T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN KERATİNOSİTLERİ İLE OLUŞTURULAN İN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİNE GÖBEK KORDONU MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ ve HİPERGLİSEMİK ORTAMIN ETKİLERİ

Furkan Paşa DİRİARIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nermin YELMEN
(danışman imzalı olacaktır)
II. DANIŞMAN
Dr. Aykut ORUÇ

Fizyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalı

Fizyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Mart, 2025

TEZ KABUL VE ONAYI

Furkan Paşa DİRİARIN tarafından, **Prof. Dr. Nermin YELMEN** danışmanlığında hazırlanan "İNSAN KERATİNOSİTLERİ İLE OLUŞTURULAN İN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİNE GÖBEK KORDONU MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ ve HİPERGLİSEMİK ORTAMIN ETKİLERİ" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **00/03/2025** tarihinde yapılan sınav sonucunda **….** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Nermin YELMEN İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Furkan Paşa DİRİARIN
(İmza)

Aileme ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

İNSAN KERATİNOSİTLERİ İLE OLUŞTURULAN İN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİNE GÖBEK KORDONU MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ ve HİPERGLİSEMİK ORTAMIN ETKİLERİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 37868

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının tamamlanmasında bana her daim rehberlik eden, anlayışı, sabrı ve hoşgörüsüyle destek olan, aktardığı her bilgiyle bilimsel düşünce, analiz ve eleştirel bakış açımı geliştirmemde büyük katkıları olan kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nermin YELMEN'e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca fikir ve değerlendirmeleriyle bana yol gösterip rehberlik eden Anabilim Dalı Başkanımız Sayın, Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK'e;

Bilgi birikimleriyle yolumu aydınlatan ve derslerini büyük keyifle takip ettiğim pek değerli hocalarım Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ, Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN'e;

Yaratıcı fikirleri ve modern bilimsel yaklaşımlarıyla bu tezin konusunun şekillenmesine ve çalışmamın gelişimine çok değerli katkılar sunan ikinci danışman hocam Uzm. Dr. Aykut ORUÇ'a;

Tez projemin temel taşı olan insan keratinosit hücre hattını sağlayıp laboratuvar imkanlarını cömertçe paylaşan ve deneylerime emekleriyle çok önemli katkılar yapan Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. Dr. Öğr. Üyesi Gökhan AĞTÜRK'e; yolun en başından beri bana mentorluk yapan, değerli tecrübe ve fikirlerini aktaran, her zaman öğütleriyle doğru yolu işaret eden sevgili ablam İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. Arş. Gör. Yağmur ORUÇ'a ve biyokimyasal analizlerimin tamamlanmasında emeği geçen İstinye Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.D. Arş. Gör. Mert GEÇİM'e ve son olarak;

Hayatımın her anında bana sevgilerini, desteklerini ve sonsuz fedakarlıklarını esirgemeyen sevgili annem Muazzez DİRİARIN ve sevgili babam Mehmet Emin DİRİARIN'a,

Minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mart 2025 Furkan Paşa DİRİARIN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xvi**
ABSTRACT ..... **xviii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **4**
2.1. DERİ YAPISI 4
2.2. YARA İYİLEŞME SÜRECİ 6
2.3. YARA İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER 9
2.3.1. Lokal Faktörler 9
2.3.2. Sistemik Faktörler 10
2.4. YARAYA UYGULANAN TEDAVİ YÖNTEMLERİ 13
2.5. EKSOZOM 14
2.5.1. Eksozomların Biyolojik Bileşimi 15
2.5.2. Eksozom Biyogenezi 17
2.5.3. Yara İyileşmesinde Eksozom Kullanımı 18
2.6. ÇALIŞMANIN AMACI 21
3. YÖNTEM **22**
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Sarflar ve Cihazlar 22
3.2. Hücre Kültürü Deney Modelinin Oluşturulması 23
3.2.1. Hücrelerin Ekimi 23
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması 23

3.2.3. Canlı Hücrelerin Sayımı 24
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması 24
3.3. MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ 24
3.4. ÇİZİK YARA MODELİ 25
3.5. ELISA ANALİZİ 28
3.6. BİYOKİMYA ANALİZİ 29
3.6.1. Glutatyon Analizi 30
3.6.2. Malondialdehit Analizi 30
3.6.3. Protein Analizi 30
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 31
4. BULGULAR 32
4.1. MTT TESTİ BULGULARI 32
4.2. YARA MODELİ BULGULARI 34
4.3. ELISA BULGULARI 39
4.4. BİYOKİMYA BULGULARI 43
5. TARTIŞMA 45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR 56
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 67
ETİK KURUL İZİN YAZISI 68
KURUM İZNİ YAZILARI 69
ÖZGEÇMİŞ 70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1: Farklı cilt katmanlarını ve bileşenlerini gösteren temel insan deri anatomisinin şematik gösterimi [24]. 5

Şekil 2. 2: Epidermis tabakasının yapısı [23]. 6

Şekil 2. 3: Yara iyileşmesinin aşamaları [24]. 7

Şekil 2. 4: Eksozomun yapısal bileşenleri [77]. 16

Şekil 2. 5: Eksozom biyogenezi [77]. 18

Şekil 3. 1: Çizik yara modelinin şematik gösterimi [104]. 25

Şekil 3. 2: HaCaT hücrelerinin ekimi yapılan plakalar, plakalarda çizik yara modeli oluşturulması, yara modelinin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi. 26

Şekil 3. 3: Eksozomların hücre kültürü yara iyileşmesi modelinde kullanımı ve konsantrasyonları. 27

Şekil 3. 4: Çalışmamızda kullanılan ELISA kit içeriği, plakada oluşan kolorimetrik değişim, spektrofotometrik okuma yöntemi. 28

Şekil 3. 5: Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi. 29

Şekil 4. 1: 50k ve 50M partikül konsantrasyonu aralığında değişen hUC-MSC-Exo dozlarının HaCaT hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca metabolik aktivite üzerindeki etkileri. 32

Şekil 4. 2: 50k ve 50M partikül konsantrasyonu aralığında değişen hUC-MSC-Exo dozlarının HaCaT hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca metabolik aktivite üzerindeki etkileri. 33

Şekil 4. 3: 50k ve 50M partikül konsantrasyonu aralığında değişen hUC-MSC-Exo dozlarının HaCaT hücrelerinde 72 saatlik inkübasyon süresi boyunca metabolik aktivite üzerindeki etkileri. 34

Şekil 4. 4: Normoglisemik ortamda kontrol, 25M p/ml eksozomlu, 50M p/ml eksozomlu gruplar arasındaki 0-12-24-48. saatlerde gerçekleşen yara hattı kapanma yüzdeleri (% değer olarak verilmiştir). 35

Şekil 4. 5: Normoglisemik ortamda in-vitro çizik yara iyileşmesi deneyinde ana hatları sarı renk ile çizilen başlangıç hücresi bölgeye hücre göçü ve yara kapanmasının 0., 12., 24., ve 48. saatlerdeki görsel karşılaştırması. Ölçek çubuğu 20 µm'dir. 36

Şekil 4. 6: Hiperglisemik ortamda kontrol, 25M p/ml eksozomlu, 50M p/ml eksozomlu gruplar arasındaki 0-12-24-48. saatlerde gerçekleşen yara hattı kapanma yüzdeleri (% değer olarak verilmiştir). 37

Şekil 4. 7: Hiperglisemik ortamda in-vitro çizik yara iyileşmesi deneyinde ana hatları sarı renk ile çizilen başlangıç hücresi bölgeye hücre göçü ve yara kapanmasının 0., 12., 24., ve 48. saatlerdeki görsel karşılaştırması. Ölçek çubuğu 20 µm'dir. 38

Şekil 4. 8: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası Hidroksipirolin nmol/L 12-48. Saatlerdeki ELISA analizi sonuçları. 40

Şekil 4. 9: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası Trombospondin-1/ ng/ml 12-48. saatlerdeki ELISA analizi sonuçları. 41

Şekil 4. 10: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası IL-8 ng/L 12-48. saatlerdeki ELISA analizi sonuçları. 42

Şekil 4. 11: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası Distonin ng/L 12-48. saatlerdeki ELISA analizi sonuçları. 43

Şekil 4. 12: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası MDA µg/mL 12-48. saatlerdeki biyokimya analizi sonuçları. 44

Şekil 4. 13: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası GSH µg/L 12-48. saatlerdeki biyokimya analizi sonuçları. 45

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3. 1: ELISA kitlerinde kullanılan standart ve seri dilüsyon konsantrasyonları.....28

Tablo 4. 1: Hiperglisemik ortam yara alanı mesafesi ortalama değerleri.....38

Tablo 4. 2: Normoglisemik ortam yara alanı mesafesi ortalama değerleri.....36

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
p	: Partikül
p/mL	: Partikül/mililitre
M	: Milyon
k	: Yüzbin

Kısaltmalar	Açıklama
AD	: Adipoz doku
AD-MSC	: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
ATP	: Adenozin trifosfat
Alix	: Programlanmış hücre ölümü 6 ile etkileşen protein
BM	: Kemik iliği
BM-MSC	: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
BP230	: Büllöz pemfigoid 230 kDa protein
BPAG1e	: Büllöz pemfigoid antijen 1
CD37	: Diferansiyasyon kümeleri 37
CD53	: Diferansiyasyon kümeleri 53
CD63	: Diferansiyasyon kümeleri 63
CD81	: Diferansiyasyon kümeleri 81
CD82	: Diferansiyasyon kümeleri 82
CD9	: Diferansiyasyon kümeleri 9
CHMP3	: Multiveziküler gövde proteini 3
CHMP4	: Multiveziküler gövde proteini 4

CHMP6 : Multiveziküler gövde proteini 6
CO2 : Karbondioksit
Col I : Tip 1 kolajen
Col III : Tip 3 kolajen
Ctl : Kontrol
CTL-H-12h : Hiperglisemik kontrol grubu 12. saat
CTL-H-48h : Hiperglisemik kontrol grubu 48. saat
CTL-N-12h : Normoglisemik kontrol grubu 12. saat
CTL-N-48h : Normoglisemik kontrol grubu 48. saat
DAMP : Hasar ilişkili moleküler desenler
DFU : Diyabetik ayak ülseri
DMEM : Dubbelco'nun modifiye edilmiş besiyeri
DMSO : Dimetilsülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
ECM : Ekstraselüler matriks
EDTA : Etilendiamintetraasetik asit
EGF : Epidermal büyüme faktörü
ELISA : Enzim bağlantılı immünosorbent analiz
ESCRT : Taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi
EV : Ekstraselüler vezikül
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
FGF-2 : Fibroblast büyüme faktörü 2
GC : Glukokortikoid
GSH : Glutatyon
GTPaz : Guanosin trifosfataz
HE-25M-12h : 25 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren hiperglisemik grubu 12. saat
HE-25M-48h : 25 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren hiperglisemik grubu 48. saat
HE-50M-12h : 50 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren hiperglisemik grubu 12. saat
HE-50M-48h : 50 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren hiperglisemik grubu 48. saat
HGF : Hepatosit büyüme faktörü
HRP : Yabanturbu peroksidazı
HaCaT : İnsan keratinosit hücreleri
Hrs : Hepatosit büyüme faktörüyle düzenlenen tirozin kinaz substratı
Hyp : Hidroksipirolin

IL-1 : İnterlökin 1
IL-10 : İnterlökin 10
IL-17 : İnterlökin 17
IL-1α : İnterlökin 1 alfa
IL-1β : İnterlökin 1 beta
IL-6 : İnterlökin 6
IL-8 : İnterlökin 8
ILV : İntraluminal vezikül
IgG : İmmünoglobülin G
LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAPK : Mitojenle aktive olan protein kinaz
MDA : Malondialdehit
MMP : Matris metalloproteaz
MSC : Mezenkimal kök hücre
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVB : Multiveziküler cisimcik
NAD : Nikotinamid adenin dinükleotit
NE-25M-12h : 25 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren normoglisemik grubu 12. saat
NE-25M-48h : 25 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren normoglisemik grubu 48. saat
NE-50M-12h : 50 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren normoglisemik grubu 12. saat
NE-50M-48h : 50 milyon p/mL hUC-MSC-Exo içeren normoglisemik grubu 48. saat
OD1 : Optik dansite 1
OD2 : Optik dansite 2
PBS : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDGF : Trombosit kökenli büyüme faktörü
PDGF-BB : Trombosit kökenli büyüme faktörü BB
PI3P : Fosfatidilinositol-3-fosfat
RNA : Ribonükleik asit
ROS : Reaktif oksijen türleri
SCF : Kök hücre faktörü
SNARE : Çözünür NSF bağlantı proteini reseptörü
SOD : Süperoksit dismutaz
TGF : Transforming büyüme faktörü
TGF-β : Transforming büyüme faktörü beta

TGFBR1 : Transforming büyüme faktörü beta reseptörü 1
TGFBR2 : Transforming büyüme faktörü beta reseptörü 2
TMB : 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine
TLR : Toll-like reseptör
TNF : Tümör nekroz faktörü
TNF-α : Tümör nekroz faktörü alfa
TSG101 : Tümör duyarlılık geni 101
TSP-1 : Trombospondin 1
TfR : Transferin reseptörü
Th1 : Tip 1 yardımcı T-hücresi
UACR : İdrar albümin ve kreatinin oranı
UC : Göbek kordonu
UC-MSC : Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücre
UV : Ultraviyole
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Vps4 : Vakuoler protein sıralama 4
Wnt4 : Wingless ilişkili integrasyon alanı 4
eGFR : Tahmini glomerüler filtrasyon hızı
hUC-MSC-Exo : İnsan göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri kaynaklı eksozom
hUCB-MSC : İnsan kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücreleri
hUCB-MSC-Exo : İnsan kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomları
iPSC : İndüklenmiş pluripotent kök hücre
lncRNA : Uzun kodlanmayan RNA
mRNA : Mesajcı RNA
miRNA : Mikro RNA
ncRNA : Kodlanmayan RNA
piwi : P-element kaynaklı wimpy testis
rRNA : Ribozomal RNA
snRNA : Küçük nükleer RNA
α-SMA : Alfa düz kas aktini

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN KERATİNOSİTLERİ İLE OLUŞTURULAN İN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİNE GÖBEK KORDONU MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ VE HİPERGLİSEMİK ORTAMIN ETKİLERİ

Furkan Paşa DİRİARIN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalı

Fizyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman : Prof. Dr. Nermin YELMEN

II. Danışman : Dr. Aykut ORUÇ

Akut ve kronik yaraların iyileştirilmesinde, hem geleneksel hem de rejeneratif tedavi yöntemleri tercih edilir. Akut yaraya kıyasla, kronik yara tedavi sürecinin daha uzun ve zorlu olması rejeneratif yaklaşımlara kapı açar. İyileşme bozukluğu ile karakterize diyabetik yaralar, kronik yapıları ve karmaşıklıkları nedeniyle klinik tedavi aşamasında zorluk teşkil eder. Başlangıçta canlı hücre uygulamasını içeren rejeneratif tedavi yöntemleri, zamanla geliştirilerek günümüzde yalnızca hücresel ajanların kullanıldığı 'hücresiz tedavi' düzeyine ulaşmıştır. Hücreler tarafından salgılanan ekstraselüler veziküllerin bir türü olan eksozomlar, kaynaklandıkları hücrenin ana parakrin özelliklerini taşır ve zengin hücresel materyal içerikleri sayesinde migrasyon ve proliferasyon gibi yara iyileşmesine dahil olan fizyolojik mekanizmaları tetikleme özelliklerine sahiptir.

Çalışmamızda hiperglisemik ve normoglisemik ortamlarda kültürlenen insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ile oluşturulan çizik yara modeli üzerinde insan göbek kordonu kaynaklı

mezenkimal kök hücre eksozomlarının (hUC-MSC-Exo) yara iyileştirici etkileri in vitro ortamda incelendi.

HaCaT yara modeline hUC-MSC-Exo uygulaması sonucunda hem normoglisemik hem de diyabetik ortamı taklit eden hiperglisemik gruplarda artan hücresel canlılık oranı; migrasyon ve proliferasyon olayları, bozulmuş yara iyileşmesiyle ilişkilendirilen fizyolojik mekanizmalarda görevli trombospondin 1 (TSP-1), BPAG1e (BP230) ilişkili distonin, interlökin 8 (IL-8) ve hidroksiprolin (Hyp) düzeyleri ELISA ile analiz edildi. Oksidan/antioksidan oranını gösteren malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ise biyokimyasal olarak analiz edildi.

hUC-MSC-Exo uygulamasının, in vitro yara iyileşmesini normoglisemik ve hiperglisemik ortamlarda zaman-doz bağımlı olarak hızlandırdığı belirlendi. 25 milyon partikül/mL ve 50 milyon partikül/mL hUC-MSC-Exo konsantrasyonlarının hücrelerde metabolik aktiviteyi artırdığı, bu konsantrasyonlar aşıldığında metabolik aktivitenin etkilenmediği, normoglisemik ve hiperglisemik ortamlarda 25M p/ml hUC-MSC-Exo dozunun zamana bağlı olarak en etkili/ideal doz olduğu saptandı. Hem normoglisemik hem de hiperglisemik gruplarda hUC-MSC-Exo uygulamasının kontrol gruplarına kıyasla keratinosit migrasyonunu, yara kapanma oranını; BP230, TSP-1 ve Hyp düzeylerini artırırdığı gözlendi. Bu artıştan hUC-MSC eksozomlarının keratinositlerde çeşitli hücresel sinyal yolakları ve büyüme faktörü sentezlerini uyararak, aynı zamanda içerdiği metabolik düzenleyiciler aracılığıyla yaptığı saptandı. Çalışmamızda aynı zamanda, hem normoglisemik hem de hiperglisemik gruplarda keratinositlerden akut dönemde IL-8 sentezini uyararak yara iyileşmesinin inflamatuar fazını tetiklediği, kronik dönemde ise düşürerek yara iyileşmesinin proliferatif evresine katkı sağladığı belirlendi.

Çalışmamızda diyabette bozulmuş yara iyileşmesiyle ilişkili patofizyolojik mekanizmalarda yer alan moleküllerin rolünü hUC-MSC-Exo tedavisi ile birlikte açıklamaya çalıştık.

Mart 2025 , 89. sayfa.

Anahtar kelimeler: Eksozom, Hiperglisemik ortam, Yara iyileşmesi, Diyabet, Keratinosit

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

THE EFFECTS OF UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELL EXOSOMES AND HYPERGLYCEMIC ENVIRONMENT ON AN IN VITRO WOUND HEALING MODEL CREATED WITH HUMAN KERATINOCYTES

Furkan Paşa DİRİARIN

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Physiology

Physiology Master Programme

Supervisor : Prof. Dr. Nermin YELMEN

Co-Supervisor : Dr. Aykut ORUÇ

Both conventional and regenerative treatment modalities are preferred for the treatment of acute and chronic wounds. Compared to acute wounds, the chronic wound treatment process is longer and more challenging, opening the door to regenerative approaches. Diabetic wounds, characterized by impaired healing, pose a challenge in the clinical treatment phase due to their chronic nature and complexity. Regenerative treatment methods, which initially included the application of living cells, have been developed over time and have reached the level of 'cell-free treatment' where only cellular agents are used today. Exosomes, a type of extracellular vesicles secreted by cells, carry the main paracrine properties of the cell from which they originate and have the ability to trigger physiological mechanisms involved in wound healing such as migration and proliferation thanks to their rich cellular material content.

In our study, the wound healing effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell exosomes (hUC-MSC-Exo) on the scratch wound model created with human keratinocyte cell line (HaCaT) cultured in hyperglycemic and normoglycemic environments were examined in vitro.

Increased cellular viability rate in both normoglycemic and hyperglycemic groups mimicking diabetic environment as a result of hUC-MSC-Exo application to HaCaT wound model; migration and proliferation events, thrombospondin 1 (TSP-1), BPAG1e (BP230) related dystonin, interleukin 8 (IL-8) and hydroxyproline (Hyp) levels involved in physiological mechanisms associated with impaired wound healing were analyzed by ELISA. Malondialdehyde and glutathione levels, which indicate the oxidant/antioxidant ratio, were analyzed biochemically.

It was determined that hUC-MSC-Exo administration accelerated in vitro wound healing in normoglycemic and hyperglycemic environments in a time-dose dependent manner. 25 million particles/mL and 50 million particles/mL hUC-MSC-Exo concentrations increased metabolic activity in cells, metabolic activity was not affected when these concentrations were exceeded, and 25M p/ml hUC-MSC-Exo dose was found to be the most effective/ideal dose in normoglycemic and hyperglycemic environments in a time-dependent manner. In both normoglycemic and hyperglycemic groups, hUC-MSC-Exo administration increased keratinocyte migration, wound closure rate, BP230, TSP-1 and Hyp levels compared to control groups. This increase was attributed to hUC-MSC exosomes stimulating various cellular signaling pathways and growth factor synthesis in keratinocytes, as well as through the metabolic regulators it contains. In our study, it was also determined that hUC-MSCs triggered the inflammatory phase of wound healing by stimulating IL-8 synthesis from keratinocytes in the acute phase and contributed to the proliferative phase of wound healing by decreasing it in the chronic phase in both normoglycemic and hyperglycemic groups.

In this study, we tried to explain the role of molecules involved in the pathophysiological mechanisms associated with impaired wound healing in diabetes with hUC-MSC-Exo treatment.

March 2025, 89. pages.

Keywords: Exosome, Hyperglycemic environment, Wound healing, Diabetes, Keratinocyte

1. GİRİŞ

İnsan vücudundaki en büyük organ olarak kabul edilen deri, ortalama 1,85 m2'lik bir yüzey alanını kaplarken, toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Derinin en önemli işlevi; mikrobiyal patojenlere, toksik ajanlara, ultraviyole (UV) ışığa ve mekanik yaralanmalara karşı fiziksel bir bariyer oluşturmaktır [1]. Bu fiziksel bariyerin bütünlüğü bozulduğu zaman, oluşan hasarı onarmak ve deri bütünlüğünü geri kazandırmak için karmaşık ve senkronize şekilde ilerleyen hücresel ve moleküler olaylar meydana gelir. Bu süreçte meydana gelen kusurlar, uygunsuz onarımların gelişmesine sebebiyet vererek akut ya da kronik yara oluşumuna neden olabilir [2].

Akut yaralar; cerrahi yaralar, ısırıklar, yanıklar, sıyrıklar, küçük kesikler ile şiddetli travmatik kesikler, ezilme veya ateşli silah yaralanmaları sonucu oluşabilir. Akut yaralar sonucunda genellikle kısa bir süre içinde deride kaliteli bir iyileşmenin gerçekleştiği görülür [3]. Kronik yaraların iyileşme süresi ise yara bölgesinde oluşan enfeksiyon ve sıvı kaybı gibi nedenlerle yavaşlar. Kronik yaralar endojen mekanizmalar tarafından, genellikle dermal ve epidermal doku bütünlüğünü bozan durumlara bağlı olarak oluşur. Örneğin bacak ülseri, ayak ülseri ve bası yarası gibi kronik yaraların oluşumu, bozulmuş arteriyel beslenmenin, bozulmuş venöz drenajın veya diyabet gibi metabolik hastalıkların bir sonucudur. Deri bütünlüğünü bozarak milyonlarca hastayı negatif yönde etkileyen kronik yaralar, küresel sağlık sistemlerine oldukça büyük ekonomik ve toplumsal sorunlar getirir [4, 5, 3].

Geleneksel ve rejeneratif tedavi yöntemleri kullanılarak deri yaralarının tedavisi gerçekleştirilir. Geleneksel tedavi yöntemlerinde temel olan düzenli pansuman ve debridman uygulamaları, enfeksiyonu kontrol altına almayı amaçlar [3]. Yara iyileşmesinde kullanılan rejeneratif tedavi yöntemleri arasında; kök hücre tedavisi, gen terapisi, çeşitli büyüme faktörlerinin kullanımı, biyomühendislik ürünü olan deri ikameleri ve yara örtüleri gibi biyoaktif materyallerin kullanımı bulunur. Bu yöntemlerin kullanımı yara izi oluşumunu azaltırken, daha kaliteli bir yara iyileşme süreci sağlar [6, 7].

Son dönemlerde özellikle indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) ve mezenkimal kök hücreler (MSC) gibi farklı kök hücre türlerinin kullanımını kapsayan rejeneratif tedavi yöntemlerine ilgi önemli seviyede artmıştır. Bu tedavi yöntemleri klinik ve klinik öncesi çalışmalarla aktif olarak araştırılmaktadır [8]. MSC'lerin yara onarımında ve cilt

yenilenmesinde kullanımı ile ilgili büyük ilerlemeler kaydedilmiştir, ancak kök hücre tedavisinin doğasında bulunan bazı sınırlamalar vardır. Bunlar arasında kök hücrelerin farklı özelliklere sahip olmasından ötürü oluşan heterojenite durumu, hücrelerin sınırlı hayatta kalma ve dayanıklılık sorunları, tümör oluşturma riski ve kök hücre uygulanacak hastanın yaş ve sağlık durumu gibi faktörler bulunmaktadır. Bu sınırlamaların sonucu olarak, MSC kaynaklı eksozomların bir tedavi ajanı olarak kullanımı, potansiyel hücresiz bir strateji olarak ilgi çekmektedir [9].

Eksozomlar, kan, idrar ve hücre kültürü besiyeri dahil olmak üzere birçok ve belki de tüm ökaryotik sıvılarda bulunan hücre kökenli küçük veziküllerdir [10]. Eksozomlar; sitokinler, proteinler, lipitler, mRNA'lar, miRNA'lar, kodlanmayan RNA'lar (ncRNA'lar), ribozomal RNA'lar (rRNA'lar), sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere çok çeşitli içeriğe sahiplerdir [11].

Eksozomların bağışıklık regülasyonu, vasküler rejenerasyonun teşvik edilmesi, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, migrasyon, apoptoz, vücudun fizyolojik durumunun korunması ve hastalık süreçlerine katılım gibi oldukça önemli işlevleri vardır [12]. MSC kaynaklı eksozomlar, kendi kendini onarma ve doku rejenerasyonunu destekleme, doku homeostazını geri kazandırabilme ve yaralanma bölgelerindeki yara onarımını hızlandırabilme gibi özelliklere sahip, kaynağı oldukları hücrelerin etkilerine sahiptirler [13]. MSC'lerle karşılaştırıldığında, MSC kaynaklı eksozomlar; doğrudan hedef hücrelerle kaynaşıp yoğun biyolojik etkiler oluşturma, kolayca bozulmayan plazma zarı sayesinde taşınabilme ve -70 °C'de uzun süre saklanabilme, kullanım dozu-metodu-süresi gibi parametrelerin kolayca kontrol edilebilir olması gibi avantajlara sahiptir. Ek olarak doku reddi ve tümör oluşumu riski olmaması eksozom kullanımının en büyük avantajıdır [14].

Eksozom bazlı tedaviler, genellikle kronik yaraların nedeni olan diyabet gibi metabolik hastalıkların tedavisinde umut vaat etmektedir. Diyabetin yara iyileşmesi üzerindeki etkisini anlamak, yeni tedavi yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmek için gereklidir. Diyabetik yara iyileşmesine farklı bir açıdan bakmayı sağlayacağımız projemizde hem kök hücre kaynaklı eksozom kullanımının diyabetik yara iyileşmesi üzerindeki etkinliğinin in vitro değerlendirmesini ayrıntılı bir şekilde inceleyip patofizyolojik mekanizmasını aydınlatacak, hem de daha önceden üzerinde çalışma yapılmamış olan bu konuya yeni bir terapötik yaklaşım getirerek diyabetik yara iyileşmesi alanındaki önemli bir boşluğu doldurmayı hedeflemekteyiz.

Hiperglisemik koşullarda keratinosit göçü engellenir ve yara iyileşme sürecinde gecikme meydana gelir. Bu durumda keratinositlerden salınan interlökin (IL-8) ve trombospondin-1 (TSP-1) seviyelerindeki artışla iyileşmede gecikme daha fazla uzar. Bu maddeler sırasıyla inflamatuar yanıtlar ve fibrozis ile ilişkili olduğundan dolayı iyileşmede güçlük yaşanır. Keratinositlerin bozulmuş göçü ve çoğalması diyabetik yaranın kapanması için gerekli olan normal re-epitelizasyon sürecini engeller. Ayrıca hiperglisemik ortamda keratinositler içinde reaktif oksijen türlerinde (ROS) bir artış gözlenmektedir. Bu oksidatif stres sadece hücresel bileşenlere zarar vermekle kalmaz, aynı zamanda nötrofillerin toplanması ve hücre aktivasyonunda önemli bir kemokin olan IL-8 üretimini de artırır. Nötrofillerin aşırı infiltrasyonu, yara bölgesinde artan bir inflamatuar yanıta yol açar, daha fazla doku hasarına neden olur ve iyileşme sürecini engeller [15]. İyileşen doku, büyüyen hücrenin bir bileşeni olan kolajeni sentezler. Hidroksiprolin (Hyp) konsantrasyonu, kolajen konsantrasyonunun bir ölçüsüdür. Hidroksiprolin konsantrasyonunun yüksek olması yaranın daha hızlı iyileştiğini gösterir [16]. Tez çalışmamızda hidroksipirolin değerleri analiz edilerek yaranın in-vitro iyileşme seyri saptanacaktır.

BPAG1e (BP230), keratin filamentlerini hemidesmosom plağına bağlayarak keratinositlerin yapısal bütünlüğünü sağlayan bir hemidesmosomal proteindir. Hiperglisemik ortamda BP230'un ifadesinin azalmasının yanında hücresel mimari, adezyon ve yara iyileşme sürecinin olumsuz yönde etkilendiği çalışmalarda bildirilmiştir [17]. Yapılan literatür araştırmasında in vitro diyabetik yara iyileşmesinde mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozom kullanımı ile BP230'un ifade değişimi ilişkisini konu edinen bir çalışma bulunmamıştır.

Bu araştırmanın özgün değeri, MSC kaynaklı eksozomların diyabetik yara iyileşmesindeki rollerini aydınlatmak ve yara iyileşmesinde önemli rol oynadığı düşünülen hemidesmozomal protein BP230'un etkilerini araştırmaktır. Ayrıca in vitro hiperglisemik ortam koşullarında insan keratinosit hücreleri (HaCaT) ile oluşturulan yara modeline eksozom uygulamasının; ROS, TSP-1, IL-8 ve Hyp ifadelerinin değişimleri üzerine etkileri incelenerek, diyabette bozulmuş yara iyileşmesinin altında yatan patofizyolojik mekanizmalara ilişkin yolaklar aydınlatılacaktır.

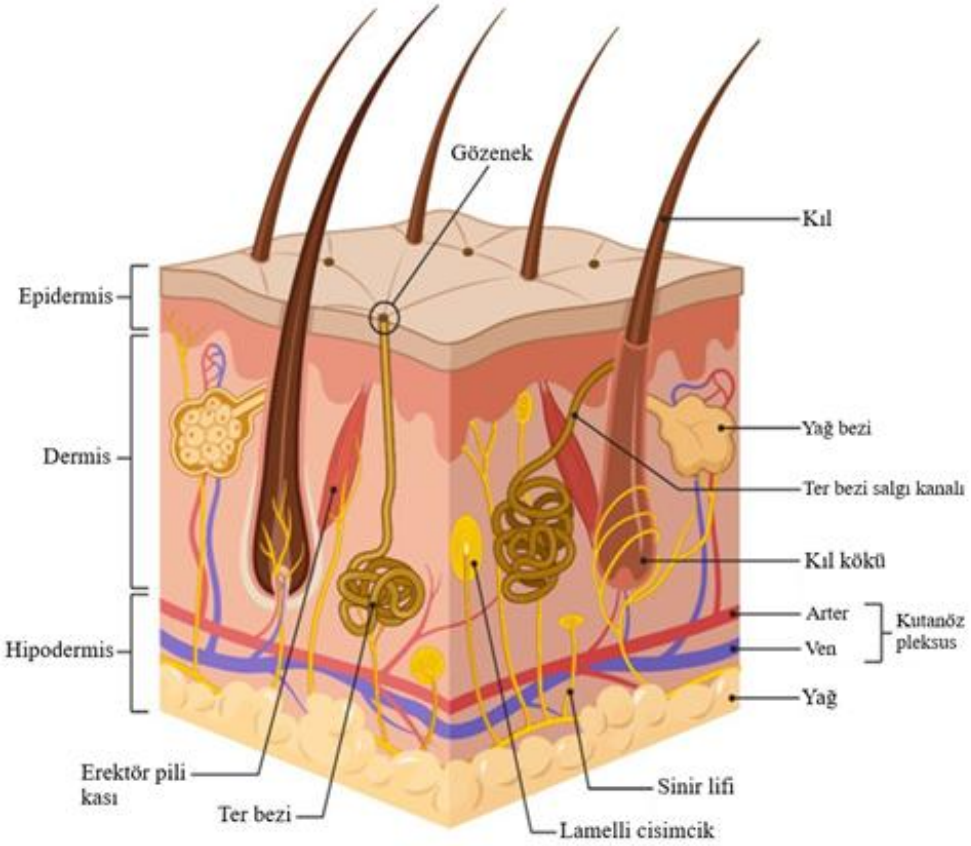
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. DERİ YAPISI

Deri, insan vücudunun dış çevreye karşı sahip olduğu ilk fiziksel bariyerdir. Ek olarak, deri en büyük organdır ve vücudun tüm dış yüzeyini kaplar. İşlevleri arasında ısı düzenlemesi, sıvı kaybının kontrolü, homeostazın sağlanması ve UV ışığa, travmaya, patojenlere, mikroorganizmalara ve toksinlere karşı koruma yer alır. Deri farklı vücut bölgelerinde farklı kalınlıklar gösterir ve bölgelere göre özelleşmiş işlevleri vardır [18, 19]. Ağrı, sıcaklık, dokunma ve derin basınç hissinin oluşumu ilk olarak deride başlar. Deri, kalsiyum emilimi ve normal kemik metabolizması için gerekli olan D vitamini üretiminde yer alan biyokimyasal süreçleri başlatarak endokrin aktiviteyi sürdürür ve düzenler. Su, üre ve amonyak salınımı deri yoluyla gerçekleşir. Deri sebum, ter ve feromon gibi ürünler salgılar ve sitokinler gibi biyoaktif maddeler salgılayarak önemli immünolojik işlevleri yerine getirir. Deri, ısıyı tutup koruyarak veya serbest bırakarak termal düzenlemeye katılır ve vücudun homeostatik dengesinin korunmasına yardımcı olur [18].

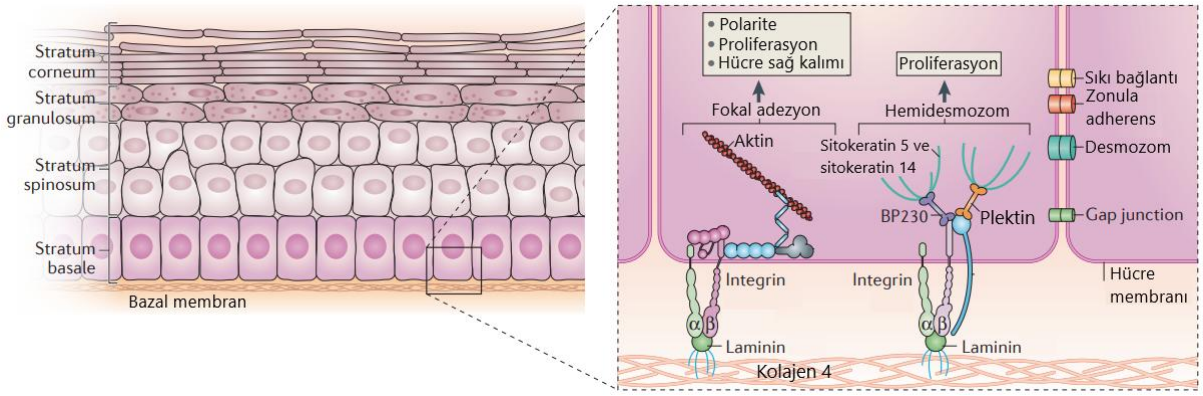
Deri temel olarak üç katmandan oluşur. Üst katman epidermis, epidermisin altındaki katman dermis, üçüncü ve en derin katman ise subkutan doku olan hipodermistir. Epidermis, sıvı geçirmeyen bir bariyer görevi görür ve derinin renk tonunu belirler, avuç içi ve ayak tabanı gibi kalın derilerde beş katmana ayrılır (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum ve stratum corneum, diğer yerlerde ise epidermis sadece dört katmana sahiptir ve stratum lucidum yoktur). Epidermisin altında bulunan dermis; bağ dokusu, kıl folikülleri, kan damarları, lenf damarları ve ter bezleri içerir. Dermis, papiller dermis (üst tabaka) ve retiküler dermis (alt tabaka) olmak üzere iki tabakaya ayrılır. Hipodermis ise bolca yağ ve bağ dokusundan oluşur [18, 19]. Epidermis katmanı keratinositler, Merkel hücreleri, melanositler ve antijen sunan dendritik Langerhans hücreleri gibi çeşitli özelleşmiş hücre türlerinden oluşur [20]. Keratinositler, epidermisteki hücre popülasyonunun yaklaşık %90'ını oluştururken, epidermal iyileşme sürecinde ve suyun taşınmasında rol oynarlar. Keratinositler tarafından salgılanan çeşitli büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler; inflamasyonu ve bağışıklık tepkilerini yönetirler [21]. Yüzeysel dokunmanın hassas bir şekilde algılanmasını ve mekanik uyarıların merkezi sinir sistemine

iletilmesini sağlayan Merkel hücreleri, keratinositler tarafından alınan deri pigmenti melanini salgılayan melanositler, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığı destekleyen antimikrobiyal peptitler salgılayan Langerhans hücreleri epidermis katmanında yer alır [22].



Şekil 2. 1: Farklı cilt katmanlarını ve bileşenlerini gösteren temel insan deri anatomisinin şematik gösterimi [24].

Epidermis, dört ayrı keratinosit katmanından oluşan tabakalı bir epitel dokudur. Sadece stratum basale'de bulunan keratinositler, integrinleri içeren fokal adezyonlar ve α6β4 integrinini içeren hemidesmozomlar aracılığıyla bazal membranla temas halindedir. Fokal adezyonla beraber laminin ve tip 4 kolajen, talin ve diğer aktin bağlayıcı adeziv bileşenler aracılığıyla aktine bağlanır; hemidesmozomlar ise laminini yapısal moleküller plektin ve BP230 aracılığıyla sitokeratin 5 ve 14'e bağlar. Plektin ve BP230'un integrine bağlanmasıyla hemidesmozom yapısı oluşur. Yapısal işlevlere ek olarak, fokal adezyondan gelen sinyaller hücre proliferasyonuna, hücresel sağ kalıma ve hücre polaritesinin kurulmasına katkıda bulunur. Hemidesmozomlardan gelen sinyaller proliferasyon için önemlidir [23].



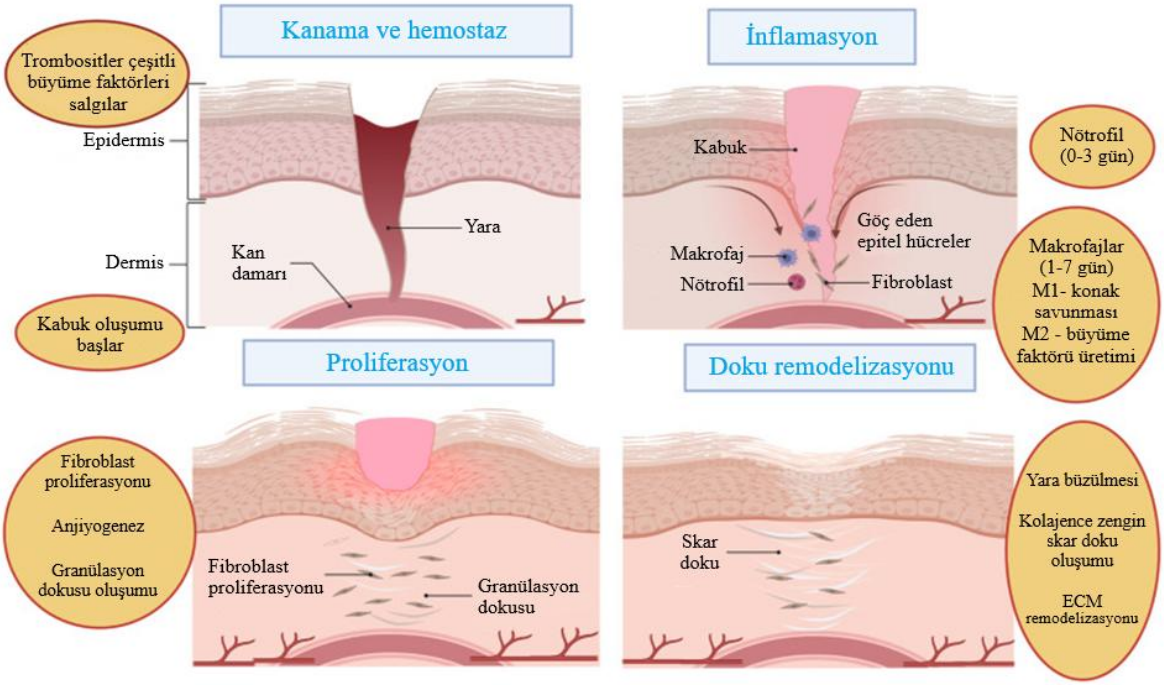
Şekil 2. 2: Epidermis tabakasının yapısı [23].

Yara iyileşme sürecinde dermis ve epidermis bağlantısının restorasyonunu sağlamak, epidermisin dermis tabakasından ayrılmasını engellemek ve deri bütünlüğünü yeniden sağlamak için oldukça önemlidir [25]. Dermis katmanı, ECM içeren bir bağ dokusudur ve vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar, Schwann hücreleri, mast hücreleri, ter bezleri, kan damarları, kıl folikülleri ile serbest ve kapsüllü nöron uçlarını yapısında barındırır [26, 27]. Dermis, papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki tabakadan oluşur. Papiller dermis ince bir yapıya sahipken retiküler dermis fibroblastlar ve kalın kolajen lifleriyle doludur. Dermisin ana hücreleri olan fibroblastlar; glikozaminoglikan, kolajen ve elastin salgılayarak deriye elastikiyet ve mekanik dayanıklılık kazandırır [28].

Dermis derinin nöral, vasküler ve lenfatik yapısını içeren yapısal özellikleri sayesinde epidermise mekanik ve metabolik destek sağlar. Dermisin altındaki derin subkutan doku ise dermisi kas ve kemik gibi daha derin yapılara bağlayan hipodermisi oluşturur [29]. Hipodermis tabakası, gevşek bağ dokusu, adipositler, proteoglikanlar, glikozaminoglikan emici sıvı, kan damarları ve nöronlardan oluşur. Bu tabakanın temel işlevleri arasında yağ depolama, vücut ısısının düzenlenmesi ve deri ile alttaki yapılar arasında destek görevini sağlama yer alır [30].

2.2. YARA İYİLEŞME SÜRECİ

Yaralar; dış etkenler (kesikler, yanıklar, basınç vb.), cerrahi, diyabet veya vasküler hastalıklar gibi patolojik durumlar nedeniyle oluşan, deri bütünlüğünü ve yapısını bozan yaralanmalar veya bozukluklar olarak tanımlanır [31].



Şekil 2. 3: Yara iyileşmesinin aşamaları [24].

Yara iyileşmesi hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve re-modelizasyon fazları olmak üzere birbiriyle ilişkili ve örtüşen dört faza ayrılan, karmaşık ve dinamik bir fizyolojik süreçtir [32]. Akut yaralanmadan sonra, koordine şekilde gerçekleşen bu olaylar dizisi, birbiriyle örtüşen ancak farklı iyileşme fazları boyunca yara iyileşmesinin ilerlemesini düzenleyen bir süreci başlatır [33].

Farklı yara iyileşme fazlarında gerçekleşen, büyüme faktörleri ve sitokinlerin hücresel salınımı, kemotaksi, fagositoz, kolajenlerin yeniden şekillenmesi ve kolajen bozunmasını içeren sıkı bir şekilde düzenlenmiş olaylar zinciri yara iyileşmesinin karmaşık ve dinamik doğasını yansıtır [34]. Yaralanmadan hemen sonra iyileşmenin ilk aşaması, vücudun trombosit agregasyonunu içeren vasküler daralma ve kabuk oluşumu yoluyla kanamayı durdurmaya çalıştığı hemostazdır [35]. Trombositler yara bölgesine ulaşır ve normal kan akışını bozmadan kan pıhtılaşmasını destekler. Bu kan pıhtılaşması geçici yara sızdırmazlığı sağlar ve böylece gereksiz kan kaybını önler. Bu süreç ayrıca yaralanma sonrası mikroorganizmaların yayılmasını da sınırlar [36, 37].

Hasar gören epitel ve endotel hücreleri, kan pıhtılaşmasıyla bir sonraki iyileşme aşamasını başlatmak için bağışıklık hücrelerini yara bölgesine çeken çeşitli kemotaktik faktörleri serbest bırakır. Bu hasar sinyal faktörlerinin etkisiyle, mikrobiyal enfeksiyonu önlemek amacıyla yara bölgesine göç eden nötrofiller, monositler ve lenfositler gibi bağışıklık hücrelerinin aktivitesi, hemostazın ardından gelen inflamasyon fazını oluşturur. İnflamasyon

fazında, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin yanı sıra interlökinler (IL-1, IL-6, IL-17), tümör nekroz faktörü (TNF) ve ROS salınımı, farklı bağışıklık hücrelerinin yara bölgesine toplanmasında önemli rol oynar [38].

İnflamasyon fazı sırasında, farklı beyaz kan hücreleri, mikrobiyal kirleticilerin daha etkin bir şekilde yutulması ve sindirilmesi amacıyla kan dolaşımı yoluyla yara bölgesine göç eder [39]. Kılcal damarların artan geçirgenliği ve genişlemesi, lökositlerin yara bölgesine doğru göçünü sağlar. Antimikrobiyal rol oynayan nötrofiller, yara bölgesine önce ulaşır ve yara iyileşme sürecini tetikledikten sonra 24 saat yara bölgesinde kalır. Bunu takiben, re-modelizasyon fazı için nötrofillerin salgıladığı büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla makrofajlar ve lenfositler gibi diğer bağışıklık hücreleri bölgeye toplanır [38, 40]. Yara iyileşmesinde inflamasyon fazının süresi genellikle yaralanmadan sonra 1-4 gündür ve bu esnada yara fagositoz ve debris temizleme süreciyle rejenerasyona hazırlanır [35]. İnflamasyon esnasında bağışıklık hücreleri tarafından çoğalma fazını başlatmak için büyüme faktörleri ve sitokinler salgılanır ve bunun sonucunda fibroblastlar, keratinositler, endotel hücreleri gibi çeşitli hücreler yara bölgesine toplanır [41, 42]. Fibroblastlar; proteoglikanlar, hyaluronik asit, prokolajen ve elastin gibi ECM bileşenlerini üreterek çoğalır ve granülasyon dokusunun oluşumunu destekler. Granülasyon dokusu anjiyogenez için uygun bir altyapı sağlar. Endotel hücreleri tarafından gerçekleştirilen anjiyogenez, hücrelere oksijen ve besin taşınmasını sağlar. Granülasyon dokusundan salgılanan kimyasallar mevcut kan pıhtısını parçalarken, fibroblastlar tarafından üretilen kolajen, yaranın mekanik dayanıklılığını artırır ve elastikiyet kazandırır. Keratinositlerin farklılaşması ve çoğalması sonucu yaranın yüzeyinde epidermal bir örtü oluşur [43].

Bu aşamayı, granülasyon dokusunun tip 1 kolajen sentezi ile değiştirildiği ve ter bezleri, yağ bezleri, saç folikülleri gibi çeşitli deri bileşenlerinin yeniden oluştuğu re-modelizasyon fazı takip eder. Yaralı bölge işlevsel olarak eski durumuna geri kazandırılır [37]. Bu aşamada, fibroblastlar miyofibroblastlara farklılaşır ve tip 3 kolajen, deriye elastikiyet özelliği kazandırmak için tip 1 kolajene dönüşür [44].

Akut yaralarda, yara iyileşmesi tüm bu aşamaların başarılı bir şekilde tamamlanmasıyla sağlanır. Ancak, kronik yaralarda bu aşamaların tamamı gerçekleşmez ve iyileşme süreci kesintiye uğrar. Hipoksi ve değişen hücre fenotipleri, kronik yaraların temel özelliklerindendir. Kronik yaralardaki tüm alanların iyileşme sürecinin aynı evresinde

bulunmaması da sürecin düzensizliğine katkıda bulunur [45, 8]. Kronik yaraların en ayırt edici özelliği, moleküler düzeydeki etiyolojik farklılıklar nedeniyle diğer yara iyileşme evrelerine geçemeyen kalıcı inflamasyondur. Bu durum, inflamatuar hücrelerin yara bölgesinde aşırı birikmesine ve büyüme faktörlerinin kontrolsüz şekilde salınmasına yol açar. Bu durum, kronik yara iyileşmesinde uzun süren bir inflamatuar evreye neden olur [34].

Büyüme faktörlerindeki eksiklik ve vasküler yetersizlik, kronik yaralarda iyileşme sürecinin gecikmesine neden olur. Bunun sonucunda, kronik yaralardaki lezyonlar, akut yaralardaki düzenli proinflamatuar sitokin kaskadının aksine, uzun süre devam eden bir inflamasyon ve yüksek proteaz seviyeleri ile karakterize edilir. Tüm bu faktörler göz önüne alındığında, kronik yaraların doğru şekilde değerlendirilmesi ve etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için sistematik ve kapsamlı bir yaklaşımın benimsenmesi gerekir [45].

2.3. YARA İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Birçok faktör yara iyileşmesinin bozulmasına yol açabilir. Genel olarak, onarımı etkileyen faktörler lokal ve sistemik olarak kategorize edilebilir. Lokal faktörler, yaranın özelliklerini doğrudan etkileyen faktörlerdir, sistemik faktörler ise bireyin iyileşme yeteneğini etkileyen genel sağlık veya hastalık durumudur. Bu faktörlerin çoğu ilişkilidir ve sistemik faktörlerin etkileri, yara iyileşme sürecini değiştiren lokal etkiler yoluyla oluşur [46].

2.3.1. Lokal Faktörler

2.3.1.1. Oksijenasyon

Anjiyogenez, keratinosit farklılaşması ve göçü, fibroblast proliferasyonu, kolajen sentezi, yaraların enfeksiyondan korunması ve yara büzülmesi gibi yara iyileşmesi süreçlerinde temel bir rol oynayan oksijenasyon, ayrıca hücre metabolizması ve adenozin trifosfat (ATP) yoluyla enerji üretimi için çok önemlidir. Yeterli oksijenasyon sağlanamayan yaralarda iyileşme süreçleri bozulur. Akut yaralarda geçici hipoksi ile birlikte büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı tetiklenerek iyileşmeyi başlatan olumlu bir etki görülür, uzun süreli hipoksi ise bu süreci geciktirir ve iyileşmeyi olumsuz yönde etkiler [47, 48]. Hipoksi, makrofajlar, keratinositler ve fibroblastlardan PDGF, TGF-β, VEGF, TNF-α ve endotelin-1 gibi büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımını tetikleyerek hücre proliferasyonunu, hücre migrasyonunu ve anjiyogenezi destekler.

Normal yara iyileşmesinde, ROS hücresel sinyal iletici olarak görev yapar ve hücre hareketliliği, sitokin sinyali ve anjiyogenezi teşvik eder. Ancak hem hipoksi hem de hiperoksi

ROS üretimini artırabilir; aşırı ROS seviyeleri ek doku hasarına yol açarak iyileşme sürecini olumsuz etkiler [48]. Yara iyileşmesi için uygun oksijen düzeyi kritik bir öneme sahiptir. Hipoksi, büyüme faktörlerinin salınımını ve anjiyogenezi tetikleyerek iyileşme sürecinin başlangıcını sağlar, ancak sürecin devamı ve başarılı bir şekilde tamamlanması için yeterli oksijen sağlanması gereklidir [47].

2.3.1.2. Enfeksiyon

Deri yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar alttaki dokulara deri yaralanması esnasında nüfuz edebilirler. Deri altına geçen mikroorganizmaların çoğalma ve yayılma seviyesi ile birlikte oluşturduğu enfeksiyon durumu, yaranın durumunu belirler. Bu durumlar kontaminasyon, kolonizasyon, lokal enfeksiyon/kritik kolonizasyon veya yayılan invaziv enfeksiyon olarak belirlenebilir. Yaranın yüzeyinde bulunan fakat çoğalmayan mikroorganizma varlığı, kontaminasyon olarak tanımlanır. Mikroorganizmaların çoğalmasına rağmen doku hasarına yol açmaması durumu kolonizasyon olarak tanımlanır. Lokal enfeksiyon/kritik kolonizasyon, mikroorganizmaların çoğalmasıyla birlikte lokal doku tepkilerinin ortaya çıktığı aşamayı ifade eder. İnvaziv enfeksiyon ise mikroorganizmaların yara içinde çoğalarak konağa zarar vermesiyle karakterize edilir [49].

Yara iyileşmesinde temel ve gerekli bir süreç olan inflamasyon fazı, mikroorganizmalar etkili bir şekilde uzaklaştırılamazsa uzayabilir. Yara bölgesinde bakteri ve endotoksin varlığı, IL-1 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinlerin uzun süre yüksek değerlerde salgılanmasına neden olur, bu nedenle inflamasyon kronikleşir. Kronik inflamasyon, ekstraselüler matriksi parçalayan matris metalloproteazların (MMP) seviyesini artırırken, doğal proteaz inhibitörlerinin seviyesini azaltır. Oluşan bu dengesizlik durumu kronik yaralarda büyüme faktörlerinin hızla parçalanmasına neden olarak yara iyileşmesini zorlaştırır [49, 50].

2.3.2. Sistemik Faktörler

2.3.2.1. Yaş

Hücresel ve moleküler düzeyde yapılan birçok çalışma, yara iyileşmesinde yaşa bağlı değişiklikleri ve gecikmeleri incelemiştir. Sağlıklı yaşlı yetişkinlerde, yaşlanmanın etkisinin yara iyileşmesinde geçici bir gecikmeye neden olduğu, ancak iyileşmenin kalitesi açısından bozulmaya neden olmadığı kabul edilmektedir [51, 52]. Yaşlılarda gecikmiş yara iyileşmesi, inflamatuar yanıtın değişmesiyle ilişkilidir. Kemokin üretiminde değişiklikler ve makrofaj fagositik kapasitesinde azalma ile yara bölgesine gecikmiş T-hücresi infiltrasyonu sonucu değişen inflamatuar yanıt yara iyileşme sürecini olumsuz etkiler [53].

Genç ve yaşlı kişiler arasında yara iyileşme süreçlerinde büyük farklılıklar görülür. Yaşa bağlı değişikliklerin iyileşme kapasitesi üzerinde yarattığı etkilerin gözden geçirilmesiyle iyileşmenin her aşamasının değişikliklere uğradığını göstermektedir. Trombosit agregasyonunun artması, inflamatuar düzenleyici ajanların salgılanmasının artması, makrofaj ve lenfositlerin infiltrasyonunun gecikmesi, makrofaj fonksiyonunun bozulması, büyüme faktörlerinin salgılanmasının azalması, re-epitelizasyonun gecikmesi, anjiyogenez ve kolajen birikiminin gecikmesi, kolajen döngüsünün ve yeniden şekillenmesinin azalması gibi olumsuz yönde etkilenen faktörler yara iyileşmesinde yaşa bağlı değişiklikleri açıklar [51].

2.3.2.2. Stres

Stres, insan sağlığı ve sosyal davranış üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Kardiyovasküler hastalıklar, kanser, yara iyileşmesinin bozulması ve diyabet gibi birçok hastalık stresle ilişkilidir. Stres kaynaklı nöroendokrin bağışıklık dengesinin bozulmasının sağlık açısından önemli olduğu çok sayıda çalışma ile doğrulamıştır [54]. Hipotalamus-hipofiz-adrenal ve sempatik-adrenal medüller eksenleri, hipofiz ve adrenal hormonlarının salınımını düzenler. Bu hormonlar arasında adrenokortikotropik hormonlar, kortizol, prolaktin ve katekolaminler (epinefrin ve norepinefrin) bulunur. Stres, glukokortikoid (GC) seviyesini artırır ve yara bölgesindeki proinflamatuar sitokinler olan IL-1β, IL-6 ve TNF-α'nın seviyelerini azaltır. Stres ayrıca yara bölgelerindeki IL-1α ve IL-8 ekspresyonunu azaltır; her ikisi de yara iyileşmesinin ilk inflamatuar evresi için gerekli olan kemotaktik ajanlardır [55, 54].

GC'ler farklılaşmayı ve çoğalmayı baskılayarak, gen transkripsiyonunu düzenleyerek ve bağışıklık hücresi trafiğinde rol oynayan hücre yapışma moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak yara iyileşmesini olumsuz yönde etkiler [56]. GC kortizolü bir anti-inflamatuar ajan olarak işlev görür ve iyileşmenin ilk evresi için gerekli olan Th1 aracılı bağışıklık tepkilerini düzenler. Bu nedenle, psikolojik stres yara bölgesindeki normal hücre aracılı bağışıklığı bozarak iyileşme sürecinde önemli bir gecikmeye neden olur [54].

2.3.2.3. Beslenme

Kronik veya iyileşmeyen yaraları olan ve beslenme eksikliği yaşayan hastalar genellikle özel besinlere ihtiyaç duyarlar. Enerji, karbonhidrat, protein, yağ, vitamin ve mineral metabolizmasının tümü iyileşme sürecini etkileyebilir [57]. Yağlarla birlikte karbonhidratlar, yara iyileşme sürecinde birincil enerji kaynağıdır. Glikoz, anjiyogenez ve yeni dokuların birikimi için enerji sağlayan hücresel ATP'yi oluşturmak için kullanılan ana

yakıt kaynağıdır [58]. Glikozun ATP sentezi için bir kaynak olarak kullanılması, diğer aminoasit ve protein substratlarının tükenmesini önler ve doku onarımında gerekli olan yapı taşlarının korunmasına yardımcı olur [57].

Proteinler yara iyileşmesini etkileyen en önemli faktörlerinden biridir. Protein eksikliği kılcal damar oluşumunu, fibroblast çoğalmasını, proteoglikan sentezini, kolajen sentezini ve yara yeniden şekillenmesini bozabilir. Protein eksikliği ayrıca bağışıklık sistemini etkiler ve bunun sonucunda lökosit fagositozu azalır ve enfeksiyona karşı duyarlılık artar [59]. Kolajen, bağ dokusunun ana protein bileşenidir ve esas olarak glisin, prolin ve hidroksiprolinden oluşur. Kolajen sentezi, lizin ve prolinin hidroksilasyonunu ve demir ve C vitamini gibi yardımcı faktörleri gerektirir. Bozulmuş yara iyileşmesi, bu yardımcı faktörlerden herhangi birindeki eksikliklerden kaynaklanır [60].

2.3.2.4. Obezite

Obezitenin koroner kalp hastalığı, tip 2 diyabet, kanser, hipertansiyon, dislipidemi, felç, uyku apnesi, solunum problemleri ve bozulmuş yara iyileşmesi gibi birçok hastalık ve sağlık durumu riskini artırdığı bilinmektedir. Obez bireyler sıklıkla cilt yarası enfeksiyonu, dehisans, hematom ve seroma oluşumu, bası ülserleri ve venöz ülserler gibi yara komplikasyonlarıyla karşı karşıya kalırlar [61]. Özellikle obez hastalarda cerrahi bölge enfeksiyonu oranı daha yüksektir. Bu komplikasyonların çoğu, deri altı yağ dokusunda oluşan hipoperfüzyon ve iskemi kaynaklı olabilir. Bu durum, antibiyotiklerin yara bölgesine ulaşımındaki azalma durumundan kaynaklanabilir. Cerrahi yaralarda, yara kenarlarındaki artan gerginlik de yara dehisansına yol açabilir. Oluşan yara gerginliği, doku basıncını artırarak mikroperfüzyonu ve yaraya oksijen ulaşımını azaltır [62, 61].

Obez bireylerde bası yarası veya basınca bağlı yaralanmaların artışı, hipovaskülariteden de etkilenir, zayıf perfüzyon sonucu doku bu tür yaralanmalara karşı daha hassaslaşır. Obez bireylerin hareket etme zorlukları veya yetersizlikleri, basınca bağlı yaraların oluşma riskini artırır. Ek olarak, deri kıvrımlarının nemli alanlarında, enfeksiyon gelişimine ve doku bozulmasına katkıda bulunan mikroorganizmalar bulunur. Sürekli deri-deri teması sürtünme ülserasyonuna neden olur. Tüm bu faktörler bir araya geldiğinde, obez bireylerin vücudunda bozulmuş yara iyileşmesi daha fazla gözlenir [62, 63, 61].

2.3.2.5. Diyabet

Diyabet dünya çapında yüz milyonlarca insanı etkileyen önemli bir sağlık sorunudur, diyabet hastalarında akut yara iyileşmesi bozulmuştur. Tüm diyabet hastalarının %15'inde oluştuğu tahmin edilen kronik iyileşmeyen diyabetik ayak ülserleri (DFU) diyabetin ciddi bir

komplikasyonudur. Diyabetle ilişkili tüm alt bacak amputasyonlarının %84'ünden önce DFU meydana gelir [64]. Diyabetli kişilerde hem DFU'ların hem de akut kutanöz yaraların bozulmuş iyileşmesi birden fazla karmaşık patofizyolojik mekanizmayı içerir. Venöz staz hastalığı ve basınca bağlı kronik iyileşmeyen yaralar gibi DFU'lara her zaman hipoksi eşlik eder [65].

Diyabetik yaralarda, T-hücresi bağışıklığındaki bozukluk, lökosit kemotaksisindeki, fagositozdaki ve bakterisidal kapasitedeki bozukluklar ve fibroblastlar ile epidermal hücrelerin işlev bozuklukları gibi çeşitli düzensiz hücresel işlevler yer alır. Bu bozukluklar, diyabetli bireylerde yetersiz bakteri temizliğinden ve gecikmiş veya bozulmuş onarımdan sorumludur [52, 66]. Diyabetik bireylerde yara iyileşmesinin bozulması, hipoksi, fibroblast ve epidermal hücre disfonksiyonu, yetersiz anjiyogenez ve neovaskülarizasyon, yüksek proteaz seviyeleri, oksidatif stres, azalmış bağışıklık direnci ve nöropati gibi çoklu faktörlerle ilişkilidir. Bu patofizyolojik süreçlerin anlaşılması, diyabetik yaraların etkin tedavisi için kritik öneme sahiptir.

2.4. YARAYA UYGULANAN TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Akut yaralarda tüm iyileşme aşamaları organize şekilde tamamlanır ve deri onarımı hızlıca gerçekleşirken, iyileşmesi zor veya kronik yaraların tedavisi çok uzun zaman alır ve tedavi için yüksek maliyetler gerektirir. Kronik yara iyileşmesi ele alınınca, TIME (doku (T) değerlendirmesi ve debridmanı, enfeksiyon/iltihaplanma (I) kontrolü ve etiyoloji değerlendirmesi, nem dengesi (M) ve epitel kenar (E) ilerlemesi) tedavi yönergelerine göre iyileşme süreci takip edilir [67, 68].

Yara iyileşmesine geleneksel tedavi yaklaşımları arasında çeşitli cerrahi ve cerrahi olmayan uygulamalarla birlikte farmakolojik ajanların kullanımı bulunur [69]. Debridman (cisimler, debris, kemik parçaları veya her tipte doku artığının temizlenmesi), deri greftleri ve deri flepleri cerrahi tedaviler olarak uygulanırken; topikal formülasyonlar, yara pansumanları ve deri ikamelerinin kullanımı cerrahi olmayan tedavi yöntemlerini oluşturur [70].

Yara bölgesindeki devitalize dokunun debridmanı, ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesini hızlandırırken, yara iyileşme bozukluğunu önlemek için yara yatağını iyileşme sürecine hazırlar [71]. Yara iyileşme sürecinin yönetimi için diğer bir cerrahi tedavi yöntemi olan deri greftlerinin kullanımı, büyük doku kaybı olan yaralarda ve kronik yaralarda

uygulanır ve bu tip yaralar için en yaygın cerrahi tedavi olarak kabul edilir. Bu uygulama, sağlıklı deri bölgesinden alınan greftin (epidermis ve dermisin bir kısmı) hasarlı deri alanını örtmek için kullanımına dayanır [24]. Deri greftleri donör kökenlerine göre üçe ayrılır, bunlar otogreftler, allogreftler ve ksenogreftler olarak adlandırılır [72].

Otogreft deri uygulaması, hastadan alınan sağlıklı derinin tekrar kendisinde kullanılması esasına dayanır. Deri bütünlüğünün yeniden sağlanması için otogreft deri kullanımı, deri onarımı cerrahisinde altın standart olarak kabul edilir [73]. Lokal damarlanma ve epidermal fonksiyonun yeniden sağlanması ile bağışıklık reddinin olmaması, otolog doku kullanımının en büyük avantajlarındandır. İyileşme sürecinin ağrılı olması, yeterli sağlıklı deri toplanamaması ve greft çıkarımına bağlı yara izi oluşumları otogreft kullanımıyla ilişkili sınırlamalardan bazılarıdır [24]. Allogreft kullanımı, derinin bir kişiden alınıp farklı bir kişiye uygulanması esasına dayanır. Deri greftinin hemen bulunabilmesi ve gelecekte kullanılmak üzere uzun süre saklanabilmesi, allogreft kullanımının avantajları arasında yer alır. Ksenogreftler ise farklı türlerden elde edilen ve insanlara nakledilen deri greftleridir. Allogreft ve ksenogreft kullanımında bağışıklık reddi, hastalık bulaşma riski, ağrılı iyileşme süreci ve yara izi gibi sınırlamalar bulunmaktadır [24].

Yaralar için geleneksel cerrahi olmayan tedaviler, farklı yara pansumanları, topikal formülasyonlar, iskeleler/hidrojel bazlı deri greftleri ve deri ikamelerini içerir. Bu cerrahi olmayan tedaviler yara yatağını temizler, nemi doğru şekilde dengeler, enfeksiyon ve iltihap oluşumunu, re-epitelizasyonu ve kasılmayı kontrol eder [24]. Deri onarımında cerrahi olmayan tedavi yöntemleri arasında bulunan yara örtüsü kullanımının önemli bir yeri vardır. Genellikle doğal ve sentetik biyomalzemelerden türetilen yara örtüleri; büyüme faktörleri, ilaçlar ve diğer biyoaktif molekülleri yapısında bulundurur. İpek fibroin, aljinat, hyaluronik asit ve diğerleri gibi doğal biyomalzemelerden türetilen yara örtüleri cildin ECM ortamını taklit eder ve yara iyileşme sürecini hızlandırır [24].

2.5. EKSOZOM

Eksozomlar, tüm hücrelerden salınan ve hücreler arası iletişimi düzenleyen ekstraselüler veziküllerin (EV) bir türü olan küçük veziküllerdir [74-76]. Fonksiyonel proteinleri, metabolitleri ve nükleik asitleri hedef alıcı hücrelere taşıyıp aktararak hücresel iletişimde önemli rol oynarlarken; doku onarımı, bağışıklık tepkileri, merkezi sinir sistemi

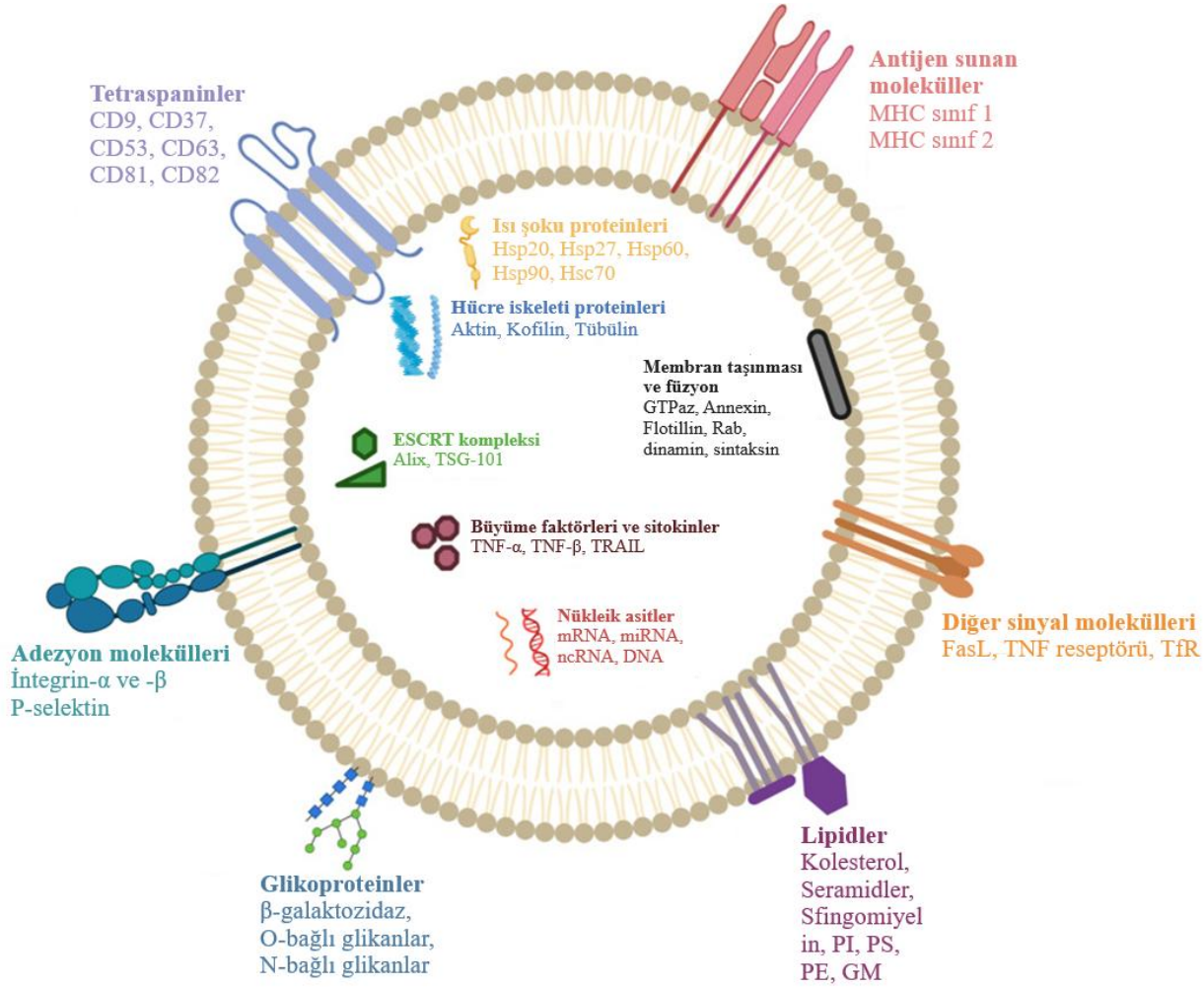
iletişimi, nörodejenerasyon, kanser ve inflamasyon gibi birçok fizyolojik süreçte önemli etkileri bulunur [77].

Eksozomlar, tanısal biyobelirteçler ve terapötik kargo taşıyıcıları olarak klinik uygulama için önemli ilgi yaratmıştır [78]. Küçük boyutları ve membran kompozisyonları, kan beyin bariyeri dahil olmak üzere başlıca biyolojik membranları geçmelerine olanak tanır. Tasarlanmış eksozomların üretimi, çeşitli terapötik kargoların değerlendirilmesini, hedef seçiciliğinin artırılmasını ve üretimin optimize edilmesini destekleyen aktif bir araştırma alanıdır [79, 80].

2.5.1. Eksozomların Biyolojik Bileşimi

Eksozom kargoları salındığı hücrenin fizyolojik durumunu yansıtan proteinleri, nükleik asitleri ve metabolitleri içerebilir [81, 82]. Tetraspanin ailesinin üyeleri (CD9, CD63 ve CD81), taşıma için gerekli endosomal sıralama kompleksi (ESCRT) proteinleri (Alix, TSG101), integrinler, ısı şoku proteinleri (Hsp), aktin ve flotilinler eksozom membranına bağlı olan sitozolik proteinlerdir [83, 78]. Bu sert ve çift katmanlı membran ayrıca sfingomiyelin, kolesterol ve seramidler gibi kargo sınıflandırmasını, eksozom salgılanmasını, yapısını ve sinyallemesini etkileyen lipid bileşenlerinden oluşur [84, 85].

DNA, mesajcı RNA (mRNA) ve kodlanmayan RNA (ncRNA) türleri gibi nükleik asitler de eksozomun biyolojik bileşiminin bir parçasıdır [75, 86]. Eksozomlarda en fazla bulunan RNA türlerinden biri olan mikroRNA'lar (miRNA); ekzositoz, hematopoez ve anjiyogenez gibi birden fazla biyolojik süreçte rol oynarken eksozom aracılı hücresel iletişime katılırlar [87, 78].



Şekil 2. 4: Eksozomun yapısal bileşenleri [77].

Diğer eksozomal RNA türleri arasında bulunan ribozomal RNA (rRNA), uzun kodlamayan RNA (lncRNA), transfer RNA (tRNA), küçük nükleer RNA (snRNA) ve p-element kaynaklı wimpy testis (piwi) ile etkileşime giren RNA'ların tümü biyolojik süreçleri ve özellikle tümör gelişimini etkiledikleri için eksozomların invaziv olmayan hastalık teşhisi ve prognoz aracı olarak kullanılma potansiyelleri araştırılmaktadır [88, 77, 78].

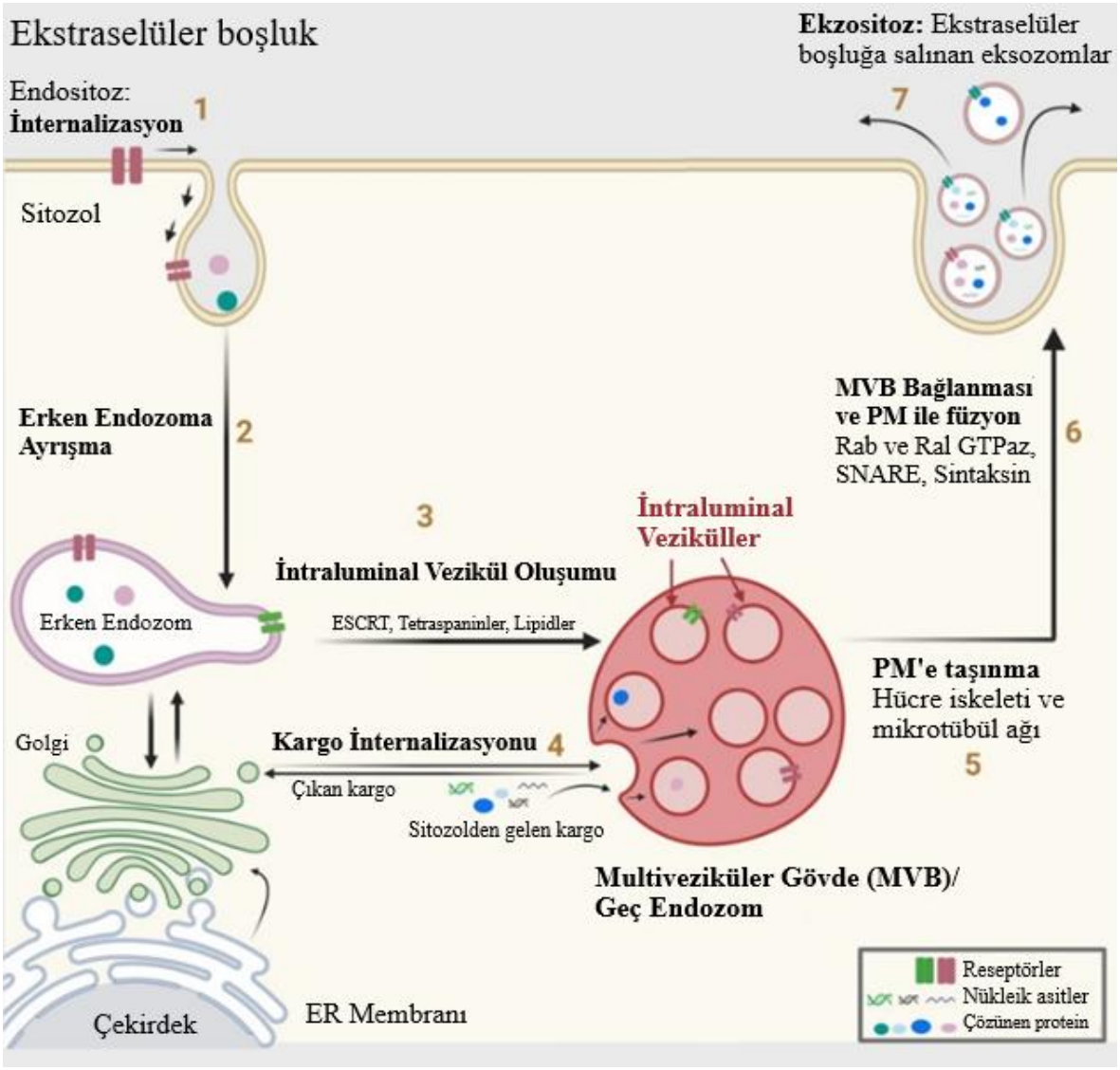
Multiveziküler cisimcikler (MVB) ve geç endosomlar, spesifik proteinleri, lipitleri ve hücresel bileşenleri izole eden intraluminal veziküller (ILV) açısından zengin olan özelleşmiş endosomal bölmelerin alt kümeleridir. ILV'ler hücreden salındıklarında eksozomlara dönüşürler. ILV'ler, endozomal zarın internalizasyonu ile oluşurlar, bu süreç ilk olarak olgun retikülositler tarafından transferin reseptörünün (TfR) veziküler salgılanmasının incelenmesiyle keşfedilmiştir [89]. MVB'ler, hücre iskeleti ve mikrotübül ağı yoluyla plazma membranına taşınır ve membranla füzyon sonrası ekzositoza uğrar, böylece ILV'ler eksozomlar olarak salgılanır [90].

2.5.2. Eksozom Biyogenezi

Eksozom biyogenezine ilişkin tanımlanan birden fazla mekanizma mevcuttur, bunlar arasında ESCRT kompleksi öne çıkarken, SNARE proteinleri ve bunların Rab GTPazlar gibi efektörleri de ek mekanizmalarda önemli role sahiptir. Ek olarak, tetraspaninlere ve lipidlere dayanan mekanizmaların, eksozom oluşum ve salınım mekanizmalarının anlaşılmasında önemi büyüktür [86, 91].

ILV biyogenezi ve salgılanması esas olarak ESCRT sistemi tarafından sürdürülür. ESCRT sistemi MVB'lerde vezikül tomurcuklanmasını ve kargo sınıflandırmasını sağlar. Sistemin çalışması ESCRT-0, -I, -II, -III ve Vps4 olmak üzere beş temel komplekse dayanmaktadır. Ubikitinlenmiş kargolar, ESCRT-0'ın alt birimi hepatosit büyüme faktörü tarafından düzenlenen tirozin kinaz substratı (Hrs) tarafından fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) ile zenginleştirilmiş endosomal bölmelere sınıflandırılır.

ESCRT yolağında PI3P, Hrs etkileşimi yoluyla kargo organizasyonunu düzenler. Daha sonra ESCRT-0, ESCRT alt birimi tümör duyarlılık geni 101 (Tsg101) ile etkileşime girerek ESCRT-I'i sürece dahil eder. ESCRT-I, ESCRT-II ile ubikitinlenmiş protein kümelerinin etrafında içe doğru tomurcuklanmayı sağlar. ESCRT-III'ten gelen yüklü multiveziküler gövde proteini-6 (CHMP6)'nın alt birimi ESCRT-II'ye bağlanır ve tomurcuklanan ILV kesesinin boynu etrafında bir bobin görevi gören CHMP4'ü aktifleştirir. CHMP3 eklendiğinde, tomurcuk ILV'leri oluşturacak şekilde parçalanır, bu olayı Vps4 tarafından katalize edilen ATP kullanılarak ESCRT-III'ün sökülmesi izler [77, 92].



Şekil 2. 5: Eksozom biyogenezi [77].

Lipitlere dayalı mekanizmalar da eksozom biyogenezinde önemli bir rol oynar. Örneğin, seramid gibi lipitler, membranın kıvrılarak tomurcuklanmasını sağlar ve ILV oluşumunu destekler [93]. Ayrıca, CD9, CD63 ve CD81 gibi tetraspaninler, eksozom biyogenezinde ve kargoların eksozomlara taşınmasında önemli rol oynar. Tetraspaninler, eksozom membranlarının düzenlenmesinde anahtar proteinler olarak işlev görür ve biyobelirteçler olarak da sıklıkla kullanılır [94, 95].

2.5.3. Yara İyileşmesinde Eksozom Kullanımı

2.5.3.1. Preklinik Çalışmalar

Kemik iliği (BM), yağ dokusu (AD) ve göbek kordonu (UC) kaynaklı primer MSC'lerden salınan eksozomların yara iyileşmesi, deri hücresi proliferasyonu ve migrasyonu ile ilişkili rejeneratif potansiyellerin araştırıldığı bir çalışmada; her üç MSC kaynağından elde

edilen eksozomlarda vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF-A), fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü BB (PDGF-BB) gibi yara iyileşmesine aracılık eden önemli büyüme faktörleri bulunduğu, bu büyüme faktörlerinin eksozomlardaki ekspresyon seviyelerinin MSC kökenlerinden etkilendiği ve özellikle dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-β) sadece UC-MSC kaynaklı eksozomlarda tespit edildiği rapor edilmiştir. Üç MSC kaynağı tarafından salınan tüm eksozomlar keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu ve migrasyonunu indüklediği ve hücre migrasyonunun daha yüksek dozda eksozom kullanıldığında (20 μg) daha hızlı migrasyon hızı gözlendiği bildirilmiştir. Ek olarak, eksozomların hücre çoğalması ve göçü üzerindeki etkileri, eksozom kökenleri ve ayrıca eksozomların hedef hücreleri ile ilişkilendirilmiştir; primer dermal fibroblastların en büyük indüksiyonu BM-MSC kaynaklı eksozomlara aitken keratinositlerin en büyük indüksiyonu UC-MSC kaynaklı eksozomlara ait olduğu belirtilmiştir [96]. Bu çalışmadan elde edilen veriler, klinik koşullar altında BM-MSC'lerin ve UC-MSC'lerin salgıladığı eksozomların, tedavi amaçlı ürünlere dönüştürülmesi için umut verici olduğunu göstermiştir.

Sıçan derisinde oluşturulan yanık yarası modelini kullanarak insan göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri kaynaklı eksozomların (hUC-MSC-Exo) kutanöz yara iyileşmesindeki faydalarını inceleyen bir çalışmada, hUCMSC-Exo uygulamasının; in vivo'da sitokeratin-19, hücre çoğalması nükleer antijeni ve kolajen I ekspresyonunun artmasıyla önemli ölçüde hızlandırılmış re-epitelizasyon sergilediği, in vitro'da ısı stresinden sonra deri hücrelerinin çoğalmasını teşvik ettiği ve apoptozunu engellediği bildirilmiştir. Ayrıca Wnt4'ün hUC-MSC-Exo'da bulunduğunu ve hUC-MSC-Exo kaynaklı Wnt4'ün, deri hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü artırmak için β-katenin nükleer translokasyonunu ve aktivitesini desteklediği keşfedilmiştir. Araştırma boyunca, hUC-MSC-Exo tarafından sağlanan Wnt/β-katenin aktivasyonunun yaranın yeniden epitelizasyonunda ve hücre çoğalmasında önemli bir rol oynadığını doğrulayan in vivo çalışmalar yapılmıştır. hUC-MSC-Exo'da Wnt4'ün baskılanmasının, in vitro β-katenin aktivasyonunu, deri hücresi çoğalmasını ve göçünü ortadan kaldırarak in vivo'da da terapötik etkileri engellediği belirtilmiştir. Ek olarak, hUC-MSC-Exo tarafından AKT yolunun aktivasyonu, sıçan cilt yanığı modelinde ısı stresi kaynaklı oluşan apoptoz etkinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir [97]. Bu bulgular, eksozomla taşınan Wnt4'ün kutanöz yara iyileşmesinde MSC'lerin terapötik kullanımında yeni bakış açıları sağladığını göstermiştir. Dermal fibroblast ve miyofibroblastlarla yapılan bir in-vitro çalışmada hUC-MSCs kaynaklı eksozomların; fibroblastlarda α-SMA ekspresyonunu

ve Col I ve Col III salgılanmasını inhibe ettiği, TGF-β1/Smad2/3 yolağını inaktive ettiği, TGF-β1 dermal fibroblast-miyofibroblast geçişini indüklediği ve fibroblast-miyofibroblast geçişini inhibe ettiği bildirilmiştir [98].

Rejeneratif yara iyileşmesini araştıran bir çalışmada kullanılan insan kordon kanı mezenkimal kök hücreleri (hUCB-MSC) ve insan kordon kanı mezenkimal kök hücreleri kaynaklı eksozomların (hUCB-MSC-Exo) yara kapanmasını hızlandırdığı, yara izi oluşumunu azalttığı, deri katmanlarında bulunan sinirler ve damarların yenilenmesini iyileştirdiği ve yara iyileşme sürecinde kolajen liflerinin doğal dağılımını düzenlediği rapor edilmiştir. Ayrıca, hUCB-MSC-Exo aşırı miyofibroblast ve kolajen I oluşumunu baskılayarak in vivo ve in vitro deri hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü artırdığı bildirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda hUCB-MSC kaynaklı miRNA'ların miyofibroblast farklılaşmasını indükleyebilen dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) sinyal yolağı ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, hUCB-MSC-Exo'da yüksek oranda ifade edilen bol miktarda miRNA belirlediklerini, miR-21-5p ve miR-125b-5p'nin sırasıyla TGF-β reseptör tip II (TGFBR2) ve TGF-β reseptör tip I (TGFBR1) inhibisyonuna katkı sağladığını bildirmişlerdir [99].

MSC kaynaklı eksozomların apoptoz indükleyici faktörün (AIF) nükleer translokasyonunu baskılayarak hücre ölümünü hafiflettiği ve kutanöz yara iyileşmesini artırdığı bildirilmiştir. HaCaT hücrelerine uygulanan hUC-MSC-Exo tedavisinin, hücre çoğalmasını ve göçünü zaman ve doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Hayvan deneyleri, Huc-MSC'lere kıyasla hUC-MSC-Exo kullanımının epidermal re-epitelizasyonu ve dermal anjiyogenezi artırarak tam kat deri yaralanmalarını hafiflettiği gösterilmiştir [100].

Sistemik skleroz fare modelinde MSC eksozomlarının antifibrotik etkileri ve mekanizmalarını araştıran bir çalışmada, eksozom uygulaması sonucunda; farelerde bleomisin kaynaklı dermal fibrozun engellendiği, lezyonel derideki kolajen miktarını ve α-SMA miyofibroblastlar ile CD68 makrofajların sayısının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca in vitro fibroblastlarda tip I kolajen ve TGF-β reseptörü 1 ekspresyonunun azaldığı, mikro-RNA analizi sonucu MSC eksozomlarında bulunan birkaç mikroRNA'nın antifibrotik potansiyele sahip olduğu bulunmuştur [101].

2.5.3.2. Klinik Çalışmalar

MSC eksozomlarının kronik böbrek hastalığında kullanıldığı bildirilen ilk klinik çalışma; Mısır'da Nassar ve diğ. [102] tarafından yapılan, hastalığın ilerlemesini iyileştirmek

için insan kordon kanı mezenkimal kök hücre eksozomlarını (hUCB-MSC-Exo) kullanan tek merkezli, randomize, plasebo kontrollü bir klinik çalışmadır. Çalışmaya, yaşları 26 ila 44 arasında değişen, evre III veya IV KBH'li 40 hasta katılmıştır. Katılımcılar, 1:1 oranında kontrol (plasebo) veya hUCB-MSC-Exo gruplarına rastgele ayrılarak;.hUCB-MSC-Exo grubuna atananlar, iki hafta boyunca 100 μg/kg vücut ağırlığında haftada bir olmak üzere hUCB-MSC-Exo dozu almıştır. İlk doz intravenöz olarak, ikinci doz ise intra-arteriyel olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna intravenöz tuzlu su infüzyonu uygulanmıştır. HUCB-MSC-Exo grubunda 12 aylık çalışma süresi boyunca tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR), serum kreatinin seviyesi, kan üre ve idrar albümin-kreatinin oranı (UACR) değerlerinde önemli bir iyileşme elde edilmiştir. Plazma TGF-β1 ve IL-10 seviyeleri tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. İyileşmelerin dolaşımdaki anti-inflamatuar sitokinlerdeki artıştan ve proinflamatuar sitokinlerdeki düşüşten kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Fraksiyonel CO2 lazeri takiben akne izi tedavisinde ek bir tedavi olarak yağ dokusu kök hücreleri kaynaklı eksozomların klinik etkinliğini araştıran; 12 haftalık prospektif, çift kör, randomize bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya katılan toplam 25 hasta, üç ardışık fraksiyonel CO2 lazer seansına girmiştir. Her lazer seansından sonra, yüzün bir tarafı yağ kök hücresinden türetilen eksozomlar içeren bir jel ile tedavi edilirken, diğer taraf plasebo jeli muamele edilmiştir. Sonuç olarak eksozom jeli ile tedavi edilen tarafın, plasebo ile tedavi edilen tarafa kıyasla akne izlerinde önemli ölçüde daha fazla iyileşme gösterdiği rapor edilmiştir [103].

2.6. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu tez, in vitro hiperglisemik ve normoglisemik ortamlarda insan keratinositleriyle oluşturulan çizik yara modelinde, insan göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri kaynaklı eksozomların yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini ve etki mekanizmalarını araştırmaktadır.

Çalışmamızda distonin, hidroksiprolin, trombospondin-1 ve interlökin-8 düzeylerinin incelenmesi, yara iyileşme süreçlerinde uygulanan hUC-MSC eksozomlarının olası iyileştirici etkideki moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına yol açacaktır. Bu bağlamda çalışmamız hem diyabetik yara iyileşmesi hem de eksozom bazlı tedavi yaklaşımlarına yönelik yenilikçi bir katkı sağlamayı hedeflemekte ve mevcut literatüre önemli bir bilimsel değer katmayı amaçlamaktadır.

3. YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Sarflar ve Cihazlar

Fetal Bovine Serum (Cat No: 10500-064, Gibco, ABD), Trypsin/EDTA %25 (Cat No: 325043229, Wisent, Kanada), Dulbecco's PBS 1x (Cat No: PBS-1A, Capricorn Scientific, Almanya), DMEM High Glucose (Cat No: 11995065, Thermo Fisher Scientific, ABD), DMEM Low Glucose (Cat No:SH30021.01, Cytiva, İsveç), Tripan Blue Solution 0.4% (Cat No: 15250061, Thermo Fisher Scientific, ABD), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Cas No: 67-68-5, Merck KGaA, Almanya) kimyasalları tez çalışmamız esnasında deneysel süreçlerde kullanılmıştır. 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (6,6′-Dinitro-3,3′-dithiodibenzoic acid, DTNB, Ellman's Reagent, CAS Number:69-78-3, Merck, Almanya), Bütil Hidroksi Toluen (Butylated Hydroxytoluene (BHT) (C15H24O - CAS No:128-37-0, KimyaLab, Türkiye), Tiobarbitürik asit (2-Thiobarbituric acid, CAS No: 504-17-6, Merck, Almanya), Trikarboksilik asit (Trichloroacetic acid, TCA, CAS No: 76-03-9, Merck, Almanya), Etilen Dinitril Tetraasetik Asit (EDTA) (Ethylenedinitrilotetraacetic acid, CAS 6381-92-6, Merck, Almanya) kimyasalları ise biyokimyasal analizler sırasında kullanılmıştır.

ELISA ve biyokimyasal parametrelerin ölçümü için spektrofotometre cihazı (Multiskan GO 1510, Thermo Fisher Scientific, Finlandiya), hücre kültürü deneyleri için aseptik koşulların sağlanmasında Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (Deltasafe 120, Biotech+, Türkiye), toplanan kültür örneklerinin ependorf tüplerinde homojen hale getirilmesi için vorteks cihazı (MX-S, Scilogex, Çin), hücrelerin hızlı bir şekilde dondurulması için dondurma kutusu (Mr. Frosty, Freezing Container, 18 Tube, Cat No:5100-0001, Thermo Scientific, Finlandiya), toplanan kültür örneklerinin süpernatan ve pelet fazlarına ayrıştırılmasında santrifüj cihazları (Universal 320 R, Hettich, Almanya ve Hitachi Himac CT 15E, Hitachi Koki Co., Ltd., Japonya), hücrelerin inkübasyon ortamının sağlanmasında CO^2 inkübatör (CO2 Incubator, MCO-170AC-PE, PHCBİ, PHC Corporation, Japonya), hücre plakalarının kontrolünde Işık Mikroskopu Primovert (Carl Zeiss, Almanya), görüntü almak için ters mikroskop (Carl Zeiss TM, Axio Vert.A1 FL-LED Inverted Microscope, Almanya), görüntülerin fotoğraflanması için mikroskoba bağlı kamera (Carl Zeiss TM, AxioCam 506,

Microscope Camera, Almanya), fotoğraflama ve görüntü işleme için bilgisayara bağlı yazılım (Carl Zeiss TM, AxioCam 506, Zen 2 Lite Software, Almanya) kullanılmıştır.

Deneysel çalışmamızda, göbek kordonu dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomları (hUC-MSC-Exo) içeren ExoStem (Stembio Hücre ve Doku Merkezi, Gebze, Türkiye) kullanılmıştır.

Hidroksiprolin düzeylerinin belirlenmesinde Human Hydroxyproline, Hyp ELISA Kit (Cat.No.E1900Hu, Bioassay Technology Laboratory, Çin), Trombospondin-1 düzeylerinin belirlenmesinde Human Thrombospondin 1, TSP-1 ELISA Kit (Cat.No.E1110Hu, Bioassay Technology Laboratory, Çin), İnterlökin-8 seviyelerinin belirlenebilmesi için Human Interleukin 8, IL-8 ELISA Kit (Cat.No.E0089Hu, Bioassay Technology Laboratory, Çin), Distonin düzeylerinin belirlenmesi için Human Dystonin, DST ELISA Kit (Ref: DZE201123668, Sunredbio, Çin) ELISA kitleri çalışmamızda kullanıldı.

3.2. Hücre Kültürü Deney Modelinin Oluşturulması

Tez çalışmasında in vitro yara iyileşmesi modeli ölümsüzleştirilmiş insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) kullanılarak oluşturulmuştur. Hücre hattı, Haliç Üniversitesi Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.2.1. Hücrelerin Ekimi

-80 °C'de saklanan HaCaT hücreleri, 37 °C su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Çözülen hücreler, içerisinde önceden 5 mL besiyeri bulunan steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Pipetleme işlemiyle homojen hale getirilen hücre süspansiyonu, 1300 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, süpernatan aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücre peletinin üzerine 3 mL besiyeri eklenerek tekrar pipetleme yoluyla homojen hale getirildi. Elde edilen homojen hücre süspansiyonu, içerisine önceden 5 mL besiyeri eklenen T25 hücre kültürü flaskına aktarıldı, 37 °C sıcaklık ve %5 CO2 koşullarına sahip inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücreler, flask yüzeyinin %80'ini kapladığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemi sırasında, hücrelerin bulunduğu besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyinde biriken atık maddelerin temizlenmesi için PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemi ardından, flask içerisine 5 mL Trypsin-EDTA (%0,25)

eklendi, hücreler 37 °C sıcaklık ve %5 CO2 koşullarına sahip inkübatörde 3 dakika süreyle inkübe edildi. Bu süreçte, flask yüzeyine yapışık olan hücreler, Trypsin-EDTA'nın etkisiyle yüzeyden ayrıldı. Hücrelerin ayrıldığı ortama besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu hazırlandı ve bu süspansiyon toplanarak steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler, 1300 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatan aspire edilerek uzaklaştırıldı ve kalan hücre peletinin üzerine 3 mL besiyeri eklendi. Pipetleme işlemi uygulanarak homojen bir hücre süspansiyonu elde edildi. Homojenize edilen hücre süspansiyonu, T75 hücre kültürü flaskına aktarıldı, 37 °C sıcaklık ve %5 CO2 koşullarına sahip inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin büyümesi ve çoğalması, ters mikroskop kullanılarak günlük olarak gözlemlendi. Hücreler flask yüzeyinin %80-90'ını kapladığında pasajlama işlemi aynı şekilde tekrar edildi.

3.2.3. Canlı Hücrelerin Sayımı

10 µL hücre süspansiyonu 10 µL tripan mavisiyle 1:1 oranında karıştırıldı ve 10'ar µL alınarak Thoma lamına yüklendi. Toplam canlı hücre sayısı Toplam canlı hücre sayısı=Sayılan hücre sayısı ortalaması×Dilüsyon faktörü×Hücre süspansiyon hacmi (mL)×10^4 formülüne göre hesaplandı.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

HaCaT hücrelerinin dondurma işlemine hazırlanması için, hücre süspansiyonuna kriyoprotektan ajan olarak %10 oranında DMSO eklendi. Bu karışım daha sonra kriyotüplere aktarıldı ve kontrollü bir şekilde dondurulmaları amacıyla Mr. Frosty özel dondurma kaplarına yerleştirildi. Kriyotüpler, bu işlem tamamlandıktan sonra -80 °C'lik bir dondurucuya kaldırıldı ve burada uzun süreli muhafaza altına alındı. Tüm hücre kültürü işlemleri sırasında aseptik koşullara dikkat edildi, kontaminasyonu önlemek için steril ekipman ve ortam kullanıldı.

3.3. MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ

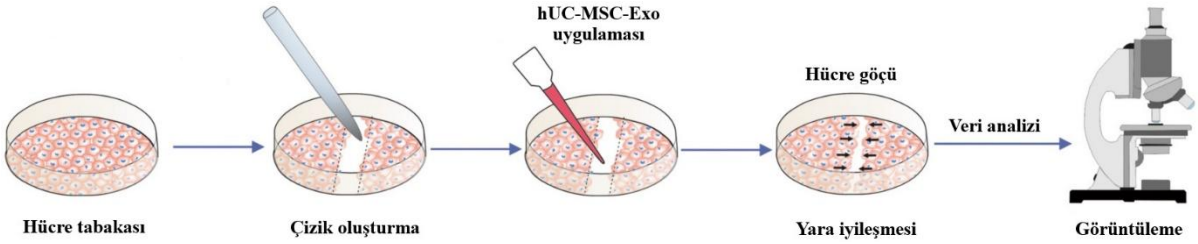
Hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi yöntemi ile değerlendirildi. Çalışma solüsyonu, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak PBS içinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Toz formdaki MTT bileşiği PBS'de çözülerek renkli bir çözelti elde edildi. Bu çözelti, 5 mL'lik ependorf tüplerine alındı ve ışık geçirmemesi için alüminyum folyo ile sarıldı. Hazırlanan ancak kullanılmayan çözeltiler

alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi. 96 kuyulu plakalardaki her bir kuyuya $5x10^3$ hücre ekildi. Hücre ekimi sonrası plakalar, %5 CO2'li, 37°C'de inkübe edilerek hücrelerin konfluent hale gelmesi sağlandı.

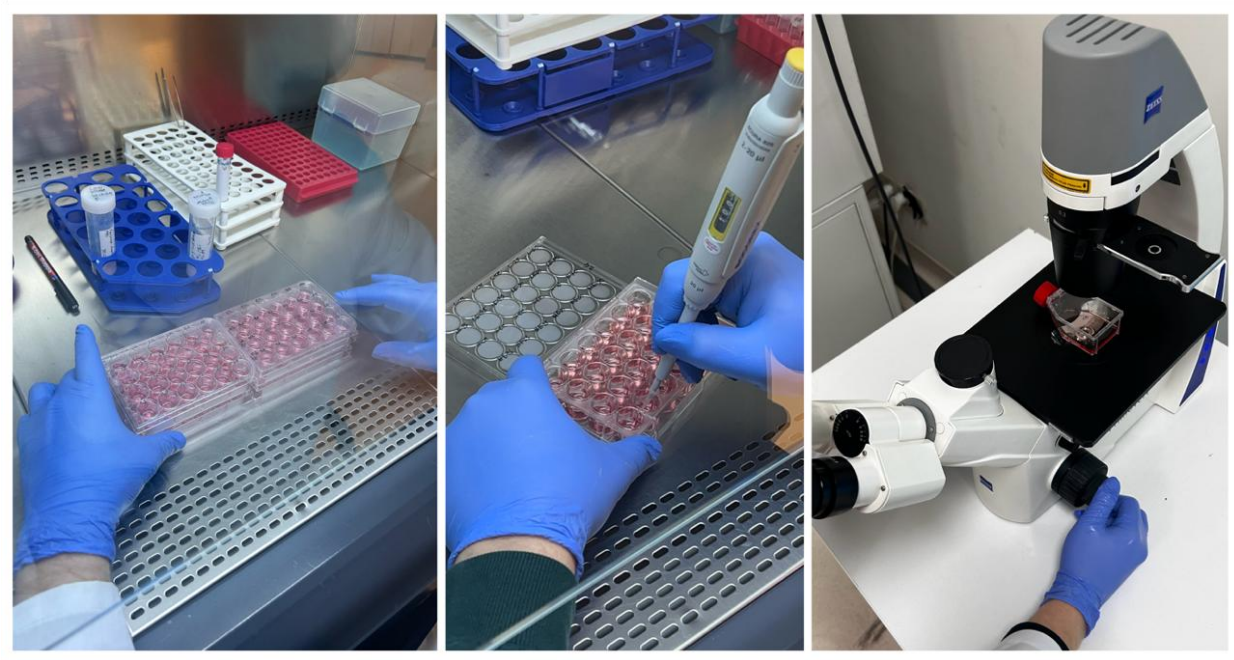
Belirli kuyulara farklı partikül konsantrasyonlarında $5x10^4$ p/mL ile $5x10^7$ p/mL arasında; $5x10^4$ p/mL, $1x10^5$ p/mL, $2.5x10^5$ p/mL, $5x10^5$ p/mL, $1x10^6$ p/mL, $5x10^6$ p/mL, $1x10^7$ p/mL, $5x10^7$ p/mL olacak şekilde eksozom dozajları uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarında MTT testi uygulandı. Testin sonunda oluşan renk değişimi, 450 nm dalga boyunda spektrofotomete cihazı kullanılarak ölçüldü. Test sonucunda elde edilen veriler, doz ve hücre canlılığı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Microsoft Excel programında (Microsoft 365, 2021, ABD) analiz edildi ve grafik haline getirildi.

3.4. ÇİZİK YARA MODELİ

HaCaT hücreleri, yara modeli oluşturulmadan önce 24 kuyulu plakalara, her kuyuya $5x10^4$ hücre gelecek şekilde ekildi, hiperglisemik ile normoglisemik ortamları simüle eden DMEM High Glucose ve DMEM Low Glucose besiyerlerinde kültürlendi. Hücrelerin %100 yoğunluğa ulaştığı, ters mikroskop ile doğrulandıktan sonra, 200 µL mikropipet ucu kullanılarak her bir kuyunun ortasına düz ve tek bir çizgi çekilerek yara modeli oluşturuldu. Çizik işleminden sonra yerinden ayrılan hücrelerin uzaklaştırılması için besiyeri aspire edildi. Daha sonra kuyular dikkatlice besiyeri ile yıkandı ve besiyeri tekrar aspire edildi.



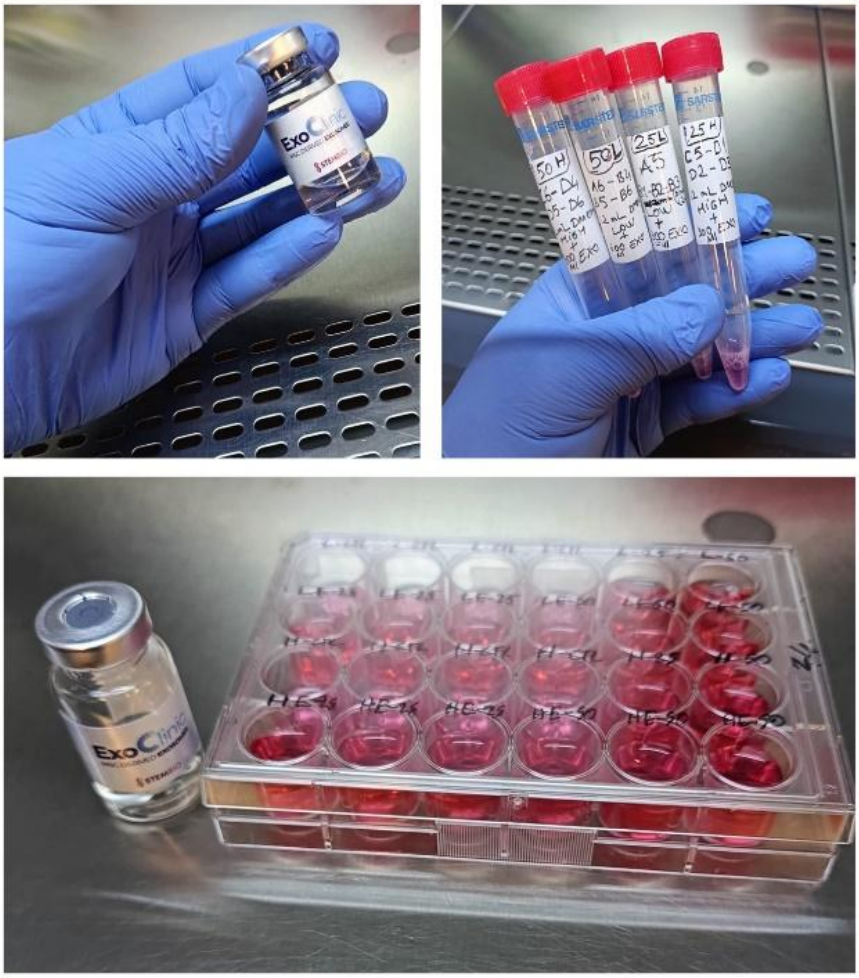
Şekil 3. 1: Çizik yara modelinin şematik gösterimi [104].



Şekil 3. 2: HaCaT hücrelerinin ekimi yapılan plakalar, plakalarda çizik yara modeli oluşturulması, yara modelinin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi.

MTT analizinde, her bir deney grubunda $5x10^3$ keratinosit kullanılarak eksozomların hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve sonuç olarak 5.000.000 patikül/mL ve 10.000.000 partikül/mL eksozom içeren etkili dozlar belirlendi. Çizik yara modeli oluşturulurken hücre göçü üzerindeki etkileri değerlendirmek amacıyla başlangıçta $5x10^4$ keratinosit ekildiği için MTT analizinde kullanılan dozların bu hücre sayısına göre ölçeklendirildi. Bu bağlamda, MTT analizinde $5x10^3$ hücreye etkili olan eksozom dozu, çizik yara modelinde $5x10^4$ hücreye uygulanacak şekilde oransal olarak arttırıldı. Böylece hücre sayısına göre eksozom dozunun biyolojik etkiler açısından tutarlı olması sağlandı.

MTT analizi ile belirlenen uygun hUC-MSC-Exo partikül konsantrasyonları çizik yara modelinde kullanılan hücre sayısına göre 25.000.000 patikül/mL ve 50.000.000 partikül/mL olmak üzere ölçeklendirildi, bu dozları içeren DMEM High ve DMEM Low besiyerleri kuyulara eklendi. Hazırlanan 24 kuyulu plakalar, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO2 içeren inkübatörde farklı zaman aralıklarında (0, 12, 24 ve 48 saat) inkübe edildi. İnkübasyon süresince düzenli olarak, yara kapanma süreçlerinin görüntüleri ters mikroskop ve kamera sistemi ile fotoğraflandı.



Şekil 3. 3: Eksozomların hücre kültürü yara iyileşmesi modelinde kullanımı ve konsantrasyonları.

Yara alanlarının görüntüleri**,** Image J yazılımı (Image J, National Institutes of Health (NIH), ABD) kullanılarak analiz edildi ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Analiz sonucunda, yara açıklıkları yüzdesel oranlar olarak hesaplandı ve gruplar arası fark değerlendirildi. Yara hattı kapanma oranı aşağıdaki formüle göre Image J yazılımında ölçüldü:

$$\text{Yara Kapanma Yüzdesi} = \left[1 - \frac{\text{Gi}-\text{Gf}}{\text{Gi}}\right] \times 100 \quad (3.1)$$

Gi: kenarlar arasındaki ilk boşluk

Gf: kenarlar arasındaki son boşluk

3.5. ELISA ANALİZİ

Tüm gruplardan elde edilen hücre kültürü süpernatanları, santrifüjleme işleminin ardından analiz edildi. Distonin, IL-8, trombospondin-1 ve hidroksiprolin seviyeleri, kolorimetrik sandviç ELISA protokolü kullanılarak ölçüldü.



Şekil 3. 4: Çalışmamızda kullanılan ELISA kit içeriği, plakada oluşan kolorimetrik değişim, spektrofotometrik okuma yöntemi.

Tablo 3. 1: ELISA kitlerinde kullanılan standart ve seri dilüsyon konsantrasyonları.

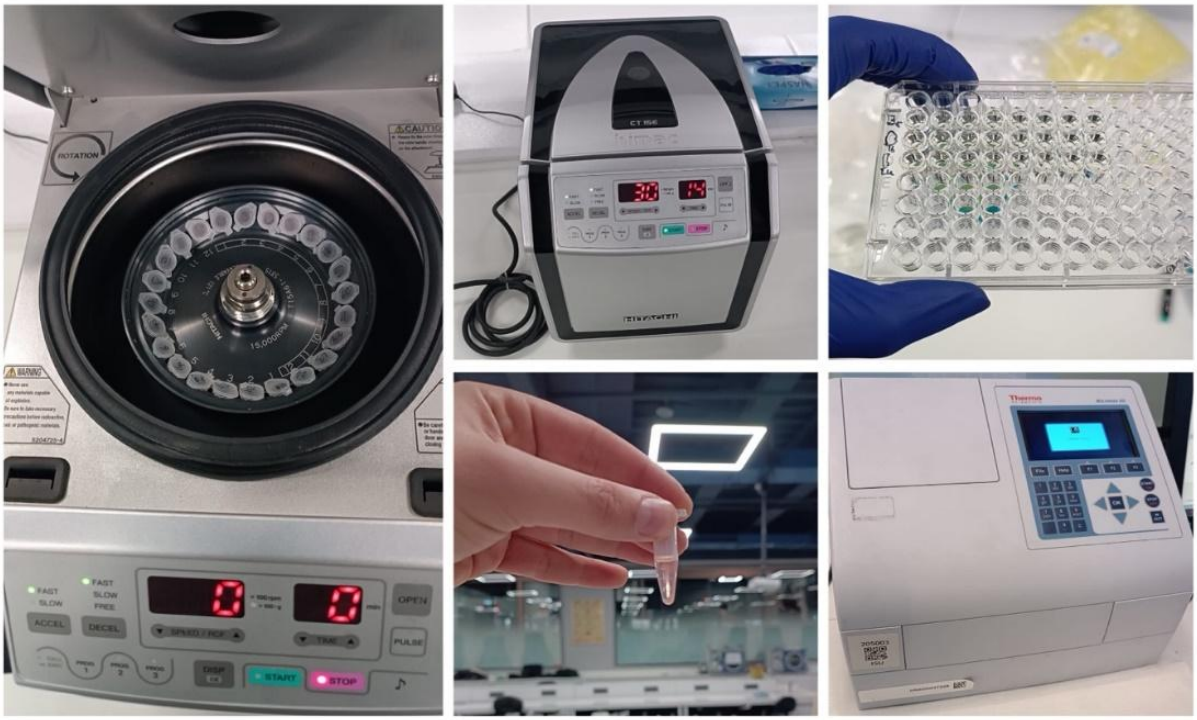
	ELISA Standart Konsantrasyonlar	Standart No 5	Standart No 4	Standart No 3	Standart No 2	Standart No 1
Distonin (DST) ng/L	4800 ng/L	2400 ng/L	1200 ng/L	600 ng/L	300 ng/L	150 ng/L
İnterlökin-8 (IL-8) ng/L	1280 ng/L	640 ng/L	320 ng/L	160 ng/L	80 ng/L	40 ng/L
Trombospondin-1 (TSP-1) nmol/L	720 ng/ml	360 ng/ml	180 ng/ml	90 ng/ml	45 ng/ml	22.5 ng/ml
Hidroksiprolin (Hyp)	4800 nmol/L	2400 nmol/L	1200 nmol/L	600 nmol/L	300 nmol/L	150 nmol/L

Standart solüsyon ve standart dilüenti, prosedüre uygun şekilde hazırlandı. Standart kuyularına duplike olarak 50 µL standart solüsyonu pipetlendi. Her bir numune kuyusuna 40 µL numune eklendi. Numune kuyularına ayrıca 10 µL biyotinlenmiş antikor eklendi ve hem standart hem de numune kuyularına 50 µL horse radish peroxidase (HRP) konjuge saptama

antikoru ilave edildi. Plaka, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyu içerikleri aspire edilerek her bir kuyu >300 µL yıkama tamponu ile beş kez yıkandı. Her kuyuya sırasıyla 50 µL TMB substrat solüsyonu A ve 50 µL substrat solüsyonu B eklendi, plaka 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 10 dakika boyunca inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için her kuyuya 50 µL stop solüsyonu ilave edildi. 10 dakikalık bir beklemenin ardından absorbans değerleri, 450 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Sonuçlar, dört parametreli standart eğri uyumu kullanılarak hesaplandı. Bu yöntem hem standart hem de numune değerlerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağladı.

3.6. BİYOKİMYA ANALİZİ

Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonunun son ürünüdür. MDA, serbest oksijen radikallerinin oluşumunda veya araşidonik asit oluştuğunda meydana gelir ve oksidatif stresin bir oksidan parametresi olarak kabul edilmektedir. İndirgenmiş glutatyon (GSH) reaktif oksijen moleküllerini hücreden uzaklaştıran temel antioksidan parametrelerden biridir [105]. Biyokimyasal analizler İstinye Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.



Şekil 3. 5: Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi.

3.6.1. Glutatyon Analizi

GSH seviyeleri, Tietz yöntemi [106] referans alınarak ölçüldü. Analiz için, 200 µl serum örneği üzerine 800 µl fosfat tamponu ilave edildi ve 412 nm dalga boyunda başlangıç absorbansı (OD1) ölçüldü. Ardından, aynı tüpe 100 µl 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) eklenerek, ikinci absorbans değeri (OD2) belirlendi. Glutatyon konsantrasyonu, mmol/g protein cinsinden hesaplandı ve mmol/glutatyon (mg/dl) cinsinden konsantrasyonu verildi.

3.6.2. Malondialdehit Analizi

Besiyeri örneklerindeki MDA seviyeleri, Bird ve Draper yöntemi [107] baz alınarak ölçüldü. Analiz prosedürü kapsamında, 200 ml serum örneği içeren tüplere sırasıyla 800 ml fosfat tamponu, 25 ml butillenmiş hidroksi toluen çözeltisi ve 500 ml %30'luk trikarboksilik asit ilave edildi. Tüpler vorteks cihazı ile karıştırıldıktan sonra, 2 saat boyunca buz banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda, tüpler 2000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatandan 1 ml alınarak temiz bir tüpe aktarıldı. Süpernatan içeren bu tüplere 75 ml etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve 250 ml tiyobarbutirik asit eklendi. Karışım tekrar vortekslenerek, tüpler 15 dakika süreyle sıcak su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler oda sıcaklığına getirildi ve örnekler plakaya triplike olarak pipetlenerek absorbans değerleri 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.

3.6.3. Protein Analizi

Bradford testi, protein konsantrasyonlarını belirlemek için hızlı ve son derece hassas bir yöntemdir. Bu yöntem, çözeltilerdeki denatüre olmuş proteinlere bağlanan Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının, absorbans maksimumunun 465 nm'den 595 nm'ye kayması prensibine dayanır [108].

Standart eğrisinin oluşturulabilmesi için, protein standardından 0 ile 20 µg 1 mg/mL IgG arasında seyreltme hazırlandı ve son hacim olarak 20 µL deiyonize su eklendi. Her seyreltmeye 10 µL örnek ve tampon eklendi. Tekrarlanabilirliği değerlendirebilmek amacıyla yeterli sayıda standart konsantrasyonu test edildi. Sekiz farklı konsantrasyon 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 ve 20 µg üç kopya ile ölçüldü. Standart eğrisine paralel olarak, örnek protein çözeltisinin üç farklı 2, 5 ve 10 µL hacimleri örnek tamponunda 10 µL nihai hacme kadar seyreltildi. Her seyreltmeye 20 µL deiyonize su eklendi. Standartlara ve numunelere 1 mL Bradford çalışma reaktifi eklendi ve iyice karıştırılabilmesi için vortekslendi. Rengin oda

sıcaklığında 5 dakika boyunca gelişmesi beklendi. Spektrometre 595 nm'de sıfırlandı ve 0 µg numune boş olarak kullanılarak, ardından 595 nm'de standartların ve numunelerin absorbansları kaydedildi. Protein standardı konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak, 595 nm'de ortalama absorbans çizilerek bir standart eğrisi oluşturuldu. Protein miktarları, standart eğrisinin doğrusal aralığında olmalıdır. Her hacim için konsantrasyonlar mikrolitre başına mikrogram cinsinden hesaplandı ve bu konsantrasyonların ortalaması alındı. Örnek protein miktarları, doğrudan standart eğrisinden okundu veya standart eğrisinin eğimi hesaplandı. Elde edilen protein miktarları çalışmamızda MDA ve GSH parametrelerinin her birine oranlandı, sonuçlar MDA/Protein oranı ve GSH/Protein oranı olarak verildi.

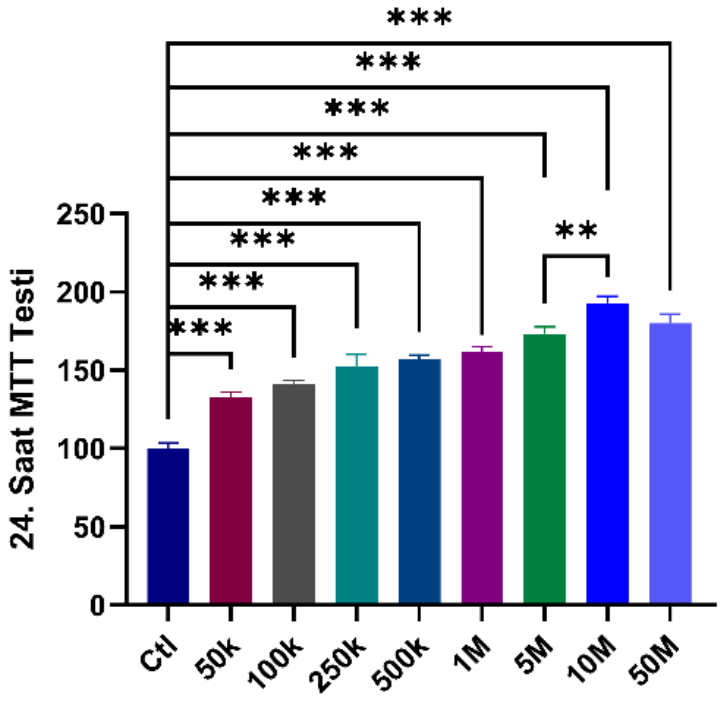
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler Graph Pad, Prism İstatistik Programı (Prism 10.2.3, GraphPad Software, Kaliforniya, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normallik dağılımı, Kolmogrov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Grup sayısı, normallik dağılımı ve homojenlik durumuna bağlı olarak parametrik veya non-parametrik test seçimi yapıldı. Verilerin homojenlik testi Levene Testi ile yapıldı. Normal dağılıma uyan verilerin analizinde gruplar arası karşılaştırmalarda Tek-Yönlü ANOVA testi kullanıldı. ANOVA sonucu anlamlı bulunan verilerde, gruplar arası ikili karşılaştırmalarda homojen dağılım gösteren verilere Bonferonni testi, homojen dağılım göstermeyen verilere ise Tamhane's T2 testi uygulandı. Normal dağılıma uymayan verilerin analizinde, ikili grupların karşılaştırılması için Mann-Whitney U Testi, tüm gruplar arası karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Verilerimiz normal ve homojen dağılım göstermiştir. Sonuçlar, ortalama±standart sapma, olarak verildi. $P<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasında gözlenen istatistiksel anlamlılık düzeyleri, $p<0.05$*, $p<0.01$**, $p<0.001$*** ile belirtilmiştir.

4. BULGULAR

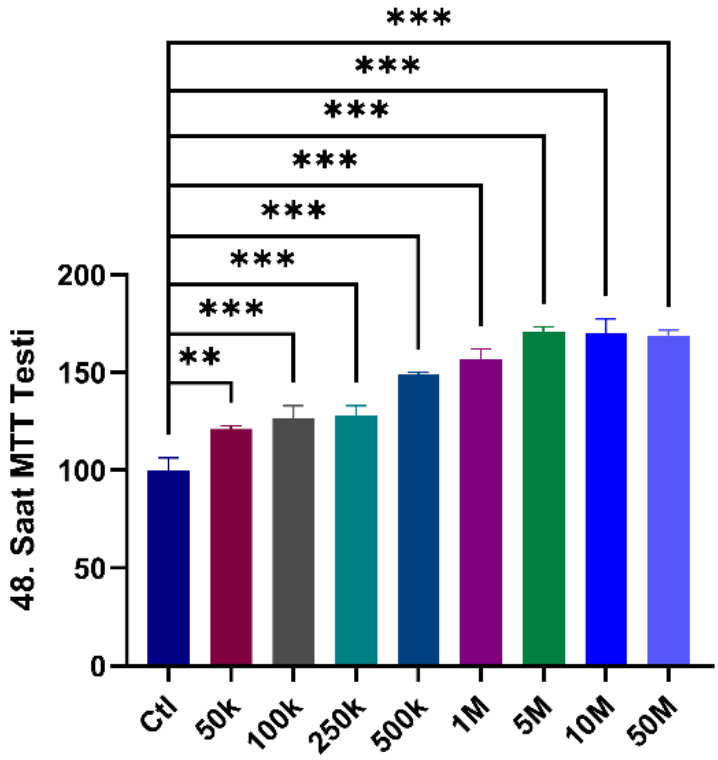
4.1. MTT TESTİ BULGULARI

24 saatlik inkübasyon süresinin ardından, tüm hUC-MSC-Exo konsantrasyonlarının (50k-50M) HaCaT hücrelerinin metabolik aktivitesini artırdığı gözlendi. Kontrol grubu (Ctl) ile kıyaslandığında, tüm grupların (50k-50M) hücresel metabolik aktivitesinde istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p < 0.001$***) görüldü. 5M grubu ile kıyaslandığında, 10M grubunun metabolik aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0.01$**) görüldü. 10M ve 50M konsantrasyonlarında metabolik aktivitenin en yüksek seviyelere ulaştığı tespit edildi. Hücresel metabolik aktivite oranının tüm gruplar arasında; kontrol grubunda en düşük seviyede olduğu gözlenirken, 10M ve 50M gruplarında en yüksek seviyede olduğu tespit edildi (Şekil 4.1).



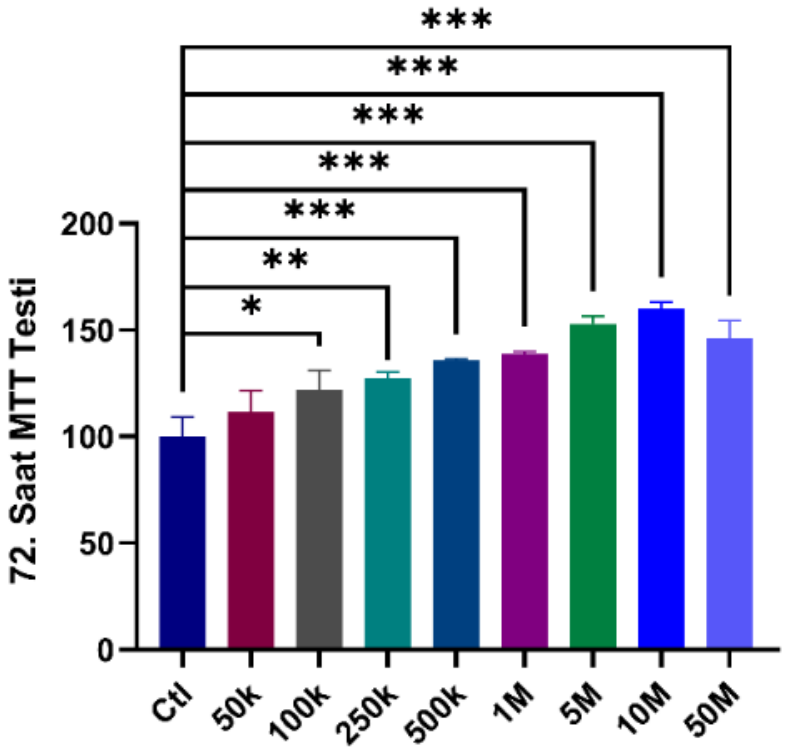
Şekil 4. 1: 50k ve 50M partikül konsantrasyonu aralığında değişen hUC-MSC-Exo dozlarının HaCaT hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca metabolik aktivite üzerindeki etkileri.

48. saat MTT Testi sonuçları ele alındığında, Ctl grubuna kıyasla; 50k grubu metabolik aktivite oranı istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.01$**) gösterirken, diğer tüm gruplarda (100k – 50M) metabolik aktivite oranının çok anlamlı artış ($p<0.001$***) gösterdiği görüldü. Genel olarak doza bağımlı bir artış olduğu gözlendi. 10M ve 50M gruplarında metabolik aktivitenin en yüksek seviyeye ulaştığı görüldü, fakat bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı, bu da hücresel metabolizmanın bu doz seviyelerinde doygunluk etkisinin oluşmasıyla ilişkilendirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2: 50k ve 50M partikül konsantrasyonu aralığında değişen hUC-MSC-Exo dozlarının HaCaT hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca metabolik aktivite üzerindeki etkileri.

72 saatlik inkübasyon, eksozomların hücresel metabolik aktivite üzerindeki etkilerinin daha uzun süreli maruziyetle nasıl değiştiğini gösterdi. Ctl grubu ile kıyaslandığında, 100k grubunun metabolik aktivite oranında istatistiksel olarak az anlamlı artış ($p<0.05$*) görüldü. Ctl grubu ile kıyaslandığında, 250k grubunun metabolik aktivite oranında istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.01$**) görüldü. Ctl grubuna kıyasla, düşük konsantrasyon grupları (50k, 100k ve 250k) haricindeki tüm grupların (100k – 50M) metabolik aktivite oranında çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü (Şekil 4. 3).



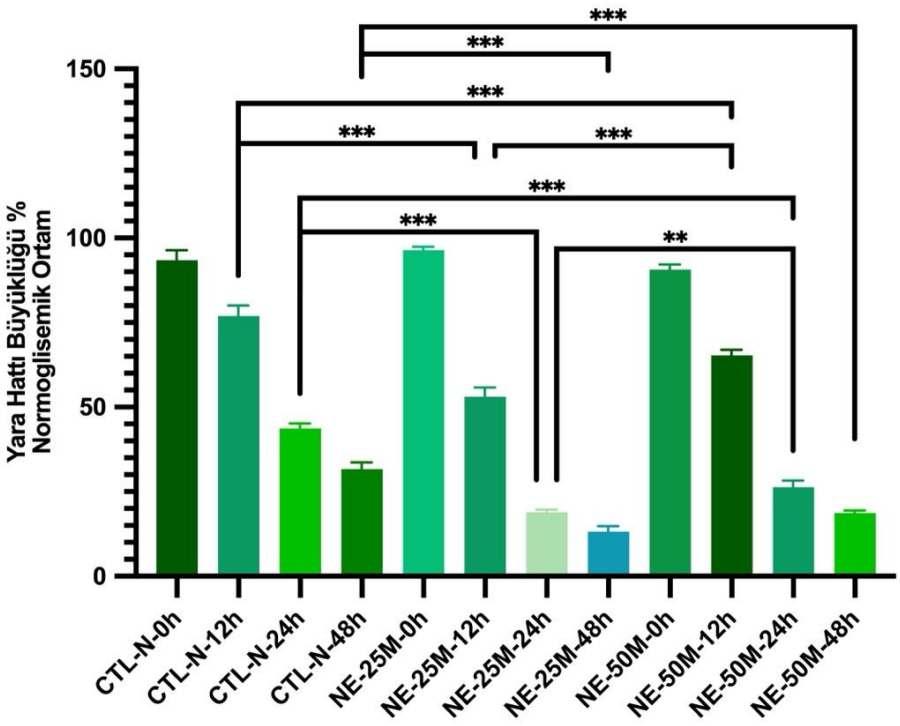
Şekil 4. 3: 50k ve 50M partikül konsantrasyonu aralığında değişen hUC-MSC-Exo dozlarının HaCaT hücrelerinde 72 saatlik inkübasyon süresi boyunca metabolik aktivite üzerindeki etkileri.

24, 48 ve 72 saatlik MTT testi sonucunda, 50k ve 50M arasında değişen partikül konsantrasyonları arasında değişen hUC-MSC-Exo dozlarının, HaCaT hücrelerinin metabolik aktivitesini ve hücre canlılığını artırdığı, bu etkinin doza ve zamana bağlı olduğu tespit edildi. Tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkların olduğu görüldü. Tüm testlerde en yüksek metabolik aktivite 10M ve 50M hUC-MSC-Exo dozlarında gözlendi, bu nedenle HaCaT hücrelerinin değişen hUC-MSC-Exo dozlarına maruziyetinin hücresel metabolik aktivite ve canlılık oranını artırıcı bir etkisi olduğuyla ilişkilendirildi. 10M ve 50M grupları arasında anlamlı bir farkın olmaması, metabolik aktivitenin bu dozlarda maksimum düzeye ulaştığını ve eksozom alımında doygunluk seviyesine ulaştığıyla ilişkilendirildi. Eksozom dozlarına maruziyet süresinin uzaması düşük dozların metabolik aktiviteyi artırıcı etkisini azalttığı, yüksek dozların bu olumlu etkisinin stabil kaldığı gözlenmiştir.

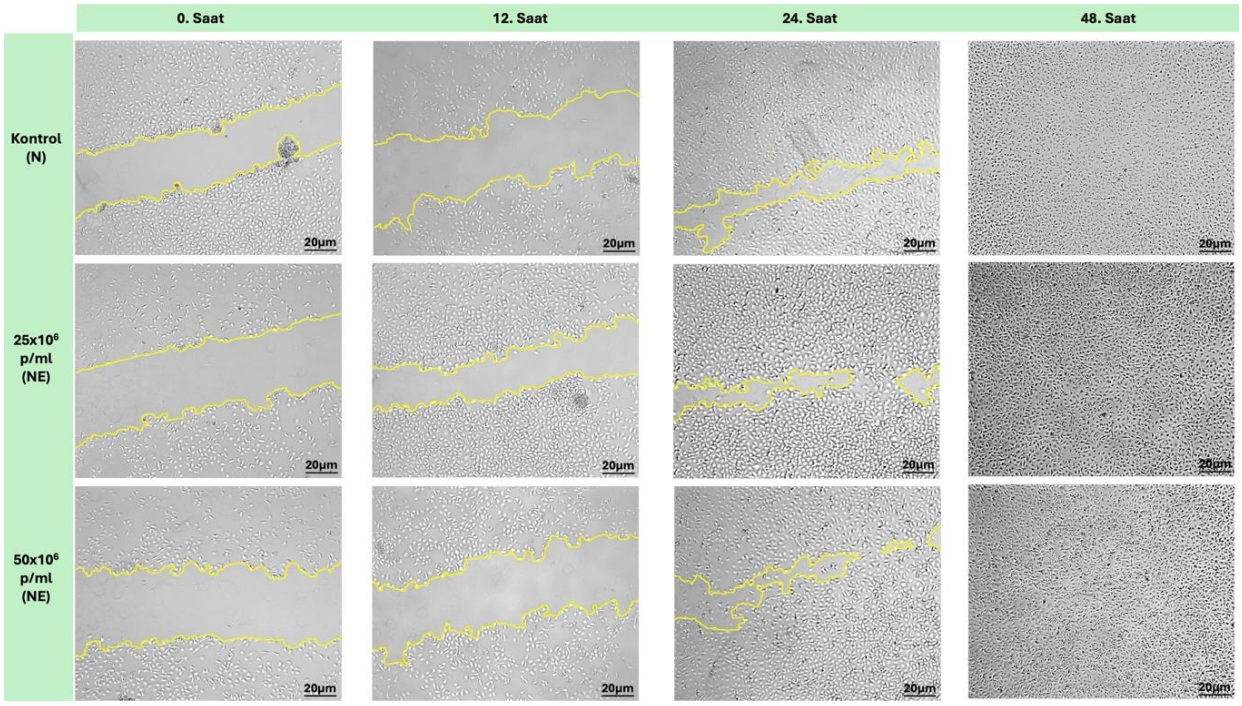
4.2. YARA MODELİ BULGULARI

Normoglisemik ortamdaki yara hattı büyüklük oranları ele alındığında, CTL-N-12h grubu ile kıyaslandığında, NE-25M-12h ve NE-50M-12h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-N-24h grubu ile kıyaslandığında, NE-25M-24h

ve NE-50M-24h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı azalma (p<0.001***) görüldü. CTL-N-48h grubu ile kıyaslandığında, NE-25M-48h ve NE-50M-48h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı azalma (p<0.001***) görüldü. NE-25M-12h grubuna kıyasla, NE50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış (p<0.001***) görüldü. NE-25M-24h grubuna kıyasla, NE-50M-24h grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış (p<0.01**) görüldü (Şekil 4. 4, Şekil 4.5, Tablo 4.1).



Şekil 4. 4: Normoglisemik ortamda kontrol, 25M p/ml eksozomlu, 50M p/ml eksozomlu gruplar arasındaki 0-12-24-48. saatlerde gerçekleşen yara hattı kapanma yüzdeleri (% değer olarak verilmiştir).



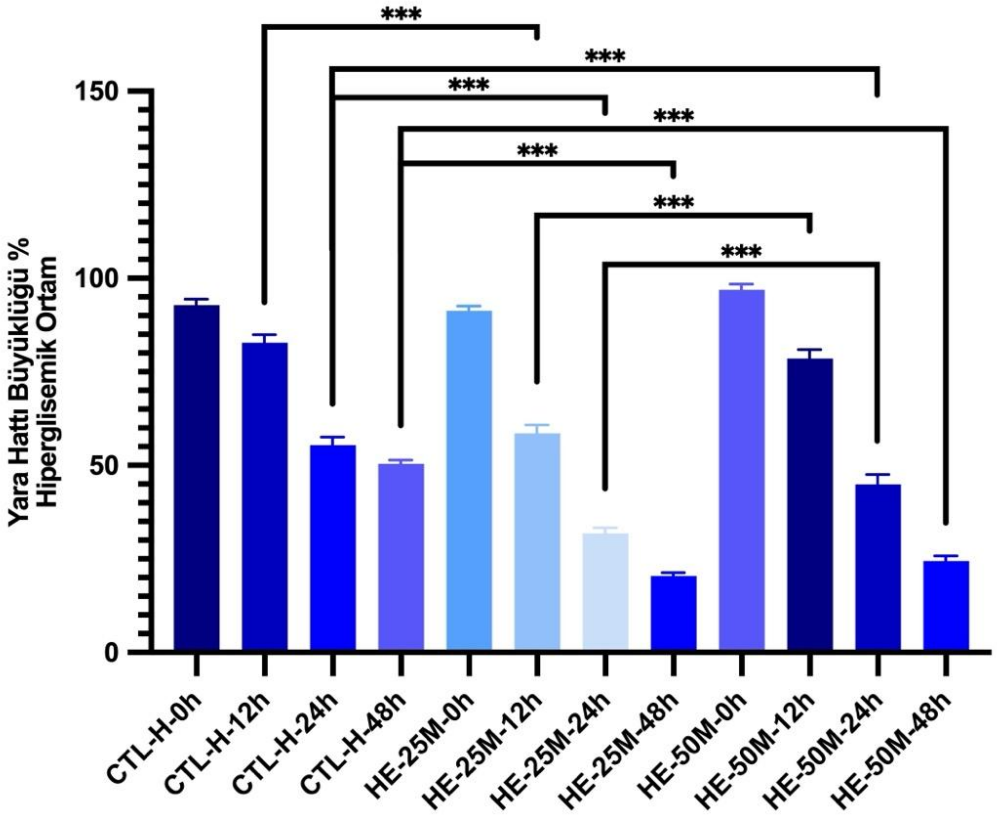
Şekil 4. 5: Normoglisemik ortamda in-vitro çizik yara iyileşmesi deneyinde ana hatları sarı renk ile çizilen başlangıç hücresi bölgeye hücre göçü ve yara kapanmasının 0., 12., 24., ve 48. saatlerdeki görsel karşılaştırması. Ölçek çubuğu 20 µm'dir.

Tablo 4. 1: Normoglisemik ortam yara alanı mesafesi ortalama değerleri.

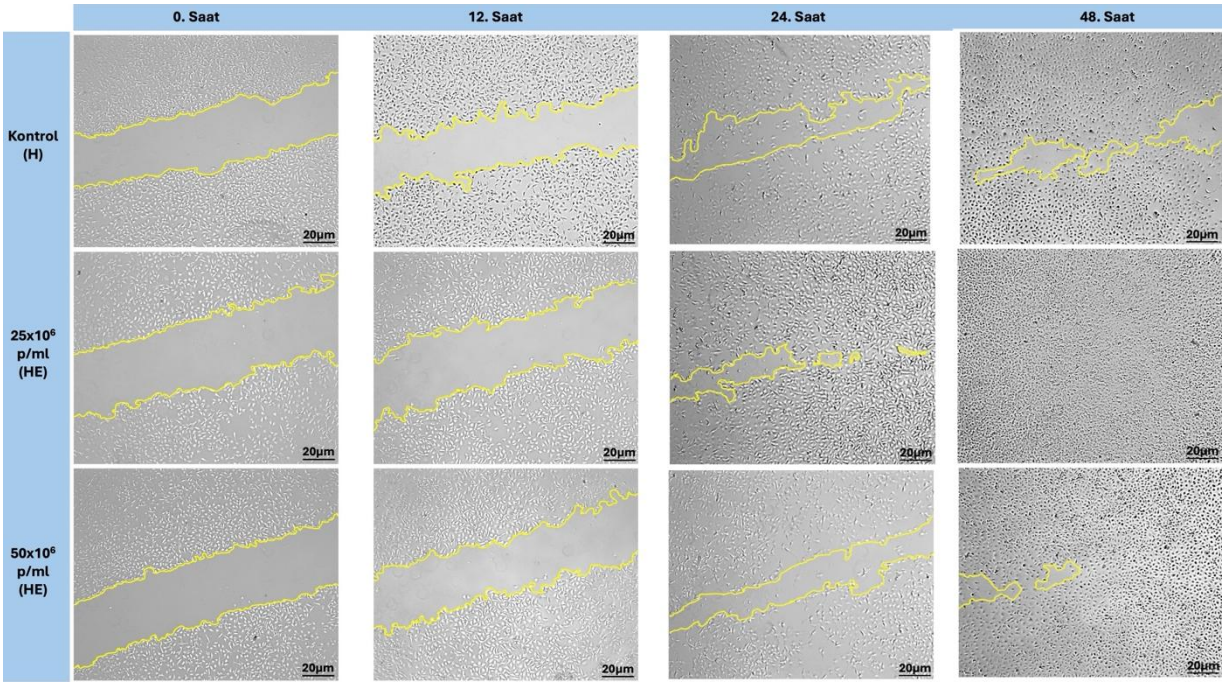
Normoglisemik Ortam	Yara Hattı Mesafesi (%)	Yara Hattı Mesafesi (µm)
CTL-N-0h	95,92	579,33
CTL-N-12h	79,25	478,67
CTL-N-24h	43,27	261,33
CTL-N-48h	32,84	198,33
NE-25M-0h	96,96	669
NE-25M-12h	50,15	346
NE-25M-24h	19,37	133,67
NE-25M-48h	14,54	100,33
NE-50M-0h	92,32	667
NE-50M-12h	66,62	481,33
NE-50M-24h	28,56	206,33
NE-50M-48h	18,04	130,33

Hiperglisemik ortamdaki yara hattı büyüklük oranları ele alındığında CTL-H-12h grubu ile kıyaslandığında, HE-25M-12h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-H-24h grubu ile kıyaslandığında, HE-25M-24h ve HE-50M-24h gruplarında istatistiksel

olarak çok anlamlı azalma (p<0.001***) görüldü. CTL-H-48h grubuna kıyasla, HE-25M-48h ve HE-50M-48h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı azalma (p<0.001***) görüldü. HE-25M-12h grubuna kıyasla, HE-50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış (p<0.001***) görüldü. HE-25M-24h grubuna kıyasla, HE-50M-24h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış (p<0.001***) görüldü (Şekil 4. 6, Şekil 4.7, Tablo 4.2).



Şekil 4. 6: Hiperglisemik ortamda kontrol, 25M p/ml eksozomlu, 50M p/ml eksozomlu gruplar arasındaki 0-12-24-48. saatlerde gerçekleşen yara hattı kapanma yüzdeleri (% değer olarak verilmiştir).



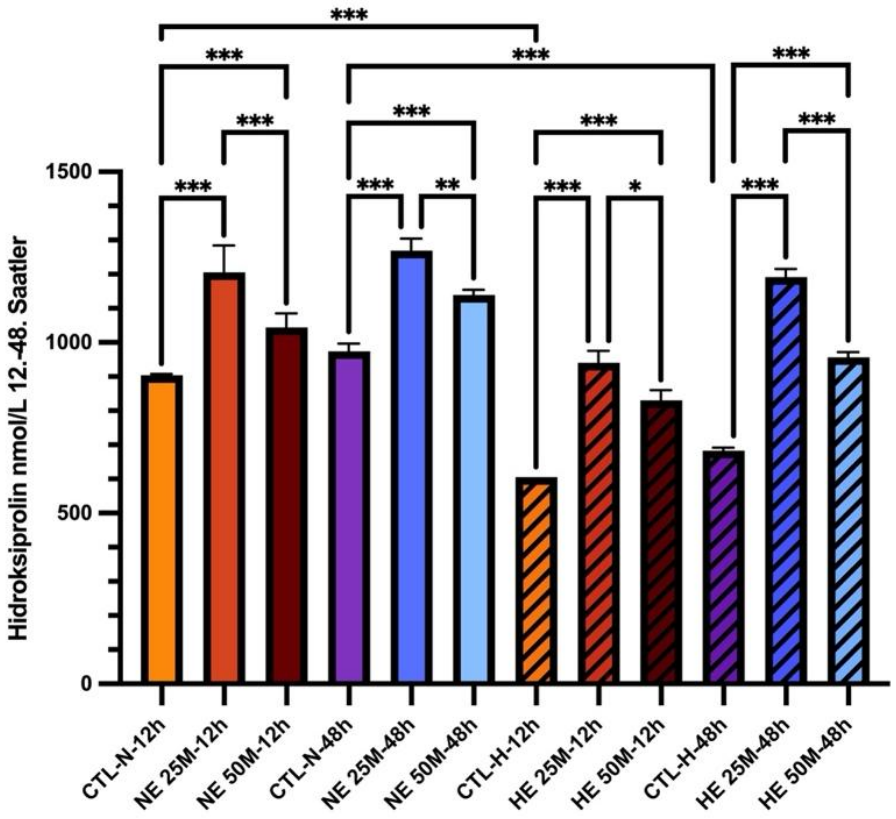
Şekil 4. 7: Hiperglisemik ortamda in-vitro çizik yara iyileşmesi deneyinde ana hatları sarı renk ile çizilen başlangıç hücresi bölgeye hücre göçü ve yara kapanmasının 0., 12., 24., ve 48. saatlerdeki görsel karşılaştırması. Ölçek çubuğu 20 µm'dir.

Tablo 4. 2: Hiperglisemik ortam yara alanı mesafesi ortalama değerleri.

Hiperglisemik Ortam	Yara Hattı Mesafesi (%)	Yara Hattı Mesafesi (µm)
CTL-H-0h	93,13	551,33
CTL-H-12h	82,80	490
CTL-H-24h	57,69	341,5
CTL-H-48h	49,60	293,65
HE-25M-0h	91,18	654,67
HE-25M-12h	60,97	437,76
HE-25M-24h	32,70	234,79
HE-25M-48h	21,31	153
HE-50M-0h	98,16	625,33
HE-50M-12h	77,96	496,65
HE-50M-24h	47,78	304,38
HE-50M-48h	24,44	155,70

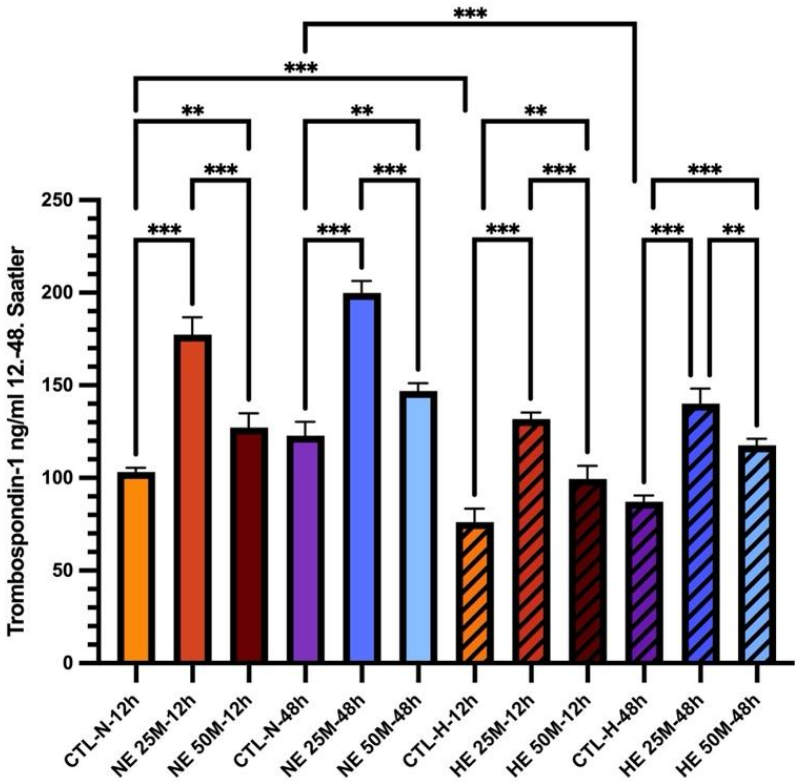
4.3. ELISA BULGULARI

Hidroksiprolin düzeyleri ele alındığında, CTL-N-12h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-12h ve NE 50M-12h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görülürken, CTL-H-12h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. NE 25M-12h grubuna kıyasla, NE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-N-48h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-48h ve NE 50M-48 gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görülürken, CTL-H-48h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. NE 25M-48h grubuna kıyasla, NE 50M-48h grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma ($p<0.01$**) görüldü. CTL-H-12h grubuna kıyasla, HE 25M-12h ve HE 50M-12h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. HE 25M-12h grubuna kıyasla, HE 50M-12h grubunda istatistiksel anlamda az anlamlı azalma ($p<0.005$*) görüldü. CTL-H-48h grubu ile kıyaslandığında; HE 25M-48h ve HE 50M-48h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. HE 25M-48h grubuna kıyasla, HE 50M-58h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü (Şekil 4. 8).



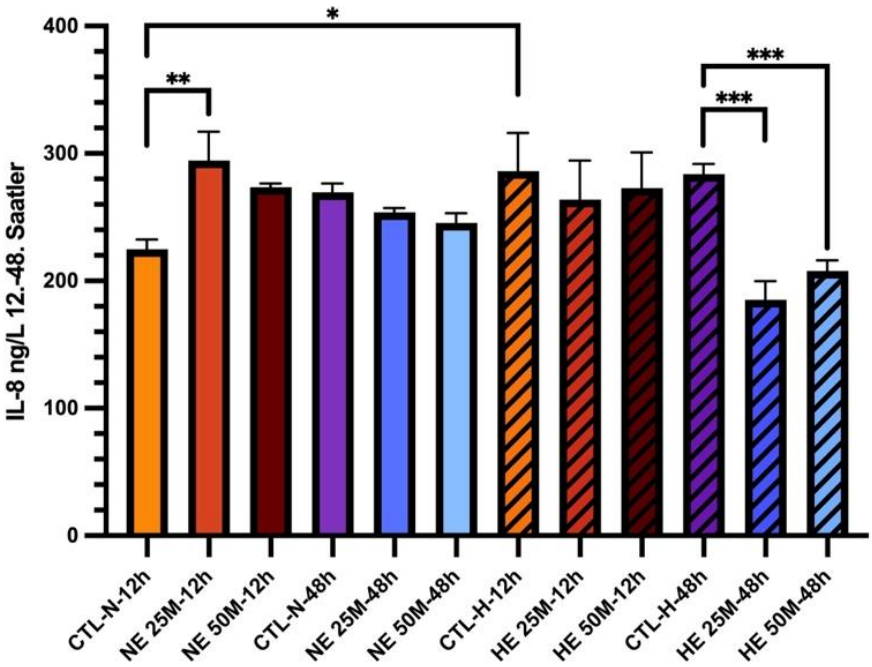
Şekil 4. 8: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası Hidroksipirolin nmol/L 12-48. Saatlerdeki ELISA analizi sonuçları.

Trombospondin düzeyleri ele alındığında CTL-N-12h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***), NE 50M-12h grubunda anlamlı artış ($p<0.01$**), CTL-H-12h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. NE 25M-12h grubuna kıyasla, NE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-N-48h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-48h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***), NE 50M-48h grubunda anlamlı artış ($p<0.01$**), CTL-H-48h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. NE 25M-48h grubuna kıyasla, NE 50M-48h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-H-12h grubu ile kıyaslandığında, HE 25M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görülürken, HE 50M-12h grubunda anlamlı artış ($p<0.01$**) görüldü. HE 25M-12h grubuna kıyasla, HE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. CTL-H-48h grubu ile kıyaslandığında; HE 25M-48h ve HE 50M-48h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. HE 25M-48h grubuna kıyasla, HE 50M-48h grubunda istatistiksel olarak grubunda anlamlı azalma ($p<0.01$**) görüldü (Şekil 4.9).



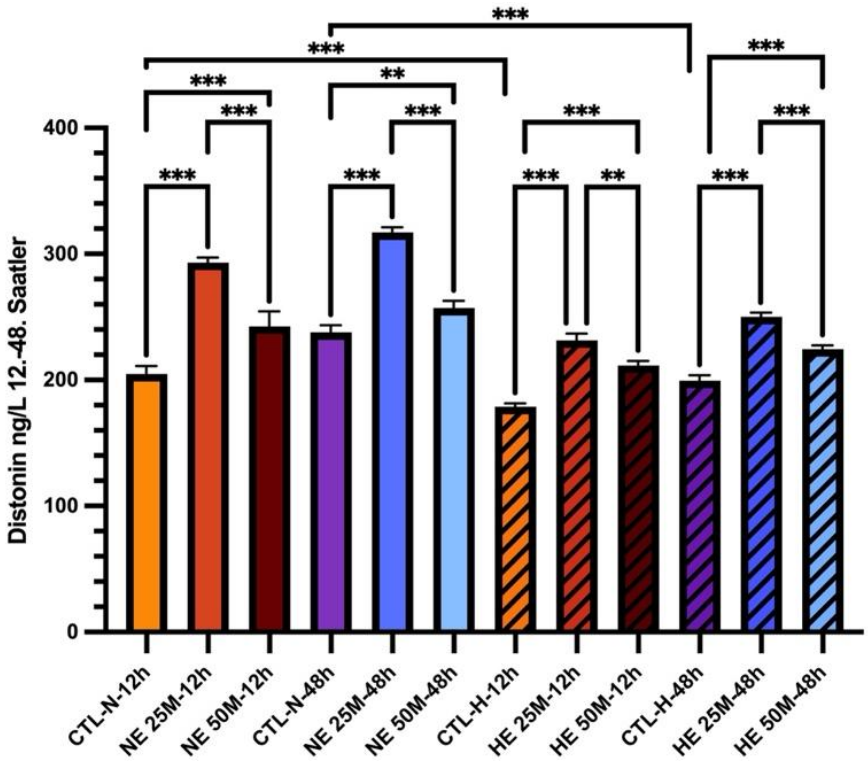
Şekil 4. 9: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası Trombospondin-1/ ng/ml 12-48. saatlerdeki ELISA analizi sonuçları.

IL-8 düzeyleri ele alındığında, CTL-N-12h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-12h grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.01$**) görülürken, CTL-H-12h grubunda az anlamlı artış ($p<0.005$*) görüldü. CTL-H-48h grubu ile kıyaslandığında, HE 25M-48h ve HE 50M-48h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü (Şekil 4. 10).



Şekil 4. 10: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası IL-8 ng/L 12-48. saatlerdeki ELISA analizi sonuçları.

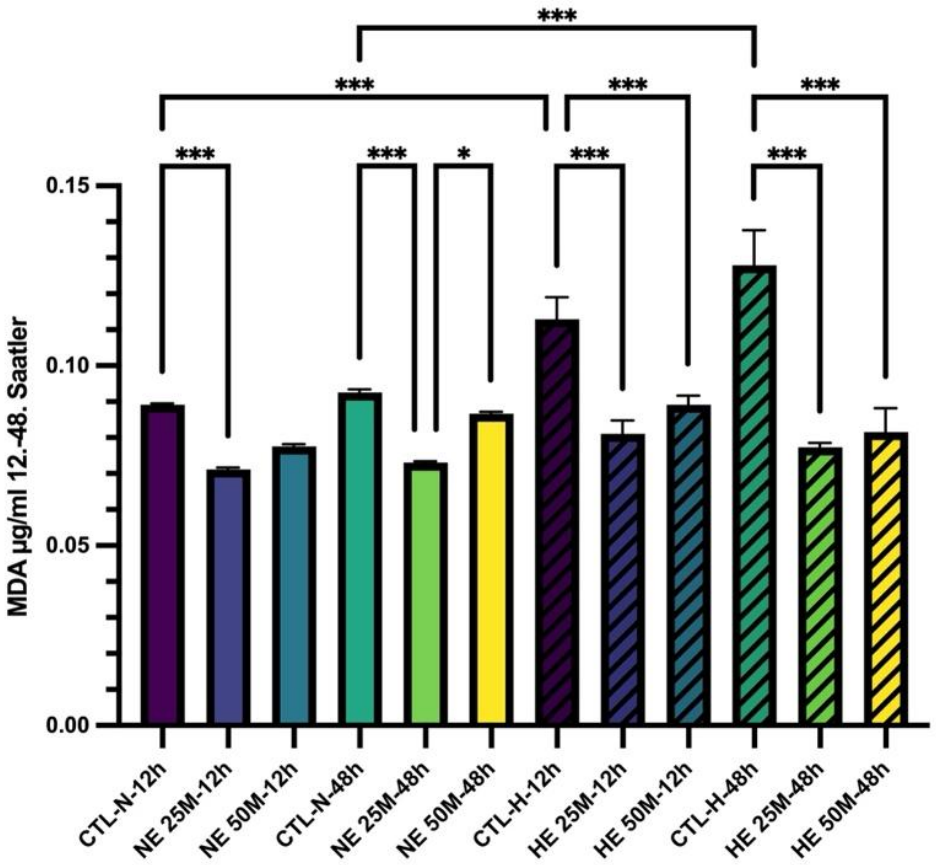
Distonin düzeyleri ele alındığında CTL-N-12h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-12h ve NE 50M-12h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görülürken, CTL-H-12h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. NE 25M-12h grubu ile kıyaslandığında, NE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-N-48h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-48h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***), NE 50M-48h grubunda anlamlı artış ($p<0.01$**) ve CTL-H-48h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. NE 25M-48h grubuna kıyasla, NE 50M-48h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-H-12h grubu ile kıyaslandığında; HE 25M-12h ve HE 50M-12h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. HE 25M-12h grubuna kıyasla, HE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma ($p<0.01$**) görüldü. CTL-H-48h grubu ile kıyaslandığında; HE 25M-48h ve HE 50M48h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. HE 25M-48h grubuna kıyasla, HE 50M-48h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü (Şekil 4. 11).



Şekil 4. 11: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası Distonin ng/L 12-48. saatlerdeki ELISA analizi sonuçları.

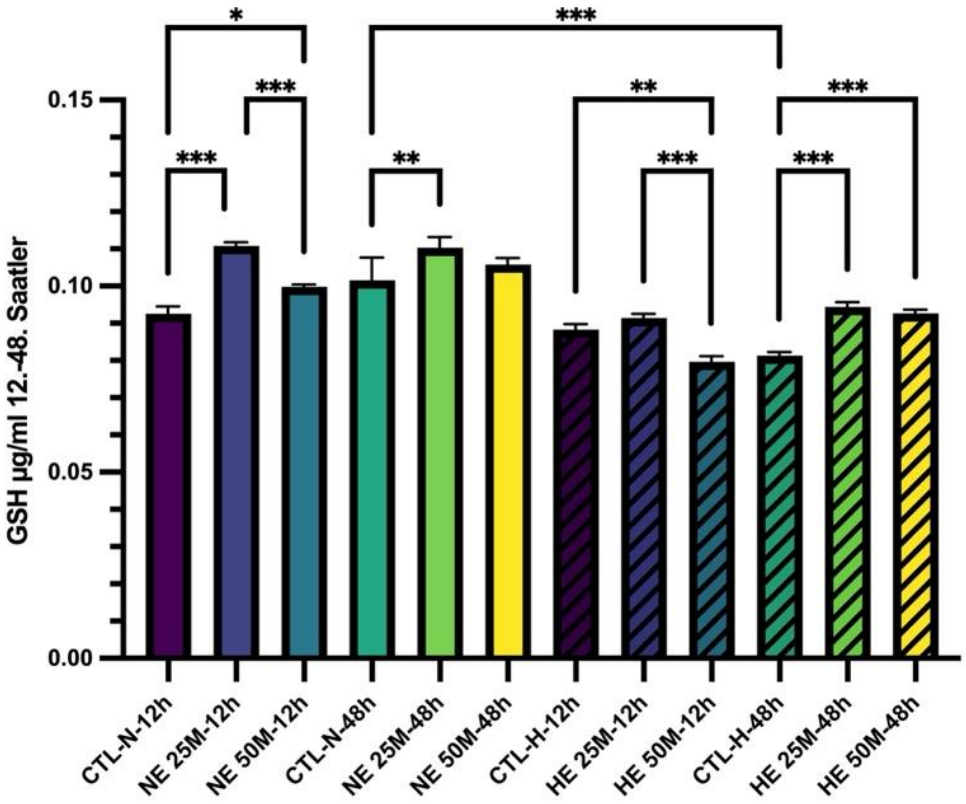
4.4. BİYOKİMYA BULGULARI

MDA düzeyleri ele alındığında, CTL-N-12h grubu ile kıyaslandığında; NE 25M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görülürken, CTL-H-12h grubunda çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. CTL-N-48 grubuna kıyasla; NE 25M-48h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görülürken, CTL-H-48h grubunda çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü. NE 25M-48h grubuna kıyasla, NE 50M-48h grubunda istatistiksel olarak az anlamlı artış ($p<0.005$*) görüldü. CTL-H-12h grubuna kıyasla; HE 25M-12h ve HE 50M-12h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-H-48h grubuna kıyasla; HE 25M-48h ve HE 50M-48h gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü (Şekil 4. 12).



Şekil 4. 12: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası MDA µg/mL 12-48. saatlerdeki biyokimya analizi sonuçları.

GSH düzeyleri ele alındığında CTL-N-12h grubunda, NE 25M-12h grubuna kıyasla istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görülürken, NE 50M-12h grubuna kıyasla az anlamlı azalma ($p<0.005$*) görüldü. NE 25M-12h grubu ile kıyasladığında, NE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-N-48 grubuna kıyasla; NE 25M-48h grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.01$**) görülürken, CTL-H-48h grubunda çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-H-12h grubuna kıyasla, HE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma ($p<0.01$**) görüldü. HE 25M-12h grubuna kıyasla, HE 50M-12h grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma ($p<0.001$***) görüldü. CTL-H-48h grubuna kıyasla, HE 50M-48h ve HE 25M-48h gruplarında çok anlamlı artış ($p<0.001$***) görüldü (Şekil 4. 13).



Şekil 4. 13: Normoglisemik ve hiperglisemik gruplar arası GSH µg/L 12-48. saatlerdeki biyokimya analizi sonuçları.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda MTT testlerinde hUC-MSC eksozomlarının HaCaT hücrelerinde metabolik aktiviteyi artırdığı ve bu etkilerini doza ve zamana bağlı gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızdaki metabolik aktivite artışının doza bağlı olduğu gözlemlenmiş ve yüksek dozlarda (5M, 10M ve 50M), hücresel metabolizmanın maksimum seviyelere ulaştığı ve 10M dozdan sonra metabolik etkiyi daha fazla arttırmadığı gözlenmiştir. Bu durum literatürde rapor edilen doygunluk etkisiyle uyumluluk göstermektedir [109]. Bu etki, eksozomların hücre yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla alımının belirli bir kapasiteyle sınırlı olmasıyla ilişkili olabilir. Pan ve diğ. [110] eksozom membranındaki lipid yapıların hücresel alımda kritik bir rol oynadığını ve reseptör aracılı alımın bir eşik düzeyine ulaştıktan sonra doygunluk etkisi gösterdiğini rapor etmiştir.

Zamana bağlı etkiler incelendiğinde, düşük dozlarda metabolik aktivitenin zamanla artış gösterdiği ve yüksek dozlarda bu etkinin erken dönemde maksimum seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Bu durum, düşük dozlarda eksozomların hücresel süreçleri kademeli olarak etkilediği, yüksek dozların ise erken dönemde hücre sağkalımı işlevlerini hızla desteklediğini gösterebilir. Chen ve diğ. [111] yüksek doz eksozomların erken dönemde mitokondriyal NAD^+ seviyelerini artırdığı, Sirt3 proteini aktivitesini düzenlediği ve bu sayede hücre sağkalımı üzerinde oldukça etkili olduğu belirtilmiştir. Uzun süreli inkübasyonda metabolik aktivitenin stabil kalması, eksozomların taşıdığı biyoaktif moleküllerin hücrelere uzun vadede enerji üretimi desteği sağladığı, enerji kullanımını azaltarak hayatta kalma sürelerini uzattığını desteklemektedir. Benzer şekilde çalışmalarda [112-114] eksozomların mitokondriyal membran potansiyelini ve ATP üretimini artırdığı, ATPaz aktivitelerini düzenleyerek hücrelerin enerji ihtiyacını azalttığı ve uzun süreli hayatta kalımı artırdığı gösterilmiştir.

Eksozomların etkilerinin yalnızca taşıdıkları biyoaktif içeriklerle değil, aynı zamanda hedef hücrelerdeki sinyal yollarını aktive etme yetenekleriyle de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Literatürde eksozomların taşıdığı mikroRNA'ların (örn. miR-21 ve miR-23a) PI3K/Akt ve ERK sinyal yollarını aktive ettiği ve böylece hücresel proliferasyonu ve mitokondriyal biyogenezi artırdığı gösterilmiştir [115]. Zhang ve diğ. [116] ise hUC-MSC eksozomlarının endotel hücrelerinde Wnt4 aracılı Wnt/β-katenin yolağı üzerinden hücrelerin proliferasyonunu artırdığını belirtmektedir. Ayrıca hUC-MSC eksozomlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalarda eksozomların miyokardiyal iskemiyi ve reperfüzyon hasarını azaltmada [117], karaciğer fibrozisini hafifletmede [118] ve akut böbrek hasarına karşı koruma sağlamada [119] etkili olduğu da belirtilmektedir. Ayrıca eksozomların PTEN ve GSK3β'yi susturarak c-Jun/AP1 aktivitelerini artırdığı ve böylece hücresel yenilenmeyi desteklediği literatürde rapor edilmiştir [120,121].

Yara iyileşmesi, dış etkenlere bağlı olarak cilt bütünlüğünün bozulması veya hasar görmesi sonucu başlayan karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreç iki temel aşamadan oluşur: akut inflamasyon evresi, hasar bölgesinde inflamatuar sitokinlerin arttığı, inflamatuar hücrelerin toplanarak temizleme ve savunma işlevi gördüğü, hücre proliferasyonunun da nispeten başladığı aşamadır. Hücresel proliferasyon evresi ise inflamasyonun sınırlandırıldığı, fibroblast ve keratinosit gibi hücrelerin çoğalarak yeni dokuların oluşumunu başlattığı aşamadır [122,123]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hUC-MSC'lerin ve bunlardan elde edilen eksozomların bu aşamaların her birinde önemli roller oynadığını göstermektedir. hUC-

MSC'lerin yara iyileşmesini destekleyerek cilt yaralanmalarında potansiyel bir tedavi seçeneği sunabileceği bildirilmektedir [124,125].

Yara iyileşmesinin ilk aşaması olan akut inflamasyon evresinde, yara hattındaki hücrelerin migrasyonu ve organizasyonu sürecin başarısında kritik bir rol oynar. Keratinositler yara iyileşmesinin akut evresinden itibaren yara iyileşme sürecini düzenleyen platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), kök hücre faktörü (SCF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), trombospondin-1 gibi büyüme faktörleri; TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 gibi sitokinler salgılar [126,127]. Bunun yanı sıra kültüre edilmiş keratinositlerin yara iyileşmesi sırasında doku bütünlüğünün geri kazanılması ve migrasyonun desteklenmesi amacıyla başta tip IV kolajen olmak üzere tip I, tip III, tip V kolajen gibi bazal lamina proteinlerini ve distonin protein/gen ailesinden büllöz pemfigoid protein gibi hemidesmozom proteinlerini sentezlediği de gösterilmiştir [128].

Çalışmamızda normoglisemik ortamda, kontrol grubunda yara kapanma oranlarının zamanla azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, normal koşullar altında yara iyileşmesinin ilerleyen evrelerinde inflamasyon azalmasından dolayı proliferasyonun teşvik edilmesiyle ilişkilendirilebilir. Ancak, hUC-MSC eksozomlarının özellikle 25M dozunda uygulanmasıyla yara kapanma oranlarında hem akut dönemde (24h) hem de kronik dönemde (48h) bir artış saptanmıştır. Bu bulgu, normoglisemik koşullarda dahi eksozomların keratinositlerin migrasyon kapasitesini artırarak inflamasyonun düzenlenmesine ve yara hattındaki organizasyonun hızlanmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Literatürde, hUC-MSC eksozomlarının TGF-β ve VEGF gibi büyüme faktörlerini içerdiği ve bu moleküllerin hücrelerin ECM sentezini artırarak yara kapanma sürecine olumlu etkiler sağladığı rapor edilmiştir [129,130]. Bu tip büyüme faktörlerinin hücre içi sinyal yolağı olan p38/mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), çeşitli hücre tiplerinde göç ve proliferasyonu destekleyen hücre iskeleti yeniden organizasyonundan sorumlu önemli bir kinaz olarak bilinmektedir. p38/MAPK yolunun yara iyileşmesi koşullarında keratinosit migrasyonunu düzenlediği gösterilmiştir [130-133]. Aynı zamanda MAPK'lar, hipoksi, oksidatif stres ve radyasyon gibi çeşitli stres durumlarında otofajinin önemli düzenleyicileridir [134,135].

Çalışmamızda hiperglisemik ortam kontrol grubu yara kapanma oranları, normoglisemik ortam kontrol grubu yara kapanma oranları ile karşılaştırıldığında, hiperglisemik ortamda yara kapanma oranlarının belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir.

Diyabetik hastalarda yara iyileşmesinin gecikmesi yaygın bir durumdur. Yapılan çalışmalarda diyabetin yara iyileşme sürecinde keratinositleri olumsuz etkileyebilecek mekanizmalar arasında; azalmış keratinosit migrasyonu ve proliferasyonu, gap junction anormallikleri, inflamatuar sitokinlerde dengesizlikler, artmış oksidatif stres ve matriks metalloproteinazların (MMP'ler) düzensiz ekspresyonu yer aldığı öne sürülmektedir [136]. Yapılan diğer çalışmalarda [136] yüksek glikoz ortamının kültüre edilen keratinositlerin göç yeteneğini azalttığı gösterilmiş olup; benzer bir çalışmada [137] keratinosit hareketliliğini ve hücre iskeleti yapısını belirleyen önemli faktörlerden biri olan keratinosit fokal adezyon kinaz (p125FAK)'ın yüksek glikozlu ortamda ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.

Literatürdeki diğer çalışmalar da diyabette keratinosit hareketliliğinin bozulduğunu farklı mekanizmalarla doğrulamıştır. İleri glikasyon son ürünleri (AGEs), glikoz ile proteinlerin amino grupları arasındaki kimyasal reaksiyon sonucu oluşur. Diyabetik yaralarda hiperglisemik ortam, kolajen gibi proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonuna neden olabilir [138]. Morita ve diğ. [139] glikasyonlanmış kolajen I üzerinde keratinositlerin yapışma ve göç yeteneğinin azaldığını bildirmiştir. Song ve diğ. [140] AGE ile modifiye edilmiş insan serum albümini ile kültüre edilen keratinositlerde yapışma ve göçün azaldığını ve bunun integrin alfa-3 ekspresyonunun düşmesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Zhang ve diğ. [141] hiperglisemik koşulların ve diyabetik yaraların keratinosit göçünü bozduğunu ve bu sürecin FOXO1 transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenebileceğini öne sürmüştür. Bu nedenle, diyabetik yaralarda keratinosit hareketliliğinin azalmasında birden fazla mekanizma rol oynayabilir. Buna karşın, hUC-MSC eksozomları, özellikle 25M dozunda, bu olumsuz etkileri tersine çevirmiştir. Yüksek doz eksozom uygulamasının yara kapanma oranlarını artırması, eksozomların ROS seviyelerini düşürerek hücresel enerji metabolizmasını desteklediğini ve inflamasyonu düzenleyebildiğini düşündürmektedir.

Hidroksiprolin, ağırlıklı olarak fibriler kolajenlerde bulunan ve toplam amino asit içeriğinin yaklaşık %13-14'ünü oluşturan bir bileşiktir. Kolajen sentezi sırasında, prolinin prolin hidroksilaz enzimi tarafından post-translasyonel olarak modifiye edilmesiyle üretilir. Bu amino asit neredeyse tamamen kolajen yapısında bulunduğundan, ölçülen seviyeleri dokulardaki kolajen döngüsünü yansıtan önemli bir biyokimyasal belirteç olarak kabul edilmektedir [142]. Yapılan çalışmalarda [143,144] artan hidroksiprolin sentezinin ve seviyelerinin yara iyileşmesi, keratinizasyon oranı ile paralellik gösterdiği, ayrıca prolin ve hidroksiprolinden zengin beslenmenin yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu

çalışmada da hidroksiprolin seviyeleri 25M eksozom verilen gruplarda kontrol gruplarına göre hem akut dönemde hem de kronik dönemde arttığı gözlenmiştir. 50M eksozom uygulanan gruplardaki hidroksiprolin seviyelerine bakıldığında kontrol gruplarına göre artmış olsa da 25M gruplarındaki kadar artış gözlenmemiştir. Bu bulgu 25M dozunun daha etkili olduğuna işaret etmekte olup yara kapanma oranlarımız ile uyumludur. Bulgularımıza benzer şekilde eksozomların doku metalloproteinaz'ları inhibe ederek [145,146]; içerdiği epitelyal büyüme faktörü (EGF) başta olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri sayesinde [147] ve inflamasyonu inhibe edip çevresel stres faktörlerini baskılayarak [148] kolajen sentezini artırdığı gösterilmiştir.

Hiperglisemik ortamdaki kontrol gruplarıyla normoglisemik ortamdaki kontrol grupları karşılaştırıldığında hiperglisemik ortamın hidroksiprolin sentezini baskıladığı ve yara iyileşmesini geciktirdiği gözlenmektedir. Literatürde hipergliseminin farklı dokularda bulunan fibroblastlarda kolajen sentezini artırdığını ve fibrozis oluşumunu tetiklediğini belirten birçok çalışma [149,150] olsa da keratinositlerin kolajen sentezi üzerine etkisini belirten bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak yüksek glikozun keratinositler üzerinde birçok büyüme faktörünün hücre içi ortak sinyal yolu olan PKC ve tirozin-kinazın etkisini, ayrıca IGF-1'in etkilerini baskıladığı gösterilmiş olup [151-153], bu yolakların kolajen sentezi üzerindeki tetikleyici etkileri bilinmektedir [154]. Çalışmamızda kolajen sentezinin bir göstergesi olan hidroksiprolin seviyelerinin hiperglisemik ortamda azalması bununla ilgili olabilir. Öte yandan özellikle 25M dozunda daha belirgin olmak üzere eksozom uygulaması çalışmamızda hem akut hem de kronik dönemde zamana bağlı şekilde hidroksiprolin sentezini artırmıştır. Eksozomlar bu etkilerini yukarıda da belirtildiği gibi hem direkt olarak hem de hiperglisemik ortamın yarattığı olumsuz etkileri azaltarak göstermiş olabilir.

Trombospondin-1 (TSP-1), keratinositler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinin yapışmasını, proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını düzenleyen 450 kDa ağırlığında bir glikoproteindir [155]. İnsan derisinde, bazal epidermal keratinositler tarafından salgılanan TSP-1, bazal membran bölgesine depolanır [156]. TSP-1 ayrıca vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) inhibisyonu üzerinden anjiogenezi inhibe etmektedir [157]. Bu mekanizma, damarsız epidermis ile vaskülarize dermis arasındaki doğal anti-anjiyojenik bariyerin korunmasına katkıda bulunur [158]. TSP-1'in bu çoklu etkilerinden dolayı yara iyileşmesi sırasındaki rolü daha karmaşıktır. Yapılan çalışmalarda [159-161], erken yara iyileşmesi sırasında ekstraselüler matrikste artmış TSP-1 seviyeleri tespit edilmiş, ayrıca yara

kapanmasının geç evrelerinde damarların çevresinde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Bu durum TSP-1'in yara onarımında keratinositlerin normal göç ve adezyonuna katkı sağladığı gibi ayrıca da fizyolojik anjiyogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca DiPietro ve diğ. [162] TSP-1 ekspresyonunun inhibisyonunun deride yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir ve bu nedenle TSP-1'in doku onarımında önemli bir düzenleyici rol oynadığı öne sürülmüştür. Çalışmamızdaki bulgularımız eksozom uygulaması, özellikle 25M dozunda, TSP-1 sentezini artırarak yara iyileşmesine olumlu katkı sağlamış olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde hUC-MSC eksozomlarının keratinosit TSP-1 sentezi üzerine bir çalışma olmamakla birlikte, Kim DH ve diğ. [163] yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş hUC-MSC hücrelerinin TSP-1 sentezlediği gösterilmiştir. Ayrıca Kang H ve diğ. [164] çalışmalarında hem adipoz doku kaynaklı mezenkimal hücrelerde hem de hUC-MSC'lerde eşit oranda TSP-1 sentezlendiğini belirtmişlerdir. Bu bağlamda hUC-MSC eksozomlarının da TSP-1 içerdiği düşünülebilir.

Çalışmamızın bulguları hiperglisemik ortamın TSP-1 sentezini baskıladığını göstermektedir. Normoglisemik kontrol gruplarıyla kıyaslandığında TSP-1 seviyeleri hiperglisemik kontrol gruplarında azalmıştır. Eksozom uygulamaları ise, özellikle 25M dozunda bu baskılamayı anlamlı şekilde geriletmiştir. Yara kapanma oranlarımız da göz önünde bulundurulduğunda hiperglisemik ortamda azalmış TSP-1 seviyeleri gecikmiş yara iyileşmesi ile ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde hiperglisemik ortamda eksozom uygulamasının yara kapanmasını hızlandırmasındaki mekanizmalardan birisi de TSP-1 sentezini artırmak olabilir. Bulgularımızın aksine literatürde birçok çalışma [165-167] diyabette TSP-1 oranındaki artışları bozulmuş doku onarımı ile ilişkilendirmektedir. Bununla birlikte yüksek seviye glikozun endotel hücrelerinde TSP-1'i kodlayan mRNA seviyelerinin arttığı, endotel hücrelerindeki TSP-1 reseptörü olarak görev yapan ve anjiyogenezden sorumlu CD47'nin yıkımını azalttığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalar [168,169] in-vitro çalışmalar değildir. Diyabetin birçok fonksiyonu aynı anda bozan bir sistemik bir hastalık olduğu göz önünde bulundurulduğunda [170], bozulmuş yara iyileşmesi ile korelasyon gösteren TSP-1 artışının keratinosit dışındaki birçok hücreden de kaynaklanabileceği de unutulmamalıdır. Ayrıca TSP-1'in anjiyogenezden de sorumlu bir molekül olduğu ve diyabette oluşan mikrovasküler komplikasyonlar nedeniyle gelişen hipoksi sonucu da artabileceği unutulmamalıdır [171]. Bu nedenle çalışmamızda TSP-1'in seviyelerinin hiperglisemik ortamda yara iyileşme oranları ile paralellik göstermesi keratinositlerdeki proliferasyon ve

migrasyon etkisinin daha farklı olabileceğini düşündürtmektedir. Öte yandan Bhattacharyya S ve diğ. [172] çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde yüksek doz glikozun miR-467 sentezini aşırı derecede artırdığı ve bunun da TSP-1 sentezini baskıladığını öne sürmektedir.

IL-8, yara iyileşmesinin akut döneminde öncelikli olarak granulosum tabakasında yer alan keratinositlerden sentezlenen ve keratinositlerin mitogenezini ve anjiyogenezi artıran bir sitokindir ve IL-8 seviyelerinin normal bir yara iyileşmesinde keratinosit tabakalaşması için gerekli olduğu belirtilmektedir [173]. Normal yara iyileşmesinin akut döneminde keratinositler çevresinde yer alan hasarlanmış hücrelerden salgılanan hasar ilişkili moleküler desenleri (DAMP) yapılarında yer alan Toll-Like Reseptörleri (TLR) sayesinde tanımakta ve buna bağlı inflamasyonu tetiklediği belirtilmektedir [174]. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda TLR3'ün DAMP görevi gören çift sarmal DNA'lar tarafından aktive olmasının yara iyileşmesi için gerekli olduğu gösterilmiş [175] ve TLR3 aktivasyonu sonucunda keratinositlerden ön planda IL-8 olmak üzere çeşitli pro-inflamatuar sitokinler sentezlendiği [176,177] ve IL-8 aracılığıyla çevre keratinositleri tetikleyerek doku onarımı ve kolajen sentezi için gerekli transglumatinaz 1 (TGM1) ve ATP bağlayıcı kaset ailesi A12 (ABCA12) gibi genlerin ekspresyonunu artırdığı çeşitli çalışmalarda [178,179] gösterilmiştir. Benzer şekilde Jiang ve diğ. [180] rekombinant IL-8 uygulamasının yara iyileşmesinin akut döneminde HaCaT keratinosit migrasyonu ve proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da akut dönemde 25M ve 50M dozunda eksozom uygulanan gruplarda IL-8 seviyeleri kontrole göre artmış ve bu artış 25M dozunda daha belirgin olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda eksozomların DAMP sinyallerini taklit ederek immün homeostazisi düzenlediği gösterilmiş olup [181,182], çalışmamızda da keratinositlerdeki IL-8 sentezini bu yolla tetiklemiş ve yara iyileşmesinin akut fazını hızlandırmış olabilir. Literatürde yara iyileşmesinin kronik döneminde ise keratinositlerde hem IL-8 üretiminin hem de IL-8 reseptörlerinin azaldığı ve böylelikle inflamasyonun sonlandırılarak yara yeri onarımının tetiklendiği belirtilmektedir [180]. Bu çalışmada da benzer şekilde 25M dozunda eksozom verilen gruplarda kronik dönemde IL-8 seviyeleri azalmış ancak gruplar arası seviyeler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bununla birlikte her ne kadar IL-8 seviyelerinin akut dönemde artışı normal yara iyileşmesinde kritik rol oynasa da IL-8 aynı zamanda proinflamatuar bir sitokindir ve hiperglisemik ortamda fazla artışı ROS üretiminde tetiklenme ve bozulmuş yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiştir [183]. Diyabetik hastalarda hiperglisemik ortamda bulunan keratinositler

tarafından aşırı miktarda üretilen IL-8'in aynı zamanda nötrofil göçünü artırdığı, oksidatif stres üretimine neden olan myeloperoksidaz enzimini artırdığı [183], hücre proliferasyonunu ise baskıladığı gösterilmiştir [184]. Çalışmamızda da benzer şekilde hiperglisemik kontrol gruplarında IL-8 seviyeleri normoglisemik kontrol gruplarına göre hem akut hem de kronik dönemde artmış olup, bulgularımız özellikle 25M dozundaki eksozom uygulaması bu artışı frenleyerek IL-8'in hiperglisemik ortamda yarattığı bu potansiyel yan etkilerin önüne geçtiğini düşündürmektedir.

Bullöz pemfigoid antijen 1 (BPAG1-e, BP230), güncel adıyla distonin, hemidesmozomal iskelet bağlantı proteinleri ailesine ait olup, distonin (DST) geninin bir izoformu tarafından kodlanmaktadır [185]. Literatürdeki çalışmalar BPAG1'in C-terminal tekrar bölgelerinin hemidesmozomların sitoplazmik plağı ile çapraz bağlar oluşturduğunu öne sürmekte ve bu yapının, keratin filamentlerinin bağlanması için ana bağlantı noktası olarak işlev gördüğünü belirtmektedir [186]. Michael ve diğ. [185] distonin'in keratinosit yapışması ve hareketliliğini kontrol etmede önemli bir role sahip olduğunu yaptıkları çalışmada göstermiş ve hemidesmozomların olgunlaşmasını ve adezyonlarının kontrolünde kritik bir işlevi olabileceği öne sürülmüştür. Yine aynı çalışmada [185] DST geninde işlev kaybına neden olan mutasyonları taşıyan bireylerden elde edilen hücrelerde morfoloji, yapışma ve göç açısından önemli kusurlar tespit edilmiş, Hamill ve diğ. [187] ise distonin seviyelerinin keratinositlerde knockdown yöntemiyle azaltıldığı çalışmalarda, keratinosit polaritesinde hafif bozukluklar olabileceğini yaptıkları çalışmayla ileri sürmüştür. Bu çalışmada 25M ve 50M dozunda eksozom verilen gruplarda akut ve kronik dönemde distonin sentezinde kontrol grubuna kıyasla artış saptanmış ve bu artış özellikle 25M grubunda daha belirgin olarak gözlenmiştir. Bu bulgular yara kapanma oranları bulgularımız ile paralellik göstermiştir. Keratinositlerdeki distonin sentezindeki artışın, eksozom uygulamasının özellikle de 25M dozunda yara iyileştirmesini hızlandırdığına dair bir gösterge olabilir. Benzer şekilde Guo L ve diğ. [188] BPAG1 knockout fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında da hem akut hem de kronik dönemde kontrol gruplarında distonin seviyeleri artmış, knockout grupta ise yara iyileşmesinde gecikme olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda hiperglisemik ortamın distonin seviyelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular her ne kadar hiperglisemik ortamın yara iyileştirmesini geciktirdiğini düşündürse ve yara kapanma oranlarımızla paralellik gösterse de literatürde hiperglisemik ortamın keratinositlerde distonin sentezi üzerindeki etkilerini gösteren başka

çalışma bulunmamaktadır. Öte yandan Cheng J ve diğ. [189] streptozosin ile indüklenmiş diyabet modeli yaratılan sıçanlarda DST geninde upregülasyon olduğunu göstermişlerdir. Bu durumun nedeni hiperglisemik ortamda bozulan distonin sentezinin bir kompanzasyonu olabilir. Ek olarak farklı mekanizmalar ile tetiklenen distonin eksikliği sonucu gözlenen büllöz pemfigoid hastalığının görülme oranının diyabette arttığı gösterilmiştir [190,191]. Bununla birlikte eksozom uygulaması, yara kapanma oranlarına paralel bir şekilde distonin sentezindeki azalmaları engellemiş ve bu etki özellikle 25M dozunda daha belirgin şekilde gözlenmiştir.

Travma, hücre hasarına bağlı inflamatuar yanıt oluşturan bir durumdur. Hücre hasarını takiben hem lokal hem de sistemik oksidan değişikliklerin meydana geldiği, bunların artmış serbest radikal aktivitesi ve lipid peroksidasyonu ile kendini gösterdiği bilinmektedir [192]. Aynı zamanda doku harabiyeti total antioksidan seviyelerinde belirgin bir azalmaya ve antioksidan savunma kapasitesinin düşmesine neden olur [193]. Epitel hasarı sonrası oksidatif stresin toksik ürünlerinin dolaşımdaki lipid peroksitler olduğu güçlü kanıtlarla gösterilmiştir. Lipid peroksitler, proteinler ve amino asitlerle reaksiyona girerek malondialdehit (MDA) oluşumuna yol açar [194,195]. Yapılan bir çalışmada [196], epitel hasarı sonrası 4 saat içinde sıçan ve farelerin serumunda MDA seviyelerinin önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde, yaygın epitel hasarı sonrası hastalarının plazmasında MDA seviyelerinin yanık yaralanmasını takiben kısa sürede arttığı ve bu artışın 12 gün boyunca devam ettiği gözlenmiştir [197]. Aynı zamanda yüksek glikoz seviyelerinin ROS üretiminde artışa neden olarak, artan glikasyon ürününün oluşumunu ve lipid yıkımını tetikleyerek MDA seviyelerinde artışa neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [195]. Çalışmamızda da benzer şekilde yüksek glikoz ortamında MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir. Eksozom uygulaması, özellikle 25M dozunda, akut ve kronik dönemde hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortamda MDA artışını yukarıda bahsedilen mekanizmalar ile engellemiş ve yara onarım hızını artırmıştır.

Aynı zamanda travma sonrası reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarla mücadelede önemli antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar arasında indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler yer almaktadır [194]. Hücresel GSH seviyelerinin azalması, hücrelerin serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini yok etme kapasitesini düşürerek genel oksidatif stres seviyesini artırabilir [198]. Yara dokularında toksik olmayan ROS seviyelerini

koruyan antioksidan maddeler, iyileşme sürecini destekleyebilir ve hızlandırabilir. Bu nedenle ROS ve antioksidan seviyelerinin modülasyonu yoluyla redoks dengesinin düzenlenmesi, yeni tedavi stratejileri için önemli bir hedef oluşturmaktadır [199]. Çalışmamızın bulguları eksozom uygulamasının, özellikle 25M dozunda, yukarıda bahsedilen etkilerle GSH seviyelerini hem akut hem de kronik dönemde artırarak yara iyileşmesine olumlu etkiler gösterdiğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalar yüksek glikozun keratinositler de dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde antioksidan kapasiteyi düşürdüğü ve buna bağlı oksidatif stres hasarı yarattığını açıkça göstermektedir [200-202]. Çalışmamızda da benzer şekilde hiperglisemik gruplarda GSH seviyeleri düşmüş olup, bu düşüş hiperglisemik kontrol gruplarında yara iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörlerden birisi olabilir. Normoglisemik gruplardakine benzer şekilde eksozom uygulamasının, özellikle 25M dozunda, GSH seviyelerini hem akut hem de kronik dönemde artırarak yara iyileşmesine olumlu etkiler gösterdiği görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarını özetlersek,

- hUC-MSC-Exo uygulaması, yara iyileşmesini normoglisemik ve hiperglisemik ortamda zaman-doz bağımlı olarak hızlandırmaktadır.
- Normoglisemik ve hiperglisemik ortamda 25M p/ml hUC-MSC-Exo dozu zamana bağlı olarak en etkili/ideal doz olarak belirlenmiştir.
- Normoglisemik ve hiperglisemik ortamda eksozom aracılı yara iyileşmesinde, distonin ve trombospondin-1 düzeylerindeki artışların etkili olduğu görülmüştür.
- Diğer taraftan, hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortamda eksozom aracılı yara iyileşmesinde akut ve kronik dönemlerinde kolajenin yapıtaşı hidroksiprolinin artması, eksozom uygulamasının kolajen yapımını artırdığını destekler niteliktedir.
- Aynı zamanda, 25M p/ml hUC-MSC-Exo dozu antioksidan/oksidan kapasite oranını artırıp, ROS oluşumunu inhibe ederek oksidatif stresi baskılar ve yara iyileşmesini desteklemektedir.
- Hem normoglisemik hem de hiperglisemik gruplarda keratinositlerden akut dönemde IL-8 sentezini uyararak yara iyileşmesinin inflamatuar fazını tetiklediği, kronik dönemde ise düşürerek yara iyileşmesinin proliferatif evresine katkı sağladığı belirlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda hUC-MSC eksozomlarının akut ve kronik dönemde normoglisemik ve hiperglisemik ortamlarda yara iyileşmesini kolaylaştırıcı etkileri ve etki mekanizmaları ortaya konulmuştur. Sonuçlarımızın gelecekte moleküler ve genetik düzeyde daha ileri çalışmalarla araştırılarak desteklenmesi ile eksozomlar, diyabette bozulmuş yara iyileşmesi ve benzeri durumlarda etkili bir tedavi seçeneği olarak sunulabilir.

KAYNAKLAR

[1]. Park, K., 2015, Role of micronutrients in skin health and function. *Biomolecules & therapeutics*, 23(3), 207.

[2]. Gurtner, G.C., et al., 2008, Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321.

[3]. Okur, M.E., et al., 2020, Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(6), 661-684.

[4]. Dreifke, M.B., A.A. Jayasuriya, and A.C. Jayasuriya, 2015, Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering: C*, 48, 651-662.

[5]. Nussbaum, S.R., et al., 2018, An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. *Value in health*, 21(1), 27-32.

[6]. Han, G. and R. Ceilley, 2017, Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in therapy*, 34, 599-610.

[7]. Hosseini, M. and A. Shafiee, 2021, Engineering bioactive scaffolds for skin regeneration. *Small*, 17(41), 2101384.

[8]. Leavitt, T., et al., 2016, Stem cells and chronic wound healing: state of the art. *Chronic Wound Care Management and Research*, 7-27.

[9]. Hu, P., et al., 2019, Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration. *Burns & Trauma*, 7,

[10]. Keller, S., et al., 2006, Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters*, 107(2), 102-108.

[11]. Simons, M. and G. Raposo, 2009, Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 575-581.

[12]. Tkach, M. and C. Théry, 2016, Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 164(6), 1226-1232.

[13]. Lai, R.C., R.W.Y. Yeo, and S.K. Lim. *Mesenchymal stem cell exosomes*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2015. Elsevier.

[14]. Lu, K., et al., 2017, Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 8, 1-11.

[15]. Fang, W.-C. and C.-C.E. Lan, 2023, The epidermal keratinocyte as a therapeutic target for management of diabetic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4290.

[16]. Dwivedi, D., et al., 2017, Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of Pongamia pinnata in wistar rats. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(1), 79-85.

[17]. Hopkinson, S.B., et al., 2014, Focal contact and hemidesmosomal proteins in keratinocyte migration and wound repair. *Advances in wound care*, 3(3), 247-263.

[18]. Maranduca, M.A., et al., 2019, Synthesis and physiological implications of melanic pigments. *Oncology Letters*, 17(5), 4183-4187.

[19]. Someya, T. and M. Amagai, 2019, Toward a new generation of smart skins. *Nature biotechnology*, 37(4), 382-388.

[20]. Pasparakis, M., I. Haase, and F.O. Nestle, 2014, Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews immunology*, 14(5), 289-301.
[21]. Shirakata, Y., 2010, Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *Journal of dermatological science*, 59(2), 73-80.
[22]. Ter Horst, B., et al., 2018, Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. *Advanced drug delivery reviews*, 123, 18-32.
[23]. Winograd-Katz, S.E., et al., 2014, The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(4), 273-288.
[24]. Kolimi, P., et al., 2022, Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements. *Cells*, 11(15), 2439.
[25]. Stecco, C., et al., 2019, Dermatome and fasciatome. *Clinical Anatomy*, 32(7), 896-902.
[26]. Carlson, B.M., 2018, *Human Embryology and Developmental Biology-Inkling Enhanced E-Book*, Elsevier Health Sciences, 0323661440.
[27]. Stan, D., et al., 2021, Wound healing applications of creams and "smart" hydrogels. *Experimental dermatology*, 30(9), 1218-1232.
[28]. Sharma, S., M. Hashmi, and R. Chakraborty, 2021, StatPearls [Internet] StatPearls Publishing. *Treasure Island (FL): Sep*, 18,
[29]. Wong, R., et al., 2016, The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental dermatology*, 25(2), 92-98.
[30]. Iheanacho, F. and A.R. Vellipuram, 2019, Physiology, mechanoreceptors.
[31]. Tottoli, E.M., et al., 2020, Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, 12(8), 735.
[32]. Cañedo-Dorantes, L. and M. Cañedo-Ayala, 2019, Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation*, 2019(1), 3706315.
[33]. Desmet, C.M., V. Préat, and B. Gallez, 2018, Nanomedicines and gene therapy for the delivery of growth factors to improve perfusion and oxygenation in wound healing. *Advanced drug delivery reviews*, 129, 262-284.
[34]. Eming, S.A., P. Martin, and M. Tomic-Canic, 2014, Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, 6(265), 265sr6-265sr6.
[35]. Wallace, H.A., B.M. Basehore, and P.M. Zito, 2017, Wound healing phases.
[36]. El-Ashram, S., et al., 2021, Naturally-derived targeted therapy for wound healing: Beyond classical strategies. *Pharmacological Research*, 170, 105749.
[37]. Rodrigues, M., et al., 2019, Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*, 99(1), 665-706.
[38]. Kanji, S. and H. Das, 2017, Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. *Mediators of inflammation*, 2017(1), 5217967.
[39]. Kawasumi, A., et al., 2013, Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. *New perspectives in regeneration*, 33-49.
[40]. Wu, L., et al., 2015, A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4–ERK5 axis. *Journal of Experimental Medicine*, 212(10), 1571-1587.
[41]. Barchitta, M., et al., 2019, Nutrition and wound healing: an overview focusing on the beneficial effects of curcumin. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1119.
[42]. Zhao, R., et al., 2016, Inflammation in chronic wounds. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2085.
[43]. Raja, S.K., M.S. Garcia, and R.R. Isseroff, 2007, Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci*, 12(3), 2849-2868.

[44]. Darby, I.A., et al., 2014, Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 301-311.
[45]. Aydemir, I., et al., 2016, Mesenchymal stem cells in skin wound healing. *Anatomy*, 10(3), 228-234.
[46]. Guo, S.a. and L.A. DiPietro, 2010, Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
[47]. Bishop, A., 2008, Role of oxygen in wound healing. *Journal of wound care*, 17(9), 399-402.
[48]. Rodriguez, P.G., et al., 2008, The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic surgery*, 34(9), 1159-1169.
[49]. Edwards, R. and K.G. Harding, 2004, Bacteria and wound healing. *Current opinion in infectious diseases*, 17(2), 91-96.
[50]. Menke, N.B., et al., 2007, Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 19-25.
[51]. Gosain, A. and L.A. DiPietro, 2004, Aging and wound healing. *World journal of surgery*, 28, 321-326.
[52]. Keylock, K.T., et al., 2008, Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(1), R179-R184.
[53]. Swift, M.E., et al., 2001, Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(5), 1027-1035.
[54]. Godbout, J.P. and R. Glaser, 2006, Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1, 421-427.
[55]. Boyapati, L. and H.-L. Wang, 2007, The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontology 2000*, 44(1),
[56]. Sternberg, E.M., 2006, Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 318-328.
[57]. Arnold, M. and A. Barbul, 2006, Nutrition and wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 42S-58S.
[58]. Nelson, E.A., 2003, Nutrition for optimum wound healing. *Nursing Standard (through 2013)*, 18(6), 55.
[59]. PP, G., 1995, Physiology of wound healing. *Clinical wound management*, 8-12.
[60]. Campos, A.C., A.K. Groth, and A.B. Branco, 2008, Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(3), 281-288.
[61]. Wilson, J.A. and J.J. Clark, 2004, Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Advances in skin & wound care*, 17(8), 426-432.
[62]. Anaya, D.A. and E.P. Dellinger, 2006, The obese surgical patient: a susceptible host for infection. *Surgical infections*, 7(5), 473-480.
[63]. Greco III, J.A., et al., 2008, The effect of weight loss surgery and body mass index on wound complications after abdominal contouring operations. *Annals of plastic surgery*, 61(3), 235-242.
[64]. Brem, H. and M. Tomic-Canic, 2007, Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1219-1222.
[65]. Tandara, A.A. and T.A. Mustoe, 2004, Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World journal of surgery*, 28, 294-300.

[66]. Loots, M.A., et al., 1998, Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(5), 850-857.
[67]. Dowsett, C. and H. Newton, 2005, Wound bed preparation: TIME in practice. *Wounds Uk*, 1(3), 58.
[68]. Lindholm, C. and R. Searle, 2016, Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International wound journal*, 13, 5-15.
[69]. Gushiken, L.F.S., et al., 2021, Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. *Life*, 11(7), 665.
[70]. Bellingeri, A., et al., 2016, Effect of a wound cleansing solution on wound bed preparation and inflammation in chronic wounds: a single-blind RCT. *Journal of Wound Care*, 25(3), 160-168.
[71]. Lumbers, M., 2018, Wound debridement: choices and practice. *British Journal of Nursing*, 27(15), S16-S20.
[72]. Ferrario, C., et al., 2020, From food waste to innovative biomaterial: Sea urchin-derived collagen for applications in skin regenerative medicine. *Marine drugs*, 18(8), 414.
[73]. Varkey, M., J. Ding, and E.E. Tredget, 2015, Advances in skin substitutes—potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *Journal of functional biomaterials*, 6(3), 547-563.
[74]. Deatherage, B.L. and B.T. Cookson, 2012, Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and immunity*, 80(6), 1948-1957.
[75]. Doyle, L.M. and M.Z. Wang, 2019, Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8(7), 727.
[76]. Johnstone, R.M., et al., 1987, Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412-9420.
[77]. Gurung, S., et al., 2021, The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 47.
[78]. Zhang, Y., et al., 2019, Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9, 1-18.
[79]. Bunggulawa, E.J., et al., 2018, Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *Journal of nanobiotechnology*, 16, 1-13.
[80]. Haney, M.J., et al., 2015, Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of controlled release*, 207, 18-30.
[81]. Bobrie, A., et al., 2011, Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12(12), 1659-1668.
[82]. Zamani, P., et al., 2019, The therapeutic and diagnostic role of exosomes in cardiovascular diseases. *Trends in cardiovascular medicine*, 29(6), 313-323.
[83]. Garcia, N.A., et al., 2015, Glucose starvation in cardiomyocytes enhances exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. *PloS one*, 10(9), e0138849.
[84]. Skotland, T., et al., 2019, Thematic review series: Exosomes and microvesicles: Lipids as key components of their biogenesis and functions: Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *Journal of Lipid Research*, 60(1), 9.
[85]. Skryabin, G., et al., 2020, Lipid rafts in exosome biogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 85, 177-191.
[86]. Mashouri, L., et al., 2019, Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular cancer*, 18, 1-14.

[87]. Huang, X., et al., 2013, Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics*, 14, 1-14.
[88]. Ge, L., et al., 2020, Circulating exosomal small RNAs are promising non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(24), 14502-14513.
[89]. Pan, B.-T. and R.M. Johnstone, 1983, Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978.
[90]. Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
[91]. Pegtel, D.M. and S.J. Gould, 2019, Exosomes. *Annual review of biochemistry*, 88, 487-514.
[92]. Schmidt, O. and D. Teis, 2012, The ESCRT machinery. *Current Biology*, 22(4), R116-R120.
[93]. Trajkovic, K., et al., 2008, Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247.
[94]. Hemler, M.E., 2003, Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual review of cell and developmental biology*, 19(1), 397-422.
[95]. Perez-Hernandez, D., et al., 2013, The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 11649-11661.
[96]. Hoang, D.H., et al., 2020, Differential wound healing capacity of mesenchymal stem cell-derived exosomes originated from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord under serum-and xeno-free condition. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 119.
[97]. Zhang, B., et al., 2015, HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. *Stem cells*, 33(7), 2158-2168.
[98]. Hu, J., et al., 2020, Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress dermal fibroblasts-myofibroblats transition via inhibiting the TGF-β1/Smad 2/3 signaling pathway. *Experimental and molecular pathology*, 115, 104468.
[99]. Zhang, Y., et al., 2021, Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor-β receptor inhibition. *Stem cell research & therapy*, 12, 1-14.
[100]. Zhao, G., et al., 2020, MSC-derived exosomes attenuate cell death through suppressing AIF nucleus translocation and enhance cutaneous wound healing. *Stem cell research & therapy*, 11, 1-18.
[101]. Baral, H., et al., 2021, Antifibrotic effects and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes in a systemic sclerosis mouse model: possible contribution of miR-196b-5p. *Journal of Dermatological Science*, 104(1), 39-47.
[102]. Nassar, W., et al., 2016, Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomaterials research*, 20(1), 21.
[103]. KWON, H.H., et al., *Combination Treatment with Human Adipose Tissue Stem Cell-derived Exosomes and Fractional CO*.
[104]. Brindell, M., et al., 2022, Moving Ru polypyridyl complexes beyond cytotoxic activity towards metastasis inhibition. *J Inorg Biochem*, 226, 111652.
[105]. Yilgor, A. and C. Demir, 2024, Determination of oxidative stress level and some antioxidant activities in refractory epilepsy patients. *Scientific Reports*, 14(1), 6688.

[106]. Tietze, F., 1969, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*, 27(3), 502-522.

[107]. RP, B., 1984, Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Method Enzymol*, 105, 299-305.

[108]. Kielkopf, C.L., W. Bauer, and I.L. Urbatsch, 2020, Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), pdb. prot102269.

[109]. Yao, X. Y., et al., 2022, Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells to Treat Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder (hUC–MSC–NMOSD): A study protocol for a prospective, multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Frontiers in Neurology*, *13*, 860083.

[110]. Pan, W., et al., 2023, Repeat-dose toxicity study of human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys by intravenous and subcutaneous injection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1273723.

[111]. Fang, S., et al., 2022, Pro-angiognetic and pro-osteogenic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-21-5p in osteonecrosis of the femoral head. *Cell death discovery*, *8*(1), 226.

[112]. Ronquist, K. G., 2019, Extracellular vesicles and energy metabolism. *Clinica chimica acta*, *488*, 116-121.

[113]. Kawate, T., et al., 2009, Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature*, *460*(7255), 592-598.

[114]. Pisitkun, T., et al., 2004, Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(36), 13368-13373.

[115]. Qi, H., et al., 2019, Exosomes derived from mesenchymal stem cells inhibit mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of chondrocytes via p38, ERK, and Akt pathways. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, *55*, 203-210.

[116]. Zhang, B., et al., 2015, Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/β-catenin pathway. *Stem cells translational medicine*, *4*(5), 513-522.

[117]. Lai, R. C., et al., 2010, Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*, *4*(3), 214-222.

[118]. Li, T., et al., 2013, Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem cells and development*, *22*(6), 845-854.

[119]. Zhou, Y., et al., 2013, Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem cell research & therapy*, *4*, 1-13.

[120]. Jiang, T. Y., et al., 2023, PTEN deficiency facilitates exosome secretion and metastasis in cholangiocarcinoma by impairing TFEB-mediated lysosome biogenesis. *Gastroenterology*, *164*(3), 424-438.

[121]. Qu, Q., et al., 2024, Exosomes derived from hypoxic mesenchymal stem cells restore ovarian function by enhancing angiogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, *15*(1), 496.

[122]. Liang, X., et al., 2023, HucMSC-Exo promote mucosal healing in experimental colitis by accelerating intestinal stem cells and epithelium regeneration via Wnt signaling pathway. *International journal of nanomedicine*, 2799-2818.

[123]. Velnar, T., et al., 2009, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical research*, *37*(5), 1528-1542.

[124]. Bakhtyar, N., et al., 2017, Acellular gelatinous material of human umbilical cord enhances wound healing: a candidate remedy for deficient wound healing. *Frontiers in physiology*, *8*, 200.

[125]. Yin, S., et al., 2019, Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. *American journal of translational research*, *11*(3), 1230.

[126]. Uchi, H., et al., 2000, Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of dermatological science*, *24*, S29-S38.

[127]. Shirakata, Y., 2010, Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *Journal of dermatological science*, *59*(2), 73-80.

[128]. Pruniéras, M., et al., 1983, Keratinocytes synthesize basal-lamina proteins in culture. *Journal of Investigative Dermatology*, *81*(1), S74-S81.

[129]. Yin, S., et al., 2019, Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. *American journal of translational research*, *11*(3), 1230.

[130]. Zhang, L., et al., 2022, Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells regulate lymphangiogenesis via the miR-302d-3p/VEGFR3/AKT axis to ameliorate inflammatory bowel disease. *International immunopharmacology*, *110*, 109066.

[131]. O'Toole, E. A., et al., 2008, Hypoxia induces epidermal keratinocyte matrix metalloproteinase-9 secretion via the protein kinase C pathway. *Journal of Cellular Physiology*, *214*(1), 47-55.

[132]. Woodley, D. T., et al., 2009, Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90α autocrine signaling to promote keratinocyte migration. *Journal of cell science*, *122*(10), 1495-1498.

[133]. Jiang, X., et al., 2014, Hypoxia regulates CD9-mediated keratinocyte migration via the P38/MAPK pathway. *Scientific reports*, *4*(1), 6304.

[134]. Li, L., et al., 2019, High glucose suppresses keratinocyte migration through the inhibition of p38 MAPK/autophagy pathway. *Frontiers in physiology*, *10*, 24.

[135]. Kim, E. K. and Choi, E. J, 2015, Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of toxicology*, *89*(6), 867-882.

[136]. Hu, S. C. S. and Lan, C. C. E., 2016, High-glucose environment disturbs the physiologic functions of keratinocytes: focusing on diabetic wound healing. *Journal of Dermatological Science*, *84*(2), 121-127.

[137]. Lan, C. C., et al., 2008, Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *British Journal of Dermatology*, *159*(5), 1103-1115.

[138]. Rungratanawanich, W., et al., 2021, Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. *Experimental & molecular medicine*, *53*(2), 168-188.

[139]. Morita, K., et al., 2005, Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound repair and regeneration*, *13*(1), 93-101.

[140]. Song, Z. Q., et al., 2008, Impact of advanced glycosylation end products-modified human serum albumin on migration of epidermal keratinocytes: an in vitro experiment. *Zhonghua yi xue za zhi*, *88*(38), 2690-2694.

[141]. Zhang, C., et al., 2015, FOXO1 differentially regulates both normal and diabetic wound healing. *Journal of Cell Biology*, *209*(2), 289-303.

[142]. Kraenzlin, M. E. and Seibel, M. J., 2006, Measurement of biochemical markers of bone resorption. In *Dynamics of bone and cartilage metabolism* (pp. 541-563). Academic Press.

[143]. Dryden, S. V., et al., 2013, Wound management and nutrition for optimal wound healing. *Atlas of the oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, *21*(1), 37-47.

[144]. Wang, X., et al., 2022, The effect of a compound protein on wound healing and nutritional status. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2022*(1), 4231516.

[145]. Norouzi, F., et al., 2024, Exosomes derived stem cells as a modern therapeutic approach for skin rejuvenation and hair regrowth. *Regenerative Therapy*, *26*, 1124-1137.

[146]. Kim, Y. J., et al., 2017, Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *493*(2), 1102-1108.

[147]. Hajialiasgary Najafabadi, A., et al., 2024, Exosomes in skin photoaging: biological functions and therapeutic opportunity. *Cell Communication and Signaling*, *22*(1), 32.

[148]. Shi, H., et al., 2021, Exosomes: Emerging cell-free based therapeutics in dermatologic diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 736022.

[149]. Tang, M., et al., 2007, High glucose promotes the production of collagen types I and III by cardiac fibroblasts through a pathway dependent on extracellular-signal-regulated kinase 1/2. *Molecular and cellular biochemistry*, *301*, 109-114.

[150]. Li, H., et al., 2008, High glucose promotes collagen synthesis by cultured cells from rat cervical posterior longitudinal ligament via transforming growth factor-β1. *European Spine Journal*, *17*, 873-881.

[151]. Berti, L., et al., 1994, Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(5), 3381-3386.

[152]. Spravchikov, N., Sizyakov, G., Gartsbein, M., Accili, D., Tennenbaum, T., & Wertheimer, E. (2001). Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes*, *50*(7), 1627-1635.

[153]. Ide, R., et al., 1994, High glucose condition activates protein tyrosine phosphatases and deactivates insulin receptor function in insulin-sensitive rat 1 fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, *201*(1), 71-77.

[154]. Blackstock, C. D., et al., 2014, Insulin-like growth factor-1 increases synthesis of collagen type I via induction of the mRNA-binding protein LARP6 expression and binding to the 5′ stem-loop of COL1a1 and COL1a2 mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(11), 7264-7274.

[155]. Bornstein, P., 1995, Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of cell biology*, *130*(3), 503-506.

[156]. Wight, T. N., et al., 1985, Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *33*(4), 295-302.

[157]. Iruela-Arispe, M. L., et al., 1991, Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(11), 5026-5030.

[158]. Detmar, M., 1996, Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *Journal of investigative dermatology*, *106*(2), 207-208.

[159]. Raugi, G. J., et al., 1987, Thrombospondin in early human wound tissue. *Journal of investigative dermatology*, *89*(6), 551-554.

[160]. Reed, M. J., et al., 1993, Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *41*(10), 1467-1477.

[161]. DiPietro, L. A., et al., 1996, Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *The American journal of pathology*, *148*(6), 1851.

[162]. DiPietro, L. A., et al., 1994, Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. *Journal of vascular research*, *31*(3), 178-185.

[163]. Kim, D. H., et al., 2018, Thrombospondin-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells rescues neurons from synaptic dysfunction in Alzheimer's disease model. *Scientific reports*, *8*(1), 354.

[164]. Kang, H., et al., 2023, Human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue showed a more robust effect than those from the umbilical cord in promoting corneal graft survival by suppressing lymphangiogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, *14*(1), 328.

[165]. Aiken, J., et al., 2019, Hyperglycaemia correlates with skeletal muscle capillary regression and is associated with alterations in the murine double minute-2/forkhead box O1/thrombospondin-1 pathway in type 1 diabetic BioBreeding rats. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *16*(1), 28-37.

[166]. Klaassen, I., et al., 2017, Identification of proteins associated with clinical and pathological features of proliferative diabetic retinopathy in vitreous and fibrovascular membranes. *PLoS One*, *12*(11), e0187304.

[167]. Matsugi, K., et al., 2016, Thrombospondin 1 suppresses insulin signaling in C2C12 myotubes. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, *62*(1), E13.

[168]. Bitar, M. S., 2019, Diabetes impairs angiogenesis and induces endothelial cell senescence by up-regulating thrombospondin-CD47-dependent signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 673.

[169]. Maile, L. A., et al., 2008, Glucose regulation of integrin-associated protein cleavage controls the response of vascular smooth muscle cells to insulin-like growth factor-I. *Molecular Endocrinology*, *22*(5), 1226-1237.

[170]. Ewing, G. W., and Parvez, S. H., 2010, The multi-systemic nature of diabetes mellitus: Genotype or phenotype?. *North American Journal of Medical Sciences*, *2*(10), 444.

[171]. Cheng, R., and Ma, J. X., 2015, Angiogenesis in diabetes and obesity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *16*, 67-75.

[172]. Bhattacharyya, S., et al., 2012, Novel tissue-specific mechanism of regulation of angiogenesis and cancer growth in response to hyperglycemia. *Journal of the American Heart Association*, *1*(6), e005967.

[173]. NV, K., 1996, Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. *J Invest Dermatol*, *107*, 615-621.

[174]. Piipponen, M., et al., 2020, The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *International journal of molecular sciences*, *21*(22), 8790.

[175]. Lai, Y., et al., 2009, Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury. *Nature medicine*, *15*(12), 1377-1382.

[176]. Köllisch, G., et al., 2005, Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, *114*(4), 531-541.

[177]. Liu, S., et al., 2019, IL-17A synergistically enhances TLR 3-mediated IL-36γ production by keratinocytes: A potential role in injury-amplified psoriatic inflammation. *Experimental Dermatology*, *28*(3), 233-239.

[178]. Kalali, B. N., et al., 2008, Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *The Journal of Immunology*, *181*(4), 2694-2704.
[179]. Borkowski, A. W., et al., 2013, Activation of TLR3 in keratinocytes increases expression of genes involved in formation of the epidermis, lipid accumulation, and epidermal organelles. *Journal of Investigative Dermatology*, *133*(8), 2031-2040.
[180]. Jiang, W. G., et al., 2012, Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC-γ and potential clinical implications. *Experimental and therapeutic medicine*, *3*(2), 231-236.
[181]. Fleshner, M., and Crane, C. R., 2017, Exosomes, DAMPs and miRNA: features of stress physiology and immune homeostasis. *Trends in immunology*, *38*(10), 768-776.
[182]. Picca, A., et al., 2020, Extracellular vesicles and damage-associated molecular patterns: A Pandora's box in health and disease. *Frontiers in Immunology*, *11*, 601740.
[183]. Lan, C. C. E., et al., 2013, High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: new insights into impaired diabetic wound healing. *Diabetes*, *62*(7), 2530-2538.
[184]. Jain, M., et al., 2011, Effect of hyperglycemia and neuropeptides on interleukin-8 expression and angiogenesis in dermal microvascular endothelial cells. *Journal of vascular surgery*, *53*(6), 1654-1660.
[185]. Michael, M., et al., 2014, BPAG1-e restricts keratinocyte migration through control of adhesion stability. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(3), 773-782.
[186]. Ali, A., et al., 2017, BPAG1, a distinctive role in skin and neurological diseases. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 69, pp. 34-39). Academic Press.
[187]. Hamill, K. J., et al., 2009, BPAG1e maintains keratinocyte polarity through β4 integrin–mediated modulation of Rac 1 and cofilin activities. *Molecular biology of the cell*, *20*(12), 2954-2962.
[188]. Guo, L., et al., 1995, Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell*, *81*(2), 233-243.
[189]. Cheng, J., et al., 2019, Dystonin/BPAG1 modulates diabetes and Alzheimer's disease cross-talk: a meta-analysis. *Neurological Sciences*, *40*, 1577-1582.
[190]. Pasmatzi, E., et al., 2011, Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors cause bullous pemphigoid in diabetic patients: report of two cases. *Diabetes Care*, *34*(8), e133-e133.
[191]. Skandalis, K., et al., 2012, Drug-induced bullous pemphigoid in diabetes mellitus patients receiving dipeptidyl peptidase-IV inhibitors plus metformin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *26*(2), 249-253.
[192]. Janero, D. R., 1990, Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free radical biology and medicine*, *9*(6), 515-540.
[193]. Ren, H., et al., 2018, Protective effects of glutathione on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in intestinal epithelial cells. *journal of surgical research*, *222*, 39-47.
[194]. Berger, M. M., 2006, Antioxidant micronutrients in major trauma and burns: evidence and practice. *Nutrition in Clinical Practice*, *21*(5), 438-449.
[195]. Slatter, D. A., et al., 2000, The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*, *43*, 550-557.
[196]. Horton, J. W., 2003, Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*, *189*(1-2), 75-88.
[197]. Sasaki, J., et al., 1983, Lipid peroxidation following thermal injury. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, *4*(4), 251-254.

[198]. El-Ferjani, R. M., et al., 2016, In vivo assessment of antioxidant and wound healing improvement of a new schiff base derived Co (ii) complex in rats. *Scientific reports*, *6*(1), 38748.

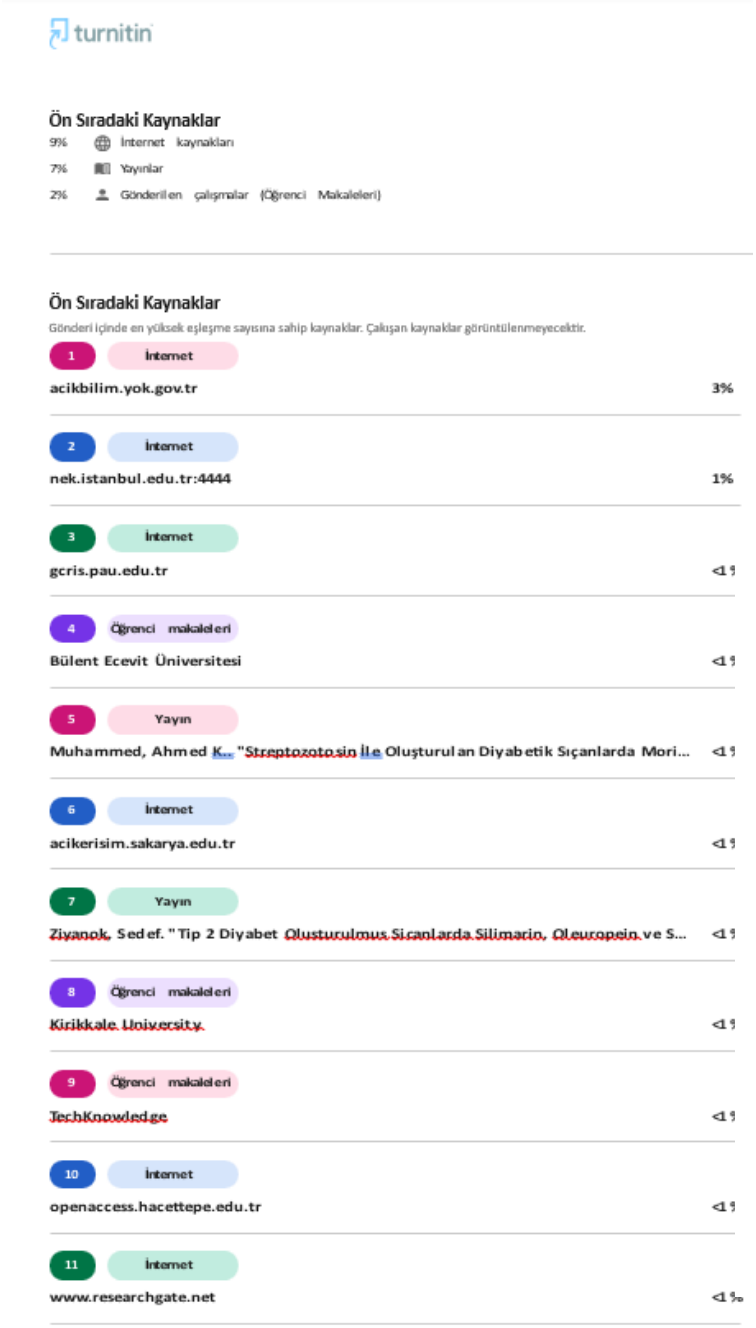
[199]. Dunnill, C., et al., 2017, Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*, *14*(1), 89-96.

[200]. Powell, L. A., et al., 2004, High glucose decreases intracellular glutathione concentrations and upregulates inducible nitric oxide synthase gene expression in intestinal epithelial cells. *Journal of molecular endocrinology*, *33*(3), 797-803.

[201]. Terashi, H., et al., 2005, High glucose inhibits human epidermal keratinocyte proliferation for cellular studies on diabetes mellitus. *International wound journal*, *2*(4), 298-304.

[202]. Shi, J., et al., 2022, High glucose induces late differentiation and death of human oral keratinocytes. *Current Issues in Molecular Biology*, *44*(9), 4015-4027.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



turnitin

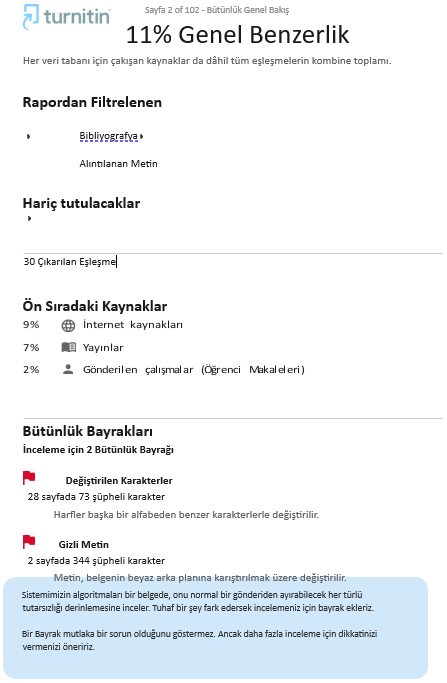
Ön Sıradaki Kaynaklar

9% İnternet kaynakları
7% Yayınlar
2% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Ön Sıradaki Kaynaklar

Gönderi içinde en yüksek eşleşme sayısına sahip kaynaklar. Çalışan kaynaklar görüntülenmeyecektir.

1	İnternet	acikbilim.yok.gov.tr	3%
2	İnternet	nek.istanbul.edu.tr:4444	1%
3	İnternet	gcris.pau.edu.tr	<1%
4	Öğrenci makaleleri	Bülent Ecevit Üniversitesi	<1%
5	Yayın	Muhammed, Ahmed K... "Streptozotosin İle Oluşturulan Diyabetik Sıçanlarda Mori...	<1%
6	İnternet	acikerisim.sakarya.edu.tr	<1%
7	Yayın	Ziyanok, Sedef. "Tip 2 Diyabet Olusturulmus Sicanlarda Silimarin, Oleuropein ve S...	<1%
8	Öğrenci makaleleri	Kirikkale University	<1%
9	Öğrenci makaleleri	TechKnowledge	<1%
10	İnternet	openaccess.hacettepe.edu.tr	<1%
11	İnternet	www.researchgate.net	<1%



turnitin Sayfa 2 of 102 - Bütünlük Genel Bakış

11% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çakışan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Rapordan Filtrelenen

Bibliyografya

Alıntılanan Metin

Hariç tutulacaklar

30 Çıkarılan Eşleşme

Ön Sıradaki Kaynaklar

9% İnternet kaynakları
7% Yayınlar
2% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 2 Bütünlük Bayrağı

Değiştirilen Karakterler
28 sayfada 73 şüpheli karakter
Harfler başka bir alfabeden benzer karakterlerle değiştirilir.

Gizli Metin
2 sayfada 344 şüpheli karakter
Metin, belgenin beyaz arka planına karıştırılmak üzere değiştirilir.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☐ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☒ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Furkan Paşa DİRİARIN
(İmza)

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Furkan Paşa DİRİARIN
(İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Furkan Paşa DİRİARIN
Doğum Tarihi	12.04.1996
Uyruğu	☒ T.C. ❒ Diğer:
E-Posta Adresi	furkandiriarin@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Biruni Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	2020
Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Anabilim Dalı	Fizyoloji Anabilim Dalı
Programı	Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Makale ve Bildiriler