

DeneySEL Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Yara Modeli Üzerine Periferik Kan Mononükleer Hücre Uygulamasının İyileşme Üzerine Etkileri

Effects of Peripheral Blood Mononuclear Cell Application on Wound Healing in Rats with Experimental Diabetes

Pınar Kılıçaslan Sönmez*, Mehmet İbrahim Tuğlu

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Manisa, Türkiye

ÖZET

Amaç: Diyabetik yaraların tedavisi hastanın yaşam kalitesini azaltan oldukça zor ve maliyetli bir durumdur. Bu alanda kök hücre tedavisi ile değişik kaynaklardan elde edilen hücreler klinik kullanımda tedavide yerini almıştır. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) periferik dolaşımdan kolaylıkla elde edilen bir kök hücre (KH) kaynağıdır. Bu çalışmada, PKMH uygulamasının diyabetik greft yara modelinde iyileşmeye olan etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Sıçanlardan alınan tam kanlardan PKMH izolasyonu ve kültürde çoğaltılması sağlandı. Sıçanların sırt bölgesinde 1x1 cm boyutunda dört adet tam kat deri grefti yapıldı. Kontrol, sham ve PKMH olarak 3 gruba ayrılan sıçanlarda streptozotosin ile diyabet oluşturulduktan sonra kontrol grubuna sadece greft yara modeli yapıldı, sham grubuna sadece besiyeri uygulandı ve PKMH grubuna ise besiyeri içerisinde PKMH yara bölgesine uygulandı. Hücreler tedavi her bir yaraya 1x10⁶ hücre /gün şeklinde uygulandı. Greftlerden erken dönemde (3. Gün) biyopsi alınarak incelendi. Histokimyasal (HK) olarak hematoksin-eosin (H-E), masson trikrom (MT) boyamaları, immunohistokimyasal (İHK) olarak oksidatif stres için eNOS ve iNOS, inflamasyon belirteci olarak IL-1 β boyaması yapıldı. H-skor ile istatistiksel analiz yapıldı.

Bulgular: 3.gün H-E ve MT boyamalarında PKMH verilen grupta belirgin histopatolojik düzeltilmeler görüldü. Immunohistokimyasal boyamalarda da PKMH uygulanan grupta eNOS, iNOS ve IL-1 β immunoreaktivitesinde anlamlı olarak azalma izlendi. Immunohistokimyasal boyamalar H-skor ile değerlendirildiğinde izlenen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

Sonuç: PKMH uygulamasının, diyabetik yara iyileşmesinin inflamasyon sürecine destekleyici tedavinin yapılmasına katkı sağladığı gösterildi. Kronik yaraların tedavisinde kullanılmalarına yönelik katkı sağlayacak olan bu çalışmanın tedavi maliyetlerini azaltarak ve iyileşme süresini kısaltarak hastaların yaşam kalitesini arttıracakını düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Greft, Yara İyileşmesi, Periferik Kan Mononükleer Hücre

ABSTRACT

Objective: Treatment of diabetic wounds is a difficult and costly condition that reduces the patient's quality of life. In this area, cell therapies have taken their place in clinical use. In this study, it was aimed to investigate the effect of Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) application on healing in diabetic graft wound model.

Materials and Methods: Isolation and proliferation of PBMC was achieved from rats. After creating diabetes model with streptozotocin, full-thickness skin grafts, 1x1 cm in size, were made in the back region of the rats. The rats were divided into 3 groups as control, sham and PBMC. PBMCs were applied to each wound as 1x10⁶ cells per day. Skin biopsy was taken in the early period (3th day) and examined. Hematoxylin-eosin (H-E), masson trichrome (MT) and immunohistochemical (IHC) staining were performed. In immunohistochemical staining, anti-eNOS, anti-iNOS and anti-IL1 β immunoreactivities were evaluated. Statistical analysis was performed with the H-score.

Results: In H-E and MT staining, significant histopathological improvements were seen in the group treated with PBMC. Immunohistochemical staining also showed a significant decrease in the immunoreactivity of eNOS, iNOS and IL-1 β in the group treated with PBMC. The changes observed were found to be statistically significant.

Conclusion: PBMC administration has been shown to contribute to supportive therapy for the inflammatory process of diabetic wound healing. This study, which will contribute to the use of PBMCs in chronic wound treatment, is thought to reduce treatment costs and improve the patients' life quality by shortening the wound healing process.

Key Words: Diabetes, Graft, Wound Healing, Peripheral Blood Mononuclear Cell

*Sorumlu Yazar: Pınar Kılıçaslan Sönmez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Manisa, 45030 Türkiye

E-mail: kilsln.pnr@gmail.com, Tel: 0 (553) 421 07 53, Fax: 0 (236) 233 14 66

ORCID ID: Pınar Kılıçaslan Sönmez: 0000-0002-9413-1735, Mehmet İbrahim Tuğlu: 0000-0002-0569-8415

Geliş Tarihi: 24.06.2020, Kabul Tarihi: 16.07.2020

Giriş

Yara iyileşmesi, derinin yeniden organizasyonunu gerektiren karmaşık bir süreçtir. Özellikle Tip 2 Diabetes Mellitus (DM) gibi yara iyileşmesinin bozulduğu kronik hastalıklarda bu süreç hastanın yaşam kalitesini bozmakta ve tedavi için ortaya çıkan maliyeti arttırmaktadır (1).

Tip 2 DM hastalarında, kronik hiperglisemiye bağlı ortaya çıkan duyu kusurları ve mikrosirkülasyonda meydana gelen bozulmalar nedeniyle nöral ve vasküler lezyonlar diyabetik ayak ülserleri (DAÜ) gibi iyileşmeyen yaralara neden olmaktadır. DAÜ prevalansındaki artış ise araştırmacıları tedavi için yeni terapötik modeller bulmaya yönlendirmektedir.

Klinikte kullanımı yaygınlaşan kök hücre uygulamasının, güncel çalışmaların özellikle iskemik veya DAÜ modellerine odaklandığı saptanmıştır (2). Birçok farklı kaynaktan elde edilmesine karşılık periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) elderi, çoğaltılmaları ve kök hücre olarak kullanılmalarındaki kolaylıklar nedeni ile potansiyel bir ürün olarak görülmektedir (3,4,5,6).

Kronik yaralarda; inflamasyon, proliferasyon (fibroblastik evre), maturasyon ve remodelling evrelerinden oluşan yara iyileşmesinin inflamasyon fazında uzama görülmektedir.

Bozulan mikrosirkülasyonu iyileştirmeye yönelik tedaviler, aynı zamanda anjiyogenezin bozulduğu ve özellikle inflamatuvar yanıtın uzadığı diyabetik hastalarında yara iyileşmesini genel olarak iyileştirir. PKMH'lerin, fare diyabet modellerinde tam kat deri yaralarında yeniden damarlanma ve iyileşmeyi hızlandırma potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada, CD34⁺ PKMH uygulaması yapılan gruplar kontrollerle karşılaştırıldığında, tedaviden 4 gün sonra yara boyutunun azaldığı, epidermal iyileşmenin ve revaskülarizasyonun hızlandığı görülmüştür (3).

Doku hasarını takiben gerçekleşen hemostaz yanıtı ile başlayan yara iyileşme sürecinin ilk aşaması olan inflamasyon fazında endotel hücrelerinden salgılanan histamin, prostoglandin E2, prostasiklin ve endotelial büyüme faktörü ile vazodilatasyon gelişir ve damar permeabilitesi artar (7,8). Damar permeabilitesinin artmasıyla, kompleman faktörler, interlökin-1, Tümör nekroz faktör- alfa (TNF- α), Transforming growth faktör- β (TGF- β), Trombosit Faktör 4 (PF-4) gibi kemotaktik maddeler, nötrofil kemotaksisini uyarır (9,10). Yara iyileşmesinin ilk 2-3. günlerinde nötrofil hakimiyetinde çeşitli sitokinler aracılığıyla süregelen inflamasyon fazının sonlarına doğru ortamdaki sitokin düzeylerinin düşmesiyle

monosit/makrofajların ağırlıkta olduğu hücre infiltrasyonu giderek azalır. Böylece yaranın derinliğine ve genişliğine göre değişmekle beraber inflamatuvar faz ortalama 3-5 gün devam eder (11).

Literatürde PKMH'lerin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma vardır. Biz bu çalışmada özellikle inflamasyon fazının bozulduğu iyileşmesi güç diyabetik yara modelinde PKMH'lerin greft ile transferi sonrasında yara iyileşmesine ve yara iyileşmesinin moleküler düzeyine etkisinin araştırılmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntem

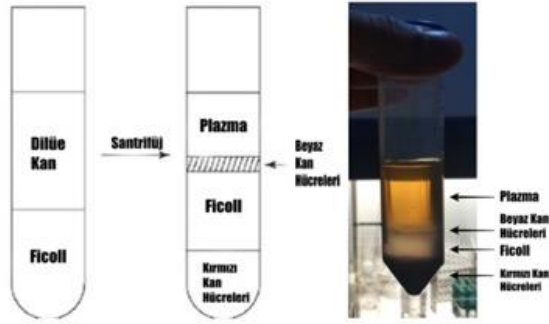
Hücre Kültürü Deneyleri

PKMH Eldesi ve Karakterizasyonu: Çalışmamızda kullandığımız PKMH'ler sıçanlardan elde edilen tam kandan ficol dansite gradient metodu ile izole edilmiştir. 50 ml'lik bir falkon tüpüne serolojik pipetle 10 ml kan ve üzerine tam kan miktarına eşit olarak 10 ml PBS eklenerek karıştırıldı. PBS ile karıştırılmış olan periferik kan 10 ml ficol içeren bir diğer falkon tüpünün kenarından yavaşça sızdırılarak ficol (Biosera, Germany) üzerinde iki sıvının birbirine karışmadan tabaka oluşturması sağlanmıştır. Daha sonra falkon tüpü 2700 RPM hızında 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda orta tabakada meydana gelen PKMH hücreleri içeren bulutsu tabaka serolojik pipetle dikkatlice çekilerek başka bir 50 ml 'lik falkon tüpüne alındı. Elde edilen hücreler hacminin yaklaşık 3 katı kadar PBS eklenerek 1800 RPM hızında 15 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Üzerinde oluşan supernatant atılarak 6-8 ml PBS ile 1800 RPM hızında 10 dakika kadar tekrar santrifüj edildi ve sonrasında supernatant tekrar atılarak hücreler DMEMF12 (11320-033; Gibco, USA) besiyeriyle süspanse edilerek kültür kabına alındı (Şekil 1).

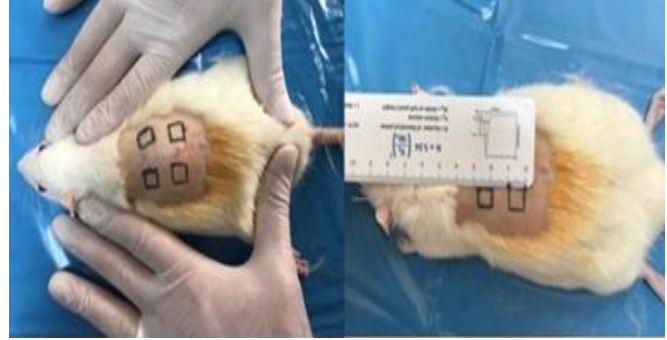
Elde edilerek çoğaltılan PKMH'leri daha sonra karakterizasyon için anti-CD34 (sc-7324, Santa Cruz Biotechnology), anti-CD45 (sc-19597, Santa Cruz Biotechnology), anti-CD90 (sc-53456 Santa Cruz Biotechnology), anti-STRO-1(sc-47733, Santa Cruz Biotechnology) belirteçleriyle immunositokimyasal olarak boyandı (Şekil 5).

Hayvan Deneyleri

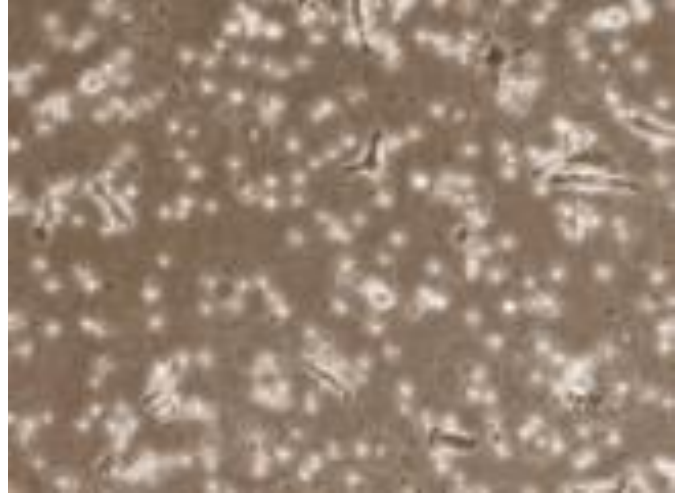
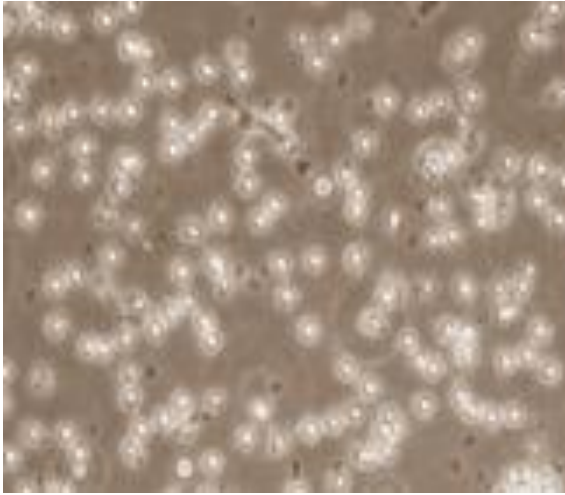
Bu çalışma 12/09/2017 ve 71.637.435 karar numaralı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi (M.C.B.Ü.T.F.) Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı ile yürütülmüştür. Çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde (DEHAM) yapılmış olup 42



Şekil 1. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi



Şekil 2. Deney hayvanlarının sırt bölgesinde 1x1 tam kat greft yara modeli oluşturma



Şekil 3. Hücre kültür kabındaki PKMH 1. Gün (A) ve 5. Gün (B) inverted faz mikroskobu ile morfolojik görünümü (Bar; 10µm, Büyütme; 100X)

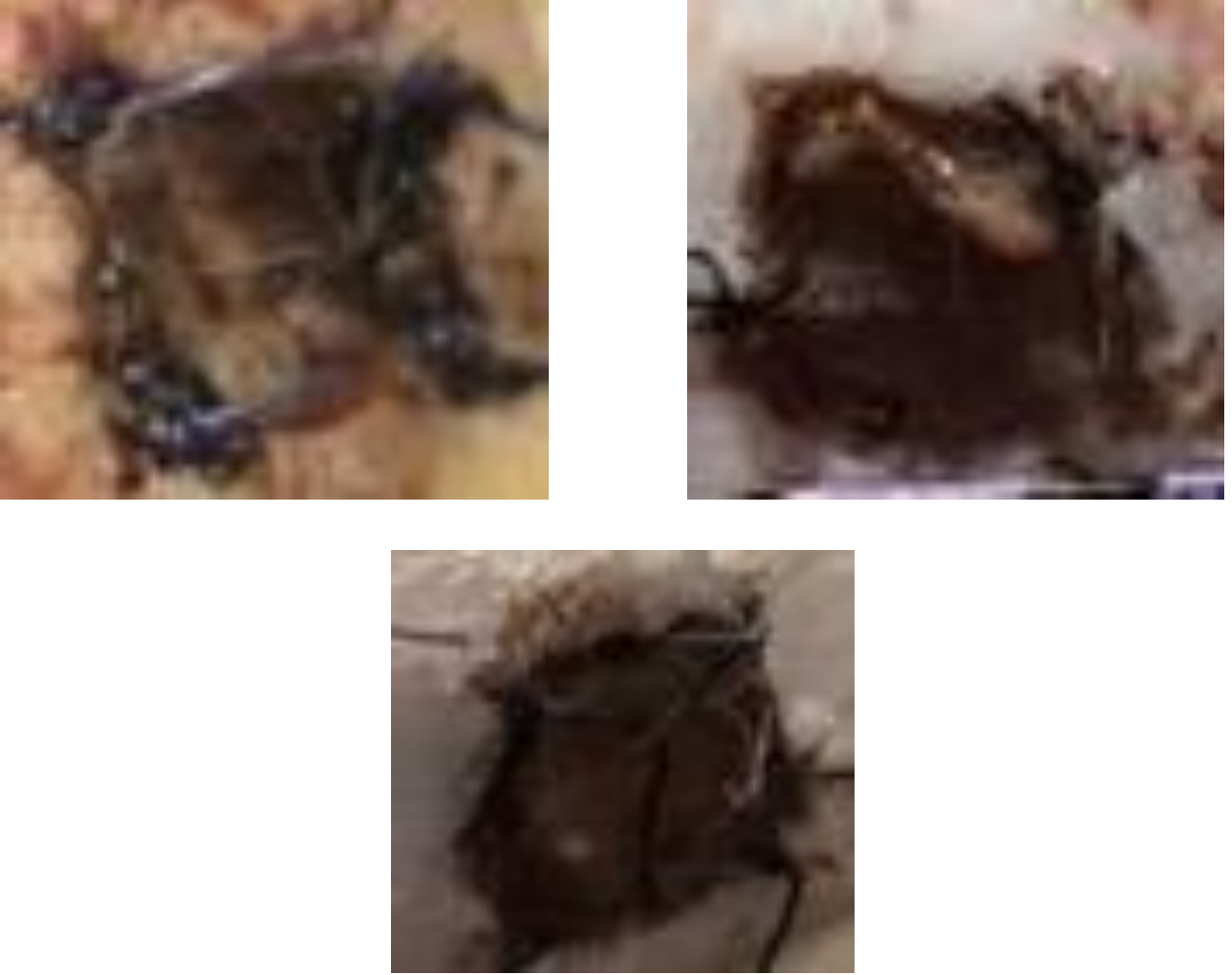
adet, ağırlıkları 250 ± 50 gr arasında değişen 12 haftalık Wistar Albino cinsi erişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 3 gün boyunca adaptasyon için herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletildi. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar olan 22°C sıcaklık, % 30-70 nem, 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu. Kuru pelletler ve çeşme suyu ile ad libitum beslenmeleri sağlandı.

Deneyel Diyabet Modelinin Oluşturulması: Diyabet oluşturulacak olan deney hayvanları işlem öncesi aç bırakılmadı. Bu amaçla diyabetik gruptaki hayvanlara tek doz şeklinde, taze hazırlanmış %0.9 izotonik tuz solüsyonunda çözdürülen 50 mg/kg Streptozotosin (STZ) (AG-CN2-0046, Adipogen, USA) intraperitoneal olarak verilerek diyabet oluşturuldu. STZ uygulandıktan üç gün sonra açlık kan şekeri 250 mg/dL ve üzeri olanlar diyabet kabul edildi.

Deneyel Graft Yara Modelinin Oluşturulması: Deneyel greft yara modeli sıçanlarda genel anestezi altında oluşturuldu. Yara modelleri sıçanların sırt

bölgesinde dört adet 1x1 cm boyutlarında epidermis ve dermisi içeren tam kat deri grefti karşılıklı olarak yer değiştirilmek suretiyle yapıldı (Şekil 2). Sıçanlar toplam 3 gruba ayrıldı; kontrol grubuna sadece greft yara modeli yapıldı, sham grubuna sadece besiyeri uygulandı ve diğer gruba ise, besiyeri içerisinde PKMH yara bölgesine uygulandı. Uygulamalar 7 gün boyunca tekrarlandı. Yara yerleri günlük olarak epitelizasyon, enfeksiyon ve inflamasyon açısından takip edildi. Hiçbir deney hayvanına yara yeri enfeksiyonu nedeniyle topikal ve sistemik antibiyotik verilmedi.

Histopatolojik Değerlendirme: Deney süresince zaman bağımlı olarak yaranın tam ortasından alınacak biyopsi örneklerinde süreç canlı olarak izlendi ve örnekler değerlendirildi. Yaralı ve sağlam deri bölgelerini içeren örnekler %10'luk formalin içerisinde 24-72 saat tespit edildi. Akarsuda formalinden kurtarıldıktan sonra örnekler rutin doku takip prosedürünü takiben parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile yaklaşık 5 µm

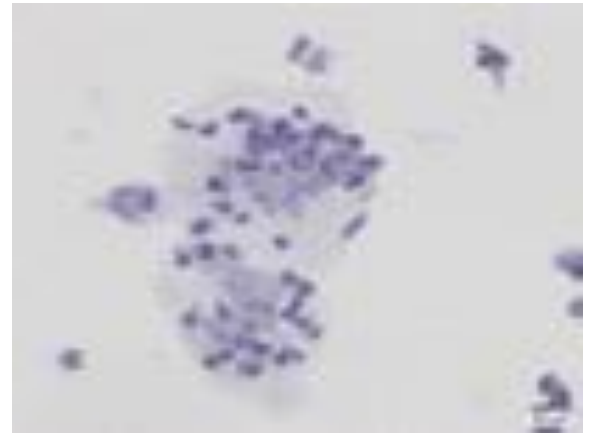
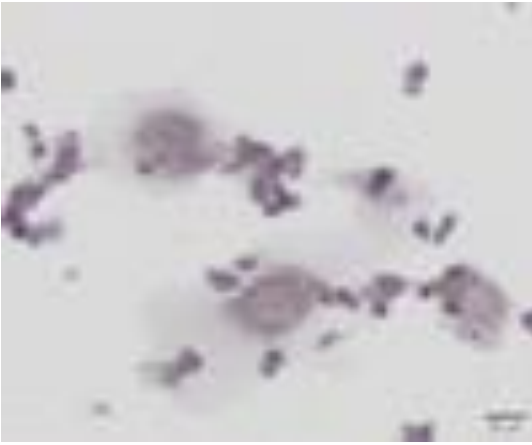
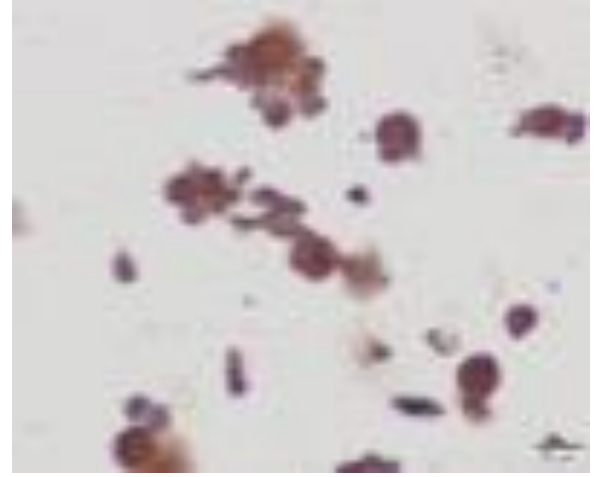
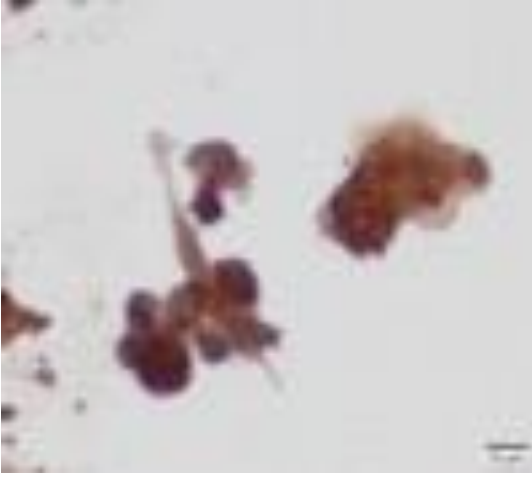


Şekil 4. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. gün PKMH davranışının makroskobik analizi

kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler her bir adezivli lamda 3-4 adet olacak şekilde dizildi. Kesitler 60°C derecede de etüv içinde deparafinize edildikten sonra çeşme suyunda yıkanıp histopatolojik inceleme için Hemotoksilen-Eozin boyası ve Masson Trikrom ile boyandı.

Histokimyasal Boyama: Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. 2 dakika hematoksilin ile boyamanın ardından, 5 dakika akar suda yıkanan kesitler 30 saniye eozin ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobunda incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Ayrıca Masson Trikrom boyaması yapılarak kollajen ve matriks değerlendirildi.

İndirekt İmmunohistokimya Boyaması: Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlandı. Dakopen ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H2O2 uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Phosphate buffer solution)(00-3002, Invitrogen, USA) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar eNOS (RB-1711-P1; Neomarkers), iNOS (RB-1605-P; Neomarkers) ve IL-1β (sc-12742; Santa Cruz) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikorunu (85-9043; Invitrogen®-Histostain Plus Bulk Kit, CA, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa



Şekil 5. PKMH'lerin anti-CD45(A), anti-CD34(B), anti-CD90(C), anti-STRO1(D) belirteçleri ile karakterizasyonu (Bar; 20µm, Büyütme; 400X)

5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (3,3'Diaminobenzidine) (00-2020; Zymed, CA, USA) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E; Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumuna ile kapatıldı.

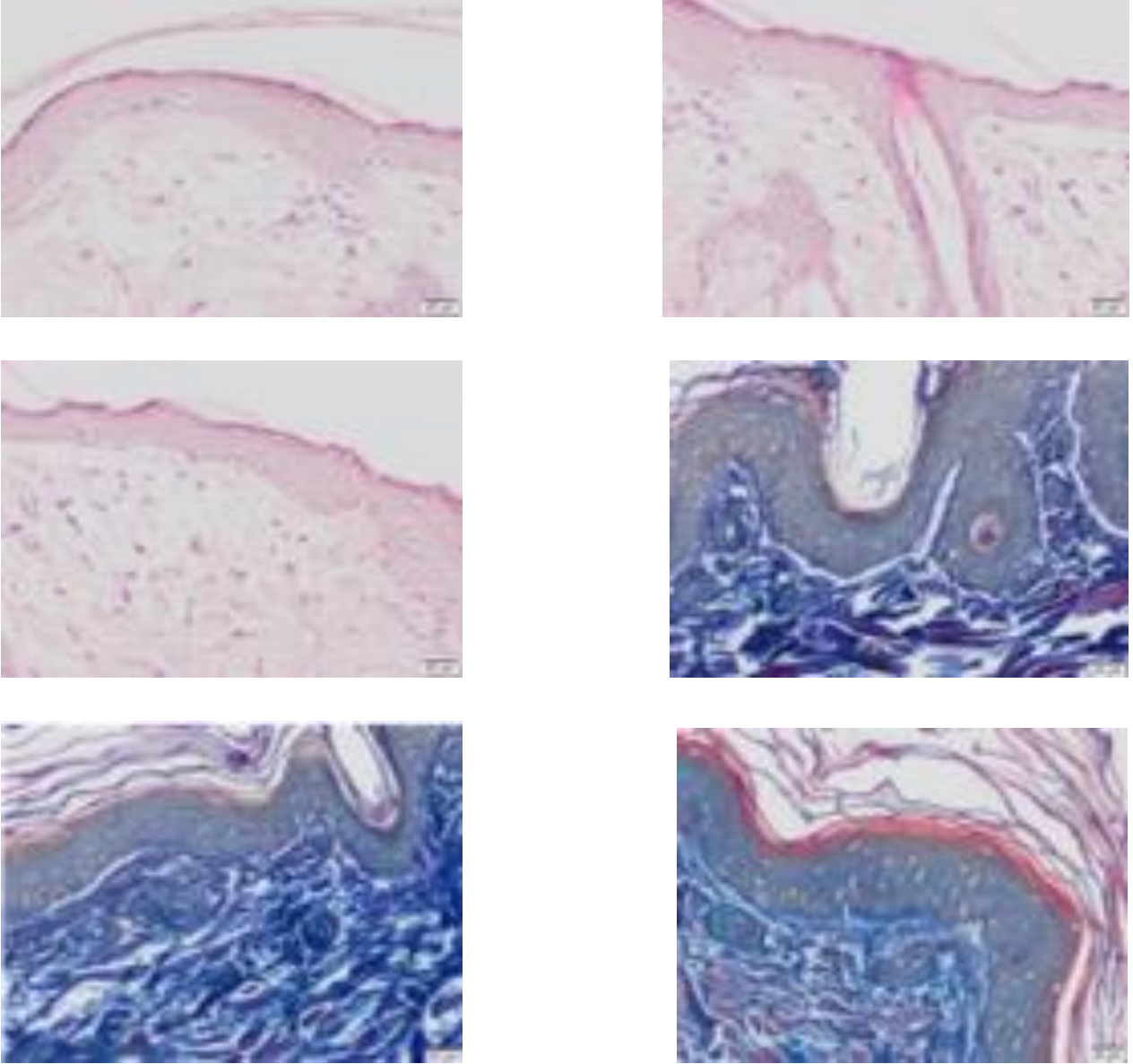
İstatistiksel Analiz: İmmunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi ve 0 = hücrelerin %1'den azında boyanma; 1+ = hücrelerin %1- 10'unda boyanma; 2+ = hücrelerin %11-50'sinde boyanma; 3+ = hücrelerin %51-80'inde boyanma; 4+ = hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma ile boyanma şiddeti de 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Daha sonra "(1+boyanma şiddeti/3) x boyanma oranı" formülü ile toplam skor hesaplandı. Elde edilen bulgular ile gruplar arasındaki farklılık Tek yönlü-ANOVA testi ile saptandı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Hücre Kültürü Ortamında PKMH Eldesi ve Karakterizasyonu: Kültürün birinci gününden beşinci gününe kadar hücrelerin yuvarlak biçimli oldukları gözlemlendi (Şekil 3A, Şekil 3B). Bu hücrelerin immunositokimyasal boyamalarla CD45, CD34, CD90, STRO-1 belirteçlerinin ifadesine bakıldığında CD45 ve CD34'ün güçlü pozitif (Şekil 5A, 5B), ve CD90 (Thy-1) ifadesinin zayıf pozitif (Şekil 5C), STRO-1 ifadesinin ise negatif olduğu görüldü (Şekil 5D).

Yara İyileşmesinin Makroskobik Sonuçları: Makroskobik değerlendirme amacı ile yapılan inceleme sonrasında erken dönemde PKMH (Şekil 4C) verilen grupta kontrol (Şekil 4A) ve sham (Şekil 4B) gruplarına göre iyileşmede belirgin bir fark gözlemlenmedi.

Histokimyasal Boyama Sonuçları: Örneklerin H-E (Şekil 6A, 6B ve 6C) ve MT (Şekil 6D, 6E ve 6F) boyamalarına bakılarak yapılan morfolojik incelemelerde histolojik görüntülerini destekler biçimde hücresel tedavi etkinliği saptandı. Analizlerde



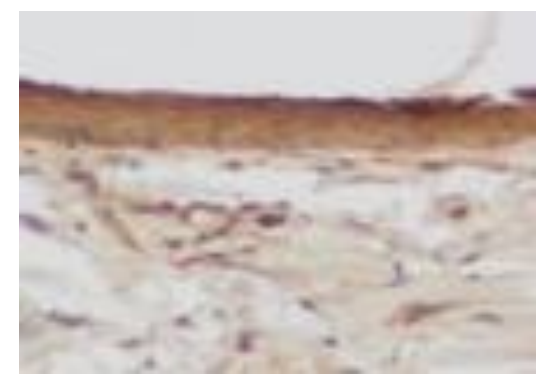
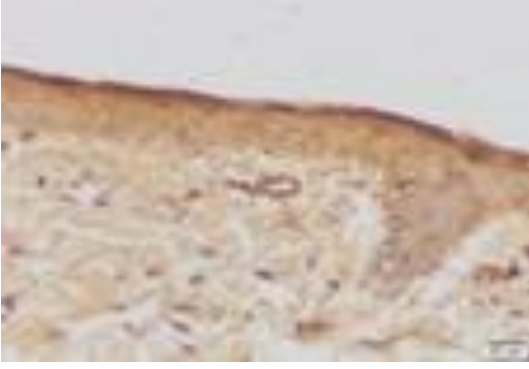
Şekil 6. Deri greftlerinin transferi sonrasında 3. gün PKMH davranışının H-E (A, B, C) ve MT (D, E, F) analizi (Bar; 20µm, Büyütme; 400X)

3.gün incelemelerinde diyabet gruplarda kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında PKMH verilen grupta anlamlı ($p<0,05$) iyileşme olduğu görüldü (Şekil 6C, Şekil 6F).

İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları: Oksidatif stress belirteci olarak eNOS immunoreaktivitesinin tüm gruplarda pozitif olduğu izlendi. Erken dönemde tüm gruplarda yoğun görülen oksidatif stresin PKMH verilen grupta azaldığı gösterildi. Bununla birlikte Kontrol ve Sham grupları ile karşılaştırıldığında PKMH verilen gruplarda oksidatif stresin çok daha anlamlı ($p<0,001$) olarak azaldığını doğrular şekilde eNOS immunoreaktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 7A, 7B, 7C; Şekil 8A).

Bir diğer oksidatif stress belirteci olan iNOS immunoreaktivitesinin de eNOS'a benzer şekilde erken ve geç dönemde tüm gruplarda pozitif olduğu gözlemlendi. Oksidatif stresin yoğun gözlemlendiği 3. günde PKMH verilen gruplarda oksidatif stresin anlamlı ($p<0,001$) olarak azaldığını doğrular şekilde iNOS immunoreaktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 7D, 7E, 7F; Şekil 8B).

IL-1 inflamatuvar yanıtta merkezi rol oynayan bir mediyatördür. Yara iyileşmesinin hem inflamasyon fazında hem de fibroziste rol oynadığı bilinmektedir. IL-1 β immunoreaktivitesinin tüm gruplarda 3. ve 7. Günlerde pozitif olduğu izlendi. Ancak yara iyileşmesinin erken fazı olan inflamasyon evresinde 3. günde yüksek IL-1 β ekspresyonu olduğu, PKMH



verilen gruplarda immunoreaksiyonun oldukça anlamlı ($P<0,001$) olarak daha az olduğu görüldü (Şekil 7G, 7H, 7I; Şekil 8C).

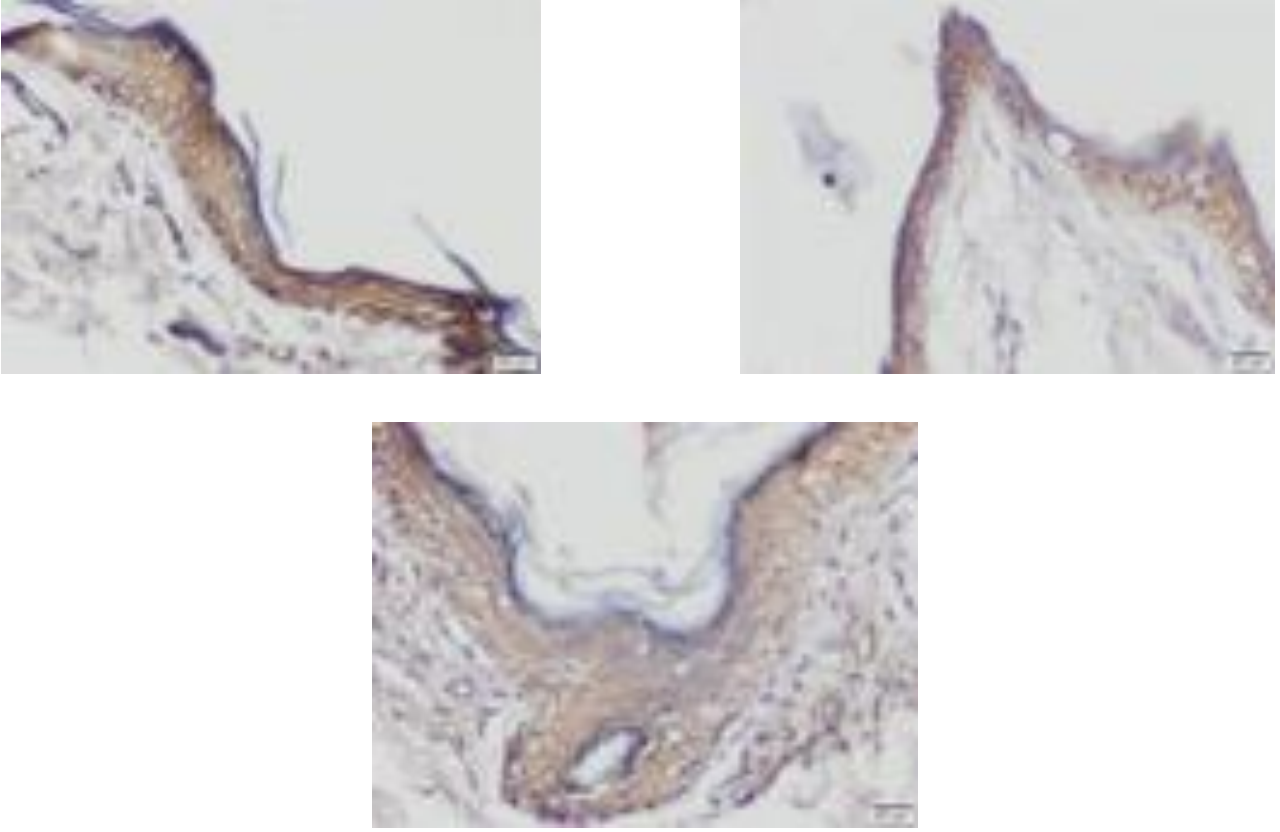
Tartışma

Sağlıklı bir deri bütünlüğü, insan vücudunun fizyolojik homeostazının korunmasında hayati öneme sahiptir. Onarım ve yenileme özelliği ise derinin tüm bu fonksiyonlarının merkezinde yer alır (12).

Günümüzde giderek artan uluslararası bir sağlık sorunu haline gelen diyabetik yaralar yeni tedavi arayışlarını da beraberinde getirmiş olup hücresele tedavi ürünlerinin kullanımı popülerlik kazanmaktadır. Bu hücresele ürünler içerisinde özellikle hematolojik

malignitelerin tedavisinde kullanılmakta olan PKMH diyabetik yaraların tedavisinde de umut vaatmektedir.

Kök hücrenin kültür ortamında damarlanma üzerine etkisini göstermek için yapılan bir çalışmada, uygulamanın CD31, CD34, vWF, CD146 ve SMA belirteçleri üzerinden anlamlı bir şekilde artışa neden olduğu görülmüştür (13). Doku iskeleleri üzerinde yapılan kök hücre uygulamalarının reepitelizasyonu ve neovaskülarizasyonu arttırdığı, kollajen birikimini azalttığı, kıl folikülü ve yağ bezlerini daha çok ürettiği ayrıca parakrin faktörler yolu ile yara iyileşmesini hızlandırarak istenilen iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (14).



Şekil 7. Kontrol, Sham ve PKMH gruplarının erken dönem deri biyopsi örneklerinin anti-eNOS (A, B, C) , anti-iNOS (D, E, F) ve anti-IL1 β (G, H, I) immünoaktivitelerinin dağılımı (Bar; 20 μ m, Büyütme; 400X, Zıt boyama; Mayers Hematoksilen)

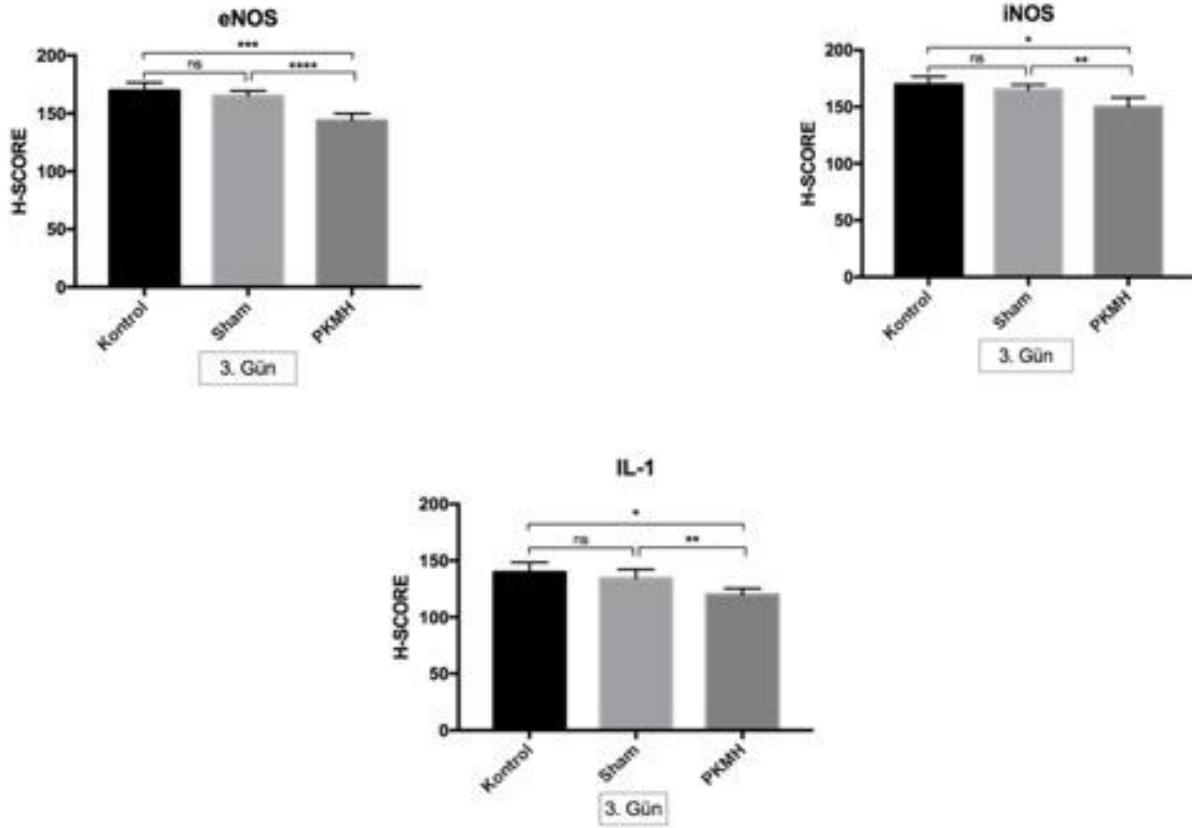
Yara onarımının inflamasyon evresinde nötrofiller, PDGF'ye yanıt olarak trombosit tıkaçına çekilerek ölü dokuyu ve bakteri partiküllerini fagosite eder, reaktif oksijen ürünleri (ROS) ile de antibakteriyel ortam yaratır. Nötrofiller ayrıca proinflamatuvar bir sitokin ve keratinositlerin çoğalması için bir uyarıcı olarak çift etkiye sahip olan IL-1 sunar. Yara iyileşmesinin düzenlenmesindeki rolü kritiktir ve yara iyileşmesi ilerledikçe değişiklikler meydana gelir. Makrofajların yara iyileşmesinde merkezi bir rol oynadığı, yara içinde homeostazı meydana getirdiği ve patolojik inflamasyonu önlemek için inflamatuvar durumu azalttığı yaygın olarak kabul edilmektedir (15). Kronik hastalık, vasküler yetmezlik, diyabet, malnutrisyon, yaşlanma, basınç, enfeksiyon ve ödem gibi faktörlerin sebep olduğu kronik yaralarda meydana gelen doku hasarı, ROS ve destrüktif enzimler ile yarayı bol miktarda nötrofil infiltrasyonu ile karakterize, uzun süren artmış bir inflamatuvar durumda hapseder (16).

İnsan periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) periferik kandan izole edilir. PKMH'ler, lenfositleri (T hücreleri, B hücreleri ve NK hücreleri), monositleri ve dendritik hücreleri içerir. İnsanlarda bu popülasyonların oranı bireyler arasında değişir, ancak dendritik hücreler % 1-2'lik bir oranda bulunurken, tipik olarak lenfositler%

70-90 arasında, monositler de %10-20 arasında bulunurlar. Lenfosit popülasyonu içindeki hücre tiplerinin frekansları %70-85 CD3 + T hücreleri, % 5-10 B hücreleri ve % 5-20 NK hücreleri içerir. CD3 + lenfositleri yaklaşık 2: 1 oranında CD4 + ve CD8 + T hücrelerinden oluşur. Aktivasyon sonrası CD4 + T hücre alt kümesi, Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, folliküler yardımcı (Tfh) hücreleri ve farklı düzenleyici hücre türleri de dahil olmak üzere çeşitli efektör hücre alt gruplarına dönüşebilir (17-18). CD4 + yardımcı T hücreleri immün homeostazın ve inflamasyonun vazgeçilmez araçlarıdır (19).

Literatürde PKMH için yara iyileşmesindeki rolüyle ilgili in vivo çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada PKMH sekretomunun in vivo ve in vitro yara iyileşmesini arttırdığı gösterilmiştir. Bunun için dermal yara modeli yapılan farelerde PKMH sekretomu uygulanan grupta kontrol grubuna göre yara kapanması önemli ölçüde artmış olup histolojik değerlendirmede epitelizasyon hızlandığı ve anjiyogenezin arttığı görülmüştür (20).

PKMH hücrelerinin bakteri ile uyarılma durumlarında da IL-6-10-17-23, IFN- γ , TNF- α , TGF-1 β düzeylerinin elisa ile incelendiğinde



Şekil 8. Kontrol, sham ve PKMH gruplarında eNOS (A), iNOS (B), IL-1 β (C) primer antikorlarının immünohistokimyasal boyama yoğunluğu (H-Skor) (Bar; ortalama \pm S.D. Anti-eNOS (A), anti-iNOS (B), anti-IL1 (C) immünoreaktiviteyi arasındaki farkları test etmek için GraphPad Prism 7® kullanılarak tek yönlü ANOVA ($p < 0.05$) yapıldı.)

arttırdığı ve bunun TGF- β için anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu durum PKMH için immunregülatuar ve antiinflamatuvar etkinin varlığını göstermektedir (21). Yapılan çalışmalarda allojenik olarak uygulanmış kök hücrenin diyabetik sıçanlarda immunosupresif etki gösterdiği, benzer şekilde PKMH ile aynı etkinin görüldüğü, hücrelerin uygulama sonrasında dokularda kaldığı ve fonksiyonel olduğu saptanmıştır, iyileşmeyen yaralarda ise IL-1, IL-6 ve MMP düzeylerinin normalin seviyenin üzerinde bulunduğu gösterilmiştir (22). Bizim çalışmamızda PKMH verilen gruplarda morfolojik olarak iyileşmenin daha hızlı gerçekleştiği, immünohistokimyasal boyamalarda ise IL-1 β ekspresyonunun azalması ile yara iyileşmesinin inflamatuvar fazını etkilediğini gözlemledik.

Önceki bir çalışmada flap modelinde dimetil arginin artışına bağlı damarsal endotelial NO (nitrik oksit) üretiminin ve buna bağlı oksidatif stresin iskemi ile arttığı görülmüştür (23). Artan NO ve oksidatif stresin bazal kan akımını etkileyerek iyileşme alanında kanlanmayı azalttığı düşünülmüştür (24). İskemiye bağlı endotelial ve indüklenbilir NOS aktivitesinin

artmasının mikrodolaşımın artması ile paralel olduğu ve endotel hücrelerinde membranlarda katlanmalar, şişmeler ve hücre kayıplarının eşliğinde gerçekleştiği bulunmuştur (25). Bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda eNOS ve iNOS immünoaktivitesinin kontrol ve sham grubunda hücre verilen gruplara göre anlamlı derecede artmış olması, PKMH verilen gruplarda ise anlamlı bir azalma olması bu hücrelerin yara onarımına PKMH tedavisinin yaralanma sonrası ortaya çıkan oksidatif stresi azaltarak iyileşmeye katkı sağladığını göstermektedir.

Tüm bu veriler ışığında kullandığımız PKMH, diyabetik ayak gibi kronik yaraların iyileşmesinde destekleyici tedavinin yapılmasına katkı sağladığı gösterildi. Kronik deri yaralarının tedavisinde kullanılmalarına yönelik katkı sağlayacak olan bu çalışmanın tedavi maliyetlerini azaltarak ve iyileşme süresini kısaltarak hastaların yaşam kalitesini arttıracığını düşünülmektedir.

Referanslar

1. Adegate J, Nurulain S, Tekes K, Fehér E, Kalász H, Adegate E. Novel biological

- therapies for the treatment of diabetic foot ulcers. *Expert Opin Biol Ther* 2017; 17(8): 979-987.
2. Cao Y, Gang X, Sun C, Wang G. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *J Diabetes Res* 2017; 2017: 1-10.
 3. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, Schatteman GC. CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res* 2003; 40(4): 68-77.
 4. Asai J, Takenaka H, Ichihashi K, Ueda E, Katoh N, Kishimoto S. Successful treatment of diabetic gangrene with topical application of a mixture of peripheral blood mononuclear cells and basic fibroblast growth factor. *J Dermatol* 2006; 33(5): 349-352.
 5. Huang SM, Wu CS, Chao D, Wu CH, Li CC, Chen GS, et al. High-glucose-cultivated peripheral blood mononuclear cells impaired keratinocyte function via reduced IL-22 expression: implications on impaired diabetic wound healing. *Exp Dermatol* 2015; 24(8): 639-641.
 6. Charles HT, Robert WB, Sherrell JA, Scott PB, Geoffrey CG, Scott LS, editors. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. Wolters Kluwer Health Adis; 2013.
 7. Hom DB. Wound healing in relation to scarring. *Facial Plast Surg Clin North Am* 1998; 6: 11.
 8. Charles K. Management of acute wounds. *Clin Plastic Surg* 2007; 34(4): 685-695.
 9. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 509-528.
 10. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: An overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 1-31.
 11. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 2004; 187(5): 11-16.
 12. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res* 2017; 58(1-2): 81-94.
 13. Vishnubalaji R, Manikandan M, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A, Alajez NM. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC Dev Biol* 2012; 27(12): 7.
 14. Formigli L, Paternostro F, Tani A, Mirabella C, Quattrini LA, Nosi D, et al. MSCs seeded on bioengineered scaffolds improve skin wound healing in rats. *Wound Repair Regen* 2015; 23(1): 115-123.
 15. Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am* 2017; 97(1): 189-207.
 16. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci* 2016; 17(12): 2085
 17. Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MM, Oshiiwa M, Taylor KN, et al. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor- α as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 206-211.
 18. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 1998; 47: 224-229.
 19. Makom Ndifossap IG, Frigerio F, Casimir M, Ngueguim Tsofack F, Dongo E, Kamtchouing P, et al. *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) stem-bark extract corrects glycaemia in diabetic rats and acts on beta- cells by enhancing glucose-stimulated insulin secretion. *J Endocrinol* 2010; 205: 79-86.
 20. Beer L, Mildner M, Gyöngyösi M, Ankersmit HJ. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis* 2016; 21(12): 1336-1353.
 21. Fidan I, Yesilyurt E, Kalkanci A, Aslan SO, Sahin N, Ogan MC, et al. Immunomodulatory effects of voriconazole and caspofungin on human peripheral blood mononuclear cells stimulated by *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Am J Med Sci* 2014; 348(3): 219-223.
 22. Patel S, Maheshwari A, Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J Wound Care* 2016; 25(1): 46-55.
 23. Karaaslan O, Sonmez E, Kankaya Y, Silistreli OK, Can MM, Bedir YK, et al. Monitorization of asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in an experimental ischemia-reperfusion flap model: a preliminary report. *J Reconstr Microsurg* 2013; 29(6): 417-420.
 24. Gribbe O, Samuelson UE, Wiklund NP. Effects of nitric oxide synthase inhibition on blood flow and survival in experimental skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007; 60(3): 287-293.
 25. Gribbe O, Lundeberg T, Samuelson UE, Wiklund NP. Dexamethasone increases survival and attenuates induction of inducible nitric oxide synthase in experimental skin flaps. *Ann Plast Surg* 1999; 42(2): 180-184.