadavradan elde edilen kök hücreler

2.1.1.1.1. Erişkin Kök Hücreleri

Erişkin kök hücreleri, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücreler olup, kendini yenileyip köken aldığı organın spesifik hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir (3, 7). Erişkin kök hücreleri vücutta birçok doku ve organda bulunurlar ve buldukları bölgedeki hücrelerin hasar görmesi durumunda çoğalarak hasarlı kısmın onarılmasını sağlarlar. Yakın zamanda deney hayvanları ile gerçekleştirilen çalışmalarda, buldukları ortama göre daha farklı hücrelere de dönüşebildikleri gösterilmiş olsa da, dönüşebildikleri hücre tipleri sınırlıdır. Erişkin bir kök hücrenin bir dokudan diğerine dönüşme özelliğine plastisite

denir (5). Örneğin kemik iliğinden elde edilmiş kök hücreler deneysel şartlarda nöronlara ve beyinde bulunan diğer hücrelere dönüşebilirler. Doğru çevresel şartlar sağlandığında erişkin kök hücrelerin genetik olarak yeniden programlanarak diğer dokuların karakteristik özelliğini taşıdığını gösteren kanıtlar mevcuttur. Bazı bilim adamları, erişkin kök hücresi yerine “somatik kök hücresi” terimini kullanmaktadır (3). Bir organizma olgunlaşırken, kök ve öncül hücrelerin sayısı azalır. Dolayısıyla, erişkinlerdeki dokular az sayıda kök ve öncül hücre içermektedir ve bu hücreler farklı anatomik yerleşimlerle sınırlıdır (Resim 2.2). Olgun bir dokudaki hücrelerin çoğu, kendi buldukları çevreye uyum sağlamış, belirli fenotipik özellikleri olan farklılaşmış hücrelerdir. Dolayısıyla, bir organın yenilenme kapasitesi, yaşla birlikte ve etkin bir şekilde bölünebilen kök ve öncül hücrelerin sayısıyla orantılı olarak azalır. Bu sınırlamalarla birlikte vücut, dokuların yerine konulması ve yenilenmesi için iki büyük strateji geliştirmiştir. Birincisi, farklılaşmış ve işlev gören hücrelerdeki çoğalma kapasitesidir. Hasar sonrası, o bölgede hücre kaybının sınırlı bir şekilde yerine konmasını yönlendirmeye yetecek düzeyde mitojenlerin salındığı ve böylece hücre bölünmesinin uyarıldığı karaciğer, iskelet kası ve damar endotel hücreleri bu gruba girmektedir.



Resim 2.2: Bazı erişkin kök hücrelerinin buldukları yerler (9).

İkincisi ise, bölünebilen kök hücrelerden gelen yeni nesil hücrelerin, farklılaşmış hücrelerin yerini almasıdır. Kan hücreleri buna örnek olarak verilebilir. Bütün hematopoietik hücreler, kendisini yenileyebilen, sınırlı sayıdaki çoğalma potansiyeline sahip hücrelerden oluşurlar ve bu hücreler, olgun kan hücrelerine farklılaşmayı kontrol eden uygun sitokinlerin etkisi altındadır (3).

Erişkin kök hücreleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

- I – Hematopoietik Kök Hücreler
 - a – Kemik İliği Kök Hücreleri
 - b – Periferik Kan Kök hücreleri
 - c – Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri
- II – Stromal (Mezenkimal) Kök Hücreler
- III – Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri

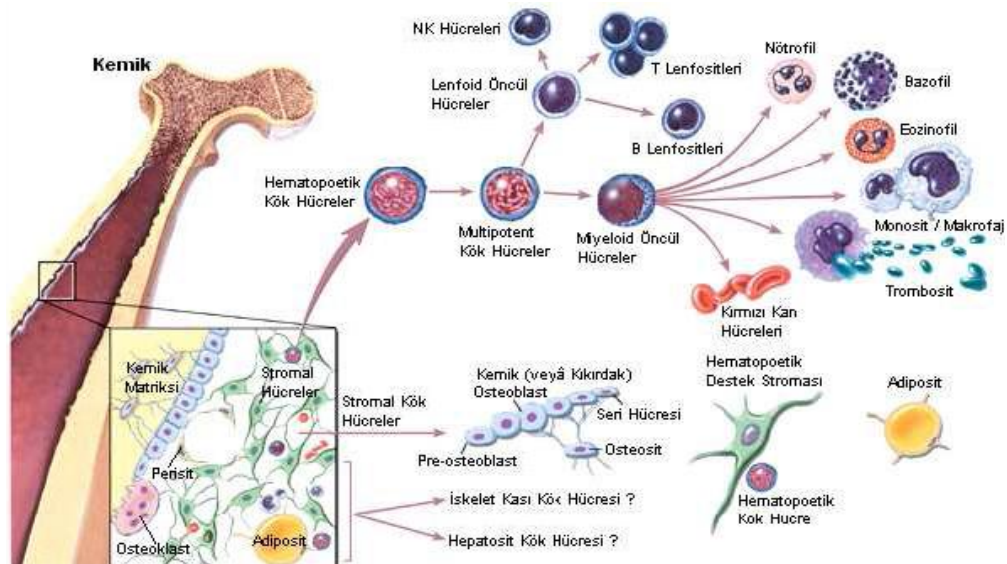
I – Hematopoietik Kök Hücreler (HKH)

Pek çok hastalığın günün birinde kök hücre tedavisiyle iyileştirilebileceğine yönelik beklentiler, kemik iliği nakillerinin lösemi, kalıtsal kan hastalıkları ve bağışıklık sistemini ilgilendiren hastalıklarda ortalama yaşam süresini uzatmasına ilişkin birçok araştırmaya dayanmaktadır. Yaklaşık kırk yıl önce, elde edilen başarılı sonuçlardan sorumlu birincil hücre tipi, hematopoietik kök hücresi olarak tanımlanmıştır. Hematopoietik kök hücrelerinin kemik iliğinde sürekli olarak kendilerini yenileyebilme ve kanda bulunan hücre tiplerine farklılaşabilme yetenekleri, bunları temel erişkin kök hücresi sınıfına sokmaktadır (3, 10, 11, 12, 13). İnsan hematopoietik kök hücrelerin hücre yüzey antijen ekspresyonu CD34⁺ ve CD38⁻ dir (5, 10, 11, 12, 14). Kemik iliği stromal hücreleri denilen ikinci bir grup hücreler ise önceleri hematopoezi indüklemek amaçlı kullanılırken, sonraları osteositlere, kondrositlere, tendinositlere, yağ dokusu hücrelerine ve düz kas hücrelerine

dönüşebildikleri gösterilmiştir (3, 13, 15). Kemik iliği stromal hücreleri mezenkimal kök hücreleri ve multipotent erişkin progenitör hücreleri içerir (14). Hematopoietik kök hücreleri, erişkin insanlardan izole edilebilen az sayıdaki kök hücrelerdendir. Esas itibarıyla, kemik iliğinde yerleşik olan hematopoietik kök hücreler normalde fötüsün karaciğerinde, dalağında, göbek kordonunda, plasentada ve erişkin periferik kanında bulunurlar (3, 12, 13). Hematopoietik kök hücre kaynakları; kemik iliği, periferik kan ve göbek kordon kanıdır.

A – Kemik İliği Kök Hücreleri

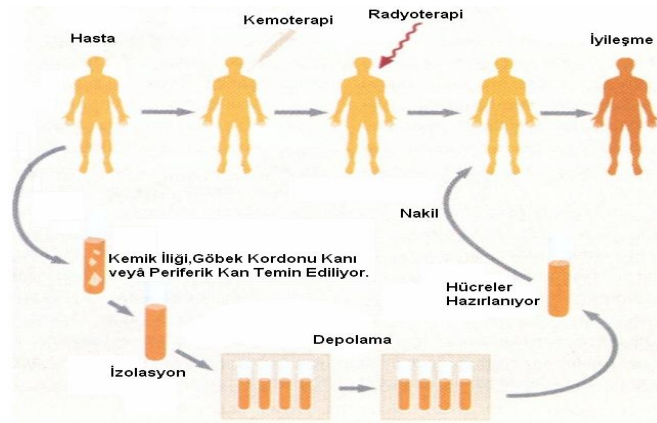
Kemik iliği kök hücreleri, önceleri başta lösemiler olmak üzere çeşitli hastalıklarda kan sistemini tekrar elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Bugün ise, lösemiler dışında solid organ tümörlerinde, doğumsal genetik hastalıklarda ve bazı edinsel kan hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Resim 2.3) (3, 10, 14).



Resim 2.3: Kemik iliği kaynaklı kök hücreler ve farklılaşabildikleri hücreler (16).

B – Periferik Kan Kök Hücreleri

Hematopietik sistemin yeniden kurulmasına ilişkin, kemik iliği kök hücrelerinin klinikte alternatifi olarak son 10-20 yıldır periferik kan kök hücreleri de kullanıma girmiştir (10). İlk başarılı periferik kan kök hücre nakli, 1985' te kronik miyeloid lösemili bir hastada yapılmıştır. Özellikle, lenfomalarda, bazı solit tümörlerde, multiple myelomda ve lösemilerde önemli bir tedavi yöntemi olmuştur (3, 10). Bu tür hastalıklarda periferik kan kök hücrelerinin kullanımının avantajları; düşük tümör hücresi kontaminasyon riski, genel anestezi riskinin olmaması, girişimsel bir işlem gerektirmemesi, poliklinik şartlarında uygulanabilmesi, hızlı engraftman (yerleşim), yineleyen ototransplantasyonların mümkün olması, hastanede yatış süresinin az olması, daha ucuz ve konforlu olmasıdır. Özellikle, hücre ayırıştırma tekniklerinde oluşan gelişmeler ve hematopietik büyüme faktörlerinin mobilizasyon tekniklerine girmesiyle periferik kandan elde edilen kök hücrelerin oranını arttırmak ve yeterli sayıda kök hücre toplamak mümkün olmuştur. Dolayısıyla, klinik nakilde kullanılan insan hematopietik hücrelerin birincil kaynakları arasına periferik kan kök hücreleri (PKKH) de girmiştir (Resim 2.4). Hastada kronik fazın tekrar elde edildiğinin görülmesinden sonra, PKKH' lerinin kullanıldığı otolog transplantasyonlarda büyük bir artış olmuş ve gittikçe otolog kemik iliği naklinin yerine kullanılabilir duruma gelmiştir.



Resim 2.4: Hematopietik kök hücrelerin tedavide kullanılması (9).

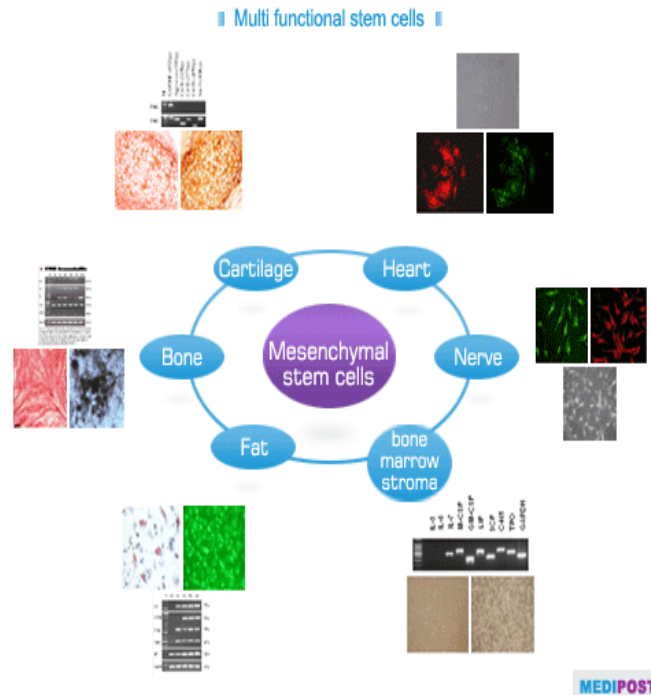
C – Göbek Kordonu Kanı Kök Hücreleri

Göbek kordon kanı önemli bir kök hücre kaynağıdır ve kök hücre kaynağı olarak dünyada 1988 yılından beri kullanılmaktadır (17, 18). Bu hücreler değişik hücre tiplerine farklılaşabilir ve çoğalabilir (18). Göbek kordon kanı kök hücre kaynağı olarak kemik iliğine göre daha güçlü bir alternatiftir. Kordon kanının içerdiği kök hücrelerin yeterliliği, invaziv olmayan yöntemlerle elde edilmeleri, kültürde daha uzun süre yaşamaları, graft versus host hastalığı insidansının azlığı ve diğer allojenik HKH kaynakları (kemik iliği, periferik kan) ile karşılaştırıldığında bir veya iki HLA uyumsuzluğunu daha iyi tolere edebilir olmasından dolayı avantajlıdır (18). Sağladığı bu üstünlükler doğrultusunda göbek kordon kanı toplanması, bankacılığı ve bu hücrelerin tedavide kullanımı bütün dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun yanı sıra spesifik donörden sadece tek bağışın kullanılabilir olması, kordon kanı ünitesinde limitli sayıda HKH bulunması, hematolojik ve immün engraftman oluşumunun gecikmesi ve buna bağlı olarak infeksiyon, kanama ve erken mortalite riskinin artması dezavantajdır (18). Az sayıda kök hücre içermesi nedeniyle yetişkinlerde çocuklardaki kadar yaygın kullanımı yoktur. Kordon kanı umbilikal venden veya doğumdan hemen sonra ayrılmış plasentadan toplanır. Kök hücreler ayrıştırılır. Uygun teknikler kullanılarak - 196⁰ C derecede sıvı nitrojende dondurulur ve dondurulan hücreler daha sonra gerek duyulduğunda çözülerek tedavide kullanılır. Bu işlemler için, 30-60 ml kordon kanı alınması yeterlidir (3).

II – Stromal (Mezenkimal) Kök Hücreler

Kemik iliğinin hematopoietik kök hücrelerine ek olarak mezenkimal kök hücreleride içerdiği gösterilmiştir (13-15, 19, 20). Fibroblast benzeri morfolojiye sahip, koloni olarak çoğalan, kemik, yağ veya kartilaja benzeyen hücrelere farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir (Resim 2.5) (13, 15, 19, 20).

Yapışan hücre kolonileri ilk olarak koloni oluşturan fibroblastlar (colony forming unit fibroblastlar: CFU-F) olarak tanımlanmıştır (13,19). Bu hücreler daha sonra kendini yenileme ve mezenkimal hücre serilerine in vivo ve in vitro farklılaşma yeteneklerine dayanılarak mezenkimal kök hücreleri veya ilik stromal hücreleri olarak terminolojiye girmiştir. Kemik iliği stroması; farklı serilerdeki hücreler ile fibroblast, adiposit ve osteogenik hücreler gibi farklılaşmanın çeşitli düzeylerindeki progenitor hücreleri içerir (13). Kemik iliğinden mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu sırasında öncelikle gradient santrifüj kullanılarak mononükleer hücreler elde edilir ve kültüre edilir. Yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılmasından sonra kültür kabına yapışan hücreler pasajlama yöntemi ile çoğaltılır. İnsan mezenkimal kök hücreleri; CD105, SH3, Stro-1 ve CD13'ü eksprese ederler. Ama hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri olan CD45, CD34, CD14 ve CD11b negatiftir. Mezenkimal kök hücreleri; adiposit, kondroblast, fibroblast, osteoblast, miyoblast, nöronlara ve hepatositlere farklılaşabilirler (21).



Resim 2.5: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştığı dokular (22).

III- Organlarda Yerleşik Diğer Erişkin Kök Hücreleri

Nöronal Kök Hücreler (NKH): Nöronal kök hücreler erişkinlerde; lateral ventrikülün subventriküler tabakasında, hipokampal formasyonun subgranüler tabakasında ve spinal kordda bulunurlar (23). Bu hücrelerde; hücre yüzey belirteci olarak CD133, yapısal protein olarak ara filaman molekülü olan Nestin veya RNA bağlayıcı protein olan Musashi tanımlanmıştır.

Plasenta Kaynaklı Kök Hücreler: Pluripotent embriyonik kök hücre karakterinde olup multipotent kök hücrelerdir (24). Bu hücreler kök hücre belirteçleri olan; c-kit, Thy-1, Oct-4, SOX2, hTERT, SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA1-60 ve TRA1-81' i eksprese ederler. Bu hücreler mezenkimal kök hücrelerine benzerler ve indüklendiklerinde pankreas hücrelerine, hepatositlere, damar endotel hücrelerine ve nöronlara benzeyen hücrelere farklılaşabilirler (24). Bu nedenle plasentadan farklılaşan kök hücreler terapötik ve toksikolojik uygulamalarda kullanılabilirler. Kullanımları çok yaygın değildir.

Karaciğer kökenli kök hücreler: Hepatoblastlar embriyonik gelişim sırasında iki hepatik epitelyal hücre serisini; hepatositleri ve bilier hücreleri oluştururlar (25). Bilier epitelyal hücreler hepatoblastlara yakınlığından dolayı iki serinin belirteçlerini de eksprese eder. Albumin ve AFP hepatosit belirteçleri olarak ve sitokeratin-7 ve 19 safra kanalı epiteli belirteçleri olarak eksprese edilir. Hering kanalı hücreleri kök hücre özelliğindedirler. Bu hücreler oval hücreler olup, fetal hepatosit ve bilier hücrelere farklılaşabilirler. O nedenle bu hücrelere bipotensiyel progenitör hücreler adı verilir. Kaynağı tam olarak bilinmeyen ama bilier kanal epitelinin köken aldığına inanılan kültüre karaciğer epitel hücreleri kalbe ve diğer dokulara transplante edildiklerinde kardiyak miyoblastlara ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilirler.

Fakat hepatosit progenitör hücrelerin kültürü sırasında en önemli problem hepatosit olmayan hücrelerin farklılaşan hücreler arasında yer almasıdır. Oval hücreler; genellikle hematopoitik serilerle ilişkili antikörlara, Thy-1, CD34, c-Kit gibi, karşı immünreaktiftirler (26). Karaciğer epitel hücrelerinin deriden farklılaşan multipotent kök hücrelere benzerlik gösterdiği ve glia, nöron, düz kas hücresi ve yağ hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir.

Epidermal kök hücreler: Normalde in vivo ortamda yavaş bir siklusa sahip, kendi kendini yenileyebilen ve uzun süre dokuda kalabilen, yara iyileşmesi sırasında aktive olan veya in vitro ortamda yüksek oranda proliferasyon gösteren, epidermis, saç folikülü ve yağ bezlerine farklılaşabilen hücrelerdir. Multipotenttirler, kıl folikülünün bulbus bölgesinde birkaç yüzey epidermal hücreleri ile birlikte lokalizedirler. Farede bulbus bölgesi, kıl folikülündeki tüm epitelyal hücre tiplerini içerir. O nedenle insan, fare veya sıçan epidermal kök hücreleri ile çalışılır iken, bunlara dikkat edilmesi gerekir. Epidermal kök hücreler hem in vivo hem de in vitro ortamda integrin β 1 eksprese ederler. Bununla beraber, integrin α 6, transferrin reseptörü CD71, sitokeratin-15 ve 19 eksprese ederler. Fakat bu hücreler CD34 negatiftir (27).

2.1.1.1.2. Fötal Kök Hücreler

Kök hücreler, spontan olarak sonlanmış ya da ebeveynlerin izni ile ilgili hekimlerce yasal ve sistemli olarak sonlandırılmış olan gebeliklerin sonucu fötuslardan elde edilir (3). Bu tip kök hücreler oldukça sınırlı sayıdadır ve nöral kök hücrelere, hematopoitik kök hücrelerine ve pankreas adacık öncül hücrelerine farklılaşabilirler (28). Fötüsün beyinde çok sayıda bulunan nöral kök hücreler izole edilerek kültür ortamında farklılaşmamış olarak çoğalmaları sağlanabilir ve bu hücrelerin, üç temel tipteki beyin hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir. Bu hücreler Parkinson hastalığının kemirici modellerinde kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir (3) .

2.1.1.1.3. Partenogenezis

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

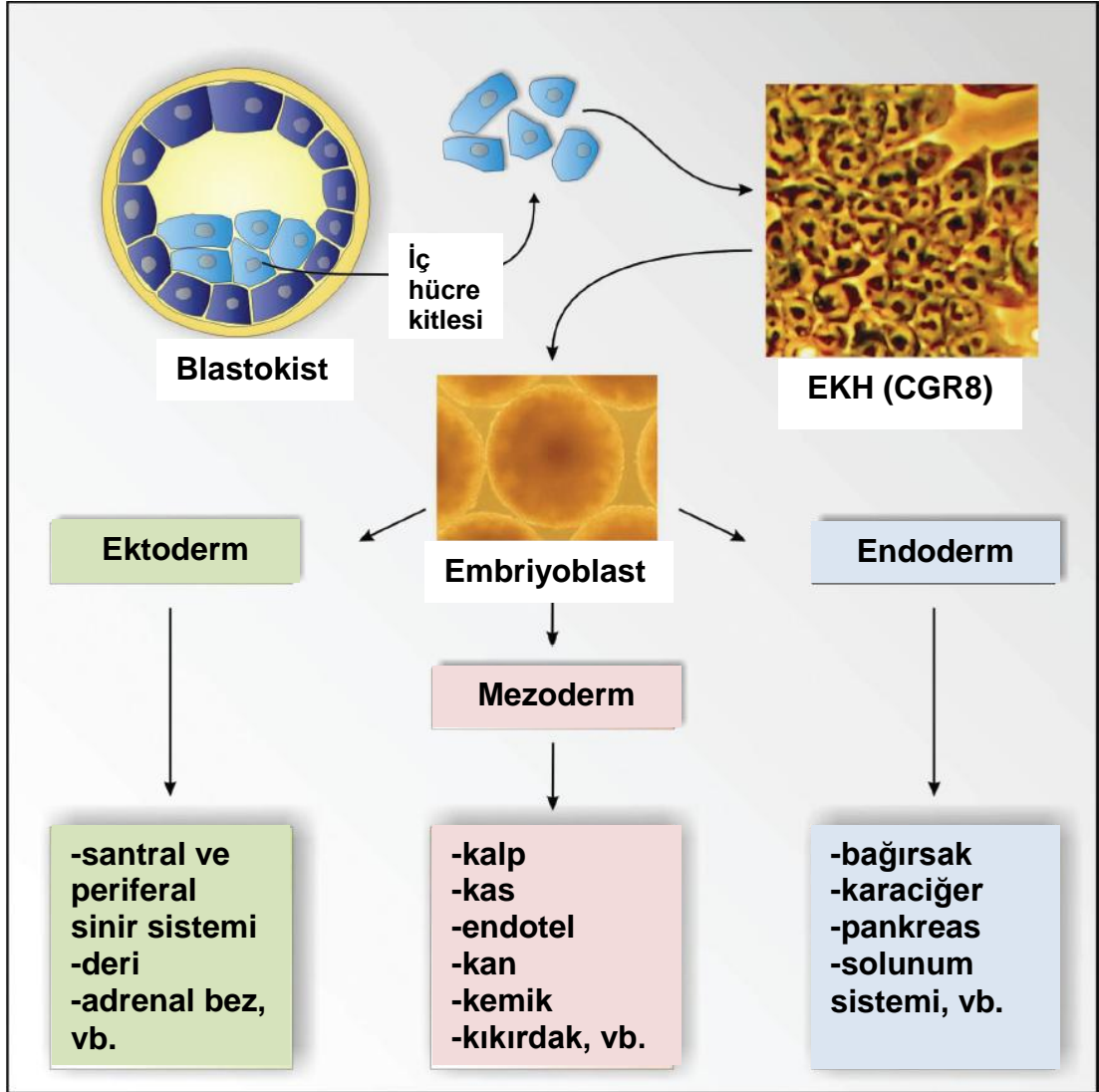
2.1.1.1.4. Kadavradan Elde Edilen Kök Hücreler

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

2.1.1.2. Embriyonik Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler arasında en çok çalışılan embriyonik kök hücrelerdir (5). Embriyonik kök hücreler vücuttaki her hücre ve doku tipine farklılaşabilme kapasiteleri ile doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında büyük bir potansiyele sahiptirler (29). Fare embriyonik kök hücreleri ilk defa 20 yıldan fazla bir süre önce tanımlanmış olup blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (5, 21, 29, 30, 31, 32, 33). Uygun kültür ortamı sağlandığında bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin farklılaşması da sağlanabilir (Resim 2.6) (5, 29, 32, 33).

Embriyonik kök hücrelerin çeşitli hücrelere farklılaşabilme özelliklerinden yararlanılarak doku hasarında daha hızlı iyileşmenin sağlanması veya sinir hücresi gibi hasarlandıktan sonra yerine konması mümkün olmayan hücrelere farklılaştırılarak yara tamirlerinde kullanılması son yıllardaki en önemli araştırma konularındandır.



Resim 2.6: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve pluripotensisi (33).

Embriyonun ilk hücresele farklılaşması morulayı oluşturan hücrelerin blastokist hücrelerine farklılaşmasıdır. Morulanın dış tarafında bulunan hücreler sıvı transportunu sağlayan ve blastoselin oluşmasında rol oynayan trofoblast epitel hücrelerine farklılanır. İçte bulunan morula hücreleri ise blastokistin iç hücre kitlesini oluşturur. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent kök hücreler olup embriyoyu oluşturacak olan tüm dokuların esas

kaynağıdır (Resim 2.6). İç hücre kitlesini oluşturan hücreler onların esas kaynağı olan totipotent morula hücreleri gibi artık totipotent değildirler (29).

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

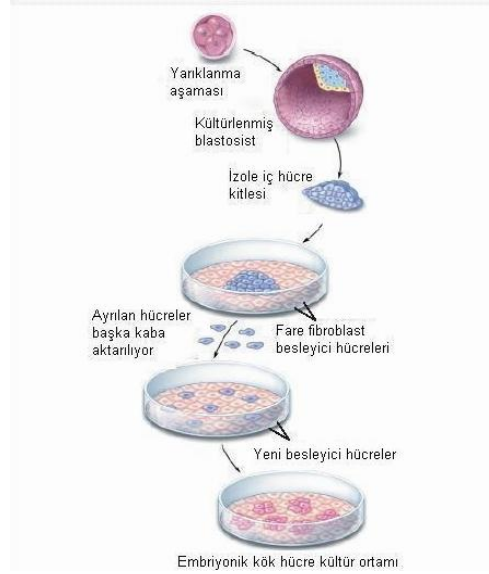
2.1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Farklılaşma Potansiyeli

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

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

Kendini yenileme yeteneği ile ilgili belirteçlerin tanımlanması, bunu sürdürmek için ilk önemli sorunu oluşturmaktadır (5). Fare ve insan embriyonik kök hücreleri; besleyici tabaka olarak, farklılaşmaları ve çoğalmaları durdurulmuş fare embriyonik fibroblastları kullanılarak serum içeren kültür vasatı içinde kültüre edilirler (Resim 2.7) (5). Fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin pasajlanması birbirinden farklıdır. Fare embriyonik kök hücreleri 2- 3 günde bir subkültüre edilir. Tek hücre elde etmek için koloniler tripsinle enzimatik olarak ayrıştırıldıktan sonra fare embriyonik fibroblastlarının bulunduğu ortama alınır. İnsan embriyonik kök hücreleri ise 6- 7 günde bir subkültüre edilir ve küçük hücre grupları şeklinde

pasajlanır. İnsan embriyonik kök hücreleri tek tek hücrelerden ziyade koloniler şeklinde çoğalma yeteneğine sahiptir ve genellikle mekanik (manual) ayrıştırma tercih edilir (5).

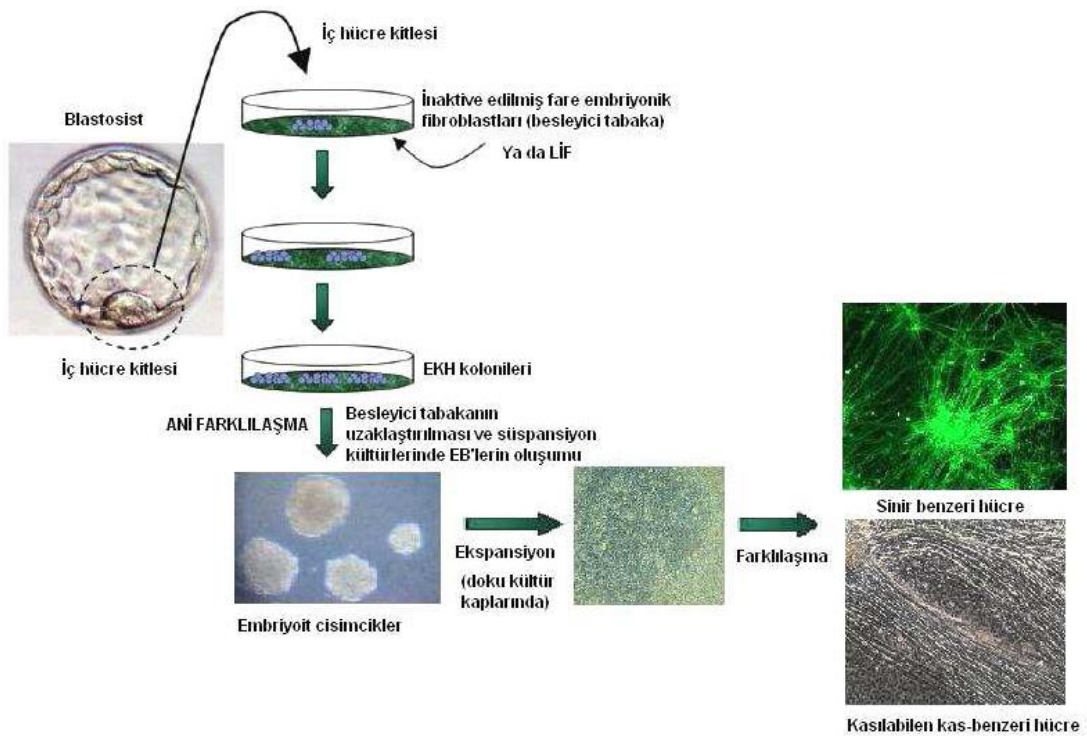


Resim 2.7: Embriyonik kök hücrelerin kültüre edilmesi (36).

Fare embriyonik kök hücrelerinin morfolojileri tipiktir ve kolaylıkla alttaki fibroblast tabakasındaki hücrelerden ayırt edilebilir. Hücrelerdeki çekirdeğin sitoplazmaya oranı daha fazladır ve çekirdekçik belirgindir (34). Transkripsiyon faktörleri; oct-4, nanog ve rex-1 ve hücre yüzey belirteçleri SSEA-1 farede, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81 insanlarda bulunur (34, 35).

Kendini yenilemeyi destekleme ve farklılaşmayı önleme yeteneğine sahip olan faktör; altta bulunan besleyici hücreler tarafından oluşturulur (Resim 2.8). Bu faktör, lösemi inhibe edici faktör (LIF) olarak tanımlanmıştır (33, 34, 35). LIF, IL-6 sitokin ailesinin bir üyesidir. LIF sayesinde embriyonik kök hücrelerin besleyici hücreler olmaksızın da jelatinli doku kültür kaplarında serumlu ortamda üremeleri sağlanmıştır. Bununla beraber embriyonik kök hücreler kültürde LIF' e bağlı olarak ürerken, LIF veya LIF reseptörü eksik

olan embriyoların da gerekli normal gelişmeyi gösterdikleri saptanmıştır (34). LIF' in fare embriyonundaki fizyolojik rolünün; embriyonik gelişimin yavaşlaması sırasında iç hücre kitlesinin yaşayabilirliğini sürdürmek olduğu düşünülmektedir (34).



Resim 2.8: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve kültürü (9).

Fare modelinde, embriyonik kök hücreler spontan olarak üç boyutlu agregatlar oluştururlar ve LIF' in kültür ortamından uzaklaştırılması ile farklılaşırlar (5, 29). Bu üç boyutlu agregatlara embriyoblast denir. Fare embriyonik kök hücrelerinden embriyoblast oluşumu kolonilerin tek hücre haline getirilmesi ve hücrelerin kümeler oluşturmasını sağlayacak ortama

konması ile elde edilir. Bununla beraber aynı büyüklükte embriyoblastlar elde edilebilen ve hücre sayısının kontrollü olarak yapılabildiği damla (hanging drop) metodu en sık kullanılan yöntemlerdendir (5, 29). İnsan embriyonik kök hücreleri için embriyoblast oluşumu, daha çok tercih edilen mekanik yolla elde edilen kolonilerin uygun ortama konması ile sağlanmaktadır (5). Enzimatik (kollajenaz) veya kimyasal ayırma (EDTA) yolları ise hücrelere zarar verebileceği düşünüldüğünden çok tercih edilmez. İnsan embriyonik kök hücreleri kolonilerinden elde edilen embriyoblastların aynı büyüklükte ve hücre sayısının her bir embriyoblastta aynı olmaması bir dezavantajdır (5). Kök hücreler kullanılarak yapılan hücre replasman tedavisi uygulamalarının birçoğu diabet için β hücreleri veya Parkinson için dopaminerjik nöronlar gibi özgün hücre tiplerinin üretimini gerektirir (5). Tek hücre tabakası veya embriyoblast şeklinde spontan farklılaşma kontrolsüz olarak farklı tiplerdeki hücrelerin karışık popülasyonuna yol açar. Embriyonik kök hücrelerin spesifik bir yöne farklılaşmasını sağlamak için farklılaşmayı, proliferasyonu veya spesifik hücre tiplerinin hayatta kalımını indükleyecek büyüme faktörlerinin gereksinimine ihtiyaç vardır (5, 29, 33, 35). Büyüme faktörlerinin kullanımı, istenilen hücre popülasyonunu sağlamayı güçlendirirse de farklılaşmış hücrelerin karışık popülasyonu hala bulunmaktadır (5).

2.2. Deri ve Deri Eklerinin Gelişimi

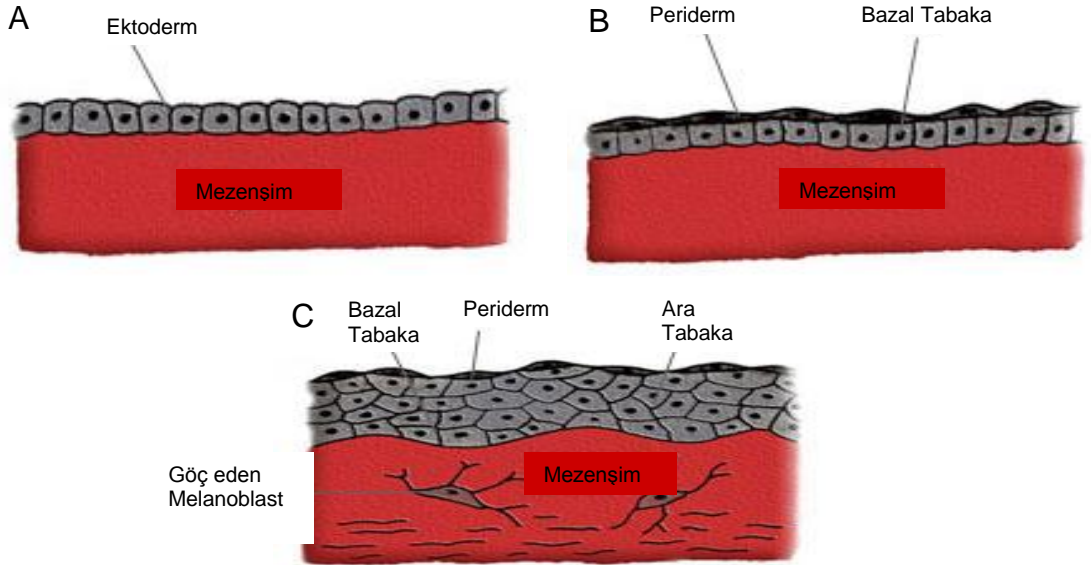
Vücudun koruyucu örtüsü olan deri vücudun en büyük organıdır. Deri, yüzey ektodermi ve onun altındaki mezenşimden köken alan iki tabakadan oluşur.

- a) Epidermis, yüzey ektoderminden gelişen yüzeyel bir epitel dokudur.
- b) Dermis, mezenşimden gelişmiş sıkı, düzensiz bağ dokusundan oluşan daha derin bir tabakadır.

Embriyonik deri, 4- 5. haftalarda mezodermi örten tek katlı yüzey ektoderminden gelişir.

2.2.1. Epidermis

Başlangıçta embriyonun dışı tek sıralı bir ektodermal hücre tabakasıyla örtülüdür (Resim 2.9 A). İkinci ayın başında, bu epitelyum ikiye bölünür ve embriyonun dış yüzeyi periderm veya epitrikiyum adı verilen yassı hücrelerle kaplanır (Resim 2.9 B). Bazal tabakadaki hücrelerin daha ileri proliferasyonu ile üçüncü bir ara bölge oluşur (Resim 2.9 C). Dördüncü ayın sonunda, epidermis son ve kesin şeklini alır ve artık dört tabaka ayırt edilebilir hale gelir.



Resim 2.9: Deri oluşumu- A: 4. hafta, B: 7. hafta, C: 11. hafta (37).

Germinatif tabaka olarak da bilinen bazal tabaka, yeni hücrelerin yapımından sorumludur. Bu tabaka daha sonra, deri yüzeyinde parmak izini oluşturacak olan girinti ve çıkıntıları meydana getirir.

Spinöz tabaka, ince tonofibriller içeren ve büyük polihedral hücrelerden oluşan kalın bir tabakadır.

Granüler tabaka, hücreleri küçük keratohyalin granüller içeren bir tabakadır.

Boynuzsu tabaka birbirine sıkıca bağlanmış ve keratinle dolu ölü hücrelerden oluşur. Periderm hücreleri genellikle intrauterin hayatın ikinci yarısında dökülür ve amniyotik sıvı içinde bulunabilirler.

Gelişimin ilk üç ayı süresince, epidermis nöral krest kökenli hücreler tarafından işgal edilir. Bu hücreler, dendritik uzantılar yoluyla epidermisin diğer hücrelerine de transfer edilebilen, melanin pigmentini sentezlerler. Melanosit adıyla bilinen bu hücreler doğumdan sonra derinin pigmentasyonunu sağlarlar (Resim 2.9).

2.2.2. Dermis

Dermis lateral plak mezodermi ve somitlerden gelen dermatomlardan köken alır (Resim 2.9). Üçüncü ve 4. aylar süresince, korium adı verilen bu doku, epidermis içine doğru uzanan çok sayıdaki düzensiz papiller yapıları, dermal papillaları oluşturur. Bu papillalar genellikle, küçük bir kapiller veya duyu sinir uçlarını içerirler. Dermisin daha derin tabakası olan subkorium önemli miktarda yağ dokusu içerir.

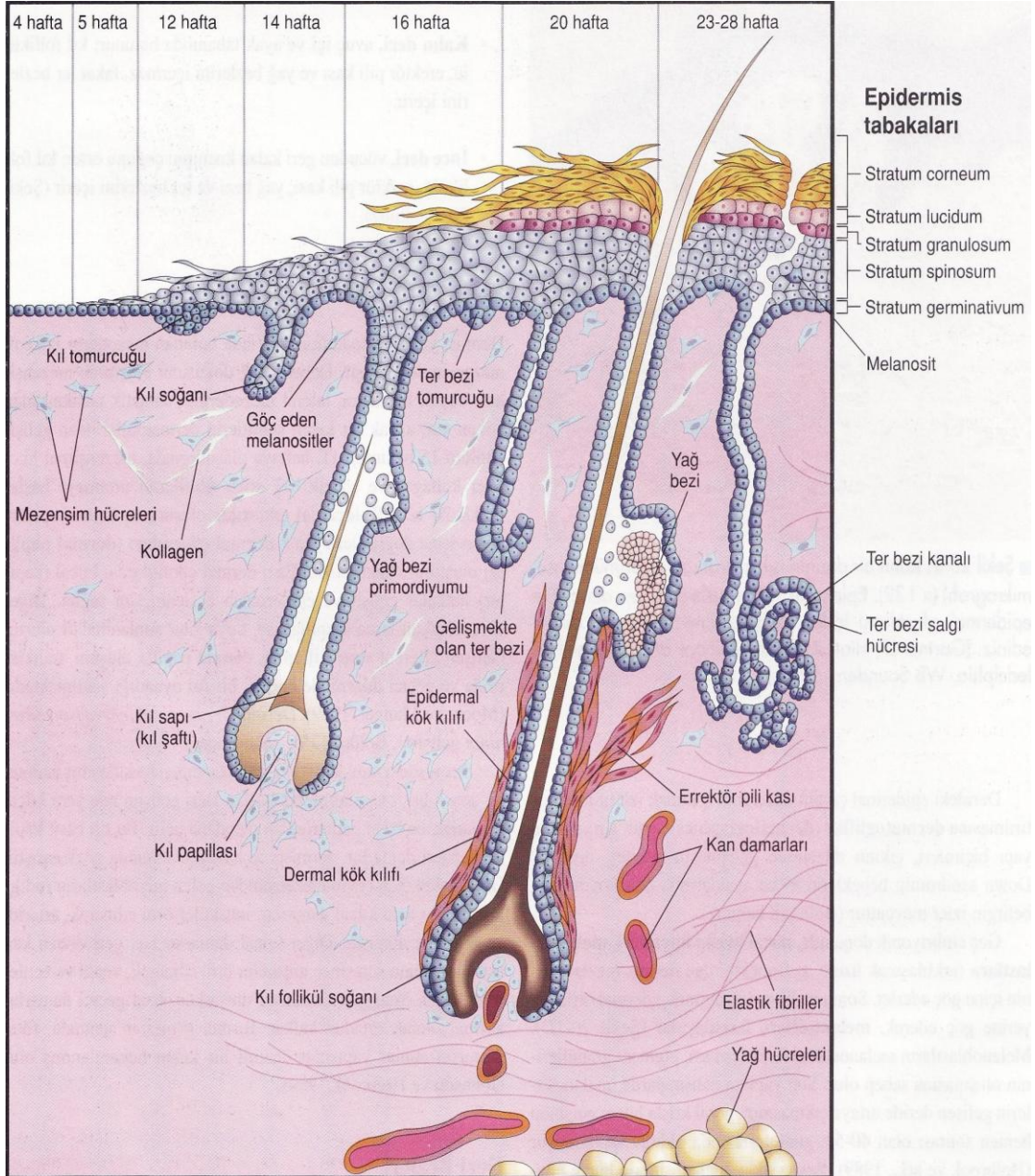
Doğumda deri, sebase bezlerin salgıları, dejenere olmuş epidermal hücre ve kıllardan oluşan beyazımsı bir tabaka verniks kazeoza ile örtülüdür. Bu tabaka deriyi, amniyotik sıvının zedeleyici etkisinden korur (38).

2.2.3. Deri Bezleri

Yağ ve ter bezleri olmak üzere iki tip bez, epidermisten farklılaşarak dermis içine doğru büyür.

2.2.3.1. Yağ Bezleri (Glandulae Sebaceae)

Yağ bezlerinin büyük bir kısmı, kıl foliküllerinden gelişen epitel kök kılıflarının yan tarafından tomurcuklar olarak meydana gelir (Resim 2.10). Bu glandüler tomurcuklar, kendilerini çevreleyen embriyonik bağ dokusu içine büyüyerek, birkaç alveol ve kanallarının primordiyalarını oluşturmak için dallanır. Alveollerin merkez hücreleri yıkılarak, yağlı bir salgı olan sebümü yapar. Bu salgı, kıl foliküllerine verilip deri yüzeyine ulaştınca, deskuame olmuş peridermal hücrelerle birleşerek verniks kazeozayı oluşturur. Kıl folikülleri ile bağlantılı olmayan yağ bezleri de benzer şekilde epidermisten tomurcuklar halinde gelişir (39).

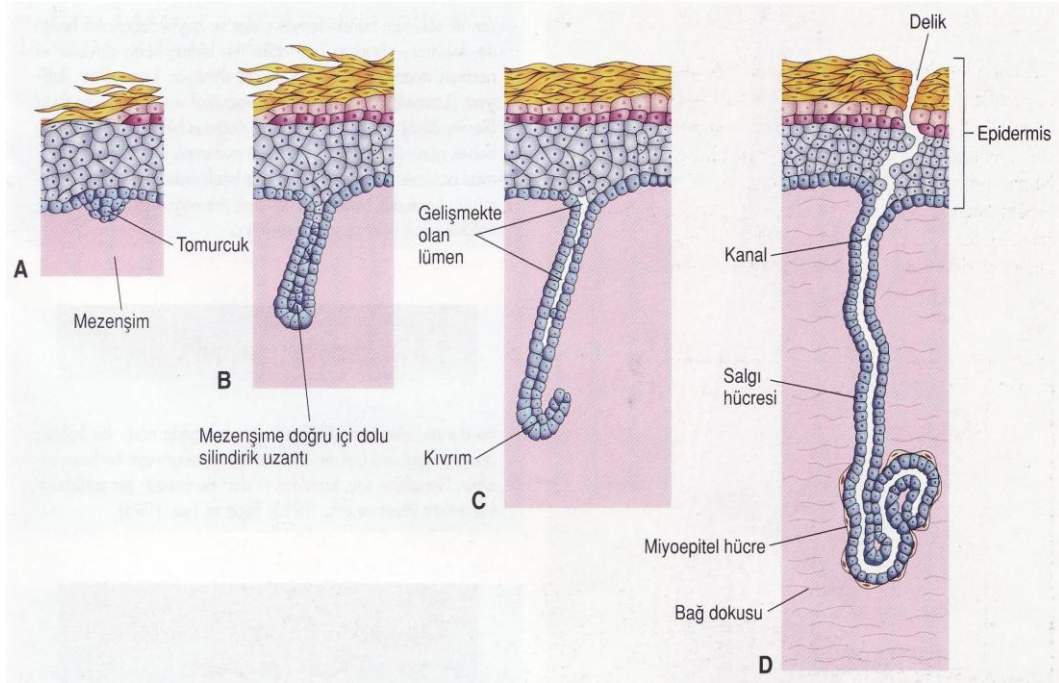


Resim 2.10: Kıl ve bağlantılı olan yağ bezi ve errektör pili kasının birbirini izleyen gelişme evreleri (39).

2.2.3.2. Ter Bezleri (Glandulae Sudoriferae)

Ekrin ter bezleri vücut derisinin büyük bir kısmında bulunur. Bu bezler, epidermal çıkıntılarının altta bulunan mezenşim içine doğru uzamasıyla gelişir (Resim 2.10). Tomurcuklar uzadıkça bunların son kısımları kıvrılarak, bezin salgı kısmının primordiyumunu oluşturur (Resim 2.11). Gelişen bezin epidermise tutunan epitel kısmı ise, kanalın primordiyumunu oluşturur. Bu primordiyal kanalların merkez hücreleri dejenere olup, bir lümen oluşturur. Bezin salgı yapan kısmının perifer hücreleri, miyoepitel hücre ve salgı hücrelerine farklılaşır (Resim 2.11). Miyoepitel hücrelerin, terin bezlerden dışarı atılmasına yardımcı olan özelleşmiş düz kas hücreleri olduğu düşünülmektedir. Ekrin ter bezleri, doğumdan kısa bir süre sonra fonksiyonel duruma geçerler.

Büyük apokrin ter bezlerinin insanlardaki dağılımı, genellikle koltuk altı, perineal, pubik bölgeleri ve memenin areolası ile sınırlıdır. Bunlar, kıl foliküllerini meydana getiren epidermisin germinatif tabakasının aşağıya doğru büyümesiyle gelişirler. Sonuç olarak; apokrin bez kanalları, bilinen ter bezlerinde olduğu gibi deri yüzeyine açılmazlar, ancak kıl foliküllerinin üst kısmında bulunan yağ bezleri açılım yerlerinin üst yüzeyine açılırlar. Bu bezler sadece puberteden sonra salgı yaparlar (39).



Resim 2.11: Ter bezinin gelişiminde, birbirini izleyen evreler. A: 16. hafta, B: 20. hafta, C: 23. hafta, D: 28. hafta (39).

2.2.4. Kılların Gelişimi

Kıllar erken fetal dönemde (9- 12. hafta) gelişmeye başlamasına rağmen, yaklaşık 20. haftaya kadar kolaylıkla seçilemezler. Kıllar ilk olarak kaşlarda, üst dudakta ve çenede fark edilir. Kıl folikülü, epidermisin germinatif tabakasının proliferasyonu olarak belirir ve altta bulunan dermis içine uzanır (Resim 2.10). Kıl tomurcukları kısa zamanda beyzbol sopası şeklini alarak, kıl yumrularını oluşturur. Kıl yumrunun epitel hücreleri, daha sonra kıl yapıcı germinal matriksi meydana getirir ve kıl yumrularının içine, küçük mezenşimal kıl papillaları girer (Resim 2.10). Gelişen kıl foliküllerinin perifer hücreleri, epitelyum kök kılıflarını oluştururken, çevresindeki mezenşimal hücreler ise dermal kök kılıflarına farklılaşır. Germinal matriksdeki hücreler çoğalırken, kıl saplarını oluşturmak üzere keratinize olup, yüzeye doğru

itilirler. Onikinci haftanın sonunda kıllar, kaşların ve üst dudakın üzerindeki epidermise doğru büyür.

İlk beliren kıllar olan lanugo kılları (ayva tüyü); ince, yumuşak ve açık renklidir. Lanugo kılları, 12. haftanın sonuna doğru görülmeye başlar ve 17-20. haftalar arasında sayıları oldukça artar. Bu kıllar, verniks kazeozanın deriye tutunmasını sağlar. Perinatal dönemde, lanugo kıllarının yerine daha kalın kıllar geçer. Bu kalın kıllar, vücudun büyük bir kısmında kalıcı olmasına rağmen, pubertede koltuk altı ve kasık bölgelerinde, daha kalın terminal kıllarla yer değiştirirler. Erkeklerde benzeri kıllar, yüz ve sıklıkla göğüstedey ortaya çıkar.

Melanoblastlar, kıl yumrularına göç ederek melanositlere farklılaşırlar. Bu hücrelerden üretilen melanin, doğumdan birkaç hafta önce germinal matriksde kıl yapıcı hücrelere aktarılır. Melanin içeriği, farklı saç renklerini belirler.

Kılların erektör kasları, düz kas liflerinin küçük demetleri olup, kıl folikülünü çevreleyen mezenşimden farklılaşırlar ve kıl folikülünün dermal kök kılıfı ile dermisin papillar tabakasına tutunur (Resim 2.10). Erektör kasların kasılması, deriyi tuttukları yerden aşağı çekerken, kıl sapı etrafındaki deriyi yukarı kaldırarak, deri yüzeyinde kaz derisine benzeyen küçük tümsekler oluşturur.

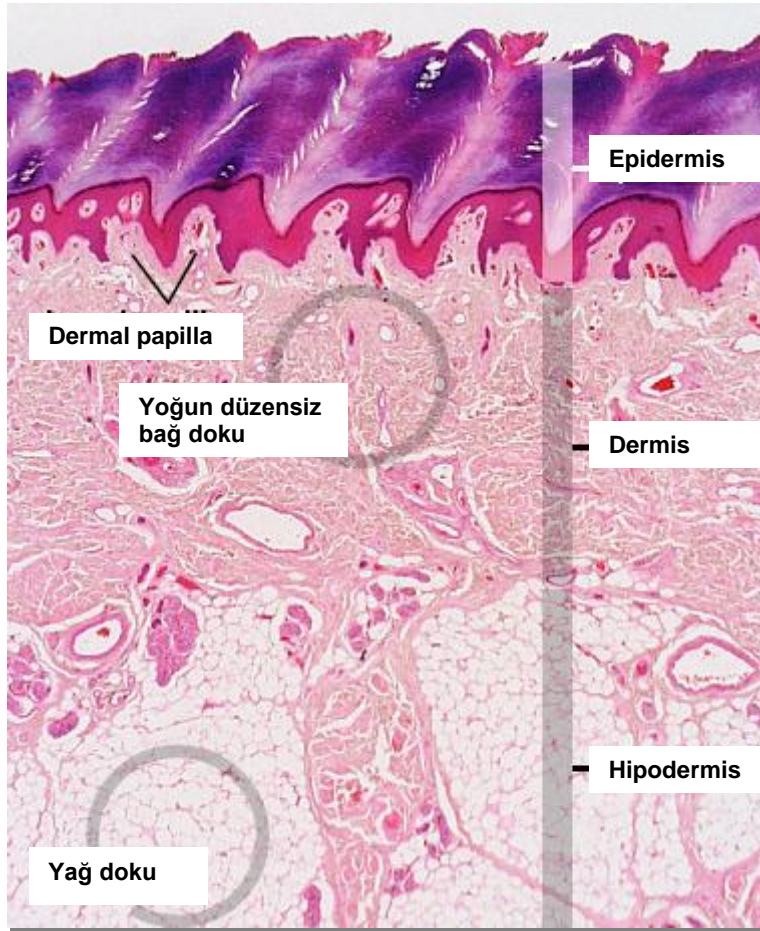
Erektör kasları, yüzün belirli kısımları ve koltuk altı kıllarında yeterince gelişmemiştir. Kaşları oluşturan kıllar ve kirpikleri yapan silyalarda erektör kas bulunmaz (39).

2.3. Derinin Histolojik Yapısı

Deri, birbirine sıkıca bağlı üç tabakadan meydana gelir (Resim 2.12):

- 1) En dışta ektoderm kökenli epidermis
- 2) Daha derinde mezoderm kökenli dermis

- 3) Anatomide yüzeyel fasya olarak adlandırılan hipodermis veya subkütanöz tabaka (42).



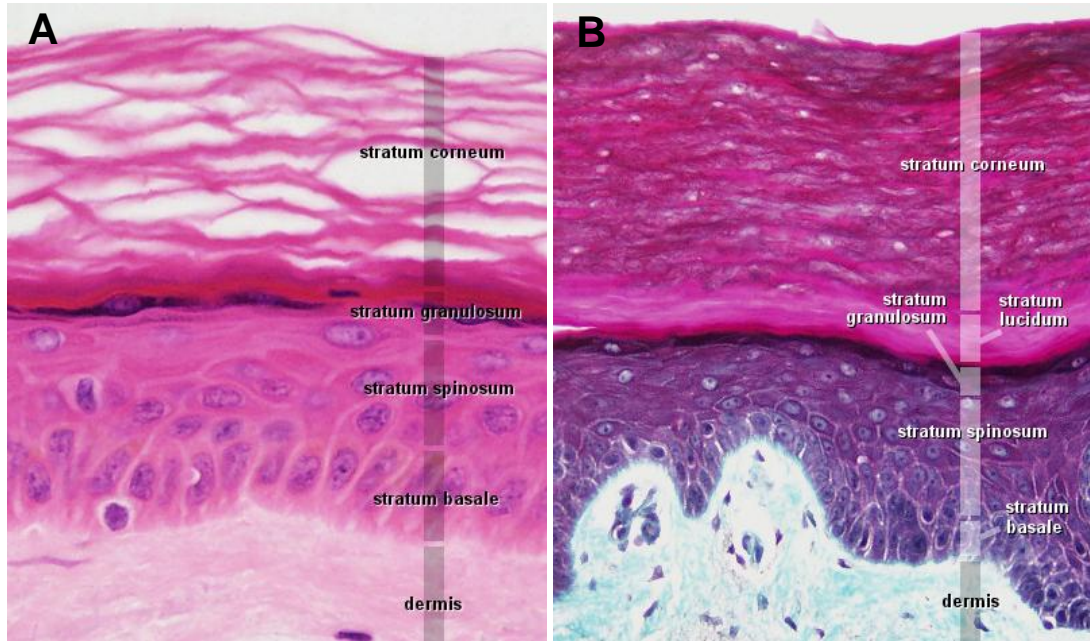
Resim 2.12: Deriyi oluşturan tabakalar (40).

Genel olarak iki tip deri vardır:

- 1) Kalın deri
- 2) İnce deri

Kalın deri (5 mm' den daha kalındır), el ayası ve ayak tabanında bulunur. Kalın bir epidermis ve dermise sahiptir. İnce deri (1-2 mm kalınlığındadır) vücudun geri kalan bölümlerini örter; burada epidermis incedir (Resim 2.13).

Epidermal çıkıntı, epidermisin dermal tarafta yaptığı uzantılardır ve burada primer dermal papillalar bulunur. İnterpapillar bir uzantı, primer dermal papillayı iki adet sekonder dermal papillaya ayırır. İnce deride, papillaların derinliği ve sayısı daha azdır (42, 43).



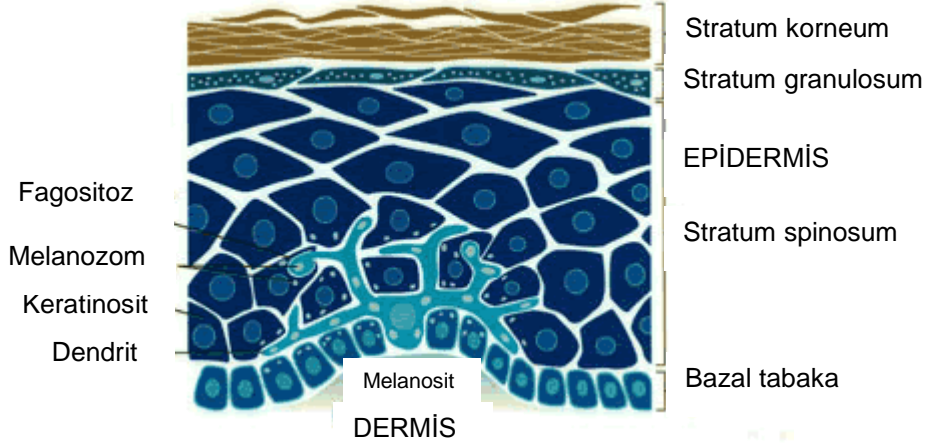
Resim 2.13: A: İnce deri (H-E), B: Kalın deri (Masson Trikróm) örnekleri (40).

2.3.1. Epidermis

Epidermis çok katlı yassı keratinize epitel tabakadan oluşur. Bu tabakada dört ayrı hücre tipi bulunur:

- 1) Esas hücre tipi keratinositlerdir. Bu hücreler, başlıca ürünleri olan ara filaman proteini keratin nedeniyle bu ismi almışlardır.
- 2) Melanositler, melanin üretiminden sorumlu nöral krista kökenli hücrelerdir (Resim 2.14).
- 3) Langerhans hücreleri, kemik iliği kökenli dendritik hücrelerdir. T lenfositlere antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar.

- 4) Merkel hücreleri, dokunma duyusunda rol alan nöral krista kökenli hücrelerdir (42).



Resim 2.14: Epidermisi oluşturan tabakalar ve bazal tabakada yer alan melanosit (41).

Keratinositler, beş tabaka şeklinde düzenlenmişlerdir:

- 1) Stratum bazale
- 2) Stratum spinozum
- 3) Stratum granülozum
- 4) Stratum lusidum
- 5) Stratum korneum.

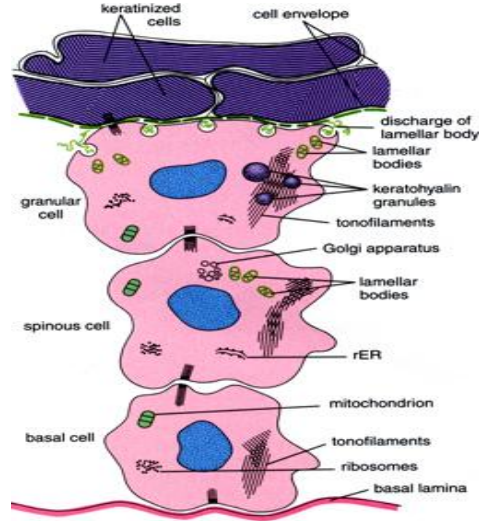
Stratum spinozum ve stratum bazale birlikte Malpighi tabakasını oluştururlar. Stratum bazale bir bazal membran üzerine dizilmiş tek sıralı prizmatik veya yüksek kübik keratinositlerden meydana gelir. Hücre sitoplazmalarında desmozomlarla bağlantılı ara filamanlar bulunur. Işık mikroskopta izlenebilen ara filaman demetlerine tonofilaman adı verilir. Hemidesmozomlar ve bunlarla bağlantılı ara filamanlar, bazal hücrelerin bazal yüzeylerini bazal membrana bağlarlar.

Stratum bazale hücreleri mitozla çoğalırlar. Bölünen hücrelerin bir bölümü stratum bazalenin kök hücre topluluğunu oluştururken, geri kalanları

stratum spinosumda göç ederler ve stratum korneum oluşumuna kadar giden farklılaşma sürecine girerler (42, 43).

2.3.1.1. Keratinosit

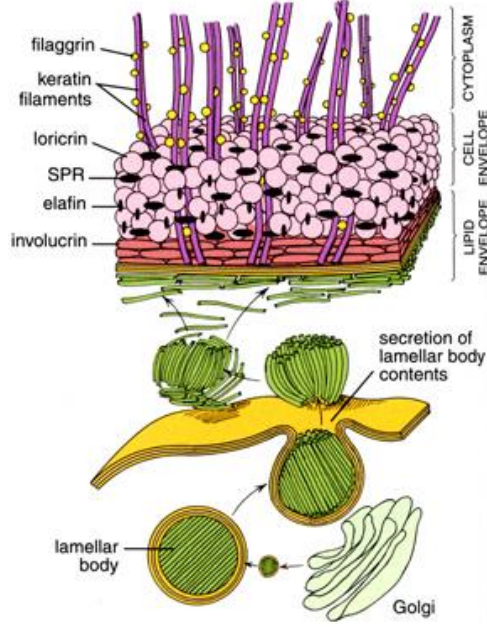
Stratum spinosumdaki keratinositler, yassı poligonal şekilli ve belirgin oval bir çekirdeğe sahip hücrelerdir. Sitoplazmada içinde lamelli bir yapı bulunduran küçük granüller izlenir. Bu granüllere membran kaplı granül veya lamelli cisimcikler adı verilir. Ara filaman demetleri olan tonofilamanlar dikensi görünümlü sitoplazmik çıkıntılar içinde ilerleyerek bir desmozomun yoğun plağına tutunurlar (42). Filamanlar hücreler arasındaki yapışmada ve yıpranma etkilerine karşı dayanıklılıkta önemli bir rol oynarlar. Sürekli sürtenmeye ve basınca maruz kalan bölgelerde epidermis daha bol tonofibril ve desmozom içeren daha kalın bir stratum spinosumda sahiptir (43). Stratum granulozum, birkaç sıralı yassı çekirdekli keratinositlerden meydana gelir. Bu tabakadaki keratinositlerin başlıca ürünü, ara filaman yapısında olmayan bir protein, filaggrindir. Filaggrin keratinlerin kümeleşmesini uyarır. Sitoplazmada, bir zarla çevrili olmayan düzensiz şekilli tipik keratohiyalin granülleri ve bunlara eşlik eden tonofilamanlar izlenir. İlk olarak stratum spinosumdaki keratinositlerde görülen lipidlerden oluşan lamelli cisimcikler, stratum granulozumda sayıca artarlar ve granül içeriği olan glikolipid açilglukozilseramid hücreler arası boşluğa salınır (Resim 2.15). Hücreler arası aralıkta bu lamelli materyal çok tabakalı geniş bir kılıf halinde düzenlenir. Bu yapı, bir üst tabaka olan stratum lusidumda keratinositlerin yüzeyini kaplayarak epidermise su bariyeri özelliği kazandırır (42).



Resim 2.15: Keratinositin farklılaşması (41).

Stratum lusidum, kalın deride daha belirgin olan oldukça yassı eozinofilik hücrelerin oluşturduğu yarı saydam ince bir tabakadır. Organeller ve çekirdekler artık belirgin değildir ve sitoplazma öncelikle elektron yoğun bir matriks içine gömülü sıkıca paketlenmiş filamanlardan meydana gelir. Komşu hücreler arasındaki desmozomlar hala belirgindir (43).

Stratum korneum, birkaç sıra halinde dizilmiş çekirdek içermeyen yassılaştırmış keratinize hücre tabakasından meydana gelir. Sitoplazmada, transglutaminazlarca katalizlenen bir reaksiyonla filaggrinle (Resim 2.16) birbirlerine çapraz bağlanan keratin ara filamanlarına ait yığınlar bulunur. Keratin- filaggrin kompleksi, hücre zarının hemen altında birikerek, hücre kapsülü olarak adlandırılan boynuzsu bir yapı oluşturur. Hücre dışında, lamelli cisimciklerden salınan lipidler hücre kapsüllerini birbirine bağlayarak birleşik hücre kapsülünü meydana getirir. Birleşik hücre kapsülü, sıvıların hücre zarından geçişini engeller.



Resim 2.16: Lameller granüllerin sentezi epidermal sıvı bariyeri (41).

Farklılaşmanın en son noktasında bulunan stratum korneumdaki keratinositler, oldukça dirençli birleşik hücre kapsülü ile çevrelenmiş yassı yapılar şeklindedir. Bunlar, epidermis yüzeyinden dökülürler ve alt tabakalardan gelen keratinositler tarafından sürekli olarak yenilenirler (42).

2.3.1.2. Melanositler

Melanositler, epiderminin stratum bazale tabakasına yerleşmiş uzantılı hücrelerdir (Resim 2.14). Melanositler, nöral kristadan göç eden öncü hücreler olan melanoblastlardan köken alırlar. Melanoblastın, melanositlere dönüşmesi, membrana bağlı bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörüyle etkileşime giren kök hücre faktörünün kontrolü altında gerçekleşir. Melanositler, gelişmekte olan epidermis içine girerler ve farklılaşmakta olan keratinositlerle herhangi bir desmozom bağlantısı kurmadan bağımsız hücreler olarak kalırlar. Melanositlerin hayat döngüsü, keratinositlerinkinden

daha yavaştır. Melanositler, melanin granülleri içinde paketlenmiş olarak melanin üretirler. Bu granüller de, dallanan hücre uzantıları aracılığıyla, sitokrin salınımıyla keratinositlere aktarılır. Melanin, öncelikle golgi organelinden köken alan membranla çevrili bir premelanozom içinde depolanır. Melanin, tirozinaz enzimi etkisiyle tirozinin, 3, 4-dihidroksifenilalanine (DOPA) oksidasyonu sonucunda üretilir. DOPA daha sonra melanine dönüştürülür. Melanin, böylece, melanositlerin sitoplazmik uzantıları boyunca bulunan olgun melanin granülleri olan melanozomlar içinde birikir. Ortama salınan ve çözünmeyen koyu melanin granüllerini keratinositler alır (42).

2.3.1.3. Langerhans hücreleri (Dendritik Hücreler)

Langerhans hücreleri, epidermiste bulunan kemik iliği kökenli hücrelerdir. Bu hücreler, immün cevapta, özellikle derinin aşırı duyarlılık reaksiyonlarının başlangıcında, T lenfositlere antijen sunumunda rol oynarlar. Langerhans hücreleri, epidermisten lenf düğümlerine göç ederek, burada MHC1 ve MHC2 ile B7 hücre yüzey antijenlerini taşıyan aktif dendritik hücrelere dönüşürler. Aktif dendritik hücreler de, T lenfositleri uyararak, onları aktif hale getirirler.

Melanositler gibi, Langerhans hücrelerinin de stratum spinosumdaki keratinositler arasında uzanan sitoplazmik uzantıları (dendritik hücreler) vardır. Bu uzantılarla keratinositler arasında dezmozomal bağlantı yerine E-kadherin aracılığıyla temas sağlanır.

Langerhans hücre çekirdeği çentiklidir ve sitoplazmada tipik çubuk şeklinde granüller (Birbeck veya vermiform granülleri) bulunur (42).

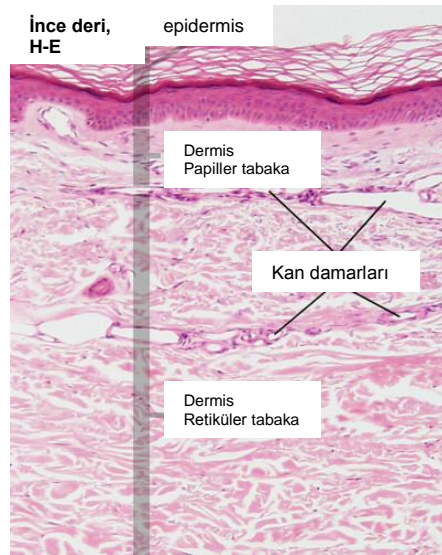
2.3.1.4. Merkel Hücreleri

Merkel hücreleri, stratum bazalede bulunan ve modifiye keratinositlere benzeyen hücrelerdir. Parmak uçlarında daha çok bulunurlar. Merkel hücreleri, komşu keratinositlere dezmozomlarla bağlı bulunan ve dermisten epidermise uzanan miyelinli afferent sinir lifleriyle irtibatlı mekanoreseptör hücrelerdir. Çekirdeğin şekli düzensizdir ve sitoplazmada nörotransmitter içeren çok sayıda granüller bulunur (42).

2.3.2. Dermis

Dermis, sınırları belirgin olmayan iki tabakadan meydana gelir: 1) papillalı tabaka epidermisse temasta olan gevşek bağ dokusu (fibroblastlar, kollajen lifler ve ince elastik lifler) yapısındadır ve 2) retiküler tabaka, kalın kollajen lif demetleri ve kaba elastik lifler içerir (Resim 2.17). Kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri, derminin çeşitli seviyelerinde bulunan epidermal türevlerdir.

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



Resim 2.17: Dermisse oluşan tabakalar (40).

2.3.3. Derinin Damarlanması

Deride, birbirleriyle bağlantılı üç şebeke bulunur:

- 1) Subpapiller pleksus, dermisin papillalı tabakasında seyreder.
- 2) Kütanöz pleksus, dermisin papillalı ve retiküler tabakaları arasındaki sınırdaki gözlenir.
- 3) Hipodermik veya subkütanöz pleksus, hipodermiste veya subkütanöz yağ dokusunda bulunur.

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

Hipodermik ve kütanöz pleksusların dalları, hipodermisin yağ dokusunu, ter bezlerini ve kıl foliküllerinin derin kısımlarını besler. Arteriyel ve venöz dolaşım arasında bulunan arteriyovenöz anastomozlar, retiküler ve hipodermik bölgelerde yaygın olarak bulunur ve vücut ısısının düzenlenmesinde rol oynarlar.

2.3.4. Hipodermis

Hipodermis veya derinin subkütanöz tabakası, dermisin derindeki devamıdır. Vücuttaki lokalizasyonuna bağlı olarak değişen kalınlıklarda bir tabaka oluşturan, gevşek bağ dokusu ve yağ hücrelerinden meydana gelir (42).

2.3.5. Deri Ekleri: Kıllar, bezler ve tırnaklar

2.3.5.1. Kıllar

Gelişim sırasında, epidermis ve dermis, ter bezleri ile kıl gibi eklerin oluşumu için birbirleriyle etkileşirler. Dermal mezodermdeki fibroblastlardan

kaynaklanan sinyal molekülleri etkisiyle epidermin bazal tabakasında hücre topluluğu şeklinde bir kıl folikül taslağı meydana gelir.

Bazal epidermal hücre topluluğu, dermise doğru uzanırken, dermal fibroblastlar kıl folikül taslağının dermal papilla adı verilen bir küçük nodül oluştururlar. Dermal papilla kıl folikül taslağının içine doğru ilerler. Buradaki hücreler bölünüp, farklılaşarak keratinize kıl gövdesini meydana getirirler. Taslaktaki melanositler de, ürettikleri melanini kıl gövdesine aktarırlar. Kıl folikül taslağında foliküler bulbus olarak adlandırılan bir şişkinlik, kök hücreler (klonojenik keratinositler) içerir. Bu hücreler, morfogenetik sinyallere cevap olarak göç edip, kıl gövdesinin, epidermin ve yağ bezlerinin rejenerasyonu olmasını sağlarlar.

İnsan embriyosundaki ilk kıl, lanugo olarak adlandırılan, ince, pigmentsiz kıllardır. Lanugo doğumdan önce dökülür ve vellus adı verilen kısa renksiz kıllarla yer değiştirir. Vellus, daha sonra derinin alın gibi kılsız bölümleri dışında, terminal kıllarla yer değiştirir.

Kıl folikülleri sürekli olarak yenilenirler. Folikülün büyüme dönemleri anajen, gerileme dönemi katajen, dinlenme dönemi telojen olarak adlandırılırlar.

Kıllar, hemen hemen tüm vücut yüzeylerinde bulunan uzun keratinize yapılardır. Sadece, el ayası, ayak tabanı, el ve ayak parmaklarının yan tarafları, meme uçları, glans penis ve klitoriste bulunmazlar.

Her bir kıl, iki bölümden oluşur: 1) kıl folikülü ve 2) kıl gövdesi.

Kıl folikülü, epidermin tübuler bir invajinasyonudur ve kılın büyümesinden sorumludur. Kıl bulbusu, invajine olmuş kıl folikülünün en alttaki bölümüdür. Damardan zengin bir bağ dokusu bölümü (dermal papilla), kıl bulbusuna doğru uzanır.

Kıl folikülü iki kılıfla çevrilidir: 1) epidermin bir uzantısı olan dış kök kılıfı ve 2) üç tabaka yumuşak keratinden oluşan iç kök kılıfı.

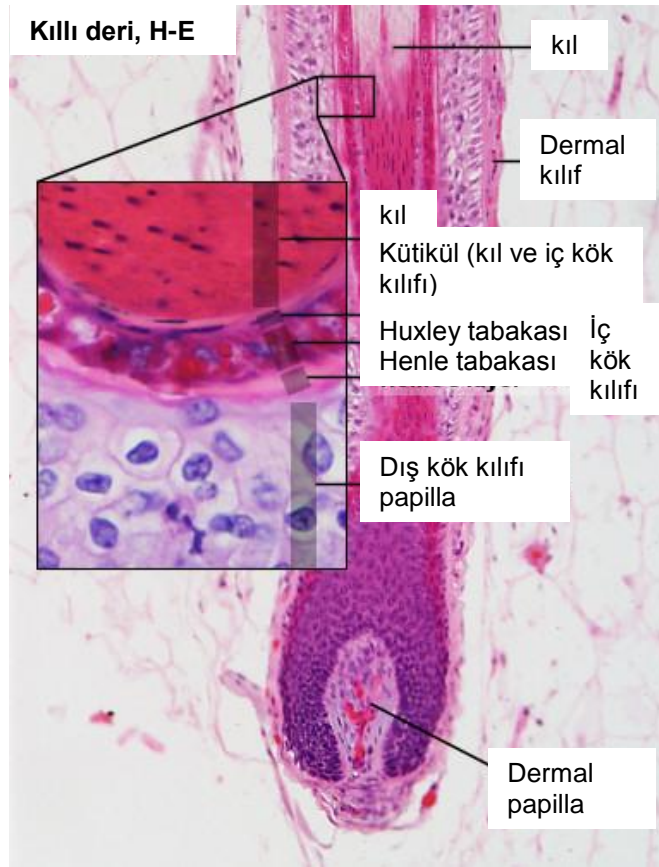
Kalın kıl gövdesinin enine kesitinde iç içe geçmiş ve keratinize hücrelerden oluşan üç tabaka izlenir: 1) kütikül, 2) korteks ve 3) medulla

(medulla ince kılda bulunmaz) (Resim 2.18). Kıl gövdesi sert keratinden meydana gelir.

Kıl folikülü, bir bağ dokusu tabakası ile çevrilidir. Erektör pili kası, foliküler bulbusa bağlıdır.

Kılın ve iç kök kılıfının keratinizasyonu, keratojen bölge adı verilen ve olgunlaşan epidermal hücrelerle sert keratin arasında bulunan geçiş bölgesinde meydana gelir.

Kılın rengi, kıl gövdesinde bulunan melanin miktarına ve dağılımına bağlıdır. Sarı kılda çok az melanosom bulunur. Gri kılda, melanosit ve melanin miktarı az sayıdadır. Kırmızı kılda ise melanin kimyasal olarak farklıdır ve melanosomlar elips şeklinden ziyade daha yuvarlaktır (42, 43).



Resim 2.18: Kılı oluşturan tabakalar (40).

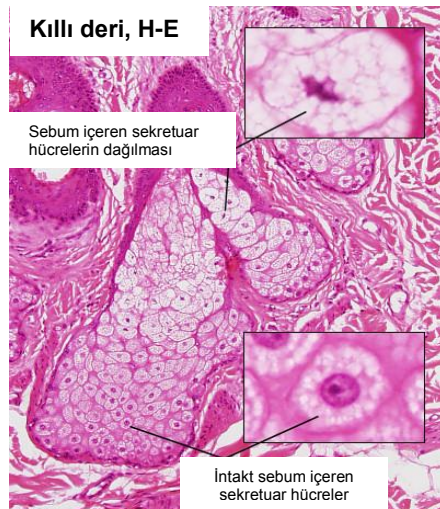
2.3.5.2. Bezler

Derideki bezler 1) yağ bezleri (Resim 2.19), 2) ter bezleri (ekrin ve apokrin ter bezleri Resim 2.20 ve 2.21) ve 3) meme bezleridir.

2.3.5.2.1. Yağ Bezi

Yağ bezi, el ayası ve ayak tabanı dışında tüm vücut yüzeyinde yaygın olarak bulunan, basit holokrin alveolar bir bezdir. Yağ bezinin salgı bölümü, dermiste bulunur; boşaltım kanalı ise kıl folikülünün boynuna açılır. Dudaklarda, ağız köşelerinde, glans peniste, labia minorda ve meme ucunda yağ bezleri kıllardan bağımsız olarak doğrudan deri yüzeyine açılırlar.

Yağ bezlerinin salgı bölümü, küçük kanalcıklarla boşaltım kanalına bağlanmış olan asinus gruplarından oluşur. Her bir asinus, sayısız küçük lipid damlacıkları içeren multiloküler adipositlere benzeyen hücreler bulundurur. Boşaltım kanalı, epidermisin Malpighi tabakası ve kılın dış kök kılıfı ile devam eden çok katlı yassı epitelle döşelidir. Bezin yağlı salgısı (sebum) kıl ve epidermis yüzeyine salınır (42, 43).



Resim 2.19: Yağ bezleri (40).

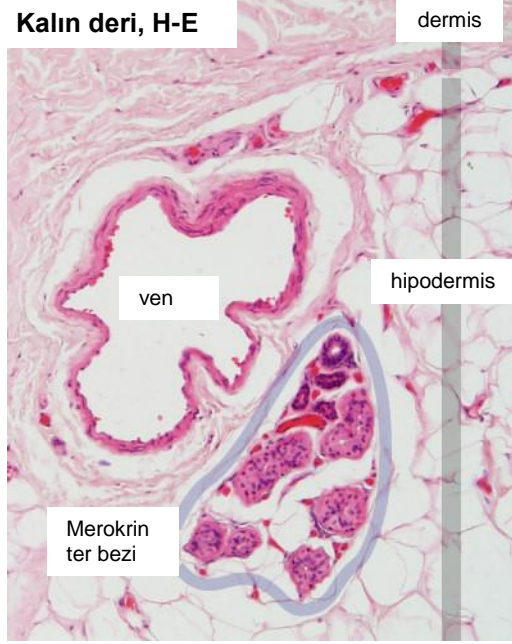
2.3.5.2.2. Ter Bezi

İki tip ter bezi vardır: 1) ekrin (merokrin) ter bezleri (Resim 2.20) ve 2) apokrin ter bezleri (Resim 2.21). Ekrin ter bezi, vücut ısısının kontrolünde rol oynayan, basit kıvrımlı tübüler bezdir. Ekrin ter bezleri, kolinerjik sinirlerle uyarılır. Ekrin ter bezinin salgı bölümü (Resim 2.20) üç hücre tipi içeren kıvrımlı bir tüptür: 1) açık hücreler, 2) koyu hücreler ve 3) miyoepitelyal hücreler.

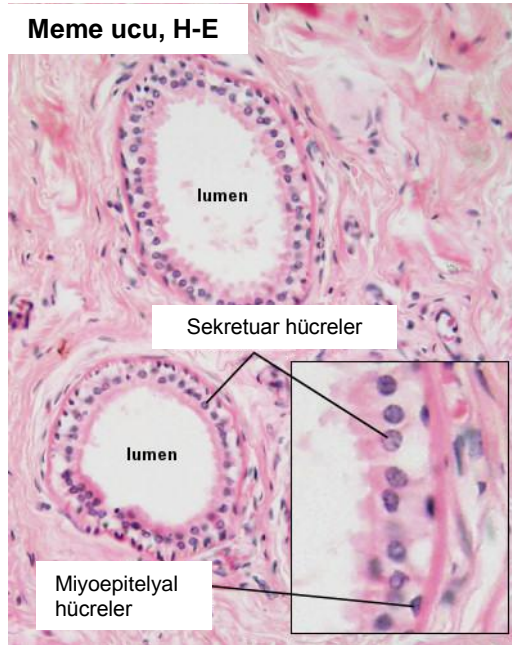
Açık hücreler, birbirlerinden intersellüler kanalcıklarla ayrılmış, bol miktarda mitokondri içeren katlantılı bir bazal bölgeye sahip, bir bazal lamina üzerine oturan ve terdeki su ve elektrolitlerin (başlıca Na^+ ve Cl^-) çoğunu salgılayan hücrelerdir. Koyu hücreler, açık hücrelerin üzerine otururlar. Bu hücreler glikoprotein salgırlar. Miyoepitelyal hücreler, bazal lamina ile açık hücreler arasında yer alırlar.

Ekrin ter bezinin boşaltım kanalı, iki sıralı kübik hücrelerle örtülüdür. Bu hücreler, aldosteron etkisi altında, NaCl ve su geri emilimini yaparlar. Kanal, epidermise yaklaştığında sarmal bir yol izler ve deri yüzeyine bir delikle açılır. Epidermis içinde, boşaltım kanalı keratinositlerle çevrilidir. Apokrin ter bezleri (Resim 2.21), kıvrımlı bezlerdir ve aksilla, mons pubis ve anal bölgede bulunurlar. Apokrin ter bezleri, ekrin ter bezlerine göre daha büyük salgı asinüsleri içerirler. Salgı bölümleri, dermiste ve hipodermiste lokalizedir. Boşaltım kanalı kıl folikülüne açılır (ekrin ter bezlerinde epidermise açılır). Apokrin ter bezleri puberteden sonra fonksiyon kazanırlar ve adrenerjik sinirlerle inerve edilirler. Apokrin ter bezlerinin özel iki örneği, dış kulak yolundaki serüminöz bezler ile göz kapaklarının kenarındaki Moll bezleridir.

Serüminöz bezler, pigmentli bir lipid olan serümeni üretirler. Bu bezlerin boşaltım kanalları, dış kulak yolunda yağ bezlerinin kanalları ile birlikte kıl foliküllerine açılır. Moll bezlerinin boşaltım kanalları, göz kapaklarının serbest yüzeyine veya kirpiklere açılır (42, 43).



Resim 2.20: Ektrin (merokrin) tip ter bezleri (40).



Resim 2.21: Apokrin tip ter bezi (40).

2.3.5.3. Tırnaklar

Tırnaklar, el ve ayak parmaklarının terminal falankslarının dorsal yüzünde bulunan sert keratin plaklardır. Tırnak plağı, yalnızca stratum bazale ve stratum spinozumdan oluşmuş deri yüzeyi olan tırnak yatağını örter. Tırnak plağı, yapıca komşu deri epidermisine benzeyen lateral tırnak katlantıları ile çevrilidir. Tırnak plağının proksimal kenarı, tırnak kökü veya matriksidir (burada hilal şekilli beyaz lunula bulunur). Tırnak matriksine çok yakın bir bölgede, tırnak maddesinin oluşumundan sorumlu bir epidermis bölümü yer alır. Plağın distal bölümü tırnağın serbest kenarıdır. Tırnak plağı, kornifiye epitel hücrelere karşılık gelen sert yapılardan oluşur. Tırnak plağının proksimal kenarı epinişyum ile örtülüdür. Bu derinin stratum korneum tabakasından uzanan bir katlantıdır (kütikül). Tırnak plağının distaldeki serbest kenarı altında, epidermisin stratum korneumu hiponişyum adı verilen kalın bir yapı meydana getirir. Hiponişyum, tırnağın matriks yatağını bakteri ve mantarlara karşı korur (42, 43).

2.4. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi primer ve sekonder yara iyileşmesi olarak ikiye ayrılır.

2.4.1. Primer Yara İyileşmesi

Cerrahi insizyon ve suture alanlarındaki, epitelyal ve bağ doku kaybının minimum olduğu, epitelyal bazal membranın düzgün olarak zedelendiği yara iyileşmesine primer yara iyileşmesi denir (44). Primer yara alanı birkaç saniye içinde fibrin ve kan hücreleri içeren kan tıkaçı ile dolar; yüzeydeki tıkaç dehidratasyonla yara üzerini örten kabuğu (krut) oluşturur.

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

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

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

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

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

Birinci ayın sonunda, üzeri sağlam epidermis ile kaplı, iltihap hücresi içermeyen skar dokusu oluşur. Deri ekleri insizyon hattında kalıcı olarak kaybolur. Gerilmeye karşı direnç (dayanıklılık) artmaya başlar. Direnç artışı kollajen sentezi ile oluşur. Gerilmeye karşı tam dayanıklılık oluşması aylarca sonra oluşur. Bu son aşamaya matürasyon evresi de denir ve yara iyileşmesinin en uzun süre devam eden aşamasıdır (44).

2.4.2. Sekonder Yara İyileşmesi

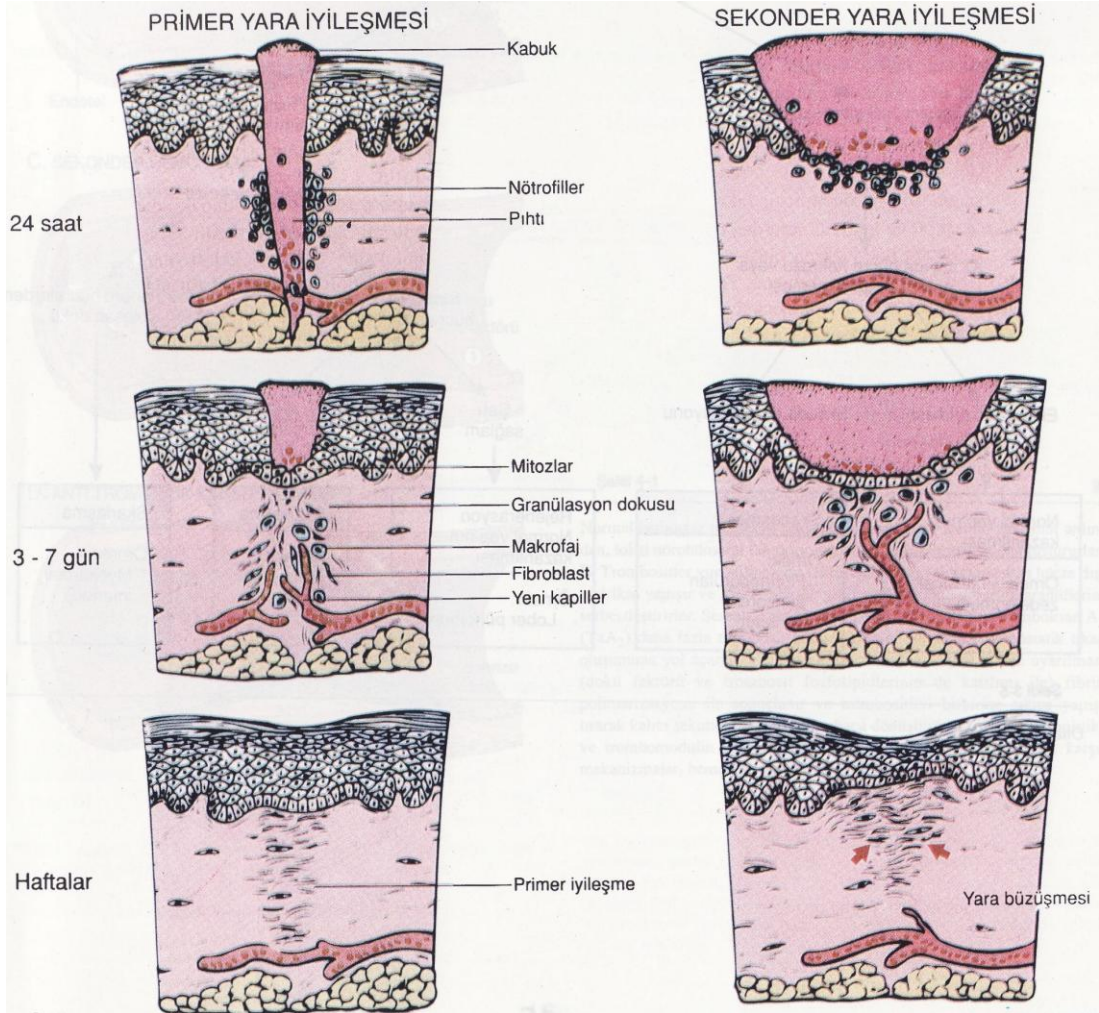
İnfarktüs, iltihabi ülserasyon, apse oluşumu ve büyük doku kaybı olan yüzey yaraları gibi daha fazla hücre ve doku kaybı varsa onarım olayı daha

komplikedir. Bunların tümünde de doldurulması gereken büyük doku kaybı vardır. Parankim hücrelerinin rejenerasyonu tam anlamıyla orijinal yapıyı sağlamaz. Oluşan doku defekti alanları erken dönemde aşırı granülasyon dokusu, geç dönemde ise skar dokusu ile doldurularak iyileşme oluşur. Bu tip yara iyileşmesine sekonder yara iyileşmesi denir (44).

2.4.3. Sekonder Yara İyileşmesinin Primer Yara İyileşmesinden Farkları

Sekonder yara iyileşmesinde doku kaybı fazla olup, iyileşme daha geç olur. Uzaklaştırılması gereken daha çok nekrotik doku artıkları ve eksuda vardır. İltihabi yanıt daha şiddetlidir. Daha fazla granülasyon dokusu oluşur. Büyük yüzey yaralarında görülen yara kontraksiyonu sekonder yara iyileşmesinde yara yüzeyini küçültmek amacı (% 5-10) ile yaklaşık 3- 30. günler arasında oluşur. Yara kontraksiyonu miyofibroblastlara dönüşen fibroblastlar tarafından gerçekleştirilir (44).

Parenkimal hücrelerle iyileşmenin (rejenerasyon) oluşmadığı durumlarda fibrozis ya da skatrile iyileşme oluşur. Rejenere olmamış parenkimal hücreler 24 saat içerisinde fibroblast ve vasküler endotel hücreleri ile yer değiştirir. Granülasyon dokusu 3- 5. günde oluşur. Granülasyon dokusunda progresif olarak kollajen birikir (Resim 2.22) (44).

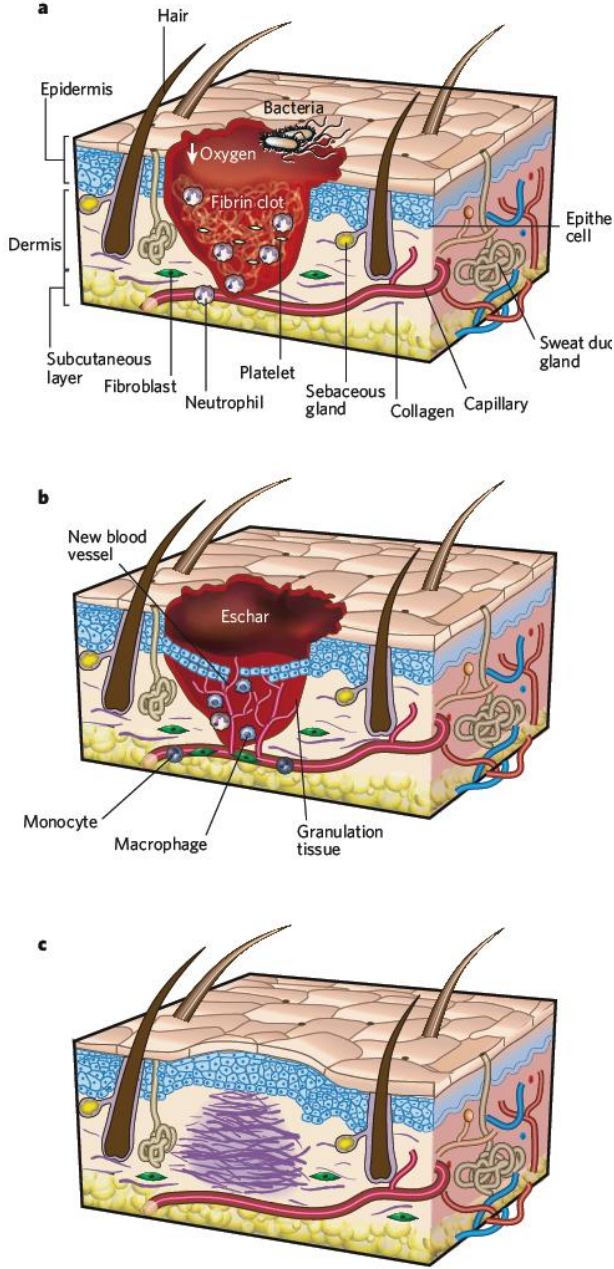


Resim 2.22: Primer ve sekonder yara iyileşmesi (44).

2.4.4. Yara İyileşmesinin Evreleri ve Genel İlkeleri

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

- 1) Hemostaz ve İnflamasyon
- 2) Proliferasyon
- 3) Matürasyon ve Yeniden yapılanma (olgunlaşma ve yeniden şekillenme) (Resim 2.23) (45).



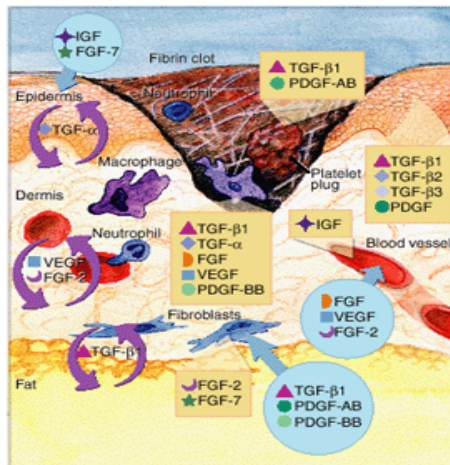
Resim 2.23: Yara iyileşmesinin evreleri; a: inflamasyon, b: proliferasyon, c: matürasyon ve yeniden yapılanma (46).

2.4.4.1. Hemostaz ve İnflamasyon

Temel özellikleri vasküler permeabilite artışı, dolaşımdan yaraya hücre kemotaksisi, sitokinlerin ve büyüme hormonlarının yerel olarak açığa çıkması ve hücre göçünün aktivasyonu olan inflamasyon süreci, iyileşmenin temel mekanizmalarıdır. Bu süreçte hemostazın sağlanması ile ortaya çıkan subendotelyal kollajene yapışan trombositler çeşitli faktörler salgılayarak pıhtılaşmanın ekstrensek basamağını aktive eder (45).

Yara alanında oluşan pıhtı, nötrofil, monosit, fibroblast ve endotelial hücreler için bir iskelet oluşturur; bu süreçte hemostaz başarısız olursa yetersiz pıhtı oluşumuyla hücrelerin inflamatuvar alana kemotaksisi ve adezyonu azalır ve iyileşme olumsuz etkilenir (45).

Yara alanında ilk saptanan hücrelerden olan nötrofillerin göçü inflamasyonla artan vasküler permeabilite ve prostoglandinler, interlökin-1 (IL-1), tümör nekrozis faktörü- α (TNF- α), kompleman sistemi gibi faktörlerin etkisi ile uyarılır (45). Trombositler tarafından salgılanan iki en önemli faktör, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor: PDGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (transforming growth factor: TGF- β)'dir (Resim 2.24) (47).



Resim 2.24: Yara alanında bulunan hücreler ve hücrelerden salgılanan moleküller (48).

Yara yüzeyinin hemen altında nötrofiller ve makrofajlar tarafından bir band paterni göstererek güçlü bir şekilde eksprese edilen interlökin-8 (IL-8), yüksek sayıda nötrofilin yara yerine göçüne aracılık eder. Yara yüzeyinin altında IL-8' in güçlü bir şekilde ekspresyonu, IL-1 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler, bakteriyel ürünler ve hipoksi tarafından indüklenir. Buna ek olarak yara yüzeyinin altında en yüksek seviyeye ulaşmış olan IL-8 düzeyleri, yara kenarında keratinositlerin çoğalmasını ve proliferasyonunu stimüle edebilir (49). Makrofajlar, lenfositler ve fibroblastlar da daha sonra benzer uyarılarla bölgeye gelerek aynı faktörlerin etkisiyle aktive olur (45). Makrofajlar, nötrofiller ve lenfositlerle birlikte mast hücreleride yara iyileşme sürecinde önemli bir mediatör kaynağıdır ve yara yerinde yaralanmamış derinin tersine yüksek düzeylerde saptanır. Normal yara iyileşmesi için makrofajlar esastır. Makrofajlar, antijen sunucu hücre ve fagosit olarak immünolojik görevleri vardır ve büyüme faktörlerinin önemli bir kaynağıdır.

Monosit- makrofaj atraktan kemokin (MCP-1), yerleşik hücreler (yara kenarındaki keratinositler ve endotel hücreleri) ve inflamatuvar hücreler (makrofajlar) tarafından salgılanır ve yara iyileşmesi sırasında farklı evrelerde monosit, mast hücreleri ve lenfositlerin yara yerine göçlerinde önemli rol alır (49). MCP-1 ekspresyonu özellikle yaralanmadan sonraki bir haftayla sınırlıdır. Yaklaşık olarak bütün hücrelerin (yerleşik ve infiltre olan mononükleer hücreler) % 20' si yaralanmadan sonraki 1. günde MCP- 1 mRNA' sını eksprese ederler. Özellikle 2. günden sonra MCP- 1, oldukça yüksek proliferasyon kapasitesine sahip ve yara yüzeyini kapatmak için göç eden keratinositler için hücre kaynağı olan bazal keratinositler tarafından eksprese edilir. MCP-1 sadece monositlerin değil mast hücrelerininide yara yerine göç etmesini sağlar (49). Mast hücrelerinden salgılanan granüller, yara kenarı etrafındaki inflamasyonun karakteristik bulgularından sorumlu olan, enzimler, histamin ve diğer aktif aminler ve bunların mediatörlerini içerir. Mast hücrelerinden salgılanan aktif aminler, çevredeki damarların geçirgenliğini arttırarak yara alanına mononükleer hücrelerin hızlı geçişine izin verir (47).

Yara iyileşmesi sırasında mast hücre sayısındaki beş kat artış proliferasyondan ziyade mast hücrelerinin yara yerine gelmesinden kaynaklanır. Mast hücrelerinden salgılanan interlökin-4 (IL-4) fibroblast proliferasyonunu stimüle ederken MCP-1 ve IL-8 gibi bazı kemokinlerin ekspresyonunu azaltır, böylece inflamatuvar reaksiyon sınırlanır (49).

Yara alanında erken dönemde nötrofillerin bakterilere karşı fagositoz görevini daha sonra makrofajlar devralır (45). O nedenle, ortamda bulunan hücre artıklarının fagositozu yanı sıra makrofajlardan salınan sitokinler anjiyogenezi ve fibroplaziyi uyarır (45).

Makrofajlar, inflamatuvar sitokinleri ve büyüme faktörleri salgılama kapasitesinden dolayı yara tamirinde merkezi bir role sahiptir (47, 49).

Aktive makrofajlar, açığa çıkan sitokinlerle uyarılan lenfositlerin salgıladıkları lenfokinler yara alanında fibroblast migrasyonunu, proliferasyonunu ve kollajen sentezini düzenler (45).

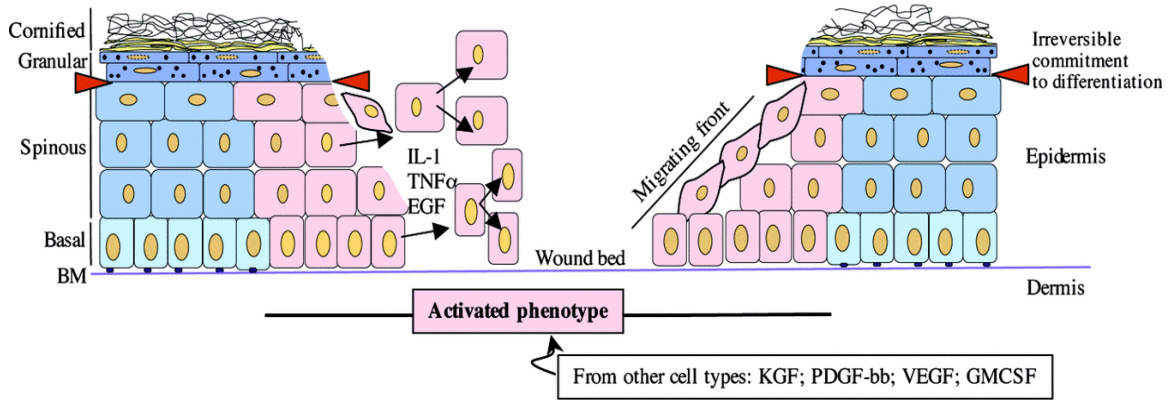
IFN- δ ile indüklenen monokin (monokine induced by IFN- δ : Mig) ve interferon ile uyarılabilir protein 10 (Interferon-inducible Protein-10: IP-10) selektif olarak lenfositleri yara alanına çekerler. Lenfositler, efektör immunolojik hücreler olmalarının yanı sıra, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF=FGF-2) ve lökosit kaynaklı büyüme faktörü (LDGF) gibi büyüme faktörlerini de salgılama yeteneğine sahiptir (50).

2.4.4.2. Proliferasyon

Bu evrede, trombositlerden ve aktive olmuş makrofajlardan salınan sitokinlerin ve büyüme hormonlarının etkisiyle fibroblastlar ve endotelial hücrelerin yara alanında çoğalması ön plandadır (45). Trombositlerden ve aktive makrofajlardan, PDGF ve TGF- β salgılanır (47, 50). PDGF, nötrofillerin, makrofajların, düz kas hücrelerin ve fibroblastların kemotaksisini başlatır. Buna ek olarak fibroblastların ve düz kas hücrelerinin mitogenezini stimüle eder. TGF- β makrofajları etkileyerek bFGF, PDGF, TNF- α ve IL-1 gibi

sitokinlerin salgılanmasını stimüle eder. Ayrıca TGF- β fibroblast ve düz kas hücre kemotaksisini arttırarak kollajen ve kollajenaz ekspresyonunu düzenler (47). Fibroblastlar çevre dokudan yaraya doğru göç eder. Yara alanına yakın sağlam venüllerden çoğalan endotelial hücreler bölgeye gelerek anjiyogenezi başlatarak yeni kapiller ağı oluşturur (45). Anjiyogenezin en önemli pozitif mediatörleri vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA) ve FGF-2' dir (46). Kemokinler, IL-8, büyüme ile ilişkili onkogen- α (GRO- α), GRO- β , GRO- γ , kemokin bağ doku aktive edici peptid 3 (chemokine-connective tissue-activating peptide 3: CTAP3), β - tromboglobulin ve nötrofil aktive edici peptid-2 (NAP-2) in vitro endotelial hücre proliferasyonunu ve in vivo anjiogenezi indükler (49). Bu evrenin ileriki aşamalarında makrofajlar tarafından stimüle edilerek yara kenarından veya kemik iliğinden gelen fibroblastların bazıları miyofibroblastta dönüşür (46). Epitel kaybı oluşan yaralanmalarda fibroblast ve endotelial hücrelere ek olarak epitel hücreleride sıvı kayıplarına ve enfeksiyona karşı yeniden bir engel oluşturmak üzere çoğalır. Yaralanmadan bir iki gün sonra epitel hücreleri yara kenarındaki hasarsız epitel adacıklarından çoğalarak yara alanına doğru göç etmeye başlar (Resim 2.25) (45). Epitelizasyon, aktive yara makrofajları, trombositler ve keratinositlerden salgılanan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- α (transforming growth factor- α : TGF- α) tarafından stimüle edilir (47). Epitelizasyonu pozitif olarak düzenleyen diğer faktörler, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi, epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi ve hepatosit büyüme faktörü (HGF)' dür. Bunlar, keratinositlerin migrasyonu, proliferasyonu ve hayatta kalmasını, aktivasyonu ile stimüle eden tirozin kinaz reseptörünün ligandlarıdır (46). İn vitro çalışmalar IL-8' in insan keratinosit migrasyonunu ve proliferasyonunu stimüle ettiğini göstermektedir. İnsizyonel insan yaralarının iyileşmesinde IL-8, epidermal defekti kapatmak için yara kenarından keratinositlerin göç ettiği yerde yara yüzeyi boyunca oldukça yüksek seviyede eksprese edilmektedir. GRO- α ' nın

ekspresyonu IL-8 ile kolokalizdir ama GRO- α mRNA düzeyleri önemli ölçüde düşüktür (49).



Resim 2.25: Bazal hücrelerin çoğalması ve göçü (51).

2.4.4.3. Matürasyon ve Yeniden Yapılanma

Endotel hücrelerinin büyük bir kısmı, makrofajlar ve miyofibroblastlar, birkaç hücre ve daha çok kollajenden ve diğer ekstrasellüler matris proteinlerinden oluşan bir artık bırakarak, programlı hücre ölümü olan apoptozise giderler veya yara yerinden ayrılırlar (46). Bu evrenin temel özelliği yara alanına kollajen depolanmasıdır. Kollajen depolanmasının miktarı, oranı ve kalitesinin yara gerilme kuvveti üzerine olan etkileri nedeniyle bu süreç klinik açıdan en önemli evredir. İyileşmeden sonra doku bütünlüğünü devam ettiren bağ dokusunu oluşturan hücre dışı makromoleküler ara madde kollajen, elastin, fibronektin, laminin, proteoglikanlar ve hiyalüronik asitten oluşur.

Organizmamızda çeşitli görevler üstlenen kollajenin molekül ve zincir yapısındaki farklılıklara göre 23 değişik tipi tanımlanmıştır. Üç polipeptid zincirden oluşan kollajen, fibroblastların endoplazmik retikulumunda var olan mRNA'nın özelliklerine göre sentezlenip salgılanır. Salgılanan bu polipeptid zincirler yara alanında çapraz bağlarla birbirlerine bağlanır ve yara gerilme

kuvvetinin temelini oluşturur. Fibroblastlar içinde kollajen gibi intrasitoplazmik filamanlar halinde sentezlenip hücreler arası bölgeye verilen diğer maddeler proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardır. Bu maddeler bağlanma sürecinde kollajen fibrillerin çaplarını ve büyüklüklerini etkileyerek oluşturulan bağ dokusunun fiziksel özelliklerini belirler.

Kollajenin sentez ve birikiminin yanında, oluşturulan bağ dokusunun anatomik ve fonksiyonel olarak en uygun şekli almasında önemli rol oynayan diğer faktörler kollajenazlar ve bazı proteazlardır. Yaralanmadan sonra tüm hücrel kollajen sentez ve depolanmasıyla birlikte yaradaki kollajen miktarının sabit kalması, yarada aynı anda kollajen yıkımının da olduğunun bir göstergesidir. Fibroblastlar, epitel hücreleri ve aktive makrofajlar tarafından salgılanan kollajenazlar yara alanında depolanan kollajeni yıkıp yeniden şekillendirerek yara skarının oluşmasını sağlar. Deri ve deri altını içeren bir yarada bir yıldan fazla süren matürasyon ve yeniden yapılanma aşamasından sonra son şeklini almış yara skarındaki kollajen fibrilleri hiçbir zaman orijinal derideki gibi düzenli dağılım gösteremez (45).

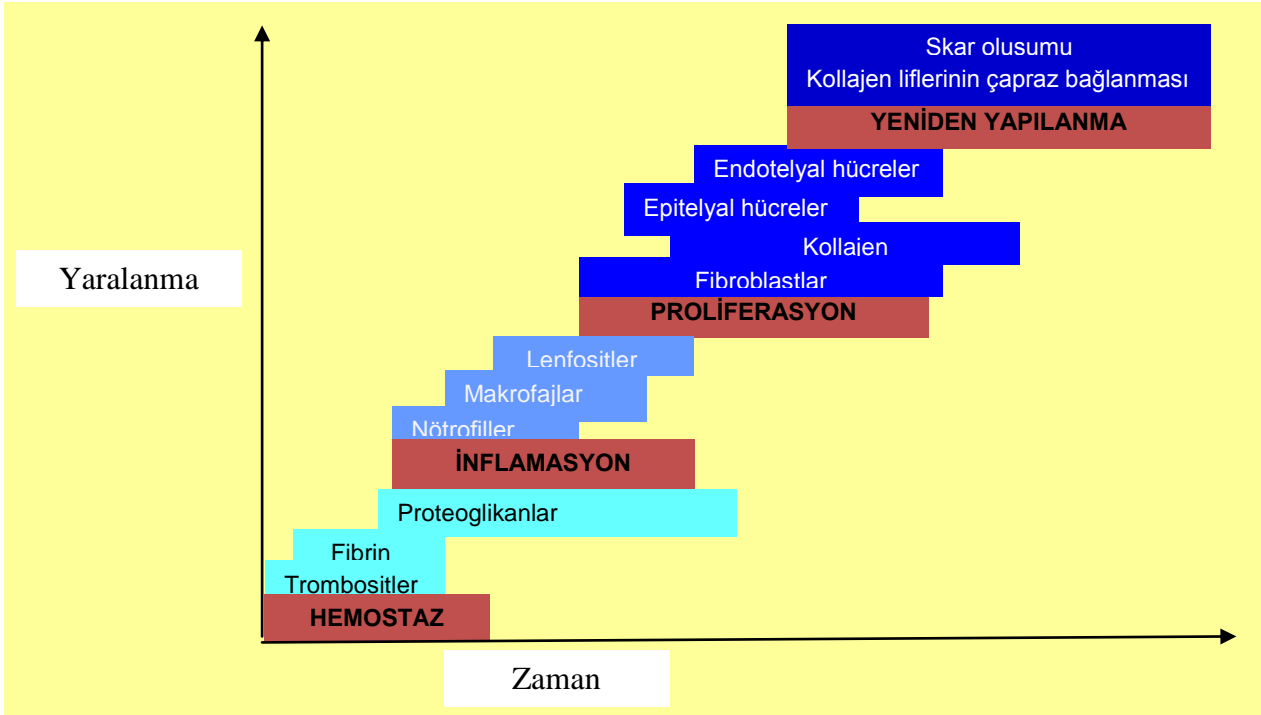
Yara iyileşmesi sürecinde gelişen tüm hücrel ve biyokimyasal olayların en önemli sonucu, yara gerilim kuvvetinin maksimuma ulaşmasıdır. İyileşmenin erken döneminde gerilme kuvvetine katkıda bulunan önemli faktörler epitel hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri ve fibrin- fibronektin kompleksi arasındaki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

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

2.4.5. Yara Kontraksiyonu

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

Yara kontraksiyon alanındaki skar dokusunun kısalması olarak tanımlanan yara kontraktürü, yanık iyileşmesinden sonra görülen kontraktürler gibi deformite ve fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. Yara zeminindeki granülasyon dokusunun greftle kapatılması miyofibroblast miktarında azalma oluşturup kontraksiyonu durdurabilir (Resim 26).



Resim 2.26: Normal yara iyileşmesi.

2.5. Çalışmada Kullanılan Belirteçler

2.5.1. Keratinler

Epitelin karakteristik ara filaman proteinleri olan keratinler heteropolimerik filamanları asidik (tip 1) ve bazik (tip 2) molekülleri olarak ayrılırlar. Hücre içi keratin filamanları moleküler ağırlıkları birbirine yakın, bir asidik ve bir bazik keratinin birlikte sunulması ile oluşurlar (52, 53, 54, 55). Bu özel keratin çiftlerinin birlikte sunulması epitele özgü olduğu gibi, hücre tabakasına da özgüdür. Her epidermal hücre tabakasındaki keratin çifti, keratinosit farklılaşmasının durumunu yansıtmaktadır (55). İnsanlarda 54 fonksiyonel keratin geni bulunmaktadır (52, 53, 54). Moleküler ağırlıkları 40 kDa ile 70 kDa arasında değişir. İzoelektrik pH 4.9- 7.8 arasındadır (53, 56).

Epitel tipine ve hücreSEL farklılaşma evresi ile ilişkili olarak eksprese olurlar. Epitelyal iskeletin bir parçası olarak keratinler, epitelyal hücre ve dokuların mekanik denge ve bütünlüğü için önemlidirler. Bununla beraber bazı keratinlerin düzenleyici fonksiyonları vardır ve stresden korunma, yara iyileşmesi ve apoptozis gibi hücre içi sinyal yollarında rol alırlar (52, 53). Embriyonik gelişim sırasında epidermiste bazal tabaka ile periderm arasındaki ara tabakada olmak üzere tüm tabakalarda keratin eksprese edilmeye başlar. Bazal tabakada keratin-5 ve 14, ara tabakada keratin-1 ve 10, periderm tabakasında ise keratin-8 ve 19 keratinleri bulunur (55). Erişkin epidermis bazal tabakasında bulunan keratinositler keratin-5 ve 14' ü eksprese ederken, stratum spinozum tabakasındaki keratinositlerde keratin-1 ve 10 ekspresyonu saptanmıştır (42). Stratum spinozum tabakasından farklılaşıp, stratum granulozum tabakasına göç eden keratinositlerde ise keratin-2e ve 9 ekspresyonu görülmüştür. Epidermisin farklı tabakalarında bulunan farklı sitokeratinlerin defektleri veya ekspresyonlarındaki bozukluklar sonucunda farklı hastalıklar gözlenmektedir. Örneğin keratin-5 veya 14 mutasyonları sonucunda epidermolizis bulloza simpleks, keratin-1 veya 10' daki mutasyonlar sonucunda epidermolitik hiperkeratoz, keratin-2e defektleri sonucunda ise İhtiyozis bulloza, keratin-9' a ait defektte ise epidermolitik palmoplanter keratodermanın geliştiği gösterilmiştir (42).

2.5.2. Monosit- makrofaj atraktan kemokin-1 [MCP-1(CCL2)]

MCP-1 kemokinler olarak bilinen kemotaktik sitokinler (CC) ailesinin bir üyesi olup (57), 23 aminoasidi içeren prekürsör protein ve 76 amino asid içeren matür peptid olarak üretilir. Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 13 kDa' dur. İnsanlarda 17. kromozom üzerine lokalizedir. Hücre yüzeyinde bağlandığı reseptörler CCR2 ve CCR4' tür (57, 58). Monositler, vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri, glomerül mezenşimal hücreleri ve osteoblastik hücreler tarafından eksprese edilirler (57). Makrofaj ve

monositler için güçlü kemoatraktandır. Hem insan hem de fare çalışmalarında yara bölgesinde MCP-1 proteininin ya da mRNA' sının arttığı gösterilmiştir (59). MCP-1 eksikliği gözlenen hayvanlarda yara yerinde geçikmiş re-epitelizasyonun varlığı, MCP-1 ekspresyonunun keratinosit migrasyonunu düzenlediğini desteklemektedir (59).

2.5.3. İnterlökin-8 (IL-8)

Başlıca stimüle olmuş monositlerden ve makrofajlardan salgılanan IL-8, ayrıca fibroblastlar, endotel hücreleri, keratinositler, melanositler, hepatositler, kondrositler, tümör hücre hatları gibi birçok hücre tarafından da üretilir (60, 61). Birçok hücre tipinde IL-8 sentezi IL-1 ve TNF- α tarafından uyarılır (60). Epitel, endotel ve fibroblastik hücrelerde ise IL-8 sentezi IL-17 tarafından kontrol edilir (60). Moleküler ağırlığı 8 kDa (72 amino asit) olup (60), IL-8 geni tarafından kodlanır (61). Hücre yüzeyinde IL-8 birçok reseptöre bağlanarak fonksiyon görür. Bunlardan en çok bilinenler; CXCR1 ve CXCR 2' dir. CXCR1' in ekspresyonu ve IL-8' e affinitesi CXCR2' ye göre daha fazladır (61). İnflamatuar cevapta ana mediatörlerden biri olan IL-8, kemoatraktan olması yanı sıra, güçlü bir anjiogenik faktördür. İnflamatuar cevapta, IL-8' in primer görevi nötrofiller gibi hedef hücrelerde kemotaksisin indüksiyonudur (61). IL-8 nötrofillerde geçici olarak sitozolik kalsiyum düzeyini arttırarak granüllerden enzimlerin salınmasına yol açarak reaktif oksijen moleküllerinin metabolizmasını ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırır (60). Anjiogenezde makrofaj kaynaklı IL-8 görev alır ve romatoid artrit, tümör büyümesi, yara iyileşmesi gibi anjiogeneze dayalı bozukluklarda rol oynar (60). IL-8 seviyesinin akut cerrahi yaralarda dermiste arttığı gösterilmiştir (59). Bununla beraber in vitro insan örneklerinde yapılan çalışmalar, IL-8' in keratinosit migrasyonunu ve proliferasyonunu stimüle

ettiğini ve yara re-epitelizasyonunda önemli bir role sahip olduğunu da desteklemektedir (59).

2.5.4. Fibroblast büyüme faktörleri (FGF)

Anjiogenez, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim ve tümörögenizde yer alan büyüme faktörleri ailesidir (62, 63). FGF ailesinin moleküler ağırlığı 16-18 kDa arasındadır. Fibroblast büyüme faktörlerinin bilinen iki esas grubu vardır: asidik FGF (FGF-1) ve bazik FGF (FGF-2) (62, 64, 65). FGF faktörleri heparine yüksek affinite gösterirler ve bu yüzden heparin bağlayan büyüme faktörü olarak isimlendirilirler. Birçok hücrenin ve dokunun proliferasyon ve farklılaşmasında FGF' ler anahtar rol oynarlar (61, 65, 66). İnsanlarda 22 adet FGF ailesi üyesi tanımlanmıştır. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü ailesinin 4 üyesi bulunmaktadır; FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4. Genellikle mitojen olarak etki göstermelerine rağmen düzenleyici, morfolojik ve endokrin etkileride vardır. FGF' lerin gelişim sırasındaki görevleri, mezoderm indüksiyonu, antero-posterior aksın belirlenmesi, ekstremitelerin oluşumu, nöral indüksiyon, beyin gelişimi, dokularda anjiogenez, keratinosit organizasyonu ve yara iyileşmesini içerir (62). FGF-2 veya bazik FGF, yara yerinde hasarlanmış endotel hücrelerinden ve makrofajlardan salgılanır ve FGF-2 aktivitesi bloke edilirse yara anjiogenezi neredeyse tamamen durur (65). Kan damarı oluşumunu stimüle ettikleri kadar yara iyileşmesinde de önemli rol alırlar. FGF-1 ve FGF-2 anjiogenezi ve fibroblastların proliferasyonunu stimüle ederek, yara iyileşmesinin erken evresinde yara kavitesini/ boşluğunu dolduran, granülasyon dokusunu oluştururlar (61). FGF-2 hasarlı endotel hücrelerinden salınarak yara bölgesinde arttığı gösterilmiştir (58). Hücre kültürü çalışmaları FGF-2' nin keratinosit motilitesini arttırdığını ve re-epitelizasyonda rol oynadığını da göstermiştir (58).

2.5.5. Epidermal büyüme faktörü (EGF)

Hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli rol oynar (67). EGF, süt, tükürük, idrar, plazma ve diğer birçok vücut sıvısında değişen konsantrasyonlarda bulunur. Ayrıca trombosit, fibroblast ve makrofajlardan eksprese edilir. EGF 6,4 kDa moleküler ağırlığında 53 aminoasitten oluşan globüler bir proteindir. Biyolojik aktivitesi için gerekli olan intramoleküler 3 disülfid bağı vardır (67). EGF birçok hücre için güçlü bir mitojendir (68). EGF, epidermal ve epitelyal hücrelerin proliferasyonunda, in vitro olarak fibroblastların, böbrek epitel hücrelerinin, insan glial hücrelerinin, over granüloza hücreleri ile birlikte tiroid hücrelerinin de indüksiyonunda görev alır (68). EGF ayrıca embriyonik hücrelerin proliferasyonunu da stimüle eder. EGF, endotelyal hücreleri için mitojeniktirler ve angiogenezi arttırırlar. Fibroblastlar ve epitelyal hücreler için güçlü kemoatraktandırlar. EGF tek başına ve diğer sitokinlerle kombine olarak yara iyileşmesinde önemli bir faktör olarak yer alır (68). Özellikle akut yaralanmalarda artmış ekspresyonu ile re-epitelizasyonun gerçekleşmesinde rol oynar. Kronik yaralarda ise EGF ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (69).

2.5.6. Kollajen-1

Bağ dokunun esas proteini ve memelilerde en çok bulunan protein olan kollajen-1, insan vücudunda da en çok bulunan kollajen tipidir. Vertebralı dokularının yapısal bütünlüğü için gerekli major fibriler ekstrasellüler bir proteindir (70). Tip 1 kollajenin sentezi, yara iyileşmesi doku morfogenezi ve fibrozisi içeren birçok biyolojik olayda artar ve TGF- β , IL-1, TNF- α , vitamin D ve C gibi birçok ekstrasellüler sinyal molekülü tarafından normal ve patolojik durumlarda sentezi kontrol edilir (70). Skar dokusunda bulunur, tamir ile dokunun iyileşmesinde en son üründür. Tendon, deri, arter duvarında, miyofibrillerin endomisyumunda, fibrokartilajda ve kemik ve dişin organik

parçalarında da bulunur (71). Kutanöz doku defektlerinin yeniden yapılanmasında tip 1 kollajen, dermisin esas yapısal bileşeni olarak merkezi bir role sahiptir (72). Deneysel granülasyon dokusunun oluşumunun 7. gününde tip 1 kollajen histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak saptanabilir (72). Bununla beraber yeni sentez edilen kollajen ile önceden bulunan kollajen arasında ayırım yapmak skar dokusunun oluşumunun takibi için önemlidir (72).

AMAÇ

Çalışmada fare embriyonik kök hücreleri kültür ortamında üretildikten sonra keratinositlere farklılaştırılması ve elde edilen bu hücrelerin oluşturulan cerrahi yara üzerine transfer edilerek kullanılabilirliği ve yara iyileşmesinde rol oynayan moleküler belirteçler ile birlikteliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 2007- 53) tarafından desteklenmiştir.

Embriyonik kök hücreler, fibroblast hücrelerinden oluşturulan besleyici tabaka üzerinde kültür edilerek çoğalmaları sağlandıktan sonra keratinositlere farklılaştırıldı. Elde edilen keratinositler, analizi yapıldıktan sonra yara yerine transferi amacı ile mesh üzerinde kültüre edildi. Mesh ile birlikte hücreler yara yerine transfer edilerek yara iyileşmesinin farklı dönemlerinde salgılanan moleküllerin analizi ile üretilen keratinositlerin yara iyileşmesindeki etkisi araştırıldı.

3.1. STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması Ve Kültürü

3.1.1. Jelatinle Kaplı Kültür Kaplarının Hazırlanması

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

3.1.2. STO Hücrelerinin Kültürü

Stok fare fibroblast hücreleri (STO, 86032003, ECACC) sıvı azot tankından alındıktan sonra hücreler direkt olarak 37⁰ C sıcak su banyosu içerisinde çözülmesi sağlandı. Stok hücre (1 ml), 5 ml STO kültür vasatı [4500mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM, F0445, Biochrom AG, Berlin, Germany) , % 15 fötal sığır serumu (FBS, S0113, Biochrom AG, Berlin, Germany), % 1 L-glutamin (K0283, Biochrom AG, Berlin, Germany), % 1 Penisilin/streptomisin (A2213, Biochrom AG, Berlin, Almanya)] içerisine alındı. Hücreler 15 ml' lik falkon tüpleri içerisinde 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi ve üstte kalan kısım atılarak hücre peletine 3 ml yeni hazırlanmış STO kültür vasatı ilave edildi. Hücreler pipetaj yapılarak 3 kültür kabına dağıtıldı, 37⁰ C' de % 5 CO₂' li inkübatörde her iki günde bir kültür vasatı değiştirilerek hücreler konfluent oluncaya kadar yaklaşık 1 hafta kültüre edildi. Konfluent olan STO hücreleri 2 ml tripsin/EDTA (L2143, Biochrom AG, Berlin, Germany) solüsyonu ile 5 dk. 37⁰ C' de % 5 CO₂' li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin kültür kabından kaldırılması sağlandı. Hücrelerin kalktıkları kontrol edildikten sonra her bir kültür kabının içerisine 2 ml STO kültür vasatı ilave edildi. Hücreler toplanarak 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi ve hücrelerin üst kısmında bulunan kültür vasatı atılarak 3 ml yeni STO kültür vasatı ilave edildi. Bir kültür kabından elde edilen hücreler 3 adet yeni kültür kabına bölünerek STO hücrelerinin kültürü sağlandı. Her hafta STO hücreleri konfluent olduktan sonra bu şekilde kültüre edilerek yeterli sayıda hücre elde edilinceye kadar STO hücrelerinin kültürüne devam edildi.

3.1.3. STO Hücrelerinin Mitomisin-C İle Muamele Edilmesi

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

3.2. Embriyonik Kök Hücre Kültürü

Embriyonik kök hücre hattı (CGR8, 07032901, ECACC) kuru buz üzerinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra hücreler bekletilmeden 37° C sıcak su banyosu içerisinde çözülmesi sağlandıktan sonra 1 ml hücre 5 ml embriyonik kök hücre (EKH) kültür vasatı [4500 mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM, F0445, Biochrom AG, Berlin, Germany) , % 15 fetal sığır serumu (FBS, S0113, Biochrom AG, Berlin, Germany), % 1 L-glutamin (K0283, Biochrom AG, Berlin, Germany), % 1 Penisilin/streptomisin (A2213, Biochrom AG, Berlin, Germany), 0.1 mM Non-essential amino asid (NEAA, K0293, Biochrom AG, Berlin, Germany), 10⁻⁶ M β-mercaptoethanol (M7522, Sigma, St. Louis, USA) ve 1000 U/ml lökemia inhibitor faktör (LIF, L5158, Sigma, St. Louis, USA)] içerisine alındı. Hücreler 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım atılarak hücre peletine 3 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek pipetaj yapıldı ve hücrelerin eşit miktarda dağılımı sağlandıktan sonra mitomisin-C ile muamele edilmiş STO hücreleri üzerine konularak kültüre

edildi. Her iki günde bir kültür vasatları değiştirilerek oluşan koloniler inverted mikroskobu (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) altında değerlendirildi.

3.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Pasajlanması

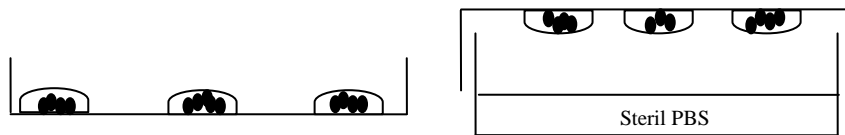
Mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri üzerinde koloni oluşturmuş embriyonik kök hücrelere 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu konarak 5 dk. 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kültür kabından kalktıları kontrol edildikten sonra üzerine 2 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek tripsin/EDTA etkisinin durdurulması sağlandı. Hücreler 15 ml' lik tüplere toplanarak 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildi. Hücrelerin üst kısmında bulunan kültür vasatı atılarak 3 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek pipetaj yapıldı ve hücrelerin eşit miktarda dağılımı sağlandıktan sonra daha önce hazırlanmış 3 adet mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri üzerine eşit miktarda hücreler dağıtıldı. EKH' ler 7 günde bir olmak üzere 6 kez pasajlandı.

3.2.2. Embriyonik Kök Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Koloni oluşturdukları gözlenen EKH' lerin üzerindeki kültür vasatı aspire edildikten sonra 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu konuldu ve 5 dk. 37° C' de inkübe edildi. Hücrelerin kültür kabından kalktıları gözlendikten sonra üzerine 2 ml EKH kültür vasatı ilave edildi. Toplanan hücreler 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılarak alttaki hücre peleti üzerine her bir vial için 1 ml olacak şekilde 1:9 oranında hazırlanan [dimetil sulfoksid (DMSO, A3672,0250, Applichem, Darmstadt, Germany):FBS (S0113, Biochrom AG, Berlin, Germany)] hücre dondurma vasatı ilave edilerek sıvı azot tankında daha sonra kullanılmak üzere stoklandılar.

3.2.3. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması

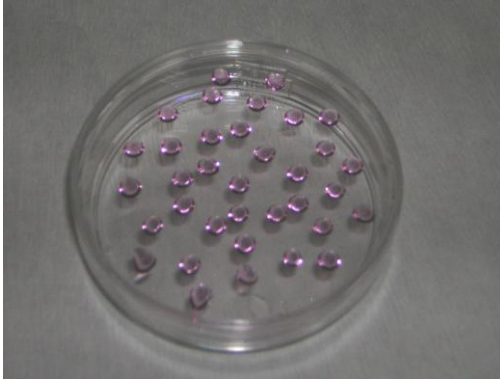
Mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri üzerinde koloni oluşturmuş embriyonik kök hücrelere 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu konarak 5 dk. 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde bekletildi. Bu aşamada kültür kabından kalkan hücrelerin üzerine 2 ml EKH kültür vasatı ilave edilerek tripsin/EDTA etkisinin durdurulması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



Şekil 3.1: Hanging Drop Yönteminin Çizimsel Açıklaması

Hanging drop yöntemi kullanılarak oluşturulan damlalar 2 gün 37° C' de % 5 CO₂' li inkübatörde bekletildikten sonra farklılaştırma kültür vasatı

ilave edilerek embriyoblastlar toplandı. Embriyoblastlar jelatin ve STO fare fibroblast hücreleri içermeyen kültür kabına aktarılarak kültüre devam edildi. Kültür kaplarına aktarıldıktan sonra 4 gün kültüre edilerek yeterli büyüklüğe ulaşmaları sağlanan embriyoblastlar keratinosit farklılaştırma kültür vasatına alındı.



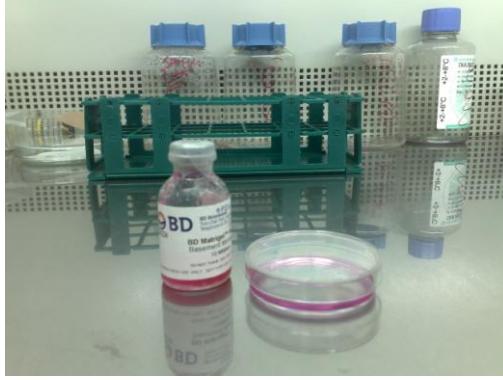
Resim 3.1: Hanging Drop Yöntemi ile oluşturulan kültür ortamı. X100

3.3. Embriyoblastlardan Keratinosit Kültürü

3.3.1. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması

Steril edilmiş 12 mm çapında yuvarlak lameller (0111520, Marienfeld Lab., Königshofen, Germany) 24 gözlü kültür kabına yerleştirildi. Matrijel (354234, BD Biosciences, Massachusetts, USA) benmari usulü eritilerek, DMEM ile 1/100 oranında dilüe edildi (Resim 3.2). Dilüe edilen matrijel, 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözünde 500 µl olacak şekilde daha önce yerleştirilen yuvarlak lamellerin üzerine ilave edildi. Oda sıcaklığında ve steril ortamda 1 saat bekletildikten sonra kültür kaplarındaki matrijel fazlası alınarak, 4. günün sonunda yeterli büyüklüğe ulaşan embriyoblastlar transfer edildi. Embriyoblastların 2 gün matrijele yapışması beklendi ve kültürün 3. gününden itibaren 24 gözlü kültür kabının her bir gözüne 0.5 nM kemik morfogenetik proteini-4 (BMP-4, B2680, Sigma, St. Louis, USA) olacak

şekilde 10 gün boyunca her gün BMP-4 ilave edilerek hücrelerin keratinosite farklılaşmaları sağlandı.



**Resim 3.2: Matrijel ve hazırlanışı.
X100**

3.3.2. Keratinositlerin Dondurularak Saklanması

Keratinositlerin üzerindeki kültür vasatı aspire edildikten sonra 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu konuldu ve 5 dk. 37⁰ C' de inkübe edildi. Hücrelerin kültür kabından kalktıkları gözlemlendikten sonra üzerine 2 ml farklılaştırma kültür vasatı ilave edildi. 15 ml' lik tüplere toplanan hücreler 5 dk. 1000 rpm de santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılarak alttaki hücre peleti üzerine her bir vial için 1 ml olacak şekilde 1:9 oranında hazırlanan DMSO:FBS dondurma vasatı ilave edilerek projenin diğer aşamalarında kullanılmak üzere sıvı azot tankında saklandı.

3.3.3. Keratinositlerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile Tanımlanması

Farklılaştırılan hücrelerin keratinosit olduklarının belirlenmesi amacı ile hücrelerden bir kısmının kültür vasatı uzaklaştırılarak bir defa steril PBS ile yıkandıktan sonra % 4' lük paraformaldehit ile 30 dk. tespit edildi. Tespit işleminden sonra 3 kez 5 dk. PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk. % 3' lük hidrojen peroksit (H₂O₂, K31355100, Merck,

Darmstadt, Germany) uygulandıktan sonra, hücreler 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için hücreler % 0,1 Triton-X 100 (A4975,0100, Applichem, Darmstadt, Germany) ile 15 dk. buz üstünde inkübe edildi ve 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra 1 saat bloklama solüsyonu (K023, DBS, California, USA) konarak bekletildi. 1/ 25 dilüsyonda monoklonal anti-sitokeratin-8 (sc-101459, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) ve monoklonal anti-sitokeratin-14 (sc-53253, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) antikoları ile bir gece +4 C⁰ de inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkanan hücreler anti-mouse ve anti-rabbit biotinlenmiş ikincil antikor (KP500, DBS, California, USA) ile 30 dk. inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5' er dk. yıkanan hücreler streptavidin hidrojen peroksidaz (KP500, DBS, California, USA) 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 (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile 5 dk. boyama yapıldıktan sonra hücreler distile su ile 15 dk. yıkanarak direkt olarak kapatma medyumu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı ve Olympus marka BX 40 mikroskop ile incelendi.

3.3.4. Keratinositlerin Elektron Mikroskopi Takibi ve İncelenmesi

Hücreler tripsinle kaldırılarak toplandı ve 1000 rpm hızda 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantı atıldıktan sonra % 2.5' lik gluteraldehit (16210, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) ile +4⁰ C' de 1 saat tespit edilen hücreler tekrar santrifüj edilerek 3 saat süreyle tekrar gluteraldehit ile tespit edildi. Santrifüjden sonra A+B tampon solüsyonu (Tampon A: 0.06 M KH₂PO₄ + Tampon B: 0.08 M Na₂HPO₄) ile 2 kez 10' ar dk. yıkandı. İkincil tespit işlemi için % 1' lik Osmium tetroksit (R1015, Agar Scientific, Essex, UK) ile karanlıkta +4⁰ C' de 1 saat tespit edildi. A+B tampon solüsyonu ile

yıkandıktan sonra hücreler % 2' lik agara (A 2114, AppliChem, Darmstadt, Germany) gömüldü ve tekrar tamponla 10 dk. yıkandı. Dehidratasyon için agara gömülü hücreler sırasıyla % 70 ve % 80 alkolden (111727, Merk, Darmstadt, Germany) 10 dk., absolü alkolden de 2 kez 10 dk. ve 15 dk. süre ile geçirildi. İnfiltrasyon için 1/1 oranında absolü alkol ve propilen oksit (R1080, Agar Scientific, Essex, UK) karışımında 30 dk. bekletildikten sonra 15' er dk. 2 kez saf propilen oksitte tutuldu. Daha sonra 2:1 oranında propilen oksit ve saf epon (2660, SPI-CHEM, West Chester, USA) karışımında 1 saat, 1:2 oranında propilen oksit ve saf epon karışımında 1 saat bekletilen hücreler saf eponda bir gece +4° C' de bekletildi. Ertesi gün örnekler üzerindeki saf epon alınarak, içerisinde % 1.5 olacak şekilde 2,4,6 tris dimetilaminometil fenol (DMP-30, 2660, SPI-CHEM, West Chester, USA) içeren epon ilave edilerek örnekler kapsüllere gömüldü. Polimerizasyon için sırasıyla 37° C, 45 ° C ve 60 ° C etüvde birer gün bekletildi. Polimerize olan epon bloklardan ultra mikrotomda (EM UC6, Leica, Vienna, Austria) yarı ince (~800 nm) ve ince kesitler (~120 nm) alındı.

Yarı ince kesitlerin toluidin mavisi ile boyanması aşamasında, 1 gr sodyum tetraborat (6303, Merck, Darmstadt, Germany) 100 ml distile suda çözülerek 1 gr toz halindeki toluidin mavisi (R1727, Agar Scientific, Essex, UK) eklendi. İyi karıştırılarak filtre kağıdı ile süzülen boya kesit alınırken eş zamanlı olarak benmari usulü ile ısıtıldı. Alınan yarı ince kesitler öze ile alınarak boyaya konuldu. 1 dk. boya içinde tutulan kesitler yine öze ile alınarak distile suda 2- 3 kez yıkandı. Lam üstüne alındıktan sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

İnce kesitler formvar kaplı gridlere (F218/100, TAAB, Berks, England) alındı. İnce kesitlerin kontrastlama aşamasında, 2 gr uranil asetat (U007, TAAB, Berks, England) 80 ml metil alkolde (K32626607, Merck, Darmstadt, Germany) çözülerek, 20 ml distile su eklendi. Kesitler 45 dk. uranil asetat

çözeltisi içinde bekletildi. Bidistile su ile 15 dk. yıkanan kesitler kurutuldu. Kesitler kurşun sitrat çözeltisi (0.5 ml A solüsyonu: 0.1 M NaOH [2680100, Smyras, İzmir, Türkiye] + 50 ml B solüsyonu: 0.01 M Pb (NO₃)₂ [L003, TAAB, Berks, England]) içinde 15 dk. bekletildikten sonra bidistile su ile 15 dk. yıkandı. Kuruması sağlanan kesitler Zeiss, LIBRA 120 elektron mikroskobunda incelendi.

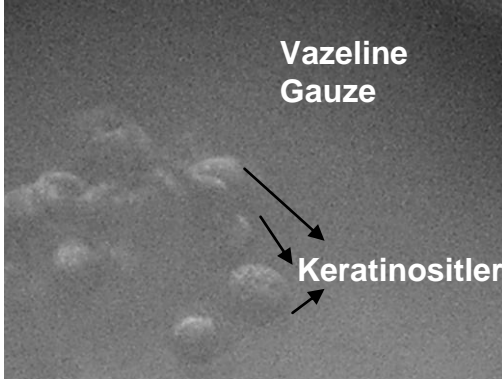
3.3.5. Keratinositlerin Brd-U ile İşaretlenmesi

Bromodeoksiüridin (Brd-U), bir timidin analogudur. Brd-U genellikle canlı dokulardaki çoğalan hücrelerin saptanmasında kullanılır. Brd-U, yeni sentezlenen DNA' ya hücre siklusunun S fazında bağlanır. Böylelikle S fazında işaretlenen hücreleri daha sonra incelenme olanağı sağlar (73, 74). Keratinositleri Brd-U ile işaretlemek amacı ile hücreler Brd-U işaretleme seti (11296736001, Roche, Mannheim, Germany) içerisindeki 1:1000 oranında dilüe Brd-U ile 37° C' de 1 saat inkübe edildi. Uygulamadan sonra kültür vasatı ile 3 defa 5'er dakika yıkanan hücreler, kültür vasatı aspire edildikten sonra 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu konuldu ve 5 dk. 37° C' de inkübe edildi. Hücrelerin kültür kabından kalktıkları gözlemlendikten sonra üzerine 2 ml farklılaştırma kültür vasatı ilave edildi. 15 ml' lik tüplere toplanan hücreler 5 dk. 1000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılarak alttaki hücre peleti üzerine kültür vasatı ilavesi yapılarak içerisinde mesh bulunan 24 gözlü kültür kaplarına pasajlandı.

3.3.6. Keratinositlerin Vaseline Gauze Üzerinde Kültüre Edilmesi

Yara yerine hücrelerin transfer edilebilmesinde kullanılan mesh, steril vazeline gauze (8884423600, Tyco Healthcare, Mansfield, USA), hava akışı kabin içinde steril makasla 24 gözlü kültür kaplarının gözlerine uyacak şekilde kesilerek önceden 1 ml kültür vasatı konmuş kültür kabının gözlerine

yerleştirildi. Her bir gözdeki vazelin gauze üzerinde 5×10^3 hücre/ml olacak şekilde hücreler ilave edildi. Vazelin gauze üzerindeki hücreler 5 gün süre ile inkübe edildi ve inverted mikroskop altında incelendi (IX71 Olympus, Tokyo, Japan) (Resim 3.3).



Resim 3.3: Vaseline Gauze üzerindeki keratinositler. X1000

3.4. Keratinositlerin Yara Yerine Transferi

Bulb C tipi 60 adet fare Bornova Veterinerlik Araştırma Enstitüsünden temin edildi. Her bir grupta 15 adet fare olacak şekilde ayrıldı.

Gruplar:

Grup 1: Deney Grubu (Cerrahi yara oluşturulduktan sonra mesh+hücre uygulandı)

Grup 2: Kontrol Grubu (Sadece cerrahi yara oluşturuldu)

Grup 3: Sham Grubu (Cerrahi yara oluşturulduktan sonra mesh uygulandı)

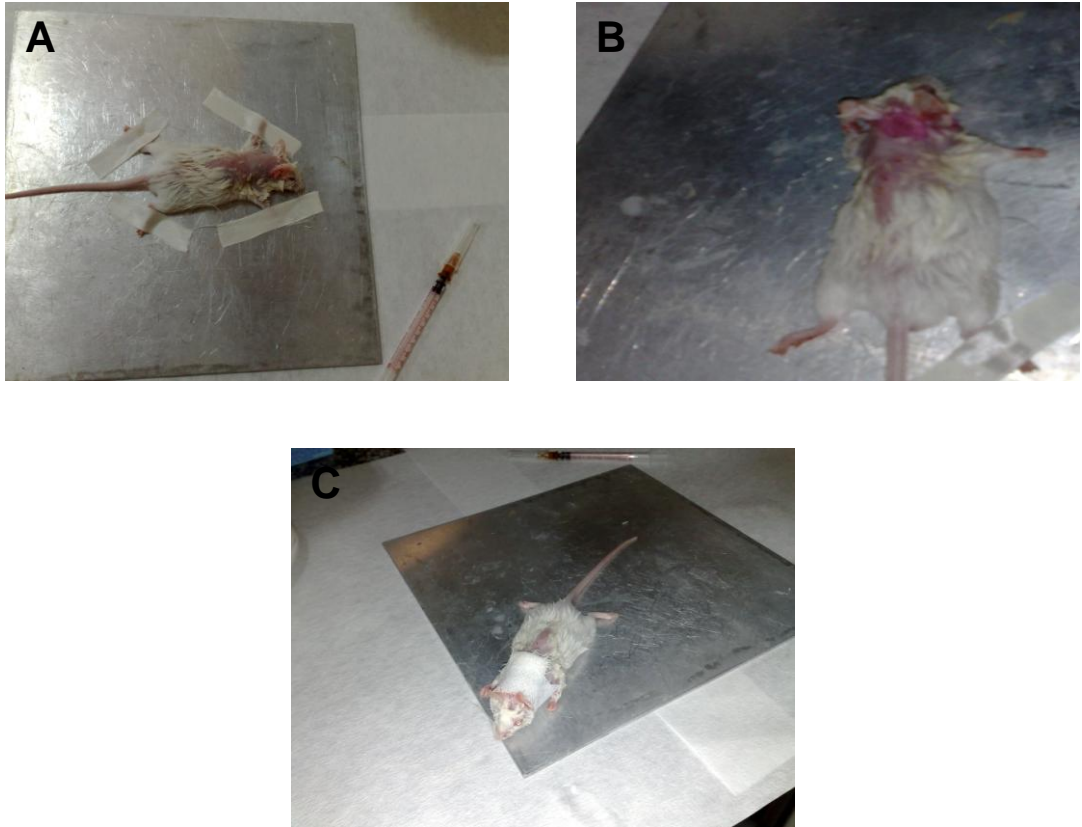
Grup 4: Sağlam Deri (Hiçbir işlem uygulanmadı)

Her bir gruptan 3., 5. ve 7. günlerde örnekler alındı. O nedenle her bir grup için gün bazında 5 denekten örnek alındı.

Cerrahi işlem uygulanacak farelere 80-100 mg/kg ketamin (Ketalar, 002038, Eczacıbaşı Sağlık Ürünleri Sanayi ve Ticaret AŞ., Lüleburgaz, Türkiye) ve 5-10 mg/kg xylazin (Alfazyne, 0804125-11, Alfasan, Woerden, Holland) olacak şekilde intraperitoneal olarak işlemden hemen önce uygulandı. Farelerin ense bölgesi tüy dökücü krem (6001106118501, Veet, Reckitt Benckiser, Elandsfontein, South Africa) ile kıllar uzaklaştırıldıktan sonra, steril % 0.9 serum fizyolojik (SF) ile temizlendi (Resim 3.4 A). Grup 1, 2 ve 3' deki deneklerde steril cerrahi set kullanılarak farenin kıllardan uzaklaştırılan ense bölgesinde 1x1 cm boyutlarında epidermis ve dermisi içeren yara yeri oluşturuldu (Resim 3.4 B). Grup 2' deki denekler kontrol grubu olarak alındı ve sadece steril serum fizyolojik ile ıslatılmış tampon konarak kapatıldı. Grup 3' deki deneklerde yara yerine kültür vasatı ile ıslatılmış vazeline gauze konarak kapatıldı ve denekler sham grubu olarak değerlendirildi. Grup 1' deki denekler deney grubunu oluşturdu ve üzerinde kültüre edilen keratinositler bulunan vazeline gauze konularak kapatıldı. Keratinositler yara yeri üzerine gelecek şekilde vazeline gauze konduktan

sonra saat 3 ve 12 yönünde sağlam deri ile birlikte suture edildi. Yara yerleri steril SF' li gazlı bez konarak betafix (5502, Betasan, Kocaeli, Türkiye) ile tespit edilerek kapatıldı (Resim 3.4 C).

Deney, kontrol ve sham gruplarındaki deneklerden 3., 5. ve 7. günlerde yara bölgesi ve sağlam deriyi içeren, sağlam deri grubundan ise sadece sağlam deriyi içeren biyopsi örnekleri alınarak ışık mikroskopik inceleme için % 10 formalin solüsyonuna ve elektron mikroskopik inceleme için % 2.5 gluteraldehit solüsyonuna kondu.



Resim 3.4: Uygun anestezi uygulandıktan sonra ense bölgelerindeki kıllar tüy dökücü krem ile uzaklaştırılan ve tespit edilen denek (A), yara yeri oluşturulduktan sonra (B), yara yerine mesh+hücrelerin transfer edilip pansumanı yapılarak betafix ile kapatıldıktan sonra (C). X100

3.5. Işık Mikroskopik İnceleme

Denekler her gün pansumanları yapıldıktan sonra 3., 5. ve 7. günlerde örnek alındıktan sonra sakrifiye edildi. Yara yeri ve sağlam deriyi içeren örnekler % 10' luk formalin solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm' lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin (H-E) ve Masson Trikrom boyamaları yapıldı. Yara iyileşmesinin moleküler analizi için sitokeratin-8 (sc-101459, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), sitokeratin-14 (sc-53253, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), EGF (sc-57088, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), IL-8 (sc-73321, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), FGF-1 (sc-1884, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), FGF-2 (sc-79, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), MCP-1(NB110-2000, Novus Biologicals, Littleton, USA) ve kollajen-1 (sc-59772, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) dağılımları indirekt immunohistokimya yöntemi ile incelendi.

3.5.1. Parafin Doku Takibi

Tespit edilen deri örnekleri, tespit solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30' ar dakika % 60' dan % 80' e artan etil alkol serilerinden geçirildi. % 95 alkol içerisinde 1' er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1' er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dakika 60° C' lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo

3.1). Alınan 5 µm' lik kesitlere histokimyasal inceleme için hematoksil-eozin ve Mason Trikrom boyaları, immunohistokimyasal inceleme için indirek immunoperaksidaz ve anti-Brd-U boyaması yapıldı.

Tablo 3.1 Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme 60° C etüvde	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

3.5.2. Hematoksilin-Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm' lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95' den % 60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk. boyandıktan sonra, boyanın

fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk. Akar suda yıkandı.

Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk. akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk. eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk. akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Hematoksilen-Eozin Boyaması

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

3.5.3. Masson Trikrom Boyaması

5 µm' lik parafin kesitler, deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde tutulduktan sonra 30' ar dakika iki değişim ksilen uygulandı ve ardından rehidratasyon amacıyla azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler üzerine % 71 pikrik asit (80456, Biochemika, Buchs, Germany), % 24 formaldehit (605-001-01-2, Birpa, Ankara, Türkiye), % 5 asetik asit (27225, Sigma, Seelze, Germany) oranında hazırlanan Bouin solüsyonundan konarak önceden ısıtılmış 56° C' deki etüvde 15 dk. bekletildi. Çeşme suyunda soğutulan preparatlar 5 dk. akar suda yıkandı. Masson Trikrom boyama setinde hazır olarak bulunan (HT15, Sigma, St. Louis, USA) 1:1 oranında Weigert hematoksilen boyası ile ferrik klorür çözeltisi karışımı damlatılarak 5 dk. boyanan kesitler, 5' er dk. akar su ve distile su ile yıkandı. Kesitlere, Biebrich Scarlet- Acid Fuchsin çözeltisi 5 dk. uygulandıktan sonra distile su ile 5 dk. yıkandı. Fosfotungstik asit, fosfomolibdik asit ve distile su sırasıyla 1:1:2 oranında karıştırılarak 5 dk. uygulandı. Fosfotungstik asit, fosfomolibdik asit ve distile su karışımı uzaklaştırıldıktan sonra kesitler anilin mavisi boyası ile 5 dk. boyandı. Kesitler % 1' lik asetik asit solüsyonu içerisinde 2 dk. tutulduktan sonra 5 dk. distile su ile yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirilen kesitler, ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Masson Trikrom Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Akselerasyon	Bouin solüsyonu (56° C)	15 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Weigert Demirli Hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Boyama	Biebrich Scarlet Acid Fuchsin	5 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Boyama	Fosfotungstik asit, fosfomolibdik asit ve distile su karışımı	5 dakika
Boyama	Anilin mavisi	5 dakika
Yıkama	% 1 asetik asit	2 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 ve % 95' lik alkol	2' şer dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika (2 değişim)
Kapama	Entellan	

3.5.4. Brd-U İle İşaretlenmiş Keratinositlerin İncelenmesi

Anti-Brd-U boyaması, Brd-U ile işaretlenmiş hücrelerin analizine olanak sağlar. Böylelikle S fazında işaretlenmiş hücreler anti-Brd-U boyaması ile immunohistokimyasal veya akış sitometrisi ile incelenebilir (73, 74).

Brd-U ile işaretlenmiş ve yara yerine transfer edilen embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan keratinositlerin bulunduğu histolojik örneklerden alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95' den % 60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile suda 10 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5 'lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 10 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. % 3' lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitlere DNA denatürasyonu için 2.5 N HCL 37° C de 15 dakika uygulandı. Tekrar 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler 37° C' de 30 dakika bloklama solüsyonu (800-729-8350, Scytek Lab., Utah, USA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra monoklonal anti-Brd-U antikoru (B2531, Sigma, Missouri, USA) 1/100 dilüsyonda 37° C' de 2 saat uygulandı. PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (800-729-8350, Scytek Lab., Utah, USA) ile 30' ar dakika boyandı. Yine 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) ile 2 dk. boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 15 dk. yıkanan kesitler % 80 ve % 95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulduktan sonra

şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutuldu ve entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 Anti-Brd-U Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	2.5 N HCl	15 dakika, 37°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	30 dakika, 37°C de
Antikor ile inkübasyon	Anti-Brd-U	2 saat, 37°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika

Boyama	DAB	2 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Zıt Boyama	Mayer' s hematoksilen	15 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.5.5. İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Alınan deri kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95' ten % 60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5' lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. % 3' lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-sitokeratin-8 (sc-101459, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-sitokeratin-14 (sc-53253, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-EGF (sc-57088, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-IL-8 (sc-73321, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-FGF-1 (sc-1884, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-FGF-2 (sc-79, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), MCP-1(NB110-2000, Novus Biologicals, Littleton, USA) ve anti-kollajen-1 (sc-59772, Santa Cruz

Biotechnology, Heidelberg, Germany) (Tablo 3.6) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 30' ar dakika boyandı. Yine üç defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, 85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 5 dk. boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk. yıkanan kesitler kapatma medyumunu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 3.5)

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

Tablo 3.5 İndirek İmmunohistokiya Boyaması

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

	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	10 dakika
Antikor ile inkübasyon	K-8, K-14, FGF-1, FGF-2, MCP-1, EGF, IL-8, Kollajen-1	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	AEC	5 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Zıt Boyama	Mayer' s hematoksilen	15 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Kapama	Kapatma mediumu	

Tablo 3.6: Çalışmada Kullanılan Primer Antikorlar

Antikor Adı	Katalog No	Türü	Firma	Dilüsyon
Sitokeratin-8	sc-101459	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/75
Sitokeratin-14	sc-53253	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/75
EGF	sc-57088	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/200
IL-8	sc-73321	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/200
FGF-1	sc-1884	Goat Poliklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/200
FGF-2	sc-79	Rabbit Poliklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/200
MCP-1	NB110-2000	Rabbit Monoklonal	Novus Biologicals ²	1/200
Kollajen-1	sc-59772	Mouse Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ¹	1/200

¹ Heidelberg, Germany

² Littleton, USA

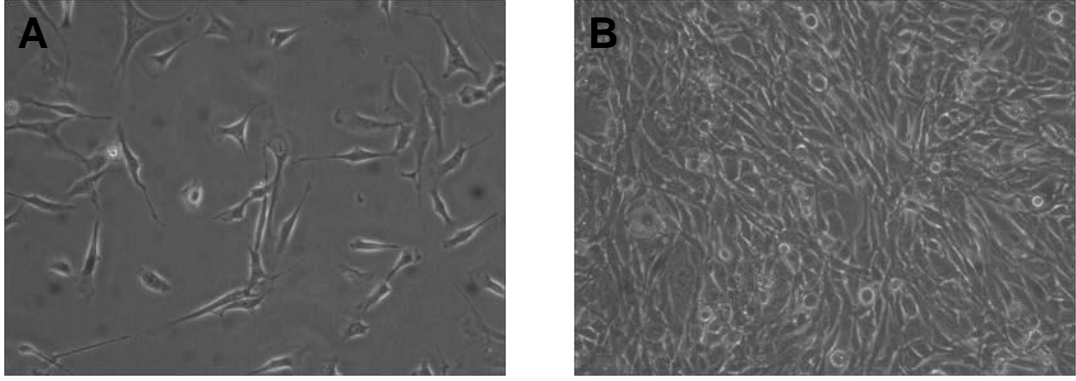
3.6. Deri Dokularının Elektron Mikroskopi Takibi ve İncelenmesi

Yara yeri ve sağlam deriyi içeren örnekler yaklaşık 1 cm³ olacak şekilde küçültüldükten sonra 2 değişim % 2.5' lik glutraldehit (16210, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) ile +4⁰ C' de önce 1 saat sonra 3 saat süre ile tespit edildi. A+B tampon solüsyonu (Tampon A: 0.06 M KH₂PO₄ + Tampon B: 0.08 M Na₂HPO₄) ile 2 kez 10' ar dk. yıkandı. İkincil tespit için % 1' lik Osmium tetroksit (R1015, Agar Scientific, Essex, UK) ile karanlıkta +4⁰ C' de 1 saat tespit edildi. A+B tampon solüsyonu ile 15 dk. yıkanan örnekler dehidratasyon için sırasıyla % 50, % 60, % 70 ve % 80 alkolden (1 11727, Merk, Darmstadt, Germany) 15' er dk., absolü alkolden de 2 kez 15' er dk. süreyle geçirildi. İnfiltrasyon için 1/1 oranında absolü alkol ve propilen oksit (R1080, Agar Scientific, Essex, UK) karışımında 30 dk. bekletildikten sonra 15' er dk. 2 kez saf propilen oksitte tutuldu. Daha sonra 2:1 oranında propilen oksit ve saf epon (2660, SPI-CHEM, West Chester, USA) karışımında 1 saat, 1:2 oranında propilen oksit ve saf epon karışımında 1 saat bekletilen hücreler saf eponda bir gece +4⁰ C'de bekletildi. Ertesi gün örnekler üzerindeki saf epon alınarak, içerisinde % 1.5 olacak şekilde DMP-30 (2660, SPI-CHEM, West Chester, USA) içeren epon ilave edilerek örnekler kapsüllere gömüldü. Polimerizasyon için sırasıyla 37⁰ C, 45⁰ C ve 60⁰ C etüvde birer gün bekletildi. Polimerize olan epon bloklardan ultra mikrotomda (EM UC6, Leica, Vienna, Austria) yarı ince (~800 nm) ve ince kesitler (~120 nm) alındı. Yarı ince kesitler toluidin mavisi, ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama işlemleri keratinositlerdeki gibi yapıldıktan sonra (Bakınız bölüm 3.3.4) yarı ince kesitler Olympus BX40 mikroskopunda, ince kesitler Zeiss, LIBRA 120 elektron mikroskopunda incelendi.

IV. BULGULAR

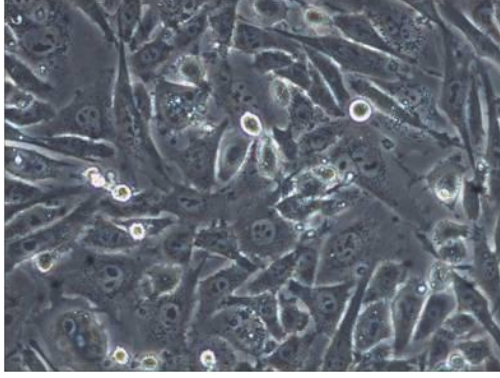
4.1. Embriyonik Kök Hücre Kültürü

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



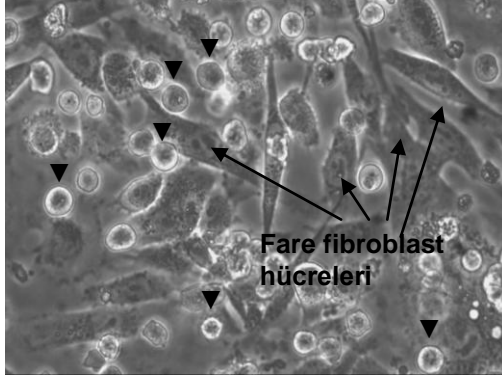
Resim 4.1: Kültürün 2. gününde (A) ve 7. gününde (B) fare fibroblast hücreleri. X100

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

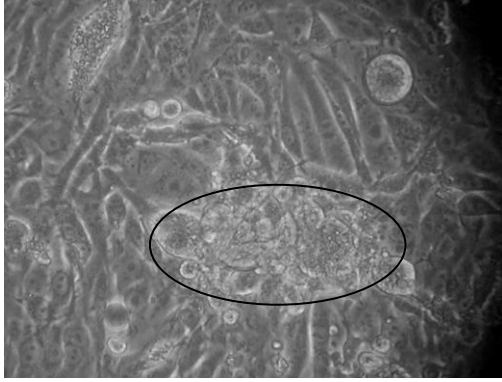


Resim 4.2: Mitomisin-C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri (kültürün 7. günü). X200

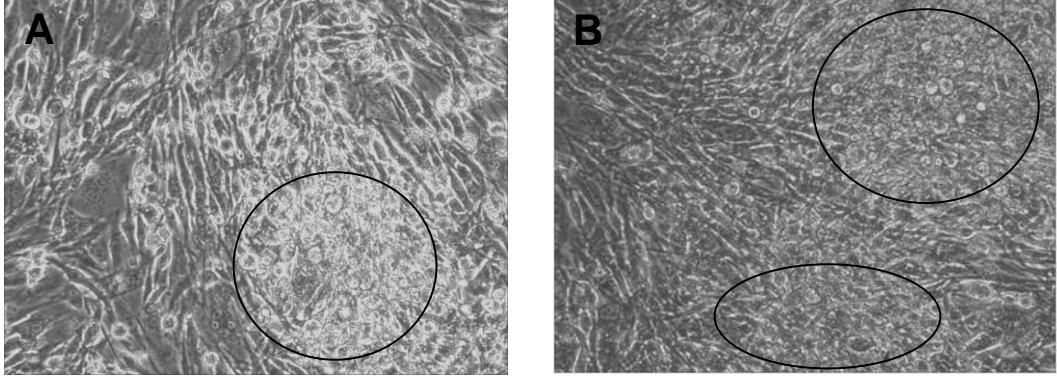
Embriyonik kök hücre hattı kuru buz üzerinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra hücreler bekletilmeden 37⁰ C sıcak su banyosu içerisinde çözülmesi sağlanarak embriyonik kök hücre kültür vasatı içinde, eşzamanlı olarak hazırlanan mitomisin-C uygulanmış fare fibroblast hücreleri üzerinde kültüre edildi. Hücrelerin alttaki fibroblast hücrelerinin üzerinde yuvarlak şekilli ve parlak çekirdekli olarak buldukları gözlemlendi (Resim 4.3). Her iki günde bir kültür vasatları değiştirildikten sonra incelenen hücrelerin alttaki fibroblast hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilen, küçük koloniler oluşturmaya başladıkları izlendi (Resim 4.4). Embriyonik kök hücreler kültür kabının yüzeyine doğru çoğaldıkları için oluşan kolonilerin, fare fibroblast hücrelerinden keskin sınırlarla ayrıldıkları ve sıkıca birbirine yapışmış oldukları gözlemlendi (Resim 4.5 A). Kültüre devam edildiğinde ise, kolonideki hücrelerin çoğalması ile birlikte kolonilerin büyüdüğü, alttaki fibroblast hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebildikleri ve kolonideki hücre sayısının artmış olmasından dolayı kontürlerinin net olarak seçilemediği saptandı (Resim 4.5 B).



Resim 4.3: Mitomisin-C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerine transfer edilen embriyonik kök hücreler (▼: Embriyonik kök hücreler). X200



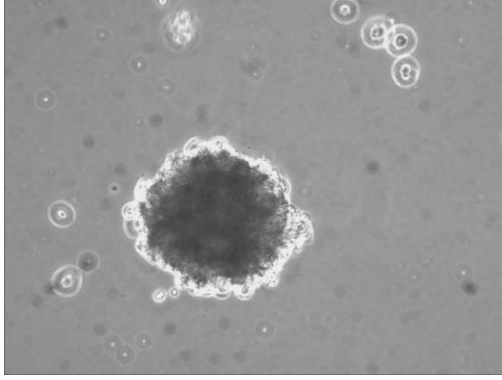
Resim 4.4: Mitomisin-C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerinde kültürün 1. günündeki embriyonik kök hücre kolonileri. X100



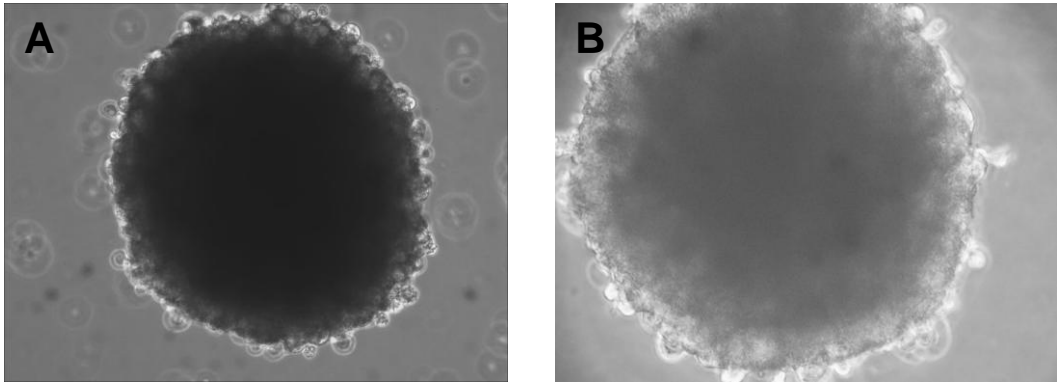
Resim 4.5: Kültürün 4. gününde (A) ve 7. gününde (B) mitomisin-C uygulanmış konfluent fare fibroblast hücreleri üzerindeki embriyonik kök hücre kolonileri. X100

4.2. Embriyonik Kök Hücrelerden Embriyoblastların Oluşturulması

Hanging drop yöntemi kullanılarak embriyonik kök hücrelerden oluşturulan embriyoblastların, tek tek hücrelerden ziyade hücrelerin bir araya gelmesinden oluşan, kültür vasatı içerisinde yüzen, yuvarlak şekilli, düzensiz kontürlere sahip oldukları izlendi (Resim 4.6). Embriyoblastlar 4 gün süre ile kültüre edilerek yeterli büyüklüğe ulaşmaları sağlandı (Resim 4.7). Oluşan embriyoblastlarda hem dış hem de iç tabakayı oluşturan hücreler ayırt edilmekteydi (Resim 4.7). Dış tabakadaki hücrelerin belirgin biçimde küboidal şekilli yüzey ektodermine benzer tek tabakalı hücrelerden oluştuğu gözlemlendi (Resim 4.7).



Resim 4.6: Hanging drop yöntemi ile oluşturulan embriyoblast. X100

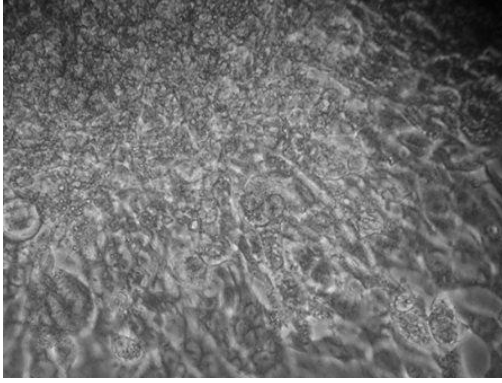


Resim 4.7: Hanging drop yönteminden sonra kültürün 5. (A) ve 7. (B) günündeki embriyoblastlar. A: X100, B: X200

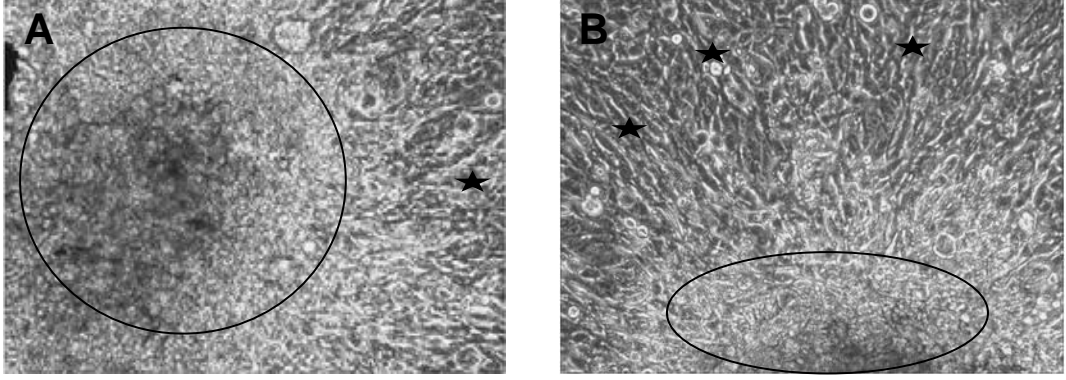
4.3. Embriyoblastların Keratinositlere Farklılaştırılması

Embriyoblastlar matrijel kaplı kültür kaplarına transfer edilerek, 2 gün boyunca matrijele yapışması beklendi. Bu süre sonunda embriyoblastların matrijel üzerine yapıştıkları ve hücrelerin çoğaldıkları gözlemlendi (Resim 4.8). Kültürün 3. gününden itibaren hücrelerin ektodermal seriyeye farklılaşmasını

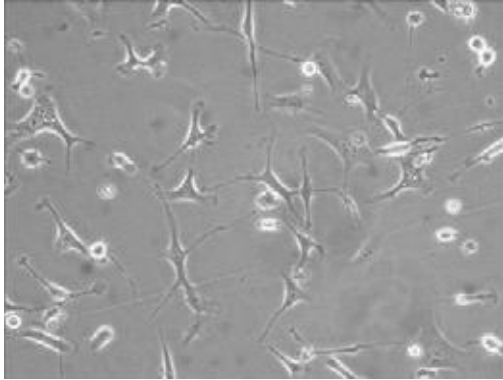
sağlamak amacı ile BMP-4 verilmesinden sonra, hücrelerin bir kısmı fuziform şeklinde iken, diğer hücrelerin epiteloid şekilde oldukları izlendi (Resim 4.9 A, B). Farklılaşan hücreler tekrar yeni matrijel üzerinde kültüre edilerek çoğalmaları sağlandı (Resim 4.10) ve epiteloid şeklindeki hücrelerin fuziform şekilli hücrelere göre sayıca artmış olduğu saptandı (Resim 4.10). Fuziform hücrelerin farklılaşmamış hücreler olabilecekleri, epiteloid şekilli hücrelerin ise farklılaşmış keratinositler olduğu düşünüldü (Resim 4.10).



Resim 4.8: Matrijele transfer edilen embriyoblast kültürü. X100



Resim 4.9: Matrijel üzerinde BMP-4 içeren ortamda kültüre edilen embriyoblastlar ve farklılaşan hücreler (★) (A,B). X100

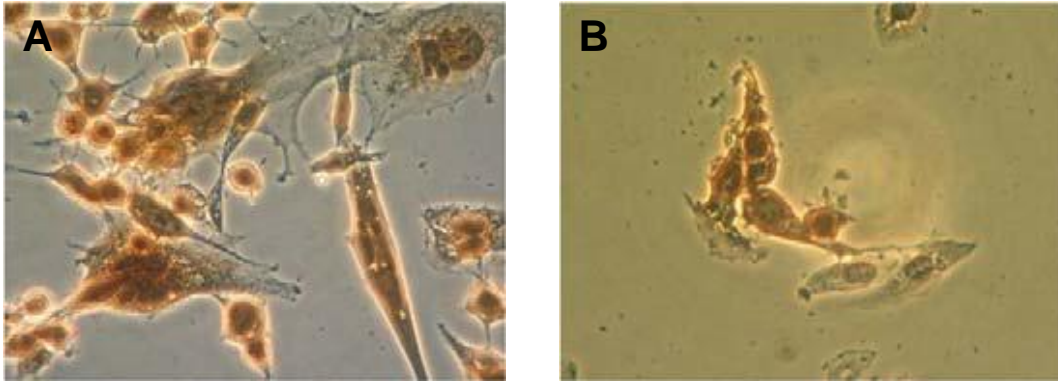


Resim 4.10: BMP-4 içeren ortamda kültüre edilmiş embriyoblastlardan oluşturulan yeni pasaj. X100

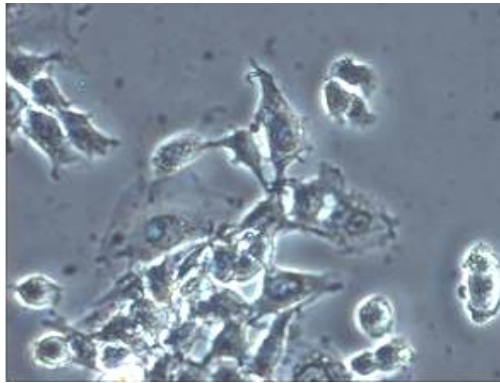
4.4. Keratinositlerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi İle Tanımlanması

Farklılaştırma işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen hücrelerin karakterizasyonu için immunohistokimyasal analiz sonucunda, erken dönem

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



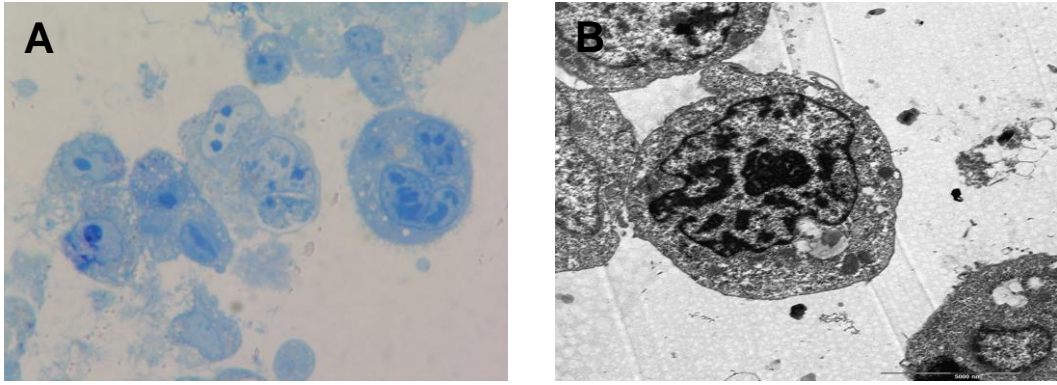
Resim 4.11: Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerde sitokeratin-8 (A) ve sitokeratin-14 (B) immunoreaktivitesi. X400



Resim 4.12: Kontrol immunohistokimya boyaması. X200

4.5. Keratinositlerin Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi

Elektron mikroskopik inceleme sonucunda ise, ışık ve immunohistokimyasal analizlerde epiteloid şekilde gözlenen hücrelerin sitoplazmasında yer yer tonofilaman lifleri ve keratohiyalin granüllerinin gözlenmesi üzerine, farklılaştırılan hücrelerin ultrastrüktürel olarak keratinositlere benzer hücreler olduğu saptandı (Resim 4.13).



Resim 4.13: Embriyonik kök hücreden farklılaştırılan keratinositlerin yarı ince (A) ve ince kesitleri (B). A: X1000, B: X5000

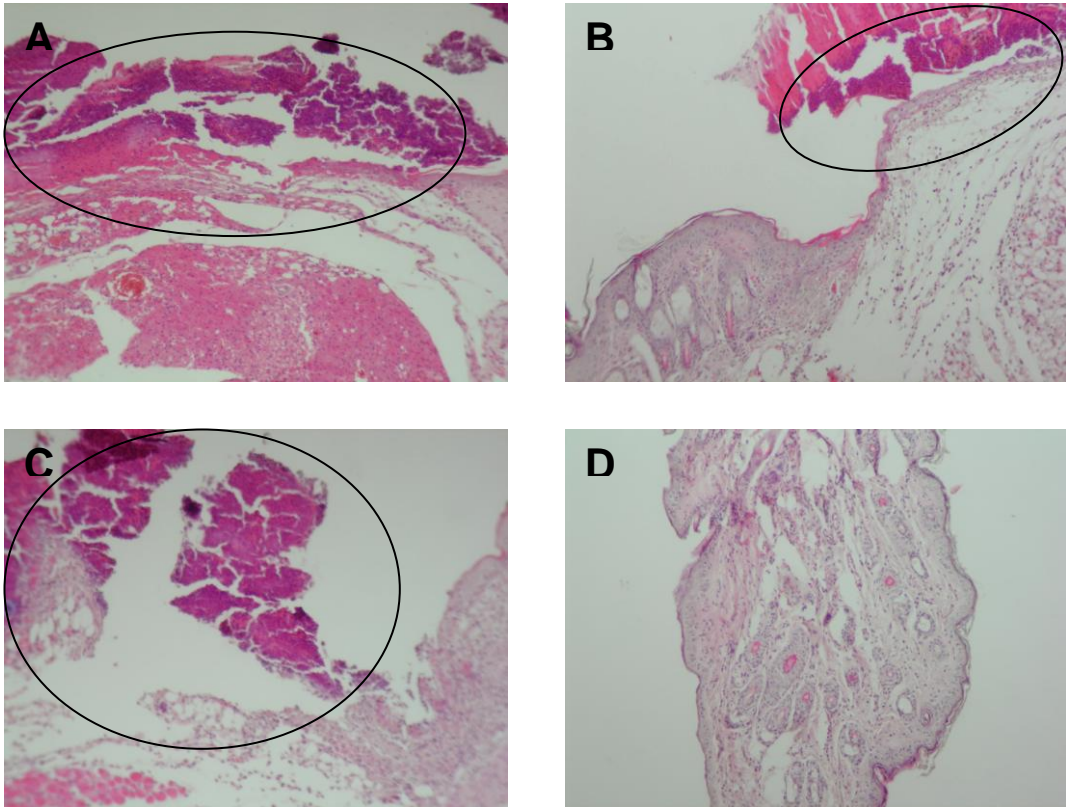
4.6. Yara Yerine Transfer Edilen Keratinositlerin Işık Mikroskopik İncelenmesi

Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler, mesh üzerinde 5 gün süre ile kültüre edildi. Hücreler mesh üzerinde yuvarlak şekilli olarak transfer edildikleri bölgede, ayrıca kuyucuğun kenarlarında meshsiz alanda kültür kabına tutunmuş epiteloid şekilli olarak gözlemlendi (Resim 3.3). Mesh ile birlikte hücreler direkt olarak steril ortamda Bulb C tipi farelerde oluşturulan cerrahi yara yerine hücreler yara yeri tarafında olacak şekilde transfer edildi. Aynı anda kontrol ve sham gruplarında cerrahi yara oluşturulduktan sonra, sham grubundaki deneklere sadece mesh yara yerine kondu. Deneklerden 3., 5. ve 7. günlerde biyopsi örnekleri alındı. Deney, kontrol ve sham grubundaki deneklerden sağlam deriyide içeren yara bölgesinden örnekler alındı. Yara oluşturulmayan grup 4' den ise sadece deriden biyopsi örneği alındı.

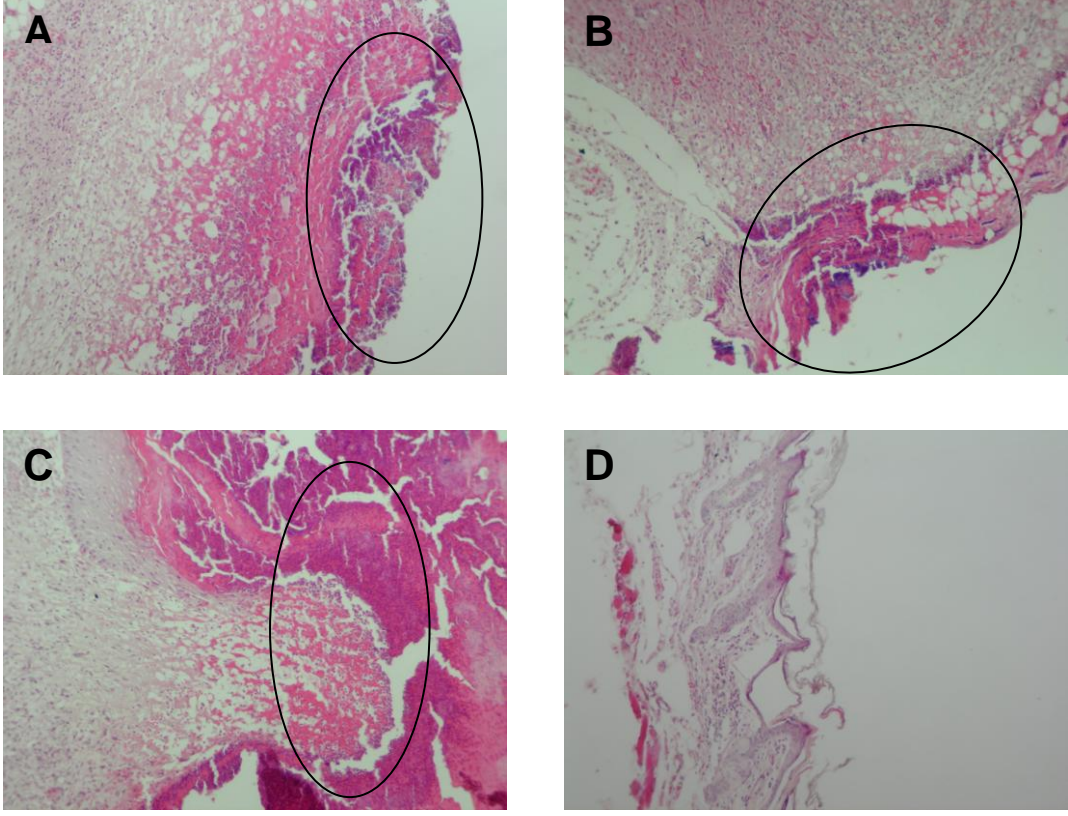
4.6.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Değerlendirmesi

Örnekler temel histolojik yapının değerlendirilmesi amacıyla hematoksilen-eozin boyası yapılarak incelendi. Deney, kontrol ve sham gruplarında, cerrahi yara oluşturulduktan sonraki 3. günde yara oluşturulan bölgede, epidermin kaybı ile birlikte polimorf nüveli lökosit (PNL) infiltrasyonu, trombosit ve fibrin pıhtısını içeren eksudanın oluşumu gözlemlendi (Resim 4.14 A, B, C). Cerrahi yaranın bittiği yerden ise epidermin devam ettiği, deri eklerinin ve derminin korunduğu izlendi (Resim 4.14 A, B, C). Yara oluşumundan sonraki 3. ve 5. günde deney, kontrol ve sham gruplarında polimorf nüveli lökositlerin yara yerine hakim olduğu, 7. günde ise makrofajların yara yerinde esas hücreler olduğu belirlendi (Resim 4.14, Resim 4.15, Resim 4.16 A, B, C). Ayrıca deney, kontrol ve sham gruplarında 5. ve 7. günlerde sağlam doku ile yara yeri sınırında mast hücreleri ve 5.

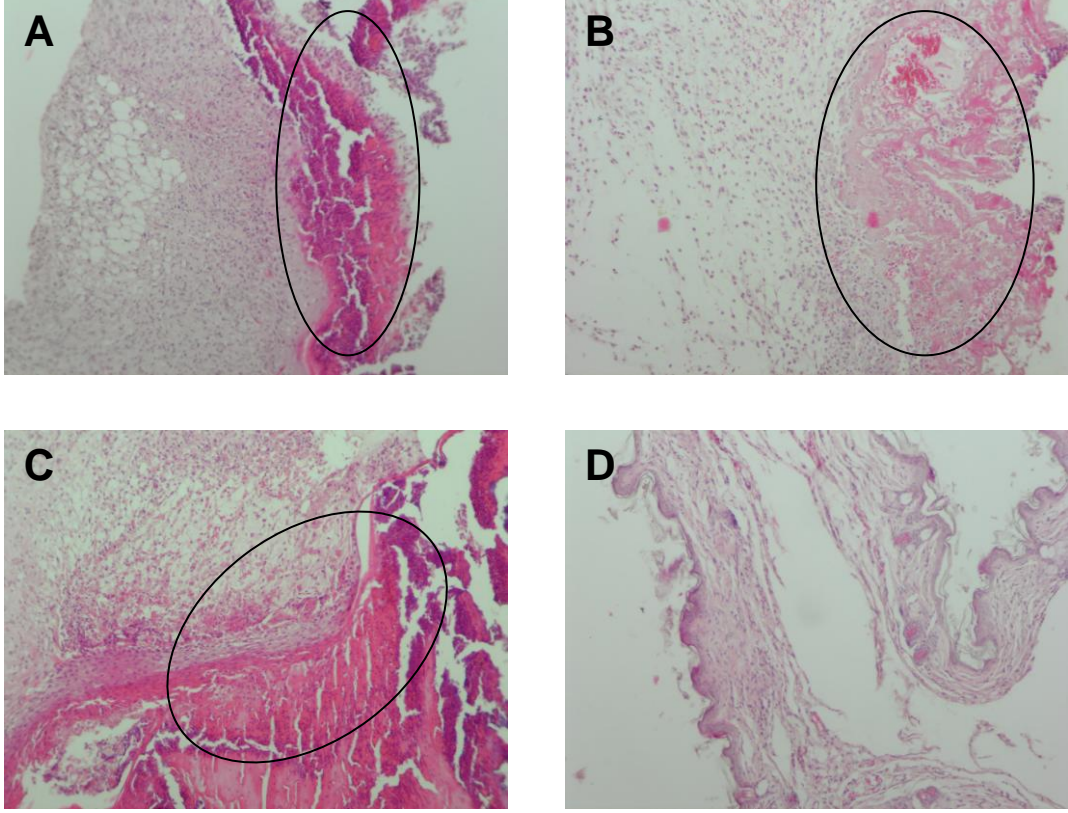
günden itibaren yara yüzeyinin altında vaskülaritede artış saptandı (Resim 4.15, Resim 4.16 A, B, C). Yara yeri kenarında deney, kontrol ve sham grubunda 7. günde sağlam epidermisin bazal hücrelerinin proliferere olarak yara kenarındaki epidermisin kalınlaştığı ve bazal hücrelerin krut altında epitelizasyonu sağlamak üzere göç ettiği izlendi (Resim4.16 A, B, C). Sağlam deri örneklerinin 3., 5. ve 7. günde hematoksilen-eozin boyaması ile incelenmesi sonucunda epidermisin çok katlı yassı epitel özelliğinde ve dermisin ekleri ile birlikte histolojik olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi (Resim 4.14, Resim 4.15, Resim 4.16 D)



Resim 4.14: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün histokimyasal örnekleri. H-E X100



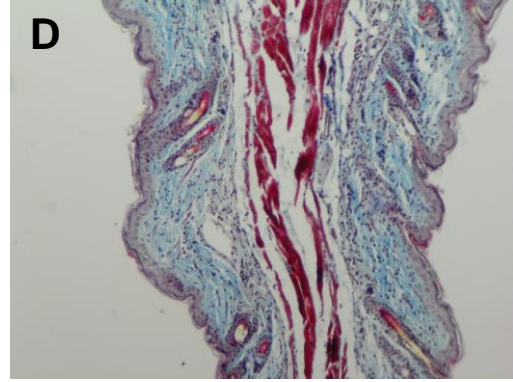
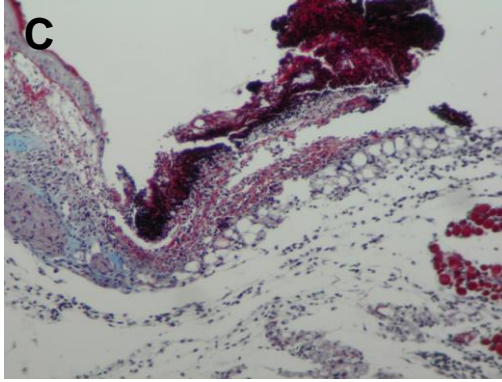
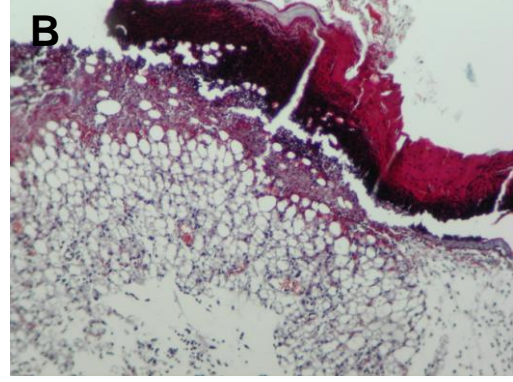
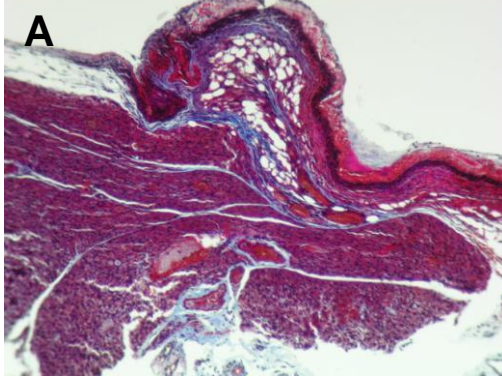
Resim 4.15: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün histokimyasal örnekleri. H-E X100



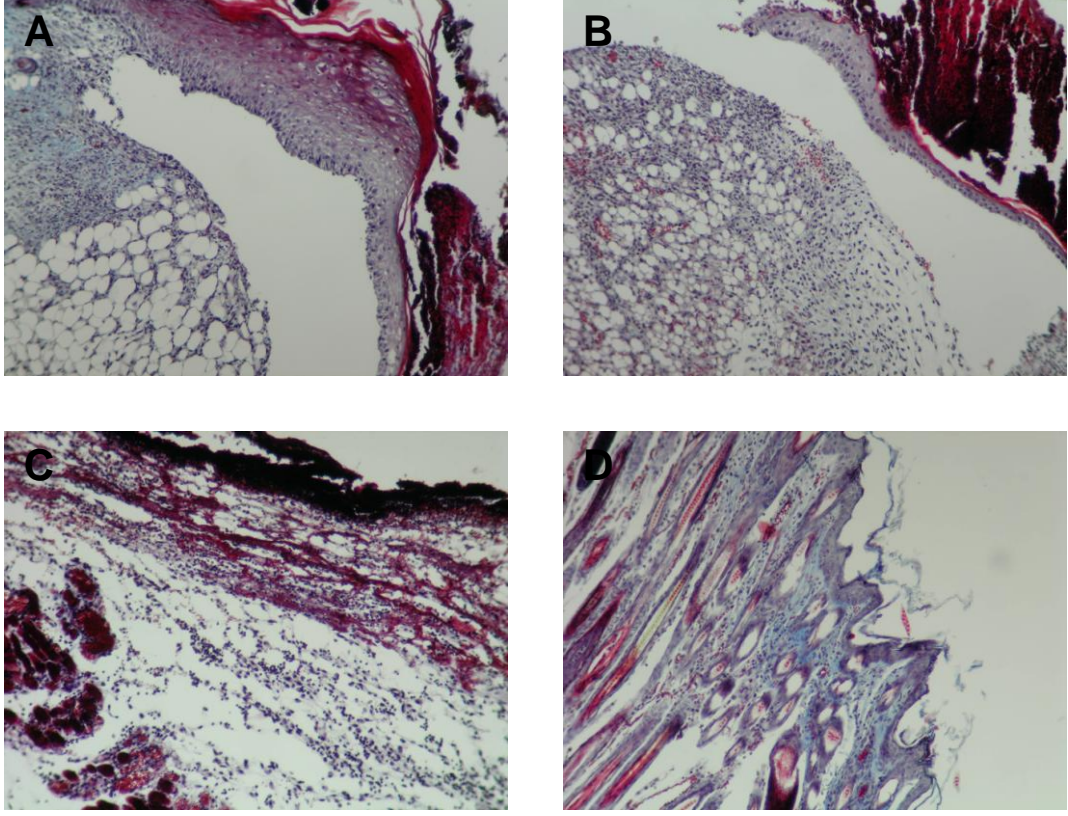
Resim 4.16: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün histokimyasal örnekleri. H-E X100

4.6.2. Masson Trikrom Boyaması Değerlendirmesi

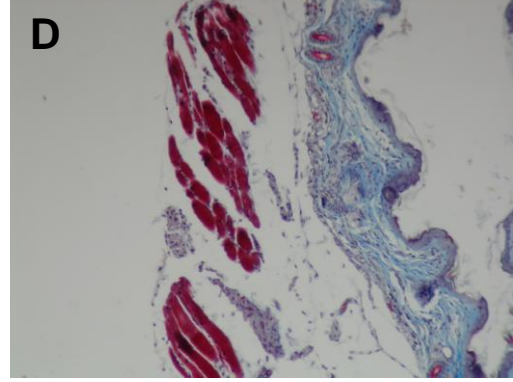
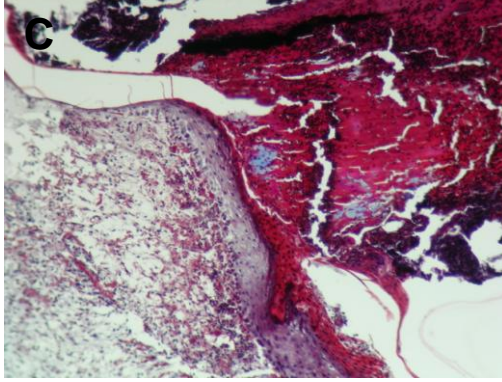
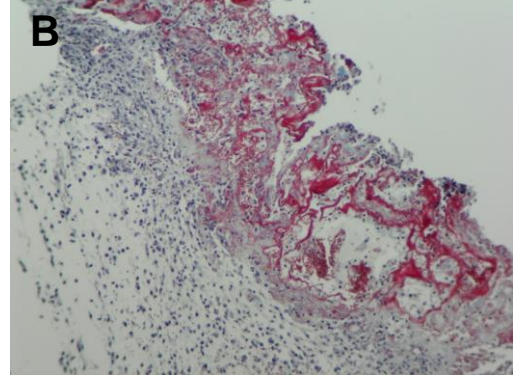
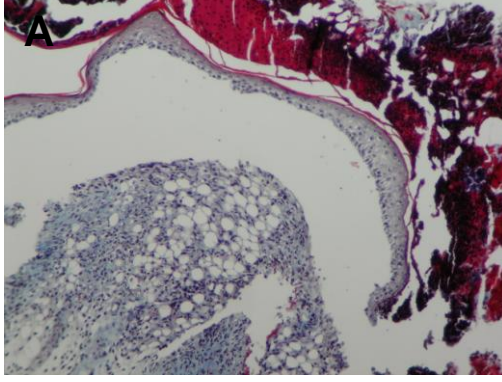
Örneklerin Masson Trikrom boyaması ile incelenmesi sonucunda, deney, kontrol ve sham gruplarına ait örneklerde yara oluşturulan bölgenin alt tarafındaki alanda kollajenin mavi renkte boyandığı gözlemlendi. Deney grubunda 3. günde kollajen boyamasının yara yerinin altındaki alanda kontrol ve sham grubuna göre daha fazla olduğu (Resim 4.17 A, B, C), deneyin 5. ve 7. günlerinde kollajen boyanmasının kontrol ve sham grubunda 3. güne oranla daha fazla iken (Resim 4.18, Resim 4.19 B,C), deney grubunda artış olmadığı izlendi (Resim 4.18, Resim 4.19 A). Sağlam deride ise tüm günlerde dermis tabakasında kollajene ait boyanmada farklılık olmadığı saptandı (Resim 4.17, Resim 4.18, Resim 4.19 D).



Resim 4.17: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün histokimyasal rnekleri. Masson Trikrom X100



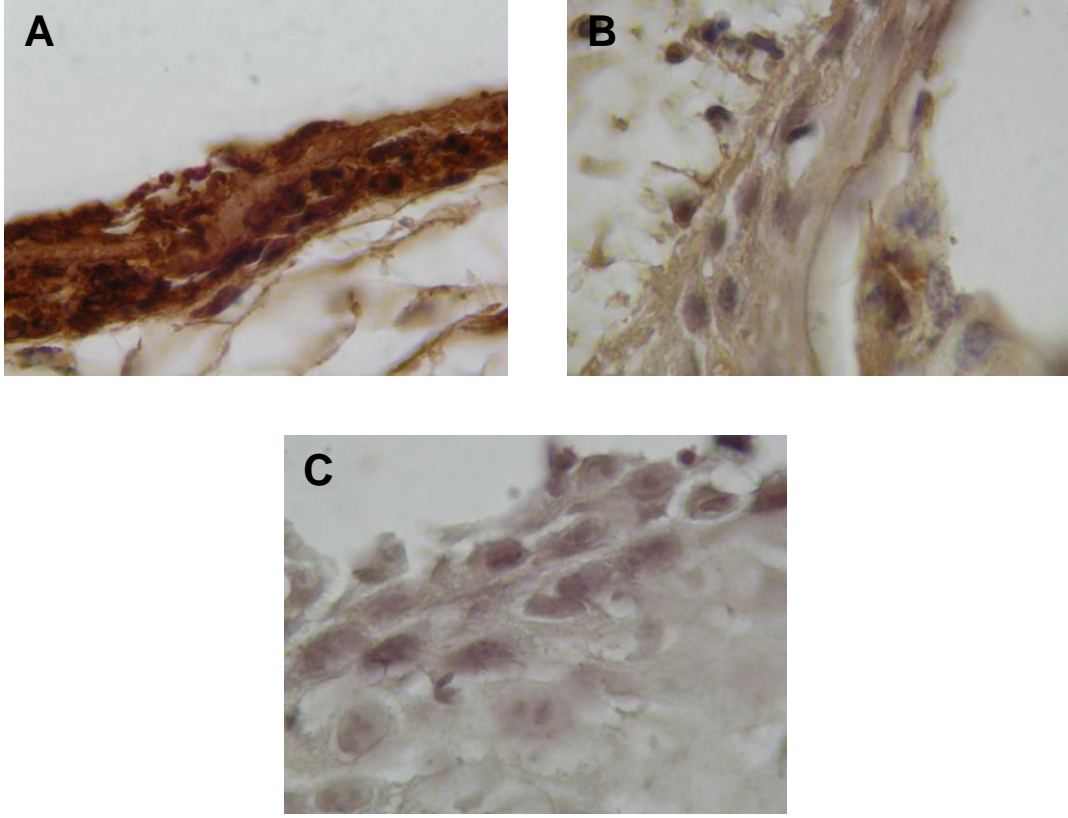
Resim 4.18: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün histokimyasal örnekleri. Masson Trikrom X100



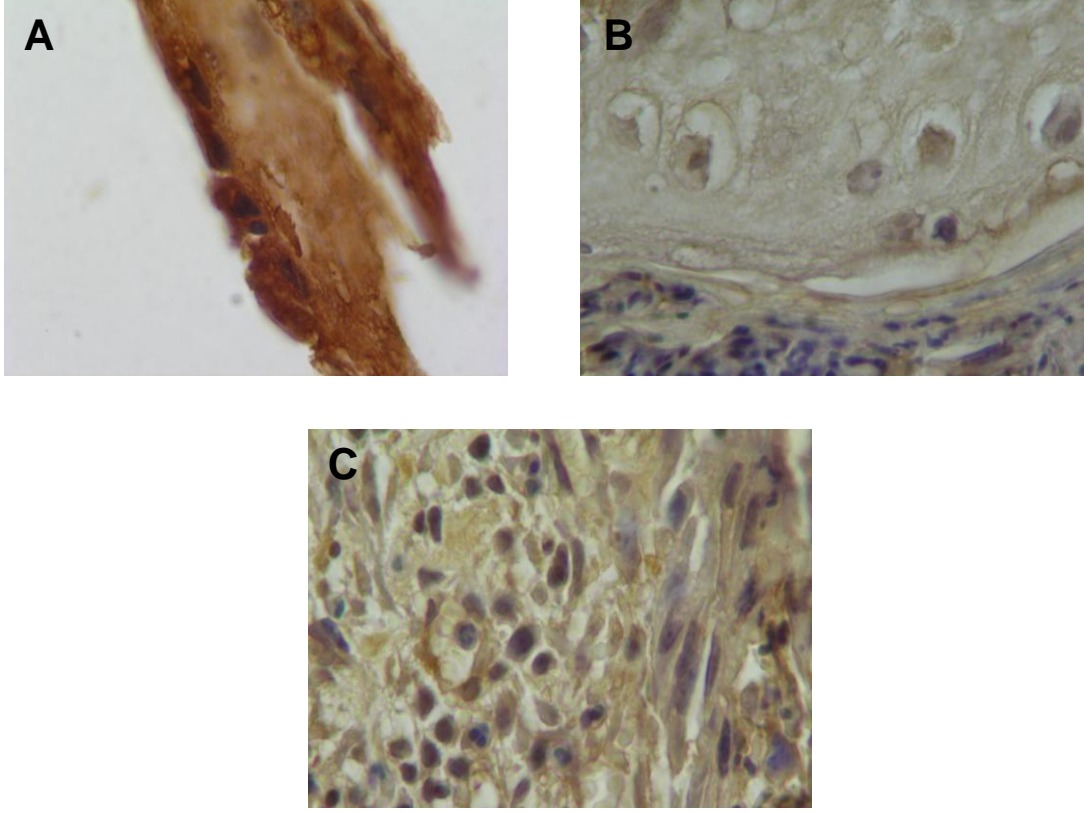
Resim 4.19: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün histokimyasal örnekleri. Masson Trikrom X100

4.6.3. Brd-U İle İşaretlenmiş Keratinositlerin İncelenmesi

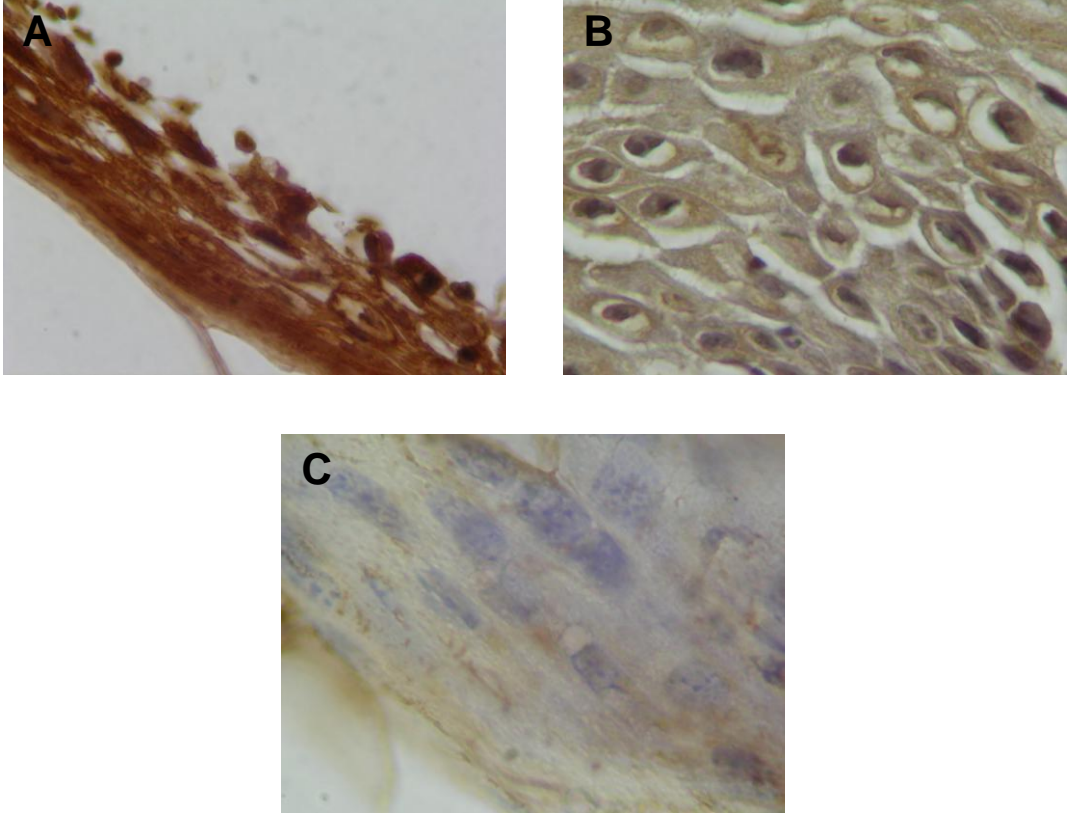
Fare embriyonik kök hücresinden farklılaştırılan keratinositler, yara yerine transfer edilmeden önce, yara yerindeki hücrelerin kültür ortamından gelen hücreler olduğunu saptamak amacı ile yapılan Brd-U işaretlemesi ve boyaması sonucunda, 3. günden itibaren deney grubunda yara bölgesindeki hücrelerin çekirdeklerinin pozitif olarak boyandığı gözlemlendi (Resim 4.20, Resim 4.21, Resim 4.22 A). Kontrol ve sham gruplarında herhangi bir pozitif boyanmaya rastlanmadı (Resim 4. 20, Resim 4.21, Resim 4.22 B, C). Örneklerin 5. ve 7. günlerdeki incelemelerinde de deney grubundaki hücreler pozitif boyanır iken, 3. gündeki boyanmaya göre daha az hücrenin pozitif boyandığı saptandı (Resim 4.21, Resim 4.22 A). Bununla beraber deney grubunda işaretlenen hücrelerin yara yerinde mevcut olup epitelizasyona katıldığı izlendi (Resim 4. 20, Resim 4.21, Resim 4.22 A). Kontrol ve sham gruplarında ise 5. ve 7. günlerde de boyanmaya rastlanmadı (Resim 4.21, Resim 4.22 B, C).



Resim 4.20: Deney (A), kontrol (B) ve sham (C) grubuna ait 3. gün Brd-U işaretli örneklerde anti-Brd-U boyaması. X1000



Resim 4.21: Deney (A), kontrol (B) ve sham (C) grubuna ait 5. gün Brd-U işaretli örneklerde anti-Brd-U boyaması. X1000



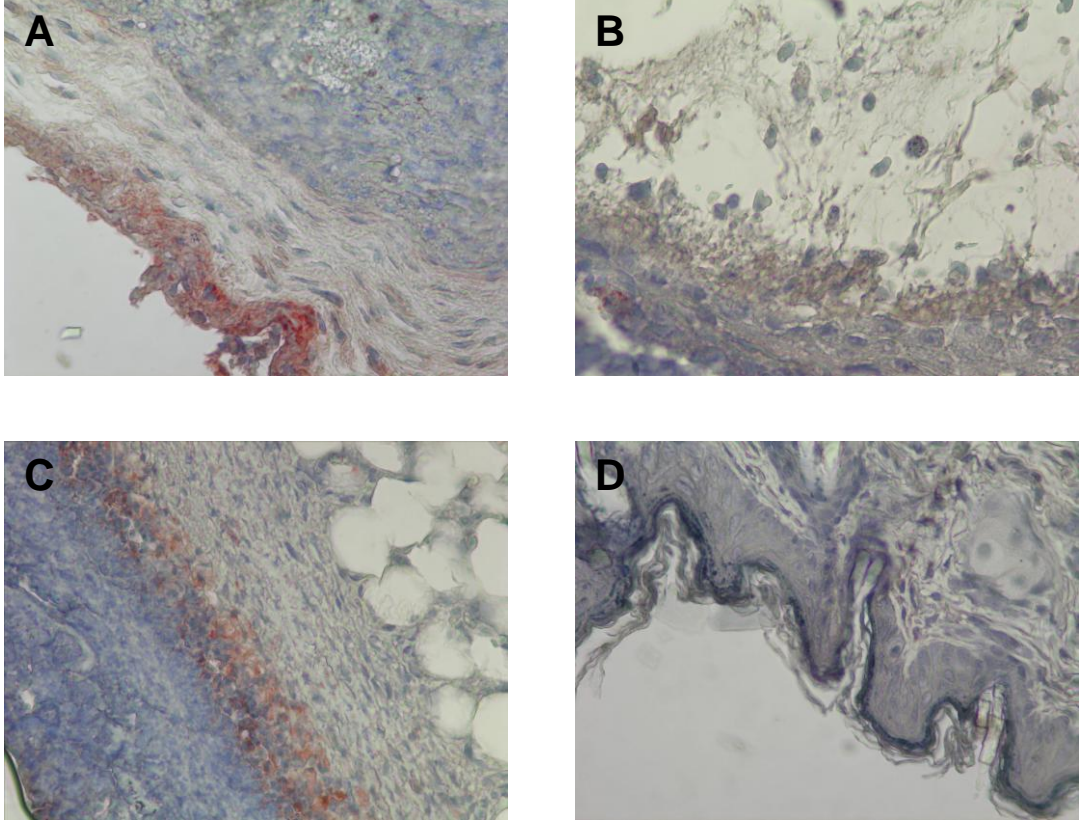
Resim 4.22: Deney (A), kontrol (B) ve sham (C) grubuna ait 7. gün Brd-U işaretli örneklerde anti-Brd-U boyaması. X1000

4.6.4. İndirekt İmmunohistokimya Uygulamasının Değerlendirilmesi

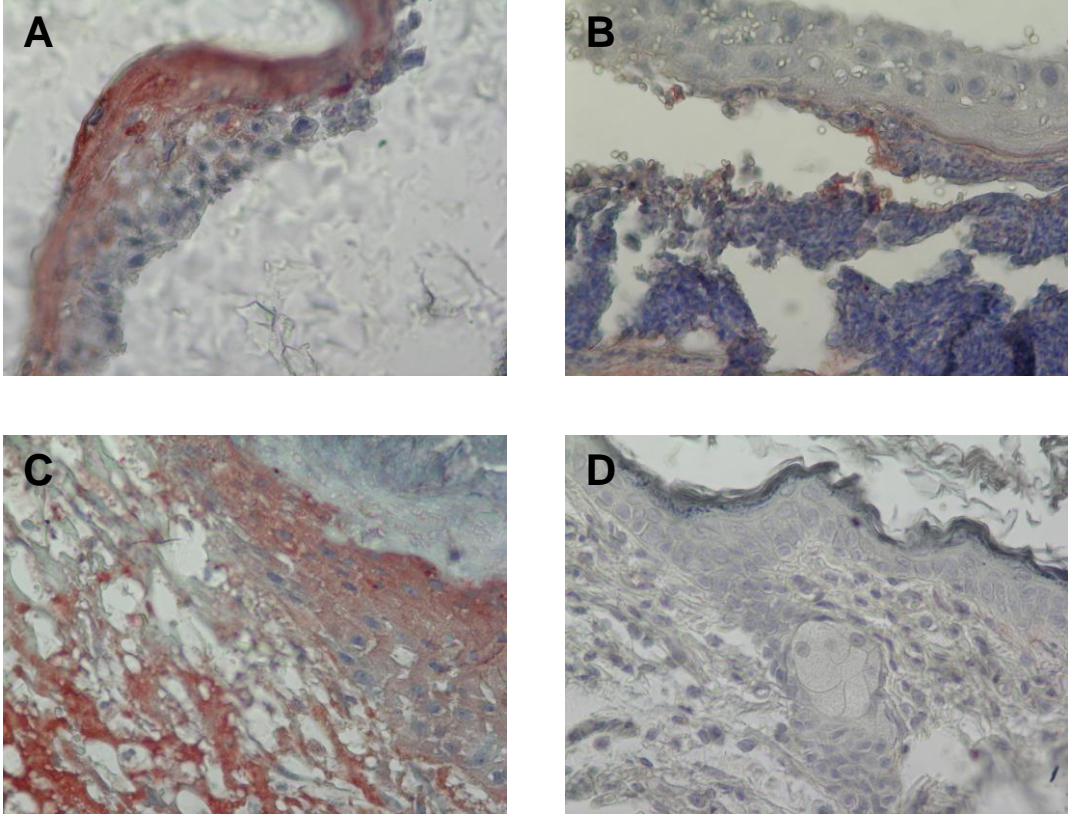
Embriyonik kök hücreden farklılaştırılan keratinositlerin farede oluşturulan cerrahi yaraya implantasyonundan sonra 3., 5. ve 7. günlerde alınan örneklerin Sitokeratin-8, Sitokeratin-14, EGF, IL-8, FGF-1, FGF-2, MCP-1 ve kollajen-1' in dağılımı indirekt immunohistokimya tekniği kullanılarak değerlendirildi.

4.6.4.1. Sitokeratin-8 Dağılımı

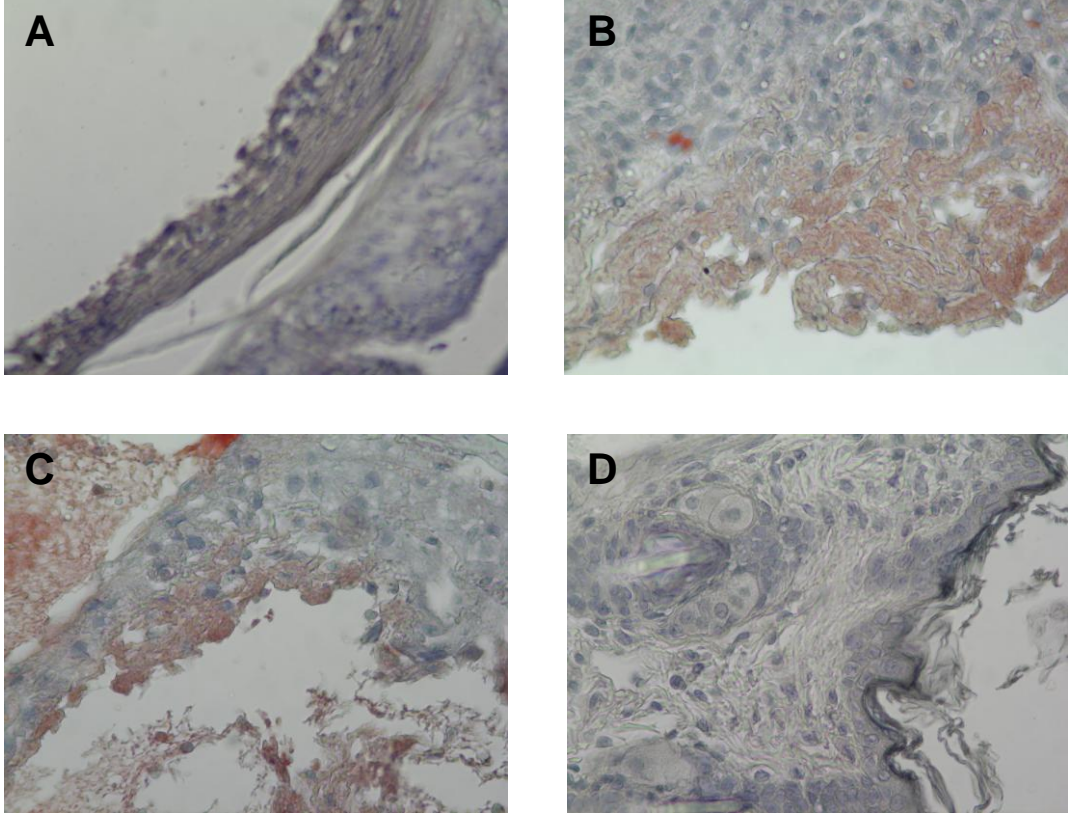
Erken dönem keratinosit farklılaşma belirteci olan sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin, deney grubunda 3. ve 5. günlerde yara yerinin kenarında bulunan epidermis bazal hücrelerinde pozitif olarak boyandığı gözlenir iken (Resim 4.23, Resim 4.24 A), 7. günde deney grubunda immunoreaktivite saptanmadı (Resim 4.25 A). Kontrol grubunda sitokeratin-8 immunoreaktivitesi 3. ve 5. günde saptanmazken, 7. günde pozitif olduğu gözlemlendi (Resim 4.23, Resim 4.24, Resim 4.25 B). Sadece mesh uygulanan sham grubunda, sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin her üç günde de pozitif olarak boyandığı (Resim 4.23, Resim 4.24, Resim 4.25 C), fakat immunoreaktivitenin 5. günde daha fazla olduğu izlendi (Resim 4.24 C). Deney grubundaki sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin kontrol ve sham grubuna oranla 3. ve 5. günde daha fazla olduğu gözlemlendi. Sağlam deride ise 3., 5. ve 7. günlerde sitokeratin-8 immunoreaktivitesi saptanmadı (Resim 4.23, Resim 4.24, Resim 4.25 D).



Resim 4.23: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün Sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



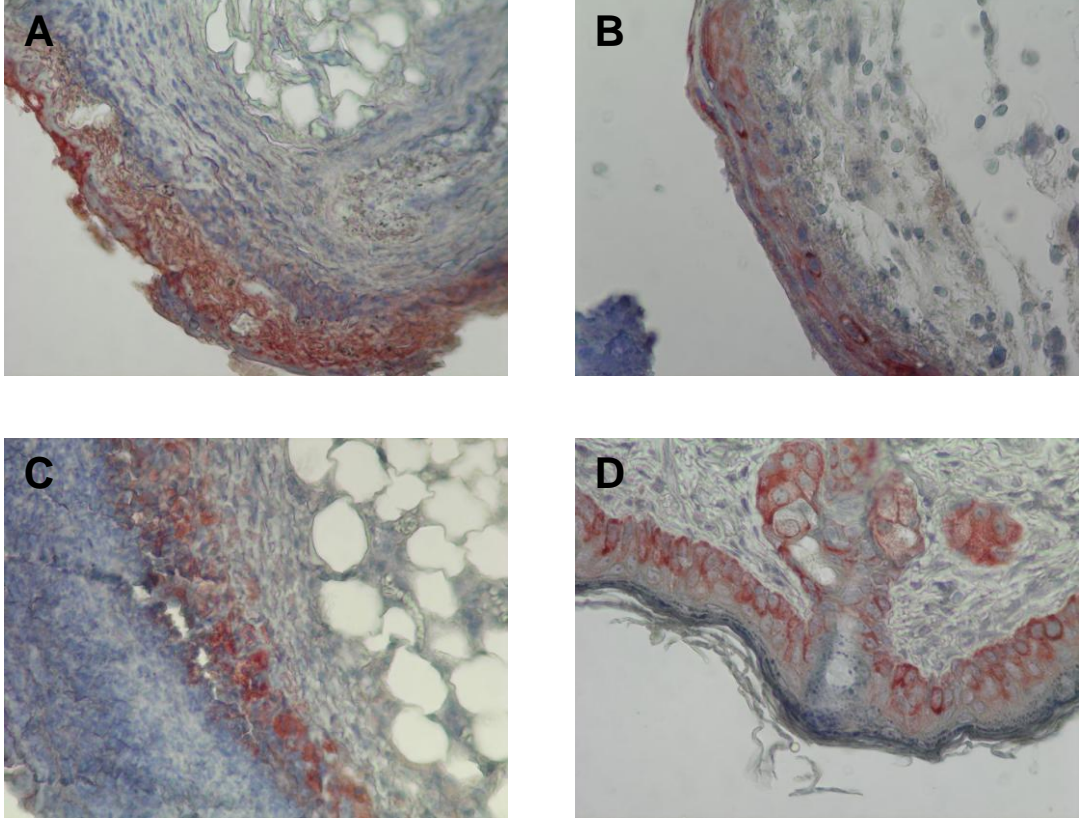
Resim 4.24: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün Sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



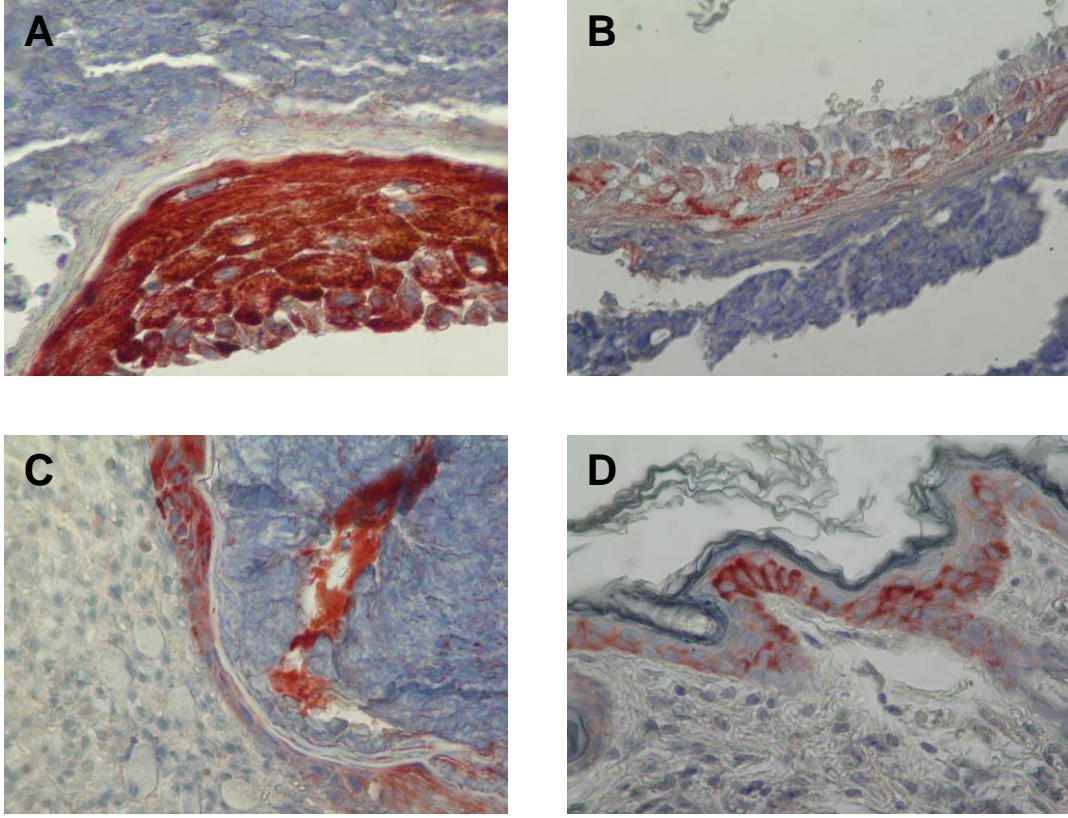
Resim 4.25: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün Sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

4.6.4.2. Sitokeratin-14 Dağılımı

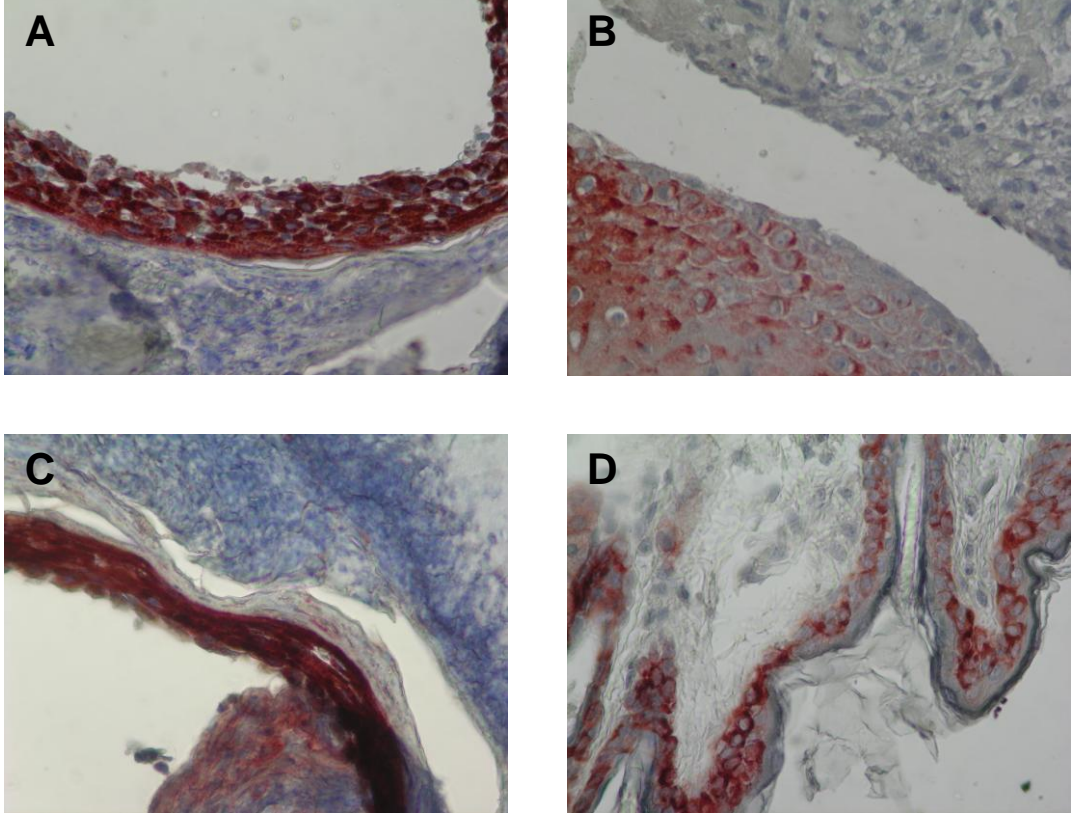
Farklılaşmış keratinositlerde eksprese edilen sitokeratin-14' ün immunohistokimyasal dağılımı incelendiğinde, sağlam deriden 3., 5. ve 7. günde alınan örneklerde sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin, epiderminin stratum bazale tabakasında bulunan hücrelerde sitoplazmik olarak kuvvetli pozitif boyandığı gözlemlendi (Resim 4.26, Resim 4.27, Resim 4.28 D). Deney, kontrol ve sham gruplarında ise, yara yerinin kenarında bulunan sağlam derinin stratum bazale tabakasında sitokeratin-14 immunoreaktivitesi cerrahi yara oluşturulan 3., 5. ve 7. günde pozitif iken, cerrahi yara oluşturulan bölgede 3. günde zayıf veya negatif olarak saptandı (Resim 4.26 A, B, C). Kontrol ve sham grubunda yara oluşturulan bölgede 5. günde epitelizasyonun başlaması ile birlikte 2-3 katlı olarak gözlenen epitelizasyon alanında, sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin orta şiddette olduğu gözlemlenirken (Resim 4.27 B, C), deney grubunda yara bölgesine transfer edilen keratinositlerin farklılaşmalarının daha fazla olmasından dolayı 4-6 katlı epitelizasyon alanında tüm katmanlardaki keratinositlerin sitoplazmalarında şiddetli pozitif olarak saptandı (Resim 4.27 A). Deney, kontrol ve sham grubunda sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin cerrahi yara oluşturulduktan sonraki 7. günde pozitif olduğu (Resim 4.28 A, B, C), fakat özellikle deney grubundaki immunoreaktivitenin 5. gündeki immunoreaktivite ile benzer olduğu izlendi. Kontrol ve sham grubunda sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin 7. günde, 5. güne oranla daha fazla olduğu gözlemlendi (Resim 4.28 B, C).



Resim 4.26: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün Sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



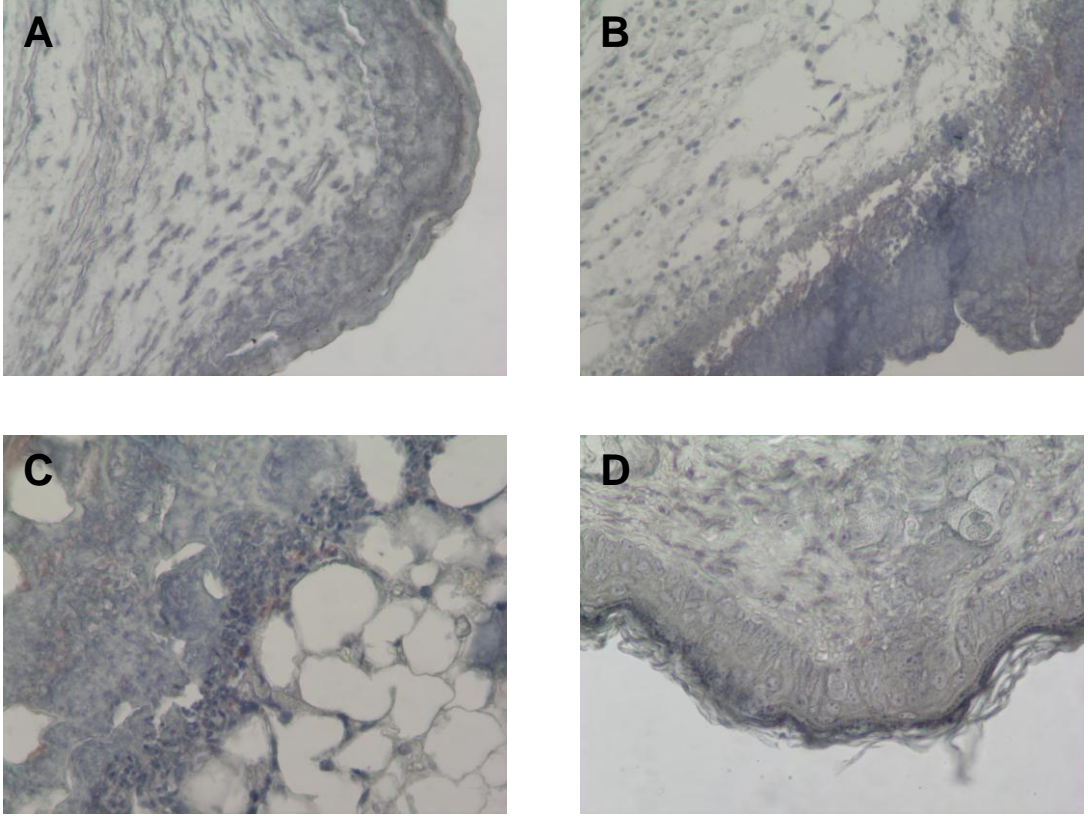
Resim 4.27: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna it 5. gün Sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



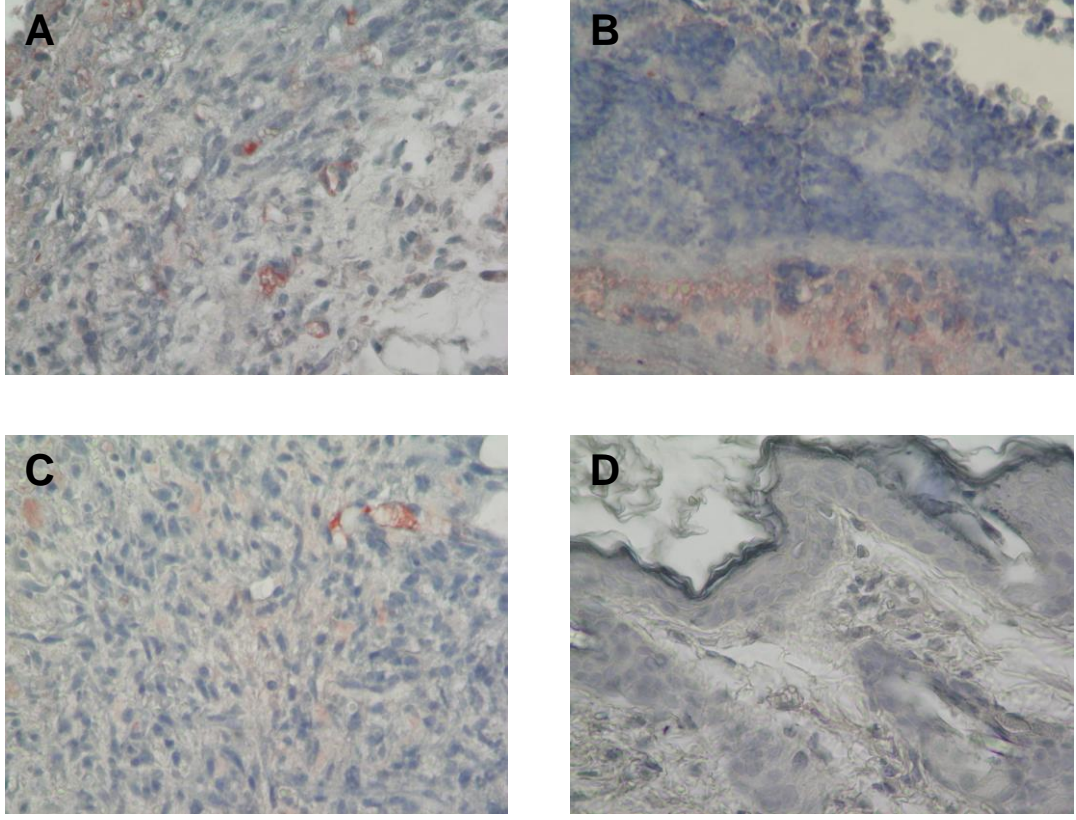
Resim 4.28: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün Sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

4.6.4.3. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) Dağılımı

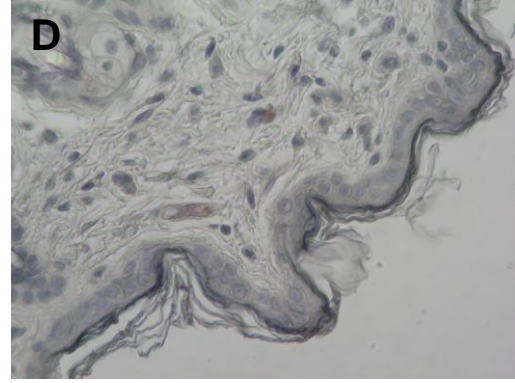
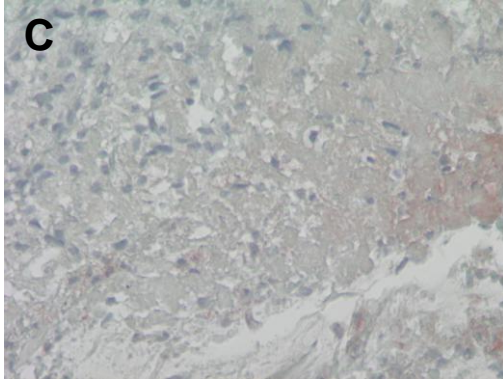
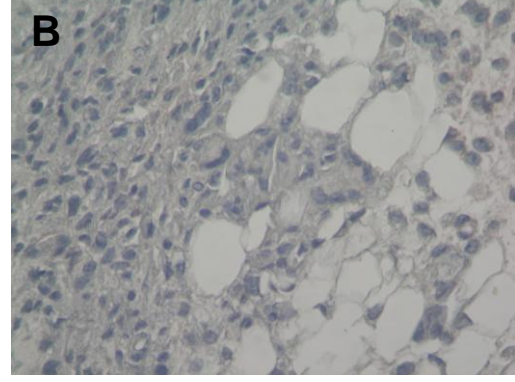
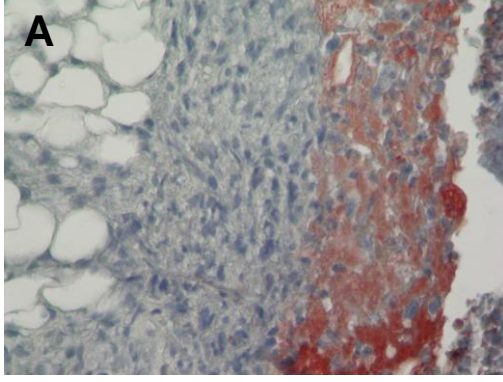
Epidermis hasarında çevre epidermis bazal hücreleri ile birlikte yara tamirinde görev alan makrofaj, trombosit ve keratinositlerden salgılanan epidermal büyüme faktörünün immunoreaktivitesi incelendiğinde, deney, kontrol ve sham grubunda 3. günde EGF immunoreaktivitesinin negatif olduğu (Resim 4.29 A, B, C), 5. günde ise deney, kontrol ve sham grubunda EGF immunoreaktivitesinin zayıf olduğu saptandı (Resim 4.30 A, B, C). EGF immunoreaktivitesi 7. günde ise kontrol ve sham gruplarında zayıf şiddette, deney grubunda ise orta şiddette pozitif olduğu gözlemlendi (Resim 4.31 A, B, C). Kontrol, sham ve deney gruplarındaki farklı dönemlerde gözlenen EGF immunoreaktivitelerinin cerrahi yara oluşturulan bölgenin alt kısmındaki bağ dokusu içerisinde ekstrasellüler alanda olduğu izlendi (Resim 4.30, Resim 4.31 A, B, C). Sağlam deride ise her üç gün de de EGF immunoreaktivitesinin negatif olduğu saptandı (Resim 4.29, Resim 4.30, Resim 4.31 D).



Resim 4.29: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün EGF immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



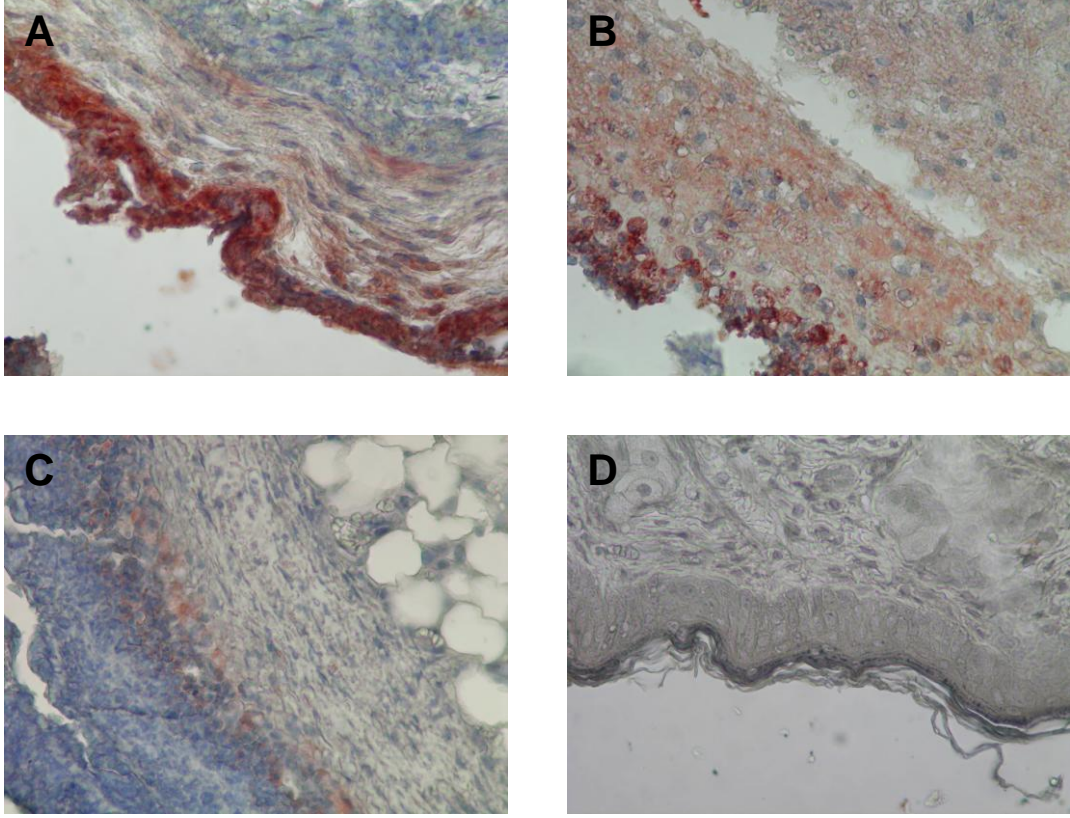
Resim 4.30: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün EGF immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



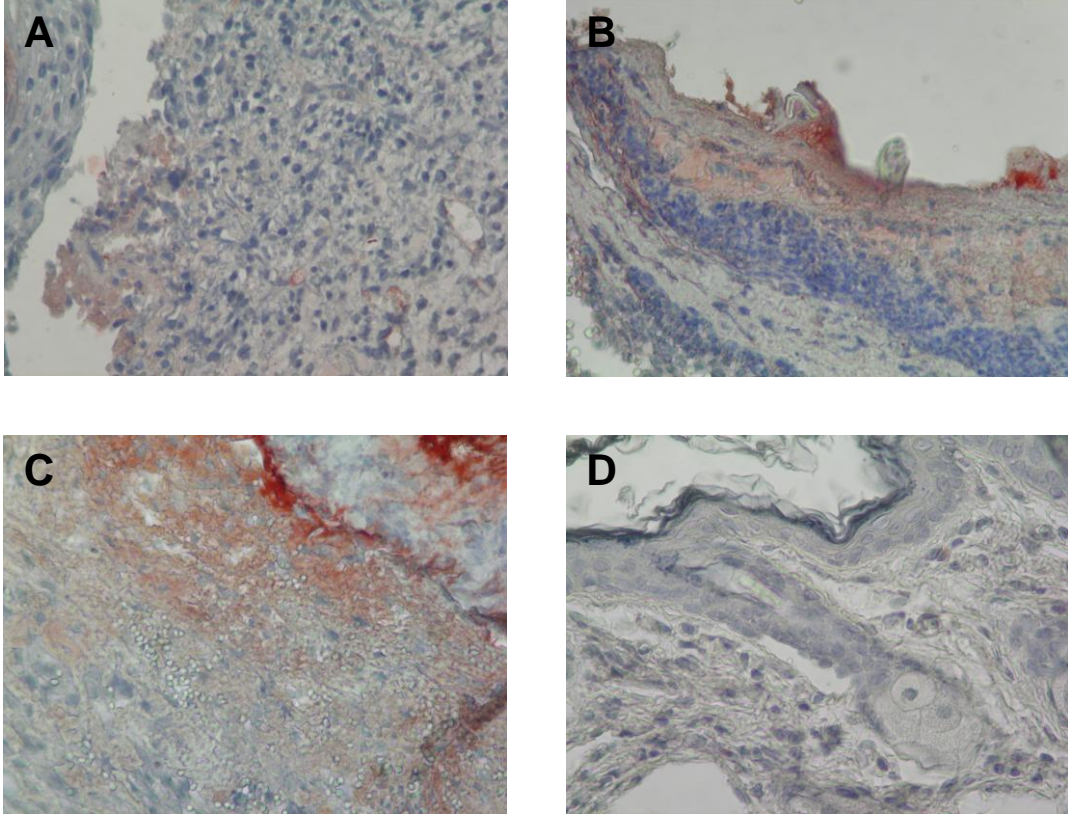
Resim 4.31: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün EGF immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

4.6.4.4. İnterlökın-8 (IL-8) Dağılımı

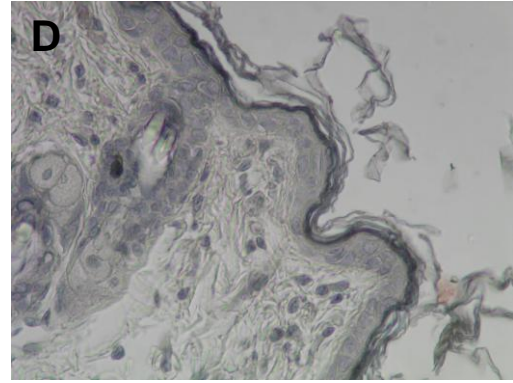
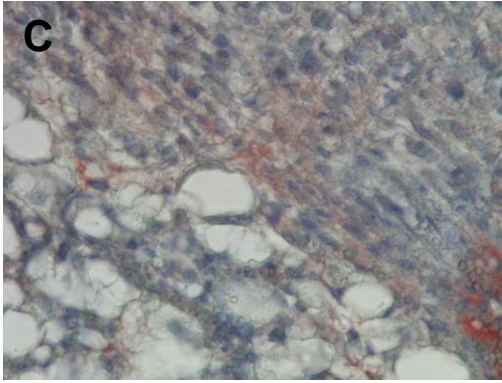
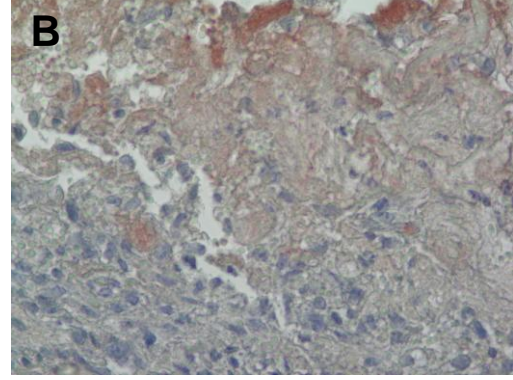
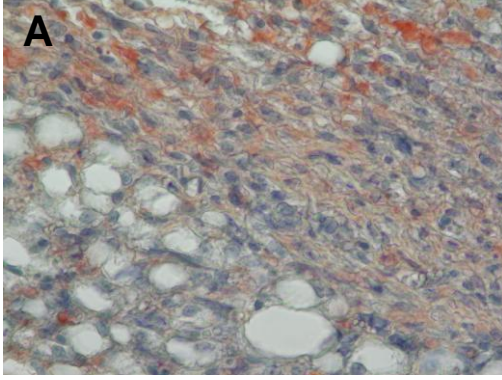
Nötrofiller ve makrofajlar tarafından eksprese edilen ve yara yerine nötrofilin göçüne, keratinosit migrasyonuna ve proliferasyonuna aracılık eden IL-8 immunoreaktivitesi, deney ve kontrol grubunda 3. günde en fazla olmak üzere tüm günlerde pozitif olduğu ve pozitif immunoreaktivitenin yara oluşturulan bölgenin hemen altında PNL infiltrasyonunun yoğun izlendiği alanda olduğu gözlemlendi (Resim 4.32, Resim 4.33, Resim 4.34 A, B). Sham grubunda ise IL-8 immunoreaktivitesinin 3. ve 7. günde zayıf şiddette, 5. günde ise orta şiddette olduğu izlendi (Resim 4.32, Resim 4.33, Resim 4.34 C). Sağlam deri grubunda ise her üç günde de IL-8 immunoreaktivitesi negatif idi (Resim 4.32, Resim 4.33, Resim 4.34 D).



Resim 4.32: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün IL-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



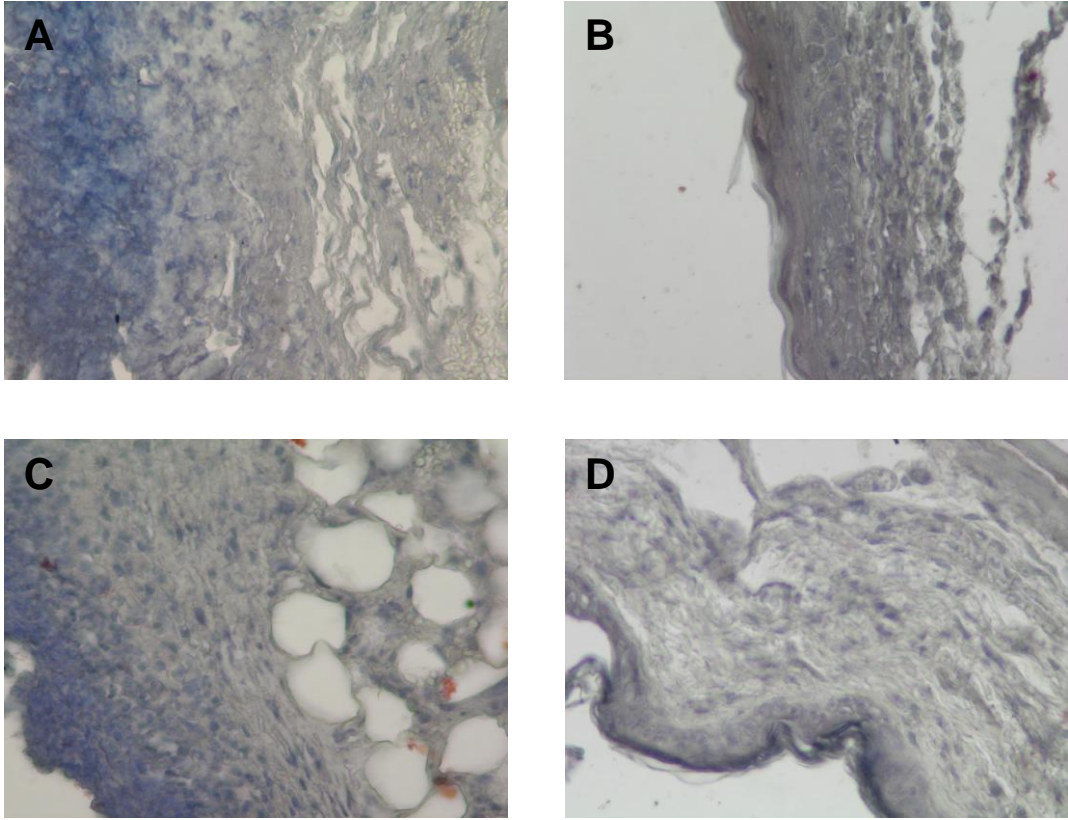
Resim 4.33: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün IL-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



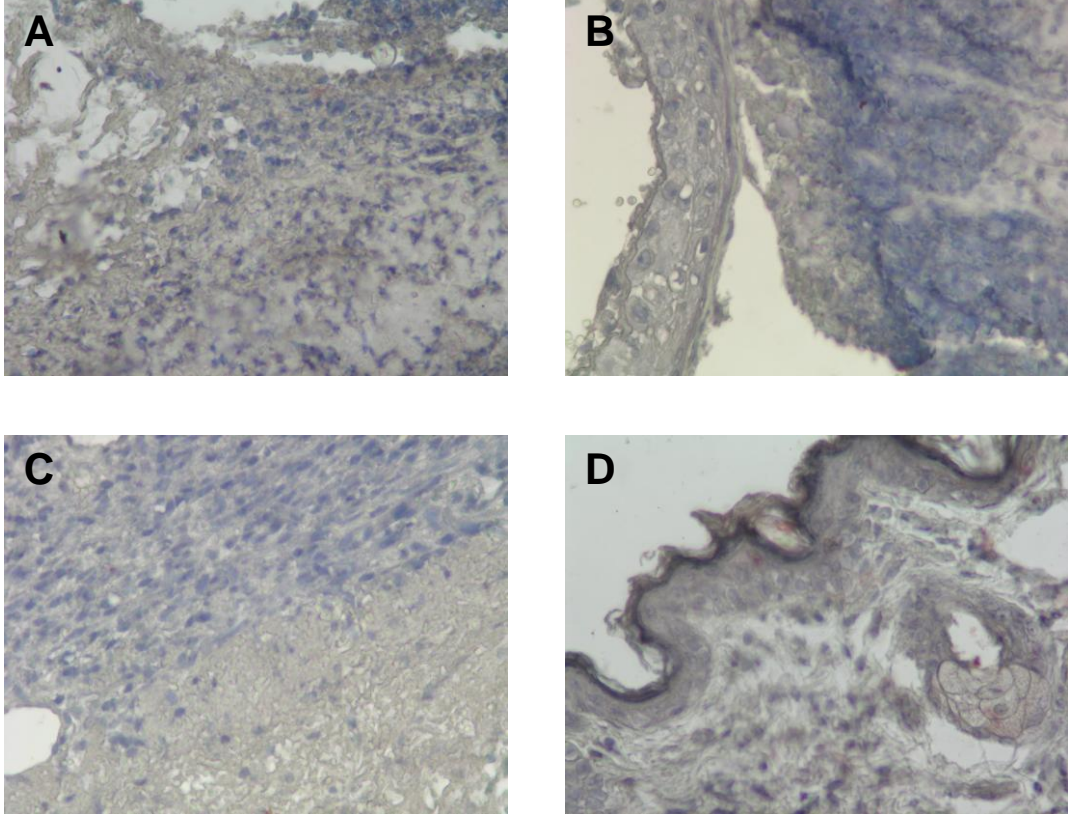
Resim 4.34: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün IL-8 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

4.6.4.5. Fibroblast Büyüme Faktörü-1 (FGF-1) Dağılımı

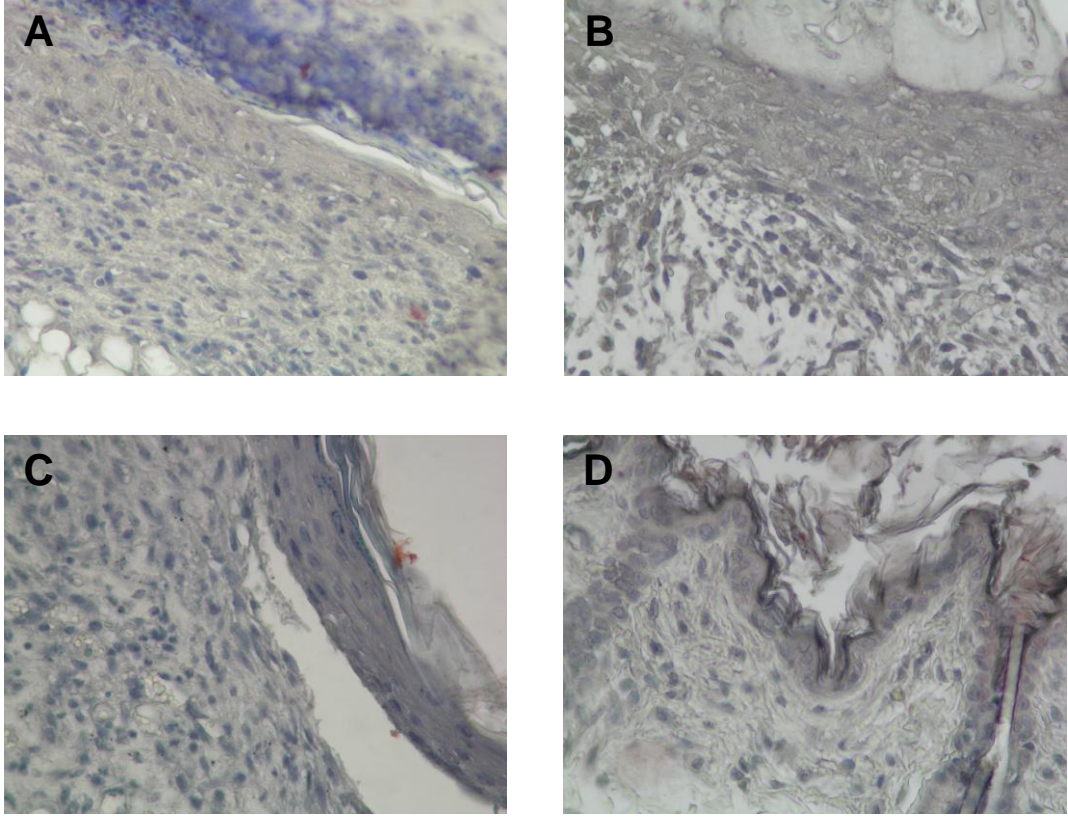
Epitelizasyonda önemli rol oynayan FGF ailesi üyelerinden FGF-1 immunoreaktivitesinin tüm gruplarda ve 3., 5. ve 7. günlerde negatif olduğu gözlemlendi (Resim 4.35, Resim 4.36, Resim 4.37).



Resim 4.35: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün FGF-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



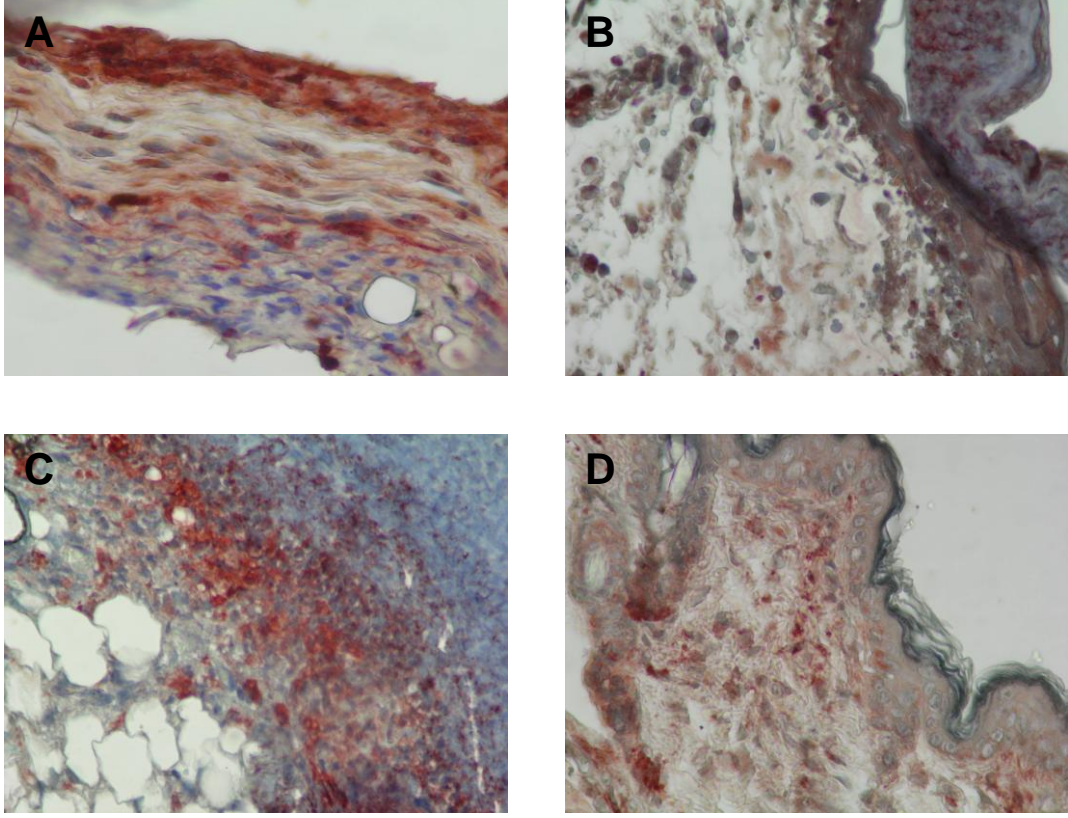
Resim 4.36: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün FGF-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



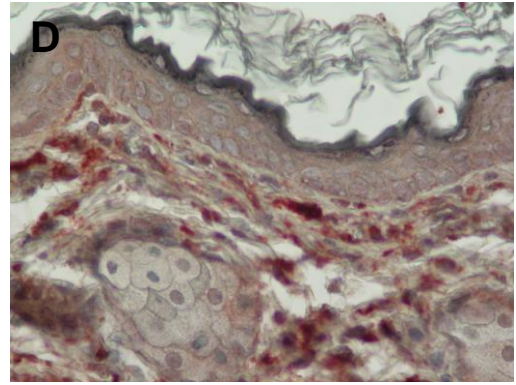
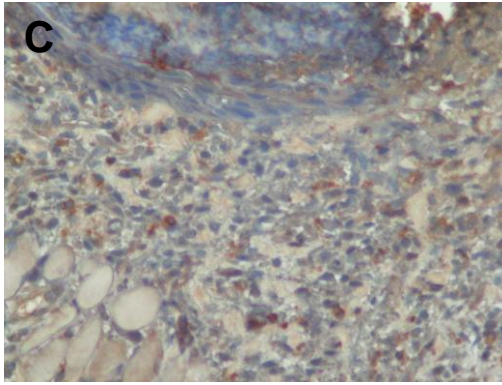
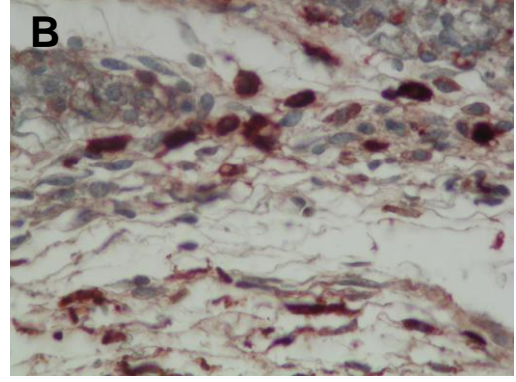
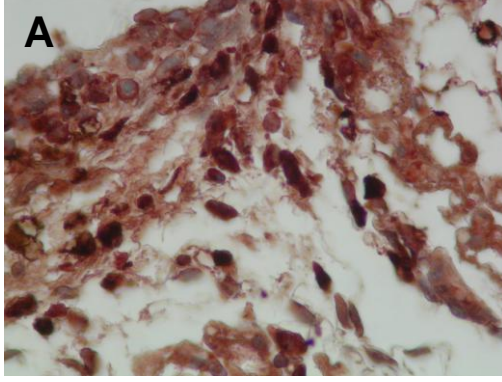
Resim 4.37: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün FGF-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

4.6.4.6. Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2) Dağılımı

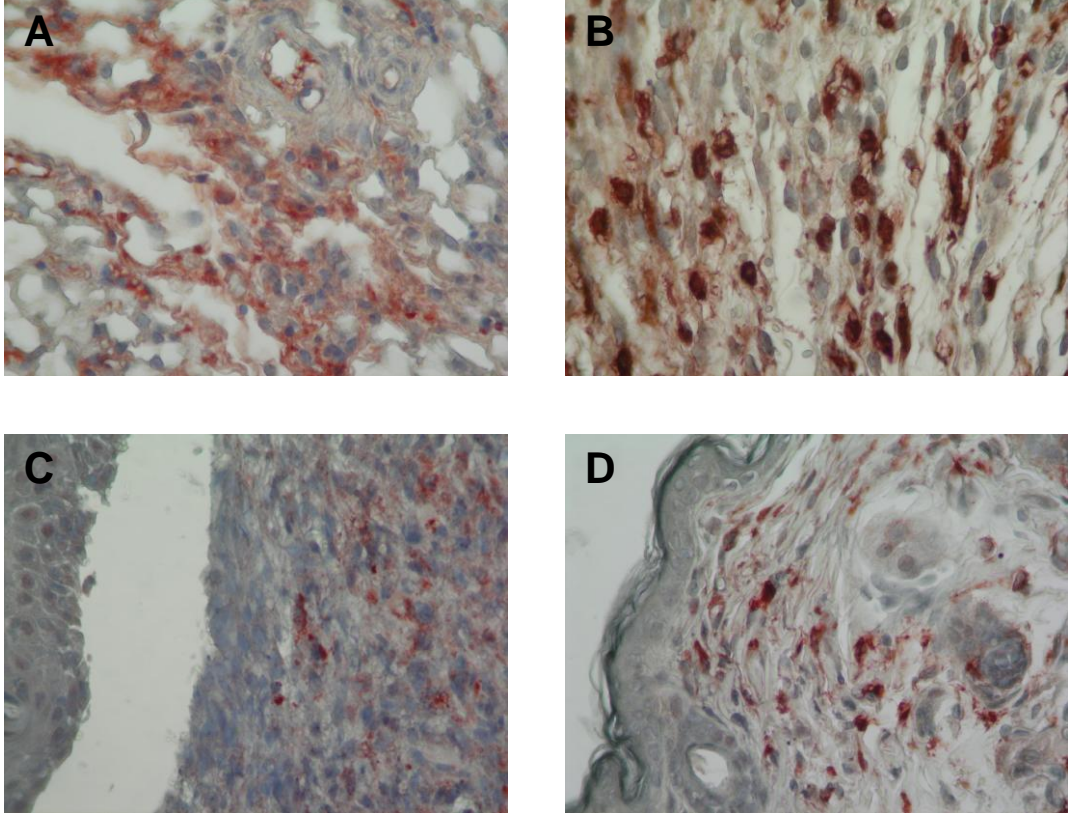
Epitelizasyonda önemli rol oynayan ve bağ dokusu hücreleri tarafından salgılanan FGF-2 immunoreaktivitesi, 3. günde deney ve sham grubunda orta ve yer yer kuvvetli pozitif olarak yara bölgesinin hemen altında gözlenir iken (Resim 4.38 A, C), kontrol grubunda zayıf ve yer yer orta şiddette gözlendi (Resim 4.38 B). Deney ve kontrol grubunda 5. günde FGF-2 immunoreaktivitesi bağ dokusu içerisinde bulunan fibroblastların sitoplazmalarında şiddetli pozitif olarak izlendi ve FGF-2 immunoreaktivitesine sahip hücrelerin deney grubunda daha fazla olduğu saptandı (Resim 4.39 A, B). FGF-2 immunoreaktivitesi 7. günde deney grubunda 5. güne göre biraz azalırken kontrol grubunda 5. gün ile aynı şiddette olduğu izlendi (Resim 4.40 A, B). Sham grubunda ise 5. ve 7. günlerde FGF-2 immunoreaktivitesi zayıf şiddette gözlendi ve günler arasında farklılık olmadığı saptandı (Resim 4.39, Resim 4.40 C). Sağlam deri grubunda FGF-2 immunoreaktivitesi 3., 5. ve 7. günlerde bağ dokusu içerisindeki fibroblastlarda olmak üzere orta şiddette pozitif olduğu izlendi. (Resim 4.38, Resim 4.39, Resim 4.40 D).



Resim 4.38: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün FGF-2 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



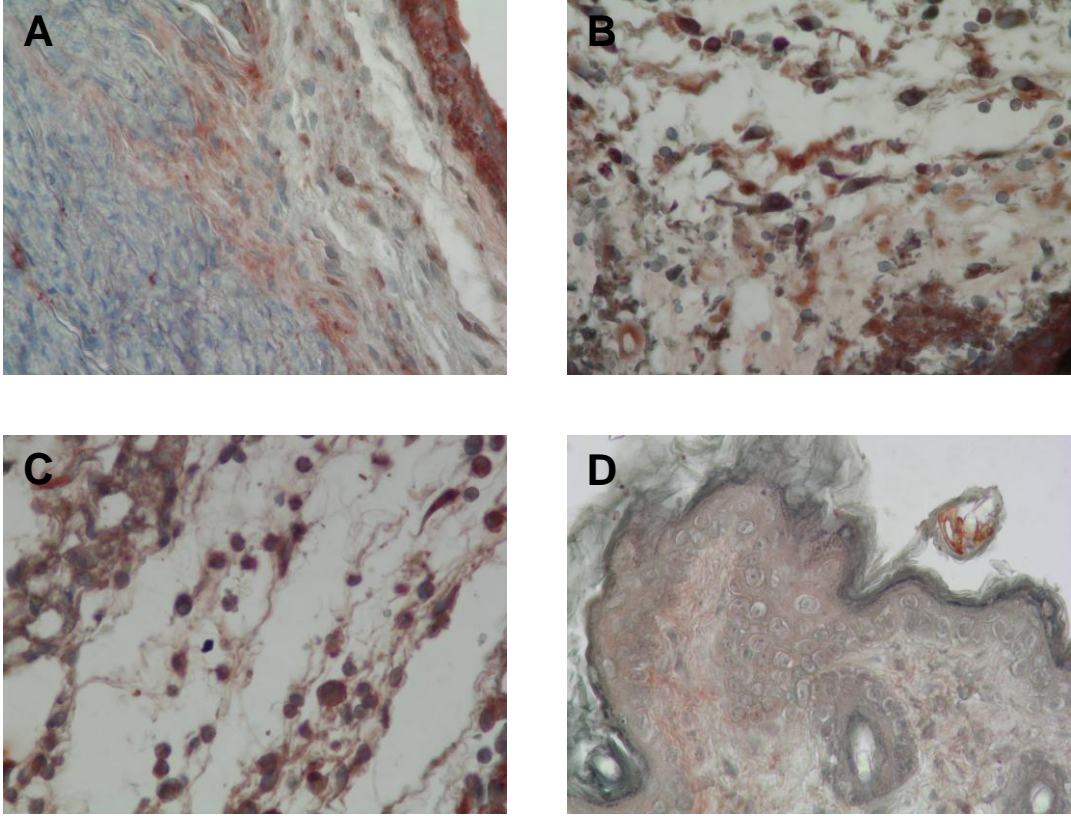
Resim 4.39: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün FGF-2 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



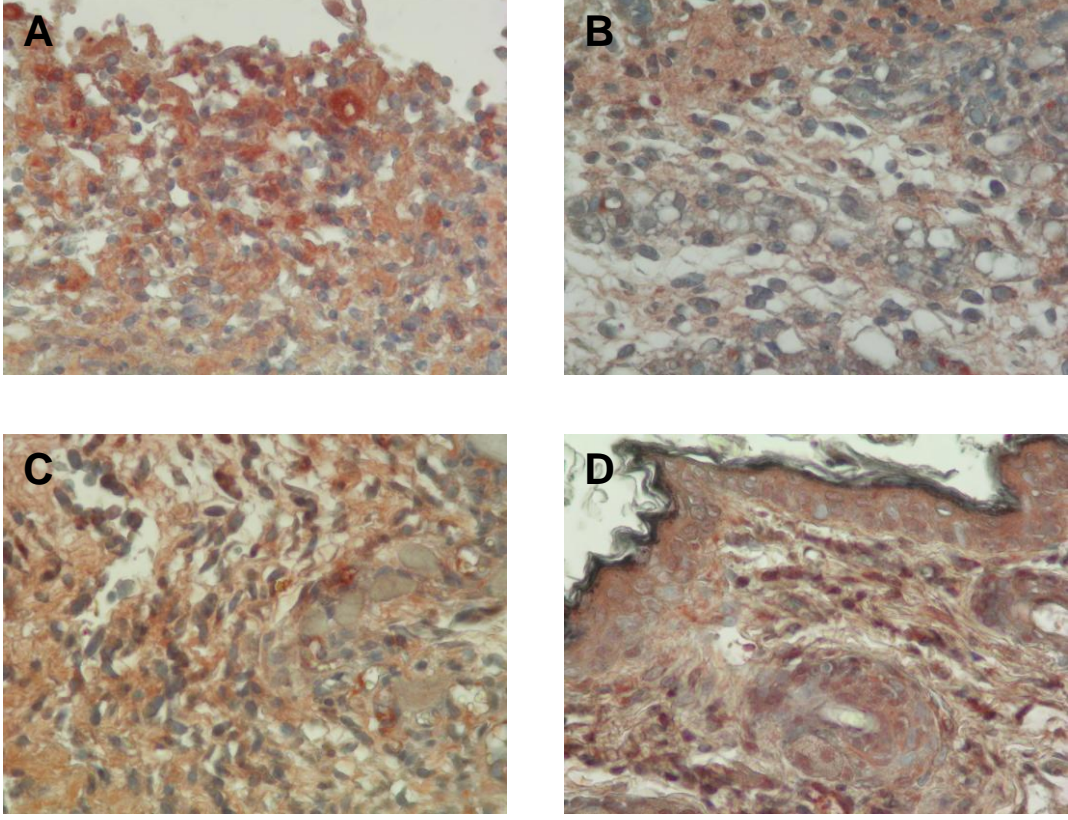
Resim 4.40: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün FGF-2 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

4.6.4.7. Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1) Dağılımı

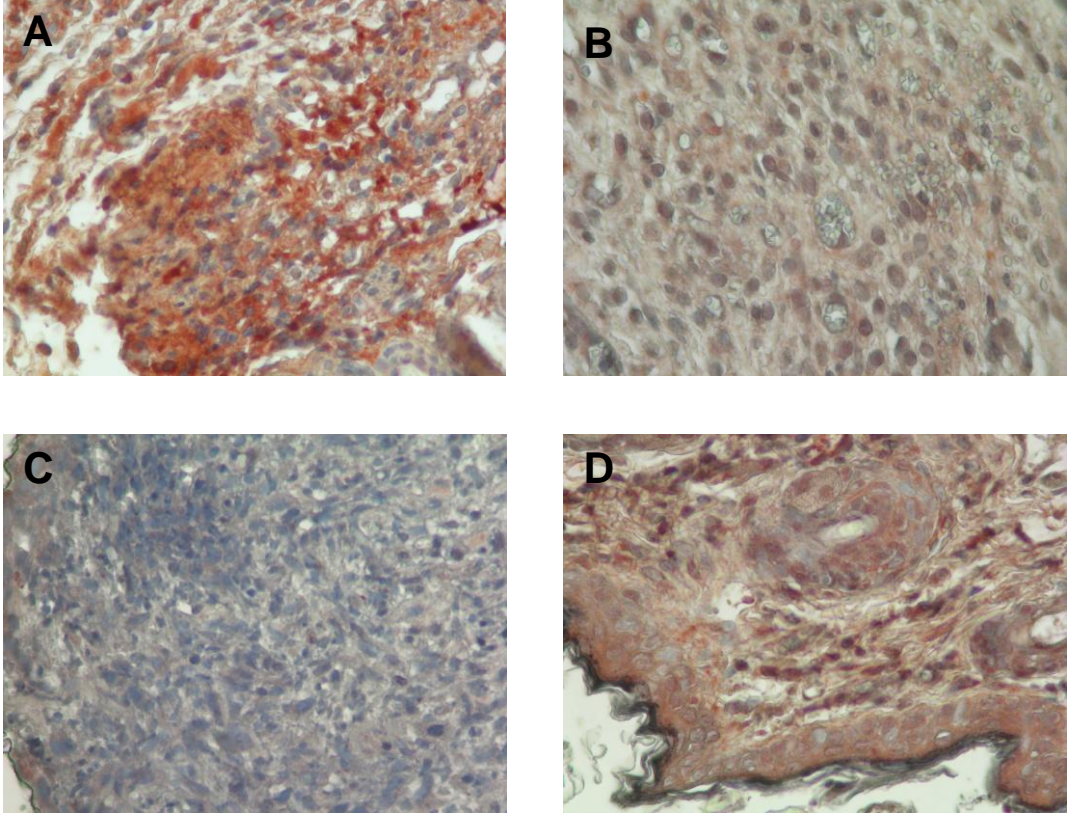
Yara kenarındaki keratinositler, endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanan ve yara iyileşmesi sırasında farklı evrelerde monosit, mast hücreleri ve lenfositlerin yara yerine göçlerinde önemli rol oynayan MCP-1 immunoreaktivitesinin deney grubunda 3. günde yara bölgesinin hemen altında orta şiddette pozitif iken, kontrol ve sham grubunda yine aynı bölgelerde zayıf, yer yer orta şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 4.41 A, B, C). MCP-1 immunoreaktivitesi 5. günde deney, kontrol ve sham grubunda orta şiddette pozitif olarak saptandı (Resim 4.42 A, B, C). Kontrol ve sham grubunun immunoreaktivitesinin 3. güne oranla daha fazla olduğu gözlenir iken, deney grubundaki immunoreaktivitenin 3. gün ile benzer olduğu izlendi. MCP-1 immunoreaktivitesi 7. günde deney grubunda 3. ve 5. güne benzer olarak orta şiddette gözlenir iken, kontrol ve sham grubunda MCP-1 immunoreaktivitesinin azaldığı saptandı (Resim 4.43 A, B, C). Sağlam deri örneklerinin 3., 5. ve 7. gün MCP-1 immunoreaktivitesi incelendiğinde, bağ dokusu içerisinde zayıf, yer yer orta şiddette pozitif immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 4.41, Resim 4.42, Resim 4.43 D).



Resim 4.41: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün MCP-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



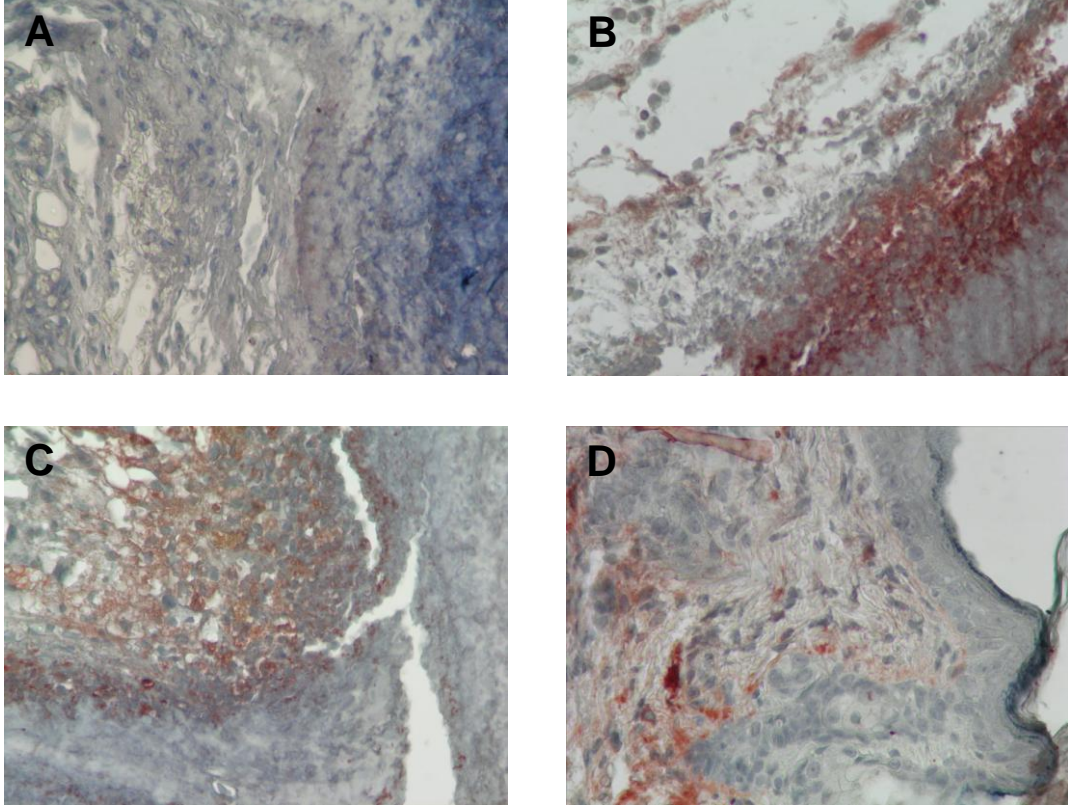
Resim 4.42: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün MCP-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



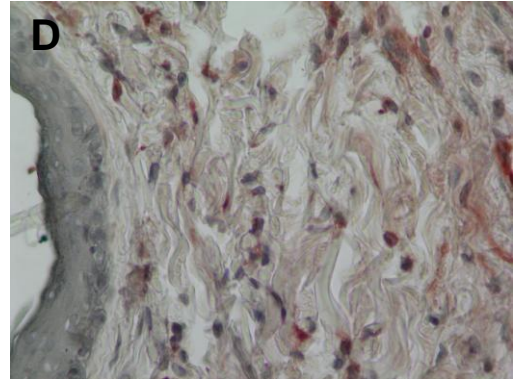
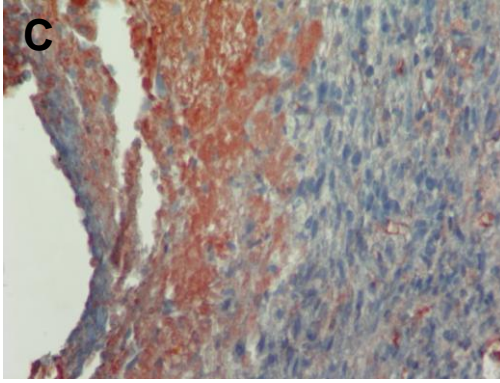
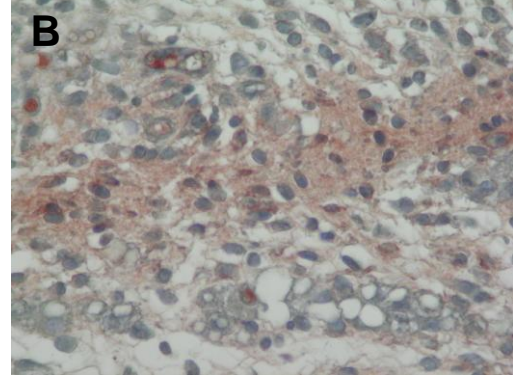
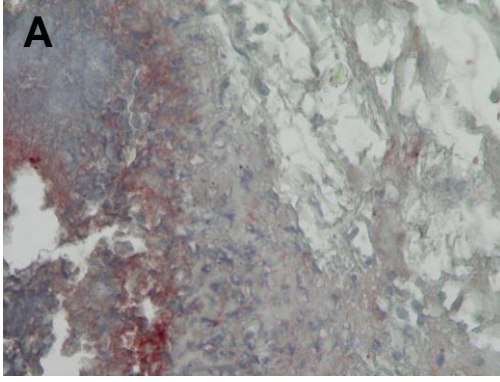
Resim 4.43: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün MCP-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

4.6.4.8. Kollajen-1 Dağılımı

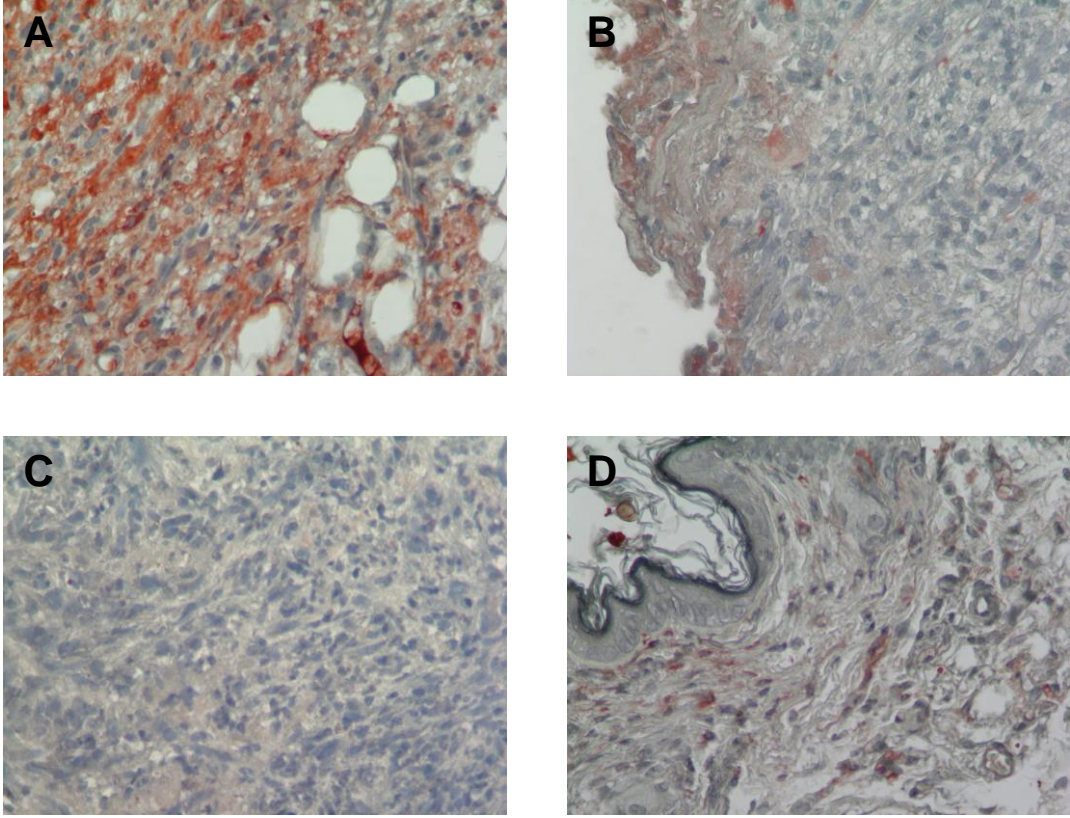
Bağ dokusunun ana kollajeni olan ve yara iyileşmesi sırasında yeniden şekillenme aşamasında depolanarak yara tamirine katılan kollajen-1 immunoreaktivitesinin 3. gün örneklerinde deney grubunda negatif olduğu gözlenirken, kontrol ve sham grubunda 3. günde immunoreaktivitenin zayıf şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 4.44 A, B, C). Kollajen-1 immunoreaktivitesi deney grubunda 5. günde zayıf, 7. günde orta şiddette iken kontrol ve sham gruplarında immunoreaktivitenin giderek azaldığı saptandı (Resim 4.45, Resim 4.46 A, B, C). Sağlam deri örneklerinde kollajen-1 immunoreaktivitesinin dermiste pozitif olduğu ve günler arasında fark olmadığı gözlemlendi (Resim 4.44, Resim 4.45, Resim 4.46 D).



Resim 4.44: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 3. gün Kollajen-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



Resim 4.45: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 5. gün Kollajen-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400



Resim 4.46: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait 7. gün Kollajen-1 immunoreaktivitesinin dağılımı. X400

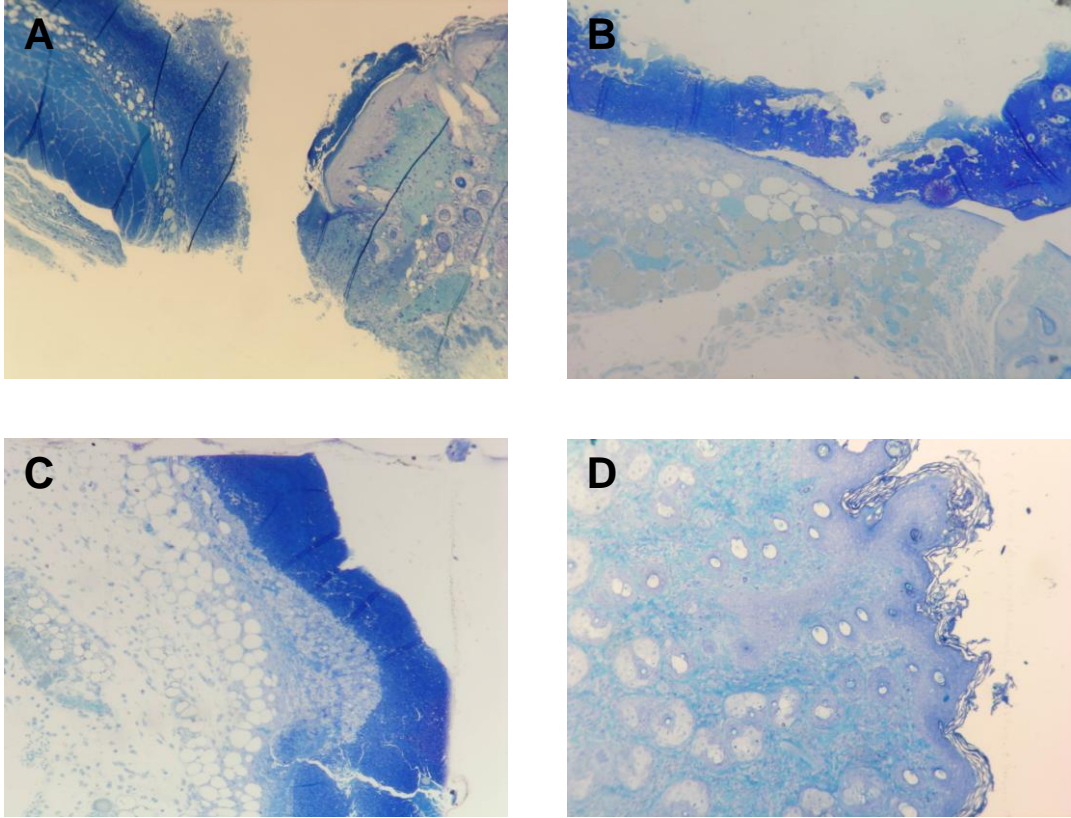
Tablo 4.1 Deney, kontrol, sham ve sağlam deri gruplarının 3., 5. ve 7. günlere ait örneklerinin sitokeratin-8, sitokeratin-14, EGF, IL-8, FGF-1, FGF-2, MCP-1 ve kollajen-1 immünoreaktivitelerinin dağılımı.

	3.gün				5.gün				7.gün			
	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Sham Grubu	Sağlam Deri Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Sham Grubu	Sağlam Deri Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Sham Grubu	Sağlam Deri Grubu
K8	++	-	+	-	+++	-	++	-	-	+++	+	-
K14	+	+	+	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
EGF	-	-	-	-	+	+	+	-	++	+	+	-
IL-8	+++	+++	+	-	+	+	++	-	++	++	+	-
FGF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FGF2	++/+++	+/++	++/+++	++	+++	+++	+	++	++	+++	+	++
MCP1	++	+/++	+/++	+/++	++	++	++	++	++	+	+	++
Col1	-	+	+	+	+	+	+	+	++	+/-	-	+

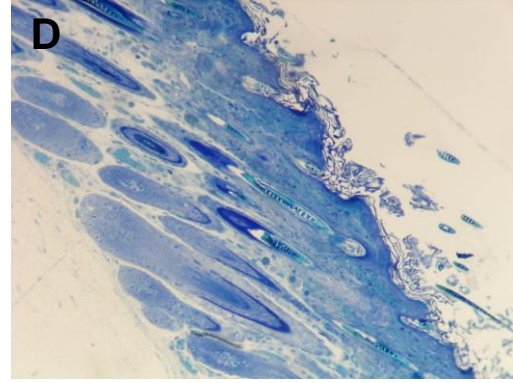
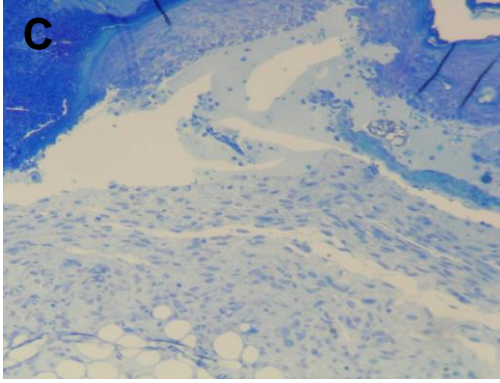
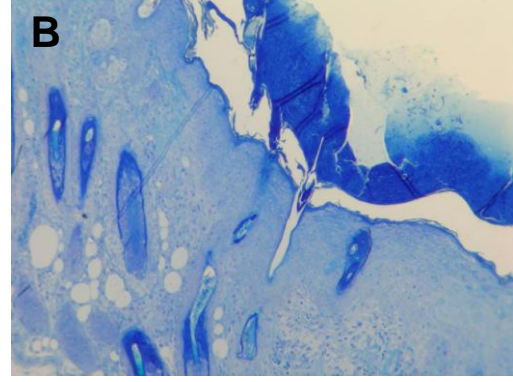
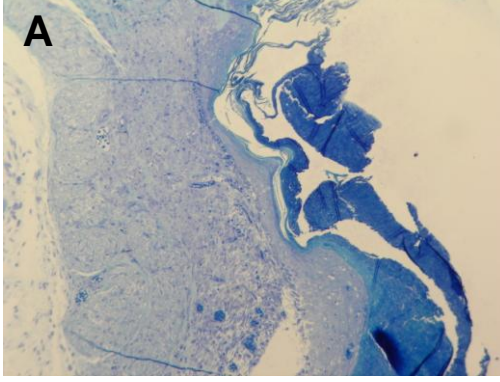
4.6.4.9. Deri Örneklerinin Yarı İnce Kesitlerinin Değerlendirilmesi

Alınan yarı ince kesitlerin toluidin mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda değerlendirilmesinde 3., 5. ve 7. günlerde sağlam deri grubu hariç diğer tüm gruplarda yara yerinde fibrin tıkaç ve inflamatuvar hücrelerin oluşturduğu eksuda gözlemlendi (Resim 4.47, Resim 4.48, Resim 4.49 A, B, C). Yara yeri ile birlikte yara kenarlarında deney, kontrol ve sham grubunda sağlam epidermis ve dermis ile birlikte kıl folikülleri ve yağ bezlerinin olduğu saptandı (Resim 4.47, Resim 4.48, Resim 4.49 A, B, C). Yara yerinde ise epitelizasyonun kaybı, yara yerinin hemen altında vaskülaritede artış izlenirken, PNL infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 4.47, Resim 4.48, Resim 4.49 A, B, C). Ayrıca sağlam deri ile yara yeri sınırında birçok mast hücrelerinin olduğu saptandı (Resim 4.47, Resim 4.48, Resim 4.49 A, B, C). Çalışmanın 5. gününde alınan örnekler incelendiğinde, deney, kontrol ve sham gruplarında

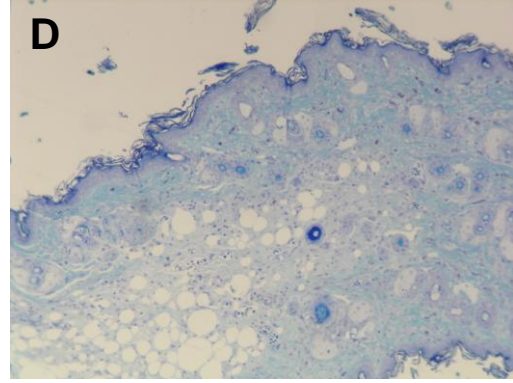
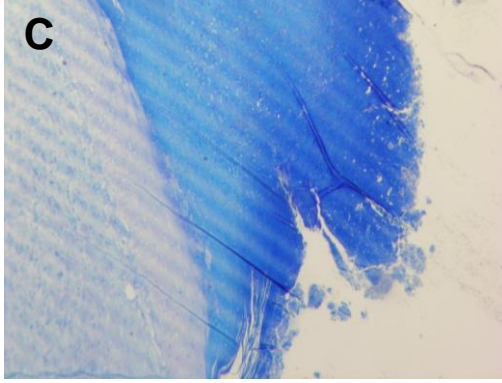
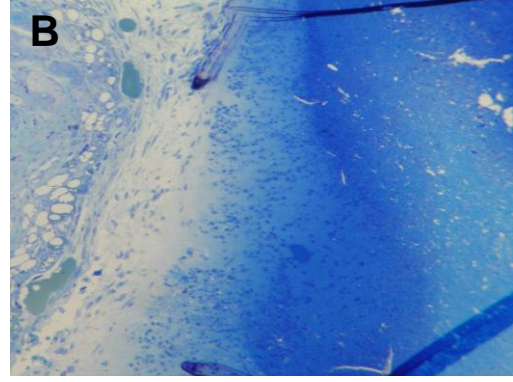
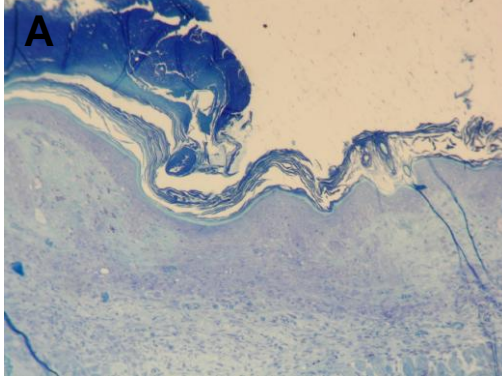
epitelizasyonun başladığı gözlenir iken, deney grubundaki epitel katlarının kontrol ve sham grubuna oranla daha fazla olduğu gözlemlendi (Resim 4.48 A, B, C). Sağlam deri örneklerinin 3., 5. ve 7. günde incelenmesi sonucunda epidermisin çok katlı yassı epitel özelliğinde ve dermisin ekleri ile birlikte histolojik olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi (Resim 4.47, Resim 4.48, Resim 4.49 D).



Resim 4.47: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait yarı ince kesitlerin 3. gün histokimyasal örnekleri. Toluidin Mavisi X100



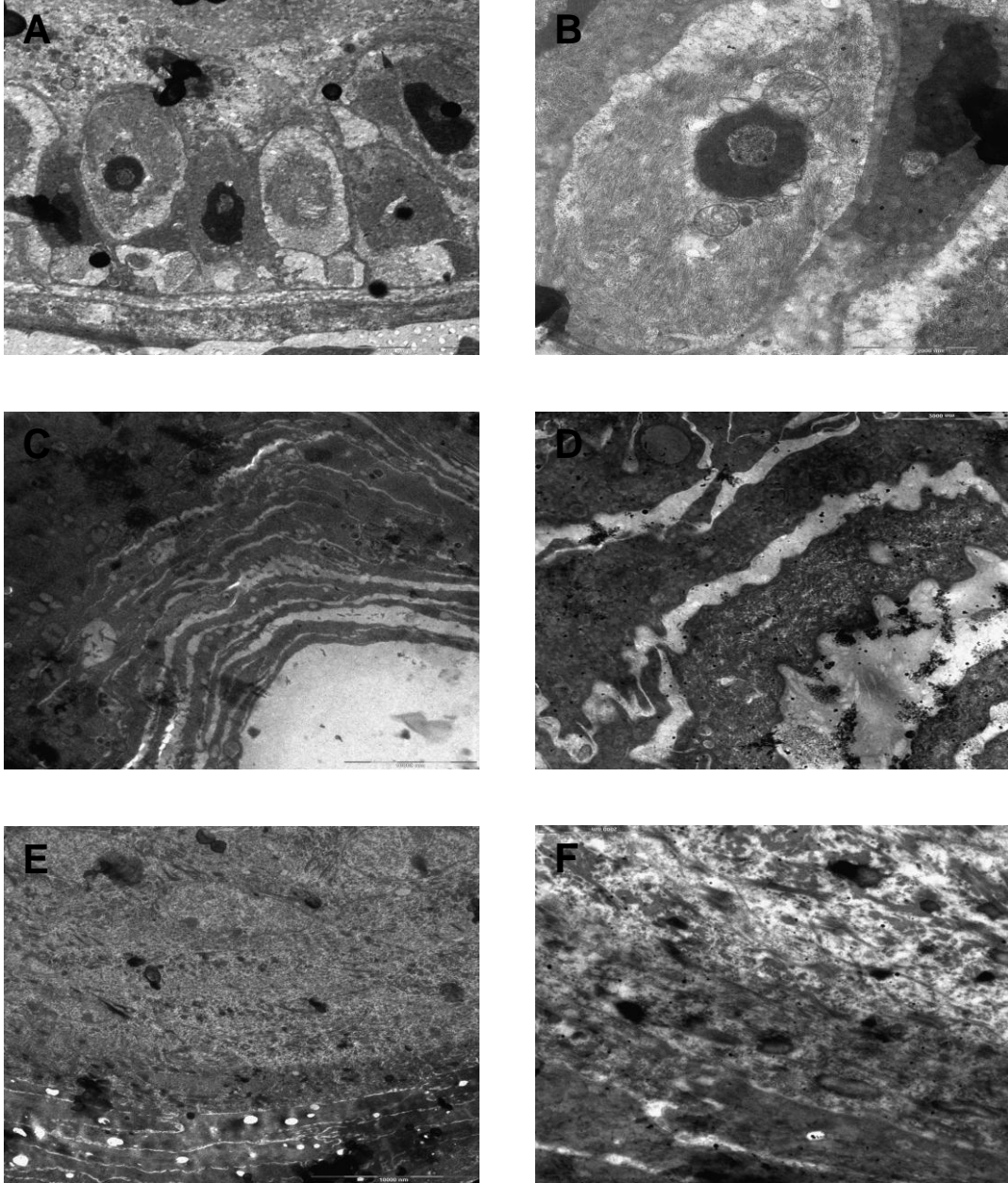
Resim 4.48: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait yarı ince kesitlerin 5. gün histokimyasal örnekleri. Toluidin Mavisi X100



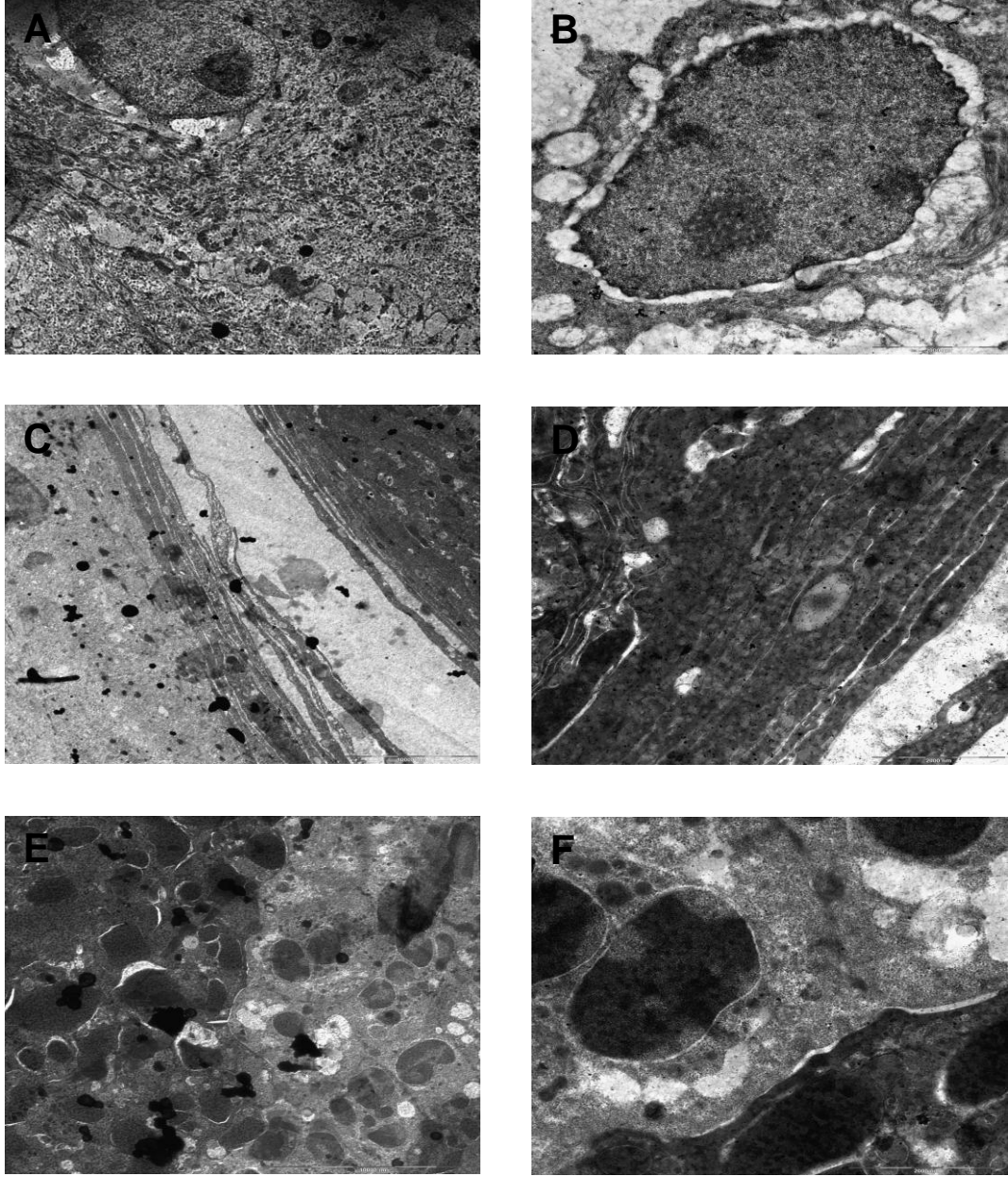
Resim 4.49: Deney (A), kontrol (B), sham (C) ve sağlam deri (D) grubuna ait yarı ince kesitlerin 7. gün histokimyasal örnekleri. Toluidin Mavisi X100

4.7. Deri Dokularının Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi

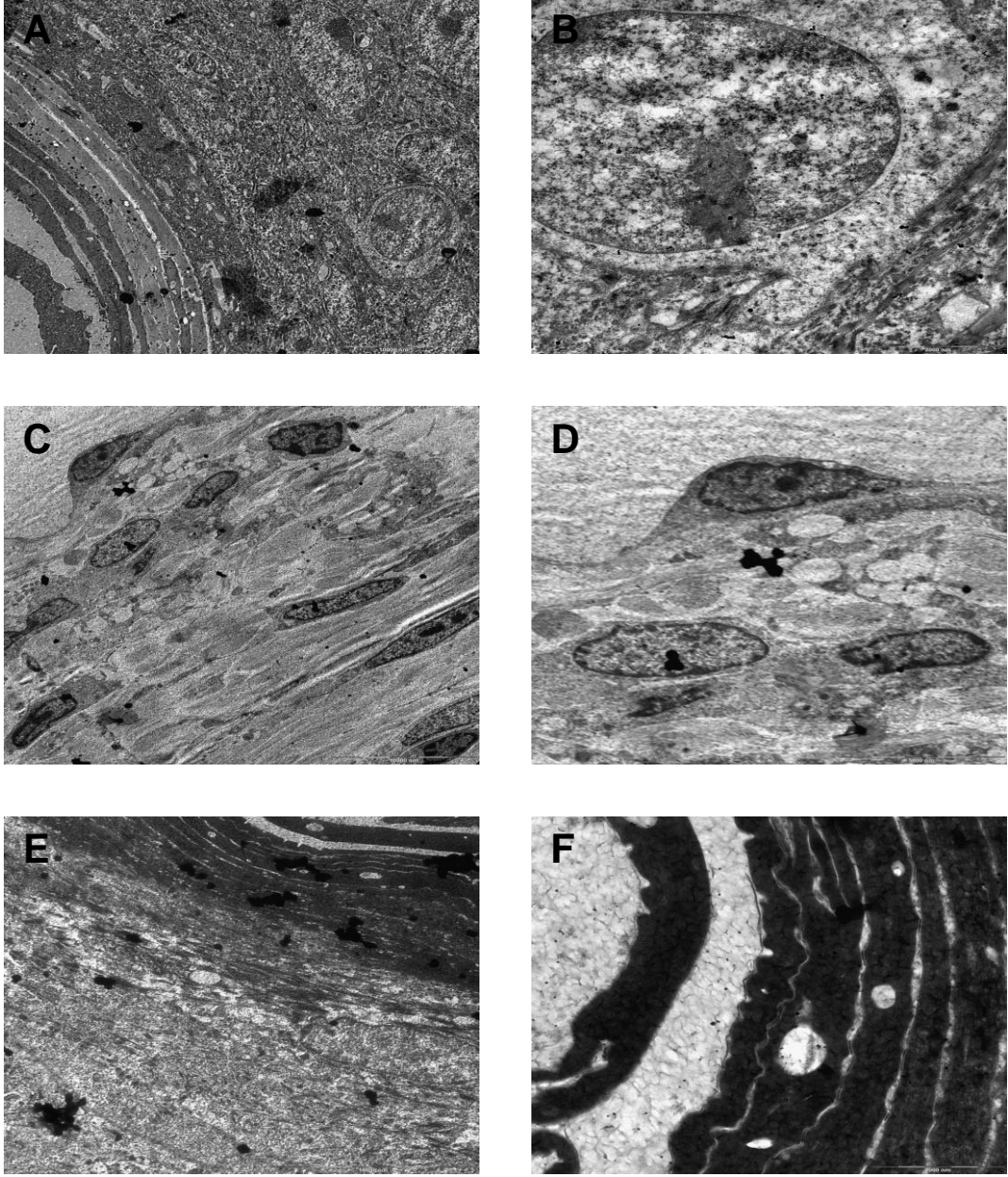
Fare embriyonik kök hücreleri kültür ortamında keratinositlere farklılaştırılarak farede oluşturulan cerrahi yara modeline transfer edildikten sonra 3., 5. ve 7. günlerde yara yerinden örnekler alındı. Bu örneklerin elektron mikroskopik incelenmesinde 3. gün deney grubunda epitelizasyonun başladığı ve keratinositlerin yara bölgesinde yer aldığı gözlemlendi (Resim 4.50 A, B). Keratinositlerin belirgin çekirdekçiğe sahip oval çekirdekli ve çekirdek membranının yer yer çöküntü oluşturduğu izlendi (Resim 4.50 B). Bununla beraber sitoplazma içerisinde tonofilamanların varlığı ile birlikte az sayıda kapsüllü, dens granüller saptandı (Resim 4.50 B). Kontrol ve sham gruplarının 3. gün örneklerinin incelenmesi sonucunda, yara yeri alanında epitelizasyona ait bulgu gözlenmez iken, yara yerinin alt bölgesinde bulunan bağ dokusuna ait hücreler gözlemlendi (Resim 4.50 C, D, E, F). Çalışmanın 5. ve 7. günlerdeki örnekleri incelendiğinde, deney grubunda keratinositlerin yara yerinde aktif olduğu gözlenir iken (Resim 4.51, Resim 4.52 A, B), kontrol grubunda 5. gündeki kesitlerde yer yer keratinositlerin varlığı (Resim 4.51C, D), 7. günde ise epitelizasyonun başladığı saptandı (Resim 4.52 C, D) . Sham grubunda ise yara yeri bölgesinde 3. ve 5. günlerde keratinositlerden ziyade granülasyon dokusu ve PNL hücrelerinin hakim olduğu (Resim 4.50, Resim 4.51 E, F), 7. günde ise epitelizasyonun başladığı izlendi (Resim 4.52 E, F).



Resim 4.50: Deney (A, B), kontrol (C, D) ve sham (E, F) gruplarının 3. gün örneklerine ait mikrograflar. A, C, E: X800, B, D, F: X4000



Resim 4.51: Deney (A, B), kontrol (C, D) ve sham (E, F) gruplarının 5. gün örneklerine ait mikrograflar. A, C, E: X800, B, D, F: X4000



Resim 4.52: Deney (A, B), kontrol (C, D) ve sham (E, F) gruplarının 7. gün örneklerine ait mikrograflar. A, C, E: X800, B, D, F: X4000

V. TARTIŞMA

Yara iyileşmesi, inflamasyon, granülasyon dokusunun oluşumu, re-epitelizasyon, matriks oluşumu ve yeniden yapılanmayı iç içe geçmiş evrelerden oluşan kompleks bir süreçtir (69). Bu süreçte ekstrasellüler matriks bileşenleri ile birlikte keratinosit, fibroblast, endotelial hücreler, sinir hücreleri ve yara yerine göç eden lökositler yer alır (49). Bu dönemde salgılanan büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerin ve hücrel işlevleri koordine eden sinyallerin miktarı yara iyileşmesinin başarısı ile doğru orantılıdır (69). Bu ajanlar yara yerine hücrelerin göçünü, başta keratinositler olmak üzere hücrel farklılaşmayı, granülasyon dokusunun oluşumunu ve re-epitelizasyonun başlamasını tetikleyerek metabolizma değişimini etkileyen aktif polipeptitlerdir (69).

Deride oluşan yaralanma ile epidermal bariyer bozulur ve bariyer hasarına karşı ilk olarak keratinositlerde depo halinde bulunan IL-1 salgılanır (69). Ardından kan komponentlerinin yara yerine gelişi ile pıhtılaşma mekanizması aktive olarak pıhtı oluşumu hemostazı indükler. Kan damarlarının geçirgenliğinin artışı ile inflamatuvar hücrelerin yara yerine migrasyonu matriks içerisindeki trafiği başlatır (69,77). İşte bu süreçte hem göç eden hücreler hem de hali hazırda yara yeri etrafında bulunan hücreler tarafından salgılanan birçok büyüme faktörü, sitokinler, kemokinler ve ekstrasellüler matriks bileşenleri ile birlikte tamir mekanizması başlar (77). O nedenle son yıllarda, hızlı ve fizyolojik yara tamirini sağlamak için yara iyileşmesinin mekanizmalarının ve rol alan sitokinler, kemokinler gibi büyüme faktörlerinin farklı yara iyileşme modellerinde incelenmesi gündemde olup, özellikle büyük deri kaybına yol açan durumlarda yara yeri tedavisinin etkin olabilmesi ve infeksiyon oluşumunun engellenerek tamirin gelişebilmesi için alternatif tedavi yöntemleri denenmektedir. Bu yüzden rejeneratif tıptaki

araştırmaların büyük bir kısmını doku mühendisliğinde ve deri greftlerinde erişkin ve embriyonik kök hücrelerin kullanımı oluşturmaktadır.

Hücre terapisi, lokal veya sistemik infüzyon şeklinde otolog veya allojenik hücrelerin hasarlı dokulara transplantasyonudur (75). Doku mühendisliği tarafından allojenik deri greftlerinin oluşturulmasında blastokist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler veya keratinosit serisine yönlendirilmiş kıl folikülünde bulunan epidermal kök hücreler veya kemik iliği ve periferal kan gibi epidermal olmayan fakat keratinositlere farklılaştırılan erişkin kök hücreleri kullanılabilir (76).

Kök hücreler, kendini yenileyebilme yeteneği ve farklılaşmış hücreleri oluşturabilme potansiyeli nedeniyle hücre terapisi için en iyi seğenektir (75). Kök hücre kaynakları embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere temel olarak ikiye ayrılır. Embriyonik olmayan kök hücre grubunda sayılan erişkin kök hücreleri, embriyonik kök hücrelerine oranla farklılaşma ve çoğalma potansiyelleri daha sınırlı olan hücrelerdir. Erişkin kök hücrelerin ölümsüz ve kendini yenileme kapasiteleri belirsiz ve tartışmalı bir konudur (76). Birçok çalışma, deri, kemik iliği veya periferal kan kaynaklı erişkin kök hücrelerin kendini yenileme ve çoğalma kapasitelerinin sınırlı ve yaşla birlikte azaldığını göstermektedir. Bununla birlikte bu çalışmaların çoğunda erişkin kök hücrelerin saf homojen bir topluluğu temsil etmedikleri de belirtilmiştir (76). Embriyonik kök hücreler, ölümsüz ve kendini yenileyebilme kapasiteleri ile farklılaşma sürecinde progenitör ve olgun hücre oluşturma potansiyelleri açısından önemli bir kaynaktırlar (76). Bu nedenle, embriyonik kök hücreler erişkin kök hücrelere oranla doku mühendisliğince üretilen allojenik doku greftlerin oluşturulmasında önceliklidir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda cerrahi yara modelinde kullanılacak olan keratinositlerin erişkin kök hücre kaynaklarından ziyade, embriyonik kök hücre kaynağından farklılaştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Keratinositler farklı hücre kaynaklarından farklılaştırılarak elde edilebilirler (65, 75, 76). En çok kullanılan kaynak hücreler, epidermal, embriyo dışı kaynaklı ve embriyonik kök hücrelerdir. Epidermal kaynaklı kök hücreler, epiderminin bazal tabakasında bulunan ve erişkinde de mitozla çoğalarak keratinositlere farklılaşan hücrelerdir. Bunun yanı sıra, kıl folikülünün bulbusunda, dermal papilla ve kılıfta ve dermiste kök hücre toplulukları bulunmakla birlikte, bunlardan kıl folikülünün bulbusunda bulunan kök hücrelerin keratinositlere farklılaşabildikleri gösterilmiştir (75, 78). Kıl folikülü ve dermiste bulunan diğer kök hücreler yara iyileşmesi sırasında farklılaşmaları keratinositlere indüklense bile, esas olarak dermisi oluşturan bağ dokusu hücrelerine farklılaşarak ekstrasellüler matriksin sentezini sağlarlar (75). Embriyo dışı kaynaklı kök hücrelerden keratinositlerin eldesi ve farklılaştırılması embriyonik ve epidermal kök hücre kaynaklarına oranla daha sınırlıdır. Bu alanda yapılan çalışmalarda kemik iliği stromal hücreleri ve periferik kan kök hücreleri en sık kullanılan hücrelerdir. Fakat sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda embriyonik ve epidermal kök hücre kaynaklarına oranla bir üstünlük sağlamadıkları gösterilmiştir (65, 76). Embriyonik kök hücreler ise çoğalmaları kontrol edilebilen ve sınırsız farklılaşma ve çoğalma kapasitelerinden dolayı en sık kullanılan kök hücre kaynaklarıdır. Kök hücrelerden keratinositlerin farklılaştırılması için genellikle üç temel basamak vardır (76). Öncelikle ilk basamakta embriyonik kök hücrelerin çoğaldıktan sonra farklılaşma için yönlendirilmesi indüklenmelidir. Keratinosit farklılaştırılması için kültür ortamına, BMP-4 (76, 79, 80, 81, 82), askorbik asit (76, 80), ekstrasellüler matriks (Matrijel) (83), matrijel yerine fibroblast kaynağının kullanımı (76, 79, 80, 81, 82, 84), büyüme faktörleri (FGF, EGF, Epiregulin, IGF, KGF, TGF, GM-CSF vb.) ve sitokinlerin (TNF- α , IL-1 vb.) (76, 84) ilaveleri gerekmektedir. Kollajen-1 içeren kültür ortamlarında

farklılaştırılan keratinositlere ait Troy ve Turksen çalışmalarında, embriyoblastların kollajen-1' e kolaylıkla yapıştıkları ve 6. günün sonunda epitelyal morfolojiye sahip hücrelerin embriyoblastın merkezinden dışarıya doğru göç ettiğini saptamışlardır. Bununla beraber bazal membran matriksi (matrijel) üzerinde kültüre edilen hücrelerin ise, kollajen-1 üzerinde kültüre edilen hücrelere göre matrijele daha hızlı yapıştıkları ve 6. günün sonunda daha fazla sayıda hücrenin göç ederek epitelyal toplulukları oluşturduklarını göstermişlerdir. Ayrıca kültürün 10. gününde sitokeratin-8 ve daha az oranda sitokeratin-14 ve 17 immunoreaktivitelerinin pozitif olduğunu göstermişlerdir (83).

Büyüme faktörlerinden EGF ilavesi yapılan kültür çalışmasında ise hanging drop metodu ile oluşturulan embriyoblastlarda kültürün 16. gününden itibaren 46. gününe kadar sitokeratin-14 pozitifliği saptanmıştır (84).

BMP-4, TGF- β süperaillesinin bir üyesidir (79, 81). BMP-4 embriyonik kök hücrelerde nöral farklılaşmayı inhibe ederken, keratinositlere farklılaşmayı indükler (81, 85). Başka bir çalışmada, BMP-4' ün nöral yolak ile ilişkili olan hücrelerin apoptozisi ile nöral farklılaşmayı inhibe ederek keratinosit farklılaşmasını arttırdığını destekleyici sonuçlar verilmiştir (82). Aberdam ve arkadaşlarının bir diğer çalışmasında ise embriyoblast oluşturmadan fibroblast tabakası üzerinde embriyonik kök hücreler kültür vasatı içerisine BMP-4 ilave ederek 3- 10 gün kültüre edildikten sonra keratinositleri tanımlamışlardır. Özellikle kültürün 8. gününde sitokeratin-14 pozitif hücreler gösterilmiştir (79). Coraux ve arkadaşları, BMP-4 ilavesi ile embriyonik kök hücrelerden keratinosit farklılaşmasının arttığını ve bu etkinin zaman bağımlı olup kültürün 4. ile 8. günü arasında en etkili olduğunu göstermişlerdir (80).

Çalışmamızda embriyonik kök hücrelerden hanging drop metodu ile oluşturulan embriyoblastların matrijel üzerinde BMP-4 ilavesi yapılarak kültüre edilmesi sonucunda, embriyoblastlardan çoğalan hücrelerin matrijel üzerinden dışarıya doğru göç ederek proliferasyon yaptıkları ve kültürün 10. gününden itibaren sitokeratin-8 ve 14 immunoreaktivitelerinin pozitif olduğu saptandı. Sitokeratin-8 erken keratinosit farklılaşma belirteci iken, sitokeratin-14 geç dönem belirteci olarak kullanılmaktadır (79, 81, 83, 84, 91). Sitokeratin-8 ve 14 seviyelerinin veya dağılımlarının tespit edilmesi, hücrelerin keratinosit benzeri hücreler olduğunu desteklemektedir. Çalışmamızda matrijel kullanılması hücrelerin farklılaşması için ekstrasellüler matriks benzeri bir ortam oluşmasını, BMP-4 kullanımı ise farklılaşmamış hücrelerden keratinositlerin farklılaştırma sürecinin birinci basamağı olan hücre yönlendirilmesini sağlamaktadır. Diğer çalışmalarda farklı kültür ortamı veya kültür vasatı içerisinde farklı kültür kokteylleri kullanılarak keratinosit farklılaşması elde edilmiş olmasına rağmen, çalışmamızda embriyoblastların oluşmasından sonra matrijel ve BMP-4 içeren ortamda hücrelerin keratinosite yönlendirildikleri ve farklılaştıkları sitokeratin-8 ve 14 immunoreaktivite pozitifliği ile tanımlanmıştır. Bununla beraber kültür ortamında elde edilen keratinositlerin elektron mikroskopik incelemeleri sonucunda, ultrastrüktürel olarakta keratinosite benzer hücreler özelliğinde olduğu gösterilmiştir. Embriyonik kök hücrelerden keratinositlere indüksiyonun moleküler temeli henüz kesinlik kazanmadığından dolayı farklı kültür ortamları denenmektedir. Sonuç olarak embriyonik kök hücrelerden keratinosit farklılaştırılmasında farklı kültür ortamları olmasına rağmen, elde edilen hücrelerin in vivo olarak ta devamlılığı ve kullanılabilirliğinin test edilmesi önemlidir.

Keratinositler kültür ortamında yönlendirildikten sonra, hücrelerin saflaştırılması ve ayırımı ikinci basamağı oluşturur (76). Bu aşamanın belirlenebilmesi için farklılaşmış keratinositlerden salgılanan endojen yüzey belirteçleri veya yeşil floresan proteini ile işaretlenmiş hücrelerin

tanımlanması gerekmektedir. Genellikle tercih edilen erken ve geç dönem keratinosit farklılaşma belirteçleri olan sitokeratin dağılımlarının immunohistokimyasal, akış sitometrisi, western blotting, RT-PCR vb. teknikler kullanılarak belirlenmesidir. Yapılan çalışmalarda sitokeratin-1, 8, 14, 17, 19 dağılımları kültürün farklı evrelerinde incelenmiştir (76, 79, 80, 81, 83, 84). O nedenle çalışmamızda in vitro ortamda sitokeratin-8 ve 14 dağılımlarının immunohistokimyasal olarak incelenmesi yapılmıştır.

Kültürdeki son basamak ise proliferasyon ve terminal farklılaşmanın sağlanmasıdır (76). Bu amaç için genellikle yukarıda verilen büyüme faktörleri ve sitokinlerin yer aldığı kültür kokteylleri kullanılmaktadır. Bizde çalışmamızda embriyoblastların matrijel üzerine alındıktan sonraki 3. günden itibaren BMP-4 ilavesi her gün yapılarak farklılaşmanın devamlılığı sağlanmıştır.

In vitro olarak farklılaştırılan keratinositlerin hücresel terapi için herhangi bir yara yerine konduğunda canlılığını devam ettirmesi, proliferasyonu, re-epitelizasyona katılımı açısından uygulanabilirliği önemli konulardan biridir. Bu nedenle in vitro olarak deneysel cerrahi yara modelleri kullanılarak farklılaştırılmış keratinositlerin bu özelliklerini belirlemek için yapılan çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Epidermal kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin in vitro yara yeri modeline uygulanmasında elde edilen sonuçlara göre büyük cilt defektleri olan hastalara transfer edildiğinde üretilen bu epitelin dermal komponentleri içermediğinden sonuçlar çok yüz güldürücü olmamıştır (86). Üretilen bu epidermal greftlerin fibrin yapıştırıcıları ile birlikte kullanılması bir miktar etkili olsa da fibrin yapıştırıcıların yara yerindeki etkisi tam olarak bilinmediği için kullanılabilirliği tartışmalıdır (87). O nedenle çalışmamızda üretilen keratinositlerin bir mesh üzerinde üretimlerine devam edilmesi ve kültür ortamından direkt yara yerine transfer edilerek çevresel ortamın bozulmaması amaçlanmıştır. Vazeline gauze yara yeri

tedavisinde kullanılan içeriğinde petrolatum bulunan bir meshdir (88). O nedenle çalışmamızda daha önce yara yerinde kullanılabilirliği test edilmiş olan vazeline gauze kullanıldı. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositler vazeline gauze üzerinde kültüre edilerek cerrahi yara modeline transfer edildi. Kültür ortamına konulan vazeline gauze mesh özelliğinde olduğundan dolayı kültür ortamında keratinositlerle birlikte kültüre edilmesi bir sorun oluşturmadı. Daha önceki çalışmalarda kollajen tip 1, kollajen tip IV, ekstrasellüler matriks komponentleri, poliprolin vb. içeren meshler hem hücre kültürü ortamında hem de cerrahi müdahaleler sırasında kullanıldığı gösterilmiştir (65). Mesh üzerinde 5 gün kültüre edilen hücrelerin canlılığını devam ettirdikleri gözlemlendikten sonra yara yerine transfer edildi. Yara yerine mesh ile birlikte transfer edilen embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan hücrelerin bulunduğu örnekler incelendiğinde, yara oluşturulduktan sonraki 3. günde yara yerinde eksudanın bulunduğu, epitelizasyon kaybı, PNL ve mast hücre infiltrasyonu ile birlikte yara yeri altındaki bölgede vaskülarizasyonda artış olduğu izlendi. Kontrol ve sham gruplarında da deney grubunda gözlenen histolojik değişikliklerin varlığı, cerrahi yara modelinin oluşturulduğunu ve yara yeri etrafında yara iyileşmesi sürecinin başladığını gösterir inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vaskulogenezis gibi bulgular mevcuttu. Kontrol, sham ve deney gruplarında, cerrahi yaranın bittiği yerde ise epiderminin devam ettiği, deri eklerinin ve dermisin korunduğu izlendi. Kontrol, sham ve deney gruplarının 3. gün örnekleri karşılaştırıldığında, deney grubunda yara yerinde keratinosit hücrelerinden oluşan bir tabakanın bulunduğu gözlenir iken, kontrol ve sham grubunda yara yeri kenarlarında keratinosit hücrelerinde proliferasyonun başladığı, fakat yara yerinde epitelizasyona ait bir bulgu gözlenmemesi, deney grubunda transfer edilen keratinositlerin yara yeri tamirine katkıda bulunduğunu düşündürdü. Kontrol, sham ve deney gruplarının 5. gün örnekleri karşılaştırıldığında ise, her üç grupta da yara yerinde epitelizasyonun başladığı, fakat deney grubundaki epitel dokusunun kontrol ve sham grubuna oranla daha fazla olması 3. günde

başlayan epitelizasyonun devam ettiğini desteklemektedir. Örneklerin 7. güne ait bulgularıda 5. güne benzer olduğu ve deney grubunun diğer gruplara oranla daha iyi olduğu izlendi. Sağlam deri örneklerinin 3., 5. ve 7. günde hematoxilen-eozin boyaması ile incelenmesi sonucunda epiderminin çok katlı yassı epitel özelliğinde ve derminin ekleri ile birlikte histolojik olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi. Histokimyasal analiz sonucunda, deney grubunda erken dönemde gözlenen keratinosit hücreleri ve epitelizasyon bulguları, elektron mikroskopik sonuçlar ile de desteklenmiş ve transfer edilen keratinositlerin yara yeri bölgesinde aktif hücreler olarak bulunduğu gösterilmiştir. Elektron mikroskopik örneklerin analizi sonucunda deney grubundaki keratinositlerin açık sitoplazmalı ve aktif çekirdek ile birlikte membranın çöküntü yapmış olması hücrelerin farklılaşmasını tamamlamak üzere olan hücreler olabileceğini desteklemektedir. Bununla beraber bu hücrelerin deney grubunda 5. ve 7. günde de gözlenmesi aktif hücre özelliğini koruduğunu ve yara iyileşmesinde etkin rol oynadığını düşündürdü.

Epitelizasyona katılan keratinositler iyileşme sürecinde yara kenarındaki epidermis kaynaklıdır (89). Akut yaralanmanın ilk 24 saatinde keratinositlerde boyutta büyüme gibi görülebilecek değişiklikler meydana gelir. Yaralanmadan saatler sonra (>18 saat) yaranın proksimalindeki epiderminin bazal ve suprabazal tabakalarından göç eden keratinositler uzamış ve polarize morfolojiye sahiptir. Epitelizasyonda rol alan keratinositler arasında hücre hücre adezyonununun kısmi kaybına bağlı olduğu düşünülen intersellüler boşluklar oluşur (77, 89). Çalışmamızda elektron mikroskopik örnekler incelendiğinde yara yerinde bulunan keratinositler arasındaki bağlantı komplekslerinin görülememesi, bu hücrelerin epitelizasyona katıldığını doğrulamaktadır. Kontrol ve sham grubunda elektron mikroskopik incelemede 3. günde epitelizasyona ait hücreler gözlenmez iken daha sonraki günlerde yara alanında epitelizasyon ve keratinositler görülmeye başlandı.

Bununla beraber Brd-U ile işaretlenmiş keratinositlerin, anti-Brd-U boyaması sonucunda deney grubunda epitelin görüldüğü alanda pozitif olarak boyanmanın saptanması, buradaki keratinositlerin sağlam deriden göç eden keratinositlerden ziyade kültür ortamında üretilen keratinositler olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin in vivo ortama transfer edilebildiği ve yara yerinde canlılığını devam ettirerek yara tamirine katılabildiği düşünüldü.

Keratinositlerin erken ve geç dönem farklılaşma belirteçleri olan sitokeratin-8 ve 14 dağılımları, kontrol, sham ve deney gruplarında karşılaştırıldığında sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin deney grubunda 3. ve 5. günde pozitif iken, 7. günde immunoreaktivitesinin azalmış olması, keratinositlerin farklılaştığını desteklemektedir. Kontrol grubunda 3. ve 5. günde sitokeratin-8 immunoreaktivitesi 7. güne oranla daha az olması veya saptanmaması, yara yeri kenarındaki hücrelerin göçünün deney grubuna oranla daha yavaş olduğunu ve keratinositlerin 7. günde de farklılaşmalarının devam ettiğini göstermektedir. Sham grubunda ise sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin her üç günde de pozitif olmasına rağmen, özellikle 5. gündeki immunoreaktivitenin diğer günlere oranla daha fazla olması, uygulanan meshin yara yeri kenarındaki keratinosit hücrelerinin farklılaşmasını ve/veya göçünü bir miktarda olsa desteklediğini düşündürdü. Sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin deney grubunda diğer gruplara oranla daha fazla olması, in vitro farklılaştırılmış keratinositlerin in vivo olarak farklılaşma sürecini kısalttığı ve proliferasyonun başlayarak epitelizasyona diğer gruplara göre daha erken başladığını göstermektedir. Sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin sağlam deri örneklerinde negatif olması, keratinosit erken dönem farklılaşma belirteci olan sitokeratin-8' in sadece farklılaşan hücrelerde pozitif olduğunu göstermektedir.

Sitokeratin-14' ün, deney gurubunda erken dönemde diğer gruplara oranla daha kuvvetli pozitif olması, kùltür ortamında üretilen keratinositlerin hızla in vivo ortamda çoğalmaya başladığını ve yara iyileşme sürecinin gelişme aşamalarını beklemeden daha hızlı bir şekilde epitelizasyonu sağladığını düşündürdü. Sitokeratin-14' ün 7. günde immunoreaktivitesinin azalmış olması ise, burada erken dönemde farklılaşan hücrelerin epitelizasyonu sağladığından dolayı artık farklılaşmadığı ve tamir mekanizmasını hızlandırdığını göstermektedir.

Kontrol ve sham grubunda ise sitokeratin-14' ün normal epitelizasyonda olduğu gibi sağlam deriden göç eden hücrelerden farklılaşan keratinositlerden salgılandığı ve farklılaşmanın esas olarak gözleendiği 5. ve 7. günlerde immunoreaktivitenin 3. güne oranla daha fazla olmasını desteklemektedir. Bununla beraber sham grubunda sitokeratin-14 immunoreaktivitesinin kontrol grubuna oranla özellikle 5. ve 7. günlerde bir miktar artmış olmasının yara yerine konan meshin etkisi ile olabileceği düşünöldü. Sağlam deriden alınan örneklerde ise sadece bazal tabakadaki hücrelerin pozitif olduğu ve günler arasında fark olmadığı gözleendi. O nedenle sitokeratin-14' ün normalde de salgılandığı, fakat yara iyileşme sürecinde arttığı gösterilmiştir. Deney grubunda 7. günde sağlam deriden daha fazla sitokeratin-14 immunoreaktivitesi gözlenmesi ise, in vitro ortamda üretilen hücrelerin in vivo ortama uyum sağladığı ve canlılığını koruduğunu düşündürdü.

Bickenbach ve arkadaşları neonatal ve erişkin derisinden izole ettikleri epidermal kök hücreleri GFP ile işaretleyerek C57BL/6 genç erişkin farelerde oluşturdukları yara kenarına 2. günde yara kenarı boyunca enjekte etmişler ve enjeksiyondan dört gün sonra epidermal kök hücre enjekte edilen yaraların kapandığını, kontrol yaraların hala krut ile örtölü olduğu ve enjeksiyondan sonraki 7. güne kadar iyileşmediğini göstermişlerdir (90).

Epidermal kök hücrelerin farklılaştırılmadan yara yerine enjeksiyonu sonrasında epidermis ve dermiste GFP pozitif hücreler saptanmış ve bu hücrelerin morfolojisinin mezenkimal hücreler gibi adipositlere veya fibroblastlara benzer olduğu gözlenmiştir (90). Bizim çalışmamızda ise farklılaştırıldıktan sonra transfer edilen hücrelerin hala keratinosit olarak devam ettiği hem ultrastrüktürel hem de immunohistokimyasal olarak gösterilmiş ve ayrıca yara yerinde devamlılığı sağlamıştır. O nedenle erişkin dönemde alınan epidermal kök hücrelerin yara yerine transferinde yara yeri tamirinde kullanılabilir olması yanısıra, bu hücrelerin saf epidermal kök hücrelerden ziyade, adiposit ve/veya fibroblastlara benzer hücreler olması, yara yeri epitelizeşyonuna katkısı açısından düşündürücüdür.

Yara oluştuktan sonra veya deride epitelizeşyon kaybı meydana geldiğinde alttaki bağ dokusu içerisinde bulunan hücreler ile birlikte yara yeri kenarında bulunan keratinositler tarafından salgılanan birçok faktör ile iyileşme süreci başlar. Trombositlerin α granüllerinden EGF, PDGF ve TGF- β gibi büyüme faktörleri salgılanır (69, 92). Fibroblast ve yara yerine göç eden makrofajlardan salgılanan EGF ekspresyonu artarak re-epitelizeşyonun başlaması için ilk sinyal verilmiş olur (69). EGF ile birlikte TGF- α ve FGF, keratinositlerin migrasyonu ve proliferasyonunda önemlidir. Yara iyileşme sürecinde yara yerinde öncelikle göç eden nötrofil, makrofaj, mast vb. hücreler ile granülasyon dokusu oluşturulur ve epitelizeşyon daha sonra gerçekleşir. Matriksin formasyonunda FGF ailesi üyeleri tarafından sağlanarak granülasyon dokusuna katılır. EGF trombosit, fibroblast ve makrofaj hücrelerinden salgılanır ve keratinositlere parakrin olarak etki eder (93) iken keratinositler EGF salgılamazlar (69). Çalışmamızda EGF immunoreaktivitesinin 3. günde tüm gruplarda negatif iken, deney grubunda 5. ve 7. günlerde giderek artan şiddette pozitif olduğu gözlemlendi. Kontrol ve sham grubunda ise 5. ve 7. günlerde immunoreaktivitenin deney grubuna göre daha az ve zayıf şiddette olduğu izlendi. EGF ekspresyonu özellikle re-

epitelizasyonda artar ve keratinosit migrasyonu ve proliferasyonunu sağlar (69). Sağlam deride negatif olarak gözlenen EGF immunoreaktivitesinin, deney grubunda kontrol ve sham grubuna oranla daha fazla gözlenmesi, keratinositlerin proliferasyonunun sağlanması amacı ile makrofaj, fibroblast ve trombosit hücrelerinden salgılanan faktörlerin diğer gruplara oranla daha önce aktive olduğu ve böylece deney grubunda re-epitelizasyonun erken başlamasından sorumlu olduğu düşünüldü. Kontrol grubu ile sham grubundaki immunoreaktivite karşılaştırıldığında ise, her iki grup arasında fark olmadığı ve uygulanan meshin EGF salgılanmasında bir rolü olmayabileceği düşünüldü.

Yara iyileşmesinde önemli birçok hücrenin yara yerine göçünü sağlayan kemokinler, yara yerinde re-epitelizasyon, dokunun yeniden yapılanması ve anjiogenezde rol oynarlar (69). IL-8, CXC kemokin ailesinin bir üyesi olup ekspresyonu akut yaralarda artar (50). Ayrıca, keratinosit göçünü ve çoğalmasını artırarak re-epitelizasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (94, 95). Bununla beraber IL-8, lökositlerden salgılanan matriks metalloproteinazları aktive ederek dokunun yeniden yapılanmasında, keratinositlerin proliferasyonu ile birlikte hem keratinosit hemde inflamatuvar cevapta yer alan nötrofillerin göçünde önemli rol oynar (50, 96). Çalışmamızda IL-8 immunoreaktivitesi yara oluşturulduktan sonraki 3., 5. ve 7. günlerde deney ve kontrol grubunda giderek azalan şiddette gözlenir iken, sham grubundaki immunoreaktivitenin deney ve kontrol grubuna göre daha az olduğu izlendi. Deney ve kontrol grubundaki IL-8 immunoreaktivite şiddeti 3. günde benzer olmasına rağmen, deney grubunda IL-8 pozitif hücrelerin daha fazla olduğu saptandı. Yara iyileşmesinin erken evresinde IL-8 immunoreaktivitesinin kontrol ve deney grubunda 3. günde en fazla olmasının keratinosit proliferasyonu ile birlikte keratinosit ve nötrofil migrasyonunu sağlamak amacı ile aktive olduğu düşünüldü. Deney grubunda IL-8 pozitif hücrelerin kontrol grubuna oranla daha fazla olması, yara yerine

transfer edilen keratinositlerin IL-8 salgılanmasında bir miktar artışa sebep olduğu, bununda burada bulunan keratinositlerin proliferasyonu ve migrasyonunu sağlamak amacı için artmış olabileceği kanısına varıldı.

FGF ailesi üyeleri yara iyileşmesinin tüm evrelerinde keratinositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücrelerinden salgılanırlar (69, 97, 98). Fakat erken ve geç dönem evrelerde salgılanan FGF tipleri farklıdır. FGF ailesi üyelerinden esas olarak FGF-2, FGF-7 ve FGF-10 yara iyileşmesinde görev alır (69). FGF-7 ve FGF-10, keratinosit büyüme faktörü 1 ve 2 olarak ta adlandırılır ve akut yaralanmalarda parakrin etki ile keratinositin migrasyonunu ve proliferasyonunu sağlarlar (93, 99,100). FGF-2 akut yaralarda artarak granülasyon dokusunun oluşumunda, re-epitelizasyonda ve dokunun yeniden yapılanmasında rol oynar (101). In vitro çalışmalar, FGF-2' nin çeşitli ekstrasellüler matriks komponentlerinin sentezini ve depolanmasını düzenlediğini, re-epitelizasyon sırasında keratinosit motilitesini, fibroblastların göçünü ve kollajenaz üretimini arttırdığını göstermektedir (102). FGF-1 epitelizasyonda FGF-2' ye oranla daha az etkindir. O nedenle çalışmada FGF-1 immunoreaktivitesi açısından gruplar arasında fark gözlenmemiştir, fakat kontrol grubunda da immunoreaktivitenin olmaması yara iyileşmesinde etkinliğin az veya olmadığını desteklemektedir. FGF-2 immunoreaktivitesi, 3. günde deney grubunda orta ve yer yer kuvvetli pozitif olarak yara bölgesinin hemen altında gözlenir iken, kontrol ve sham grubunda zayıf ve yer yer orta şiddette gözlendi. FGF-2 mast hücresi, fibroblast, endotelyal hücreler, düz kas hücresi ile keratinositlerden salgılanır (69). Deney grubunda erken dönemde artmış FGF-2 immunoreaktivitesinin bağ dokusu hücreleri yanısıra transfer edilen keratinositlerden de salgılandığını düşündürdü. Bununla beraber yara iyileşmesi sürecinde artmış olan FGF-2 immunoreaktivitesinin keratinositler üzerinde parakrin ve otokrin etki ile keratinositlerin migrasyonunu ve proliferasyonunu desteklediği düşünüldü. Deney ve kontrol

grubunda 5.günde FGF-2 immunoreaktivitesinin bağ dokusu içerisinde bulunan fibroblastların sitoplazmalarında şiddetli pozitif olarak gözlenmesi, yara iyileşmesi sürecindeki ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanması için önemli olabileceği ve FGF-2 immunoreaktivitesine sahip hücrelerin deney grubunda daha fazla olması ise yara iyileşme sürecinin daha erken başlamasından dolayı olabileceği varsayıldı. FGF-2 immunoreaktivitesinin 7. günde deney grubunda 5. güne göre daha az olarak saptanması ve kontrol grubunda ise 7. günde immunoreaktivitenin 5. güne oranla artmış olması, deney grubunda yara iyileşme sürecinin kontrol grubuna oranla daha hızlı olduğu, o nedenle kontrol grubundaki FGF-2 salgısının 7. günde hala devam ettiğini düşündürdü. Sham grubunda ise 5. ve 7. günlerde FGF-2 immunoreaktivitesinin zayıf şiddette ve günler arasında farklılık olmaması ile uygulanan meshin ekstrasellüler salgıda etkin rol oynayamayabileceği sonucuna varıldı. Sağlam deri grubunda FGF-2 immunoreaktivitesinin 3., 5. ve 7. günlerde bağ dokusu içerisindeki fibroblastlarda orta şiddette pozitif olması ise, fibroblastlardan FGF-2' nin normal dokuda da salgılandığını göstermektedir.

Kemokinler, özellikle inflamatuvar hücreler olmak üzere bir çok hücre tipinin yara bölgesine göçünü stimüle ederek, yara iyileşmesi sürecinde aktif rol oynarlar (69). Buna ek olarak, yara bölgesindeki daimi hücrelerde kemokin reseptörlerinin bulunması re-epitelizasyon, dokunun yeniden yapılanması ve anjiogenezin düzenlenmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (59, 69). MCP-1 bir kemokin olarak, yaralanmanın özellikle ilk 7 gününde keratinositlerden, endotel hücrelerinden ve makrofajlardan salgılanır (49). MCP-1 monosit/ makrofajlar, T lenfositler ve mast hücreleri için kemoatraktandır (103). MCP-1 eksikliği, fare yara iyileşmesi modellerinde re-epitelizasyon, anjiogenez ve kollajen sentezinde iyileşmede gecikmeye yol açarken, kronik yara iyileşme sürecinde MCP-1' in ekspresyonunun devam ettiği ve uzamış inflamatuvar cevaba katkıda bulunmak üzere nötrofil ve

makrofajların yara yerinde kalmasını sağladığı gösterilmiştir (104, 105). Çalışmamızda MCP-1 immunoreaktivitesi hem yaralı hem de sağlam dokuda gözlemlendi. Fakat yaralı gruplarda gözlenen immunorektivitenin sağlam gruba oranla daha fazla olduğu ve hem hücrede hem de ekstrasellüler alanda olduğu görüldü. Bununla beraber MCP-1 immunoreaktivitesinin deney grubunda kontrol ve sham grubuna göre 7. günde de orta şiddette devam etmesi, buraya transfer edilen hücrelere karşı hücresel bir cevap olarak MCP-1 salgısının devam ettiğini düşündürdü.

Matürasyon ve yeniden yapılanma evresinin temel özelliği yara alanına kollajen depolanmasıdır (45). Kollajen depolanmasının miktarı, oranı ve kalitesinin yara gerilme kuvveti üzerine olan etkileri nedeniyle bu süreç klinik açıdan en önemli evredir. Fibroblastlar içinde kollajen intrasitoplazmik filamanlar halinde sentezlenip hücreler arası bölgeye verilir. Yara iyileşmesi sürecinde salgılanan FGF, TGF- β ve PDGF fibroblast infiltrasyonuna izin verir ve fibroblastların miyofibroblastlara çevrilmesini indükler (69). Matriksin yeniden yapılanması sürecinde kollajen ve elastin liflerinin salgılanarak matriksde depolanması, granülasyon dokusunun yerini alarak yara yeri altında bulunan dermisin tamirini sağlar. Bu dönemde özellikle TGF- β 'nin aracılığıyla yeni kollajen sentezi ve PDGF tarafından eski kollajenin yıkımı gerçekleşir (69). O nedenle yeni oluşan kollajenin matriksde depolanması yara iyileşmesi sürecinin geç evresinde olur. Çalışmamızda kollajen dağılımı Masson Trikrom boyaması ile gösterildi. Tüm gruplarda kollajen dağılımının olduğu, fakat yara oluşturulan deney, kontrol ve sham gruplarında sağlam gruba oranla daha az olduğu izlendi. Deney grubunda 3. günde kollajenin kontrol ve sham grubuna oranla daha fazla olması, transfer edilen keratinositler sayesinde, hem keratinositler hemde yara yeri bölgesinde salgılanan diğer faktörlerin salgılarının tetiklenmesi sonucunda yara iyileşmesinin daha hızlı olmasından dolayı olduğu düşünüldü. Yara iyileşme sürecinin 7. günden sonrası incelenmediğinden dolayı, gruplar arasındaki

kollajen depolanmasının derecesi değerlendirilemedi. Kollajen-1 immunoreaktivitesi çalışmamızda deney grubunda 3. günde zayıf veya negatif, 5. ve 7. günlerde pozitif olarak gözlenir iken, kontrol ve sham gruplarında 3. ve 5. günde zayıf şiddette, 7. günde immunoreaktivitenin zayıf veya negatif olduğu gözlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda deney grubunda kollajen-1 sentezinin yara iyileşmesi sürecindeki diğer moleküler dağılımlara uyumlu olarak daha geç evrede arttığı gözlenir iken, kontrol ve sham gruplarında kollajen-1 sentezinin daha az olması ve özellikle erken evrede gözlenmesi, matriksin yeniden yapılanmasında eksiklik olabileceğini düşündürdü.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda amacımız, kültür ortamında üretilen keratinositlerin yara yerine transferinde yara yerine adaptasyonu ile, epitelizasyonu başlatarak yara tamirine katkıda bulunmasının incelenmesi olup, elde edilen hücrelerin yara tamir mekanizmasında kullanılabileceği sonuca varıldı.

Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan keratinositlerin immunohistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak keratinosit benzeri hücreler olduğu, yara yerine mesh üzerinde transfer edildiğinde canlılığını koruduğu gözlenmesi üzerine, in vitro ortamda üretilen hücrelerin in vivo ortama adapte olabildiği görüldü. Çalışmamızda keratinositlerin embriyoblast oluşturulduktan sonra matrijel ve BMP-4 içeren kültür ortamında üretilmesi ilk defa denenmiştir. Bu protokol ile embriyonik kök hücrelerin keratinosite benzer hücrelere farklılaşabildiği ve yara yerinde de devamlılığının sağlandığı izlenmiştir. Yara tamiri sırasında ise, transfer edilen keratinositler sayesinde tamir mekanizması sürecinin daha erken başladığı ve yara tamirinde rol alan moleküllerin salgısının da kontrol grubuna oranla tamir sürecini iyi yönde etkileyecek şekilde olması, keratinositlerin klinik uygulamalarda da yara tamiri sürecinde kullanılabileceğini desteklemektedir. Bununla beraber farklılaştırılan keratinositlerin bir mesh üzerinde transfer edilmesi, hücre transferi sırasında hücre kaybını önlemesi yanısıra, keratinositlerin ortama adapte olmasını da kolaylaştırdığını düşünmekteyiz. Ancak farklılaştırılan keratinositlerin biyouyumluluk süreçlerinin test edilebilmesi için farklı mesh veya biyomateryaller kullanılarak yara modellerinde incelenmesi uygun olacaktır.

Kök hücrelerin keratinositlere farklılaşmasını sağlamakla birlikte in vitro olarak saflaştırılması ve çoğalması için iyi tanımlanmış ve verimli protokollere gerek duyulur. Bu tür protokollerin geliştirilmesi spontan olarak kök hücrelerin birçok farklı hücre tipine farklılaşmasını azaltırken embriyonik

kök hücrelerin klinikte uygulanması ile oluşabilecek teratoma riskini de azaltacaktır. Buna ek olarak bu tür protokollerin geliştirilmesi deri doku biyolojisi çalışmaları için kullanılabilir in vitro modellerin oluşturulmasına ve terapötik uygulamalar için kök hücrelerin genetik manuplasyonunu kolaylaştırır. Kök hücrelerin keratinositlere yönlendirilmesi ve farklılaştırılması için geliştirilen protokoller ile deri ile ilişkili biyomateryallerin ve ilaçların farmakokinetik ve sitotoksik/genotoksik testlerinin yapılabilmesine olanak sağlar.

In vitro olarak üretilen keratinositlerin, sadece cerrahi yara modellerinde değil, diğer deri kayıplarına neden olan yaralanmalarda da kullanılabilirliği incelenmeli ve klinik uygulamalar için ön çalışmalar planlanması gerektiği düşünülmektedir.

VII. ÖZET

Deri vücudun iç ortamının bütünlüğü ve çevreye karşı korunmasında hayati bir rol oynar. Yanık ve deri yaralanmalarının en az hasarla tedavi edilmesi için doku mühendisliğince otolog veya allojenik olarak embriyonik veya erişkin kök hücrelerinden oluşturulan deri greftlerinin oluşturulması ve kullanımı gündemdedir. Pluripotent olan embriyonik kök hücreler uygun kültür ortamı sağlandığında farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile farklılaşmaları sağlanabilir. Bu çalışmada amacımız fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan keratinositlerin, farede oluşturulan cerrahi yara modeline transfer edildikten sonra yara iyileşmesine ve yara iyileşmesi sırasında salgılanan moleküllere etkilerinin araştırılmasıdır.

Embriyonik kök hücrelerden embriyoblastlar oluşturularak matrijel ve BMP-4 içeren kültür ortamında keratinosit benzeri hücreler elde edildi. Farklılaştırılan keratinositler % 4' lük paraformaldehit ile tespit edildikten sonra sitokeratin-8 ve sitokeratin-14 dağılımları immunohistokimyasal teknik ile, hücrelerin ultrastrüktürel özellikleri, gluteraldehit ve osmik asit ile tespit edildikten sonra agara gömülerek tanımlandı. Farklılaştırılan hücreler yara yerine transfer edilmeden önce Brd-U ile işaretlendi. Deneysel cerrahi yara modeli oluşturmak üzere 60 adet Bulb C tipi fareler dört eşit gruba ayrıldı [deney (n=15), sham (n=15), kontrol (n=15), ve sağlam deri (n=15)]. Sağlam deri grubuna hiçbir işlem uygulanmadı buna karşılık kontrol grubunda sadece yara oluşturuldu. Sham grubunda yara oluşturulduktan sonra sadece mesh transfer edilirken, deney grubunda kültür ortamında elde edilen keratinositler mesh üzerinde yaraya transfer edildi. Tüm grumlardan cerrahi müdahalenin 3., 5. ve 7. günlerinde doku örnekleri ışık ve elektron mikroskopik inceleme için alındı. Işık mikroskopik inceleme için alınan doku örnekleri % 10 formalin ile tespit edildi ve rutin parafin takip işleminden sonra alınan seri kesitlerin bir kısmı H-E ve Masson Trikrom ile diğer kesitler ise sitokeratin-8, sitokeratin-14, EGF, IL-8, FGF-1, FGF-2, MCP-1 ve kollajen-1 dağılımlarını belirlemek

için indirekt immunoperoksidaz yöntemi ile boyandı. Brd-U ile işaretlenmiş hücrelerin analizi için anti-Brd-U boyaması yapıldı. Elektron mikroskopik inceleme için alınan doku örnekleri gluteraldehit ve osmik asit ile tespit edilip epona gömülerek yarı ince ve ince kesitler alındı.

Kültür ortamında farklılaştırılan hücrelerin, erken ve geç dönem keratinosit farklılaşma belirteçleri olan sitokeratin-8 ve 14 immunoreaktivitelerinin pozitif olması ve ultrastrüktürel olarak benzer özellikleri taşıması, keratinosit benzeri hücreler olduklarını düşündürdü. Işık mikroskopik incelemede 3. günde deney grubunda yara bölgesinde keratinosit hücrelerinden oluşan epitelizasyon gözlenirken kontrol ve sham gruplarında yara yeri kenarlarında keratinosit hücrelerinin henüz proliferasyonunun başladığı ve epitelizasyonun olmadığı gözlemlendi. Üçüncü günden itibaren deney grubunda yara bölgesine Brd-U ile işaretlenerek transfer edilen hücrelerin çekirdeklerinin, anti-Brd-U boyaması ile pozitif olarak boyandığı gözlemlendi. İndirekt immunohistokimyasal incelemede, sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin, kontrol grubunda 3. ve 5. günde negatif, 7. günde pozitif; deney grubunda ise 3. ve 5. günde pozitif, 7. günde negatif olduğu tespit edildi. Sham grubunda, sitokeratin-8 immunoreaktivitesinin her üç günde de pozitif, sağlam deride ise her üç günde de negatif olduğu izlendi. Sitokeratin-14 immunoreaktivitesi sağlam deride 3., 5. ve 7. günde kuvvetli pozitif boyanırken, deney, kontrol ve sham gruplarında ise, 3. günde zayıf şiddette veya negatif olarak saptandı. Kontrol ve sham gruplarında 5. ve 7. günlerde sitokeratin-14 immunoreaktivitesi orta şiddette, deney grubunda ise şiddetli pozitif olarak gözlemlendi. EGF immunoreaktivitesi, sağlam deri grubunda her üç günde de negatif iken, deney, kontrol ve sham gruplarında 3. günde negatif, 5. ve 7. günlerde özellikle 7. günde deney grubunda daha fazla olmak üzere her üç grupta da pozitif boyandığı saptandı. IL-8 immunoreaktivitesi, sağlam deri grubunda her üç günde de negatif, deney ve kontrol grubunda 3. günde en fazla olmak üzere tüm günlerde pozitif olduğu, sham grubunda 3. ve 7. günde zayıf, 5. günde ise orta şiddette olduğu

izlendi. FGF-1 immunoreaktivitesinin tüm gruplarda ve 3., 5. ve 7. günlerde negatif olduğu gözlemlendi. FGF-2 immunoreaktivitesi, tüm gruplarda ve 3., 5. ve 7. günlerde pozitif olarak gözlenir iken, 5. günde FGF-2 immunoreaktivitesine sahip hücrelerin deney grubunda daha fazla olduğu saptandı. MCP-1 immunoreaktivitesinin sağlam deri grubunda her üç günde de bağ dokusu içerisinde zayıf şiddette olduğu gözlenir iken deney, kontrol ve sham gruplarında 3. ve 5. günde orta şiddette pozitif, 7. günde deney grubunda yine orta şiddette, kontrol ve sham grubunda ise giderek azalan şiddette olduğu saptandı. Kollajen-1 immunoreaktivitesinin sağlam deri grubunda dermiste pozitif olduğu ve günler arasında fark olmadığı gözlenir iken 3. günde deney grubunda negatif, kontrol ve sham grubunda zayıf şiddette ve 5. ve 7. günlerde giderek azaldığı, deney grubunda ise giderek arttığı izlendi. Örneklerin elektron mikroskopik incelenmesinde 3. günden itibaren deney grubunda epitelizasyonun başladığı ve keratinositlerin yara bölgesinde yer aldığı gözlemlendi.

Fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılan keratinositlerin, farede oluşturulan cerrahi yara bölgesine transferini takiben anti-Brd-U ile boyanmış olması varlıklarını devam ettirdiklerinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. Farklılaştırılan hücrelerin, yara bölgesinde yara iyileşmesinde rol oynayan moleküllerden kollajen-1, EGF ve sitokeratin-14 salınımının geç dönemde; sitokeratin-8, IL-8, FGF-2 ve MCP-1 salınımının ise erken dönemde artışına neden olduğu tespit edildi. Farklılaştırılan hücrelerin yara iyileşmesi evrelerini hızlandırdığı ve yara iyileşmesi üzerine olumlu etki yaptığı sonucuna varıldı.

VIII. SUMMARY

Utilization of the Keratinocytes from Epidermal Lineage Cells which Differentiated from Mouse Embryonic Stem Cells, on Primer Wound Healing

The skin plays a crucial role in protecting the body against the environment and integrity of the body's internal milieu. The treatments of burns and skin injuries with less damage using autologous or allogenic skin grafts constitute from adult or embryonic stem cells in tissue engineering are at the forefront. Pluripotent embryonic stem cells are able to proliferate in suitable condition without differentiation, in addition to this, the cells can differentiate when the culture condition is changed. The aim of this project is to investigate the effects of keratinocytes which differentiated from mouse embryonic stem cells after transferring on the surgical wound model of the mouse during wound healing and secreted molecules which after wound healing.

Keratinocyte like cells were obtained from embryoblasts which derived from embryonic stem cells on matrigel and culture media supplemented with BMP-4. Differentiated keratinocytes were fixed in 4% paraformaldehyde and distribution of cytokeratin-8 and cytokeratin-14 using with immunohistochemical technique, and the ultrastructural properties of the cells were analyzed after fixation with glutaraldehyde and osmic acid and embedded in an agar. The keratinocytes are labelled with Brd-U before transferring to the wound area. For creating experimental surgical wound model 60 Bulb C type mouse divided in 4 equal groups [experimental (n=15), control (n=15), sham (n=15) and healthy skin (n=15)]. In healthy skin group nothing is done however in control group only wound is made. In sham group, only mesh is transferred after the wound is made, while in experimental group, the mesh with keratinocytes which obtained from culture condition were transferred on to the wound area. From all groups, the

samples were collected after the surgical process on the 3th, 5th and 7th day for both light and electron microscopic analyses. For the light microscope analyze, samples were fixed in 10% formalin and sections were taken after routine paraffin process, and some of the sections were stained either H-E or Masson Trichrom, also the rest of the sections were stained with indirect immunoperoxidase technique in order to determine distributions of cytokeratin-8, cytokeratin-14, EGF, IL-8, FGF-1, FGF-2, MCP-1 and collagen-1. For analyzing Brd-U labelled cells, the sections were also stained with anti-Brd-U. For electron microscope analyze, samples were fixed in glutaraldehyde and osmic acid, were then embedded in epon and half thin and thin sections were taken.

The differentiated cells in culture condition were both positive for early and late term keratinocyte differentiation markers, cytokeratin-8 and cytokeratin-14 and similarity ultrastructurally with keratinocytes, were thought keratinocyte-like cells. In light microscopic analyze, on the 3th day in experimental group, on the wound area there was an epithelialization that consist of keratinocyte cells, while in control and sham groups near the wound area, only keratinocytes which were just started to proliferate were observed but there was no evidence about epithelialization. From the 3th day in experimental group in the wound area, Brd-U labelled transferred cells's nucleuses were stained positively with anti-Brd-U stain.

In indirect immunohistochemistry analyze, while cytokeratin-8 immunoreactivities were negative in control group on the 3th and 5th days, it was positive on the 7th day, in experimental group on the 3th and 5th days were positive, but on the 7th day it was negative. In the sham group, cytokeratin-8 immunoreactivities in all days were positive, while in healthy skin it was negative in all days. The cytokeratin-14 immunoreactivity in healthy skin on the 3th and 5th and 7th days stained strongly positive while in experimental, control and sham groups it was minimal or negative on the 3th day. In control and sham groups cytokeratin-14 immunoreactivity on the 5th

and 7th days was moderate but in experimental group it was strongly positive. EGF immunoreactivity in healthy skin group was negative in all days while it was negative on the 3th day and positive on the 5th and 7th days in experimental, control and sham groups, but, immunoreactivity was especially detectable on the 7th day of experimental group. IL-8 immunoreactivity was negative in healthy skin group in all days, in experimental and control group in all days immunoreactivities were positive but it was more on the 3th day than the other days, in sham group on the 3th and 7th days it was minimal, on the 5th day it was moderate. FGF-1 immunoreactivity in all groups on the 3th, 5th and 7th days was negative. FGF-2 immunoreactivities in all groups on the 3th, 5th and 7th days were positive while FGF-2 immunoreactivity positive cells were more on the 7th day of experimental group than others. MCP-1 immunoreactivity in healthy skin group in all days was minimal in connective tissue while in experimental, control and sham groups on the 3th and 5th days was moderate where as on the 7th day in experimental group it was moderate and in control and sham group it was less. Collagen-1 immunoreactivity in healthy skin group was positive in dermis and there was no difference between the days, however, it was negative on the 3th day in experimental group, in control and sham group it was minimal and the immunoreactivity was gradually decreased on the 5th and 7th days, while in experimental group it was gradually increased. Electron microscope analyze of samples, in experimental group beginning from the 3th day it was observed that epithelialization started and keratinocytes were on the wound area.

Keratinocytes which derived from mouse embryonic stem cells after transferring on the surgical wound area were evaluated healthy because of positively stained with anti-Brd-U. Differentiated cells were demonstrated increased secretion of molecules that collagen-1, EGF and cytokeratin-14 secretion in late term and the cytokeratin-8, IL-8, FGF-2 and MCP-1 secretion in early term during wound healing on wound area. In conclusion

differentiated cells are accelerate and influence positively to the wound healing stages.

IX. KAYNAKLAR

- 1- Pomahac B, Svensio T, Yao F, et al. Tissue engineering of skin. Crit Rev Oral Biol Med 1998; 9: 333- 44.
- 2- Horch RE, Kopp J, Kneser U, et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. J Cell Mol Med 2005; 9: 592-608.
- 3- Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. 2004
- 4- Sue O'Shea K. Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. Biol Reprod 2004; 71: 1755- 65.
- 5- Montoya FU, Verfaillie CM, Hu WS. Culture Systems for Pluripotent Stem Cells. J Of Bioscience and Bioengineering. 2005;100: 12- 27.
- 6- Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. J Anat 2002; 200: 277- 82.
- 7- Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 745-53.
- 8- Vats A, Tolley NS, Polak JM et al. Stem cells: sources and applications. Clin Otolaryngol 2002; 27: 227- 32.
- 9- <http://kogem.kocaeli.edu.tr/kokhucretipleri.jpg>
- 10- Gonsilius E, Gastl G, Petzer AL. Hematopoietic stem cells. Biomed Pharmacother 2001; 55: 186-94.
- 11- Szilvassy SJ. The Biology of Hematopoietic Stem Cells. Archives of Medical Research 2003; 34: 446- 60.
- 12- Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2004; 36: 607- 20.
- 13- Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells from the bone marrow stroma: basic biology and potential for cell therapy. Current Anaesthesia & Critical Care 2004; 15: 410- 17.

- 14- Haider HK, Ashraf M. Bone marrow cell transplantation in clinical perspective. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005; 38: 225-35.
- 15- Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Experimental Cell Research* 2005; 306: 330- 35.
- 16- <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter5.asp>
- 17- Smith OF, Thomson GB. Umbilical Cord Blood Collection, Banking, and Transplantation: Current Status and Issues Relevant to Perinatal Caregivers. *Birth* 2000; 27: 2.
- 18- Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2005; 10: 209- 20.
- 19- Short B, Brouard N, Scott TO. Mesenchymal Stem Cells. *Archives of Medical Research* 2003; 34: 565- 71.
- 20- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36: 568- 84.
- 21- Gadue P, Huber TL, Nostro MC, et al. Germ layer induction from embryonic stem cells. *Experimental Hematology* 2005; 33: 955- 64.
- 22- <http://eng.medi-post.co.kr/index.asp>
- 23- Bauer HC, Tempfer H, Bernroider G, et al. Neuronal stem cells in adults. *Experimental Gerontology* 2005;1- 6.
- 24- Matikainen T, Laine J. Placenta- an alternative source of stem cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 207: 544- 49.
- 25- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of Development* 2003; 120: 117- 30.

- 26- Fiegel HC, Lange C, Kneser U, et al. Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 577- 87.
- 27- Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. *JEADV* 2005; 19: 405- 13.
- 28- Şenel F. Kök Hücreler. *Bilim ve Teknik Dergisi* 2002; 1- 15.
- 29- Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2004; 37: 23- 34.
- 30- Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 2005; 132: 227- 33.
- 31- Loebel DAF, Watson CM, Young AD et al. Lineage choice and differentiation in Mouse embryos and embryonic stem cells. *Developmental Biology* 2003; 264: 1- 14.
- 32- Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology* 2002; 12: 432- 38.
- 33- Doss MX, Koehler CI, Gissel C, et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 465- 73.
- 34- Friel R, Van Der Sar S, Mee PJ. Embryonic stem cells: Understanding their history, cell biology and signalling. *Advanced Drug delivery Reviews* 2005; 57: 1894- 1903.
- 35- Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 324- 35.
- 36- 69.20.19.211/.../stemcell012907df.htm
- 37- <http://www.embryo.chronolab.com/integumentary.htm>
- 38- Sadler TW. *Langman' s Medikal Embriyoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2005: 417- 22.
- 39- Moore KL, Persaud TVN. *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2002: 514- 28.

- 40- <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.htm>
- 41- http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/lecture.f04/integument.f04/skinlayer.jpg
- 42- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 299- 319.
- 43- Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1998: 346- 58.
- 44- Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1995: 53- 58.
- 45- Yararbaş Ö, Aydede H. Yara İyileşmesi ve Yara Bakımı. Çelik Ö, ed; Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. İzmir: Asya Tıp Kitabevi, 2007: 1039- 48.
- 46- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. Nature 2008; 453: 314- 21.
- 47- Diegelmann RF, Evans MC. Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. Frontiers in Bioscience 2004; 9: 283- 89.
- 48- http://www.rndsystems.com/DAM_public/5187.gif
- 49- Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. Journal of Leukocyte Biology 2001; 69: 513- 21.
- 50- Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, et al. Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and Mig Are Sequentially and Differentially Expressed During Phase-Specific Infiltration of Leukocyte Subsets in Human Wound Healing. Am J Pathol 1998; 153: 1849- 60.
- 51- Biol. Cell 2006; 97: 173-83. www.biolcell.org
- 52- Moll R, Divo M, Langbein L. The Human Keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol 2008; 129: 705- 33.

- 53- Hong Gu L, Coulombe PA. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Current Opinion in cell Biology* 2007; 19: 13- 23.
- 54- De Pianto D, Coulombe PA. Intermediate filaments and tissue repair. *Experimental Cell Research* 2004; 301: 68- 76.
- 55- Tüzün Y, Tüzün B, Kotoğyan A. Normal Derinin Yapısı ve Gelişmesi. Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH, Baransü O, ed; *Dermatoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1994: 17- 28.
- 56- http://mubio.com/frameset2/antibodies/body_cytokeratins.htm
- 57- <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=MCP-1>
- 58- <http://en.wikipedia.org/wiki/CCL2>
- 59- Sivamani RK, Garcia MS, Isserof RR, Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 2849- 68.
- 60- <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=IL8>
- 61- http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_8
- 62- http://en.wikipedia.org/wiki/Fibroblast_growth_factor
- 63- Guo L, Degenstein L, Fuchs E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes and Development* 1996; 10: 165- 75.
- 64- <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=FGF>
- 65- Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface* 2006; 4: 413- 37.
- 66- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, et al. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Reviews* 1997; 18: 26- 45.
- 67- http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor
- 68- <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=EGF>

- 69- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 2008; 16: 585- 601.
- 70- Liska DAJ, Reed MJ, Sage EH, et al. Cell-specific Expression of α 1(I) Collagen-hGH Minigenes in Transgenic Mice. *The Journal of Cell Biology* 1994; 125: 695- 704.
- 71- <http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>
- 72- Scharffetter K, Kulozik M, Stolz W, et al. Localization of Collagen α ₁(1) Gene Expression During Wound Healing by In Situ Hybridization. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 405- 12.
- 73- <http://en.wikipedia.org/wiki/Bromodeoxyuridine> 15.07.2009
- 74- <http://www.wellesley.edu/Biology/Concepts/Html/brdu.html> 15.07.2009
- 75- Shi C, Zhu Y, Su Y, et al. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trends in Biotechnology* 2006; 24: 48- 52.
- 76- Heng BC, Cao T, Liu H, et al. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. *Experimental Dermatology* 2005; 14: 1- 16.
- 77- Coulombe PA. Towards a Molecular Definition of Keratinocyte Activation after Acute Injury to Stratified Epithelia. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 1997; 236: 231- 38.
- 78- Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature* 2007; 445: 834- 42.
- 79- Aberdam D. Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 203- 6.
- 80- Coraux C, Hilmi C, Rouleau M. Reconstituted Skin from Murine Embryonic Stem Cells. *Current Biology* 2003; 13: 849- 53.
- 81- Aberdam D, Gambora K, Medawar A, et al. Embryonic stem cells as a cellular model for neuroectodermal commitment and skin formation. *C R Biologies* 2007; 330: 479- 84.

- 82- Gambaro K, Aberdam E, Virolle T, et al. BMP-4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of Mouse embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Death and Differentiation* 2006; 13: 1075- 87.
- 83- Troy TC, Turksen K. Commitment of Embryonic Stem Cells to an Epidermal Cell Fate and Differentiation in Vitro. *Developmental Dynamics* 2005; 232: 293- 300.
- 84- Haase I, Knaup R, Wartenberg M, et al. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells into keratinocyte-like cells. *European Journal of Cell Biology* 2007; 86: 801- 5.
- 85- Kawasaki S, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity. *Neuron* 2000; 28: 31- 40
- 86- Inoue H, Oshima H, Matsuzaki KI, et al. Application for regenerative medicine of epithelial cell culture-vistas of cultured epithelium. *Congenital Anomalies* 2006; 46: 129- 34.
- 87- Horch RE, Bannasch H, Kopp J, et al. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplant* 1998; 7: 309-17.
- 88- Greenberg S, Margulis A, Garlick JA. In Vivo Transplantation of Engineered Human Skin. In: Turksen K, eds. *Epidermal Cells Methods and Protocols*, Humana Press, 2005: 423-37.
- 89- Coulombe PA. Wound Epithelialization: Accelerating the Pace of Discovery. *J Invest Dermatol* 2003; 37: 219- 30.
- 90- Bickenbach JR, Grinnell KL. Epidermal stem cells: interactions in developmental environments. *Differentiation* 2004; 72: 371- 80.
- 91- Bagutti C, Wobus AM, Fassler R, et al. Differentiation of Embryonal Stem Cells into Keratinocytes: Comparison of Wild- Type and β_1 Integrin- Deficient Cells. *Developmental Biology* 1996; 179: 184- 96.

- 92- Engin A. Yara İyleşmesi. Sayek İ, ed; Temel Cerrahi. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 320- 25.
- 93- Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. Trends in Cell Biology 2001; 11: 143- 46.
- 94- Michel G, Kemeny L, Peter RU, et al. Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. FEBS Lett 1992; 305: 241- 3.
- 95- Tuschil A, Lam C, Haslberger A, et al. Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. J Invest Dermatol 1992; 99: 294- 8.
- 96- Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, et al. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. J Surg Res 2000; 93: 41- 54.
- 97- Wu L, Pierce GF, Galiano RD, et al. Keratinocyte growth factor induces granulation tissue in ischemic dermal wounds. Importance of epithelial-mesenchymal cell interactions. Arch Surg 1996; 131: 660- 6.
- 98- Ceccarelli S, Cardinali G, Aspite N, et al. Cortactin involvement in the keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 promotion of migration and cortical actin assembly in human keratinocytes. Exp Cell Res 2007; 313: 1758- 77.
- 99- Werner S, Peters KG, Longaker MT, et al. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 6896- 900.
- 100- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem 1996; 271: 15292- 7.
- 101- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Endocr Relat Cancer 2000; 7: 165- 97.

- 102- Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 457- 62.
- 103- DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, et al. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol* 1995; 146: 868- 75.
- 104- Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, et al. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 245- 53.
- 105- Low QE, Drugea IA, Duffner LA, et al. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 457- 63.