T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE DENEYSEL DİYABETİK RATLARDA MİDKİN'İN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burak DİK

DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Ahmet Levent BAŞ

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE DENEYSEL DİYABETİK RATLARDA MİDKİN'İN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burak DİK

DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

1.Danışman
Prof.Dr. Ahmet Levent BAŞ
2.Danışman
Doç.Dr. Nuray YAZIHAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12102003 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Günümüzde canlılar için yaralanmalar oldukça önem arz eden bir durumdur. Yaralanmış deri bölgesinin fizyolojik olarak eski fonksiyonlarını kazanması, estetik bozukluklar oluşmadan yaranın mümkün olduğunca hızlı bir şekilde kapanması klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Tüm yaralarda olduğu gibi diyabetiklerde oluşan yaraların iyileşme sürecinin kısaltılması oldukça önemlidir. Özellikle diyabetiklerde oluşan yaralara yeni bir tedavi stratejisinin geliştirilmesinin amaçlanması bu çalışmaya ayrı bir değer katmaktadır.

Bu çalışmada midkin uygulaması ile yaranın normale en yakın ve en hızlı şekilde kapanması amaçlandı. Bu amaçlar doğrultusunda sağlıklılarda istenilen hedefe ulaşıldı. Ancak diyabetiklerde diyabetin multifonksiyonel bir hastalık olması midkinin tek başına yeterli olmadığını gösterdi.

Bu çalışmanın yapılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr. Ahmet Levent BAŞ'a, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ, Prof.Dr. Halis OĞUZ, Prof.Dr. Muammer ELMAS, Prof.Dr. Enver YAZAR, Doç.Dr. Kamil ÜNEY, Uzm.Dr. Ayşe ER ve Arş.Gör. Orhan ÇORUM'a, 2. tez danışmanım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr. Nuray YAZIHAN'a, Selçuk Üniversitesi Sarayönü Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Meltem Demirel KARS'a ve uygulama sırasındaki emek ve ilgilerinden dolayı sevgili eşim Arş.Gör.Irmak DİK'e, babam Prof.Dr. Bilal DİK'e, annem Şerife DİK'e ve kardeşim Orkun DİK'e teşekkür ederim.

Tez projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv
1. GİRİŞ 1
1.1. Deri 2
1.2. Yara ve yara iyileşmesi 3
1.2.1. Yarada büyüme faktörleri ve oksidatif stres 7
1.2.2. Yara iyileşme evreleri 11
1.3. Diyabetik yaralar 18
1.4. Midkin 23
2. GEREÇ VE YÖNTEM 28
2.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler 28
2.2. Kimyasal maddeler, solüsyonlar ve kitler 28
2.3. Hayvan materyali 28
2.4. Streptozosinin (STZ) uygulamaya hazır hale getirilmesi 29
2.5. Midkinin uygulamaya hazır hale getirilmesi 29
2.6. Deneysel diyabet oluşturulması 30
2.7. Ratlarda glikoz seviyelerinin belirlenmesi ve deney grubuna alınması 30
2.8. Deney gruplarının oluşturulması 30
2.9. Sağlıklı ve deneysel diyabetli ratlarda yara oluşturulması 31
2.10. Sağlıklı ve deneysel diyabetli ratlarda yara bölgesine serum fizyolojik ve midkin uygulanması 31
2.11. Deney gruplarındaki ratlardan deri materyalinin toplanması 31
2.12. Deri materyalinin ELISA kitleri için hazırlanması 32
2.13. İstatistik analizleri 32
3. BULGULAR 33
4. TARTIŞMA 40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 63
6. KAYNAKLAR 65
7. EKLER 71
EK A:Etik Kurul Kararları 71
EK B:Tezden üretilmiş yayınlar 73
8. ÖZGEÇMİŞ 74

SİMGELER VE KISALTMALAR

ECM : Ekstraselüler matriks

EGF : Endotelyal büyüme faktörü

FGF : Fibroblast büyüme faktörü

IGF : İnsülin büyüme faktörü

IL : İnterlöykin

JAK : Janus kinaz

LDL : Düşük dansiteli lipoprotein

LRP : LDL ilişkili reseptör protein

MMP : Matriks metalloproteinaz

PDGF : Trombosit bağlı büyüme faktörü

RTP : Reseptör benzeri tirozin fosfataz

STAT : Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatör

STZ : Streptozotosin

TBARS : Tiobarbütürik asit reaktif ürünleri

TGF-β : Transforme edici büyüme faktörü

TNF-α : Tümör nekrozis faktör-α

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sağlıklı ve Deneysel Diyabetik Ratlarda Midkin'in Yara İyileşmesi Üzerine Etkinliğinin Değerlendirilmesi

BURAK DİK

Farmakoloji-Toksikoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA–2015

Midkin, farklı dokularda onarımı ve yeni hücrelerin gelişimini kontrol altında tutmakta, inflamasyonun onarılmasında ve giderilmesinde önemli rol oynamaktadır. Mevcut araştırmada maddi kayıplı yara oluşturulan sağlıklı ve diyabetik ratlarda midkin uygulamasının yara iyileşmesi üzerindeki etkinliği araştırıldı. 108 adet Wistar Albino erkek ratların 6 adeti sağlıklı ve 6 adeti diyabetli grup için pozitif kontrol zamanı olarak ayrıldıktan sonra, kalanı 4 gruba ayrıldı; sağlık kontrol, sağlık+midkin (10 ng/kg, SC, gün aşırı), diyabet kontrol (STZ, 40 mg/kg, SC) ve diyabet+midkin (10 ng/kg, SC, gün aşırı). Her gruptan 6 şar hayvan yara oluşturulduktan sonraki 3., 7., 14. ve 28. günlerde ötenazi edilerek, yara bölgesinden deri örneği alınarak homojize edildi. Homojenattan Matrix Metalloproteinase 8 (MMP-8), Transforming Growth Factor Beta (TGF-β), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ve Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) düzeyleri ölçüldü ve yara iyileşmesi görsel olarak değerlendirildi. Gruplarda MMP-8 ile PDGF düzeylerinin bütün gruplarda dalgalı seyir izlediği, diyabetli grupta TGF-β'nın dalgalı seyir izlendiği ancak sağlıklı+midkin grubu 28. günde değerinin bütün gruplardan yüksek ($p<0.05$) olduğu, VEGF seviyesinin 7. günde sağlıklı+midkin grubunda bütün gruplardan yüksek ($p<0.05$) olduğu ve TBARS düzeyinin sağlıklı (kontrol) grupta ve diyabet ile diyabet+midkin grubunda düştüğü belirlendi ($p<0.05$). Yara bölgesinin makroskobik gözleminde ise midkin uygulanan gruplarda yara iyileşmesinin daha iyi ve daha hızlı olduğu gözlendi. Literatür taramalarında midkinin oksidatif durum üzerine ve büyüme faktörleri üzerine etkileri olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak midkin uygulamasının yara iyileşmesini hızlandırdığı, yara bölgesi büyüme faktörleri ve oksidatif durumu üzerine etkili olduğu ifade edilebilir.

Anahtar Sözcükler : Diyabet; midkin; yara iyileşmesi.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Determination of Effects of Midkine on Wound Healing of Experimental Diabetic and Healthy Rats

BURAK DİK

Department of Pharmacology and Toxicology (VET)

PhD THESIS / KONYA-2015

Midkine plays a role in the control of tissue repairing and development of new tissue, and it is an important agent in the regulation of inflammation. In the present study, effect of midkine was investigated in the experimental wound healing of rats. 12 Wistar Albino rats are divided two groups as 6 healthy and 6 diabetic positive controls. Remaining 96 rats are divided four groups; healthy group, healhty+midkine group (10 ng/kg, SC, every other day), diabetic group (STZ, 40 mg/kg, SC) and diabetic+midkine group (10 ng/kg, SC, every other day). After 6 rats from per groups were created wound, they were euthanized on 3., 7., 14. and 28. days and their wound skin were removed. The skin samples were homogenized and levels of Matrix Metalloproteinase 8 (MMP-8), Transforming Growth Factor Beta (TGF-β), Platelet Derived Growth Factor (PGDF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) were measured. Additionally, the wound skins were evaluated macroscopically. Levels of MMP-8 and PDGF fluctuated in all groups and levels of TGF-β also fluctuated only in diabetic groups, whereas TGF-β levels were higher than any other groups on 28^{th} days in healhty+midkine group ($p<0.05$). Levels of VEGF were higher than any other groups on 7^{th} days in healhty+midkine group ($p<0.05$). Levels of TBARS decreased in healthy, diabetic and diabetic+midkine groups ($p<0.05$). Macroscopically, the wounds in the midkine groups healed better and fastly compared to the other groups. In literatures, the effects of midkine on oxidative stress and growth factors were reported. In conclusion, it may be stated that midkine accelerates to wound healing and influences the growth factors and oxidative status in wound tissues.

Key Words: Diabet; midkine; wound healing.

1.GİRİŞ

Deri canlı vücudunda çok önemli bir yer tutmaktadır. Canlıdan canlıya bazı farklar göstermekle beraber genel olarak; solunum, terleme, ısı ve sıvı-elektrolit dengenin düzenlenmesi, vücudun dış ortama karşı fiziksel olarak korunmasını sağlamaktadır.

Dünyada eksojen ve endojen kaynaklı yaralanma oranları oldukça ciddi düzeylerdedir. Basit bir çizik, kesici, delici alet yaralanmaları ya da ileri derece yanıklara kadar çok çeşitli yaralanmalar bulunmaktadır. Bunlara ilave olarak diyabet gibi kronik hastalıklara bağlı yaralar da oluşabilmekte tedavileri ise oldukça zahmetli ve uzun süreli olmaktadır. Sağlıklı ve diyabetli canlılarda çoğu zaman yaralar normal deri ile aynı niteliklere ve niceliklere sahip olarak iyileşememektedir. Aşırı skar üremesi ya da yetersiz yara iyileşmesi hem görünüm anlamında hem de derinin fiziksel, kimyasal ve endokrinolojik fonksiyonlarını sağlaması anlamında tam olarak işlevini yerine getirememektedir. Günümüzde yaraların tam anlamı ile iyileştirilmesi, yaralanmış deri bölgesinin tam olarak eski şeklini almasını sağlayacak bir madde bulunmamaktadır. Özellikle diyabetlilerde bu durum daha ciddi bir hal almaktadır. Sağlıklılarda ise ileri derece yaralanmalarda deri geç iyileşebilmekte ve yara bölgesinde iz kalmakta, derinin koruyucu, fizyolojik özelliklerinin çoğu kaybedilmektedir. Ayrıca vücutta estetik kusurlar oluşmaktadır. Bu gibi nedenlerden derinin iyileşmesi, eski şeklini alabilmesi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi tıbbi anlamda önem arz etmektedir.

Midkin; anjiogenezis, inflamatuar hücre migrasyonu ve yeni endotel oluşumu gibi fizyolojik özellikleri bulunan endojen sentezlenen bir sitokindir. Özellikle tümör oluşumlarında salınımı artan, tümörün canlılığını ve metastazını sağlayan önemli bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Fakat tümördeki istenilmeyen özelliklerinin yarada istenilen bir durum haline gelmesi, midkinin eksojen olarak uygulanmasının yarada yeni ve yararlı bir tedavi yaklaşımı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, klinik olarak sağlıklı ve deneysel diyabetik Wistar Albino ırkı ratlarda midkinin 10 ng/kg dozunda günaşırı subkutan uygulamasının, bazı büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

1.1.Deri

Vücudun en büyük organı deridir. Deri, 70 kilogram ağırlığındaki bir insanda yaklaşık 1,8 m^2 yüzey alanı kaplar (WHO 2006). Derinin temel fonksiyonu; çevresel etmenlere, toksik maddelere, endojen sıvı ve besinlerin kaybına karşı canlıyı korumaktır (Singer ve ark 1999, WHO 2006). Deri, terleme ve termoregülasyon ile beden ısısının korunmasında da önemli rol oynar. Ayrıca yaralanma ve yanık gibi olaylarda deri turnoveri ile kendini otomatik olarak onarmakta ve bu mekanizma sitokin salınımı ile daha da hızlanmaktadır (WHO 2006).

Deri temel olarak iki büyük bölüme ayrılır. En dıştaki katman epidermis, mesodermden köken alan daha alt katman ise dermis olarak tanımlanır (WHO 2006). Epidermis keratinize bir tabakadan, dermis ise epidermisi besleyen, kollajenden zengin kalın bir tabakadan oluşur (Martin 1997).

Epidermis dıştan içe stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum ve bazal tabaka (stratum germinativum) olarak 5 temel bölüme ayrılır. Epidermisde en yoğun bulunan hücre tipi keratinositlerdir (WHO 2006).

Stratum corneum bazal tabaka ile karşılaştırıldığında, stratum corneum yaklaşık %5-20 düzeyinde sıvı içerirken, fizyolojik olarak aktif olan bazal tabaka yaklaşık %70 sıvı içermektedir (WHO 2006). Stratum corneum tabakasındaki keratinositlerin temel görevi, canlıyı yabancı cisimler, mikroorganizmalar ve dehidrasyona karşı korumaktır (Wiegand ve Hipler 2008).

Dermis, damarsız olan epidermise besin desteği sağlayan bir katmandır, gerilme-esneme fonksiyonları ile enfeksiyon etkenlerine karşı bariyer görevi üstlenir ve su deposu olarak işlev görür. Dermis, yaklaşık 2-3 mm kalınlığındadır ve yapısında fibröz protein matriks, kollajen ve elastin içerir. Ayrıca kan damarları, duyu sinirleri (basınç, sıcaklık ve ağrı), lenf damarları, ter bezleri ve pilosebasöz üniteler içermektedir (WHO 2006).

İnsan derisinin 1 cm^2 alanında ortalama 40-70 kıl folikülü, 200-250 ter kanalı bulunur. Derinin dış yüzeyi asidik bir niteliğe sahiptir (pH 5) (WHO 2006).

1.2. Yara ve yara iyileşmesi

Yara, vücuttaki doku ve organların bütünlüğünün bozulması anlamına gelmektedir (Ekmekçi ve Bostancı 2002). Başka bir ifade ile yumuşak dokuların normal fonksiyonları ve anatomik yapısının bozulması yara olarak tanımlanmaktadır (Karasu ve Bakır 2008).

Yara iyileşmesi, anatomik bütünlüğün bozulması ile başlayıp, yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal bir olaydır. Dokunun hasar görmesini takiben önce kanamanın durdurulması, sonra enfeksiyonun önlenmesi ve bozulan anatomik bütünlüğün onarılması ile gerçekleşir (Diegelmann ve Evans 2004, Karasu ve Bakır 2008).

Yara iyileşmesi, yaralanan dokunun kendi hücreleriyle gerçekleşiyorsa rejenerasyon, bağ dokusu ile gerçekleşiyorsa reperasyon adını alır. Yara iyileşmesi, epitelin rejenerasyonu ve kontraksiyonu ile başlar, yeni kollajen sentezi doku bütünlüğünün sağlanmasıyla tamamlanır (Şenol 1995).

Bu iyileşme sürecinde çeşitli mediatörler (büyüme faktörleri, kemotaktik faktörler, vazoaktif aminler), parankimal hücreler (fibroblastlar, makrofajlar, keratinositler, endotel hücreleri), ekstraselüler matriks elemanları (kollajen, elastin, glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar) ve kanın şekilli elemanları (trombositler, nötrofiller, monositler) görev yapmaktadır (Şenol 1995, Clark 2001, Diegelmann ve Evans 2004). Pıhtılaşma tamamlandıktan sonra yara bölgesinde aktive olan trombositlerin indirekt etkisine bağlı olarak vazodilatasyon şekillenir ve kan doku aralığına sızmaya başlar (Mutsaers ve ark 1997, Li ve ark 2007). Lenfatik drenajın bloke olması sonucu inflamasyon şekillenmektedir (Li ve ark 2007). Daha sonra yara bölgesine gelen nötrofil ve trombositler tarafından sentezlenen, sitokin ve büyüme faktörleri, yeni damar oluşumları için anahtar rol oynamaktadırlar (Diegelmann ve Evans 2004).

Tam kat deri yaralanmaları tüm deri katmanlarını (dermis ve epidermis) kapsamaktadır. Epidermis damarsız yapıya sahip olduğu için epitelizasyon ile iyileşmektedir. Dermis ise kollajen sentezi ve granülasyon dokusunun oluşumu ile iyileşir (Karasu ve Bakır 2008). Sadece epidermisi etkileyen yaralanmalarda

epidermal rejenerasyon, keratinositlerin yara yüzeyinde çoğalmasıyla oluşur (Şenol 1995).

Açık yaraların yüzeyi tek tabaka ile keratinositler tarafından kaplandıktan sonra altta kalan bazal lamina ve epidermis, keratinosit katının altından yara boşluğunu doldurmak için uzar ve çoğalırlar (Martin 1997). Aynı zamanda açık yaranın kapanabilmesi için yara dudaklarının kontraksiyonu gereklidir. Bu kontraksiyonu da granülasyon dokusunun yara dudaklarını merkeze doğru çekmesi sağlar (Bayındır 2007, Karasu ve Bakır 2008). Yara kontraksiyonu yaranın oluşumundan sonraki yaklaşık 5.-15. günlerde maksimuma ulaşır (Karasu ve Bakır 2008). Bu safhada fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşerek yara bölgesindeki kasların kasılmasını sağlar. Bu kasılmayı transforme edici büyüme faktörü β (TGF-β) ve dışarıdan gelen mekanik uyarılar başlatmaktadır (Martin 1997).

Dermis ve epidermisi içine alan doku kayıplarında epitelizasyon yara kenarlarından başlar (Şenol 1995). Yaralanmayı takiben yapısı bozulan kan damarlarından trombositler yara bölgesine sızar ve bu bölgede kollajenlerle birleşerek pıhtı oluştururlar. Pıhtı ile birlikte bölgede fibrin ağları oluşur (Clark 2001, Ekmekçi ve Bostancı 2002, Diegelmann ve Evans 2004). Daha sonra sırasıyla hemoztasis sağlanmakta, hücrelerin yapışmasında görevli fibronektin ve fibrinojen ile birlikte geçici bir matriks oluşturulmakta ve yara bölgesine en yakın bölgelerden hücre ve fibroblastların göçü gerçekleşmektedir (Mutsaers ve ark 1997, Verderio ve ark 2004).

Mast hücreleri de yara iyileşmesinde önemli hücrelerdir. Mast hücreleri enzim, histamin ve diğer aktif aminler ile dolu granüller salgılarlar. Bu mediatörler yara çevresindeki inflamasyonu sağlamaktadırlar. Bunu da yara çevresindeki sağlam kan damarlarından mononükleer hücrelerin sızmasını sağlayarak gerçekleştirirler. Aynı zamanda yara kenarlarındaki kan damarlarındaki sızıntı ile inflamasyonun temel belirteçleri olan, kızarıklık (rubor), sıcaklık (calor), şişlik (tumor) ve ağrı (dolor) oluşmaktadır (Digelmann ve Evans 2004).

Epitelizasyon, yaralanmadan sonra derinin dış ortama karşı koruyucu özelliğini yeniden kazandırmak amacıyla epitelyum hücrelerinin göç etmesini, çoğalmasını ve keratinize olmasını sağlayan bir süreçtir. Yaralanmalardan sonra

oluşan pıhtı epitelizasyon için geçici bir engel oluşturmaktadır. Fibronektinin etkisiyle epitelyum hücreleri yara tabanına doğru hareket eder (Karasu ve Bakır 2008). Bu olaylar ve bu tip hücreler, sitokinler ve büyüme faktörleri için reservuar sağlamaktadırlar. Çünkü sitokinler ve büyüme faktörlerinin bazıları bu bölgedeki trombositlerden salınmaktadırlar (Martin 1997, Diegelmann ve Evans 2004).

Yaralanmadan birkaç saat sonra re-epitelizasyon başlar. Ekstraselüler matriksin bozulması ile epidermal hücreler fibrinojene bağlanarak ve kollajenaz salgılayarak, dermis ve fibrin eskarı arasına göç eder (Singer ve ark 1999, Clark 2001). Epidermal hücrelerin plazminojen aktivatör üretmesi ile plazmin aktifleştirilir. Plazminojen aktivatör matriks metalloproteinaz gibi kollajenazları aktifleştirerek kollajen ve fibrinden oluşan geçici ekstraselüler matriks bariyerinin yıkılmasına neden olur (Martin 1997, Singer ve ark 1999). Epidermis fibrinojen, fibronektin ve tip I kollajenden oluşan matriks üzerine kurulmaya başlar (Clark 2001). Yaralanmadan 1-2 gün sonra yara dudaklarındaki epidermal hücreler çoğalmaya başlar. Büyüme faktörlerinin salınımı ve reseptörlerinin ekspresyonunun artması bu sistemi uyarır (Singer ve ark 1999). Bu evrede fibrin ve fibronektin yara çevresinde görülmeye başlar. Yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra yara bölgesi granulasyon dokusu adı verilen yeni bir doku ile kaplanmaya başlar. Bu dokunun oluşumunda çok sayıda damarlaşma, makrofaj ve fibroblast vardır. Buradaki makrofajlar anjiogenezisi stimüle eden ve fibroplaziyi sağlayan büyüme faktörlerine kaynaklık ederler. Fibroblastlar da kan damarlarının oluşturulmasında ve ekstraselüler matriks için gerekli hücre özelliğini sağlarlar (Singer ve ark 1999, Clark 2001).

Derinin yara iyileşmesinde ve dış ortama karşı bariyer olarak görev yapmasında fibroblastlar ve keratinositlerin önemli bir yeri mevcuttur. Fibroblastlar dermisde yerleşmiştir. Fibroblastların temel fonksiyonları; ekstraselüler matriksi oluşturan temel makromoleküllerin (kollajen, glikozamin ve glikoproteinler) salgılanmasına neden olmalarıdır. Doku hasarı durumunda fibroblastların salınması sitokinlerinde salınımına neden olmaktadır. Keratinositlerde fibroblastlara benzer şekilde immun cevap oluşumunda, sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılaması ile yara iyileşmesine önemli katkılar sağlamaktadır (Wiegand ve Hipler 2008).

Yaralanmadan sonra oluşan kollajen matriks, yara bölgesini tamamen doldurur. Daha sonra fibroblastlar kollajen sentezini durdurarak fibroblasttan zengin

granülasyon dokusunu oluşturur. Ancak bu döngüdeki herhangi bir bozukluk keloid ve skleroderma gibi bozukluklara yol açar. Kollajen matriksten granulasyon dokusuna geçerken, kollajenin az miktarda yıkımlanması ya da sentezinin devam etmesi aşırı skar oluşumuna neden olur (Singer ve ark 1999). Aynı zamanda fibroblastların apoptozisindeki artış ve büyüme faktörlerinin desensitizasyonu yara kapanmasının durmasına neden olmaktadır (Martin 1997).

Özetle yara iyileşmesinde ilk 48 saat içinde yapılacak farmakolojik tedavi önemli yer tutmaktadır. Ayrıca bu tedavi yara iyileşmesi tamamlanana kadar devam etmelidir (Ferguson ve Kane 2004).

Trombosit bağlı büyüme faktörü (PDGF) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF)-β da sağlam dokudaki fibroblastları stimüle ederek fibroblastların bu bölgeye göçünü artırmakta ve yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Singer ve ark 1999, Clark 2001). PDGF nötrofiller, makrofajlar ve kas hücrelerinin kemotaksisini başlatmaktadır (Diegelmann ve Evans 2004). TGF-β ise makrofajların bu bölgeye gelmesini ve fibroblast büyüme faktörü (FGF), TNF-α ve IL-1 gibi sitokinlerin sentezini stimüle etmektedir. Bunun yanında kollajen ve kollajenazın ekspresyonunu modüle eder. Bu sistemin düzgün işlemesi sonucu sağlam ve nitelikli bir yara iyileşmesi gerçekleşmektedir (Diegelmann ve Evans 2004).

Sonuç olarak fibroblastlar ekstraselüler matriksin yetersiz ya da aşırı sentezinden sorumlu olabilirler. Bu aşamada yeni ekstraselüler matriks oluşurken proteolitik sisteminde önemi bulunmaktadır. Bu sistem sayesinde o bölgedeki eski hücreler temizlenerek yeni hücrelerin o bölgeye migrasyonu sağlanır (Singer ve ark 1999).

İyileşmenin 2. haftasında miyofibroblastlar hücrenin plazma membranının sitoplazmik yüzü hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantıları arasında yoğun aktin içeren mikrofilamentler oluştururlar. Yara dudaklarının bu bağlar ile kontraksiyonu TGF-β ve PDGF ile stimule edilir (Singer ve ark 1999). Miyofibroblastlar yaraya yapısal destek oluşturarak iyileşme için zemin oluştururlar (Mutsaers ve ark 1997).

Yarada enfeksiyon bulunmuyorsa yaklaşık 3. günden sonra nötrofillerin sayısı azalmaya başlayarak yerlerini makrofajlara bırakır (Şenol 1995, Ekmekçi ve Bostancı 2002, Karasu ve Bakır 2008). Makrofajlar kan dolaşımından sızarak yara

bölgesinde toplanır. Yara bölgesinde toplanmaları herhangi bir şekilde engellenirse ya da yara bölgesinde yeterli sayı sağlanamazsa yara iyileşmesi bozulmaktadır (Mutsaers ve ark 1997, Diegelmann ve Evans 2004). Makrofajlar, büyüme faktörleri ve kemoatraktan moleküllere depo görevi yapmaktadırlar. Salgıladıkları bu moleküller, yara bölgesi çevresindeki endotelyal hücreler için mitojenik ve kemotaktiktirler (Mutsaers ve ark 1997). Yara bölgesine gelen makrofajlar IL-1 ve TNF-α salınımı ile inflamasyonu devam ettirirler. Makrofajlar, keratinositler ve fibroblastlar tarafından salgılanan metalloproteinazlar ile hasarlı ekstrasellüler matriks yıkımlanır (Ekmekçi ve Bostancı 2002, Karasu ve Bakır 2008). Makrofajlar yara iyileşmesinin en önemli inflamatuar hücrelerdendir. Anjiogenezis ve fibrogenezisin stimulasyonu sağlayan büyüme faktörlerinin üretiminde, aşırı skar oluşumunun engellenmesi ve kronik yaraların iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Koh ve Dipietro 2011).

Yara iyileşmesindeki gelişen reaksiyonlar özetlenecek olursa, dokunun yaralanmasından hemen sonra fibrin birikimi ve pıhtılaşma meydana gelir (Diegelmann ve Evans 2004). Nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin bölgeye gelmesi ile inflamasyon başlar (Boyce ve ark 2001, Diegelmann ve Evans 2004). Daha sonra bölgeye fibroblastların gelmesi ve doku onarımı için gerekli olan fibroblastlardan kollajen salınımı ile ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi gerçekleşir (Clark ve ark 1997, Diegelmann ve Evans 2004). Son olarak kollajen ağı ve skar olgunlaşması ile yaranın iyileşmesi tamamlanmış olur (Diegelmann ve Evans 2004). Ancak diyabet gibi patolojik durumlarda makrofaj infiltrasyonunun, hücre proliferasyonunun (Galeno ve ark 2001) ve angiogenezisin geciktiği belirtilmiştir (Altavilla ve ark 2001).

1.2.1. Yarada büyüme faktörleri ve oksidatif stres

Yara iyileşmesi karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler önemli görevler almakta ve iletişim sinyallerini sağlamaktadır. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), PDGF, TGF-β ailesi ve matriks metolloproteinazlar (MMP) yara iyleşmesinde önemli olan büyüme faktörleridir. TGF-β, PDGF, EGF, VEGF yara bölgesindeki trombositlerden salınarak yara bölgesinde etkin rol oynarlar. Bu büyüme faktörleri yeni ekstraselüler matriksin oluşumunda görev almaktadırlar (Barrientos ve ark 2008).

Organizmada yara bölgesindeki hücreler arası iletişimi büyüme faktörleri ve sitokinler sağlamaktadır. Büyüme faktörleri, hücre proliferasyonunu uyarmakta ve iyileşme üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Kemotaktik etkileri sayesinde inflamatuar hücrelerin ve fibroblastların yara bölgesine gelmelerini, anjiogenezisi ve ekstraselüler matriks oluşumunu sağlamaktadırlar (Ekmekçi ve Bostancı 2002).

EGF; trombosit, makrofaj ve fibroblastlardan salınarak epidermisin oluşumunda görev alır. VEGF; endotel hücreleri, keratinositler, fibroblastlar, trombositler, nötrofiller ve makrofajlardan üretilmektedir. Endotelyal hücre migrasyonu ve proliferasyonunu ile anjiogenezisi sağlamaktadır. PDGF; trombosit, makrofaj, vasküler endotelyum, fibroblast ve keratinositlerden salınarak, yara bölgesinde nötrofiller, makrofaj, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinin mitojenezis ve kemotaksisini uyarır. TGF-β gibi büyüme faktörlerinin makrofajlardan sentezlenmesi ve üretimini stimule eder (Barrientos ve ark 2008). TGF-β'nın yardımıyla kollajen matriksin, ekstraselüler matriksle yer değiştirerek yara bölgesinin normal doku haline gelmesini sağlar (Singer ve ark 1999). TGF-β ilk olarak insan trombositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraları TGF-β'nın, trombosit, makrofaj, fibroblastlar ve keratinositlerden salındığı ve inflamasyon, anjiogenezis, reepitelizasyon ve bağ doku oluşumunda görevli olduğu bildirilmiştir (Tokgöz 1997, Barrientos ve ark 2008).

EGF uygulanmış tam kat yaralarda kollajen birikimi ve gerilme kuvvetinin arttığı belirtilmiştir. Ayrıca EGF'nin epidermal rejenerasyon oranını hızlandırdığı bildirilmiştir (Mutsaers ve ark 1997).

Şimşek ve ark (1998), deney hayvanlarında yapılan çalışmada topikal olarak biyoadhesif jel ile birlikte EGF uygulanan grupta yara iyileşmesinin 14.günde tamamlandığını, kontrol grubunda ve sadece biyoadesif jel uygulanan grupta ise iyileşmenin 21.günde olduğunu, bu sonuca dayalı olarak EGF uygulamasının yeni damar oluşumunu uyararak yara iyileşmesini hızlandırdığını bildirmişlerdir.

PDGF yara iyileşmesinin erken dönemlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Fibroblastlar ve düz kas hücreleri için PDGF mitojen ve kemoatraktan bir moleküldür. Ayrıca PDGF, nötrofil ve monositler için kemotaktik ve makrofaj aktivasyonunu stimule edici özelliktedir. Ayrıca yara iyileşmesinde dokuların

birbirine yakınlaşması ve birleşmesinde önemli olan fibronektin gen ekspresyonunu, prokollajen sentezini ve kollajenaz aktivitesini artırmaktadır (Mutsaers ve ark 1997).

Judith ve ark (2010), ratlarda deneysel yara modeli oluşturdukları bir araşırmada; kitozan+kollajen+PDGF karışımı uygulanan grupta yara 10 günde, kitozan+PDGF karışımı uygulanan yara 14 günde, kontrol grubunun ise 20 günde iyileştiği, kitozan+kollajen+PDGF uygulanan ratlarda yara kontraksiyonunun da diğer gruplara göre daha iyi olduğunu ifade etmiştir.

PDGF'in kronik ve diyabetik yaralarda kullanımı FDA tarafından onaylanmış ve kısmen kullanıma sunulmuştur (Türkaslan ve Altındaş 2004).

Yaralanmayla birlikte artan TGF-β seviyesi yaranın esneme gücünü, inflamatuar hücrelerin ve fibroblastların bu bölgede toplanmasını artırmaktadır. Ayrıca ekstraselüler matriks üretimini potansiyalize etmektedir (Mutsaers ve ark 1997). Fibroblastlardan; kollajen ve fibronektinin molekül ve reseptör sentezini artırmakta ve regülasyonunu sağlamaktadır (Mutsaers ve ark 1997, Tokgöz 1997, Li ve ark 2007). Ayrıca yaralanma sırasında zarar gören sinir uçlarının onarımı, kollajen genlerinin transkripsiyonu, kollajen degredasyonunun inhibisyonunu ve matriks proteinlerinin üretiminde önemli rol oynamaktadır (Martin 1997, Mutsaers ve ark 1997, Diegelmann ve Evans 2004). Bu özelikleri granulasyon dokusunun oluşumunda önem arz etmektedir (Li ve ark 2007). Özetle TGF-β yara iyileşmesinin tüm basamaklarında görev yapmaktadır (Ekmekçi ve Bostancı 2002).

Yara iyileşmesinin ileriki aşamalarında özellikle TGF-β ve diğer büyüme faktörlerinin stimülasyonu ile kollajenden zengin yeni bir matriks oluşumu başlar (Martin 1997). Matriksin yeniden oluşması ve yaranın iyileşme sürecini birkaç metalloproteinaz ve matriks inhibitör metalloproteinazlar kontrol eder (Verderio ve ark 2004).

MMP; keratinosit, fibroblastlar ve inflamatuar hücrelerden salgılanır ve yeni oluşan matriksin degradasyonunda görev alır. Yara iyileşmesinin koordinasyonunda ve modülasyonunda önemlidir (Martins ve ark 2013).

Matriks metalloproteinazlar ve plazminojen gibi proteazların ekspresyonu arttığında yara iyileşmesi kaliteli ve çabuk olur (Martin 1997). Matriks

metalloproteinazlar sağlıklı canlılarda ve yara iyileşmesinin erken evrelerinde tespit seviyesinin çok altında olduğu için tespit edilemeyebilir. Ancak sitokinler ve büyüme faktörlerinin yanıtı sırasında, hücre ile ekstraselüler matriks arasında bağlantı oluşturulduğunda matriks metalloproteinazlar tespit edilebilmektedir. Matriks metalloproteinazların aşırı etkisi inhibitörleri ile kontrol altında tutulmaktadır (Li ve ark 2007).

Yaradaki kollajenin yıkımlanması makrofajlar, epidermal ve endotelyal hücreler tarafından üretilen matriks metalloproteinazlar olarak bilinen proteolitik enzimler tarafından kontrollü olarak gerçekleştirilir (Martin 1997, Singer ve ark 1999). Matriks metalloproteinazlar yara bölgesine migrasyonu da artırmaktadır (Esteo ve ark 2005).

Anjiogenezis için hipoksi olması, arteriyogenezis için ise iskemi ya da inflamasyonun olması gerekmektedir. Anjiogenezis kapillerin çoğalması ile meydana gelirken, arteriyogenezis kollateral arterlerin çoğalmasıyla oluşmaktadır. Kapillerin artması kan ile doku arasında gaz (O_2, CO_2) ve besin maddelerinin değişimi açısından, arteriyogenezis ise iskemik alanlara yeterli miktar da kan akımını dolayısı ile dokunun beslenmesini ve metabolik son ürünlerin taşınmasını sağlaması açısından önemli yer tutmaktadır. Bu görüşten yola çıkarak özellikle yara için çok önemli olan anjiogenezis oluşurken zincirleme çok sayıda olay gerçekleşmektedir. İlk olarak anjiogenezise neden olan bir etken ortaya çıkmakta, daha sonra bu etkenden dolayı anjiojenik bir faktörün salınması (VEGF, PDGF, FGF, vs) gerçekleşmektedir. Bu faktörün salınması, bazal membranın parçalanması (matriks metalloproteinazlar aracılığıyla), endotel hücrelerin aktivasyonu, adezyonu, migrasyonu, tüp (kan damarı şekline gelmesi) oluşumuna neden olması ve yeni damarın oluşması şeklinde gerçekleşmektedir (Deveci 2003).

Yeni kan damarlarının oluşturulabilmesi, yeni granulasyon dokusunun oluşturulabilmesine ve endotelyal hücrelerin mitojenik stimülasyonu ile göç etme yeteneğine bağlıdır. Kan damarlarının oluşması VEGF, TGF-β ve anjiopoetin gibi bazı faktörlere bağlıdır (Singer ve ark 1999, Clark 2001). Yaralanma ile birlikte azalan oksijen ve artan laktik asit miktarı, makrofajlar tarafından üretilen VEGF ve FGF'yi artırarak yara kenarlarından başlayan anjiogenezisi artırır (Martin 1997, Singer ve ark 1999, Diegelmann ve Evans 2004). Bu iki büyüme faktörü birbirleri ile

sinerjik etkiye sahiptir (Deveci 2003). Yaralanmanın ilk üç gününde anjiogenezis için FGF zemin hazırlarken, 4-7. günler arasında oluşan granulasyon dokusu süresince VEGF kritik rol oynar (Singer ve ark 1999, Diegelmann ve Evans 2004). Düşük oksijen miktarı, nükleer transkripsiyon faktörünü uyararak etraftaki sağlam vaskuler endotelyal hücrelerden VEGF'nin ekspresyonunu stimüle eder. Oksijen seviyeleri normale geldiğinde VEGF salınımı azalmaktadır. Sonuç olarak VEGF, FGF ve TGF-β vaskuler endotelyal hücrelerin oluşumunu stimüle etmektedirler (Diegelmann ve Evans 2004).

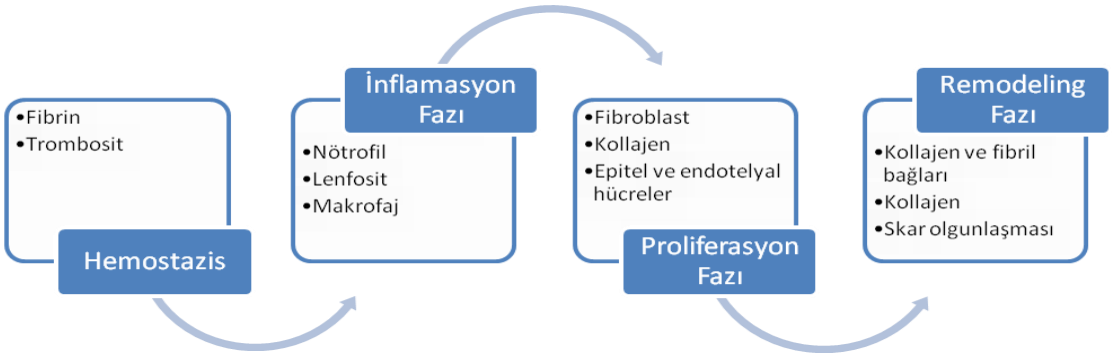
Sen ve ark (2002), VEGF ekspresyonunu artıran Rac 1 geni transfer edilen hastalarda yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu, hiperproliferasyonun görüldüğü epitelyal bölgelerde VEGF ekspresyonunun daha fazla olduğunu belirtmiştir.

Yara iyileşmesinde oksidatif stres önemli bir yer tutmakta ve oksidatif stresin azaltılması ile yara iyileşmesi hızlandırılmaktadır. Hücre hasarı durumlarında oksidatif stres ve antioksidan kapasite arasında denge bozulmaktadır. Hemostazis durumlarında aşırı oksijenlenmeye bağlı kısa süreli oksidatif stres oluşabilmektedir. Antioksidan sistem aşırı oksijenlenme ya da oksidatif strese aşırı maruziyet durumunda serbest oksijen radikallerinin indirgenmesini sağlamaktadır. Yaraya bağlı o bölgeye göç eden nötrofil, makrofaj ve diğer inflamatuar faktörler yara bölgesindeki oksidatif stresi artırmaktadır. Yüksek oksidatif stres fibroblastlarda yaşlılığa neden olmakta ve fibroblastların kontraksiyondaki işlevini ve fibroblastların büyüme faktörlerine olan cevabı azaltmaktadır (Soneja ve ark 2005).

Canlı vücudunda üretilen serbest oksijen radikalleri, enzimatik (Süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz vs) veya nonenzimatik antioksidanlarca detoksifiye edilerek hücrelere zararları engellenmeye çalışılır. Üretilen hidrojen peroksit enzimatik reaksiyonlar ile su ve moleküler oksijene dönüştürülerek etkisizleştirilir. Üretilen serbest oksijen radikalleri yeterince detoksifiye edilemediği durumlarda, hücrelerde başta hücre membranı olmak üzere lipid peroksidasyonuna neden olarak yapılarını bozar. Gelişen lipid peroksidasyonunun biyolojik belirteci olarak ise malondialdehid veya tiobarbütürik asit reaktif ürünleri (TBARS) ölçüm düzeyinden faydalanılmaktadır (Yazar ve Traş 2002, Mayne 2003, Dik ve ark 2014).

1.2.2. Yara iyileşme evreleri

Yara iyileşmesi; inflamasyon (eksudatif), hücresel proliferasyon ve maturasyon (rejeneratif) olmak üzere üç evrede incelenmektedir (Ekmekçi ve Bostancı 2002, Verderio ve ark 2004, Karasu ve Bakır 2008). Bazı yazarlar ise hemostazis yani kanın pıhtılaşma evresini de bu iyileşme basamaklarının içine katarak dört evrede incelendiğini bildirmektedir (Şekil 1) (Li ve ark 2007). Sağlıklı bir canlıda inflamasyon evresi yaklaşık 3 gün, proliferatif evre yaklaşık 10 gün ve maturasyon (rejeneratif) evresi yaklaşık 2 yıl sürmektedir (Ekmekçi ve Bostancı 2002).



Şekil 1.1: Yara İyileşme Evreleri.

İnflamasyon evresi

İnflamasyon evresi cerrahi müdahale ya da travma sonrası oluşan doku hasarına karşı organizmayı kan kaybına karşı koruyan, yabancı maddelerin invazyonunu önleyen ve yara iyileşmesinin başladığı aşamadır (Şenol 1995, Singer ve ark 1999). İnflamasyon evresi vaskuler ve selüler cevap olarak ikiye ayrılmaktadır. Akut inflamasyon yaklaşık 24-48 saat sürmekte ancak bazı vakalarda 2 hafta kadar sürebildiği bildirilmektedir (Li ve ark 2007).

Bu evrede yarayı takiben vazokonstriksiyon, bununla eş zamanlı olarak trombositlerin kümelenmesi ve damarı tıkaması (pıhtılaşma) gerçekleşir (Şenol 1995, Singer ve ark 1999, Li ve ark 2007). Bunun yanında hasarlı hücrelerden lipoprotein yapıda pıhtılaşmaya katkıda bulunan doku faktörleri salınır (Li ve ark 2007). Pıhtılaşma, hücrelerin göçü için geçici bir ekstraselüler tabaka oluşturur (Singer ve

ark 1999). Bu geçici matrikste bulunan fibronektin ile hücre migrasyonu sağlanmakta, hyaluronik asitle hücre invazyonu sağlanmakta ve fibrinojenlerle de sitokinler için rezervuar oluşturulmaktadır (Clark 2001, Li ve ark 2007). Aynı zamanda bölgedeki trombositler kan kaybını azaltmalarının yanında, büyüme faktörü (özellikle TGF-β ve PDGF) salınımı ve sitokinlerin bölgeye göçü için sinyal oluşturmaktadırlar. İnflamatuar hücrelerin ve fibroblastların yara bölgesine göçü ile yara iyileşmesi başlamış olur (Diegelmann ve Evans 2004, Li ve ark 2007). Bu aşamada yara bölgesindeki trombositler yara iyileşme kaskadını başlatan kemoatraktan molekül olarak görev yapmaktadır (Li ve ark 2007).

İnflamatuar evrede erken dönemde nötrofil ve makrofajlar baskın hücrelerdir (Li ve ark 2007). Yara bölgesine ilk olarak nötrofiller gelerek, yara bölgesine giren mikroorganizmaları ve ölü dokuları fagosite etmektedirler (Clark 2001, Ekmekçi ve Bostancı 2002, Bayındır 2007, Karasu ve Bakır 2008). Aynı zamanda yara iyileşmesi için gerekli olan proinflamatuar sitokinler için kaynak oluşturur ve lokal fibroblastları ile keratinositleri aktive ederler (Martin 1997). Nötrofil lökositler, serin proteaz ve metalloproteinaz salgılarlar. Bunlar yara iyileşmesinin ileriki evrelerinde var olacak ekstrasellüler matriksi yıkımlar ve kollajeni parçalarlar (Mutsaers ve ark 1997, Karasu ve Bakır 2008). Yara ağır şekilde enfekte değilse nötrofil infiltrasyonu birkaç gün içinde durur ve bölgedeki nötrofiller doku makrofajları tarafından fagosite edilirler (Martin 1997). Ancak enfeksiyon durumunda bölgedeki kalma süreleri uzar ve yara iyileşmesi gecikir. Geç dönemde ise nötrofil sayısı azalarak makrofaj sayısı daha baskınlaşır (Li ve ark 2007).

Yara bölgesine gelen nötrofil ve makrofajlar yara bölgesini yabancı cisimler, bakteriler ve debrislerden temizler (Singer ve ark 1999, Li ve ark 2007). Makrofajlar fibroblastların yara bölgesine gelmesini sağlayan fibronektin gibi kemotaktik faktörler salgılarlar. Makrofajlar inflamasyon ve yara iyileşmesi arasında temel rol oynarlar. Aynı zamanda salgıladıkları büyüme faktörleri ve sitokinler ile matriks üretimi ve proliferasyonu sağlamaktadırlar (Li ve ark 2007). Daha sonra trombositler ile kollajenin teması sonucu PDGF, TGF-β, EGF, trombosit faktör IV, fibronektin, seratonin, tromboksan A_2, fibrinojen, fibronektin, TNF-α ve IL-1 gibi sitokinler salınır (Şenol 1995, Singer ve ark 1999, Ekmekçi ve Bostancı 2002, Verderio ve ark 2004, Karasu ve Bakır 2008). Bu faktörler, fibroblastların, endotel hücrelerin ve

keratinositlerin o bölgeye göçüne neden olur (Şenol 1995, Clark 2001). Bu şekilde granulasyon dokusu oluşturulur (Singer ve ark 1999).

Makrofajların en önemli görevi inflamasyon evresi ile proliferasyon evresi arasında geçiş görevi üstlenmesi, epitelizasyon, fibroplazia, anjiogenezis ve yara iyileşmesi için gerekli TGF-β, TNF-α, IL-1, PDGF ve FGF gibi faktörleri salgılamalarıdır. Bu büyüme faktörleri ekstraselüler matriksin organizasyonunu ve endotel hücreleri ile düz kas hücrelerinin proliferasyonunu düzenlerler (Ekmekçi ve Bostancı 2002, Verderio ve ark 2004, Bayındır 2007, Karasu ve Bakır 2008).

Makrofajlar herhangi bir şekilde baskılanacak olursa kollajen sentezi, neovaskülarizasyon ile fibroblastların proliferasyonu ve migrasyonunda gecikme, buna bağlı olarak yara iyileşmesinin bozulması gözlenmektedir. Aşırı kontamine yaralarda ise makrofajların stimulasyonu, inflamatuar fazın uzaması, yaranın daha geç iyileşmesi ve aşırı skar dokusuna neden olmaktadır (Karasu ve Bakır 2008). Ayrıca aşırı fibrozis, yara kapandıktan sonra kollajen sentezinin hala devam etmesi skar oluşumunun artmasına diğer bir ifade ile keloid ya da hipertorfik skara neden olurken, yetersiz fibrozis ya da yetersiz iyileşme ve yaranın gerilme kuvvetinin zayıf olmasına neden olmaktadır (Matsuers ve ark 1997, Diegelmann ve Evans 2004). Bu dengeyi sağlayan ise matriks metalloproteinaz seviyeleri ve kollajen sentezi ya da inhibisyonudur (Matsuers ve ark 1997).

İn vitro koşullarda trombositten zengin plazmanın endotel hücreleri üzerine mitojenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Duchesne ve ark 2010). Yang ve ark (2011), trombositten zengin plazma ve hepain-fibrin konjugatı ile tedavi edilen yara da iyileşmenin daha hızlı olduğunu ifade etmiştir. Vazokonstriksiyonu takiben histamin, seratonin, prostaglandin E_1/E_2 aracılığı ile vazodilatasyon şekillenmektedir. İnflamasyonun başlaması ile bölgede kızarıklık, ağrı, şişkinlik ve ısı artışı şekillenir. Yara kabuğunun oluşmasıyla yara dış ortamdan, sekonder kanamalardan korunur ve kabuk altında epitelyal doku gelişmeye başlar (Li ve ark 2007, Karasu ve Bakır 2008).

Proliferasyon evresi

Proliferasyon evresi inflamasyonu takiben yaralanmadan sonraki yaklaşık 3-5. günlerde yaradaki nekrotik doku ve kan pıhtısı kalktıktan sonra başlamaktadır.

Proliferatif dönemde fibroblastların çoğalması, granülasyon dokusunun oluşumu ve yara kontraksiyonu bulunmaktadır. Yara iyileşmesi için en iyi belirteç granülasyon dokusunun oluşumudur ve yaklaşık 3.-6.günlerde başlar (Karasu ve Bakır 2008). Kollajen, fibronektin, hyaluronik asit, yeni damarlaşmalar, fibroblast ve inflamasyon hücrelerinin birleşimi granülasyon dokusunu oluşturmaktadır. Ayrıca granülasyon dokusu epitelyum hücrelerinin göç etmesi için zemin oluşturmaktadır. İnflamatuar fazda şekillenen geçici matriks, sitokinler ve büyüme faktörleri granülasyon dokusu oluşumunu desteklemektedir. Granülasyon dokusunun gelişimi yeni damar süreci olan anjiogenezis ile karakterizedir. Bu dönemde kollajen üreten fibroblastların yara kenarından yaraya göç etmeleri ve kollajenin sentezi ve birikimi gerçekleşir (Şenol 1995, Ekmekçi ve Bostancı 2002, Verderio ve ark 2004, Karasu ve Bakır 2008). Yeni oluşan kollajen ile kollajene helikal yapı veren hidroksiprolin sayesinde deri yeniden elastikiyetini ve direncini kazanmaktadır (Diegelmann ve Evans 2004).

Yaranın 2-3. gününde endotelyal hücrelerden psedopodların uzamasıyla ve matriks metalloproteinaz sekresyonunun artmasıyla yeni kan damarları oluşmaktadır. Yeni oluşan kan damarları granulasyon dokusunun yapısına katılarak, dokuların oksijenlenmesini ve beslenmesini sağlamaktadır. Anjiogenezis süresince endotelyal hücreler, biyolojik maddeler ve sitokin üretirler; keratinositler ve fibroblastlar ise VEGF üretimini sağlayarak damarlaşma ile yara iyileşmesini regüle etmektedirler (Li ve ark 2007). Yara bölgesinde artan hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri VEGF ekspresyonunu güçlü bir şekilde artırmaktadır (Sen ve ark 2002).

Yeni kan damarlarının oluşumu sitokinlere ve ekstraselüler matriks komponentlerinin organizasyonuna bağlıdır. Son gelişmeler ekstraselüler matriks proteinlerinden birisi olan laminin yara angiogenezisinde önemli bir protein olduğu belirtilmiştir (Li ve ark 2007).

Yara iyileşmesinin bu evresinde fibroblastlar önceden şekillenen fibrin pıhtısı içindeki lifler ve kapiller boyunca yaranın içine doğru hareket ederler. Fibroblastlar genellikle yaranın oluşmasından sonraki 3.-4. günlerde şekillenir ve yaklaşık 15.-21. güne kadar aktif olarak kalırlar. Fibroblastlar onarım sürecinin temel elementleridir ve dokuların yeniden yapılanmasında yapısal proteinlerin üretiminden sorumludurlar (Diegelmann ve Evans 2004, Karasu ve Bakır 2008). Fibroblastlar fibrin pıhtısını geçici matriks olarak kullanır ve fibronektin, laminin ve kollajen gibi yapıları

bünyesinde bulunduran ekstraselüler matriks ile yer değiştirirler. Fibroblastlar yaraya gerilim kuvveti veren glikoprotein yapısında olan kollajen sentezini de gerçekleştirirler (Mutsaers ve ark 1997, Diegelmann ve Evans 2004, Karasu ve Bakır 2008). Yaranın erken döneminde artan gerilim kuvveti kollajene bağlı iken, ileriki dönemlerde skar dokusunun olgunlaşmasına bağlıdır. Anjiogenezis süresinde şekillenen yeni kapilların oluşması yara bölgesindeki oksijen seviyesini artırarak fibroblast proliferasyonunu azaltır ve maksimum matriks protein üretimini sağlarlar. Matriksin birikmesi ve fibroblastlarda protein sentezinin sona ermesi ile fibroblastlar miyofibroblast formuna geçerler (Diegelmann ve Evans 2004, Karasu ve Bakır 2008). Miyofibroblastlar yara dudaklarının kapanması sırasında dominant bir rol oynamaktadırlar (Li ve ark 2007).

Yaralanma bölgesindeki sağlam kıl kökleri, keratinositler için rezervuar görevi görmektedirler. Prolifere olan keratinositler yara içine doğru göç ederler ve yara kenarlarının birbirine yaklaşmasında, yara kenarları arasında hücresel göçün sağlanmasında ve köprüler kurulmasın da önemli rol oynar (Li ve ark 2007). Böylece anjiojenik uyarımlara bağlı olarak yaralanmadan sonraki ikinci günden başlayarak kapillar ağ şekillenir (Karasu ve Bakır 2008). Keratinositlerin migrasyonu, matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörleri reepitelizasyonda görev almaktadır. Keratinosit proliferasyonu sonrası yara kenarları arasındaki bağlantı sağlandığı anda, proliferasyon azalmaktadır (Li ve ark 2007).

Remodeling ve maturasyon evresi

Epidermis ve dermis arasındaki bağlantı tamamlandığında derinin iyileşmesi görüntü olarak tamamlanmış hale gelir (Li ve ark 2007). Epitelizasyonun tamamlanması ile yara iyileşmiş olarak kabul edilmektedir. Ancak iyileşme devam etmekte ve bu evre maturasyon evresi olarak adlandırılmaktadır (Şenol 1995, Karasu ve Bakır 2008). Yeni kan damarlarının oluşması ve fibroblastların birikimi ile fibroplazia denilen bir döneme geçilir. Bu dönemde fibroblastlar prolifere olarak yara kabuğunun altında kollajenden zengin geçici matriks oluştururlar. Buradaki fibroblastlar protein sentezine de katılarak yara iyileşmesinde görev alırlar (Li ve ark 2007).

Fibronektin; fibroblastların ekstraselüler matrikse yapışmalarını sağlamakta, fibroblast sentezini artırmakta ve diyabetlilerde yara iyileşmesi üzerine önemli bir rol oynamaktadır (Ekmekçi ve Bostancı 2002, Qiu ve ark 2007). Ayrıca yara kontraksiyonunu ve kollajen fibrillerinin yapışmasını sağlamaktadır. PDGF, FGF, EGF ve TGF-β gibi büyüme faktörleri fibroblast proliferasyonunu ve migrasyonunu artırmaktadır (Li ve ark 2007).

Yaranın varlığında ya da yokluğunda hücreleri destekleyen yapı ekstraselüler matrikstir (Bayındır 2007). Ekstraselüler matriks, sitokinler ve büyüme faktörleri için rezervuar görevi görmektedir (Li ve ark 2007).

Bu evrede yara bölgesindeki fibroblast sayısı azalmakta, kollajen üretimi dengeye ulaşmakta, yara gerilim direnci artmakta, skar dokusunun hacmi azalmakta ve yara rengi soluklaşmaktadır (Şenol 1995, Bayındır 2007, Karasu ve Bakır 2008).

Kollajen, bağ dokunun temel bileşeni olarak görev yapmakta ve dokuları deformasyonlara karşı korumaları ile dokulara şekil vermeleri en önemli görevlerindendir. Dokuların dayanıklılığı ile bütünlüğünü sağlayan tip I kollajen, vücuttaki kollajenin %90'ını oluşturmaktadır (Karasu ve Bakır 2008).

Yara remodeling safhasındaki karakteristik bulgulardan biri ekstraselüler matriksin kompozisyonunun değişmesidir. Bu evrede granülasyon dokusundaki tip III kollajen yerini skar dokusundaki tip I kollajene bırakır. Yara iyileşmesi tamamlanırken matriks metalloproteinazlar tarafından kollajen III yıkılıp yerine kollajen I yapımı artırılır. Böylece eski kollajen yıkılıp yerine yeni kollajen sentezlenir (Ekmekçi ve Bostancı 2002, Li ve ark 2007, Karasu ve Bakır 2008). Fakat bu evrede kolajen sentezi sürmeye devam ederse hipertrofik skar dokusu olarak bilinen kabarık ve sert bir doku oluşur. Maturasyon evresinde kollajen birikiminin kontrol altında tutulması bu evrenin en önemli özelliğidir. Başlangıçta üretilen kollajen çok zayıf olması nedeni ile zaman geçtikçe bu kollajen ortadan kaldırılır ve bunun yerini daha kalın ve sağlam derideki gibi bir kollajen alır (Şenol 1995, Ekmekçi ve Bostancı 2002, Karasu ve Bakır 2008). Ancak durum böyle olmazsa epitelizasyon tamamlandığın da onarım faaliyetlerini durduran stop sinyalleri etkisiz kalmaktadır. Böyle durumlarda hipertrofik skar oluşmaktadır (Bayındır 2007).

Yeni kollajen molekülleri üzerinde oluşan integrin reseptörlerine keratinositlerin bağlanması regüle edilir. Yara merkezine doğru tek kat keratinosit tabakası oluşturulur. Bağlanma tamamlandıktan sonra keratinositlerden salınan matriks metalloproteinazlar, kollajen ve laminin seviyesi azaltılır (Li ve ark 2007).

Matriks metalloproteinazların ve bu metalloproteinazların doku inhibitörleri arasındaki sentez dengesizlikleri yara iyileşmesini geciktirebilir ya da fibrozise, başka deyişle aşırı skara neden olabilmektedir. Enfeksiyon, yetersiz beslenme ve diyabet gibi patobiyolojik durumlar kronik veya iyileşmeyen yaralara ve aşırı fibrozise (keloid ya da skar) ve dokunun fonksiyon kaybına neden olabilmektedir (Li ve ark 2007). Fibrozis genellikle yaranın kronik hale gelmesi sonucu ekstraselüler matriks proteinlerinin ve kollajenin aşırı birikimi olarak tarif edilmektedir. Aynı zamanda yara iyileşmesinin devamındaki patofizyolojik değişiklik olarak belirtilmektedir (Mutsaers ve ark 1997). Matriks metaloproteinazdan yoksun fareler de yara iyileşmesi ve yara kontraksiyonunun geciktiği bildirilmiştir (Bayındır 2007).

Sonuç olarak inflamasyon, vaskularizasyon, apoptozis, ekstraselüler stabilizasyon, hücrelerin migrasyonu gibi olaylar doku harabiyetinde çok önemli yer tutmaktadır. Yaşa, düşük yaşam kalitesine, hastalıklara ve diyabete bağlı olarak yara iyileşmesi gecikmekte ya da yetersiz kalmaktadır (Verderio ve ark 2004).

1.3. Diyabetik yaralar

Diyabetes mellitus; dislipidemi, hiperglisemi, glikozüri, periferal insülin direnci, azalan β hücre fonksiyonu ve bunlara eşlik eden birçok klinik ve biyokimyasal bulgu ile seyreden sistemik ve kronik bir metabolizma hastalığıdır (Mahler ve ark 1999). Aynı zamanda diyabet hücre ve bağ dokusu metabolizmasında bozulmaya sebep olmakta ve yara iyileşmesi için risk oluşturmaktadır (Komesu ve ark 2004). Diyabetiklerde yara iyileşmesinin yetersiz olmasının temel sebebi olarak insülin salınımının azlığı ve artan kan glikoz seviyesi olduğu düşünülmektedir (Loots ve ark 1999, Dagogo ve ark 2002, Lerman ve ark 2003).

Diyabetik yaralar; zor iyileşen, multiple fizyopatolojiye sahip ve biyokimyasal hasarların üst düzeylerde olduğu bir yara tipidir (Singer ve ark 1999). Yapılan çalışmada hiperglisemiye bağlı olarak apoptozisin artışı ile canlı hücre sayısında azalma, hücre-matriks arasında bağlantı yetersizliği, matriksin aşırı

yıkımlanması tespit edilmiştir. Bunun yanında hücre proliferasyonunun, prokollajen I mRNA ekspresyonu, ekstraselüler matriks gen ekspresyonu ve yara dudaklarının kontraksiyonunun azalması gibi olumsuz etkilerin yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir (Darby ve ark 1997).

Bitar ve ark (1999), glikokortikoid verilen grupta yara iyileşmesinin bozulduğunu ve buna bağlı olarak inflamatuar hücrelerin baskılandığını, angiogenezisin azaldığını ve kollajen metabolizmasının bozulduğunu; diyabetlilerdeki yara gecikmesinin de buna benzer nedenlerden olabileceğini ortaya koymuşlar ve insülin uygulanan diyabetli hayvanlarda yara iyileşmesinin daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir.

Diyabet hastalarında yara iyileşmesi esnasında bozuk granülasyon dokusu oluşmakta ve kollajen sentezi yetersiz olmaktadır (Grotendorst ve ark 1985, Hehemberger 1998). Kollajen seviyesindeki bu yetersizlik ya da bozukluk fibroblastların çoğalma kapasitelerinde yetersizliğe, hücrelerin sentez aktivitesinin bozulmasına ve yeni sentezlenen kollajen katabolizmasındaki artışa bağlanmaktadır (Lerman ve ark 2003). İnsülin, tip I kollajenin üretimini artırabilmektedir. Diyabet hastalarında insülin yetersizliğine bağlı olarak kollajen üretimi de bozulmaktadır (Schaffer ve ark 1997, Tokudome ve ark 2004).

Diyabetli hastalarda duyu kaybına bağlı olarak hassas deri bölgelerinde baskıyı hissetmeme ve vaskuler bozukluklara bağlı olarak iskemiler sonucu çeşitli iyileşmeyen ya da zor iyileşen yaralar oluşmaktadır (Singer ve ark 1999). Bu hastaların büyük bölümünde bozulmuş yara iyileşmesi ve sinir dejenerasyonlarına bağlı olarak çok sayıda amputasyon gerçekleşebilmektedir (Ahmed 2005). Ayrıca sempatik tonusun kaybına bağlı olarak arteriovenöz şantlar oluşmakta ve deri kan akımında azalma meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak diyabetik ayak ülserleri gelişmektedir (Türkaslan ve Altındaş 2004). Bunun yanında diyabetli hastalardaki yaralarda kemotaksi ve granulosit fonksiyonlarının bozulmuş olması, hastaları enfeksiyona predispoze duruma getirebilmektedir. Ayrıca inflamatuar hücrelerin yara bölgesine gelmesinde gecikme ve uzamış inflamasyon, bozulmuş neovaskularizasyon, kollajen sentezinde azalma, proteinaz seviyelerinin artması ve bozulmuş makrofaj fonksiyonları diyabetik yaraların iyileşmesini olumsuz etkileyen diğer faktörlerdir (Singer ve ark 1999, Ahmed 2005).

Diyabetlilerde oluşan ülserlerde, aşırı nötrofil birikimi ve reaktif oksijen türlerinin artmasına bağlı olarak kronik bir inflamasyon bulunmaktadır. Bölgede bulunan nötrofiller aşırı miktarda MMP-8 salınımı ile elastaz adı verilen ve TGF-β ve PDGF gibi önemli iyileşme faktörlerini yok eden enzimler sentezlemektedirler Bunun yanında aşırı miktarda biriken serbest oksijen radikalleri sağlıklı ve yeni iyileşen hücrelerin hasar görmesine neden olarak ülserlerin sürekliliğini sağlamaktadırlar. Kronik inflamasyon azalana kadar da bu ülserler iyileşememektedir (Diegelmann ve Evans 2004).

Diyabetik ülserlerde, TGF-β ya da diğer büyüme faktörlerine karşı fibroblastların cevabı ve TGF-β reseptör sayısı azalmış, sinyal iletimi bozulmuştur (Li ve ark 2007).

Grotendorst ve ark (1985), insülin ve PDGF'in kombine olarak uygulandığı diyabetli ratlarda yara iyileşmesinde etkin rol alan proteinlerin ve büyüme faktörlerinin bu kombinasyonla artırılmasına bağlı olarak iyileşmenin olumlu yönde etkilendiğini bildirmişlerdir.

Goova ve ark (2001), genetik olarak diyabetli olan farelerde matriks metalloproteinaz seviyesinin yüksek olduğunu, bu durumun büyüme faktörlerinin ve inflamatuar hücrelerin salınımını sınırlandırdığını bildirmiştir.

Diyabet modellerinde yapılan çalışmalarda yangı, kollajen birikimi, hücrelerarası matriks farklılaşması, yara kontraksiyonunda ve fibroblast çoğalmasında anormal doku cevapları gözlenmiştir (Darby ve ark 1997, Bitar ve ark 1999, Komesu ve ark 2004). Belirlenen bu farklılıkların yara iyileşmesinin başındaki inflamatuar evresinde oluşan bozukluklar olduğu belirtilmiştir (Fahey ve ark 1991, Komesu ve ark 2004). Diyabette yara iyileşmesinin inflamatuar evresinde lökosit aktivitesinin bozulması daha sonraki evrelere de etki etmektedir (Ahmed 2005). Bunun devamında da fibroblast çoğalması ve kollajen sentezi de engellenmektedir (Grotendorst ve ark 1985, Hehemberger 1998).

Diyabetlilerde inflamasyon fazının yavaş başladığı ve uzun sürdüğü, nötrofil dansitesinin düşük olduğu ve nötrofillerin 3. günden sonra yara bölgesinden ayrıldığı, makrofaj ve lenfositlerin bu moleküllerin yerini aldığı bildirilmiştir. Ancak başlangıç fazında, epitelyal yenilenmede gecikme olmadığı da belirtilmiştir. Sonuç

olarak inflamasyonun geç ve yetersiz oluşu diyabetlilerde yara iyileşmesini geciktirmektedir (Komesu ve ark 2004).

Diyabetik hastalarda mikrovasküler trombozlarla kan akımında bozulma ve immunitenin zayıflaması gözlenmektedir. Buna bağlı olarak yara iyileşmesinde inflamatuar fazın yeterli miktarda oluşamaması veya yara bölgesinin enfekte olması gözlenmekte ve sonuç olarak yara iyileşmesi gecikmektedir (Ekmekçi ve Bostancı 2002). Komesu ve ark (2004), diyabet grubunda inflamatuar fazın yetersiz olduğunu ve yangı alanına hücrelerin göçünün yavaşladığı gözlemlemiştir.

Diyabetlilerde lökosit ve makrofaj fonksiyonlarında bozulma ile eş zamanlı olarak büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımında azalma, ekstraselüler matriks yapımında gecikme, özellikle FGF ve kollajen sentezinde bozulma ve yara iyileşmesinin inflamatuar fazında defektler belirtilmiştir (Loots ve ark 1998).

Fahey ve ark (1991), diyabetli ratlarda inflamatuar fazın geciktiğini, faz boyunca total lökosit sayısının ve IL-6 seviyesinin azaldığını, sitokin ve diğer immun yanıtı oluşturan hücrelerin (büyüme faktörleri, v.s.) yara iyileşmesi için mutlaka gerekli olduğunu ancak diyabetlilerde bunların eksikliğine bağlı yara iyileşmesinin geciktiği vurgulanmıştır.

Lerman ve ark (2003), hipoksi ve glukoz artışına bağlı olarak anjiogenezisi sağlayan büyüme faktörlerinin ve fibroblastların sayısının azaldığı gözlemlemiştir. Fibroblastların azalmasının; fibroblastlar tarafından salgılanan angiogenezis, proliferasyon ve matriks depolanmasını sağlayan büyüme faktörlerinin miktarında da azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Aşırı artan glikozun sorbitole dönüştürülmesi, sorbitolün ise fruktoza yeterince dönüştürülememesi sonucu sorbitolün dokular üzerindeki zararlı etkileri hipergliseminin diyabetiklerde geliştirdiği bozukluklarının temelini oluşturmaktadır. Bunun yanında hemoglobin, albumin, kollajen, fibrin ve lipoproteinlerin aşırı glikolizasyonu sonucu diyabetik vasküler komplikasyonlar gelişebilmektedir (Türkaslan ve Altındaş 2004). Hiperglisemi sonucu oluşan son ürünlerin ve bunlara bağlı oluşan serbest radikallerin diyabette biyomoleküler hasara yol açtığı belirtilmiştir. Artan oksidatif stresin inflamasyonu arttırdığı sitokinlerin aşırı sentezine ve vazokonstriksiyonuna neden olduğu görülmüştür. Bu evrede vitamin E

gibi antioksidanların dışarıdan verilmesinin faydalı olabileceği bildirilmiştir (Ahmed 2005).

Diyabetli hayvanlarda yapılan bir çalışmada deneysel yara oluşturulması sonrası oksidatif stresin bir belirteci olan tiobarbiturik asit (TBARS) seviyesinin diyabet olan gruplarda arttığı, ancak yapısında bulundurduğu selenyum yönünden zengin, antioksidan özelliğe sahip "parmak darı" olarak adlandırılan bir besin verildiğinde bu seviyenin azaldığı, glukoz seviyelerinin düştüğü ve yara iyileşmesinin hızlandığı bildirilmiştir. TBARS seviyesindeki bu artışın nedeninin diyabet ve yaraya bağlı olarak oluşan inflamasyon olduğu, oksidatif stresin yara iyileşmesinin gecikmesinde çok önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Rajasekaran ve ark 2004).

Diyabet ve obezite oluşturulmuş ratlarda diyabetik yaraların ilk hafta genişlediği daha sonra yara kapanmasının başladığı, diyabetik olmayan kontrol grubunda ise yaranın ilk gününden itibaren küçüldüğü bildirilmiştir. Diyabetik grupta oluşan granulasyon dokusunda fibrozis daha ince iken, diyabetik olmayan grupta daha kalın olduğu ve diyabetik hayvanlardaki granulasyon dokusunun daha geç, düzensiz (yara yüzeyine pararlel tek kat fibrozisin olmadığı) ve adipoz dokudan zengin (diyabet olmayanlardan 4-5 kat daha fazla) bir iyileşmenin görüldüğü bildirilmiştir. Bunun yanında diyabetik yaralarda kabuk miktarında bir artışın olduğu (diyabetik olmayanlardan 2-3 kat daha kalın) ve yara kabuğunun içerisinde belirgin nötrofil infiltrasyonunun olduğu belirtilmiştir. Skar dokusunun ise diyabetik hayvanlarda daha geniş olduğu gösterilmiştir. Yara bölgesinde makrofajlar, nötrofiller, keratinositler ve fibroblastlar tarafından üretilen IL-6 seviyesinin diyabetiklerde artmasına bağlı olarak yara iyileşmesinin bozulduğu, doku onarımının geciktiği ve fibroblast proliferasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Matriks metalloproteinaz seviyesinin diyabetik ratlarda artmasına bağlı olarak kollajen seviyesinin azaldığı belirtilmiş, aşırı matriks metalloproteinaz salınımının proteolitik doku hasarına yol açtığı bildirilmiştir (Slavkovsky ve ark 2011).

Chithra ve ark (1998), *Aloe vera* uygulamalarının diyabetiklerde yara iyileşmesi üzerindeki etkinliğini inceledikleri araştırmalarında; diyabetik ratlarda deride kollajen yapımının azaldığını ve katabolizmasının arttığını buna bağlı olarak yara iyileşmesinin geciktiği, derinin elastikiyetini kaybettiğini bildirilmişlerdir. *Aloe*

vera uygulamasının özellikle yaranın kollajen sentezi ve fibroplazia döneminde etkili olduğu, granulasyon dokusunda kollajen sentezini arttırdığı buna bağlı olarak diyabetiklerde yara iyileşmesini hızlandırdığını bildirmişlerdir.

Seifter ve ark (1981), streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde; glukoz ve ketojenik metabolitlerin kollajen birikimini ve kollajen bağlanmasını inhibe ettiğini, ancak vitamin A takviyesi ile geciken inflamasyonun hızlandırılması, fibroblast proliferasyonu, kollajen formasyonunu-maturasyonunu ve yeni kan damarı oluşumunun hızlandırılması sonrasında bu inhibisyonun azaldığını tespit etmişlerdir.

STZ ile diyabet yapılan başka bir çalışmada insizyon şeklinde yara oluşturulmuş ve yara iyileşmesinde hGH'nin olumlu etkilere sahip olduğu öne sürülmüş, bu durumun makrofajlardan salınan büyüme faktörleri, matriks metalloproteinazların artışı ve yeni kan damarları oluşumuna bağlı olduğu belirtilmiştir (Esteo ve ark 2005).

1.4. Midkin

Midkin temel aminoasitler özellikle sistein yönünden zengin ve yaklaşık 13kDa ağırlığına sahip bir sitokin olarak tanımlanmaktadır (Muramatsu 2011). Midkin hücre içinde MAP kinazı etkileyerek hücre gelişimi ve canlılığı, hücre migrasyonu, kemotaksis, onkogenezis, fibrinolizis ve embriyonegenezisi sağlamaktadır (Xu ve ark 2014). Ayrıca midkin; anti-apoptotik, mitojenik, anjiojenik, kemotaktik ve yangı hücrelerinden sitokin salınımı tetikleyici özelliklere sahiptir (Kadomatsu 2005).

Heparin bağlayıcı sitokin olan midkin, hedef hücrelerin aktivitesini, büyümesini, göç etmesini ve canlılığını teşvik etmektedir. Midkin özellikle embriyogenezis döneminde yoğun miktarda sentezlenirken, yetişkinlerde düşük miktarlarda sentezlenmektedir (Muramatsu 2010, Muramatsu 2011). Ancak prognozu kötü kanser hastalarında midkin ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir. Ayrıca diyabetik nefropati, romatoid artrit ve ateroskleroz gibi kronik hastalıklarda midkin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Weckbach ve ark 2011).

Midkin protein tirozin fosfataz ζ, anaplastik lemfoma kinaz, Notch2, LDL reseptör ilişkili protein 1, integrin ve proteoglikan reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu

bağlamda midkine ait spesifik bir reseptör henüz tespit edilememiştir. Ayrıca anjiogenezis oluşturmasındaki etkileri hangi reseptör üzerinden sağladığı belirlenememiştir (Kadomatsu ve ark 2013).

Midkin, reseptör tirozin fosfataz (RTP)-β etkileyerek hücrelerin canlı kalabilmesini sağlamaktadır (Maeda ve ark 1999). Doku onarımında ve dokuların yeniden oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Iwashita ve ark 1999).

Midkin, sitoplazmik proteinler olan sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivator (STAT) ve janus kinazı (JAK) etkileyerek apoptozisi engellemektedir. LDL ilişki reseptör protein (LRP) ile bağlanarak nükleolin proteini etkinleştirerek; nükleer translokasyona, apoptozisin engellenmesine, inflamasyona, hücre proliferasyonu ve migrasyonuna neden olmaktadır (Shibata ve ark 2002, Sakaguchi ve ark 2003).

Midkin sağlıklı ratların epidermis ve kıl folükülleri çevresinde düşük seviyede sentezlenirken, dermal katmanda, özellikle de yağ bezleri çevresinde daha yüksek seviyelerde sentezlenmektedir. Ayrıca subdermal bağ dokusunda varlığı da tespit edilmiştir (Iwashita ve ark 1999).

Midkin, beyin hasarı gibi işemik doku yaralanmalarında sentezlenebilmektedir. Midkinin eksojen verilmesi ya da midkin gen transferi nöronal hücre ölümünü engellemektedir. Regulatör T hücrelerinin baskılandığı, lökosit göçünün arttığı ve kemokin üretiminin arttığı inflamatuar hastalıklarda midkin üretimi artmaktadır. Sonuç olarak midkinin inflamatuar cevabı desteklediği anlaşılmaktadır (Muramatsu 2011).

Kosugi ve ark (2007) genetik olarak midkin noksan ve midkin pozitif transjenik farelerde deneysel diyabetik nefropati oluşturarak, ortaya çıkan değişiklikleri incelemişlerdir. Midkinin glukozun artışı ile inflamatuar etkilerinin arttığını ve makrofaj infiltrasyonu ile kollajen birikiminin arttığını bildirmişlerdir.

Midkin ailesi, heparine bağımlı büyüme faktörü midkin ve pleitropinden oluşmaktadır. Midkin ve pleitropin, nöronal gelişimden mitojenik aktiviteye kadar pek çok olaya katılmaktadır (Mitsiadis ve ark 1995, Muramatsu 2002). Midkin, farklı dokularda onarım ve yeni hücrelerin gelişimini kontrol altında tutmakta (Sumi ve ark

2000, Muramatsu 2010) ve nötrofillerin hasarlı bölgeye göçüne neden olmaktadır (Takada ve ark 1997, Muramatsu 2010).

Midkinin patojenlere karşı koruma sağladığı ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Muramatsu 2002, Svensson ve ark 2010). Midkin ve pleitropin endotelyal hücrelerin fibrinolitik aktivitesini stimüle etmektedir. Ayrıca vasküler endotelyal dokunun gelişiminde önemli olduğu, hücrelerden salgılattığı anjiojenik faktörler ile endotelyal hücreler ve damar gelişimine etkili diğer hücreler üzerine etkileri bulunmaktadır (Muramatsu 2002).

Hasarlı dokularda, özellikle işemi sonrası damarlarda midkin ekspresyonu artmakta, böylece hücre canlılığının devamı ve doku onarımı sağlanmaktadır (Muramatsu 2011).

Midkin, inflamasyonun regüle edilmesi ve giderilmesinde önemli rol oynamaktadır. Midkin, fibroblastlar üzerine büyüme ve kollajen kontraksiyonuna destek olma, keratinositlerin gelişimi, endotelyal hücrelerin fibrinolitik faaliyetleri, düz kas hücrelerinin göçü, IL-8 sentezi, nötrofil ve makrofajların göçünü aktive etmede etkili olmaktadır. Kan damarlarının hasarı, beyin ile kalpteki işemi ve hasar durumlarında midkin eksprese edilmektedir. Ayrıca doku onarımında midkinin antibakteriyel etkili olduğu bulunmuştur (Muramatsu 2011).

Midkin sentezi yetersiz farelerde yapılan bir çalışmada hasarlı damarlara, makrofaj ve nötrofil migrasyonunun önemli oranda bozulduğu bildirilmiştir (Horiba ve ark 2000).

Endotelyal hücrelerden salgılanan ve düz kas hücreleri üzerinde etkili olan midkin, IL-8 üretimini stimüle etmektedir. IL-8, endotelyal hücrelerin büyümesini ve gelişimini desteklemektedir. Midkin mezenşimal hücreler ile epitelyal hücreler arasındaki etkileşimde önemli rol oynamaktadır (Muramatsu 2010).

Midkin in vitro olarak farklı aktiviteler sergilemektedir. Örneğin, fibroblastların gelişimi, embriyonik nöronların canlılığı ve kemokinlerinlerin ekspresyonu üzerine farklı roller üstlenmiştir (Muramatsu 2010). Ancak midkinin fibroblast gelişimindeki etkisinin, FGF'den daha zayıf olduğu bildirilmiştir (Muramatsu 2002).

Takada ve ark (1997), sinovitis durumunda ve yeni oluşan endotelyal hücrelerde midkin ekspresyonunun varlığını tespit etmişlerdir. Çalışmada midkinin, nötrofiller için kemotaktik bir ajan olduğu, doku hasarı ve inflamasyonun erken dönemlerinde midkin ekspresyonunun önemli olduğu gösterilmiştir.

Periferal inflamatuar hücrelerin midkin sekresyonuna neden olduğu (Yazihan ve ark 2008), ayrıca nötrofil, makrofaj, IL-8, TGF, monosit kemotaktik protein ve makrofaj gibi inflamatuar proteinlerin sentezinde ve inflamasyonda da görev aldığı bildrilmiştir (Wang ve ark 2008).

Prognozu kötü olan tümörlerde; tümör migrasyonunu sağlaması, anjiogenezisi ve tümör canlılığını arttırması nedeni ile sıklıkla midkin ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (Muramatsu 2010).

Kaspaz-3 aktivitesini baskılanmasına bağlı olarak midkinin hepatoselüler hücrelerde antiapoptotik olduğu gösterilmiştir (Ohuchida ve ark 2004).

Diyabetik hastalarda yaranın erken dönemlerinde inflamasyonun yetersiz olması ve ileryen dönemlerde inflamasyonun artarak kronik hale gelmesi nedeniyle yara iyileşmesi gecikmekte ve periferik bölgelerde doku ve organ kayıplarına neden olmaktadır. İnflamasyonun geç şekillenmesi büyüme faktörleri ve diğer iyileşme faktörlerinin salınımını da geciktirmektedir. Bu sebeplerle yara iyileşmesini düzeltebilecek, normale yakın bir iyileşmenin oluşması için yeni maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Araştırmacılar bu konularda çeşitli yeni çalışmalar yapmaktadırlar. Benzer durumlar sağlıklı canlılarda da görülebilmekte ve çeşitli nedenlere bağlı olarak yara normal olarak iyileşememektedir.

Sağlıklı canlılarda oluşan normal olmayan yara iyileşmesi durumlarında apoptozis artmakta, yara dokusu nitelik ve nicelik bakımında tekrar aynı özelliklerini kazanamamakta ve yara iyileşme sürecinde enfekte olabilmektedir. Ayrıca sağlıklı canlılarda oluşan akut yaralarda hem estetik açıdan hemde fizyolojik fonksiyonlar açısından yaranın daha hızlı ve kaliteli kapanması istenmektedir. Bununla birlikte asker, polis, hemşire, doktor, veteriner hekim v.b. personelin mesleği gereği oluşabilecek çeşitli yaralar iş gücü ve önemli sağlık tehdidi oluşturabilmektedir. Bu açıdan bakıldığında midkin uygulaması bu tip yaraların enfeksiyon oluşmadan hızlı bir şekilde ve estetik bozukluk oluşmadan iyileşmesi önem arz etmektedir.

Midkin; proliferatif, mitojenik, anti-apoptotik, kemotaktik ve anjiojenik etkilere sahiptir. Bu etkilerine bağlı olarak yara iyileşmesinde etkili olan büyüme faktörleri ve inflamatuar hücreleri modüle ederek yara bölgesinde epitelizasyonu hızlandırmakta, kıllanma ve anjiogenezisi artırmakta ve sonuç olarak yara iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada midkinin, yukarı da sayılan özellik ve etkileri ile yara iyileşmesinin gerçekleşmesinde tek bir büyüme faktörünün etkili olamayacağı, bu durumda midkinin birden fazla büyüme faktörü ve oksidatif stres düzeylerini olumlu yönde değiştirebileceği hipoteze edildi.

Elde edilen bilgiler ışığında midkinin yara iyileşmesinde önemli bir yere sahip olduğu düşünüldü. Bu çalışmanın amacı doku kayıplı yara oluşturulmuş sağlıklı ve diyabetik ratlarda midkinin gün aşırı 10 ng/kg dozda yara iyileşmesi üzerinde ki etkinliğinin belirlenmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Çalışmada derin dondurucu (-20 ^{o}C, Siemens, Germany), pH metre (WTW, pH 315i, Germany), saf su sistemi (Younglin, aquaMAXTM Ultra 370 Series – Ultra Water Purification System, Korea), santrifüj (Sigma, 3K 18, Germany), terazi (Sartorious, CP224, Germany), vorteks (VWR International, VWR mixer, USA), otoanalizör (Ilab 300, Instrumentation Laboratory, Milano, Italy), ELISA-Spektrofotometre (Bio-Tek Instruments Inc., MWGt Lambda Scan 200, USA), homojenizatör (Heidolph, Silent Crusher M, Germany), bistüri, makas, pens, biopsy punch ve falkon tüp (15 ml) kullanıldı.

2.2. Kimyasal maddeler, solüsyonlar ve kitler

Çalışmada rat spesifik matriks metalloproteinaz 8 (MMP-8, Cusabio Life Science, China), transforme edici büyüme faktörü (TGF-β, Uscn Life Science Inc. Wuhan, China), trombosit bağlı büyüme faktörü (PDGF, Uscn Life Science Inc. Wuhan, China), epidermal büyüme faktörü (EGF, Uscn Life Science Inc. Wuhan, China) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF, Cusabio Life Science, China) ELISA kitleri, tiobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS, Cayman Chemical Company, Michigan, USA) ELISA kiti, streptozotosin ≥75% α-anomer basis, ≥98% (HPLC), powder (Sigma-Aldrich Co. USA), insan midkin (Powder, M3441-50UG, Sigma-Aldrich Co. USA), saf alkol (Merck Corporate Headquarters, USA), polivinyilpirolidon iyod (Batticon sol. 1000ml, Adeka, İstanbul), dekstroz (%5, 500 ml, Eczacıbaşı Baxter, İstanbul) ve tiyopental sodyum (Pental Sodyum, I.E. ULAGAY, İstanbul) kullanıldı.

2.3. Hayvan materyali

Çalışmada sağlıklı 108 adet Wistar Albino ırkı erkek rat (250-350 g, T.C. Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Ünitesi, Konya) kullanıldı.

Ratlar araştırmaya dâhil edilmeden, iki hafta boyunca ortama intibak etmeleri için herhangi bir uygulama yapılmadan barındırıldı. Deney süresi boyunca yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak giderildi. Hayvanlara birleşimi %12 nem, %23 ham protein, %3 ham yağ, %7 ham selüloz, %8 ham kül, %1,0-2,5 kalsiyum, %0,9 fosfor

ve %0,5-1 sodyumdan oluşan pelet yem verildi. Yem içeriğinde mısır, soya küspesi, razmol, bonkalite, yonca, melas, et-kemik unu, tavuk unu, sepiolit, DCP ve tuz mevcuttu.

Hayvanların barındırıldığı ortamın ışık, ısı ve nem düzeyleri kontrol altında tutuldu (12/12 saat ışık/karanlık–7:30/19.30, 22±2^{o}C, % 55±5 nem).

Deneye başlamadan önce T.C. Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kuruluna yapılan başvuru sonrasında tüm çalışma sürecinde hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek işlemlerin uygunluğuna dair Etik Kurul onayı (No:2013/059, 2013-139) alındı.

2.4. Streptozosinin (STZ) uygulamaya hazır hale getirilmesi

Streptozosin (STZ), 1 g'lık ambalajlar şeklinde temin edildi. Molekül ağırlığı 357 g olan sodyum sitrattan 0,1 molar alınarak distile suda çözdürüldü. Aynı şekilde molekül ağırlığı 210,14 g olan sitrik asitten 0,1 molar alınarak distile suda çözdürüldü. Bu iki çözelti pH'sı 4,5 olana kadar uygun miktarlarda karıştırılarak sitrat buffer çözeltisi elde edildi. Hazırlanan çözelti +4 ^{o}C'de soğutuldu. STZ, uygulama yapılacağı gün taze olarak, 20 mg/ml olacak şekilde hazırlanan sitrat buffer çözeltisi içinde çözdürüldü.

2.5. Midkinin uygulamaya hazır hale getirilmesi

Ratlardaki yaralara subkutan uygulama için "Human Midkine" kullanıldı. 50 µg toz midkin 500 µL saf su da çözdürülerek, 10 adet ependorf tüpe 50µl'lik porsiyonlar halinde stok olarak ayrıldı ve çalışma süresince -80 ^{o}C'de tutuldu.

Uygulamadan önce stoktaki ependorflardan bir tanesi açılarak 50 µL'sinde 5 µg midkin olan stoktan 10 µL alınarak, 990 ml ultra saf su ile sulandırıldı (1µg/mL midkin). Birinci sulandırma sonunda elde edilen 1µg/mL midkinden 100'er µL alınarak 10 eşit ependorfa bölündü ve ikinci sulandırma basamağına geçildi. İkinci sulandırmada, birinci sulandırma sonunda 100'er µL (100 ng/mL midkin) olarak ependorflara ayrılan midkinin üzerine 900 µL %0,09'luk serum fizyolojik ilave edildi. Son sulandırma sonucunda içerisinde 100 ng/mL olan midkin çözeltisi elde

edildi. Bu çözeltiler uygulama anına kadar -80 ^{o}C'de tutuldu. Uygulama anında çözdürülerek kullanıldı.

2.6. Deneysel diyabet oluşturulması

İki gün boyunca günde tek doz 40 mg/kg subkutan (SC) STZ uygulanan (Sindelar ve ark 1999) ratlara son uygulamadan hemen sonra STZ'nin oluşturabileceği olası ölümleri engellemek için 3 gün boyunca içme suları içerisinde %5'lik dekstroz çözeltisi verildi. STZ uygulamasından sonra kan glikoz seviyeleri belirlenene kadar başka bir uygulama yapılmadı.

2.7. Ratlarda glikoz seviyelerinin belirlenmesi ve deney grubuna alınması

İlk STZ uygulamasından 14 gün sonra diyabet grubu olarak ayrılan 54 adet ratın kuyruğundan kan alınarak otoanalizörde kan glikoz seviyeleri belirlendi. Açlık kan glikoz seviyeleri 300 mg/dl üzerinde olanlar diyabetli olarak kabul edildi (Qui ve ark 2007).

Diyabet kabul edilen ratlarda diyabetin diğer organlar ve deri üzerine olan olumsuz etkilerinin görülmesi amacıyla 7 gün uygun ortamda bekletildi. Bu süre içerisinde hiçbir uygulama yapılmadı (Dadpay ve ark. 2012).

2.8. Deney gruplarının oluşturulması

250-350 g ağırlığındaki 96 adet Wistar Albino erkek rat sağlıklı ve diyabetli olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Sağlıklı ve diyabetli olan ratlar kendi içlerinde de "serum fizyolojik" ve "midkin" uygulanan gruplar olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Sonuç olarak her bir grupta 24 adet rat içeren "sağlıklı (kontrol)", "sağlıklı+midkin", "diyabet (kontrol)" "diyabet+midkin" olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Her gruptan 6 hayvan yara oluşturulduktan sonraki 3., 7., 14. ve 28. günlerde ötenazi edilmek üzere ayrıldı (Çizelge 2.1). Bu gruplara ek olarak sağlıklı ve diyabetli 6 adet rat 0. saatte sırt bölgesinden hiç yara oluşturmadan ötenazi edilerek sadece derileri alındı.

Çizelge 2.1: Deney gruplarındaki rat sayıları.

Gruplar/Ötenazi Günleri	Yara oluşturulmadan once	3.Gün	7.Gün	14.Gün	28.Gün
Sağlıklı (kontrol)	6	6	6	6	6
Sağlıklı + Midkin		6	6	6	6
Diyabet (kontrol)	6	6	6	6	6
Diyabet + Midkin		6	6	6	6

2.9. Sağlıklı ve deneysel diyabetli ratlarda yara oluşturulması

Diyabetli ve sağlıklı ratlar tiyopental sodyum 20 mg/kg dozda intraperitoneal uygulanarak anestezi altına alındı. Ratların sırt bölgeleri traş edilerek tüy ve kıllardan temizlendi. Daha sonra bölgenin antisepsisi amacıyla %70'lik alkol ve daha sonra polivinyilpirolidon iyod kullanıldı. Sert plastik üzerine düzgün dairesel biçimli, birbirinden eşit uzaklıkta yara delikleri prototipleri oluşturuldu. Bu prototip delikler içerisinden biopsi punch ile ratların dorsal bölgelerinde epidermis ve dermis katlarını içine alan 4 adet doku kayıplı tam kalınlıkta yara oluşturuldu (Ballas ve Davidson 2001).

2.10. Sağlıklı ve deneysel diyabetli ratlarda yara bölgesine serum fizyolojik ve midkin uygulanması

Deney gruplarında bulunan toplam 108 adet rattan 48 adet rata ötenazi sürelerine kadar gün aşırı 10 ng/kg dozda SC, 4 adet doku kayıplı yaranın tam ortasındaki sağlam deri bölgesine midkin uygulandı. Buna eş değer olarak diğer 48 adet rata da aynı uygulama yolu ve dozaj rejiminde midkinin çözdürülmesinde kullanılan serum fizyolojik uygulandı.

2.11. Deney gruplarındaki ratlardan deri materyalinin toplanması

Yara oluşturulmadan (0.saat) sağlıklı ve diyabetik 12 adet rat tiyopental sodyum anestezisi altında sırt derileri traş edildi ve 4 cm^2'lik kare şeklinde deri alanı steril makas ve bistirü yardımıyla çıkarılarak kapaklı steril tüplere alındı. Tüpler

derin dondurucu (-80 ^{0}C) da dondurularak, daha sonra büyüme faktörleri ve antioksidan kapasitenin ölçümü için saklandı.

Yara oluşturulduğu gün, 0.gün kabul edilerek bundan sonraki 3., 7., 14. ve 28. günlerde her gruptan ayrılan 6 adet rat, tiyopental sodyum ile anestezi altına alındı. Sırt bölgeleri traş edilerek tüy ve kıllardan temizlendi ve yara bölgelerini içine alan 4 cm^2'lik kare şeklinde deri alanı steril makas ve bistirü yardımıyla çıkarılarak kapaklı steril tüplere alındı. Tüpler derin dondurucu (-80 ^{0}C) da donduruldu. Daha sonra büyüme faktörleri (EGF, VEGF, TGF-β, MMP-8, PDGF) ve antioksidan kapasitenin (TBARS) ölçümü için saklandı.

2.12. Deri materyalinin ELISA kitleri için hazırlanması

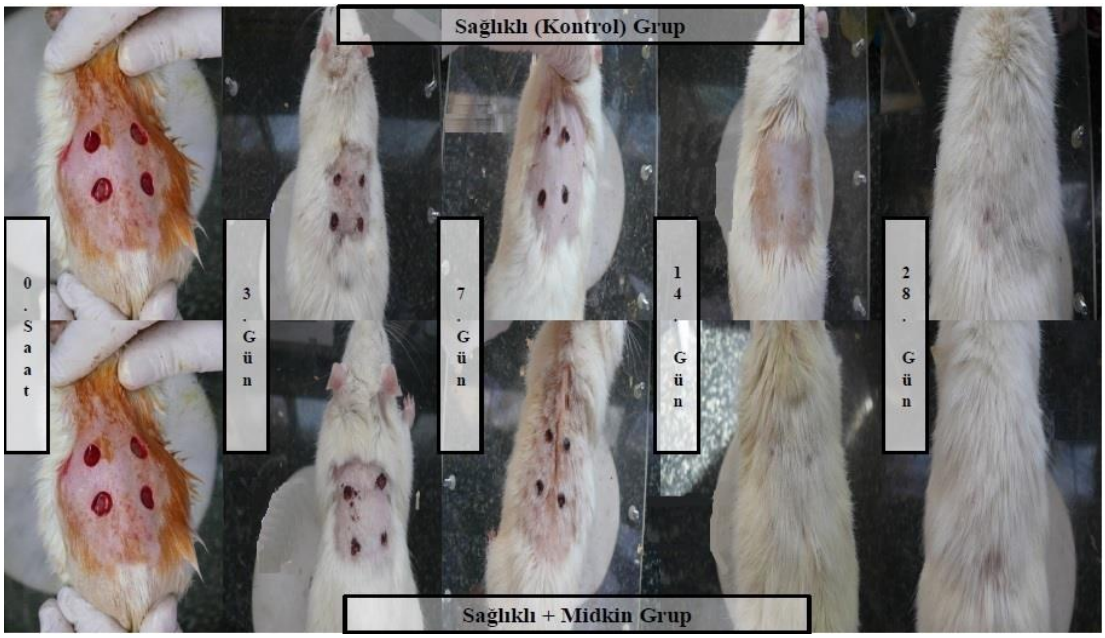
Uygun koşullarda (-80 ^{0}C) muhafaza edilen deri materyalinin yara bölgesi olan kısımları ELISA kitlerinin prosedürlerine uygun şekilde homojenizatör ile parçalandı. Daha sonra santrifüj edilerek süpernatant alındı. Kit prosedürlerine uygun şekilde işlendi.

2.13. İstatistik analizleri

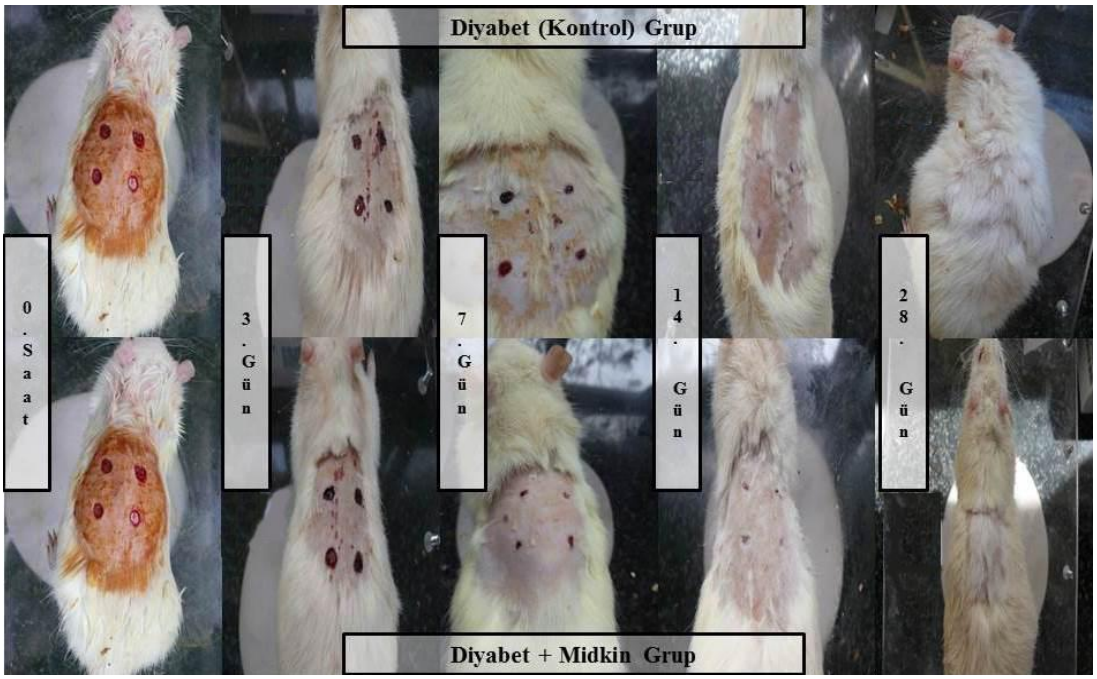
Tüm değerler ortalama ± Standart hata (SE) olarak gösterildi. Parametreler arasındaki istatistiksel farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testi ile belirlendi. Post-Hoc test olarak ise Duncan testi (IBM SPSS Statistics 19.0) kullanıldı. Tüm analizlerde güven aralığı %95 olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamda önemlilik sınırı olarak $P<0.05$ değeri alındı.

3.BULGULAR

Yara oluşumundan sonra derideki fiziksel bazı değişiklikler fotoğraflanarak gözlendi (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3). Midkin uygulanan gruplarda yara iyileşmesinin dış bakısında daha iyi ve daha hızlı iyileşme olduğu gözlendi. Diyabet ve sağlıklı gruplardaki midkin uygulmasında ise sağlıklı+midkin uygulanan grupta, yara iyileşmesinin çok daha hızlı olduğu ve yara bölgesindeki kıllanmanın çok kısa sürede, çok hızlı şekilde arttığı belirlendi.



Şekil 3.1. Sağlıklı ve Sağlıklı + Midkin Gruplarının Yara Oluşturulduktan Sonra Farklı Günlerdeki (0., 3., 7., 14., 28.) Yara Bölgelerinin Makroskobik Görünümleri



Şekil 3.2. Diyabet ve Diyabet + Midkin Gruplarının Yara Oluşturulduktan Sonra Farklı Günlerdeki (0., 3., 7., 14., 28.) Yara Bölgelerinin Makroskobik Görünümleri



Şekil 3.3. Sağlıklı + Midkin ve Diyabet + Midkin Gruplarının Yara Oluşturulduktan Sonra Farklı Günlerdeki (0., 3., 7., 14., 28.) Yara Bölgelerinin Makroskobik Görünümleri

Deney gruplarındaki ratların derilerinden ölçülen EGF miktarı incelendiğinde sağlıklı+midkin grubunda günler arasında düzenli bir artışın olduğu görüldü ve yara oluşturmadan önce (0. Saat) ile karşılaştırıldığında 14. ve 28. günlerde istatistiki açıdan anlamlı bir fark gözlendi ($p<0.05$). Aynı günler arasında karşılaştırılma yapıldığında 3. günde sağlıklı (kontrol) grupta EGF değerinin bütün gruplardan düşük olduğu ve 28. gün sağlıklı+midkin değerinin diğer gruplardan yüksek ($p<0.05$) olduğu belirlendi (Çizelge 3.1).

Sağlıklı ve diyabetik ratlarda deneysel oluşturulmuş yaralarda midkin uygulamasının MMP-8 üzerine etkisi değerlendirildiğinde sağlıklı (kontrol) grupta MMP-8 seviyesinin dalgalı bir seyir izlediği, yara oluşturmadan önce (0.saat) düşük olan MMP-8 seviyesinin 3. günde arttığı ($p<0,05$), daha sonraki örnekleme zamanlarında düştüğü gözlendi ($p<0,05$). Sağlıklı+midkin grubunda ise lineer bir seyir gözlendi. Diyabet (kontrol) grubunda grup içinde herhangi bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Ancak diyabet+midkin grubunda bu durumun değiştiği 0. saatten sonra MMP-8 oranının azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Aynı günler arasında 3. ve 7. günlerde sağlıklı (kontrol) grup düzeylerinin diğer gruplardan yüksek ($P<0.05$) olduğu tespit edidi (Çizelge 3.2).

Araştırmada PDGF değerlerinin bütün gruplarda günler arasında dalgalı seyir izlediği, sağlıklı (kontrol) grupta 7. gün, sağlıklı+midkin grubunda 14. gün, diyabet (kontrol) grubunda 3. gün ve diyabet + midkin grubunda 14. gün en yüksek ($p<0.05$) düzeye çıktığı belirlendi. Sağlıklı (kontrol) grupta 0. saat ve 28. gün, diğer gruplarda ise 0. saat en düşük ($p<0.05$) düzeyde belirlendi. Aynı günler arasında, 3. günde diyabetik (kontrol) grupta ve 14. günde sağlıklı+midkin grubunda ($p<0.05$) PDGF seviyesi yüksek olarak ölçüldü (Çizelge 3.3).

Elde edilen TGF-β verileri ele alındığında sağlıklı (kontrol) grupta günler arası bir fark gözlenmezken, sağlıklı+midkin grubunda 0. saatle karşılaştırıldığında 28. gün değeri yüksek olarak belirlendi ($p<0,05$). Diyabet (kontrol) grubunda TGF-β'nın dalgalı bir seyir izlediği ve 3. günden sonra bir düşüş olduğu gözlendi ($p>0,05$). Diyabet+midkin grubunda 14. güne kadar TGF-β seviyelerinde düzenli bir yükseliş olduğu gözlendi. 3. ve 14. günler karşılaştırıldığında 14. günde TGF-β seviyesinin istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$). Aynı günler arasında 3. günde diyabet (kontrol) grubunda istatistiki açıdan diğer gruplardan daha

yüksek olduğu gözlendi ($p<0,05$). 14. ve 28. günlerde sağlıklı+midkin grubunda, sağlıklı (kontrol) gruba göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). 28. Gün sağlıklı+midkin grubunda TGF-β seviyesinin diğer bütün gruplardan istatistiki olarak önemli derecede yüksek seviyede olduğu belirlendi ($p<0,05$), (Çizelge 3.4).

Deney gruplarındaki VEGF değerleri incelendiğinde, 14. günde sağlıklı+midkin ve diyabet+midkin gruplarında bu değerin yüksek ($p<0.05$) düzeylere çıktığı belirlendi. Aynı günler arasındaki değerler incelendiğinde 3. günde sağlıklı(kontrol) grubunun diyabet+midkin grubundan yüksek ($p<0.05$) olduğu gözlendi. Araştırmanın 7. gününde sağlıklı+midkin grup değerinin diğer gruplardan yüksek ($p<0.05$) olduğu, 14. gün diyabet (kontrol) grubu VEGF düzeyinin, sağlıklı+midkin grubundan düşük ($p<0.05$) olduğu belirlendi (Çizelge 3.5).

Sağlıklı ve diyabetik ratlarda deneysel oluşturulmuş yaralarda midkin uygulamasının oksidatif stresin bir belirteci olan tiobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS) üzerine etkisi değerlendirildiğinde sağlıklı (kontrol) grupta yara oluşturulduktan sonra anlamlı bir düşüşün olduğu gözlendi ($p<0,05$). Sağlıklı+midkin grubu değerlerinin sağlıklı (kontrol) grubuna benzer olduğu gözlendi. Diyabet (kontrol) ve diyabet+midkin gruplarında yara oluşturulmadan önce diyabete bağlı gelişen oksidatif stresin çok yüksek olduğu, ancak yara oluşumu ile oksidatif stresin azaldığı gözlendi ($p<0,05$). Gün içi farklılıklar değerlendirildiğinde ise yara oluşturulmadan önce sağlıklı (kontrol) ve diyabet (kontrol) grupları arasında önemli bir farkın olduğu belirlendi ($p<0,05$). Ancak 28. güne kadar sağlıklı (kontrol) ve diyabet (kontrol) yaralarda istatistiki olarak herhangi bir farkın olmadığı gözlendi. 28. günde diyabet (kontrol) grubunda TBARS değerinin en yüksek olduğu ve diğer gruplardan farklı olduğu gözlendi ($p<0,05$) (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.1: Deneysel Yara Oluşturulmuş Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Midkin (10 ng/kg dozda, SC, 48 saat ara ile) Uygulamasının EGF Üzerine Etkisi (Ortalama±SE).

EGF(ng/100mg doku) Gruplar/Günler	Yara oluşturulmadan once	Yara Oluşumdan Sonraki Günler			
	0.Saat	3.Gün	7.Gün	14.Gün	28.Gün
Sağlıklı (kontrol)	$1,72 \pm 0,40^{A,a}$	$1,63 \pm 0,13^{A,b}$	$1,99 \pm 0,23^{A,a}$	$2,48 \pm 0,66^{A,a}$	$2,50 \pm 0,22^{A,b}$
Sağlıklı + Midkin	$1,72 \pm 0,40^{C,a}$	$2,57 \pm 0,29^{BC,a}$	$2,83 \pm 0,31^{BC,a}$	$3,67 \pm 0,29^{AB,a}$	$4,19 \pm 0,55^{A,a}$
Diyabet (kontrol)	$1,88 \pm 0,28^{B,a}$	$2,60 \pm 0,25^{AB,a}$	$2,79 \pm 0,28^{A,a}$	$2,01 \pm 0,29^{AB,a}$	$2,69 \pm 0,22^{AB,b}$
Diyabet + Midkin	$1,88 \pm 0,28^{A,a}$	$2,19 \pm 0,43^{A,ab}$	$2,54 \pm 0,43^{A,a}$	$2,77 \pm 0,98^{A,a}$	$2,40 \pm 0,43^{A,b}$

Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) ve aynı satırdaki farklı harfler (^{A,B,C}) istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 3.2: Deneysel Yara Oluşturulmuş Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Midkin (10 ng/kg dozda, SC, 48 saat ara ile) Uygulamasının MMP-8 Üzerine Etkisi (Ortalama±SE).

MMP-8 (ng/100mg doku) Gruplar/Günler	Yara oluşturulmadan once	Yara Oluşumdan Sonraki Günler			
	0.Saat	3.Gün	7.Gün	14.Gün	28.Gün
Sağlıklı (kontrol)	$70,20 \pm 53,00^{B,a}$	$314,9 \pm 78,97^{A,a}$	$92,23 \pm 43,56^{B,a}$	$59,59 \pm 40,68^{B,a}$	$25,39 \pm 12,35^{B,a}$
Sağlıklı + Midkin	$70,20 \pm 53,00^{A,a}$	$67,72 \pm 26,73^{A,b}$	$8,65 \pm 1,33^{A,b}$	$59,60 \pm 51,81^{A,a}$	$22,89 \pm 14,04^{A,a}$
Diyabet (kontrol)	$29,90 \pm 19,32^{A,a}$	$3,67 \pm 1,70^{A,b}$	$19,97 \pm 14,44^{A,b}$	$3,48 \pm 3,33^{A,a}$	$3,17 \pm 1,36^{A,a}$
Diyabet + Midkin	$29,90 \pm 19,32^{A,a}$	$6,85 \pm 2,77^{B,b}$	$1,22 \pm 0,46^{B,b}$	$0,91 \pm 0,16^{B,a}$	$0,66 \pm 0,48^{B,a}$

Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) ve aynı satırdaki farklı harfler (^{A,B,C}) istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 3.3: Deneysel Yara Oluşturulmuş Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Midkin (10 ng/kg dozda, SC, 48 saat ara ile) Uygulamasının PDGF Üzerine Etkisi (Ortalama± SE).

PDGF(ng/100mg doku) Gruplar/Günler	Yara oluşturulmadan once	Yara Oluşumdan Sonraki Günler			
	0.Saat	3.Gün	7.Gün	14.Gün	28.Gün
Sağlıklı (kontrol)	$1,72 \pm 0,62^{C,a}$	$15,8 \pm 2,06^{AB,b}$	$18,0 \pm 3,68^{A,a}$	$7,92 \pm 4,27^{BC,c}$	$6,08 \pm 1,13^{C,a}$
Sağlıklı + Midkin	$1,72 \pm 0,62^{C,a}$	$15,1 \pm 1,87^{B,b}$	$18,7 \pm 2,36^{B,a}$	$26,0 \pm 2,73^{A,a}$	$14,2 \pm 2,80^{B,a}$
Diyabet (kontrol)	$1,81 \pm 0,93^{C,a}$	$25,3 \pm 1,05^{A,a}$	$18,1 \pm 2,20^{B,a}$	$14,4 \pm 1,98^{B,bc}$	$16,1 \pm 3,38^{B,a}$
Diyabet + Midkin	$1,81 \pm 0,93^{C,a}$	$16,4 \pm 1,07^{AB,b}$	$18,0 \pm 2,23^{AB,a}$	$24,1 \pm 4,46^{A,ab}$	$11,5 \pm 5,65^{BC,a}$

Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) ve aynı satırdaki farklı harfler (^{A,B,C}) istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 3.4: Deneysel Yara Oluşturulmuş Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Midkin (10 ng/kg dozda, SC, 48 saat ara ile) Uygulamasının TGF-β Üzerine Etkisi (Ortalama± SE).

TGF-β (pg/100mg doku) Gruplar/Günler	Yara oluşturulmadan once	Yara Oluşumdan Sonraki Günler			
	0.Saat	3.Gün	7.Gün	14.Gün	28.Gün
Sağlıklı (kontrol)	$8,45 \pm 2,85^{A,a}$	$5,30 \pm 0,69^{A,b}$	$8,45 \pm 0,78^{A,a}$	$6,49 \pm 1,85^{A,b}$	$9,93 \pm 1,61^{A,b}$
Sağlıklı + Midkin	$8,45 \pm 2,85^{B,a}$	$6,58 \pm 1,32^{B,b}$	$10,2 \pm 2,42^{AB,a}$	$13,0 \pm 2,21^{AB,a}$	$15,8 \pm 1,72^{A,a}$
Diyabet (kontrol)	$7,49 \pm 0,56^{AB,a}$	$11,7 \pm 1,19^{A,a}$	$7,68 \pm 1,46^{B,a}$	$7,55 \pm 1,63^{B,ab}$	$8,82 \pm 0,92^{AB,b}$
Diyabet + Midkin	$7,49 \pm 0,56^{AB,a}$	$6,06 \pm 0,56^{B,b}$	$9,28 \pm 1,45^{AB,a}$	$10,3 \pm 1,16^{A,ab}$	$8,98 \pm 1,78^{AB,b}$

Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) ve aynı satırdaki farklı harfler (^{A,B,C}) istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 3.5: Deneysel Yara Oluşturulmuş Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Midkin (10 ng/kg dozda, subkutan, 48 saat arayla) Uygulamasının VEGF Üzerine Etkisi (Ortalama± SE).

VEGF (pg/100mg doku) Gruplar/Günler	Yara oluşturulmadan once	Yara Oluşumdan Sonraki Günler			
	0.Saat	3.Gün	7.Gün	14.Gün	28.Gün
Sağlıklı (kontrol)	$206,6 \pm 56,08^{A,a}$	$473,6 \pm 92,31^{A,a}$	$225,8 \pm 50,41^{A,b}$	$405,5 \pm 244,4^{A,ab}$	$186,0 \pm 63,98^{A,a}$
Sağlıklı + Midkin	$206,6 \pm 56,08^{C,a}$	$323,1 \pm 154,6^{C,ab}$	$793,5 \pm 109,9^{AB,a}$	$922,8 \pm 193,2^{A,a}$	$454,8 \pm 123,2^{BC,a}$
Diyabet(kontrol)	$166,8 \pm 65,20^{A,a}$	$193,8 \pm 100,7^{A,ab}$	$206,8 \pm 84,9^{A,b}$	$47,34 \pm 10,0^{A,b}$	$310,9 \pm 153,1^{A,a}$
Diyabet + Midkin	$166,8 \pm 65,20^{B,a}$	$89,7 \pm 42,11^{B,b}$	$83,1 \pm 24,90^{B,b}$	$435,3 \pm 141,6^{A,ab}$	$130,7 \pm 29,5^{B,a}$

Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) ve aynı satırdaki farklı harfler (^{A,B,C}) istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 3.6: Deneysel Yara Oluşturulmuş Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Midkin (10 ng/kg dozda, SC, 48 saat ara ile) Uygulamasının TBARS Üzerine Etkisi (Ortalama± SE).

TBARS (μM)/25 mg doku) Gruplar/Günler	Yara oluşturulmadan once	Yara Oluşumdan Sonraki Günler			
	0.Saat	3.Gün	7.Gün	14.Gün	28.Gün
Sağlıklı (kontrol)	$1,99 \pm 0,46^{A,b}$	$0,88 \pm 0,12^{B,a}$	$0,82 \pm 0,10^{B,a}$	$1,06 \pm 0,36^{B,a}$	$1,04 \pm 0,17^{B,b}$
Sağlıklı + Midkin	$1,99 \pm 0,46^{A,b}$	$2,16 \pm 0,97^{A,a}$	$1,79 \pm 0,85^{A,a}$	$2,25 \pm 1,10^{A,a}$	$0,73 \pm 0,03^{A,b}$
Diyabet (kontrol)	$25,5 \pm 8,72^{A,a}$	$0,97 \pm 0,16^{B,a}$	$1,11 \pm 0,16^{B,a}$	$1,40 \pm 0,60^{B,a}$	$1,49 \pm 0,19^{B,a}$
Diyabet + Midkin	$25,5 \pm 8,72^{A,a}$	$2,32 \pm 1,45^{B,a}$	$0,91 \pm 0,80^{B,a}$	$0,79 \pm 0,05^{B,a}$	$0,84 \pm 0,13^{B,b}$

Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) ve aynı satırdaki farklı harfler (^{A,B,C}) istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

4.TARTIŞMA

Yara iyileşmesi, bütünlüğü bozulmuş derinin dış ortama karşı koruyucu faaliyetleri ve metabolizmanın fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için yeniden oluşturması anlamına gelen kompleks bir olaydır. Yara iyileşmesi multiselüler ve multifaktöriyel olaylar zinciridir. Bu süreç keratinosit, fibroblast, endotelyal hücre, makrofaj ve trombosit gibi hücrelerin etkileriyle oluşmaktadır. Proses birçok büyüme faktörü, sitokin ve kemokinlerin biraraya gelmesiyle tamamlanmaktadır (Barrientos ve ark 2008).

Çalışmada belirlenen veriler değerlendirildiğinde her bir büyüme faktörünün yara iyileşmesinin farklı aşamalarında ya da yaranın iyileşmesinde farklı yönlerden etkilerinin olduğu literatülerde belirtilmiştir (Verderio ve ark 2004, Barrientos ve ark 2008, Karasu ve Bakır 2008).

Deneysel ve klinik yara çalışmalarında EGF'nin yara iyileşmesi üzerine pozitif etkilerinin olduğu bildirilmiştir. EGF, keratinositlerin uyarılmasını sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Santoro ve Gaudino 2005).

Yara bölgesindeki epidermis ve kıl folikülleri kendi kendine yenilenen temel yapılar olup aynı zamanda bu yenilenmenin denge halinde devam edebilmesi için keratinosit hücrelerinin varlığı gereklidir. Keratinosit hücrelerinin kontrolü de EGF reseptör/ligand sistemine bağlıdır. Bu sistem keratinositlerin regülasyonunu ve derideki hemostazisi sağlamaktadır (Bluemenberg 2013, Nanba ve ark 2013). Ancak yara bölgesindeki keratinositlerin yeniden oluşabilmesi için ve epitelizasyonun yeniden sağlanabilmesi yara kenarlarındaki sağlam kıl köklerine ve ter bezlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Xue ve ark 2006).

Yara kenarlarındaki keratinositlerin çoğalamaması yaranın kapanmasına engel olmaktadır. Bu durum keratinositlerin o bölgeye göç edememesi ya da göç etmeleri için gerekli olan sinyallerin oluşmaması ile açıklanmaktadır (Li ve ark 2007). Midkinin keratinositler üzerindeki direkt etkisi ya da inflamatuar hücreler üzerindeki etkisiyle sinyal oluşumunu sağlaması yara kapanmasının hızlanmasında etkili olduğunu düşündürmektedir.

Epidermisin ve kıl foliküllerinin yaradan sonra tekrar oluşabilmesini sağlayan keratinositler epidermisin bazal katmanında yer alır. Epidermis ve kıl foliküllerinin hemostazisi için EGF reseptör sinyalleri gereklidir. Bu sinyallerdeki düzensizlikler kanser ya da diyabet gibi kronik inflamatuar bozukluklara neden olabilir (Nanba ve ark 2013). Yara bölgesinin perifer kısımlarından keratinositlerin proliferasyonu ve migrasyonu ile önce geçici bir matriks daha sonra yeni epitel doku oluşmakta ve yara iyileşmesi gerçekleşmektedir (Santoro ve Gaudino 2005). EGF, keratinosit regülasyonunu sağlamasının yanında apoptotik sinyal genlerini de baskılamaktadır. Ayrıca yara bölgesinde EGF'nin keratinosit regülasyonunu artırmasına bağlı olarak yaralı dokunun dış ortama karşı koruması sağlanır (Santoro ve Gaudino 2005, Bluemenberg 2013). Aynı zamanda EGF, anjiojenik ve diğer büyüme faktörlerinin üretimine neden olmaktadır (Bluemenberg 2013). Mevcut çalışmada diyabetik ratlarda EGF düzeyinin düzensiz seyrettiği (Çizelge 3.1), buna bağlı olarak epidermal iyileşme ve derideki kıllanma da gecikme ve bozukluklar belirlendi (Şekil 3.2, 3.3) Aynı zamanda diyabetik grupta kıllanmadaki yetersizlik ve bozukluklar keratinosit hücrelerindeki yetersizliği ya da hemostazisinde bir bozukluğun göstergesi olarak değerlendirilebilir. Midkin uygulanan gruplarda kıllanmanın ve yara iyileşmesinin daha fazla olması hem EGF sinyallerine hemde keratinosit miktarındaki ya da hemostazisdeki değişikliklere bağlı olabilir. Sağlıklı+midkin grubundaki fiziksel değişiklikler incelendiğinde bu gruptaki iyileşmenin makroskobik olarak da daha hızlı olduğu görülmektedir. Bu durum; EGF seviyesinde artış, diğer büyüme faktörlerinin ve derinin normal yapısında bulunan kollajen ve fibroblast miktarını artırarak bu iyileşmenin yapısal ve makroskobik olarak kaliteli olmasına neden olmasından kaynaklanabilir.

Gümüş sülfodiazin (Ag-SD) ve EGF ile yapılan bir çalışmada EGF'nin tek başına ya da Ag-SD+EGF kombinasyonunun sadece Ag-SD uygulamasından daha iyi olduğu makroskobik/mikroskobik değerlendirmeler ve yara kapanmasının ölçümü ile belirlenmiştir. Araştırmacılar yaradaki erken kapanmanın EGF'nin hücre proliferasyonunu artırıcı özelliğinden kaynaklandığını, Ag-SD grubundaki gecikmenin ise fibroblast ve keratinositler üzerine inhibe edici etkilerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Lee ve ark 2005). Mevcut araştırmada özellikle sağlıklı+midkin grubunda midkinin EGF seviyesini arttırdığı (Çizelge 3.1) ve buna bağlı olarak epidermal iyileşmeyi ve muhtemelen keratinosit miktarını artırarak

kıllanmayıda arttırdığı düşünüldü (Şekil 3.1). Ancak diyabet+midkin grubunda bu etkisinin zayıf kaldığı (Şekil 3.2) ve diyabete bağlı oluşan EGF seviyesindeki dalgalanmayı azalltığı gözlendi. Diyabet+midkin grubunda sağlıklı+midkin grubundaki kadar etkili olmaması, diyabetin erken döneminde var olan inflamasyon yetersizliğinin ve midkinin muhtemel potansiyel etkilerine aracılık etmesi beklenen hücresel unsurların ortamda bulunmamasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. EGF'nin, sitokin ve diğer büyüme faktörlerinin seviyesini erken dönemlerde artırması (Bluemenberg 2013) ile ortamdaki yangıyı tetikleyerek sağlıklı+midkin grubunda yara iyileşmesinin daha hızlı olmasını sağlamış olabilir.

EGF, kutaneöz yara iyileşmelerinde epitelyal hücre migrasyonu ve proliferasyonu sağladığı için önemli büyüme faktörlerinden biridir. Yaralanmadan hemen sonra EGF salınımı artmakta ve EGF, epidermal morfogenezisi, deri hemostazisini sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Shirakata ve ark2005, Barrientos ve ark 2008). Genetik olarak EGF üretemeyen farelerde yapılan çalışmada yara iyileşmesinin geciktiği ve EGF ailesindeki maddelerin yara iyileşmesinde birçok hücre tipinin farklılaşması, regülasyonu, proliferasyonu ve migrasyonunu sağladığı belirtilmiştir. Bunun da keratinositlerin varlığında gerçekleştiği düşünülmektedir. EGF keratinosit migrasyonunu artırmakta ve yara kenarlarından merkeze doğru epitel oluşumunu sağlamaktadır (Shirakata ve ark 2005). Mevcut araştırmada da özellikle sağlıklı+midkin grubunda EGF seviyesinin arttığı (Çizelge 3.1) buna bağlı olarak yaranın daha hızlı kapandığı, kıllanmanın arttığı ve EGF artışının keratinosit miktarını arttırdığı düşünülmektedir. Ancak diyabet grubunda EGF artışının düzenli olmadığı (Çizelge 3.1), bu durumun yansıması olarak yara iyileşmesinin arzu edilen düzeyde olmadığı görüldü (Şekil 3.2). Diyabet grubundaki kıllanmanın yetersizliği ve iyileşmenin gecikmesinin bir nedenin de keratinositlerin yara bölgesine yeterli miktar da göç etmemelerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Spravchikov ve ark (2001), yüksek glikoz konsantrasyonunda keratinosit proliferasyonun azaldığını, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasının bozulduğunu belirtmişlerdir.

FGF ve EGF'nin yara üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada EGF uygulanan grupta yara kapanma hızının 21. günden 24. güne kadar arttığı ve 28. günde tamamen kapandığı ifade edilmiştir. Ayrıca FGF ve EGF uygulanan gruplarda yara bölgesinin hafif kırmızı ve tamamen epitelize olduğu, kontrol grubunda ise koyu

kırmızı ve daha kalın bir epitelin varlığı tanımlanmıştır (Xing ve ark 2013). Mevcut araştırmada da sağlıklı+midkin grubunda yara bölgesinin 14. gün de tamama yakınının kapandığı ve yara bölgesinin hafif kırmızı olduğu görüldü (Şekil 3.1). Ancak diğer gruplarda iyileşmenin 28. günde tamamının kapandığı ve yara bölgelerinin koyu kırmızı olduğu görüldü. Bu farklılık özellikle sağlıklı+midkin grubunda midkinin etkilerine bağlı olarak 28. güne kadar artan EGF seviyesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca diyabet+midkin grubunda da bu artıştan söz edilebilir (Çizelge 3.1). Ancak bu gruptaki EGF seviyesindeki dalgalanmaların ve diğer büyüme faktörlerinin yetersiz miktarlarda salgılanmalarına bağlı sağlıklı+midkin grubu kadar kaliteli ve hızlı iyileşmenin sağlanmadığı belirlendi. Bu da diyabete bağlı olarak gelişen büyüme faktörlerinin miktarlarının azalmasına bağlanabilir.

Xing ve ark (2013) EGF ve FGF uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre damarlaşmanın daha erken başladığı belirtilmiştir. EGF grubundaki iyileşmenin hızlı ve kaliteli olması erken dönemde ve metafaz aşamasında fibroblast proliferasyonuna, kollajen sekresyonuna ve damarlaşmaya bağlanmıştır. Ayrıca enfeksiyona karşı deriyi koruması ve hipertrofik skar doku oluşumunu azaltması EGF'nin diğer önemli etkileri olarak belirtilmiştir. Mevcut araştırmada sağlıklı+midkin grubunda erken dönemdeki iyileşme midkinin EGF seviyesini artırarak damarlaşmayı ve kollajen sekresyonunu artırmasına bağlı olabilir. Midkinin damarlaşmayı artırıcı etkisi, vasküler endotelin oluşmasında gerekli en önemli büyüme faktörü olan VEGF seviyesini artırması ile de açıkca belirtilebilir (Çizelge 3.5).

Yara iyileşmesi ve yaranın eski halini alabilmesi için anjiogenezisin çok önemli olduğu, keratinositler ve makrofajların anjiojenik faktörlerin salgılanması için önemli bir kaynak görevi gördüğü bildirilmiştir (Gillitzer ve Goebeler 2001). Mevcut araştırmada sağlıklı+midkin grubunda kıllanma ve VEGF değerinin artışına bağlı anjiogenezisin ve buna bağlı yara iyileşmesinin hızlanmasındaki en önemli faktörlerin, midkinin indüklediği keratinosit ve makrofaj hücrelerinin olduğu düşünülmektedir.

Sharma ve ark (2006) genetik diyabetli farelerde yaptığı çalışmada diyabetik grupta yara iyileşmesi morfolojik açıdan ve ayrıca anjiopoetin 2, matriks metalloproteinaz ve VEGF gibi bazı yara iyileşmesini belirleyici unsurların gen ekspresyonlarının belirlenmesi ile değerlendirilmiştir. Damarlaşma da etkili olan

faktörlerin (VEGF, anjiopoeietin 2, v.s.) diyabetik yaralarda düşük seyrettiği bildirilmiştir. Ayrıca kollajen, yeni damarlaşmalar ve granulasyon dokusunun oluşması için gerekli olan osteopontin seviyesi diyabetik yaraların erken döneminde düşük seviyedeyken, sağlıklı farelerin yaralarında erken dönemde yüksek düzeyde olduğu ifade edilmiştir. Bu seviyenin diyabetik farelerin erken dönemlerinde düşük olması nekroz ve inflamasyonun fazla olmasına bağlanmıştır. Mevcut araştırma da dışardan midkin uygulanarak diyabetli ratlardaki yaranın erken döneminde yangının ve anjiogenezisin artırılarak iyileşmenin hızlandırılması amaçlanmış ve sağlıklı ratlarda bu amaca ulaşılmıştır. Ancak midkinin anjiogenez ve epitelizan etkileri, diyabetlilerde erken dönemdeki yangısal hücrelerin yetersizliğine bağlı olarak diyabetik yara iyileşmesini düzeltememiştir.

Anjiogenezis, re-epitelizasyon, hücre migrasyonu ve yeni granulasyon dokusunun oluşabilmesi için ekstra selüler matriksin (ECM) kontrollü bir şekilde degradasyonu gerekir (Xue ve ark 2006). Matriks metalloproteinazlar (MMP) ECM degradasyonu için gerekli büyüme faktörleridir. Geçici matriksin ortadan kaldırılıp yeniden oluşturulması ve hücre migrasyonunun oluşabilmesinde önemli yer tutmaktadır (Santoro ve Gaudino 2005). MMP, keratinosit, fibroblast ve inflamatuar hücrelerin farklı tiplerinden sentezlenmektedir. Epidermal hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu sırasında MMP sentezi artmaktadır. Sağlıklı dokularda MMP sentezi az miktardadır (Martins ve ark 2013). Kollajenaz 2 olarak da bilinen MMP-8 sağlıklı canlılardaki yaralanmalarda apoptozisi ve anti-inflamasyonu sağlamaktadır (Xue ve ark 2006). MMP-8 sağlıklı dokularda inaktif olarak sentezlenir ve yaralanma veya herhangi bir inflamasyon durumlarında aktif hale geçer, yara bölgesine ilk göç eden hücreler olan nötrofillerden sentezleri artar (Lint ve Libert 2006).

Özellikle diyabetik insanlar ve hayvanlarda deride bağ dokuyu oluşturan kollajen ve glikozaminoglikan, fibroblastlardan sentezlerinin azalmasına bağlı miktarları azalmaktadır. Ayrıca bu tip vakalarda nitrik oksit miktarının azalmasına bağlı olarak kollajen sentezinin azaldığı da belirtilmiştir. Bu azalma ve diğer büyüme faktörlerinin de etkisiyle MMP miktarı artar, ekstraselüler matriksin oluşumu azalır ve yara iyileşmesi gecikir (Blakytny ve Jude 2006). Kronik yaralarda ve diyabet durumlarında MMP seviyesinin artışına bağlı olarak ECM'in aşırı yıkımlanması sonucu yara iyileşmesi gecikmektedir (Martins ve ark 2013). Fernandez ve ark

(2007), MMP-8 seviyesindeki değişikliklerin MMP-13 tarafından kompanze edilebileceğini bildirmiş ve MMP-8'in yara iyileşmesi için mutlak gerekli bir faktör olduğu vurgulamıştır. Diyabetik farelerde yaranın akut fazında nötrofillerin göçü yetersiz olmakta ve buna bağlı olarak yaranın ilk aşamalardaki iyileşme süreci gecikmektedir (Lint ve Libert 2006). MMP-8 negatif transjenik farelerde yaranın erken dönemlerinde inflamatuar hücrelerin yetersiz olduğu, ileriki aşamalarda nötrofil apoptozisinin yetersiz olması ve makrofaj birikiminin artmasına bağlı yara iyileşmesinin geciktiği vurgulanmıştır (Fernandez ve ark 2007).

Mevcut çalışmada MMP-8 seviyesi sağlıklı ve sağlıklı+midkin grubunda normal seviyelerde seyretmesine karşın, diyabetik gruplarda bu seviyenin çok düşük olduğu belirlendi. Bu çalışmada MMP-8 seviyelerinin diyabetik gruplarda düşük bulunmasının muhtemel sebebi inflamatuar hücrelerin yara bölgesine geç gelmesi ve bu bölgede kronik bir inflamasyon şekillendirmeleridir. Önceden belirtildiği gibi MMP-8'den noksan farelerde yapılan çalışmada nötrofil infiltrasyonunun yetersiz olmasına bağlı yara iyileşmesinin geciktiği belirtilmiş ve MMP-8'in yara iyileşmesi için predominant kollajenaz olduğu belirtilmiştir (Fernandez ve ark 2007). Mevcut araştırmada da diyabete bağlı olarak yaranın ilk dönemlerinde muhtemeldir ki nötrofil göçü düşük miktarlardadır. Bu çalışmada midkin ile nötrofil göçünün yaranın ilk günlerinden itibaren artırılmasına bağlı büyüme faktörlerinin ve inflamasyonun artırılması amaçlanmıştı. Fakat diyabetik grupta bu amaca ideal ölçüde ulaşılamamıştır. Bu durumun muhtemel gerekçesi midkinin anjiogenezisi ve epitelizasyonu artırıcı özellikleri yanında diyabetik yara iyileşmesinde etkili olan multifaktöriyel diğer nedenler üzerine etkili olmaması olabilir. MMP-8 seviyesindeki artışın sağlanamaması da buna bir örnek oluşturmaktadır. Ayrıca MMP-8 seviyesinin azalmasına bağlı olarak diyabetik gruplarda özellikle yaranın geç evrelerinde nötrofil apoptotizisinin azaldığı düşünülmektedir. Özetle midkin, MMP yönünden değerlendirildiğinde diyabetik gruplarda yara iyileşmesinin erken evrelerinde ekstraselüler matriksin degradasyonunda yeterince etkili olamamaktayken, geç evrede makrofaj infiltrasyonu ve inflamatuar hücrelerin aşırı artışına bağlı yara iyileşmesinin geciktiği düşünülmektedir. Bununla birlikte MMP ve MMP intihibitörleri arasındaki dengenin bozulmasına bağlı yara iyileşmesi gecikmiş olabilir.

MMP-8 özellikle lökosit fonksiyonları ve inflamasyon için anahtar rol oynamaktadır. MMP-8 yetersizliğinde yara iyileşmesi olumsuz yönde etkilenmektedir (Xue ve ark 2006). Mevcut çalışmada MMP-8, diyabetik gruplarda çok düşük seviyelerdeyken, sağlıklı gruplarda dalgalı bir seyir izlediği belirlendi (Çizelge 3.2). Diyabetik gruplarda MMP-8 seviyesinin düşüklüğüne bağlı olarak lökosit infiltrasyonu bozulmuş, inflamatuar etkiler de regüle edilememiş ve yara iyileşmesi istenilen şekilde sağlanamamış olabilir. Sağlıklı gruplarda MMP-8 seviyelerindeki dalgalanmaya bağlı olarak inflamasyon değişkenlik göstermiş ancak dışardan midkin uygulaması ile inflamasyon istenilen seviyelerde tutulmuş ve olumlu şekilde yara kapanması sağlanmıştır (Şekil 3.1). Fakat diyabetik gruplarda MMP-8 seviyelerinin çok düşük olmasına ve diğer etmenlere bağlı olarak midkin uygulanan grupta midkin inflamasyonu istenilen seviyelere getirememiş ve yara iyileşmesinde umulan düzeylerde olumlu sonuçlar göstermemiştir (Şekil 3.2).

MMP-8 seviyelerinin düşük olması yara bölgesindeki kemotaksinin azalmasına neden olmaktadır (Lint ve Libert 2006). Mevcut araştırmada diyabetik gruplarda yara iyileşmesinin gecikmesi ve kalitesiz bir iyileşmenin gözlenmesi düşük MMP-8 seviyesinden kaynaklanmış olabilir (Çizelge 3.2).

Literatür taramaları ve mevcut araştırma sonuçları değerlendirildiğinde MMP-8 seviyelerinin çok düşük ve çok yüksek olması yara iyileşmesini bozmaktadır. Bu çalışmada da sağlıklı ve sağlıklı+midkin grubunda böyle bir durum izlenmemiştir (Çizelge 3.2). Bu gruplarda sağlıklı bir ECM degredasyonu için yeterli miktarda MMP-8 seviyesinin korunduğu ve yara iyileşmesinin normal olarak devam ettiği görülmektedir. Ancak yara bölgelerinin fiziksel görünümleri karşılaştırıldığında sağlıklı+midkin grubunda MMP-8 sentezinin aşırı yüksek olmaması ve sağlıklı (kontrol) gruptaki gibi büyük dalgalanmalar göstermemesi nedeniyle yara iyileşmesinin hipertrofik skarsız ve kaliteli olabildiği düşünülmektedir. Buradan da görülmektedir ki midkin yara bölgesinde düzenleyici bir rol oynamaktadır.

Platelet derived growth factor (PDGF) yara iyileşmesinin birçok fazında etkili bir büyüme faktörüdür. Özellikle fibroblast, nötrofil ve monositler için kemoatraktan özelliktedir. Kollajen ve fibroblast birikimi sağlayarak yaranın kontraksiyonu ve granulasyon dokusunun re-epitelizasyon fazındaki formasyonunu düzenlemektedir.

Ancak diyabetik yaralarda PDGF seviyeleri azalmaktadır (Santoro ve Gaudino 2005).

Cheng ve ark (2007), ratlara tam kalınlıkta yara oluşturarak PDGF uygulaması sonrasında re-epitelizasyon, damarlaşma ve granulasyon dokusu olgunlaşma hızının arttığını bildirmişlerdir. Bunun temelinde de ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz fosforilasyonunun arttığı vurgulanmıştır.

Genetik diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada yara iyileşmesinin geciktiği ve yaranın daha kalın (hipertrofik) iyileştiği bildirilmiştir. Deneklere uygulanan PDGF sonrası dönemde yara iyileşmesinin hızı ve kalitesi değerlendirilmiştir. Düşük doz PDGF verilen grupta yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu, epitelizasyonun ve kollajen birikimin arttığı ve granulasyon dokusunun düzeldiği ancak yüksek doz uygulanan grupta yara iyileşmesinin daha yavaş olduğu belirtilmiştir (Greenhalgh ve ark 1990).

Mevcut araştırmada midkin uygulanan gruplarda, yara iyileşmesinin proliferasyon fazında PDGF düzeyinin arttığı görülmektedir (Çizelge 3.3). Yaranın erken dönemlerinde PDGF'nin anjiogenezisi artırması, granulasyon dokusunun hızlı şekillenmesi ve fibroblast, kollajen miktarındaki muhtemel artış yaraların daha kaliteli ve daha hızlı iyileştiğini göstermektedir. Ancak sağlıklı+midkin grubunda yara iyileşmesindeki bu olumlu özellikler daha belirginken, diyabet+midkin grubunda sadece PDGF'nin artışı yara iyileşmesi için yeterli olmamıştır (Şekil 3.3). Çünkü PDGF tek başına yara iyileşmesi için yeterli bir faktör olmamaktadır. Bunun yanında diğer büyüme faktörlerinin de önemi büyüktür. Örneğin diyabet+midkin grubunda VEGF düzeyleri PDGF düzeyleri ile paralellik göstermemektedir (Çizelge 3.3 ve 5). Bu da damarlaşmanın sadece PDGF artışı ile olmadığını ancak bu artışın dalgalı seyrettiği, sürekli düzgün bir artış olmadığından PDGF'nin istenilen düzeylere ulaşamadığı görülmektedir.

Brown ve ark (1994) PDGF ve EGF'nin kombine olarak yara üzerine uygulandığında genetik diyabetli farelerde yara iyileşmesinin hızlandığı ve bu iki büyüme faktörünün sinerjistik etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada EGF'nin yara iyileştirici etkilerinin yanında PDGF'nin mitojenik etkileri ve fibroblast, makrofaj, nötrofil ve damarların yapısını oluşturan düz kas hücreleri üzerine

kemotaktik etkisi yara iyileşmesinde etkili olmuştur. PDGF'nin kollajen ve ekstraselüler matriksin düzenlenmesinde önemli etkileri de bulunmaktadır (Brown ve ark 1994). Mevcut çalışmada diyabet+midkin grubunda EGF seviyesinde istenilen düzeyde bir değişiklik olmaması ve PDGF seviyesindeki dalgalanmalar yeterli miktarda iyileşmeyi hızlandıramamış ve bu nedenle diyabet grubu ile çok önemli bir fark gözlenmemiştir. Ancak sağlıklı+midkin grubunda midkin, EGF ve PDGF düzeylerinde istenilen artışı sağlayarak (Çizelge 3.1 ve 3.3) bu iki büyüme faktörünün sinerjistik etkisi ile yara iyileşmesinin diğer gruplardan daha hızlı şekillenmesine zemin oluşturduğu düşünüldü. Ayrıca bu gruptaki hayvanların yara bölgelerinin makroskobik görünümünün diğer gruplardan daha iyi olduğu gözlendi (Şekil 3.3). Gözlenen bu olumlu değişimler yara bölgesindeki kollajen, fibroblast birikiminin hızı ve epitelizasyonun performansından kaynaklanmış olabilir.

Sun ve ark (2007), PDGF'nin kollajen membrana yüklenip yara bölgesine uygulanması sonucu PDGF uygulanan gruplarda yara iyileşmesinin kontrol grubuna göre daha hızlı olduğunu, histolojik değerlendirmede özellikle 7. ve 14. günlerde iyileşmenin daha hızlı olduğunu ve PDGF uygulamasının damarlaşma, re-epitelizasyon, kollajen ve fibroblast birikimini artırdığını bildirilmişlerdir. Ancak pratikte jel ve likit formunun, uygulama zorluğu oluşturması nedeniyle dışardan PDGF uygulanmasının çok pratik olmadığı ifade edilmiştir (Sun ve ark 2007). Mevcut çalışmada uygulanan deneysel protokol kapsamında midkin uygulaması ile PDGF seviyelerinin artırılabildiği görülmüştür. Pratikte uygulama zorluğu olan PDGF ve diğer büyüme faktörleri yerine dışardan midkin uygulamasının daha faydalı ve uygulanabilir olacağı düşünülebilir.

TGF-β; makrofajların aktivasyonunu, anjiogenezisin uyarımını, fibroblast proliferasyonunu ve matriksin oluşumunu sağlayan, re-epitelizasyon periyodu boyunca epitelyal hücrelerin migrasyonunu başlatan önemli bir büyüme faktörüdür. Yara bölgesindeki pıhtı oluşumu ile makrofaj ve keratinositlerden ortama büyük miktarlarda TGF-β salınmaktadır. Özellikle inflamasyonun baskı altına alınmasında ve yara bölgesinin kapanmasında önemli fonksiyonları bulunmaktadır (Santoro ve Gaudino 2005).

Diyabetik farelerde yaranın ilk fazında apoptozisin geciktiği ve inflamatuar fazın uzadığını, diyabetik fare ve ratlarda kurkumin uygulamaları sonrasında artan

TGF-β'nın keratinosit migrasyonu ve epidermal iyileşmeyi arttırdığı bildirilmiştir. Kurkuminin bu etkisinin TGF-β'nın düşük konsantrasyonda fibroblastların kümeleşmesini sağlaması, yüksek konsantrasyonda ise fibroblastları stimule etmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca kollajen birikimi de sağlayarak yaranın kapanmasında önemli yer tuttuğu vurgulanmıştır (Sidhu ve ark 1999). Mevcut araştırmada yaranın ilk dönemlerinde azalan TGF-β konsantrasyonu midkin ile kompanze edilmiş ve bu sayede özellikle sağlıklı+midkin grubunda yara iyileşmesi hızlanmıştır (Çizelge 3.4). Midkin uygulanan gruplarda TGF-β düzeyindeki artışın, keratinosit düzeylerine olumlu yansımalar yaptığı düşünülebilir. Özellikle sağlıklı+midkin grubunda görülen kıllanmanın 14.günden sonra daha belirgin hale gelmesi bu etkileşime atfedilebilir. Diyabet+midkin grubunda bu seviyenin 14.gün ve sonrasın da korunamamasına bağlı olarak kıllanmanın yeterince şekillenemediği izlenmiştir.

Sidhu ve ark (1999)'nın diyabetik canlılarda yara iyileşmesinin erken dönemlerine ilişkin apoptozisin azalmasına ait bulgular dikkate alındığında, diyabet+midkin grubunda TGF-β seviyesinde erken dönemde görülen kısmi artışa bağlı olarak midkin uygulamaları sonrasında diyabetik yaralarda kontrolsüz seyreden apoptozisin kontrol altına aldığı öngörüsü gündeme getirilebilir.

Komesu ve ark (2004) deneysel diyabet oluşturulan ratlarda yaptığı çalışmada yara bölgesindeki nötrofil infiltrasyonunun kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak daha az olduğu ve buna bağlı olarak yara iyileşmesinin geciktiğini vurgulamıştır. Mevcut araştırmada diyabet+midkin grubunda yara iyileşmenin sağlıklı ve sağlıklı+midkin gruplarına göre daha geç şekillenmesi ve ölçülen parametrelerin istenilen düzeylere gelmemesinin temel nedeni midkinin sitokinler ve büyüme faktörleri üzerindeki düşük etkinliğinden ziyade, diyabetik yara bölgesinde yangısel infiltrasyonun yetersizliği olduğu öngörülebilir.

Maturasyon evresinde, fazla miktarda vasküler ve hücresel yapıya sahip olan granülasyon dokusu, yapı değiştirerek damarlaşmayı sağlayan büyüme faktörlerinin azalmasına bağlı daha az hücre ve damara sahip olan skar dokusu ile yer değiştirmektedir. Hücrelerdeki bu azalma hücrelerin yara dışına göç etmelerinden ya da programlı hücre ölümünden (apoptozis) kaynaklanmaktadır (Şenol 1995, Ekmekçi ve Bostancı 2002, Karasu ve Bakır 2008). Midkin yeni gelişen hücreler üzerine anti-

apoptotik özelliğe sahip olmasıyla hücrelerdeki bu azalmanın önüne geçerek yaranın normal hale daha çabuk gelmesini sağlamaktadır (Muramatsu 2002).

In vitro bir çalışmada uygulanan midkin miktarı ve bekleme süresine göre kollajen sentezinin değişmekte olduğu, midkinin kültüre edilmiş insan keratinositlerinden eksprese edildiği, 100 ng/ml uygulandığında 72 saat içerisinde kollajen miktarının iki katına çıktığı belirtilmiştir. Araştırmada ayrıca hyaluronan artışı ile birlikte glikozaminoglikan stimulasyonunu, TGF-β ve matriks metalloproteinaz-2 seviyelerini de artırdığı ve sonuç olarak midkinin gecikmiş yara iyileşmelerinde kullanılabileceği ifade edilmiştir. Midkinin kollajen ve glikozaminoglikan stimulasyonunu nasıl sağladığı tam olarak anlaşılamamıştır. (Yamada ve ark 1997). Mevcut araştırmada da midkin uygulanan gruplarda TGF-β düzeyindeki artış ile artan kollajen yapımı sayesinde sağlıklı+midkin grubunda yara iyileşmesinin hızlandığı görülmüştür (Şekil 3.1). Ayrıca diyabet+midkin grubundaki TGF-β artışı da olumlu bir bulgu oluşturmaktadır. Sonuç olarak diyabetteki diğer faktörlerin engellenmesi ya da yeni tedavi stratejilerinin yanına midkin eklenmesiyle diyabette daha etkili ve hipertrofik skarsız yara iyileşmesinin sağlanabileceği düşünülebilir.

Fibronektinin, diyabetli ratlardaki yara iyileşmesi üzerine etkinliğinin değerlendirildiği bir araştırmada yaranın kontrol grubuna göre daha hızlı ve daha iyi iyileştiği görülmüştür. Çalışmada fibronektinin, fibroblast sayısı, kollajen rejenerasyonu ve epitelizasyonu artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca fibroblastlardan salınan TGF-β ve hidroksipirolin seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu tespit edilmiş ve TGF-β salınımının 3. günden itibaren kontrol grubundan daha yüksek olduğunu bulunmuştur. Topikal fibronektin uygulanan diyabetli grupta TGF-β ve diğer sitokinlerin salınmasıyla inflamatuar faz erken başlamış ve bu nedenle yaranın daha erken iyileşmeye başladığı ifade edilmiştir. Çalışmada TGF-β'nın makrofajlar, nötrofiller ve fibroblastları uyararak kendi salınımını daha da artırtırdığı ve yara bölgesinde granulasyon dokusu oluşumunu ve bundan sonraki yara iyileşme sürecini (re-epitelizayon, fibroblastların proliferasyonu ve granulasyon dokusunun oluşumu sürecinde kollajen birikiminin olması) hızlandırdığı belirtilmiştir. Sonuç olarak temelde TGF-β ve fibroblast sayısının artışı diyabetli grupta yara iyileşmesini hızlandırmıştır (Qiu ve ark 2007). TGF-β eksik olan

farelerde yara iyileşmesinin geciktiği (Crowe ve ark 2000) ve diyabetlilerde TGF-β'nın yetersiz sentez edildiği belirtilmiştir (Jude ve ark 2002). Mevcut araştırma sonuçları incelendiğinde midkin uygulaması ile özellikle sağlıklı+midkin grubunda TGF-β düzeylerinin arttığı, bu artışa bağlı olarak yara iyileşmesinin hızlandığı görülmüştür. Midkinin, makrofaj ve nötrofil sayısını ve sentezini artırarak TGF-β düzeyini artırdığı, buna bağlı olarak yara bölgesindeki fibroblast, kollajen ve epitelizasyonu artırdığı öngörülebilir. Sonuç olarak midkin uygulaması yara iyileşmesini hızlandırmış ve özellikle sağlıklı+midkin grubunda hipertrofik skarsız iyileşmeyi sağlamıştır.

Kant ve ark (2013), P maddesinin topikal olarak uygulandığı ratlarda açık yara iyileşmesinin hızlandığı, TGF-β ve VEGF düzeyinin 3. ve 7. günlerde deneme grubunda istatistiksel farklı olarak yükseldiği, 14. günde ise düştüğünü gözlemlemiştir. Bu seviyelerin artışına bağlı olarak granulasyon dokusunun P maddesinin uygulandığı grupta daha iyi olduğu, aynı zamanda kollajen ve fibroblast birikimin daha hızlı ve daha fazla olduğu, buna bağlı olarak ekstraselüler matriksin daha hızlı oluştuğu ve yara kontraksiyonunun daha fazla olduğu, anjiogenezisin arttığı belirtilmiştir. TGF-β'nın pozitif feed-back mekanizması ile makrofajların yara bölgesine daha hızlı gelmesini ve daha fazla miktarda toplanmasını yara bölgesindeki ölü dokuların atılmasını, yerine yeni dokuların gelmesini hızlandırdığı ifade edilmiştir. Benzer şekilde VEGF seviyesininde artarak yaranın 3.gününden itibaren yeni damarlaşmanın P maddesi uygulanan grupta arttığı bildirilmiştir (Kant ve ark 2013). Mevcut araştırma sonuçları TGF-β ve VEGF yönünden incelendiğinde midkin uygulanan gruplarda TGF-β ve VEGF düzeyinin düzgün doğrusal bir artış içinde olduğu, özellikle bu artışın sağlıklı+midkin grubunda daha belirgin olduğu (Çizelge 3.4 ve 3.5) ve buna paralel olarak yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu görülmüştür (Şekil 3.1). Bu çalışma ile benzer olarak belirtilen büyüme faktörleri düzeyinin de 3.günden sonra arttığı ve buna bağlı olarak; anjiogenezisin, kollajen matriks ve ekstraselüler matriksin yaranın daha erken dönemlerinde oluşabileceği ve yara kapanmasının hızlandığı düşünülebilir. Aynı zamanda diyabetik grupta TGF-β düzeyinin diyabete bağlı olarak düşük olduğu, bu nedenle yara iyileşmesinin sağlıklı gruplarla karşılaştırıldığında daha geç ve daha kalitesiz olduğu görülmüştür. Ayrıca sağlıklı grupta da TGF-β istenilen düzeyinin yara iyileşmesinin sonuna kadar sürdürülememesi yara iyileşmesinin son dönemlerde midkin uygulanan gruptan geri

kaldığını göstermektedir ($p<0,05$). Aynı durum VEGF düzeyi içinde geçerli olmakla birlikte midkin uygulanan gruplarda bu düzeyin arttığı söylenebilir (Çizelge 3.4 ve 3.5).

VEGF, trombosit, nötrofil, makrofaj ve endotelyal hücreler gibi birçok farklı hücreden salınan ve anjiojenik özellik gösteren endojen bir büyüme faktörüdür. Fakat aynı zamanda kollajen ve epitelizasyonu desteklediğine dair bilgiler de bulunmaktadır. Özellikle iyileşmenin erken dönemlerinde salınımı hızla artmaktadır. VEGF nitrik oksit sentetazı ve siklooksijenazı tetikleyerek vazodilatasyonu sağlamaktadır. Bunun yanında kemotaksisi ve endotelyal hücre proliferasyonunu desteklemektedir. Yara iyileşmesinde VEGF seviyesinin 3-7 günler arasında maksimuma çıktığı belirtilmiştir (Bao ve ark 2009).

Mevcut araştırmada sağlıklı+midkin grubunda VEGF düzeyinin yara iyileşmesinin 14. gününe kadar arttığı ve en yüksek seviyeye ulaştığı, ancak diyabet+midkin grubunda bu seviyenin 14. günde arttığı belirlendi ($p<0.05$, Çizelge 3.5). Diyabetik ratlarda kollajen bağlı VEGF'in dışardan uygulanması ile yara bölgesinde yeni damar oluşumunun ve perfüzyonun arttığı, 7. günden sonra VEGF düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği belirtilmiştir (Yan ve ark 2010). Mevcut çalışmada ise diyabet+midkin grubunda bu seviyenin ancak 14. gün artması, midkinin diyabetik vakalarda iyileşmede geçde olsa etkili olabileceğini akla getirmiştir. Fakat sağlıklı+midkin grubunda VEGF seviyesinin daha erken dönemlerde daha yüksek seviyelere ulaşması, midkinin sağlıklılarda daha etkili olduğunu göstermektedir. Diyabet+midkin grubundaki iyileşmenin gecikmesinin muhtemel nedenleri arasında, VEGF sentezinin düşük düzeylerde seyretmesine bağlı olarak damarlaşmanın ve perfüzyonun yetersiz olması ve buna bağlı olarak diyabetik dokularda artan hipoksinın varlığı düşünülebilir.

Bu çalışmada VEGF düzeyinde sağlıklı+midkin grubunda 3. günden başlayarak düzenli bir artışın olduğu ancak diyabet+midkin grubunda bu artışın 14. günde başladığı görüldü. Diyabetik ratlarda yapılan bir çalışmada nanopartikül halinde VEGF uygulamasının granulasyon dokusunu, re-epitelizasyon oluşumunu ve kollajen birikimini hızlandırdığı belirtilmiştir (Losi ve ark 2013). Mevcut çalışmada sağlıklı+midkin grubunda VEGF ve diğer büyüme faktörlerinin erken dönemde artışı ayrıca iyileşmenin erken dönemlerde olması diğer gruplara göre sağlıklı+midkin

grubunda bu etkilerin daha belirgin olması ile açıklanabilir. Diyabet+midkin grubunda iyileşmenin diyabet grubuna göre hızlı ancak sağlıklı gruba göre daha yavaş olmasının muhtemel sebepleri arasında VEGF seviyesinin daha geç artışına bağlı olarak damarlaşmanın ve granulasyon dokusunun daha geç oluşumu yer alabilir.

Diyabetik vakalarda lökosit fonksiyonları bozulur ve miktarı azalır, ayrıca yara bölgesine nötrofillerin ve makrofajların migrasyonu yetersizdir. Bu nedenle yara bölgesinin enfeksiyona maruziyet düzeyi artar ve buna bağlı olarak yara iyileşmesi gecikir. Gecikmenin diğer bir nedeni ise yara bölgesinin yeterince kanlanamaması ve keratinosit büyüme faktörünün azalmasıdır. Bu faktörlerin biraraya gelmesi ve iyileşen dokuda iskelet görevindeki kollajen miktarının azalması diyabetik yaraların geç iyileşmesine neden olmaktadır (Blakytny ve Jude 2006). Mevcut araştırmada midkinin immunstimulasyonu sağlayarak, nötrofil göçü ve anjiogenezisi artırarak yara iyileşmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ancak sağlıklı yaralar ve diyabetli yaraların erken döneminde midkinin bu etkileri yara iyileşmesini hızlandırırken, diyabete bağlı olarak inflamasyonun yetersiz olması midkinin yara iyileşmesi üzerine etkilerini kısıtlamış olabilir.

VEGF'in dışardan uygulanması ile yapılan yara iyileşmesi çalışmalarında VEGF'in anjiogenezis yanında PDGF (Galiano ve ark 2004) ve TGF-β (Yan ve ark 2010) ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir. Mevcut araştırma sonuçları incelendiğinde sağlıklı+midkin grubunda VEGF seviyesinin artışı ile PDGF ve TGF-β seviyelerininde paralel olarak arttığı görüldü. Benzer sonuçlar diyabet+midkin grubu içinde geçerli olmasına karşın bu büyüme faktörlerinin seviyelerininde VEGF gibi 14. gün civarında arttığı gözlendi. Bu durum midkinin uyardığı ve büyüme faktörlerinin sentezlendiği fibroblast, nötrofil ve makrofaj hücrelerinin yara iyileşmesinin erken fazında yetersiz olması ancak midkinin etkileri ile 14. günde normal düzeylerin üzerine çıkması ile açıklanabilir.

Yara iyileşmesinde oksidatif stresi azaltıcı maddelerin uygulanması yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Hücrelerde oksidatif stres ve antioksidan kapasite arasında denge yaralanma ile bozulmaktadır. Hemostazis durumlarında da aşırı oksijenlenme nedeni ile kısa süreli oksidatif stres oluşabilmektedir. Aşırı oksijenlenme ya da oksidatif strese aşırı maruziyet durumunda serbest oksijen

radikallerinin indirgenmesi antioksidan sistem tarafından sağlanmaktadır. Yara bölgesinde oluşan kemotaksis ile nötrofil, makrofaj ve diğer inflamatuar faktörler yara bölgesindeki oksidatif stresi artırmaktadır. Aşırı oksidatif stres fibroblastlarda apoptozise neden olmakta, fibroblastların kontraksiyondaki işlevini bozmakta ve fibroblastların büyüme faktörlerine olan cevabını azaltmaktadır (Soneja ve ark 2005). Mevcut araştırmada diyabetik grupta oksidatif stresin başta çok yüksek olmasının fibroblastların işlevini bozduğu ve bu durumun yara iyileşmesinde geciktirici unsurlardan biri olduğunu akla getirmektedir.

Rasık ve Shukla (2000) diyabetik ve sağlıklı ratlarda yara iyileşmesinde oksidatif stres ve antioksidan kapasite yönünden değerlendirme yapmış ve tiobarbütirik asit reaktif substansları (TBARS), süperoksit dismutaz (SOD) katalaz, glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz parametreleri ölçülmüştür. Hiçbir uygulama yapmadan bu parametrelerin sağlıklı ve diyabetik ratların derilerindeki düzeylerine bakılmış, hepsinin diyabetik grupta, sağlıklı gruptan daha yüksek olduğu bulunmuş ancak sadece katalaz ve GSH ölçümünde istatistiki bir fark almıştır. Yara oluşturulduktan sonraki ölçümlerde sonucun yine aynı yönde değiştiği bulunmuş ancak tüm bulunan bu sonuçlar içerisinde sadece GSH düzeyi ölçümünde diyabetik yaralarda sağlıklı dokulardan anlamlı ($p<0,05$) düşüş olduğu bulunmuştur. Diyabetteki yara iyileşmesinde gecikmenin temel nedeni olarak glutatyon seviyesinde düşüş olduğu gösterilmiştir.

Mevcut araştırmada yara öncesi uygulama yapılmadan alınan diyabetik ve sağlıklı derilerde TBARS yönünden bir değerlendirme yapılmış ve diyabetik ratların derilerinde TBARS düzeyinin istatistiki olarak ($p<0,05$) yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç diyabete bağlı olarak oksidatif stresin arttığı ve böylece TBARS seviyesinin yükseldiğini göstermektedir. Mevcut araştırmada yara bölgelerinin fiziksel görünüşü incelendiğinde diyabetik ratlarda yara iyileşmesinin gecikmesinde oksidatif stresin yüksek olmasınında bir yeri olduğu düşünülmektedir. Yara oluşturulduktan sonra sağlıklı ratlar ile diyabetik ratlardaki TBARS yönünden benzerlik görülmesine karşın, diyabetik ratlardaki TBARS seviyesinin yara oluşturulmadan önce çok yüksek seviyelerde olması bu durumu etkilemiştir. Yara iyileşirken bölgedeki sağlam dokularda oksidatif stresin devam etmesinine bağlı olarak yara iyileşmesinin geciktiği düşünülmektedir. TBARS seviyesinin sağlıklı ve

diyabetik gruplarda benzer olması ise örneklerin yeni oluşan granulasyon dokusundan alınmasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Fiziksel olarak yara bölgeleri incelendiğinde diyabetik gruplarda yara kapanması 28. günde gerçekleşmiş ancak fizyolojik olarak iyileşmenin devam ettiği izlenmiştir. Bu klinik gözlemin bir yansıması olarak TBARS sonuçları incelendiğinde ise 28. güne kadar diyabetik gruplarda bu seviyenin artarak devam ettiği ve muhtemelen fizyolojik iyileşme tamamlandığında bu seviyenin başlangıç değerlerine döneceği düşünülebilir.

Yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda oksidatif stres ve büyüme faktörleri arasında ilişkiyi gösteren az sayıda araştırma bulunmaktadır. Kalay ve Cevher (2012), dışardan yara bölgesine EGF uygulanan ratlarda yara oluşumundan önceki ve yara oluşumundan sonraki TBARS seviyelerini belirlemişlerdir. Yara oluşturulmadan önceki TBARS seviyeleri ile yara oluşumundan sonra EGF uygulanan gruplarda TBARS seviyesinin günler arasında dalgalı bir seyir izlediği belirlenmiştir. Yara oluşturulmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EGF uygulanan grupta TBARS seviyesi 1. gün istatistiki olarak anlamlı şekilde artarken, 5.günde düşmüş, 7.günde tekrar anlamlı bir yükselme göstermiştir. Tedavi edilmeyen sadece yara oluşturulan grupta 1.günde istatistiki olarak anlamlı bir artış, daha sonra ise düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak EGF uygulamasının 5. güne kadar antioksidan olduğu belirtilmiş ve bu günden sonraki dalgalanmanın bilinmeyen bir negatif etkiye bağlı olduğu bildirilmiştir. Mevcut araştırmada da midkin uygulanan gruplarda TBARS seviyesinin dalgalı bir seyir izlediği görülmektedir (Çizelge 3.6). Ancak bütün gruplardaki TBARS verileri incelendiğinde midkinin oksidatif stres üzerine belirgin bir etkisi olmadığını akla getirmiştir. Fakat bu durumun oksidatif stresi belirten birden fazla parametrenin ve antioksidan parametrelerinde ölçülmesi gerekliğini ortaya koymuştur. Bu tür çalışmalar incelendiğinde oksidatif stresi ve antioksidan kapasiteyi belirten unsurların farklı sonuçlar ortaya çıkarabildiği düşünülmektedir.

Mevcut araştırmada sağlıklı (kontrol) grup ve diyabetik gruplarda TBARS düzeyinde düşüş belirlenirken ($p<0.05$), sağlıklı+midkin grubunda değişiklik belirlenmedi ($p>0.05$, Çizelge 3.6). Shukla ve ark (1997), ratlarda yara oluşumu sonrası TBARS seviyelerinin yara bölgesinde 7. güne kadar anlamlı düştüğünü

($p<0,01$) ve sonrasında yükseldiğini ifade etmiştir. Mevcut çalışmada TBARS düzeyinin azalması yara bölgesindeki lipid ürünlerinin yetersizliğinden kaynaklanabilir. Sağlıklı+midkin grubunda TBARS düzeyinde değişiklik gözlenmemesi, midkinin yara bölgesinde lipid oluşumunu normalleştirmesi ile açıklanabilir.

Mevcut araştırmada diyabetik gruplarda yara oluşumundan önce TBARS düzeyinin sağlıklı gruplara göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$, Çizelge 3.6). Yara iyileşmesinin olmadığı ve yara olmayan diyabetik hastalarla, sağlıklı insanların MDA düzeyleri yönünden karşılaştırıldığı bir çalışmada MDA düzeyinin diyabetik gruplarda yüksek olduğu bildirilmiştir (Arya ve ark 2011). Mevcut çalışmada diyabetik gruplarda büyük çoğunluğunu MDA'nın oluşturduğu TBARS düzeylerinin başlangıçta yüksek seviyede olması, artan oksidatif stres ve apoptozise bağlı olarak yara iyileşmesini olumsuz etkilediği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Midkin antiapoptotik, migrasyonu tetikleyen, anjiojenik ve antimikrobiyal özelliklere sahip multifonksiyonel bir büyüme faktörü ya da sitokindir. Midkin, hasarlı dokuların canlılığını artırmakta ve inflamatuar lökositlerin hasarlı bölgede birikimini sağlamaktadır. Ayrıca birçok dokuda yaralanma sonrası doku onarımını gerçekleştirmektedir (Xu ve ark 2014). Midkin ekstraselüler matriks moleküllerinin sentezini artırmakta ve vakaların erken dönemlerinde daha etkili olduğu belirtilmektedir. Midkin yara kenarlarındaki sağlıklı dokulardan pseudopodların uzamasınıda artırarak, hasarlı hücrelerin yeniden sağlam hale getirilmesini sağlamakta ve yara bölgesindeki yeni gelişen sağlıklı hücrelere şekil vererek yara bölgesinin hızlı kapanmasını sağlamaktadır (Yamada ve ark 1997). Mevcut araştırmada yara bölgesinin makroskobik görüntüleri incelendiğinde midkin uygulanan gruplarda iyileşmenin hem hızlı hemde daha düzgün olduğu görülmektedir.

Midkinin, tümör migrasyonunu sağlaması, anjiogenezisi ve tümörün canlılığını artırması gibi tümör için olumsuz olan sonuçlar (Muramatsu 2010), yara iyileşmesi durumlarında olumlu özellikler olarak karşımıza çıkmaktadır.

İşemik yaralarda iyileşme süreci incelendiğinde kontrol grubuna göre %50 daha az iyileşme görüldüğü tespit edilmiştir. Ancak yaranın 7. gün ve daha erken

safhalarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Chen ve ark 1999). Mevcut araştırma sonuçları incelendiğinde sağlıklı+midkin grubunda midkinin anjiojenik ve proliferatif özellikleri ile yara sonrası oluşan işemiyi azaltmış olabileceği öngörülebilir. Makroskobik olarak da iyileşme süreci incelendiğinde 7. günden sonra iyileşmenin daha hızlı olduğu (Şekil 3.1), bunun nedeninde midkinin yangı üzerine modülatör etkinliğinin olması ve VEGF düzeyini 7. günden sonra anlamlı ($p<0,05$) bir şekilde arttırması ile açıklanabilir (Çizelge 3.5).

Deneysel kolitis oluşturulan ratlarda midkin sekresyonunun arttığı ve bu artışa bağlı olarak mukozal onarımında buna paralel olarak arttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda epitelyal ve mezenşimal hücreler arası iletişimin midkine bağlı olarak arttığı bildirilmiştir. Ancak kolitise bağlı olarak bir midkin reseptörü olan RPTP-β miktarının ve midkininin etkilerinin azaldığı görülmüştür (Yuki ve ark 2006). Mevcut araştırma da sağlıklı+midkin grubunda epitelyal ve mezenşimal etkileşimin daha iyi olabileceği ve buna bağlı olarak iyileşmenin daha hızlı ve daha kaliteli olduğu düşünülmektedir. Diyabet+midkin grubunda iyileşmenin sağlıklı+midkin grubundaki kadar iyi olmaması bu etkileşimin yetersiz ve midkin reseptör sayısının diyabete bağlı olarak azalmış olabileceği ihtimalini gündeme getirebilir.

Midkin kendi etkisi dışında, in vitro olarak TGF-β sentezini artırarak yara iyileşmesi, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırmaktadır (Yuki ve ark 2006). Ayrıca midkinin artırdığı TGF-β ekspresyonu, kollajen jel kontraksiyonunu da artırmaktadır (Sumi ve ark 2000). Mevcut in vivo araştırmada da sağlıklı+midkin grubunda TGF-β sentezinin arttığı ($p<0.05$, Çizelge 3.4) ve buna bağlı olarak TGF-β'nın ve midkinin granulasyon dokusu üzerine etkileri ile yaranın daha hızlı ve daha iyi iyileştiği görülmüştür. Diyabet+midkin grubunda belirgin iyileşme olmaması TGF-β sentezinin istenilen zamanda, istenilen düzeye gelmemesinden kaynaklanmış olabilir.

Midkinin, intestinal epitelyumun situmulasyonunu sağladığı bildirilmiştir (Yuki ve ark 2006). Mevcut araştırmada sağlıklı+midkin grubunda EGF seviyesinin artışı ($p<0.05$, Çizelge 3.1) ile makroskobik görünüm (Şekil 3.1.) epitelyumun hızlı iyileşmesini desteklemektedir. Sonuç olarak midkinin kendi özel etkileri yanında büyüme faktörleri üzerine etkisi ile yara iyileşmesi üzerine etkili bir terapotik ajan olabileceği ifade edilebilir.

Midkin mezenşimal hücrelerde hipoksiye karşı koruyucu rol oynamaktadır. Bunun altında yatan mekanizma VEGF, TGF-β ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 ekspresyonun artışı ile damarlaşmanın ve oksijenlenmenin artışı olarak belirtilmiştir (Zhao ve ark 2014). Mevcut araştırma sonuçlarına bakıldığında TGF-β ve VEGF seviyelerinin midkin uygulanan gruplarda arttığı, özellikle damarlaşmanın temel göstergesi olan VEGF miktarının 14. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.05$, Çizelge 3.5). Sağlıklı+midkin grubunda VEGF'nin artışı ile damarlaşmanın artışına bağlı olarak yaranın daha hızlı iyileştiği, diyabet+midkin grubunda ise bu seviyenin daha düşük olması, sağlıklı+midkin grubu kadar olmasada iyileşmenin diyabet grubundan daha iyi olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Deneysel diyabet oluşturulmuş ve sağlıklı farelerin derilerinde oluşturulan yaraların karşılaştırılması amaçlanan bir çalışmada diyabetiklerde yaranın inflamasyon fazında yetersiz kaldığı, inflamasyonun yeterince oluşamaması ile granulasyon dokusu miktarının azaldığı ve yara iyileşmesinin daha geç olduğu, kollajen seviyelerinin diyabetiklerde az olması ve glikolizasyon son ürünlerinin artmasına bağlı olarak yaranın gerilme kuvvetinin diyabetik hayvanlarda yetersiz olduğu ve sonuç olarak diyabetiklerde inflamasyonun yeterince şekillenmemesine bağlı olarak yara iyileşmesinin erken dönemlerinde gecikmeler gözlendiği belirtilmiştir (Fahey ve ark 1991). Mevcut araştırma sonuçları incelendiğinde diyabetik gruplarda birbirine bağlı bu karışık olaylar zinciri sonucunda yaranın erken dönemlerde tam olarak iyileşemediği ya da yetersiz iyileşebildiği görülmüştür.

Goova ve ark (2001), genetik diyabetli farelerde eriyebilir glikasyon son ürün reseptörlerinin (sRAGE) deri örtüsü ile birlikte uygulanması ile yara iyileşmesi kalitesinin arttığını, iyi vaskularize granulasyon dokusunun hızla yara bölgesini kapladığını, PDGF ve VEGF seviyesinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu etkinin, aşırı artan sitokin (TNF-α, IL-6, matriks metalloproteinaz 2, 3, 9) seviyesinin baskılanmasına bağlı olduğu, diyabetli farelerde yara iyileşmesinin non-diyabetiklerden %60 daha hızlı ancak yara iyileşmesindeki granulasyon dokusunun daha kalın olduğu bildirilmiştir. sRAGE uygulamalarının temel olarak faydaları diyabetlilerde inflamasyonu ve reperatif süreci hızlandırması olarak açıklanmıştır. 14 ve 21. günde alınan yara örneklerinde inflamatuar hücrelerin, epitelyal ve yeni kan damarı hücrelerini arttırdığı, kontrol grubunda ise bu hücrelerin artışının 35. günde

meydana geldiği, 35. günde sRAGE uygulanan grupta inflamasyonun azaldığı, re-epitelizasyon ve yeni kan damarlarının arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak inflamasyonun hızlandırılması ve belirli periyodlarda sınırlandırılması ile yaranın daha hızlı ve daha nitelikli iyileştiği bildirilmiştir. Mevcut araştırmada midkinin sağlıklı+midkin grubunda VEGF, PDGF gibi büyüme faktörlerini artırmasına ve inflamasyonu istenilen düzeylerde tutmasına bağlı olarak yara iyileşmesini hızlandırdığı, ancak diyabet+midkin grubunda bu faktörleri istenilen düzeylere getirememesine bağlı olarak yara iyileşmesinin sağlıklı+midkin kadar hızlı ve düzgün olmadığı görüldü.

Diyabetik vakalar da yara iyileşmesinin erken dönemlerinde nötrofil ve makrofajların, proinflamatuar mediatörlerin yetersiz olması ve apoptozisin yüksek seviyelerde olması, inflamasyonun geç şekillenmesi ve kontrolsüz şekilde devam etmesi yara iyileşmesini geciktirmektedir (Koh ve Dipietro 2011). Bu nedenle dışardan midkin uygulaması ile yaranın erken dönemlerinde inflamasyonun kontrol altına alınması (Muramatsu 2002) sonucu yaranın daha hızlı ve daha iyi iyileşmesi düşünülmüş ancak bu etki tam olarak oluşmamıştır. Bu durum diyabetin karmaşık yapısının olması ve midkinin diyabet üzerinde yeterince etkili olamaması ile açıklanabilir. Ayrıca diyabete bağlı olarak midkinin etkilediği reseptör sayısının azalmış ve/veya yapısının bozulmuş olabileceği düşünülebilir.

Midkin, ekstraselüler matriks moleküllerinin sentezini artırmakta (Yamada ve ark 1997, Muramatsu 2002) ve hücre iskeletini oluşturan temel yapıların yeniden oluşumu, hücrelerin migrasyonu ve kemokinlerin indüklenmesini sağlamaktadır (Muramatsu 2002, Muramatsu 2010). Özellikle hücre iskeletinin oluşturulmasında ve hücre şeklini etkileyen diğer hücrelerin migrasyonunda etkili olan midkin, bu görevini tirozin fosfataz reseptörü üzerinden sağlamaktadır (Sumi ve ark 2000).

Diyabetlilerde kapiller bazal membranın kalınlaşması sonucu lökosit migrasyonu azalmakta, kemotaktik faktörlerin yara bölgesine gelmesi gecikmekte ve yara bölgesinde enfeksiyona hassasiyet oluşmaktadır (Türkaslan ve Altındaş 2004). Ancak midkin azalan lökosit migrasyonunu ve kemokinlerin salınımını artırmaktadır (Muramatsu 2002). Midkin proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonu ve regulatör T hücrelerin büyümesini modüle etmektedir (Muramatsu 2010, Weckbach ve ark 2011). Mevcut araştırma sonuçları incelendiğinde diyabete bağlı olası enfeksiyona

maruziyet durumu sağlıklı (kontrol) ve diyabetik (kontrol) gruplarda yara iyileşmesinin gecikmesinde etkili olmuş olabilir. Ancak diyabet+midkin grubunda midkinin lökosit migrasyonunu artırıcı etkisi ile olası enfeksiyonu önlediği ve yara iyileşmesini kısmen hızlandırdığı düşünülebilir.

Mevcut araştırma sonuçları incelendiğinde sağlıklı+midkin grubunda midkinin iyileşme sürecini hızlandırdığı ve büyüme faktörlerinin seviyesini olumlu yönde arttırdığı belirlendi. Diyabet+midkin grubunda sadece PDGF ve TGF-β düzeyleri üzerine sağlık+midkin grubu kadar bir etkisinin olduğu, bu bağlamda midkinin sağlıklılarda oluşan yaralarda daha etkili olduğu belirlendi. Bunun temel nedeni midkinin inflamatuar hücreler üzerine etkisiyle yara bölgesinde anjiogenezisi, büyüme faktörlerinin salınımını ve yeni kollajen sentezini artırmasıdır. Aynı zamanda midkinin özellikle makrofajlar üzerine etkisiyle, hızlı epitelizasyonun sağlanması ve inflamatuar hücrelerin migrasyonunda önemli görev alan TGF-β sentezinin artmasıdır (Eming ve ark 2007). Ancak diyabetik yaralarda yüksek glikoz düzeyinin makrofajların etkilerini bozabildiği bildirilmiş (Maruyama ve ark 2007) ve diyabetik yaraların erken dönemlerinde hücre infiltrasyonunun yetersiz olması, remodeling ya da maturasyon evresinin başlangıcından itibaren ise uzun süre kalıcı nötrofil ve makrofajların olması yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca diyabete bağlı olarak büyüme faktörlerinin ekspresyonu, anjiogenezis, epitelizasyon ve ekstraselüler matriks yapısında yetersizlik oluşmaktadır (Ochoa ve ark 2007, Pradhan ve ark 2009).

Brown ve ark (1997) diyabetik farelerde yara oluşturulduktan sonraki 5. güne kadar yeterli miktarda inflamatuar hücrelerin ortamda bulunmadığını ancak 14. günde yeterli miktara ulaştıklarını tespit etmiştir. Diyabetiklerde apoptozisin de 5. günde düşük seviyelerde başladığı ve 14. günden sonra arttığı belirtilmiştir. Diyabetik olmayan grupta ise yara oluşumundan hemen sonra apoptozisin yüksek seviyelere çıktığı ve yangının başladığı görülmüştür. Topikal olarak büyüme faktörü (IGF ve PDGF) uygulanan diyabetik grupta apoptozisin ve hücre infiltrasyonunun daha erken dönemlerde meydana geldiği, diyabetiklerde bu durumun yetersiz ve gecikmesine bağlı olarak yaranın geç iyileştiği vurgulanmıştır. Ancak topikal uygulanan büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir. Belirtilen araştırma ile mevcut araştırma sonuçlarının tutarlı olduğu ve buna bağlı

yara iyileşmesinin hızlandığı, belirtilen büyüme faktörlerinin midkin uygulaması ile arttığı izlendi.

Hiperglisemiye bağlı lökosit fonksiyonları, pıhtı oluşumu, makrofaj aktivasyonu, re-epitelizasyon ve anjiogenezisde bozukluklar oluşmaktadır. Sonuç olarak büyüme faktörlerinin işlevi bozulmakta ve yaranın ilerleyen aşamalarında nöropati gelişmesi de yara iyileşmesi geciktirmektedir. Aynı zamanda diyabetiklerde mast hücreleri ve makrofaj sayılarının azaldığı bildirilmiştir (Gillitzer ve Goebeler 2001, Pradhan ve ark 2009). Mevcut araştırmada da diyabetik gruplarda iyileşmenin sağlıklı gruplardaki kadar iyi olmamasının muhtemel nedenlerinden birinin bu olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu hücrelerin sayısındaki azalış fibroblast proliferasyonunu ve büyüme faktörü sentezininde yetersizliğe neden olmuş olabilir.

Kosugi ve ark (2007) diyabetik nefropati oluşturulan midkin pozitif transjenik farelerde makrofaj infiltrasyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Mevcut araştırmada sağlıklı+midkin grubundaki büyüme faktörlerindeki belirgin artış ve hızlı iyileşmenin diğer nedeni midkinin makrofaj infiltrasyonunu ve bu hücrelerden salgılanan büyüme faktörü miktarını artırması olduğu düşünülmektedir.

Midkin ile yapılan in vitro çalışmada midkinin ekstraselüler matriks moleküllerinin sentezini artırdığı belirtilmiş, yanık gibi deri hasarı olan bozuklukların tedavisinde midkinin bu etkisinden yararlanılabileceği, midkinin erken safhalarda daha etkili olduğu ve midkinin yaranın ileri safhalarında aşırı konsantrasyonu hipertrofik skar oluşumuna neden olabileceği belirtilmiştir (Sumi ve ark 2000). Mevcut araştırma da bu görüşlere dayanılarak yara iyileşmesindeki etkileri yönünden incelenmiş ve elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde midkin yara iyileşmesinin dönemine ve midkin konsantrasyonuna bağlı farklılık gösterebileceği görülmüştür.

Midkinin, etkileşime girdiği integrin molekülleri hücre içinde iletişimin sağlanmasında, hücrelerin hareketinde önemli görev almaktadır. Hücre yüzeyinde α ve β alt tipleri bulunmaktadır. Hücrelerin göçü sırasında endotelyal hücrelerin bu alt tiplere yüksek afinitesi bulunmaktadır (Falanga 2005). Midkin, integrin alt tiplerine bağlanarak hücre içinde bulunan paxililin adaptör proteinini aktifleştirir ve bu proteinin tirozin ile fosforilasyonu sağlar. Fosforile olan paxillin molekülleri

hücrenin büyüme faktörü stimulasyonunu artırır (Muramatsu ve ark 2004). Aynı zamanda hücre motilitesi, transformasyonu ve olgunlaşmasında görev almaktadır. Paxillin, damar gibi düz kaslı dokularda, makrofaj, lenfosit gibi hücrelerde de bol miktarda bulunmaktadır. Yara iyileşmesi için elzem rol oynayan hücrelerin göçü ve adezyonları için gerekli adaptör proteinlerdendir. Bu süreç midkin gibi maddelerle regüle edildiğinde büyüme faktörü salınımları ve bundan önce bahsedilen olaylar meydana gelmektedir (Turner 1998). Mevcut araştırma sonuçları dikkate alındığında sağlıklı+midkin grubunda midkin uygulaması ile yara bölgesinde inflamatuar hücrelerin ve damarlaşmanın yapısı artırılarak midkinin paxillin proteinine olan etkisi ortaya çıkarılmış olabilir. Bu grupta midkin kendisi migrasyonu ve inflamasyonu sağladığı gibi hücre içi proteinleri aktifleştirerek büyüme faktörlerinin salınımına da katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Diyabet+midkin grubunda midkin inflamatuar hücrelerin yara bölgesine gelmesi için yeterli etki gösterememesi nedeniyle bu süreci aktifleştiremediği ve bu grupta iyileşmenin ve büyüme faktörü salgılarının sağlıklı+midkin grubundaki kadar olmadığını akla getirmektedir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada yara iyileşmesinin birçok faktöre bağlı olduğu, sağlıklı ve diyabetli dokulardaki büyüme faktörleri ve sitokin salgılarının çok farklı seviyelerde olduğu, sağlıklı ve diyabetlilerde yara iyileşmesinin farklı olduğu görüldü. Midkin uygulamasının özellikle sağlıklı bireylerde yara iyileşmesi üzerine belirgin etkilerinin olduğu, diyabetiklerde ise farklı bir tedavi stratejisi ile kombine kullanılabileceği sonucuna ulaşıldı.

Midkinin birçok büyüme faktörünü ve araştırmada değerlendirilemeyen birçok sitokin ve hücresel faktörü etkileyebileceği, yara iyileşmesinde daha ileri düzey çalışmalarda bu etkilerinin de belirlenip midkinin klinik olarak kullanımının değerlendirilebileceği, özellikle anjiogenezis başta olmak üzere yeni matriks ve epidermis gelişimini hızlandırdığı, midkin uygulamasının yaranın erken dönemlerinde çok daha etkili olduğu ve yara iyileşmelerinde yara izi, hipertrofik skar ya da yara bölgesinin kılsız kalması gibi istenmeyen durumları ortadan kaldırabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Midkinin enjeksiyon yolu ile yara bölgesine uygulanmasının çok pratik olmadığı ancak yara bandı ya da yaraya topikal uygulanabilecek bir forma getirilmesinin, az kıllı bölgelerdeki yara iyileşmelerinde yeni kılların oluşumuna ve kötü görüntünün oluşmasına neden olabileceğinden dolayı bu tür az kıllı bölgelerde yeni yara iyileşmesi çalışmalarında midkin etkinliğinin değerlendirilmesi, midkinin dozaj rejimini belirlemek için farmakokinetik çalışmaların yapılması, yan etkileri yönünden ve özellikle keratinosit ve fibroblastlar üzerine etkilerinin değerlendirilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Mevcut araştırmada klinik olarak sağlıklı ve deneysel diyabetik Wistar Albino ırkı ratlara midkin uygulaması ile bazı büyüme faktörlerinin seviyelerinin artırılması, yara bölgesinde oksidatif stresin engellenmesi ve yaranın hızlı kapanması amaçlanmıştı. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmada özellikle sağlıklı gruba midkin uygulamasının makroskobik olarak ve büyüme faktörleri üzerine önemli etkilerinin olduğu gözlendi. Ancak midkin uygulamasının diyabetik grupta makroskobik ve büyüme faktörleri üzerine etkilerinin zamana ve değerlendirilen büyüme faktörüne göre değişkenlik gösterdiği belirlendi. Midkinin

sağlıklı gruptaki kadar etkili olmasa da diyabetik grupta da etkili olduğu tespit edildi. Diyabetik grupta bu etkinin istenilen düzeye çekilememesinin nedenin ise midkinin etkili olduğu hücrelerin ortamda yeterince bulunmamasının ve diyabetin multisellüler bir hastalık olmasından kaynaklanmış olabileceği öngörüldü.

Sonuç olarak midkin ile ilgili yara iyileşmesi çalışmalarına hız verilmesi gerektiği, özellikle sağlıklılarda makroskobik olarak istenilmeyen görüntülerin yok edilmesinde, estetik olarak iyileşmesi düşünülen yaralarda ve yara iyileşmesinin hızlandırılmasında, diyabetik hastalarda ise farklı tedavi stratejileri ile kombine kullanılması için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekliliği, midkinin yara iyileşmesinde yeni bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

Altavilla S, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonia T, Torre V, Rosso G, Sardella A, Urma G, Campo GM, Cavallari V, Squadrito G, Squadrito F, 2001. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. Diabetes, 50, 667-74.

Ahmed N, 2005. Advanced glycation end products role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res Clin Pr, 67, 3-21.

Arya AK, Pokharia D, Tripathi K, 2011. Relationship between oxidative stress and apoptotic markers in lymphocytes of diabetic patients with chronic non healing wound. Diabetes Res Clin Pr, 94(3), 377–84.

Ballas CB, Davidson JM, 2001. Delayed wound healing in aged rats is associated with ıncreased collagen gel remodeling and contraction by skinfibroblasts, not with differences in apoptotic or myofibroblast cell populations. Wound Rep Reg, 9, 223-37.

Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H, 2009. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. J Surg Res, 153(2), 347-58.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M, 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen, 16(5), 585-601.

Bayındır Y, 2007. Yaraya genel yaklaşım. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 11, 13-8.

Bitar MS, Farook T, Wahid S, Francis MS, 1999. Glucocorticoid-dependent ımpairment of wound healing in experimental diabetes amelioration by adrenalectomy and RU 486. Journal of Surgical Research, 82(2), 234-43.

Boyce DE, Ciampolini J, Ruge F, Murison MSC, Harding KG, 2001. Inflammatory cell subpopulations ın keloid scars. Br J Plast Surg, 54, 511-16.

Brown RL, Breeden MP, Greenhalgh DG, 1994. PDGF and TGF-α act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic Mouse. J Surg Res, 56(6), 562–70.

Blakytny R, Jude E, 2006. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. Diabet Med, 23(6), 594-608.

Blumenberg M, 2013. Profiling and metaanalysis of epidermal keratinocytes responses to epidermal growth factor. BMC Genomics, 14(85), 1-20.

Brown DL, Kao WW, Greenhalgh DG, 1997. Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and ımprovement with topical growth factors. Surgery, 121(4), 372-80.

Chen C, Schultz GS, Bloch M, Edwards PD, Tebes S, Mast BA, 1999. Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wounds as a model for human chronic wounds. Wound Rep Reg, 7, 486-94.

Cheng B, Liu HW, Fu XB, Sun TZ, Sheng YZ, 2007. Recombinant human platelet-derived growth factor enhanced dermal wound healing by a pathway ınvolving ERK and c-fos in diabetic rats. J Dermatol Sci, 45, 193-201.

Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G, 1998. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. J Ethnopharmacol, 59(3), 195-201.

Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson JM, 1997. TGF-Beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. J Cell Physiol, 170(1), 69-80.

Clark RAF, 2001. Fibrin and wound healing. Ann N Y Acad Sci, 936, 355-67.

Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG, 2000. Delayed wound healing in immunodeficient TGF-1 knockout mice. J Invest Dermatol, 115, 3-11.

Dadpay M, Sharifian Z, Bayat M, Bayat M, Dabbagh A. 2012. Effects of pulsed infra-red low level-laser irradiation on open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats by biomechanical evaluation. J Photochem Photobiol B, 111, 1-8.

Dagogo-Jack S, George KM, Alberti MM, 2002. Management of diabetes mellitus in surgical patients. Diabetes Spectrum, 15, 44-8.

Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG, 1997. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. Int J Biochem Cell Biol, 29(1), 199-200.

Deveci D, 2003. Anjiyojenezis, arteriyojenezis ve vaskülojenezis terimlerinin anlamları ve hipoksik ve/ veya iskemik koşullarda anjiyojenezis. Genel Tıp Derg, 13(3), 141-51.

Diegelmann RF, Evans MC, 2004. Wound healıng: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Frontiers in Bioscience, 9, 283-9.

Dik B, Er A, Corum O, 2014. Effect of alcoholic extract of tarantula cubensis (Theranekron®) on serum thiobarbituric acid-reactive species concentrations in sheep. Eurasian J Vet Sci, 30, 68-71.

Duchesne MPB, Grenier D, Gagnon G, 2010. Epidermal growth factor released from platelet rich plasma promote endothelial cell proliferation in vitro. J Periodont Res, 45, 87-93.

Ekmekçi P, Bostancı S, 2002. Yara iyileşmesi. Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi, 12, 114-20.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM, 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms, J Invest Dermatol, 127(3), 514-25.

Esteo FG, Pascual G, Honduvilla NG, Gallardo A, Roman SJ, Bellon JM, Bujan J. 2005. Histological evaluation of scar tissue inflamatory response: The role of HGH in diabetic rats. Histol Histopathol, 20(1), 53-7.

Falanga V, 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet, 366(9498), 1736-43.

Ferguson MWJ, Kane SO, 2004. Scar-free healing from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 359(1445), 839-50.

Fernández Gutiérrez-A, Inada M, Balbín M, Fueyo A, Pitiot AS, Astudillo A, Hirose K, Hirata M, Shapiro SD, Noël A, Werb Z, Krane SM, López-Otín C, Puente XS, 2007. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). FASEB J, 21(10), 2580-91.

Galeano M, Torre V, Deodato B, Campo GM, Colonna M, Sturiale A, Squadrito F, Cavallari V, Cucinotta D, Buemi M, Altavilla D, 2001. Raxofelast, a hydrophilic vitamin e like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice. Surgery, 129(4), 467–77.

Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC, 2004. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. Am J Pathol, 164(6), 1935-47.

Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrod S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM, 2001. Blockade of receptor for advanced glycation end products restores effective wound healing in diabetic mice. Am J Pathol, 159(2), 513–25.

Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R, 1990. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. Am J Pathol, 136(6), 1235-46.

Karasu A, Bakır B, Yara ve yara iyileşmesi. 2008. Veteriner Cerrahi Dergisi, 14(1), 36-43.

World Health Organization (WHO), 2006. Dermal absorption. Environmental Health Criteria (EHC) 235. Switzerland, p. 1-197.

Lee Cho AR, Leem H, Lee J, Park KC, 2005. Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor. Biomaterials, 26(22), 4670-6.

Li J, Chen J, Kirsner R, 2007. Pathophysiology of acute wound healing. Clin Dermatol, 25(1), 9-18.

Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E, 1998. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. J Invest Dermatol, 111(5), 850-7.

Esteo GF, Pascual G, Honduvilla NG, Gallardo A, Roman JS, Bellon JM, Bujan J, 2005. Histological evaluation of scar tissue ınflamatory response : The role of hGH in diabetic rats. Histol Histopathol, 20, 53-7.

Fahey TJ, Sadaty A, Jones WG, Barber A, Smoller B, Shires T, 1991. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. Journal of Surgical Research, 50, 308-13.

Gillitzer R, Goebeler M, 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. J Leukoc Biol, 69(4), 513-21.

Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK, 1985. Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. J Clin Invest, 76, 2323-29.

Hehemberger K, Kratz G, Hansson A, Brismar K, 1998. Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate which is recovered by the addition heparin. J Dermatol Sci, 16, 144-51.

Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, Muramatsu H, Ikematsu S, Sakuma S, Hayashi K, Yuzawa Y, Matsuo S, Kuzuya M, Kaname T, Hirai M, Saito H, Muramatsu T, 2000. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. J Clin Invest, 105(4), 489-95.

Iwashita N, Muramatsu H, Toriyama K, Torii S, Muramatsu T, 1999. Expression of midkine in normal and burn sites of rat skin. Burns, 25(2), 119-24.

Jude EB, Blaktytny R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW, 2002. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. Diabet Med, 19, 440-7.

Judith R, Nithya M, Rose C, Mandal AB, 2010. Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing. Life Sci, 87, 1-8.

Kadomatsu K, 2005. The Midkine Family in Cancer, Inflammation and neural development. Nagoya J Med Sci, 67(3-4), 71-82.

Kadomatsu K, Kishida S, Tsubota S, 2013. The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. J Biochem, 153(6), 511-21.

Kalay Z, Cevher C, 2012. Oxidant and antioxidant events during epidermal growth factor therapy to cutaneous wound healing in rats. Int Wound J, 9(4), 362-71.

Kant V, Gopal A, Kumar D, Bag S, Kurade NP, Kumar A, Tandan SK, Kumar D, 2013. Topically applied substance P enhanced healing of open excision wound in rats. Eur J Pharmacol, 715 (1-3), 345-53.

Koh TJ, DiPietro LA, 2011. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. Expert Rev Mol Med, 13(23), 1-10.

Komesu MC, Tanga MB, Buttros KR, Nakao C, 2004. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. Pathophysiology, 11, 63-7.

Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Arata-Kawai H, Suzuki N, Kato N, Matsuo S, Kadomatsu K, 2007. Midkine is involved in tubulointerstitial ınflammation associated with diabetic nephropathy. Lab Invest, 87(9), 903-13.

Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JD, Gurtner GC, 2003. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast. Am J Pathol, 11, 63-7.

Lint PV, Libert C, 2006. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. Cytokine Growth Factor Rev, 17(4), 217-23.

Loots MAM, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD. Middlekop E, 1999. Cultured fibroblast from chronic diabetic wound on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show distrubed proliferation. Arch Dermatol Research, 291, 93-9.

Losi P, Briganti E, Errico C, Lisella A, Sanguinetti E, Chiellini F, Soldani G, 2013. Fibrin-Based scaffold ıncorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. Acta Biomater, 9(8), 7814-21.

Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Noda M, 1999. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase Ptpζ/Rptpβ binds a heparin-binding growth factor midkine ınvolvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to Ptpζ. J Biol Chem, 274, 12474-9.

Mahler JR, Adler ML, 1999. Type 2 diabetes mellitus : update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. J Clin Endocrinol Metab, 84(4), 1165-71.

Martin P, 1997. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. Science, 276(4), 75-81.

Martins VL, Caley M, O'Toole EA, 2013. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. Cell Tissue Res, 351, 255-68.

Maruyama K, Asai J, Ii M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA, 2007. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to ımpaired diabetic wound healing. Am J Pathol, 170(4), 1178-91.

Mayne ST, 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. J Nutr, 133(3), 933-40.

Mitsiadıs TA, Salmıvırta M, Muramatsu T, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, Jalkanen M, Thesleff I, 1995. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (mk) and hb-gam (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. Development, 121, 37-51.

Muramatsu T, 2002. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. J Biochem (Tokyo), 132(3), 359-71.

Muramatsu H, Zou P, Suzuki H, Oda1 Y, Chen GY, Sakaguchi N, Sakuma S, Maeda N, Noda M, Takada Y, Muramatsu T, 2004. α4β1- and α6β1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. J Cell Sci, 117(22), 5405-15.

Muramatsu T, 2010. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 86(4), 410-25.

Muramatsu T, 2011. Midkine: A promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system. Curr Pharm Des, 17(5), 410-23.

Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ, 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. Int J Biochem Cell Biol, 29(1), 5-17.

Nanba D, Toki F, Barrandon Y, Higashiyama S, 2013. Recent advances in the epidermal growth factor receptor/ligand system biology on skin homeostasis and keratinocyte stem cell regulation. J Dermatol Sci, 72(2), 81-6.

Ochoa O, Torres FM, Shireman PK, 2007. Chemokines and diabetic wound healing (Abstract). Vascular, 15(6), 350-5.

Ohuchida T, Okamoto K, Akahane K, Higure A, Todoroki H, Abe Y, Kikuchi M, Ikematsu S, Muramatsu T, Itoh H, 2004. Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against trail-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity. Cancer, 100(11), 2430-6.

Qiu Z, Kwon A, Kamiyama Y, 2007. Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wounds in streptozotocin-ınduced diabetic rats. J Surg Res, 138, 64-70.

Pradhan L, Nabzdyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A, 2009. Inflammation and neuropeptides: The connection in diabetic wound healing. Expert Rev Mol Med, 11(2), 1-24.

Rajasekaran NS, Nithya M, Rose C, Chandra TS, 2004, The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. Biochim Biophys Acta, 1689(3), 190-201.

Rasık AM, Shukla A, 2000. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. Int J Exp Path, 81, 257-63.

Sakaguchi N, Muramatsu H, Ichihara-Tanaka K, Maeda N, Noda M, Yamamoto T, Michikawa M, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T, 2003. Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. Neurosci Res, 45(2), 219-24.

Santoro MM, Gaudino G, 2005. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. Exp Cell Res, 304(1), 274-86.

Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A, 1997. Diabetes-impared healing and reduced wound nitric oxide synthesis: A possible pathophysiologic correlation. Surgery, 121, 513-19.

Sen CK, Khanna S, Barbior BM, Hunt TK, Ellison EC, Roy S, 2002. Oxidant-ınduced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. J Biol Chem, 277(36), 33284-90.

Sharma A, Singh AK, Waren J, Thangapazham RL, Maheshwari RK, 2006. Differential regulation of angiogenic genes in diabetic wound healing. J Invest Dermatol, 126, 2323-31.

Sheıfter E, Rettura G, Padawer J, Stratfordf, Kambosos D, Levenson SM, 1981. Impaired wound healing in streptozotocin diabetes. Ann Surg, 194(1), 42-50.

Shibata Y, Muramatsu T, Hirai M, Inui T, Kimura T, Saito H, McCormick LM, Bu G, Kadomatsu K, 2002. Nuclear targeting by the growth factor midkine. Mol Cell Biol, 22(19), 6788-96.

Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, Hashimoto K. 2005. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. J Cell Sci, 118(11), 2363-2370.

Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK, 1997. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. Free Radic Res, 26(2), 93-101.

Slavkovsky R, Kohlerova R, Tkacova V, Jiroutova A, Tahmazoglu B, Velebny V, Rezačová M, Sobotka L, Kanta J, 2011. Zucker diabetic fatty rat: a new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity. Wound Repair Regen, 19(4), 515-25.

Sidhu GS, Mani H, Gaddipati JP, Singh AK, Seth P, Banaudha KK, Patnaik GK, Maheshwari RK, 1999. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. Wound Repair Regen, 7(5), 362-74.

Sindelar DK, Havel PJ, Seeley RJ, Wilkinson CW, Woods SC, Schwartz MW, 1999. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. Diabetes, 48, 1275-80.

Singer AJ, Clark RAF, 1999. Cutaneous wound healing. New Engl J Med, 341(10), 738-46.

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), 1627-35.

Soneja A, Drews M, Malinski T, 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. Pharmacol Rep, 57, 108-19.

Sun W, Lin H, Xie H, Chen B, Zhao W, Han Q, Zhao Y, Xiao Z, Dai J, 2007. Collagen membranes loaded with collagen-binding human PDGF-BB accelerate wound healing ın a rabbit dermal ischemic ulcer model. Growth Factors, 25(5), 309-18.

Sumi Y, Muramatsu H, Hata K, Ueda M, Muramatsu T, 2000. Midkine enhances early stages of collagen gel contraction. J Biochem, 127, 247-51.

Svensson SL, Pasupuleti M, Walse B, Malmsten M, Mörgelin M, Sjögren C, Olin AI, Collin M, Schmidtchen A, Palmer R, Egesten A, 2010. Midkine and Pleiotrophin have bactericidal properties: preserved antibacterial activity in a family of heparin-binding growth factors during evolution. J Biol Chem, 285(21), 16105-15.

Şenol M, 1995. Yara iyileşmesi. Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi, 5, 49-53.

Şimşek MB, Sargon M, Şenel S, Güngör N, 1998. Biyoadesif taşıyıcı sistem ile birlikte uygulanan epidermal büyüme faktörünün yara iyileşmesi üzerine etkisinin histopatolojik olarak açıklanması. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 1(1), 59-63.

Takada T, Toriyama K, Muramatsu H, Song XJ, Torii S, Muramatsu T, 1997. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in ınflamatory response: chemotactic activity to neutrophils and association with ınflamatory synovitis. J Biochem, 122: 453-8.

Takudome T, Horio T, Yoshihara F, Suga S, Kawano Y, Kohno M, Kangawa K, 2004. Direct effects of high glucose and insulin on protein synthesis in cultured cardiac myocytes and DNA and collagen synthesis in cardiac fibroblasts. Metabol, 53, 710-5.

Tokgöz G, 1997. Klinik immunoloji. Ankara, Antıp A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, s. 10-6.

Turkaslan T, Altındaş M, 2004. Diyabetik ayak yaraları. Türk Plast Rekonstr Est Cer Derg, 12(1), 51-7.

Turner Christopher E, 1998. Molecules in focus paxillin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 30, 955-9.

Xing B, Wu F, Li T, Qi S, Xie J, Ye Z, 2013. Experimental study of comparing rhEGF with rhβFGF on improving the quality of wound healing. Int J Clin Exp Med, 6(8), 655-61.

Xu C, Zhu S, Wu M, Han W, Yu Y, 2014. Functional receptors and intracellular signal pathways of midkine (MK) and pleiotrophin (PTN). Biol Pharm Bull, 37(4), 511-20.

Xue M, Le NT, Jackson CJ, 2006. Targeting matrix metalloproteases to ımprove cutaneous wound healing. Expert Opin Ther Targets, 10(1), 143-55.

Verderıo EAM, Johnson T, Griffin M, 2004. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing. Amino Acids, 26, 387-404.

Wang J, Takeuchi H, Sonobe Y, Jin S, Mizuno T, Miyakawa S, Fujiwara M, Nakamura Y, Kato T, Muramatsu H, Muramatsu T, Suzumura A, 2008. Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. Proc Natl Acad Sci USA, 105(10), 3915-20.

Weckbach LT, Muramatsu T, Walzog B, 2011. Midkine in inflammation. Scientific World Journal, 11, 2491-505.

Wiegand C. Hipler U, 2008. Methods for the measurement of cell and tissue compatilibility including tissue regeneration proccesses. GMS Krankenhhyg Interdiszip, 3(1), 1-9.

Yamada H, Inazumi T, Tajima S, Muramatsu H, Muramatsu T, 1997. Stimulation of collagen expression and glycosaminoglycan synthesis by midkine in human skin fibroblasts. Arch Dermatol Res, 289, 429-33.

Yan X, Chen B, Lin Y, Li Y, Xiao Z, Hou X, Tan Q, Dai J, 2010. Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model. Diabetes Res Clin Pract, 90(1), 66-72.

Yang HS, Shin J, Bhang SH, Shin JY, Park J, Im GI, Kim CS, Kim BS, 2011. Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma. Exp Mol Med, 43(11), 622-9.

Yazar E, Tras B, 2002. Serbest oksijen radikalleri, antioksidan enzimler ve antibiyotikler. Türk Veteriner Hekimliği Dergisi, 14(2), 42-4.

Yazıhan N, Uzuner K, Salman B, Vural M, Koken T, Arslantas A, 2008. Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. Int. J. Care Injured, 39, 1408-13.

Yuki T, Ishihara S, Rumi MA, Ortega-Cava CF, Kadowaki Y, Kazumori H, Ishimura N, Amano Y, Moriyama N, Kinoshita Y, 2006. Increased expression of midkine in the rat colon during healing of experimental colitis. Am j physiol gastrointest liver physiol, 291(4), 735-43.

Zhao SL, Zhang YJ, Li MH, Zhang XL, Chen SL, 2014. Mesenchymal stem cells with overexpression of midkine enhance cell survival and attenuate cardiac dysfunction in a rat model of myocardial infarction. Stem Cell Res Ther, 5(37), 1-13.

EK B: Tezden Üretilmiş Yayın

of diagnostic marker enzymes, TSA and LSA levels in the experimental groups of rats. Blueberry has protective effects on APAP-induced hepatotoxicity by reducing sialic acid levels. This study provides some examples of the significance of sialic acids in normal and hepatotoxicity states. This study can provide great opportunities for new researches.

References

1. Parmar SR, Vashrambhai PH, Kalia K. Hepatoprotective activity of some plants extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. J Herb Med and Toxicol 2010; 4(2):101-106.
2. Chun LJ, Tong MJ, Busuttil RW, Hiatt JR. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. J Clin Gastroenterol. 2009; 43(4):342-9.
3. Ben-Shachar R, Chen Y, Luo S, Hartman C, Reed M, Nijhout HF. The biochemistry of acetaminophen hepatotoxicity and rescue: a mathematical model. Theor Biol Med Model. 2012; 19(9):55.
4. Varki A. Sialic acids in human health and Disease. Trends in Molecular Medicine 2008; 14(8):
5. Gruszewska E, Cylwik B, Panasiuk A Szmitkowski M, Flisiak R Chrostek L. Total and Free Serum Sialic Acid Concentration in Liver Diseases. Biomed Res Int 2014 (in press).
6. Wang YP, Cheng ML, Zhang BF, Mu M, Zhou MY, Wu J, Li CX. Effect of blueberry on hepatic and immunological functions in mice. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2010; 9(2):164-8.

Poster No. 32

Determination of Effects of Midkine on Wound Healing and Oxidative Stress of Experimental Diabetic and Healthy Rats

Burak Dik[1], Ahmet Levent Baş[1], Nuray Yazıhan [2]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, Veterinary Faculty, University of Selcuk, Konya, Turkey.
[2] Department of Physiopathology, Medicine Faculty, University of Baskent, Ankara, Turkey.

Midkine plays a role in the control of tissue repairing and development of new tissue (1, 2), and it is an important agent in the regulation of inflammation (3). In the present study, effect of midkine was investigated in the experimental wound healing of rats. 12 Wistar Albino rats are divided two groups as 6 healthy and 6 diabetic positive controls. Remaining 96 rats are divided four groups; healthy group, healthy+midkine group (10 ng/mg, SC, every other day), diabetic group (STZ, 40 mg/kg, SC) (4) and diabetic+midkine group (10 ng/mg, SC, every other day). After 6 rats from per groups were created wound, they were euthanized on 3., 7., 14. and 28. days and their wound skin were removed. Obtained samples were homogenized and level of Matrix Metalloproteinase 8 (MMP8), Transforming Growth Factor Beta (TGFβ), Platelet Derived Growth Factor (PGDF) and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) were measured. Additionally, the wound skins were evaluated macroscopically. Levels of MMP8 and PDGF fluctuated in all groups and levels of TGFβ fluctuated only in diabetic groups, whereas TGFβ levels were higher than any other groups on 28. days in healthy+midkine group ($p<0.05$). Levels of TBARS decreased in healthy, diabetic and diabetic+midkine groups ($p<0.05$). Macroscopically, midkine groups better healed compared to other groups. Effects of midkine on oxidative stress (5) and growth factors (6) were reported. In conclusion, it may be stated that midkine accelerates to wound healing and influences to growth factors and oxidative status on wound tissues.

References

1. Sumi Y, Muramatsu H, Hata K, Ueda M, Muramatsu T. 2000. Midkine enhances early stages of collagen gel contraction. J Biochem 127: 247-252.
2. Muramatsu T. 2010. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases, Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 86(4): 410-25.
3. Muramatsu T. 2011. Midkine: A Promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system, Curr Pharm Des 17(5): 410-23.
4. Sindelar DK, Havel PJ, Seeley RJ, Wilkinson CW, Woods SC, Schwartz MW. 1996. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats, Diabetes 48: 1275-1280.
5. Kosugi T and Sato W. 2012. Midkine and kidney : Health and diseases, Nephrol Dial Transplant 27:16-21.
6. Zhao SJ, Zhang YJ, Li MH, Zhang XL, Chen SL. 2014. Mesenchymal stem cells with overexpression of midkine enhance cell survival and attenuate cardiac dysfunction in a rat model of myocardial infarction, Stem Cell Research & Therapy 5(57): 1-13.

Poster No. 33

Neuroprotection induced by vitamin E against oxidative stress in hippocampal neurons:involvement of TRPV1 channels and PMCA

de Jesus Ferreira MC Crouzin N, Cohen-Solal C, Barbanel G, Guiramand J, Vignes M.

Max Mousseron Institute of Biomolecules, Montpellier, France.

Poster No. 34

The Importance of Voltage Gated Channels in Breast Cancer

Didem Turgut Cosan[1], Ahu Soyocak [1], Çağrı Oner[1], Mustafa Serdar Erkasap[2], Evrim Bayman[3], Fezan Mutlu Sahin[4], Mustafa BA Djamgoz[5]

[1] Eskişehir Osmangazi University, Medical Faculty, Department of Medical Biology, Eskişehir, Turkey.
[2] Eskişehir Osmangazi University, Medical Faculty, Department of General Surgery, Eskişehir, Turkey.
[3] Eskişehir Osmangazi University, Medical Faculty,

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Konya'da doğdu.1997 yılında ilkokulu Ali İhsan Dayıoğlugil İlkokulun'da bitirdi. 2000 yılında Ortaokulu Şükrü Doruk İlköğretim okulunda bitirdi. 2004 yılında Lise öğrenimini Meram Konya Lisesi (YDAL)'nde tamamladı. Aynı yıl 2004 Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. 2005 yılında yatay geçiş ile geldiği Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 10.07.2009 tarihinde mezun oldu. 2011 yılından bu yana Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evlidir.