

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

**KORDON KANI KÖK HÜCRELERİNİN DİYABETİK AYAK  
YARALARINDA İYİLEŞMEYİ SAĞLAYAN FAKTÖRLER ÜZERİNE  
ETKİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE GÖSTERİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. NAZLI ÇİL**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. E. OĞUZHAN OĞUZ**

**DENİZLİ - 2014**

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

**KORDON KANI KÖK HÜCRELERİNİN DİYABETİK AYAK  
YARALARINDA İYİLEŞMEYİ SAĞLAYAN FAKTÖRLER ÜZERİNE  
ETKİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE GÖSTERİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. NAZLI ÇİL**

**DANIŞMAN**


**DOÇ. DR. E. OĞUZHAN OĞUZ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 17.05.2012 tarih ve 2012TPF022 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ – 2014**

Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ danışmanlığında Dr. Nazlı ÇİL tarafından yapılan “Kordon kanı kök hücrelerinin diyabetik ayak yaralarında iyileşmeyi sağlayan faktörler üzerine etkisinin immünohistokimyasal yöntemle gösterilmesi” başlıklı tez çalışması gün: 31./ay: 10./yıl: 2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. Gülcin Abban Mete 

ÜYE Prof. Dr. Birkan Jahan 

ÜYE Doç. Dr. E. Oğuzhan Oğuz 

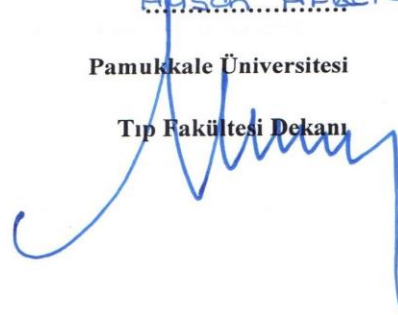
Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.  
gün: 10./ay: 12./yıl: 2014

Prof. Dr.

Hasan HEKEM

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı



## TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık tezim yapım aşamasında her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini esirgemeyen; tezin her aşamasında, bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Emin Oğuzhan OĞUZ ve yardımcı danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye emekleri için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin yürütülmesi esnasında, tüm laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan ve laboratuvar çalışmalarımda önerileri ile bana yol gösteren Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Recep KUTLUBAY'a, Sayın Prof. Dr. Kenan Çoyan'a, Sayın Prof. Dr. A. Çevik TUFAN'a, Sayın Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a, Sayın Doç. Dr. Nazan KESKİN'e, tezin deneysel aşamalarında gerekli olan materyalleri sağlamasında bana yardımcı olan Denizli Devlet Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı doktorlarına ve hemşirelerine, tezin deney düzeneğinin kurulmasında yardımcı olan Deneysel Araştırma Birimi Sorumlusu Veteriner Hekim Sayın Barbaros ŞAHİN'e, tezin histolojik preparasyon aşamalarında tecrübeleriyle bana destek olan Teknisyen Sayın Erdiç KARATAŞ'a ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve tezin yapılmasında emeği geçen bütün asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren babam İsmail TURGUT ve annem Huriye TURGUT'a, bu süreçteki destek ve sabırlarını benden esirgemeyen eşim Ümit Kamil ÇİL, çocuklarım Meva Aysel ve Muhammed Turgut'a ve tüm aileme sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	IX
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	X
<b>ÖZET</b> .....	XI
<b>ABSTRACT</b> .....	XIII
<b>GİRİŞ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>GÖBEK KORDONU (UMBLİKAL KORD)</b> .....	3
Göbek Kordonu Embriyolojisi .....	3
Göbek Kordonunun Histolojisi.....	5
<b>KÖK HÜCRELER</b> .....	6
Kök Hücre .....	6
Kök Hücrelerinin Genel Özellikleri.....	7
Kök Hücre Çeşitleri –Kaynakları.....	9
<b>DİYABETES MELLİTUS</b> .....	14
Tanım .....	14
Diyabetes Mellitus Epidemiyolojisi.....	14
Diyabetes Mellitus Sınıflaması.....	14
Diyabetes Mellitus Etiyopatogenezi .....	14
Diyabetes Mellitus Kliniği ve Tanı Kriterleri.....	15
Diyabetes Mellitus Komplikasyonları .....	16
Diyabetik Ayak.....	16
<b>DERİ HİSTOLOJİSİ</b> .....	18
Epidermis.....	18
Dermis.....	19

<b>YARA İYİLEŞMESİ</b> .....	20
Yara İyileşmesi Tipleri .....	20
Yara İyileşmesi Evreleri.....	23
Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler .....	29
Yara İyileşmesindeki Büyüme Faktörleri ve Sitokinler .....	30
Diyabetin Yara İyileşmesine Etkileri.....	33
<b>APOPTOZİS VE YÜKSEK GLİKOZUN YOL AÇTIĞI HÜCRE HASARIYLA İLİŞKİSİ</b> .....	35
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	40
<b>DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE DENEYİN YAPILIŞI</b> ...	40
Sıçanlarda Streptozosinle Deneysel Diyabetin Oluşturulması .....	40
Umbilikal Kordon Kanından CD34+ Hücre Eldesi .....	41
Kesitlerin Alınması ve Hazırlanması .....	42
Fiksatif Solüsyonunu Hazırlama .....	43
Doku Takip Yöntemi .....	43
İmmünohistokimyasal Boyama .....	43
TUNEL Boyama.....	45
<b>İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER</b> .....	46
<b>BULGULAR</b> .....	47
<b>SIÇANLARIN DİYABET BULGULARI</b> .....	47
<b>İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE TUNEL BOYAMA SONUÇLARI</b> .....	50
<b>TARTIŞMA</b> .....	69
<b>SONUÇ</b> .....	81
<b>KAYNAKLAR</b> .....	82

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>apaf 1</b>	Apopitoz proteaz aktive edici faktör 1
<b>ASK1</b>	Apopitotik sinyal düzenleyici kinaz-1
<b>kaspaz</b>	Sistein aspartat spesifik proteaz
<b>CD</b>	Farklanma Kümeleri=Clusters of Differentiation
<b>CTL</b>	Sitotoksik T lenfositleri
<b>D grubu</b>	Diyabet oluşturulan grup
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DISC</b>	Ölümün indüklediği sinyal kompleksi
<b>ECM</b>	Ekstrasellüler matriks
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>EKH</b>	Embriyonik kök hücreler
<b>FAD</b>	Fas adapter protein with a death domain
<b>FGF</b>	Fibroblast büyüme faktörü
<b>GAG</b>	Glikozaminoglikanlar
<b>GCSF</b>	Granülosit stimule edici faktör
<b>HKH</b>	Hematopoetik kök hücre
<b>HLA</b>	İnsan lökosit antijeni
<b>IDF</b>	Uluslararası Diyabet Federasyonu
<b>IGT</b>	Bozulmuş glikoz toleransı
<b>IL-1</b>	İnterlökin 1
<b>İp</b>	İntraperitoneal

<b>K grubu</b>	Kontrol grubu
<b>KGD</b>	Kan glikoz düzeyleri
<b>KH grubu</b>	Diyabet oluşturulup kök hücre verilen grup
<b>MAPK</b>	Mitojen aktive edici protein kinaz
<b>MKH</b>	Mezenşimal kök hücre
<b>MMPs</b>	Matriks metalloproteinazları
<b>OGTT</b>	Oral glikoz tolerans testi
<b>PAF</b>	Trombositte aktive büyüme faktörü
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PDGF</b>	Trombositte derive büyüme faktörü
<b>STZ</b>	Streptozosin
<b>TGFalfa</b>	Transforme edici büyüme faktörü alfa
<b>TGF-β</b>	Transforme edici büyüme faktörü beta
<b>TNF</b>	Tümör nekroz faktörü
<b>TNFR</b>	Tümör nekroz faktör reseptörü
<b>TRADD</b>	TNF Reseptör tip-1 ilişkili ölüm alanı proteini
<b>TUNEL</b>	Terminal deoksinükleotidil-transferaz aracılı dUTP nick-and labelling
<b>TÜİK</b>	Türkiye İstatistik Kurumu
<b>TxA2</b>	Tromboksan A2
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörü
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Teşkilatı



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1: Göbek kordonu embriyolojisi.....	4
Şekil 2: Göbek kordonun histolojisi .....	5
Şekil 3: Kök hücre kaynakları (12).....	10
Şekil 4: Primer ve sekonder yara iyileşmesi (29). .....	22
Şekil 5: Normal yara iyileşmesi (30). .....	25
Şekil 6: K, KH, D gruplarının başlangıç ağırlıklarının (0. Gün) ve son ağırlıklarının (14. Gün) ortalamalarının grafiği .....	48
Şekil 7: K, KH ve D gruplarının 0. Gün, diyabet oluşturulmasından sonraki 3. Gün ve 10. Günlerde ölçülen KGD ortalamalarının grafiği.....	49
Şekil 8: K, D ve KH gruplarında Kaspaz 3 dağılımı ve yerleşimi.....	51
Şekil 9: K, D ve KH gruplarında FGF dağılımı ve yerleşimi.....	53
Şekil 10: K, D ve KH gruplarında IL-1 dağılımı ve yerleşimi. ....	56
Şekil 11: K, D ve KH gruplarında TGF- $\beta$ dağılımı ve yerleşimi. ....	58
Şekil 12: K, D ve KH gruplarında TNF- $\alpha$ dağılımı ve yerleşimi. ....	60
Şekil 13: K, D ve KH deneklerin deri dokusunda PDGF yerleşimi ve ekspresyonu	62
Şekil 14: K, D ve KH gruplarında VEGF dağılımı ve yerleşimi. ....	64
Şekil 15: K, D ve KH gruplarında Hematoksilen Eozin boyama. ....	66
Şekil 16: TUNEL yöntemi uygulanmış K , D ve KH gruplarında TUNEL + hücreler .....	68

## TABLÖLAR DİZİNİ

### Sayfa No

<b>Tablo 1:</b> Akut ve kronik yarada, yara iyileşmesini etkileyen büyüme faktörleri ve sitokinler (31).....	32
<b>Tablo 2:</b> Deneyde kullanılan sıçanların ağırlıkları ve kan glikoz değerleri .....	47
<b>Tablo 3:</b> K , D ve KH deneklerin deri dokusunda Kaspaz-3 yerleşimi ve ekspresyonu .....	52
<b>Tablo 4:</b> K , D ve KH deneklerin deri dokusunda FGF yerleşimi ve ekspresyonu..	54
<b>Tablo 5:</b> K, D ve KH deneklerin deri dokusunda IL-1 yerleşimi ve ekspresyonu ....	55
<b>Tablo 6:</b> K, D ve KH deneklerin deri dokusunda TGF- $\beta$ yerleşimi ve ekspresyonu	57
<b>Tablo 7:</b> K, D ve KH deneklerin deri dokusunda TNF- $\alpha$ yerleşimi ve ekspresyonu	59
<b>Tablo 8:</b> K, D ve KH deneklerin deri dokusunda PDGF yerleşimi ve ekspresyonu.	61
<b>Tablo 9:</b> K, D ve KH deneklerin deri dokusunda VEGF yerleşimi ve ekspresyonu.	63
<b>Tablo 10:</b> TUNEL boyama yapılan K, D ve KH gruplarının apoptotik indeks değerlerinin karşılaştırılması.....	67
<b>Tablo 11:</b> Diyabetik yara iyileşmesinde sitokinler ve büyüme faktörlerinin salınımındaki değişiklikler .....	77

## ÖZET

### **Kordon kanı kök hücrelerinin diyabetik ayak yaralarında iyileşmeyi sağlayan faktörler üzerine etkisinin immünohistokimyasal yöntemle gösterilmesi**

Dr. Nazlı ÇİL

Diyabetik ayak tedavisinde kemik iliğinden, periferik kandan ve kordon kanından elde edilen kök/progenitör hücrelerin kullanılması gün geçtikçe daha yaygın hale gelmektedir. Kök/Progenitör hücreler anjiogenik faktörleri salgılatarak neovaskülarizasyona yardım ederler. Aynı zamanda bu hücreler iskemik durumlarda, diyabetik ayak ülserasyonunu da içeren bazı patolojik durumlarda hücre çoğalması ve hücre göçünü uyararak epitelizasyonu sağlarlar. Biz çalışmamızda kordon kanından elde ettiğimiz CD 34(+) kök hücrelerini diyabetik yara oluşturduğumuz sıçanlara vererek yara iyileşmesindeki rollerini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda Wistar-Albino cinsi, sağlıklı, 18 adet erkek sıçan kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 230 gr (200–250 gr), rasgele seçilerek üç gruba ayrıldı. 1. grup kontrol (K grubu; n: 6), 2. grup diyabet oluşturulan grup (D grubu; n: 6), 3. grup ise diyabet oluşturulduktan sonra kordon kanı kök/progenitör hücre verilen grup (KH grubu; n:6 ) olarak 3 eşit gruba ayrıldı. Tüm sıçanların başlangıç ağırlıkları ve kan glikoz düzeyleri ölçüldü. D grubu ve KH grubundaki her bir sıçan deneysel diyabet oluşturmak için streptozosin 50-60 mg/kg tek doz intraperitoneal olarak uygulandı. Streptozosin uygulamasından sonraki 3. gün sıçanlarda kan glikoz düzeyleri'ni 250 mg/dl nin üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi. Tüm sıçanların sağ ön ayaklarına steril punch biyopsi kullanılarak 5 mm çapında yara yeri oluşturuldu. KH grubuna  $0,5 \times 10^6$  kordon kanı kökenli CD 34 (+) hematopoetik kök hücre lokal olarak yara yerine uygulandı. Yara oluşumundan sonra sıçanların 10. günde ağırlıkları ve kan glikoz düzeyleri tekrar ölçüldü. Sıçanlar genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildiler. Yara bölgesinden deri dokuları alınıp formaldehitte tespit edildi. Işık mikroskop takip yöntemi uygulanarak parafine gömülen bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere daha sonra Terminal deoksinükleotidil-transferaz aracılı dUTP nick-and labelling (TUNEL) yöntemi, TGF-β ,PDGF, VEGF , FGF, IL-1 ,TNF-α ve kaspaz 3 aktivasyonlarını belirlemek için immünohistokimyasal yöntem uygulandı.

Diyabetik sıçan modelinde ayak ülseri tedavisinde kullandığımız kordon kanı CD34(+) kök hücreleri yaralarda belirgin iyileşme sağlamıştır. Işık mikroskopik bulgularımız KH uygulanan deneklerde ayak yaralarında yeni oluşan derinin diyabet grubuyla karşılaştırıldığında çok daha normal yapıda olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda VEGF, PDGF, IL-1, FGF, TGF $\beta$  TUNEL, kaspaz 3 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonları açısından diyabet ve kök hücre uygulanan gruplar arasında farklılık vardı. VEGF, PDGF ve TGF $\beta$ 'nin kök hücre uygulanma gruplarda fazla olması yara iyileşmesinde bu faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir.

TNF- $\alpha$  sonuçlarımız bizim için oldukça anlamlıydı. Apoptozisin önlenmesinde FGF uyarımının etkin olduğu düşünülmektedir. FGF'nin TNF- $\alpha$  yı inhibe ederek apoptozisi engellemesi yara iyileşmesinde önemli bir süreçtir. Kök hücre uygulamalarının FGF ekspresyonun artırmasının diyabetik yara iyileşmesinde yeni tedavi yaklaşımlarında anahtar molekül olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** CD 34, diyabetik ayak, yara iyileşmesi, apoptozis

## ABSTRACT

### **The Indication of the Influence of Cordon Blood Stem Cells on the Factors that Provide Healing on Diabetic Foot Scars Using Immunohistochemical Method**

Dr. Nazlı ÇİL

It gets commoner each day to use stem/progenitor cells procured from bone marrow, peripheral blood and cordon blood in diabetic foot treatment. The stem/progenitor cells help neovascularization by having angiogenic factors excreted. At the same time, these cells provide epithelisation by stimulating cell multiplication and cell migration in certain pathological situations that also includes diabetic foot ulceration in ischemic conditions. Stem/progenitor cells help the restoration of the scarred area. In this study, we aimed to examine the role of the CD 34(+) stem cells acquired from cordon blood in healing the scars by applying it on rats.

In our study, 18 healthy male rats of Wistar-Albino kind were used. Their average weight was 230 gr (200-250 gr) and they were randomly divided into three groups. The first group was the control group (Group K; n: 6), the second group was a group consisting of diabetics (Group D; n: 6) and the third group was the group which was given cordon blood stem/progenitor after the creation of diabetic (Group KH; n: 6 ). The weights and glucose levels of all the rats were measured at the beginning. Each rat in group D and group KH was given a single dose of 50-60 mg/kg streptozosin intraperitoneally. On the third day after the streptozosin application, the rats with over 250 mg/dl glucose level were regarded as diabetics. Scarred areas of 5 mm in diameter were generated on the feet of all the rats by the application of sterile punch biopsy. CD 34(+) rooted in  $0,5 \times 10^6$  cordon blood was applied locally on the scarred area in group KH. On the tenth day after the generation of the scar, the weights and blood glucose levels of the rats were measured. The rats were sacrificed by decapitation under general anaesthesia. By the use of light microscopy monitoring method, tissues in 5  $\mu$ m thickness were taken from the paraffin-embedded blocks. The tissues were later applied with terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick-and labelling (TUNEL) and TGF- $\beta$  ,PDGF, VEGF , FGF, IL-1 ,TNF- $\alpha$  methods; and were also applied immunohistochemical method in order to determine their caspase 3 activations.

In the treatment of foot ulcer in diabetic rat model, the use of cordon blood CD 34(+) stem cells provided a significant healing. Our light microscopic findings showed that the newly formed skin in the foot scars in KH applied subjects were found to be a lot more normal compared to diabetic group.

In our study, there were differences between diabetic and stem cell applied groups in terms of their VEGF, PDGF, IL-1, FGF, TGF $\beta$ , TUNEL, caspase3 and TNF- $\alpha$  expressions. The higher amount of VEGF, PDGF and TGF $\beta$  in stem cell applied groups indicates that these factors are influential in scar healing.

The TNF- $\alpha$  results were rather significant for us. It is thought that the FGF stimulation has an active role in apoptosis prevention. FGF's prevention of apoptosis by inhibiting TNF- $\alpha$  is an important process in the healing process of the scars. We assume that the increase of FGF expressions by the application of stem cells will be a key molecule in new treatment approaches to diabetic scar healings.

**Keywords:** CD 34, diabetic foot, wound healing, apoptosis

## GİRİŞ

Gebelik boyunca anneyle bebek arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonu içerisinde erişkin kanında gördüğümüz eritrosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücreleri vardır. Bunlara ilaveten erişkin kanından daha yüksek oranda kök hücreler bulunur. Kordon kanı kök/progenitör hücreleri, kemik iliği ve periferik kandaki kök/progenitör hücrelerle karşılaştırıldığında daha uzun telomere, daha yüksek çoğalma kapasitesine sahiptir. İmmün yapılanma yönünden henüz timus eğitimini tamamlamamış olması, başka bir insanda daha kolay uyum göstermesine olanak sağlar. Bu nitelikleri nedeniyle diğer kök hücrelere göre daha avantajlıdır ve bu nedenle bir çok alanda tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar (1).

Diabetes mellitus (DM) karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemik bir hastalıktır. Ayak ülserleri diyabetli bireylerde yaşam kalitesini ve süresini etkileyen ve diyabete bağlı gelişen önemli morbidite ve mortalite nedeni olup hastaların en sık hastaneye yatış nedenlerinden biridir (2).

Yara iyileşmesi kompleks bir süreçtir ve bu süreç diyabetli hastalarda oldukça ağır ve zor geçer. Genel olarak yara iyileşmesinin üç evresi vardır. a) İnflamatuar Evre b. Proliferatif Evre (Fibroblastik Evre) c. Maturasyon Evresi ( Remodeling Evresi) (3).

İnflamatuar evre yaralanma anında başlayıp, 24-48 saat içinde sonlanır. Yara iyileşmesinin başlangıç basamağı olan akut inflamasyon, hemostazın sağlanması, immün sistem komponentlerinin göçü, mekanik, bakteriyel ve kimyasal etkilere karşı cevabın oluşmasını sağlar. Bu dönemin en önemli elemanı, kan damarlarıdır (3).

Yaralanmayı takiben nötrofil ve lenfositlerden sonra bölgeye gelen hücreler makrofajlardır. Makrofajların yara iyileşmesinde görevi, fibroblastik çoğalma ve farklanma yanında anjiogenez ve kollajen sentezini uyaran mitojen maddeleri serbestleştirmeleridir. Makrofajların önceden sadece fagositik fonksiyonları olduğu

düşünülürken bugün yara iyileşmesinde oldukça önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu role sahip olmasının en önemli nedeni salgıladığı büyüme faktörleridir. Aktif makrofajlardan salınan büyüme faktörleri: TGF- $\beta$  - Transforming growth faktör beta, PDGF - Platelet derived growth faktör, IL-1 - İnterlökin 1, PAF Platelet activated growth faktör, TGFalfa - Transforming growth faktör alfa, TNF - Tümör nekroz faktörü, FGF - Fibroblast growth faktör, EGF - Epidermal growth faktördür (3,4).

Diyabetik ayak tedavisinde kemik iliğinden, periferik kandan ve kordon kanından elde edilen kök/progenitor hücrelerin kullanılması gün geçtikçe daha yaygın hale gelmektedir (5).

Kök/Progenitor hücreler anjiogenik faktörleri salgılatarak neovaskularizasyona yardım ederler. Aynı zamanda bu hücreler iskemik durumlarda, diyabetik ayak ülserasyonunu da içeren bazı patolojik durumlarda hücre çoğalması ve hücre göçünü uyarak epitelizasyonu sağlarlar. Kök/progenitor hücreler yaralı alanın tamirine aracılık ederler (6).

Biz bu çalışmada kordon kanından elde edeceğimiz CD 34(+) kök hücrelerini diyabetik yara oluşturduğumuz sıçanlara vererek yara iyileşmesini incelemeyi amaçladık. Bu süreçte etkili olan büyüme faktörlerinden TGF- $\beta$  ve PDGF, anjiogenezisle ilgili olarak vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve FGF, sitokinlerden de IL-1 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak inceledik. Bu çalışmada ayrıca kordon kanı kök hücrelerinin apoptotik sürece olan etkisini araştırmayı amaçladık. Literatür taramasında kök hücrelerin yara iyileşmesi sırasında apoptotik sürece olan etkileriyle ilgili çalışmaya rastlanılamamıştır. Bunun için TUNEL yöntemi uyguladık ve apoptotik yolda ölüm molekülü olan Caspas 3 aktivasyonunu immunohistokimyasal olarak inceledik.



## GENEL BİLGİLER

### GÖBEK KORDONU (UMBLİKAL KORD)

Göbek kordonu fetus ve plasenta arasındaki yaşam kanalıdır. Umblikal kord 5. haftada gelişmeye başlar ve tüm gebelik boyunca fetus ve plasenta arasındaki damarları korur (7). Umblikal kord genellikle 1-2 cm çapında ve 30-90 cm (ortalama 55 cm) uzunluğundadır (8).

### Göbek Kordonu Embriyolojisi

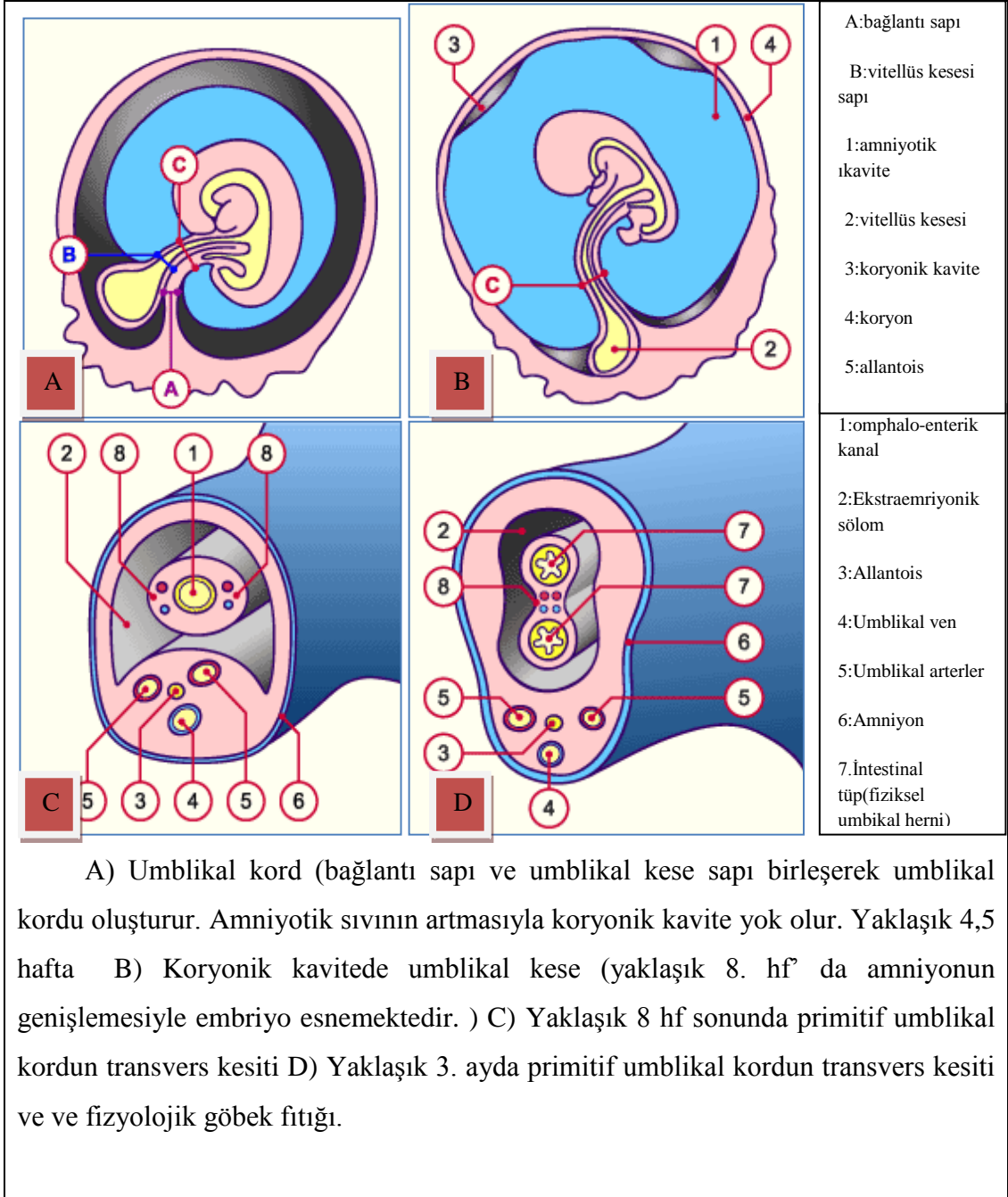
Amniyon ve embriyonik ektoderm birbiriyle ilkel göbek halkası (primitif umblikal ring) adı verilen oval biçimli bir çizgide birleşirler (amniyoektodermal birleşim çizgisi). Gelişimin 5. Haftası bu halkadan şu yapılar geçer (şekil 1A). :1) allantois ve iki arter, bir venden oluşan umblikal damarları içeren bağlantı sapı. 2) vitellin kanal ve vitellin damarlar. 3) İntraembriyonik ve ekstraembriyonik kölom boşluklarını birleştiren kanal (şekil 1C).

Vitellüs kesesi amniyon ve koryon plağıyla sınırlanmış olan koryon boşluğu içinde bulunur (şekil 1B).

Gelişimin ilerlemesiyle, amniyon boşluğu koryon boşluğundan daha da hızlı büyüyerek, koryon boşluğunda daralmaya yol açar. Bunun sonucunda amniyon bağlantı sapıyla vitellüs kesesi sapını dıştan sararak, primitif göbek kordonunun oluşmasını sağlar (şekil 1B). Distalde kordonun içinde vitellüs kesesinin sapıyla umblikal damarlar ve daha proksimalde bunların yanı sıra barsak kıvrımlarıyla allantoisin kalıntıları bulunur (şekil 1C). Koryon boşluğu içinde bulunan vitellüs kesesi de göbek kordonuna bir sapla bağlıdır. Üçüncü ayın sonunda amniyon iyice genişleyerek koryon ile sırt sırta gelir. Koryon boşluğu kaybolur (şekil 1D). Vitellüs kesesi daha sonra büzüşür ve zamanla tıkanır.

Bu dönemdeki abdominal kavite geçici bir süre hızla büyüyen barsak halkalarının sığamayacağı kadar küçüktür ve bu nedenle barsakların bir kısmı göbek kordonu içindeki ekstraembriyonik sölom boşluğuna itilir. Barsak halkalarının bu şekilde dışarı sarkmasına fizyolojik göbek fitiği denir (şekil 1D). Üçüncü ayın sonuna doğru barsak halkaları tekrar karın boşluğuna dönerler ve göbek kordonu

içindeki sölom boşluğu yok olur. Allantois, vitellin kanal ve damarlarının yok olmasıyla göbek kordonu içinde sadece wharton's jelyyle kaplı umblikal damarlar kalır (9).



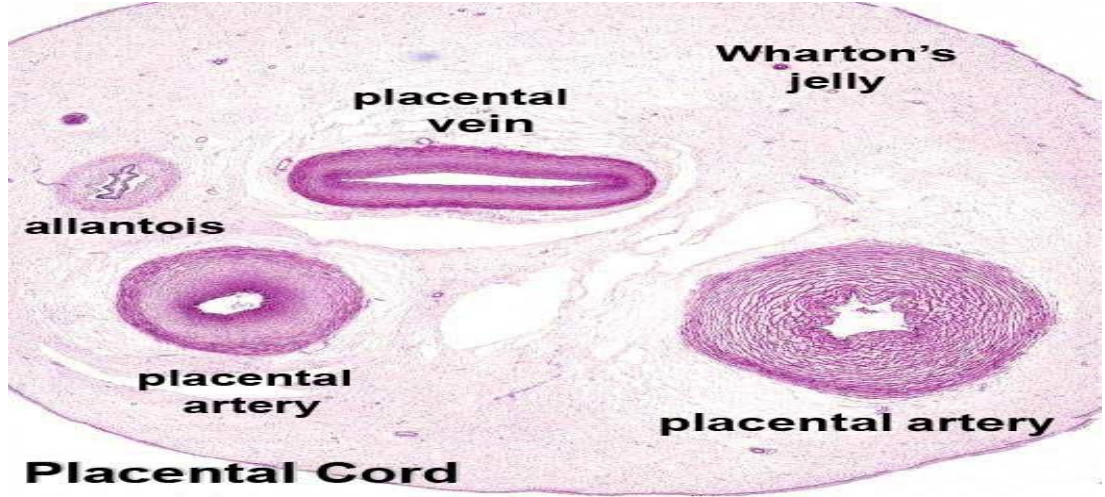
**Şekil 1:** Göbek kordonu embriyolojisi

(<http://www.embryology.ch/anglais/fplacenta/cordon01.html>

The umbilical cord, development of the umbilical cord. Erişim tarihi:25.03.2013)

## Göbek Kordonunun Histolojisi

Göbek kordonu etrafı amniyon zarı epiteliyle sarılı iki arter, bir venden oluşur. İki umblikal arter deoksijene kanı plasentaya; bir umblikal ven oksijene kanı plasentadan embriyoya taşır. Umblikal damarlar embriyonik allantoisten gelişen Wharton jeli adı verilen müköz bağ dokusuyla çevrilidir (10). Bu umblikal kord maddesini ilk tanımlayan kişi İngiliz hekim ve anatomist Thomas Wharton'dur (1614-1673) (11). Wharton jeli proteoglikan, kollajen lifler ve myofibroblast benzeri stromal hücrelerden meydana gelen jelatinimsi bir bağ dokusudur (10). Umblikal damarların çevresinde koruyucu bir kat oluşturur. Doğum sırasında plasental dolaşımın kesilmesiyle umblikal arter duvarı muskuler olduğunda ve çok sayıda elastik lif içerdiğinden, göbek kordonu bağlandıktan sonra bu arterler hızla daralır ve kapanırlar (9). Damar duvarında düz kas kontraksiyonu ve Wharton jeli'nin etrafında genişleme olur (11). Plasental kan damarlarının kapatılmasına yardımcı olmak için Wharton jelinin hacmi artar (miksömatöz). Wharton jelindeki matriks hücreleri son zamanlarda kök hücreler için potansiyel bir kaynak olduğu tespit edilmiştir (11). Şekil 2'de göbek kordonunun histolojik kesiti görülmektedir. Bu kesit fetuse yakın kısımdan alındığı için allantois görülmektedir.



Şekil 2: Göbek kordonun histolojisi

<http://embryology.med.unsw.edu.au/notes/placenta5.htm#PlacentalMembranes>

Erişim Tarihi: 26 Mart 2013 (11)

## KÖK HÜCRELER

### Kök Hücre

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücrelere “kök hücre” denir (12).

Kök hücreler vücuttaki diğer hücrelerden farklıdır. Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlamak için beş ölçüt tanımlanmıştır:

- 1) Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptirler.
- 2) Kök hücreler özelleşmemişlerdir.
- 3) Kök hücrelerden elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.
- 4) Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilmelidir.
- 5) Kök hücreler in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilmelidir (13).

Hücrelerin bölünme kapasitesini, ömrünü belirleyen faktörlerden biri doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve ‘telomer’ denilen DNA zincirleridir. Telomerler doğrusal kromozomların uçlarıdır ve kısa DNA tekrar dizileri (insanda TTAGGG) içerirler. Telomerler kromozom uçlarının parçalanmasını ve dağılmasını ya da diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar. Telomerler mayozda ve kromozomların çekirdek içinde organize olmasında rol alır. Telomerik DNA, her bir çoğalma döngüsünde ve oksidatif DNA hasarlanması gibi nedenlerle kaybolur. Her replikasyon sonrası kromozom kısalır. Bu kaybı karşılamak için telomerler bünyesinde human telomeraz revers transkriptaz ve telomeraz RNA taslağını taşıyan bir ribonükleoprotein olan telomeraz enzimi tarafından uzatılır (13). Kök hücrelerin sınırsız bölünme yetenekleri telomeraz enzim aktivitesi sonucu oluşmaktadır. Bu enzim telomerlerin kısalmasını engellemektedir. Bir hücrede telomeraz ne kadar aktifse telomerler o kadar uzun, hücrenin bölünme kapasitesi de o kadar fazla olur. Kök hücrelerin çok aktif telomeraz enzim aktivitesi ve buna bağlı uzun telomer zinciri vardır. Bu nedenle kök hücreler sınırsız bölünme

yetenekleriyle kendilerini kopyalarlar. İnsan germ,tümör,embriyonik ve erişkin kök hücre serilerinde yüksek telomeraz enzim aktivitesi bulunmuştur (12). Kök hücreler, totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 grup altında tanımlanmaktadır.

**1) Totipotent Kök Hücre:** Fertilizasyon ile spermium ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonik hücredir. Bu hücreye her şeyi yapabilen anlamında “*totipotent hücre*” denir. Embriyonun 5. gününe kadar olan tüm blastomerler totipotenttir (12). Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadarki tüm blastomerler totipotenttir (13). Tam ve işlev gören bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabilir. Plasenta ve amniyon kesesi gibi embriyo dışı dokulara da farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Totipotent hüceler gelişmenin ileri evrelerinde pluripotent hücelere dönüşebilirler (12).

**2) Pluripotent Kök Hücre:** Fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon döneminde 5. günde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücelerdir. Blastosist; trofoblastik hüceler, blastosöl ve iç hücre kitlesi olmak üzere 3 yapıdan oluşmuştur (12). Embriyonik kök hücelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hüceler *pluripotent kök hüceler* olup, gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 270 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptirler. Ancak kendilerinden yeni bir birey oluşmaz (13).

**3) Multipotent kök hücre:** Bu hüceler, embriyonik gelişmenin daha ileri evresine ait hüceler olup, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler ve erişkin kök hücelerine dönüşürler. Erişkin kök hüceleri de, buldukları dokunun hücre tipini üretirler. Multipotent hüceler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar (12).

## **Kök Hücelerinin Genel Özellikleri**

### ***Farklanma (plastisite)***

Farklanma ayrışmamış bir hücrenin (örn; bir kök hücrenin) vücuttaki spesifik bir hücreye dönüşme işlemine verilen addır (14). Sitokinlerin, büyüme ve farklanma faktörlerinin, hücre dışı matris proteinlerinin ve hücelerarası iletişimin kombine etkisiyle oluşan karmaşık olaylar dizinidir (15). Hücre farklılaşmasını tetikleyen

hücre içi ve hücre dışı sinyaller yeni yeni ortaya çıkmaya başlamıştır. İç sinyaller hücredeki genler aracılığıyla kontrol edilir. Dış sinyaller ise diğer hücrelerden salınan kimyasal maddeler, komşu hücrelerle fiziksel temas ve mikroçevredeki bazı moleküllerdir. Yapılan çalışmalarda hematopoetik kök hücrelerde, mezenkimal kök hücrelerde ve nöral kök hücrelerinde plastisite özelliği gösterilmiştir. Sinir hücresine dönüşen kan hücreleri, insülin üreten karaciğer hücreleri ve kalp hücrelerine dönüşebilen hematopoetik kök hücreleri plastisiteye örnek olarak verilebilir (13).

### ***Kendini yenilenme, Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Nişi***

Kök hücreler organizmanın yaşamı boyunca kendi kopyasını alacak şekilde çoğalırlar. Gerekliğinde organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilirler. Embriyonik gelişim sürecinde, yetişkin insan hücrelerinin ve dokularının uzun süreli korunması ve onarımında, kök hücreler ile farklılanmakta olan hücreler arasındaki denge çok önemlidir (15).

Kök hücreleri öncü hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri, bölünmeler sırasında kök hücreler bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken diğer bir yandan da kendini yedeklemesidir. Bu olay asimetrik hücre bölünmesi sonucu oluşur ve kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar. Asimetrik hücre bölünmesinde hücre içi ve hücre dışı etkenlerin birlikte çok sıkı kontrol edilmesi gerekir. Hücre içindeki asimetri, bazı organellerin, protein gruplarının ve RNA'nın yavru hücrelerden sadece birine aktarılmasıyla başarılıdır. Bölünme sonunda orjinal DNA, yavru hücrelerden birine giderken kararlanma geçirir ve öncü hücreye dönüşecek olan diğer hücrede yeni DNA sentezi meydana gelir. Bu mekanizmalar sayesinde kök hücreler mutasyonlardan korunmakta ve hep aynı genoma sahip hücreler bozunmadan kalabilmektedir. Sonuç olarak kök hücrelerde gen ifadesi ve işlevleri korunmaktadır (15).

Kök hücrelerin hücre dışı asimetrisi, hücrenin dışındaki mikroçevre (niş) tarafından oluşturulur. Nişi oluşturan hücre dışı matris bileşenleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri, kök hücre sayısını ve hücrenin bulunduğu durumu kontrol altında tutar. Sonuç olarak hücre içi ve hücre dışı sinyaller hücrenin kendini yenilemesinde önemli etkenlerdendir. Her ne kadar kök hücre havuzunu sabit tutabilmek için asimetrik hücre bölünmesi gerekse de, yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için simetrik hücre bölünmesi de gerçekleşmelidir (15).

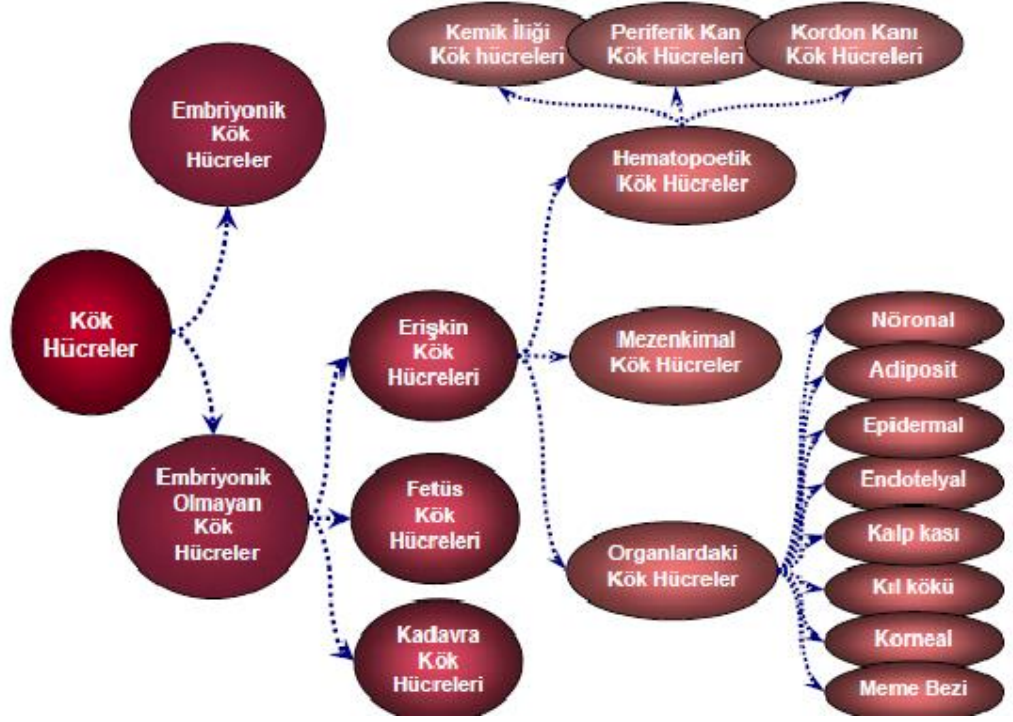
Kök hücrenin nişten uzaklaştırılması örneğin labaratuarda kök hücrelerin ayrıştırılması ve kültürü, bu hücrelerin kendini yenileme yeteneklerinin hızla kaybolmasıyla sonuçlanır (15).

### ***Köklülük (Stemness)***

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran hücresel ve moleküler özelliklerdir. Bunlar özgün gen ifadeleri ve transkripsiyon sonrası bir dizi değişimler olup kök hücreler farklılanmaksızın özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar. Kök hücre belirteçlerini kullanarak kök hücre tipini belirlemek günümüzde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu 'CD' (Farklanma Kümeleri=Clusters of Differentiation) olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar. Embriyonik kök hücreler için yaygın kullanılan belirteçler: SSA1, SSA4, TRA-1-60, Sox2, Oct4 ; hematopoetik kök hücreler için en yaygın kabul edilen belirteçler CD33, CD34, CD45; mezenkimal kök hücreleri ayırt etmek için CD29, CD79, CD105 kullanılır (15, 16).

### **Kök Hücre Çeşitleri –Kaynakları**

Kök hücreler iki kaynaktan elde edilir. Embriyonik gelişim sürecinin erken döneminde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücrelerdir. (embriyonik olmayan kök hücreler; dokuya özgü kök hücreler; doğum sonrası dönemdeki kök hücreler) (13).



**Şekil 3:** Kök hücre kaynakları (12)

(İnan S, Özbilgin K, (2009) dan alınmıştır.)

**1. Embriyonik kök hücreler (EKH):** Blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir (12,17). Vücuttaki herhangi bir farklılaşmış hücreyi oluşturma yeteneğindedirler. EKH'ler, çekirdeği çıkartılmış bir ovumla kaynaştırılarak elde edilmiş olan (klonlanmış) bir embriyodan da elde edilebilir (12). EKH'ler sınırsız kendikendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler ve tüm fetal dokulara ve erişkin kök hücrelerine ve bunların daha farklılaşmış progenitörlerine farklılaşabilir. EKH'ler in vitro süspansiyonda kültür edildiklerinde kendiliklerinden embriyonik cisimler (embryoid bodies) oluştururlar (16). Bunlar plasenta dışında, ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir (12, 16). Embriyonik kök hücreler, hücre yüzey belirteçleri olarak Oct-4, SSEA-1, TRA1-60, TRA1-81 eksprese ederler (12).



## **2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler:**

**Erişkin kök hücreler:** Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen bu hücreler, organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korurlar. Erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler. Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır ve multipotent kök hücrelerdir. Bu hücrelerin, vücut dışında embriyonik kök hücreler kadar uzun süre özelliklerini koruyarak çoğalma yetenekleri yoktur. Kişinin immun sistemine uyum gösterirler, ancak tüm hücre tiplerine dönüşemedikleri için kullanımları sınırlıdır. Günümüzde, erişkin kök hücrelerin diğer organ ve dokulara farklılaşması yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Organizmada ancak belirli birkaç hücre türüne dönüşebilen erişkin kök hücreleri, laboratuvar koşullarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında birçok farklı hücre türüne dönüşebilmektedirler. En iyi tanımlanmış embriyonik olmayan kök hücreler hematopoetik kök hücreler olmakla birlikte, erişkin kök hücrelerin beyin, barsak, kas, deri/kıl follikülü, kalp, akciğer ve son zamanlarda meme bezi gibi çeşitli doku ve organlarda varlığı gösterilmiştir. Hücresel fenotipik yüzey belirteçleri ile ayırt edilebilmektedirler. Erişkin kök hücreleri doku homeostasisini sağlamakla birlikte doku hasarından sonra rejenerasyonu da sağlarlar (12).

**Kordon kanı kök hücreleri:** Gebelik boyunca anneyle rahimdeki bebek arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonundaki kana kordon kanı adı verilir (1). Bebeğin doğumunun ilk yarım saati içerisinde alınan plasenta ve göbek kordon kanı erişkin kök hücreler için önemli bir kaynaktır (12). İçerisinde erişkin kanında gördüğümüz eritrosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücrelerine ilaveten erişkin kanından daha yüksek oranda kök hücre bulunur (1). Göbek kordon kanı, kök hücre kaynağı olarak 1988 yılından beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (12). Kordon kanı kök hücreleri kemik iliği ve çevre kanı gibi dokularla kıyaslandığında daha uzun telomere, daha yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olması, immün yapılanma yönünden henüz timus eğitimini tamamlamaması, başka bir insanda daha kolay uyum gösterme nitelikleriyle önemli avantajlara sahiptir. Üstelik doğum sırasında genellikle atılan bu kaynak, verici için hiçbir zahmet oluşturmadan toplanıp saklanarak **human**

*leukocyte antigen* (HLA) uygun bir verici saptandığında hemen kullanılabilme gibi çok büyük bir üstünlüğe sahiptir (1).

Kordon kanı mezenşimal kök hücre (MKH- yağ, kemik, kıkırdak gibi birçok dokuyu oluşturabilen kök hücreler ) içeriği uzun süreden beri bilinmektedir. Diğer MKH içeren kaynaklar, yani erişkin kemik iliği veya periferik kana oranla hem MKH içeriği daha zengindir hem de hücrelerin çoğalma özelliği daha fazladır (15).

Son yıllarda kordon kanının daha erken aşamalara ait embriyonik kök hücre özelliği de içerdiği gösterilmiştir. Embriyonik kök hücre işaretleyicilerinden olan Oct-4, Nanog gibi moleküller veya SSEA-3, SSEA-4 pozitifliği göstermesinin yanı sıra bazı özellikleri taşımayarak (HLA, CD34, CD11b) ve allojenik lenfositleri uyaramayarak embriyonik özelliklerini hala koruduğunu kanıtlamak mümkün olmuştur. Hatta kordon kanından elde edilen bu embriyonik hücrelerin deneysel olarak diyabet oluşturulmuş farelere aktarıldığında insülin üreten hücreler (endoderm) geliştirilerek hipergliseminin engellendiği gösterilmiştir. Yine kordon kanından kültür yapılarak elde edilen bu embriyonik kök hücrelerden endotel (mezoderm) veya nöron benzeri (ektoderm) hücrelerin de elde edilebileceği gösterilmiştir. Hem hücre belirleyicileri, hem de bu farklılaşma deneyleri kordon kanının embriyolojik kök hücre potansiyelini kanıtlamaktadır (15).

**Hematopoetik kök hücre:** Hematopoetik kök hücre (HKH) kandan ve kemik iliğinden izole edilebilen, kendi kendini yenileyebilen, kan dolaşımıyla mobilize olabilen, özelleşmiş hücre çeşitlerine farklılaşabilen, programlı hücre ölümüne gidebilen hücre olarak tanımlanmaktadır. Bilim adamları 50 yıllık bir çalışmadan sonra kan elemanlarını meydana getiren HKH hakkında yeterli bilgiye ulaşmışlar ve tedavide kullanmaya başlamışlardır. Bugün HKH kan, immun sistem ve kanser hastalıklarının tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Son dönemlerde hayvanlarda yapılan çalışmalar, HKH'in aynı zamanda kas, kemik, ve kan damarı gibi diğer hücre türlerine de dönüşebildiğini göstermektedir. Eğer insan HKH'i için de aynı şey söz konusu olur ise bu hücreler diğer doku türlerinin tamir için de kullanılabilir (18).

HKH'lerin en önemli markerlarından birisi CD34 dür. Bu insan kemik iliği hücrelerinin %0.5-5' inde eksprese olur. Erken progenitörlerde bulunurken daha matür hücrelerde bulunmaz (17,19). Yaklaşık 115 kD iç hücre membran

glikoproteinidir. İşlevleri tam olarak tespit edilememiş olsa da biyokimyasal olarak karakterize edilebilen bir glikoproteindir (20).

### **Hematopoetik kök hücre kaynakları**

**Kemik İliği:** Kök hücrelerin klasik kaynağı kemik iliğidir. 40 yıldır doktorlar kemik iliğinden, donörden anestezi altında genelde kalça kemiğinden kemik iliği hücreleri elde etmektedirler. Bu hücrelerin her 100.000’de biri uzun vadede kan elemanlarını oluşturan kök hücrelerdir. Diğerleri stromal hücreler, stromal kök hücreler, kan progenitor hücreleri ve matür beyaz ve kırmızı kan hücreleridir (18).

**Periferik Kan:** Hekimler son yıllarda klinik transplantasyon için kök hücreleri dolaşımdaki kandan elde etmeyi tercih ediyorlar. Yıllardır dolaşımdaki kök hücre ve öncü hücre sayısı az olarak bilinirdi, fakat son 10 yılda bilim adamları kök hücrelerin kemik iliğinden dolaşıma geçmesini sağlayan granülosit stimule edici faktör (GCSF) gibi sitokinler yardımı ile bu sayıyı arttırdılar. Bu işlem için donöre kök hücreler elde edilmeden birkaç gün önce GCSF enjekte edilir. Hücreleri toplamak için donörün venine bir tüp takılır, kan CD34(+) hücrelerini çeken bir filtrenin içinden geçirilir ve kırmızı hücreler tekrar hastaya verilir (18).

**Umbilikal Kord Kanı:** 1980’lerin sonu ve 1990’ların başında bilim adamları insan umbilikal kordon kanı ve plasentanın hematopoetik kök hücreler açısından zengin bir kaynak olduğunu fark ettiler. Fankoni anemili bir çocuğa yapılan başarılı bir kordon kanı transplantasyonundan sonra bu hücrelerin toplanması ve tedavide kullanımı arttı. Bugün kordon kanının çoğaltılması ve kemik iliği kök hücreleri ile arasındaki farklar ve kıyaslamalarla ilgili pek çok çalışma yürütülmektedir. Bugün kordon kanı kök hücrelerinin multiple germ tabakası hücrelerine (multipotent), hatta endoderm, ekdoderm, ve mesoderm gibi tüm germ tabakası hücrelerine (pluripotent) dönüşebileceği iddia edilmektedir (18).

## **DİYABETES MELLİTUS**

### **Tanım**

Diyabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik metabolik bir hastalıktır (21). Hiperglisemi kontrolsüz diyabetin yaygın etkisidir ve zaman içinde bir çok vücut sisteminde, özellikle sinir ve dolaşım sisteminde ciddi hasarlara yol açar (22).

### **Diyabetes Mellitus Epidemiyolojisi**

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre 2007 yılı itibariyle Dünya`da 246 milyon diyabetli kişinin yaşadığı, bunların %46' sının orta yaş (40-59) grubunda olduğu ve eğer önlem alınmazsa 2025 yılında diyabetli nüfusun 380 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (22). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre 2030 yılında diyabetin ölüm nedenleri içinde 7. sırada olacağı tahmin ediliyor (23). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2007 yılı nüfus rakamlarına göre ülkemizde 2.85 milyonun üzerinde tip 2 diyabetli ve 2.6 milyon civarında bozulmuş glikoz toleranslı (IGT) hastanın yaşadığı tahmin edilmektedir (22).

### **Diyabetes Mellitus Sınıflaması**

Diyabet sınıflamasında dört klinik tip yer almaktadır. Bunlardan üçü (tip 1 diyabet, tip 2 diyabet ve Gestasyonel Diyabetes Mellitus) primer, diğeri ( $\beta$ -hücre fonksiyonlarının genetik defekti , insülinin etkisindeki genetik defektler, pankreasın ekzokrin doku hastalıkları, ilaç veya kimyasal ajanlar, endokrinopatiler, diyabetle ilişkili genetik sendromlar (Monogenik diyabet formları)) ise sekonder diyabet formları olarak bilinmektedir (21).

### **Diyabetes Mellitus Etiyopatogenezi**

**Tip 1 Diyabet:** Tip 1 diyabetin etiyopatogenik nedeni pankreasta insülinitis (enflamasyon), insülin üreten hücrelerin selektif destrüksiyonuna bağlı mutlak insülin yetersizliğidir. Etiyolojisi ve doğal seyri tam olarak bilinmemekle birlikte, tip 1 diyabetin ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörlerin ortak etkisi olduğu

bilinmektedir. Etyolojisinde HLA genetiği major rol oynasa da diğer genler de etkiler ve kalıtsal geçiş şekli henüz aydınlanmamıştır. Çevresel faktörler (virüsler, toksinler ve bazı besinler) genetik zeminde  $\beta$  hücrelerinin destrüksiyonunu ve diyabetin ortaya çıkmasını başlatır veya süreci tetikler (22).

Tip 1 diyabetin prelinik dönemde en önemli triad genetik risk, humoral otoimmün belirteçleri ve erken faz insülin salgısı bozukluğudur. Klinik dönemde ise  $\beta$  hücrelerinin rezervi çok düşüktür (C Peptit  $< 0.1$  ng/ml), otoantikör titreleri azalmıştır. Hastalara ekzojen insülin verilmelidir (22).

**Tip 2 Diyabet:** İnsülin direnci ve rölatif İnsülin sekresyonunda azalmayla karakterizedir (21). İnsülin direnci ekzojen ve endojen insüline karşı normal biyolojik yanıtın bozulmasıdır. İnsülinin hedef dokuları karaciğer, kas ve yağ dokusudur. Karaciğerde glukoneogenezi ve glukojenolizi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini baskılar. Glukozun kas ve yağ dokusuna alımını ve burada enerji kaynağı olarak depolanmasını sağlar. İnsülin direnci geliştiğinde, insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki etkilerine karşı da direnç gelişir. Sonuçta hepatik glukoz çıkışında artış (hepatik insülin direnci), kas ve yağ dokusu içine alınamayan glukoz (periferik insülin direnci) ile kanda hiperglisemi gelişir. Hiperglisemiye kompanse etmek için  $\beta$  hücrelerinden daha fazla insülin salgınır. Fakat ilerleyen dönemde  $\beta$  hücreleri de fonksiyonlarını kaybetmeye başlayınca, insülin salgınım eksikliği ve sonuçta diyabet gelişir (22).

### **Diyabetes Mellitus Kliniği ve Tanı Kriterleri**

**Klasik semptomlar:** Poliüri, polidipsi, polifaji veya iştahsızlık, halsizlik, çabuk yorulma, ağız kuruluğu, noktüri (21).

**Daha az görülen semptomlar:** Bulanık görme, açıklanamayan kilo kaybı, inatçı infeksiyonlar, tekrarlayan mantar infeksiyonları, kaşıntı (21).

Diyabet için 2003 ve 2010 yılı revizyonlarını da kapsayan yeni 4 tanı kriteri şu şekildedir (21):

- 1) Açlık plazma glukozu (APG) :  $\geq 126$  mg/dl olmalıdır. Açlık en az 8 saat süreyle gıda alımının olmadığı süreyi belirtmektedir.
- 2) 75 gr glukozla yapılan oral glikoz tolerans testinin (OGTT) 2.saatinde plazma glikozunun  $\geq 200$  mg/dl olması
- 3) Diyabet klasik semptomları ve rasgele ölçülen plazma glikozunun  $\geq 200$  mg/dl olması. Rasgele kelimesi günün herhangi bir saatini, diyabet klasik semptomları da poliüri, polidipsi, polifaji veya iştahsızlık, halsizlik, çabuk yorulma, ağız kuruluğu, noktüri gibi semptomları kasetmektedir.
- 4) Standardize metotlarla ölçülmüş glikozillenmiş hemoglobin A1c düzeyi  $\geq \% 6.5$  ( $\geq 48$  mmol/mol) olmalıdır.

### **Diyabetes Mellitus Komplikasyonları**

Diyabetin komplikasyonları akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır. Akut komplikasyonlar diyabetik ketoasidoz, hiperozmolar nonketotik koma, laktik asidoz ve hipoglisemidir. Kronik komplikasyonlar da kendi içinde makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır. Makrovasküler komplikasyonlar hipertansiyon , koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık; mikrovasküler komplikasyonlar ise retinopati, nefropati, nöropatidir (21).

### **Diyabetik Ayak**

Diabetik ayak nontravmatik amputasyonların en önemli nedenidir. Morbidite açısından önemli sosyoekonomik bir sorundur (22). Diyabet Amerika Birleşik Devletleri`nde ölüm nedenleri arasında 7. sırada yer almaktadır. Diyabetli hastaların %15`inde diyabetik ayak gelişmektedir ve bunların % 14-20'si amputasyona gitmektedir (24, 25).

Diyabetin geç komplikasyonları olan periferik nöropati, periferik damar hastalıkları, enfeksiyon ve ayak travmaları ülserlerin başlıca nedenleridir (21,24,26). Ayrıca motor ve otonom defisitler de ülser gelişiminde katkıda bulunurlar. Diyabetik ayak ülserleri nöropatik, iskemik veya nöro-iskemik olarak sınıflandırılır. Nöropatik ülserler diyabetik ayak ülserlerinin en sık görülenidir (21). Dokuyu innerve eden

sinir liflerinin fonksiyon kaybı ya da bozulmasıyla sonuçlanır (24). Diyabetik nöropatide özellikle distal simetrik sensörimotor polinöropati ağrı, parestezi, kas atrofisi ve his kaybıyla ülser patogenezinde en önemli nedendir (21,22). Motor nöropati ayak intrinsek kaslarında atrofi ve zayıflığa ve sonuçta ayak parmaklarında fleksiyon deformitesine bağlı (özellikle metatarsal kemik başları altında ve ayak parmakları altında), basının arttığı alanların oluşmasına neden olur (21,25). Motor nöropatide ayağın ekstresek ve intrinsek kas sistemi arasındaki mekanik dengeyi değiştirmesi nedeniyle ayak deformiteleri oluşur (24). Otonom nöropatide terleme azalması, ayakta kuru cilt sonuçta çatlaklar ve fissür oluşumu gözlenir (22,24). Çatlaklardan bakteri girişi ve enfeksiyon kolaylaşır. Enfeksiyonlar diyabetiklerde mikrotrombüs oluşumuna neden olarak dolaşımı bozar. Bu durum kolayca parmak gangrenine dönüşebilir. Enfeksiyonun nondiyabetiklerde yarattığı vazodilatasyon reaksiyonu diyabetiklerde mikrosirkülasyon bozulduğu için yetersizdir (22). Perfüzyonu kötü olan dokularda travma sonrası iskemik ülserler gelişir. Ayrıca eklem hareketlerinin kısıtlanması, kötü ayak bakımı ve ayak deformiteleri ayak ülserlerinin gelişimi için risk oluşturur (21).

Son çalışmalar ortaya koyuyor ki klinik predispozan risk faktörlerinin yanı sıra, doku moleküler düzeyinde çok karmaşık mekanizmalar normal yara iyileşmesinin önlenmesine neden oluyorlar. Bu olaya katılan kemo-sitokinler; matriks metalloproteinazları, serin proteazlar, integrinler, kemokinler, replikatif hücre yaşlanması, büyüme faktörleri ve yetişkin kök hücreleridir. Diyabetik hastalarda başlangıçta hasarlanmış dokuda inflamatuvar hücreleri harekete geçiren kemotaktik etkileri azaltarak immün sistemi bozduğu görülmektedir. Sonunda yara iyileşmesi azalmakta ve bakteriyel enfeksiyon riski artmaktadır. Bu başlangıç sürecinin ardından, inflamatuvar yanıt geç de olsa kurulduğunda; inflamasyonda alevlenme ve proteoliz görülür. Uzun süre hiperglisemiye maruziyet sonucunda glikolize proteinler üretilir ve hücresel yanıtta bozukluklar görülür. Sonucunda doku tamiri ve fibrozis oluşumu engellenir (26).

Yapılan bir çalışmaya göre diyabetik ülserli hastada lökositlerin ülsere girişi ve birikimi engellenir ve bu nedenle normal yara iyileşmesi sağlamada başarısız olur (26).

Kronik diyabetik ülserli hastalarda fibroblastların perisellüler matriksteki yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asitleri daha konsantredir. Fibroblastların bu özgün özellikleri bu hastalarda kronik ülser formasyonunun oluşumuna katkıda bulunabilir (26).

## **DERİ HİSTOLOJİSİ**

Toplam vücut ağırlığının %16'sını oluşturan deri vücudun en ağır organıdır. Ektoderm kökenli bir epitelyum katmanı olan epidermis ve mezoderm kökenli bir bağ dokusu katmanı olan dermisten oluşur. Dermis ve epidermisin birleşme yeri düzensizdir. Dermisin papilla adı verilen çıkıntıları epidermisin epidermal kıvrımlar olarak bilinen uzantılarla kenetlenmiş şekilde gözükür. Epidermis türevlerini kıllar, tırnaklar, yağ ve ter bezleri oluşturur. Dermisin altında hipodermis olarak adlandırılan deriyi komşu dokulara gevşekçe bağlayan makroskobik olarak yüzeyel fasiaya benzeyen bir tabaka vardır (27).

### **Epidermis**

Epidermis çok katlı yassı keratinleşmiş epitelden oluşur ve daha az sayıda olmak üzere 3 hücre tipi daha içerir: Melanositler, langerhans hücreleri ve merkel hücreleri. Keratinleşmiş epidermis hücreleri keratinositlerdir.

Dermisten dışarıya doğru yerleşen epidermis keratinositlerin oluşturduğu 5 tabakadan oluşmuştur (27).

***Stratum Bazale:*** Dermisle epidermisin birleşme yerinde bazal membran üzerine oturmuş bazofilik prizmatik ya da kübik hücrelerden oluşan tek bir hücre tabakasından meydana gelir. Bu tabakanın hücrelerini desmozomlar yan yada üst yüzeylerinden bağlarlar. Bazal hücre yüzeyinde bulunan hemidesmozomlar bu hücrelerin bazal laminaya tutunmasına yardım eder. Kök hücreler içeren stratum bazale yoğun mitoz aktivitesine sahiptir. Bir sonraki tabakanın başlangıç bölümüyle birlikte epidermal hücrelerin sürekli yenilenmesinden sorumludur. Yaklaşık olarak her 15-30 günde bir yenilenmektedir (27).

### ***Stratum Spinozum:***

Çekirdeği merkezde bulunan ve sitoplazma uzantıları keratin filaman demetleriyle dolu kübik ya da hafif yassılaştırmış hücrelerden oluşur. Bu tabakadaki



hücreler birbiriyle içi filaman dolu dikensi sitoplazmik çıkıntılar ve yüzeyi delerek hücreye dikenlerle kaplı bir görünüm veren desmozomlarla sıkıca bağlanmıştır. Bu keratin filaman demetlerine tonofilaman denir. Desmozomların sitoplazmik yoğun bölgelerinde sonlanırlar.

Bütün mitozlar stratum bazale ve spinözümün birlikte oluşturdukları malpighi tabakasında gerçekleşir. Epidermal kök hücreler sadece malpighi tabakasında yer alır (27).

#### ***Stratum Granülozum:***

Sitoplazması keratohiyalin granülleri olarak adlandırılan kaba bazofilik granüllerle dolu, yassılaştırmış poligonal hücrelerin oluşturduğu 3-5 tabakadan meydana gelir. Bu granüllerin proteinleri sistin içeren proteinlerin yanı sıra fosforillenmiş histidinden zengin bir protein de içerir. Zarla çevrili olmayan keratohiyalin granülleri yoğun bir şekilde bazofilik görünmesinin nedeni bol miktarda bulunan fosfat gruplarıdır (27).

#### ***Stratum Korneum:***

Bu tabakadaki hücrelerin sitoplazması keratin adı verilen ışığı çift kırıcı filamentöz bir skleroproteinle kaplıdır. Stratum korneum çekirdek içermeyen, yassılaştırmış ve keratinleşmiş 15-20 tane hücre katmanından meydana gelir.

Keratinizasyonda sonra hücreler yalnızca fibriler ve amorf proteinler ve kalınlaşmış plazma membranından oluşur; bunlara boynuzsu hücreler denir. Keratinleşme sırasında sitoplazmik organellerin ortadan kalkmasında lizozomal hidrolitik enzimler önemli rol alır. Bu hücreler stratum korneum yüzeyinden sürekli olarak dökülürler (27).

### **Dermis**

Epidermisi destekleyen ve derialtı dokusuna bağlayan bağ dokusu tabakasıdır. Dermisin yüzeyi oldukça düzensizdir ve epidermis uzantılarıyla iç içe geçen çok sayıda dermal papillaya sahiptir. Dermal papilla basınca maruz kalan bölgelerde daha fazla bulunur. Dermis epidermis bağlantı yüzeyini artırır ve güçlendirir (27).

Dermisin papiller tabakasıyla stratum bazale arasında her zaman bir bazal lamina bulunur. Bu iki tabakanın iç içe geçtiği hat boyunca uzanır. Bazal laminanın

altında lamina retikularis olarak adlandırılan ince bir retiküler lif ağı bulunur. Bunların birleşerek oluşturduğu yapıya bazal membran denir (27).

Dermis iki tabakadan oluşur: En dışta bulunan tabaka papiller dermis, onun altında bulunan tabaka ise retiküler dermis tabakasıdır. İnce papiller dermis gevşek bağ dokusundan oluşur; burada fibroblastlar ile makrofaj ve mast hücreleri olmak üzere bağ dokusunun diğer hücreleri bulunur. Damar dışına çıkan lökositler de görülebilir. Bu tabakadan bazal laminaya özel kollajen fibriller girer. Tutturucu fibriller olarak adlandırılan bu fibriller dermisi epidermise bağlar. Retiküler tabaka daha kalın başlıca tip I kollajen olmak üzere düzensiz tıkHz bağ dokusundan oluşur. Papiller tabakaya göre daha bol lif ve daha az hücreye sahiptir. Başlıca glikozaminoglikan dermatan sülfattır. Dermis elastik sisteme ait lifler içerir. Bu elastik ağ derinin esnekliğinden sorumludur.

Dermiste zengin bir kan ve lenf damar ağı vardır. Sinir bakımından da zengin olan dermiste parasempatik innervasyon yoktur (27).

## **YARA İYİLEŞMESİ**

Yara, vücudun herhangi bir dokusuna ait yapıların anatomik ve fonksiyonel devamlılığının bozulmasıdır (28). Mikrovasküler hasar ve kan ekstrevasasyonu ile karakterizedir (29). İyileşme, temel hemostatik süreçlerin yaşandığı yaralanmaya, vücudun herhangi bir doku yıkımına karşı iyileşme cevabı verme yeteneğidir. Ölmüş veya hasar görmüş hücrelerin rejenerasyonu veya replasmanıdır (28).

### **Yara İyileşmesi Tipleri**

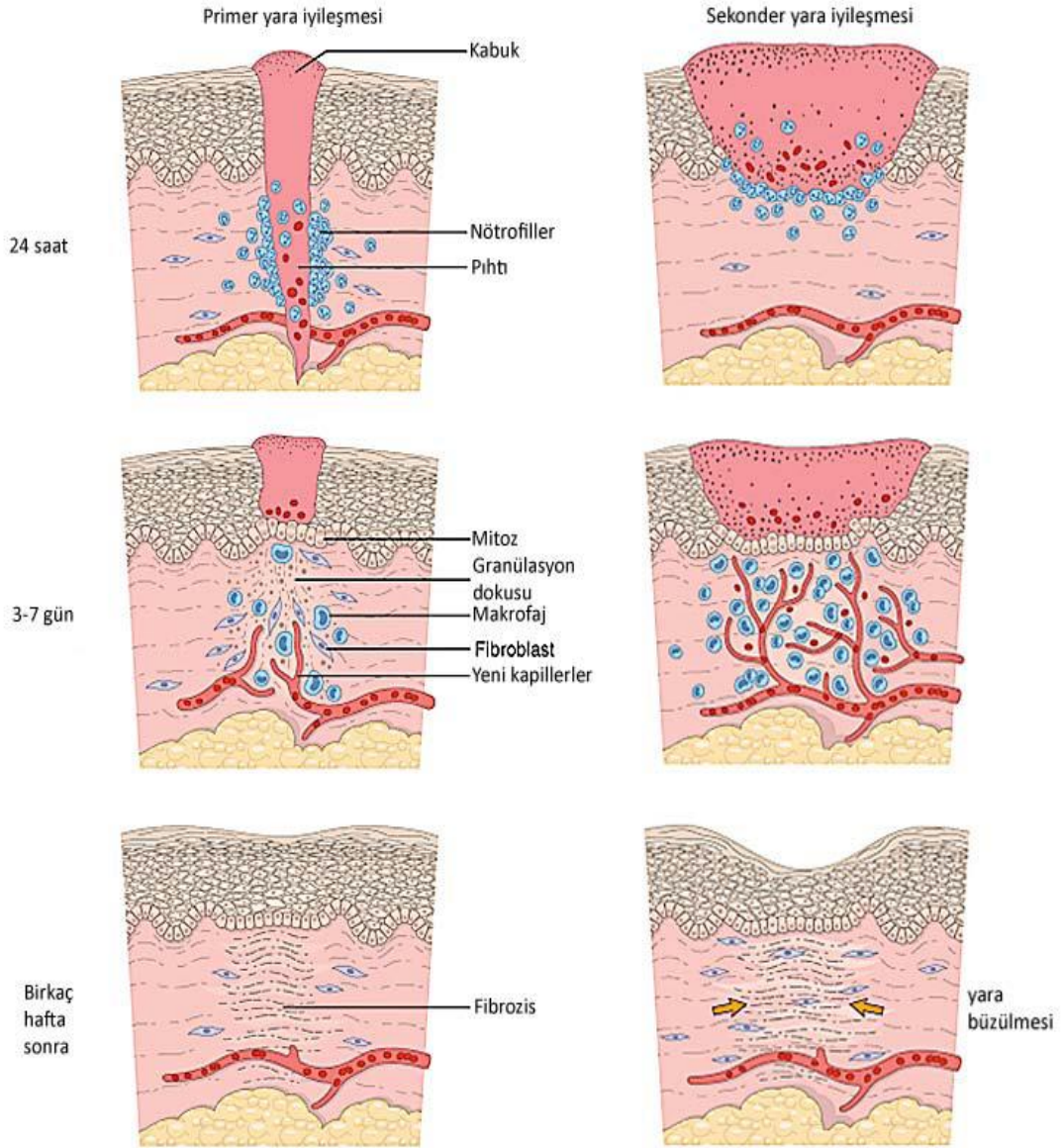
- A) Primer İyileşme
- B) Sekonder İyileşme
- C) Tersiyer iyileşme

**A. Primer Yara İyileşmesi:** Belirgin bakteriyel kontaminasyon ve doku kaybının olmadığı durumlarda yara kenarlarının direkt yaklaştırılarak kapanması sonucu meydana gelen iyileşmedir (28). İyileşme minimal ödem ve çok ince bir skar dokusuyla enfeksiyon olmadan tamamlanır (Şekil 4). İyileşme sonrası yara, önceki gücünün %85-90'ını geri kazanır (29).

**B. Sekonder Yara İyileşmesi:** Yara alanında granülasyon dokusunun gelişmesi, yara alanını doldurması beklenerek, spontan rejenerasyon ve reepitelizasyonun gelişmesi ile meydana gelen iyileşmedir (28). Sekonder iyileşme yavaş işleyen bir süreçtir ve epitelizasyonun tamamlanması 4-8 hafta alabilir. Sekonder iyileşmede her zaman skar oluşumu vardır (29) (Şekil 4).

***Sekonder iyileşme ile primer iyileşme arasındaki farklar:***

1. Sekonder iyileşmede çok fazla debris, eksuda ve fibrin dokusu vardır. Sonuçta iltihabi reaksiyon daha yoğundur. Bunların ortadan kaldırılması daha uzun sürer, dolayısıyla inflamatuvar evre süresi uzamıştır.
2. Sekonder iyileşmede daha fazla granülasyon dokusu meydana gelir.
3. Sekonder iyileşmede daha fazla kontraksiyon olur ve bu primer iyileşmeyi sekonder iyileşmeden ayıran en önemli özelliktir (28).



**Şekil 4:** Primer ve sekonder yara iyileşmesi (29).

Ergin DN, 2009 dan alınmıştır.

**C) Tersiyer Yara iyileşmesi (Gecikmiş primer iyileşme):** Sekonder iyileşmeye bırakılan yaranın şartlar uygun hale geldiğinde yani yeterli granülasyon dokusu oluştuğunda suture edilerek kapatılmasıdır. Bu tip iyileşmede kollajen metabolizması bozulmaz ve sonunda primer kapanmada ulaşılan gerilme kuvvetine eşit değerler elde edilir (28,29).

## Yara İyileşmesi Evreleri

Yara iyileşmesi 3 fazdan oluşur:

- a. Hemostazis ve İnflamatuar Evre
- b. Proliferatif Evre ( Fibroblastik Evre)
- c. Maturasyon Evresi ( Remodeling Evresi) (28-31)

### *a) Hemostazis ve İnflamatuar Evre (İnflamasyon) (0-3 gün)*

Yaralanma anında başlayıp, 24-48 saat içinde sonlanır. Yara iyileşmesinin başlangıç basamağı olan akut inflamasyon, hemostazın sağlanması, immun sistem komponentlerinin göçü, mekanik, bakteriyel ve kimyasal etkilere karşı cevabın oluşmasını sağlar. Bu dönemin en önemli elemanı kan damarlarıdır. İlk önce bölgesel kanama başlar ve doku travmasını takiben pıhtılaşma mekanizması harekete geçer (28). Pıhtının iki görevi vardır: Açığa çıkan dokuların geçici olarak korunmasını sağlamak ve hücre göçü için geçici bir matriks oluşturmaktır (29). Pıhtılaşma mekanizması, trombositlerce yönlendirilir. Bu evrede, trombositler başlangıç trombüsünü oluşturup, mediatörler ve büyüme faktörleri salgırlar (30). Bu mediatörler nötrofil ve makrofajlar için kemoatraktan görevi görürler. Yara alanına gelen nötrofil ve makrofajlar nekrotik doku, debris ve bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlarlar (28).

İnflamatuar evrede, yara oluşumu ile başlayan uyarıya karşı vasküler ve hücrel yanıt oluşur (28). Bu evre hiperemiyle karakterizedir ve yaralı alana arka arkaya inflammatuar hücreler göç ederler (30).

**Vasküler Yanıt:** Doku travması ile görülen kanamaya ilk vasküler yanıt, 5-10 dakika süren, tromboksan A2 (TxA2), gibi araşidonik asit metabolitlerine bağlı geçici vazokonstrüksiyondur. Bu süre içinde hemostaz sağlanır. Yaralanma ile koagülasyon mekanizması aktive olur, trombosit adezyonu ve agregasyonu sonucu pıhtı meydana gelir. Agrege olan trombositlerin, granüllerindeki içerik boşalarak, kemotaktik, vazoaktif mediatörler ortama salınır.

Trombositlerin alfa granüllerinden: Fibrinojen, fibronektin, platelet faktör 4, TGF- $\beta$ , PDGF, TxA2, biyojenik aminler, prostoglandinler salgılanır.

Geçici vazokonstrüksiyonu takiben aktif vazodilatasyon fazı görülür; böylece kapiller permeabilite artar. Bazı aktif substanslar; mast hücrelerinden salınan histamin, serotonin, bradikinin ve prostoglandinler, mikro sirkülasyonda

permeabiliteyi arttırmaları ve venüllerin dilate olmasını sağlarlar. Erken permeabilite değişiklikleri ve vazodilatasyonda asıl etken maddenin histamin olduğu düşünülmektedir. Vazodilatasyon 72 saat boyunca sürmektedir. Permeabilite artışı ile inflamasyon bulguları görülür. Plazma ve hücre göçünden dolayı bölgede ödem ve bunun sonucunda oluşan doku basıncı artışından dolayı da ağrı olur.

Aktif trombositler, kinin ve kompleman sistemi komponentleri, prostoglandinlerden salgılanan hemostatik faktörler, hücrelerel kontrol sinyallerini oluştururlar. Bu hücreler tarafından salgılanan mediatörlerin etkisiyle inflamatuvar hücre göçü başlar (28).

**Hücrelerel Yanıt:** İnflamatuvar evrede hücrelerel yanıt, vasküler değişikliklerin görülmesinden sonra kısa bir süre içinde başlar. Yaralanmadan birkaç saat sonra, nötrofiller damar duvarlarından diapedez yolu ile ilerleyerek yara alanına doğru göç ederler. Nötrofiller, kemotaktik uyarıların etkisi ile yaralanma bölgesine gelen ilk hücrelerdir ve yaralanmayı takiben 6 saat sonra yara da görülürler. Maksimum sayıya 1-2 günde ulaşır ve enfeksiyon yoksa 2-3 günden sonra sayıları azalır. Nötrofil ve mononükleer hücrelerin yara yerine göçü dolaşımdaki sayıları ile doğru orantılı olarak gerçekleşir. Nötrofil sadece birkaç saat inflamasyon sahasında kalır (28). Nötrofillerin rolü fagositoz, enfeksiyonun önlenmesi ve proteaz salınımı ile ölü dokuların eritilmesidir (28-30). Yeterli oksijen desteği ile lizis fonksiyonlarını yerine getirirler. Bu işlemlerin sonucunda inflamasyon sahasında serbest oksijen radikalleri meydana gelir. Yara bölgesinde yabancı cisim ve enfeksiyon olmadığı takdirde, nötrofil sayısı hızla azalır, hidrolitik enzimleri hücre dışına yayılır (28).

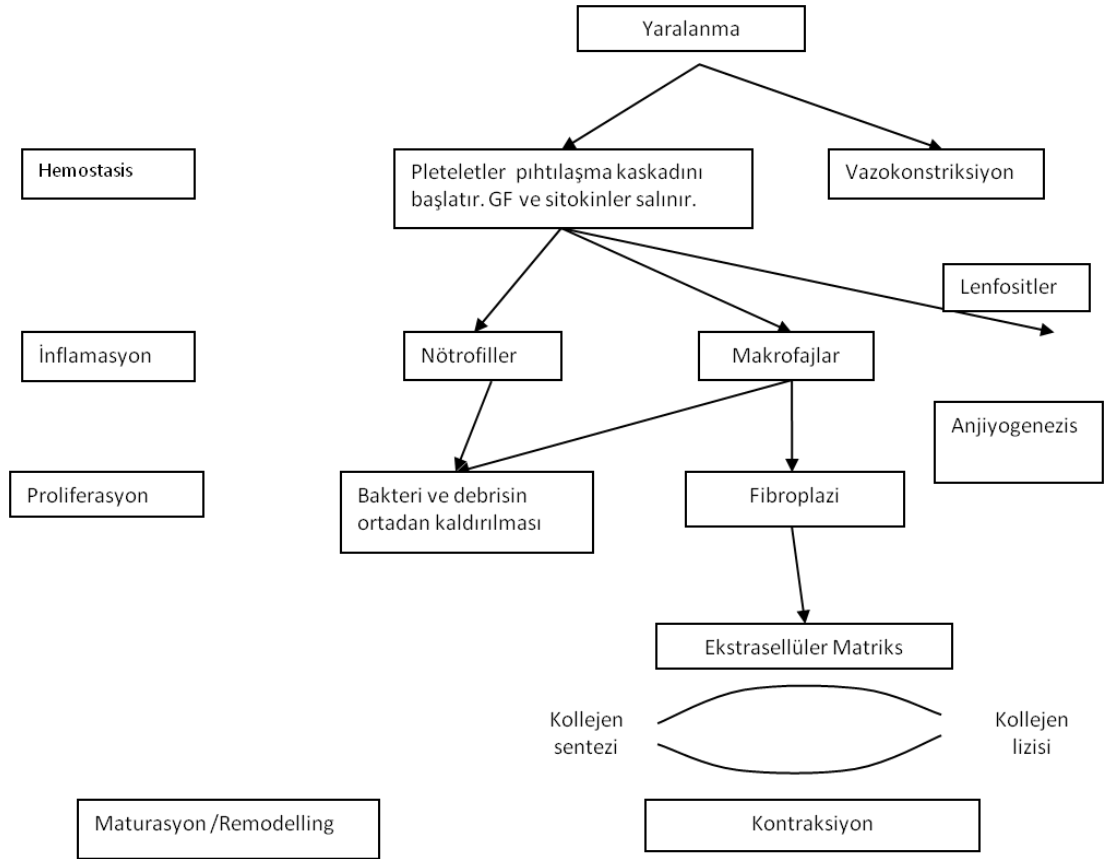
Nötrofilden sonra yara yerine lenfositlerin göçü olur ve yaralanmadan sonraki 6. günde maksimum sayıya ulaşır. Lenfositlerden salgılanan lenfokinlerin, fibroblast migrasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Lenfokinlerin yara yerindeki endotel hücreleri ve hücrelerin kemotaksisi üzerinde etkileri vardır (28).

Yaralanmayı takiben nötrofil ve lenfositlerden sonra bölgeye gelen hücreler makrofajlardır. Makrofajlar sistemik dolaşımdaki monositlerden veya mevcut dokudaki makrofajlardan kaynaklanan mononükleer fagositik hücrelerdir. Makrofajların yara iyileşmesinde görevi, fibroblastik proliferasyon ve transformasyon yanında anjiogenez ve kollajen sentezini uyaran mitojen maddeler serbestleştirmeleridir (28-30). Makrofajların önceden sadece fagositik fonksiyonları

olduğu düşünülürken bugün yara iyileşmesinde merkezi bir hücre rolü oynadıkları gösterilmiştir. Bu role sahip olmasının en önemli nedeni salgıladığı büyüme faktörleridir. Aktif makrofajlarda salınan büyüme faktörleri: TGF $\beta$ , PDGF, IL-1, PAF, TGF $\alpha$ , TNF, FGF, EGF. Makrofajlar, bu özellikleriyle yara iyileşmesinde inflamatuvar evrenin orkestra şefidir (28).

### **Makrofajlar;**

- Fibroblast ve diğer mezenkimal hücreler için büyüme faktörü kaynağıdır,
- Neovaskularizasyon için anjiogenik faktörlerin kaynağıdır,
- Konnektif doku matriks proteinlerinin üretimine yardımcı olur (28).



**Şekil 5:** Normal yara iyileşmesi (30).

(Jeffcoate J.W ve ark. dan alınmıştır (2004)).

### ***Fibronektin***

Granülasyon fazının major elemanlarından birisi de fibronektindir. Yaralanmanın olduğu ilk 24-48 saatte yara yerinde yüksek miktarda bulunur. Pek

çok hücre çeşidinden fibroblast, endotel ve trombositler gibi hücrelerden üretilir. Granülasyon dokusunun formasyonu sırasında fibronektin ;

·Fibrin, heparin, kollajen, proteoglikanlar gibi makromoleküller arasında bağlantıyı sağlar,

·Nötrofil, monosit, fibroblast, endotel hücrelerinin yara yerine göçünde görev alır, yara debridmanına katkıda bulunur,

·Makrofajlar ve fibroblastlar için opsonik aktiviteye sahiptir,

·Matriks formasyonu, kollajen depozisyonunda da rol oynayan bu protein ayrıca geç remodeling evresinde işlev görür (28).

### ***b) Proliferatif Evre (Proliferasyon, Fibroplastik) (3-12 gün)***

Yaralanmadan sonraki iki ile üçüncü gün arasında başlayarak, yaklaşık olarak 3 haftada sonlanır. Bu dönemdeki ana hücreler fibroblast ve endotel hücreleridir. 72. saatte makrofajlardan salgılanan TGF- $\beta$ , fibroblastları yaraya doğru harekete geçirir ve proliferatif evrenin başlangıç sinyalini verir. Makrofajlardan salgılanan diğer büyüme faktörleri ve sitokinler bu evrede anjiogenezi stimüle ederler. Proliferasyon evresi fibroblast proliferasyonu ve angiogenezi içerir (28,29).

#### ***1. Fibroblastik Proliferasyon***

Fibroblastlar, makrofajlar tarafından salgılanan bir kemoatraktan olan TGF etkisi ile yara alanına göç etmeye başlarlar. Fibroblast, yara yakınındaki konnektif doku hücrelerinden köken alır. Birinci haftanın sonunda, yara yerindeki predominant hücre olur. Fibroblastların yara yerine göç etmesi ve fonksiyonlarını yerine getirmesi yeterli oksijen seviyeleri ile ilişkilidir (28).

Fibroblast, yara iyileşmesi için gerekli maddeleri üretir, bunlar:

a. Glikozaminoglikanlar (GAG)

b. Kollajen lifleridir.

#### ***a. Glikozaminoglikanlar***

Tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşan protein çekirdektir. İlk sentez edilen GAG hyaluronik asittir; bunu kondroidin-4-sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat izler. Fibroblastlar ve diğer mezenkimal hücrelerden salgılanan GAG, proteoglikan ve mukoproteinler tarafından, amorföz jel karakterli bir madde salgılanır. Yara yerinde oluşan bu madde kollajen liflerinin agregasyonunda



görevlidir. Yeni kollajen lifleri ve hücrelerin organizasyonunun sağlanmasında destek görevi görür; kollajen liflerinin oryantasyonu ve boyutlarının kontrolü ile ilişkilidir (28).

### ***b. Kollajen Sentezi***

Bağ dokusunun ana makromolekülü kollajendir. Kollajen molekülü pek çok hücreden sentezlenebilir, fakat en önemli kaynak fibroblasttır. Fibroblastlar, nedbe oluşumunda ana elemanlardır ve yumuşak doku zedelenmesinin iyileşmesinde temel ürün olan kollajeni oluşturarak, yara direncini sağlarlar (28).

Aktif kollajen üretimi fibroblastların endoplazmik retikulumunda başlar. Hücre içinde işlem gördükten sonra prolin ve lizin ile hidroksile olmuş prokollajen halinde salınır. Prokollajen tropokollajene dönüşür. Tropokollajen birimlerinin amino ve karboksi terminallerine peptit dizileri eklenerek kollajen lifleri meydana gelir. Kollajen üretim hızı, birçok faktöre bağlıdır. Bunlardan en önemlileri, dolaşım yeterliliği ve doku oksijen basıncıdır (28).

İntersiyel matriks, fibroblastlar ve diğer mezenkimal hücrelerce yapılır ve kollajen liflere sahiptir. İntersiyel matriksin ana elemanı proteoglikanlar olup, yeni oluşan skar dokusunun %50'sini oluşturur. Diğer %50 miktarı kollajen oluşturur. Kollajenle yapılan bu maddeler, yaralanmayı takiben 2. haftada en fazla üretilir (28).

Kollajen sentezi 2. haftada hızlanır. Birikimi 2. ve 3. haftalarda en yüksek seviyeye ulaşır. 3. Hafta sonunda sentez ve yıkımı dengededir. 4. haftadan sonra sentezi azalır (28).

Normal deri %80 tip I kollajen, %20 tip III kollajen içerir. Yara iyileşme sürecinde biriken kollajen tipleri farklılıklar göstermektedir (28).

Yaralanmadan sonraki ilk saatlerde tip IV-V kollajen dominant, 24. saatte tip III kollajen, 60. saatte tip I kollajen dominant olmak üzere, tip III-IV kollajen birikimi olur (28).

### ***2) Anjiogenezis***

Yara yüzeyi rölatif olarak iskemiktir, oksijen ve besin transferi olmadan iyileşme gerçekleşemez. Anjiogenez yaralanmadan sonraki 4. günde başlar. Makrofajlar tarafından salınan, endotel ve mezotel hücreleri için kemoatraktan moleküller olan, angiogenik faktörlerin stimülasyonu ile tetiklenir (28).

Endotel hücrelerinin proliferasyonu ile yara yüzeyinde kapiller tomurcuklar oluşur. Bu tomurcuklar ilerleyip, diğerleriyle aralarında yeni bağlantılar oluşturarak, yeni kapiller ağları ve kapiller yatakları yaparlar. Yaranın metabolik ihtiyaçlarına bağlı olarak, yeni kapillerlerde remodeling ve regresyon olur, bu oluşum skar dokusunun eriteminin azalması şeklinde gözlenir (28).

***c) Maturasyon Evresi (Remodeling, Olgunlaşma) (6-14 gün)***

Bu fazda, akut ve kronik inflamatuvar hücreler yavaş yavaş azalır, anjiogenez sonlanır ve fibroplazi biter. Yaralanmadan sonraki iki ile üçüncü hafta arasında başlar, ortalama bir yıl kadar devam eder. Yaralanmanın ilk haftasında sentezlenen kollajen, remodelizasyon fazında yerini daha çok stabil örgü halindeki kollajene bırakır. Lifler arasındaki kovalent bağlar artarak stabilizasyon sağlanır. Başlangıçta rastgele dizilmiş olan kollajen lifleri, kademeli olarak mekanik güçlerin etkisiyle organize olurlar. Maturasyon evresinde kollajen sentezi devam etmekle birlikte, yıkımı da başladığı için net kollajen miktarında artış olmaz. Kollajen lifleri, mekanik kuvvetlerin yarattığı stres hattı boyunca dizilime uğrar ve yarada daha fazla gerilim kuvveti meydana gelir. Yaranın direnç kuvveti kollajen miktarından öte, dizilimine bağlı olarak artar. Kollajen yıkımı kollajenaz enzimi tarafından yapılır. Kollajenaz çinko içeren metalloproteaz bir enzimdir; matur kollajenin a- heliks zincirleri arasına girerek yıkımı gerçekleştirir. Diğer proteazlar da kollajen yıkımında görev alırken, tip I, II, III kollajeni yıkan major enzim kollajenazdır (28).

Maturasyon evresinde depolanan yeni kollajen lifleri stabil çapraz bağlar kurarak kalıcı hale gelirler. Kollajen çapraz bağları yaraya direnç ve bütünlük kazandırır. Komşu kollajen lifleri arasında da çapraz bağlar oluşur ve 3 boyutlu triple heliks yapısını kazanır. Maturasyon evresinde diğer değişiklikler, interselüler matriks moleküllerinde olur. Hyaluronik asit, kondroidin-4-sülfat gibi GAG'ların ve proteoglikanların miktarı dermiste bulunan normal düzeylerine iner, dokuların su içeriği kademeli olarak azalıp normale döner. Kollajen kalınlaşır ve yoğunlaşır, kan damarları giderek konstrükte olup kaybolur (28). Remodelling fazı yara kapandıktan sonra aylarca devam edebilir (30).

## **Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

Yara iyileşmesini etkileyen faktörler lokal ve genel faktörler olarak ikiye ayrılırlar (28,29).

### **1. Lokal faktörler**

**a.** Uygun olmayan cerrahi teknikler

**b.** Enfeksiyon: Enfeksiyon, yara iyileşmesinde bozulmalara yol açar. Doku oksijen basıncını düşürür, kollajenolizi artırır ve inflamatuvar evrenin uzamasına neden olur. Bakteriyel kolonizasyon epitelizasyon ve anjiogenezisi azaltır. Bakteri metabolit ve toksinleri epitelyum migrasyonunu bozar, dermisteki polisakkarit ve protein yapıları etkiler. Enfekte yaralarda granülasyon dokusu daha ödematöz, hemorojik ve frajildir. Bakteriyel kontaminasyon ile artan kollejenolitik aktivite sonucunda yara gerilim direnci düşer ve yara kontraksiyonu azalır.

**c.** Vasküler bozukluklar ve doku iskemisi

**d.** Topikal steroid ve antibiyotikler

**e.** Artefakt yaraları ve kronik travma

**f.** Yabancı cisim

**g.** Uygunsuz örtü ve sargılar

**h.** Kanser

**i.** Kronik radyasyon (28,29).

### **2. Genel faktörler**

**a.** Beslenme: Protein-kalori malnütrisyonu, inflamasyon aşamasını uzatır. Fibroplaziyi, proteoglikan ve kollajen sentezini olumsuz yönde etkiler. Yara iyileşmesinde esansiyel aminoasitlerin önemli yeri vardır. Esansiyel aminoasitler inflamasyon ve fibroblast ürünlerinin üretiminin artırılması için gereklidir. Sistin kollajen sentez aşamasında kofaktör olarak rol oynar. Arjinin, büyüme hormon sekresyonunu uyararak, yara iyileşmesini hızlandırır. Protein eksikliğinde, ortalama yedinci hafta sonunda iyileşme olayında gecikme ortaya çıkar. Serum protein düzeyi 2 gramın altında olan kişilerde inflamatuvar evre uzamış ve fibroplazi azalmıştır. Vücut ağırlığının %10'unun veya daha fazlasının kaybı yara komplikasyonlarını artırır. Glukoz lökositlerin enerji kaynağıdır ve yağlar yeni hücrelerin sentezi için gereklidir. Yara iyileşmesinde, minerallerin kollajen metabolizmasını ilgilendiren çeşitli basamaklarda rolleri vardır. Prolin, kollajen sentezi aşamasında demir ve

askorbik asit kofaktör olarak kullanılarak hidroksiproline çevrilir. Demir eksikliğinde, iyileşmede bozulma meydana gelir. Manganez, kollajen metabolizmasında galaktozil transferaz ve glukozil transferaz reaksiyonlarında kofaktördür.

**b. Dolaşım bozuklukları**

**c. Yaş, cins, ırk:** Yaşın ilerlemesiyle birlikte yara gerilim direnci ve yara kapanma hızlarında düşüş gözlenmektedir. Yara iyileşme süresi uzamıştır. İnflamatuvar yanıt yaşın ilerlemesiyle azalır, bu nedenle yaşlılarda yaraya azalmış bir yanıt vardır. Epitelyal hücrelerin, fibroblastların proliferatif kapasitesinde azalma vardır.

**d. Hormonlar**

**e. Steroid, antimetabolitler ve yüksek doz antiinflamatuvar ilaç kullanımı:** İmmunosupresif ve antiinflamatuvar etkileri vardır. Bu ajanlar yara iyileşmesini inhibe ederler. Steroidler makrofaj migrasyonunu, nötrofil fonksiyonunu, fibroblastların prokollajen sentezini inhibe eder. Epitelizasyon ve anjiogenezisi geriletirler. Yara gerilim direncini azaltır, yara kontraksiyonunu engellerler.

Kronik steroid kullanan hastaların dermisi incelmış, kollajen düzeyleri azalmış, yara iyileşme yeteneği büyük oranda azalmıştır.

Yüksek doz antiinflamatuvar ilaç kullanımı sonucunda kollajen sentezi azalmaktadır.

**f. Kronik hastalıklar (28,29)**

**Yara İyileşmesindeki Büyüme Faktörleri ve Sitokinler**

Yara iyileşmesi sürecinin başarısı büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinlerin uyumuna bağlıdır. Bu maddeler biyolojik olarak aktif polipeptitlerdir. Bunlar hedef hücrelerin metabolizması, diferansiasyonu ve büyümesini değiştirmek için çalışırlar. Parakrin, otokrin, jukstakrin veya endokrin mekanizmalarla görev yaparlar. Spesifik hücre yüzey reseptörlerine yada ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerine bağlanmalarının bir sonucu olarak hücre davranışını etkilerler. Bu reseptörlere bağlanma moleküler olaylar kaskadını tetikler (Tablo 1) (30,31).

Deri yaralanmasından sonra epidermal bariyer bozulur ve keratinositler daha önceden depolanan IL-1'i serbest bırakır. Hücreler etrafındaki hasara bariyer uyarısı

olan IL-1 ilk sinyaldir. Ek olarak kan bileşenleri pıhtılaşma kaskadını aktifleştirmek için yara alanına salınırlar. Elde edilen pıhtı hemostazı indükler ve inflamatuvar hücrelerin alımı için matriks sağlar. Trombositler degranüle alfa granüllerinden PDGF, EGF ve TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörleri sekrete ederler. PDGF proinflamatuvar sitokin IL-1 ile birlikte kontamine bakterileri ortadan kaldırmak için nötrofilleri yara yerine çekmektedir. TGF- $\beta$  monositleri makrofajlara dönüştürür. Makrofajlar doku debridmanı ve inflamatuvar yanıtın arttırılmasında önemli rol oynamaktadır. Granülasyon dokusu gelişimini başlatırlar ve çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6) ve büyüme faktörlerinin (FGF, EGF, TGF- $\beta$ , PDGF) serbest bırakılmasını sağlarlar (31).

Trombositlerden salınan VEGF, FGF yardımıyla endotelial hücreler çoğalır ve angiogenesis gelişir. Bu işlem yeni ECM organizasyonu, birikimi ve sentezi için gereklidir. FGF, TGF- $\beta$ , PDGF fibroblast infiltrasyonuna olanak sağlar. TGF- $\beta$ , PDGF fibroblastları myofibroblastlara dönüştürmek için fenotipik değişiklikleri başlatır. Bu myofibroblastlar yara kapanmasını kolaylaştırmak için konstriktif gücü üretmek için ECM sınırları boyunca kendi aralarında dizilirler (31).

Epitelyal hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu stimüle etmek için EGF, FGF ve TGF- $\alpha$  salınımı olur. Bu işlem geçici olarak ECM üzerindeki keratinositlerin migrasyonu ve hücre-hücre, hücre-alt tabaka temasının dağıtılmasıyla başlar. Yara kapanması olduğu zaman (% 100 epitelizasyon) bariyeri restore etmek için keratinositler stratifikasyon ve diferansiasyona uğrarlar (31).

Matriks formasyonu revaskülarizasyonla granülasyon dokusunun ortadan kaldırılmasını gerektirir. Kollajen ve elastik lifler bir iskelet olarak granülasyon dokusunun yerini alır. Bu iskelet daha sonra proteoglikan ve glikoproteinle doldurulur. Bunu doku remodellingi takip eder. TGF- $\beta$  tarafından yeni kollajen sentezi, PDGF tarafından yaşlı kollajenin kaldırılması şeklinde olur. Bu süreçteki nihai ürün skar dokusudur (31).

**Tablo 1:** Akut ve kronik yarada, yara iyileşmesini etkileyen büyüme faktörleri ve sitokinler (31).

Barrientos S ve ark. (2008)

Büyüme Faktörleri	Hücreler	Akut Yara	Fonksiyonu	Kronik Yara
EGF	Trombosit Makrofaj Fibroblast	↑	Reepitelizasyon	↓
FGF-2	Keratinosit Mast Hücre Fibroblast Endotel Hücre Düz Kas Hücre Kondrosit	↑	Granülasyon doku formasyonu Reepitelizasyon Matriks formasyonu ve remodeling	↓
TGF- $\beta$	Trombosit Keratinosit Makrofaj Lenfosit Fibroblast	↑	İnflamasyon Granülasyon doku formasyonu Reepitelizasyon Matriks formasyonu ve remodeling	↓
PDGF	Trombosit Keratinosit Makrofaj Endotel Hücre Fibroblast	↑	İnflamasyon Granülasyon doku formasyonu Reepitelizasyon Matriks formasyonu ve remodeling	↓
VEGF	Trombosit Nötrofil Makrofaj Endotel Hücre Düz Kas Hücre Fibroblast	↑	Granülasyon doku formasyonu	↓
IL-1	Nötrofil Monosit	↑	İnflamasyon Reepitelizasyon	↑
	Makrofaj Keratinosit			
IL-6	Nötrofil Makrofaj	↑	İnflamasyon Reepitelizasyon	↑
TNF- $\alpha$	Nötrofil Makrofaj	↑	İnflamasyon Reepitelizasyon	↑

## **Diyabetin Yara İyileşmesine Etkileri**

Diyabetik ayak yaralarının çoğunluğu travma tarafından tetiklenir. Fakat yaralar çoğunlukla iyileşme konusunda başarısız olur ve hızla ve kolaylıkla kronik yaraya transforme olur. Diyabette iyileşme hem ekstrinsik hemde intrinsik faktörler tarafından inhibe edilir. Ekstrinsik faktörler koruyucu duyu kaybından tekrarlayan travmaya kadar nöropati, iskemi, enfeksiyon gibi durumları içerir. İntrinsik faktörler; defektif lökosit fonksiyonu, ECM ve büyüme faktörlerinin anormal üretimi, fibroblast aktivitesinin azalması, aşırı yada dengesiz yara preteazlarının üretimidir (30).

### ***Ekstrinsik Faktörler***

**1)Nöropati:** Gözden kaçan devam eden travma kadar koruyucu duyu kaybı da diyabetik ayak oluşturur. Periferik otonom hasar, azalmış inflamatuvar yanıt ve bozulmuş yara iyileşmesiyle birlikte küçük kan damarlarında nörojenik kontrolü bozar. Prekapiller vazokonstriksiyon kaybolabilir. Deri kapillerine akımı azaltarak ve venöz basıncı arttırarak arterio-venöz şantın artmasına neden olur. Kılcal damarlarda intravasküler basıncın artması ödem oluşumuna predispozan etki yapar. Ödem enfeksiyon riskini ve ayakkabı travmalarını arttırır (30).

Eğer nöropati (distal simetrik duysal nöropati) duyu kaybına neden olursa, yara riski fark edilmeyen travmalarla artacaktır (30).

**2)İskemi: Makrovasküler hastalık:** Ateroskleroz diyabette alt ekstremitayı özellikle diz altındaki büyük damarları tercih eder. Tipik olarak multisegmental ve simetriktrdir. Ayaktaki küçük arterioller ve venülleri tutma eğilimi yoktur (30).

**İskemi: Mikrovasküler hastalık:** Bazal membran kalınlaşması ve anormal endotel fonksiyonu vardır. Doku iskemisi, bozulmuş nörojenik kontrol ve kapiller trombozla kötüleşir (30).

**3) Enfeksiyon:** Diyabetik ayak ülserlerine nadir olarak neden olur. Fakat diyabetik ayak ülserlerini kolayca komplike eder. Kronik yaralar kaçınılmaz bir şekilde bakteriler tarafından kolonize olur. Bunlar kompleks polisakkaritlerden oluşan koruyucu bir tabakayla ve ECM proteinlerine bağlanmış kompleks biyofilm içinde bulunabilirler. Hangi noktada etkisi olduğu açık olmayan bu biyoyükün iyileşme sürecini olumsuz etkilediği açıktır ve şu mümkündür ki bakteriler bazen yara iyileşmesinde kolaylaştırıcı rol oynayabilir. Bununla birlikte gerçek süpervenöz

enfeksiyonlar özellikle nötrofilik vaskülitini indükleyerek doku hasarını ciddi şekilde kötüleştirir (30).

***İntrinsik faktörler:***

**1) Büyüme Faktörlerinin Biyoyararlanımındaki Değişiklikler:** Diyabetik ayak ülserlerinde büyüme faktörlerinin anormal ekspresyonu gözlenmiştir. (TGF- $\beta$ , IGF-1) Büyüme faktörleri glikolize olabilir ve FGF-2'nin glikasyonu tirozin kinaz reseptör bağlanmasını ve sinyal iletim yollarını aktif hale getirme kabiliyetini azalttığı gösterilmiştir. Büyüme faktörleri, sitokinler, ECM proteinleri ekstrasvasküler alana sızmış albumin ve fibrinojen gibi makromoleküllere bağlı olabilirler. Büyüme faktörleri ekstrasvasküler alana sızan  $\alpha$ -2 makroglobulin tarafından temizlenmiş olabilir (30).

**2) Doku Sıvısı Anormallikleri, Ekstrasellüler Matriks ve Doku Proteaz Aktivitesi:** Kronik yaradaki sıvı proliferasyon ve anjiogenezisi bloke ederken akut ve deneysel yaralardaki sıvı fibroblast, keratinositler ve endotelial hücrelerdeki invitro proliferasyonu stimüle eder. Bu nedenle granülasyon doku formasyonu azalmasıyla fibroblastlar defektif olur ve çeşitli büyüme faktörlerine olan duyarlılığı azalır. Kronik yaralardaki sıvı aynı zamanda aşırı miktarda matriks metalloproteinazlarını (MMPs) içerir. MMP'lerinin aşırı sentezi ya da MMP'leri ile doku inhibitör metalloproteinazları arasındaki dengesizlik, fibronektin, vitronektin gibi doku proteinlerinin istenmeyen bir şekilde bozunmasına neden olabilir. Aşırı MMP üretimine bağlı olsun yada olmasın yaşlanma yüzünden kronik yaradaki hücrelerin proliferasyonu ve hareket kapasiteleri bozulur (30).



## **APOPTOZİS VE YÜKSEK GLİKOZUN YOL AÇTIĞI HÜCRE HASARIYLA İLİŞKİSİ**

Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen, programlı hücre ölümüne apoptozis denir (32). Apoptotik ölüm sinyali alan hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar. Sitoplazma da yoğunlaşmaya başlar ve hücrenin boyutları küçülür. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçacıkların en büyük özelliği, fragmente olmuş nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi enflamasyon yönünde uyarmamasıdır. Apoptotik cisimcikler, yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yandaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır (32,33).

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciridir. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- I)** Apoptozun başlatılması,
- II)** Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- III)** Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- IV)** Fagositozdur (32).

### ***I) Apoptozun Başlatılması (Sinyal Üretici Yollar)***

Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce, genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyal ile karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya hücre dışından gelebilir (32).

#### ***a) Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller***

Hücreler çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksden gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptoza giderler. Çevreden gelen sinyallerin kesilmesi ile hücre ölümünün nasıl başladığı tam olarak bilinmemektedir. Büyüme faktörüne bağımlı hücrelerin kültürlerinde, büyüme faktörleri çekildiği zaman, hücrelerin metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre siklusunda duraklama olduğu izlenmiştir.

Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup “tumor necrosis factor receptor (TNFR)” ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptoz ile sınırlı değildir. Bir kısmı apoptoz oluştururken, bir kısmı proliferasyona neden olur. Bir kısmı ise her ikisini de oluşturur. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1’dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, “adaptör proteinlere” bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptoz için başlatıcı olan kaspazlara (örn: prokaspaz 8) bağlanırlar (32).

Hücre yüzey reseptörü Fas (CD95, APO-1) aracılığı ile oluşan apoptozda Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle (FADD- Fas adapter protein with a death domain) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini ( death inducing signal complex - DISC) oluşturur. Bu da prokaspaz 8 in aktifleşmesini sağlar (32,33).

Bir sitokin olan TNF’nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn: TNFR1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRADD- TNFR adapter protein with a death domain) ile etkileşir. TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8’i aktiveleştirerek apoptoza neden olur (32).

Sitotoksik T lenfositler (CTL) enfekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL’lerin ana görevi malign ve/veya virus ile enfekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir. Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL’ler sitoplazmalarında granzyme B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apoptoz oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler. Perforin, transmembran por oluşturucu bir proteindir. CTL’ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, sitoplazmalarına granzyme B salgırlar. Granzyme B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (32).

Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptoza neden olabilirler . Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptoz meydana getirirler (32).

### ***b) Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller :***

DNA hasarı, hücre içi  $Ca^{++}$  seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptoza götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir (32).

### ***II) Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu***

İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara **kaspaz** ("caspase"= cysteine –containing aspartate specific proteases) adı verilmektedir. İnsan hücrelerinde 10'dan fazla kaspaz tespit edilmiştir. Sağlıklı hücrelerde kaspazlar, enzimatik olarak inaktif ve aktif forma göre daha uzun bir polipeptid zincir olarak bulunurlar. Buna zimogen form denir. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlar olarak ikiye ayrılırlar. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile başlatıcı kaspazları aktive ederler. Aktive olan başlatıcı kaspazlar da, zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler (32).

İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bazı proteinler ayarlamaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bu grubu oluşturan proteinlerin bir kısmı antiapoptotik, bir kısmı ise proapoptotiktir. Bcl-2 proteini antiapoptotiktir. Mitokondri dış membranına ve apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (apaf 1)'e tutunmuştur. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller Apaf 1'in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c sitoplazmada apaf 1, kaspaz 9 ve ATP ile birleşir. Oluşan yapıya apoptozom denir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3' ü aktive ederek apoptoza neden olur (32,33).

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozuna neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin

transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni *bax* proteinini (Bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (32).

### ***III) Hücrede Oluşan Biyokimyasal Ve Morfolojik Değişiklikler***

#### ***Biyokimyasal Değişiklikler***

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

**1-DNA kırıklarının oluşması:** Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$  bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur.

**2-Hücre iskeletinin yıkılması:** Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan bir proteindir. Aktin filamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder.

**3-Hücre membran değişiklikleri:** Kaspazların etkisiyle hücre membranının asimetrisi bozulur. Plazmalemmanın iç yüzünde bulunan fosfatidilserin yer değiştirerek membranın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre membranlarında thrombospondin denilen adheziv bir glikoprotein ve bazı hücre adhezyon molekülleri (örn: ICAM 3) içerirler. Bütün bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilmelerini ve fagositozlarını sağlamaktadır. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerde oluşan çapraz bağlanmalar, membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar (32).

#### ***Morfolojik Değişiklikler***

Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler, büzüşürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirlerine yaklaştığı izlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller genel olarak sağlamdır. Bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikrofilaman kümeleşmeleri ve endoplazmik

retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu sanılmaktadır. Dilatasyona uğrayan sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluşturur. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar (32).

En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Çekirdek de hücre gibi büzülür. Bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar (32-34).

Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur (32-34).

#### ***IV) Fagositoz***

Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenirler (32).

#### **Yüksek Glikozun Yol Açtığı Hücre Hasarı**

Yüksek glikoz konsantrasyonları ya direkt olarak ya da apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK1) aracılığıyla mitojen activated protein kinase'ları (MAPK) aktive eder. Yüksek glikozun indüklediği oksidatif stres DNA hasarına neden olur ve p53 ilişkili mekanizmalarla apoptozisi indükleyebilir. Yüksek glikoz kalsiyum bağımlı bir proteaz olan calpaini aktive eder. Calpain kaspaz bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla apoptozisi başlatabilir (35).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE DENEYİN YAPILIŞI

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan 01.03.2012 tarihinde PAUDHEK-2012/015 numarasıyla onay alındı. Çalışmamız için gerekli hayvanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyleti Hayvanları Labaratuarından elde edildi. Çalışmamızda Wistar-Albino cinsi, sağlıklı, 18 adet erkek sıçan kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 230 gr (200–250 gr ) 20 haftalık sıçanlar rasgele seçilerek üç gruba ayrıldı. 1. grup kontrol (K grubu; n: 6), 2. grup diyabet oluşturulan grup (D grubu; n: 6), 3. Grup ise diyabet oluşturulan kordan kanı kök/progenitör hücre verilen grup (KH grubu; n: 6) olarak 3 eşit gruba ayrıldı.

Sıçanların tamamı çalışma süresince oda ısısında ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ),  $\%60\pm 5$  nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan laboratuar koşullarında takip edildi ve sıçanların istedikleri kadar yem ve suya erişmesi sağlandı.

Tüm sıçanların başlangıç ağırlıkları ve kan glikoz düzeyleri (KGD) ölçüldü. (Tablo 2) Kan glikoz düzeyi ölçümü kuyruk veninden elde edilen kandan bakıldı. Ölçüm için Optium Xceed marka glikometri ve Abbott Optium FreeStyle plus Kan Glikoz Test Çubukları kullanıldı.

### Sıçanlarda Streptozosinle Deneyleti Diyabetin Oluşturulması

Sıçanlarda deneyleti diyabet oluşturmak için streptozosin (STZ) (Sigma, St. Louis, MO, USA) kullanıldı. Litaratürde deneyleti diyabet oluşturmak amacıyla en sık kullanılan yöntem STZ'nin 50-60 mg/kg intraperitoneal (ip) enjeksiyonudur (36,37). Bu amaçla D grubu ve KH grubundaki her bir sıçan için verilmesi gereken doz miktarı hesaplandı. Daha sonra  $(-20)^{\circ}\text{C}$  de muhafaza edilen STZ çıkarıldı ve gerekli olan miktar hassas tartıda ölçülerek steril falkon tüp içerisine konuldu. Aliminyum folyoyla sarılı olarak soğuk zincir kurallarına uygun bir şekilde deneyleti hayvanları labaratuarına götürüldü. STZ taze olarak distile su içinde eritildi. Tek doz 50-60 mg/kg STZ ip olarak uygulandı.

STZ uygulamasından sonraki 3. gün sıçanların kuyruk veni kanlarından KGD ölçüldü. Önceki çalışmalar göz önüne alınarak KGD'i 250 mg/dl nin üzerinde olan sıçanlar diyabetli olarak kabul edildi (36,37). Diyabet oluşturulduktan sonra tüm

sıçanların sağ ön ayaklarına steril punch biyopsi kullanılarak yaklaşık 5 mm çapında yara yeri oluşturuldu ve sekonder iyileşmeye bırakıldı. Diyabet olup ekstremitte yarası oluşturulan sıçanlardan 6 tanesine (KH grubu)  $0,5 \times 10^6$  kordon kanı kökenli CD 34+ hematopoetik kök hücre lokal olarak uygulandı.

### **Umblikal Kordon Kanından CD34+ Hücre Eldesi**

Denizli Devlet Hastanesi Kadın Doğum Hastalıkları biriminde gerekli bilgilendirmenin yapıldığı ve yazılı izinlerin alındığı sağlıklı vericilerden heparinlenmiş bir enjektöre 20 ml kordon kanı alınarak Pamukkale Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Ana bilim Dalı'na getirildi.

Prensip: İzole edilmesi istenen hücrelere karşı monoklonal antikolar ve magnetik nanopartiküller kullanılarak mıknatıs yardımıyla pozitif hücre seleksiyonu yapılır. Kordon kanından CD34 pozitif seleksiyonda Easysep yöntemi uygulandı. Bunun için EasySep magnet ( Stemcell catalog: 18000) ve EasySep Human CD34 Positive Selection Kit (Stemcell, Lot: 12B43208) kullanıldı. Aşağıda basamaklar halinde verilen işlemlerin tamamı laminar flow içerisinde yapıldı.

1) 12x75 mm boyutlarında polystyrene bir tüpe ilk olarak 4 ml ficol (Ficoll-Paque Plus, Stemcell Technologies, Lot: 12B43208) konuldu. Daha sonra üzerine tüpün cidarından sızdırarak 2 ml kordon kanı eklendi. Ficolle kanın karışmaması için kordon kanını mümkün olduğu kadar yavaş koymaya özen gösterildi.

2) Santrifüjün (Nüve NF 800 R) ilk hızlanma ve son yavaşlama hızları sıfırlanmış olarak kullanılacak şekilde 3250 rpm de 4 °C 'de 25 dk. soğutmali santrifüjde dik olarak santrifüj edildi. Burada kullanılan kan ve ficoll oda sıcaklığındaydı.

3) Santrifüj sonrası dibe çöken kırmızı hücrelerle plazma arasında kalan BULUT (buffycoat) kısmı toplandı.

4) Tüpe konan hücre süspansiyonu üzerine her 1 mL hücre için 100 µL pozitif seleksiyon kokteyli ilave edilerek pipetajla iyice karıştırıldı. Karışım oda ısısında 15 dakika süreyle inkübe edildi.

5) Hücre-monoklonal antikor karışımı üzerine magnetik nanopartiküller her 1 mL hücre için 50 µL ilave edilerek , iyice karıştırıldı ve 10 dakika süreyle oda

ısısında inkübe edildi. ( Magnetik nanopartiküller hiç kullanılmamış bir pipetle nazik bir şekilde aşağı ve yukarı doğru 4-5 kez karıştırıldı.)

6) 10 dk sonunda tüp içerisindeki mix süspansiyon recommend medium (Stemcell Technologies Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lot: 12G44761), ( PBS + % 2 FBS 1 mikromolar EDTA, Ca ve Mg (-)) ile 2,5 ml ye tamamlandı ve bir pipetle nazik bir şekilde yukarı ve aşağı doğru 3-4 kez karıştırıldı. Sonra tüp miknatısın içerisine kapaksız olarak konuldu ve 5 dakika süreyle bekletildi.

7) Süpernatant atıldı ve tüpte yalnızca seleksiyonu istenen hücrelerin kalması sağlandı. Tüp ve miknatıs birlikte 2-3 sn süreyle ters pozisyonda tutuldu. Asla sallanmadı. Sonra tekrar düz pozisyona getirildi.

8) Tüp miknatıstan çıkarıldı ve 2,5 mL kültür mediumu ilave edildi. Elde edilen karışım pipetle 3-4 kez karıştırılıp miknatısa tekrar konuldu ve 5 dakika süreyle beklenildi.

9) 6, 7, 8. basamaklar tekrar edildi. 7. basamak bir kez daha tekrar edildi. Böylece tüpte kalan hücreler en az iki kez kültür solüsyonu ile yıkanarak uygun hücre süspansiyonu elde edilmiş oldu. Bu işlemler sonrasında pozitif seleksiyonla elde edilen hücreler kullanıma hazır hale gelmiş oldu.

Bu aşamalar sonrasında hücre elde edilemediğini görmek için tüpe 1 ml recommend medium ekleyip nazikçe pipetajlandı. Daha sonra Olympus CX31 marka faz-kontrast mikroskopta Makler kamera kullanılarak kök hücreler sayıldı.

### **Kesitlerin Alınması ve Hazırlanması**

Sıçanların yara oluşumundan sonra 10. günde ağırlıkları ve KGD' leri tekrar ölçüldü. Sıçanlar 30 mg/kg ketamine hydrochloride ve 6 mg/kg % 2 lik xylazine hydrochloride kombinasyonunun ip olarak uygulanmasıyla sağlanan genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildiler. Yara bölgesinden deri dokuları alınıp formaldehitte (Tekkim Formaldehit, Lot: 070312510) tespit edildi. Işık mikroskop takip yöntemi uygulanarak parafine gömülen bloklardan, Leica RM-2125 Rotary Microtom cihazı ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler lizinli lamlara (Marienfeld Laboratory Glassware Histobond (+), Lot: 23573 ) alındı. Kesitlere daha sonra Terminal deoksinükleotidil-transferaz aracılı dUTP nick-and labelling (TUNEL) yöntemi, TGF- $\beta$  ,PDGF, VEGF , FGF, IL-1 ,TNF- $\alpha$  ve kaspaz 3 aktivasyonlarını



belirlemek için immunohistokimyasal yöntem uygulandı. Kesitler daha sonra Olympus BX-51 ışık mikroskobu ve Olympus PP72 Digital Kamera ataçmanı ile incelenerek resimlendi.

### **Fiksatif Solüsyonunu Hazırlama**

% 37'lik formaldehitden % 10'luk fiksatif solüsyonu hazırlamak için kullanılan formül = İstenilen konsantrasyon/bilinen konsantrasyon X Elde edilmek istenen miktar (38).

### **Doku Takip Yöntemi**

Doku takibinde kullanılan ksilen ve etil alkol Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır.

- a) Alınan dokular formaldehitde 1 gece bekletildi.
- b) Akarsuda 30 dakika yıkandı.
- c) %70'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- d) %80'lük etil alkolde 1 saat bekletildi.
- e) %90'lük etil alkolde 1 saat bekletildi.
- f) %100'lük etil alkolde 1 saat bekletildi.
- g) Ksilende 1 saat bekletildi.
- h) Ksilende 1 saat bekletildi.
- i) Parafinde 1 saat bekletildi.
- j) Parafinde 1 saat bekletildi.
- k) Dokulara parafinle gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

### **İmmunohistokimyasal Boyama**

Doku takip yöntemi tamamlanan deri bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µ' luk kesitler alındı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir: Reaktifler için Histostain-Plus kit (Lot: 1018708A, İnvitrogen) kullanılmıştır.

- a) Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
- b) Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 saat bekletildi.

- c) Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
- d) Kesitler sırasıyla %100, %96, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
- e) Alkolden çıkan preparatlar akarsuda yıkanarak 10 dakika Phosphate buffered saline (PBS)'de bırakıldı. Bu aşamada kesitler PAP pen kullanılarak işaretlendi.
- f) Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
- g) Lamlar 3 defa 2 dakika PBS ile yıkandı. Üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu (reagent A) ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- h) Kesitler üzerine uygun primer antikolar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikolar şu şekildeydi: TGF- $\beta$ (1:100, Lot: F2512, Santa Cruz Biotechnology), PDGF(1:100, Lot: E1311, Santa Cruz Biotechnology), VEGF(1:100, Lot: F1312, Santa Cruz Biotechnology) , FGF(1:100, Lot: A0512, Santa Cruz Biotechnology), IL-1(1:100, Lot: F2212, Santa Cruz Biotechnology) ,TNF- $\alpha$ (1:100, Lot: F2211, Santa Cruz Biotechnology) ve Kaspaz 3(1:10, Lot: 1992267, Millipore) dür. Bütün primer antikolar PBS ile dilüe edilmiştir.
- i) Kesitler, PBS ile yıkandıktan (2dkX3) sonra primer antikolarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikolarla (Reagent B) 20 dakika muamele edilmiştir.
- j) Tekrar PBS ile yıkanması (2dkX3) yapılan kesitlere, biotinlenmiş-sekonder antikolarla kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) (Reagent C) 10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- k) Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan (2dkX3) sonra kromojen boyası DAB-Plus Substrate Kit (Lot: 1018723A, İnvitrogen) ile 3-10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- l) Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merks Harris) ile zıt boyama yapılmıştır.
- m) Kesitler akarsu da yıkanmış ve sırasıyla %70, %80, %90, %100'lük etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilmiştir.
- n) Dokuların üzeri entellan ile kapatılmıştır.

Boyanmanın değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanıldı.

(+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (/+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok, (/): o yapıya rastlanmamıştır

### **TUNEL Boyama**

Her gruptan 5 µm kalınlıktaki kesitler lizinli lama alındı. Apoptoz için ApopTag Plus Peroxidase İn Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Lot:1951838, USA) kullanıldı.

- 1) Kesitler önce 3 kez değiştirilen ksilende 15'er dk bekletildiler ve deparafinize edildiler.
- 2) 2 kez %100'lük alkolde 5'er dk tutuldular.
- 3) %95'lik alkolde 3 dk tutuldular.
- 4) %70'lik alkolde 3 dk tutuldular.
- 5) PBS solüsyonunda 5 dk yıkandılar.
- 6) Proteinaz K solüsyonunda oda ısısında 15 dk tutuldular.
- 7) 2 kez değiştirilmiş distile suda 2'şer dk yıkandılar.
- 8) %3'lük Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'de oda ısısında 5 dk bekletildi.
- 9) PBS solüsyonunda 5-10 dk yıkandılar.
- 10) Equilibration Buffer içinde oda ısısında 5 dk inkübe edildiler.
- 11) Kesitlere TdT enzimi uygulanarak etüvde 37°C de nemli ortamda 1 saat tutuldular.
- 12) Kesitler daha sonra Working Stop /Wash Buffer solusyonunda 15 sn çalkalandılar ve 10 dk oda ısısında inkübe edildiler.
- 13) 3 Kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 1'er dk yıkandılar.
- 14) Oda ısısındaki kesitlere anti- digoxigenin peroksidaz damlatılarak üzerleri plastik cover sliple kaplandı ve oda ısısında nemli ortamda 30 dk bekletildiler.
- 15) 4 Kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda oda ısısında 2'şer dk yıkandılar.
- 16) Kesitlerin üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildiler.
- 17) Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1'er dk yıkandı ve son olarak distile suda 5 dk tutuldular.

18) Zıt boyama için preparatlar %1'lik metilgreen (Sigma-Aldrich, Lot: MKBK7934V) içerisinde 10 dk bekletildi.

19) 3 kez değiştirilmiş distile suda 30'ar saniye çalkalandılar.

20) Kesitler 3 kez değiştirilmiş %100 lük butenolden hızlı bir şekilde çalkalanarak geçirildiler.

21) Ksilen I de 2 dk bekletildi.

22) Ksilen II de 2 dk bekletildi.

23) Ksilen III de 2 dk bekletildi.

24) Kesitler en son olarak kapatma mediumu damlatılarak kapatıldılar.

**Apopitotik indeks:** Apopitotik indeksin tespiti için ışık mikroskopunda x40 büyütmede rasgele seçilen 10 alanda TUNEL yöntemiyle pozitif olarak işaretlenen apopitotik nükleuslar sayılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı: Apopitotik indeks=apopitotik nükleus sayısı / toplam hücre sayısı x100

### **İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER**

Sıçanların ağırlıklarının ve KGD lerinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, fark yaratan grubun belirlenmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Yapılan immünohistokimyasal boyamalarda epitel hücreleri, bağ dokusu hücreleri, yağ bezi ve ter bezi hücreleri sayıldı, pozitif boyanan hücrelerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, gruplar arasındaki farklar Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. TUNEL pozitif hücrelerde apopitotik indeks hesaplanıp istatistiksel olarak ortalamaları alındı. Veriler SPSS 17,0 programı ile analiz edildi. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

## BULGULAR

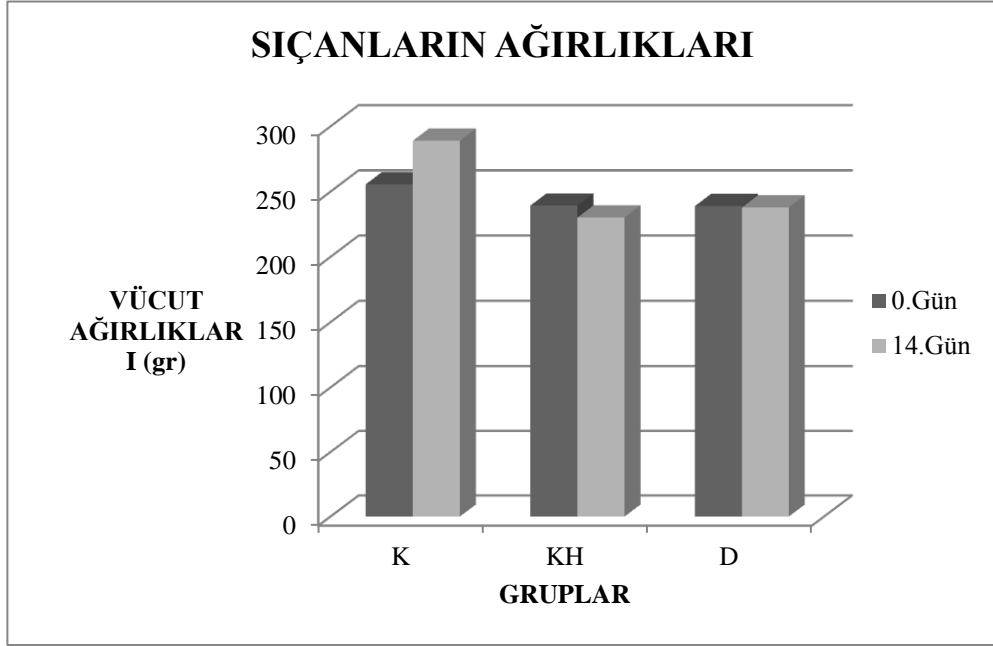
### SIÇANLARIN DİYABET BULGULARI

Bütün sıçanların başlangıç ağırlıkları ve dekapitasyon öncesi son ağırlıkları (14. Gün) Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Deneyde kullanılan sıçanların ağırlıkları ve kan glikoz değerleri

Sıçan no:	Gruplar	Ağırlıklar (gr)		Kan Glukoz Değerleri (mg/dl)		
		0. Gün	14. Gün	0. Gün	3. Gün	10. Gün
1	K	270	306	93	108	88
	KH	237	217	90	431	290
	D	265	242	122	250	309
2	K	231	253	160	110	100
	KH	282	278	76	251	344
	D	190	230	79	266	254
3	K	306	350	68	92	83
	KH	253	229	94	338	364
	D	237	236	97	250	264
4	K	225	270	87	118	87
	KH	201	216	85	398	434
	D	264	244	101	297	450
5	K	237	267	73	102	74
	KH	232	225	80	372	358
	D					
6	K	265	288	64	79	72
	KH	231	216	75	354	450
	D					
ORT. (±SD)	K	255.6±30.7	289±35	90.8±35.6	101.5±14	84±10
	KH	239.3±26.8	230±24	83.3±7.6	357.3±61.6	373.3±59
	D	239±35.14	238±6.3	99.7±17.6	265.7±22.1	319.2±90

Sıçanların başlangıç ağırlıkları K grubu  $255,6\pm 30,7$ gr, KH grubunun  $239,3\pm 26,8$ gr, D grubunun ise  $239\pm 35,1$ gr olarak hesaplandı (Tablo 2) . K, KH, D gruplarındaki sıçanların başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis testi) (Şekil 6)



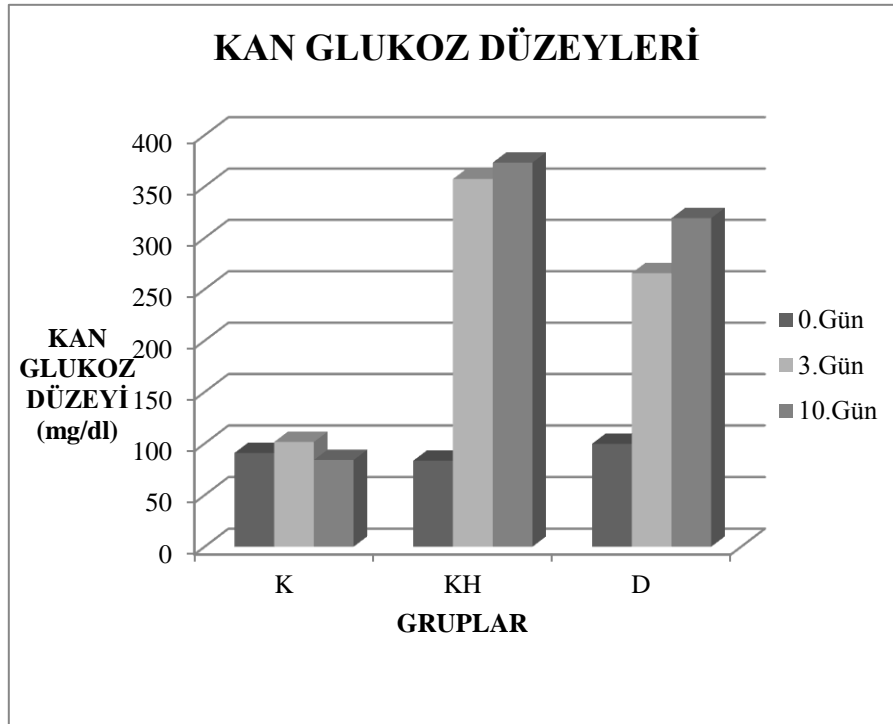
**Şekil 6:** K, KH, D gruplarının başlangıç ağırlıklarının (0. Gün) ve son ağırlıklarının (14. Gün) ortalamalarının grafiği

Dekapitasyon öncesi sıçanların son ağırlıkları (14. Gün), K grubunun  $289\pm 35$ gr, KH grubunun  $230\pm 24$ gr, D grubunun ise  $238\pm 6,32$  gr olarak hesaplandı (Tablo 2). K, KH, D gruplarının son ağırlıkları arasında anlamlı bir fark vardı ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis testi).

KH ve D grubu sıçanların ağırlıkları K grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldı. ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney U testi) . Fakat KH ve D grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktu ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney U testi) (Şekil 6)

Diyabet oluşturulan KH ve D grubundaki sıçanların deney süreci sonunda vücut ağırlıklarını arttırmadıkları ayrıca başlangıç ağırlıklarına göre vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney U testi) (Şekil 6).

Deneyin başlangıcında (0. Gün) sıçanların ilk KGD K grubunda  $90.8 \pm 35.6$  mg/dl, KH grubunda  $83.3 \pm 7.6$  mg/dl, D grubunda  $99.7 \pm 17.6$  mg/dl olarak ölçüldü. STZ ile diyabet oluşturulduktan sonraki 3. gündeki KGD K grubunda  $101.5 \pm 14$  mg/dl, KH grubunda  $357.3 \pm 61.6$  mg/dl , D grubunda  $265.7 \pm 22.1$  mg/dl olarak ölçüldü. 10. gündeki KGD K grubunda  $84 \pm 10$  mg/dl, KH grubunda  $373.3 \pm 59$  mg/dl , D grubunda  $319.2 \pm 90$  mg/dl olarak ölçüldü (Tablo 2). Deneyin başlangıcında K, KH ve D gruplarındaki sıçanların KGD arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis testi ) (Şekil 7). Diyabet oluşumundan sonraki 3. Gün ve 10. Gün K, KH ve D gruplarındaki sıçanların kan glukoz düzeyleri arasında anlamlı bir fark vardı. ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis testi )



**Şekil 7:** K, KH ve D gruplarının 0. Gün, diyabet oluşturulmasından sonraki 3. Gün ve 10. Günlerde ölçülen KGD ortalamalarının grafiği

KH ve D gruplarındaki sıçanların 3. Gün ve 10. Gün KGD K grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney U testi) (Şekil 7). Ve kan glukoz düzeyleri KH ve D gruplarının her ikisinde de 250 mg\dl

nin üzerindeydi. KH ve D grupları arasında 3. ve 10. gün KGD arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0,05$ , Mann-Whitney U testi) (Şekil 7).

## **İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE TUNEL BOYAMA SONUÇLARI**

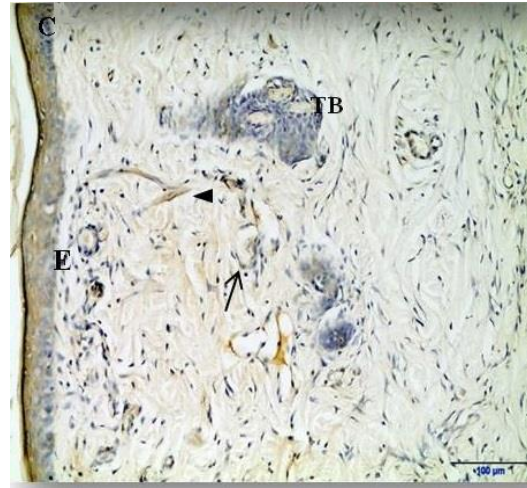
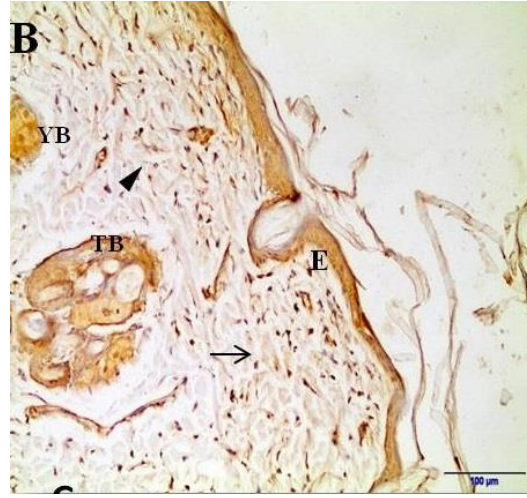
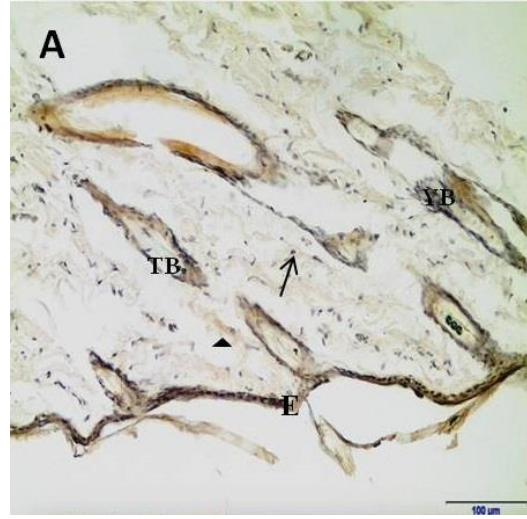
### **Kaspaz 3**

K grubunda epidermis 2-3 sıralı haldeydi ve boyanma orta dereceli pozitif. Çekirdek boyanması çok azdı. Yağ dokusunda da boyanma orta derecede pozitif. Boyanma bağ dokusu liflerinde çok zayıf olarak izlendi (Şekil 8) (Tablo 3).

D grubunda epidermis kaspaz 3 açısından yoğun pozitif. Sitoplazma ve çekirdeklerin boyandığı ve boyanmanın yaygın olduğu izlendi. Bağ dokusu hücreleri negatif ve zayıf pozitif reaksiyon gösterirken çekirdekleri negatifti. Kıl kökünde yer alan yağ doku hücreleri orta derecede boyanma göstermişti. Çekirdeklerinde pozitif reaksiyon izlendi. Boyanma yaygındı (Şekil 8) (Tablo 3).

KH grubunda çok sıralı epidermiste boyanma orta derecede pozitif. Çekirdek boyanması yoktu ve çok azdı. Apikale doğru boyanma artmıştı. Bağ doku liflerinde boyanma çok zayıftı. Bağ doku hücrelerinin çekirdeklerinin boyanması çoğunluğunun negatifti. Yağ bezi hücrelerinde boyanma yoğundu. Çekirdek boyanması az da olsa izlendi (Şekil 8) (Tablo 3).





**Şekil 8:** K, D ve KH gruplarında Kaspaz 3 dağılımı ve yerleşimi

A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis (E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri (ok başı), yağ bezi (YB), ter bezi (TB). İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyası.

**Tablo 3:** K , D ve KH deneklerin deri dokusunda Kaspaz-3 yerleşimi ve ekspresyonu

	Epidermis	Bağ dokusu Lifleri	Bağ Dokusu hücreler	Yağ bezleri	Ter bezleri
K	++*	+	++	+**	+
D	+++	+++	+++	+++	+++
KH	++*	+	+	+**	+

\*Stratum bazale tabakası negatif olarak izlendi

\*\* Boyanma yalnızca sitoplazmik çekirdek boyanması izlenmedi.

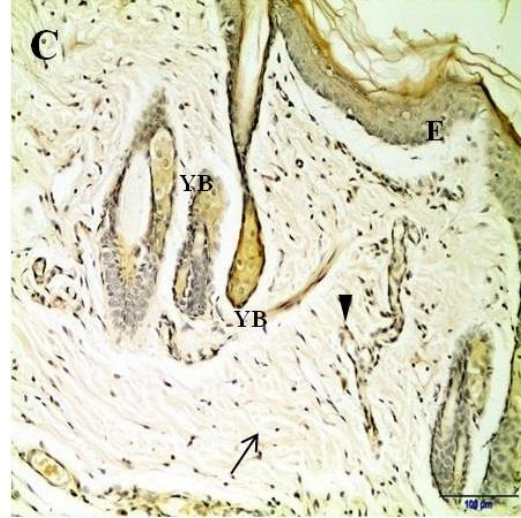
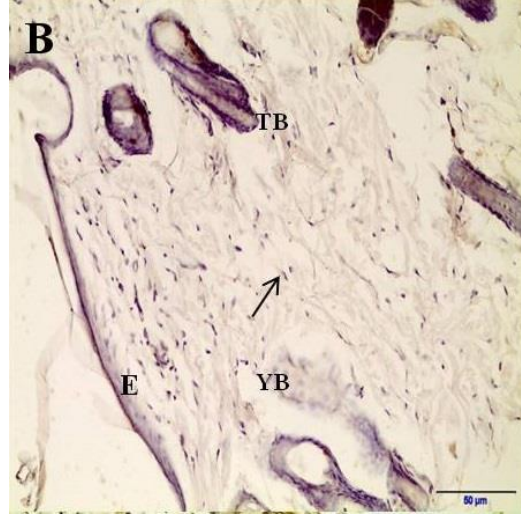
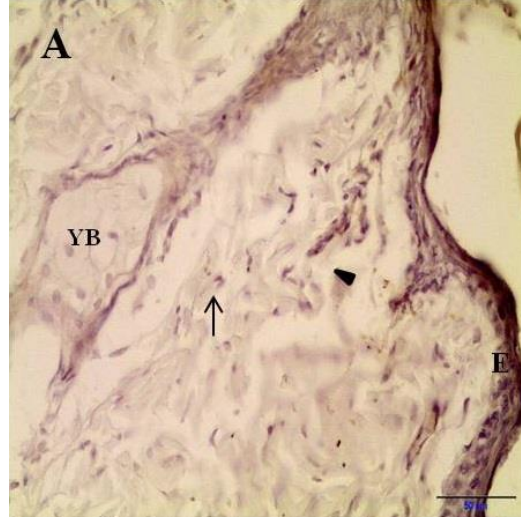
K, D, KH grupları arasında epidermis, bağ dokusu ve yağ bezinde kaspaz 3 pozitif hücre sayısında anlamlı fark bulundu. Pozitif hücre sayısı D grubunda anlamlı olarak daha fazla bulundu. KH ve D grupları ve K ve D grupları kendi aralarında ter bezi pozitifliği konusunda herhangi bir anlamlılık bulunamadı. Bağ dokusu pozitifliği yönünden K ve KH grupları arasında anlamlı bir fark vardı ( $p<0,05$ ).

#### **FGF**

K grubunda epidermis, bağ dokusu hücre çekirdekleri, yağ bezi ve bağ dokusu lifleri zayıf pozitif boyanarak izlendi (Şekil 9) (Tablo 4).

D grubunda epidermiste, yağ bezi hücrelerinde ve bağ dokusu hücre çekirdeklerinde boyanma negatifti. Bağ dokusu liflerinde zayıf boyanma dikkati çekti (Şekil 9) (Tablo 4).

KH grubunda epidermiste boyanma apikalde yoğun olarak izlendi. Pozitif boyanma gösteren bağ dokusu hücre çekirdekleri ve yağ bezi hücre çekirdekleri dikkati çekti (Şekil 9) (Tablo 4).



**Şekil 9:** K, D ve KH gruplarında FGF dağılımı ve yerleşimi.

A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis ;(E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri; (ok başı), yağ bezi; (YB), ter bezi; (TB). İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyası.

**Tablo 4:** K , D ve KH deneklerin deri dokusunda FGF yerleşimi ve ekspresyonu

	Epidermis	Bağ Dokusu Lifleri	Bağ Dokusu Hücreler	Yağ bezleri	Ter bezleri
K	+,+/-	-	-	+,+/-	+,+/-
D	-	-	-	-	-
KH	++	+	+++	+++	+

K, D, KH grupları arasında epidermis, bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde FGF pozitifliği, anlamlı olarak farklı bulundu. KH ve D grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında epitel, bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde FGF pozitifliği anlamlı olarak farklıydı. FGF (+) hücreler KH grubunda daha fazla bulundu. K ve D grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında; FGF (+) hücreler K grubunda daha fazlaydı. Bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezi FGF pozitifliği anlamlı değildi. K ve KH grupları karşılaştırıldığında epidermis, bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezi FGF pozitifliği KH grubunda daha fazlaydı ( $p<0,05$ ).

#### **IL-1**

K grubunda epidermis, bağ dokusu ve yağ bezinde pozitif reaksiyon gözlemlendi. Epidermiste ve yağ bezlerinde boyanma yoğunken, dermiste bağ dokusu liflerinin daha zayıf reaksiyon gösterdiği belirlendi. Bu grupta da boyanma sitoplazmik ve nükleerdi (Şekil 10) (Tablo 5).

D grubunda epidermiste hücre sitoplazması ve çekirdekleri, bağ doku lifleri ve çekirdekleri yoğun pozitif boyanmıştı. Yağ bezi hücrelerinde de yoğun pozitif boyanma izlendi. Boyanma sitoplazmik ve nükleerdi (Şekil 10) (Tablo 5).

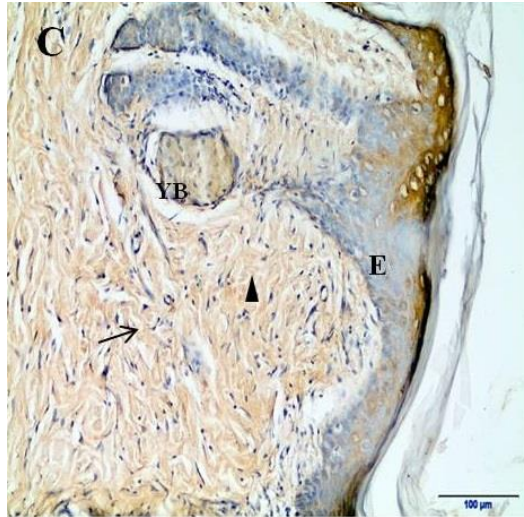
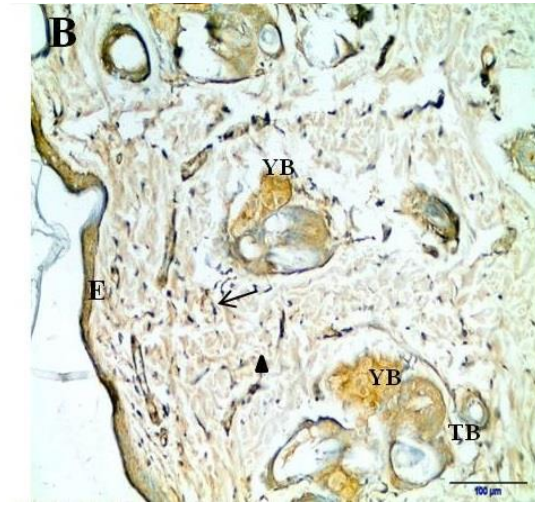
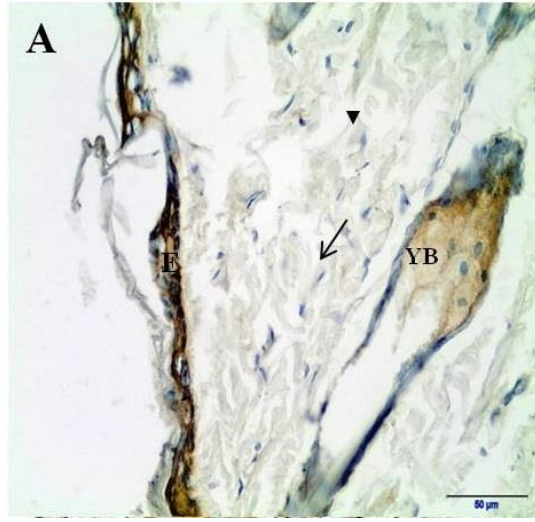
KH grubunda boyanma K grubuna yakın olarak izlendi. Ancak hem epidermiste hem de yağ bezinde yer yer negatif boyanma dikkati çekti. Ayrıca dermiste bağ dokusu liflerinin K grubunda yoğun boyandığı izlendi (Şekil 10) (Tablo 5).

**Tablo 5:** K, D ve KH deneklerin deri dokusunda IL-1 yerleşimi ve ekspresyonu

	Epidermis	Bağ Dokusu Lifleri	Bağ Dokusu Hücreleri	Yağ bezleri	Ter bezleri
K	+++	+ / +++	+	+++	+++
D	+++	+++	+++	+++	+++
KH	+++	+++	+++	+++	+++

K, D, KH grupları arasında epidermis, bağ dokusu ve ter bezinde IL-1 pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu. Yağ bezi pozitif hücre varlığı anlamlı değildi. KH ve D grupları kendi aralarında bağ dokusunda IL-1 pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu. Farklılığın nedeni KH grubunda daha fazla pozitif hücre vardı. Epidermiste ve ter bezinde IL-1 pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı. K ve D grupları arasında bağ dokusu, ter bezi IL-1 pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu. D grubunda bağ dokusu pozitifliği daha fazlayken, K grubunda ter bezi pozitifliği daha fazla bulundu. Epidermiste IL-1 pozitifliği anlamlı bir farklılık bulunmadı. K ve KH grupları karşılaştırıldığında epidermiste IL-1 pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu ( $p < 0,05$ ). Bağ dokusu ve ter bezi IL-1 pozitifliği konusunda anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p > 0,05$ ).





**Şekil 10:** K, D ve KH gruplarında IL-1 dağılımı ve yerleşimi.

A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis (E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri (ok başı), yağ bezi (YB), ter bezi (TB). İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyası.

## TGF-β

K grubunda epidermiste, yağ bezi hücrelerinde kuvvetli pozitif reaksiyon gösterirken dermiste bağ dokusu lifleri orta ve zayıf derecede boyanmıştı. Ter bezlerinde de pozitif reaksiyon vardı (Şekil 11) (Tablo 6).

D grubunda epidermiste, yağ bezi hücrelerinde kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. Bağ dokusu hücrelerinde ve liflerinde ve ter bezlerinde de zayıftan orta dereceye değişen t pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 11) (Tablo 6).

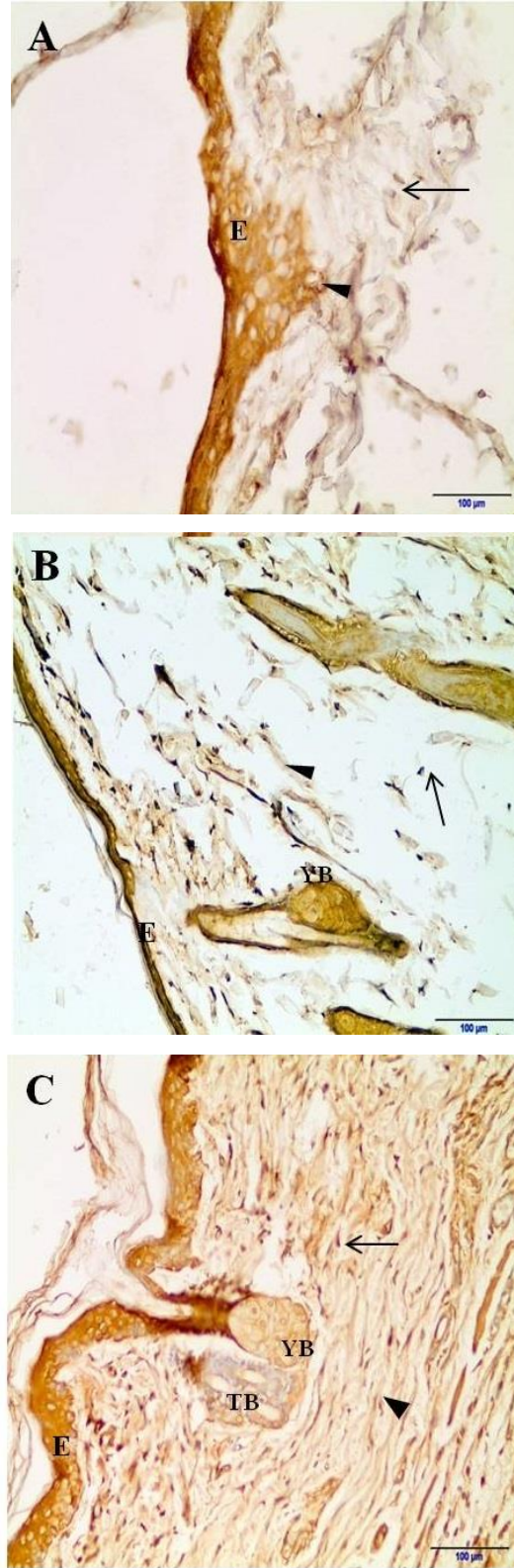
KH grubunda epidermis, bağ dokusu lifleri, yağ bezi hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon gösterirken, ter bezlerinin bazıları ve dermisteki bağ dokusu hücrelerinin bazıları pozitif, bazılarında negatif boyanma izlendi (Şekil 11)(Tablo 6).

**Tablo 6:** K, D ve KH deneklerin deri dokusunda TGF-β yerleşimi ve ekspresyonu

	Epidermis	Bağ Dokusu Lifleri	Bağ Dokusu Hücreler	Yağ bezleri	Ter bezleri
K	+++	-/+++	-/+++	+++	++
D	+++	+ /+++	+ /+++	+++	++
KH	+++	+++	+++	+++	+++

K, D, KH grupları arasında epidermis, bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde TGF-β pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu. KH ve D grupları arasında epitel, bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde TGF-β pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı (  $p < 0,05$ ). Epidermis, bağ dokusu ve yağ bezinde KH grubunda daha fazla pozitif hücre izlenirken, D grubunda ter bezinde daha fazla pozitif hücre bulundu. K ve D grupları arasında bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde TGF-β pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı. D grubunda bağ dokusunda daha fazla pozitif hücre izlenirken, K grubunda yağ bezi ve ter bezinde daha fazla pozitif hücre bulundu. Epidermiste anlamlı bir farklılık yoktu. K ve KH grupları arasında bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde TGF-β pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı. Bağ dokusu ve yağ bezinde KH grubunda daha fazla pozitif hücre izlenirken, ter bezinde K

grubunda daha fazla pozitif hücre bulundu. Epidermisde gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu (  $p>0,05$ ).



**Şekil 11:** K, D ve KH gruplarında TGF- $\beta$  dağılımı ve yerleşimi.

A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis (E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri (ok başı), yağ bezi (YB), ter bezi (TB). İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyası.



### TNF- $\alpha$

K grubunda epidermis, bař dokusundaki fibriller ve hücreler, ter ve yağ bezleri orta derecede pozitif. Reaksiyon sitoplazmik olup çekirdekte boyanma izlenmedi (Şekil 12) (Tablo 7).

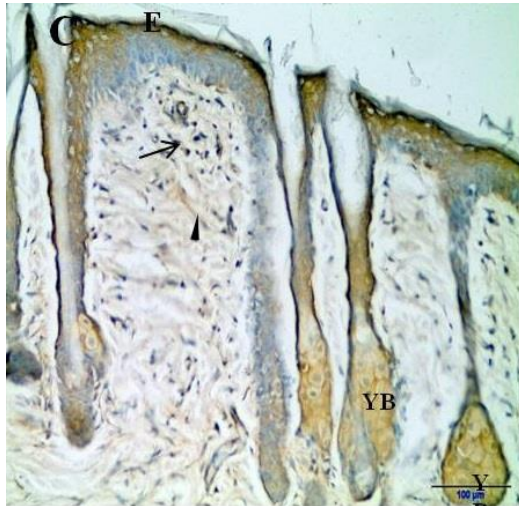
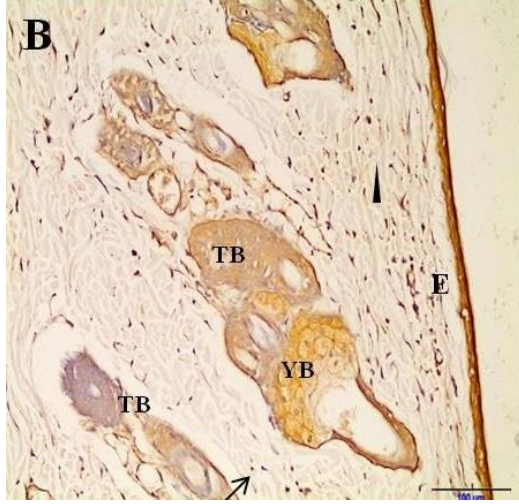
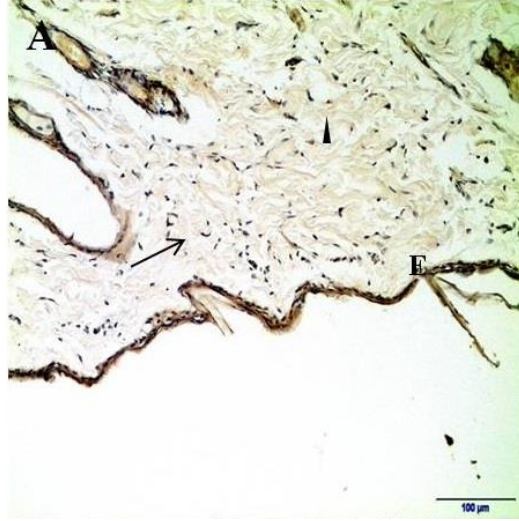
D grubunda epidermiste, yağ bezi ve ter bezi hücrelerinde pozitif reaksiyon gözleendiği izlendi. Reaksiyon ter ve yağ bezlerinde sitoplazmik. Çekirdek boyanması izlenmedi. Epidermisteki hücre çekirdeğinde de pozitif reaksiyon vardı. Bař dokusu lifleri ve hücrelerinde reaksiyon zayıf pozitif ve negatif olarak izlendi (Şekil 12) (Tablo 7).

KH grubunda epidermis üst katmanlarında boyanma izlenirken, bazal katmanlarda boyanmanın negatif olduğu dikkati çekti. Ter ve yağ bezlerinde kuvvetli boyanma izlenirken baş dokusu liflerinde ve hücrelerinde zayıf boyanma izlendi (Şekil 12) (Tablo 7).

**Tablo 7:** K, D ve KH deneklerin deri dokusunda TNF- $\alpha$  yerleşimi ve ekspresyonu

	Epidermis	Bař Dokusu Lifleri	Bař Dokusu Hücreler	Yağ bezleri	Ter bezleri
K	+++	++	++	++	++
D	+++	-/+	-/+	+++	+++
KH	+++	+	+	+++	+++

K, D, KH grupları arasında epidermis, baş dokusu, yağ bezi ve ter bezinde TNF- $\alpha$  pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu. KH ve D grupları arasında epidermis, baş dokusu ve yağ bezinde TNF- $\alpha$  pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı. D grubunda anlamlı olarak daha fazla pozitif hücre vardı. Ter bezinde anlamlı bir farklılık yoktu. K ve D grupları arasında baş dokusu, yağ bezi ve ter bezinde TNF- $\alpha$  pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı. Bař dokusunda D grubunda daha fazla pozitif hücre izlenirken, yağ bezi ve ter bezinde K grubunda daha fazla pozitif hücre bulundu. Epidermis pozitifliği anlamlı değildi. K ve KH grupları arasında epidermis, baş dokusu ve ter bezinde TNF- $\alpha$  pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı ( $p < 0,05$ ). Epidermis, baş dokusu ve ter bezinde K grubunda pozitif hücre sayısı daha fazlaydı. Yağ bezi pozitifliği anlamlı değildi ( $p > 0,05$ ).



**Şekil 12:** K, D ve KH gruplarında TNF- $\alpha$  dağılımı ve yerleşimi.

A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis; (E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri; (ok başı), yağ bezi; (YB), ter bezi; (TB). İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyası.

## PDGF

K grubunda epidermis tabakası kuvvetli pozitif reaksiyon gösterirken, bağ dokusu lifleri, zayıf pozitif. Ter ve yağ bezleri orta derecede pozitif boyanma gösterdi. Çekirdek boyanması izlenmedi (Şekil 13) (Tablo 8).

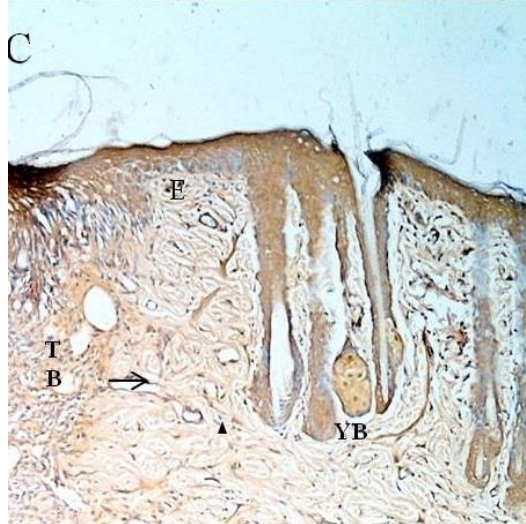
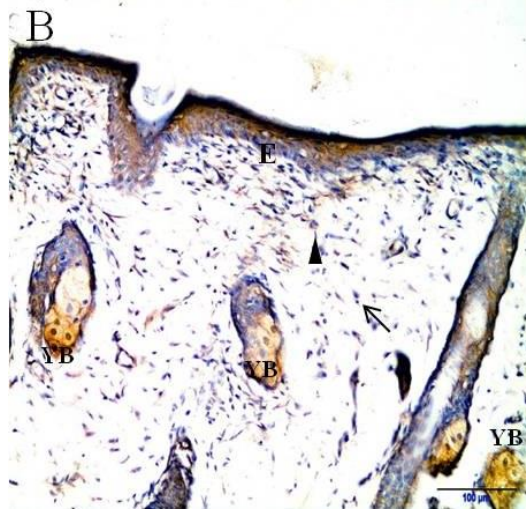
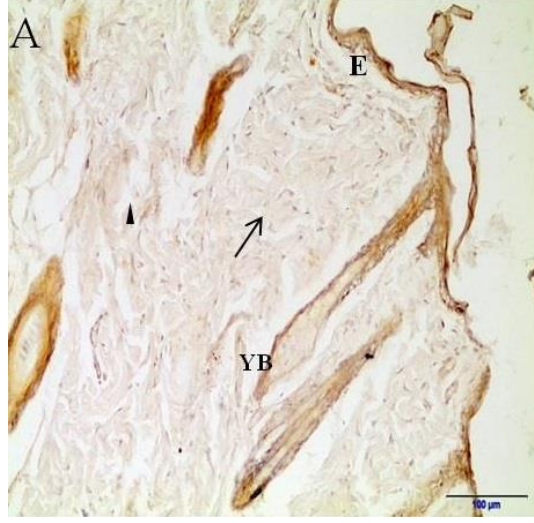
D grubunda epidermis bazalde negatif apikale doğru pozitif reaksiyon gösterdi. Yağ ve ter bezleri hücrelerinin bazıları orta derecede bazılarında da zayıf boyanma gözlemlendi. Bağ dokusu lifleri ve hücreleri zayıf pozitif (Şekil 13) (Tablo 8).

KH grubunda epidermis, bağ dokusu lifleri ve hücreleri, ter ve yağ bezleri kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. Boyanma sitoplazmik ve nükleerdi (Şekil 13) (Tablo 8).

**Tablo 8:** K, D ve KH deneklerin deri dokusunda PDGF yerleşimi ve ekspresyonu

	Epidermis	Bağ Dokusu Lifleri	Bağ Dokusu Hücreler	Yağ bezleri	Ter bezleri
K	+++	+	++	++	++
D	-/+++	-/+	-/+	+++	++,+
KH	+++	+++	+++	+++	+++

K, D, KH grupları arasında bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde PDGF pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu. Fakat epidermis hücrelerinde anlamlı bir farklılık yoktu. KH ve D grupları arasında bağ dokusu ve ter bezinde PDGF pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı. KH grubunda anlamlı olarak daha fazla pozitif hücre vardı. K ve D grupları arasında bağ dokusu, yağ bezi ve ter bezinde PDGF pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklı bulundu. Bunun nedeni K grubunda anlamlı olarak daha fazla pozitif hücre vardı. K ve KH grupları arasında yağ bezi ve ter bezinde PDGF pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı ( $p < 0,05$ ). PDGF pozitif hücreler yağ bezinde K grubunda, ter bezinde KH grubunda anlamlı olarak daha fazla pozitif bulundu. Bağ dokusunda anlamlı bir farklılık yoktu ( $p > 0,05$ ).



**Şekil 13:** K, D ve KH deneklerin deri dokusunda PDGF yerleşimi ve ekspresyonu  
A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis (E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri (ok başı), yağ bezi (YB), ter bezi (TB). İmmunoperoksidaz-hematoksilen.

## VEGF

K grubunda epidermis, ter ve yağ bezleri kuvvetli pozitif reaksiyon gösterirken, dermisteki bağ dokusu lifleri negatif, bağ dokusu hücrelerinin bazılarının kuvvetli pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 14) (Tablo 9).

D grubunda epidermis, demisteki bağ dokusu hücreleri, ter ve yağ bezlerinde kuvvetli pozitif reaksiyon gözlenirken, bağ dokusu lifleri zayıf pozitif reaksiyon gösterdi. Boyanma çoğunlukla sitoplazmikti. Bazı alanlarda çekirdek boyanması gözlemlendi (Şekil 14) (Tablo 9).

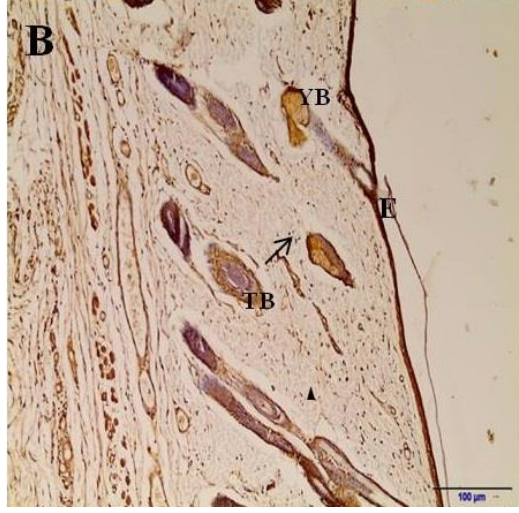
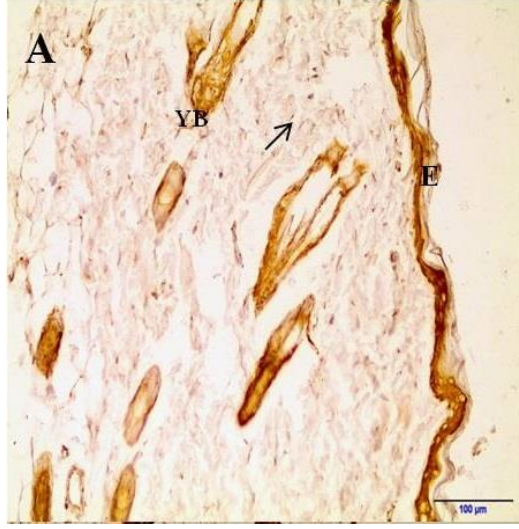
KH grubunda epidermis, ter bezleri ve yağ bezleri, dermis bağ dokusu hücreleri ve lifleri kuvvetli pozitif. Boyanma hem sitoplazmik hem de nükleerdi (Şekil 14) (Tablo 9)

**Tablo 9:** K, D ve KH deneklerin deri dokusunda VEGF yerleşimi ve ekspresyonu

	Epidermis	Bağ Dokusu Lifleri	Bağ Dokusu Hücreler	Yağ bezleri	Ter bezleri
K	+++	+++	+++	+++	+++
D	+++	+++	+++	+++	+++
KH	+++	+++	+++	+++	+++

K, D, KH grupları arasında epidermis, bağ dokusu, yağ bezinde VEGF pozitifliği anlamlı olarak farklı bulundu. Fakat ter bezinde anlamlı bir farklılık yoktu. KH ve D grupları arasında epidermis, bağ dokusu ve ter bezinde VEGF pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı. KH grubunda anlamlı olarak daha fazla pozitif hücre vardı. Yağ bezinde anlamlı bir farklılık bulunmadı. K ve D grupları arasında epitel ve bağ dokusu VEGF pozitifliği anlamlı olarak farklıydı. Epidermiste K grubunda ,bağ dokusunda D grubunda pozitif hücre anlamlı olarak fazla bulundu. Yağ bezinde anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0,05$ ). K ve KH grupları arasında epidermis, bağ dokusu ve ter bezinde VEGF pozitif hücre varlığı anlamlı olarak farklıydı. KH grubunda anlamlı olarak daha fazla VEGF pozitif hücre vardı ( $p<0,05$ ).





**Şekil 14:** K, D ve KH gruplarında VEGF dağılımı ve yerleşimi.

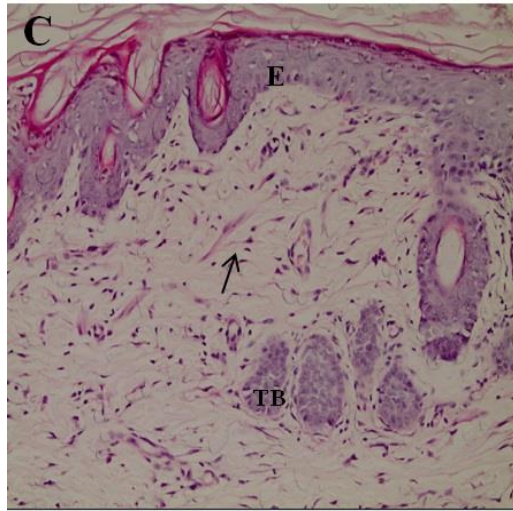
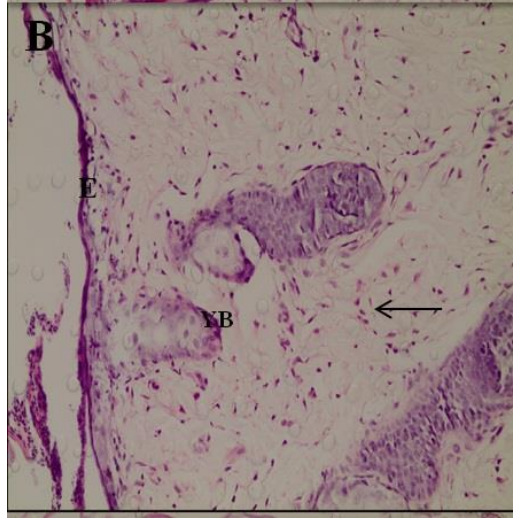
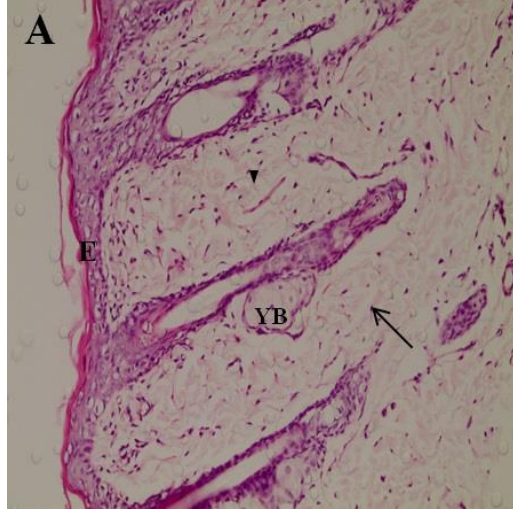
A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis (E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri (ok başı), yağ bezi (YB), ter bezi (TB). İmmunoperoksidaz-hematoksilen.

### **HE Boyama**

K grubunda epidermisteki epitelyum tabakası çok katmanlı olarak izlendi. Keratin tabakası epitelyum tabakası üzerinde oldukça yoğun olarak gözükmekteydi. Dermisteki bağ dokusu lifleri, ter ve yağ bezleri normal görünümdeydi (Şekil 15-A).

D grubunda epidermis ince bir katman olarak izlenirken, dermisteki liflerin bütünlüğünün kaybolduğu, aralarında boşluğun olduğu izlendi. Yağ ve ter bezlerindeki bütünlük devam ediyordu (Şekil 15-B).

KH grubunda epidermis epitel tabakası çok katlı olarak, keratin tabakasıyla birlikte normale yakın görünümdeydi. Dermisteki bağ dokusu lifleri, ter ve yağ bezleri normal görünümdeydi (Şekil 15-C).



**Şekil 15:** K, D ve KH gruplarında Hematoksilen Eozin boyama.

A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. Epidermis (E), bağ dokusu hücreleri (ok), bağ dokusu lifleri (ok başı), yağ bezi (YB), ter bezi (TB). Hematoksilen-Eozin



### **TUNEL sonuçları**

D grubunda epidermis tabakası çok yoğun pozitif. Dermis tabakasında lifler orta derecede boyanırken hücrelerin kuvvetli boyandığı dikkati çekti. Ter ve yağ bezlerinde TUNEL (+) hücreler yoğun şekilde izlendi (Şekil 16)

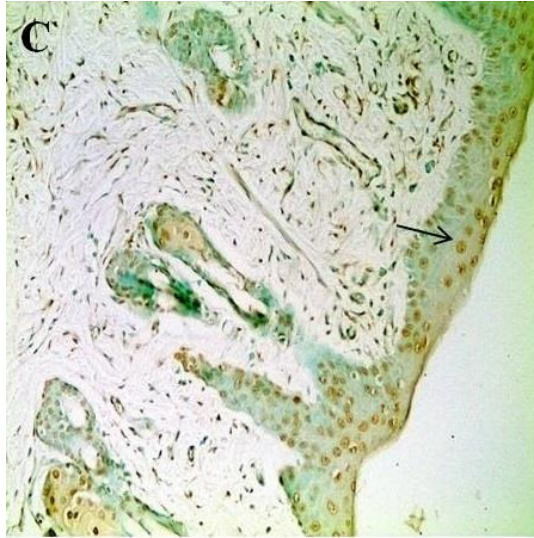
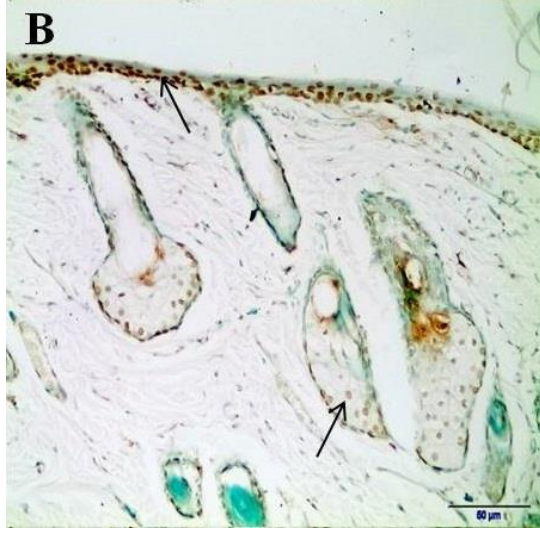
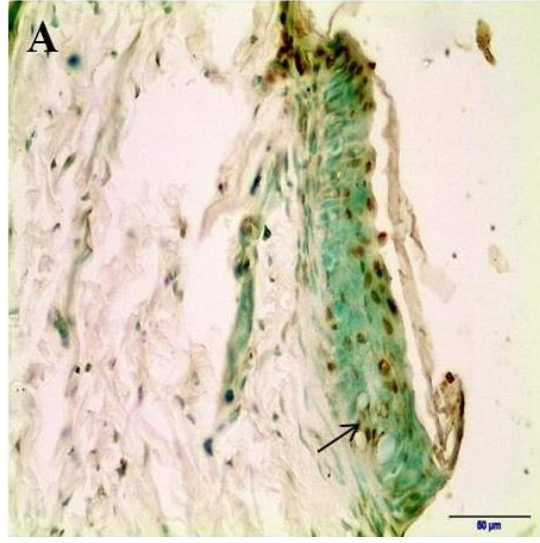
KH ve K grubunda epidermiste , dermiste , ter ve yağ bezlerinde pozitif hücreler vardı. Bu hücrelerin sayısı diyabet grubuna göre azdı (Şekil 16).

Her preparatta X400 büyütmede rastgele seçilmiş alanlarda toplam 500 hücre sayıldı. TUNEL + hücrelerin tüm hücrelere oranı % olarak hesaplanarak apoptotik indeks değerleri belirlendi. Apoptotik indeks değerine göre yapılan istatıksel analiz sonucu K, D, KH grupları arasında anlamlı bir farklılık bulundu (Tablo 10). D grubunda anlamlı olarak apoptotik hücre sayısı daha fazlaydı ( $P < 0.05$ ).

**Tablo 10:** TUNEL boyama yapılan K, D ve KH gruplarının apoptotik indeks değerlerinin karşılaştırılması

	<b>Mean</b>	<b>Standart Sapma</b>
<b>K</b>	55,33	$\pm 3,6$
<b>D</b>	92,25	$\pm 0,9$
<b>KH</b>	67,33	$\pm 4,1$

( $P < 0.05$ )



**Şekil 16:** TUNEL yöntemi uygulanmış K , D ve KH gruplarında TUNEL + hücreler  
A) Kontrol grubu B) Diyabet grubu C) Kök Hücre grubu. TUNEL Boyaması

## TARTIŞMA

Diyabet yara iyileşmesinin bozulmasında prototip bir modeldir. Diyabetli hastalarda düşük yara çevresi transkutanöz oksijen basıncı ve düşük kan basıncıyla ilişkili olarak doku tamiri oranı azalır. Diyabetli hastalardaki ülserasyonun predispozisyon nedenleri multifaktoriyeldir ve endotel disfonksiyonu, ateroskleroz ve periferik nöropati gibi birbiriyle ilişkili nedenleri vardır (39).

DM'nin önemli komplikasyonlarından biri olan ayak ülserinde yara iyileşmesi gecikmekte, alt ekstremitte amputasyonu, uzun süreli yatış ve hayatı tehdit eden sepsis dahil birçok klinik problemle sonuçlanabilmektedir (40). DM içinde yara kapanmasını ve iyileşmeyi geciktiren faktörler; hücresel disfonksiyon, büyüme faktöründeki değişiklikler, keratinosit ve fibroblastların migrasyonunu ve proliferasyonunu zayıflatan sinyallerdeki değişiklikler, ekstraseluler matris üretimi, anjiyogenez, ve yara dokusunun bakteri ve enfeksiyona duyarlılığıdır (41). Buna ek olarak, diyabetik nöropati nedeniyle nöropeptid sayılarında azalma yara kapanması ve iyileşmesini etkiler. Nöropeptidler hücre kemotaksisinin stimülasyonunu, proliferasyonu ve büyüme faktörü üretimini etkiler (40). Yapılan bir çalışmaya göre diyabetik ülserli hastada lökositlerin ülsere girişi ve birikimi engellendiği ve bu nedenle de normal yara iyileşmesinin başarısız olduğu bildirilmiştir (26).

Oksidatif stres, hiperglisemik psödohipoksi, non enzimatik glikasyon ve koagülasyon kaskadının aktivasyonu gibi birçok metabolik bozukluk endotelial disfonksiyondan sorumlu olabilir (39).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, re-epitelizasyon ve yara yerinde hücre apoptozunun başarısızlığından kaynaklanan granülasyon doku azalmasının ortaya çıkması, yara kapanmasında ve iyileşmesinde de kontrol yaralarına oranla önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (42). Yara tedavisi, tüm bu komplikasyonlarla başa çıkabilmek için, yara kapanması ve iyileşmesinin çoklu adımlarından oluşan etkili bir metod gerektirir (41). Kök hücrelerin yara kapanmasını arttırabildiği ileri sürülmektedir (43). Kök hücrelerin yara kapanma sürecini hızlandırmasında 2 olasılık vardır; ilki, kök hücreler büyüme faktörleri, sitokinler ve mediatörlerin salınımını sağlayarak komşu doku ve hücre oluşumunu stimüle eder. İkinci olarak,

kök hücreler yara alanında rejeneratif hücrelere farklılaşır veya komşu hücreler ile işbirliği yaparak doku yenilenmesini uyarır (41).

Göbek kordon kanı serumunun insan serumuyla karşılaştırıldığında yüksek miktarda sitokin ve büyüme faktörü ve kök hücre içerdiği bildirilmektedir (44).

Bu çalışmada kordon kanından elde edilen CD 34(+) kök hücrelerini diyabetik yara oluşturulan sıçanlara verilerek yara iyileşmesi incelendi. Özellikle bu süreçte etkili olan büyüme faktörlerinden TGF- $\beta$  ve PDGF, anjiogenezisle ilgili olarak VEGF ve FGF, sitokinlerden de IL-1 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelendi. Bu çalışmada ayrıca kordon kanı kök hücrelerinin apoptotik sürece olan etkisi araştırıldı. Literatür taramasında kök hücrelerin yara iyileşmesi sırasında apoptotik sürece olan etkileriyle ilgili çalışmaya rastlanmadı. Bunun için TUNEL yöntemini uyguladı ve apoptotik yolakta ölüm molekülü olan kaspaz 3 aktivasyonu immünohistokimyasal olarak incelendi.

Bu çalışmada streptozosinle DM oluşturuldu. Streptozosin, hızlı ve geri dönüşümsüz bir nekrozu tetikleyen pankreatik  $\beta$ -hücrelerine karşı toksik etkiye sahiptir. Etkisi, insan tip 1 diyabet başlangıcını taklit edebilir (45).

Kim, J.Y. ve ark. yaptığı çalışmada insan kordon kanından elde edilen endotelial progenitör hücre (EPC) transplantasyonu hasardan 3 gün sonra önemli ölçüde keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu stimüle etmiştir. PBS control grubuyla karşılaştırıldığında STZ'nin indüklediği diyabetik farelerde yara kapanması anlamlı ölçüde hızlanmıştır. RT-PCR analizleri göstermiştir ki EPCs yara iyileşmesiyle ilişkili çeşitli büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Bunların arasında keratinosit büyüme faktörü , PDGF, EPC lerden büyük oranda eksprese edilmiştir ve EPC enjekte edilen dermal dokuda önemli ölçüde bulunmuştur (46).

EPC'ler hasarlı dokudaki revaskularizasyon ve doku tamirine katılan endothelial prokürsördür. EPC'lerin bu teropatik potansiyelleri hayvan modeli ve insan modelindeki iskemik hastalıklarda (Kalp Krizi, inme, Periferik Arter Hastalığı) rapor edilmiştir. EPC'ler çeşitli anjiogenik büyüme faktörlerini sekrete ederek endojenik anjiogenezisi stimule eder (46).

Diyabetik yaraların yara iyileşmesinde gecikme yapmasının nedenleri büyüme faktörü üretiminde azalma, anjiogenezisin azalması, keratinosit ve fibroblast proliferasyonu ve göçünde bozukluk gibi birçok nedene bağlı olabilir. Buna ek olarak

son zamanlarda bir çalışmada diyabetik farelerde kan dolaşımında ve yarada azalmış EPC'lerin miktarının anlamlı ölçüde daha az olduğu gösterilmiştir. Ayrıca diyabetik farelerden EPC hayvan modelinde iskemik hayvanlara enjekte edildiği zaman revaskülarizasyonu bozar. Fakat normal farelerden EPC hasarlı dokuda kan akımını anlamlı ölçüde iyileştirir (46).

EPC transplantasyonu erken yara iyileşmesi sürecinde keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu sağlar. Dikkatlice incelenirse hücresel değişiklikler erken yara iyileşmesi boyunca EPC transplantasyonu ile meydana gelir (46). Kim, J.Y. ve ark. yaptığı çalışmada özellikle CK 14 (+) proliferatif hücreler keratinosit rezervuar alanı olarak bilinen, komşu sağlam deride kıl foliküllerinin dış kılıfında bulundu. Çünkü foliküler keratinositler normal derinin gelişiminden, mitozaya gitmeden, yaralanma durumunda epidermin devamlılığını sağlamak gibi özellikleri vardır. Reepitelizasyonun başlamasında kritik rolü olduğu düşünülmektedir. CK14/ Ki 67 (+) hücrelere EPC tedavisi alan yaralarda, PBS verilen kontrol grubuna göre kıl foliküllerinde daha fazla olduğu gözlemlendi. Hasardan sonraki 7. günde alınan dokudaki granülasyon dokusuna yapılan immünohistokimyasal analiz sonucu EPC transplantasyonu granülasyon dokusunda fibroblast proliferasyonu sağlamıştır (46).

İnsan kordon kanından elde edilen EPC'ler diyabetik farelerde yara kapanmasını anlamlı olarak arttırmaktadır. Bunu da keratinosit / fibroblast proliferasyonunu ve revaskülarizasyonu artırarak yapmaktadır. Özellikle EPC transplantasyonu epidermin bazal tabakasındaki CK 14 (+) keratinosit ve yara yanındaki kıl foliküllerinin dış kılıfında proliferasyonunu stimüle ettiğini göstermiştir. Bu proliferasyon çok az Ki 67 + proliferatif hücrelerin bulunduğu yara yatağının merkezine keratinosit migrasyonunu destekleyerek erken dönemde hızlı reepitelizasyonu sağlayabilir. Çünkü kıl folikülü keratinositlerinin aktivasyonu yaralanmadan sonra hızlı reepitelizasyonun başlaması için gereklidir (46).

EPC ile tedavi edilen yaradaki bulgular göstermiştir ki, EPC'ler direkt olarak fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu aktive eder. Diyabette bozulmuş yara iyileşmesi PDGF ve keratinosit büyüme faktörünün (KGF) ekspresyonunun azalmasıyla ilişkilidir. Bu bağlamda insan EPC'ler enjekte edilenlerde salınan PDGF ve KGF keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle eder (46).

Yüksek glikoz konsantrasyonları ya direkt olarak ya da apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK1) aracılığıyla mitojen activated protein kinase'ları (MAPK) aktive eder. MAPK hücrel strese cevap olarak aktive olur ve Bax oligomerizasyonuna ve mitokondriden sitokrom c salınımına neden olur. Bunu apoptosome formasyonu, kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonu takip eder. Artmış mitokondrial dış zar permeabilitesi kaspas kaskadını genişleten bazı apoptotik regülatörlerin salınımına neden olur. Yüksek glikozun indüklediği oksidatif stres DNA hasarına neden olur ve p53 ilişkili mekanizmalarla apoptozisi indükleyebilir. Yüksek glikoz kalsiyum bağımlı bir proteaz olan calpaini aktive eder. Calpain kaspaz bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla apoptozisi başlatabilir (35).

Hematopoetik kök hücreler (HSCs) tüm olgun kan hücre tiplerine farklılaşma ve kendini yenileme potansiyeli olan multipotent kök hücrelerdir (16). Homeostazis ve immün sistemde fonksiyonları vardır. Ayrıca, HSC tarafından üretilen bazı sitokinler ve büyüme faktörleri, yara onarımında aracı rollere sahiptir, örn IGF-1, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  ve IL-1 (47).

Yapılan bir çalışmaya göre insan periferik kan CD34(+) hücreleri neovaskülarizasyonu hızlandırmış ve diyabetik farelerde deri yaralarının iyileşmesini sağlamıştır (48).

Fibrin jel içinde enkapsüle edilmiş insan kordon kanı (CB) CD34(+) hücreleri ve endotelial kökenli CD34(+) hücreleri kombinasyonu ile streptozosin ile induklenmiş diyabette yara kapanmasının ve iyileşmenin geliştiği gösterilmiştir. Bu tedavi enflamatuvar reaksiyonu azaltmış ve yara neovaskülarizasyonunu artırmıştır (49).

Başka bir çalışmada, CB-CD34 (+) hücreleri diyabetik sıçan modelinde ayak ülseri tedavisinde kullanılmıştır. CD34 (+) kök hücrelerin kullanımı hayvanların çoğunda yaralarda iyileşme ve belirgin düzelme sağlamıştır. Işık ve elektron mikroskopik inceleme sonucu yeni oluşan derinin normal görünümde olduğu saptanmıştır (43).

Kamonnaree Chotinantakul ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucu genişletilmiş ve taze izole edilmiş CD34(+) hücreleri ile yara alanındaki ve çevresindeki insan CB-CD34(+) hücrelerinin varlıklarını ortaya çıkarmıştır. Veriler bu hücrelerin yara kapanması sırasında yerel kök hücreler, makrofajlar, endotelial

hücreler, fibroblastlar ve diğer enflamatuar hücreler ile kooperasi çalışıyor olabileceğini göstermiştir (41).

Biz çalışmamızda KH uygulanan grupta ve D grubunda ince bir katman olarak izlenen epidermin çok katlı hale geldiğini, dermisteki liflerin bütünlüğünün korunduğunu, ter ve yağ bezlerinin normal görünümde olduğunu saptadık KH grubunda genel görünüm K grubuna yakındı.

İnsan CD34(+) hücreleri ve hematopoetik prekursor hücreler bir takım VEGF, HGF, FGF2, Flt3-L, IL-1, IL-16, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve Trombopoetin gibi sitokinler ve büyüme faktörlerini otokrin veya parakrin yolla salgılayabilirler. Bu araçların bazıları, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi IGF-1 gibi, yara iyileşme sürecine aracılık eder. insan CB-CD34 (+) hücreleri aynı zamanda yara kapanma işlemi sırasında endotelial hücrelere farklılaşabilmektedirler (41).

VEGF'deki artış yeni kan damarlarının anjiogenik gelişimini içeren mikrovasküler aktivite ve vasküler geçirgenlikteki artışın göstergesidir. EGF'deki artış epiteliyal hücre büyümesinin ve yara iyileşmesinin göstergesidir (50).

VEGF çeşitli hücrelerden (platelet, makrofaj, fibroblast, keratinosit) salınır. Anjiogenezin çeşitli aşamalarını stimüle eder. İyileşmenin erken fazları boyunca up-regüledir. VEGF yara iyileşmesini anjiogenez üzerinden teşvik eder. Kollajen üretimi ve epitelizasyonu da artırır (39).

VEGF mRNA'sı hasarlı olmayan deride diyabetik farelerde genetik olarak yükselir. Ancak tam kat yara üzerindeki VEGF seviyesi ilk olarak artar. Fakat son olarak 5. Günde saptanamayacak kadar azalır. Bu zaman boyunca granülasyon dokusu birikir. Nondiyabetik normal dokuda VEGF piki görülür. Ayrıca STZ ile indüklenen diyabetik farelerde VEGF nin de içinde olduğu çeşitli büyüme faktörlerinin sentezinin azaldığı gösterilmiştir. Ancak diyabetik yaralarda büyüme faktörü regülasyonunda düzensizlik görülmektedir (39).

Diyabetik hayvanlarda tam kat yara iyileşmesi ilginç bir şekilde farklıdır. Normal hayvanların yaralarında meydana gelen kontraksiyon olmaksızın diyabetik yaralarda iyileşme hücresel infiltrasyon, granülasyon dokusu depozisyonu, reepitelizasyon şeklinde olur. Bu şekilde yara kapanması, diyabetik dekübit ülserli, venöz stazlı hastalarda kronik ülserli dokuda yaygındır. VEGF uyarımı epitelizasyonu ve kollajen üretimini tetikler. PDGF diyabetik ülserlerde etkili



olmasına rağmen, VEGF yara iyileşmesindeki ilave komponentleri stimule edebilir (39).

Ching-Jen Wang ve ark. yaptığı çalışmada kronik diyabetik ayak ülserlerinde uygulanan Ekstrakorporeal Şok Dalga Tedavisi (ESWT) ve Hiperbarik oksijen tedavisi sonrası alınan biyopsi örneklerinden immünohistokimyasal boyama sonucunda VEGF ve EGF ekspresyonunda anlamlı artışın olduğu saptanmıştır (50).

Bizim çalışmamızda K ve KH uygulanan grupta epidermis ve dermiste VEGF pozitif reaksiyon gözlemlendi. K ve KH grubunda VEGF pozitif hücre sayısı diyabet grubuna oranla daha fazlaydı. Çalışmalar diyabette başlangıçta VEGF artışından bahsetmektedirler. Bulgularımız bunu desteklemektedir. Kontrol ve kök hücre grubunda da pozitif olması beklenen bir durumdur.

TUNEL yöntemi ölen ya da apoptozise giden hücreleri saptar. Apoptozis oranı nekrotik dokuda ve kronik yara yatağında artar. Yapılan çalışmalarda ESWT tedavisi sonrası TUNEL ekspresyonu anlamlı olarak azalmış fakat Hiperbarik oksijen tedavisi sonrası anlamlı azalma saptanamamıştır (50).

Ian A. Darby ve ark. yaptığı çalışmada nonobez diyabetiklerde (NOD) apoptozisi incelemiştir. Bu çalışmada deney ve kontrol grubu deneklerden 7. ve 14. günlerde alınan dokuda apoptozis oranı TUNEL yöntemiyle incelenmiştir. Araştırmacılar NOD diyabetik hem 7. günde hem de 14. günde (yara iyileşmesinin geç döneminde) apoptozis arttığı bildirilmiştir. 7 günlük yaralı kontrol farelerinde TUNEL boyama kesitlerinde nadir olarak apoptotik hücreye rastlanırken. 7. gündeki diyabetik yaralarda daha fazla apoptotik hücrenin olduğunu bulmuşlardır. Hücre sayımları diyabetik yaralarda apoptotik hücrelerde 3 kat fazla artış olmuştur. Bu çalışmada ayrıca morfolojik kriterler kullanılarak diyabetik yaralardaki apoptozise giden perisitler, fibroblastlar, endotelial hücreler tanımlanmıştır (51).

Diyabette azalan hücre proliferasyonu, myofibroblast fenotipi geciktirdiği, prokollojen I mRNA ekspresyonu azalttığı gösterilmiştir. Diyabet modelinde görülmektedir ki apoptotik hücre ölümünün anormal kontrolü, bozulmuş yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. İnsanda kronik yarada, değişik problemler örneğin periferik kan perfüzyonundaki bozukluklar ve periferik nöropati nedeniyle duyu sinir fonksiyonlarının azalması bozulmuş iyileşmeye katkıda bulunabilir. Diyabetik farelerde iyileşme boyunca apoptozis artar. Bu da DM farelerde anormal



hücre yaşam kontrolü olduğunu düşündürür. Diyabet olmayan farelerde apoptozis sadece iyileşmenin skar dönemi boyunca geç dönemde gözlenir. Ian ve arkadaşlarının çalışmasında yaranın 7. Gününde alınan dokuda proliferasyon oranı kontrol grubunda yüksekti. Diyabetik granülasyon dokusunda proliferasyon düşüktü. Bu da yarada normalde proliferasyonu stimüle eden büyüme faktörleriyle ilişkilidir (51).

Diyabetik hastalarda bozulmuş yara iyileşmesi cerrahi yaralarda olduğu gibi akut yaralarda görülmektedir ve kronik yaraya duyarlılık artmaktadır. Önceki çalışmalarda apoptozisin normal yara iyileşmesinin geç döneminde olduğu gösterilmiştir Diyabette akut tamir süreci hem gecikmiştir hem de bu modelde diyabetin bozduğu yara iyileşmesinde apoptozis artmıştır (51).

İnsan çalışmalarında diyabetik kronik yaralardan alınan biyopside hem nekrozun hem de apoptozisin arttığı gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda endotelial hücrelerde kültür mediumunda yüksek dozda (25 mmol / l) glikozun apoptozisi indüklediğini göstermiştir. Bu nedenle hiperglisemi diyabetik yaralarda görülen apoptozis seviyelerindeki artıştan sorumlu olabilir (51).

Bizim çalışmamızda D grubunda TUNEL (+) hücrelerin diğer iki gruba oranla çok fazla olduğu bulunmuştur. Özellikle epidermis dokusunda apoptotik hücre sayısı oldukça fazladır. K grubunda TUNEL (+) hücreye çok az rastlanırken KH grubunda bu sayının biraz daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Kaspaz 3 ekspresyonu TUNEL ekspresyonuna benzerlik göstermiştir. Diyabette epitelyum caspaz 3 açısından yoğun boyanmışken bu boyanma kök hücre uygulanan grupta orta derecede, kontrol grubunda ise zayıftı.

$\alpha$ FGF fibroblast proliferasyonunu artırır ve ülser tamir yeteneğini artırır.  $\alpha$ FGF nin indüklediği fibroblast proliferasyonunu TGF- $\beta$ , PCNA protein ekspresyonunu artırarak gerçekleştirir. TGF- $\beta$  hücresel büyümeyi düzenler ve apoptozis ekstrasellüler matriks sentezini indükler. TGF- $\beta$  ekspresyonundaki değişiklikler mikrovasküler rejenerasyonla uyumludur. Ek olarak TGF - $\beta$  ekspresyonu fibroblastlardan kollajen proteinlerinin, fiber konneksin ve integrin salınımını sağlar. Epitel hücre migrasyonunu artırır (52).

Diyabetik ayak ülser alanındaki makrofajların bozulmuş fonksiyonu TNF, IL-1 $\beta$  gibi yara iyileşme sürecini hızlandıran sitokinlerin salınımını azaltır (52).

Diyabetik yara iyileşmesindeki defektler inflamatuvar cevapta bozukluk, ekstrasellüler matriks, makrofaj fonksiyonda bozukluk, angiogenesis, reepitelizasyon, keratinosit ve fibroblast göçünde ve proliferasyonunda, sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin üretimindeki bozuklukları kapsar. Örneğin diyabetik hastalarda makrofajlarda fagosit fonksiyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Diyabetik farelerde yaradan makrofaj izole edilmiştir. Bu makrofajlarda nekrotik dokuyu temizleme yeteneğinin azaldığı gösterilmiştir. Bu da sitokin ve büyüme faktör seviyesi bozuklukları gibi diğer faktörlerle birlikte, yara iyileşmesinin sonlanma fazına ilerlemesini engelleyerek inflamatuvar fazı uzatabilir (53).

Keratinositlerin yara alanında migrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyon yetenekleri bozulmuştur. Bunun bir olası nedeni  $\beta$ -katenin stabilizasyonu (EGF yanıtında blok) ve keratinositlerde hücre iskeleti komponentinin baskılanmasıdır. Ayrıca keratinositler epitel hücreleri gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunun up-regülasyonunda başarısız olurlar (53).

**Tablo 11:** Diyabetik yara iyileşmesinde sitokinler ve büyüme faktörlerinin salınımındaki değişiklikler

(Nga N.Le ve ark. Alınmıştır 2011).

Sitokin ve Büyüme Faktörleri	Yara İyileşmesindeki Normal Roller	Diyabetik Yara İyileşmesindeki Ekspresyonu
IGF-1	Reepitelizasyon Keratinosit ve fibroblast proliferasyonu Epitelyal hücre aktivasyonu	Azalmış
TGF-β1	Kemoaktraktan ECM depozisyonu Anjiogenezis	Azalmış
PDGF	Fibroblast aktivasyonu Anjiogenezis EGM depozisyonu MMp sentezi	Azalmış
EGF	EGM depozisyonu Keratinosit migrasyonu ve proliferasyonu	Azalmış
IL-8	Keratinosit proliferasyonu Makrofaj kemotaksisi Nötrofil kemotaksisi	Azalmış
Anjiopoetin 2	Kan damarı oluşumunu bozar	Artmış

Hasarda, yaralanmalarda fibroblast, makrofaj ve epitelial hücrelerde VEGF salınır. TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi büyüme faktörleri ve uzamış inflamatuvar yanıt tarafından artmış proteaz seviyelerinin stimüle edildiği görülmektedir. Proteaz seviyelerinin artması, normal iyileşme için gerekli olan büyüme faktörleri ve proteinlerin destrüksiyonu sebebiyle iyileşme süreci uzar. PDGF, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ 1 gibi diğer birçok sitokin ve büyüme faktörleri (ki bu faktörler epitelyum hücrelerinin uyarılmasında rol alırlar) diyabetik hastalardaki ayak ülserlerinde azalmaktadır. Aslında TGF- $\beta$ 1 yara iyileşmesinin çeşitli fazlarında ve farklı hücre tiplerine etki eden kutanöz yara iyileşmesinde yer alan bir büyüme faktörüdür. TGF- $\beta$ 1 fibroblastlar, keratinositler, inflamatuvar hücreler gibi birçok hücre tipi için kemoatraktandır, anjiogenezisi stimüle eder, ekstrasellüler matriks oluşumunu uyarır. TGF- $\beta$ 1 in sıçanlarda, diyabetik hastanın ayak ülserlerinde ve derisinde azaldığı gösterilmiştir. TGF- $\beta$ 1 topikal uygulaması sonucu diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra TGF- $\beta$ 1 diyabetik ayak ülserlerinde azalan PDGF, IGF-1, EGF ve IL-8 gibi sitokinlerin anjiogenezisi teşvik etmelerini sağlamaktadır. Anjiogenez dokuya oksijen ve besin sağlamak için esansiyeldir (53).

TGF- $\beta$  yara iyileşmesinde PDGF ve diğer büyüme faktörleriyle etkileşim içindedir. TGF- $\beta$ 1 salınımı sonucunda fibroblast migrasyonu, proliferasyonu ve ECM sekresyonu artar (54).

Jude ve ark. yaptığı çalışmada TGF- $\beta$ 3 ekspresyonu diyabetik ve normal ciltten alınan örneklerde diyabetik ayak yarasında epitelde daha yoğun bir şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). TGF- $\beta$ 3 immünflorasan ve immünohistokimyasal olarak güçlü immünoreaktivite göstermiştir. Diyabetik ayak ülserlerinin kenarındaki bütün epidermis katmanları boyunca ve diyabetik deri bazal tabakada, fakat diğer epitel tabakalarında daha az yoğun olarak boyandığı izlenmiştir. Stratum spinosum ve stratum granulozumda minimal boyanmayla birlikte diyabetik deriyle karşılaştırıldığında normal deride sadece bazal epidermis tabakasında boyanma izlenmiştir. Western blot analizi sonucu TGF- $\beta$ 3 diyabetik deri ve normal deriye göre diyabetik ayak ülserlerinde arttırdığını göstermiştir. TGF- $\beta$ 1 normal deri ve diyabetik deride epidermis ve dermisin bütün tabakalarında görülmüştür. En güçlü boyanma epidermis bazal tabakasıydı. Ancak TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu diyabetik ayak

ülserleri ve kronik venöz ülserde diyabetik ve normal ciltle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış saptanmamış, TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunun artışıdaki eksiklik hem diyabetik ayak ülserlerinde, hem de kronik yarada iyileşmenin tamamlanamamasını açıklamaktadır (54).

Schmid ve ark. akut ve kronik basınç yarasında TGF- $\beta$  immünoreaktivitesini incelenmiştir. Akut yarada TGF- $\beta$ 1-2 rejener epidermiste eksprese olmuş, TGF- $\beta$ 3 ekspresyonu gecikmeli olarak artmıştır. Ancak kronik yarada TGF- $\beta$ 3 ekspresyonu olmuştur. Higley ve ark. TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunu venöz ülserlerde azaldığını saptanmıştır. Akut yarada TGF- $\beta$ 1 artarken , kronik yarada azalmıştır (54).

Bizim çalışmamızda TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$  ve IL-1 ekspresyonları diyabet grubunda epidermiste, dermiste bağ doku hücrelerinde ve liflerinde, yağ bezi hücrelerinde pozitif reaksiyon gösterdi. Ter bezlerinde de pozitif reaksiyon bulundu. Ancak TNF- $\alpha$  pozitif hücre sayısının diyabet grubunda yüksek olması kök hücrenin TNF- $\alpha$  yı inhibe ettiğini düşündürmüştür.

Liyun Xie ve ark. yaptığı diyabet oluşturulan sıçanların yara yerine  $\alpha$ FGF uygulandıktan sonra sonuçlar  $\alpha$ FGF anlamlı bir şekilde ülser dokusunda fibroblast miktarını ve kapillerleri arttırdığını göstermiştir. FGF, TGF- $\beta$  ve PCNA proliferasyon proteinlerinin ekspresyonunu arttırır. Bu nedenle diyabetik ayak ülser dokusunun iyileşmesini sağlar. Şimdiye kadar çalışmalarda  $\alpha$ FGF yara tamir hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Erken dönem yarada ,hasarlı dokudaki makrofaj ve endotelial hücrelerden salınan  $\alpha$ FGF keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu stimüle eder. Bu stümlasyon çeşitli sitokinlerin ,proteaz ve kollejenazların salınımını sağlayarak olur (52).

Wang ve ark. hücre proliferasyonu  $\alpha$ FGF uygulanan grupta diyabetik gruptan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Mellin ve ark. ise Western Blot tekniğiyle incelediği dokularda diyabetik gruba göre  $\alpha$ FGF grubunda inflamatuvar sitokin miktarının ekspresyonunu anlamlı olarak fazla bulmuştur (52).

Liyun Xie ve ark. göre  $\alpha$ FGF diyabetik ülserde iyileşmeyi sağlamaktadır. Fibroblastlar yara tamirinde major hücredir. Yara meydana geldikten sonra ekstrasellüler matriks komponentlerinin ve uygun kollajen proteinlerinin sentez ve sekresyonunu sağlar. Fibroblast doku yenilenme sürecini, yara kontraksiyonunu ve granülasyon doku formasyonunun oluşumunu sağlar. Bu çalışmada  $\alpha$ FGF grubu

diyabet grubuyla karşılaştırıldığında yeni oluşan kapillerler ve fibroblastlardan kollajen protein ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır (52).

Kim ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada FGF nin NF-kB sinyal yolağını aktive ettiğini gösterilmiştir. FGF aracılığı ile NF-kB artışının anti-apoptozis faktörlerinden Bcl-2 ailesini uyardığı ve Bcl-2'nin TNF- $\alpha$  yı inhibe ederek apoptozisi engellediği belirtilmektedir (55).

Bizim çalışmamızda, FGF, diyabet grubunda epidermis ve dermis negatif reaksiyon gösterirken, kök hücre grubunda epitelde boyanma pozitif olarak izlendi. Kontrol grubunda epitel, bağ doku hücre çekirdekleri ve yağ dokuda yoğun pozitif boyanma gösterirken, bağ doku lifleri zayıf pozitif boyanma olarak izlendi.

## SONUÇ

Çalışmamızda VEGF, PDGF, IL-1, FGF, TGF $\beta$ , TUNEL, Kaspaz 3 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonları açısından diyabet ve kök hücre uygulanan gruplar arasında farklılık vardı. VEGF, PDGF ve TGF $\beta$ 'nin kök hücre uygulanma gruplarda fazla olması yara iyileşmesinde bu faktörlerin etkili olduğunu düşündürmektedir.

TNF- $\alpha$  sonuçları bizim için oldukça anlamlıydı. Apoptozisin önlenmesinde FGF'yi uyarımının etkin olduğunu düşünmekteyiz. FGF'nin TNF- $\alpha$  yı inhibe ederek apoptozisi engellemesi yara iyileşmesinde önemli bir süreçtir. Kök hücre uygulamalarının FGF ekspresyonun artırmasının diyabetik yara iyileşmesinde yeni tedavi yaklaşımlarında anahtar molekül olacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Beksaç M. Kök Hücre Kaynağı Olarak Kordon Kanı, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamaları (2009).
2. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Joslin's Diabetes Mellitus. 14.th Edition. Lippincott Williams-Wilkins, 2005.
3. Sayek İ, Özmen MM, Temel Cerrahi El Kitabı, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009
4. Brunicardi CF, Schwartz's Principles Of Surgery, Mc Graw-Hill, 2005
5. Jiang XY, De-Bin Lu, Chen B. Progress in stem cell therapy for the diabetic foot. Diabetes research and clinical practice, 2012; 97: 43–50.
6. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ Res 1999;85(3):221–8.
7. Kliman HJ, The Umbilical Cord, Yale University School of Medicine, 2006:1-14.
8. Moore K.L, Persaud T.V.N, Klinik Yönleriyle Medikal Embriyoloji, Dalçık H , Yıldırım M, Çev.Ed, 8. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009:125.
9. Sadler T.W. Langman's Medical Embryology. 11.Baskı, Philadelphia: Lippincott William&Wilkins 2010:104-105.
10. General Chemistry Principles and Modern Applications. <http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/martini10/chapter28/custom3/deuxe-content.html>. Erişim tarihi: 25 Mart 2013
11. UNSW Australia Embryology <http://embryology.med.unsw.edu.au/notes/placenta5.htm#PlacentalMembrane> s. Erişim Tarihi:26 Mart 2013
12. İnan S, Özbilgin K. Kök Hücre Biyolojisi. Sağlıkta Birikim. Cilt 1, Sayı 5, 2009:11-23s
13. Karaöz E. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu. Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Merkezi Kocaeli, 2010.



14. Kök Hücre Derneği  
[http://www.kokhucrederneği.org.tr/tur/kok\\_hucre/hema\\_kaynak.htm](http://www.kokhucrederneği.org.tr/tur/kok_hucre/hema_kaynak.htm) Erişim tarihi: 09.04.2013
15. Can A. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. TÜBA: Ankara: 2009: 15-22.
16. R&D Systems-Tools for Cell Biology Research  
<http://www.rndsystems.com> Stem cell differentiation markers. Erişim tarihi: 17.04.2013
17. Ural A.U, Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi, 2006, Cilt: 5 Sayı: 3-4, 140-145.
18. National Institutes of Health (NIH). <http://stemcells.nih.gov> Erişim Tarihi: 15 Nisan 2013.
19. Bellantuono İ, Haemopoietic stem cells, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2004; 36: 607–620
20. Civin CI, Strauss LC, Fackler MJ, Trischnamm TM, Wiley JM,Loken MR: Positive stem cell selection-basic science. Progress in Clinical Biological Research. 1990: 333:387-401
21. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Ankara: 2011.
22. İmamoğlu Ş, Ersoy C , Diabetes Mellitus. İstanbul: Deomed Medikal Yayıncılık: 2009:13-25,319-323.
23. World Health Organization <http://www.who.int> Erişim Tarihi:25 Mayıs 2013
24. Malhotra S, Bello E, Kominsky S. Diabetic foot ulcerations: biomechanics, charcot foot, and total contact cast. Seminars in Vascular Surgery. 2012 Jun;25(2):66-9.
25. Jeffcoate WJ, Harding KG. Diabetic foot ulcers. The Lancet 2003;361:1545-51
26. Leung PC. Diabetic foot ulcers-a comprehensive review. Surgeon. 2007;5(4):219-31.
27. Junqueira LC , Carneiro J. Temel Histoloji, Solakoğlu S, AYTEKİN Y, Çeviri Editörleri, 11. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2009: 360-372

28. Öcal K. Yara İyileşmesi ve Yara Bakımı. <http://cevretoplulugu.mersin.edu.tr>  
Erişim Tarihi:05/02/2012
29. Ergin DN. Farklı Dikiş Materyallerinin Gingivada Oluşturduğu Doku Reaksiyonunun Değerlendirilmesi (Doktora Tezi). Ankara: Başkent Üniversitesi; 2009
30. Jeffcoate J.W, Price P, Harding G.K.Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. Diabetes/Metabolism Research and Reviews 2004; 20(Suppl 1): S78–S89.
31. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair and Regeneration 2008;16:585–601
32. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002: 9(2); 143-148
33. Yüksel B, Handemir Kılıç S, Taşdemir N, Batıoğlu S. Apoptosis ve Kaspaz Sistemi. jinekoloji obstetrik ve neonatoloji tıp dergisi 2009 10:58
34. Sunguroğlu A, Atabenli Erdemli E, Tekelioğlu M. Programlı Hücre Ölümü: Apoptozis. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri 1996; 16:333-337.
35. Allen D, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. Journal of Nutritional Biochemistry 2005;16:. 705–713.
36. Mohamed A. Elsharawya, Magda Naimb and Sahar Greish. Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats, Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery 0 (2011) 1–6
37. Gürpınar T, Ekerbiçer N, Uysal N , Barut T , Tarakçı F, Tuğlu M. İ. The Histologic Evaluation of Atorvastatin and Melatonin Treatment on Oxidative Stress and Apoptosis of Diabetic Rat Pancreas. Kafkas Univ Vet Fak Dergisi 2010; 16 (4): 547-552.
38. Demir R . Histolojik Boyama Teknikleri. Ankara: Palme Yayıncılık 2001: syf:5
39. Bao P , Kodra A, Tomic-Canic M. , Golinko M.S , Ehrlich P , Brem H, The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing, NIH-PA Author Manuscript, 2009 15; 153(2): 347–358

40. Pradhan L., Nabzdyk C., Andersen N.D., LoGerfo F.W. et al. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert Rev. Mol. Med.* Cambridge University Press 2009 11:1-24.
41. Chotinantakul K, Dechsukhum C. , Dejjuj D, LEEANANSAKSIRI W. Enhancement of wound closure in diabetic mice by ex vivo expanded cord blood CD34<sup>+</sup> cells, *Cell Mol Biol Lett.* 2013 Jun; 18(2):263-83
42. Smith P.G. and Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 307 (2002) 281–291.
43. Elsharawy M.A, Naim M and Greish S. Human CD34<sup>+</sup> stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 14 2012; 288–293.
44. Ang LP, Do TP, Thein ZM, Reza HM, Tan XW, Yap C, et al. Ex vivo expansion of conjunctival and limbal epithelial cells using cord blood serum-supplemented culture medium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011; 52, 6138–6147.
45. Motyl K and McCabe LR. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol. Proced. Online* 11 ,2009, 296–315.
46. Kim JY, Song SH, Kim KL, Ko JJ, Im JE, Yie SW , et al. Human cord blood-derived endothelial progenitor cells and their conditioned media exhibit therapeutic equivalence for diabetic wound healing. *Cell Transplant.* 19, 2010,1635–1644.
47. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34 (+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/ paracrine manner. *Blood* 97 (2001) 3075–3085,30.
48. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J. and Schatteman GC. CD34<sup>+</sup> blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J. Vasc. Res.* 40 (2003) 368–377.
49. Pedroso DC, Tellechea A, Moura L, Fidalgo-Carvalho I, Duarte J, Carvalho E. and Ferreira L. Improved survival, vascular differentiation and wound

healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. PLoS ONE 6 (2011) e16114.

50. Wang CJ, Ko JY , Kuo YR , Yang YJ. Molecular changes in diabetic foot ulcers, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2011,94;105-110
51. Darby IA , Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG. Apoptosis is Increased in a Model of Diabetes-impaired Wound Healing in Genetically Diabetic Mice, *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 ;29(1):191-200.
52. Xie L, Zhang M, Dong B, Guan M, Lu M, Huang Z , et al. Improved refractory wound healing with administration of acidic fibroblast growth factor in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 ;93(3):396-403.
53. Rafehi H, El-Osta A, Karagiannis TC. Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing. *Int Wound J* 2011;8:12–21.
54. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med*. 2002 ;19(6):440-7.
55. Kim HR, Heo YM, Jeong KI, Kim YM, Jang HL, Lee KY , et al. FGF-2 inhibits TNF- $\alpha$  mediated apoptosis through upregulation of Bcl2-A1 and Bcl-xL in ATDC5 cells. *BMB Rep*. 2012 May;45(5):287-92.