



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI
KÖK HÜCRE PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİNE
ETKİSİ**

Serkan ŞAHİN

**Mayıs 2024
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI
KÖK HÜCRE PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serkan ŞAHİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin METE

Denizli, 2024

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Serkan ŞAHİN

İmza :

ÖZET

FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ

Serkan ŞAHİN

Yüksek Lisans Tezi, Kök Hücre Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin METE

Mayıs 2024, 53 Sayfa

Mezenkimal kök hücreler (MKH) deri yara iyileşmesinde etkili bir yöntem olarak gelişmeye devam etmektedir. Kök hücrelerin elde etme kolaylığı, düşük immünojenisite gibi diğer özellikleri, doğal yara iyileşmesi fizyolojisindeki nihai rolleriyle birlikte onlara rasyonel, güvenli ve aynı zamanda efektif bir terapötik yaklaşım getirmektedir.

Bu çalışmada dental pulpa ve yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan diyabetik ayak iyileşmesine ve TNF alfa, IL-1, IL-6 ve IL-10 ekspresyonuna etkisi karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

Çalışmada 24 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların 6 tanesi kontrol olarak kullanıldı. Tek doz 55 mg/kg intraperitoneal streptozotosin uygulaması ile 18 sıçanda diyabet oluşturuldu. Tüm sıçanların ayaklarında 5 mm çapında skar alanları oluşturuldu. 18 sıçanın 6 tanesi diyabetik kontrol olarak kullanılırken 6 tanesine 1×10^6 dental pulpa kökenli mezenkimal kök hücre 6 tanesine 1×10^6 yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre lokal olarak uygulandı. Sıçanlar kök hücre uygulamasını takiben 10. Günde sakrifiye edilerek deri dokuları alındı. Deri dokusunda kök hücrelerin proinflamatuvar sitokinlerden TNF alfa, IL-1 ve IL-6, anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 ekspresyonuna etkisi immunohistokimyasal olarak incelendi.

Kök hücre uygulaması yapılan gruplarda yara iyileşmesinin tedavi görmeyen gruba göre daha iyi olduğu tespit edildi. Mezenkimal kök hücre uygulamasının IL-1 ekspresyonunu azaltırken IL-10 ekspresyonunu artırdığı bulundu. Histokimyasal ve immunohistokimyasal bulgularımız yara iyileşmesi açısından dental pulpa ve yağ doku kök hücreleri arasında fark olmadığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, Diyabetik Yara, Dental Pulpa Kök Hücre, Adipoz Kök Hücre, Yara İyileşmesi

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022SABE023)

ABSTRACT

THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS OBTAINED FROM DIFFERENT SOURCES ON DIABETIC WOUND HEALING

SAHIN, Serkan

Master Thesis, Department of Stem Cell

Supervisor: Prof. Gulcin METE (PhD)

May 2024, 53 Pages

Mesenchymal stem cells (MSCs) continue to evolve as an effective method for skin wound healing. The ease of acquisition, low immunogenicity and other characteristics of stem cells, together with their ultimate role in the physiology of natural wound healing, make them a rational, safe and at the same time effective therapeutic approach.

In this study, the effects of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and adipose tissue on diabetic foot healing and TNF alpha, IL-1, IL-6 and IL-10 expression in rats were comparatively investigated.

24 male rats were used in the study. Six of the rats were used as control. Diabetes was induced in 18 rats with a single dose of 55 mg/kg intraperitoneal streptozotocin administration. Scar areas with a diameter of 5 mm were formed on the feet of all rats. While 6 of 18 rats were used as diabetic control, 1×10^6 dental pulp derived mesenchymal stem cells were applied locally to 6 rats and 1×10^6 adipose tissue derived mesenchymal stem cells were applied locally to 6 rats. Rats were sacrificed on the 10th day after stem cell administration and skin tissues were removed. The effects of stem cells on the expression of pro-inflammatory cytokines TNF alpha, IL-1 and IL-6 and anti-inflammatory cytokines IL-10 were analysed immunohistochemically.

Wound healing was found to be better in the stem cell treated groups compared to the untreated group. Mesenchymal stem cell application was found to decrease IL-1 expression and increase IL-10 expression. Our histochemical and immunohistochemical findings showed that there was no difference between dental pulp and adipose tissue stem cells in terms of wound healing.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Diabetic Wound, dental Pulp Stem Cell, Adipose Stem Cell, Wound Healing

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project number 2022SABE023.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini, önerilerini ve değerli tecrübesini benimle paylaşan yalnızca tez danışmanım olarak değil her konuda bana fazlasıyla yardımcı olan tez danışmanım ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımını esirgemeyen ve tezime katkı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Kök Hücre Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Nazlı ÇİL, M. Serkant ÜNAL, asistanları; Gül NEŞET, İsmail Kubilay BAYKAN, Can SORKUN, Hale YETGİN, Ayşenur CERİT'e teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR'e çok teşekkür ederim.

Tez süresince yardımcı olan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya ÇETİN'e teşekkür ederim.

Ders dönemim sürecinde destekleri ve emekleri için Pamukkale Üniversitesi Kök Hücre Anabilim Dalındaki değerli bölüm hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Üniversitede şans eseri yolumun kesiştiği ve o zamandan beri her zaman bana destek olan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ali Çağdaş YÖRÜKOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez sürecinde katkılarından dolayı başta Denizli Özel Egekent Hastanesi Başhekimi Anestezi ve Reanimasyon Uzmanı Dr. Gökhan PEKER başta olmak üzere tüm hastane yönetimi ve çalışanlarına desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez sürecimde yardıma ihtiyacım olduğunda en çok yanımda olan değerli arkadaşlarım Esmire YAVUZ, Emre KESMEN, Ayşe ÇELİKEL, Barış ALP'e ve sabır, ilgi ve anlayışlarıyla, maddi manevi beni destekleyen, sevgileriyle bugünlere gelmeme yardımcı olan annem Serpil ÖGEL, anneannem Ümran ÖGEL, dedem Ramazan ÖGEL ve daima arkamda desteğini hissettiğim büyük aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaçlar.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Kök Hücre.....	4
2.1.1. Adipoz Kök Hücre.....	4
2.1.2. Pulpa Kök Hücre.....	6
2.2. Deri Histoloji.....	7
2.2.1. Epidermis.....	8
2.2.1.1. Stratum Bazale.....	8
2.2.1.2. Stratum Spinozum.....	8
2.2.1.3. Stratum Granülozum.....	9
2.2.1.4. Stratum Korneum.....	9
2.2.1.5. Stratum Lusidum.....	9
2.2.2. Dermis.....	10
2.2.2.1. Papillar Dermis.....	11
2.2.2.2. Retiküler Dermis.....	11
2.3. Tip 2 Diyabet.....	11
2.4. Diyabetik Ayak.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
3.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması.....	14
3.2. Diyabet Oluşumu.....	14
3.3. Yara Oluşumu.....	14
3.4. Histokimya ve İmmunohistokimya.....	15
3.4.1. Doku Takip Yöntemi.....	15
3.4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü.....	15
3.4.3. Masson Trichrome Boyama Prosedürü.....	16
3.4.4. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü.....	17
3.5. İstatiksel Analiz.....	18
4. BULGULAR	19
4.1. Hematoksilen & Eozin ve Masson'un Üçlü Boyama Sonuçları.....	19
4.2. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları.....	22
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ	33
7. KAYNAKLAR	34
8. ÖZGEÇMİŞ	39
EKLER	

Ek-1. Etik Kurul Onayı	41
------------------------------	----

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1.1.1. Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli	5
Şekil 2.1.1.2. Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Fibroblast Morfolojisi	5
Şekil 2.1.2. Dental kök hücreler	7
Şekil 2.2.1. Bir Epidermis Parçasının Histolojik Görüntüsü	10
Şekil 2.2.2. Epiderminin Katmanları	10
Şekil 4.1.1. 10. Gün Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu Hematoksilen & Eosin	20
Şekil 4.1.2. 10. Gün Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu Masson's Trichrome	21
Şekil 4.2.1. Diyabet Oluşturulmayan ve 10. Gün Sakrifiye Edilen Kontrol Grubundan Alınan Deri Dokusu İmmunoperoksidaz & Hematoksilen	23
Şekil 4.2.2. Diyabet Oluşturulup Tedavi Uygulanmayan Ve 10. Gün Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu İmmunoperoksidaz & Hematoksilen	24
Şekil 4.2.3. Diyabet Oluşturulup Pulpa Kökenli Mezankimal Hücre Uygulanan Ve 10. Günde Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu İmmunoperoksidaz & Hematoksilen	25
Şekil 4.2.4. Diyabet Oluşturulup Yağ Kökenli Mezankimal Hücre Uygulanan ve 10. Günde Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu İmmunoperoksidaz & Hematoksilen	26

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 4.1. Deney Gruplarında Yara Çapı Ölçümlerinin İstatiksel Analizi	19
Tablo 4.2. Pulpa Kökenli ve Yağ Doku Kökenli Kök Hücrelerin Diyabetik Yara İyileşmesine Etkisi	21
Tablo 4.3. Pulpa Kökenli ve Yağ Doku Kökenli Kök Hücrelerin Diyabetik Yara İyileşmesinde TNF-Alfa, IL-1, IL-6 Ve IL-10 Ekspresyonlarının H-Skor Analizleri.	27

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler:

%	Yüzde
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-10	İnterlökin-10
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
MKH	Mezankimal Kök Hücre
MSC	Mezankimal Kök Hücre
DFU	Diyabetik Ayak Ülserleri
EB	Epidermolizis Bülloza
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
DP-MKH	Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücre
Kİ-MKH	Kemik İliğinden Elde Edilmiş Olan Mezenkimal Kök Hücre
K	Kontrol Grubu
DK	Diyabetik Kontrol Grubu
D+pMKH	Diyabetik Dental Pulpa Kökenli MKH Uygulanan Grup
D+yMKH	Diyabetik Yağ Kökenli MKH Uygulanan Grup
i.p.	İntraperitoneal
STZ	Streptozotosin
μ m	Mikrometre
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
mg	Miligram
kg	Kilogram
nm	Nanometre
cm ²	Santimetrekare
rpm	Revolutions per minute
dk	Dakika
sn	Saniye
CD	Cluster of Differentiation
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
PBS	Phosphate Buffered Saline
HRP-SA	Horse Radish Peroksidaz Konjugatı Streptavidin

1. GİRİŞ

Diyabet, insüline bağlı defekt veya insülin eksikliğinden kaynaklanan karbonhidrat, yağ ve proteinlerin yeterince kullanılmadığı tıbbi bakım gerektiren metabolik ve kronik bir hastalıktır (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2011). Hiperglisemi ise diyabetin kontrolsüz bir etkisidir ve zaman içinde çoğu sistemde, özellikle de sinir ve dolaşım sisteminde hasarlara yol açar (İmamoğlu 2009).

Diyabetik ayak ülserleri (DFU'lar), epidermolizis bülloza (EB) gibi diğer patolojik durumlarda yara iyileşmesinin zor olduğu bilinmektedir (Gurtner 2008). Kronik yaralar belirgin hasta morbiditesine neden olmakta, hastanın yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkiler yaratmakta ve ayrıca ağrı, stres ve depresyonu arttırmaktadır (Chatzigeorgiou 2010). Mevcut yara bakımında inflamasyonun azalması ve yara iyileşme sürecinin ilerlemesi beklenir (Nwomeh 1998). Yara iyileşme süreci çoğunlukla pahalı, zaman alıcı ve yetersizdir. Ayrıca, kronik yaraların% 50'sinden fazlası geleneksel tedavilere karşı önemli direnç göstermektedir (Maruyama 2007).

Deri yara iyileşmesi, çeşitli hücre tiplerinin yanı sıra çeşitli hücre moleküllerinin işbirliğini de içeren iyi organize edilmiş fizyolojik bir süreçtir (Hohman 1989). Yara onarımı sürecinde hücre ve biyokimyasal olaylar, hemostaz fazı, inflammatory faz, proliferatif faz ve ayrıca yeniden şekillenme (veya olgunlaşma fazı) olmak üzere dört ana faza ayrılır (Araújo 2010). Deri hasarını takiben, iyileşmenin birincil adımı kanamanın sona ermesidir. Trombosit agregasyonu aktivasyonu ve son olarak, trombosit kümeleri trombin ile stabil bir pıhtıya dönüşmesi ve büyük ölçüde bir fibrin ağının oluşumudur. Yara iyileşmesinin ikinci aşamasında, bakteriler enkazın yok edilmesine odaklanır ve yeni dokunun oluşumu için yara yatağını temizler (Dorai 2012). Bu tür olaylar esas olarak nötrofillerin ve makrofajların aktivasyonuna bağlıdır (Lee 2012). Yara onarımının proliferatif aşaması, yaranın kenar boşluklarının miyofibroblast fonksiyonları yoluyla kasılmasının yanı sıra epitelizasyon olarak da adlandırılan yaranın örtülmesini içerir (Buganza Tepole 2013). Bu arada, taze granülasyon dokusuna oksijen ve besin sağlamak için acilen yeni bir kan damarı kompleksinin oluşturulması gerekmektedir (Martin 2003).

Remodelasyon evresinde kollajen birikimi, yaralı bölgenin tamamen taze dokulardan kaplanması ve son olarak skar dokusunun oluşması sağlanır (Leukoc 2003). İnşa edilen doku yavaş yavaş güç kazanır ve ayrıca kollajen tip III'ten tip I'e yeniden şekillendirilir ve yara tamamen kapanır (Swanson 2015).

Büyüme faktörleri (PDGF, EGF, FGF ve VEGF), büyüme faktörü olmayan faktörler (insülin, eritropoietin, stromal hücre kaynaklı faktör-1, spidroin ve timosin beta 4), peptitler (anti-mikrobiyal peptitler, katelidinler, LL-37 türevleri ve vazoaaktif bağırsak peptidi), kan kaynaklı faktörleri (PDGF-BB, TGF- β 1, FGF-2, VEGF-A, EGF ve trombosit faktörü-4), mikroRNA'lar, ilaçlar ve küçük moleküller (adenozin trifosfat, statinler, deferoksamin, doğal bileşikler ve hyaluronan) içeren terapötik stratejiler, nanomateryaller ve kök hücreler (adipoz kaynaklı kök hücreler, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler ve plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücreler) anjiyogenezi ve yara iyileşmesini arttırmak için araştırılmaktadır (Nyenwe 2011). Mezenkimal stromal hücreler (MSC'ler) cilt yara iyileşmesini iyileştirmek için etkili bir yöntem olarak gelişmiştir. Ek olarak, MSC'nin elde etme kolaylığı, düşük immünojenisite gibi diğer özellikleri, doğal yara iyileşmesi fizyolojisindeki nihai rolleriyle birlikte onlara rasyonel, güvenli ve aynı zamanda efektif bir terapötik yaklaşım getirmektedir (Kato 2014). Aslında, MSC'ler deri hücresi göçünü, anjiyogenezi, granülasyon dokusu oluşumu ile birlikte re-epitelizasyonu teşvik eder ve bu da yara kapanmasının hızlanmasına neden olur.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) deri yara iyileşmesini iyileştirmek için etkili bir yöntem olarak gelişmeye devam etmektedir. Kök hücrelerin elde etme kolaylığı, düşük immünojenisite gibi diğer özellikleri, doğal yara iyileşmesi fizyolojisindeki nihai rolleriyle birlikte onlara rasyonel, güvenli ve aynı zamanda efektif bir terapötik yaklaşım getirmektedir. Aslında, MKH'ler deri hücresi göçünü, anjiyogenezi, granülasyon dokusu oluşumu ile birlikte re-epitelizasyonu teşvik eder ve bu da yara kapanmasının hızlanmasına neden olur.

1.1. Amaçlar

Yapılan literatür taramasında farklı kaynaklardan gelen MKH'lerin yara iyileşmesinde benzer işlevleri nasıl sergileyebileceğini ve belirli bir kaynaktan türetilen MKH'lerin diğer doku kaynaklarından türetilenlerden daha güçlü etkilere sahip olup

olmadığının anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Li 2015). Bu çalışmada pulpa ve yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan diyabetik ayak iyileşmesine ve TNF alfa, IL-1,IL-6 ve IL-10 ekspresyonuna etkisi karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

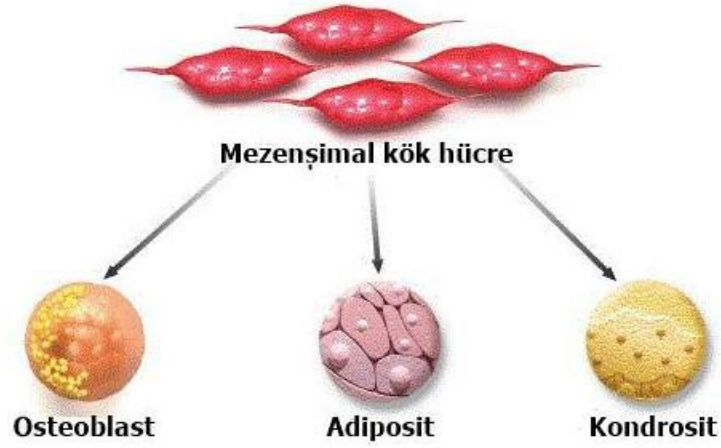
2.1. KÖK HÜCRE

Kök hücreler, kendini yenileme özelliği olan özelleşmemiş hücre tiplerine farklılaşabilen henüz farklılaşmamış hücreler olup, çok hücreli tüm canlıların doku ve organlarını oluşturan öncü hücrelerdir (Ural 2006). Ayrıca bu hücreler, hasar görmüş dokulara uygulandıklarında dokuyu onarabilme yeteneğine sahiptirler. Kök hücrelerin, çok sayıda bulunması, izole edilmesinin kolay olması, birçok doku ve organ tipine farklılaşabilmesi, otolog veya allojenik alıcılara güvenli bir şekilde uygulanabilmesi gibi yetenekleri sayesinde rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir (Tekeli vd 2016).

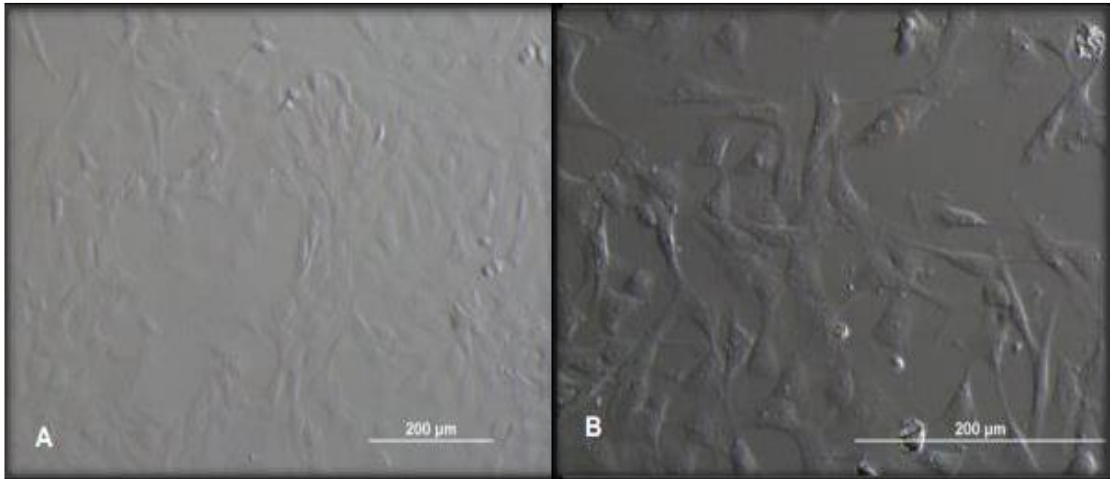
Çok sayıda telomeraz aktiviteleriyle kök hücreler bölünebilme (proliferasyon) ve kendi kendini yenileyebilme (self-renewal) yeteneğine sahip farklılaşmamış hücre gruplarıdır. (Sağsöz ve Ketani 2000). Kök hücreler farklılaşarak öncülük edecek hücre gruplarını oluştururlar (plastisite). Kök hücreler hasar görmüş olan dokuya nakledildiği zaman hasar görmüş olan dokuları onarırlar ve dokuların işlevini artırır. Dokuda hasar olmasa bile in vivo ortamda farklılaşmış nesillere katkı sağlar (Karaöz 2010).

2.1.1. ADİPOZ KÖK HÜCRE

Yağ doku mezodermden türemiş bir yapıdır. Yağ doku MKH'leri, elde edilmesi kolay ve bir seferde bol miktarda doku izole edilebildiği için alternatif bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler kondrojenik, adipojenik, nörojenik, osteojenik ve miyojenik farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Bengal, Perdiguero vd 2017).



Şekil 2.1.1.1. Yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşma potansiyeli



Şekil 2.1.1.2. Yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerin fibroblast morfolojisi A) X10 B) X20

Yağ dokusu köken alan mezenkimal kök hücreler yüzey belirteç ifadelerinin tümünü göstermezler. Fenotipik özelliklerine bakıldığında bu hücreler CD29, CD13, CD90, CD44, CD73, CD54, CD105, CD146 ve HLA-ABC için pozitif, endotel ve hematopoetik hücrelerin belirteçleri olan CD34, CD45, CD133 ve HLA-DR için ise negatif ifade göstermektedir. Kemik iliği kökenli kök hücrelerle adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler karşılaştırıldığında, CD36 için pozitif ve CD106 için negatif ifade gösterir (Maslov, Barone vd 2004).

2.1.2. PULPA KÖK HÜCRE

Kök hücre özelliğine sahip hücreler, dişin çeşitli kısımlarından izole edilmiştir. Bunlar; çocukların düşmüş olan süt dişlerinden ve yetişkinlerin dişlerinin pulpasından, dişlerin kökünü kemiğe sabitleyen periodontal bağdan, gelişen köklerin uçlarından ve diş folikülünden meydana gelmiş olan hücreleri içerir. Dental kaynaklı kök hücreler, mezenkimal kökenli osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşabilirler ve mezenkimal kök hücre özelliklerine sahiptirler. Dental kaynaklı mezenkimal kök hücreler çeşitli bölgelerden izole edilebilmektedir (Ansari 2017).

Diş yaralanmalarından sonra, dişin onarıcı dentin oluşturabildiği uzun zamandır biliniyor. Bu nedenle diş pulpasında yerleşmiş olan kök hücre topluluğunun varlığı düşünülmüştür (Kitamura 1999). Bu düşünce, insan kalıcı dişlerinde bulunan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin (DP-MKH) keşfedilmesiyle kanıtlanmıştır (Gronthos 2000). Tanımlanmış ve izole edilmiş ilk orofasial kök hücreler DP-MKHlerdir. Bunun yanında DP-MKH'ler mezenkimal kök hücreler gibi in vitro olarak farklılaşma yeteneği, plastik yapışma ve klonojenik özellik sergilemektedir (Gronthos 2000).

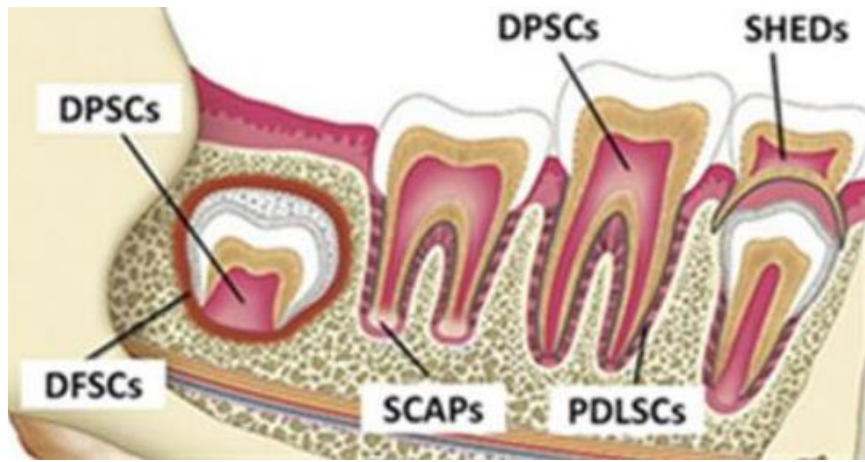
Dental pulpanın içinde bulunmuş olan mezenkimal kök hücrelerinin keşfi nedeniyle diş pulpası yakın zamanda kök hücre kaynağı olarak ilgi çekmiş ve klinik uygulamaları araştırılmıştır (Liu 2015 ve Yamada 2020). İnsan diş pulpası hayvanlarla karşılaştırıldığında elde edilmesi çok daha basit olduğu için üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Diş pulpasının ana hücre tipleri; endotelyal hücreler, odontoblastlar, fibroblastlar ve Schwann hücreleridir (Osaki 2022).

Dental kök hücrelerde, CD90, CD73, CD146, CD106, CD29, CD13, Stro-1 gibi mezenkimal kök hücre belirteçleri pozitifdir. Ancak CD11b, CD45 ve CD34 gibi hematopoetik kök hücre belirteçleri eksprese olmazlar (Aydın vd 2019). DP-MSC'ler, kemik iliğinden elde edilmiş olan mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH) ve adiposit kaynaklı kök hücreler dâhil olmak üzere diğer mezenkimal kökenli kök hücrelerden daha fazla proliferasyon gösterirler. Yapılmış olan hücre proliferasyonu analizinde DP-MKH'lerin Kİ-MKH'lere göre daha yüksek proliferasyon yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Tsutsui 2020).

Diş pulpasından elde edilen kök hücreler tedavi amacıyla gerekli tüm özellikleri karşılar ayrıca bu hücrelerin izole edilmesi de kolaydır. DP-MKH'lerin farklılaşabilme

potansiyelleri de yüksektir. Dondurma ve çözdürme evrelerinde de bir problemle karşılaşılmamaktadır (Todorovic 2008).

DP-MKH'ler üzerinde yapılan araştırma alanları büyük bir potansiyele sahiptir. Hücreler atılacak olan dişlerden elde edilebilmesi, iyi bir farklılaşma potansiyeli göstermesi ve kültürlenmesinin kolay olmasından dolayı tercih edilirler. DP-MSK'lerin Kİ-MKH'lere göre, çekilmiş dişlerden eldesi non-invaziv ve daha uygulanabilirdir (Shi 2020). Bu sebeplerle DP-MSK'ler, en son yapılan teknolojik araştırmalarda ve rejeneratif tıp uygulamalarının geliştirilmesi çalışmalarında umut verici bir hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (Tsutsui 2020).



Şekil 2.1.2. Dental kök hücreler

2.2. DERİ HİSTOLOJİSİ

Derinin toplam ağırlığı vücudun %16'sını oluşturduğundan en ağır organdır. Epidermis ve dermisten oluşur. Epidermis ektoderm, dermis ise mezoderm kökenli bağ dokusudur. Bu iki katmanın birleşme yerleri düzensizdir. Dermiste bulunan papilla denen çıkıntılar epidermisin epidermal kıvrımlar olarak bilinen uzantılarla kenetlenmiş şekilde gözüktür. Epidermisi oluşturan yapılar kıllar, tırnaklar, yağ ve ter bezleridir. Dermisin altında bulunan hipodermis yüzeysel bir fasya tabakası olup deriyi komşu dokulara gevşekçe bağlar (Junqueira 2009).

2.2.1. EPİDERMİS

Epidermis çok katlı yassı keratinleşmiş epitelden oluşmuş olup az sayıda olmak üzere 3 hücre tipi de içerir bunlar; melanositler, langerhans hücreleri ve merkel hücreleridir. Keratinleşmiş epidermis hücrelerine ise keratinositler denir.

Epidermis keratinositlerin oluşturmuş olduğu, dermisten dışarıya doğru yerleşen 5 tabakadan oluşur. (Junqueira 2009).

2.2.1.1. STRATUM BAZALE:

Bazal membran üzerinde epidermisle dermisen birleşim yerinde bazofilik, kübik ya da prizmatik hücrelerden oluşmuş olan tek bir hücre tabakasından oluşur. Desmozomlar bu tabakanın hücrelerini üst ya da yan yüzeyden bağlar. Hemidesmozomlar ise bazal hücre yüzeyinde bulunarak bu hücrelerin bazal laminaya tutunmasını sağlar. Bu tabaka kök hücreleri bulundurur ve çok sayıda mitoz aktivitesine sahiptir. Diğer tabakanın başlangıç bölümüyle birlikte epidermal hücrelerin sürekli olarak yenilenmesini sağlar. Bu süre yaklaşık olarak 15-30 gündür (Junqueira 2009).

2.2.1.2. STRATUM SPİNOZUM:

Keratin filaman demetlerinden oluşan uzantıları ve sitoplazması ve merkezde çekirdeği olan kübik ya da hafif yassılaştırmış hücrelerden oluşur. Bu tabakadaki hücreler birbirine hücreye dikenlerle kaplı görünüm veren desmozomlar ve dikensi sitoplazmik çıkıntılarla bağlanmıştır. Bu keratin filaman demetlerine tonofilaman denir. Tonofilamanlar desmozomların sitoplazmadan yoğun bölgelerinde sonlanırlar.

Bütün mitoz bölünmeler stratum spinosum ve stratum bazalenin birlikte oluşturdukları Malpighi tabakasında gerçekleşir. Epidermal kök hücreler sadece malpighi tabakasında yer alır (Junqueira 2009).

2.2.1.3. STRATUM GRANÜLOZUM:

Keratohiyalin granülleri adı verilen kaba bazofilik granüllerle dolu ve yassılaştırılmış poligonale hücrelerden oluşan 3-5 tabakadan meydana gelir. Bu granüllerin proteinleri fosforillenmiş histidin ve sistinden zengin bir protein içerir. Zarla çevrili olmamasına rağmen keratohiyalin granüllerinin yoğun bir şekilde bazofilik görünmesinin nedeni bol miktarda bulunan fosfat grubunu bulundurmasıdır (Junqueira 2009).

2.2.1.4. STRATUM KORNEUM:

Bu tabakadaki hücrelerin sitoplazması filamentöz bir skleroproteinden oluşan keratinle kaplıdır. Stratum korneum çekirdeksiz, keratinleşmiş ve yassılaştırılmış 15-20 tane hücre katmanından meydana gelir.

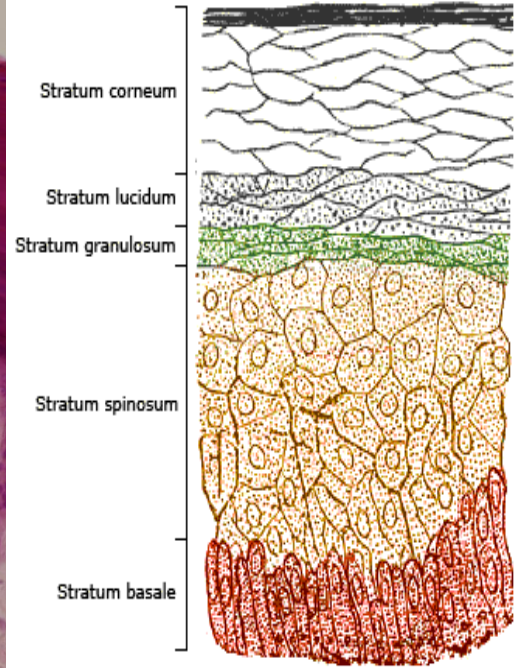
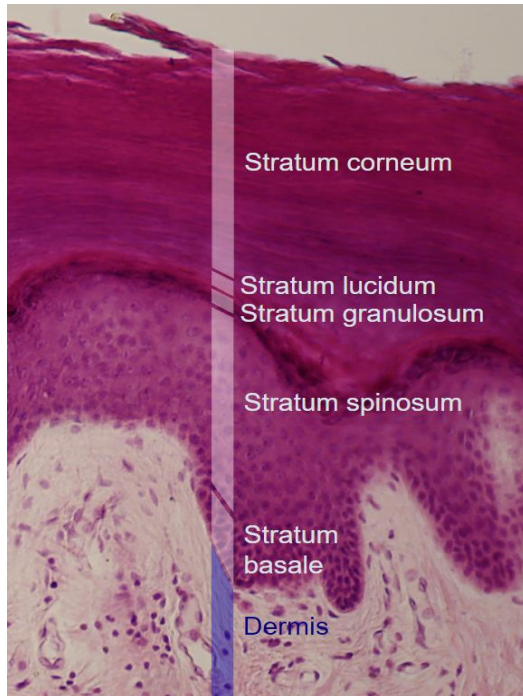
Keratinleşme sırasında lizozomal hidrolitik enzimler sitoplazmik organellerin ortadan kalkmasında rol alır. Bu hücreler stratum korneumun yüzeyinden dökülürler (Junqueira 2009).

2.2.1.5. STRATUM LUSİDUM:

Epidermiste ölü deri hücrelerinin oluşturduğu ince, açık renkli bir katmandır. Bu katman avuç içi ve ayak tabanlarında bulunan kalın deri üzerinde görülebilir.

Stratum granülozum ve stratum korneum katmanları arasında bulunan stratum lusidum üç ile beş arasında ölü, düzleşmiş keratinosit katmanından oluşur. Stratum lusidumdaki keratinositler belirgin sınırlara sahip değildir. Bu hücreler, stratum spinozum ve stratum granülozundan yukarı hareket ederlerken biriken lamellar cisimciklerin ekzositozu sonucu ortaya çıkan bir yağlı madde ile kaplıdır.

Stratum lusidumun kalınlığı, epidermal hücrelerin mitoz hızı ile kontrol edilir. Stratum bazaledeki melanozomlar, stratum lusidumun koyuluğunu belirler (Junqueira 2009).



Şekil 2.2.1. Bir epidermis parçasının histolojik görüntüsü Şekil 2.2.2 Epiderminin katmanları

2.2.2. DERMİS

Dermis epidermisi destekler ve onu derialtı dokusuna bağlayan bir bağ dokusu tabakasıdır. Dermisin yüzeyi çok düzensiz, epidermis uzantılarıyla iç içe olan oldukça çok dermal papillaya sahiptir. Dermal papilla basınca uğrayan yerlerde daha fazla bulunur. Dermis epiderminin bağlantı yüzeyini artırır ve onu güçlendirir (Junqueira 2009).

Dermisin papiller tabakası ve epiderminin stratum bazale tabakası arasında bazal lamina bulunur. Bu iki tabaka birlikte bir hat boyunca uzanır. Bazal laminanın altında ince retiküler lif ağlarından oluşan lamina retikularis bulunur. Bunlar birleşerek bazal membran diye adlandırılan yapıyı oluştururlar (Junqueira 2009).

Dermisi iki tabaka oluşturur: En dışta papiller dermis onun altındaki tabakada retiküler dermis tabakası bulunur.

2.2.2.1. PAPILLAR DERMİS

En dışta bulunan tabakadır. Papiller dermis fibroblast, mast hücreleri, makrofajlar ve diğer bağ dokusu hücreleri bulunan gevşek bağ dokusundan oluşur. Ara ara damarların dışına çıkan lökositler de görülebilir. Bu tabakadan bazal laminaya doğru özel kollajen fibriller girer. Bu fibriller dermisi epidermise bağlayan tutturucu fibriller olarak adlandırılır (Junqueira 2009).

2.2.2.2. RETİKÜLER DERMİS

Başlıca tip I kollajen olmak üzere düzensiz bağ dokulardan oluşan retiküler tabaka papiller tabakaya göre daha az hücre ve bol lif içerir. Başlıca glikozaminoglikan dermatan sülfattır. Elastik sisteme ait lifler içerir. Bu elastik ağ derinin esnekliğinden sorumludur.

Dermis zengin bir lenf damar ağı, kan damarları ve sinir bulundurur fakat parasempatik innervasyon yoktur (Junqueira 2009).

2.3. TİP 2 DİYABET

Rölatif insülin sekresyonunun azalması sonucunda insülin direnci meydana gelir (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2011). Normal biyolojik yanıtın ekzojen ve endojen insüline karşı bozulmasına insülin direnci denir. İnsülin kas, karaciğer ve yağ dokusunu hedef alır. Karaciğerde hepatik glukoz üretimi glukoneogenez ve glukojenoliz inhibe edilerek baskılanır. Glukozun yağ ve kas dokusuna alınarak enerji üretiminde kaynak olarak depolanmasını sağlar. İnsülin direnci olduğu zaman ayrıca insülinin kas, karaciğer ve yağ dokusundaki etkilerine karşı da direnç gelişir. Sonuçta hepatik insülin direnci ve periferik insülin direnciyle kanda hiperglisemi gelişir. Hiperglisemiyi dengelemek için Beta hücrelerinden daha fazla insülin salgınır. Fakat sonraki dönemde Beta hücreleri de özelliklerini kaybetmeye başlayınca, insülin salgınımında azalma ve sonuç olarak diyabet gelişir (İmamoğlu 2009).

2.4 DİYABETİK AYAK

Diyabetik ayak travma olmaksızın meydana gelen ampütasyonlar arasında en önemli nedendir. Morbidite açısından bakıldığında ciddi bir sosyoekonomik sorundur (İmamoğlu Ş, 2009). Diyabet tanısı almış olan hastaların %15'inde diyabetik ayak meydana gelmekte ve bunların % 14-20'si ise ampütasyona kadar gitmektedir (Malhotra 2012).

Diyabetin geç komplikasyonlarından olan periferik damar hastalıkları, periferik nöropati, ayak travmaları ve enfeksiyon ülserler için başlıca nedenlerdendir (Jeffcoate 2003). Ayrıca otonom ve motor defisitler ülserlere neden olur. Diyabetik ayak ülserleri iskemik, nöropatik ve nöroiskemik olarak sınıflandırılır. Bunlar arasında en sık görülen diyabetik ayak ülseri nöropatik ülserlerdir (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2011). Dokuyu uyaran sinir liflerinin fonksiyonunu kaybetmesinden ya da bozulmasından kaynaklanır (Malhotra 2012). Diyabetik nöropatide ülserin patogeneğinde distal simetrik sensörimotor polinöropati ağrı, parestezi, kas atrofi ve his kaybı yer alır (İmamoğlu 2009). Motor nöropati, ayak intrinsek kaslarında atrofiye neden olur ve sonuçta ayak parmaklarında fleksiyon deformitesine bağlı genellikle metatarsal kemik başları altında ve ayak parmaklarının altında olmak üzere basının arttığı alanların oluşmasına neden olur (Jeffcoate 2003). Motor nöropatide ayağın intrinsek ve ekstrinsek kasları arasındaki mekanik dengeyi değiştirmesi sebebiyle ayakta deformiteler meydana gelir (Malhotra 2012). Otonom nöropatide terlemede azalmaya bağlı olarak ayakta kuru cilt meydana gelir bunun sonucunda çatlaklar ve fissür oluşumu gözlenir (İmamoğlu 2009). Oluşan çatlaklardan bakteri girişi ve buna bağlı enfeksiyon oluşumu kolaylaşır. Diyabet hastalarında enfeksiyonlar mikrotrombüs oluşturarak dolaşımı bozar. Böylece parmakta gangren oluşabilir. Enfeksiyonun diyabet olmayanlarda yarattığı vazodilatasyon reaksiyonu diyabetiklerde mikrosirkülasyon bozulduğu için yetersiz olmaktadır (İmamoğlu 2009). Perfüzyon yeteneği kötü olan dokularda travmadan sonra iskemik ülserler oluşur. Ayrıca eklem hareketlerinin kısıtlanması, ayak bakımının kötü olması ve ayak deformiteleri ayak ülserlerinin gelişimi için risk durumudur (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2011).

Son çalışmalarda klinikteki risk faktörlerinin yanı sıra, moleküler düzeyde çok karmaşık mekanizmalarda normal yara iyileşmesinin önlenmesine sebep oluyorlar. Bu

olaya katılan kemositokinler arasında matriks metalloproteinazları, serin proteazlar, integrinler, kemokinler, replikatif hücre yaşlanması, büyüme faktörleri ve yetişkin kök hücreleri bulunur. Diyabetlilerde başlangıçta hasar görmüş olan dokuda inflamatuvar hücrelerini harekete geçiren kemotaktiklerin etkileri azaltılarak immün sistemin bozulduğu görülmektedir. Bunun sonucunda yara iyileşmesi azalır ve bakteriyel enfeksiyon riski artar. Ardından, inflamatuvar yanıt geç de olsa sağlandığında; inflamasyonda alevlenme ve proteoliz görülür. Uzun süre hiperglisemiye maruz kalma sonucunda glikolize proteinler üretilerek hücresel yanıtta bozukluk oluşur. Bunun sonucunda doku tamiri ve fibrozis oluşumu engellenir (Leung 2007).

Yapılan bir çalışmada diyabetik ülserli hastalarda lökositlerin ülserle göçü ve orada birikmesi engellenir ve bu sebeple normal yara iyileşmesi sağlanamaz (Leung 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanların Gruplandırılması

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu izniyle (PAUHADYEK-2022/31) 7-9 haftalık 24 adet erkek sıçan kullanıldı.

Sıçanlar aşağıdaki gibi gruplandırıldı.

1. Kontrol; diyabet oluşturulmayan ve yara oluşturulan 10. Gün dekapite edilen grup (K, N= 6)
2. Diyabet ve yara oluşturulan 10. Gün dekapite edilen grup (DK, N= 6)
3. Diyabet ve yara oluşturulan ve dental pulpa kökenli MKH uygulanan ve 10. Gün dekapite edilen grup (D+pMKH, N= 6)
4. Diyabet ve yara oluşturulan ve yağ kökenli MKH uygulanan ve 10. Gün dekapite edilen grup (D+yMKH, N= 6)

3.2. Diyabet Oluşumu

Diyabet oluşturulacak 18 sıçana distile suda taze olarak çözülmüş tek doz 55 mg / kg streptozotisin (STZ) (Sigma, St. Louis, MO) intraperitoneal olarak (i.p.) enjekte edildi. Deney gruplarında diyabet gelişimi, STZ tedavisinden 72 saat sonra kuyruk damarı kan örneklerinde glikoz düzeyleri ölçülerek doğrulandı. Kan şekeri düzeyi $250 \text{ mg/dl} \geq$ olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

3.3. Yara Oluşumu

Steril biyopsi punch kullanılarak tüm sıçanların ön sağ bacaklarında 0,5cm çapında tam kalınlıkta dairesel bir yara oluşturuldu.

Yara oluşturulan 12 sıçana mezenkimal kök hücre uygulaması yapıldı. Yaranın üstüne 1.10^6 kök hücre topikal olarak uygulandı.

Deneyde kullanılacak kök hücreler anabilim dalımızda daha önce elde edilmiş ve karakterizasyonu yapıp -80°C’de dondurulmuş olarak stoklanan kök hücrelerdir.

3.4. Histokimya ve İmmunohistokimya

Yara oluşturulduktan 10. gün sonra, her sıçanın ağırlığı ölçüldü ve sonrasında ketamin ve ksilazin anestezisi altında sıçanlar dekapite edildi. Yara bölgelerinden doku örnekleri alınarak %10'luk formaldehitte tespit edildi. Daha sonra ışık mikroskopik olarak takip edilen dokular parafine gömülerek 5 µm'de kesitler alındı. Lizin kaplı lamlara alınan kesitler hematoksinin ve eozin (H&E) ile boyandı. Kesitlerin bir kısmına IL-1, IL-6, TNF alfa ve IL-10 ekspresyonların belirlenmesi için immunohistokimyasal işlem uygulandı.

3.4.1. Doku Takip Yöntemi

1. Alınan dokular 72 saat formaldehitte bekletildi.
2. Akarsuda 60 dakika yıkandı.
3. %50 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
4. %70 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
5. %80 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
6. %90 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
7. %100 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
8. Ksilan I de 1 saat bekletildi.
9. Ksilan II de 1 saat bekletildi.
10. Parafin I de 1 saat bekletildi.
11. Parafin II de 1 saat bekletildi.
12. Dokulara parafine gömme ve etiketleme işlemi yapıldı.

3.4.2. Hematoksiklen-Eozin Boyama Protokolü

Dokular etüvde 60 dakika boyunca deparafinizasyona uğratıldı. Etüvden alınan dokular sırasıyla şu aşamalardan geçirilir:

1. Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika

2. Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika
3. %100 Etil alkol 10 dakika
4. %96 Etil alkol 10 dakika
5. %80 Etil alkol 10 dakika
6. %70 Etil alkol 10 dakika
7. Distile suda 10 dakika bekletme
8. Hematoksilen 3 dakika bekletme
9. Akarsuda Yıkama
10. Asit -Alkol Batırıp çıkarma
11. Amonyak 1-2 saniye
12. Akarsu Yıkanma
13. Eozin 10 saniye
14. %70 Etil alkol 10 dakika
15. %80 Etil alkol 10 dakika
16. %96 Etil alkol 10 dakika
17. %100 Etil alkol 10 dakika
18. Ksilen 10 dakika
19. Kapatma; Ksilen den alınan lamalar üzerine entellan damlatıldı. Hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmeye hazır hale getirdi.

3.4.3. Masson Trichrome Boyama Prosedürü

1. Kesitler 15 dk ksilende bekletilir.
2. Azalan alkol serisinde 3dk hidrate ve deparafinize edilir (100-90-70'lik ethanol). Distile su ile yıkanır (daldır çıkar).
3. Dokular 5 damla A solüsyonu 5 damla B solüsyonu karıştırılarak üzerleri örtülür ve 10 dk bekletilir ve uzaklaştırılır.
4. Yıkama yapmadan 5 dk bekletilir.
5. Dokular 10 damla C solüsyonu damlatılarak 4 dk bekletilip, distile su ile daldır çıkar yapılır.
6. Dokular 10 damla D solüsyonu damlatılarak 4 dk bekletilip, distile su ile daldır çıkar yapılır.
7. Dokular 10 damla E solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletilip, boya uzaklaştırılır.

8. Yıkamadan 5 dk kurutulur.
9. Dokular 10 damla F solüsyonu damlatılarak 5 dk bekletilip, distile su ile yıkanır.
10. Alkol serisinden geçirilip (daldır çıkar), entellan ile örtülür.

3.4.4. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü

Doku takip yöntemi tamamlanan doku bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µm'lik kesitler alınıp, kesitler benmariye bırakıldı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir:

1. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirilir.
2. Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 gece bekletilir.
3. Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletilir.
4. Ksilenden çıkarılıp havada kurutularak PAP pen ile dokular işaretlenir.
5. Kesitler sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilir.
6. Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkanır.
7. Antijen retrieval işlemi için önceden hazırlanmış ve 37°C'de bekletilen Tripsin solüsyonu (200cc PBS + 0,2gr Tripsin) ile 37°C'de 30 dakika bekletilir.
8. 10 dakika PBS'de bırakılır.
9. Dokulardaki endojenperoksidaz aktivitesi, %30'luk H₂O₂: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırılır.
10. Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
11. Kesitler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece inkübasyona bırakıldı. Bu çalışmada kullanılacak primer antikorlar IL-1 (Affinity Lot:4255931 cat no:DF8894), IL-6 (Affinity Lot:25a2866 cat no:DF8087), IL-10 (Affinity Lot:4255931 cat no:DF8894), TNF-α (Affinity Lot:7393336 cat no:AF7014) dır. Bütün primer antikorlar PBS ile dilüte edilir.
12. Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edilir.

13. Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş-sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horse radish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edilir.
14. Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3-10 dakika kadar muamele edilir.
15. Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin ile zıt boyama yapılır.
16. Kesitler akan suda yıkanır ve sırasıyla %50, %70, %80, %96, %100' lük etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletilir.
17. Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilen II'de 2'şer dakika bekletilir.
18. Ksilenden alınan dokuların üzeri kuruması beklenilmeden entellan ile kapatılır.
19. Boyanmanın değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanılır. IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α ekspresyonu gruplarda H skoru [$H \text{ SCORE} = \sum P_i (I+1)$] Kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi. Burada I, boyama yoğunluğunu belirtir (0=ifade yok, 1=hafif, 2=orta ve 3=güçlü). Pi, her yoğunluk için boyanan hücrelerin yüzdesini belirtir.

3.5. İstatiksel Analiz

Elde edilen histolojik sonuçların istatistiksel analizi SPSS for Windows 21 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farklılıkları araştırmak için tek yönlü ANOVA analizi yapıldı. İstatistiksel anlamlılıkla $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir. H skoru sonuçları, gruplar arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmak için Tukey post hoc testleri kullanılarak analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hematoksilen & Eozin ve Masson'un Üçlü Boyama Sonuçları

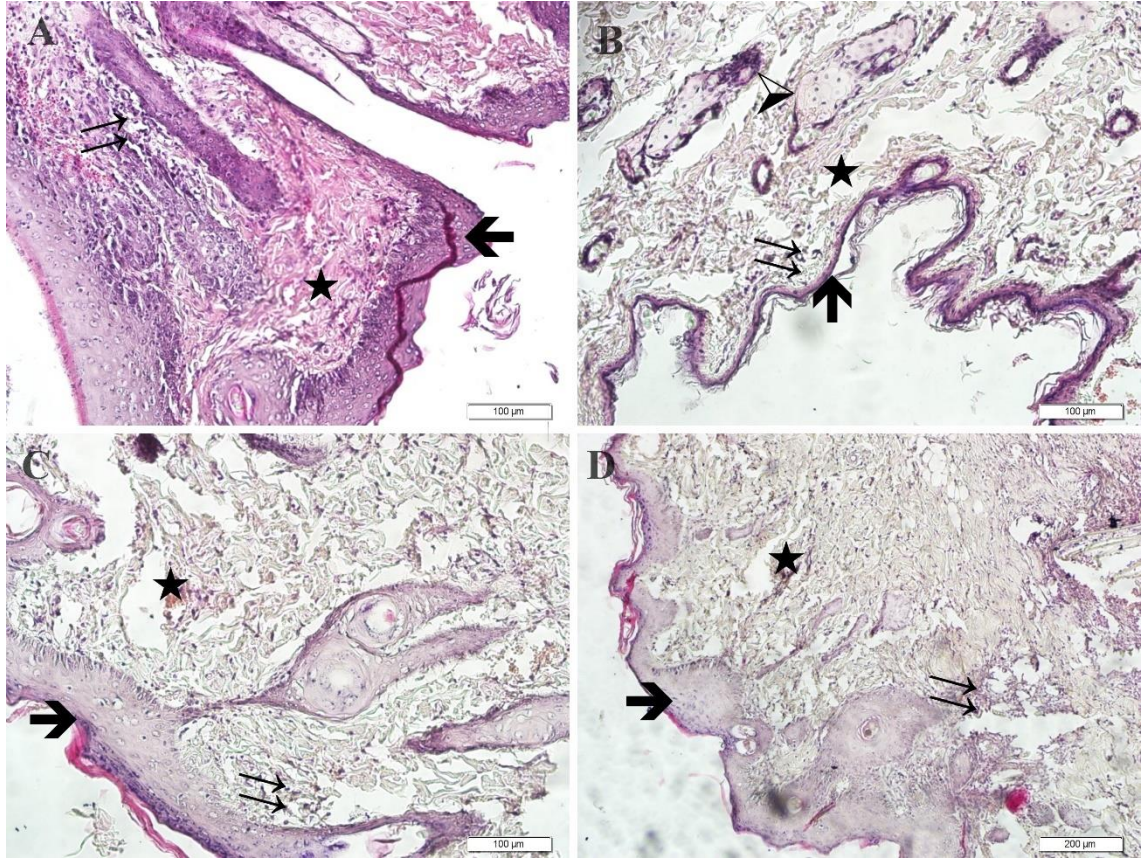
Kontrol, diyabet oluşturulan ve diyabet oluşturulduktan sonra dental pulpa ve yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan gruplarda yara çapları ölçüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda tüm gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlılık olmadığı belirlendi ($p < 0.05$).

Tablo 4.1. Deney Gruplarında Yara Çapı Ölçümlerinin İstatistiksel Analizi

	P Değerleri
K-DK	0,411
K-D+pMKH	0,924
K-D+yMKH	1
DK-D+pMKH	0,589
DK-D+yMKH	0,411
D+pMKH- D+yMKH	0,924

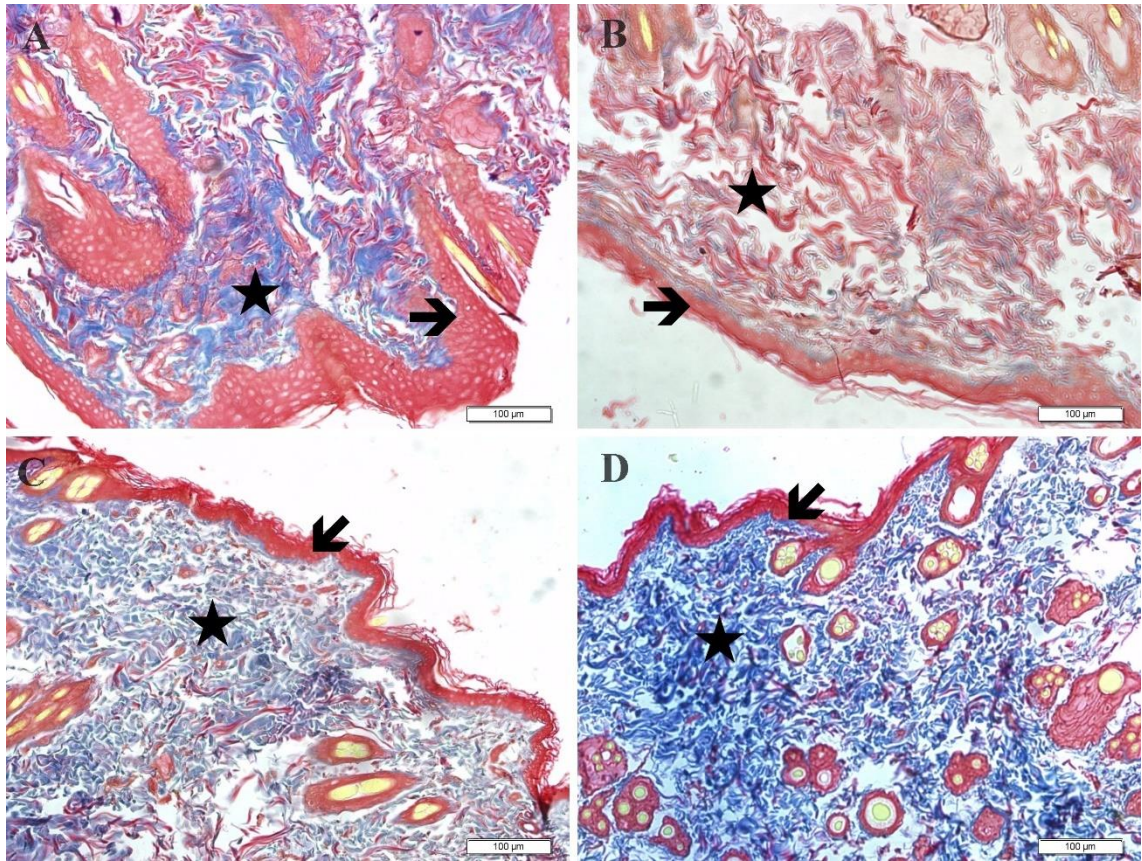
Kontrol, dental pulpa kökenli kök hücre ve yağ doku kökenli kök hücre uygulanan gruplarda deri dokusu normale yakın görünümdeydi. Epidermis çok katlı yassı epitel ile çevrilmişti. Diyabetik kontrol grubunda epidermis diğer gruplara karşın daha inceydi.

Dermiste liflerarası alanda boşlukların varlığı dikkati çekti. Dental pulpa kökenli ve yağ doku kökenli kök hücre uygulanan gruplarda epidermis diyabetik kontrol grubuna göre daha kalındı. Dermiste liflerarası alanda açılmaların azalmakla birlikte halen devam ettiği belirlendi. Bunun yanı sıra tüm gruplarda epiderminin tabanına yakın bölgede inflamatuvar hücrelerin varlığı ilgi çekiciydi (Şekil 4.1.1.).



Şekil 4.1.1. 10. Gün Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu. Epidermis (ok), dermis (yıldız), Yağ doku (ok başı), inflamatuvar hücreler (çift ok) .A: K, B; DK, C; D+pMKH, D; D+yMKH. Hematoksilen&Eosin. X200 Bar=100µm

Masson'un üçlü boyamasında kollajen liflerin kontrol ve tedavi gruplarında yoğun olduğu ancak tedavi edilmeyen diyabetik kontrol grubunda az olduğu izlendi (Şekil 4.1.2.)



Şekil 4.1.2. 10. 10. Gün Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu. Epidermis (ok), dermis (yıldız), A: K, B; DK, C; D+pMKH, D; D+yMKH. Masson's Trichrome X200 Bar=100µm

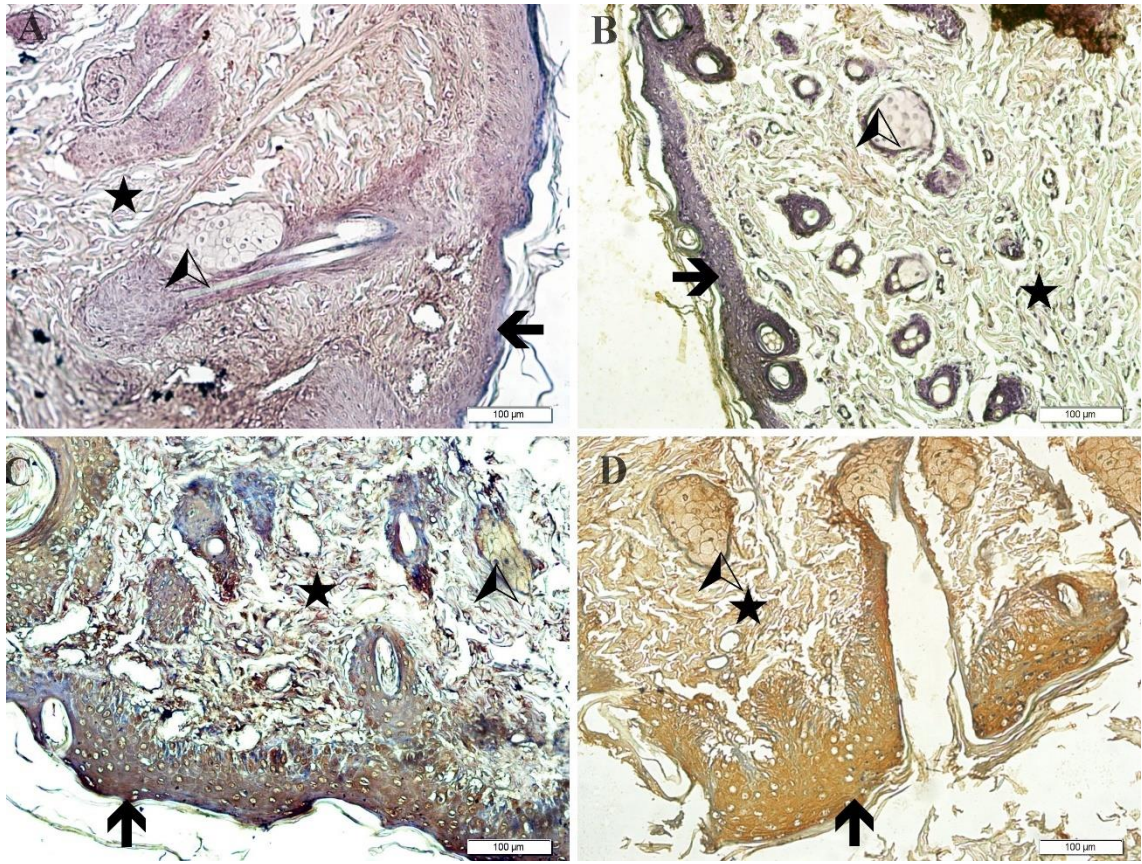
Tablo 4.2. Pulpa Kökenli ve Yağ Doku Kökenli Kök Hücrelerin Diyabetik Yara İyileşmesine Etkisi

K	Epidermis yenilenmesi	+++
	Granulasyon dokusu	++
	İnfiltrasyon	+
	Yeni damar oluşumu	+
	Fibroblast hücreler	++
	Kollajen yoğunluğu	+++
DK	Epidermis yenilenmesi	++
	Granulasyon dokusu	+

	İnfiltrasyon	+++
	Yeni damar oluşumu	+
	Fibroblast hücreler	+
	Kollajen yoğunluğu	+
D+pMKH	Epidermis yenilenmesi	+++
	Granulasyon dokusu	+
	İnfiltrasyon	++
	Yeni damar oluşumu	+
	Fibroblast hücreler	+++
	Kollajen yoğunluğu	+++
D+yMKH	Epidermis yenilenmesi	+++
	Granulasyon dokusu	+
	İnfiltrasyon	++
	Yeni damar oluşumu	+
	Fibroblast hücreler	+++
	Kollajen yoğunluğu	+++

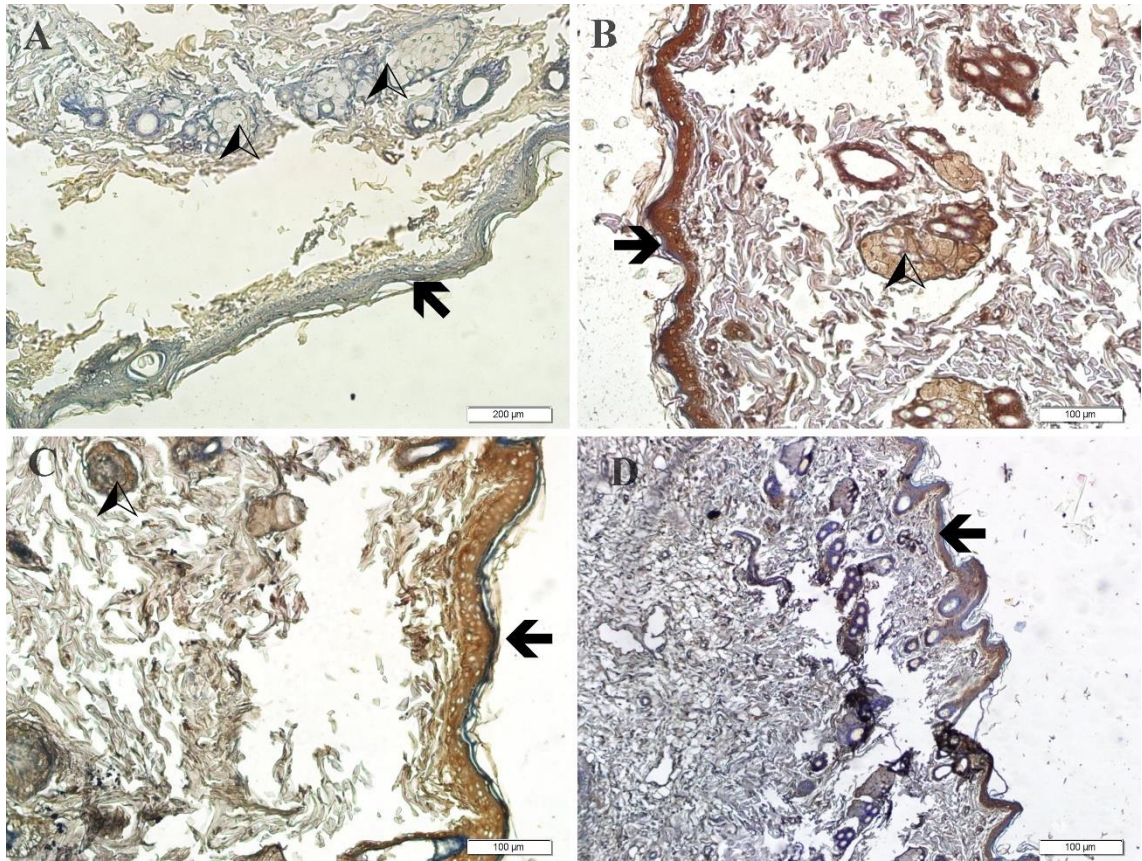
4.2 İmmunohistokimyasal Boyama sonuçları

Kontrol grubunda TNF ekspresyonu tüm yapılarda zayıf pozitif ekspresyon gösterirken IL-1 ekspresyonun zayıf orta derece olduğu dikkati çekti. IL-6 ekspresyonu orta derecede ve IL-10 ekspresyonun ise tüm yapılarda kuvvetli pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.1.).



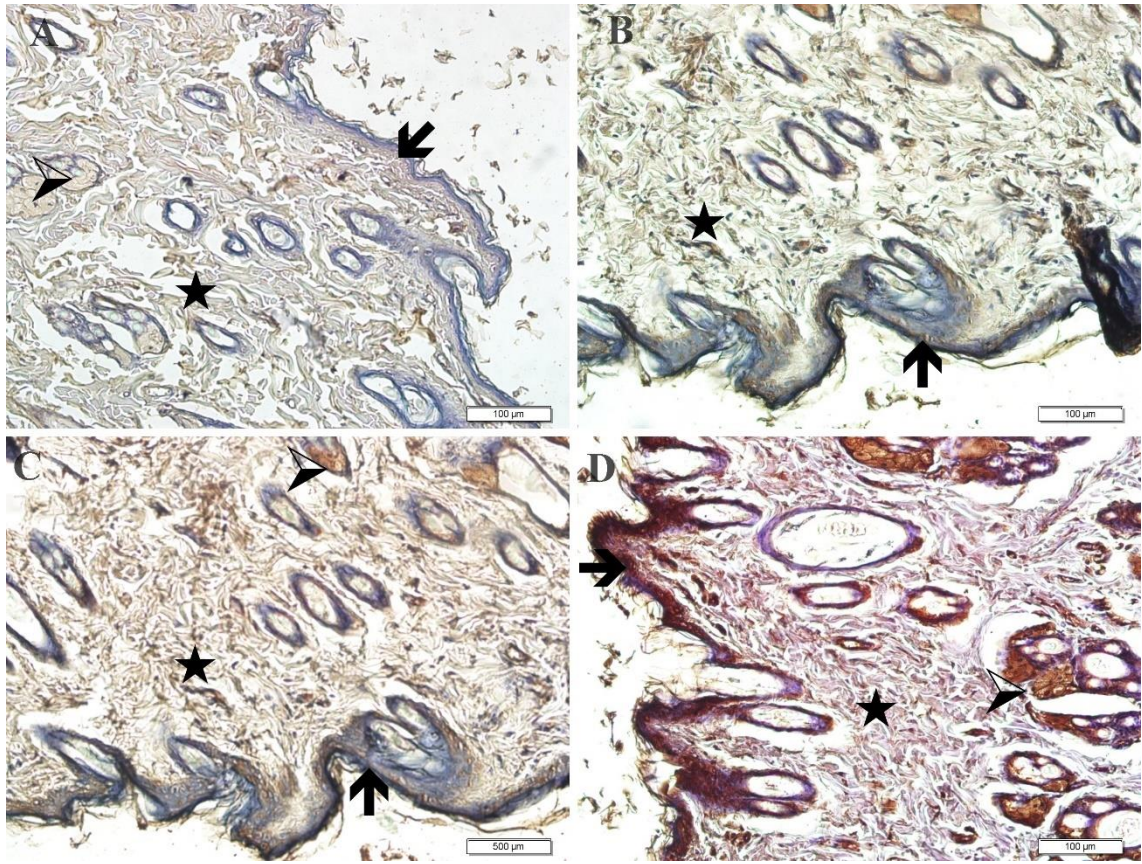
Şekil 4.2.1. Diyabet Oluşturulmayan Yara Oluşturulan ve 10 Gün Sakrifiye Edilen Kontrol Grubundan Alınan Deri Dokusu. Epidermis (ok), dermis (yıldız), Yağ doku (ok başı), inflamatuvar hücreler (çift ok) . A; TNF alfa, B; IL-1, C;IL-6, D; IL-10 ekspresyonu. İmmunoperoksidaz & Hematoksilen. X200 Bar=100μm

Diyabetik kontrol grubunda TNF alfa ekspresyonu epidermiste ve yağ bezlerinde zayıf pozitif reaksiyon gösterirken, kollajen liflerde orta derece pozitif. Bu grupta IL-1 ve IL-6 ekspresyonunun tüm yapılarda kuvvetli pozitif olduğu dikkati çekti. IL-10 reaksiyonu ise epidermiste, kıl folliküllerinde ve yağ bezlerinde orta derecede kollajen liflerde ise zayıf negatif boyanma gösterdi (Şekil 4.2.2.).



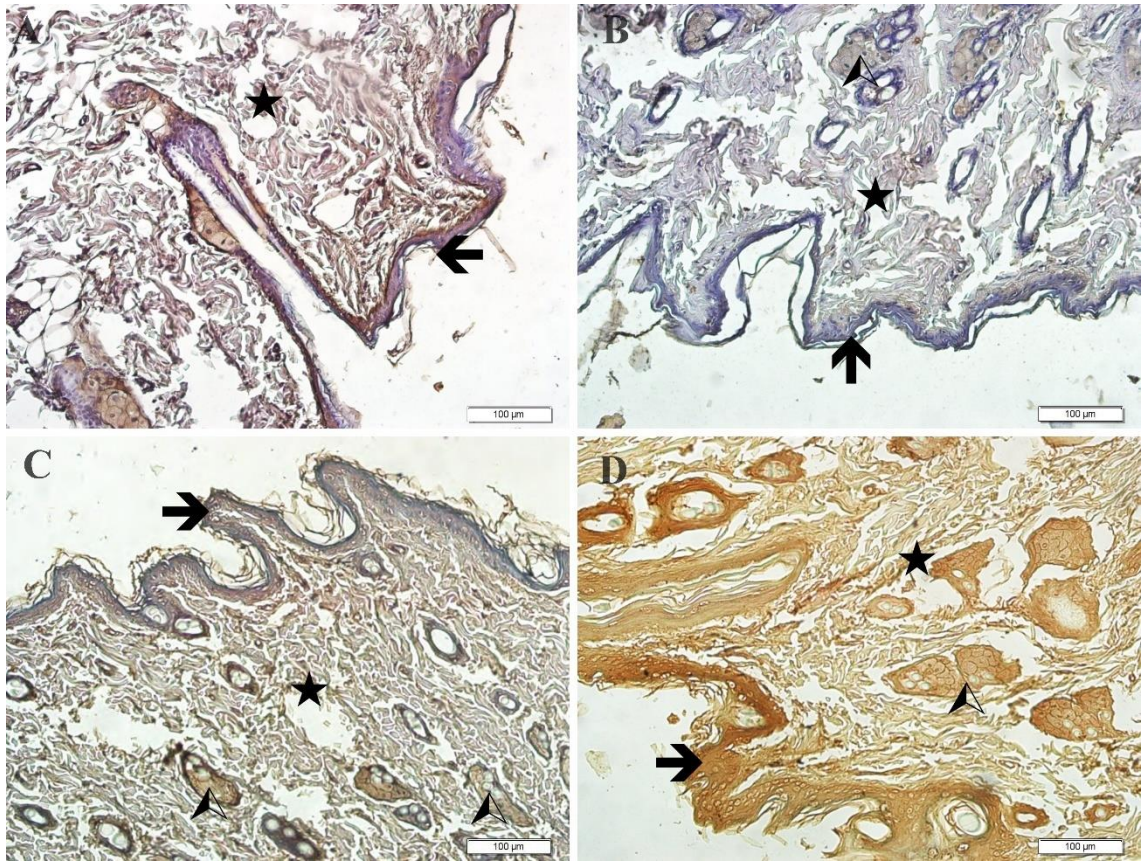
Şekil 4.2.2. Diyabet Oluşturulup Tedavi Uygulanmayan ve 10. Gün Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu. A; TNF alfa, B; IL-1, C; IL-6 D; IL-10 ekspresyonu. İmmunoperoksidaz & Hematoksilen. X200 Bar=100µm

Diyabet oluşturulup dental pulpa kökenli kök hücre uygulanan grupta TNF-alfa ve IL-6 epidermiste, kıl folliküllerinde ve yağ bezlerinde orta dercede reaksiyon gösterdi. TNF alfa ekspresyonunun kollajen liflerde zayıf, IL-6'nın ise orta derece olduğu gözlemlendi. IL-1 tüm yapılarda zayıf pozitif boyanma göstermesine karşın IL-10 ekspresyonunun tüm yapılarda kuvvetli pozitif boyanması ilgiyi çekti (Şekil 4.2.3.).



Şekil 4.2.3. Diyabet Oluşturulup Pulpa Kökenli Mezankimal Hücre Uygulanan ve 10. Günde Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu. **A; TNF alfa, B; IL-1, C;IL-6, D; IL-10 ekspresyonu. İmmunoperoksidaz & Hematoksilen. X200 Bar=100**

Diyabet oluşturulan ve yağ doku kökenli kök hücre uygulanan grupta TNF alfa ve IL-6 epidermis ve yağ bezlerinde zayıf orta derecede ekspresyon gösterirken IL-1 için ekspresyon zayıftı. Kollajen liflerde ise TNF alfa ve IL-6 ekspresyonu orta IL-1 için zayıf orta derecedeydi. IL-10 ise tüm yapılarda kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi (Şekil 4.2.4.)



Şekil 4.2.4. Diyabet Oluşturulup Yağ Kökenli Mezankimal Hücre Uygulanan Ve 10. Günde Sakrifiye Edilen Deneklerden Alınan Deri Dokusu. **A; TNF alfa, B; IL-1, C; IL-6, D; IL-10** ekspresyonu. İmmunoperoksidaz & Hematoksilen. X200 Bar=100

Tablo 4.3. Pulpa Kökenli ve Yağ Doku Kökenli Kök Hücrelerin Diyabetik Yara İyileşmesinde TNF-Alfa, IL-1, IL-6 Ve IL-10 Ekspresyonlarının H-Skor Analizleri

Gruplar	TNF -alfa P değerleri	IL-1 P değerleri	IL-6 P değerleri	IL-10 P değerleri
K-DK	0,861	0,022	0,002	0,015
K-D+pMKH	0,260	0,818	0,015	0,065
K-D+yMKH	0,065	0,240	1	0,937
DK-D+pMKH	0,055	0,026	0,045	0,048
DK-D+yMKH	0,08	0,026	0,04	0,043
D+pMKH- D+yMKH	0,093	0,132	1	0,393

5.TARTIŞMA

Yara iyileşmesi, travma, yanık veya diyabetik ülserler nedeniyle yaralanma sonrasında cilt dokusunda meydana gelen karmaşık bir biyolojik süreçtir (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2011). Diyabetik veya uzun süreli yatalak hastalarda kronik cilt yaralarının iyileşmesi zordur (İmamoğlu 2009). Bu nedenle yara iyileşmesi klinisyenler için en zorlu sorunlardan biri ve hastalar için hem fiziksel hem de finansal olarak ağır bir yüküdür. Atrofik yara izleri ve pigment anormallikleri riski olan geleneksel yara bakım yöntemleri arasında deri grefti, deri flep transplantasyonu, lazer tedavisi ve biyolojik stentler bulunur. Yara iyileşmesinde kullanılan biyolojik yapı iskeleleri maliyetli ve yavaştır ve büyük ölçüde travmaları tedavi etmek için uygun değildir (Chatzigeorgiou 2010).

Diğer tedaviler arasında spesifik büyüme faktörlerinin lokal olarak uygulanması (Nwomeh 1998) ve gen tedavisi yer alır (Maruyama 2007). Bununla birlikte, lokal büyüme faktörleri vücut sıvılarında kolayca parçalanırken, yara yerinde kontrol edilemeyebilir (Hohman 1989). Bu nedenle, yara iyileşmesini teşvik etmek için alternatif etkili ve güvenli yöntemlere ihtiyaç vardır. Son zamanlarda, mezankimal kök hücrelerin kendini yenilemesi ve rejeneratif sitokinlerin salgılanmasını teşvik etme yeteneği nedeniyle yara iyileşmesinde kullanılmaya başlamıştır (Ranjani 2010). Pluripotent özellikteki mezenkimal kök hücrelerin kullanımının güvenli olduğu kabul edilir ve embriyonik kök hücrelerle ilgili etik problemleri yoktur (Araújo 2010). Kök hücreler (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2011), makrofajları (Dorai 2012), T hücrelerini, B hücrelerini (Shah 2012) düzenleyerek (Shah 2012, Buganza Tepole 2013) inflamasyonu azaltırlar, (İmamoğlu 2009). Anjiyogenezi desteklemek için VEGF salgılayarak, (Leukoc 2003) fibroblastların ve keratinosit oluşturan hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekler (Singer 1999). Anti-fibroz sitokinleri üreterek ve (Chatzigeorgiou 2010) mikrovasküler endotelial hücrelere ve keratinositlere dönüştürerek (Shah 2012) parakrin bir şekilde yara iyileşmesini teşvik etmektedirler.

Ek olarak, MSC'nin elde etme kolaylığı, düşük immünojenisite gibi diğer özellikleri, doğal yara iyileşmesi fiziolojisindeki nihai rolleriyle birlikte onlara rasyonel,

güvenli ve aynı zamanda efektif bir terapötik yaklaşım getirmektedir (Swanson 2015, Gupta 2013). Aslında, MKH'ler deri hücresi göçünü, anjiyogenezi, granülasyon dokusu oluşumu ile birlikte re-epitelizasyonu teşvik eder ve bu da yara kapanmasının hızlanmasına neden olur.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) deri yara iyileşmesini iyileştirmek için etkili bir yöntem olarak gelişmeye devam etmektedir. Kök hücrelerin elde etme kolaylığı, düşük immünojenisite gibi diğer özellikleri, doğal yara iyileşmesi fizyolojisindeki nihai rolleriyle birlikte onlara rasyonel, güvenli ve aynı zamanda efektif bir terapötik yaklaşım getirmektedir. Aslında, MKH'ler deri hücresi göçünü, anjiyogenezi, granülasyon dokusu oluşumu ile birlikte re-epitelizasyonu teşvik eder ve bu da yara kapanmasının hızlanmasına neden olur.

Yapılan literatür taramasında farklı kaynaklardan gelen MKH'lerin yara iyileşmesinde benzer işlevleri nasıl sergileyebileceğini ve belirli bir kaynaktan türetilen MKH'lerin diğer doku kaynaklarından türetilenlerden daha güçlü etkilere sahip olup olmadığının anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Vojtassák 2006, Kallmeyer 2020).

Bu çalışmada dental pulpa kökenli mezenkimal kök hücreler ve yağ doku kökenli mezankimal kök hücreler olmak üzere iki farklı kaynak kullanılmıştır.

MKH'ler kondrositler, adipositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir, osteositler, miyositler, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve keratinositler (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2011, Gurtner 2008). Farklılaşma potansiyelleri göz önüne alındığında dokuya özgü hücre tiplerine dönüştürür, anjiyogenezi teşvik ederler.

Deri yara iyileşmesi, çeşitli hücre tiplerinin yanı sıra çeşitli hücre moleküllerinin işbirliğini de içeren iyi organize edilmiş fizyolojik bir süreçtir (Li 2015, Spriet 2015). Yara onarımı sürecinde hücre ve biyokimyasal olaylar, hemostaz faz, inflamatuvar faz, proliferatif faz ve ayrıca yeniden şekillenme (veya olgunlaşma fazı) olmak üzere dört ana faza ayrılır (Spriet 2015). Deri hasarını takiben, iyileşmenin birincil adımı kanamanın sona ermesidir. Birinci faz trombosit agregasyonu aktivasyonu ve trombosit kümeleri trombin ile stabil bir pıhtıya dönüşmesi ve büyük ölçüde bir fibrin ağının oluşumudur. Yara iyileşmesinin ikinci fazında, bakteriler enkazın yok edilmesine odaklanır ve yeni dokunun oluşumu için yara yatağını temizler (Jun 2013, Zhang 2020). Bu tür olaylar esas olarak nötrofillerin ve makrofajların aktivasyonuna bağlıdır (Ning 2009). Yara

onarımının proliferatif fazında, yaranın kenar boşluklarının miyofibroblast fonksiyonları yoluyla kasılmasının yanı sıra epitelizasyon olarak da adlandırılan yaranın örtülmesini içerir (Nery 2013). Bu arada, taze granülasyon dokusuna oksijen ve besin sağlamak için acilen yeni bir kan damarı kompleksinin oluşturulması gerekmektedir. Remodelasyon evresinde kollajen birikimi, yaralı bölgenin tamamen taze dokulardan kaplanması ve son olarak skar dokusunun oluşması sağlanır. İnşa edilen doku yavaş yavaş güç kazanır ve ayrıca kollajen tip III'ten tip I'e yeniden şekillendirilir ve yara tamamen kapanır (Loretelli 2020). Diyabetik hastalarda vasküler patolojiye bağlı ayak hastalığının yönetimi, kan dolaşımının azalması ve fibroblast göçü nedeniyle zordur.

Diyabetik hastalarda ayak hastalığının tedavisi hasarlı kan damarlarının onarılması gerekmektedir ve bu da hücre temelli tedavilerle kolaylaştırılabilir.

MKH'ler, yara bölgesindeki fibroblastlar, miyofibroblastlar, vasküler hücreler, perisitler ve keratinositler dahil olmak üzere yerleşik dokudaki bir çok hücre tipine farklılaşabilirler (Arabpour 2021). Diyabetik yaralar, keratinositlerin ve fibroblastların göçünün bozulması, kemokin ve büyüme faktörü üretiminin anormal düzenlenmesi, inflamatuvar hücrelerin anormal yanıtı ve anjiyogenezin inhibisyonu gibi karmaşık faktörler nedeniyle iyileşmesi zor yaralardır (Krzyszczuk 2020).

Birçok çalışma, intravenöz veya intradermal MKH'lerin uygulanmasının, hayvanlarda ve insanlarda eksizyonel yaraları, diyabetik ülserleri, radyasyon ülserlerini ve yanıkları gibi akut ve kronik cilt yaralanmalarında tedaviyi arttırdığını göstermiştir (Liu 2013)

Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar, MKH'lerin normal veya diyabetik hayvanlarda insizyonel tam kat yaralara topikal ve/veya subkutan enjeksiyon yoluyla ekzojen uygulaması, artan anjiyogenez ve yeniden epitelizasyon ile ilişkili yara iyileşmesinin hızlandığını ve yaralarda inflamasyonun azaldığını ortaya koymuştur (Philippidis 2004). Ek olarak, artan sayıda çalışma insanlarda iyileşmeyen yaraları tedavi etmek için klinik deneylerde MKH'leri kullanmıştır. Örneğin, Falanga vd , bir fibrin spreyi içinde verilen kemikiliği kökenli kök hücrelerin (BM-MSK'lerin) yara iyileşmesini hızlandığını bildirmiştir.

Ayrıca, Lu vd (2013) insanlarda otolog BM-MSK'lerin veya BM-türevi mononükleer hücrelerin (MNC'ler) intramüsküler enjeksiyonlarının diyabetik iskemi ve ayak ülserlerinin iyileşmesi üzerindeki etkisini karşılaştırdıkları randomize klinik çalışmada BM-MSK'lerle tedavi edilen grubun ülser iyileşme oranı, BM-MNC'ler grubundan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu saptamışlardır (Lu vd 2013). ADSC'ler

çeşitli koşullarda anjiyojenik faktörlerin, vasküler endotelial büyüme faktörünün ve bFGF'nin ekspresyon seviyelerini artırır (Ning 2009, Liu 2013). Çalışmalarda bu büyüme faktörlerinin yara iyileşmesinde proliferasyon ve migrasyonu artırdığı gösterilmiştir.

Liu ve arkadaşları in vitro olarak çeşitli kültür koşulları altında hADSC'ler tarafından bFGF salgılandığını bildirmiştir (Liu 2013). ADSC'ler oksidatif stresi inhibe eder (Nery 2013) Hayvanlarda yara iyileşmesi üzerine yapılan önceki çalışmalarda fare kaynaklı ADSC hücreleri veya genetik olarak modifiye edilmiş hücreler kullanılmıştır bu hücreler yara iyileşmesi üzerinde faydalı etkiler göstermiştir. Bizim çalışmamızda dental pulpa ve yağ doku olmak üzere iki farklı kaynaktan elde edilen kök hücreler kullanıldı. Kök hücrelerin yaralı deri epidermisinde hücre kat sayısını artırdığı diyabetik dokuda izlenen dejenerasyonları kısmen geri döndürdüğü ancak inflamasyonda çok etkili olmadığını gösterdi.

Kök hücre tabanlı tedavilerin onarıcı etkilerinin kısmen anti- anti-enflamatuar etkilere bağlı olduğu varsayılmıştır. İmplant edilen kök hücrelerin immünomodülatör düşük dereceli inflamasyonun ortadan kaldırılmasına etki eder, hasarlı dokuların iyileşmesini hızlandırır ve vücudu homeostazda tutar (Arabpour vd 2021).

Kök hücreler doku hasarından sonra doku homeostazını sağlamak için, iyileşmenin farklı aşamalarında pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasında rol oynarlar (Loretelli vd 2020).

Kato vd (2014) yılında yaptıkları bir çalışmada diyabetik farelere kemik iliği kaynaklı kök hücre verdiklerinde keratinositlerin uyarıldığı ve keratinositlerde fonksiyonel iyileşmenin olduğu plantar deri lezyonlarının iyileşmesinin hızlandığı saptanmıştır (Kato vd 2014)

Shen ve arkadaşları diyabetik yaralarda interlökin-1, interferongamma, TNF- α ve interlökin-6 gibi proinflamatuvar sitokinler de artış olduğunu göstermiştir (Shen vd 2021).

Topikal olarak uygulanan mikrogliya/KH'ler antiinflamatuvar sitokin IL-10 üreterek inflamasyonu azaltma potansiyeline sahiptir (Wang vd 2016). Plasenta kaynaklı kök hücrelerin topikal uygulanmasının (PMSC'ler) IL-10 antikörlerini artırdığını aynı zamanda IL-1, TNF- α ve IL-6 seviyelerine düşüşe neden olduğu belirtilmiştir (Wang vd 2016).

Bir başka çalışmada da MKH'lerin proinflamatuvar IL-1 ve IL-6 seviyeleri sitokinlerin salınımını azaltarak ve yara bölgesinde antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırarak kutanöz yaraların iyileşmesini sağladığı bulunmuştur (Shen vd 2021).

Diyabetik yaralarda makrofaj fagositozu bozulur ve makrofaj infiltrasyonu ve inflamasyon yavaşlar. M1 makrofajları proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF- α , IFN- α) varlığıyla aktive olur. IL-4, IL-10 ve TGF- β gibi antiinflamatuvar sitokinler ise M1'den M2 makrofajlarına geçişi tetikler dolayısıyla bunlar TGF- β ve IL-10 üretimi ile karakterize edilir (Krzyszczuk vd 2020). Çalışmalar göstermiştir ki M2 makrofajları anjiyogenezi artırır, sinir hasarını azaltır ve inflamasyonu bastırır. Topikal olarak uygulanan KH'ler makrofajlarda bir değişime neden olduğu gösterilmiştir.

Klasik olarak aktive edilmiş veya M1 makrofajlar, IL-1, IL-6, IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinleri salgırlar. M2 makrofajlar, ki bunlar immünoregülatör ve anti-inflamatuvar. IL-4 ve IL-13 gibi Th2 sitokinleri ve anti-enflamatuvar IL-10 ve TGF- β gibi sitokinleri salgırlar (Philippidis vd 2004).

Bizim çalışmamızda DK grubunda proinflamatuvar sitokinlerden TNF alfa, IL-1, IL-6 arttığı aynı zamanda antinflamatuvar sitokinlerdende IL-10 seviyesinde de azalma olduğu izlendi. Kök hücre uygulanan gruplarda diyabetik kontrol grubuna göre IL-1 ve IL-6 ekspresyonunda azalma izlenirken TNF alfa seviyesinde değişme izlenmedi. Bununla birlikte IL-10 ekspresyonunda artış belirgindi. Diyabetik kontrol grubuna göre tedavi gruplarındaki iyileşmenin daha iyi olması önceki çalışmalarda gösterildiği gibi sitokin salgılarıyla ilgili olabilir. Bununla birlikte tedavi edilmeyen grupta epitel dokuda yenilenmenin olması oldukça dikkat çekiciydi. Bu grupta genel olarak IL-10 azalışı izlenmekle birlikte IL-10 ekspresyonun epidermis hücrelerinde olması ve reaksiyonun orta derece olması epidermis yenilenmesinin nedeni olabileceği kanısındayız. Ancak dermiste IL-10 ekspresyonun negatife yakın olması iyileşmenin diğer gruplara nazaran daha geride olmasına neden olmuş olabilir.

Tedavi hücrelerindeki immunohistokimyasal boyanma kontrol grubuyla benzerdi.

6. SONUÇ

Dental pulpa ve yağ doku kökenli kök hücrelerin diyabetik yaralara topikal enjeksiyonunun yara iyileşmesini teşvik ettiği saptandı.

Hem dental pulpa hem de yağ doku kökenli kök hücreler IL-1 ve IL-6 ekspresyonunu azalttı ve IL-10 ekspresyonunu artırdı. Ancak TNF alfa ekspresyonuna etki etmedi. Ayrıca kök hücrelerin en etkili olduğu sitokinlerin IL-1 ve IL-10 olduğu saptandı.

Çalışmamızda yara iyileşmesi açısından dental pulpa ve yağ doku kök hücreleri arasında fark bulunmadı.

Sonuç olarak oldukça kompleks bir süreç olan yara iyileşmesinde kök hücrelerin tedavide etkili olduğu bulundu. Ancak yara iyileşmesinde kök hücre kullanımının daha kapsamlı araştırılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration *Nature*, 453, pp. 314-321
- Singer, A.J., Clark, R.A. (1999). Cutaneous Wound Healing *N. Engl. J. Med.* 341, pp. 738-746
- Chatzigeorgiou, A., Harokopos, V., MylonaKaragianni, C., Tsouvalas, E., Aidinis, V., Kmper, E.F. (2010). The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann. Med.*, 42, pp. 426-438
- Khanna, S., Biswas, S., Shang, Y., Collard, E., Azad, A., Kauh, C., et al. (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice *PLoS One*, 5, p. 9539
- Nwomeh, B.C., Yager, D.R., Cohen, I.K. (1998). Physiology of the chronic wound *Clin. Plast. Surg.*, 25, pp. 341-356
- Maruyama, K., Asai, J., Ii, M., Thorne, T., Losordo, D.W., D'Amore, P.A. (2007). Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing *Am. J. Pathol.*, 170, pp. 1178-1191
- Hohman, T.C., Nishimura, C., Robison Jr., W.G. (1989). Aldose reductase and polyol in cultured pericytes of human retinal capillaries *Exp. Eye Res.*, 48, pp. 55-60
- Ranjani, M., Rajan, S., Brindha, P. (2010). Antioxidant and antibacterial potentials of aloe vera juice extract against wound isolates. *J Pure Appl Microbiol*; 4:2733–2739.
- Araújo, L.U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V.C., Carneiro, C.M., Silva-Barcellos, N.M. (2010). Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir Bras*;25:460–466.

- Dorai, A.A. (2012). Wound care with traditional, complementary and alternative medicine. *Indian J Plast Surg*; 45:418–424.
- Shah, J.M., Omar, E., Pai, D.R., Sood, S. (2012). Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg*;45:220–228.
- Lee, Y.S., Wysocki, A., Warburton, D., Tuan, T.L. (2012). Wound healing in development. *Birth Defects Res C Embryo Today*;96:213–222.
- Buganza Tepole, A., Kuhl, E. (2013). Systems-based approaches toward wound healing. *Pediatr Res*;73:553–563.
- Leukoc, J. (2003). Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice *Biol.*, 73, pp. 448-455
- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. (2011). *Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu*. Ankara.
- Martin P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., McKercher, S.R. (2003). Wound healing in the PU. 1 null mouse—tissue repair is not dependent on inflammatory cells *Curr. Biol.*, 13, pp. 1122-1128
- Swanson, T., Keast, D., Cooper, R., Black, J., Angel, D., Schultz, G., Carville, K., Fletcher, J. (2015). Ten top tips: identification of wound infection in a chronic wound *Wounds*.
- Nyenwe, E.A., Jerkins, T.W., Umpierrez, G.E., Kitabchi, A.E. (2011). Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism*; 60(1):1–23. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.09.010>.
- Yazdanpanah, L., Nasiri, M., Adarvishi, S. (2015). Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World J Diabetes*; 6(1):37–53. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i1.37>.
- İmamoğlu, Ş., Ersoy, C. (2009). *Diabetes Mellitus*. İstanbul: Deomed Medikal Yayıncılık; 13-25,319-323.
- Kato, J., Kamiya, H., Himeno, T., Shibata, T., Kondo, M., Okawa, T., Fujiya, A., Fukami, A., Uenishi, E., Seino, Y., Tsunekawa, S., Hamada, Y., Naruse, K., Oiso, Y., Nakamura, J. (2014). Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing

- through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats. *J Diabetes Complications*. 28(5):588–95. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.05.003>.
- Si, Y.L., Zhao, Y.L., Hao, H.J., Fu, X.B., Han, W.D. (2011). MSCs: biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev*. 10(1):93–103. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.08.005>.
- Ankrum, J., Karp, J.M. (2010). Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 16(5):203–9. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.02.005>.
- Gupta, P.K., Chullikana, A., Parakh, R., Desai, S., Das, A., Gottipamula, S., Krishnamurthy, S., Anthony, N., Pherwani, A., Majumdar, A.S. (2013). A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med*. 11(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-143>.
- Vojtassák, J., Danisovic, L., Kubes, M., et al. (2006). Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett*. 27(Suppl 2):134.
- Sarasúa, J.G., López, S.P., Viejo, M.A., et al. (2011). Treatment of pressure ulcers with autologous bone marrow nuclear cells in patients with spinal cord injury. *J Am Paraplegia Soc*. 34(3):301–7.
- Karp, J.M., Teo, G.S.L. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 4(3):206–16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>.
- Li, Z., Hu, X., Mao, J., Liu, X., Zhang, L., Liu, J., Li, D., Shan, H. (2015). Optimization of mesenchymal stem cells (MSCs) delivery dose and route in mice with acute liver injury by bioluminescence imaging. *Mol Imaging Biol*. 17(2):185– 94. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0792-6>.
- Spriet, M., Hunt, G.B., Walker, N.J., Borjesson, D.L. (2015). Scintigraphic tracking of mesenchymal stem cells after portal, systemic intravenous and splenic administration in healthy beagle dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 56(3): 327–34. <https://doi.org/10.1111/vru.12243>.

- Jun Soo, B., Byung Kook, K., Jae Kyun, K., et al. (2013). Engraftment of human mesenchymal stem cells in a rat photothrombotic cerebral infarction model : comparison of intra-arterial and intravenous infusion using MRI and histological analysis. *J Korean Neurosurg Soc.* 54(6):467–76.
- Kallmeyer, K., André-Lévigne, D., Baquié, M., Krause, K.H., Pepper, M.S., PittetCuénod, B., Modarressi, A. (2020). Fate of systemically and locally administered adipose-derived mesenchymal stromal cells and their effect on wound healing. *Stem Cells Transl Med.* 9(1):131–44. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0091>.
- Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., et al. (2010). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 22(4): 625–34.
- Reed, M.J., Meszaros, K., Entes, L.J., Claypool, M.D., Pinkett, J.G., Gadbois, T.M., Reaven, G.M. (2000). A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metab Clin Exp.* 49(11):1390–4. <https://doi.org/10.1053/meta.2000.17721>.
- Zhang, J., Liu, Y., Chen, Y., Yuan, L., Liu, H., Wang, J., Liu, Q., Zhang, Y. (2020). Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem Cells Int.* 8810813.
- Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., Malka, G. (2019). Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2523.
- Ning, H., Liu, G., Lin, G., Yang, R., Lue, T.F., Lin, C.S. (2009). Fibroblast growth factor 2 promotes endothelial differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *J. Sex. Med.* 6, 967–979.
- Nery, A.A., Nascimento, I.C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J.E., Ulrich, H. (2013). Human mesenchymal stem cells: From immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytom. Part A J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 83, 48–61.
- Liu, L., Gao, J., Yuan, Y., Chang, Q., Liao, Y., Lu, F. (2013). Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol. Int.* 37, 551–560.

- Arabpour M., Saghazadeh A., Rezaei N. (2021). Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Int. Immunopharmacol.* 97, 107823. 10.1016/j.intimp.2021.107823
- Loretelli, C., Ben Nasr, M., Giatsidis, G., Bassi, R., Lancerotto, L., D'Addio, F., Fiorina, P. (2020). Embryonic stem cell extracts improve wound healing in diabetic mice. *Acta Diabetologica*, 57(7), 883–890.
- Kato, J., Kamiya, H., Himeno, T., Shibata, T., Kondo, M., Okawa, T., ... Nakamura, J. (2014). Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats. *Journal of Diabetes and its Complications*, 28(5), 588–595.
- Shen Z., Kuang S., Zhang M., Huang X., Chen J., Guan M., et al. (2021). Inhibition of CCL2 by bindarit alleviates diabetes-associated periodontitis by suppressing inflammatory monocyte infiltration and altering macrophage properties. *Cell. Mol. Immunol.* 18 (9), 2224–2235.
- Wang H., Chen L., Liu Y., Luo B., Xie N., Tan T., et al. (2016). Implantation of placenta-derived mesenchymal stem cells accelerates murine dermal wound closure through immunomodulation. *Am. J. Transl. Res.* 8 (11), 4912–4921.
- Krzyszczczyk P., Kang H. J., Kumar S., Meng Y., O'Reggio M. D., Patel K., et al. (2020). Anti-inflammatory effects of haptoglobin on LPS-stimulated macrophages: Role of HMGB1 signaling and implications in chronic wound healing. *Wound repair Regen. official Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 28 (4), 493–505.
- Philippidis P., Mason J. C., Evans B. J., Nadra I., Taylor K. M., Haskard D. O., et al. (2004). Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: Antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation Res.* 94 (1), 119–126.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 02.09.2022-E.250348



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-250348
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Prof. Dr. Gülçin METE

İlgi : 29/08/2022 tarihli dilekçeniz. *10.20.1.83*
36904

"Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Diyabetik Yara İyileşmesine Etkisi" (PAUHADYEK-2022/31) konulu çalışmanızın 01.09.2022 tarih ve 2022/07 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın **Hayvan Deneyleri Etiği** açısından uygun olduğuna ve **66 adet sıçan kullanılarak yapılmasına** oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE
Başkan

