

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**İNSAN KIL FOLİKÜLLERİNDE EKSPRESE EDİLEN MARKERLARIN
FARKLI DERİ BÖLGELERİNE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Proje No: TCD-2013-4517

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd.Doç.Dr.Arzu Hanım YAY
Tıp Fakültesi/Histoloji-Embriyoloji AD.

Araştırmacılar

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Arş.Gör. Gözde Özge ÖNDER
Tıp Fakültesi/Histoloji-Embriyoloji AD.

Prof.Dr. İbrahim Suat ÖKTEM
Tıp Fakültesi/Beyin ve Sinir Cerrahisi AD.

Prof.Dr. Atilla Çoruh
Tıp Fakültesi/Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahisi AD.

Temmuz 2015

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde maddi desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VI
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ-YÖNTEM	10
4. BULGULAR	13
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	20
6.KAYNAKLAR.....	23

İNSAN KIL FOLİKÜLLERİNDE EKSPRESE EDİLEN MARKERLARIN FARKLI DERİ BÖLGELERİNE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Deri eklerinden birisi olan kıl ve onun bağlı bulunduğu kıl folikülü, dış ve iç faktörlerin etkisiyle büyüme, gerileme ve dinlenme dönemleri geçiren ve kök hücre nişinin en tipik örneklerinden birisini oluşturan, çıkıntı ve kıl germi bölgesinden köken alan kıl folikülü kök hücrelerinden gelişir. Bu çalışmanın amacı, kıl folikülü ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan K15, K6, Ki-67 ve TUNEL immunofluoresan boyamaları yapılarak bu antikorların terminal ve vellus tipi kıllardaki ekspresyon yoğunluklarını bölgelerine göre belirlemek amaçlanmıştır.

Mevcut çalışmada, ameliyat olan ve hiçbir cilt hastalığı bulunmayan bireylerden alınan vücudun 5 farklı bölgesine (baş, bacak, karın, sırt ve bel) ait kıllı deri biyopsi materyalleri kullanıldı. Deney sonunda deneklerden alınan dokuların bir kısmı histolojik incelemeler için bir kısmı da immunofluoresan boyamalar için kullanıldı. Histolojik inceleme için alınan kıllı deri dokuları Hematoksilen-eozin ile boyanırken, farklı bölgelere ait kıl foliküllerinde K15, K6, Ki-67 ve TUNEL ekspresyonlarını belirlemek için immunofluoresan boyama metodu kullanıldı.

Çalışmada, skalp dokudan alınan kıl foliküllerinin tam bir histolojik tabakalanma gösterirken, özellikle bel ve karın bölgelerinden alınan kıl foliküllerinde kıl foliküllerinin tüm tabakaları net olarak ayırt edilmediği gösterildi. Bu durum, farklı bölgelerdeki kıl foliküllerinin aynı histolojik yapıya sahip olmadığını göstermektedir. Farklı bölgelerdeki kıl foliküllerinde K15, K6, Ki-67 ve TUNEL ekspresyonları değerlendirildiğinde, K15, K6 ve Ki-67 ekspresyon yoğunluğunun en yüksek skalp ve sırt bölgelerindeki kıl foliküllerinde olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; skalp dokuya ait kıl foliküllerindeki kök hücrelerin kullanılmasının yanı sıra sırt bölgesine ait kıl folikülü kök hücrelerinin de kök hücre çalışmaları için uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Kıl folikülü, Kök hücre, K15

THE EVALUATION OF MARKERS EXPRESSING IN HUMAN HAIR FOLLICLES ACCORDING TO DIFFERENT SKIN AREAS

ABSTRACT

A hair follicle is the primary unit that produces a single outgrowing visible hair shaft. All hair follicles have a regeneration cycle consisting growth, destruction and resting phase, all of which are controlled by several intrinsic and extrinsic mechanisms. The purpose of this study, it was aimed to determine the intensity of the expression of these antibodies in terminal hair and vellus type according to the region by using C15, C6, Ki-67 and TUNEL immunofluorescent staining method frequently used in studies related to hair follicles.

In the present study, were used hairy skin biopsy specimens of the five different regions of the body (head, legs, abdomen, back and waist) received from individuals having surgery and without any skin diseases. At the end of the experiment, a portion of the tissue obtained from the subject was used for histological examination and other portion of tissue was used for immunofluorescence staining. Hairy skin tissues taken for Histological examination stained with hematoxylin-eosin while, to determine C15, C6, Ki-67 and TUNEL expression was used immunofluorescent staining method in the hair follicle belonging to different regions.

In the study, the hair follicles from scalp tissue showed a complete histological layering while, all layers of hair follicle was not distinguished especially in the hair follicles taken from the back and abdomen. This showed that it was not same histological structures in different regions of the hair follicles. When we evaluate C15, C6, when the Ki-67 and TUNEL expression in the hair follicles in different regions evaluation, it was detected that C15, C6, and Ki-67 expression has the highest density in the hair follicles in the scalp and the back.

Consequently, we believe that hair follicle stem cells from the back would be appropriate in stem cell research as well as use of stem cells in the hair follicles of the scalp tissue.

Key words: Hair follicle, stem cell, C15

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan derisinde yaklaşık olarak 5 milyon kıl folikülü bulunur. Bunların yaklaşık 100.000 kadarı saçlı deride yer alır. Kıl, bir fibril içerisine sıkıştırılmış ölü keratinositlerin en son farklılaşmasından oluşur. Memeliler için karakteristik olan kıl, fiziksel koruma, ısı yalıtımı, kamuflaj, ter ve yağ dağılımı, duyu ve dokunsal fonksiyonlar ve sosyal etkileşimler gibi görevleri üstlenir. İnsan toplumunda kıl çok büyük bir fiziksel öneme sahiptir ve birçok hastalık kıl kaybı veya sıklığında azalma, kılın aşırı ya da tamamen dökülmesine bağlı olarak gelişir. Ayrıca uygun olmayan kıl büyümesi kişide şiddetli acı çekmeye neden olabilmektedir. Kozmetik açıdan aşırı kıl dökülmesinin getirdiği sıkıntılar nedeniyle, toplumda kıl artırıcı ve görünümü düzelten ilaçlara da artan bir talep vardır. Kıl foliküllerinin yapısı ve işleyişi uzun yıllardan beri araştırmacıların ilgi alanını oluşturmuştur. Özellikle kıl folikülü kök hücrelerinin kendi kendilerini yenilemeleri ve derinin diğer kompartmanlarına ait hücrelere farklılaşma yeteneklerinin keşfedilmesiyle, kıl folikülü kök hücreleri bilim dünyasında dikkati çeken bir araştırma konusu olmuştur. Mevcut çalışmada K15 markerı kullanılarak, kıl folikülü kök hücreleri sadece kafa derisindeki terminal kıllarda değil, vücudun diğer bazı bölgelerinde bulunan vellus tipi kıllarda da gösterilmesi amaçlanmıştır. Dahası, kıl folikülü ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan K6, Ki-67 ve TUNEL immunofluoresan boyamaları yapılarak bu antikorların terminal ve vellus tipi kıllardaki ekspresyon yoğunluklarını bölgelerine göre belirlemek amaçlanmıştır. Kıl folikülü ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan bu markerların, vücudun diğer bazı bölgelerinde bulunan kıl foliküllerindeki ekspresyon yoğunlukları bölgelerine göre belirlenecek ve ekspresyon yoğunlukları karşılaştırılacaktır. Elde edilmesi beklenen sonuçlarla, hangi bölgedeki kıl folikülü kök hücrelerinin kök hücre çalışmalarında daha kullanışlı olabileceği ortaya konabilecektir. Böylece, in vivo olarak yara iyileşme bölgelerinde ve yanık tedavilerinde kullanılabilecek in vitro deri üretimi için gerekli olan en uygun ve iyi sonuç verebilecek kök hücre kaynağı bölgesinin veya bölgelerinin seçimi sağlanabilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.DERİNİN HİSTOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Deri vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını kapsayan büyük bir organdır. Yetişkinde yaklaşık 10 kg ağırlığındadır. Yüzey alanı ise 1,5-2 m²'dir. Dış ortam ile vücut arasında su alışverişini sınırlaması, solunum, vücut ısısının düzenlenmesi, çeşitli duyu fonksiyonlarında görev alması ve organizmayı dış etkenlere karşı koruması en önemli görevleri arasında sayılmaktadır (1,2). Deri birbirine sıkıca bağlı üç tabakadan meydana gelir.

- En dışta ektoderm kökenli **epidermis**
- Daha derinde mezoderm kökenli **dermis**
- Anatomide yüzeyel fascia olarak adlandırılan **hipodermis** veya **subkutanöz tabaka (3)**.

Epidermis: Çok katlı yassı epitelin keratinleşen tipidir. Ektodermden köken alır. Bu epitelin en dikkati çeken özelliği; yüzeyel hücrelerin sürekli dökülmesi ve bazalden mitozla çoğalan hücrelerin bunların yerini almasıdır.

Dermis (corium): Epidermisin altındaki mezodermden köken alan, damardan zengin gevşek ve sıkı düzensiz bağ dokusudur. Dermis ve epidermis birbirine kalınlığı 0,5-4 mm arasında değişen bazal membran aracılığı ile sıkıca yapışırlar. Dermisin altında yer alan hipodermis (tela subcutanea, fascia superficialis), gevşek bağ dokusu ve yağ dokusundan oldukça zengin olup, deriyi daha derindeki fascia, periosteum ya da perikondrium gibi yapılara bağlar. Hipodermis çoğu yerde deri altı yağ dokusunu oluşturur (pannikulus adipozus). Hipodermis deriye yakın komşulukta olmasına rağmen derinin bir tabakası olarak tanımlanmamıştır. Dermis hipodermise bağ dokusu lifleriyle bağlanır ve derinin hareketliliği hipodermis liflerinin sayısına bağlıdır. Bu bağlantının gevşek olduğu yerlerde deri hipodermis üzerinde kolayca hareket eder. Ayak tabanı, el ayası gibi bağlantının sıkı olduğu yerlerde ise derinin hareketliliği sınırlı ölçüdedir (4).

2.1.1. Epidermis: Epidermisin çok katlı yassı epitel tabakasında keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri olmak üzere dört ayrı hücre tipi bulunur.

Epiteli çok katlı yassı keratinize epiteldir. Vücudun değişik bölgelerinde epidermis kalınlığı ve tabakalaşma düzeni farklıdır. Epidermisin pek çok özelliklerinin yanı sıra rejenerasyon yeteneği de vardır. Bazı araştırmacılara göre tüm epidermisin yenilenme süresi 59-75 gündür. Bazılarına göre ise epidermis mitotik aktivitesini 15-30 günde tamamlamaktadır. Epidermisi keratinositler ve uzantılı hücreler olmak üzere iki tip hücre oluşturur. Epidermisin %15'ini kapsayan uzantılı

hücreler melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleridir. Epidermis hücrelerinin yaklaşık %85 kadarını ise keratinositler oluşturur. Bu hücreler boynuzsu hücrelere dönüşürken içten dışa beş tabaka şeklinde düzenlenirler.

- Stratum bazale
- Stratum spinosum
- Stratum granulosum
- Stratum lucidum
- Stratum corneum

Stratum bazale (stratum germinativum): bir bazal membran üzerine dizilmiş tek sıralı prizmatik veya yüksek kübik keratinositlerden meydana gelir. Hücre sitoplazmalarında desmozomlarla bağlantılı ara filamanlar bulunur. Işık mikroskopta izlenebilen ara filaman demetlerine tonofilaman adı verilir. Hemidesmozomlar ve bunlarla bağlantılı ara filamanlar, bazal hücrelerin bazal yüzeylerini bazal membrana bağlarlar. Stratum bazale hücreleri mitozla çoğalır. Bölünen hücrelerin bir bölümü stratum bazalenin kök hücre topluluğunu oluştururken geri kalanlar stratum spinosuma göç ederler ve stratum corneum oluşumuna kadar giden farklılaşma sürecine girerler. Stratum spinosum ve stratum bazale birlikte Malpighi tabakasını oluşturur.

Stratum spinosum: Bu tabakada bulunan hücreler oval merkezi bir nukleusa sahiptir ve kübik şekillidirler. Hücre içinde bol miktarda bulunan keratin 8 filaman demetleri hücrelerin sitoplazmik uzantılarının ucunda yerleşmiş olan desmozomlarda sonlanırlar. Bu tabakada hücreler birbirlerine içi filaman dolu dikensi çıkıntılarla sıkı sıkıya bağlanırlar.

Stratum granulosum: Çok katlı poligonal hücrelerden oluşur. Belirgin bir zar ile çevrili olmayan keratohiyalin granülleri ile tanımlanır.

Stratum lucidum ve Stratum corneum: tabakaları nukleussuz ve organelsiz hücrelerden oluşurlar (3).

2.1.2. Dermis: Epidermin altında damardan ve elastik liflerden zengin gevşek bağ dokusudur. Kalınlığı yerel değişiklikler gösterir; avuç içi ve ayak tabanında en fazla (3mm) iken, skrotum, penis ve göz kapağı derisinde en incedir. Vücudun dorsal bölümü ventrale göre, ekstremitelerin lateral bölümü de mediale göre daha kalındır. Ortalama dermis kalınlığı 1-3 mm arasındadır (5,6).

Dermis vücudun her tarafında aynı yapıdadır. Epidermis ve dermis sınırı belirgin olarak seçilir. Kan damarları, lenf damarları, sinirler, kollajen lifler, elastik lifler ve bağ dokusu hücrelerinin

dağılımına göre sınırları belirgin olmayan, stratum papillare ve stratum retikulare olmak üzere iki tabakaya ayrılır (3).

Papiller tabaka, epidermisle temasta olan gevşek bağ dokusu (fibroblastlar, kollajen lifler ve ince elastik lifler) yapısındadır. Retiküler tabaka, kalın kollajen lif demetleri ve kaba elastik lifleri içerir. Stratum bazaledeki keratinositlerin bazal yüzeylerinde bulunan hemidesmozomlar, epidermisin bazal membrana bağlayıcı filamanlarla, dermisin papillalı tabakasına ise bağlayıcı liflerle bağlanırlar.

1.Stratum Papillare

Subepitelyal tabaka (yüzeyel, ince ve epidermise komşu olan bölüm) gevşek bağ dokusu yapısındadır. Epidermisin hemen altında olup, dermis içine doğru papilla denen cep tarzında konik biçimli girintiler yapar. Papillaların sayısı ve yüksekliği avuç içi ve ayak tabanında çok fazladır (ter bezi duktusları papillaların tepe bölümünden epidermis içine girer). Bazı papillalarda özel sinir sonlanmaları bulunur (*sinirsel papilla*), bazılarında ise kapillerler yer alır (*vasküler papilla*). Stratum papillare hücreden zengin gevşek bağ dokusudur. Fibroblastlar çoğunlukta olmak üzere, mast hücresi ve makrofajlar gibi çok sayıda hücre içerir. İnce kollajen lifler ve bol miktardaki elastik lifler bu tabakada gevşek bir ağ oluştururlar (5,6).

2. Stratum Retikulare

Sıkı düzensiz bağ dokusu yapısında olup, kalın kollajen demetler içerir. Ayrıca az sayıda retikulum ve çok sayıda elastik lif bulunur. Bağ dokusu hücreleri oldukça azdır. Lifler çoğunlukla yüzeye paralel seyreder. Liflerin yönlerine göre deride gerilme çizgileri oluşur. Bu çizgiler cerrahide önemlidir, deri insizyonları bu çizgilere paralel yapılırsa gelişecek skarlar minimal olur (3,6).

2.1.3. Hipodermis: Hipodermis veya derinin subkütanöz tabakası, dermisin derindeki devamıdır. Vücuttaki lokalizasyona bağlı olarak değişen kalınlıklarda bir tabaka oluşturan, gevşek bağ dokusu ve yağ hücrelerinden meydana gelir (3).

2.2. KIL

Kıl gövdesi son derece dinamik bir organ olan kıl folikülünde yerleşmiştir ve buradan kaynaklanır. Kıl folikülü kıl siklusundan sorumlu bir moleküler sistem içeren kompleks bir organdır. Bu yönü ile kıl folikülü farklı tipte hücreler içeren bir kök hücre havuzu olarak fonksiyon görür (7). Kılların dağılımı ve büyümesi birçok genetik ve endokrin faktöre bağlıdır,

bu nedenle normal kadınlar ve erkekler arasında da kıl dağılımı yönünden belirgin farklılıklar görülmektedir (8).

2.2.1. Kıl Fizyolojisi

Kıl folikülü gelişimi fetal ve perinatal deri gelişimi süresince gözlenir. İnsan fetüsünde gestasyonel dönemin yaklaşık 9. haftasında kaş, üst dudak ve çene bölgesinde ilk primordiyal kıl folikülleri gelişmeye başlar. Geri kalan foliküller sefalokodal yönde 4.veya 5. gestasyonel haftada görülmeye başlar. Fetus derisi büyüdükçe primer ve sekonder foliküller oluşur. Yağ bezi ve apokrin ter bezleri ektodermden köken alırken, dermal papilla ve bağ dokusu kılıfı mezodermal kökenlidir. Nöral krest türevli melanosit progenitörleri kıl folikülünün pigment birimini oluştururlar (9). Doğumda insan derisinde yaklaşık olarak 5 milyon kıl folikülü bulunur. Kıl foliküllerinin sayısı yaşam boyu değişmez. Sanılanın aksine her iki cinsten, yani erkek ve kadında aynı sayıda kıl folikülü bulunmaktadır. Kıl folikül sayısı ırklar arasında değişiklik gösterir. Beyaz ırkta kıl sayısı fazladır. Asya ırkında daha az ve kuzey Avrupa ırkında en az sayıda kıl folikülü bulunur. Kılların oluşum sürecinde pilosebace unite adı verilen kıl folikülü, sebace bezler ve erektor pili bir bütün olarak oluşur. Kılı üreten asıl merkez, kıl folikülüdür. Kıl folikülünde melanosit hücreleri kılın asıl rengini veren melanin üretir. Melanin miktarı kılın rengini belirler.

Puberte ile birlikte her iki cinsten aksilla, genital bölgelerde; erkekte ise yüz, omuz, sırt, göğüs, kol ve bacaklarda terminal kıllar oluşmaya başlar. Androjen düzeylerinin artışı, vücudun büyük bölümündeki kısa, ince ve renksiz vellus tipi kılların kalın, uzun, kıvrılmaya meyilli ve pigmentli terminal kıllara dönüşmesini uyarır (10,11).

2.2.2. Kıl Tipleri

İnsan vücudunda yapısal olarak üç tip kıl vardır.

Lanugo; medullası olmayan kıllardır. İntrauterin hayatta oluşur, bebeklerin vücudunu kaplayan ince ve yumuşak kıllardır ve doğumdan birkaç ay sonra dökülür.

Vellus; yumuşak yapıya sahip olup lanugo tipi kıllardan daha uzundur. Genellikle 0.03 mm'den daha küçük bir çapa sahiptir.

Terminal; En uzun kıl tipidir ve en az 0.06 mm çapa sahip, pigmentli kıl tipidir. Vücut bölgesine bağlı olarak, hormonal düzenleme başlıca puberteden sonra kıl büyüme siklusunda önemli bir rol oynar (10,11).

2.2.3. Kıl Siklusu

Vücuttaki kılların hemen hepsi yaşam boyunca farklı sürelerle sahip yenilenme, yıkım ve dinlenme aşamalarından geçer. Kıl folikülleri kök hücre içerirler. Bu kök hücreler bölünme ve farklılaşma için kıl matriksine göç ederler. Yaşam boyunca, kıl folikülleri üç farklı peryod ile karakterize siklus geçirir;

- 1-Anagen; hızlı büyüme evresidir,
- 2-Catagen; Apoptoz aracılı gerileme evresi,
- 3-Telogen; dinlenme veya nispeten sükunet evresi.

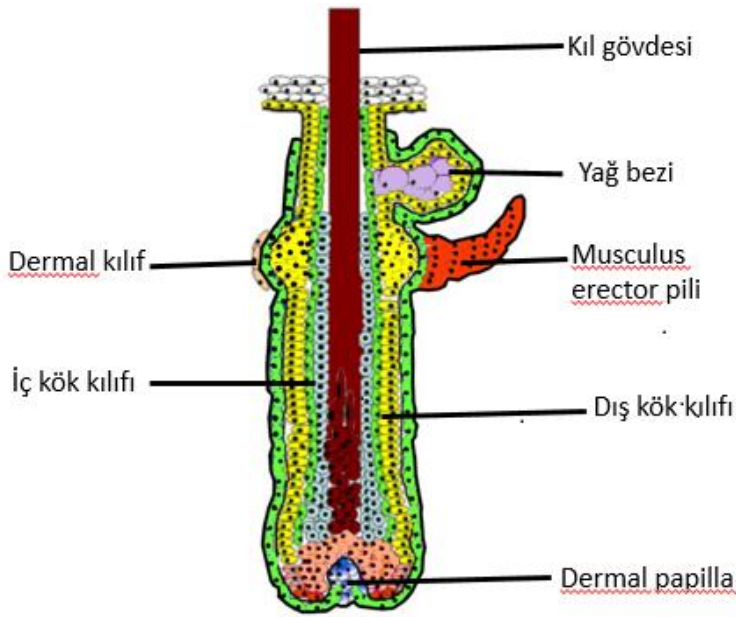
Anagen faz; farklı vücut bölgelerinde kıl siklusunda belirlenebilir. Genellikle anagen evrede, büyüme fazı 2 yada 3 yıl sürebilir. Kıl büyümesi ve anagen evrenin süresi ile oranı kıl ve lokasyonun tipi ile değişir. Kafa derisinde bulunan saç folikülleri en uzun anagen faza sahiptir ve saçtaki foliküllerin %90'ı anagen fazdadır. Kafa derisinde, terminal kılların uzama oranı günde yaklaşık olarak 0.3mm olup anagen evrenin süresi bu bölgede 2-6 yıl arasındadır. Bunun aksine, kirpikler günde sadece 0.1mm kadar uzarlar ve anagen evrenin süresi 2-3 ay kadar sürer. Bu oranın yüksek olması aktif kıl gelişimini göstermektedir.

Katagen faz; bu evrede kıl folikülünün alt bölümü geriler ve kıl gövdesinin yapımı durur. Kıl folikülünün en derin kısmı folikülün isthmus bölümüne doğru yükselir ve dermal papilla subkutan yağ dokusuna göç eder. Katagen faz süresince epitelyal tabaka gerilemesinin ardından dermal papilla folikülün bulge bölümünde lokalize olur. Kafa derisinde katagen faz genellikle 2-3- hafta civarında sürer. Kafa derisinde foliküllerin %1'inden daha azı bu evrededir.

Telogen faz; gerileme evresi olarakta bilinir. Katagen fazdan sonra oluşur ve kafa derisinde 2-4 ay arasında sürer. Normal olarak kafa derisindeki kıl foliküllerinin %10'u telogen fazdadır. Günde 50-150 arasında kıl gövdesi bu evrede dökülür. Kıl gövdesinin folikülden ayrılması ve dökülmesi telogen fazın sonunda olur ve ardından kıl folikülü yeni bir sıklusa girer.

2.2.4. Olgun kıl folikülünün yapısı

Kıl folikülünün uzunlamasına kesitine bakıldığında epitelinin her biri farklı özellikte keratin içeren en az sekiz farklı konsantrik hücre tabakası içeren 3 ana tabaka içerdiği görülür (12). Periferden başlayarak bu tabakalar dış kök kılıfı, iç kök kılıfı ve kıl gövdesi şeklindedir. Dış kök kılıfının bulge bölgesinde kıl folikülü kök hücreleri yer almaktadır (13) ve bu alan kıl büyümesinde anahtar role sahiptir. Kıl folikülünün büyüklüğü ve kıl gövdesinin çapı dermal papillanın hacmi ile belirlenir.



Şekil 2.1. Anagen fazdaki bir kıl folikülünün Histolojik bölümleri

Olgun (anagen) kıl folikülü, saç döngüsü sürecinde yenilenmeyen “kalıcı” üst kısım ve “düzenli olarak yenilenen” alt kısımdan oluşur. Üst kısım, infundibulum ve istmustan oluşurken, döngüyle yenilenen alt kısım ise kıl shaftı ve kıl tomağından (bulb) oluşur. Üst kısımda yer alan infundibulum kıl kanalının deriye açıldığı bölümdür. İfundibulu bölümü sebace bezin kıl folikülüne girişi ile belirlenmiştir. İfundibulumun proksimalinde yer alan istmusda ise erektör pili kasının girişi gözlenir ve bu bölge için sınırı belirler. İstmusta epitelyal ve melanosit kök hücrelerini barındıran bir bölge olan çıkıntı bölgesi (bulge) yer alır. Çıkıntı bölgesi, kıl folikülünün yenilenmeyen kalıcı bölgesinin son bölümüdür. Yenilenen bölümde yer alan kıl tokmağında; matriks keratinositleri ve kıl folikülünün pigmentli birimi bulunur. Çıkıntı bölgesinden göç ederek kıl shaftını oluşturmak üzere aktive olan matriks keratinositleri hızla çoğalırlar (geçici çoğalan hücreler) ve sayıları saç tokmağının boyutunu ve kıl shaftının çapını belirler (14). Matriks hücreleri çoğalmalarını durduklarında ve farklanmaya başladıklarında kıl shaftının hücre tabakalarını ve iç kök kılıfını oluştururlar. Dış kök kılıfı ise farklı öncü (progenitor) hücrelerden köken alır (15,16). İfundibulum, istmus, çıkıntı ve kıl tokmağı ektoderm kökenli kıl folikülü epitelinden köken alırken, dermal papilla ise mezoderm kökenlidir. Dermal papilla, sıkı paketlenmiş fibroblast hücrelerini içerir ve kıl tokmağı boyutunu, kıl shaftının çapını ve uzunluğunu ve anagen fazın süresini belirler (17). Kıl folikülü kesiti, epitelinin, birbirinden farklı tipte keratin ekspre eden, en az 8 farklı konsantrik tabakadan oluşur. En dıştan içe doğru; dış kök kılıfı, eşlik eden tabaka (companion), iç kök kılıfı ve kıl

şafı tabakaları rahatlıkla izlenebilir. İç kök kılıfı ise kendi içinde dıştan içe şu tabakalara ayrılmıştır; eşlik eden tabaka- Henle'nin tabakası - Huxley'in tabakası – iç kök kılıfı kütikülü. Kıl şafı tabakaları şunlardır; ortada medulla ve her iki yanında korteks. Kıl şafı iç kök kılıfının kütikülü tarafından sarılmıştır. Tüm kıl folikülü epitel tabakaları da en dışta mezoderm-kökenli olan, kollajen ve stroma hücreleri içeren bağ dokusu kılıfı ile çevrelenmiştir.

2.2.5. Kıl Büyümesinin Kontrolü

Kıl siklusu, hormonal ve nöral faktörlerin kontrolü altındadır. Östrojen, tiroid hormonu, glukortikoid, retinoid, prolaktin ve büyüme hormonu kıl siklusunu modüle ederler. En dramatik etki gösteren hormonlar androjenlerdir. Kıl foliküllerin innervasyonu zengindir. Özellikle kıl folikülündeki çıkıntı alanında çok sayıda Merkel hücresi, sinir sonlanmaları ve kıl folikül proliferasyonunu kontrol eden nörosekretuar hücreler bulunmaktadır. Katagen dönemde kıl foliküllerinde büyümeyi inhibe eden nörotrofinler gösterilmiştir (18).

2.2.6. Kıl Pigmentasyonu

Kılların rengi melanositler tarafından belirlenir. Kıllar sadece aktif büyüdükleri dönemde pigmente olurlar çünkü melanogenik aktivite kıl siklusunun anagen döneminde gerçekleşir. Melanositler anagen folikülde matriks bölümünde lokalizedirler ve pigment üretirler. 3 tip melanin vardır:

- 1) Ömelanin: Kahverengi-siyah rengi belirler.
- 2) Feomelanin: Sarı rengi belirler.
- 3) Eritromelanin: Kızıl rengi belirler.

Pigment kıl sapında korteks kısmında ağırlıkla bulunur. Yeni kıl formasyonunda tipik olarak pigment görülmez. Kıl rengindeki yoğunluk pigment miktarıyla doğru orantılıdır (18).

2.3. Epidermal Kök Hücre

Deri kök hücre araştırmalarında epidermal kök hücreler, kolay ulaşılabilme ve gösterdikleri transdiferansiyasyon özelliği ile diğer organ kök hücrelerinden ayrılmaktadırlar (19,20). Bugün epidermisde, pilosebace ünit etrafında yer alan epidermal kök hücreler; sabit lokalizasyonlu, yüksek derecede proliferasyon gösterebilen holoklon hücrelerdir. Epidermisde yer alan tüm keratinositlerin %4-8'ini kaplayan, yüksek çekirdek/sitoplazma oranına sahip, uzun dönem proliferatif kapasiteli olabilen bu hücreler bugün saptanabildiği kadarı ile yara iyileşmesindeki uyarı ile harekete geçme dışında oluştukları ilk andan itibaren hücre bütünlüğü ve yapısını hiç değiştirmeden yıllarca sabit bir şekilde durabilmektedirler (19). Epidermal kök hücrelerle ilgili ilk araştırmaların başladığı 15 yıl önce, bu hücrelerin interfolliküler alanda, sebace gland

etrafında ve kıl kökü papillasında olduğu saptanmıştı (20). Bugün ise, özellikle dermal papilla ve dış kök kılıfında yerleşen hücrelerden geliştirilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerden embriyonik kök hücre özelliklerini taşıyan keratinosit, melanosit ve fibroblast üretmek olasıdır (21,22).

Epidermal kök hücreler ile ilgili ilk araştırmalarda bu hücrelerin kese ve interfolliküler alanda bulundukları saptanmış ve kıl kökünün rejeneratif değişikliğinin kese bölgesi hücreleri ile olduğu bulunmuştu (19,20). Sonraki araştırmalar ise kıl kök dermal papillası ve kese bölgesine yakın alandaki dış kök kılıfının epidermal hücreler dışında nöron, hematopoietik hücre, kondrosit, adiposit, nöral krest hücre ve mezenkimal kök hücrelere dönüşebildiğini göstermiştir (23,24,25). Epidermal kök hücreler Şekil 1’de gösterildiği biçimde pilosebase ünit içerisinde en çok kıl follikülünün piloerektör kasın yapıştığı bölgede (Bulge-kese), interfolliküler bölgede ve kıl kökü kılıfında yer almaktadır. Kıl follikülünün bulge bölgesi kök hücreleri en zengin hücre kaynağı bölgesi olarak gözükmemektedir. Bulge bölgesi kök hücreleri, sinir sistemi hücrelerine (nöron, glia) dönüşümü dışında keratinositlere, düz kas hücrelerine, melanosit ve hematopoietik hücrelere de dönüşebilmektedir. Pilosebase ünit içinde yer alan kıl follikülü dermal kılıfındaki kök hücreler ise mezenşimal kök hücre, adiposit, kondrosit, hematopoietik ve nöronal hücrelere dönüşüm gösterebilmektedir (24,25). İnsan vücudundan elde edilen ve belirgin işlemlerle pluripotent embriyonik kök hücre niteliğine kavuşan birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilecek tür hücrelerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı 05/03/2013 tarih ve 2013/197 no'lu onayı doğrultusunda, TCD-2013-4517 no'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Beyin Cerrahisi, Plastik Rekonstruktif ve Estetik Anabilim Dalları'nda, hiçbir cilt hastalığı bulunmayan ancak başka neden ya da nedenlerden dolayı ameliyat olması gereken ve ameliyat sonrası sağlıklı deriden alınan yaklaşık 3 mm³ büyüklüğünde kıllı deri biyopsi materyalleri kullanıldı. Mevcut çalışmada, ameliyat olan ve hiçbir cilt hastalığı bulunmayan bireylerden alınacak vücudun 5 farklı bölgesine (baş, bacak, karın, sırt ve bel) ait kıllı deri biyopsi materyalleri kullanıldı. Deri biyopsileri ameliyathanede doku medyumuna içerisinde konularak Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarına getirildi.

1-Doku Takibi ve Hematoksilen-Eozin Boyama: Deney sonunda deneklerden alınan dokularının bir kısmı histolojik incelemeler için bir kısmı da immunofluoresan boyamalar için kullanıldı. Histolojik inceleme için alınan kıllı deri dokuları hemen %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildi. Daha sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilerek ksilol ile şeffaflaştırılan dokular parafin içine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler polilizinli lamlara alındı. Dokudaki histolojik yapının gözlenmesi amacıyla hematoksilen-eozin boyaması için kesitler 2 saat 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra ksilen ve azalan dereceli alkol serilerinden (%100, %96, %70, %50) geçirilerek yıkanıp 8 dakika hematoksilen ile boyandı. Kesitler tekrar yıkanarak 5 dakika eozin ile muamele edildikten sonra dehidrate edilecek ve ksilenden geçirilerek kapatılacaktır. hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanan kesitlerden histomorfometrik değerlendirme için Olympus BX51 mikroskobu altında DP71 model dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraf çekilecektir. Elde edilen görüntülerde, farklı bölgelerden alınan deri dokusunun tabakalanması ve kıl foliküllerinin yapısı morfolojilerine göre değerlendirilecektir.

2- İmmunofluoresan: Bu yöntemle incelemede parafin bloklama basamağı olmadığı için dehidratasyon, seffaflaştırma, parafin bloklama basamakları yer almaz. İmmunofluoresan çalışma metodu için alınan doku örnekleri, frozen yöntemi için kesite direnç kazandırmak amacıyla doku cryo matrix denilen bir madde içerisinde dondurularak fiksasyonları yapıldı. Daha sonra cryostat mikrotomu ile (Frozen cihazı) -20,-25 °C'de dokulardan alınan kesitler

lamlara alındı. İnsan vücudunun farklı bölgelerinden alınan kıllı deri kesitleri -80°C’de daha sonra immunoflouresan boyama yapmak üzere saklandı.

2.1. K15 immunoflouresan Boyaması

Bu boyama metodu ile K15 pozitif ekspresyon gösteren kıl folikülü kök/progenitor hücreler belirlenecek, ayrıca K15 immunorektivitesi değerlendirildi. Bunun için deney gruplarından alınan deri biyopsi örneklerinde K15 immunoflouresan boyama metodu uygulandı. Özetle, kesitler 10 dk oda ısısında kuruması için bekletildi. Sonrasında post-fiksasyon aşaması için -20°C’de aseton ya da %4’lük paraformaldehide alındı. Post-fiksasyon aşamasından sonra Tris NaCl Tween (TNT) ’de yıkanan (3x5 dakika) dokular %3’lük hidrojen peroksit’de 15 dk inkübe edildi. Sonra (TNT) ’de yıkanan (3x5 dakika) dokulara 15dk avidin muamelesinden sonra tekrar TNT ile (3x5 dakika) yıkanarak 15 dk biotin ile muamele edildi. Yıkama işlemini takiben (TNT ile (3x5 dakika)) dokular %2’luk normal goat serum ile preinkübe edilip yıkanmadan primer antikor damlatıldı (K15) ve 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Ertesi sabah TNT’de yıkanan kesitlere sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında yaklaşık 60dk kadar bekletildi. Sekonder antikor aşamasından sonra kesitler TNT ile yıkanarak TSA kit tetramethylrhodamine kullanılarak pozitif hücreler işaretlendi. Dokudaki bütün hücrelerin çekirdeklerinin görünür hale getirilebilmesi için 1 dk. DAPI uygulandı. Ardından kesitler tekrar TNT’de yıkandıktan sonra flouromount kapatma solüsyonu damlatılıp lamel ile kapatıldı.

2.2. K6 immunoflouresan Boyaması

K6 belirteci ile kıl folikülü keratinositlerini göstermek amacıyla kullanıldı. K6 immunoflouresan boyama için -80°C’den çıkarılan kesitler 10 dk oda ısısında kuruması sağlandıktan sonra post-fiksasyon aşaması için -20°C’de aseton’a alındı. Bu aşamadan sonra Tris Buffered Saline (TBS) ’de yıkanan dokular (3x5 dakika) direkt primer antikor damlatıldı (K6) (Antikor dilüent solüsyonu ile dilüe edilir) ve 1 gece 4°C’de inkübe edildi. Ertesi sabah TBS’de yıkanan kesitlere sekonder antikor (FITCH) damlatılarak oda sıcaklığında yaklaşık 45dk kadar bekletilip tekrar TBS ile yıkandı ardından 1 dk. DAPI uygulandı. Daha sonra kesitler TBS’de yıkanıp flouromount kapatma solüsyonu ile lamel kullanılarak kapatıldı.

2.3. Ki-67 ve TUNEL double immunoflouresan Boyaması

Ki-67 belirteci proliferen hücreleri göstermek amacıyla kullanılırken TUNEL metodu ile de apoptotik hücreler belirlenip buna göre bir histomorfometrik analiz yapıldı. Double immunoflouresan boyama için -80°C’den çıkarılan kesitler 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra -20°C’de paraformaldehit ile post-fiksasyonu sağlanır. Phosphat buffer saline (PBS)’de yıkanan kesitlere TUNEL kitinde yer alan solüsyonlar prosedüre uygun şekilde uygulanır ve

kesitler (PBS)'de (3x5 dakika) yıkanır. Dokulara %10'luk normal goat serum damlatılarak preinkübasyon sağlandıktan sonra primer antikor damlatılır (Ki67) ve 1 gece +4°C'de inkübe edilir. Ertesi sabah yine PBS'de yıkanan kesitlere sekonder antikor (Rhodamine'li) damlatılarak oda sıcaklığında yaklaşık 45dk kadar bekletilir. Bu aşamadan sonra yıkanan kesitlere 1 dk. DAPI uygulanıp ardından kesitler tekrar PBS ile yıkanıp flouromount kapatma solüsyonu ile kapatılır.

İstatistik:

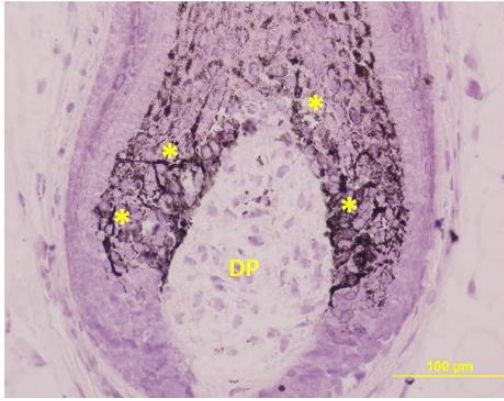
Kontrol ve deney grubuna ait İmmunohisto- ve histomorfometri analizleri Image J software programı ile yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 yazılım programında yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

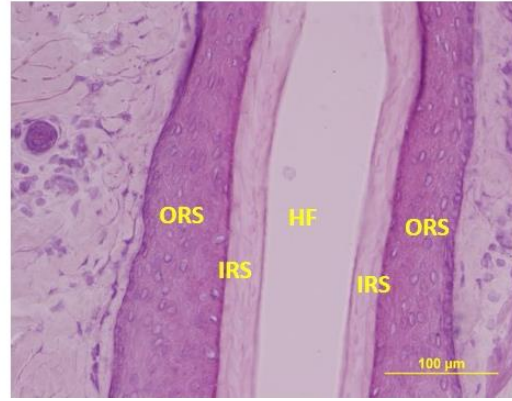
4.1. Histolojik Bulgular

Çalışmada, öncelikle insan vücudunun farklı bölgelerinden alınan kıllı deri örneklerinde kıl foliküllerinin histolojik yapıları incelendi ve kıl folikülleri histolojik olarak değerlendirildi. Bu işlem için H&E ile boyanan kesitler kullanıldı. Farklı deri bölgelerine ait kıl foliküllerinden alınan histolojik görüntüler Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Yapılan incelemede, skalp dokudan alınan kıl folikülleri tam bir histolojik tabakalanma gösterirken, diğer bölgelerden alınan (bacak, karın, sırt ve bel) kıl foliküllerinin tam bir tabakalanma göstermediği gözlemlendi.

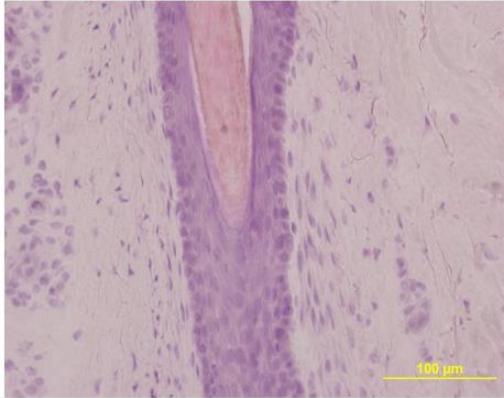
Skalp-Bulb



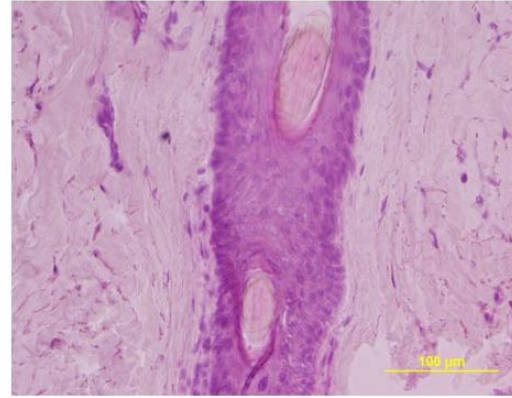
Skalp-Bulge



Bacak



Bel



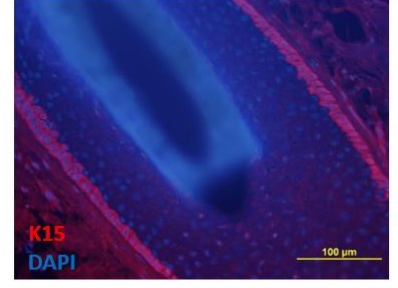
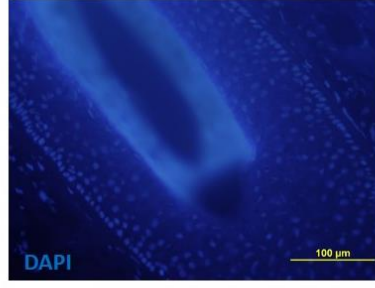
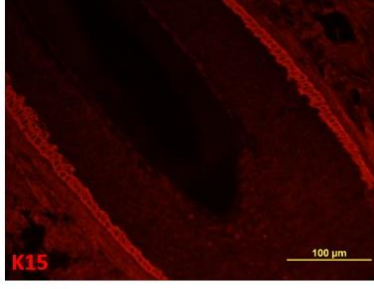
Şekil 4.1. Skalp dokuya ait bir kıl folikülünün bulb ve bulge bölgelerinin Histolojik yapısı. yıldız; melanositler, DP;Dermal papilla, HF; Kıl gövdesi, IRS; İç kök kılıfı, ORS; Dış kök kılıfı

4.2. İmmunofluoresan Bulgular

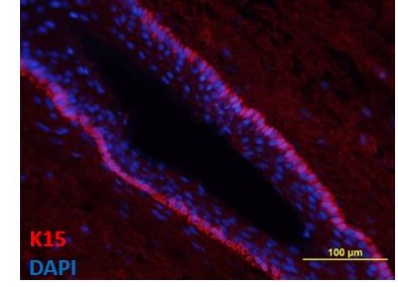
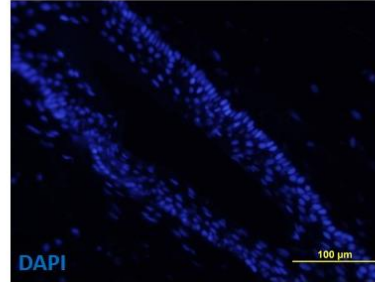
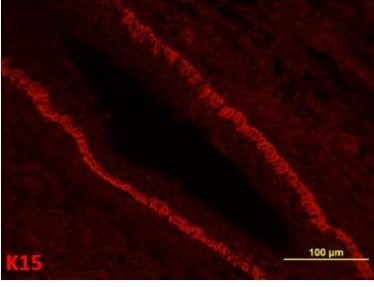
Çalışmanın bu bölümünde, kıl folikülü ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan K15, K6, Ki-67 ve TUNEL immunofluoresan boyama protokollerinin uygulandığı preparatlar seçilerek, bu antikörlerin farklı deri bölgelerinden alınan kıllardaki ekspresyon yoğunlukları hesaplandı. K15 kıl folikülü kök hücrelerini göstermek için kullanılan bir markerdir. Çalışmada, tüm bölgelere ait kıl foliküllerinin kök hücrelerinde K15 pozitif immunoreaktivite gösterdi. Kıl folikülü kök hücreleri özellikle folikülün dış kök kılıfında ve anatomik olarak bulge bölgesinde yerleşim göstermekteydi (Şekil 4.2. ve 4.3.) Kıl folikülü kök hücrelerinin K15 immunoreaktivite yoğunlukları karşılaştırıldığında en yüksek ekspresyonun skalp dokudan alınan folikül kök hücrelerinde olduğu gözlemlendi. İlginçtir ki, sırt bölgesine ait kıl folikülü kök hücreleri de neredeyse skalp dokudaki kök hücreler kadar K15 ekspresyonu gösterdi.

Farklı deri bölgelerindeki kıl folikülleri K6 ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde, kıl folikülü keratinosit hücrelerinin hepsinde K6 ekspresyonu mevcuttu. Fakat ekspresyon yoğunlukları kıl folikülünün bulunduğu bölgeye göre farklı olduğu gözlemlendi. K6 ekspresyonun en yoğun gözlemlendiği kıl folikülleri skalp dokuya ait olan kıl folikülleri idi. Bacak ve karın bölgelerinde bulunan kıl folikülleri benzer K6 ekspresyonu gösterirken, sırt bölgesine ait kıl foliküllerinde K6 ekspresyon yoğunluğu neredeyse skalp bölgeye ait kıl folikülleri ile yakınlık gösterdi. Şekil 4.4. ve 4.5.'te farklı deri bölgelerinden alınan kıl foliküllerinde K6 ekspresyonu gösterilmiştir.

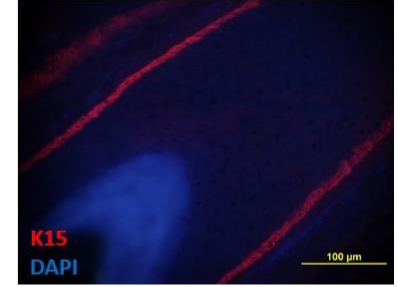
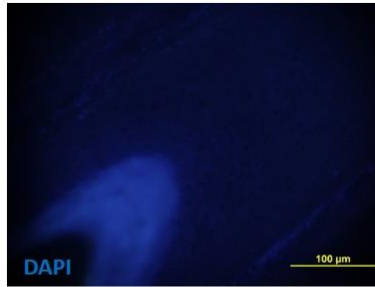
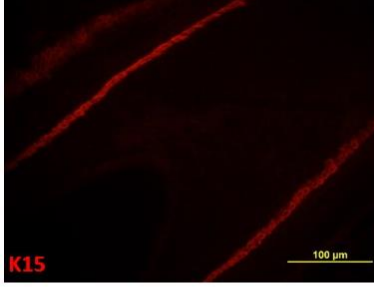
Skalp



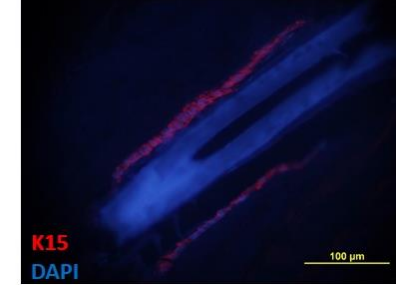
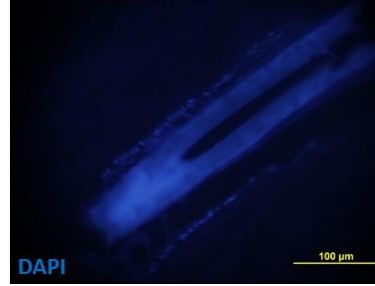
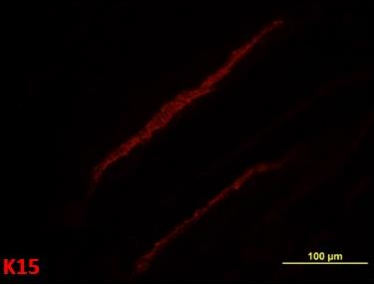
Bacak



Karın

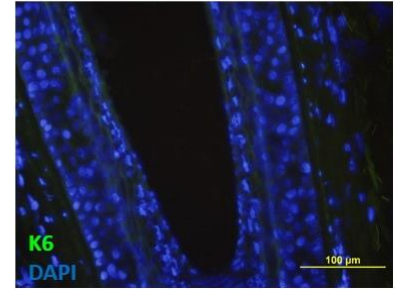
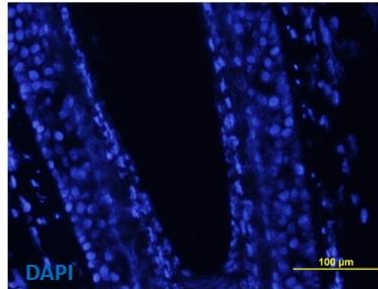
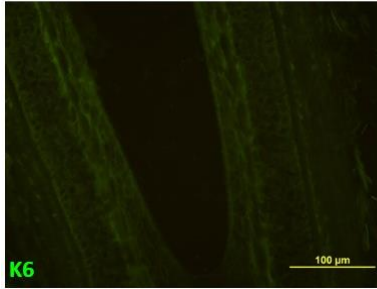


Bel

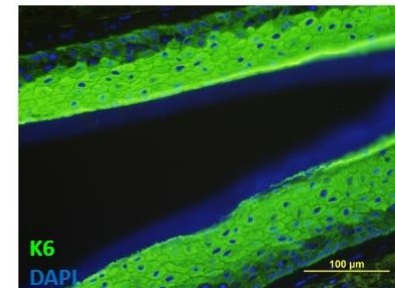
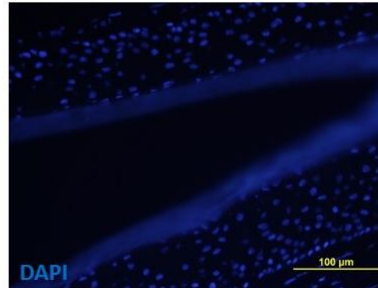
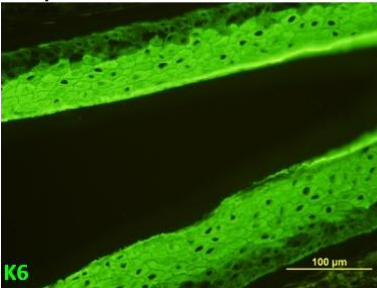


Şekil 4.2. Farklı deri bölgelerine ait kıl foliküllerinde K15 ekspresyonu

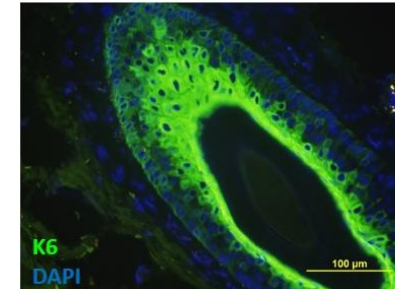
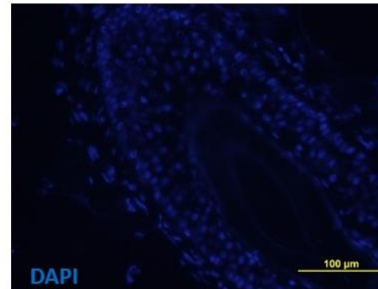
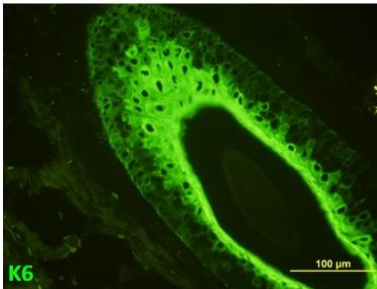
Negatif Kontrol



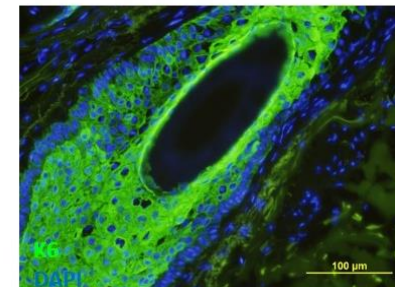
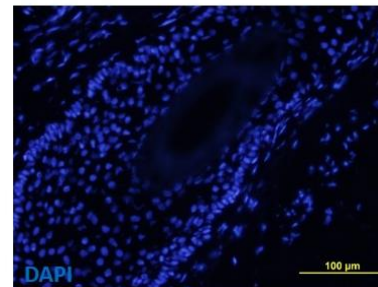
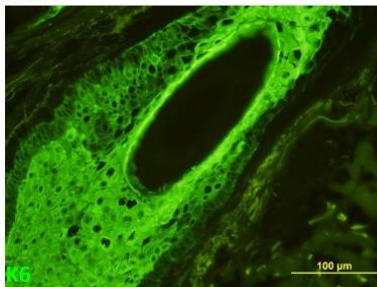
Skalp



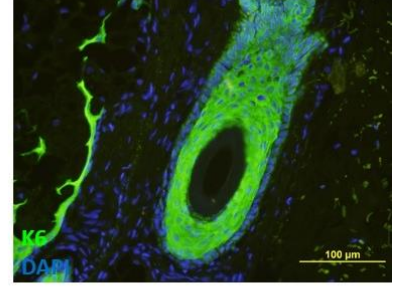
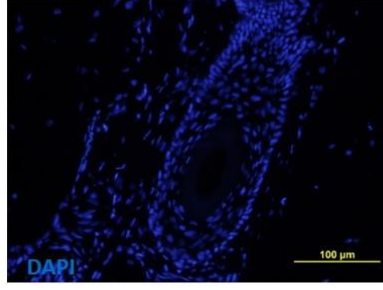
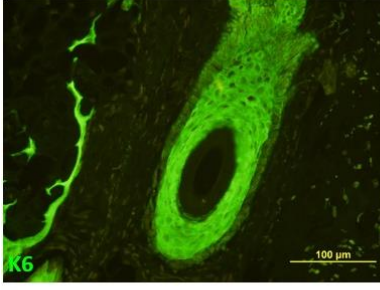
Bacak



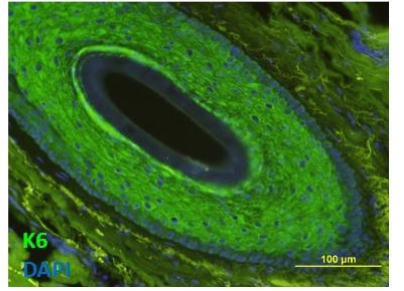
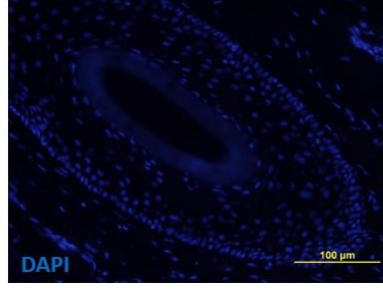
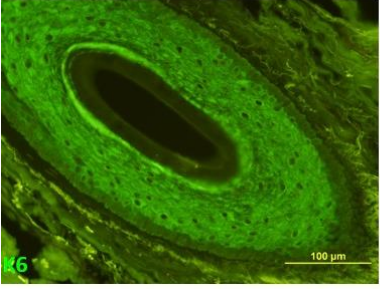
Karin



Bel

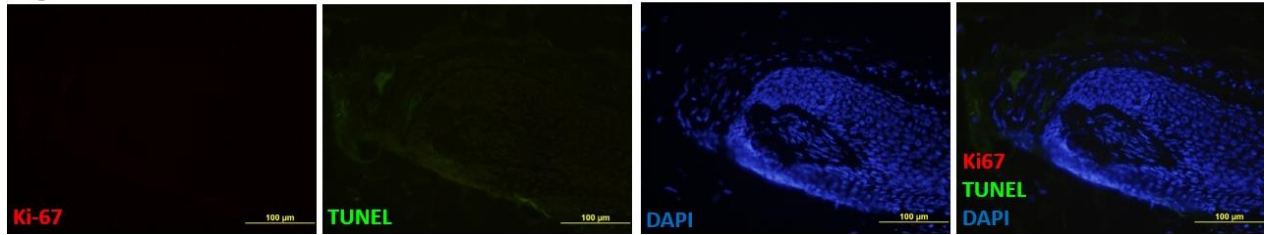


Sirt

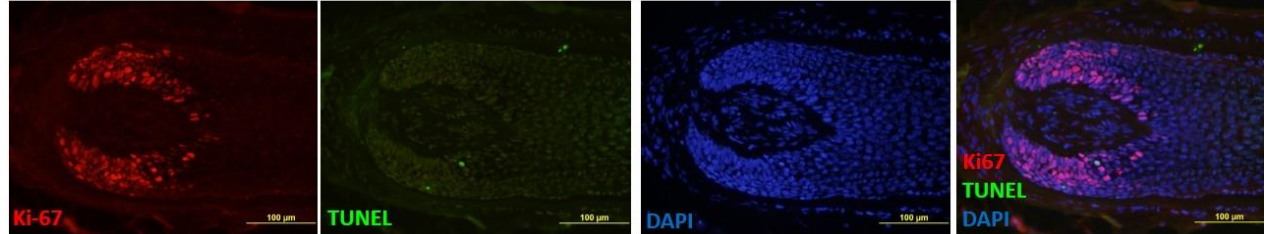


Şekil 4.3. Farklı deri bölgelerine ait kıl foliküllerinde K6 ekspresyonu.

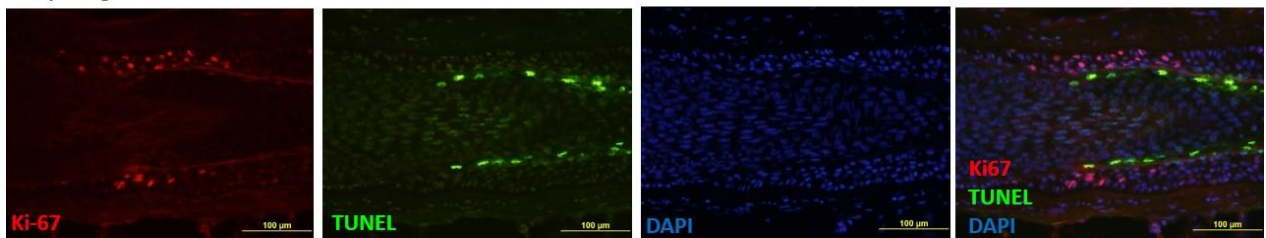
Negatif Kontrol



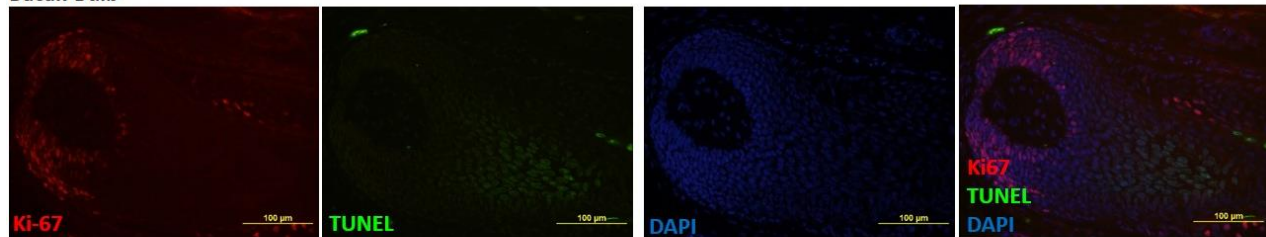
Skalp-Bulb



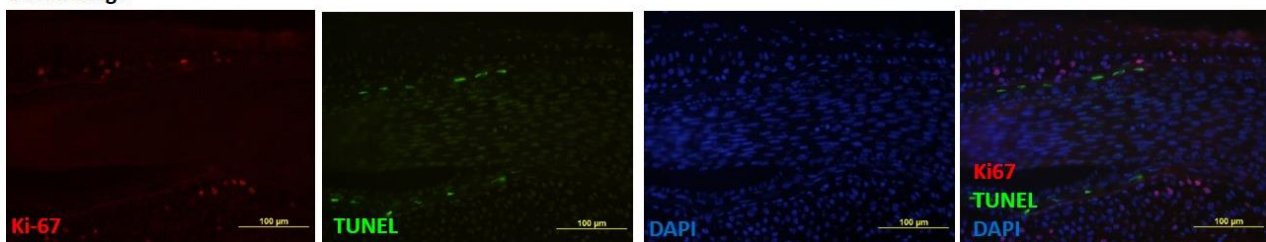
Skalp-Bulge



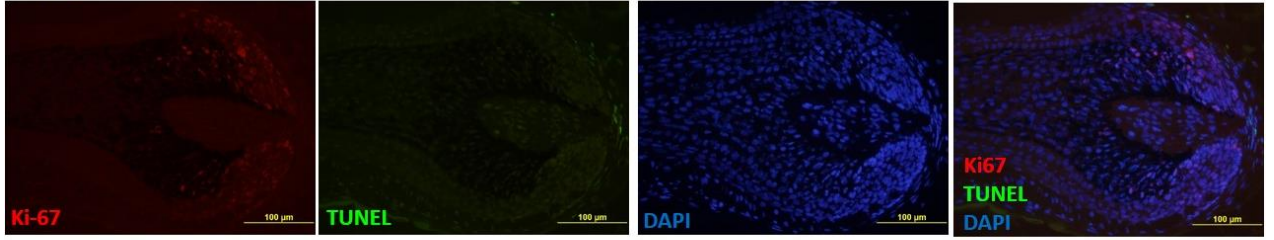
Bacak-Bulb



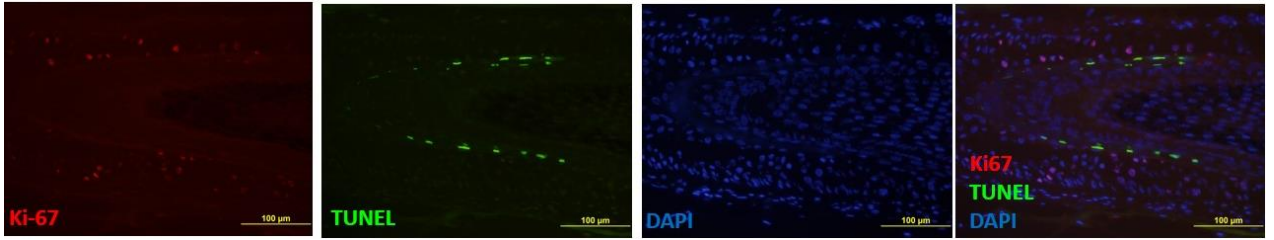
Bacak-Bulge



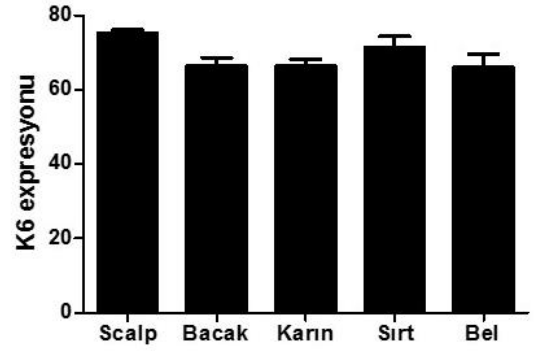
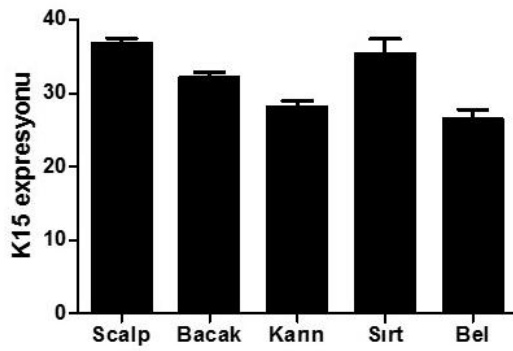
Karin-Bulb



Karin-Bulge



Şekil 4.4. Farklı deri bölgelerine ait kıl foliküllerinde Ki67-TUNEL double immunofluoresan boyaması.



Şekil 4.5. Farklı deri bölgelerine ait kıl foliküllerinde K15, K6 immunoreaktivite yoğunluğunu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deri vücut ile dış ortam arasında bir bariyer olarak bulunan, vücut için çok önemli fonksiyonlara sahip olan bir yapıdır. Deri çevresel etkenlerden koruma, sıcaklık, soğuk, basınç ve mikrobiyal patojenlere karşı koruyucu bir bariyer olarak önemli görevlere sahiptir. Ayrıca termoregulasyon, elektrolit ve su dengesinin korunmasında da gereklidir. Dahası, deri ve ekleri sosyal ve seksüel iletişim, duyu, sekresyon, birçok hormon ve nöropeptidin üretilmesi ve metabolizması içinde gereklidir (26). Memelilerin başlıca özellikleri, bir deri uzantısı olan ve termoregulasyon, fiziksel koruma, duyu ve sosyal etkileşimler gibi görevleri yerine getiren kıla sahip olmalarıdır. Kıl folikülleri, folikülle ilişkili yağ bezi, apokrin ter bezi ve arrector pili kaslarını içeren derinin kompleks bir mini organdır (13). Kıl folikülü siklusları anagen, katagen ve telogen fazlar olarak bilinir. Anagen faz yıllar, katagen faz günler, telogen faz ise aylar sürer ancak bu süreçler vücut bölgelerine ve türe göre değişebilmektedir (27). Bu sayı morfogenez süresince programlanmıştır. Özellikle androjenler olmak üzere hormonlar tarafından yönlendirilmektedir. Kıl siklusu için tamamen fonksiyonel kök hücre populasyonlarının varlığı gereklidir. Anagen fazdaki kıl folikülü olgun kıl folikülüdür ve folikülün 4 bölgeden oluşan anatomik yapısının en belirgin ayırt edilen fazıdır (13). Dış kök kılıfının bulge bölgesinde kıl folikülü kök hücreleri yer almaktadır ve bu alan kıl büyümesinde anahtar role sahiptir. Kıl folikülünün büyüklüğü ve kıl gövdesinin çapı dermal papillanın hacmi ile belirlenir. Hasar görmüş bir dermal papilla, kıl folikülü proksimal bağ dokusundaki kök hücreler tarafından tamamen yenilenebilir (28). Nina ve ark. (29) kıl folikülü yoğunluğu ve boyutunun foliküler penetrasyon ve geçirgenlik süreçlerinin anlaşılması ve hesaplanmasının önemli olduğunu vurguladığı çalışmalarında, farklı vücut bölgelerinde kıl folikülü büyüklüklerindeki çeşitliliği göstermişlerdir. Blume ve ark. alın, yanak, göğüs ve sırt üzerinde vellus tipi kıl folikülü yoğunluğunu göstermişlerdir (30). Seago ve Ebling (31) üst kol üzerine, Pagnoni ve ark. (32) ise yüzün farklı bölgelerinde kıl folikülü yoğunluğunu hesaplamıştır.

Kendini yenileyen bir sistem olarak kıl folikülü ve kıl folikülü bağ dokusu kılıfı, sadece epitelin değil, aynı zamanda melanosit ve mezenşimal kök hücrelerinin de zengin bir kaynağını oluşturur (33-35). İşaretleme metodu kullanılarak kıl folikülü sikluslarında fare ve insan kıl folikülü bulge bölgesinde erişkin epitelyal kıl folikülü kök hücrelerinin lokalizasyonu gösterilmiştir (36). Kök hücrelerin hem embriyonik hem de erişkin kaynaklarda kendi kendilerini yenilemeleri ve farklı çizgilere farklılaşmaları bu hücreleri rejeneratif tıp, doku yenilenmesi ve gen terapisi için cezbedici yapar. Epitelyal kök hücreler, anagen kıl bulb bölgesinde siklik rejenerasyon için bir hücre havuzu olarak görev yapmasının yanı sıra,

hasardan sonra yağ bezi ve epidermisin rejenerasyonunu da sağlarlar (37). Literatürü incelediğimizde, birçok kök hücre markerı veya bulge niş markerları önceden tartışılmıştır (38,39). Kloepper ve ark. epitelyal kıl folikülü kök hücrelerinin keşfinden sonra insan kıl folikülü bulge bölgesinde, faydalı markerların belirlenmesi için gerekli çalışmaların başladığını vurguladıkları çalışmalarında, insan epitelyal kıl folikülü kök hücreleri ve nişleri için faydalı olan markerların immunofenotipini belirlemişlerdir. Çalışmalarında en az 5 farklı bireyden aldıkları kafa derisini ve 11 farklı marker kullanarak standart immunohistokimyasal metodlar ile markerların spesifik immunoreaktivite yoğunluklarını hesaplamışlardır. Bu çalışmada, insan kıl folikülü kök hücrelerinin belirlenmesinde en faydalı markerın K15 olduğu belirlenmiştir (39). Bizde çalışmamızda farklı deri bölgelerinden alınan kıl folikülü kök hücrelerini K15 kullanarak belirledik. Çalışmamızda, farklı deri bölgelerinden alınan kıl foliküllerinin hepsinde K15 pozitif ekspresyon gösteren kıl folikülü kök hücreleri mevcuttu ve pozitif hücreler özellikle de folikülün dış kök kılıfında yer almıştı. Çalışmada K15 immunoreaktivite yoğunluğunun en fazla olduğu grup skalp dokuya ait kıl foliküllerine ait kök hücrelerdi. Önceki çalışmalarda da, K15'in dış kök kılıfının diğer bölgelerine oranla kıl folikülünün bulge bölgesinde up-regule olduğunu ve insan epitelyal kıl folikülü kök hücrelerinin belirlenmesinde faydalı olduğunu göstermişlerdir (40-42). Sitokeratin 19 (K19)'da kıl folikülü kök hücreleri için bir kök hücre markerı olarak belirlenmiştir ancak, K19 dış kök kılıfının farklı hücrelerinde de eksprese olduğundan dolayı faydalı bir marker olarak görülmemektedir (43). Saç kılı keratin moleküllerinin sıkı bağlarla birbirine yapışarak oluşturduğu, çok katmanlı, oldukça karmaşık bir biyolojik yapı gösterir. Saçı oluşturan keratin molekülleri farklı yapılarda ve değişik molekül ağırlıkları olan proteinlerdir. Keratin sitoplazma içinde oluşur ve yapısında sistein, serin ve arginin gibi birçok aminoasit vardır. Bu aminoasitler peptit bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluştururlar. Keratin yapısında yer alan disülfid bağları saç keratininin suda çözünmemesini ve çok stabil bir yapıya sahip olmasını sağlayan en önemli etkenlerdir. Disülfid bağlarının herhangi bir nedenle kopması saçı zayıflatır (44). Kıl ve tırnağın özelleşmiş keratinleri sıkı keratinler ya da trikositler olarak bilinirler. Trikositler özelleşmiş epitelyal hücrelerdir. K6 çoğalan epitel tabakası için bir markerdır (45,46) ve kıl folikülünün özelleşmiş epitelindeki keratinositlerde yoğun olarak eksprese olur. Mevcut çalışmada, farklı deri bölgelerinden alınan kıl folikülü keratinositleri K6 immunofluoresan boyama metodu ile belirlendi. En fazla K6 ekspresyonu skalp dokuya ait kıl foliküllerinde gözlenirken sırt bölgesine ait kıl folikülleri de skalp dokuya yakın bir K6 ekspresyon yoğunluğu gösterdi. Diğer bölgelere ait kıl folikülü kesitlerinde sırt ve skalp bölgedeki ekspresyon yoğunluğuna göre daha az K6 ekspresyon yoğunluğu mevcuttu. Ki67 bir hücre proliferasyon markerıdır ve kıl folikülü

alışmalarında da yaygın olarak kullanılır. Kıl folikülünde bir taraftan yıkılan hücrelerin yerine proliferasyon ile yeni hücreler getirilirken, diğ r taraftan folikülü oluşturan bazı hücrelerde de apoptozis görülür. Mevcut alışmada, Kloepper ve ark. tarafından  nerilen (47) Ki67 ve TUNEL double immunoflouresan boyama protokolü kullanılarak çoğalan ve apoptoza giden hücreler birlikte gösterilmiştir. Kıl folikülü kök hücrelerinin fonksiyonları, moleküler mekanizmaları ve hormonal kontrolleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Yapılan literatür taramasında, terminal kıl foliküllerinin yanı sıra, insan vücudunun farklı bölgelerindeki vellus tipi kıl foliküllerinde, kıl folikülüne özgü markerların ekspresyonu ile ilgili yeterli çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamız, bu hipotezin araştırılmasına yönelik ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Kıl folikülü hücrelerinin özellikleri ve kıl folikülü kök hücreleri araştırmalarında henüz cevaplanmış pek çok soru bulunmaktadır. Örneğın; sa kaybına yol açan klinik durumlar; androjenetik alopesi, alopesi areata ve skatrisyel alopesi bireyler için yıkıcı olabilmekte ve farmasötik endüstrinin milyon dolarlık hedefini oluşturmaktadır. Kıl folikülleri kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahiptir. Bu özelliğini yapısında bulunan epidermal kökenli kıl folikülü kök hücreleri sayesinde gerçekleştirirler. Kök hücre araştırmaları birçok koldan, birçok farklı alanda ve dünyanın en gelişmiş laboratuvarlarında süratle devam etmektedir. Sonuç olarak; kıl folikülüne özgü markerların vellus tipi kıllarda da ekspresyonlarının gösterildiğı bu çalışma ile özellikle de kafa derisine ait kıl foliküllerindeki kök hücrelerin kullanılmasını yanı sıra sırt bölgesine ait kıl folikülü kök hücrelerinin de kök hücre çalışmaları için daha uygun olacağı kanaatindeyiz. Böylece, kıl foliküllerinin ve hücrelerinin yapısal özelliklerini anlamamız, saç kaybı hastalıkları gibi birçok patolojik rahatsızlıklar için yeni tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O: Temel Histoloji, 8. Baskı, Barış Kitapçılık, (1998).
2. Erbeni T. Özel Histoloji. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 1.Baskı, İstanbul (1985).
- 3.Kierszenbaum, A.L. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık (Çeviri Editörü Ramazan Demir), 300–307.
4. Paker Ş.Histoloji, 1. Baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 1990.
5. Erkoçak A. Özel Histoloji, A.Ü. Tıp Fakültesi Basımevi-1982-Ankara
6. Gartner L.P., Hıatt J.L.: Color Textbook of Histology, First Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, (1997).
7. Paus P. Peker S. Biology of hair and nails. Dermatology. London Mosby 2004; 1007-32.
8. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:2745–2749.
9. Schmidt-Ullrich R and Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. Bioessays 2005; 27: 247–261.
10. Carr BR. Disorders of the ovaries and female reproductive tract. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams' Textbook of Endocrinology. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders; SPCK Publishing; 1998. p.751-817.
11. Deplewski D, Rosenfield RL. Role of hormones in pilosebaceous unit development. Endocr Rev 2000;21:363-92.
12. Cotsarelis G and Botchkarev V.A. Biology of hair follicles. In Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine (New York: McGraw Hill) 2008; 739–749.
13. Cotsarelis G. Gene expression profiling gets to the root of human hair follicle stem cells. J Clin Invest 2006; 116: 19–22.
14. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R: The hair follicle as a dynamic miniorgan. Curr Biol 2009;19:132-42.
15. Legue E, Nicolas JF: Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. Development 2005;132:4143-54.
16. Cotsarelis G: Epithelial stem cells: a folliculocentric view. J Invest Dermatol 2006;126:1459-68.
17. Paus R, Foitzik K: In search of the "hair cycle clock": a guided tour. Differentiation 2004; 72:489-511.

18. Pause R, Cotsarelis G. Mechanisms of diseases: Biology of hair follicles. *New Eng J Med* 1999; 341:491-498.
19. Köse O. Epidermal Kök Hücreler. *Dermatose* 2005; 4:176-81.
20. Köse O, Özdoğan S. Epidermal kök hücreler ve klinik kullanımları. *Türkiye Klinikleri J Dermatol* 2010; 20:74-80.
21. Ghadially R. 25 years of epidermal stem cell research. *J Invest Dermatol* 2012;132:797-810.
22. Nemeth K, Karpati S. Identifying the stem cell. *J Invest Dermatol* 2014;134:26.
23. Schepeler T, Page ME, Jensen KB. Heterogeneity and plasticity of epidermal stem cells. *Development* 2014;141:2559-2567.
24. Fuchs E, Horsley. Ferreting out stem cells from their niches. *Nat Cell Biol* 2011;13:513-8.
25. Petrova A, Ilic D, Mc Grath JA. Stem cell therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* 2010;163:1149-56.
26. Rosenthal M, Goldberg D, Aiello A, Larson E, Foxman B. Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol.* 2011;11(5):839-48.
27. Muller-Rover S, Handjiski B, Van DV, Eichmuller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS and Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest Dermatol* 2001;117: 3–15.
28. Forslind B. Structure and function of the hair follicle. In: Camacho FM, Randall VA, Price VH, editors. *Hair and its disorders. Biology, pathology and management.* 1st ed. London, Martin Dunitz Ltd 2000; 3-15.
29. Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W. and Jurgen Lademann. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites *J Invest Dermatol* 2004; 122:14 –19.
30. Blume U, Ferracin J, Verschoore M, Czernielewski JM, Schaefer H. Physiology of the vellus hair follicle. Hair growth and sebum excretion. *Br J Dermatol* 1991; 124: 21–28.
31. Seago SV, Ebling FJ. The hair cycle on the human thigh and upper arm. *Br J Dermatol* 1995; 135:9–16.
32. Pagnoni AP, Kligman AM, Gammal SEL, Stoudemayer T. Determination of density of follicles on various regions of the face by cyanoacrylate biopsy. Correlation with sebum output. *Br J Dermatol* 1994; 131:862–865.
33. Fuchs E. Skin stem cells, rising to the surface. *J. Cell Biol* 2008; 180: 273–284.

34. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y and Nishikawa S. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002; 416: 854–860.
35. Tiede S, Kloepper J E, Bodo E, Tiwari S, Kruse C, Paus R. Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur J Cell Biol* 2007; 86: 355–376.
36. Cotsarelis G, Sun TT and Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir carcinogenesis. *Cell* 1990; 61: 1329–1337.
37. Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA and Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 411–417. 9. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L and Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004, 118: 635–648.
38. Tiede S, Kloepper JE, Whiting DA, Paus R. The ‘follicular trochanter’: an epithelial compartment of the human hair follicle bulge region in need of further characterization. *Br J Dermatol* 2007; 157: 1013–1016.
39. Kloepper JE, Tiede S, Brinckmann J, Reinhardt DP, Meyer W, Faessler R, et al. Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. *Exp Dermatol* 2008; 17:592-609.
40. Ohyama M, Terunuma A, Tock C L et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest* 2006; 116: 249–260.
41. Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM and Tennant RW. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J. Invest. Dermatol* 2003; 120: 501–511.
42. Liu Y, Lyle S, Yang Z, Cotsarelis G. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 963–968.
43. Waters JM, Richardson GD, Jahoda CAB. Hair follicle stem cells. *Seminars in cell& Developmental Biology* 2007; 18: 245-254.
44. Ukşal Ü. Normal saçın yapısı ve bakımı. *Türkiye Klinikleri. Kozmetoloji* 2004; 5:47-49. 45. Wojcik SM, Bundman DS and Roop DR. Delayed wound healing in keratin 6a knockout mice. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5248-5255.
46. Wei XJ, Jiang DY, Zong XL, Fu XB, Sheng ZY, Wang W, Shan F. The correlation of the fetal cytokeratin expressing in epidermal cells and the different outcomes of wound repairing. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2009 Aug 15;47(16):1245-8.

47. Kloepper JE, Sugawara K, Al-Nuaimi Y, Ga'spa'r E, Beek N and Paus R. Methods in hair research: how to objectively distinguish between anagen and catagen in human hair follicle organ culture. *Experimental Dermatology* 2010; 19: 305–312.