

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE  
ESTETİK CERRAHİ  
ANABİLİM DALI

**ADİPOZ DOKU KÖKENLİ ERİŞKİN KÖK HÜCRE  
UYGULAMASININ D-GALAKTOZ İLE YAŞLANMA  
MODELİ OLUŞTURULMUŞ DERİDE YARA İYİLEŞMESİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE  
GÖSTERİLMESİ**

**DR. FATMA PINAR EROĞLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2014**

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE

ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

**ADİPOZ DOKU KÖKENLİ ERİŞKİN KÖK HÜCRE  
UYGULAMASININ D-GALAKTOZ İLE YAŞLANMA  
MODELİ OLUŞTURULMUŞ DERİDE YARA İYİLEŞMESİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE  
GÖSTERİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. FATMA PINAR EROĞLU**

**Danışman öğretim üyesi: Prof. Dr. CAN KARACA**

Bu araştırma DEÜ Araştırma Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013.KB.SAG.061 talep numarası ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<b>1- ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2- İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	<b>4</b>
<b>3- GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>7</b>
<b>4- GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>10</b>
Derinin Histolojik Tanımı ve Görevleri.....	10
Derinin Tabakaları.....	11
4.1.a. Epidermis.....	12
4.1.b Dermis.....	20
4.2.c Hipodermis.....	23
4.2.d Deri Ekleri.....	23
<b>4.2- YAŞLANMA VE DERİ</b> .....	<b>25</b>
4.2.1.Yaşlanma İle Epidermiste Olan Değişiklikler.....	26
4.2.2 Yaşlanma İle Dermiste Olan Değişiklikler.....	27
4.2.3 Deri Yaşlanmasını Etkileyen Faktörler.....	30
4.2.3.a Galaktoz ile Yaşlanma.....	31
4.2.4 Yaşlanma Belirtilerinin Önlenmesi ve Tedavisi.....	38
<b>4.3. KÖK HÜCRELER</b> .....	<b>44</b>
4.3.1 Kök Hücre Sınıflaması.....	45
<b>4.4- YARA İYİLEŞMESİ</b> .....	<b>60</b>
4.4.1 Yara İyileşme Tipleri .....	60
4.4.2 Yara İyileşmesi Fazları.....	61
4.4.3 Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	75

<b>5- GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>76</b>
<b>6- BULGULAR .....</b>	<b>98</b>
<b>7- TARTIŞMA .....</b>	<b>127</b>
<b>8- SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>133</b>
<b>9-KAYNAKLAR .....</b>	<b>135</b>

<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	
<b>Şekil 1:</b> Derinin tabakaları .....	11
<b>Şekil 2:</b> Epidermisin tabakaları.....	13
<b>Şekil 3:</b> Melanosit ve Langerhans hücresi.....	15
<b>Şekil 4:</b> Melanin biyosentezi .....	17
<b>Şekil 5:</b> Langerhans hücresi.....	19
<b>Şekil 6:</b> Epidermis ve dermisin tabakaları.....	20
<b>Şekil 7:</b> Galaktozun moleküler yapısı.....	32
<b>Şekil 8:</b> Oksidatif hasar sonucu oluşan hasarlı nükleozidler.....	33
<b>Şekil 9:</b> Oksidatif mitokondriyel DNA hasarı ve yaşlanma etkisi.....	34
<b>Şekil 10:</b> DNA hasarı ve sonuçları.....	35
<b>Şekil 11:</b> Pluripotent kök hücre.....	46
<b>Şekil 12:</b> Embriyonik kök hücre eldesi.....	48
<b>Şekil 13:</b> Mezenkimal kök hücreler ve farklılaşma potansiyelleri.....	53
<b>Şekil 14:</b> Yağ doku üzerinde CD 73 boyalı ADAS.....	55
<b>Şekil 15:</b> Yağ doku üzerinde CD 90 boyalı ADAS.....	55
<b>Şekil 16:</b> İntravenöz uygulanan mezenkimal kök hücre trofik etkisi.....	59
<b>Şekil 17:</b> Nötrofilin diapedez ile migrasyonu.....	63
<b>Şekil 18:</b> Mezenkimal kök hücre eldesi.....	86
<b>Şekil 19:</b> ADAS akım sitometri sonuçları.....	91
<b>Şekil 20:</b> ADAS akım sitometri sonuçları.....	92
<b>Şekil 21:</b> Akım sitometri sonuçlarının grafik ile karşılaştırılması.....	92

<b>Şekil 22:</b> Western Blot Yöntemi Sonuçları.....	104
<b>Şekil 23:</b> Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi.....	124

## **RESİM LİSTESİ**

<b>Resim 1:</b> Santrifüj cihazı.....	82
<b>Resim 2:</b> Hücrelerin santrifüj edilmesi.....	82
<b>Resim 3:</b> Hücrelerin ekiminde ve çoğaltılmasında kullanılan besiyeri.....	83
<b>Resim 4:</b> Hücrelerin ekiminde kullanılan flasklar.....	84
<b>Resim 5:</b> İnkübatörden hücre alınması.....	84
<b>Resim 6:</b> Hücrelerin pasajlanması.....	85
<b>Resim 7:</b> Hücrelerin pasajlanması.....	85
<b>Resim 8:</b> Hücrelerin pasajlanması.....	85
<b>Resim 9:</b> Grup I GFP gösterilmesi.....	88
<b>Resim 10:</b> Grup I GFP gösterilmesi.....	88
<b>Resim 11:</b> Grup III GFP gösterilmesi.....	89
<b>Resim 12:</b> Grup III GFP gösterilmesi.....	89
<b>Resim 13:</b> Dorsal cilt insizyonu.....	94
<b>Resim 14:</b> Dorsal kas fasyası üzerinden diseksiyon.....	94
<b>Resim 15:</b> Dorsal kas fasyası üzerinden diseksiyon.....	94
<b>Resim 16:</b> Cilt sütürasyonu ve ADAS enjeksiyonu.....	95
<b>Resim 17:</b> Cilt sütürasyonu ve ADAS enjeksiyonu.....	95
<b>Resim 18:</b> Grup I sakrifikasyon.....	99
<b>Resim 19:</b> Grup I sakrifikasyon .....	99
<b>Resim 20:</b> Grup II sakrifikasyon .....	99
<b>Resim 21:</b> Grup II sakrifikasyon .....	99

<b>Resim 22:</b> Grup III sakrifikasyon .....	100
<b>Resim 23:</b> Grup III sakrifikasyon .....	100
<b>Resim 24:</b> Grup IV sakrifikasyon.....	100
<b>Resim 25:</b> Grup IV sakrifikasyon .....	100
<b>Resim 26:</b> GFP işaretli ADAS dokuda gösterilmesi.....	109
<b>Resim 27:</b> HE boyama.....	112
<b>Resim 28:</b> Masson Trikrom boyama.....	113
<b>Resim 29:</b> TGF- $\beta$ immunhistokimyasal boyama.....	117
<b>Resim 30:</b> TGF- $\beta$ immunhistokimyasal boyama(büyütme).....	118
<b>Resim 31:</b> VEGF immunhistokimyasal boyama.....	119
<b>Resim 32:</b> VEGF immunhistokimyasal boyama(büyütme).....	120
<b>Resim 33:</b> Kollajen tip I immunhistokimyasal boyama.....	121
<b>Resim 34:</b> Kollajen tip I immunhistokimyasal boyama(büyütme).....	122



## **TABLO LİSTESİ.....**

<b>Tablo 1:</b> Deri yaşlanması ile oluşan histolojik değişiklikler.....	29
<b>Tablo 2:</b> Deri yaşlanması ile oluşan morfolojik değişikliklerin özeti.....	29
<b>Tablo 3:</b> ADAS'a ait immunfenotip belirteçleri.....	56
<b>Tablo 4:</b> Mezenkimal kök hücreler ve salgıladıkları mediatörler.....	58
<b>Tablo 5:</b> Kollajen tipleri ve dağılımı.....	71
<b>Tablo 6:</b> Yara iyileşmesinde etkili mediatörler.....	74
<b>Tablo 7:</b> Yara iyileşmesinde etkileyen faktörler.....	75
<b>Tablo 8:</b> Deney grupları ve yapılan işlemler.....	80
<b>Tablo 9:</b> Semikantitatif histolojik skorlama.....	111
<b>Tablo 10:</b> Semikantitatif histomorfolojik ve immunohistokimyasal skorlama.....	115
<b>Tablo 11:</b> Deney gruplarının histolojik skorlarının ikili karşılaştırılması.....	125
<b>Tablo 12:</b> İdrarda 8-OH-dG değerleri.....	126
<b>Tablo 13:</b> Deney gruplarının 8-OH-dG değerlerinin karşılaştırılması.....	127

## **KISALTMALAR .....**

**ADAS:** Adipose Derived Adult Stem Cell ( Adipoz Doku Kaynaklı Erişkin Kök Hücre)

**H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>:** Hidrojen Peroksit

**OH<sup>-</sup>:** Hidroksil İyonu

**NaCl:** Sodyum Klorür

**GFP:** Green Fluorescent Protein (Yeşil Floresan Protein)

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor ( Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor  $\beta$  (Transforme Edici Büyüme Faktörü)

**TRP-1:** Tyrosine Related Protein -1( Tirozin Bağımlı Protein-1 )

**TRP-2:** Tyrosine Related Protein -2( Tirozin Bağımlı Protein-2 )

**8-OH-d-Guanosin:** 8- Hidroksi- D-Guanozin

**DOPA :** Dihidroxy Phenil Alanine (Dihidroksi Fenilalanin)

**GAG:** Glikoz Amino Glikan

**PDGF:** Platelet Derived Growth Factor (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü)

**TNF - $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor ( Tümör Nekroz Faktör)

**FGF:** Fibroblast Growth Factor ( Fibroblast Büyüme Faktörü)

**EGF:** Epidermal Growth Factor ( epidermal büyüme faktörü)

**mRNA:** Messenger RiboNucleic Acide (Mesajcı Ribonükleik Asit)

**UVA:** Ultra Violet A

**UVB:** Ultra Violet B

**HA :** Hyaluronik asit

**DNA:** Deoxyribonucleic Acide ( Deoksi Ribonükleik asit)

**O<sup>-2</sup>:** Superoksit radikali

**SOD:** Superoxyde Dismutase (Süperoksit Dismutaz)

**ACTH:** Adrenocorticotropic Hormone (Adrenokortikotropik Hormon)

**GH:** Growth Hormone ( Büyüme Hormonu)

**CRH:** Corticotrophine Releasing Hormone (Kortikotropin Salgılatıcı Hormon)

**PRL:** Prolaktin Hormonu

**MMP:** Matriks Metalloproteinaz

**IPL :** Intense Pulse Light

**IGF:** Insulin-like Growth Factor (İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü)

**KGF:** Keratinosit Büyüme Faktörü

**PRP:** Platelet Riched Plasma (Plateletten Zengin Plazma)

**TSH:** Thyroide Stimulate Hormone( Tiroid Uyarıcı Hormon)

**DHEA:** Dihidroepiandrosteron

**CFU-F:** Colony forming unit- fibroblast (Koloni Oluşturucu Ünite-Fibroblast)

**EKH:** Embriyonik Kök Hücre

**YKH:** Yetişkin Kök Hücre

**MKH:** Mezenkimal Kök Hücre

**KI:** Kemik İliği

**IL:** Interleukine (İnterlökin)

**IFN:** Interferon

**MSC:** Mezenkimal Stromal Cell (Mezenkimal Stromal Hücre)

**MMSC:** Multipotent mezenkimal stromal hücre

**CD:** Clusters of Differentiation ( Farklanma Kümeleri)

**HLA:** Human Leucocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)

**MHC:** Major Histocompatibility Complex ( Major Doku Uygunluk Kompleksi)

**N<sub>K</sub> :** Natural Killer Hücre ( Doğal Öldürücü Hücre)

**PG:** Prostoglandin

**NO:** Nitric Oxide ( Nitrik Oksit)

**Th:** T Helper Hücre ( T yardımcı Hücre)

**GVHH:** Greft Versus Host Hastalığı

**SLE:** Sistemik Lupus Eritematozis

**HGF :** Hepotocyte Growth Factor (Hepatosit büyüme faktörü)

**PLA:** Processed Lipoaspirate ( İşlem Görmüş Lipoaspirat)

**TXA:** Tromboxane A (Tromboksan A)

**MITF:** Mikroftalmi associated transcription faktör( mikroftalmi ilişkili transkripsiyon faktörü)

**DHICA:** 5-6 Dihidroksi İndol 2-Karboksilik Asit

**SDS:** Sodium dodecyl sulfate( sodyum dodesil sülfat)

**LC-MS:** Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi

**DEÜTF:** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

**İYTE :** İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

**FACS:** Fluorescent Assisted Cell Sorter ( Floresan Yardımlı Hücre Sayımı)

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**PBS:** Phosphate Buffer Saline

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**SD:** Standart Deviation ( Standart Sapma)

**EDTA:** Etilendiamin tetra asetik asit

**G:** Gauge

**HE:** Hematoksilen-Eosin

**MT :** Masson's trikrom

**SPSS:** Statistical Package for Social Sciences

## TEŞEKKÜR

Cerrahi birimler içinde kişisel görüşüme göre en zoru olan Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi bölümü uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Prof. Dr. Ali Barutçu, Prof. Dr. Mustafa Yılmaz, Prof. Dr. Adnan Menderes, Prof. Dr. Haluk Vayvada ve Doç. Dr. Cenk Demirdöver'e, eğitim sorumlu hocam olması ve bana asistanlık eğitimim boyunca her aşamada destek verdiği ve bana inandığı için özellikle Prof. Dr. Can Karaca'ya teşekkürü borç bilirim.

Asistanlık eğitimim boyunca acı tatlı birçok anıyı paylaştığım anabilim dalı sekreterimiz Tülay Güler'e, poliklinik sekreterimiz Figen Çardak'a, servis sekreterimiz Gülay Turgut Elölen'e, personelimiz Melek Çibuk ve özellikle ameliyathane personelimiz Arif Karakuşa'a, tüm servis ve ameliyathane hemşire ve personellerine teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca sevinçli ve hüzünlü anlarımda beni yalnız bırakmayan, uzmanlık tezimin her aşamasında da moral desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Müge Sevindik, Dr. Nazmi Yoğurtçu, Dr. Şamil Yazgan'a teşekkür eder ve başarı ile uzmanlık eğitimlerini tamamlamalarını dilerim. Eğitim hayatımın son 6,5 senesinde tartışma ve barışmalarımızın eksik olmadığı, hayatıma farklı bir renk getiren hali hazırdaki başasistanımız Dr. Bilge Anıl Tosyalıoğlu'na teşekkür ederim. Asistanlık eğitimine başladığı hafta uzmanlık tezimin deneysel aşamasında görevlendirilen ve neye uğradığını şaşırın Dr. Fatih Alp Öztürk'e emeklerinden ötürü teşekkür ederim.

Bu uzmanlık tezi çalışması birçok bölüm ve kişinin fikirleri ve yardımları ile oluşmuştur; bu çalışmanın yapılmasını kabul eden ve tezin oluşması için ilk adımı atan çok değerli hocam Doç.Dr. Yusuf Baran başta olmak üzere, Yağmur Kiraz, Melis Kartal Yandım , Prof. Dr. Bekir Uğur Ergür, Uzman Dr. Serap Çilaker Mıcılı, Prof. Dr. Hüray İşlekel, Melis Kant, Merve Akış' a teşekkürü borç bilirim.

Uzmanlık tezimin sadece bir fikir olarak kalmamasında, hayata geçirilmesinde emeği olan ve beni büyük bir yükten kurtaran Sayın İhsan Çelikdemir'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın son 2 yılında varlığı ile her şeyi kolaylaştıran ve desteği ile huzur veren Dr. Sedat Eğriboyun'a kalpten teşekkürlerimi sunarım.

Hayata gelmemi sağlayan, Eroğlu soyadına Fatma Pınar ismini ekleyen, topluma yararlı birey olmamda en büyük pay sahibi olan, attığım her adımda iyi ya da kötü arkamda duran, hatalarımı affeden, başarılarımla gurur duyan, en büyük gurur kaynağım olan ve evlatları olmaktan her zaman onur duyacağım babam İbrahim Eroğlu'na, annem Aysun Eroğlu'na ve evimizin minik kuşu kardeşim Buket Altuntaş'a minnet ve sonsuz sevgi ile teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Fatma Pınar EROĞLU

## **1-ÖZET**

**Başlık:** Adipoz Doku Kökenli Erişkin Kök Hücre Uygulamasının D-Galaktoz ile Yaşlanma Modeli Oluşturulmuş Deride Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Moleküler Düzeyde Gösterilmesi

### **Araştırmacının Adı, Fakültesi ve Yazışma Adresi:**

Fatma Pınar Eroğlu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı İnciraltı-İzmir

### **Amaç Ve Hipotez:**

Organizmaya yüksek dozda alınan galaktoz, galaktoz oksidaz enzimi ile aldehitlere ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüşür. Oluşan hidrojen peroksit çeşitli metabolik reaksiyonlarla hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )'ne dönüşerek oksidatif hasar ile DNA hasarına yol açar. Çalışmamızda intraperitoneal olarak D –Galaktoz uygulaması ile oksidatif hasara yol açarak deri üzerinde yaşlanma modeli oluşturulmuş ve ADAS hücre uygulaması ile yaşlanmanın olumsuz etkilerini azaltmak amaçlanmıştır.

Ratların inguinal bölgesinden alınan yağ greftinden Adipoz kökenli erişkin kök hücre (ADAS) elde edildi. Kültüre edilip, çoğaltılan ADAS hücreleri rat dorsumunda oluşturulan insizyon hattına uygulandı. Bu çalışmamız ADAS hücrelerinin diferansiyasyon özelliği, büyüme faktörleri ve sitokinler salınımı arttırarak yaşlanma belirtileri ve yara iyileşmesi üzerine olumlu etki edeceği varsayımı üzerine kurulmuştur.



## **Gereç Ve Yöntem:**

Çalışmada 51 adet 230-280 g ağırlığında Sprague Dawley suşu rat kullanıldı. Ratların 3 tanesi yağ grefti donorü kullanıldı ve sakrifiye edildi. 48 adet rat dört gruba ayrıldı.

Grup I (n=12) : İntraperitoneal d-galaktoz 50 mg/kg/gün uygulaması ,sırt insizyon hattına ADAS hücre uygulaması

Grup II (n=12) : İntraperitoneal d-galaktoz 50 mg/kg/gün uygulaması ,sırt insizyon hattına Serum fizyolojik uygulaması

Grup III (n=12) : İntraperitoneal 50 mg/kg/gün serum fizyolojik uygulaması ,sırt insizyon hattına ADAS hücre uygulaması

Grup IV (n=12) : İntraperitoneal 50 mg/kg/gün serum fizyolojik uygulaması ,sırt insizyon hattına serum fizyolojik uygulaması yapılarak sütüre edildi.

4. gruptan 4 adet rat intraoperatif olarak, 2. Gruptan 1 adet rat postoperatif 2. Günde kanibalizm nedeni ile kaybedildi.

ADAS hücreleri plazmid yardımı ile '*Yeşil floresan protein*' ( GFP) ile işaretlenerek grup I ve III'teki ratların sırt insizyon hattına enjekte edildi.

Tüm rat gruplarının yarısı yara iyileşmesinin önemli olan proliferasyon döneminin ortası olan 14. gününde ve diğer yarısı yara iyileşmesinde matürasyon evresinin başlangıcı olan 28. Günde sakrifiye edildi.

Sırt derisindeki insizyon skarı hattı histomorfolojik, immnuhistokimyasal özellikleri değerlendirildi. Sırt derisinden western blot yöntemi ile TRP-1,TRP-2,Tirozinaz

enzimleri analizi yapıldı. Oksidatif hasarın kantitatif belirteci olarak ratların 12 saatlik idrarlarında kütle spektrometrisi ile *8-OH-d-Guanin* ölçümü yapıldı.

### **Bulgular :**

Deride yaşlanma ile oluşan yetersiz kollajen üretimi, vaskülarizasyonda azalma, melanin pigment artışı ve epidermal incelme deri üzerinde oluşturulan yara iyileşmesinde gecikmeye sebep olmaktadır.

Ratların sakrifikasyonu esnasında grup 3 te tüylenmede artış, vaskülarizasyonda artış olduğu görüldü. Deri insizyon hattında grup 3 te kapiller yoğunlaşma olduğu görüldü. Histolojik incelemelerde VEGF, TGF- $\beta$ , tip 1 kollajenin grup 1 ve grup 3 te yoğun olduğu görüldü.

Plazmid yardımı ile '*Yeşil floresan protein*' ( GFP) ile işaretlenerek grup I ve III'teki ratların sırt insizyon hattında ADAS hücre varlığı gösterildi.

Western blot analizlerinde yaşlanmaya immnun yanıtta önemli rol oynayan TRP-1, TRP-2, Tirozinaz düzeylerinin grup II' de arttığı görüldü.

Ratların 12 saatlik idrar sonuçlarında kütle spektrometrisi ile grup III'de *8-OH-d-Guanin* düzeylerinde artış olduğu görüldü.

### **Sonuç:**

Elde edilen sonuçlar eşliğinde yaşlanma belirtileri oluşan deride adipoz kökenli kök hücre uygulaması ile oluşan kollajen üretiminde artış, kapiller yoğunlukta artış, vaskülarizasyon artışı, melanin sentezinde azalma ile belirtilerinin azaltıldığı söylenebilir. ADAS hücre uygulamasının ile deri kalitesinde artış ve yara iyileşmesine olumlu etkileri olduğu görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** D-Galaktoz, Yaşlanma, Oksidatif Hasar, Adipoz doku kökenli kök hücre, yara iyileşmesi

## **2-ABSTRACT:**

**Title:** Molecular Effects of Adipose Derived Adult Stem Cells in Wound Healing on D-Galactose Induced Skin Aging Model

### **Name, Faculty and Adress:**

Fatma Pinar Eroğlu

Dokuz Eylöl University Faculty Of Medicine

Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery Department Inciralti-Izmir-Turkey

### **Aim And Hypothesis:**

The aim of this study is to perform a skin aging model with use of intraperitoneal D-Galactose and investigate effects of adipose derived adult stem cells on D-Galactose induced skin aging damage.

### **Materials And Method:**

In the study, 51 Sprague Dawley rats weighing 230-280 g were used. Three fat graft donor rats were used and sacrificed. 48 rats were divided into four groups.

Group I (n=12) : 50 mg / kg / day D-galactose intraperitoneally application, application of ADAS cells to dorsal incision.

Group II (n=12) : 50 mg / kg / day D-galactose intraperitoneally application, application of %0,9 NaCl to dorsal incision.

Group III (n=12) : 50 mg / kg / day %0,9 NaCl intraperitoneally application, application of ADAS cells to dorsal incision.

Group IV (n=12) : 50 mg / kg / day %0,9 NaCl intraperitoneally application, application of %0,9 NaCl to dorsal incision.

Four rats intraoperatively from the group IV, 1 rat at postoperative and 2 rats from group II were lost by cannibalism as a result.

ADAS cells labeled with the help of plasmid "green fluorescent protein" (GFP) were injected into the dorsal incision of the rats in Group I and III.

Half of the rats from all groups were sacrificed on 14<sup>th</sup> day and the other half on day 28<sup>th</sup>.

In the dorsal skin incision line, immunohistochemical and histomorphological properties were evaluated. TRP-1, TRP-2, Tyrosinase enzymes from dorsal skin was analyzed by Western Blot method. *8-OH guanine* were measured by mass spectrometry as a quantitative marker of oxidative damage in the urine of rats with 12-hour.

### **Findings:**

Inadequate skin collagen production, a reduction in vascularization, increased melanin pigment and epidermal thinning occurs with aging on the skin that causes a delay in wound healing. Pubescence of the dorsal skin and vascularization increased in group 3 during the sacrifice was observed. Histological examination of VEGF, TGF- $\beta$ , type 1 collagen in group 1 and group 3 was found to be intense. Group I and III, the presence of ADAS cells in rat dorsal incision was shown by the help of plasmid "green fluorescent protein" (GFP). The presence of important immune responses that play a role in aging TRP-1, TRP-2 and Tyrosinase levels in group II was found to be increased. *8-OH guanine* was found to be increased by mass spectrometry in 12-hour urine in the rats of group III.

**Results:**

Depending on these findings, ADAS administration comprises collagen production, increasing in capillary density and vascularization, decreasing in melanin synthesis on D-Galactose induced skin aging model.

**Keywords:**

Adipose derived adult stem cells, skin aging, D-Galactose, wound healing.

### 3-GİRİŞ VE AMAÇ

Bu çalışmada adipoz doku kökenli kök hücrelerin, yaşlanma modeli oluşturulmuş ratlarda, yaşlanmanın olumsuz etkilerini azaltma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

*Yaşlanma*; Bir sistemin fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanlardan kaynaklanan eksojen ya da endojen stres faktörlerine karşı cevap verme yetisinde azalma ile karakterize, çok yönlü ve zamana bağımlı kompleks bir süreçtir. Deri yaşlanması ise yapısal ve moleküler bozulma ile birlikte derinin fonksiyonel ve estetik sonuçlarını da etkileyen, progresif seyreden bir süreçtir.(1)

Deri yaşlanması iki farklı şekilde gerçekleşir;(1,2)

- 1- İntrensek Yaşlanma ( Kronolojik, Gerçek, Spontan, Doğal Yaşlanma); Somatik hücrelerde bölünme kapasitesi sınırlı olup, her mitozda telomer uzunluğu azalır
- 2- Ekstrensek Yaşlanma; Aşırı kalori alımının etkili olduğu yaşlanma tipidir.

#### *d-Galaktoz ile Yaşlanma:*

İntraperitoneal D-Galaktoz uygulaması ile yüksek dozda galaktoz alımı sonrasında galaktoz oksidaz enzimi ile bir aldehit olan galaktitol ve hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) dönüşür. Hidrojen peroksit serbest bir reaktif oksijen metabolitidir. Lipofilik yapıda olduğu için hücre zarından çabuk geçer, hücre içinde Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikalini oluşturur. (Lee JC. Ve ark., 2006)(6); Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) yarılanma ömrü çok kısa olan, en etkili serbest oksijen radikalidir. Hücre hasarından sorumlu temel radikal olduğu söylenmektedir. (Gardès

AM., 2006)(7)Bu oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, baz modifikasyonları ve protein-DNA bağlanması gibi reaksiyonlarla hasar oluşabilir. Aynı hasar mekanizmaları mitokondriyal DNA üzerinde de etkilidir. Artmış d-Galaktoz alımı ile hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri miktarında artış mitokondriyal oksidatif hasar oluşturarak alternatif yaşlanma belirtileri artışına neden olur.(3,8)

Ekstresek yolla deride oluşan yaşlanma ile deri üzerinde dermiste kollajen dejenerasyonu, anormal elastik materyal birikimi (dermis sararması ve kırışıklık oluşumu), dermal kollajen kaybı, kollajende kalınlaşma ve kollajen çözünürlüğünde azalma, fibroblastların proliferatif kapasitesinde azalma, dermoepidermal bileşkede yer alan tip 7 kollajen miktarında azalma ve elastozis (elastik lif yapısının bozulması ve elastin fibril üretiminin bozulması), üst ve orta dermiste elastik materyal birikimi belirtileri görülür.

Adipoz kökenli erişkin kök hücreler (ADAS) 2001 yılında Zuk ve arkadaşları tarafından tanımlandıktan sonra elde edilşinin kolay olması ve MKH'lerin temel özelliklerini taşıması nedeniyle birçok çalışmada kullanılmıştır. ADAS'lar fibroblast görünümünde plastik yüzeye yapışma özelliği olan, uygun koşullarda diferansiyasyon özelliği gösteren ve CD 34,CD 44, CD 105 gibi spesifik yüzey belirteçlerini taşıyan erişkin kök hücrelerdir. Literatüre bakıldığında ADAS'ları içeren yağ greftleri deri üzerinde oluşturulmuş çeşitli yara modellerinde kullanılmıştır ancak D-Galaktoz uygulaması ile ekstresek deri yaşlanması oluşturulup, yapılanan insizyonel yara üzerindeki etkilerini gösteren çalışma yapılmamıştır. Ekstresek yaşlanmanın yara iyileşmesi ve deri kalitesi üzerindeki etkilerinin giderilmesi klinik kullanımda rekonstrüksiyon seçenekleri arasında önemli yere sahiptir. ADAS'ların yara iyileşmesindeki olumlu etkileri göz önüne alarak, neovaskülarizasyon ve kollajen üretiminde artış sonucunda yaşlanma modeli oluşturulmuş deri üzerindeki insizyon skarının kalitesinde ve kollajen üretiminde artış olacaktır. Deri kalitesinde ve kollajen üretiminde artışın yaşlanmanın deri üzerinde ve yara iyileşmesi üzerindeki negatif etkilere karşı geri döndürücü etkileri olacağı hipoteziyle bu çalışma planlanmıştır.

Bu çalışmadaki amaçlar:

- 1- Ratlara intraperitoneal D-Galaktoz uygulaması ile ekstrensek yaşlanmaya bağlı deri hasarı oluşturulması,
- 2- Ratların inguinal bölgesinden alınan yağ greftinden ADAS hücreleri izole edilmesi ve kültüre edilerek oğaltılması
- 3- İzole edilen ve kültüre edilen ADAS'ların MKH olduklarının in vitro ortamda gösterilmesi
- 4- ADAS hücrelerinin ekstrensek yaşlanma ve yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesi



## **4- GENEL BİLGİLER:**

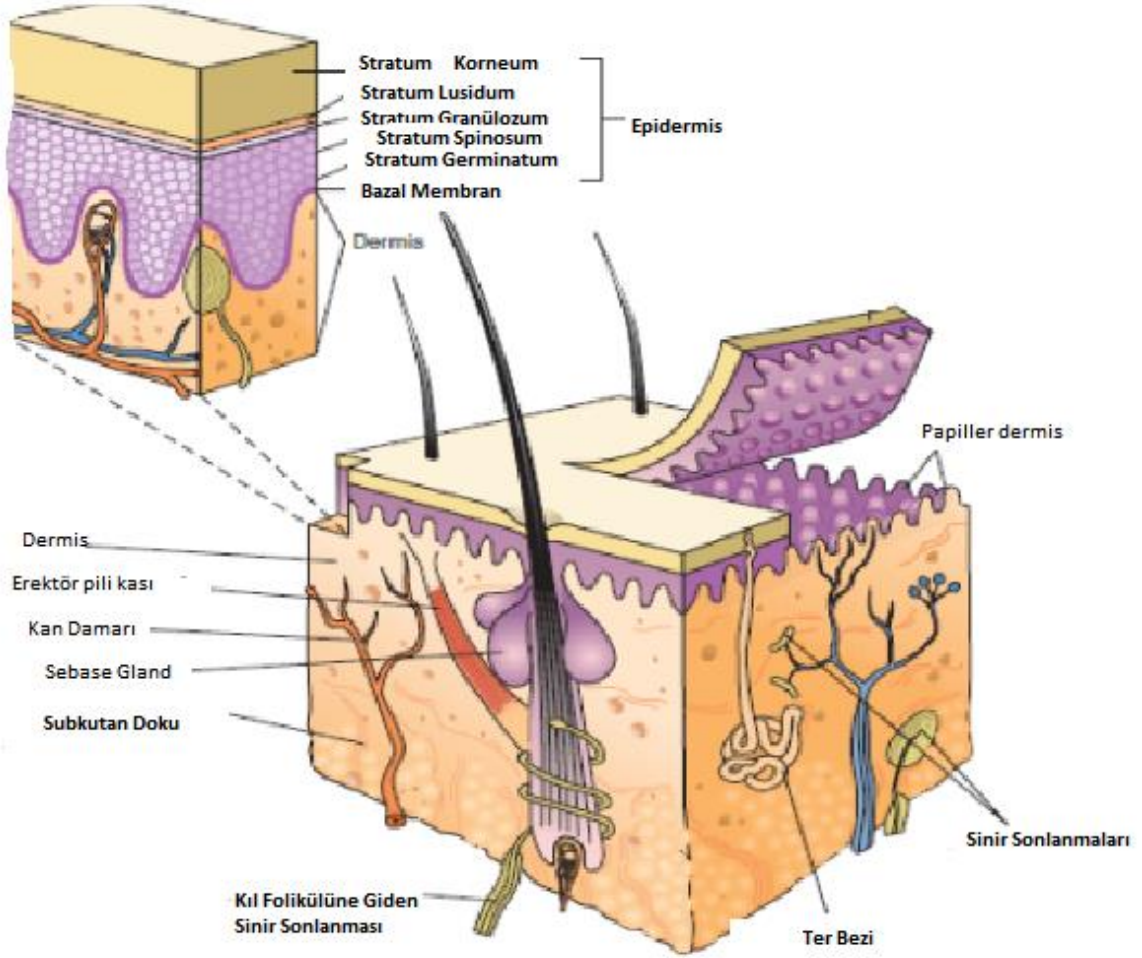
### ***4.1-Derinin Histolojik Tanımı ve Görevleri:***

Vücutun iç ortam bütünlüğünün sağlayan ve dış ortama karşı bariyer fonksiyonu gören en geniş organdır. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Deri iç etkenlere ve dış etkenlere karşı koruma görevi görür. İç etkenlere karşı korumada detoksifikasyon ve vücut ısısını ayarlama önemlidir. Dış etkenlere karşı korumada ise biyolojik etkenlere karşı korumada epidermal döngü, ısı-nem- ışık gibi fiziksel etkenlere karşı bariyer görevi ve kimyasal etkenlere karşı keratin, lipid tabaka ile önleyici bariyer oluşturması sayılabilir. Karbonhidratlar, lipidler ve su için depo görevi görür. Metabolik olarak aktif bir organdır, katabolize etme yeteneği vardır. Endojen maddeler olan hormonlar, steroidler, inflamatuvar mediatörlerle eksojen maddeler olan ilaçlar, çevresel kimyasal ve endüstriyel maddeleri katabolize edebilir. Derinin perkutanöz absorpsiyon özelliği vardır. Penetrasyon; maddenin stratum korneuma girişi, permeasyon; maddenin stratum korneumun altına ilerlemesi ve resorpsiyon; maddenin vasküler sisteme aktarılması olarak özetlenebilir. İmmun sistemin önemli bir bileşenidir. Deri duyu organı görevi de görür. Derideki serbest sinir sonlanmaları ile ağrı ve kaşıntı duyusu, Meissner cisimciği ile temas duyusu, Ruffini iğleri ile sıcaklık duyusu, Krause cisimciği ile soğuk duyusu, Vater – Paccini cisimcikleri ile denge duyusunun algılanması sağlanır. Vitamin D sentezi basamaklarında fonksiyon alır. Deri güzel görünmede önemli bir faktördür. Kırıksık, solgun ve düzensiz bir deri kişinin olduğundan daha yaşlı görünmesine sebep olur. İnsanların yaşam süresinin uzaması, görünüme verdiği önemin artması ile deri görüntüsündeki bozulmalar kişinin psikolojisini, sosyal ilişkilerini, işini ve sağlığını etkilemektedir.

Deri yüzeysel ektodermal kökenli olan epitelyal tabaka olan epidermis, mezodermal kökenli bağ dokusu tabakası olan dermis ve hipodermis tabakalarından meydana gelir. Ayrıca deri yapısında kıl folikülleri, sebace glandlar, ter bezleri gibi

deri ekleri ile immun sistem hücreleri, nöral hücreler ve derinin viabilitesini sağlayan vasküler yapılar bulunur.

### **Derinin Tabakaları :**



Şekil 1: Derinin tabakaları (Carol Mattson Porth - Essentials of Pathophysiology. Concepts of Altered Health States (3rd ed.) – 2011, sayfa 1159)

#### **4.1.a-EPİDERMİS:**

Vücutun dış yüzeyini örten, boynuzlaşma özelliği gösteren çok katlı yassı epitel tabakasıdır. Keratinleşen çok katlı yassı epitelin görüldüğü tek yerdir. Keratinositler temel hücre tipidir.

Epidermisi oluşturan hücre tipleri; Keratinositler

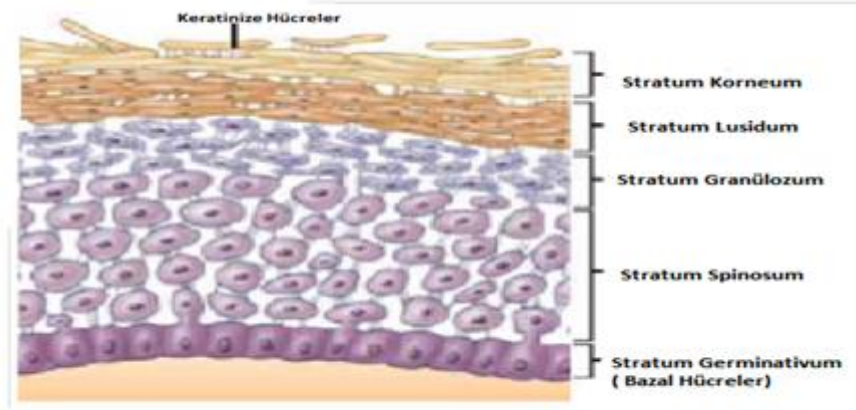
Melanositler

Langerhans hücreleri

Merkel hücreleri

##### **4.1.a.1- Keratinositler :**

Epidermal hücrelerin % 85'ini oluştururlar. Stratum bazalede bulunan hücrelerden farklılaşırlar. 20-30 gün yaşam süreleri vardır. Altındaki hücreleri ve dermisteki yapıları yaralanmaya karşı koruyan keratin biriktirirler. Lameller granüller olan lipoproteinleri sekrete ederek komşu epidermal hücreler arası boşlukları doldururlar ve su geçirmez bariyeri oluştururlar.



Şekil 2: Epiderminin tabakaları (Carol Mattson Porth - Essentials of Pathophysiology. Concepts of Altered Health States (3rd ed.) – 2011, sayfa 1161)

Beş tabaka halinde dizilmişlerdir.

- Stratum bazale
- Stratum spinosum
- Stratum granulozum
- Stratum lusidum
- Stratum korneum

**a)Stratum basale ;**

Bazal membran üzerinde yer alan tek katlı prizmatik veya yüksek kübik epitelyum hücrelerinden oluşurlar. Hücreler birbirine desmozomlarla, bazal membrana ise hemidesmozomlarla tutunur. Mitotik aktivite çok yüksektir, bazal kök hücreler olarak da adlandırılırlar. Işık mikroskobu ile incelendiğinde çekirdekleri hücre tabanına yakın ve oldukça büyüktür. Hücreler 10nm çapında sitokeratin içerir

***b) Stratum Spinosum ;***

Hücreler poligonal şekilli, çekirdekleri orta duruşludur. Stratum bazaledeki hücreler çoğalıp, yukarıya doğru uzanarak dikensi çıkıntılar halinde bu tabakayı oluşturur. Mitoz görülür. Sitoplazmalarından komşu hücelere doğru parmaklı uzantılar uzanır. Bu uzantıların içini dolduran tonofilamanların sonlandığı noktada desmozomlar bulunur. Işık mikroskopunda hücelerarası köprüler olarak görülür. Epidermise dayanıklılık veren tabakadır.

***c) Stratum Granülozum ;***

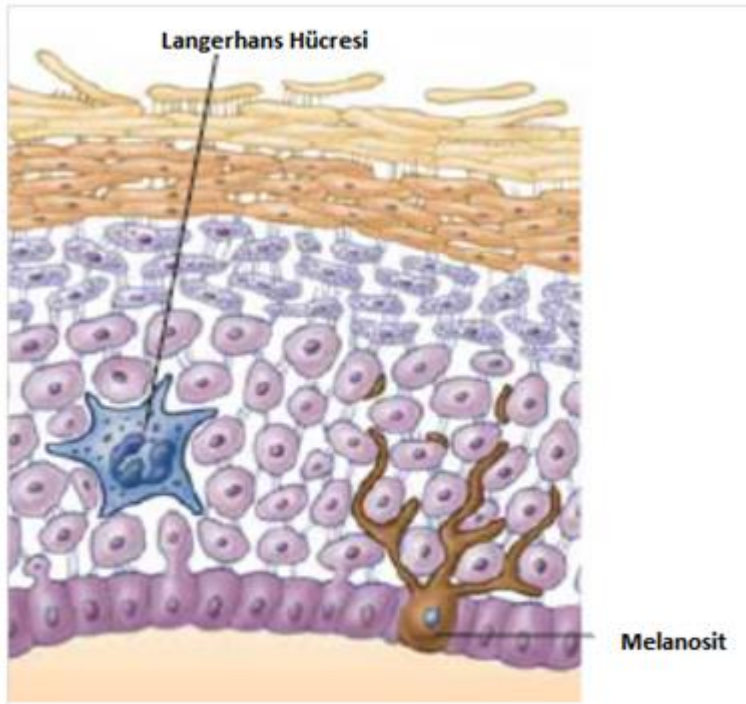
Üç ile beş tabaka poligonal hücreden oluşur. Çekirdekleri orta yerleşimlidir. Yabancı madde girişinde bariyer olarak işlev görür. Sitoplazmalarında bol miktarda sitokeratin filamanları yanı sıra keratohiyalin granülleri vardır. Bu granüller sistin ve histidine zengin protein olan 'Fillaggrin ' proteini içerir, keratin filamentlerini bir arada tutar. Çift tabakalı lipid membran ile sarılı lamellar granüller orak ya da çubuk şeklindedir. İçeriklerini intersitisyel alana boşaltırlar. Granüllerin sayı ve büyüklüğü artması hücrede dejeneratif değişikliklerin arttığına işaret eder.

***d) Stratum Lusidum ;***

Yassı hücelerden oluşun, ışık kırıcı ve parlak tabakadır. Sitoplazma yoğun filamentlerden meydana gelir. Desmozomlar sıkıca birbirlerine tutunmaya devam eder. Çekirdekleri yoktur.

e) **Stratum Korneum** ;

Boynuzsu tabakadır. Yassı epitelyum hücreleri 15-20 kat olacak şekilde üst üste dizilmiştir. Sitoplazmaları 'skleroprotein' adı verilen parlak görümlü, sert, filament benzeri protein ile yoğundur. Hücrelerde çekirdek görülmez. Tek tek hücreler seçilemez. Hücreler yassılaştırılmıştır. Hücreler deskuamasyon ile dökülürler.



Şekil 3: Melanosit ve Langerhans Hücreleri (Carol Mattson Porth - Essentials of Pathophysiology. Concepts of Altered Health States (3rd ed.) – 2011, sayfa 1161)

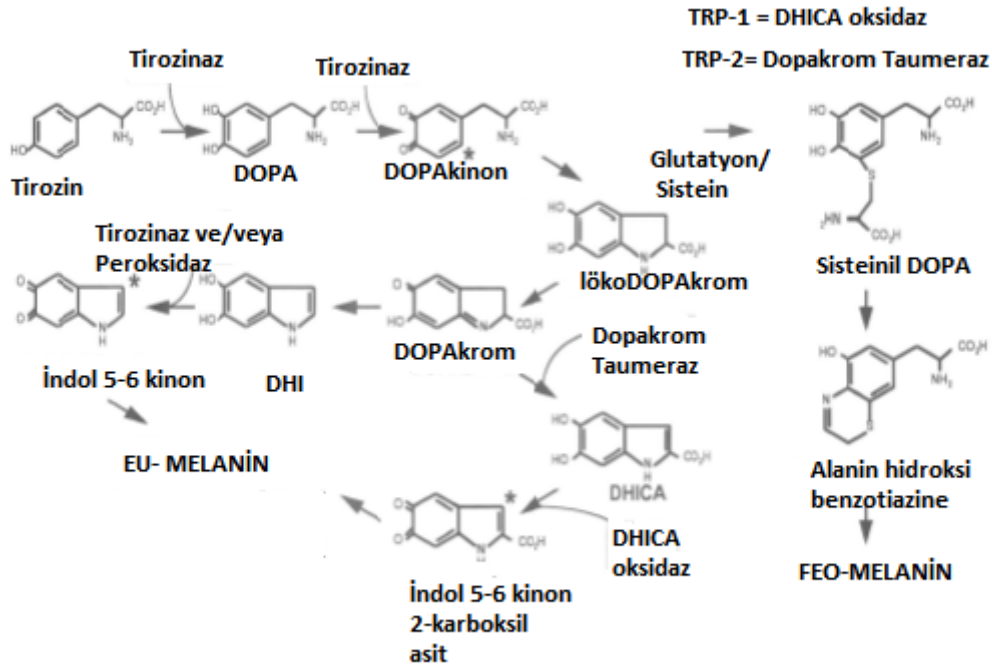
#### **4.1.a.2-Melanositler:**

Stratum bazalede tek tek bulunan, nöral krest kökenli hücrelerdir.(Şekil 3) Büyük gövdeli hücrelerdir. Melanositler komşu keratinositlerle desmozomal bağlantı kurmazlar ancak altta bulunan bazal lamina ile hemidesmozomal bağlantı kurarlar. Sitoplazmalarında 'Melanozom' adlı salgı granülleri vardır ve melanin proteini içerir. Melanin pigment yapımı tirozinden başlar. Melanozomlar içindeki tirozinaz enzim aracılığıyla önce dihidroksi fenilalanin (DOPA) daha sonra DOPA kinon ve daha sonra melanine dönüşür. Melanin sitoplazmada sentezlendikten sonra hücreler arası uzantılar aracılığıyla keratinositlere taşınır. Melanositler melanin sentezler ancak depolamazlar, melanin pigmentini keratinositler depolar. Melanin pigmenti güneş ışınlarına karşı koruyucu rol oynar. Melanositler ve keratinositler arası dağılım epidermal melanin ünitesi tarafından düzenlenir. Melanositler 800-2300 /mm<sup>2</sup> sayıda bulunur. Birim alana düşen melanosit sayısı vücut bölgelerine göre sabittir, cinse ve ırka bağlı değişiklik göstermez.

Melanositler kendilerini replike etme özelliğine sahiptir ancak bu oran keratinositlere oranla daha düşüktür. Deri pigmentasyonundaki farklılıklar melanosit sayısından daha çok melanozomların içindeki melanin içeriği ve tirozinaz aktivitesine bağlıdır. Beyaz ırkta melanozomlar daha küçük ve daha az sayıda iken esmer ırkta melanozomlar daha büyük ve daha fazla sayıdadır ayrıca tüm sitoplazmada dağılmış haldedir. Güneş ışığına maruz kalma savunma mekanizmasını uyarır ve melanosit hacmi artar, melanin sentezi artar. Yaşlanma ile melanosit sayısı azalır ve savunma mekanizmasında oluşan zaaf sonucu malignite riski artar.

Nöral krest kökenli melanositler deride iyonize radyasyon, oksidatif hasar ve reaktif oksijen metabolitleri ile etkileşim sonucu '*Melanin*' pigmenti salgılama görevli hücrelerdir. Melanositler dendritik uzantıları ile keratinositler ile bağlantılı iken melanozom adı verilen granüllerinde ise melanin sentezlerler. Melanin

sentezlendikten sonra dendrik uzantılar yolu ile keratinositlere aktarılır ve immun modulasyonda görev alır. Keratinositlere aktarılan melanin nükleus ve hücrenin diğer organellerini hasar mekanizmalarından korur.



Şekil 4: Melanin Biyosentezi (Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. 1994:15:13(24):5818-25) (9)

Çeşitli reaktif oksijen metabolitleri veya eksojen hasar etkenleri ile etkileşim sonrasında  $\alpha$ -MSH ve ACTH enzimleri etkisi ile uyarılan melanositlerde tirozin amino asidinden **Tirozinaz** enzimi etkisi ile DOPA(Dihidroksi fenil alanin) oluşur,DOPA ile tirozinaz enziminin etkileşimi ile de Dopakinon Oluşur. **Tirozinaz** enzimi Mikroftalmi associated transkripsiyon faktör (MITF) etkisi ile sentezlenir ya da aktive edilir.

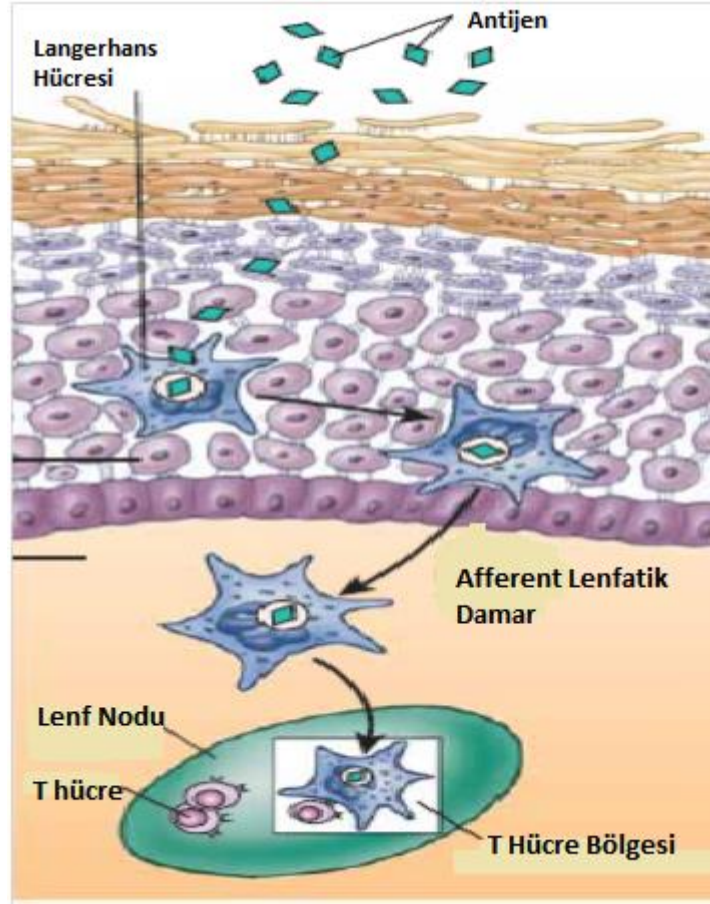
Ortamda dopakinon oluşması sonrasında bir dizi reaksiyonla Lödokrom ve dopkrom meydana gelir. **TRP-2** (tirozin related protein -2 = Dopakrom taumeraz) yine MITF ile indüklenen ve dopakromdan 5-6 Dihidroksi İndol 2-Karboksilik Asit (DHICA) oluşturan enzimdir. DHICA'nın ise DHICA oksidaz olarak da bilinen ve yine MITF ile



indüklenen TRP-1 (Tirozin related protein-1) ile reaksiyonu sonucu indol-5,6-kinon-karboksilik asit oluşur. Bu metabolik yolun son ürünü Eu-melanindir.

Eu-melanin, elips şeklindeki melanozomlarda üretilen, derinin siyah – kahverengi rengini oluşturan , immun modulatör rolü olan melanin pigmentidir. Feo-melanin ise daha çok kıvı-sarı renkten sorumludur.(9,10,11,12)

Çalışmamızda Tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2 proteinlerinin *Western Blot* yöntemi ile analizi yapılmıştır. Western blot, farklı doku örneklerindeki belirlenmiş proteinlerin göreceli miktarlarının belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Homojenat doku örneği ya da ekstresinde jel sistemi ve spesifik birincil antikor grubu kullanılarak önceden belirlenmiş olan proteinlerin miktarı belirlenir. Belirlenen proteinler denatüre edici SDS- PAGE(sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis) kullanılarak molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra membrana aktarılırlar. Spesifik antikorun hedef proteine bağlanması ile kemilüminesans ile hedef protein belirlenir.



Şekil 5 : Langerhans Hücreleri (Carol Mattson Porth - Essentials of Pathophysiology. Concepts of Altered Health States (3rd ed.) – 2011, sayfa 1162)

#### **4.1.a.3-Langerhans Hücreleri:**

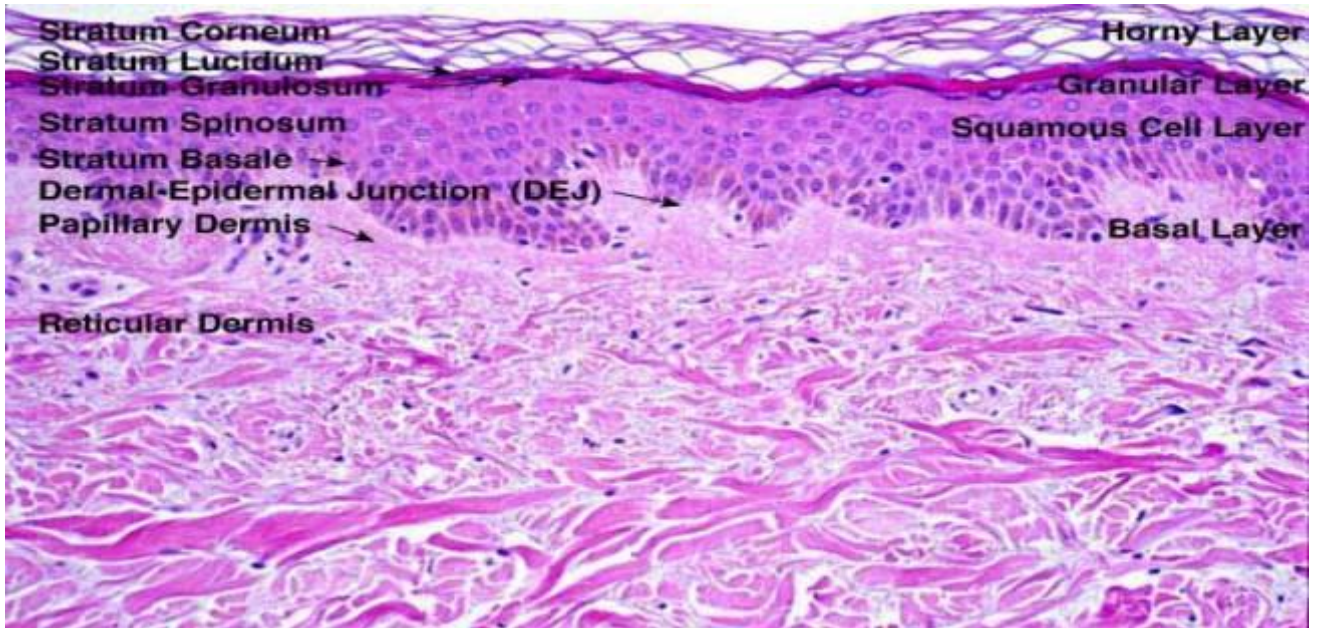
Stratum spinosum tabakasının üst kısımlarında yer alan, kemik iliği kökenli, uzantılı hücrelerdir.(Şekil 3 ve 5) Desmozom, melanin, tonofilaman içermezler. Antijen sunan hücrelerdir. Yüzey reseptörleri vardır. Derinin immun yanıtında rol alırlar. Sitoplazmalarında 'Birbeck Granülleri' içerirler. Mitoz kapasiteleri olsa da çok sınırlıdır, sürekli olarak dolaşımdan gelen öncü hücrelerden farklılaşırlar. Sürekli olarak UV ışığa maruz kalanlarda sayıları azalır ve maligniteye yatkınlık artar.

#### 4.1.a.4-Merkel Hücreleri:

Stratum bazalede bulunurlar. Duysal mekanoreseptör olarak çalışırlar. Nöroendokrin veziküller içerirler. Genelde parmak ucu, kıl foliküllerinin tabanı ve ağız mukozasında yer alırlar. Keratinositlere desmozomlarla bağlıdırlar ve keratin filamentleri içerirler. Dermisten epidermise uzanan myelinli sinir lifleri ile bağlantılıdır.

#### 4.1.b- DERMİS:

Mezoderm kaynaklı sıkı ve düzensiz bağ dokudan oluşur. Derinin elastikiyetini sağlamlığını sağlayan tabakadır. Papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki tabakadan oluşur. (Şekil 6)



Şekil 6: Epidermis ve dermisin tabakaları ( Histology for pathologists, Stacey E. Mills, Fourth Edition)

### **Papiller Dermis :**

Epidermin altındaki gevşek bağ dokusundan oluşan tabakadır. Fibroblast ve makrofajlar olmak üzere bağ dokudan zengindir. Bol miktarda Tip 3 kollajen içerir. Retiküler ve elastik lifler içerir, epidermisi dermise bağlayan Tip7 kollajenden oluşan tutturucu fibriller bulunur. Temas duyusunun algılanmasında rol alan Meissner cisimcikleri de bu tabakada yer alır. Papiller tabakada pek çok sayıda kapiller uzantılar bulunur, bu kapiller uzantılar vücut ısısını düzenlemede ve avasküler olan epidermin beslenmesinde rol alırlar.

### **Retiküler Dermis:**

Papiller dermise göre daha kalın ve düzensiz bağ dokudan oluşmuştur. Tip 1 kollajen miktarı fazladır. Kollajen lifleri yüzeye paralel seyredir. Kollajen demetlerinin arasında elastik lifler yer alır. Elastik lifler yüzeyelleştikçe incilir ve bazal lamina seviyesinde sadece elastinden yoksun mikrofibriller kalır. Retiküler dermiste ayrıca kıl folikülleri, yağ bezleri ve ter bezleri de yer alır.(Şekil 6)

Dermisteki başlıca glikozaminoglikan dermatan sülfattır. Dermis lenfatikler,serbest sinir sonlamaları ve vasküler yapılar bakımından oldukça zengindir. Dermis başlıca üç komponentten oluşur; bağ doku hücreleri, bağlayıcı lifler ve temel madde.

Dermisi oluşturan hücreler ;

- 1- Mezenşim kaynaklı hücreler : Fibrosit, fibroblast, histiositler, mast hücreleri
- 2- Kemik iliği kökenli hücreler : Lenfosit, plazmosit , nötrofiller

*Fibroblastlar;* Hücre yüzeyindeki integrin ve dermal matriksin yapısında bulunan Glikozaminglikan (GAG) ve fibronektine tutunurlar. Fibroblastların aktivasyonu ile platelet derive growth faktör (PDGF) salınımı artar. Fibroblast proliferasyonunu uyarır. Kollajen sentezini indükler. Kemotaksisi uyarır. TNF  $-\alpha$  ve  $\beta$ FGF üretimi artar; anjiogenez uyarılır. Fibroblastlardan salınan lizil oksidaz ile kollajen lifleri arasında çapraz bağlar kurularak kollajen yapısı sağlamlaştırılır. Hücreler arası matriks sentezlenmesi ve depolanması, yara iyileşmesi gibi önemli metabolik olaylarda hücreler arası iletişim için uyarıcı olan büyüme faktörlerinin salınması gibi önemli olaylarda rol alırlar.

Dermisi oluşturan lifler; Kollajen, elastin ve retikulumdan oluşur. Kollajen insan vücudu kuru ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturarak en fazla miktarda bulunan proteindir. Üç adet polipeptit zincirin oluşturduğu heliks yapısındadır. Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler kollajen sentezi için gen transkripsiyonunu tetikler. Gen transkripsiyonu sonucu oluşan pre-prokollajen hücre içinde mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ile endoplazmik retikuluma taşınır. Sinyal peptidaz enzimi sayesinde mRNA'dan ayrılan prokollajen molekülleri posttranslasyonel modifikasyona uğrar. Prokollajen moleküllerinin yapısındaki lizin ve prolin aminoasitleri lizin hidroksilaz ve prolin hidroksilaz enzimleri sayesinde hidroksilasyonu gerçekleştirir. Bu enzimler için askorbik asit, demir ve moleküler oksijen gerekmektedir. Oluşan hidroksilizin ve hidroksiprolin yapılarına transferaz enzimleri sayesinde glukoz ve galaktoz eklenir. Golgi cisimciğine iletilen prokollajen trimerleri ekstrasellüler matrikse salınır. Çinko bağımlı proteinaz enzimi ile polipeptid zincirler kovalan bağlarla birbirleri ile bağlanarak tropokollajen yapısı oluşur. Tropokollajen molekülleri birleşerek kollajen filamentlerini, bu filamentler fibrilleri, fibriller de demetleri meydana getirir.

Kollajen yapısına göre tiplere ayrılır. Yara iyileşmesinin erken döneminde Tip 3 kollajen miktarı fazla olmasına rağmen matür skar dokusunda hiçbir zaman Tip 1 kollajen miktarını geçemez. Dermis temel maddesini oluşturan komponentler; hyaluronik asit, dermatan sülfat, kondroidin sülfat, fibronektin.

#### **4.1.c -HİPODERMİS:**

Deri ve eklerini altındaki yapılara bağlayan fibröz trabeküler septalar ve yağlı gözenekli dokudan oluşur. Bağ doku lifleri deri yüzeyine dik olarak seyrederek septaları oluşturur. Bu septalar arasında yağ hücre topluluklarından oluşan lobüller yer alır. Vasküler yapılar ve sinir yapılar açısından oldukça zengin tabakadır. Isı kaybını önleme, fiziksel ve kimyasal travmalara karşı bariyer ve karbonhidrat, lipid ve su depolamada görev alır.

#### **4.1.d- DERİ EKLERİ:**

**Salgı Yapan Deri Ekleri :** Ekrin bezler, apokrin bezler, yağ bezleri

**Keratinize Deri Ekleri :** Tırnaklar ve kıllar

**Yağ bezleri;** Gelişmekte olan kıl folikülünün dış kök kılıfının lateral uzantısı olarak oluşur. Puberte öncesi aktif değildir, puberte ile birlikte sekresyonları başlar. Yağ bezlerinin salgısı 'Sebum ' olarak adlandırılır. Epidermal su kaybını azaltır, bariyer etkisi vardır. Sebum salgısı sirkadyen ritm gösterir; androjen etkisi ile artar, östrojen etkisi ile azalır.

**Ekrin bezler** ; Basit,kıvrıntılı, túbüler bez biçimindedirler. Salgı hücreleri ile bazal lamina arasında miyoepitelyal hücreler vardır ve salgının lümene iletilmesinde rol alırlar. Vücutta yaklaşık 2-3 milyon sayıda bulunurlar. Günlük terleme miktarı 10 litreye kadar ulaşabilir. %99 su, %0.5 mineral tuzlar ( NaCl, demir ...) %0.5 üre ve organik maddelerden (kreatinin,ürük asit..) oluşur.

**Apokrin Bezler** ; Dallı, alveolar bezlerdir. Ekrin bezlere göre daha az sayıdadırlar. Anogenital alan, aksilla ve periumblikal alanda yoğundur. Ekrin bezler gibi deri yüzeyine açılmaz, yağ bezleri gibi kıl foliküllerine açılırlar. Sekresyonlarının kendine özgü kokusu yağ asitleri, amonyak, hidroksiasitlere bağlı olarak ortaya çıkar. Adrenerjik uyarı ile uyarılırlar.

**Kıl ve Kıl Folikülleri**; Kıllar epidermis tabakasından dışarıya doğru uzanan keratin filamanlarının oluşturduğu yapılardır. Kıl folikülleri ise klların geliştiği, epidermisen dermise doğru yaptığı çöküntülerdir. Kıl kökünün merkezi hücreleri büyük vakuollü, az keratinize hücrelerdir. Çevrede yerleşen hücreler ise kıl korteksini oluşturan keratinize, fuziform hücrelere farklılaşırlar. Kılın rengini kıl kökünün epitel hücreleri ile dermal papillalar arasına yerleşmiş olan melanosit aktivitesi belirler. Epidermiste yumuşak keratin varken kıl üzerinde sert keratin vardır. Epidermiste keratinizasyon sürekli ve tüm yüzeyde gerçekleşirken kıl üzerinde sadece kıl kökünde keratinizasyon vardır. Epidermiste keratinize tabaka dökülürken kıl üzerinde birikerek sertleşir. *'Errektör pilli kasları'* düz kas lifleridir ve kıl folikülünü saran bağ doku kılıfına tutunur. Bu kaslar oblik olarak seyreder ve kontraksiyonları ile kıl gövdesi düzleşir.

**Tırnaklar**; Tırnak plağı, lunula, tırnak kıvrımı ve kutikuladan oluşur. Tırnak plağı üç katmanlı yapıdadır; dorsal tabaka, intermediate tabaka, ventral tabaka. Tırnak yapısında yaşla birlikte korneosit hacmi artar ve bu da tırnağın kalınlaşmasına yol açar. Tırnağın ıık geçirgenliği ise dalga boyuna bağlıdır. UVA'nın %5-10'unu, UVB'nin %1-3'ünü, görünür ışığın ise %10-20'sini geçirebilir.

## **4.2- YAŞLANMA VE DERİ**

**YAŞLANMA;** Bir sistemin fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanlardan kaynaklanan eksojen ve, veya endojen stres faktörlerine karşı cevap verme yetisinde azalma ile karakterize, çok yönlü ve zamana bağımlı kompleks bir süreçtir.(1)

***Deri yaşlanması;***

**‘Hiçbir şey insanı kırışmış ve kurumuş bir cilt kadar yaşlı göstermez.....’ (1,2)**

Deri yaşlanması yapısal ve moleküler bozulma ile birlikte derinin fonksiyonel ve estetik sonuçlarını da etkileyen ve progresif seyreden bir süreçtir.

Deri yaşlanması iki farklı şekilde gerçekleşir;

1-İntrensek Yaşlanma ( Kronolojik, Gerçek, Spontan, Doğal Yaşlanma);

Somatik hücrelerde bölünme kapasitesi sınırlı olup, her mitoz bölünme ile telomer uzunluğu azalır. Bu durum hücrelerin büyüme sinyallerine yanıt verebilme kapasitelerinde azalmaya yol açar. Bu durumun aksi olarak da büyüme inhibitörlerine yanıt verebilme kapasiteleri artar. İntrensek yaşlanmanın, esas olarak fibroblast hücre kültürlerinde çalışılmış olan, moleküler belirtileri membran yapısındaki değişiklikler, adhezyon özelliklerinde azalma, hücreler arası madde üretiminde azalma ve katalaz enzim aktivitesindeki değişiklikleri kapsar (2)



## 2-Ekstrensek Yaşlanma;

UV ile yaşlanma

Sigara

Aşırı kalori alımı

Aşırı alkol tüketimi

Malnütrisyon

### 4.2.1-Yaşlanma İle Epidermiste Olan Değişiklikler:

Yaşlanma ile en belirgin değişiklikler dermoepidermal bileşkede düzleşme ve epidermal rete çizgilerinin silinmesidir. (2,13) Epidermis ile dermis arası bağ doku fibrilleri ile oluşan bağlantılar zayıflar. Bunun sonucu olarak küçük fiziksel hasarlar sonrası cilt yüzeyinde abrazyon görülme sıklığı artar. Bu durum yaşlılarda büllöz dermatoz görülme sıklığının artmasını açıklayabilir. Bazal membran üzerindeki epitel hücrelerin hacimsel özellikleri, boyanma özellikleri belirsiz hale gelir. Stratum korneum kalınlığında azalma olmamasına rağmen derinin en dış tabakasını oluşturan korneositlerde yüzey alanı artışı görülebilir (2,14). Epidermal hücresel dönüşüm hızı, doku proliferasyonu, yenilenmesi azalma gösterir (14,15).

Birim alana düşen metabolik olarak aktif melanosit sayısı azalır. Melanositlerin sayıca ve metabolik olarak aktivitelerindeki azalma ve keratinositlere melanin pigmenti aktarımındaki bozukluk, düzensiz pigmentasyona ve UV ışınlarına karşı bariyerin bozulmasına yol açar (13,16). Hem kronolojik yaş hem de ekstrensek yaşlanma (UV ışınları ile oluşan ) epidermisdeki Langerhans hücre sayısını ve yapısını etkiler. Langerhans hücre sayısının azalması özellikle güneş ışığına maruz kalan vücut alanlarında daha belirgindir. Bunun sonucu olarak deri maligniteleri ve enfeksiyon riskinde artış görülür. Bu durumun tersi olarak immun yanıtın aşırı reaksiyon gösterdiği alerjik kontakt dermatitte ise azalmayla sonuçlanır.(2,13).

Epidermisin hormonal bir fonksiyonu olan Vitamin D üretimi de azalır. Epidermis ve dermis kalınlığında meydana gelen azalmanın ve atrofinin serumdaki 25-hidroksi vitamin D3 miktarındaki azalmanın bir sebebi olabileceği düşünülmektedir (13). Yaşlanma ile özellikle deride bazı benign proliferatif lezyonlar gelişebilir. Bu benign oluşumlardan bazıları: seboreik keratoz, sebace hiperplazi, lentigo kornu kutaneum , keratoakantom, fibroepiteliomadır(15,17). Ayrıca UV fazla miktarda maruz kalma ile bazal ve skuamöz hücreli karsinomlar da gelişebilmektedir. (13).

#### **4.2.2- Yaşlanma İle Dermiste Olan Değişiklikler:**

Dermal kalınlık yaşla birlikte azalır bunun sebebi dermal alan hücreleri olan fibroblast, mast hücreleri, langerhans hücreleri, kan damarlarının sayılarındaki azalmadır. Dermal alanda vasküler kapiller ağların boyutlarında da azalma görülür. Vasküler ağda meydana gelen değişiklikler kıl foliküllerinde , ektrin, apokrin ve sebace bezlerde atrofiye yol açar. Bu atrofi ise yaşlanma ile birlikte fibrozise sebep olur (2,13,18).

Yaşlanmış deride görülen değişikliklerin çoğunda derinin elastikiyetini sağlayan elastik liflerin yapısındaki değişiklikler ve sayılarındaki azalma sorumludur. Bu değişikliklerin sonucu olarak ciltte gevşeklik, turgorunda azalma, sarkma, kırışıklıklar ve cildin gerildikten sonra eski pozisyonuna dönmesinde gecikme ve azalma gözlenir. Elastik liflerin miktar ve yoğunluğunda azalma ile birlikte yapısal değişikliklere rastlanmaktadır. Liflerde vakuollerin geliştiği, çevresinde ise dejenerasyon olduğu görülür. Hatta elastik lif yapısında tam bir parçalanmaya da rastlanabilir. UV hasarına bağlı elastik liflerde görülen zarar; derin kırışıklıklar, gevşek görünümde kaba bir cildin gelişimine sebep olur. Bu görünüm solar elastoza ve esnekliğin azalmasına bağlıdır (13,15,18).

Yaşlanmış deride matür kollajende azalma ve dejenerasyon görülür. Tip 1 kollajen miktarında azalma sonucu Tip 1/3 kollajen oranı da değişir (2,13,18). Dermo-epidermal bileşkenin stabilizasyonunu sağlayan Tip 4 kollajen içeren fibriller azalır ve mekanik travmalara karşı deri daha hassaslaşır. (2). UV hasarına bağlı yaşlanmanın histolojik temel bulgusu ise solar elastozdur. 'Solar elastoz' dermisin orta ve yüzeysel tabakalarında yoğun, düzensiz elastotik madde birikimidir. Bu solar elastotik materyal fibrillin, elastin, ve diğer hücreler arası madde bileşenlerinden oluşmaktadır (2,13,18).

Yaşlanma ile birlikte bağ doku kalitesinde bozulma görülür. Mukopolisakkarit miktarında hafif bir azalma olur. Mukopolisakkaritler derinin kuru ağırlığının ancak %0.1-0.3'ünü oluştururlar. Ancak miktarlarındaki azalma deri elastikiyetini ve turgorunu olumsuz yönde etkiler. Mukopolisakkaritler büyük miktarlarda su bağlayarak derinin depolama görevinde ana unsuru oluştururlar. Hiyaluronik asit (HA) derideki ana glukozaminoglikan (GAG)'dır ve vücuttaki hiyaluronik asidin %50'si deri hücrelerarası maddede bulunur. Hızlı doku proliferasyonunda, rejenerasyon ve onarım sırasında hücreler arası iletişime zemin sağlamada önemlidir. (13,15,18). Yaşlanma ile birlikte hiyaluronik aside dermisin yüzeysel kısımlarında rastlanabilir, ancak epidermiste rastlanmaz.

Tablo 1: Deri Yaşlanması ile Oluşan Histolojik Değişiklikler (Gilcrest BA, Aging of skin. Dermatology in General Medicine. NewYork, 1987; 146-153)(19)

Epidermis	Dermis	Deri Ekleri
Kalınlıkta azalma	Atrofi	Depigmente kıl yapısı
Dermoepidermal bileşkede düzleşme	Fibroblast sayısında azalma	Kıl foliküllerinde azalma
Hücre büyüklük ve şeklinde değişiklikler	Mast hücre sayısında azalma	Tırnak anomalileri
Nükleer atipi	Anormal sinir sonlanmaları	Apokrin ve erkin bezlerde azalma
Melanosit reaktif hiperplazisi	Vasküler yapılarda atrofi	Terminal kılların vellüse dönüşmesi
Langerhans hücre sayısında azalma	Kapiller sayısında azalma	

Tablo 2 :Yaşlanma ile birlikte deride görülen morfolojik değişikliklerin özeti

<b>Yaşlanma ile birlikte deride görülen morfolojik değişiklikler:</b>
<i>Epidermal hücresel döngü hızında azalma</i>
<i>Yaralanma sonrası verilen epitelizasyon yanıtında azalma</i>
<i>Dermisten kimyasal maddelerin katabolize edilmesinde azalma</i>
<i>Ter ve sebum gibi sekretuar madde üretiminde azalma</i>
<i>Duysal inervasyonda azalma</i>
<i>Vasküler aktivitede azalma</i>
<i>Mekanik bariyer etkisinde azalma</i>
<i>Isı regülasyonda azalma</i>
<i>Vitamin D sentez kapasitesinde azalma(2,13,18).</i>

### 4.2.3-Deri Yaşlanmasını Etkileyen Faktörler

#### 4.2.3.a-Genetik Özellikler:

Bireyin deri yapısının belirlenmesinde genetik özellikleri önemli rol oynar bu durum kronolojik ve ekstrensek yaşlanma etkenlerine verilen cevaba da yansır. Güneşe maruz kalma ile ortaya çıkan değişiklikler genetik olarak kişiden kişiye farklılık gösterir.

Fitzpatrick altı adet deri tipi tanımlamıştır;

Tip 1; En alt seviyede melanin içerir. Güneş ışığına maruziyet sonrası her zaman yanar, bronzlaşmaz.

Tip 2; Melanin seviyesi az. Güneş ışığına maruziyet sonrası sıklıkla yanar, zor bronzlaşır.

Tip 3; Ten rengi beyazdır. Güneş ışığına maruziyet sonrası bazen hafif yanar, ortalama bronzlaşır.

Tip 4; Ten rengi orta kahverengidir. Güneş ışığına maruziyet sonrası nadiren yanar, kolay bronzlaşır.

Tip 5; Ten rengi koyu kahverengidir. Güneş ışığına maruziyet sonrası çok nadir yanar, çok kolay bronzlaşır.

Tip 6; Ten rengi siyahtır. Güneş ışığına maruziyet sonrası hiç yanmaz, çok kolay bronzlaşır. (20)

Genetik olarak yatkın, Fitzpatrick tip 1-2-3, kişilerde yaşlanma etkenlerine daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Özellikle üçüncü ve dördüncü dekatta UV hasarı ile yaşlanmaya bağlı olan değişiklikler görülmeye başlar. (13,17,21,22)

#### **4.2.3.b- Beslenme Alışkanlıkları:**

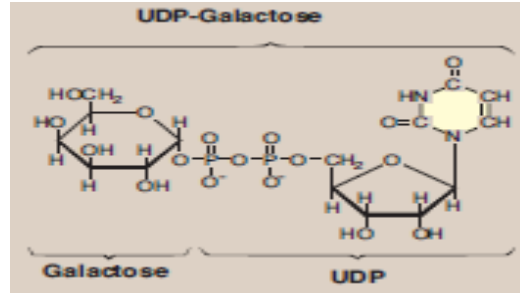
Ekstresek ya da intrensek yaşlanma sonucu oluşan belirtilerin birçoğu beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesi ile geciktirilebilir. (2,15,23,24) Dengeli ve düzenli diyet oluşturmak için boya ve yaşa uygun kalori alımını sağlamak gereklidir. Bunun için enerji alımı ve enerji tüketimi arasındaki denge sağlanmalıdır. Diyette lipid, kolesterol , doymuş yağ asidi,basit karbonhidrat tüketimini azaltmak, protein ve esansiyel yağ asitlerinden zengin beslenmek deride oluşan oksidatif hasara bağlı yaşlanma belirtilerinin azaltılmasında önemlidir. (18,23,25,26)

Esansiyel besinlerin yeterli alınması şartıyla uzun süreli kalori kısıtlaması ile yaşam süresinin uzatıldığı gösterilmiştir. (27)Esansiyel besinlerin yeteri kadar alınması sağlanan ,kalori kısıtlaması yapılmış deney hayvanlarında mitokondriyal reaktif oksijen metabolitleri oluşum hızında yavaşlama olduğu bunun sonucu olarak mitokondriyal DNA mutasyon sayısının azaldığı görülmüştür. Bu deneysel manipulasyon ile yaşlanma hızında azalma olduğu kanıtlanmıştır. (27,28)

Kalori kısıtlaması yaşam süresini uzatan bir manipülasyon ise tersi de yaşlanmayı hızlandırmada etkili olduğu kanıtlanmıştır. Tavşanlar üzerinde yapılan çalışmada kolesterol ile beslenen gruplarda aterosklerotik plak oluşumu, oksidatif DNA hasarı, apoptotik hücre ölümü gerçekleştiği görülmüştür. p 53 geni ve DNA onarım enzimi ekspresyonu arttığı gösterilmiştir. Besinle alınan kolesterol miktarı azaltıldığında ise oksidatif DNA hasarı azalmasına bağlı olarak DNA onarım enzimleri ekspresyonu azaldığı kanıtlanmıştır.(29)

### d-Galaktoz ile Yaşlanma:

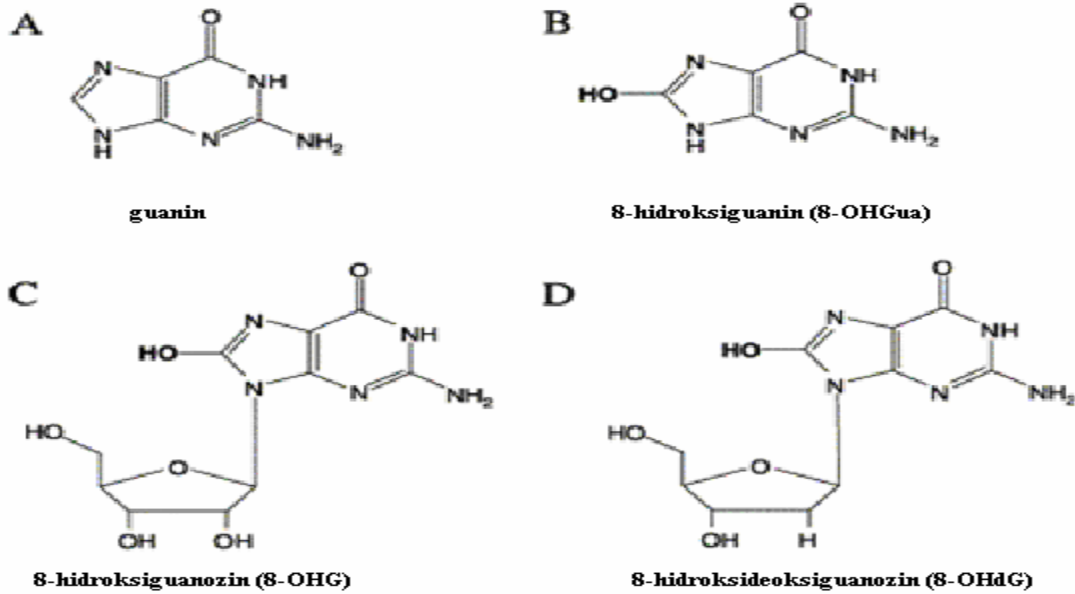
Süt ve süt ürünleri ile alınan laktoz, galaktoz kaynağıdır. Galaktoz bundan farklı olarak glikolipid veya glikoprotein gibi kompleks karbonhidratların lizozomal parçalanması ile oluşabilir. Galaktozun hücre içine alımı fruktoz gibi insulin bağımsızdır. Galaktoz da metabolize edilmeden önce 'Galaktokinaz' enzimi ile fosforillenmelidir. Galaktoz -1-fosfat, UDP-glikoz ile galaktoz 1-fosfat-uridil transferaz enzimi varlığında reaksiyona girerek UDP-Galaktoz oluşturur. UDP –galaktoz olarak glikolitik döngüye girebilir ve metabolize edilebilir.(30)



Şekil 7: Galaktoz moleküler yapısı (30)

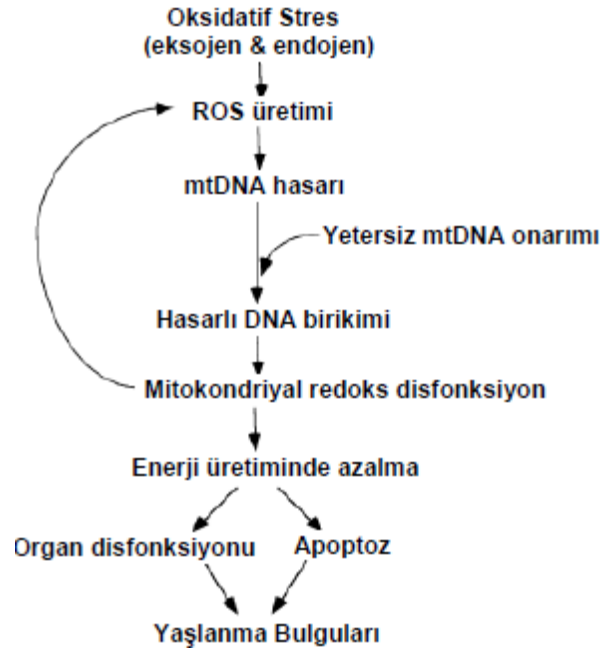
Organizmaya yüksek düzeylerde Galaktoz alındığında ise galaktoz oksidaz enzimi ile bir aldehit olan galaktitol ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüşür.(3) Hidrojen peroksit serbest bir reaktif oksijen metabolitidir. Lipofilik yapıda olduğu için hücre zarından çabuk geçer, hücre içinde Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikalini oluşturur. Ortamda demir ( $Fe^{+2}$ ) varlığında hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) oluşur. Ortamda süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) oluşur. (Lee JC. Ve ark., 2006)(6). Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) yarılanma ömrü çok kısa olan, en etkili serbest oksijen radikalidir. Hücre hasarından sorumlu temel radikal olduğu söylenmektedir. (Gardès AM ve arkadaşları, 2006)(7) Bu oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, baz modifikasyonları ve protein-DNA bağlanması gibi reaksiyonlarla hasar oluşabilir. Aynı hasar mekanizmaları mitokondriyal DNA üzerinde de etkilidir. Mitokondriyal DNA serbest radikal oluşumu meydana gelen bölgelere daha yakındır ve histonlar tarafından korunmaz.

Oksidatif hasar DNA üzerinde pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirir. DNA'da oksidatif hasar göstergesi olarak yirmiden fazla baz hasarı belirlenmiştir(Dizdaroğlu 1998)(31)DNA bazları içerisinde iyonizasyon potansiyeli düşük olan ve oksitlenmeye en yatkın olan baz Guanindir(Mc Dorman ve arkadaşları 2005).(32) Bakır iyonları polianyonik olan DNA'nın guanin bazına yüksek afinite ile bağlanır. Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) guanin molekülünün 8. Pozisyonuna eklenir. Bu reaksiyonu ürünü olan C8-OH bir elektron ve bir proton kaybederek *8-OH-d-Guanine* okside olur. (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi 2002)(33) Oksidatif hasar sonucu değişikliğe uğramış olan DNA'da *8-OH-d-Guanin* oluşur. *8-OH-d-Guanin* DNA replikasyonu esnasında G-C'den A-T'e dönüşümü arttırarak mutasyona eğilimi arttırır(Mc Dorman ve arkadaşları 2005)(32). DNA onarım mekanizmalarının aktifleşmesi ile ekzonükleaz aktivitesi başlar. Ekzonükleaz aktivitesi ile DNA dizisinden çıkarılan *8-OH-d-Guanin* idrarla atılır. 24 saatlik idrarda ölçülen *8-OH-d-Guanin* oksidatif DNA hasarı ölçümünde en sık kullanılan ve en duyarlı biyomarkerdir.(34,35)



Şekil 8: Oksidatif Hasar sonucu oluşan bazı hasarlı nükleozidler (36)



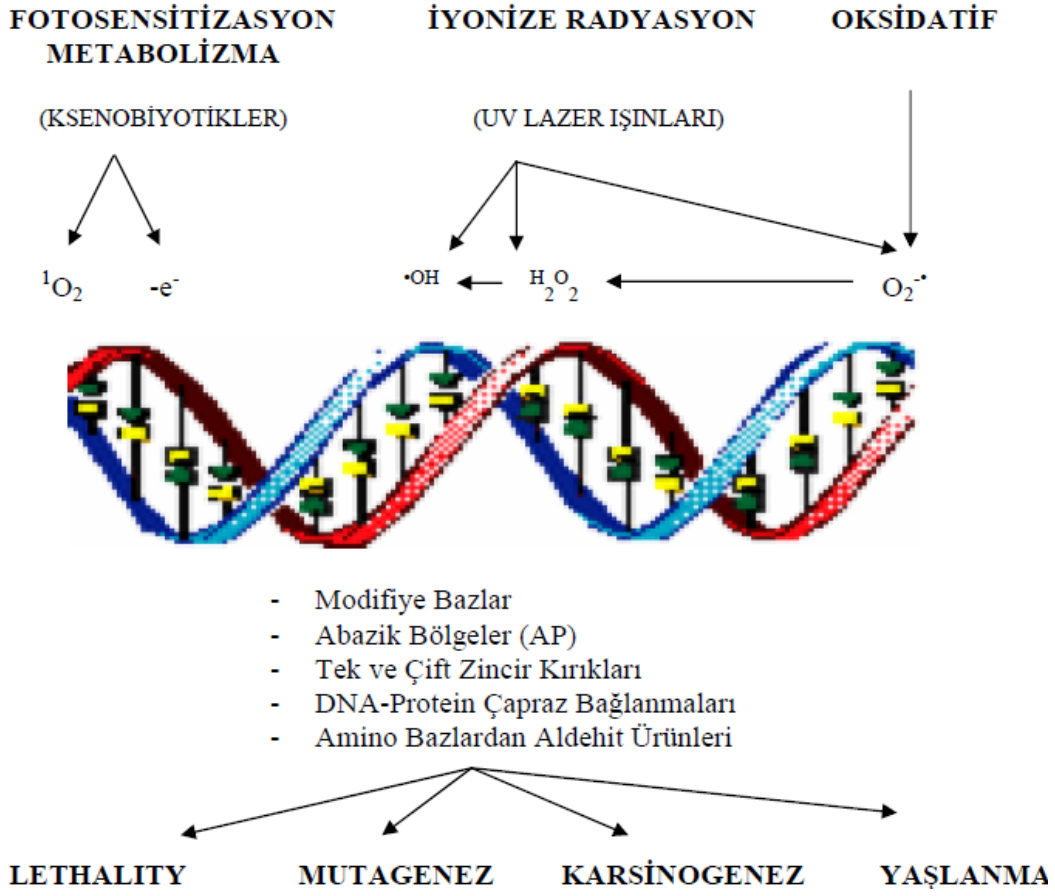


Şekil 9: Mitokondriyel reaktif oksijen metabolitleri, oksidatif mitokondriyel DNA hasarı ve yaşlanma etkisi (37)

Oksidatif hasar ve reaktif oksijen metabolitleri miktarında artış sonucu mitokondrilerde kristalarda azalma, granül eksilmesi, matriks vakuolizasyonunda azalma görülür. Mitokondride fonksiyon bozukluğu oluşması ile birlikte biyoenerjide azalma, organ disfonksiyonu ve apoptoz ile sonuçlanır. Şiddetli ve kalıcı oksidatif hasar varlığında yaşlanma belirtilerinde de artış olur. (38,39) Artmış d-Galaktoz alımı ile hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri miktarında artış mitokondriyal oksidatif hasar oluşturarak alternatif yaşlanma belirtileri artışına neden olur(3,8)

### **8-OH-d-Guanozin:**

DNA yapısal olarak stabil bir molekül olmasına karşın fizyolojik şartlarda dahi spontan kimyasal hasara uğrayabilir. Organizmadaki her hücrenin DNA'sı 10000/gün hasara uğrayabilir. (Halliwell 2002)(35,40)Çeşitli etkenler nedeni ile oluşan DNA hasarı DNA onarım mekanizmaları ile önlenmeye çalışılmaktadır. (Kasai 1997)(41)



Şekil 10: DNA hasarı Ve Sonuçları

DNA üzerinde bakır iyonunca zengin bölgeler olan Guanin ve Sitozin alanları en fazla oksidatif hasardan zarar gören bölgelerdir. Bakır iyonları polianyonik olan DNA'nın guanin bazına yüksek afinite ile bağlanır. Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) guanin molekülünün 8. Pozisyonuna eklenir. Bu reaksiyonu ürünü olan C8-OH bir elektron ve bir proton kaybederek *8-OH-d-Guanine* okside olur. (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi 2002)(33) Okside bir nükleozid türü olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), nükleer ve mitokondriyal DNA'da en sık çalışılan ve tespit edilen hasar ürünü olup, duyarlı bir in-vivo oksidatif stres biyobelirtecidir. (42,43)

DNA'da oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan ürünlerin vücut sıvılarında güvenilir analitik yöntemlerle doğru olarak değerlendirilmesi oksidatif DNA hasarının ve hastalıklardaki rolünün anlaşılması açısından son derece önemlidir. Jaruga ve arkadaşları idrar ile atılan hasarlı DNA nükleozidlerinin ölçümünde düşük düzeylerde bulunan DNA hasar ürünlerinin saptanması ve kantitasyonları için yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip yöntemlerin kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir. Avrupa Oksidatif DNA Hasarı Standartlar Komitesi (ESCODD) 8-OH-dG düzeylerinin farklı tekniklerle ölçümlerinin karşılaştırması sonucunda, en güvenilir yöntemin sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) olduğu yönünde görüş bildirmiştir. Son yıllarda, düşük konsantrasyonlardaki DNA hasar ürünlerinin analiz edilmesine olanak sağlayan ve izotop işaretli internal standart kullanılarak gerçekleştirilen sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon izleme (LC-MS/MS SID-MRM) yöntemi, yüksek analitik duyarlılık ve özgüllüğü, aynı anda birçok analitin kantitasyonunu gerçekleştirebilme kapasitesi nedeniyle diğer yöntemlere tercih edilmektedir. Bu teknikte DNA genelde formik asitli ortamda ısıtılarak hidroliz edilir. DNA hidrolizi sonucunda bulunan oksidatif hasar sonucu oluşan hasarlı nükleozidler sıvı kromatografisi ile ayrılır ve kütle spektrometresi ile tespit edilir.(Dizdaroğlu ve arkadaşları 2002)(31,44,45,46)

#### **4.2.3.c- Sigara :**

Sigaranın uzun süreli kullanımı sonucunda arteriyel ve kapiller vasküler dolaşım bozulmaktadır. Bu durum yeni kollajen sentezini olumsuz yönde etkiler ve elastin liflerinde de bozulmaya yol açar. Deri yapısındaki bu değişiklikler yaşlanma etkilerini hızlandırır.(47,48)

#### **4.2.3.c - Hormonlar:**

Deri yaşlanması üzerinde birçok hormon etkilidir. ACTH, steroidler, prolaktin, GH, katekolaminler, seks hormonları deri ve ekleri üzerinde etkili olan başlıca hormonlardır.

Keratinositler üzerinde CRH-R<sub>1</sub>, PRL-R, GH-R, Vitamin-D-R, androjen-R, östrojen-R, glikokortikoid-R, mineralokortikoid-R, muskarinik-R, nikotinik-R, glutamat-R, gastrin salgılatıcı peptit -R, H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> histamin -R, somatostatin-R, bombesin-R gibi hormon ve mediatörlerin reseptörleri bulunur iken melanositler üzerinde CRH-R<sub>1</sub>, MC1-R, LH-R, GH-R, VIP-R, vitamin D-R, androjen-R, östrojen-R, glikokortikoid-R, muskarinik-R, adreno reseptörler, H<sub>2</sub> histamin-R bulunmaktadır.(49)

Deri üzerinde yaşlanma ile oluşan stres ve oksidatif hasara en önemli antioksidan yanıt sentezlenen *melatonin* miktarıdır. Melatonin, triptofandan sentezlenir. Oksidatif hasar ve UV hasarına yanıtta önemli görev alır, deri bütünlüğünün korunmasına yardım eder. İn vivo olarak detoksifikasyon, antimutajenik, antiapoptotik etkileri kanıtlanmıştır. Vasküler permeabilite artışını inhibe ederek neovaskülerasyonu ve yara iyileşmesini hızlandırıcı etksi vardır. (49)

Deri yaşlanması endojen ve veya eksojen faktörlerle gelişen zamana bağımlı kompleks bir süreçtir. Tüm bu süreç üzerinde etkili olan faktörler genetik özellikler, beslenme alışkanlıkları, yüksek kalori alımı, güneş ışığına maruziyet, sigara ve alkol kullanımı, endojen salgılanan hormonlar ya da eksojen alınan hormonlar olarak sayılabilir. Literatürde kalori alımının artması ile yaşlanma belirtilerinin progresif ilerlediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.(4,5,17)

## 4.2.4 - YAŞLANMA BELİRTİLERİNİN ÖNLENMESİ VE TEDAVİSİ

### 4.2.4.a- Güneş Koruyucular :

UV ışınları kümülatif etki ile hem yaşlanmada hem de çeşitli cilt malignitelerinin oluşumunda etken olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden yaşlanma belirtilerinin ortaya çıkmasını önlemede güneş koruyucular önemli yer tutarlar. Etkilerini güneş ışınlarını absorbe ederek, dağıtarak ya da yansıtarak gösterirler. Kimyasal ve fiziksel bariyer özellikleri olan güneş koruyuculara serbest oksijen metabolitlerini yakalama özelliği olan vitamin E ve Beta Karoten eklenerek yararlanımı yükseltmek mümkün olabilir.(2,50)

### 4.2.4.b- Antioksidan Uygulamaları :

Serbest oksijen radikallerinin vücuttaki etkilerini azaltan maddelerdir. Etkilerini süpürme etkisi (reaktif oksijen metabolitini daha zayıf moleküle dönüştürerek) , söndürme etkisi (reaktif oksijen metabolitine bir adet hidrojen aktararak), zincir reaksiyonlarını kırma etkisi( reaktif oksijen metabolitini kendisine bağlayıp inaktive ederek) , oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarma etkisi ile gösterirler. (49)

**Vitamin olan antioksidanlar :** Vitamin E, vitamin A, vitamin C,  $\beta$ -karoten, vitamin K, nikotinamid, koenzim Q,

**Vitamin olmayan antioksidanlar :** Glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, lipoik asit.

**Vitamin E ;** Hücre membranlarını lipid peroksidasyonu ile oluşan serbest oksijen radikallerinin hasarından korur. Epidermiste bulunan major antioksidandır. UV hasarı sonrasında görülen ödem, apoptoz, lipid peroksidasyonu, DNA' da oksidatif hasar ve immun baskılamayı azalttığı gösterilmiştir. (51,52)

**Vitamin C ;** Kollajen sentezinde görevli olan prolin ve lizin hidroksilaz enzimin kofaktörüdür. Kollajenin çapraz bağ oluşumunda etkilidir. Ayrıca bozulmuş olan elastin sentezini inhibe ederek, sfingolipid sentezini aktive ederek epidermal bariyer fonksiyonunu destekler. Kültüre fibroblastlarda tip 1 ve tip 3 prokollajen mRNA düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. (53,54)

**Vitamin A;** Vitamin A öncüsü  $\beta$ -karotendir.  $\beta$ -karoten lipide eriyebilen ve serbest oksijen radikallerini tutarak inaktive eden antioksidandır ancak topikal kullanımda çok stabil olmadığı için kullanımı yaygın değildir.(54) Vitamin A'nın doğal veya sentetik deriveleri '*Retinoidler*' olarak adlandırılır. Kollajenaz ve jelatinaz aktivitesini inhibe ederler, kollajen sentezini düzenlerler. Aktif form olan '*tretinoinin*' uygulaması sonrasında deride histolojik olarak sıkışmış stratum korneum, epidermal hücre artışı, UV hasarı sonrası görülen atipide azalma, artmış kollajen tip 1 ve kollajen tip 7 sentezinde artış,tirozinaz enzimi aktivitesinde azalma, vaskülarizasyonda artış, melanin granüllerinde dağılıma görülür.(55)Topikal retinoid uygulaması ile hiperpigmentasyon ve ince kırışıklıkların giderilmesi gibi yaşlanma belirtilerinin azaldığı gösterilmiştir. (56)

**Vitamin K ;** Fitonadin kanama zamanının uzamasına yol açar. Bu etki ile ektravazasyonu azaltarak deride oluşan vasküler yaşlanma belirtilerini ve ince çizgilenmeleri azaltabilir. (54)

**Nikotinamid** ; Membran sfingolipidlerinin m RNA ekspresyonunu arttırarak sentezini arttırırlar. Lökosit peroksidaz enzimini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterirken transdermal su kaybını azaltarak deri nemlenmesini arttırırlar. Keratinositler üzerine uygulandığında stratum korneum tabakasında kolesterol, serbest yağ asitleri seramid sentezini arttırdığı gösterilmiştir. (57)

**Koenzim Q (Ubiquinon)** ; Mitokondriyal elektron transportunda rol oynayan bir proteindir. Hücre membranları üzerinde lipid peroksidasyonu önleyerek oksidatif hasar etkisini azaltır. Topikal kullanımda epidermis ve dermise penetre olarak UV hasarı sonrasında IL -6 ve Matriks Metalloproteinaz -1 üretimini azaltarak ve Kollajen 1 sentezini arttırdığı gösterilmiştir. (58,59)

**Glutasyon Peroksidaz** ; Vücudun tüm doku ve hücrelerinde bulunan, bulunduğu organa göre aktivitesi değişen, sistein içeren ve dört alt birimden oluşan bir enzimdir. Aktive olduğu zaman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indirgenir ve redükte glutasyon yükseltgenir. Redükte glutasyon membran lipidlerinin oksidasyonunu engelleyerek ince kırışıklıkların oluşumunu engelleyebilir.(60)

**Süperoksit Dismutaz** ; Süperoksit (O<sup>-2</sup>) radikalini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> ' ye dönüştüren metalloprotein yapıda enzimdir. (Memişoğulları R, 2005) Moleküler formunun büyük olması nedeni ile deriden penetrasyonu tam olmadığı için topikal kullanımlarda deri üzerindeki antioksidan etkisi tam olarak tanımlanamamıştır. (60,61)

**Lipoik Asit**; Mitokondriyal dehidrogenaz reaksiyonlarında rol oynayan bir antioksidandır. Vitamin E,vitamin C ve Glutasyon ile birlikte reaksiyona girerek hücre membranlarını oksidatif hasardan korur. (62) %1'lik lipoik asit krem ya da losyon olarak uygulandığında ince çizgileri ve akne izlerini azaltır. (54)

#### 4.2.4.c -Kimyasal Soyma Uygulamaları :

Bir veya birden fazla kimyasal ajanın topikal olarak deriye uygulanması sonrasında kontrollü olarak çeşitli seviyelerde hasar oluşturulması ve sonuç olarak sağlıklı derinin ortaya çıkarılması işlemidir. UV hasarına bağlı yaşlanma, aktinik keratoz, seboreik keratoz, senil lentigo gibi lezyonların tedavisinde kullanılır. Penetrasyon derinliği ve oluşturulan hasarın derecesine göre üç gruba ayrılırlar;

- A) Yüzeysel Soyma; %10-25 trikloro asetik asit, alfa hidroksi asit, salisilik asit, Jessner solüsyonu kullanılarak yapılan stratum korneum tabakasının soyulması işlemidir.
- B) Orta derinlikte Soyma; %30-50 trikloro asetik asit, jessner solüsyonu, %70 glikolik asit kullanılarak yapılır. Hafif ve orta derecedeki yaşlanma belirtilerinin giderilmesinde kullanılan papiller dermiste hasar oluşturulması işlemidir.
- C) Derin Soyma ; %50 ve üzeri trikloro asetik asit,%88 fenol kullanılarak yapılır. Şiddetli yaşlanma belirtileri olan deride epidermis ve dermisin katları olan papiller ve retiküler dermis tabakalarında hasar oluşturma işlemidir.

Glikolik asit, laktik asit, sitrik asit, malik asit, mandelik asit ve tartarik asit gibi alfa pozisyonunda hidroksil grubu içeren organik asitlerdir. Bu gruplar içinde kozmetik kullanıma en uygun olan moleküler ağırlığı en düşük olan glikolik asittir. Kimyasal soyma uygulaması sonrasında epidermiste belirgin kalınlık artışı, bazal hücre atipisinin geriye döndürülmesi, melanin pigmentasyonunda azalma, subepidermal yeni kollajen bantları, elastik fibrillerde kalınlaşma görülmüştür. (63, 64,65)



#### **4.2.4.d -IPL (Intense pulse light) ,Lazer ve Radyofrekans Uygulaması :**

Görünebilir ışık kaynağı kullanılarak yapılan deri gençleştirme işlemlerinin ortak çalışma prensibi; ısı ile indüklenebilir, kontrollü denatüralizasyon oluşturarak dermal kollajen sentezini uyarılmasını sağlamaktır.

Histolojik analizlerde uygulama sonrası inflamatuvar mediatörler ve GF( Growth Factor) salınımında artış, fibroblast aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır. Ultrasonografik ve radyoimmunoassay görüntülemelerde de papiller ve retiküler dermiste kollajen artışı gösterilmiştir. (66,67,68,69)

#### **4.2.4.e - Dermal Dolgu Uygulamaları :**

Otolog yağ, kollajen allogreftleri ve ksenogreftleri, hiyaluronik asit deriveleri, vitaminler, büyüme faktörleri, otolog kültüre fibroblastlar ile yaşlanma ile oluşan epidermal düzleşme ve atrofiyi azaltmak, dermal dolgunluğu tekrar sağlamak amaçlanır.

Glikozamin glikanlar ve bunun türevi olan hiyaluronik asit dermal ekstrasellüler matriksin ana bileşenidir. Boşlukları doldurma, lubrikasyonu sağlama, travma absorpsiyonu, hücresel çoğalmanın düzenlenmesi görevleri vardır. Fibroblast aktivitesini arttırarak kollajen tip 1, matriks metalloproteinaz-1 ve tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 aktivitesini arttırır. (70,71,72)

#### **4.2.4.f- Otolog Plateletten Zengin Plazma (PRP) Uygulaması:**

Trombositlerin  $\alpha$ -granülleri PDGF(Platelet derived growth factor), TGF( Transforming growth factor), VEGF (Vascular endotelial growth factor), IGF(Insulin-like Growth Factor) gibi hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonunu

düzenleyen mediatörler içerir. PRP uygulaması ile mediatör salınımı artışı ve fibroblast aktivasyonu ile dermal yenilenme sağlanır(73,74)

#### **4.2.4.g-Botulinum Toksin A Uygulamaları :**

Anaerobik bir bakteri olan '*Clostridium Botulinum*'un ürettiği toksin olan botulinum toksini ,bilinen en potent toksindir. Antijenik profili ve biyokimyasal etkileri farklı olan yedi serotipi bulunmaktadır ( Botulinum toksin A-B-C-D-E-F-G). Tüm botulinum toksin serotipleri periferik kolinerjik sonlanmalara bağlanır, hücre içine girerek nöromusküler bileşkede asetil kolin salınımı durdurarak gevşek paraliziye ve otonom belirtilere neden olurlar.(75) Yaşlanma ile ortaya çıkan glabellar çizgiler, horizontal alın çizgileri ve periorbital ince çizgilerin tedavisinde oldukça başarılıdır(76,77,78)

#### **4.2.4.h- Hormon Terapisi :**

Yaşla birlikte büyüme hormonu (GH), insulin like growth factor -1 (IGF-1), melatonin, TSH,Tiroid hormonları, dihidroepiandrosteron(DHEA), östrojen ve androjen düzeylerinde belirgin azalma görülür.

Yaşları 60 ile 79 arasında değişen, kadınlarda ve erkeklerde bir yıl boyunca yapılan DHEA replasman tedavisi sonrasında libido artışı, deri görünümünde iyileşme ve kemik dansitesinde artış saptanmıştır. (79)

Topikal %0,01'lik estradiol ve %0,3'lük estriol uygulaması ile yapılan çalışmada ( Schmidt ve arkadaşları) periorbital kırışıklıklarda azalma ve dermal elastisite artışı saptanmıştır.(80)

#### **4.2.4.i- Kök Hücre Tedavisi**

### **4.3 - KÖK HÜCRELER**

Kök Hücreler; Belirli doku- hücre karakterleri taşımayan, uygun sinyal alıncaya kadar farklılaşmamış fenotiplerini koruyan, kendini yenileyebilme ve çoğalma özelliklerine sahip hücreler olarak tanımlanırlar. Biyolojik olarak aktif farklılaşma sinyali aldıklarında diferansiye olarak birbirinden tamamen farklı terminal hücre tipine dönüşebilirler. Bu özelliklerinden dolayı in vitro hücre kültürlerinde çoğaltılabilirler. (81) Hastalıkların hücre-doku-organlarda normal yapı ve işlevlerinin hasarlanması sonucu oluştuğu bilinmektedir. Kök hücreler; hasara uğrayan hücre-doku-organların biyolojik görevlerini yerine getirmek ya da tamir etmek amacıyla önce deneysel olarak günümüzde ise klinik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hasar görmüş ve işlevini yitirmiş hedef dokuya işlevlerini yerine getirebilmesine yetecek kalitede ve sayıda farklılaşmış kök hücre transferi yapılması tedavi seçenekleri arasındadır. (81,82,83)

**Kök hücre plastisitesi:** Dokuda bulunan özgün kök hücrelerin uygun sinyal ile birlikte farklı hücre tiplerine diferansiye olma kabiliyetlerine 'Plastisite' adı verilmektedir. Deneysel alanda ve klinikte kolay elde edilebilir olması nedeni ile çok kullanılan kemik iliği kökenli kök hücreler başta olmak üzere tüm kök hücreler in vitro ve in vivo koşullarda sadece kaynaklandıkları hücre ve dokuya değil, organizmanın diğer işlevsel hücre ve dokularına dönüşebilmeleri plastisitenin kanıtıdır. (83)

### **Kök hücre plastisitesini kanıtlayan in vitro yöntemler:**

Kültür ortamının bileşenlerinin değiştirilmesi ile farklı hücre dışı sinyaller oluşturma

Genetik modifikasyonları içeren işlemler

Kültüre edilmesi istenen farklı hücre serileri ve dokular ile birlikte kültüre edilme işlemi (83)

### **Kök hücre plastisitesini kanıtlayan in vivo yöntemler:**

Eşey farklı bireyler arasında (XX'den XY 'e) organ transplantasyonu sonrasında Y<sup>+</sup> hücrelerin tranplante edilen organda gösterilmesi,

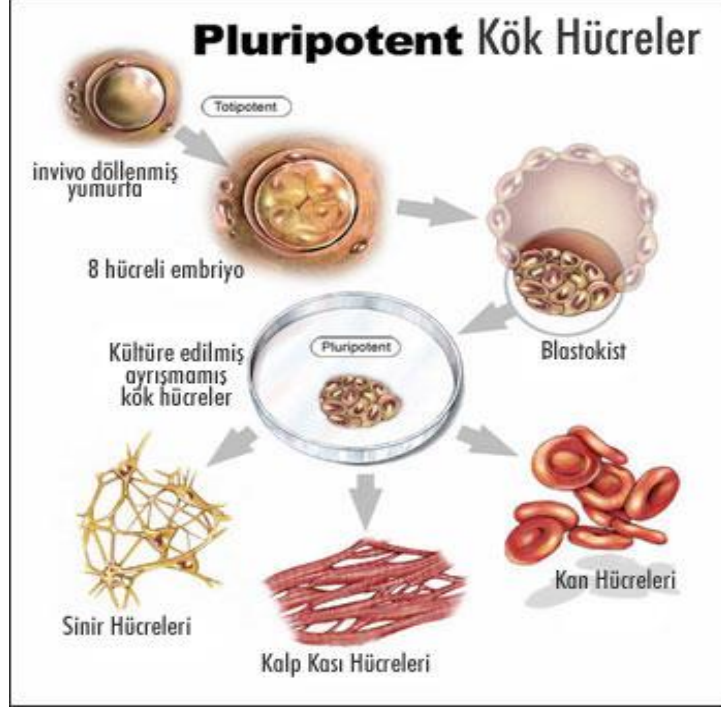
Eşey farklı bireyler arasında (XY'den XX'e) kemik iliği kökenli kök hücre nakli sonrasında Y<sup>+</sup> hücrelerin alıcının dokularında gösterilmesi.(83)

#### **4.3.1-Kök Hücre Sınıflaması**

Kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyellerine göre;

- 1- Totipotent
- 2- Pluripotent
- 3- Multipotent
- 4- Oligopotent
- 5- Unipotent

*Totipotent kök hücreler;* Döllenenmeden sonra oluşan embriyonun ilk dört gününe kadar elde edilebilen, bir organizmayı oluşturabilecek tüm hücelere dönüşme özelliği olan en potent kök hücre grubudur. Fertilize ovumdan dört hücre ile sekiz hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotent kök hücre grubuna girer. (82,83)



Şekil 11: Pluripotent Kök Hücre (Kök Hücre Derneği web sayfasından alınmıştır.)

*Pluripotent kök hücreler;* Döllenenmeden sonraki beşinci günde blastokist isimli, yaklaşık 150 hücreden oluşan, içi sıvı dolu kistik yapı oluşur. Blastokistin iç yapısında Epiblast ve Hipoblast oluşur. Hipoblasttan Yolk Kesesi oluşruken, epiblasttan organ ve dokuların temelini oluşturan ektoderm, mezoderm ve endodermi oluşturan hücreler oluşur. Organizmada bulunan tüm dokuları oluşturabilme özelliğine sahiptirler ancak tek başına embriyo oluşturamazlar. Pluripotent kök hücreler 'Embriyonik kök hücreler' olarak da adlandırılır. İlk kez 1981 yılında Evans ve Kaufman tarafından tanımlanmışlardır.

*Multipotent kök hücreler;* İntrauterin gelişim ilerledikçe hücrelerin farklılaşma potansiyelleri azalarak özelleşmiş hücrelere dönüşürler. Multipotent kök hücreler köken olarak birbirine yakın hücrelere dönüşebilen kök hücre tipleridir. ‘Erişkin tip Kök Hücreler’ olarak da bilinirler. Elde edildikleri döneme göre daha stabildirler, bölünme ve farklılaşma yetenekleri pluripotent kök hücrelere göre daha sınırlıdır. Erişkin tip kök hücreler, organizmada dokularda farklılaşmış hücre tipleri arasında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Uygun biyolojik sinyali aldığı anda kendisini yenileyebilir ve özelleşmiş hücre ve dokulara diferansiyasyon olabilir.

*Oligopotent kök hücreler;* Sadece birkaç hücre grubunu oluşturacak şekilde farklılaşabilen kök hücrelerdir. Kemik iliği kökenli myeloid ve lenfoid hücreler örnek olarak verilebilir.

*Unipotent kök hücreler;* Sadece tek hücre tipini oluşturan(kas ana hücresinde olduğu gibi), kendi kendini yenileyebilme yeteneği olmayan hücrelerdir.

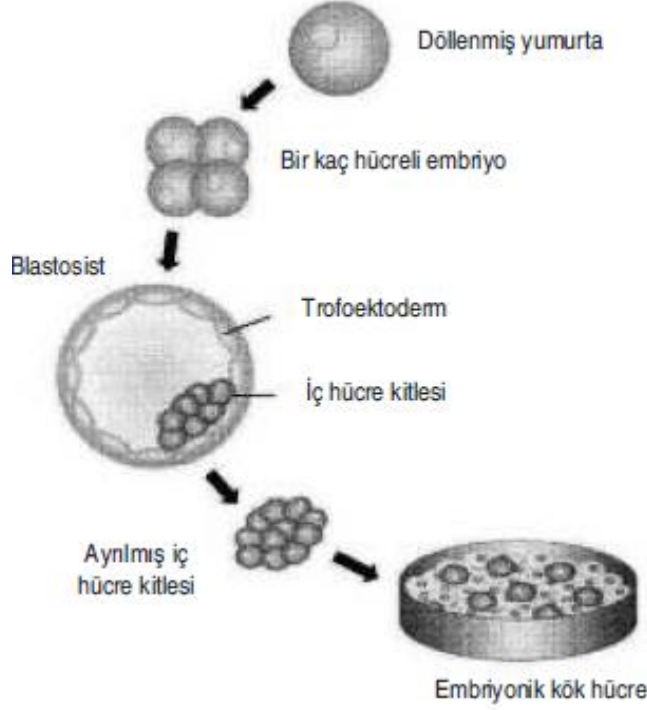
#### **4.3.2- Elde Edildikleri Kaynağa Göre Kök Hücre Sınıflaması**

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre;

1-Embriyonik kök hücreler

2-Embriyonik olmayan kök hücreler: Föetal kök hücreler, erişkin kök hücreler, kadavradan elde edilen kök hücreler

### Embriyonik kök hücreler;



Şekil 12: Embriyonik Kök Hücre Eldesi (84)

Pluripotent özelliğe sahip kök hücrelerdir. Pluripotent özelliğe sahip diğer hücreler embriyonik karsinoma ve embriyonik germ hücreleridir.(85) İn vitro kültür ortamlarında farklılaşmadan çoğalabildikleri gibi uygun biyolojik sinyal altında farklı hücre gruplarına farklılaşmaları sağlanabilir. (81) Embriyonik kök hücrelerde artmış telomer aktivitesi görülür. 'Telomer' ökaryotik hücrelerin kromozom yapısında bulunan ve tekrarlayan TTAGGG dizisinden oluşan, spesifik bir gen bölgesidir. Telomerin görevi kromozom replikasyonunu güçlendirmek ve degradasyonunu önleyerek hücreye proliferasyon yeteneği kazandırmaktır. Embriyonik kök hücrelerde ayrıca hücrelere bölünme yeteneği kazandıran, transkripsiyon faktör olarak görev yapan *Oct-4* geni ekspresyonu saptanmıştır. *Oct-4* geni farklılaşmış hücrelerde aktif değildir. (86, 87)

İlk fare embriyonik kök hücreleri 1981 yılında birbirinden bağımsız iki çalışma olan Evans ile Kaufman ve Martin ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Fare embriyonik kök hücreleri dört günlük fare embriyosu blastokistinin epiblast tabakasından elde edilir. Fare embriyonik kök hücreleri tek hücre elde edilmesi için tripsin ile ayrıştırılır ve fare embriyonik fibroblastlarının olduğu ortama inkübe edilir, 2-3 günde bir pasajlanır. Fare embriyonik kök hücrelerinin morfolojisinde çekirdek sitoplazma oranı fazla ve çekirdekçik boyutları belirgindir, bu özellikleri ile kolayca altındaki fibroblastlardan ayrılırlar.( 81,88)

İnsan embriyonik kök hücreleri ise 1998'de Thompson tarafından gösterilmiştir. İnfertilite tedavisi gören çiftlerin bağışladıkları artan blastokistlerden insan embriyonik kök hücresi elde etmişlerdir. (89) Blastokist iç hücre kitlesi, fare embriyonik fibroblastlardan oluşan besleyici tabaka üzerine yerleştirilmiştir. Beş, altı günde bir pasajlanarak küçük hücre gruplarına ayrılmıştır. İnsan embriyonik kök hücreleri daha hassas olduğu için enzimatik ayrıştırma yerine mekanik ayrıştırma tercih edilir .(90,91)

Embriyonik kök hücreleri istenilen hedef hücre ve dokularda kullanabilmek için farklılaşmayı ve proliferasyonu özgün olarak sağlamak gereklidir. Bunun için hedef hücre ya da dokuya uygun büyüme faktörleri kullanımı, genetik yaklaşımlar (hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerin ektopik transfeksiyonu ya da RNA vasıtasıyla farklılaşmanın yönlendirilmesi) ve farklı hücre serileri ve dokularla beraber kültüre edilmesi gibi yöntemler kullanılabilir.(81,88,92)



## *Embriyonik Olmayan Kök Hücreler;*

*1-Fötal Kök Hücreler;* 5-9 haftalık fetüsün primordiyal germ hücresi ve gonadal kıvrım hücrelerinin kültürlerinde elde edilmişlerdir. (Gearhart 1998) (93) Kullanımı ve üretilmesinde etik açıdan sorunlar olduğu için klinik kullanımları sınırlıdır.

## *2-Kadavra Kaynaklı Kök Hücreler*

*3-Erişkin Kök Hücreler;* Multipotent özelliğe sahip kök hücrelerdir. Organizmayı oluşturan çeşitli dokularda farklılaşmadan bulunan, kendini yenileyip bulunduğu dokunun özel hücresine diferansiye olabilen hücrelerdir. Buldukları dokunun hasar görmesi durumunda çoğalıp, diferansiye olarak hasarlı doku onarımına yardımcı olurlar. Organizmada çeşitli dokularda bulunabilirler; amniyotik kordda ( De Coppi ve arkadaşları 2007) (94), umbilikal kordda (Wang ve arkadaşları 2004)(95), merkezi sinir sisteminde (Gage 2000)(96), yağ dokuda (Zuk ve arkadaşları 2001)(97), retinada ( Tropepe ve arkadaşları 2000)(98), deride ( Toma ve arkadaşları 2001)(99) bulunabilirler. Sayısal olarak en fazla neonatal dönemde görülürken yaşla birlikte sayıları azalır bu da farklılaşmasını tamamlamış terminal dokuların yenilenme kapasitesinin yaşla birlikte azaldığının göstergesidir. Uygun sinyal aldıklarında buldukları dokunun terminal hücre tipine dönüşübildikleri gibi tamamen farklı dokulardaki hücre tiplerine de dönüşebilirler ancak erişkin kök hücrelerin plastisileri embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlıdır. (100)

### 4.3.3-Hematopoetik Kök Hücreler :

Kaynağını kemik iliğinin oluşturduğu kök hücre grubudur, mezenkimal, endotelial, hematopetik tipte kök hücreleri içerir. Friedenstein 1968 yılında kemik iliğinden aldığı hücreleri plastik kapta kültüre etmiş, kültür kabına yapışmayan hücreleri ortamdaki uzaklaştırdıktan sonra geriye kalan hücrelerin hızla çoğaldığını fark etmiştir. Koloni oluşturma özelliği gösteren bu hücrelere 'CFU-F'( Colony forming unit fibroblast) ya da 'kemik iliği stromal hücresi' adını vermiştir. Başlangıçta hematopoezi indüklemek amacıyla kullanılmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarla kemik iliği stromal hücrelerinin plastisite özelliği olduğunu ve kemik-kıkırdak-yağ doku gibi parankimal hücrelere de diferansiyasyon olabildiklerini göstermiştir. Bu sebeple bu hücrelere mezenkimal stromal hücre(MSC) ya da 'Multipotent mezenkimal stromal hücre' (MMSC) isimleri verilmiştir.(100,101,102) Önceleri sadece kemik iliğinden izole edilebilen mezenkimal kök hücreler günümüzde kas, kemik, kıkırdak, yağ doku, diş pulpası ve periodontal dokular, karaciğer, akciğer, timus, ovaryum ve testisler, amniyon sıvısı, plasenta, umbilikal kord kanından da elde edilebilirler. (83)

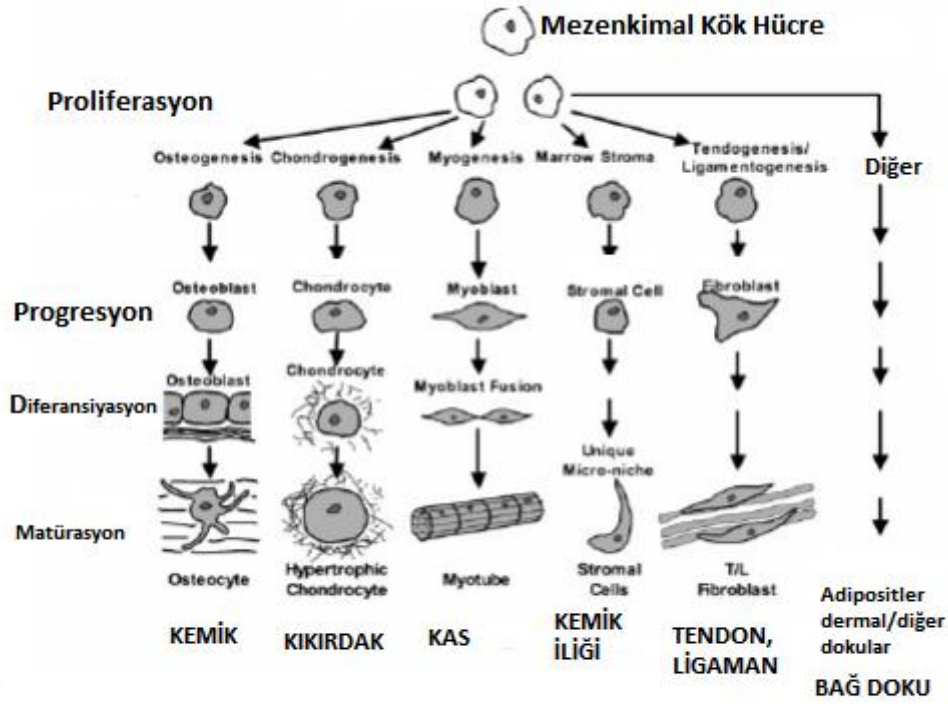
### 4.3.4- Mezenkimal Kök Hücreler:

Uluslararası Hücresel Terapi Birliği 2006 (International Society for Cellular Therapy ISCT) (103) yılında yayınladığı bildirisinde mezenkimal kaynaklı kök hücrelerin taşınması gereken özellikleri belirtmiştir. Buna göre mezenkimal kaynaklı kök hücreler;

- 1-Plastik hücre kabına yapışma özelliği göstermeli,
- 2-İn vitro kültür ortamlarında uygun diferansiyasyon sinyalleri verildiğinde osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma gösterebilmeli,
- 3-Hücrelerin yüzeyinde yer alan ve hücre sinyal yollarında rol alan farklılaşma kümeleri ( = clusters of differentiation) belirteçlerinden CD 73, CD 90, CD 105'i %95'in üzerinde ekspresyon etmeli
- 4-CD 14,CD 19, CD 34, CD 45, HLA-DR belirteçlerini %2'den az ekspresyon etmelidir.(103)

Mezenkimal kaynaklı kök hücreler intravenöz yolla organizmaya verildiklerinde ilk olarak yöneltildikleri alan kemik iliğidir ancak organizmada doku hasarı, inflamasyon olduğunda bu alanda artan integrin, selektin, kemokin gibi mediatörler mezenkimal kök hücre üzerindeki yüzey reseptörleri ile etkileşerek kök hücrelerin hasarlı dokuya yönlendirilmesinin sağlarlar.

Mezenkimal kaynaklı kök hücreler az düzeyde MHC –I ekspresyonu gösterip, MHC-II ekspresyonu göstermedikleri için antijenik aktiviteleri düşüktür. T ve B lenfosit, N<sub>K</sub> hücre aktivasyonunu baskılayıp, dendritik hücrelerin antijen sunma özelliklerini azaltırlar. Bu özellikleri ile antiinflamatuvar ve antiapoptotik mediatör salınımına yol açarak immun modülatör özellik gösterirler. VEGF (Zheng ve arkadaşları), PGE<sub>2</sub>, NO, IL- 4,6,9,10,13 mediatörlerinin salınımında artış yaparak Th -1 inhibisyonu ve Th-2 aktivasyonuna yol açarak immun baskılayıcı yanıtı neden olurlar. Bu özellikleri ile artmış immun yanıt ile karakterize hastalıklar olan greft versus host hastalığı, Crohn, romatoid artrit, multipl skleroz, sistemik lupus eritematozus gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaya çalışmaları yapılmaktadır. (104,105)



Şekil 13: Mezenkimal kök hücreler ve farklılaşma potansiyelleri (106)

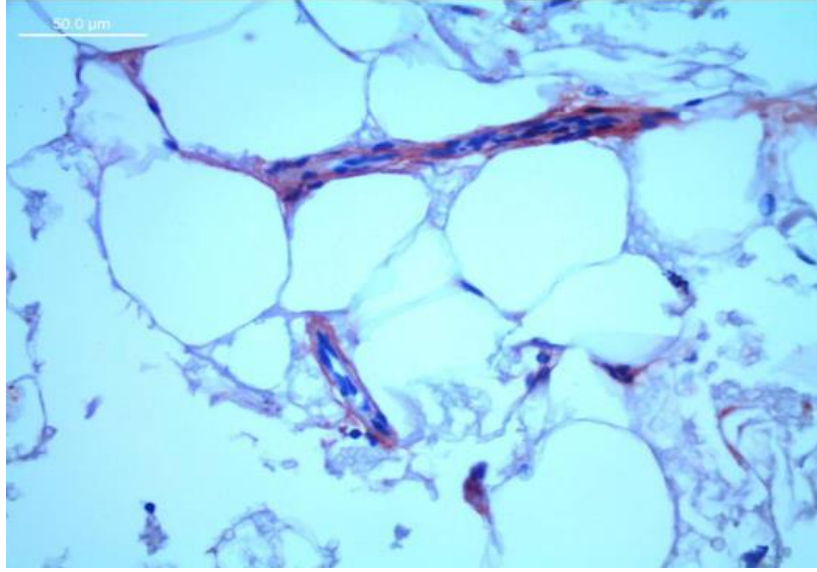
#### 4.3.5- Adipoz Doku Kökenli Kök Hücreler ( Adipose – Derived Adult Stem Cells= ADAS)

Adipoz Doku: Lipoblastlar, adipositlerden oluşan gevşek bağ doku özelliğindedir. Vücudun destek ve izolasyonunu sağlarken yağ formunda enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, termoregülasyon görevleri de vardır. İki tip yağ doku bulunmaktadır; uniloküler yağ doku(sarı yağ doku) ve multiloküler yağ doku (kahverengi yağ doku). Uniloküler yağ doku hücreleri sitoplazmalarının ortasında tek sarı yağ damlacığı içerir ve vücudun tüm bölgelerine dağılmıştır. Multiloküler yağ dokunun ise sitoplazmalarında çok yağ sayıda lipid damlacıkları vardır ve kahverengi mitokondriyumları mevcuttur. Vücut ağırlığının kadınlarda %20-

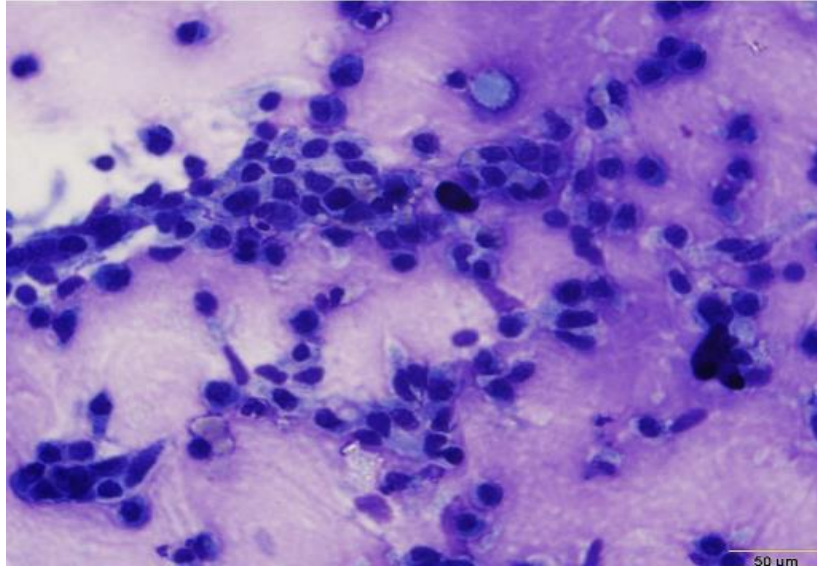
25'ini erkeklerde ise %15-20'sini oluşturur. Yağ doku da mezoderm kaynaklıdır ve stroma içerir.

Adipoz doku kökenli kök hücre elde edilmesi kemik iliğine göre daha az invaziv bir işlem gerektirir. İlk olarak 2001 yılında Zuk ve arkadaşları insan lipoaspiratında fibroblast benzeri, iğsi yapıda hücreler olduğunu ve bu hücrelerin kondrojenik, osteojenik, myojenik, adipojenik farklılaşma özellikleri olduğunu göstermişlerdir. (97,107)

Yağ dokuda matür adiposit(%16), preadiposit, postadiposit, makrofaj, retikülosit, fibroblast, vasküler endotel hücreleri(%15), mast hücreleri ve adipoz doku kökenli kök hücreler(%30) bulunur (Yoshimura ve arkadaşları). Adipoz doku kökenli kök hücreler taşıdıkları CD 73, CD 90, CD 105 gibi yüzey belirteçleri ile diğer hücrelerden ayrılırlar. Hematopoetik hücre yüzey belirteci olan CD 14, CD 45, CD 31 ADAS üzerinde bulunmaz. (108)



Şekil 14: Yağ doku üzerinde CD 73 kırmızı ile boyanmış ADAS görüntüsü (109)



Şekil 15 ; Yağ doku üzerinde CD 90 siyah- kırmızı ile boyanmış ADAS görüntüsü (109)

Tablo 3: ADAS'a ait immunfenotip belirteçleri (110)

<b>Antijen Kategorisi</b>	<b>Yüzey (+) Antijen</b>	<b>Yüzey (-) Antijen</b>
Adezyon Molekülleri	CD 9 (Tetraspan), CD 29 ( $\beta_1$ integrin), CD 49 ( $\alpha_4$ integrin), CD 54 (ICAM-1), CD 105 (Endoglin), CD 166 (ALCAM)	CD 11 ( $\alpha_b$ İntegrin), CD 18 ( $\beta_2$ İntegrin), CD 50 (ICAM -3) CD 56 (NCAM) CD 62 (E-Selektin) CD 104 ( $\alpha_4$ İntegrin)
Reseptör Molekülleri	CD 44 (Hyalüranat), CD 71 (Transferrin)	CD 16 (Fc Reseptör)
Enzimler	CD 10 (Akut Lösemi Antijeni), CD 13 (Aminopeptidaz), CD73 (5' ektonükleotidaz), Aldehit Dehidrogenaz	
Ekstrasellüler Matriks Molekülleri	CD 90 (Thy 1), CD 146 (Muc 18), Kollajen Tip 1, Kollajen tip 3, Osteopontin, Osteonektin	
Hücre İskeleti Elemanları	Vimentin , $\alpha$ - düz kas aktin	
Hematopoetik Belirteçler		CD 14, CD 45, CD 31
Kompleman Sistem Elemanları	CD 55 (Decay-accelerating factor), CD 59 (Pronektin)	
HLA	HLA - ABC	HLA - DR
Kök Hücre	CD 34, ABCG2	
Stromal	CD 29, CD 44, CD73, CD 90, CD 166	

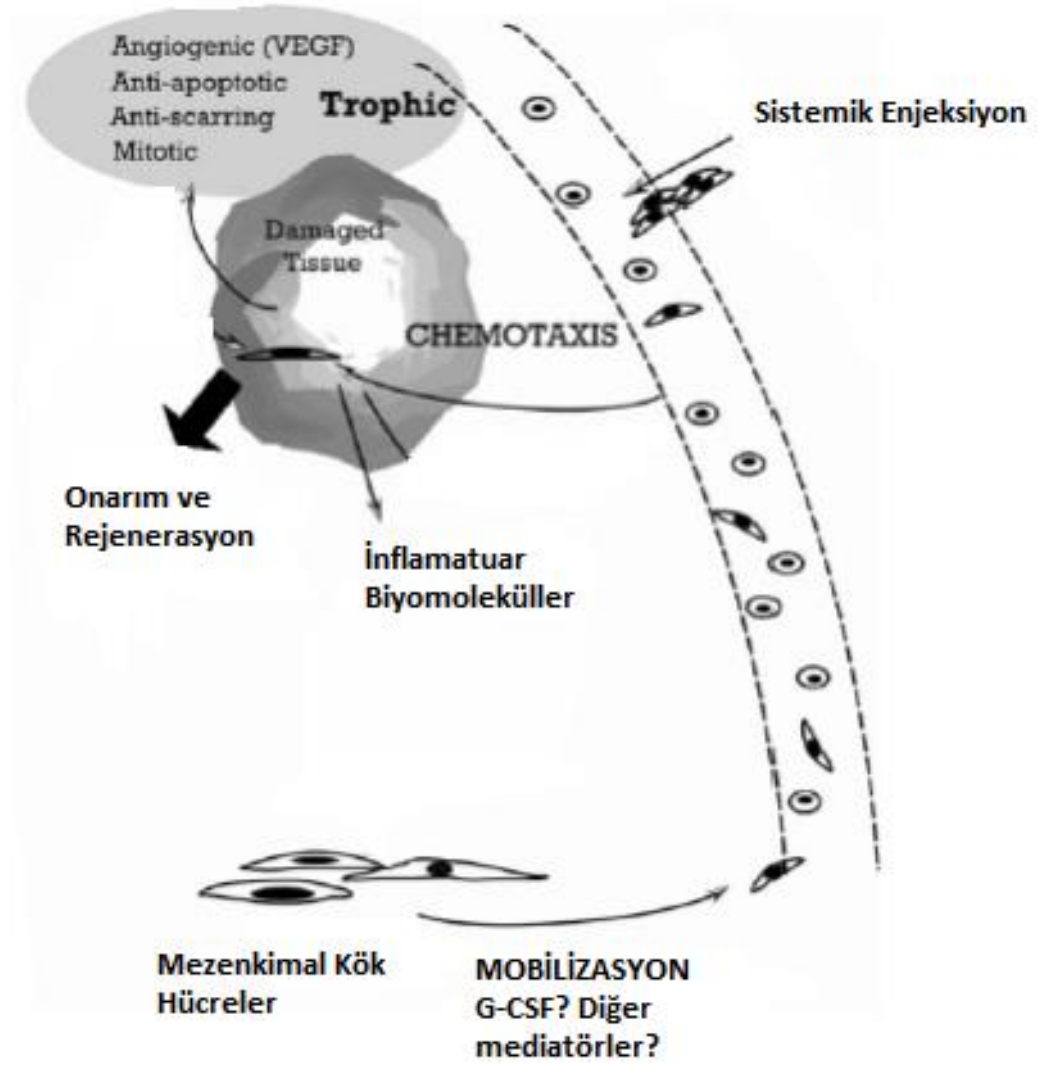
Spesifik yüzey belirteçleri ile spesifik proteinler eksprese edebilirler böylece transfer edildikleri ortamlarda uygun sinyal altında farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. (97,107,111,112). 2004 yılında Kang ve arkadaşları ADAS üzerinde uygun ortam ve biyokimyasal uyarı ile nörojenik transdiferansiyasyon olduğunu ve nöron hücrelerine dönüştüğünü göstermişlerdir. (113) Yara bölgesine uygulanan ADAS ise keratinositlere, fibroblastlara, endotel hücrelerine diferansiye olabilirler. Yara bölgesine migrasyon yapan ADAS Vasküler endotelial Growth Factor(VEGF), Hepatosit büyüme faktörü(HGF) , IGF, TGF- $\beta$ , FGF salgılayarak yara iyileşmesini hızlandırıcı etki gösterirler. (114)

Yağ doku ADAS içeriği bakımından oldukça zengindir. 1 gr yağ dokuda yaklaşık  $5 \times 10^3$  sayıda ADAS bulunabilir. (115,116) Yağ dokudan ADAS izolasyonu; yağ doku eksizyonu ya da lipoaspirat materyallerinin yıkanması ile kan hücreleri ortamdaki uzaklaştırılır. Kollajenaz ile işlem görmesi sonrası hücreler serbestleştirilir. Kollajenaz enzimi inaktive edilip, doku santrifüj edildikten sonra elde edilen ürüne 'Processed Lipoaspirate (PLA)' denir. PLA fibroblastlar, makrofajlar, endotel hücreleri, adipositler gibi heterojen hücre grupları içerir. PLA'nın seri pasajlanması sonrası ADAS hücreleri elde edilir. Transdiferasyona yönlendirilmeyen kök hücre olarak ya da uygun sinyaller altında diferansiye edilen hücreler in vivo ortama verilirler. (117)



Tablo 4: Mezenkimal kök hücrelerin salgıladıkları mediatörler ve büyüme faktörleri özeti

Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF)	<b><u>VEGF-<math>\alpha</math></u></b>
Granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)	Epidermal büyüme hormonu (EGF)
Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF)	Keratinosit büyüme hormonu (KGF)
Stem cell faktör	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)
Lökemi inhibe edici faktör (LIF)	Anjiopoetin-1
IL-6, 7, 8, 11, 12, 14, 15	
FMS benzeri tirozinkinaz-3 ligandı (FLK-3L)	



Şekil 16: İntravenöz uygulanan mezenkimal kök hücrelerin doku hasarındaki trofik etkileri (106)

#### **4.4- YARA İYİLEŞMESİ**

Canlı organizmalarda dokuların anatomik ve fonksiyonel yapılarının bozulması sonucu fizyolojik fonksiyonlarının bozulmasına 'Yara' denir. Yara oluşmasında önemli etyolojik faktörler cerrahi insizyon, fiziksel travma, yanık, donma, kimyasal ajanlar, iskemi, kemoterapötik ajanlar olarak sıralanabilir. (118)

Yara iyileşmesi ise birçok hücre ve onların ürettikleri sitokin ve mediatörlerin yer aldığı, ekstrasellüler matriks üretimi ile sonuçlanan fizyolojik ve biyokimyasal olayların bütünüdür. (119)

**Yara İyileşme Tipleri: 1- Primer yara iyileşmesi**

**2- Sekonder yara iyileşmesi**

**3-Tersiyer yara iyileşmesi**

##### **1- Primer yara iyileşmesi:**

Yara kenarlarının cerrahi yöntemler ile kapatılabildiği, epitelyel ve stromal yapıların en az hasar gördüğü, bakteriyel kontaminasyonun az olduğu yaralanma şeklidir. .

Primer yara iyileşmesinde başlıca rolü yara dudaklarına paralel yer alan keratinositler oynar. Epidermis hızla proliferer olur, insizyon hattına doğru hücre göçü görülür. 48 saat sonunda *Fibrin* tabaka oluşumu ile dış ortam teması kesilir ve dehidratasyon önlenir. Fibrin tabaka aynı zamanda bakteriyel penetrasyonu önlemede bariyer oluşturur. Üç ile beşinci günde kollajen sentezi artar, otuz günün sonunda inflamatuvar hücre içermeyen skar doku oluşur.(120,121)

## **2- Sekonder yara iyileşmesi:**

Hasar gören dokuda inflamatuvar reaksiyonun fazla olması , doku hasarının fazla görüldüğü durumlarda granülasyon dokusu artışı beklenir. Ortamda debris, bakteriyel kontaminasyon, eksuda fazla olduğu için inflamatuvar yanıt daha şiddetlidir. Epidermal rejenerasyon oranı yeterli olmadığı için granülasyon dokusu miktarı ve kontraksiyon miktarında artış vardır.

## **3-Tersiyer yara iyileşmesi**

Gecikmiş primer yara iyileşmesinde ise hasar gören doku bakteriyel yük, yabancı cisim varlığı gibi sebeplerle pansuman ile izlenir. Yara debridman ve pansumanlarla uygun hale geldikten sonra primer yara iyileşmesi yöntemleri uygulanır

### **4.4.1-Yara İyileşmesi Fazları**

- 1- Hemostaz**
- 2- İnflamasyon**
- 3- Proliferasyon**
- 4- Matürasyon**

### 6.2.1-Hemostaz :

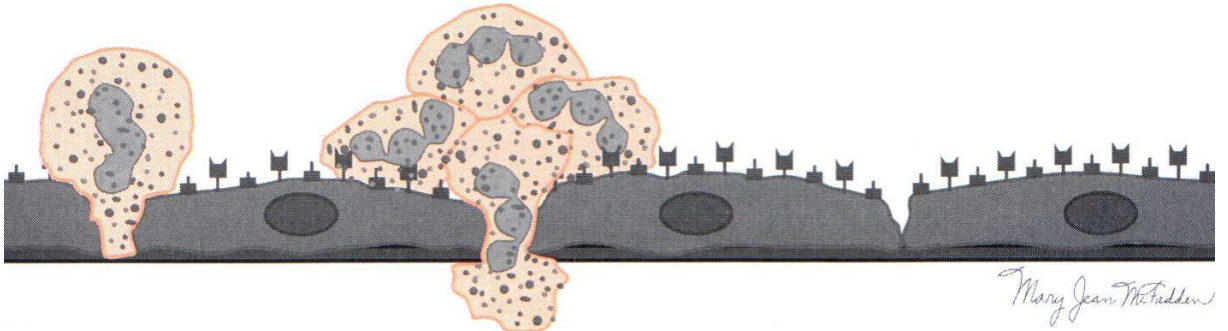
Endotel hasarı ile oluşan kanamaya verilen ilk cevaptır. Doku hasarı sonrasında beş ile on dakika içinde katekolamin salınımı sonucu oluşan vazokonstriksiyon ile bölgesel kan akımı azalır. Endotel hasarı sonucu ortaya çıkan subendotelyal kollajen, dolaşımdaki trombositlerle temas edince faktör 12(Hageman Faktör) aktive olur, koagülasyon kaskadını aktifler. Faktör 12'nin aktive olması aynı anda kompleman sistemini, kinin sistemini ve plazmin sentezini uyarır. Tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)'nin açığa çıkması ile vazokonstriksiyon ve trombosit aktivasyonu yolu ile hemostatik plak oluşur. İntrensek ve ekstrensek koagülasyon yollarının ortak aktivasyonu ile protrombinden trombin oluşur, trombin ise fibrinojeni fibrine dönüştürerek hemostatik tıkaç oluşumuna yol açar. Fibrin oluşumu ile sonuçlanan kısa süreli vazokonstriksiyon hasarlı bölgede hemostaz sağlamaya ve inflamatuvar hücre göçü için zemin hazırlanmasına yol açar. Trombositlerin alfa granüllerinden PDGF(Platelet derived growth factor), insulin benzeri growth faktör-1 (IGF-1), transforme edici growth faktör-β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibrinojen, fibronektin, platelet faktör-4, prostoglandinler, biyojenik aminler gibi birçok sitokin ve mediatör salgılayarak makrofaj ve nötrofiller için hücre göçünü başlatırlar. Hasarlı bölgeye ulaşan nötrofil ve makrofajlar nekrotik doku, debris ve bakteriyel elemanları fagosite ederek uzaklaştırılmalarını sağlar. PDGF aynı zamanda fibroblast göçünü de başlatarak aktive eder, fibroblastlarda sentezlenen glikozaminglikanlar ve kollajen ekstrasellüler matriks onarımı için gereklidir. (120,121,122,123)

### 2- İnflamasyon:

Endotel hasarından 24 saat sonra başlayan, hasara verilen hücresel ve vasküler yanıtı içeren ikinci evredir.

*Vasküler Yanıt;* geçici hemostaz sonrasında aktive olan kompleman sisteminden C3a - C5a, endotel hücrelerinden histamin, prostoglandin E<sub>2</sub>, prostosklin ve mast hücrelerinden bradikinin açığa çıkarak vazodilatasyona yol açar. Trombositlerin hasarlı endotel üzerinde bazal membrana yapışarak fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi aktive ederek araşidonik asit serbestleşmesine yol açar. Permeabilite artışı ve trombositlerden salınan PDGF ve TGF-β salınımına bağlı olarak nötrofil ve monositler hasar alanına ulaşırlar, damar duvarından interstisyel alana geçen sıvı klinik olarak şişlik olarak görülür. Şişlik nedeni ile lokal doku basıncı artışı da ağrıya sebep olur. Vazoaktif aminlerin ve histamin salınımı artışı ile hasar bölgesinde kızarıklık ve sıcaklık artışı görülür. Vazodilatasyon dönemi yaklaşık olarak 72 saat sürer. (122,124)

*Hücresel Yanıt;* vasküler permeabilite artışından sonra PDGF ve TGF-β etkisi ile hasar bölgesinde görülen ilk hücreler 'Nötrofiller'dir, 6 saat içinde yara yerinde görülürler ve 48 saate kadar baskın olan hücre tipidirler. Nötrofiller diapedez yolu ile damar duvarı dışına çıkarlar, endotel hücreleri arasından geçiş için elastaz ve kollejenaz salgırlarlar.



Şekil 17: Nötrofilin diapedez ile migrasyonu (125)

Nötrofiller yara yerinde yabancı cisimleri ve bakterileri fagosite ederek, proteaz salınımı ile hasar görmüş hücre kalıntılarını ortadan kaldırarak fonksiyon görürler. Nötrofil yüzeyindeki integrinler ile matriks bileşenleri arasında oksijen varlığında etkileşim oluşur ve sonucunda reaktif oksijen metabolitleri ortaya çıkar. Yara yerinde bakteriyel kontaminasyon ve yabancı cisim yoksa nötrofil sayısı apoptoz ile hızla azalır, tersi durumda ise inflamatuvar süreç devam eder ve yara yerinde eksüdasyona yol açarak yara iyileşmesini yavaşlatır.

Makrofajlar yara yerinde üç ile beşinci günde hakim olan hücre tipidir. Makrofajlar lenfositleri de aktive ederek yara yerine migrasyonlarını uyarırlar. Lenfosit sayısı 6. günde maksimuma ulaşır. Lenfositlerden lenfokin salınımı ile fibroblast proliferasyonu ve migrasyonu artar, endotel hücrelerden mediatör salınımı uyarır, hücre kemotaksisini hızlandırır. İnflamasyon alanında all-T-cell marker(OKT-1) taşıyan lenfositler ile sitotoksik ve supresör T lenfosit grubu birlikte görülür, birbirleri ile etkileşerek çalışmalarını sonucunda başarılı yara iyileşmesi gerçekleşebilir. Makrofajlar ise dolaşımdan dokuya geçen monositler olarak bilinir. Makrofajların hasarlı alanda hakim hale gelmesi inflamatuvar sürecin sonlanıp, proliferatif evreye geçileceğinin göstergesidir. Makrofajlar da nötrofiller gibi debris ve bakteriyel komponentleri fagositoz ile ortadan kaldırmanın yanında çeşitli mediatör ve sitokinlerin salınımı ile granülasyon dokusu oluşumu, fibroblast göçü ve proliferasyonunu, anjiyogenez ve kollajen sentezini düzenlemede önemli rol oynarlar. Makrofajlardan salınan nötral proteaz ise plazminojenden plazmin sentezini katalize eder. (124) Makrofajlardan salınan başlıca sitokin ve büyüme faktörleri; PDGF, TGF- $\alpha$ (transforming growth factor  $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , IGF-1, PAF(platlet derived growth factor), TNF- $\alpha$ (tumor nekroz faktör), FGF (fibroblast growth factor), EGF(epidermal growth factor), VEGF(vasküler endotelial growth faktör), IL-1 ve IL-6 olarak sayılabilir.

## **VEGF:**

Endotel hücrelerine özgü, glikoprotein yapıda, heparin bağlayan, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinin üyesi olan, 45 KD ağırlığında olan bir moleküldür. VEGF gen ailesi içinde VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plakental büyüme faktörü, VEGF-E ve VEGF-F olmak üzere yedi adet alt üyesi tanımlanmıştır. Anjiyogenez ile ilişkisi en fazla olan ve çalışmamızda da kullanılan VEGF-A tipidir. VEGF- A'nın sentezlenmesinde HIF-1(hipoksinin indüklediği faktör-1), EGF, TGF  $\alpha$ , TGF  $\beta$ , KGF, IGF, FGF, PDGF, NO, hipofiz hormonları, IL-1/6/8 önemli rol oynar. (126)

VEGF reseptörleri üçe ayrılır; VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3.

VEGFR-1; Endotel hücreleri, osteoblastlar, makrofajlar, mezenkimal kaynaklı kök hücreler, ve kolorektal kanseri hücrelerinde bulunur. Bulunduğu dokuya göre anjiyogenez hem indükleyici hem de inhibe edici özeliği vardır.

VEGFR-2; Endotel hücreleri, hematopoetik kök hücreler, megakaryositlerde bulunduğu gibi küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, nöroblastoma gibi malign transformasyon gösteren hücrelerde de bulunabilir.

VEGFR-3; Lenfatik ağlarda anjiyogenez etkisi vardır.



VEGF –A'nın organizmadaki görevleri;

- 1- Endotel hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu,
- 2- Monosit ve makrofajlar için kemotaktik,
- 3- Vasküler permeabilite artışı, proinflamatuvar etki,
- 4- Embriyoda vaskülogenez, erişkinde anjiogenez ve lenfanjiogenez,
- 5- Endotel hücre apoptozunun inhibisyonu,
- 6- Nöroprotektif etki olarak sayılabilir. (126,127,128)

Endotel hasarından sonraki 24-48 saat içinde fibroblast, endotel hücreleri ve trombositlerden '*Fibronektin*' üretilir. Fibronektin; fibrin, heparin, proteoglikanlar arasında bağlantı sağlar, kemotaksisi düzenler ve yara debritlemanına katkıda bulunur, fibroblastlar ve makrofajlar için opsonik özelliğe sahiptir, kollajen depolanmasında görev alır. Akut inflamasyon süreci olan ilk 24 saatte yara kenarlarında fibroblastlar görülmeye başlar ve sayıları 3-5. günde en yüksek seviyeye ulaşır. Fibroblastlar tarafından sentezlenen glikozaminglikanlar, kollajen sentezi ve ilerleyen aşamalarda kollajen liflerinin matürasyonu için gereklidir. İnflamasyon evresinde yara gerilim direncinden glikozaminglikanlar ve diğer ekstrasellüler matriks elemanları sorumludur. (125)

### **3- Proliferasyon:**

Doku hasarının üç ile dördüncü gününde başlayıp, yaklaşık üç hafta süren fibroblast hücre tipinin hakim olduğu evredir. 72. saatte makrofajlardan salınan PDGF ve TGF- $\beta$  etkisi ile fibroblastlarda kemotaksis başlar, aktive olan fibroblastlarda proliferasyon görülür. Fibroblastlar hasarlı alana geldiklerinde glikozaminglikan ve kollajen üretimine başlar. (123)

## TGF-β:

Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofaj ile birlikte birçok doku ve hücrede sentezlenen TGF-β'nin hedef hücreler üzerinde proliferasyon, diferansiyasyon, adhezyon, morfogenetik etkileşim, ekstrasellüler matriksi oluşumu gibi etkilerinin olmasının yanında tüm bunlara zıt olarak programlı hücre ölümü ve anti inflamatuvar etki gösterme gibi özellikleri de vardır. Tümoral dokularda ise onkogenik özellikler göstererek anormal proliferasyon, metaplazi ve aplaziye de neden olduğu bilinmektedir.(129)

TGF-β; 25 kd'luk, iki eş protein dimerin sülfid köprüsü ile bağlandığı bağlandığı moleküldür. Hücrede pre-pro-peptid şeklinde sentezlenir ve bu şekilde inaktif olarak hücre dışına salınır. Serin proteazlar etkisi ile N-Terminal dalının uzaklaştırılması ile aktif hale dönüşür. Hedef hücre membranında bulunan TGF-βR1 ve TGF-βR2 isimli reseptörleri ile bağlanarak etkisini başlatır. TGF-βR1 ve TGF-βR2 reseptörleri serin/treonin kinaz özelliğine sahiptirler ve bu etki ile serin-glisin bölgelerini fosforillerler, protein-reseptör kompleksi sitozolde bulunan SMAD proteinlerini fosforiller. SMAD proteinleri nükleus zarından geçerek DNA üzerinde 5'-AGAC-3' bölgesini tanıyarak bağlanır. RSmad/Smad<sub>4</sub> kompleksi birçok genin promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyon üzerine etki ederler.(130,131)

TGF-β; epitelyal ve hematopoetik hücrelerde hücre siklusunun G<sub>0</sub> fazında durmasını sağlayarak antiproliferatif etki gösterir. Prolifereasyonun baskılaması ve diferansiyasyonu hızlandırıcı etkisi siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini aktifleyerek gerçekleşir. Yara iyileşmesi üzerinde ise endotel hücreleri ve makrofajlar üzerinde kemotaksisi ve proliferasyonu artırırken, Th-1 ve Th-2, sitotoksik T lenfositleri baskılayarak immunsupresif ve antinflamatuvar etki gösterir. Kollajen sentezinin bilinen en güçlü uyarıcısı olan TGF-β, yara iyileşmesinin matürasyon fazında en önemli mediatördür, antinflamatuvar ve preapoptotik etki ile hücre çoğalmasını azaltarak, ekstrasellüler matriks üretimini artırarak skar formasyonu oluşumuna yol açar.(130,132)

### Proliferasyon evresinde epidermiste olan değişiklikler:

Yaralanma sonrasında epidermiste reepitelizasyon ile tam kat dermis oluşturulmaya çalışılmaktadır. Bazal tabakada bulunan keratinositler ilk 24 saatte yara kenarında hızla proliferasyon olurken küboid şekillerini kaybedip, düzleşirler. Keratinositlerin hücre içi tonofilamanları kısalır, psödopot benzeri uzantılar oluştururlar, sitoplazmalarında aktin filaman oluşumu ve hücreler arası desmozomal bağlantılarda azalma görülür. Migrasyonu sırasında keratinositlerin üzerinde bulunan integrin reseptörleri matriks proteinleri ile etkileşerek migrasyonun yönünü belirlerler. Yeni oluşan kollajen ve keratinositler arasındaki etkileşimi matriks metalloproteinazlar(MMP) belirler. MMP-1 fibriller kollajenden oluşmuş bağları bozarak keratinosit migrasyonunun devamını sağlarken MMP-9 bazal membran üzerinde laminin düzeyini azaltarak keratinositlerin bazal membrandan ayrılmasını kolaylaştırır. Tüm bu aşamalarda en etkili büyüme faktörleri EGF ile TGF- $\beta$ 'dir. Yara iyileşmesinin dokuzuncu gününden sonra bazal membran zonu oluşmaya başlar. Bazal membranda kollajen ve laminin başta olmak üzere birçok ekstrasellüler matriks proteini bulunmaktadır. Bu aşamada oluşan granülasyon dokusunun içeriğinde fibroblastlar, makrofajlar, endotel hücre migrasyonu ile oluşan kapiler ağlar, yeni sentezlenen kollajen fibrilleri bulunmaktadır. Granülasyon dokusu matür skar dokusu oluşana kadar hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna kılavuzluk eder.(133)

### Proliferasyon evresinde dermiste olan değişiklikler:

Fibroblastlarca düzenlenen fibroplazi ve anjiogenez safhalarından oluşur. Bu sahada oluşan granülasyon dokusu kollajen, hyaluronik asit, fibronektin, makrofajlar ve fibroblastları içerir. Geçici ekstrasellüler matriksi oluşturan fibrin pıhtı hyaluronik asit ve fibronektinden zengindir ve granülasyon dokusu için geçici iskelet dokuyu oluşturarak migrasyon ve anjiogeneze yol gösterici rol oynar. Fibronektin fibroblastların ekstrasellüler matrikse bağlanmalarını sağlar, hücre migrasyonunu indükler ve yara kontraksiyonunu belirleyici rol oynar. Fibroblastlar migrasyon ve proliferasyon esnasında aynı zamanda kollajen ve elastin gibi proteinlerin sentezini de arttırarak myofibroblastlara dönüşürler, erken dönemde yara kontraksiyonundan myofibroblastlar sorumludur. Erken dönemde oluşan kontraksiyon ile çevresel olarak yara alanının azaltılması amaçlanır.(134)Yedinci günden sonra matriks metalloproteinazların etkisi ile granülasyon dokusu rezolüsyonu başlar ve myofibroblastlar apoptoz ile ortamdan uzaklaştırılır. TGF- $\beta$ , IGF, PDGF, FGF etkisi ile fibroblastlarda yara iyileşmesi için gerekli olan Glikozaminglikanlar ve Kollajen üretilir.

### Proteoglikanlar :

Hyaluronik aside nonkovalent olarak protein bağlanması ve her proteine de kondroitin sülfat, heparan sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat gibi daha kısa glikozaminglikan bağlanması ile oluşan ekstrasellüler matriks elemanlarıdır. Kollajen ve elastin gibi fibröz proteinler ile bağlanarak dayanıklılık ve elastikiyeti sağlarlar. Fibroblast ve diğer mezenkimal hücreler kollajen, glikozaminglikan ve proteoglikan sentezinde rol alarak devamlılığı sağlarlar. (135)

## Kollajen sentezi:

18 adet gen ürünü ile sentezi düzenlenen, üç adet polipeptit zincirin oluşturduğu, helikal yapıda, bağ dokunun en önemli makromoleküldür. Amino asit dizisi tripeptit şeklindedir, yapısındaki amino asitlerden %35'i glisin, %15'i prolin ve hidroksiprolin, %11'i alaninden oluşur. Yapısında bulunan prolin ve hidroksiprolin polipeptit omurganın dönüşünü sınırladığı için kollajenin stabilitesinden sorumludur. Fibroblastlar üzerine etkili büyüme faktörleri ve sitokinlerce sentezi düzenlenir. Uygun sinyalle birlikte gen transkripsiyonu sonucu endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlarda preprokollajen sentezlenir. mRNA ile endoplazmik retikuluma taşınan preprokollajenin N-terminal dalı veziküller arasında ayrılır ve prokollajen oluşur. Endoplazmik retikulum vezikülleri içinde posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve prolin ve lizin kalıntılarının üzerine hidroksil grupları eklenerek hidroksiprolin ve hidroksilizin haline dönüşür. Bu reaksiyonda görevli lizin hidroksilaz ve prolin hidroksilaz enzimlerinin çalışması için ortamda  $\alpha$ -ketoglutarat, oksijen, demir ve askorbik asit gereklidir. Hidroksilizin ve hidroksiprolin yapılarına galaktozil transferaz ve glikozil transferaz enzimleri etkisi ile UDP –galaktozil ve UDP-glikozilden alınan glikoz veya galaktoz eklenir. Hidroksillenmesi ve glikozillenmesi tamamlanmış olan prokollajen molekülü golgi kompleksi aracılığıyla hücre dışına salınır. Prokollajenin N-terminal peptidi prokollajen aminopeptidaz enzimi ile, C-terminal ucundaki aminopeptidi prokollajen karboksipeptidaz enzimi ile ayrılır ve tropokollajen oluşur. Tropokollajende çapraz bağ oluşumu ise bakır içeren lizil oksidaz enzimi ile olur. Tropokollajenin amino ve karboksi terminallerine peptit dizileri bağlanarak kollajen filamentlerini daha sonra kollajen fibrillerini oluştururlar. (136) Yara iyileşmesinde ikinci haftada kollajen sentezi hızlanır, ikinci ve üçüncü haftalarda en yüksek düzeydedir, üçüncü haftadan sonra kollajen sentez ve yıkımı dengede iken dördüncü haftadan sonra kollajen sentezi azalır. Yaralanmadan sonraki ilk saatlerde tip 4 ve tip 5 kollajen miktarı fazladır, 24 saatte tip 3 kollajen hakim hale geçer, 60. saatten sonra tip 1 kollajen miktarı fazla iken tip 3 ve tip 4 kollajen de depolanmaya devam eder. (137)

### **Tip 1 Kollajen:**

Organizmada en fazla miktarda bulunan kollajen tipi, tip 1 kollajendir. Yara iyileşmesi matürasyon fazı ile birlikte tip 3/tip 1 kollajen oranı giderek azalır. Ekstrasellüler matriksin en önemli bileşenidir. Matür yara dokusunda tip 1 kollajen miktarının artışı yara iyileşmesi morfogenezi ve fibrozisi için gereklidir. Tip 1 kollajen sentezinde TGF- $\beta$ , IL-1, TNF- $\alpha$  gibi mediatörler ile kofaktör olarak C vitamini ve demir gereklidir. (138)

Tablo 5: Kollajen tipleri ve dağılımı (125)

<b>Kollajen tipi</b>	<b>Bulunduğu doku</b>
Tip 1	Deri, tendon,faysa,ligamentler,arterler,uterus
Tip 2	Hyalin kıkırdak, kornea
Tip 3	Deri,arter, uterus
Tip 4	Bazal membran
Tip 5	Bazal membran,plasenta
Tip 6	Kas,fasya,tendon
Tip 7	Bazal membran
Tip 8	Endotel
Tip 9	Kıkırdak doku
Tip 10	Mineralize kıkırdak
Tip 11	Mineralize kıkırdak
Tip 12	Ligamentler ve perikard

#### Anjiogenez:

Yara iyileşmesinin dördüncü gününde başlar. Endotel hücrelerinin VEGF, TNF-  $\alpha$  ve FGF etkisi ile proliferasyonu sonrasında kapiller tomurculanma ile anjiogenez başlar. Endotel hücrelerinden salınan kollejenaz ve elastaz gibi proteolitik enzimler bazal membranın parçalanmasına yol açar. Endotel hücrelerinin fenotipik değişiklikleri ile perivasküler alana çıkan hücrelerde migrasyon başlar. Yeni oluşan kapillerler granülasyon dokusu boyunca ilerleyerek birbirleri ile birleşme eğilimindedirler. Endotel migrasyonu sırasında proliferasyon baskılanır. Hücre proliferasyonunun tamamlanması ile anjiogenezi indükleyen faktörler azalır ve anjiogenez tamamlanır. Yaranın metabolik aktivitesi de neovaskülarizasyon da etkilidir; oksijen miktarında azalma, pH düşüklüğü ve laktat yüksekliği gibi faktörler anjiogenezi uyarıcı rol oynar. (139,140)

#### 4-Matürasyon:

Yara iyileşmesinin sekizinci gününde başlar ve bir yıl ya da yaralanma tipine göre daha fazla sürer. Proliferasyon fazında sentezlenmeye başlanan kollajenin fibrilleri arasında kovalen bağları artarak daha stabil bir form kazanır. Fibroblastlardan salınan lizil oksidaz enzimi kollajen fibrilleri arasında kovalen bağlar oluşturmadan sorumludur. Kollajen lifleri başlangıçta rastgele dizilim gösterirken mekanik kuvvetlerin etkisi ile organize olurlar. Matürasyon evresinde kollajen sentezi ve yıkımı denge halinde olduğu için doku kollajen miktarında artı olmaz. Matriks metalloproteinaz enzimlerinden biri olan ve yapısında çinko bulunduran 'Kollejenaz' enzimi kollajenin  $\alpha$ -heliks zincirleri arasına girerek ile kollajen yıkımına sebep olur. Tip 1 kollajen yıkımı sonucu dokuda tip 3 kollajen oranı artmaya başlar. Matriks metalloproteinazların etkisi metalloproteinaz inhibitörleri tarafından inhibe edilir, bu iki enzim grubu arasındaki denge TGF  $-\beta$ , PDGF, IL-1 ve IL-6 tarafından düzenlenir.

Yarada bulunan kollajen miktarı, çapraz bağ oluşturma oranı, sentez ve yıkım arasındaki denge yaranın gerim kuvvetini belirler. Yara gerim kuvveti 14-21. Günlerde artar ve matürasyon döneminde stabil hae geçer ancak hiçbir zaman normal doku gerim kuvvetinin %80'nini geçmez. (124,137)

Yoğun hücrel aktivitesi olan ve vaskülaritesi fazla olan yara iyileşme dokusu ilk günlerde pembe kırmızı renkte izlenirken , matürasyon dönemi boyunca daha az hücrel eleman ve vaskülarite içeren Skar dokusu ile yer değiştirir ve soluk pembe ya da beyaz renk alır. Skar dokuda inaktif şekildeki fibroblastlar iğsi hücre şeklini alır, yeni oluşan kapiller damarlarda tromboz ile birlikte apoptoz ve dejenerasyon gelişir. Hücrel metabolik aktivite azalır. Hiyaluronik asit, dermatan sülfat, keratan sülfat gibi ekstrasellüler matriks elemanlarını düzeyi normale iner. Dokuların su miktarı da aşamalı olarak azalarak normal seviyesine iner. (124,137,141)



Tablo 6: Yara İyileşmesinde Etkili Mediatorler Özeti (124,137,141)

Mediator	Kaynağı	Görevi
PDGF (Platelet derived growth factor)	Trombositler, Makrofajlar, Endotel hücreleri, Düz kas hücreleri	Fibroblast ve makrofaj proliferasyonu, Makrofaj kemotaksisi, Anjiogenez
EGF( Epidermal growth factor)	Trombositler, Plazma, Anne sütü, Tükrük ve idrar	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, Granülasyon dokusu oluşumunun uyarılması
TGF(Transforming growth factor)	Trombosit, Nötrofil, Lenfosit, Makrofaj, Birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, Kemotaksis, İndirekt anjiogenez, Diğer büyüme faktörlerinin etkilerine yardım
IL-1 ve IL-2	Makrofaj, Lenfosit, Birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, Kollajenaz salınımı, Nötrofil kemotaksisi
TNF (Tumor necrosis factor)	Makrofaj, Mast hücresi, T lenfositler	Fibroblast proliferasyonu
LDGF(Leucocyte derived growth factor)	Makrofaj, Mast hücresi, T lenfositler	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
FGF(Fibroblast growth factor)	Beyin, Pitüiter bez, Makrofaj diğer doku ve hücreler	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, matris depolanmasını uyarır, Anjiogenez, Yara kontraksiyonu
KGF(Keratinocyte growth factor)	Fibroblastlar	Epitel hücre proliferasyonu
IGF(Insuline like growth factor)	Fibroblastlar, Karaciğer hücreleri, Plazma	Sülfatlı proteoglikanlar, Kollajen sentezi, Fibroblast proliferasyonu
HGH(Human growth hormon)	Pituituer bez, Plazma	Anabolizan etkiler, IGF-1 sentezini uyarır
INF'ler(Interferonlar)	Fibroblastlar, Lenfositler	Fibroblast proliferasyonu, Kollajen sentezi inhibisyonu

#### 4.4.2- Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Tablo 7: Yara iyileşmesini etkileyen faktörler (141)

<b>Lokal Faktörler</b>	<b>Sistemik Faktörler</b>
Enfeksiyon	<u>Yaş</u>
Yabancı cisim	<u>Kalori alımı artışı</u>
Hematom ya da Seroma varlığı	Metabolik hastalıklar(Anemi, böbrek yetmezliği)
İskemi	Kardiyovasküler hastalıklar
Artmış doku basıncı, Ödem	Sigara
Mekanik Stres	Steroid ve kemoterapötik ilaç kullanımı
	Endokrin hastalıklar (Diyabet,hipotiroidizm)
	İyonize radyasyon
	Sepsis
	Bağ doku hastalıkları(Ehler-Danlos, Marfan Sendr....)

## **5- GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra çalışmanın yürütülmesi amacıyla Dokuz Eylül Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'nden destek alındı. (BAP talep numarası: 2013.KB.SAG.061)

Çalışma 51 adet 230-280 g ağırlığında Sprague Dawley suşu ratlar üzerinde yapıldı. DÜETF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanan hayvanlar yine aynı laboratuvarda 'DEÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları' doğrultusunda bakım işlemleri gerçekleştirildi.

### **5.1- ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI BÖLÜMLER**

DEÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı: Tüm cerrahi işlemler steril koşullar altında D.E.Ü.T.F Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Ratlar standart yem ve su ile beslenmiş, kafeslerde üçerli gruplar halinde tutulmuşlardır. İntraperitoneal D-Galaktoz uygulaması sonrasında ve cerrahi işlemler sonrasında ratların bakımında ve beslenmesinde sorun gözlenmemiştir. Cerrahi sonrasında yedi gün boyunca ratların insizyon hattı enfeksiyon, hiperemi, insizyon hattında seperayon açısından günlük pansumanlarla izlenmiştir.

İYTE(İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü) Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü: Kök hücre elde edilmesi, kök hücrelerin kültüre edilmesi ve işaretleyicilerinin gösterilmesi İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

DEÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı: Materyallerin histomorfolojik ve immunhistokimyasal incelemeleri DEÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

DEÜTF Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Merkez Laboratuvarı: Ratların 12 saatlik idrarlarında kreatinin ölçümü DEÜTF Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. 12 saatlik rat idrarında LC-MS/MS yöntemi ile 8-OH-d-Guanin ölçümü ve oksidatif hasar belirlenmesi DEÜTF Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır.

## 5.2- CERRAHİ İŞLEMLER

### Yağ grefti alınması:

Üç adet rata 50mg/kg Ketalar(Ketamin) + 10 mr/kg Ksilazol (Ksilazin) intraperitoneal olarak verilerek anestezi sağlandı.

Her bir rat sırt üstü yatırılarak dört ekstremitesi flaster yardımı ile traksiyona alındı.

Karın ve inguinal bölgeleri tıraşlandı.

Cerrahi alan isosol antiseptik çözelti (Baticon®) ile yıkandı ve temizlendi.

Cerrahi alan üzerinde rektus abdominis kası bulundu ve kas laterale paralel olacak şekilde yaklaşık 2,5 cm insizyon yapıldı.

İnsizyon altından görülen inguinal pannikulus dokusu rektus fasyası üzerinden her yönden diseke edilerek serbestleştirildi. İnferiorda femoral arter-ven-sinir distali görülene kadar künt olarak diseke edildi.

Inguinal pannikulus dokusu ve yağ dokuyu içeren flep kranialden kaudale doğru eleve edildi, kesildi.

Yağ ve pannikulus dokusunu içeren doku %0,9 NaCl (sodyum klorür) içerisine koyuldu.

Cerrahi işlem her ratta bilateral olarak yapıldı.

Üç rat cerrahi sonrası yüksek doz Ketalar(Ketamin®) ve Ksilazol (Ksilazin®) uygulaması ile sakrifiye edildi.

### **Deney Grupları:**

Çalışmada 51 adet 230-280 g ağırlığında Sprague Dawley suşu rat kullanıldı. Ratların 3 tanesi yağ grefti donorü kullanıldı ve sakrifiye edildi. 48 adet rat dört gruba ayrıldı.

### **GRUP I:**

6 Hafta süre ile bu gruptaki 12 adet Sprague Dawley suşu rata intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün D-Galaktoz uygulaması yapıldı. Bu çalışmada Yanar ve arkadaşlarının ile Anand ve arkadaşlarının yaşlılık oluşturma modeli temel örnek olarak alındı. (4,5)

Üç rattan alınmış yağ ve pannikulus dokusundan erişkin pluripotent kök hücreler elde edildi. Elde edilen erişkin kök hücrelerin yüzey belirteçleri işaretlendi ve bu hücreler akım sitometrisinde (FACS) sayılarak kök hücre oldukları doğrulandı, sırt insizyon yarası iyileşme hattında histolojik olarak takiplerinin yapılabilmesi amacıyla yeşil floresan (GFP) ile işaretlendi.

6 haftalık intraperitoneal D-Galaktoz uygulaması sonrasında ratların dorsal derisinde 6 cmlik insizyon hattı oluşturuldu ve bu alana 1 ml %0,9 NaCl solüsyonu içinde  $1 \times 10^6$  adet ADAS hücre enjekte edildi, branül içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml hava enjekte edilerek branül çekilmiştir. Grup I<sub>a</sub> olarak isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 14. günde, Grup I<sub>b</sub> isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 28. Günde sakrifiye edildi.

## **GRUP II:**

6 Hafta süre ile bu gruptaki 12 adet Sprague Dawley suşu rata intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün D-Galaktoz uygulaması yapıldı. (Yanar ve arkadaşları ile Anand ve arkadaşları)

6 haftalık intraperitoneal D-Galaktoz uygulaması sonrasında ratların dorsal derisinde 6 cmlik insizyon hattı oluşturuldu ve bu alana 1 ml %0,9 NaCl enjekte edildi, branül içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml hava enjekte edilerek branül çekilmiştir. Grup II<sub>a</sub> olarak isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 14. günde, Grup II<sub>b</sub> isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 28. Günde sakrifiye edildi.

## **GRUP III:**

6 Hafta süre ile bu gruptaki 12 adet Sprague Dawley suşu rata intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün %0,9 NaCl uygulaması yapıldı.

6 haftalık intraperitoneal %0,9 NaCl uygulaması sonrasında ratların dorsal derisinde 6 cmlik insizyon hattı oluşturuldu ve bu alana 1 ml %0,9 NaCl solüsyonu içinde  $1 \times 10^6$  adet ADAS hücre enjekte edildi, branül içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml hava enjekte edilerek branül çekilmiştir. Grup III<sub>a</sub> olarak isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 14. günde, Grup III<sub>b</sub> isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 28. Günde sakrifiye edildi.

#### GRUP IV:

6 Hafta süre ile bu gruptaki 12 adet Sprague Dawley suşu rata intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün %0,9 NaCl uygulaması yapıldı.

6 haftalık intraperitoneal %0,9 NaCl uygulaması sonrasında ratların dorsal derisinde 6 cmlik insizyon hattı oluşturuldu ve bu alana 1 ml %0,9 NaCl enjekte edildi, branül içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml hava enjekte edilerek branül çekilmiştir. Grup II<sub>a</sub> olarak isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 14. günde, Grup II<sub>b</sub> isimlendirilen 6 rat cerrahiden sonra 28. Günde sakrifiye edildi.

Tablo 8: Deney grupları ve yapılan işlemler

Grup Numarası	Intraperitoneal Uygulama	Sırt İnsizyon Hattına Uygulama	Sakrifikasyon Zamanı
I <sub>a</sub>	D-Galaktoz	1X10 <sup>6</sup> ADAS Hücre	14. gün
I <sub>b</sub>	D-Galaktoz	1X10 <sup>6</sup> ADAS Hücre	28. gün
II <sub>a</sub>	D-Galaktoz	1ml %0,9 NaCl	14. gün
II <sub>b</sub>	D-Galaktoz	1ml %0,9 NaCl	28.gün
III <sub>a</sub>	%0,9 NaCl	1X10 <sup>6</sup> ADAS Hücre	14. gün
III <sub>b</sub>	%0,9 NaCl	1X10 <sup>6</sup> ADAS Hücre	28.gün
IV <sub>a</sub>	%0,9 NaCl	1ml %0,9 NaCl	14.gün
IV <sub>b</sub>	%0,9 NaCl	1ml %0,9 NaCl	28.gün

## Yağ Dokudan ADAS Hücre Elde Edilmesi

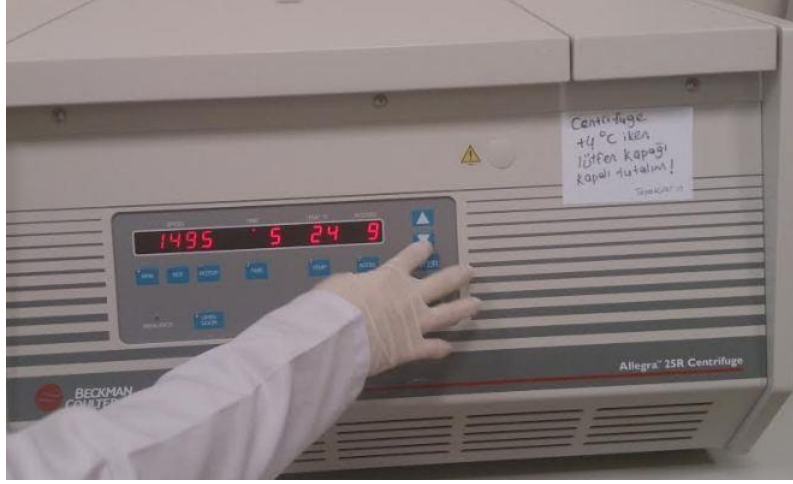
DEÜ Deney Hayvanları Laboratuvarında 3 adet ratın inguinal bölgesinden alınan ve ağzı kapaklı steril kaba yerleştirilen, steril %0,9 NaCl ile yıkanmış yağ dokusu bir saat içerisinde soğuk zincir kurallarına ve organ nakil yönteminine uygun olarak İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarına ulaştırıldı.

### Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yağ Dokusundan Elde Edilmesi:

Steril koşullarda alınan fare yağ dokusu, ilk olarak bir petri kap içerisine alındı. 5 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) ile yıkandı. Dokular yıkandıktan sonra diğer petri kabına alınarak burada da 5 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) ile iyice yıkandı. Bu arada %0,075'lik kollajenaz tip I 50 ml PBS içerisinde çözülerek 10 dakika boyunca 37°C çalkalamalı su banyosunda bekletilerek aktive edildi. Yağ dokularının yıkanmasından sonra dokuda kanlı bölgeler varsa bunlar küçük parçalar halinde kesilip atıldı. Ardından doku makasla kıyılarak küçük parçalar elde edildi ve bunların üzerine 10 ml kollajenaz tip I ilave edilerek kıyılma işlemine devam edildi. Küçük parçalar haline getirilmiş olan yağ dokusu 50 ml'lik tüp içerisine alınarak üzerine 15 ml daha kollajenaz ilave edildi ve 1 dakika boyunca çalkalandı. Ardından, 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 90-120 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sırasında her 15 dakikada bir örnekler çalkalandı. İnkübasyon süresinin sonunda homojenize olan örneklerin üzerine 15 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) eklenerek 600g'de 10 dk boyunca santrifüjlendi.(Resim 1-2) Santrifüj sonunda tüpün üst kısmında biriken yağ tabakası atıldı ve tekrar üzerine 15 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) eklendi ve 600g'de 10 dk tekrar santrifüjlendi. Santrifüj sonunda supernatant çok dikkatli bir biçimde çekilerek atıldı ve üzerine tekrar 15 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) eklenerek 600g'de 10 dk santrifüjlendi. Supernatant tekrar dikkatli bir biçimde çekilerek atıldı ve kök hücrelerin bulunduğu pellet, 15ml %15 FBS + %1 Penisillin/Streptomisin + 2 mM L-Glutamin içeren DMEM besiyeri içerisine çözüldü ve flasklara ekim yapıldı(Resim 3 ve 4). Ekimden 24 saat sonra flask içindeki besiyeri, hücrelere zarar vermeyecek şekilde pipetle çekildi ve



yerine taze besiyeri koyularak dokudan gelen istenmeyen maddelerden arındırıldı. Kök hücreler konfluent olma durumlarına göre 4 günde bir pasajlandı.



Resim 1: Santrifüj cihazı; gerekli devir, zaman ve sıcaklık ayarı yapılması



Resim 2: Hücrelerin santrifüj edilmesi



Resim 3: Hücrelerin ekiminde ve çoğaltılmasında kullanılan besiyeri



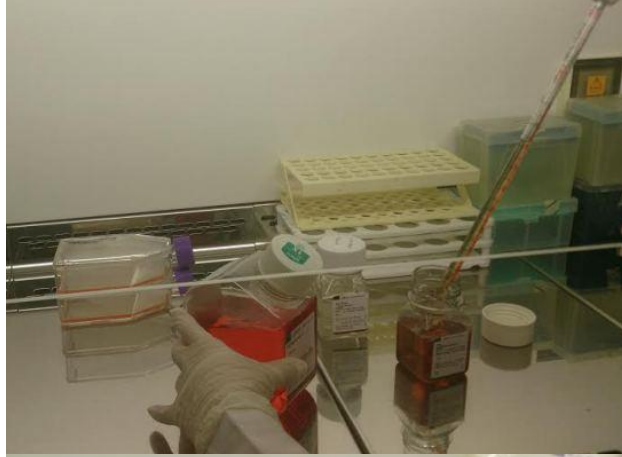
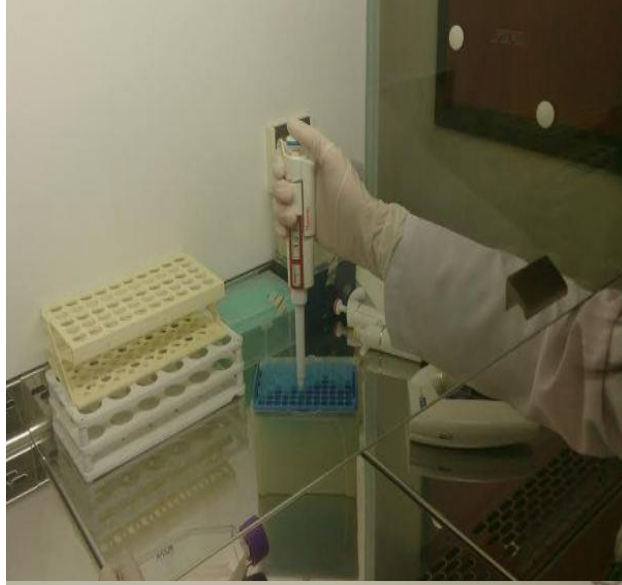
Resim 4: Hücre ekiminde kullanılan flasklar

### Kök Hücrelerin Pasajlanması:

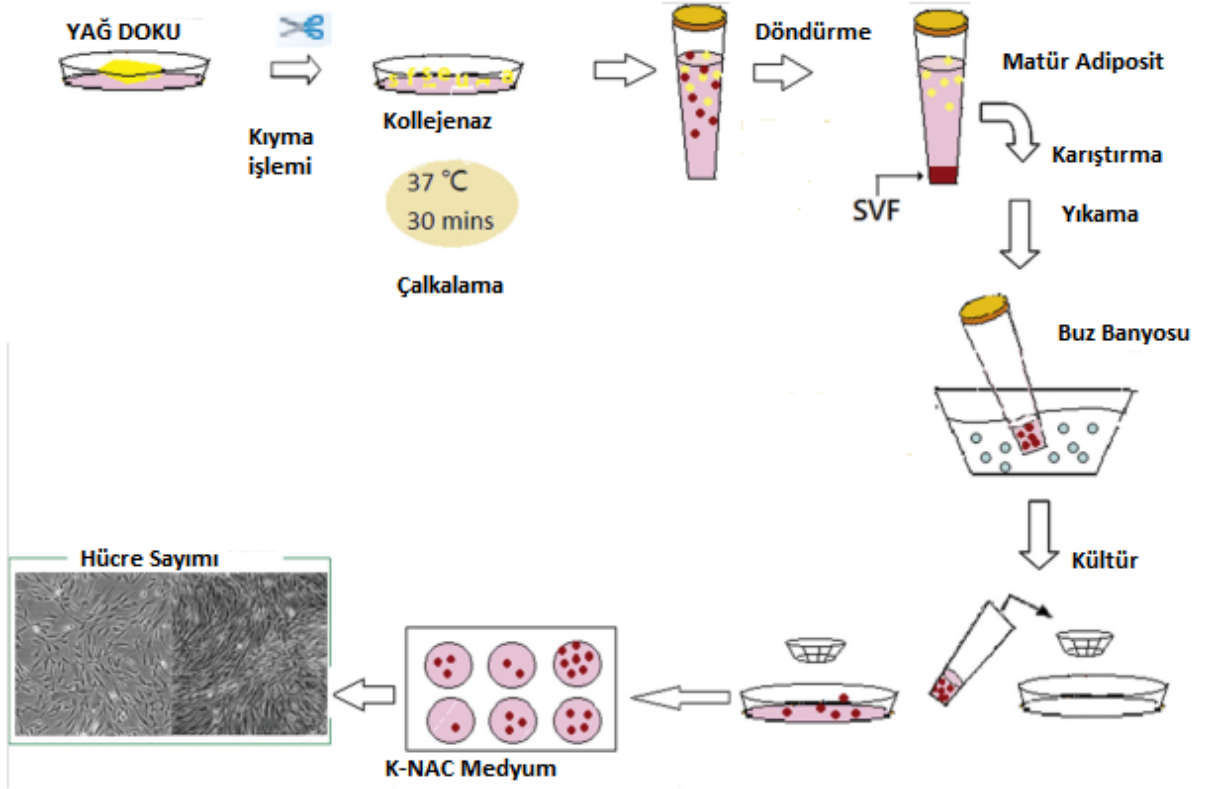
Kök hücreler flaskın yüzeyini tamamen kapladıktan sonra ya ölüme giderler ya da üst tabakaya geçerek farklılaşma eğilimine girerler. Bu nedenle, hücreler flask yüzeyini %70-80 oranında kapladıklarında pasajlama işlemi yapıldı. Pasaj işlemi öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edildi. Hücreler 5 ml PBS ile iyice yıkandıktan sonra flask yüzeyine yapışmış olan hücrelere 5 ml tripsin-EDTA eklenerek 5 dakika boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi.(Resim 5) 5 dakika sonunda yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine 5ml %15 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin + 2 mM L-Glutamin içeren DMEM besiyeri eklenerek tripsin-EDTA inaktive edildi. Daha sonra hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. (Resim 2-3) Santrifüj sonrasında supernatant atıldı ve pellet 5 ml içerisinde çözülerek içinde 10 ml taze DMEM besiyeri bulunan flaska alındı. Flasklardaki hücreler 37°C CO<sub>2</sub> inkübatörüne alınarak inkübe edildi ve 3-4 günde bir pasajlandı veya besiyeri değiştirildi. (Resim 6-7-8)



Resim 5: Inkübatörden Hücre Alınması



Resim 6-7-8: Hücrelerin Pasajlanması



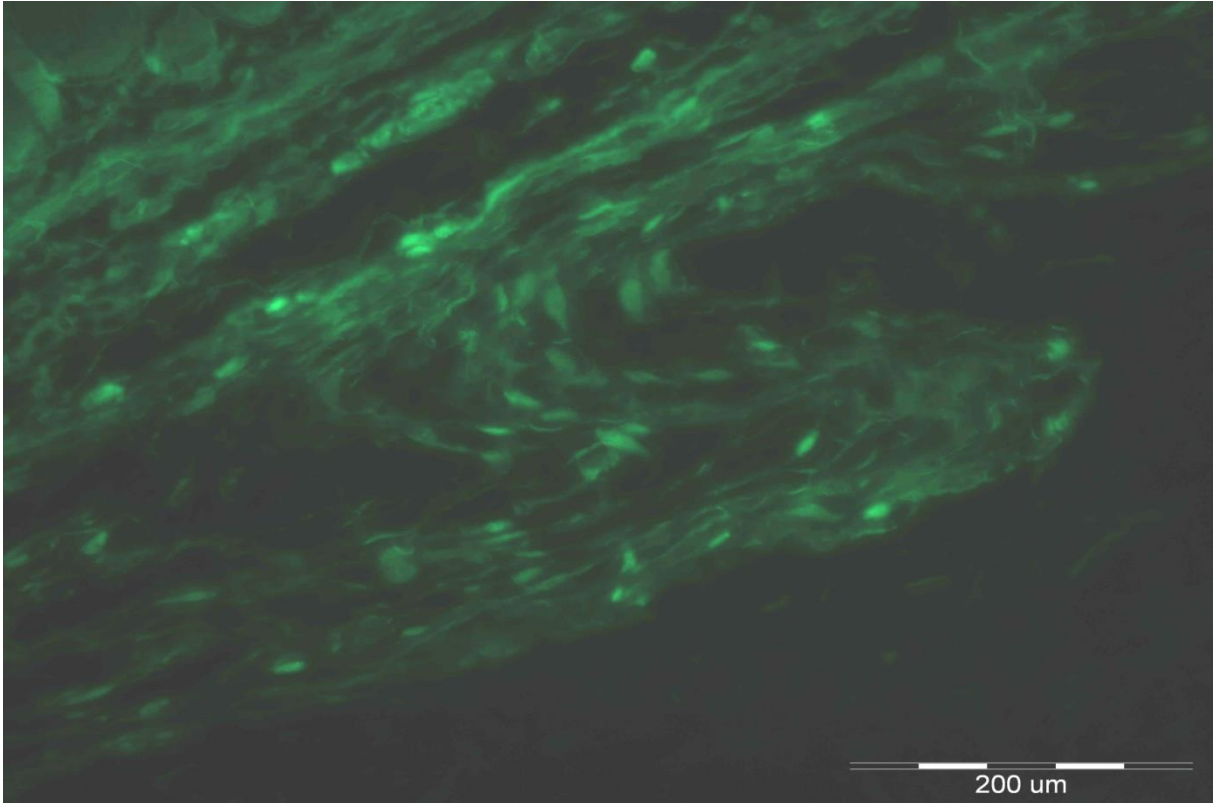
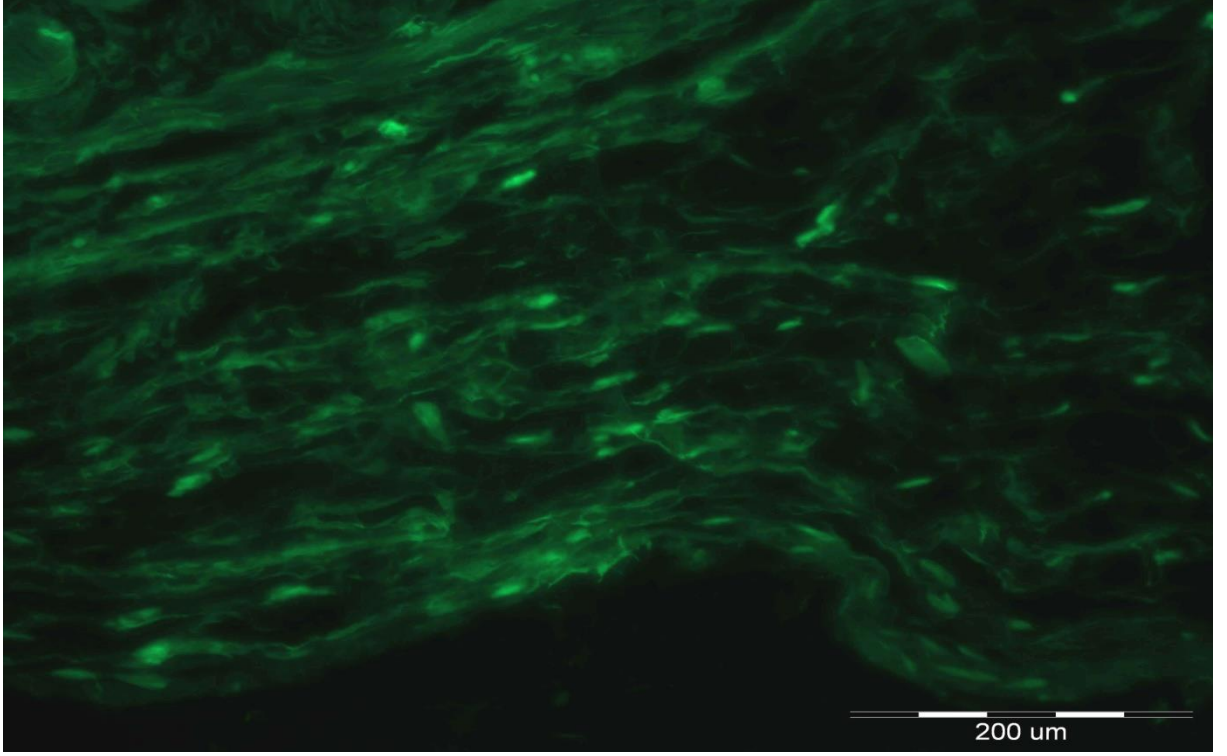
Şekil18: Mezenkimal Kök Hücre Eldesinin Şematik Görünümü (142)

### Kök Hücrelerin Yeşil Floresan Proteini (GFP) ile İşaretlenmesi:

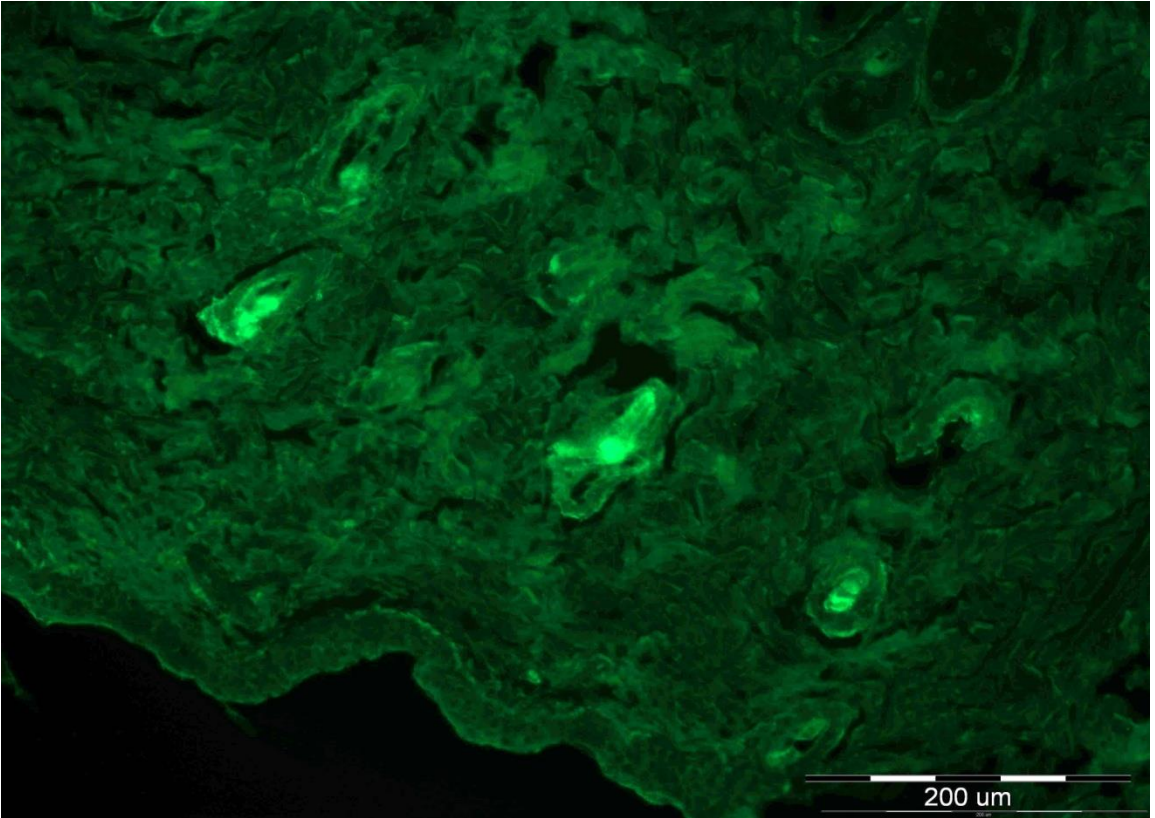
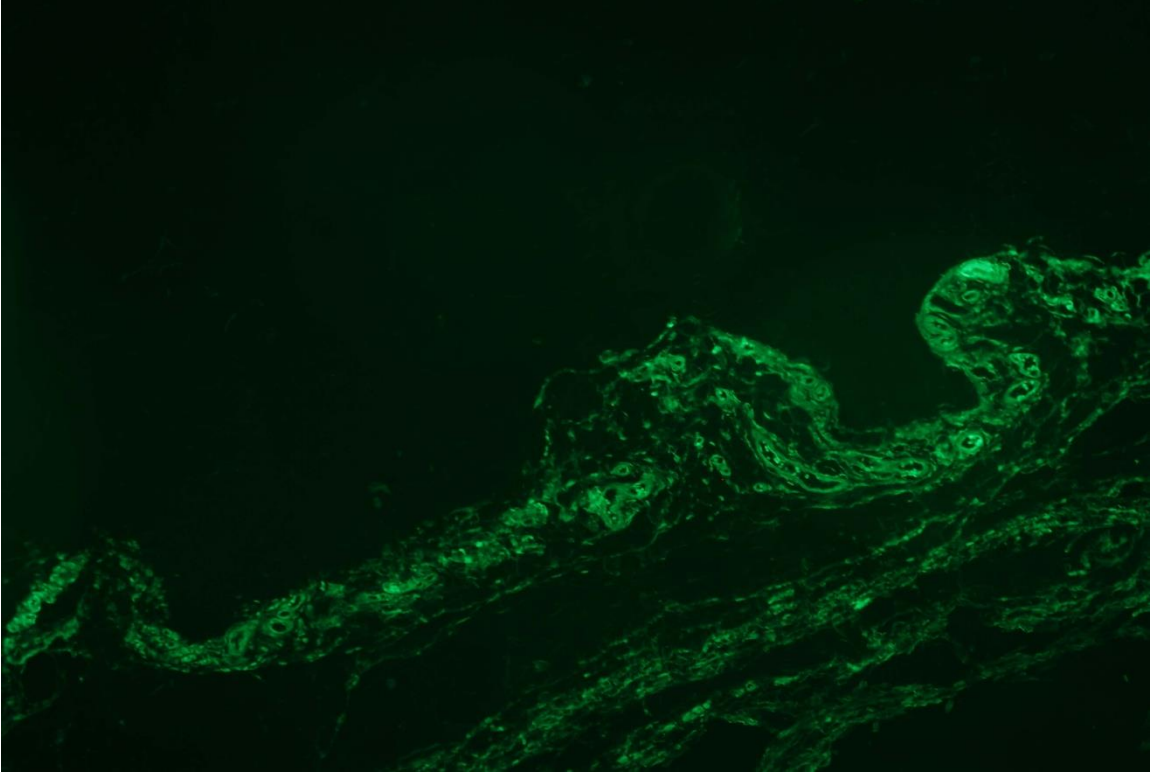
Mezenkimal kök hücreler yeterince konfluent olduktan sonra hücreleri in vivo izlemek için yeşil floresan protein içeren plazmid ile transfekte edilerek işaretlendi. MKH'ler 3. pasajdan sonra *Green Fluorescent Protein PEGFP-N2* vektör sistemi ve *Metafectene Pro transfeksiyon kiti* ile GFP içeren plazmid ile transfekte edildi.

Transfeksiyondan önce 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara 1x10<sup>6</sup> MKH ekildi. 1-2 gün sonrasında flask 5 ml PBS ile yıkandı ve yapışmayan hücreler atılarak üzerine 12 ml FBS ve Penisilin/Streptomisin içermeyen DMEM besiyeri eklendi. Bu arada, 24 kuyucuklu kabın transfekte edilecek her bir flask için iki kuyucuğuna 700'er µl PBS konuldu.

PBS içeren kuyucukların birine 6 µg plazmid DNA'sı, diğerine ise 20 µl metafectene proreaktifi konur. Daha sonra, plazmid içeren kuyucuktaki karışımın tamamı alınarak reaktif içeren kuyucuğa yavaşça konuldu ve pipetle 1 kez karıştırılarak 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi ve böylece kompleks oluşumu sağlandı. İnkübasyon sonunda bu karışım, flaskların içindeki hücrelerin üzerine damla damla verildi ve 4 saat inkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri, 15 ml %15 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin + 2 mM L-Glutamin içeren DMEM besiyeri ile değiştirildi. 72 saat sonunda GFP proteininin ekspresyonu sonucu oluşan ışımaya, immunofloresan mikroskop altında incelendi. İmmunofloresan mikroskop ile incelemede hücrelerin %80-%90 oranında GFP ile işaretlendiği görüldü.



Resim 9-10: Grup1'de dermis ve epidermiste GFP işaretli kök hücrelerin immunofloresan mikroskop ile gösterilmesi



Resim 11-12: GrupIII'de dermis ve epidermiste GFP işaretli kök hücrelerin immunofloresan mikroskop ile gösterilmesi



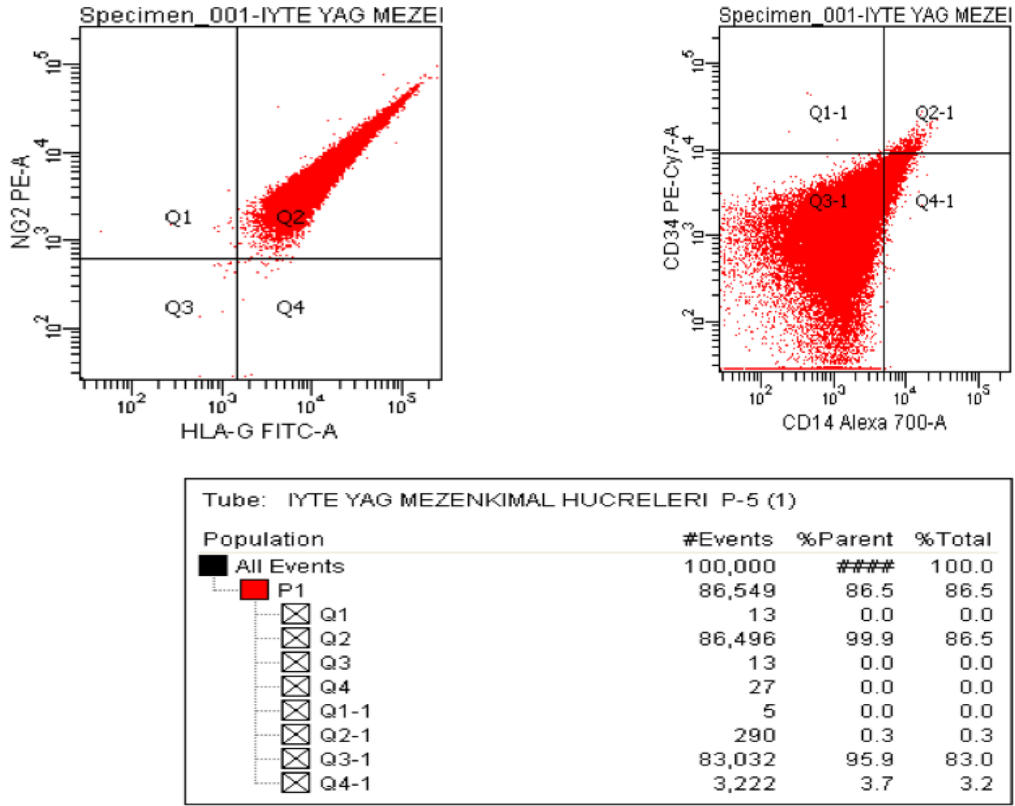
### Kök Hücrelerin Akım Sitometri (FACS) ile Sayılması:

Hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden ayrıldıktan sonra CD 45 APC H7(Becton-Dickinson, Bioscience Pharmigen, San Diego, CA, USA), CD 34 PE Cy7 (Becton-Dickinson), NG2 PE (Beckman Coulter, Marsilya, Fransa ), CD 73 PE (Becton-Dickinson) ve CD 105 FITC (Serotec, Oxford, UK)' ye karşı antikolar ile inkübasyon öncesi fosfat tamponlu salin ile yıkandı. Akım sitometrik analizler için iki tüp kullanıldı; birinci tüpte CD 105/CD73/CD34/CD45, ikinci tüpte ise CD105/NG2/CD34/CD45 bulunmaktadır. Her tüpe  $5 \times 10^5$  adet mezenkimal kök hücre eklendi ve  $5 \times 10^5$  hücre/örnek ve 400 hücre/saniye akım hızında floresan histogramlar elde edildi. Deneyler FACS Canto II (BD Bioscience Pharmigen, San Diego, CA, USA) ile yürütüldü. Akım Sitometrik veriler FACS DIVA(Becton- Dickinson) yazılımı ile analiz edildi.

### Akım Sitometri (FACS) Sonuçları:

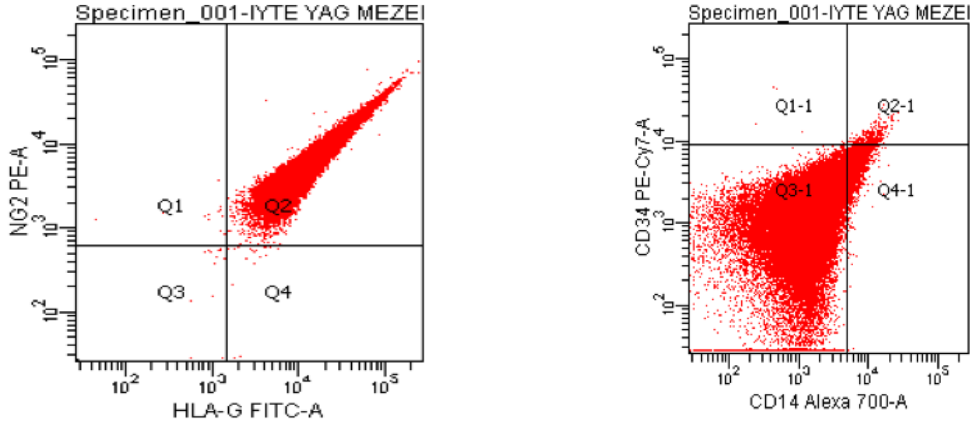
İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında elde edilen kök hücreler çoklu pasajlanmanın ardından adipoz doku kaynaklı kök hücre olduklarının doğrulanması amacıyla yüzey belirteçleri işaretlenerek akım sitometri cihazında sayım yapıldı. Hematopoetik kök hücrelere ait olan CD 34, CD 45 belirteçlerinin negatif olduğu görüldü. Adipoz doku kökenli kök hücrelere ait olan CD 73, CD 105, NG2 sayımlarının %99 oranında pozitif olduğu görüldü. (Şekil19,20,21)

NG2 MKH BELİRTEÇLERİ  
CD34 VE CD14 HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE BELİRTECİ



Şekil 19: ADAS Akım Sitometri Sayımı Sonuçları

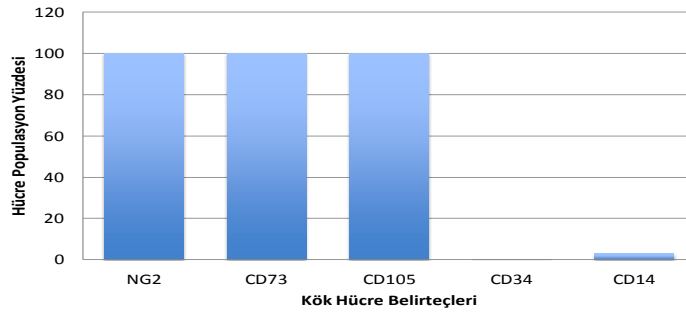
NG2 MKH BELİRTEÇLERİ  
CD34 VE CD14 HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE BELİRTECİ



Tube: IYTE YAG MEZENKIMAL HUCRELERI P-5 (1)

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100,000	####	100.0
P1	86,549	86.5	86.5
Q1	13	0.0	0.0
Q2	86,496	99.9	86.5
Q3	13	0.0	0.0
Q4	27	0.0	0.0
Q1-1	5	0.0	0.0
Q2-1	290	0.3	0.3
Q3-1	83,032	95.9	83.0
Q4-1	3,222	3.7	3.2

Şekil 20: ADAS Akım Sitometri Sayımı Sonuçları



Şekil 21 : Akım Sitometri Sonuçlarının Grafik ile Karşılaştırılması

### **Enjeksiyon Protokolü:**

Dört gruba ayrılan toplam 48 adet rata 6 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyon yapıldı. Grup I ve Grup II 'ye 6 hafta boyunca intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün D-Galaktoz enjeksiyonu yapıldı. Grup III ve Grup IV'e 6 hafta boyunca intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün %0,9 NaCl enjeksiyonu yapıldı. 6 hafta sonunda enjeksiyon protokolü tamamlandı.

### **Grup I ve Grup III ADAS Hücre Uygulaması:**

Mezenkimal kök hücreler tripsin solüsyonu ile besiyerinden ayrıldı. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı, 0,25 cc %0,9 NaCl içinde çözüldü. Hemositometre ile sayım yapılarak 6 ml içinde  $30 \times 10^6$  adet kök hücre olacak şekilde enjektöre çekildi ve bir saat içinde soğuk zincir taşıma kurallarına ve organ nakil kurallarına uygun olarak DEÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarına ulaştırıldı.

Grup I ve Grup III ratlara 50mg/kg Ketalar(Ketamin®) + 10 mr/kg Ksilazol (Ksilazin®) intraperiotoneal olarak verilerek anestezi sağlandı.

Cerrahi yapılacak rat dorsumu tıraş edildi.

Cerrahi alan isosol antiseptik çözelti (Baticon) ile yıkandı ve temizlendi.

Rat dorsal alanında dorsal kas fasyasına incek kadar 6 cm'lik insizyon yapıldı. (Resim 13 )

Verilen 220 µl'lik sıvı için alan oluşturmak amacıyla insizyon kenarından künt diseksiyon yapıldı. (resim 14-15) Diseke edilen alan insizyonunun 1 cm kaudalinden 22G branül yerleştirildi. Branül giriş deliğinden sıvı kaçağını önlemek amaçlı branül dorsal kas fasyasının ve spinal ligamanların altından ilerletildi.(Resim 16-17)

İnsizyon 4-0 poliprolen ile primer suture edildi.

Branülden  $10^6$  adet/ 220 µl ADAS enjekte edildi, branül içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml hava enjekte edildi ve branül çekildi. (Resim 16-17)



Resim 13: Dorsal cilt insizyonu



Resim 14-15: Dorsal kas fasyası üzerinden diseksiyon



Resim 16-17: Cilt sütürasyonu ve branülden  $10^6$  adet ADAS enjeksiyonu

## **Grup II ve Grup IV %0,9 NaCl Uygulaması:**

Grup II ve Grup IV ratlara 50mg/kg Ketalar(Ketamin) + 10 mr/kg Ksilazol (Ksilazin) intraperiotoneal olarak verilerek anestezi sağlandı.

Cerrahi yapılacak rat dorsumu tıraş edildi.

Cerrahi alan isosol antiseptik çözelti (Baticon) ile yıkandı ve temizlendi.

Rat dorsal alanında dorsal kas fasyasına inecek kadar 6 cm'lik insizyon yapıldı.

Verilen 220 µlt'lik sıvı için alan oluşturmak amacıyla insizyon kenarından künt diseksiyon yapıldı. Diseke edilen alan insizyonunun 1 cm kaudalinden 22G branül yerleştirildi. Branül giriş deliğinden sıvı kaçağını önlemek amaçlı branül dorsal kas fasyasının ve spinal ligamanların altından ilerletildi.

İnsizyon 4-0 poliprolen ile primer suture edildi.

Branülden 220 µlt %0,9 NaCl enjekte edildi, branül içinde sıvı kalmaması için 0,2 mlt hava enjekte edildi ve branül çekildi.

Cerrahi sonrasında anestezi etkisi azalana kadar ılık su torbası ile ısıtılarak takip edildi.

Grup IV<sub>b</sub>' 1 adet rat intraoperatif olarak kaybedildi. Grup IV<sub>a</sub>'da 2 adet rat postoperatif 1. günde üst ekstremitte perfüzyon bozukluğu nedeni ile sakrifiye edildi. Grup II<sub>b</sub>'de 1 adet rat postoperatif 2. günde kannibalizm nedeni ile sakrifiye edilerek çalışma dışı bırakıldı ve çalışma 44 adet rat ile tamamlandı. Ratlar operasyon sonrasında günlük pansumanlarla izlendi, peroperatif antibiyotik proflaksisi uygulanmadı.

Ratlar cerrahi işlemden 14 ve 28 gün sonra sakrifiye edildiler. Sakrifikasyon öncesinde her gruptan 3 adet rattan metabolizma kafesinde takip sonrası 12 saatlik

idrar toplandı. DEÜTF Biyokimya Merkez Laboratuvarında 12 saatlik spot idrarda kreatinin analizi yapıldı. Kreatinin sonuçları değerlendirilen idrar örnekleri 8-OH-d-guanozin hasarlı nükleotidinin kütle spektrometrik analizi için DEÜTF Biyokimya Anabilim Dalına teslim edildi.

### **Sakrifikasyon Protokolü:**

Sakrifikasyon öncesinde dokudaki in vivo vaskülariteyi gözleme amaçlı olarak ratlara 50mg/kg Ketalar(Ketamin®) + 10 mr/kg Ksilazol (Ksilazin®) intraperitoneal olarak verilerek anestezi sağlandı.

Makroskobik olarak cilt değişiklikleri ve tüylenme artışı incelendi.

Sırt bölgesi tıraşlandı ve sütürler alındı.

Skar hattı ortada olacak şekilde 6 cm'lik insizyon skarı belirlendi 6x3 cm'lik alan işaretlendi.

İşaretlenen andan insizyon yapılarak kas fasyasına kadar inildi ve dorsal cilt flebi lateral bazlı olarak eleve edildi. Eleve edilen flep kanlanması ve skar etrafındaki kapiller yoğunluk, epidermal incelme ve renk değişiklikleri incelendi. Kranial ve kaudaldeki 1 cm'lik alan eksize edilerek ortadaki 4cm'lik alan bırakıldı.

İnsizyon hattı ortasındaki 2cm'lik orta alan histomorfolojik inceleme amaçlı Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarına götürülmek üzere formol içine konuldu.

İnsizyon hattı ortasındaki 1cm'lik alan küçük parçalara ayrılarak ve tartılarak 1,5 ml'lik Eppendorf tüpü içinde %0,9 NaCl ile Dokudan Western Blot Yöntemi ile Tirozinaz, TRP-1, TRP-2 analizi amaçlı İYTE Moleküler Biyoloji Ve Genetik Laboratuvarına götürüldü.

Makroskobik gözlem ve örnek alımı tamamlandıktan sonra ratlar yüksek doz Ketalar(Ketamin) ve Ksilazol (Ksilazin) ile sakrifiye edildi.



## **6-BULGULAR :**

### **6.1- Sakrifikasyon esnasında makroskopik bulgular;**

İntraperitoneal D-galaktoz uygulanan grup II'deki lateral bazal fleplerin soluk beyaz olduğu, epidermal incelme, insizyon hattında kuruluk, yara iyileşme belirtilerinde gecikme olduğu görüldü.

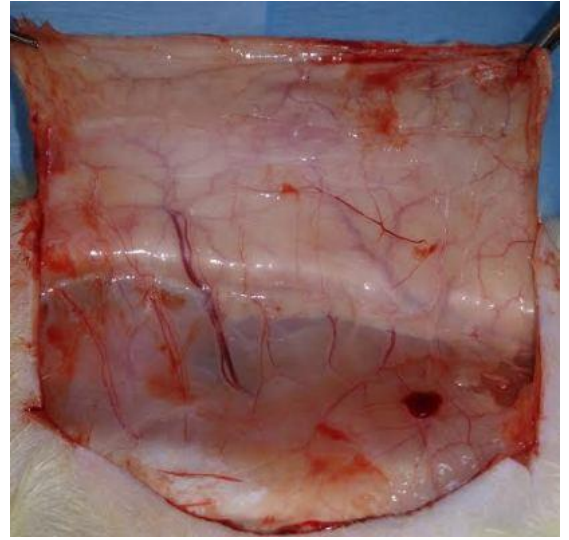
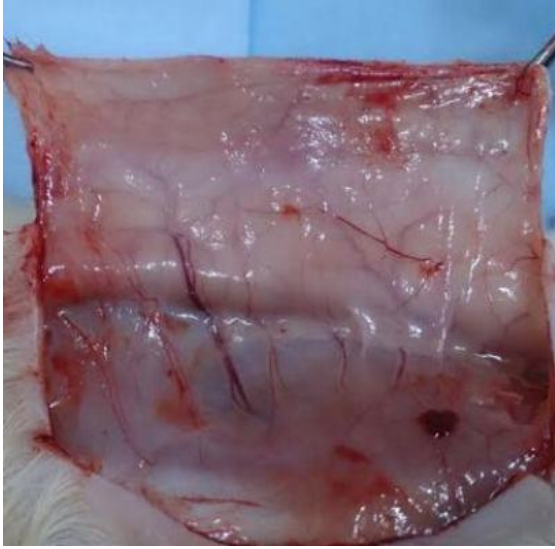
Grup I'de ise yine epiderma kalınlık azalması, tüylenmede azalma görülürken vaskülarizasyonunu grup II'ye göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Kapiller oluşumunda artış olduğu gözlemlendi.

Grup III'te skar etrafında kapiller artışı en iyi grup olarak izlendi, epidermal kalınlığın iyi olduğu ve tüylenmede artış olduğu görüldü.

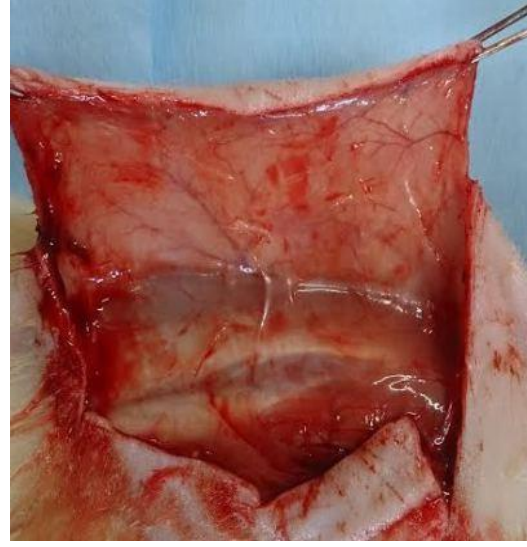
Grup IV'te ise skar etrafı kapiller artış ve epidermal kalınlığın Grup I ve II'den daha iyi ancak grup III'ten daha az olduğu görüldü.



Resim 18-19: Grup I Epidermal incelme, yeni perforatör dal ve kapiller oluşumu



Resim 20-21: Grup II , Epidermal incelme ve vaskülaritede azalma ,soluk beyaz renk



Resim 22-23 : Grup III skar etrafında yoğun kapiller ve perforatör oluşumu, epidermal kalınlık iyi



Resim 24-25: Grup IV normal yara iyileşmesi , kapiller oluşum grup III'e göre daha az

## **6.2-Western Blot yöntemi ile dokuda Tirozinaz,TRP-1,TRP-2 analizi:**

### **Western Blot yöntemi;**

#### **Deri Dokusundan Protein İzolasyonu;**

Öncelikle, sıvı azot ile dondurulan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan dokular buz kabına alınmış ve her bir doku örneği, sıvı azotta 10 dk bekletilmiş olan çelik havanın kuyucuklarına konarak havan tokmağı ile dövülerek parçalanmıştır. Parçalanmış doku örnekleri, 800  $\mu\text{l}$ 'lik özel çalkalayıcı tüplerine alınmış ve üzerine 1 x proteaz inhibitörü içeren homojenizasyon tamponundan 250  $\mu\text{l}$  eklenmiştir. Daha sonra, her bir tüpün içine 15-20 adet 2 mm'lik Zirconia Bead (BioSpec Products, Inc.) konmuştur. Zirconia Bead konan tüpler, Mini Bead Beater yardımıyla 30 saniye aralıklarla, aralıklarda 2-3 dk buzda bekletmek suretiyle, 5 kez karıştırılarak homojenize edilmiştir. Her bir tüpe 150'şer  $\mu\text{l}$  daha homojenizasyon tamponu konarak 30 saniye aralıklarla, aralıklarla 2-3 dk buzda bekletmek suretiyle, 5 kez karıştırılarak homojenizasyona devam edilmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Homojenizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, tüpler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14000 g'de 15 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrasında oluşan süpertanantlar temiz ependorf tüplerine aktarılmıştır.

#### **Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi;**

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu, BCA Protein Assay Kiti (Pierce, Thermo Scientific, USA) yardımıyla belirlenmiştir. Bu işlem, üretici firmanın kit protokolünde belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, kit içerisinde bulunan A ve B reaktifleri 50:1 oranında karıştırılmış ve bu karışımdan 96 kuyucuklu tabağın her bir kuyucuğuna 200  $\mu\text{l}$  eklenmiştir. Daha sonra, hazırlanan BSA standartlarından (25-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) ve izole edilen protein örneklerinden 25'er  $\mu\text{l}$  bu kuyucuklara her bir örnek için ikili olacak şekilde eklenmiştir. Ekim işlemi bittikten sonra 96 kuyucuklu tabak alüminyum folyo ile sarılmış ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 96 kuyucuklu tabakta bulunan örneklerin absorbansları spektrofotometrede 562 nm dalgaboyunda ölçülmüş ve bu absorbans değerlerine göre her bir örneğin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

SDS PAGE jeli hazırlandı;

% 12 Ayırma Jeli (5 ml)

4x ayırma jel tamponu (1.25 ml)

30% akrilamid karışımı (2 ml)

H<sub>2</sub>O (1.7 ml)

10% APS (75 ul)

TEMED (5 ul)

Ön Ayırma Jeli (2.5 ml);

4x ayırma jel tamponu (625 ul)

30% akrilamid karışımı (425 ul)

H<sub>2</sub>O (1.425 ml)

10% APS (38 ul)

TEMED (5 ul)

Proteinlerini BSA sonuçların göre hazırlanıp (yükleme bufferı ile), 5 dk 95<sup>0</sup>C denatüre edidi. Hazırlanan SDS PAGE in tanka yerleştirilip ve running buffer tanka döküldü.4 microlitre protein marker ilk kuyucuğa yüklendi. Geriye kalan kuyucuklara hazırlanmış proteinler yüklendi. İlk jeli geçene kadar 80 V da ( yaklaşık 45 dk) , ikinci jeli geçene kadar 100 V da yürütüldü. Mavi boya jelden tamamen çıkana kadar beklendi, yürütme işlemi durduruldu. Membrane 20 dakika boyunca methanol içerisinde bekletildi.

Proteinleri membrane a transfer etmek için, transfer buffer bir kaba döküldü. Siyah kısım buffer ın içinde olacak şekilde önce siyah sünger daha sonrasında bir

whatman paper yerleştirildi. Whatman paper ın üzerine jel, jelin üzerine membrane konuldu. Sırasıyla whatman paper ve siyah sünger konulup, transer aparatı kapatıldı.

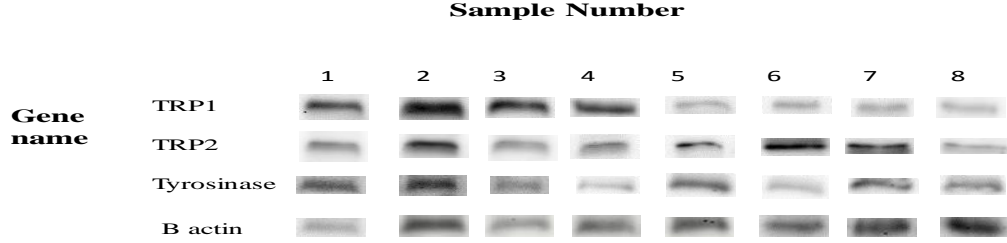
Transfer aparatının çentikli kısmı üst tarafa ve siyah kısmı tankın siyah kısmına gelecek şekilde yerleştirildi. Transfer buffer eklendi. Buz kalıbı eklendi, böylece buffer seviyesi 4. jel seviyesine yükseldi. Transfer tankı buzun içerisine yerleştirildi ve +4 °C de bir gecelik 20 V güç uygulanarak proteinlerin membrana geçiş işlemi sağlandı.

Ertesi gün membran aparattan çıkartıldı ve bir kaba koyuldu. Proteinlerin transfer olup olmadığını görmek için Ponceau S döküldü ve 2 dakika beklendi. Protein bandları görüldükten sonra 2-3 kere UP su ile yıkandı. Pembelik gidene kadar TBS-T ile yıkandı.

Bloklama için % 5 lik süt tozu (1 g süt tozu 20 ml TBS-T de çözülür), TBS-T karışımı hazırlandı. Çalkalayıcı yardımı ile 90 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 2-3 kez TBS-T ile 2-3 dk yıkandı.

Primer antikor hazırlanmış 0.5 g süt tozu + 10 ml TBS-T karışımına eklenip membran üzerine döküldü ve bir gecelik +4 oC de çalkalayıcıyla inkübe edildi. Ertesi gün, membran TBS-T ile 2 x 2-3, 1 x 15 dk, 3 x 5 dk yıkandı. Sekonder antikordan (kullandığınız primer antikor fareden üretilmesine dayanarak sekonder antikorumuzu ona göre seçiyoruz) 2 ul alınarak 10 ml TBS-T de karıştırılarak yıkanan membranımızın üzerine eklendi. Oda sıcaklığında 1 sa inkübe edildi ardından TBS-T ile 2 x 2-3 dk, 1 x 15 dk, 3 x 5 dk yıkandı.

Son yıkama sırasında, 1 ml detection reagent 1 ve detection reagent 2 den alındı ve bir tüpte karıştırıldı. Bu sırada görüntüleme aleti hazırda bekletildi. Ardından bu karışım membran üzerine dökülür ve 2 dk alüminyum folyo yardımı ile karanlıkta bekletildi. İnkübasyonun ardından şeffaf bir poşetin içine görüntüleme için kullanıldı.



Şekil 22: Western blot yöntemi ile dokudan TRP-1, TRP-2, Tirozinaz enzimi sonuçları

Örnek 1-2-3-4 olarak adlandırılan bant sırasıyla Grup I, II, III ve IV'ün yara iyileşmesinin 14. gününde alınan dokuları göstermektedir.

Örnek 5-6-7-8 olarak adlandırılan bant sırasıyla Grup I, II, III ve IV'ün yara iyileşmesinin 28. gününde alınan dokuları göstermektedir.

Grup I<sub>a</sub>'da(örnek 1) D- Galaktoz uygulamasından sonra , ADAS uygulamasına bağlı olarak oksidatif hasar oluşturma etkisi ve yaşlanma belirtilerinin azatlığını, buna bağlı olarak organizmanın oksidatif hasara yanıt olarak verdiği TRP-1,TRP-2,Tirozinaz enzim aktivitesinin de Grup II<sub>a</sub>'ya(örnek 2) oranla daha az olduğu (daha açık boyanma ) net olarak görülmektedir. Tüm grupların yara iyileşmesi 14. Gününde yapılan değerlendirmesinde (Örnek 1-2-3-4) TRP-1,TRP-2, Tirozinaz aktivitesinin en fazla olarak intraperitoneal D- galaktoz ve sırta %0,9 NaCl uygulanan grupta (grup III=örnek 3) olduğu görülmüştür ( en koyu boyanan bant). Buradan immunolojik yanıtın en fazla olduğu grup sonucu çıkarılabilir. Bu da D-Galaktoz uygulamasının deri üzerinde oksidatif hasar oluşturarak immnulojik yanıtı indüklediğinin kanıtıdır.

Grup I 'de yine intraperitoneal D-Galaktoz ve sırtta bölgesel ADAS hücre uygulaması sonucunda mezenkimal kaynaklı kök hücrelerin oksidatif hasarı azaltarak TRP-1,TRP-2,Tirozinaz enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı, buna rağmen grup III ve grup IV'e göre özellikle Tirozinaz bandında daha koyu boyanma olması intraperitoneal D-Galaktoz uygulamasının deri üzerinde oksidatif hasara yol açtığına kanıttır.

Yara iyileşmesinin 28. Gününde alınan örnekler (örnek 5-6-7-8) boyanma özellikleri de 14.günde alınan örneklere paralel olmakla birlikte daha soluk boyanma özelliği göstermesi zamana bağlı olarak oksidatif hasar etkenlerinin azaldığının kanıttır.



## **6.3 - HİSTOLOJİK GEREÇ VE YÖNTEM**

### **Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü**

%10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı.

### **Hematoksilen-Eosin (HE) Boyama Protokolü**

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksilin (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

## Masson's trikrom (MT) Boyama Protokolü

Masson's Trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi. Ve akarsuda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trikrom boyama seti içerisinde dokular üzerine 8 damla Weigert hematoksilen boyası ile 8 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. 1 dk distile su ile yıkandıktan sonra 8 damla asit-alkol çözeltisi ile 1 dakika bekletilen kesitler distile suyla iyice yıkandı. Ardından 8 damla Ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı. 5 dakika sonra uzaklaştırıldı ve 1 ml stok asit çözeltisi ve 29 ml distile su ile hazırlanan asitli su ile kısaca yıkandı. 8 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 20 dakika muamele edildikten sonra asitli su ile yıkandı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

## İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimyasal inceleme için primer antikor olarak **VEGF** (Santa Cruz, sc-7269, 1/100), **TGF-β** (SAB, Signalway, 21701, 1/100), **anti-kollajen tip I** (Novus NB600-450, 1/100) antikorları kullanıldı. 60°C lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin (00-3008, Digest

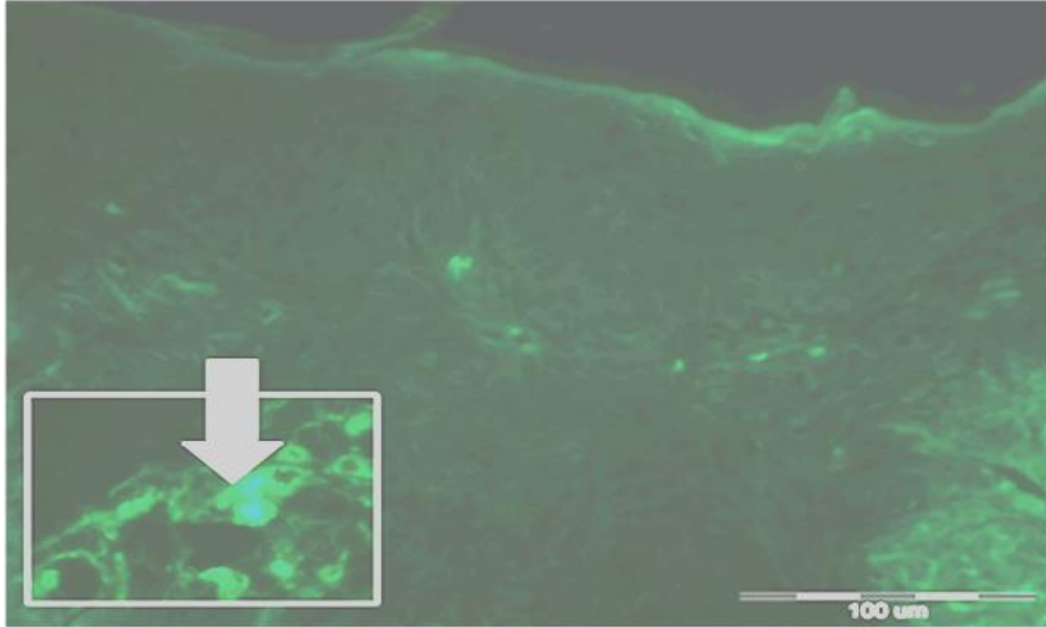
All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 10 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solusyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan primer antikorlar **VEGF, TGF-β, anti-kollajen tip I** ile bir gece +4°C'de bekletildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 30 dk muamele edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) boyası (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işlemine tabi tutulup sonra entellan ile kapatıldı. (143)

## İstatistiksel Değerlendirme

Gruplara ait değerler ortalama±Standart sapma olarak verildi. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis Varyans analizi testi ile, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı.  $p < 0.05$ , istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### **6.4-HİSTOMORFOLOJİK BULGULAR**

**Floresan işaretli kök hücrelerin gösterilmesi:** Dermiste deney sırasında verilen işaretli kök hücreler paraffin kesit alındıktan sonra Resim 26'daki gibi saptandı.



Resim 26: Floresan işaretli kök hücrelerin dokuda gösterilmesi. Ok: Floresan ışığa veren hücreleri göstermekte.

#### **6.4- Histolojik Bulgular:**

HE ile boyalı yaşlanma modeli oluşturulan Grup IIa (14gün) grubunda epidermal ve dermal organizasyonun bozulduğu, zayıf rejenerasyon olduğu, granülasyon dokusunda ve bağ doku miktarında artış olduğu belirlendi. MT boyamasında da granülasyon ve bağ doku miktarının artmış olduğu gözlemlendi. Grup IIb (28gün)'de Grup IIa grubuna göre aynı değerlerde iyileşme olduğu gözlemlendi (Tablo 9-10, Resim 27-28).

Yaşlanma modelini tedavi amacıyla kök hücre uygulaması yapılan Grup Ia'nın (14gün) HE ile boyalı kesitlerinin incelenmesinde epidermal ve dermal organizasyonun Grup IIa'ya göre daha iyi olduğu, bağ doku ve granülasyon dokusu artışının da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p=0,43$ ). MT ile boyanan kesitler incelendiğinde de granülasyon ve bağ doku artışının azaldığı gözlemlendi. Grup Ib'nin de (28gün) Grup Ia'ya göre yara iyileşmesinin artmış olduğu gözlemlendi (Tablo 9-10, Resim 27- 28).

Grup IVa'ya ait HE boyalı kesitlerin incelenmesinde tedavi verilmeyen grupta yaşlanma modeli oluşturulan Grup IIa'ya göre epidermal ve dermal organizasyonun daha iyi olduğu, MT boyamasında granülasyon ve bağ doku artışının daha hızlı azaldığı gözlemlendi. Grup IVb'de ise artan süre ile iyileşmenin daha hızlı olduğu gözlemlendi (Tablo 9-10, Resim 27-28).

Grup IIIa'nın HE boyalı kesitleri incelendiğinde epidermal ve dermal iyileşmenin tamamlandığı, MT boyamasında da diğer tüm gruplara göre granülasyon ve bağ dokusu artışının azaldığı gözlemlendi. Grup IIIb'de artan süre ile iyileşmenin tamamlandığı gözlemlendi (Tablo 9, Resim 27-28).

**Histomorfolojik Skorlama:** Bu skorlama yapılırken epidermal ve dermal iyileşme, granülasyon dokusu artışı, bağ doku artışı ve anjiyogenez değerlendirildi.

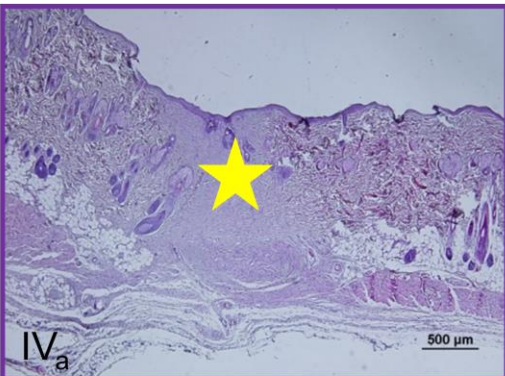
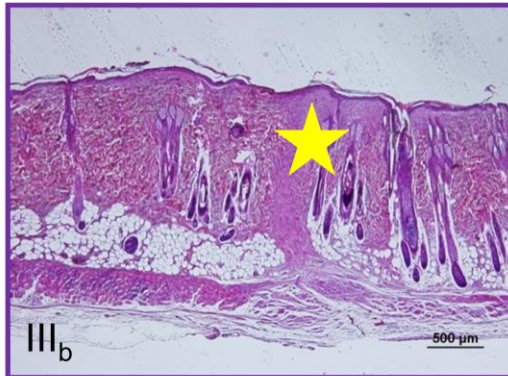
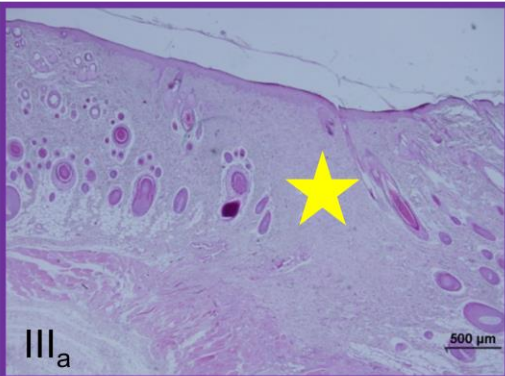
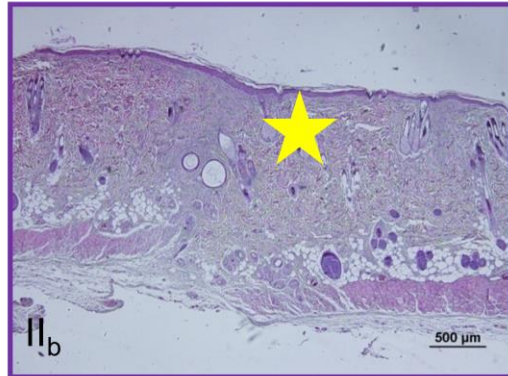
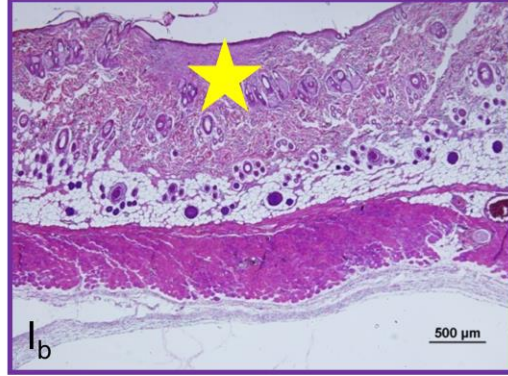
Tablo 9: Semikantitatif histomorfolojik skorlama

<b>Skorlama</b>	<b>Epidermal ve dermal rejenerasyon</b>	<b>Granülasyon dokusu oluşumu ve bağ doku artışı</b>	<b>Anjiyogenez</b>
<b>0</b>	Çok az epidermal ve dermal organizasyon	Kalın granülasyon dokusu ve çok bağ doku artışı	Zayıf anjiyogenez
<b>1</b>	Az epidermal ve dermal organizasyon	Orta granülasyon dokusu ve orta bağ doku artışı	Yeni şekillenen çok az sayıda kapiller
<b>2</b>	Orta epidermal ve dermal organizasyon	Az granülasyon dokusu ve az bağ doku artışı	Yeni şekillenen orta sayıda kapiller
<b>3</b>	Tam epidermal ve dermal organizasyon	Çok az granülasyon dokusu ve çok bağ doku artışı	Yeni şekillenen çok sayıda kapiller

14g

HE

28g

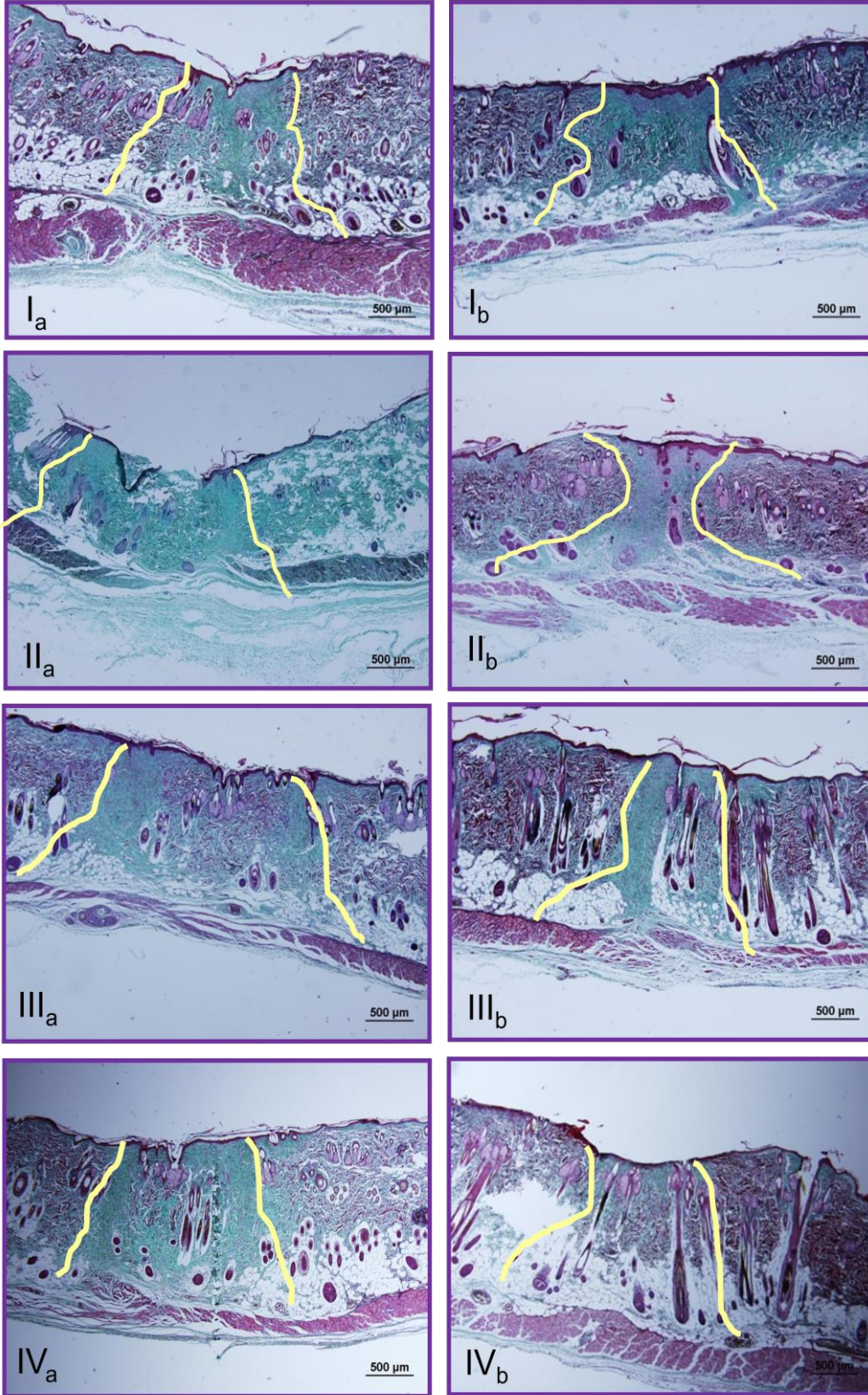


**Resim 27** : HE boyamasına ait görüntüler. Yıldızlar reepitelize olan, granulasyon ve iyileşme olan alanları göstermekte. Scale bar. 500 µm.

14g

Masson's Trikrom

28g



**Resim 28:** MTboyamasına ait görüntüler. Sarı çizgiler granulasyon dokusuna ait olan alanları göstermekte. Scale bar. 500 µm.



## İmmunohistokimyasal Skorum

TGF- $\beta$ , VEGF, ve anti-Kollajen tip I immunoreaktiviteleri semikantitatif yöntem ile değerlendirildi. Her deneğe ait preparattan rasgele seçilen 5'er farklı alanda değerlendirme yapıldı ve ortalamaları alındı. Skorumada **0**: Boyanma yok, **1**: Az boyanma, **2**: Orta Őiddette boyanma **3**: Şiddetli boyanma olacak Şekilde değerlendirildi.(144)

Tüm gruplar arasında Kruskal Wallis varyans analiz testine göre gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.00). İkili gruplar arasındaki anlamlılık Mann Whitney U testi ile değerlendirildi.

TGF- $\beta$  boyamasında en yüksek değere 14 günlerde Grup IIIa'da, 28 günlerde Grup IIIb de rastlandı. Grup Ia'da Grup IIa'ya göre anlamlı artış gözlandı (p=0,30). Benzer Şekilde Grup Ib'de Grup IIb'ye göre anlamlı olarak artmıştı (p=0,05).

VEGF boyamasında tüm doku ile birlikte özellikle vasküler ve perivasküler alanda immun pozitif hücreler gözlandı. Boyamada en yüksek değere 14 günlerde Grup IIIa'da, 28 günlerde Grup IIIb de rastlandı. Kök hücre tedavisi uygulanan Grup Ia'da yaşlanma modeli uygulanan Grup IIa'ya göre anlamlı artış gözlandı (p=0,30). Benzer Şekilde Grup Ib'de Grup IIb'ye göre anlamlı olarak artmıştı (p=0,05).

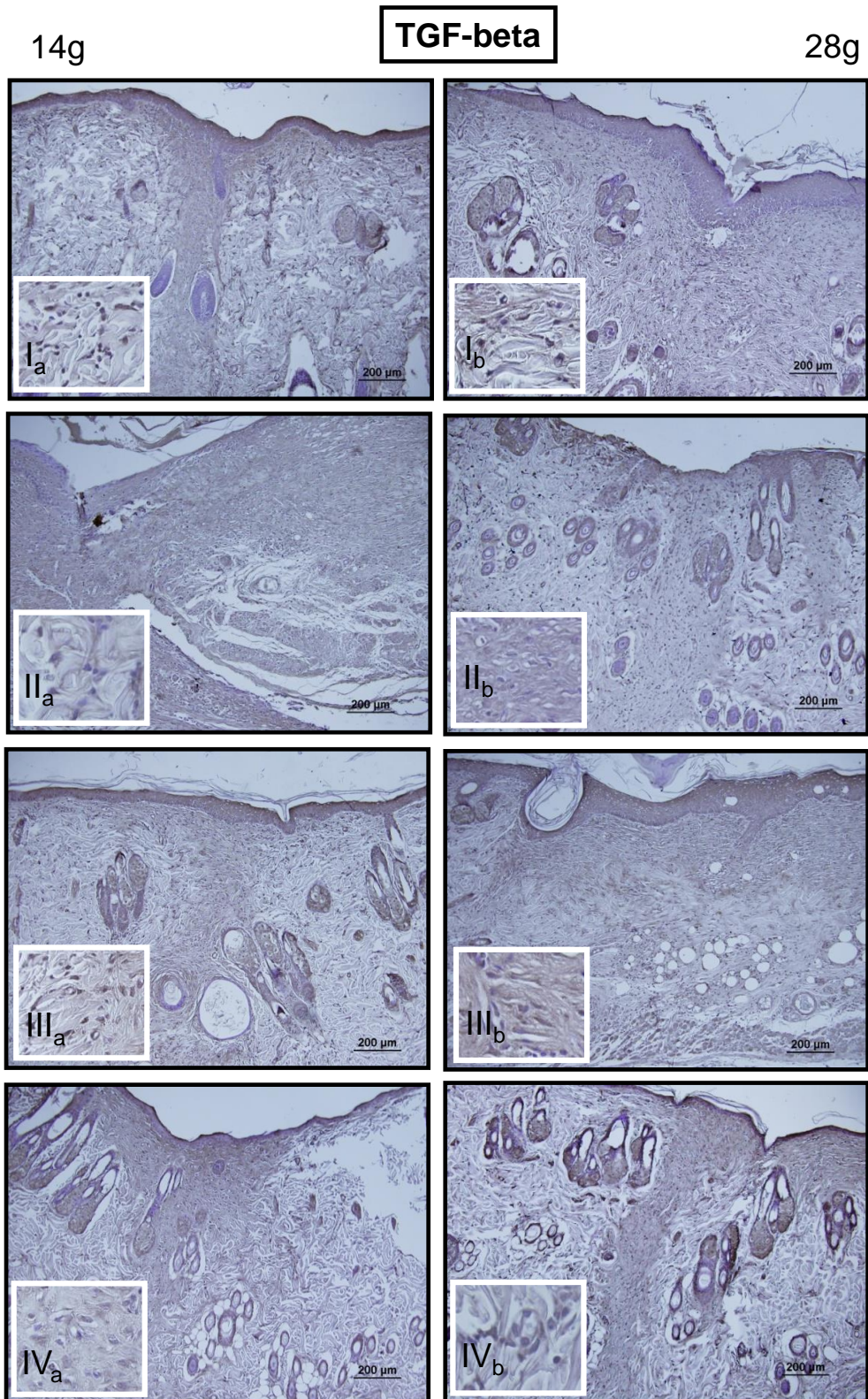
Tip I Kollagen boyamasında da en yüksek değere 14 günlerde Grup IIIa'da, 28 günlerde Grup IIIb de rastlandı. Kök hücre tedavisi uygulanan Grup Ia'da yaşlanma modeli uygulanan Grup IIa'ya göre anlamlı artış gözlandı (p=0,30). Benzer Şekilde Grup Ib'de Grup IIb'ye göre anlamlı olarak artmıştı (p=0,005).

**Tablo 10:** Gruplara ait Semikantitatif Histomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Skorlama (ORT+SS)

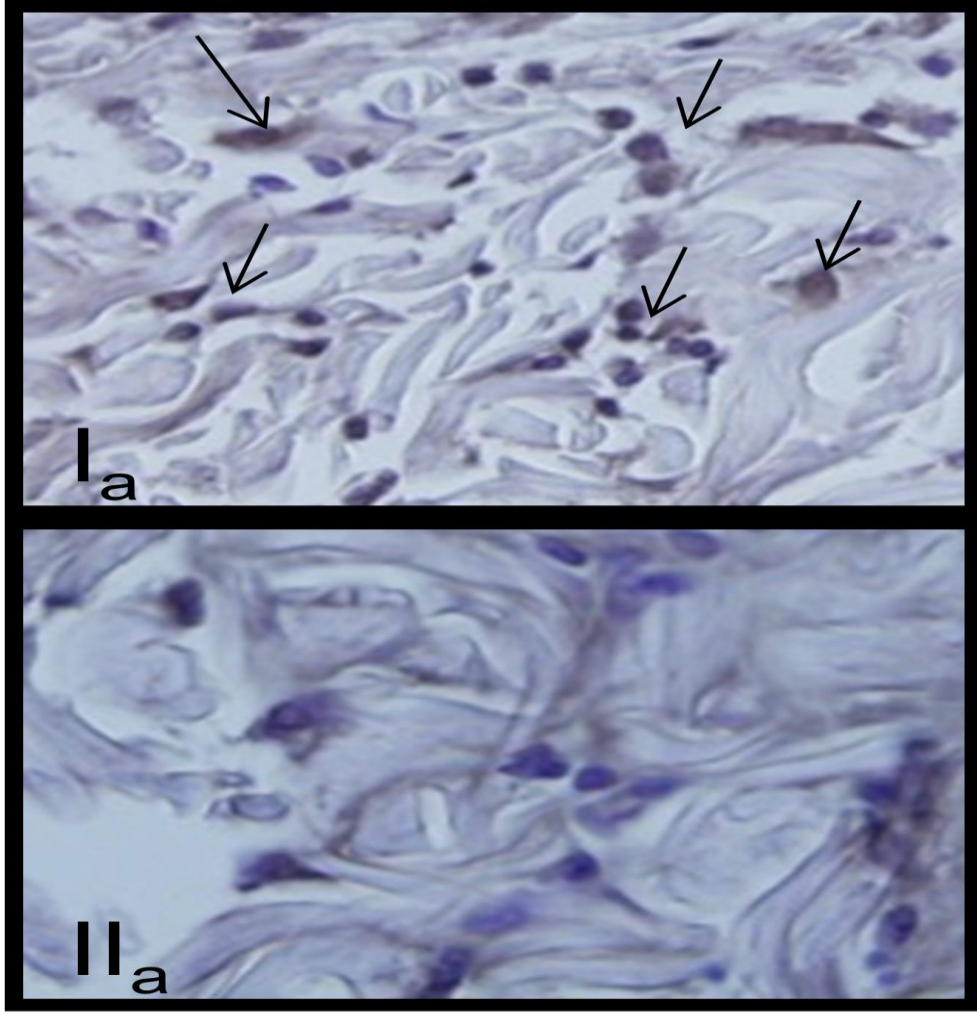
<b>Gruplar</b>	<b>HİSTOMORFOLOJİK SKORLAMA (ORT+SS)</b>	<b>TGF-β</b>	<b>VEGF</b>	<b>anti-Kollajen tip I</b>
<b>Ia</b>	1,33±0,51	1,33±0,51	1,33±0,51	1,33±0,51
<b>Ila</b>	0,50±0,54	0,50±0,54	0,50 ±0,54	0,50±0,54
<b>IIla</b>	1,66±0,51	1,66±0,50	1,50±0,54	1,66±0,51
<b>IVa</b>	1,33±0,51	1,16±0,40	1,16±0,40	1,33±0,51
<b>Ib</b>	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00
<b>IIb</b>	1,33±0,51	1,50±0,54	1,50±0,54	1,16±0,40
<b>IIIb</b>	2,16±0,40	2,33±0,51	2,33±0,51	2,16±0,75
<b>IVb</b>	1,66±0,51	1,83±0,40	2,00±0,63	1,83±0,75

**Tablo 11: İkili Gruplara Ait Karşılaştırma (Mann Whitney U Testi)**

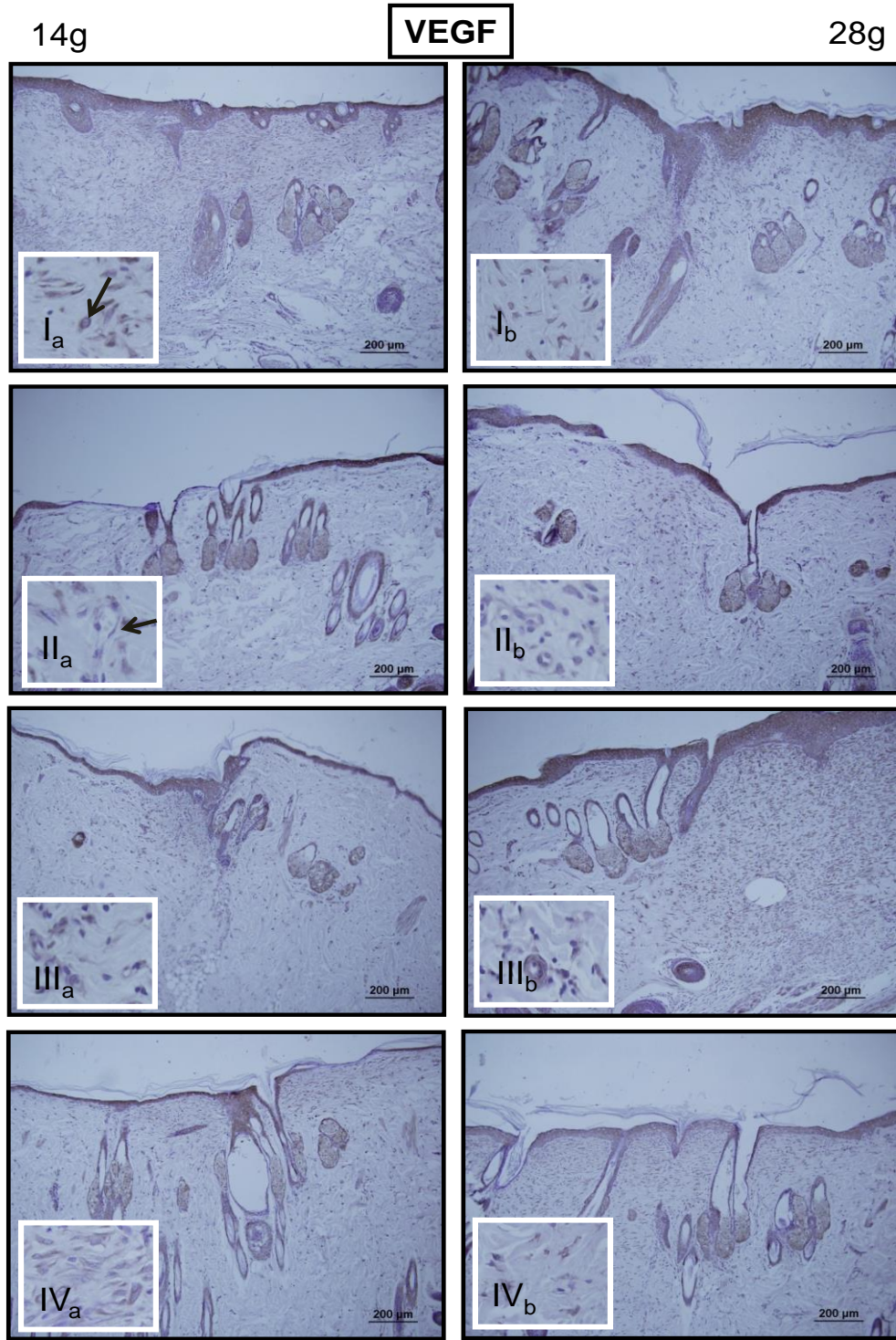
Gruplar	GRUPLAR ARASI İSTATİSTİK (p değerleri)			
	Histolojik Skorum	TGF- $\beta$	VEGF	anti-Kollajen tip I
<b>Ia-IIa</b>	0,43	0,30	0,30	0,30
<b>Ia-IIIa</b>	0,93	0,26	0,57	0,26
<b>Ia-IVa</b>	0,52	0,52	0,52	1,00
<b>IIa-IVa</b>	0,26	0,93	0,24	0,26
<b>IIIa-IVa</b>	0,03	0,04	0,04	0,03
<b>Ib-IIb</b>	0,01	0,05	0,05	0,005
<b>Ia-IIIa</b>	0,31	0,13	0,13	0,52
<b>Ib-IVb</b>	0,13	0,31	1,00	0,52
<b>IIIb-IVb</b>	0,09	0,009	0,33	0,43
<b>IIb-IVb</b>	0,26	0,24	0,17	0,08



**Resim 29:** TGF- $\beta$  immunohistokimyası.

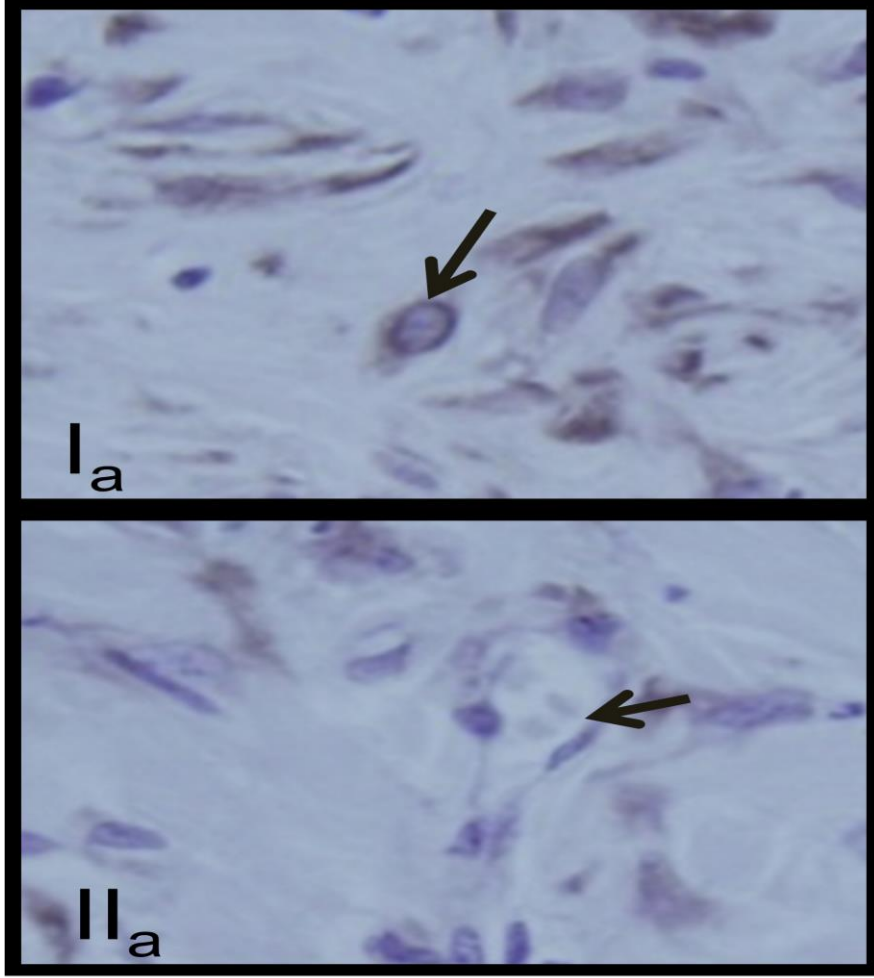


**Resim 30:** TGF- $\beta$  immunohistokimyası. Oklar pozitif boyanmaları göstermekte.



**Resim 31:** VEGF immunohistokimyası. Oklar perivasküler alanlar göstermekte.

(Küçük resim perivasküler alan)

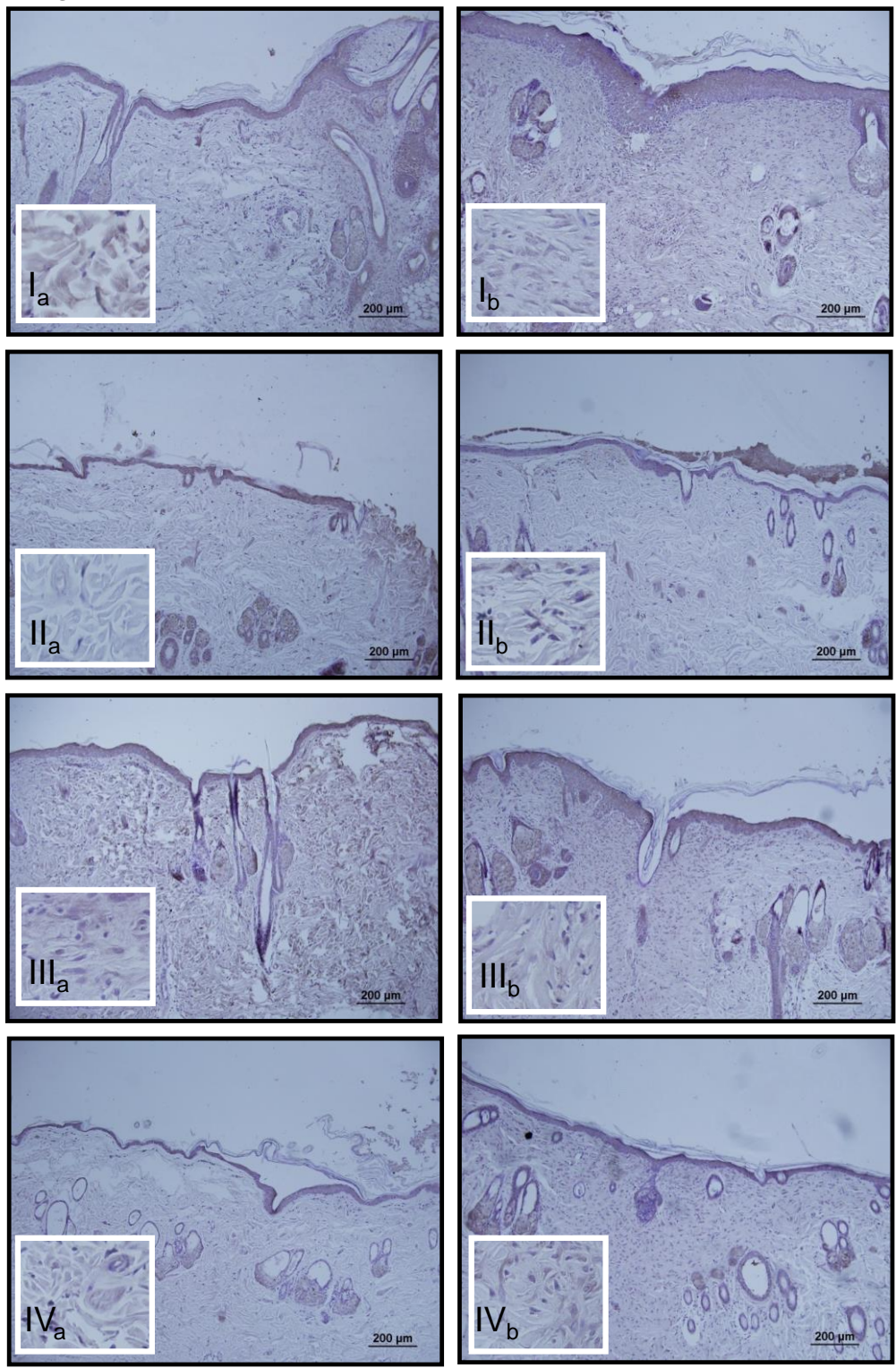


**Resim 32:** Grup I<sub>a</sub> ve II<sub>a</sub> 'nın VEGF immunohistokimyası. ( Oklar perivasküler alanları göstermekte.)

**Kollagen Tip I**

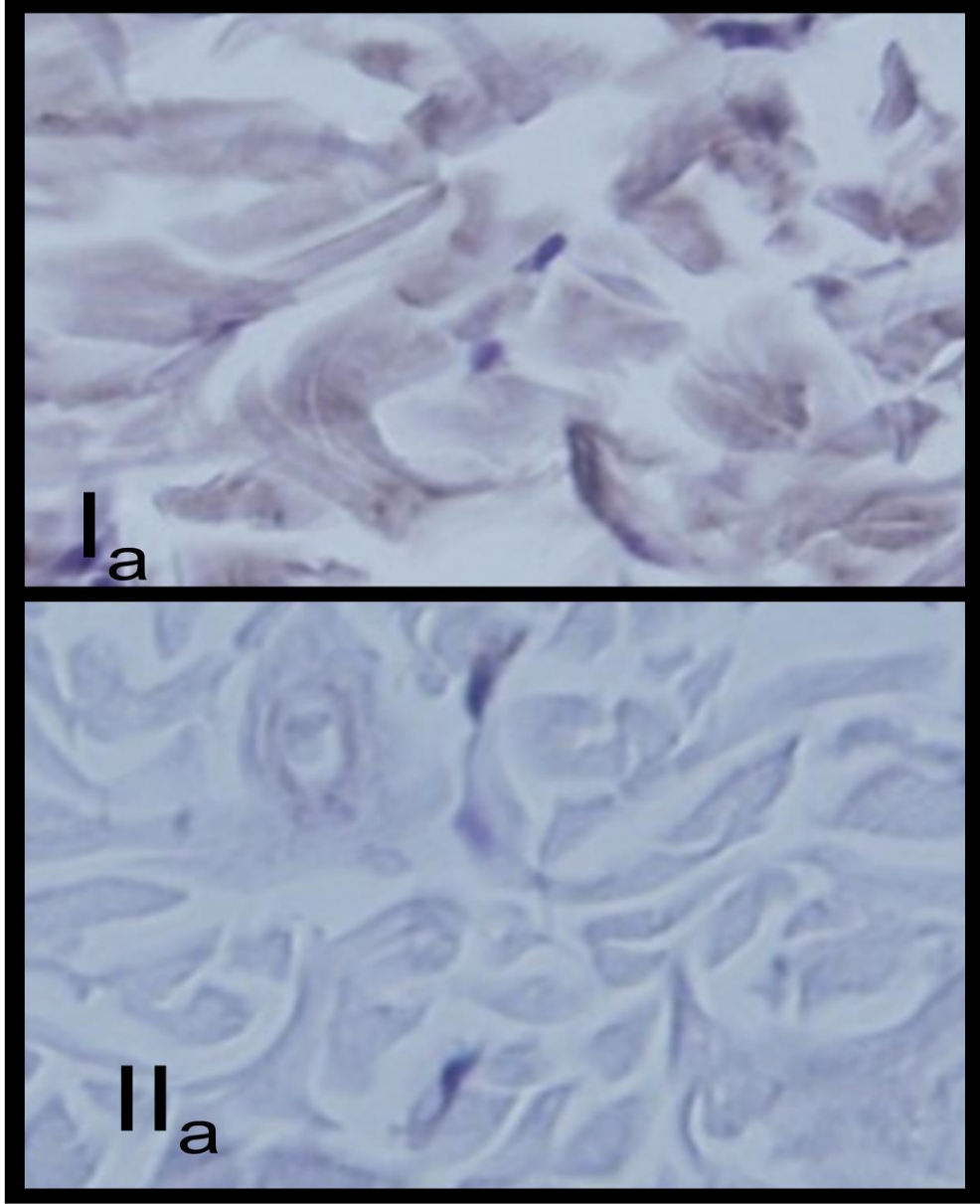
14g

28g



**Resim 33:** Tüm gruplarda Kollagen tip I immunohistokimyası





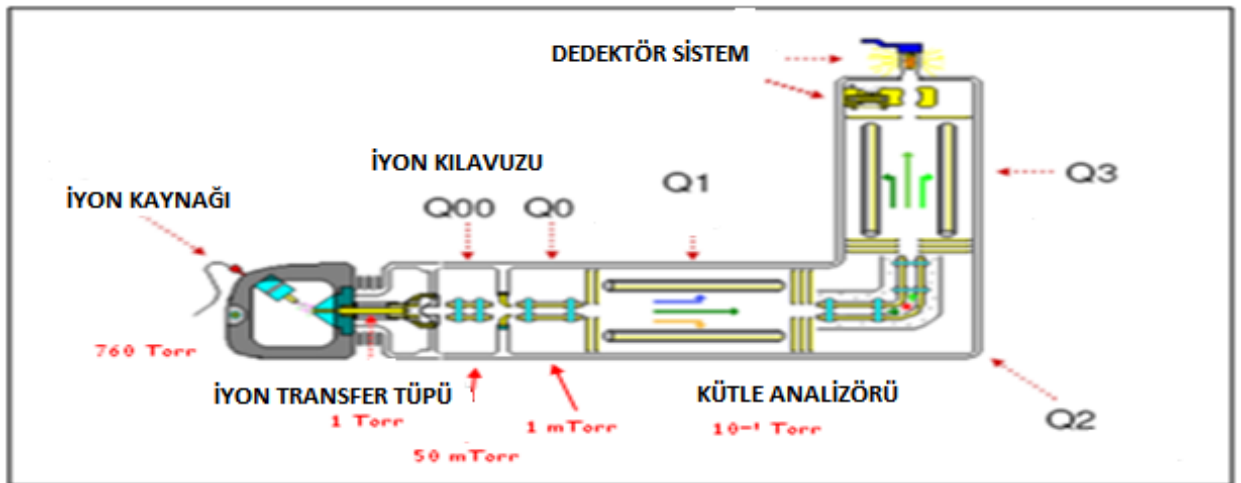
**Resim 34:** Kollagen tip I immunohistokimyası. Grup Ia'da Grup IIa'ya oranla artmış kollagen boyanması gözlenmekte .

#### **5.4-İdrarda Hasarlı DNA Nükleozidi 8-OH-dG'nin Sıvı Kromatografi - Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile Ölçülmesi**

DNA nükleozid ekstraksiyonu için 1 mL idrar örneği içine stabil izotoplar ile işaretlenmiş internal standart (8-OH-dG<sup>15</sup>N<sub>5</sub>) eklendi. Örnekler 1.000 g'de 15 dk santrifüjlendi ve süpernatantlar filtrelenerek katı faz ekstraksiyon kartuşlarına (Oasis Waters 60 mg, Milford, MA) yüklendi. 1 mL metanol ile ekstrakte edilen örnekler SpeedVac ile kurutulduktan sonra 100 µL 10 mM Tris tamponu (pH 7.5) ile çözüldü ve ardından alkalin fosfataz ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 14.000 g'de 10 dk santrifüjlenen örnekler LC-MS/MS analizi öncesinde ultrafiltrasyon membranları ile filtrelendi. (145-146)

Örnekler yüksek basınçlı sıvı kromatografide (Shimadzu, Kyoto, Japan) reversed faz C18 kolonu (Agilent Zorbax SB Aq 2.1x150 mm, 3.5µm) ve guard kolonu (Agilent Eclipse XDB C8 2.1x12.5 mm, 5 µm) ile 40°C'de ve 0.3 mL/dk akış hızında ayrımlandı. Mobil faz olarak % 0.1 formik asit içeren dH<sub>2</sub>O (A) ve asetonitril (B) kullanılarak gradient analiz gerçekleştirildi. Toplam analiz zamanı 26 dk, enjeksiyon hacmi standartlar için 10 µL, idrar örnekleri için 30 µL'dir.

Hasarlı DNA nükleozid analizi triple kuadripol iyon trap tandem kütle spektrometresinde çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda turbo V iyon sprej kaynağı ile gerçekleştirildi. 8-OH-dG için m/z 284/168, 8-OH-dG<sup>15</sup>N<sub>5</sub> için m/z 289/173 ana iyon/ürün iyon çiftleri izlendi. Veri analizlerinde Analyst Software Version 1.5 kullanıldı.



Şekil 23: Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS)  
(Dizdaroğlu 2012)

Gruplara ait değerler ortalama±Standart sapma olarak verildi. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis Varyans analizi testi ile, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı.  $p < 0.05$ , istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grup I<sub>a</sub> ile I<sub>b</sub> ve grup II<sub>a</sub> ile II<sub>b</sub> 'nin arasında (14-28. günlerde) Kruskal Wallis Varyans analizi ile yapılan testte anlamlı fark olduğu görüldü. ( $p = 0,027$ )

Tablo 12: İdrarda 8-OH-dG/kreatinin (nmol/mmol) değerinin gruplara göre ortalama değerleri (Ort±SS)

Gruplar	8-OH-dG/kreatinin (nmol/mmol) Ortalama±SS
I <sub>a</sub>	1,84±0,031
II <sub>a</sub>	1,83±0,021
III <sub>a</sub>	<b>4,36±0,083</b>
IV <sub>a</sub>	2,04±0,023
I <sub>b</sub>	3,11±0,076
II <sub>b</sub>	2,71±0,006
III <sub>b</sub>	2,59±0,019
IV <sub>b</sub>	2,22±0,295

Tablo 13 : Gruplar arasında 8-OH-dG düzeylerinin karşılaştırılması

	<b>Mann Whitney U (p değerleri)</b>
<b>I<sub>a</sub>-II<sub>a</sub></b>	0,827
<b>I<sub>a</sub>-III<sub>a</sub></b>	0,513
<b>I<sub>a</sub>-IV<sub>a</sub></b>	0,827
<b>II<sub>a</sub>-III<sub>a</sub></b>	0,513
<b>II<sub>a</sub>-IV<sub>a</sub></b>	0,376
<b>III<sub>a</sub>-IV<sub>a</sub></b>	0,513
<b>I<sub>b</sub>-II<sub>b</sub></b>	0,275
<b>I<sub>b</sub>-III<sub>b</sub></b>	0,184
<b>I<sub>b</sub>-IV<sub>b</sub></b>	0,127
<b>II<sub>b</sub>- III<sub>b</sub></b>	0,827
<b>II<sub>b</sub>-IV<sub>b</sub></b>	0,275
<b>III<sub>b</sub>-IV<sub>b</sub></b>	0,275
<b>I<sub>a</sub>.I<sub>b</sub></b>	<b><u>0,050</u></b>
<b>II<sub>a</sub>-II<sub>b</sub></b>	<b><u>0,050</u></b>
<b>III<sub>a</sub>-III<sub>b</sub></b>	0,513
<b>IV<sub>a</sub>-IV<sub>b</sub></b>	0,275

$p \leq 0.05$  ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

## **7- TARTIŞMA :**

*Yaşlanma*; Bir sistemin fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanlardan kaynaklanan eksojen ve, veya endojen stres faktörlerine karşı cevap verme yetisinde azalma ile karakterize, çok yönlü ve zamana bağımlı kompleks bir süreçtir.(1,2)

Günümüzde modern tıbbın en büyük uğraşlarından biri; daha uzun yaşam süresi elde etmek, bu süreyi daha yüksek yaşam kalitesi ile sürdürmek, yaşlanmayı azaltmak ve genç görünmeyi sağlamaktır. Yaşlanma karşıtı tedavi ise canlılığı, enerjiyi yeniden kazandıran, daha sağlıklı uzun bir yaşam sürebilmeyi sağlayan multidisipliner bir yaklaşımdır.

Deri yaşlanması yapısal ve moleküler bozulma ile birlikte derinin fonksiyonel ve estetik sonuçlarını da etkileyen ve progresif seyreden bir süreçtir, yaşlanmaya bağlı belirtilerin görüldüğü ilk organdır. İnsanların yaşam süresinin uzaması, dış görünüşe verdiği önemin artması ile deri görüntüsündeki bozulmalar kişinin psikolojisini, sosyal ilişkilerini ve sağlığını etkilemektedir.

Kronolojik yaşlanma (intrensek yaşlanma) kişinin genetik alt yapısının belirtecidir, zamana bağımlı bir süreç olup engellenemez. Yaşlanmanın hızı tüm canlılar ve aynı tür canlıların bireyleri arasında da farklılıklar gösterir. Dermiste kollajen ve elastin sentezinde azalma sonucu yaşlanan deride ince kırışıklıklar, epidermal incelme ve cilt elastikiyetinde azalma, sarkmalar ve sebum sekresyonunda azalma sonucu kuruluk gözlenir. Oluşan değişiklikler çoğunlukla fonksiyonel düzeydedir. (18,147)

Ekstresek yaşlanma ise başta kronik UV maruziyeti olmak üzere, beslenme alışkanlıkları, sigara kullanımı, alkol tüketimi ve olumsuz çevresel faktörler bağlı olarak ortaya çıkan deri yaşlanması tipidir. (1,2)

Ekstresek yaşlanma tipinde de elastikiyet kaybı, kollajen sentezinde azalma ile birlikte kronik hasar yapıcı etkene maruziyet sonucu melanin sentezinde artış, deride pigment lekeler, genişlemiş kapiller yapılar ve cilt turgor ve tonunda bozulmalar görülebilir.

Her iki yaşlanma tipinde de reaktif melanosit hiperplazisine bağlı olarak düzensiz hiperpigmentasyon görülür. Langerhans hücre sayısı belirgin olarak azaldığı için immun yanıtta da baskılanma görülür.(148) Elastik liflerin enzimatik degradasyonu sonucunda kalınlaşma, küçük kistik oluşumlar ve daha sonra da tam parçalanma görülür. Prolin ve lizin hidroksilaz enzimlerinin aktivitesinin azalmasına bağlı olarak kollajen çapraz bağlarında azalma oluşur ve kollajen stabilizasyonu azalır.

D-Galaktoz ile yaşlanma ekstresek mekanizma ile oluşan bir yaşlanma modelidir. Organizmaya yüksek düzeylerde Galaktoz alındığında galaktoz oksidaz enzimi ile bir aldehit olan galaktitol ve hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) dönüşür.  $H_2O_2$ , DNA üzerinde oksidatif hasar oluşturarak yaşlanmaya sebep olur. D-Galaktoz uygulaması ile merkezi sinir sistemi, oditör kanal, temporal lob üzerinde yaşlanma modelleri oluşturulmuştur(149,150) ancak deri üzerindeki etkileri ilk olarak bizim çalışmamızda incelenmiştir. D-Galaktoz ile yaşlanma sonrasında deride epidermal incelme, vaskülaritede azalma, melanin pigment artışı, kollajen matürasyonunda azalma olduğu görülmüştür. D-Galaktoz ile yaşlanma sonrasında fibroblast proliferasyonu ve migrasyonunun azalmasına bağlı olarak kollajen sentezi azalmakta, TGF- $\beta$ , FGF ve IGF-1 sekresyonları da azalmaktadır, tüm bu sitokin ve mediatörlerin azalmasına bağlı olarak yara iyileşmesi de gecikmekte, iyileşen yarada deri kalitesi azalmaktadır.

Won- Serk Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada UVB maruziyeti ile ekstrensek yaşlanma modeli oluşturulmuştur. RMX-3W (Handok Biotech, Seul,Korea) isimli UVB ışını yayan sistemle ratların sırtına ortalama 6,9 J/cm<sup>2</sup> dozunda 5kez/hafta olmak üzere 8 hafta boyunca ışınlama yapılmış, UVB uygulaması sonrası dermal fibroblastlarda kollajenaz aktivitesi artışı gösterilmiş. Kollajenaz aktivitesi artışına bağlı olarak epidermal kalınlıkta azalma, kırışıklık oluşumu, deride sararma görülmüş. UVB ışınlaması + ADAS Hücre verilen grupta ise VEGF,HGF( Hepatosit Growth Faktör), IGF, PDGF, TGF-β artışına bağlı olarak dermal fibroblastlardan kollajen sentezinde artış ve buna bağlı olarak epidermal kalınlıkta artma ve dermal kırışıklık oluşumunda azalma olduğu gösterilmiştir. (151)

Ishitsuka ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise UV ışınlaması sonrasında inflamatuvar hücre sayısında artış olduğunu göstermişlerdir. Tirozinaz artışı doğrudan hiperpigmentasyon ve deri yaşlanması ile bağlantılı bulunmuştur.(152)

Dong-Seok ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise yara iyileşmesi ve yaşlanma üzerinde TGF-β uygulaması sonrasında TGF-β'nin MITF ve Tirozinaz aktivitesinde inhibisyon yaparak melanogenezi inhibe ettiği bu etki sonucunda hiperpigmentasyon görülmediği, kırışıklık oluşumunda azalma olduğu gösterilmiştir. (153)



Yara iyileşmesinin ve yaşlanmanın tedavisinde son dönemde azalan ve fonksiyon yitiren maddelerin replasmanı yerine sistemik ya da lokal kök hücre uygulamaları önem kazanmaktadır. Kök hücrelerin farklı doku hücrelere diferansiyasyon olabilmeye yetenekleri nedeni ile rejeneratif tıpta kullanımları giderek artmaktadır. (154) Epidermis bazal tabaka ve kıl folikülleri etrafında bulunmakta olan yetişkin kök hücreler oksidatif hasar ya da yaralanma sonrasında ortamlarında artan mediatörlerin etkisi ile aktive ve diferansiyasyon olarak doku hasarının tamirinde rol alırlar. Yaralanma bölgesine gelerek fibroblast veya myofibroblast yönünde diferansiyasyon olurlar. (155)

Embriyonik kök hücre keşfi daha eskiye dayanmasına rağmen etik ve yasal sorunlar nedeni ile rejeneratif tıpta kullanımları kısıtlı olarak kalmıştır. Embriyonik kök hücreler totipotente oldukları için her türlü doku ve hücreye diferansiyasyon olabilmeye kapasitesine sahiptirler. Embriyonik kök hücre kullanımının diğer dezavantajı ise tümör geliştirme riski olmalarıdır. Embriyonik kök hücre kullanımı sonrasında teratom oluşumu bildirilmiştir. (156)

Yetişkin kök hücreler ise yüzey işaretleyicilerine göre mezenkimal kök hücre, hematopoetik kök hücre ve endotel progenitör kök hücre olarak ayrılırlar, temel görevleri buldukları dokuda hasar sonrası onarım mekanizmasında rol almak ve doku bütünlüğünün devamını sağlamaktır.

En önemli özellikleri;

1-Plastik yüzeye yapışabilmeleri

2-İn vitro kültür ortamlarında uygun diferansiyasyon sinyalleri verildiğinde ostojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma gösterebilmeli,

3-Hücrelerin yüzeyinde yer alan ve hücre sinyal yollarında rol alan farklılaşma kümeleri ( = clusters of differentiation) belirteçlerinden CD 73, CD 90, CD 105'i %95'in üzerinde ekspres etmeli

4-CD 14,CD 19, CD 34, CD 45, HLA-DR belirteçlerini %2'den az ekspres etmelidir.

(103)

Çalışmamızda elde ettiğimiz ADAS hücrelerin akım sitometri analizleri sonucunda hematopoetik kök hücelere ait olan CD 34, CD 45 belirteçlerinin negatif olduğu görüldü. Adipoz doku kökenli kök hücelere ait olan CD 73, CD 105, NG2 sayımlarının %99 oranında pozitif olduğu görüldü.

ADAS Hücrelerin yara iyileşmesi ve oksidatif hasar sonrası iyileşmeyi artırıcı etkileri anjiogenezi uyarıcı etkilerinin yüksek olmasına bağlıdır. VEGF, IGF, HGF, PDGF, KGF, TGF- $\beta$  düzeylerini arttırarak anjiogenezi uyarırlar. KGF artışı sonucu epitelizasyon artar. (157)

Çalışmamızda sakrifikasyon esnasında Grup I ve Grup III'te skar çevresinde yoğun yeni kapiller oluşum gözlemledik. Histolojik incelemelerde grup II ve Grup IV ile karşılaştırıldığında yeni kapiller oluşumu ve oluşan kapillerde çap artışı anlamlı olarak farklı olduğu görüldü. VEGF immunohistokimyasal olarak incelendiğinde en yüksek Grup III'te saptandı. Grup I de saptanan VEGF düzeyinin ise rölatif olarak Grup II'den yüksek olduğu görüldü. Uygulanan kök hücre sayısının artmasına bağlı olarak anjiogeneze artış olduğu ise Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir. UV hasarı sonrasında  $10^5$  adet ADAS hücre uyguladıkları grupta dermis kalınlığı ve yeni sentezlenen kollajen miktarının  $10^3$  ve  $10^4$  adet ADAS hücre uygulanan gruba göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. (158)

ADAS Hücrelerin yara iyileşmesi ve doku hasarındaki diğer bir etkisi de parakrin uyarı ile dermal fibroblastları uyararak kollajen sentezini arttırmalarıdır. (158,159) Çalışmamızda tip 1 kollajen immunohistokimyasal olarak incelendiğinde en yüksek Grup III'te saptandı. Grup I de saptanan tip 1 kollajen düzeyinin ise rölatif olarak Grup II'den yüksek olduğu görüldü. Primer yara iyileşmesi esnasında dermal fibroblastlarca üretilen kollajen miktarının artması sonucunda yeni oluşan skar dokunun kalitesi de artmaktadır. Çalışmamızda 14 ve 28. Günler arasında

karşılaştırma yapıldığında 28. Günde alınan örneklerde daha fazla kollajen miktarına rastlanması yara iyileşme dönemlerinden matürasyon evresinde ADAS hücre etkinliğinin kollajen sentezi üzerinde daha fazla olduğunu göstermektedir.

Gruplara göre tüylenme artışı ve kıl folikül sayısı incelendiğinden fazla tüylenmenin 28. Günde Grup III' te olduğunu gördük. Histomorfolojik olarak da sayım yapıldığında 28. Günde grup III'te kıl folikülü sayısı daha fazlaydı. Grup I'de ise 14 ve 28. Günlerde tüylenme ve kıl folikülü sayısının grup II'den daha fazla olduğu görüldü. Bu bulgulardan yola çıkarak ADAS hücre uygulamasının kıl köküne yerleşen kök hücrelere parakrin yolla etki yaparak uyardığını ve kıl folikülleri üzerinde apoptoz oranını düşürdüğünü söyleyebiliriz.

Oksidatif hasar DNA üzerinde pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirirerek DNA hasarı üzerinden doku hasarı ve yaşlanmaya sebep olmaktadır. (Denham Harman, Free Radical Theory of Aging). DNA bazları içerisinde iyonizasyon potansiyeli düşük olan ve oksitlenmeye en yatkın olan baz Guanindir(Mc Dorman ve arkadaşları 2005). Bakır iyonları polianyonik olan DNA'nın guanin bazına yüksek afinite ile bağlanır. Hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) guanin molekülünün 8. Pozisyonuna eklenir. Bu reaksiyonu ürünü olan C8-OH bir elektron ve bir proton kaybederek *8-OH-d-Guanine* okside olur. Çalışmamızda yara iyileşmesinin 14-28. günlerinde ratların 12 saatlik idrarlarında hasarlı DNA nükleozidi *8-OH-dG*'nin sıvı kromatografi- tandem kütle spektrometresi ile analizinin yaptık. 14. günde alınan sonuçlarda en yüksek değeri grup III'te olduğunu gördük. Grup I ve II'de ise 14. gün ve 28. günlerde alınan değerlerde anlamlı fark olması ise oksidatif hasara bağlı oluşan nükleozid hasarının metabolize edilme hızının zamanla arttığını ve atılımını hızlandığını düşündürdü. Oksidatif hasarın zamana bağımlı bir parametre olduğu ve alınan sonuçların daha geniş gruplarla daha uzun sürede yapılan analizlerle daha güvenilir olacağını düşündürdü.

## **8- SONUÇ VE ÖNERİLER:**

Bu çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin yaşlanma modeli oluşturulmuş ratlarda yaşlanmanın olumsuz etkilerini azaltma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. ADAS hücre uygulamasının azalan moleküllerin replasmanı, etkilenen hücre sayısında proliferasyonun indüklenmesi ve fibroblast ya da endotel hücre yönüne diferansiye olması, parakrin etki ile yara iyileşmesi ve üzerinde etkili olan mediatör salınımını artırması özellikleri nedeni ile oluşan hasarı azaltmada etkili olacağını düşünerek planladık. Ratların inguinal alanından alınan yağ grefti ile ADAS hücre elde ettik. Kültüre edilip, çoğaltılan hücrelerin yüzey belirteçlerini analiz ederek mezenkimal kök hücre olduğunu kanıtladık. Ratların dorsal derisinde insizyonel yara oluşturularak yaşlanma modeli oluşturulmuş grup ile kontrol grubu arasında ADAS hücre etkilerini inceledik.

ADAS hücrelerinin elde edilmesinin zor olması, sayıca az olmaları nedeni ile kültüre edilip çoğaltılmaları gerekmesi, özel merkezlerde üretilip çoğaltılması nedeni ile klinikte kullanımı hala sınırlıdır. Ayrıca uzun pasajlamalar sonrasında malign transformasyon saptanması da ADAS hücrelerin klinikte in vivo kullanımını sınırlamaktadır. (139,148) Bu bulgular sonucunda ADAS hücrelerin malign transformasyon etkilerinin incelenmesi için daha geniş serilerde araştırma yapılması ve in vivo şartlarda net olarak belirlenmesinin daha güvenli olacağını düşünmekteyiz.

Oksidatif hasar parametresi olan 8-OH-d-Guanozin ölçümlerimizde aynı gruplar olan grup I ve Grup II'de 14-28. günler arasında anlamlı fark olması bize oksidatif hasar parametre ölçümünde daha uzun süreli takiplerin daha sağlıklı analizler sunacağı sonucunu düşündürdü.

Bu alışma, yaşlanmanın tetiklendiğinde deride ADAS hücre uygulaması ile kollajen üretimi, kapiller yoğunluk, vasklarizyon ve melanin sentezinde immnuntolerans geliştirerek yaşlanma belirtilerinin azaltıldığını göstermiştir. ADAS hücre uygulamasının deri kalitesinde artış ve yara iyileşmesine olumlu etkileri olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, yaşlanmanın olumsuz etkilerinin geri çevrilmesinde MKH'leri ADAS hücrelerin önemli bir potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur.

## **9-KAYNAKLAR:**

- 1-Tüzün Y,Dolar N,Fotoyaşlanma ve kronolojik yaşlanma arasındaki farklar: 2005;1:1-6
- 2- Allı N. Deri yaşlanmasında hücrel ve moleküler mekanizmalar. T Kin J Kozmetoloji 1998; 1; 10-16.
- 3-S.C. Ho, J.H. Liu, R.Y. Wu, Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose, , Biogerontology. 2003;4(1):15-8
- 4-Yanar K, Aydın S, Cakatay U, Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain model in a mimetic ageing model 2011:109:423-433
- 5-Anand K, Mohamed Jaabir MS, Thomas PA, Geraldine P. Protective role of chrysin against oxidative stress in d-galactose-induced aging in an experimental rat model,2012: 12(4):741-50)
- 6-Lee JC, Greenberg WA, Wong CH. Programmable reactivity-based one-pot oligosaccharide synthesis. Nat Protoc. 2006;1(6):3143-52
- 7-Gerdes AM, Ejlersen B. Inherited breast and ovarian cancers Ugeskr Laeger. 2006;12;168(24):2367-9.
- 8- Cui, P. Zuo, Q. Zhang, X. Li, Y. Hu, J. Long, L. Packer, J. Liu, Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid, J. Neurosci. Res. 83(2006) 1584–1590
- 9-. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. 1994:15:13(24):5818-25

- 10- Molecular and biological control of melanogenesis through tyrosinase genes and intrinsic and extrinsic regulatory factors.1994: 7(6):376-87,
- 11- Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma.2013: 3(8):617-22
- 12- Neuroendocrine functions of melanocytes: beyond the skin-deep melanin maker.2007: 211(3):201-21
- 13-Yılmaz B, Eskiöglu F. Yaşlanma ile birlikte deride gözlenen makroskopik ve histopatolojik değişiklikler. T Kin J Kozmetoloji 1998; 1; 4-9.
- 14- Gilchrest BA, Yaar M. Aging and photoaging of the skin: observations at themolecular level. Br J Dermatol 1992; 127 (Suppl.41): 25-30.
- 15- WestMD. The cellular and molecular biology of skin agiging. Arch Dermatol 1994;130: 87-95.
- 16- Castanet J, Ortonne JP. Pigmentary changes in aged and photoaged skin. ArchDermatol 1997; 133: 1296-1299
- 17- Önder M. Deri yaşlanmasına etki eden faktörler. T Kin J Kozmetoloji 1998; 1; 17-20.
- 18- Yaar M, Gilchrest BA. Aging of Skin.. In: Freedberg MI, Eisen AZ, Wolff K, Austen FK,Goldsmith LA, Katz SI editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6thedition, New York, Mc Grawe-Hill Book Company, 2003: 1386-1398.
- 19-Gilchrest BA, Aging of skin. Dermatology in General Medicine. NewYork, 1987; 146-153)
- 20- Grabb SmithPlastic Surgery 6thEdition 2007p :460
- 21- Chung JH, Hanft VN, Kang S. Aging and photoaging. J Am Acad Dermatol 2003; 49:690-697.

- 22- Cunningham WM. Aging and photoaging. In: Baran R, Maibach H. Textbook of Cosmetic Dermatology, 2 nd edition. London, Martin Dunitz Ltd, 1998; 455-467.
- 23- Yücecan S. Deri yaşlanmasında beslenmenin önemi. T Kin J Kozmetoloji 1998; 1; 27-36.
- 24- Gniadecka M, Nielsen OF, Wessel S et al. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. J Invest Dermatol 1998; 111: 1129-1133.
- 25- Butler RN, Fossel M, Pan CX, Rothman D, Rothman SM. Anti-aging medicine. What makes it different from geriatrics? Geriatrics. 2000 Jun; 55 (6): 36,39-43.
- 26- Lawrence N. New and emerging treatments for photoaging. Dermatol Clin 2000; 18:99-112.
- 27-Barja G. Endogenous oxidative stress: Relationship to aging, longevity and caloric restriction. Ageing Res Rev 2002; 1: 397-411.)
- 28- Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 159-169.
- 29- Martinet W, Knaapen MW, De Mayer GR, Herman AG, Kockx MM. Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. Circ Res 2001; 88: 733-739
- 30-Galaktoz metabolizması Lippincott's Biochemistry 5th Edition sayfa 139
- 31-Dizdaroglu M. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. Free Radic Res. 1998;29(6):551-63.)
- 32-McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products Chem Biol Interact. 2005;15;152(2-3):107-17



- 33-De Martinis BS, de Lourdes Pires Bianchi M. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection. *Pharmacol Res.* 2002;46(2):129-31
- 34-Rodriguez M, Drouin R, Holmquist GP, O'Connor TR, Boiteux S, Laval J, Doroshov JH, Akman SA. Mapping of Cu/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 17633-17640.
- 35- Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999; 443: 37-52
- 36-Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi; B.Debeleş, G. Kantarcı- J. Fac. Pharm. Ankara
- 37-Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 159-169
- 38-Macieira-Coelho A. Cancer and aging. *Exp Gerontol* 1986; 21: 483-495.
- 39- Harman D. The biological clock: The mitochondria. *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 145-147
- 40- Hong HS, Jenner A, Halliwell B. Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with reactive oxygen species: implications for assessment of oxidative damage in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 30;296(4):883-9
- 41- Kasai H Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.* 1997;387(3):147-63

- 42-Kaneko, T., S. Tahara, and M. Matsuo, Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res*, 1996. 316(5-6): p. 277-85.
- 43- Kawanishi, S., Y. Hiraku, and S. Oikawa, Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res*, 2001. 488(1): p. 65-76.)
- 44-Dizdaroglu M., Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*, 2012. 327(1-2): p. 26-47.
- 45- Dizdaroglu, M. and P. Jaruga, Mechanisms of free radical-induced damage to DNA *Free Radic Res*, 2012. 46(4): p. 382-419.
- 46- Jaruga, P., Measurement of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in DNA in vivo by liquid chromatography/isotope-dilution tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 386(4): p. 656-60.
- 47- Kadunce DP, Burr R, Gress R, et al. Cigarette smoking: risk factor for premature facial wrinkling. *Ann Intr Med* 1991; 114: 480-484
- 48-Frances C. Smoker's wrinkles.: epidemiological and pathogenic considerations. *ClinDermatol* 1998; 16: 565-570.)
- 49-Doç. Dr. Ümit TÜRSEN Stres, Hormonlar ve Deri Dermatoz 2011 ; 2(2) 308-319.
- 50- Lawrence N. New and emerging treatments for photoaging. *Dermatol Clin* 2000
- 51-Podda M, Grundmann-Kollmann M, Low molecular weight antioxidants and their role in skin aging. *Clin Exp. Dermatol.* 2001;148:149-57
- 52-Tüzün Y, Garip F, Deri yaşlanmasında beslenmenin önemi T. *Klin. J. Int. Med. Sci* 2006;2:30-4

- 53-Topical Vitamin C: A Useful Agent for Treating Photoaging and Other Dermatologic Conditions *Dermatologic Surgery* 2005
- 54- Iupo MP, antioxidants and vitamins in cosmetics, *Clin. Dermatol.* 2001; 19:467-73
- 55-Oliver Sorg, Stephane Kuenzli, Gürkan Kaya, Jean – Hilaire Saurat. Proposed mechanisms of action for retinoid derivatives in treatment of skin aging *J. Cosmet. Dermatol.* 2005;4:237-44
- 56-Gendler EC, A practical approach to use of retinoids in aging skin *J. Am Acad Dermatol* 1998;39:114-7)
- 57-Otte N, Borelli C, Korting HC, nicotinamid- biologic actions of an emerging cosmetics ingredient. *Int. J. Cosm. Sci* 2005;27:255-61
- 58-Lazarus MC, Baumann LS, The use of cosmeceutical moisturizers. *Derm Ther* 2001;14:200-7
- 59-Chiu A, Kimball AB, Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage 2003: 149:681-9
- 60-Hekimoğlu S, Hıncal AA, Deri yaşlanmasında kozmetiklere bakış, *Kozmetoloji günleri* 1 , 1997: 29-40
- 61-Browder JF, Beers B. Photoaging *Postgrad Med.* 1993: 93(8): 74-92)
- 62-Cadenas E., *Handbook of antioxidants* (2nd ed). Marcel Dekker Incorporated, Newyork; 23:473. (2001
- 63-Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Skin antiaging strategies *Dermato-endocrinology* 2012;4:3:308-319

- 64- Monheit GD, Chastain MA. Chemical peels. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2001; 9:239-55
- 65- Fischer TC, Perosino E, Poli F, Viera MS, Dreno B; Cosmetic Dermatology European Expert Group. Chemical peels in aesthetic dermatology *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24:281-92
- 66-Sadick NS. Update on non-ablative light therapy for rejuvenation: a review. *Lasers Surg Med* 2003 2003; 32:120-8
- 67-Hardaway CA, Ross EV. Nonablative laser skin remodeling. *Dermatol Clin* 2002 2002; 20:97-111.
- 68-, Bjerring P, Christiansen K, Troilius A, Dierickx C. Facial photo rejuvenation using two different intense pulsed light (IPL) wavelength bands. *Lasers Surg Med* 2004: 34:120-6
- 69- Bjerring P, Clement M,Heickendorff L, Egevist H, Kiernan M. Selective non-ablative wrinkle reduction by laser. *J Cutan Laser Ther* 2000: 2:9-15
- 70-Eppley BL, Dadvand B. Injectable soft-tissue fillers: clinical overview. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:98e-106e
- 71- Haneke E. Skin rejuvenation without a scalpel. I. Fillers. *J Cosmet Dermatol* 2006; 5:157-67
- 72- Homicz MR, Watson D. Review of injectable materials for soft tissue augmentation. *Facial PlastSurg* 2004; 20:21-9
- 73-Kim DH, Je YJ, Kim CD, Lee YH, Seo YJ, Lee JH, et al. Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation?Evaluation of Effects of Platelet-ric Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Ann Dermatol*2011; 23:424-31

74- Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62:489-96

75-Moore P, Naumann M. Handbook of Botulinum Toxin Treatment. 2nd ed. Blackwell Science Ltd.USA 2003; 3-76, 343-59

76-Şentürk N, Antiaging tedavi yöntemleri, T Klin J Int Med Sci 2005:1:27-34

77- Huang W, Foster JA, Rogachefsky AS. Pharmacology of botulinum toxin. J Am Acad Dermatol 2000; 43:249-59

78- Rzany B, Ascher B, Monheit GD. Treatment of glabellar lines with botulinum toxin type A (Speywood Unit): a clinical overview. J Eur Acad Dermatol Venereol 2010; 24:1-14;)

79-Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A, DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. N Engl J Med 2006; 355:1647-59)

80-. Sator PG, Schmidt JB, Rabe T, Zouboulis CC. Skin aging and sex hormones in women clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. Exp Dermatol. 2004;13:4:36-40)

81-Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A, Embryonic stem cells; a promising tool for cell replacement therapy J. Cell Mol Med 2004;8:465-73

82- Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM, Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 2003;111:745-53

83- Karaöz E, Ovalı E, Kök Hücreler, Trabzon: Derya Kitabevi, 2004

84- Embriyonik Kök Hücreler, Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008

85-Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. 1989;42:10-23

86- Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. Mol Hum Reprod 2005;11:173-81

87- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 1998;95:379-91.

88- Rippon HJ, Bishop AE, Embryonic Stem Cells Cell Prolif. 2004;37:23-24

89-Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145-7.

90-Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 2000;18:399-404.

91- Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, Seol HW, Kim YY, Park YB, Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. Stem Cells 2005;23:211-9

92- Passier R, Mummery C, Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair Cardiovasc Res 2003;58:324-35 )

93-Gearhart J New potential for human embryonic stem cells. Science 1998;6;282(5391):1061-2

94-De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007 Jan;25(1):100-6)

95-( Wang HS, Hung SC, Peng ST Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord *Stem Cells.* 2004;22(7):1330-7

96-Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature.* 2000;26;407(6807):963-70),

97-Zuk PA, Zhu M, Mizuno H Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28)

98- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Retinal stem cells in the adult mammalian eye *Science.* 2000 Mar 17;287(5460):2032-6.)

99- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):778-84)

100-Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(4):169-83.

101- Prockop DJ . Marrow Stromal Cells As StemCells For Nonhematopoietic Tissues. *Science.*1997: 276:71-4.

102- Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC . Marrow Stromal Cells For Cellular Cardiomyoplasty: Feasibility And Potential Clinical Advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 120:9991006.

103-International Society for Cellular Therapy ISCT; Regulatory Strategies for Early-Stage Development of Cell Therapy Products – C. Holloway VE International Regulatory Approaches to Cell Therapy - Australia – K. Atkinson)

104-Jones S, Horwood N, Cope A, the antiproliferative effect of mesencymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells J Immunol, 2007;179(5):2824-31

105- Le blanc K, Frassoni F, Ball L, Mesencymal stem cells for treatment of steroid-resistant ,severe,acute GVH disease ; a phase II study, Lancet 2008;371(9624):1579-86)

106-Arnold I. Caplan,James E. Dennis. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators Journal of Cellular Biochemistry 2006;98:1076–1084)

107- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells Mol Biol Cell 2002;13(12):4279-95)

108- Yoshimura K, Shiguera T, Matsumoto D, et al. Characterization 52. of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. J. Cell Physiol 2006;208: 64-76.)

109- Özlem A. Gündeşlioğlu, Zeynep Karaçor, Bilsev İnce. Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler ve Plastik Cerrahide Kullanım Alanları. Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi sayı 3 Cilt 21 2013

110-Adipose derived stem cells for regenerative medicine Circ. Res. 2007;100;1249-1260

111-Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering. versus regenerative medicine. J Cell Physiol, 2007; 213: 341-7.



- 112- Zuk PA, The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead, *Mol Biol Cell* 2010;21(11): 1783-7)
- 113- Kang SK, Putman LA, Ylostalo J, Popescu IR, Neurogenesis of rhesus adipose stromal cells *J Cell Sci* 2004;117(18):4289-99)
- 114-Kim WS, Park BS, Kim HK, Evidence supporting antioxidant action of adipose derived stem cells,: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress, *J Dermatol Sci.* 2008;49(2):133-42
- 115-Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest* 1973; 29(5):570–6.
- 116- Strem BM, Hicok KC, Zhu M et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54(3):132–41).
- 117- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, adipose derived stem cells : isolation, expansion and differentiation *Methods* 2008;45(2):115-20)
- 118- Grabb and Smith 6th edition *Wound healing :normal and abnormal*
- 119-Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.)
- 120- Complex wounds and their management. 2010 90(6):1181-94
- 121- Broughton G, Janis JE, Attiger CE, the basic science of wound healing, *Plast reconstr surg* 2006;117:12-34
- 122- Goldberg SR, Diegelmann RF, *Wound healing primer.* *Surg Clin North Am.* 2010;90(6):113-46

123- Broughton G, Janis JE, Attinger CE The basic science of wound healing. *Plast Recons Surg* 2006;117:12-34)

124- Kirsner R. Wound Healing. In: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, eds. *Dermatology*. 2nd ed.: Mosby Elsevier, 2008 (vol 2):2147-58.)

125- Yara iyileşmesi ve yara bakımı, Doç. Dr. Koray ÖCAL Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Ders Notları

126-Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9:777-794.)

127- Bhisitkul RB.: Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1542-1547.

128- Ferrara, N.: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress *Endocr Rev* 2004 Aug;25:581-6111)

129- Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-21.)

130- .(Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 expression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003; 11:915-26.

131- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425: 577-84.)

132-Miyazone K, Oloffson A, Colosetti P, Holding CH. A role of the latent TGF-  $\beta$ 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- $\beta$ 1. EMBO J. 1991;10: 1091–1110.)

133-. O'Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. Clin Exp Dermatol 2001;26:525-30. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev 2003;83:835-70.)

134-Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AM. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. Int J Low Extrem Wounds 2003;2:60-8.)

135-Johnstone CC, Farley A. The physiological basics of wound healing. Nurs Stand 2005;19:59-65

136-. Gelse K, Pöschl E, Aigner T, Collages-structure,function and biosynthesis Adv Drug Deliv Rev 2003;28:55(12):1531-46

137- Joan L, Monaco W, Thomas L. Acute wound healing Clinics in Plast Surg 2003: 30(1):1-12)

138- Lischka DJ, Reed MJ, Sage EH, Cell spesific expression of  $\alpha$ -1 collagen Hgh minigenes in transgenic mice. J Cell Biol 1994;125(3):695-704

139-Rosenzweig A. Endothelial progenitor cells. N Engl J Med 2003;348:581-2.,

140- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med 2006;354:610-21.)

141- Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. Clin Dermatol 2007;25:9-18.

142-Kuang-Hung Cheng, Tzu-Lei Kuo, Kung-Kai Kuo, Chang-Chun Hsiao Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences (2011) :3: 53-62)

143- Cilaker Micili S, Göker A, Sayın O, Akokay P, Ergür BU. The effect of lipoic acid on wound healing in a full thickness uterine injury model in rats. J Mol Hist. (2013) 44:339–345.

144-Tuzun F, Gencpinar P, Ozbal S, Dilek M, Ergur BU, Duman N, et al. Neuroprotective effect of neotrofin in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia. Neurosci Lett 2012;520(1):6-10

145- Jaruga, P. and M. Dizdaroglu, Identification and quantification of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in human urine as putative biomarkers of oxidatively induced damage to DNA. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 397(1): 48-52.

146- Jaruga, P., H. Rodriguez, and M. Dizdaroglu, Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. Free Radic Biol Med, 2001. 31(3):336-44.

147-.Cunningham WM. Aging and photoaging. Baran R, Maibach H. Textbook of Cosmetic Dermatology, 2 nd edition. London, Martin Dunitz Ltd, 1998; 455-467.)

148-Rogers G: The senile epidermis. 3rd International Congress on Cosmetic Dermatology, Vienna, 1989. Smith L: Histopathologic characteristics and ultrastructure of aging skin. *Cutis* 198;43:414-424.)

149- Impairments of astrocytes are involved in the D-galactose-induced brain aging *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;369:1082–1087,

150-Age-related changes in the central auditory system: Comparison of D-galactose-induced aging rats and naturally aging rats *Brain Research* 2010;134:443–53 )

151-Won-Serk Kim, Byung-Soon Park, So-Hyun Park, Hyung-Ki Kim, Jong-Hyuk Sung Antiwrinkle Effect of Adipose-derived Stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors *Journal of Dermatological Science* 2009;53:96-102)

152-Ishitsuka Y, Maniwa F, Koide Y, Nakamura Y, Increased halogenated tyrosine levels are useful markers of human skin aging, reflecting proteins denatured by past skin inflammation. *Experimental Dermatology* 2011; 37:252-258)

153- (Dong-Seok Kim, Seo-Hyoung Park, Kyoung-Chan Park Transforming growth factor  $\beta_1$  decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *The International Journal of Biochemistry & cell biology* 2004;36:1482-1491)

154-Won-Serk Kim, Byung-Soon Park, Jong-Hyuk Sung, Protective role of Adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch. Dermatol. Res.* 2009;301:329-336)

155-Verstappen J, Katsaros C, Kuijpers-Jagtman AM, the recruitment of bone marrow-derived cells to skin wounds is independent of wound size. *Wound Repair Regen.* 2011;19(2):260-7)

156- (Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in development of stem cell therapy. J. Transl Med. 2011;9:29)

157- Byung-Soon Park, Kyoung AE Jang, Jong-Hyuk Sung. Adipose derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging Dermatol Surger 2008;34:1323-1326)

158-Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Antiwrinkle effect of adipose derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. J. Dermatol. Scien 2009;53(2):96-102)

159- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci. 2007;48(1):15-24. )