T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

METFORMİNİN DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

FATMA KÜBRA TOMBULTÜRK

DANIŞMAN
PROF. DR. TURGUT ULUTİN

II. DANIŞMAN
PROF. DR. GÖNÜL KANIGÜR

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Diyabet ve Diyabet Çeşitleri 3
2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) 5
2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) 6
2.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) 6
2.2. Deneysel Diyabet 7
2.2.1. Kimyasal Bileşiklerle Oluşturulan Diyabet Modelleri 9
2.2.2. Streptozotosin 9
2.2.2.1. Tek Yüksek Doz STZ 11
2.2.2.2. Çoklu Düşük Doz STZ 11
2.3. Diyabetik Komplikasyonlar 11
2.3.1. Diyabette İnflamasyon 14
2.4. Diyabet ve Kronik Yaralar 15
2.5. Yara İyileşmesi Mekanizması 19
2.6. Yara İyileşmesinin Fizyolojik Aşamaları 22
2.6.1. Hemostaz 22
2.6.2. İnflamasyon 22
2.6.3. Proliferasyon 24
2.6.4. Remodelizasyon 25
2.7. Yara İyileşmesi İçin Biyobelirteçler 26

2.7.1. Proteaz Seviyeleri 27
2.8. Metformin ve Yara İyileşmesi 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 31
3.1. Hayvan Deneyleri 31
3.1.1. Deney Grupları ve Adlandırılması 31
3.1.2. STZ ile Diyabet Oluşturulması 32
3.1.3. Metformin Çözeltisinin Hazırlanması 32
3.1.4. Tam Kat Yara Modelinin Oluşturulması 33
3.1.5. Yara İyileşmesi Takibi ve Dokuların Alınması 33
3.1.6. Yara Kontraksiyon Alanının Takibi ve Ölçümü 36
3.2. Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Yöntemiyle RELA, MMP2 ve MMP9 Gen Ekspresyonu Tayini 39
3.2.1. Dokuların Homojenizasyonu 39
3.2.2. Dokudan RNA İzolasyonu 39
3.2.3. Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu 41
3.3. NF-κB1 (p65) Aktivasyonunun ELISA ile Tayin Edilmesi 44
3.3.1. Homojenatların ektraksiyonu 44
3.3.2. ELISA ile NF-κB p65 Aktivasyon Ölçümü 47
3.4. İstatistiksel Değerlendirme 51
4. BULGULAR 52
4.1. Tam Kat Eksizyon Yara Modeli Oluşturulan Sıçanlara Topikal Olarak Uygulanacak Metformin Konsantrasyonunun Belirlenmesi 52
4.2. Topikal Olarak Uygulanan Metforminin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi 53
4.3. Metforminin NF-κB p65 Aktivitesi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi 57
4.4. Metforminin RELA, MMP2 VE MMP9 mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi 60
4.4.1. Metforminin RELA (p65) mRNA Düzeyi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi 60
4.4.2. Metforminin MMP2 mRNA Düzeyi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi 63
4.4.3. Metforminin MMP9 mRNA Düzeyi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi 66

5. TARTIŞMA 71
KAYNAKLAR 81
ETİK KURUL KARARI 108
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 109
ÖZGEÇMİŞ 110

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflandırması (28) 3
Tablo 2-2: Tip 1 Diyabetin En Sık Kullanılan Kemirgen Modellerinin Temel Özellikleri (51) 8
Tablo 2-3: Yara iyileşmesinin potansiyel biyobelirteçleri (88) 27
Tablo 3-1: Kontrol gruplarının deney planı 37
Tablo 3-2: Tedavi gruplarının deney planı 38
Tablo 3-3: Primerlerin dizileri 42
Tablo 3-4: Tek bir örnek için gereken RT-qPCR reaksiyon karışımı 43
Tablo 3-5: ACTB, RELA ve MMP2 ekspresyonu için RT-qPCR deney planı 43
Tablo 3-6: MMP9 ekspresyonu için RT-qPCR deney planı 44
Tablo 3-7: Complete Hypotonic Buffer (1X)'ın hazırlanması 45
Tablo 3-8: Complete Nuclear Extraction Buffer (1X)'ın hazırlanması 46
Tablo 3-9: Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer (CTFB) hazırlanması 48
Tablo 4-1: Yaralara uygulanacak olan dozun belirlenmesi için ön deneme sonuçları ... 52
Tablo 4-2: Deney gruplarının 0., 3., 7., ve 14. günlerdeki yara boyutu (mm) verileri. Sonuçlar ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla - Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 56
Tablo 4-3: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının ELISA yöntemi ile saptanan NF-κB (p65) aktivasyon sonuçları. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 59
Tablo 4-4: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan RELA mRNA ekspresyon düzeyleri. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-

diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 61
Tablo 4-5: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP2 mRNA ekspresyon düzeyleri. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 64
Tablo 4-6: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP9 mRNA ekspresyon düzeyleri. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 67
Tablo 4-7: Yara iyileşmesinin fizyolojik fazlarına göre çalışılan parametrelerin düzeylerinin gösterilmesi (Başlangıç düzeylerine göre). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: STZ'nin pankreatik beta hücresi üzerine etkisi 10
Şekil 2-2: Hipergliseminin NF-κB üzerinden inflamasyon yolağı 13
Şekil 2-3: Diyabetin farklı patofizyolojik etkilerinin gecikmiş yara iyileşmesi üzerine etkisi 18
Şekil 2-4: Yara iyileşmesinin fizyolojik süreçleri 21
Şekil 2-5: Metforminin NF-κB üzerinden potansiyel antiinflamatuvar özelliğinin gösterilmesi 30
Şekil 3-1: Deney hayvanlarında tam kat eksizyonel yara modeli oluşturulması 33
Şekil 3-2: Deney hayvanlarına tedavi uygulama süreci 34
Şekil 3-3: Cerrahi işlem anı 35
Şekil 3-4: İn vivo yara modelinin özet gösterimi 36
Şekil 3-5: Yara boyutlarının AutoCAD ile ölçülmesi 36
Şekil 3-6: Deney planının özet gösterimi 51
Şekil 4-1: Topikal olarak uygulanacak metforminin doz denemesi sonucu kontrole kıyasla kat değişim grafiği 53
Şekil 4-2: Topikal olarak uygulanan metforminin deney gruplarında 0., 3., 7., ve 14. günlerdeki yara kapanması üzerindeki iyileştirici etkisinin gösterilmesi. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 54
Şekil 4-3: Metformin ile tedavi edilen sıçanların yara kasılmasının 0., 3., 7. ve 14. günlerde fotoğraf görüntüleri. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 55
Şekil 4-4: Topikal olarak uygulanan metforminin deney gruplarında kutanöz yara iyileşmesi üzerindeki iyileştirici etkisinin grafiksel olarak değerlendirilmesi (*; 0. güne kıyasla, +; 3. güne kıyasla, #; 7. güne kıyasla – Grup içi anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu. 57
Şekil 4-5: Deney gruplarının 0. gündeki NF-κB p65 aktivitesi sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (*; NK grubuna kıyasla) 58
Şekil 4-6: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının ELISA yöntemi ile saptanan NF-κB (p65) aktivasyon sonuçlarının grafiksel olarak

değerlendirilmesi (*; 0. güne kıyasla, +; 3. güne kıyasla, #; 7. güne kıyasla – Grup içi anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.....60
Şekil 4-7: Deney gruplarının 0. gündeki RELA ekspresyon sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (*; NK grubuna kıyasla).....61
Şekil 4-8: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan RELA mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel olarak değerlendirilmesi. (*; 0. güne kıyasla, +; 3. güne kıyasla, #; 7. güne kıyasla – Grup içi anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.....62
Şekil 4-9: Deney gruplarının 0. gündeki MMP2 ekspresyon sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (¤; NK grubuna kıyasla). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.....64
Şekil 4-10: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP2 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel olarak değerlendirilmesi. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.....65
Şekil 4-11: Deney gruplarının 0. gündeki MMP9 ekspresyon sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (¤; NK grubuna kıyasla). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.....67
Şekil 4-12: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP9 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel olarak değerlendirilmesi. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.....68

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

NF-κB: Nükleer faktör kappa B

DNA: Deoksiribonükleikasit

RNA: Ribonükleikasit

mRNA: Mesajcı (messenger) ribonükleikasit

RT-qPCR: Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MMP: Matriks metalloproteinaz

STZ: Streptozotosin

DM: Diabetes mellitus

T1DM: Tip 1 Diabetes mellitus

T2DM: Tip 2 Diabetes mellitus

GDM: Gestasyonel diabetes mellitus

ATP: Adenozin trifosfat

AMP: Adenozin monofosfat

AMPK: AMP ile aktive olan protein kinaz

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitör-1

GLUT2: Glikoz taşıyıcı-2

PKC: Protein kinaz C

PI3K: Fosfotidil inositol-3-kinaz

AGE: İleri Glikasyon Son Ürünleri

CRP: C-reaktif protein

IL: İnterlökin

DAG: Diaçilgliserol

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TGF-β: Transforme edici büyüme faktör-β

TNF-α: Tümör nekroz faktörü-α

IκB: İnhibitör kappa B

ROS: Reaktif oksijen türleri

ECM: Ekstraselüler matriks

TIMP: Metalloproteinazların doku inhibitörleri

EGF: Epidermal büyüme faktörü

PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü

DAMP: Hasarla ilişkili moleküler paternler

CSF: Koloni stimulan faktör

NLR: Nötrofil / lenfosit oranı

LPS: Lipopolisakkarit

NLRP3: NOD benzeri reseptör protein 3

DPP-4: Dipeptidil peptidaz-4

FTS: Fizyolojik tuzlu su

IP: İntraperitoneal

DTT: Dithiothreitol

NP-40: Nonidet P-40

HRP: Horse radish peroksidaz

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ÖZET

Tombultürk, F.K.T. (2021). Metforminin Diyabetik Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Moleküler Mekanizmasının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Diabetes mellitus, insülin sekresyonunun ve/veya etkisinin mutlak ya da göreceli azlığı sonucu çok sayıda farklı komplikasyonlara yol açan kronik hiperglisemi ile sonuçlanan metabolik bir hastalıktır. Özellikle diyabette ve diyabetik komplikasyonlarda hipergliseminin neden olduğu inflamatuvar süreç oldukça ilgi çekmektedir. Bu komplikasyonlardan biri olan kronik yara iyileşmesindeki inflamatuvar mekanizmaların çözümüne yönelik araştırmaların, yara oluşumu ve yara iyileşmesinin gecikmesinin altında yatan süreçler hakkında fikir vermesi beklenmektedir. Yara iyileşmesi, insan vücudundaki en karmaşık süreçlerden biridir. Hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, yeniden epitelizasyon ve yeniden şekillenme aşamalarında farklı rollere sahip çeşitli hücre tiplerinin zamansal senkronizasyonunu içerir. Diyabet ve komplikasyonları için inflamatuvar temelin bu şekilde daha iyi anlaşılması, halihazırda kullanılan farmakolojik olan ve farmakolojik olmayan müdahalelerin yanı sıra tedaviye yeni yaklaşımlar getirmek için değerli olabilir. Bir biguanid olan metformin, tip 2 diyabetin tedavisinde yaygın olarak kullanılan en eski oral antihiperglisemik bir ilaç olmasına rağmen, az sayıda çalışma yara iyileşmesindeki topikal etkisinin moleküler mekanizmasını araştırmıştır. Biz de topikal metformin uygulaması sonucu diyabette sıkça görülen gecikmiş yara iyileşmesi üzerindeki moleküler etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu bağlamda, tam kat eksizyonel yara modeli uygulanan Wistar albino sıçanlar kullanılarak, metformin uygulanan diyabet ve diyabet olmayan hayvanlar ile serum fizyolojik uygulanan diyabet ve diyabet olmayan hayvanlarda 0., 3., 7. ve 14. günlerde alınan yara örneklerinde ELISA yöntemi ile NF-κB p65 DNA bağlanma aktivitesi ve RT-qPCR yöntemi ile RELA, MMP2, MMP9 mRNA ekspresyon düzeylerini araştırdık. Çalışma sonucunda metforminin özellikle diyabetik yaralarda NF-κB p65 aktivitesini düşürerek ve RELA, MMP2, MMP9 ekspresyon düzeylerini azaltarak kronik yara iyileşmesinde kritik bir aşama olan inflamatuvar süreci baskılaması sonucu yara iyileşmesini hızlandırdığını gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Yara İyileşmesi, Metformin, Nükleer Faktör kappa B, Matriks metalloproteinaz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34143

ABSTRACT

Tombultürk, F.K.T. (2021). Investigation of the Molecular Mechanism of the Effect of Metformin on Diabetic Wound Healing. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Doktora Tezi. İstanbul.

Diabetes mellitus is a metabolic disease that results in chronic hyperglycemia, leading to many different complications as a result of absolute or relative insufficiency of insulin secretion and/or its effect. Especially in diabetes and diabetic complications, the inflammatory process caused by hyperglycemia is of great interest. Studies on the resolution of inflammatory mechanisms in chronic wound healing, one of these complications, are expected to provide insight into the processes underlying wound formation and delayed wound healing. Wound healing is one of the most complex processes in the human body. It involves the temporal synchronization of various cell types with different roles in hemostasis, inflammation, proliferation, re-epithelization and remodeling stages. This better understanding of the inflammatory basis for diabetes and its complications may be valuable in introducing new approaches to therapy, as well as pharmacological and non-pharmacological interventions currently used. Although metformin, a biguanide, is the oldest oral antihyperglycemic drug commonly used in the treatment of type 2 diabetes, few studies have explored the molecular mechanism of its topical effect on wound healing. We aimed to investigate the molecular effects of topical metformin application on delayed wound healing, which is common in diabetes. In this context, we created a full-thickness excisional wound model in Wistar albino rats. We investigated NF-κB p65 DNA binding activity by ELISA method and RELA, MMP2 and MMP9 expression levels by RT-qPCR method in wound samples taken on days 0, 3, 7 and 14 in diabetic and non-diabetic animals treated with metformin and diabetic and non-diabetic animals treated with saline. As a result of our study, we showed that metformin accelerates wound healing as a result of suppressing the inflammatory process, which is a critical stage in chronic wound healing, by decreasing NF-κB p65 activity and decreasing RELA, MMP2, MMP9 expression levels, especially in diabetic wounds.

Key Words: Diabetes, Wound Healing, Metformin, Nuclear Factor Kappa Beta, Matrixmetalloproteinase

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 34143

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), göreceli veya mutlak bir insülin eksikliği ve / veya insülin direnci ile karakterize edilen ve hiperglisemiye neden olan kronik bir metabolik hastalıktır. Diyabette kronik hiperglisemiden kaynaklanan Nöropati, nefropati ve retinopati ve artmış kardiyovasküler hastalık riski gibi çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkar (1). En yaygın görülen diabetes tipleri, tip 1 diyabet (T1DM) ve tip 2 diyabettir (T2DM). Tip 1 diyabetin genellikle, insülin üreten pankreas hücrelerinin yok edilmesiyle immün sistemle ilişkili olduğu düşünülmektedir (2, 3). Bu nedenle otoimmün bir hastalık olarak kabul edilir ve en çok çocuklarda ve genç erişkinlerde görülür (4). Hastalığın kan glikoz takibi ve eksojen insülin uygulaması yoluyla yönetimi zahmetli ve maliyetlidir, bu da kan şekerini düzenlemeye yönelik titiz çabalara paralel olarak sistemik komorbiditelerle ilişkili hiper- ve hipoglisemik olaylarla sonuçlanabilir (5, 6). Tip 2 diyabet (T2DM), insülin direnci ve göreceli bir insülin eksikliğine yol açan beta hücreleri tarafından insülinin yetersiz sentezi ile ilişkilidir (7).

Diyabet kalp iskemisi, serebral iskemi, böbrek yetmezliği, amputasyon ve nöropati gibi diğer komplikasyonlara da yol açan en önemli sebeplerden biridir. Bu komplikasyonlar arasında kronik diyabetik yaralar diyabetik ülserlerin neden olduğu alt ekstremite amputasyonu diyabetik hastalarda, diyabetik olmayan hastalara göre 20 kat daha yüksektir (8). Diyabetin ayrıca bağışıklık fonksiyonunu bozduğu ve yara iyileşmesini engellediği gösterilmiştir; bunların her ikisi de kronik diyabetik yaralar ve iyileşme süreçleri için kritiktir (9, 10) Dahası, hiperglisemi, cilt hasarını takiben epitelizasyonun aşaması içinde bir risk faktörüdür (11) Tip 2 diyabetik hayvan modelleriyle yapılmış yara çalışmaların da Aktif insülin reseptörlerinin sayılarında önemli oranda düşüklük tespit edilmiştir. Diyabetik hastalarda yara iyileşmesindeki bozulma, kronik açık yaralar, kangren, ampütasyon ve hatta ölüm gibi ciddi komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir (12-14). Diyabette tespit edilen bozulmuş yara iyileşmesi, esas olarak nötrofil infiltrasyonunun yoğun inflamasyon kombinasyonu ve büyüme faktörü etkileşimlerini etkileyerek diyabetik hastalarda zayıf re-epitelizasyon veya anjiyogeneze yol açan ciddi bir komplikasyondur (15-18).

Metformin, orta çağ Avrupa'sında bitkisel tıpta kullanılan Galega officinalis bitkisinden elde edilen doğal bir ürün olan galeginden elde edilir (19, 20). Kimyasal

olarak galegin, guanidinin bir izoprenil türevidir, metformin ve fenformin ise ek ikamelerle çift guanidin molekülü içeren biguanidlerdir. Çoğu modern ilacın aksine, metformin, bitkisel tıpta kullanılan doğal bir üründen türetilmiştir ve belirli bir yolu veya hastalık mekanizmasını hedeflemek için tasarlanmamıştır, ancak 60 yıldır klinik kullanımına rağmen moleküler etki mekanizmaları hala tartışılmaktadır (21). Bir biguanid olan metformin, dünya çapında Tip 2 DM tedavisinde ilk seçenek ilaç olarak kabul edilmektedir. Antihiperglisemik etkisini, hepatik glukoz üretiminin inhibisyonu, bağırsak glikoz emiliminin azalması, glikoz alımının iyileştirilmesi ve periferik dokular tarafından kullanılması dahil olmak üzere çeşitli düzeylerde gösterir (22). Metabolik etkilerinin çoğu, mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I'in doğrudan inhibisyonu yoluyla uygulanır, bu da ATP tükenmesi ve AMP artışı ile sonuçlanır (23). Sonuç olarak, AMPK'nin fosforile aktivasyonu dolaylı olarak indüklenir (24). AMPK'ya bağımlı ve bağımsız bir şekilde metformin, immünomodülatör etkiye dahil olan mTOR sinyalini aşağı regüle eder (25). Metforminin, nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve MAPK / JNK
(26) gibi diğer inflamasyon yollarını da modüle ettiği gösterilmiştir. Bütün bunlar, immünomodülatör ve antiinflamatuar özelliklerin, yara iyileşmesinin tedavisi için metformin potansiyelini destekleyebileceğini göstermektedir.

Bu bağlamda özellikle diyabetin neden olduğu kronik yaralarda normal şartlarda T2DM'un oral tedavisi için kullanılan metforminin yaralar üzerine topikal yolla uygulanarak kronik yaraya sahip hastalar için ucuz, pratik, yan etkisi olmayan ve etkinliği yüksek terapötik bir ajan olabileceğini gösterebilmek amacıyla planladığımız çalışmada diyabetik olan ve diyabetik olmayan sıçanlar üzerinde tam kat eksizyonel yara modeli oluşturarak yara iyileşme fazları içinde kritik bir geçiş olan inflamasyon-proliferasyon adımında moleküler mekanizmayı açıklamayı hedefledik. Böylelikle yara iyileşmesini takip ettiğimiz günlerde alınan yara biyopsi örneklerinde NF-κB p65 aktivitesi ile RELA, MMP2 ve MMP9'un mRNA ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçladık. Sonuçta, akut ya da kronik yaralar üzerinde topikal olarak uygulanan metforminin inflamasyonu baskılayarak yara iyileşmesinin bir sonraki evresi olan proliferatif evreye geçerek yara iyileşmesini hızlandıran ve de gelecekte potansiyel bir terapötik ajan olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet ve Diyabet Çeşitleri

Diyabet, insülin direncine, yetersiz insülin sekresyonuna veya her ikisine bağlı olarak hiperglisemi ile karakterize metabolik bozukluktur (27). Diyabette başlıca klinik belirti hiperglisemidir. Bununla birlikte, insülin eksikliği ve / veya insülin direnci ayrıca lipid ve protein metabolizmasındaki anormallikler ve mineral ve elektrolit bozukluklar da diyabette görülmektedir. Diyabetik hastaların büyük çoğunluğu iki büyük kategoriye göre sınıflandırılır: mutlak veya neredeyse mutlak bir insülin eksikliğinden kaynaklanan Tip 1 Diabetes Mellitus veya yetersiz insülin sekresyonuna bağlı insülin direncinin varlığı ile karakterize edilen Tip 2 Diabetes Mellitus. Ayrıca hamilelikleri sırasında diyabet geliştiren kadınlar gebelik (gestasyonel) diyabeti olarak sınıflandırılır. Ayrıca enfeksiyonlar, ilaçlar, endokrinopatiler, pankreas yıkımı ve genetik kusurların neden olduğu nadir olarak görülen diyabet çeşitleri de vardır (Tablo 2-1) (28).

Tablo 2-1: Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflandırması (28)

I. Tip 1 diyabet
- İmmünite aracılı
- İdiyopatik
II. Tip 2 diyabet
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri
a. Beta hücre fonksiyonunun genetik kusurları
- MODY tipleri (MODY1,…..,MODY7)
- Geçici Yeni doğan Diyabeti
- Kalıcı Yeni doğan Diyabeti
- Mitokondriyal DNA

- Diğerleri

b. İnsülin etkisinin genetik kusurları

c. Ekzokrin pankreas hastalıkları

- Pankreatit
- Travma / pankreatektomi
- Neoplazi
- Kistik fibrozis
- Hemokromatoz
- Diğerleri

d. Endokrinopatiler

- Akromegali
- Cushing sendromu
- Hipertiroidizm
- Aldosteronoma
- Diğerleri

e. İlaç veya kimyasal kaynaklı

- Pentamidin
- Nikotinik asit
- Glukokortikoidler
- Tiroid hormonu
- Beta-adrenerjik agonistler
- Tiyazidler
- Diğerleri

f. Enfeksiyonlar

- Konjenital kızamıkçık

- Sitomegalovirüs
- Diğerleri

g. Bağışıklık aracılı diyabetin yaygın olmayan formları

- Stiff-man sendromu
- Anti-insülin reseptör antikorları
- Diğerleri

h. Bazen diyabetle ilişkilendirilen diğer genetik sendromlar

- Down sendromu
- Klinefelter sendromu
- Turner sendromu
- Huntington koresi
- Miyotonik distrofi
- Porfiri
- Prader-Willi sendromu
- Diğerleri

i. Post-transplantasyon

2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)

Tip 1 diyabet, pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanır (29, 30). Beta hücresinin immün yıkım belirteçleri, tanı anında bireylerin %90'ında mevcuttur. Bu belirteçler arasında adacık hücre antikorları (ICA'lar), glutamik asit dekarboksilaz (GAD65), ZnT8, tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2β'ye karşı antikorlar ve insülin oto-antikorları (IAA'lar) bulunur. Tip 1 diyabet genellikle çocuklarda ve ergenlerde ortaya çıkarken, her yaşta da ortaya çıkabilir. Daha genç bireylerde hızlı bir beta hücre yıkımı oranını ve ketoasidoz ile görülürken, yetişkinlerde genellikle uzun yıllar ketoasidozu önlemek için yeterli insülin sekresyonuna rastlanır (31). Sonuçta, tüm tip 1 diyabetik

hastalar, normoglisemiyi sürdürebilmek için insülin tedavisine ihtiyaç duyacaktır (32, 33).

2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)

Tip 2 diyabet, insülin direnci ve hastadan hastaya değişen bir insülin sekresyon yetersizliği ile karakterizedir (34, 35). Hastalarda plazma insülin konsantrasyonu (hem açlık hem de öğünle uyarılan) genellikle artar, ancak insülin direnç şiddeti bireyler arasında farklılık göstermesine rağmen, plazma insülin konsantrasyonu normal glikoz homeostazını sürdürmek için yeterlidir (35, 36). Ancak zamanla, ilerleyici beta hücre yetmezliği gelişir ve sonrasında insülin eksikliği daha da ciddi hale gelir., Beta hücre yanıtı ve insülin sekresyon analizleri, tip 2 diyabet riski taşıyan çoğu deneğin, yani kombine bozulmuş açlık glikozu ve bozulmuş glikoz toleransı olanlar, pankreasın toplam insülin salgı kapasitesinin %80'ine yakın, kayıp yaşadığını ortaya koymuştur (37). Tip 2 diyabetli hastaların çoğu, insülin direncinin varlığıyla yakından ilişkili ektopik yağ birikiminin bir parçası olan karın içi (viseral) obezite sergiler (31, 38). Ek olarak, bu bireylerde hipertansiyon, dislipidemi (yüksek trigliserit ve düşük HDL-kolesterol seviyeleri; postprandiyal hiperlipemi), vasküler endotel disfonksiyonu ve yüksek Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) seviyeleri görülür. Bütün bu semptomlardan dolayı tip 2 diyabet "insülin direnci sendromu" veya "metabolik sendrom" olarak adlandırılır (39- 41). Bu anormallikler nedeniyle, tip 2 diyabetli hastalar, makrovasküler komplikasyonlar (miyokardiyal enfarktüs ve felç) ile aterosklerotik kardiyovasküler hastalık (ASCVD) gelişme riski altındadır. Tip 2 diyabet güçlü bir genetik yatkınlığa sahiptir ve azınlık etnik gruplarda daha yaygındır. Tip 2 diyabetin yaygın çeşitliliğinin genetik nedenleri iyi tanımlanmamıştır. Çok sayıda gen, tip 2 diyabet ile ilişkilendirilmiştir, ancak bunlar, hastalığın kalıtsallığını tam olarak açıklamamaktadır (35, 42).

2.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Gestasyonel diabetes mellitus (GDM), ilk olarak hamilelik sırasında fark edilen glikoz intoleransı olarak tanımlanır. GDM geliştiren çoğu kadında, bozukluk gebeliğin üçüncü trimesterinde başlar. Tip 2 diyabet için yüksek riskli popülasyonlarda oranlar ikiye katlanabilse de gebelik diyabeti tüm gebeliklerin yaklaşık %8-9'unu zora sokmaktadır (43).

2.2. Deneysel Diyabet

Hayvan modelleri diyabet araştırmalarında rutin olarak kullanılmaktadır. Kemirgenler en çok etik ve pratik nedenlerle kullanılır (44), ancak domuzlar, kediler, köpekler ve primatlar gibi daha büyük hayvanlar özel çalışmalar için kullanılır. Hiperglisemi farklı diyabet tiplerini birbirine bağlasa da her birinin etiyolojisi ve klinik özellikleri farklıdır. Hayvan model seçimi, bir Tip 1 veya Tip 2 diyabet modelinin mekanizmasını açıklayacağından oldukça önemlidir. Bu seçim, ayrıca amaca göre değişir. Örneğin patogenez hakkında bilgi edinmek hastalığı başlangıç aşamasında önlemek hastalığı tedavi etmek açısından oldukça önemlidir (45).

Bu nedenlerden dolayı, hastalığın hangi yönlerinin araştırılmak isteğine bağlı olarak, diyabet hayvan modelleri dikkatlice seçilmelidir. Dahası, hayvan modelleri, sendromun genetik ve fonksiyonel karakterizasyonunun kombinasyonunu açıklayacağından diyabet patogenezinin anlaşılmasında hayati bir rol oynar (46). İnsülin üretiminde bir eksikliği ile ortaya çıkan otoimmün diyabet olarak da adlandırılan Tip 1 diyabet, Tip 2 diyabetten oluşum mekanizması açısından çok faklıdır (47). Tip 1 diyabette olduğu gibi Tip 2 diyabetin patofizyolojisini ve komplikasyonlarını anlamak için de çok sayıda hayvan modeli geliştirilmiştir (48). Bu hayvan modelleri, insülin direnci modelleri ve / veya beta hücre yetmezliği modellerini içermektedir. Öte yandan, bazı obez T2DM hayvan modelleri obezitenin T2DM gelişimiyle yakından bağlantılı olduğu nu açıklamaktadır. Bu modellerin çoğu, yüksek kan şekeri düzeylerine yol açan obezite, glikoz intoleransı ve / veya insülin direnci ile ilişkili tek bir gende veya birden fazla gende anormalliklere sahip hayvan modellerdir (49). Diyabetik komplikasyonların ilerlemesi; obezite, insülin direnci, hiperglisemi ve hiperlipidemi gibi çeşitli semptomlardan etkilenir (48). Tip 1 diyabet en çok çocuklarda ve genç yetişkinlerde teşhis edilir. Tanı anında hastalar çok az endojen insülin üretimine sahiptir ve bu nedenle ömür boyu insülin tedavisine ihtiyaç duyarlar. Hem genetik hem de çevresel faktörler hastalıkta rol oynar
(4).

Hastalık esas olarak, pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımına bağlı olarak insülin üretiminde önemli bir düşüşe bağlı şiddetli hiperglisemi ile karakterizedir (50). Bu nedenle, Tip 1 diyabetik hayvan modelleri, ideal olarak ya otoimmün süreci kopyalayarak ya da başka yollarla beta hücre kütlesinde büyük bir azalmaya sahip

olmalıdır. Tip 1 diyabetin en sık kullanılan kemirgen modellerinden bazıları Tablo 2-2'de özetlenmiştir (51).

Tablo 2-2: Tip 1 Diyabetin En Sık Kullanılan Kemirgen Modellerinin Temel Özellikleri (51)

Tip 1 diyabet modeli	Başlangıç	Yaş/indüksiyon zamanı	Patogenezi anlamak için yararlı mı?	Önleme çalışmalarında yararlı mı?
Nonobese diyabetik (NOD) fareler	Spontanöz (Doğal)	12–30 hafta	Evet	Evet
Biobreeding (BB) sıçanlar	Spontanöz (Doğal)	8–16 hafta	Evet	Evet
Lew.1AR1-IDDM sıçanlar	Spontanöz (Doğal)	~8 hafta	Evet	Evet
Komeda diyabetik eğilimli (KDP) sıçanlar	Spontanöz (Doğal)	~8 hafta	Evet	Evet
Akita fareleri	Spontanöz (Doğal)	~4 hafta	Bazı yönler	Hayır
Düşük doz streptozotosin	İndüklenmiş	Birkaç gün içinde	Bazı yönler	Bazı yönler
Yüksek doz streptozotosin	İndüklenmiş	Birkaç gün içinde	Hayır	Hayır
Alloksan	İndüklenmiş	Birkaç gün içinde	Hayır	Hayır

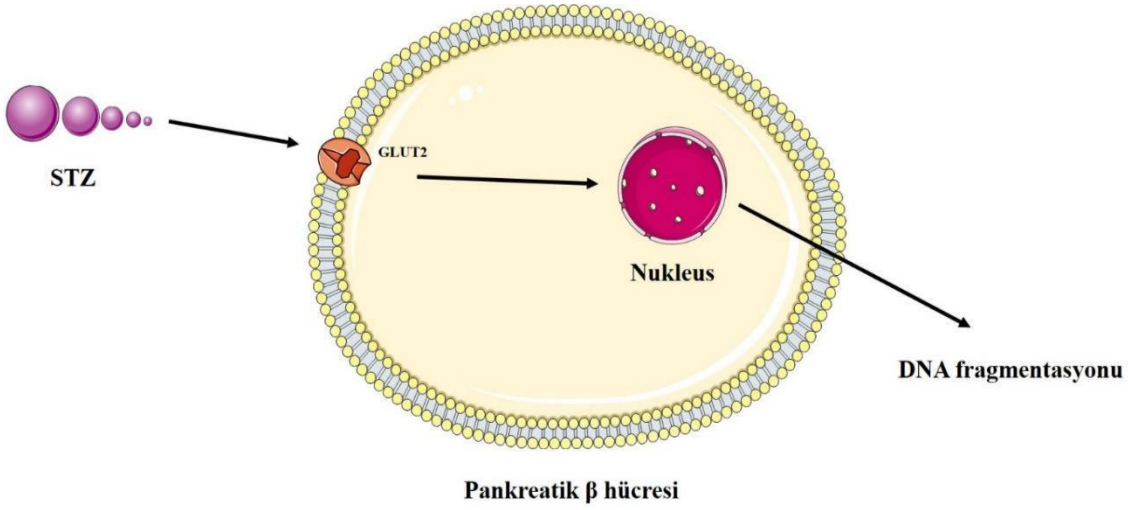
2.2.1. Kimyasal Bileşiklerle Oluşturulan Diyabet Modelleri

Bazı kimyasal bileşikler hayvan modellerinde diyabete neden olduğu gösterilmiştir, ancak en çok çalışılan ve rutin olarak kullanılan diyabet modelleri her ikisi de glikoz analogları olan streptozotosin (STZ) ve alloksanla gerçekleştirilir. STZ ve alloksan, beta hücrelerinde bulunan glikoz taşıyıcı GLUT2 aracılığıyla çalışır (52, 53). Bununla birlikte, farklı etki mekanizmalarına sahiptirler, ancak sonuçta her ikisi de adacıklar içindeki beta hücrelerinin neredeyse tamamen yıkımına yol açarak, böylece Tip 1 diyabetin ana semptomlarını gösteren, insülin üretiminde ciddi bir eksikliğe neden olur. Hiperglisemi ve kilo kaybına da yol açan bu bileşikler düşük maliyeti dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle diyabet araştırmalarında uzun yıllardır kullanılmaktadır, dahası küçük hayvanlarda bir hafta içinde stabil hiperglisemi sağlarlar (54) ve de hiperglisemiyi azaltmanın yollarını araştırmak için ideal bir platform sağlarlar, örneğin yeni insülin tedavilerinde veya adacık transplantasyonunun etkinliği gibi. Glikoza benzemeleri nedeniyle alloksan ve STZ, GLUT2 yoluyla alım için glikozla rekabet eder, bu nedenle bazı araştırmacılar uygulamadan önce hayvanların aç bırakılmasını önermektedir. Böbrek ve karaciğer de GLUT2 taşıyıcısını içerir, ancak bu organlarda toksik etkilere neden olacağından alloksan ve STZ, aşırı dozlarından kaçınmaya özen gösterilmelidir (52, 53). Beta hücre rejenerasyonu alloksan veya STZ uygulamasından sonra rutin olarak meydana gelmese de her iki bileşik için de rapor edilmiştir (55, 56) ve bu nedenle bunu kontrol etmek için önlemler alınmalıdır.

2.2.2. Streptozotosin

Streptozotosin (2-Deoxy-2-({(methyl(nitroso)amino) carbonyl} amino)-β-d-glucopyranose) (STZ), Streptomycetes achromogenes mantarı tarafından üretilen bir antibiyotiktir ve kronik diyabet sağlamak için hem tek bir yüksek dozda hem de çok sayıda düşük dozda kullanılabilir. STZ ayrıca GLUT2 taşıyıcısı aracılığıyla çalışır ve hücre içinde birikerek alkilleyici ürün diazometanı oluşturur ve bu hücrelerdeki DNA'nın alkilasyonu yoluyla beta hücre ölümüne neden olur (Şekil 2-1). Beta hücrelerinin STZ tarafından haraplanmasının nedenleri ortaya konmuştur. STZ'nin kendisi bir nitrik oksit donörüdür ve bu doğrudan DNA'yı etkileyebilir ve hasara neden olabilir. Ek olarak, STZ, alloksan gibi süperoksit gibi serbest radikallerin üretimine neden olur ve bu da sonuçta mitokondride ATP üretiminin bozulması yoluyla hidrojen peroksidaz ve hidroksil kaynaklı DNA hasarına yol açar. Bu DNA hasarı, hücre içi NAD^+'yı azaltan ve

mitokondride mevcut ATP'yi daha da düşüren poli ADP-ribozilasyon aktivasyonuna neden olur. ATP'deki bu genel azalma, beta hücrelerinden daha az insülin sentezine ve salgılanmasına yol açar. Sonraki glikoz aşırı yüklenmesi daha sonra PKC yollarını aktive eder ve aşağı akış glikasyon ürünleri ile sonuçlanır ve daha fazla oksidatif stres ve hücre apoptozu, nekroz ve DNA hasarı ile sonuçlanır (57). STZ ayrıca hem doğrudan hem de dolaylı olarak NF-κB'yi aktive etme kabiliyetine sahiptir, bu da sitokin üretimine ve mitokondriyal düzensizliğe yol açarak beta hücrelerinin bozulmasına katkıda bulunur.



Şekil 2-1: STZ'nin pankreatik beta hücresi üzerine etkisi

STZ'nin yarılanma ömrü 15 dakikadır ve bu nedenle, maksimum etki için pH 4,5 sitrat tamponunda çözdürerek her seferinde taze bir preparat olarak uygulanması önerilir. Türler ve suşlar arasındaki dozlarda birçok farklılık vardır. Tek yüksek doz için 100 ila 300 mg / kg ve çoklu düşük doz enjeksiyonlar için 30 ila 80 mg / kg arasında değişen dozlarda uygulanır (54). Aslında, araştırmada seçilecek deney hayvanların yaş ve cinsiyeti de büyük bir rol oynamaktadır, çünkü genç kemirgenler STZ'ye yaşlı hayvanlardan daha duyarlıdır (58) ve dişiler, sıçanlarda gösterildiği gibi STZ'nin neden olduğu hiperglisemiyi hafiflettiği görülen östrojenlere bağlı olarak STZ'ye kısmi direnç gösterir (59). STZ, örneğin karaciğerde (60) daha az zararlı etkiye sahip alloksandan biraz daha iyi bir toksisite profiline sahip gibi görünmektedir ve geniş bir terapötik pencereye sahip olması, onu şu anda diyabetin indüksiyonu için daha uygun bir seçenek haline getirmektedir. STZ'nin, immün toleransın dahil olabileceği adacık transplantasyon

çalışmalarının yorumunu etkileyebilecek lenfopeni indükleyebileceği de unutulmamalıdır (61).

2.2.2.1. Tek Yüksek Doz STZ

Kemirgenlerde tek bir yüksek STZ dozu, suş ve cinsiyete bağlı olarak sıçanlar için 35 ila 65 mg / kg ve fareler için 100 ila 300 mg / kg arasında değişir. İlk birkaç saat içinde bir başlangıç hiperglisemi fazı vardır ve bunu takip eden 3-5 gün içinde kan glikoz seviyelerinin genellikle 400-600 mg / dL (22–33 mM) aralığına yavaşça artmasından önce 8 saate kadar hipoglisemi izler (54, 57). Hipoglisemi raporları, enjeksiyonu takip eden erken dönemde glikoz uygulanmasını öneren bazı protokollere yol açmıştır. Bununla birlikte, King ve ark. (2016), sıçanlarda sürekli glikoz izleme kullanarak, hipoglisemi belirtisi olmadan saatler içinde STZ'ye bağlı diyabetin tetiklendiğini göstermiştir (45).

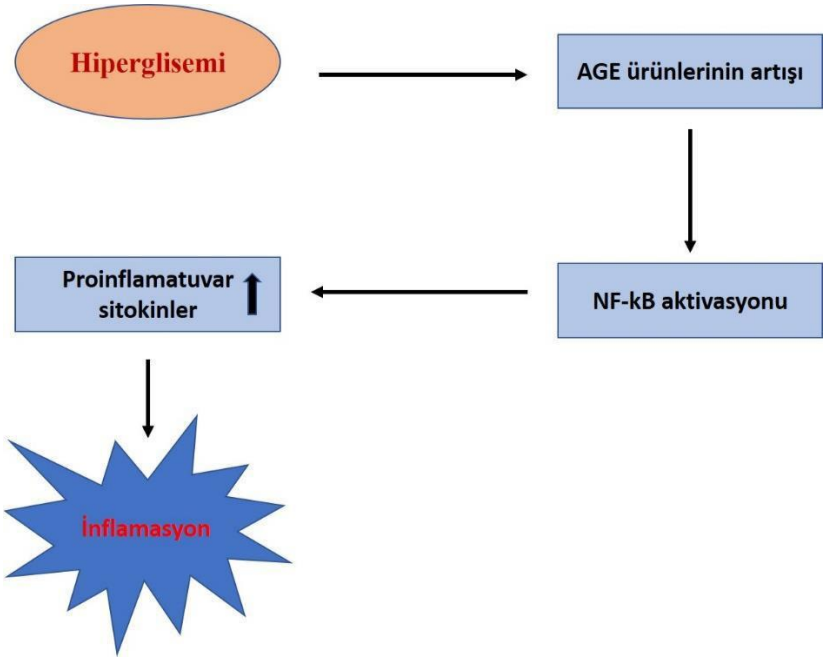
2.2.2.2. Çoklu Düşük Doz STZ

Çoklu düşük doz STZ muamelesi, insüliti modellemek ve ayrıca sıçanlarda ve farelerde hiperglisemi üretmek için kullanılır. 20 ila 40 mg / kg arasındaki çoklu STZ dozları, arka arkaya 3-5 gün boyunca uygulanır ve bu, beta hücrelerinin yaklaşık %85'inin tükenmesine yol açar. Bu tip dozlama, sonuçta sitokin aracılı hasarla beta hücre ölümüne yol açan adacıkların makrofaj infiltrasyonuna yol açan bir inflamatuvar yanıtı indükler (62-64). Bu yolun genetik olarak bloke edilmesi, daha az hayvanın diyabetik hale gelmesine yol açtığından, bunun NF-κB'ye bağlı bir yolla meydana gelmesi muhtemeldir (65). Beta hücre kütlesi ve salgılama fonksiyonunda dramatik bir kayıp 1 gün içinde meydana gelir ve ardından 3. gün civarında daha sonra görülen maksimum makrofaj infiltrasyonu izler (66).

2.3. Diyabetik Komplikasyonlar

Gerek insanlarda gerekse diyabetik hayvan modellerinde insülin eksikliği ve /veya insülin direnci diyabetik komplikasyonların gelişimi için önemli bir risk faktörü olan hiperglisemiye yol açar. İnsülin, normal fizyolojik koşullar altında kardiyovasküler dokularda iki ana yolağı uyarmak için insülin reseptörleri ile etkileşime girer: aterojenezi inhibe eden ve antiaterojenik etkilere sahip bir PI3K yolağı ve hücresel büyümeyi teşvik eden ve aterogenezi güçlendiren MAPK ile aktive edilen diğer yolak (67-69). İnsülin direnci ve diyabet varlığında, glikoz ve serbest yağ asitlerindeki artış, inflamatuvar

sitokinlerin artmasına ve PKC ve MAPK aktivitesinin değiştirilmiş regülasyonuna yol açar. Bu durum PKC, PI3K yolağını inhibe eder ve antiaterojenik nitrik oksit üretiminde bir azalma ve bozulmuş endotelyuma bağlı vazodilatasyon gibi süreçler yoluyla artmış aterojenez ile sonuçlanır. Ek olarak, insülin direnci ve diyabet tarafından başlatılan süreçler, proaterojenik eylemler için MAPK yolağını uyarır. PKC-β'nin aktivasyonunun, diyabetik retinopati ve nefropati dahil olmak üzere, diyabette mikrovasküler komplikasyonların patogenezi ile ilşkili olduğunu göstermektedir (68, 69). İnsülin eksikliğinde ortaya çıkan hiperglisemi retinopati, nöropati ve nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonların ana sebebi olarak kabul edilir. Hipergliseminin poliol/aldoz azaltma yolağı, ileri glikasyon son ürün (AGE) yolağı, reaktif oksijen türleri yolağı ve PKC yolağı dahil olmak üzere bir dizi yolak üzerinden etki ettiği gösterilmiştir (67). Bu yolaklar, dokularda hem sistemik hem de lokal olarak zararlı etkilere neden olan oksidan ve inflamatuvar aracılara yol açar. Yolakların aktivasyonu, gluko-oksidanların ve AGE'lerin artmış üretiminin yanı sıra aldoz azaltma yolu boyunca PKC, MAPK ve NF-κB gibi aracılar tarafından sinyalizasyon kaskadlarının aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 2-2) (67). Bu durum hücresel disfonksiyona ve mikro ve makrovasküler komplikasyonlarla ilişkili hasara katkıda bulunur. İnflamatuvar ve oksidan yolaklarının, diyabetik komplikasyonların patogenezine katkıları vardır (68). Kanıtlar, CRP ve IL-6 gibi sistemik inflamasyon belirteçlerindeki artışların, tip 2 diyabette diyabetik nefropati gibi komplikasyonlarla ilişkili olduğunu son çalışmalar göstermektedir (70). Hipertansiyon, hiperlipidemi ve inflamasyon birlikte kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkilidir (67).



Şekil 2-2: Hipergliseminin NF-κB üzerinden inflamasyon yolağı

Hiperglisemi, etkisini PKC yolağını indükleyerek gerçekleştirir. Bu, farklı genlerin ekspresyonuna ve / veya farklı proteinlerin fonksiyonuna yol açarak diyabetik komplikasyonların gelişmesine neden olur. Ayrıca hücresel fonksiyon bozukluğuna ve hücresel hasarlara katkıda bulunur. Diyabetik vasküler komplikasyonların gelişimi için iyi tanımlanmış bir diğer yolak, diaçilgliserol (DAG)- PKC yolağıdır (68, 69). DAG seviyelerinde ve PKC aktivitesindeki artışlar, diyabetik hayvanların (hiperglisemi sonucu) farklı dokuların da ve hücre kültür çalışmalarında saptanmıştır. Diğer taraftan DAG oluşumuna hiperglisemi sonucu oluşan serbest radikaller ve AGE'lerde birikimi yol açar. DAG sentezinin uyarılması, PKC izoformlarını aktive eder ve PKC-β'nin retina, böbrek, kalp ve damar sistemi gibi dokularda hasara yol açtığı gösterilmiştir (68, 69). PKC'nin vaskülatürde aktivasyonu, bazal matriks protein sentezindeki artışlara, lökositlerin aktivasyonu, endotel hücre aktivasyonu ve proliferasyonu, düz kas hücresi kasılması, endotelyal geçirgenlik, sitokinlerin, TGF-β, endotelin, VEGF aktivasyonu ve anjiyojenez gibi süreçlerle ilişkilli olduğu saptanmıştır (30, 69, 71). Vasküler komplikasyonlar, seçici insülin direnci varlığında kardiyovasküler dokularda artan PKC ve MAPK aktivitesinden kaynaklanır (68, 69).

2.3.1. Diyabette İnflamasyon

Bununla birlikte, diyabet ve diyabet komplikasyonlarında inflamatuvar süreç ilgi çekmektedir. İnflamatuar süreç her iki diyabet tipinde de (tip 1 ve tip 2 diyabet) etkilidir; ancak, iki tip diyabetin de farklı etiyolojisinin olması, farklı mekanizmaların etkili olduğunu göstermektedir. Tip 1 diyabet sıklıkla çocuklukta veya genç erişkinlikte bulunur ve insülin üretimi kaybına yol açan pankreas adacık hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanır. Tip 2 diyabet daha çok yetişkinlerde görülür, daha yaygın bir formudur. Pankreas beta hücrelerinin yeterli insülin salgılayamamasıyla bağlantılı olarak insülin direncinde bir artışla karakterize edilir (72).

Tip 1 diyabette inflamatuvar süreçlerin kesin rolünü ortaya koyan bazı tartışmalar olsa da dolaşımdaki inflamatuvar biyobelirteçlerin bir ölçüsü olan C-reaktif protein (CRP) seviyelerine ilişkin bulgulardan kaynaklanan çalışmalar bulunmaktadır (73). Diyabette görülen inflamatuar ve oksidatif stres artışların, mikrovasküler hastalığı olmayanlara kıyasla, mikrovasküler hastalığı olan kişilerin CRP seviyelerinde ve çözünür vasküler hücre adezyon molekülü-1 ve nitrotirozin konsantrasyonlarında artışla birlikte, diyabet komplikasyonlarının gelişmesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (74). Tip 1 diyabetli hastalarda interlökin (IL) -1β ve süperoksit anyonlarının monosit salınımındaki artışlar da rapor edilmiştir, bu durum mikrovasküler ve kardiyovasküler hastalıklarda inflamatuvar belirteç seviyesinde yükseklikle izah edilmektedir (74).

Günümüzde tip 2 diyabetin gelişmesinde ve ilerlemesinde inflamatuvar süreçlerin rolüne ait çok sayıda çalışma mevcuttur. İnflamatuvar belirteçlerdeki artışlar, daha sonra tip 2 diyabet geliştirmeye devam eden görünüşte sağlıklı bireylerde tespit edilir; bu da inflamasyonun, bozulmuş glikoz toleransı döneminde, tip 2 diyabet tanısından önce meydana geldiğini düşündürür (27, 75, 76). Tip 2 diyabetin başlangıç aşamasında insülin direnci ve bu sırada beta hücre yıkımı ve nispi insülin eksikliğinin bir sonucu olarak bozulmuş glikoz toleransı oluşur. Genetik ve çevresel etkiler, obezite ve kronik inflamasyon veya enfeksiyonla ilişkili durumlar da dahil olmak üzere, bozulmuş glikoz toleransı ve tip 2 diyabetli bireylerde insülin direncinin gelişmesiyle bağlantılı çeşitli faktörlerin rol oynadığı gösterilmiştir. Obezitenin ve özellikle yağ dokusunun aktivasyonunun, insülin direncinin gelişmesinin altında yatan inflamatuvar faktörlerin salınımını artırma olasılığı, diyabet alanında yoğun ilgi uyandırmıştır. Diyabet gelişiminde etkin faktörlerden biri de obezitedir. Obezite, tip 2 diyabet gelişimi için bir

risk faktörüdür (77, 78). Obez bireylerde lipidler, yağ asitleri ve çeşitli inflamatuvar sitokinler gibi adiposit kaynaklı metabolitlerin artan salınımı, insülin direncinin gelişmesiyle ilişkilidir (79). Kronik inflamasyon obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabet ile bağlantılıdır ve bunların tümü "metabolik sendrom " olarak bilinen metabolik patolojilerin genel özellikleridir (80).

TNF-α ve diğer inflamatuvar aracıların obezite ve tip 2 diyabette insülin direncinin gelişmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu konudaki çalışmalara göre, inflamatuvar sitokinler ve / veya bakteriyel lipopolisakkarit, nükleer faktör-kappa B'nin (NF-κB) aktivasyonunu indüklemek için I-kappa-B (IκB) kinaz-β'yi (IKKβ) ve muhtemelen IKKα'yı uyarmaktadır. Diğer inflamatuvar olmayan hücre / sitokin aracılı ajanlar da serbest yağ asitleri, obezite, hiperglisemi, protein kinaz C (PKC) aktivatörleri ve oksidanlar dahil olmak üzere NF-κB aktivasyonuna katkıda bulunur. Bir transkripsiyon faktörü olan, NF-κB'nin aktivasyonu sonucu insülin direncinin gelişimini destekleyen genlerin ekspresyonunda artış gerçekleşir (79).

Hedef genlerin NF-κB tarafından indüksiyonu, insülin direnci ile bağlantılı inflamatuvar belirteçlerin ve medyatörlerin artmış ekspresyonuna yol açar ve reseptörler, inflamatuvar medyatörler, kemokinler ve transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere diğer faktörlerin üretimi de gerçekleşir. Bunların yanı sıra, monositlerin toplanması ve bunların makrofajlara farklılaşması gerçekleşir hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, IKKβ / NF-κB yolağının insülin direncinin gelişimindeki kritik rolünü ortaya koymuştur (79, 81, 82).

2.4. Diyabet ve Kronik Yaralar

Diyabetik hastalarda yara iyileşmesinde gecikmeler 'geç yara iyileşmesi' şeklinde açıklanır. Normal şartlarda yara iyileşmesi, fagositoz, kemotaksis, mitogenez, kollajen sentezi ve bazı matriks elemanlarının sentezi gibi birçok hücresel aktivitenin düzenli bir şekilde bir arada gerçekleşmesiyle olurken diyabetik hastalardaki yara iyileşmesinde değişik aşamalarda aksamalar olur. Diyabetik yaralarda bu 3 süreç de hasarlandığından yara iyileşmesi gecikir (83). Diyabetiklerdeki kronik-iyileşmeyen yaralar, hiperglisemi, bozulmuş kan damarı rejenerasyonuna bağlı hipoksi, daha yüksek düzeylerde metaloproteinazlar (MMP'ler), periferik nöropatiler, keratinosit ve fibroblast disfonksiyonu, hücre proliferayonunda azalma, epitelizasyonda yavaşlama, daha yüksek bir enfeksiyon riski ve yüksek ROS ve AGE düzeyleri seviyelerinin bir sonucu olarak

ortaya çıkar (84). İyileşmekte olan yaraların gerilim kuvvetinin normale göre düşük olduğu ve bu durumun kollajen sentezindeki azalma ile ilgili olduğu da gösterilmiştir. Diyabet oluşturulmuş deney hayvanlarında keratinosit büyüme faktörünün ve vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) azalmış olduğu yine gösterilen bulgular arasındadır (83, 85).

Bozulmuş iyileşme, oksijenasyon, mikrobiyal varlık ve venöz besleme gibi birçok faktörden dolayı yara iyileşmesi normal aşamalarında ilerlemez. Bir yaranın meydana gelme yeteneğini etkileyen diğer faktörler arasında yaralanmanın boyutu, bireysel immün ve inflamatuvar yanıtlar ve yara oluşumundan iyileşme sürecine kadar geçen süredir (86, 87).

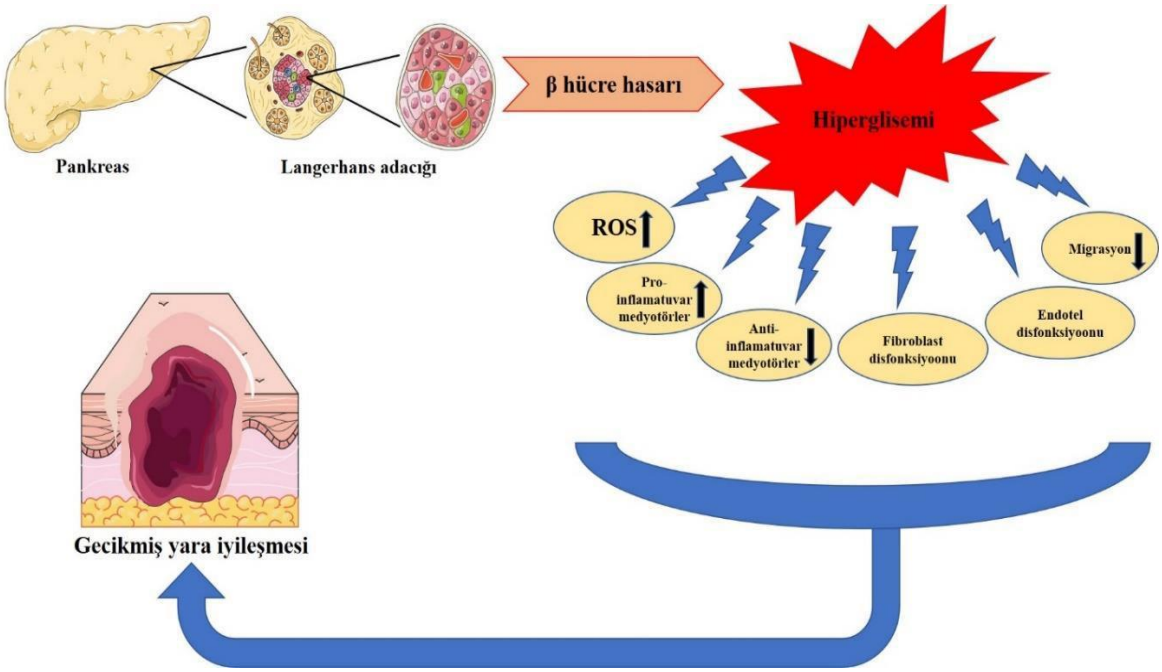
Yara iyileşmesi üzerine yapılan araştırmalar, akut, sağlıklı yaralardaki fibroblastların sağlıksız yaralardakilere göre daha aktif olduğunu ve inflamatuvar uyaranlara iyi yanıt verdiğini göstermektedir, çünkü fibroblastların kendileri hasar görmüş veya büyüme faktörlerine yanıt eksikliği gibi ortamdaki faktörler de etkilidir (88). Örneğin sağlıklı yaralardan salgılar fibroblast kültürlerinde DNA sentezini uyarırken, kronik, iyileşmeyen yaralardan gelen salgılar onları inhibe eder (88, 89).

Yara iyileşmesinin proliferasyon evresinde kollagen oluşumu oldukça önemlidir. Normal yara iyileşmesinde fibroblastlar kolajen sentezlemeye başladıkça proteaz (örn; kolajenaz) aktivitesi azalır, ancak kronik yaralarda kollagenaz aktivitesinin çok yüksek olduğu olduğu bulunmuştur. Bu durum, ekstraselüler matriksi (ECM) yok ederek yara iyileşmesini geçiktirmektedir. Çalışmalar, MMP, katepsin-G ve nötrofil elastaz seviyelerinin kronik yaralarda yüksek kalırken, MMP fonksiyonunu inhibe eden metaloproteazların doku inhibitörlerinin (TIMP'ler) daha düşük seviyelerde olduğu göstermiştir (90-93). Sonuçta, matriks proteinlerinin uygunsuz birikimi oldukça önemlidir. Proteazlar ayrıca taze ve temiz iyileşen yaralarda stabil olan TGF1-α, EGF ve PDGF molekülleri gibi büyüme faktörlerini degrade eder ve tüketir (88, 90). Aşırı yara proteazları, yeni oluşan ECM ve diğer proteinlerin degradasyonuna yol açar (büyüme faktörleri ve reseptörler gibi), böylelikle yara iyileşmesinin sürecini bozulmasına neden olur. Bu durumun nedeni iyileşmenin inflamatuvar aşamasının anormal uzaması, yaranın proliferatif faza ilerlemesinin engellenmesidir (94).

Diyabet, vasküler hastalık ve yaşlanma gibi hadiseler, kronik yaralara katkıda bulunan ve bunlar diyabetik ayak ülserlerine, venöz bacak ülserlerine ve basınç

ülserlerine neden olan ana faktörlerdir (95). Diyabetik popülasyonun (30 milyon) hızla artmasıyla birlikte kronik yaralar, sağlık bakım maliyetlerinin giderek daha büyük bir kısmına neden olmaktadır (96). Büyüme faktörleri, ECM, işlenmiş deri ve negatif basınçlı yara tedavisi gibi müdahaleler mevcut olsa da bu tedavilerin çoğu sadece orta derecede etkilidir (95). Yeni ve daha etkili tedavilere acil bir ihtiyaç vardır. Başarılı terapötik stratejiler geliştirmek için, bozulmuş iyileşmenin altında yatan mekanizmaları anlamak önemlidir.

Diyabetik yaraların patofizyolojisi çok faktörlüdür (Şekil 2-3). Diyabette kronik hiperglisemi, kollajen ve diğer proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonlarına ve ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumuna yol açar. Bu ürünler, ekstraselüler matriksin çözünürlüğünü azaltır ve diyabette gözlemlenen inflamatuvar değişikliklere neden olur (97-99). Hiperglisemi ayrıca endotel metabolizmasını ve fonksiyonunu değiştirebilir ve sonunda anjiyogenez sürecini etkileyen bir dizi mikro ve makro dolaşım bozukluğu ile sonuçlanabilir (100). Uzun süre yüksek glikoza maruz kalma durumunda, endotel hücreleri bütünlüğünü kaybeder ve apoptozise duyarlı hale gelir (101). Ayrıca, monositler aktive olabilir ve diasilgliserol-protein kinaz C (PKC) ve nükleer faktör-κB (NF-κB), oksidatif stres gibi inflamatuvar medyatörleri indükleyebilir (102). Moleküler düzeydeki bu değişiklikler, diyabet, ciltte yara iyileşmesinin sonuçlarında rol oynayan birçok kritik yolda bozukluklara neden olur. Diyabet, ayrıca hücre, proliferasyonu ve büyüme faktörü salınımını bozar. Ayrıca bozulmuş yeni damar oluşumu vardır (99, 103-106).



Şekil 2-3: Diyabetin farklı patofizyolojik etkilerinin gecikmiş yara iyileşmesi üzerine etkisi

Diyabetik yarada monositlerin girişini ve makrofajların aktivasyonunu geciktiren MCP-1 ve MIP-2 gibi kemokin ve sitokinlerin üretiminde de bir gecikmede görülür (107). Makrofaj aktivasyonundaki bir gecikme, bozulmuş efferositoza ve yara debrisinin, apoptotik hücrelerin ve nötrofillerin kalıcılığına neden olur. Yara debrisinin prevalansı, sabit bir inflamatuvar faz oluşturur ve aktive edilmiş nötrofiller, yara mikro ortamını bozan proteazları salmaya devam eder (108). İnflamasyon yeniden şekillenme aşamasında devam eder ve yara iyileşmesi hiçbir zaman tam olarak tamamlanamaz (107).

Fibroblastlar ve keratinositler de diyabette bozukluklar gösterir. Diyabetik yaradaki fibroblastlar hipoksiye önemli ölçüde daha az yanıt verir, daha az VEGF üretir ve üretilen ECM'yi parçalayan MMP'leri yüksek oranda eksprese eder (109). Diyabetik yaradaki keratinositler ayrıca mikro ortamdaki değişikliklerden etkilenir ve yer değiştirmelerinde, çoğalmalarında ve boşluk bağlantılarında değişiklikler gösterir (110).

Yaşlılarda veya şeker hastalarında bulunanlar gibi kronik yaralar, genellikle yara yatağında kolonize olan ve çoğalan mikropların zararlı etkilerinden muzdariptir (111-113). Bu özelliklerin tümü, inatçı yaraların kronikliğini teşvik eder. Toplu olarak, mikro ortamdaki, hücre fonksiyonundaki ve biyofilm birikimindeki bozukluklar, anormal yara iyileşmesine, derinin gerilme mukavemetinin azalmasına ve yaranın tekrarlamasına yol

açar (99). Bu bulgular, yara mikro ortamının normalleşmesinin hücreler tarafından kazanılan disfonksiyonu geri döndürebileceğini düşündürebilir. Bununla birlikte, uzun süreli hiperglisemiye maruz kalan hücrelerin, normoglisemiye döndüklerinde bile hücrelerin normal işlevlerini geri kazanmadıkları metabolik hafıza sergiledikleri gösterilmiştir (114, 115).

2.5. Yara İyileşmesi Mekanizması

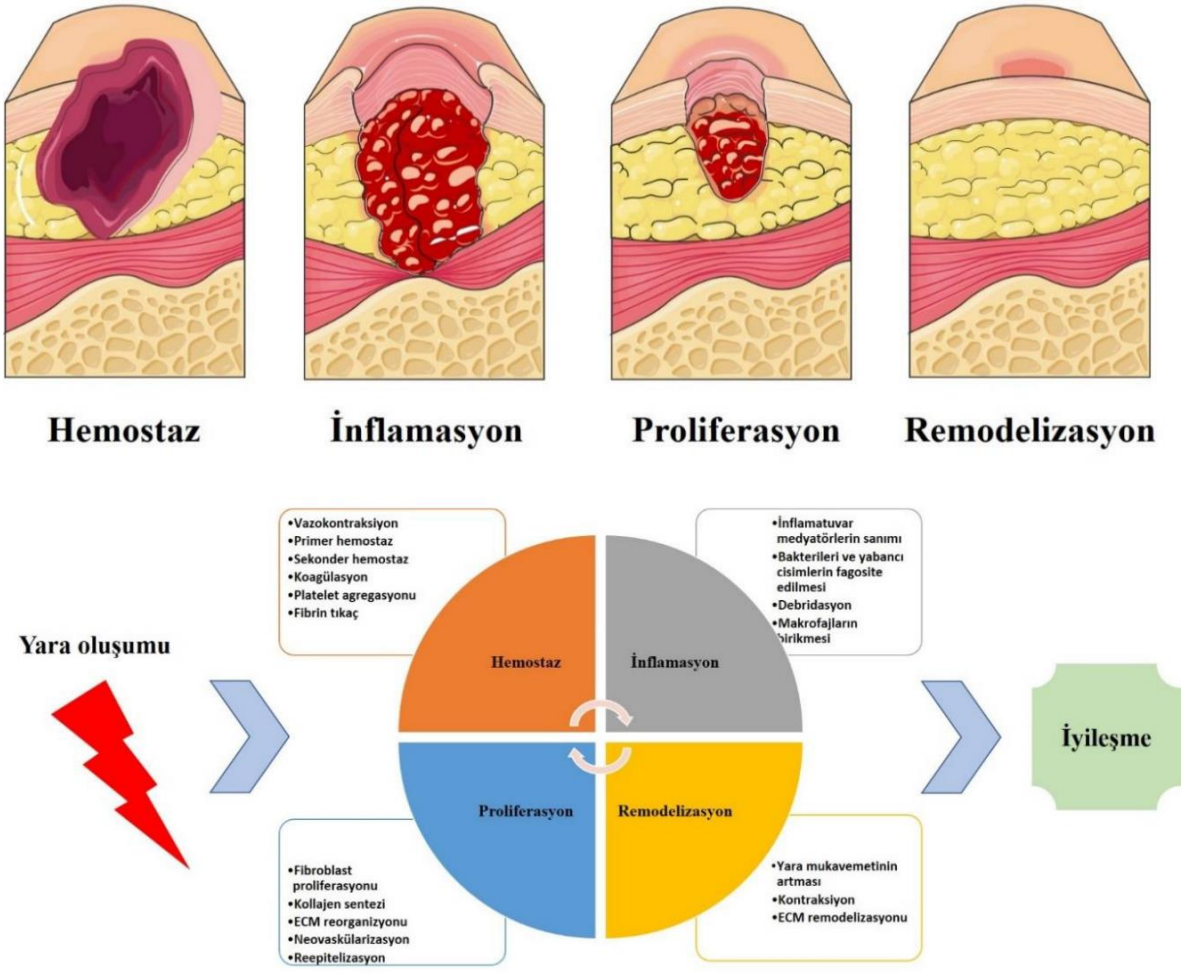
Deri, insan vücudundaki yüzey alanına göre en büyük organdır. İç dokuları mekanik hasar, mikrobiyal enfeksiyon, ultraviyole radyasyon ve aşırı sıcaklıktan koruyan kritik yapıdır (116, 117). Yara ise canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır (118). Diyabetli hastalar, yaşlılar ve orak hücre hastalığı gibi genetik bozuklukları olan hastalar, özellikle uzun vadeli sekele yol açan anormal yara iyileşmesine yatkındır. Şaşırtıcı bir şekilde, mevcut müdahaleler durumu önemli ölçüde etkilemedi. Yara iyileşmesi için birkaç tedavi mevcut olsa da bunlar sadece orta derecede etkilidir. Bu nedenle, yaraları iyileştirmek için daha etkili tedavilere ihtiyaç vardır. Cilt onarımı, birkaç farklı hücre tipinin sıralı adımlarda karmaşık senkronizasyonunu gerektirir. Epidermis ayrıca yağ bezlerini, ter bezlerini ve saç köklerini içerir. Dermis, ekstraselüler matriks (ECM), damar sistemi ve mekanoreseptörler açısından zengindir ve cilde güç, besinler ve bağışıklık sağlar. Deri altı yağ dokusu, dermisin altında bulunur ve bir enerji rezervi olarak işlev görür. Aynı zamanda dermiş için sürekli bir büyüme faktörleri kaynağıdır. Bu hücre türlerine ek olarak, her katman, cildi sürekli olarak hasar için araştıran yerleşik bağışıklık hücreleri içerir. Cilt yaralandığında, bu üç katmandaki birden fazla hücre türünün, iyileşmeyi sağlamak için kesin aşamalarda koordine olması gerekir. Hemostaz, inflamasyon, anjiyogenez, büyüme, yeniden epitelizasyon ve reepitelizasyonun bu aşamaları, geçici bir sırayla meydana gelir, ancak aynı zamanda örtüşür (119). Bu nedenle cilt onarımı, insan vücudundaki en karmaşık süreçler arasındadır. Bir yaraya ilk cevap, yaralı kan damarlarının daralması ve trombositlerin fibrin pıhtısı oluşturmak için aktivasyonudur (120). Fibrin pıhtısı kan akışını durdurur ve gelen inflamatuvar hücreler için bir yapı iskelesi sağlar. Nötrofiller, bakterilere karşı ilk savunma hattı olarak hemen pıhtıya dahil edilir (121). Monositler, yaralanmadan 48-96 saat sonra toplanır ve yara bölgesinde doku ile aktive olan makrofajlara dönüşür (122). Langerhans hücreleri, dermal dendritik hücreler ve T hücrelerini içeren adaptif bağışıklık sistemi de kendi kendine ve yabancı

antijenlerle savaşmak için aktive edilir. Bu bağışıklık hücresi popülasyonları içindeki heterojenliği, özellikle de enfeksiyonun çözülmesine karşı hücresel debrisin temizlenmesinde spesifik alt kümelerin nasıl yer aldığını anlamaya artan bir ilgi vardır (123, 124). İnflamatuvar aşama sona erdiğinde, anjiyogenez meydana gelir. Anjiyogenez, yeni kan damarları oluşturmak için endotelyal hücre proliferasyonunu, göçünü ve dallanmayı içerir. Endotel hücrelerinin çoğalmasıyla eş zamanlı olarak, bazal laminanın içindeki perisitler aktive olur, bu da endotel hücrelerine yapı bütünlüğü sağlar (125, 126). Lokal hücrelere ek olarak, kemik iliğinden dolaşan progenitör hücrelerin de yara iyileşmesi sırasında yeni kan damarı oluşumunu desteklediği bulunmuştur (103, 127-129).

Yeni kan damarı oluşumu, perivasküler boşlukta meydana gelen hücresel çeşitliliğin çoğu ile birkaç hücre tipini içerir. Yeni kan damarları ortaya çıkarken, yerleşik fibroblastlar çoğalır ve kasılma granülasyon dokusu oluşturmak için pıhtıyı istila eder. Burada bazı fibroblastlar, yara kenarlarını bir araya getirerek miyofibroblastlara farklılaşır (130). Bölünen fibroblastlar ECM biriktirir ve yara mikro ortamını inflamatuvar durumdan büyüme durumuna kaydırır (131). Yeniden epitelizasyon eşzamanlı olarak gerçekleşir ve hem tek kutuplu epidermal kök hücrelerin bazal membrandan çoğalmasını hem de terminal olarak farklılaşmış epidermal hücrelerin farklılaşmasını içerir (132). Epidermal tabakanın onarımı ayrıca deri uzantılarının yeniden yapılandırılmasını da içerir. Yağ bezleri, ter bezleri ve saç folikülleri için dokuda yerleşik kök hücreler de keşfedilmiştir ve bu hücreler lokal apendiks onarımını etkinleştirebilir (125, 133, 134). Bu hücreler, neovaskülarizasyon ve yara onarımı için kritik olan büyüme faktörlerini ve sitokinleri serbest bırakır. Deri altı dokudaki inflamatuvar hücreler de özellikle obezite ve tip 2 diyabet koşullarında dikkat çekmiştir çünkü artan inflamasyon yara onarımının sonucunu değiştirebilir. Çoğu durumda iyileşme, bariyer işlevini ve cildin normal gerilme mukavemetine yakın olmasını sağlar (119). Yara iyileşme yanıtındaki bozukluklar da kronik yaralara neden olabilir (135). Kronik yaralar hemoglobinopatiden muzdarip hastalarda olduğu gibi diyabet, damar hastalığı ve yaşlanmada yaygındır. Bu yaralara uygun olmayan bakım, nüksle sonuçlanır ve uzuvların kesilmesine ve ölüme neden olabilir. Deri onarımı ve yaraları iyileştiren hücresel mimari hakkındaki bilgilerimizin büyük ölçüde kemirgenlerde cerrahi olarak oluşturulmuş deri yaralanması modelleri kullanılarak elde edildiğini belirtmek önemlidir. Bununla birlikte, insan veya domuz derisinin aksine kemirgen derisi elastiktir, alttaki

yapılara yapışmaz ve panniculus carnosus veya çizgili kas tarafından uyarılan kasılma ile kapanır (136). Buna karşın insan cildi, granülasyon dokusu oluşumu ve yeniden epitelizasyon ile iyileşir. İnsan derisinin ex vivo kültürleri, organotipik kültürler ve debride edilmiş deri örnekleri kullanılarak insan derisinde yara iyileşmesini incelemeye artan bir geçiş olmuştur (137).

Yara iyileşmesinde rol oynayan fizyolojik süreçler ardışık bir düzen içinde olmayan, birbiri içerisinde sınırları tam olarak ayırt edilemeyen, bir dizi kısmen örtüşen biyokimyasal ve hücresel olayların bütünüdür. Yara iyileşmesi birbirini takip eden, sürekli olarak hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkilerinin olduğu temelde 4 ana evrede gerçekleşir: Hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (remodeling, maturasyon) (88, 90, 138, 139) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Yara iyileşmesinin fizyolojik süreçleri

2.6. Yara İyileşmesinin Fizyolojik Aşamaları

2.6.1. Hemostaz

Hemostaz, vasküler hasardan sonra kanamayı durduran yara iyileşmesinin (140) ilk aşamasını işaret eder. Üç adımda oluşur: vazokonstriksiyon, primer hemostaz ve sekonder hemostaz. Bu sürece dahil olan kritik hücre trombosittir; kritik matriks bileşeni fibrinojendir. Yaralanmamış durumda, trombositler sağlıklı endotel hücre tek tabakası tarafından zamansız aktivasyondan korunur (141). Yaralanmamış ciltteki trombositler damar duvarına yapışmaz veya birbirleriyle kümelenmez. Fibrinojen (faktör 1), hepatositler tarafından üretilir ve kanda dolaşır (142). Aynı zamanda trombositlerde de bulunur, ancak kan pıhtısının önemli bir bileşeni olan fibrin liflerine bölünmez (143). Deri yaralandığında, kanamayı durdurmak için hemen verilen yanıt damar duvarlarının vazokonstriksiyonudur. Daha sonra, primer hemostaz ve sekonder hemostaz, eşzamanlı ve mekanik olarak iç içe geçmiş iki yolla gerçekleşir (144). Primer hemostaz, trombosit agregasyonunu ve subendotelyal matriks içinde kollajenin maruz kalmasıyla ortaya çıkan trombosit tıkacı oluşumunu içerir. İkincil hemostaz, çözünebilir fibrinojenin fibrin ağını oluşturan çözünmez ipliklere dönüştürüldüğü pıhtılaşma kademesinin aktivasyonunu ifade eder. Trombosit tıkacı ve fibrin ağ, kanamayı durduran, tamamlayıcıları ve büyüme faktörlerini serbest bırakan ve yara iyileşmesi için gerekli olan hücrelere sızmak için geçici bir iskele sağlayan trombüsü oluşturmak üzere birleşir (140).

2.6.2. İnflamasyon

Yara iyileşmesi birkaç adım içerdiğinden, yaralı dokudaki hücresel yanıtı harekete geçiren ilk sinyalleri anlamak önemlidir. Kopyalama mekanizmasının aktivasyonu zaman alır. Böylelikle yara, ilk önce kolaylıkla aktive edilebilen transkripsiyondan bağımsız yolları açar. Bunlar arasında Ca^{2+} dalgaları, reaktif oksijen türleri (ROS) gradyanları ve purigenik moleküller bulunur. Hücre içi Ca^{2+} artışı, yaralanmanın ilk birkaç dakikasında yara kenarlarında meydana gelir ve yaranın merkezine doğru yayılır (145). Hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP'ler), hidrojen peroksit (H_2O_2), lipit aracıları ve yaralı hücreler tarafından salınan kemokinler ayrıca inflamatuvar hücrelerin, özellikle nötrofillerin toplanması için sinyaller sağlar (146). Purigenik moleküllere ek olarak, mast hücrelerinin yaralanmadan hemen sonra inflamatuvar hücreleri topladığı keşfedilmiştir. Aksi takdirde alerjik tepkilere dahil olan bu hücreler, granüllerinde çeşitli aracılar içerir. Yaralanmadan hemen sonra, mast hücreleri, inflamatuvar sitokinler, vazodilasyon

maddeleri, vasküler geçirgenlik faktörleri ve bağışıklık hücrelerinin yaraya alınmasını artıran proteazları içeren faktörleri serbest bırakır (147).

Yaralanmayı takip eden gün nötrofiller yaradaki tüm hücrelerin %50'sini oluşturur (148). İnflamasyon evresinin ilk hücresi olan nötrofillerin ana işlevleri hücre ve matriks yıkım ürünlerini, bakterileri ve yabancı cisimleri yaradan uzaklaştırırlar. Bu sürede epitelyal hücreler pıhtının altına doğru hareket eder ve çoğalarak epitel yüzeyini yeniden oluşturmaya başlarlar. Nötrofiller enfeksiyon kontrolünde ve doku debridmanında önemli bir rol oynar. Hücre proliferasyonunu destekleyen birkaç büyüme faktörü ve ekstraselüler matriksi bozan proteazlar ürettikleri için yaranın iyileşmesi sürecine de katılırlar (149). Bu sırada ortama nötrofil granüllerinden jelatinaz, elastaz, kollajenaz gibi proteazlarla birlikte reaktif oksijen radikalleri de salınır ve bu sayede nekrozu debride etmektedir (150, 151). Bununla birlikte, kronik yaralarda kanıtlandığı gibi, nötrofil kaynaklı proteolitik enzimlerin artan üretimi, büyüme faktörlerinin, büyüme faktörü reseptörlerinin ve ECM'nin bölünmesine, vasküler süreçleri ve kan akışını bozmanın yanı sıra doku hasarına neden olabilir (152).

Yaralanma, yara bölgesinde ilk 24-48 saat içinde makrofajların birikmesine neden olur (153). Aktive olmuş veya pro-inflamatuvar makrofajlar (M1 makrofajları) bakterileri, yabancı cisimleri, apoptotik nötrofilleri ve hasarlı doku bileşenlerini fagositoz yoluyla yaradan uzaklaştırır. Ayrıca çeşitli proinflamatuvar medyatörleri, sitokinleri, büyüme faktörlerini ve angiogenetik faktörleri de ifade eden primer kaynaktır (154). Makrofaj kaynaklı sitokinler yeniden damarlanma, fibroblast göçü ve çoğalması, kollajen üretimi ve yara kontraksiyonu ile iliskilidir (151, 155). Çeşitli lenfokinlerin fibroblast birikimi ve kollajen sentezi üzerine hem uyarıcı hem de engelleyici etkileri vardır. Bu iki etki arasında hassas bir denge mevcuttur (156). Yerleşik mast hücreleri de doku hasarına hızlı bir şekilde cevap verir ve yara iyileşmesi sürecinde önemli bir rol oynar (157, 158). 14. günde yaraların yeniden epitelize edildiği ve kapatıldığı genç sağlıklı farelerde, yara içindeki makrofajların sayısı kabaca 3. günde zirveye ulaşır, 5. gün civarında azalır ve 10. günde taban çizgisine yakın seviyelere ulaşır (159). Makrofajlar, normal yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi için kritik öneme sahiptir. Makrofajlardan yoksun fare yaraları, gecikmiş yara kapanması gösterir (160, 161). Makrofajı tükenmiş yaralar, telafi edici bir bağışıklık tepkisi olarak nötrofil akışını ve anjiyogenez, granülasyon dokusu, kollajen birikimi ve büyüme faktörü salınımında bir azalma gösterir (162, 163). Tersine,

yaradaki monosit veya makrofaj sayısının arttırılması hem normal hem de diyabetik murin yaralarının iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırabilir (164).

Proinflamatuvar makrofajlar ayrıca MMP'leri sentezler ve bu da onların göçlerine yardımcı olmak için ECM ve trombüsü sindirmelerine izin verir (165). Makrofaj disfonksiyonu, bozulmuş diyabetik yara iyileşmesinde de belirgindir. Diyabetik yaralar hem monosit alımı hem de makrofaj aktivasyonu için gerekli olan kemokinlerin ekspresyonunda zamansal bir gecikmeye sahiptir (107). Makrofajların gecikmiş akışı, nötrofillerin, ECM'nin ve yara debrisinin gecikmiş efferositozuna ve proliferasyon fazının gecikmiş başlangıcına yol açar (108). Diyabetik yaralardaki anormal makrofajlar, büyüme faktörü salınımında ve neovaskülarizasyonu teşvik etmede de tehlikeye girer (166).

2.6.3. Proliferasyon

İnflamasyon giderildiğinde, yara proliferatif faza geçer. Antiinflamatuvar makrofajlar (M2 makrofajlar), hücre proliferasyonunu ve protein sentezini destekleyen vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve TGF-β gibi büyüme faktörlerinin yanı sıra çeşitli anti-inflamatuvar mediatörleri, proteazları ve proteaz inhibitörlerini ifade eder (154). Yara iyileşmesinin proliferatif fazı sırasında, yeniden epitelizasyon, neovaskülarizasyon ve immünomodülasyon dahil olmak üzere diğer iyileşme süreçleri ile eş zamanlı olarak yeni bağ dokusu veya granülasyon dokusu oluşur. Granülasyon dokusu esas olarak yeni ECM'yi sentezleyen ve yaranın kasılmasına yardımcı olan aktive fibroblastlar tarafından oluşturulur. Ayrıca, yeni sentezlenen ECM, yeni kan damarları ve inflamatuvar hücreler dahil olmak üzere diğer hücreler ve bileşenler için bir iskele görevi görür. Granülasyon dokusu sonunda yara yeniden şekillenmesi sırasında normal bağ dokusu ile değiştirilir (119).

Fibroblastlar büyüme faktörlerinin uyarıları ile ekstrasellüler matriks içinden yaraya doğru göç ederler. Pıhtıdaki fibrin, fibronektin ve kollajen liflerine yapışarak çoğalırlar. Fibronektin boyunca ilerleyerek yarayı çaprazlarlar ve kollajen sentezi için bir ağ oluştururlar. 7. günde yaradaki baskın hücre grubunu oluştururlar. 5-7. günde kollajen sentezlemeye başlarlar ve bu 2-3 haftaya kadar doğrusal olarak artar (156). Epitel hücrelerinin mitozu 48-72. saatlerde başlar. Epitel iyileşmesi sağlıklı kişilerde 24-48 saatte tamamlanabilir. Daha sonra epidermisin bazal tabakası asırı mitotik aktivite göstererek kalınlaşır. Ardından keratin üreterek normal deri rengini alır. Keratin üreten

ve epitelyum hücrelerinin öncüsü olan keratinositler epitelizasyonun yanında koloni stimulan faktör (CSF), IL-1,3,6 ve büyüme faktörü de salgılayarak yara iyilesmesine ek katkıda bulunurlar. Yara uçlarının birbirine yaklaşmasıyla yara kontraksiyonu da başlamış olur (167).

Tip 1 ve tip 3 kollajen, interstisyel kollajen olup cildin majör kollajenidir ve gerilme kuvvetinin oluşmasından sorumludur. Bu dönemde esas olan kollajen sentezidir. Kollajen sentezi ilk olarak 7-10. gün baslar, 14-21. günlerde maksimumdur. Matürasyon fazı proliferasyon fazının son aşamasından, skar formasyonunun tamamlandığı zamana kadar devam eder (yaklaşık 21. gün – 6. ay). Bu fazda yaranın matürasyonu için kollajen sentezinin yanında, yıkım ve bu iki olay arasındaki denge de önemlidir. Yara iyileşmesinin en önemli safhasıdır. Çünkü bu fazın hızı, kalitesi ve oluşan matriksin miktarı skar oluşumunu direkt olarak etkilemektedir (167).

Fibroblastlar, ECM'yi biriktirdikleri ve yeniden şekillendirdikleri her organ sisteminin bağ dokusunda her yerde bulunur. Farklı dokulardan türetilen fibroblastlar arasında, gelişimin farklı aşamalarında ve aktivasyon durumlarına bağlı olarak dikkate değer bir heterojenite vardır (168). Bu heterojenlik, ECM birikimi ve organizasyonu, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanması ve immünomodülasyon dahil olmak üzere yara iyileşmesinde değişken işlevlere dönüşen fibroblast alt popülasyonları arasındaki önemli fenotipik farklılıklara katkıda bulunur (169). Fibroblast heterojenliği, yara onarımı sırasında dermal-epidermal etkileşimleri de etkiler. Daha yakın zamanlarda, yeni oluşan saç foliküllerinde miyofibroblastların yaralanma sonrası dermal adipositler oluşturabildiği ve bu miyofibroblasttan adiposite geçişin skar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (170). Dermal adipositler, saç folikülü rejenerasyonunu artırarak ve çevredeki fibroblastları aktive ederek skar oluşumunu önleyebilir (171, 172).

2.6.4. Remodelizasyon

Kan damarlarının yoğunluğu azalır ve kollajen yeniden düzenlenir. Bu safhada, fibroblastlar, granulositler ve makrofajlarca salgılanan matriks metalloproteinazların (MMP'ler) aktivitesi ile dengelenen sürekli yeni kollajen sentezi ve kollajen yıkımı vardır (13, 97, 98) ve 21 gün sonra sabit bir dengeye ulaşır. Yeni sentezlenen kollajen lifleri artık rasgele yönlendirilmemiştir, ancak çapraz bağlamayı kolaylaştıran ve böylece yaranın gerilme mukavemetini artıran gerilme çizgileri boyunca birbirine yakın durmaktadır. Kollajen miktarı, çapraz bağlanma yoğunluğu ve yapım-yıkım arasındaki

denge yaranın gücünü belirler. Miyofibroblastların, yaranın kenarlarını birbirine doğru çekerek yaranın boyutunu azalttığı sırada yara kasılması da ortaya çıkabilir (kontraksiyon) (173).

Çoğu klinik ortamda, akut ve kronik yaraların kapanması, yara iyileşmesinin son noktası olarak kabul edilir, ancak yaralar birkaç ay hatta yıllarca yeniden şekillenmeye veya doku olgunlaşmasına uğrayabilir. Yara iyileşmesinin bu son aşaması nihayetinde yara izi oluşup oluşmayacağını veya yaranın tekrar edip etmeyeceğini belirler. Yeniden modelleme aşaması, neovaskülatürün gerilemesinin yanı sıra ECM'ye periyodik bir birikimden ve ardından granülasyon dokusunun yara dokusuna yeniden oluşturulmasından oluşur. Granülasyon dokusu büyük ölçüde, yaranın yeniden şekillenmesi ilerledikçe kısmen daha güçlü kollajen I ile değiştirilen kollajen III'ten oluşur. Bu süreç, eş zamanlı kollajen I sentezi ve kollajen III lizizinin bir sonucudur, bunu ECM'nin yeniden düzenlenmesi izler (119). Yeniden epitelizasyon meydana geldiğinde, granülasyon dokusundaki miyofibroblastlar MMP'leri ve bunların ilgili inhibitörlerini (metaloproteinazların doku inhibitörleri, TIMP'ler) sentezlemeye devam eder (174, 175). MMP'ler, yeniden modellemede önemli bir adım olan bozunma için ECM'nin belirli bileşenlerini hedefler (174). MMP'ler ECM'yi yeniden oluşturmak için çalışırken, matriks sentezi önemli ölçüde yavaşlar. Böylece granülasyon dokusunda bulunan kollajen III, kademeli olarak azaltılır ve kollajen I ile değiştirilir (176). ECM modifikasyonunun ardından, TIMP'ler MMP'leri bloke etmeye başlar ve daha fazla ECM bozulmasını durdurur. TIMP ve MMP ekspresyonu arasındaki bir dengesizlik, anormal ECM modifikasyonuna ve hatta kronik yaralara neden olabilir (177, 178). Yara iyileşme sürecini tamamladığında miyofibroblastlar aracılı apoptoza uğrar (179). Granülasyon dokusundaki hücreler, yaranın yeniden şekillenmesini takiben apoptoza girmediğinde, hipertrofik izler oluşma eğilimindedir (180).

2.7. Yara İyileşmesi İçin Biyobelirteçler

Şu anda en fazla potansiyele sahip olan biyobelirteçler sitokinler ve proteazlardır. Yara sonuçlarına ilişkin devam eden araştırmalar, sitokinler, kemokinler, MMP'ler ile diğer proteazlar ve inflamatuvar belirteç proteinler dahil olmak üzere belirli proteinlerin düzeylerindeki değişikliklerin korelasyonuna dikkat çekmektedir (86).

2.7.1. Proteaz Seviyeleri

Utz vd. serum MMP-2 ve MMP-7'nin istatistiksel olarak yara iyileşme sonuçlarının tahmini olduğunu- düzey ne kadar düşükse- başarılı iyileşme şansı o kadar yüksek ve bu nedenle iyileşme için güvenilir biyobelirteçler olma olasılığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir (181). Yara sıvısı MMP-9 / TIMP oranları ve MMP'lerin ve elastazın yara seviyeleri de yara davranışının iyi prognostikatörleri olabilir (182). MMP seviyesi ve MMP-9 / TIMP oranı ne kadar düşükse, yara iyileşmesinin sonucunu tahmin etmek için uygun ve uygun biyobelirteçler olarak hizmet veren yara iyileşme şansı o kadar artar (Tablo 2-3).

Tablo 2-3: Yara iyileşmesinin potansiyel biyobelirteçleri (88)

Moleküller	Yara iyileşmesindeki etkileri
MMP seviyeleri	İyileşmeyen yaralarda yükselir
MMP/TIMP oranları	İyileşmeyen yaralarda yükselir
Sitokin seviyeleri	İyileşmeyen yaralarda yükselir
Prokalsitonin seviyeleri	İyileşmeyen yaralarda yükselir
Reaktif oksijen türleri	İyileşmeyen yaralarda yükselir

MMP–metaloproteinazlar; TIMP– metaloproteinazların doku inhibitörleri

2.8. Metformin ve Yara İyileşmesi

Orta çağda, Gallega officinalis bitkisi, Avrupa'da diyabetli hastaları tedavi etmek için kullanıldı. 1800'lerin sonlarında, bu bitkinin guanidin açısından zengin olduğu tespit edildi (183). 1918'de guanidinin tavşanlarda kan şekeri düzeylerini düşürdüğü bulundu, ancak klinik kullanım için çok toksikti (184). 1929'da metformin de dahil olmak üzere birkaç biguanid sentezlendi. Biguanidler, ana bileşiklerinin antidiyabetik etkisini azaltılmış toksisite ile koruyarak onları ilgi çekici tedavi seçenekleri haline getirdi. Jean

Sterne, diyabeti tedavi etmek için metformin kullanımı üzerine ilk klinik araştırmayı gerçekleştirdi ve çalışmalarını 1957'de yayınladı (185). 60 yılı aşkın klinik kullanımdan sonra, metforminin güvenli ve uygun maliyetli olduğu kanıtlanmıştır ve bu da onu dünya çapında en sık reçete edilen oral antidiyabetik ajan haline getirmiştir (186). Büyüleyici bir şekilde, metformin ile tedavi edilen hastalarda kanser insidansı azalmıştır (187, 188) ve metformin Caenorhabditis elegans, fareler ve diyabetli hastaların ömrünü uzatmaktadır (189-191). Ortaya çıkan kanıtlar, potansiyel renal ve kardiyovasküler koruma, antioksidan, antifibrotik ve antiproliferatif özellikler (192) ve endotelyal prekürsör hücrelerin sayısını ve işlevini artırma becerisini (193, 194) içeren metforminin yeni pleiotropik etkilerini göstermektedir. Aslında, ilgi çekici bir anti-inflamatuvar aktivite de dahil olmak üzere, metforminin pleiotropik etkilerine dair kanıtlar birikmiştir. Bu ilaca bağlı olarak hiperglisemi, insülin direnci ve lipid profilindeki iyileşme kendi başına kronik inflamasyonu düşürmesidir (195). Bununla birlikte, metformin antiinflamatuvar özelliklerinin ana medyatörü, 5'-AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aktivasyonu sağlar gibi görünmektedir ve daha çok çeşitli mekanizmalar yoluyla inflamasyon ve bağışıklığın kontrolü ile de bağlantılı olduğu düşünülmektedir (196, 197).

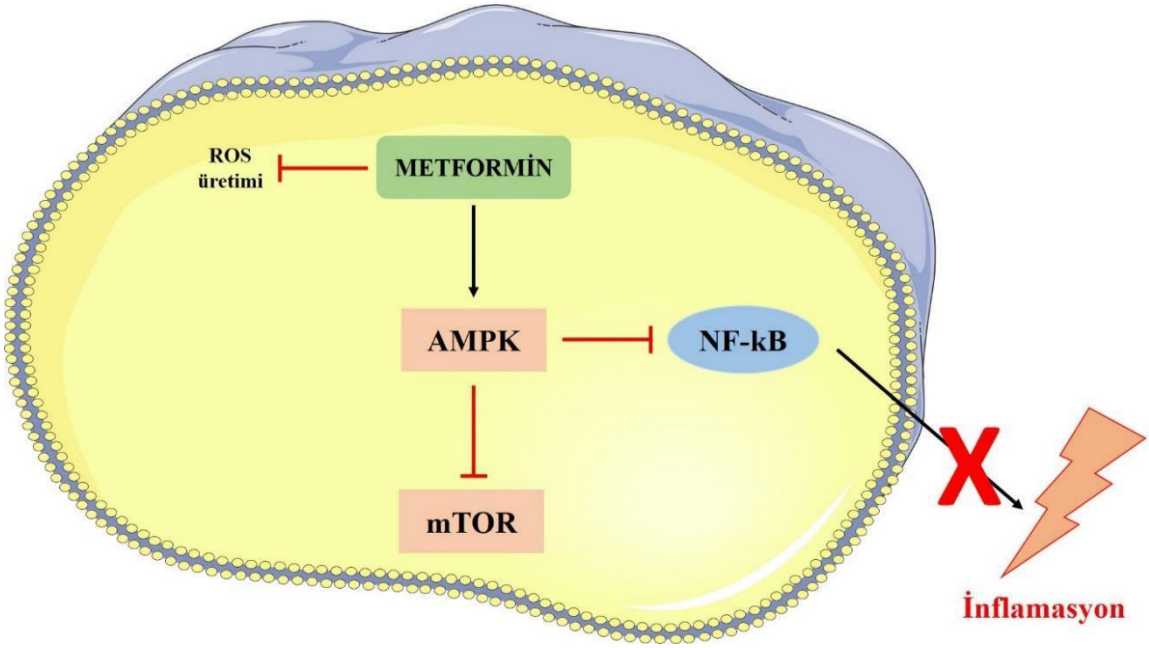
Metforminin etki mekanizması üzerinde yapılan çalışmalar, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin 1. kompleksinin inhibisyonu ve daha sonra azalmış ATP üretimi ve 5'-AMP ile olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu ile artan AMP: ATP oranı ile bağlantılı olduğunu ortaya konmuştur (22, 23). AMPK, hücresel stresi (yani besin eksikliği, hipoksi ve inflamasyon) takiben AMP ve / veya ADP'nin ATP'ye hücre içi oranındaki artışları algılayan ve daha sonra enerji homeostazını sürdürmek için ATP tüketiminden ATP üretimine metabolik bir geçişi tetikleyen önemli bir metabolizma düzenleyicisidir (198). AMPK aktivasyonu, TNF-α'nın aracılık ettiği proinflamatuvar etkiler için kritik bir yol olan sitokinle uyarılan NF-κB'nin inhibisyonu ve ayrıca sitokin sinyallemesinin, hücre büyümesi ve apoptozun önemli bir tetikleyicisi olan JAK / STAT sinyal yollarının aşağı regülasyonu ile ilişkilidir (196, 199).

AMPK, T lenfosit proliferasyonunun ve farklılaşmasının modülasyonunda önemli bir rol oynar, ancak bu enzim kompleksi, makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin diğer önemli hücrelerinin aktivitesini şekillendirmeye kritik bir şekilde katkıda bulunur (200). Son çalışmalar metforminin, monositlerin makrofajlara farklılaşması (201, 202) üzerindeki etkileri dahil, inflamasyon

üzerinde doğrudan etkileri olduğu ve bu makrofajlardan proinflamatuvar sitokinleri baskıladığı gösterilmiştir. Bunu da NF-κB transkripsiyon faktörü üzerinden gerçekleştirdiğine dair görüşler vardır. Ayrıca, metformin tip 2 diyabette nötrofil / lenfosit oranını (NLR) baskılar. NLR, son zamanlarda tüm nedenlere bağlı mortalite ve kardiyak olayların bir prediktörü olduğunu gösteren inflamasyon belirtecidir. Ek olarak, metformin, diyabeti olmayan bireylerde insan plazmasındaki çeşitli inflamatuvar sitokini baskılar (202). Laboratuvar deneylerinde, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan izole edilmiş insan monositlerinin metformin tedavisi, ilacın ERK yolağının inhibisyonu yoluyla TNF-α üretimini inhibe ettiğini göstermiştir (203). Metformin, NF-κB yolağının LPS ile indüklenen aktivasyonunu ve karaciğerdeki ER stresini azaltmak için AMPK'yi aktive ettiği bulunmuştur (204). AMPK aktivasyonunun da (bilinen bir metformin etkisi), NF-κB sinyallemesinin baskılanması yoluyla anti-inflamatuvar özellikleri indüklediği gösterilmiştir (205).

Metforminin, Tip 2 diyabet hastalarına kullanılan eski ilaçlardan biri olmasına rağmen, çok az çalışma yara iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmıştır., metforminin diyabetik hastalarda yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini ortaya koyan yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, bazı klinik çalışmalar, oral metforminin, sistemik inflamasyonda hafif bir iyileşmeye neden olabileceğini göstermektedir (206).

Metforminin, nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve MAPK / JNK (26) üzereinden inflamasyon yollarını da modüle ettiği gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bütün bunlar, immünomodülatör ve antiinflamatuvar özelliklerin, yara iyileşmesinin tedavisi için metformin etkisi olabilecegini desteklemektedir (Şekil 2-5). MTOR ve NOD benzeri reseptör protein 3 (NLRP3) inflamasyonun inhibisyonu ile AMPK'nin aktivasyonunun aslında makrofajların M2 fenotipine doğru polarizasyonunu modüle edebileceği ve yara iyileşmesinin katkıda bulunabileceğine dair ortak bir kanaate varılmasını sağlamaktadır (207). İlginç bir şekilde, insülin, metformin, bazı sülfonilüreler, tiazolidindionlar ve DPP-4 inhibitörleri dahil olmak üzere diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar, sadece anti-inflamatuvar özellikler değil, aynı zamanda kronik yaraların tedavisinde yararlı olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Son çalışmalar, bu ilaçların iyileşmeyi destekleyen bir makrofaj fenotipine doğru polarizasyon, MMP'lerin azalması, artmış keratinosit ve fibroblast proliferasyonu, anjiyogenez ve artmış granülasyon dokusu oluşumu gibi spesifik faydalı etkileri bildirilmiştir (208).



Şekil 2-5: Metforminin NF-κB üzerinden potansiyel antiinflamatuvar özelliğinin gösterilmesi

Biz de yapılan bütün bu çalışmalar ışığında çalışmamızda diyabette görülen kronik yaralar üzerinde metforminin NF-κB üzerinden inflamasyon evresinde artmış metaloproteinazların sentezi ve MMP'lerle yara iyileşme süreci üzerindeki ilişkiyi göstermeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna başvuruda bulunulmuş ve 02.09.2019 tarihinde 2019/216 sayı numaralı kararla uygun bulunarak onaylanmıştır. Proje sürecinin başlamasıyla Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı (BEDEHAL)'ndan 26 adet sağlıklı, erişkin, erkek, Wistar hannover türü albino sıçan temin edildi. Çalışmaya alınan sıçanların ağırlıklarının 300-350 gr arasında olmasına dikkat edildi. Temin edilen sıçanların bakımı Hayvan Barınma ve Üretim Odalarında, operasyonları ameliyathanede ve post-operatif işlemleri ise Postoperatif Bakım ve Reanimasyon Odasında Şubat 2020-Temmuz 2020 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmaya alınan sıçanların Hayvan Barınma ve Üretim Odasında, standart pleksiglas yapısındaki sıçan kafeslerinde, klima ile normal oda ısısı 21±2 °C'de ve nispi nem %45-65 arasında sabit tutularak barınmaları; sıkıştırılmış %20-22 protein içeren pellet yemlerle beslenerek ve içme suları günde bir kez içme suyu ile değiştirilmek suretiyle ad-libitum şeklinde beslenmeleri sağlandı. Deney hayvanları 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık periyodunda (LD; 12:12) ve gürültüsüz bir ortamda bırakıldı. Tüm gruplardaki her bir hayvan ayrı kafeslerde muhafaza edildi.

3.1. Hayvan Deneyleri

Doz denemesi: Çalışma süresinde tüm deneklerin kullanımı yerine ayrıca hayvan israfı olmaması için deney iş planı öncesinde 6 farklı doz denemesi yapıldı. Bu amaçla; iki sıçanda metforminin 14 günlük yara iyileşmesi takip sürecinde kontrole kıyasla daha hızlı yara kontraksiyonu sağlayan optimal doz 3 mM olarak belirlendi.

3.1.1. Deney Grupları ve Adlandırılması

Çalışmada ağırlıkları 300-350 gram arasında değişen 24 adet erişkin, erkek Wistar hannover türü albino sıçan kullanıldı. Bu sıçanlar diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlar olmak üzere ana 2 gruba ayrıldı ve her bir grup da kendi arasında metformin uygulanan ve FTS uygulanan gruplar (kontrol grubu) olarak toplamda 4 gruba ayrılarak her bir gruba rastgele 6 adet sıçan dağıtıldı.

1.GRUP: (Non-diyabetik kontrol grubu= NK), n=6: Sağlıklı kontrol grubu (STZ ile diyabet indüklenmemiş) olarak seçilmiş sıçanların sırt bölgesine 3 adet 12 mm^2 tam kat yara modeli oluşturularak 14 gün boyunca her gün sadece fizyolojik tuzlu su (FTS) ile pansuman yapıldı, metformin tedavisi uygulanmadı.

2.GRUP: (Non-diyabetik Metformin tedavi grubu= NT), n=6: Bu grupta sağlıklı kontrol olarak seçilmiş sıçanların sırt bölgesine 3 adet 12 mm^2 tam kat yara modeli oluşturuldu, deney planına uygun olarak 14 gün boyunca her gün 3mM metformin ile tedavi uygulandı.

3.GRUP: (Diyabetik kontrol grubu= DK), n=6: Bu gruptaki sıçanlara tek doz 60mg/kg STZ verilerek, 3 gün sonra kan glikoz düzeyi 220 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilerek deneye alındı. Sırt bölgesine 3 adet 12 mm^2 tam kat yara modeli oluşturularak bu gruptaki sıçanlara deney planına uygun olarak 14 gün boyunca her gün FTS ile pansuman yapıldı, metformin tedavisi uygulanmadı.

4.GRUP: (Diyabetik Metformin tedavi grubu= DT), n=6: Bu gruptaki sıçanlara tek doz 60mg/kg STZ verilerek 3 gün sonra kan glikoz düzeyi 220 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilerek deneye alındı. Sırt bölgesine 3 adet 12 mm^2 tam kat yara modeli oluşturularak bu gruptaki sıçanlara deney planına uygun olarak 14 gün boyunca her gün 3 mM metformin ile tedavi uygulandı.

3.1.2. STZ ile Diyabet Oluşturulması

Çalışmanın başlangıcında tüm hayvanların kan glikoz seviyeleri ve vücut ağırlıkları ölçüldü. Diyabet gruplarını oluşturan sıçanların enjeksiyondan bir gece öncesi aç bırakılmasına dikkat edilerek tek doz intraperitoneal (IP) yoldan 60 mg/kg Streptozotosin (STZ) (Cayman Cat No 13104) 0.1 M sodyum sitrat tampon içerinde çözündürülmüş olarak (pH 4,5) enjekte edildi (209). Diyabetik olmayan gruplara ise herhangi bir diyabetik işlem yapılmayarak yalnızca fizyolojik tuzlu su (FTS) enjekte (IP) edildi.

~72 saat sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kan örneklerinin glikoz seviyeleri ölçülerek (Accu-Chek Performa Nano glukometre ve Accu-Chek Performa ölçüm çubuğu) ~250 mg/dL'den yüksek olanlar diyabet kabul edildi ve bu sınırın altında kalan sıçanlar deneye alınmayarak grup dışı bırakıldı (209, 210).

3.1.3. Metformin Çözeltisinin Hazırlanması

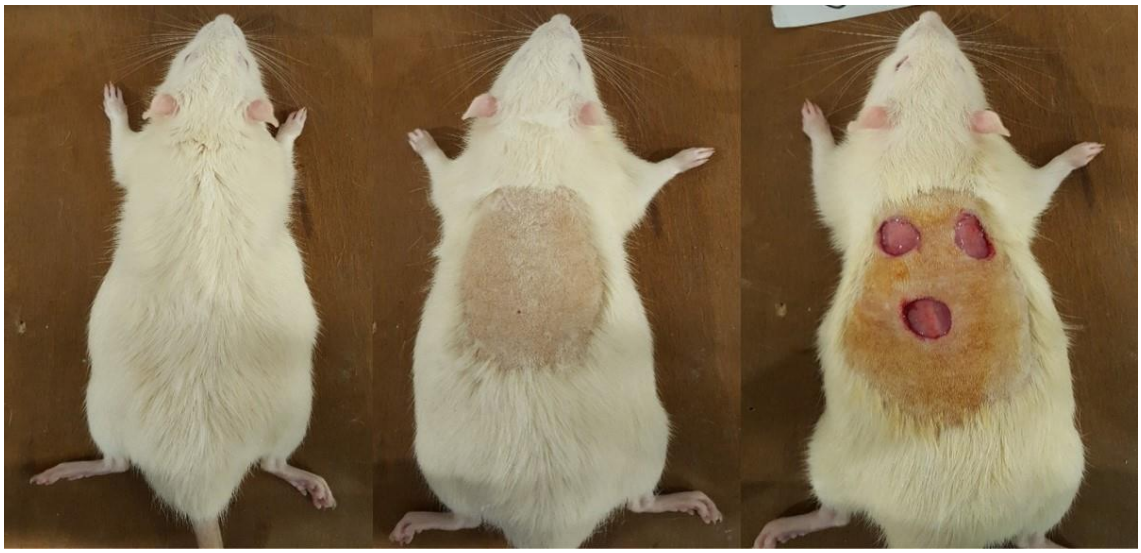
Temin edilen Metformin hidroklorür (Aarti Drugs Ltd) ile belirlenen optimal konsantrasyon olan 3mM metformin çözeltisi her gün tedaviden hemen önce günlük olarak hazırlandı. Günlük uygulanacak toplam hacme göre hesaplanan miktardaki metformin dH_2O'ya ilave edilerek vortekslendi. Daha sonra toplam hacme uygun bir

enjektör ile hazırlanan çözelti çekilir ve 0,2 µm çapa sahip bir filtreden geçirilerek steril yeni bir santrifüj tüpüne aktarılır.

3.1.4. Tam Kat Yara Modelinin Oluşturulması

Sıçanlara her bir operasyon öncesi anestezi işlemi için 50mg/kg pental sodyum (İbrahim Etem-Menarini Group) intraperitoneal olarak uygulandı. Anesteziye giren her sıçanın mekanik temizliğinin ardından sırt bölgesi elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi. Dezenfeksiyon işlemi için öncesinde sıçanların sırt bölgesi povidon iyot ile ve ardından %70'lik alkol ile degliserasyonu sağlanarak operasyona hazır hale getirildi.

Deney gruplarındaki her bir hayvanın yara bölgesine ulaşmasını engellemek amacıyla ve literatüre dayalı olarak hayvanların sırt bölgesinde 12 mm çapındaki steril punch (Acu-Punch) aracılığıyla sirküler 3 adet tam kat eksizyonel yara modeli oluşturuldu (210-212). Hayvanın orta hattı baz alınarak dorsal bölgede biri sol üst, biri sağ üst ve bir diğeri üstte açılan her iki yaranın tam ortasına ve altına gelecek şekilde yaraların lokasyonu belirlendi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Deney hayvanlarında tam kat eksizyonel yara modeli oluşturulması

3.1.5. Yara İyileşmesi Takibi ve Dokuların Alınması

Yara modeli oluşturulduktan sonra tüm yaralar steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile temizlendi. Yara boyutunu takip edebilmek amacıyla sabit olarak bir yükseklik sağlayan

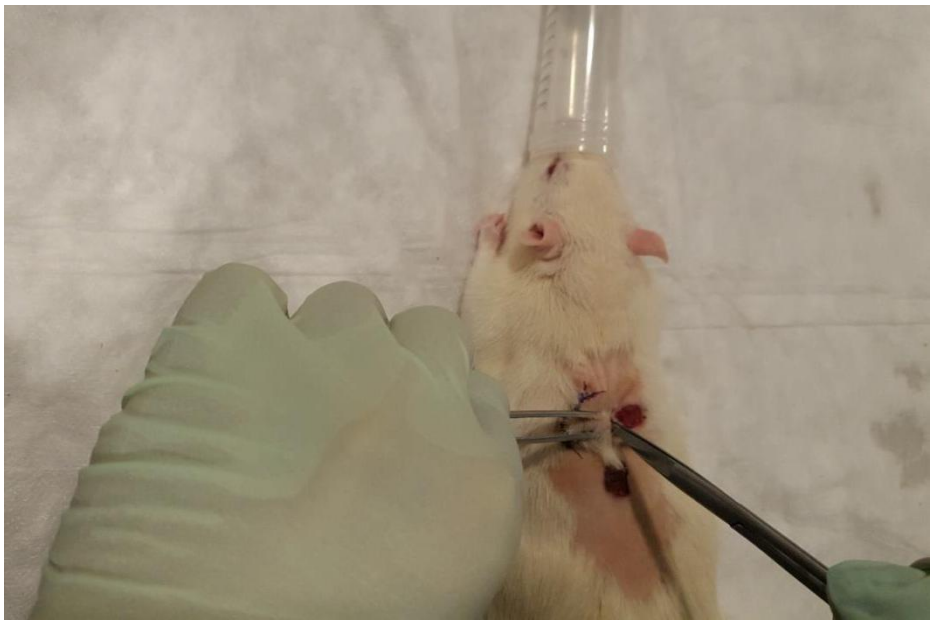
aparat yardımıyla 30 cm yükseklikten 16 MP çözünürlüğe sahip bir kamera ile yaraların fotoğrafları çekildi. Ardından non-diyabetik kontrol grubu (NK) ve Diyabetik kontrol grubundaki (DK) sıçanlara yara boyutuna göre önceden hazırlanan steril cerrahi süngerlere (Spongostan) FTS emdirilerek yara üzerine uygulandı. Non-diyabetik Metformin tedavi grubu (NT) ve Diyabetik Metformin tedavi grubundaki (DT) sıçanlara ise doz denemesine bağlı olarak belirlenen optimal doz olan 3 mM konsantrasyonda hazırlanan metformin çözeltisi steril cerrahi süngerlere emdirilerek yara üzerine uygulandı. Yara üzerinde herhangi bir enfeksiyona sebebiyet vermemek için steril gazlı bezle yara bölgesinin üzeri tek kat örtüldü, daha sonra yara üzerine gelmeyecek ve sıçanların hareketlerini kısıtlamayacak şekilde flaster yardımıyla bu örtü sabitleştirildi. Biyopsi ve tedavi işlemleri biten sıçanlar bireysel olarak etiketletlenmiş kafeslere yerleştirildi. İlk yapılan bu işlem 0. gün olarak kabul edildi ve deney süreci başlatıldı (Şekil 3-2). Deneyin ilk günü (0. gün) 12 mm^2'lik punchla açılan yaralardan alınan dokular gen ekspresyonu ve aktivasyon analizleri için bistüri ile her analiz için uygun şartlarda 2 parçaya ayrıldı ve daha sonra çalışılmak üzere -80°C' de muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.



Şekil 3-2: Deney hayvanlarına tedavi uygulama süreci

Tedavi işlemleri için deney süresi olan 14 gün boyunca her gün aynı saatlerde kontrol grubundaki sıçanlara FTS ve tedavi grubundaki sıçanlara ise günlük hazırlanan 3mM metformin çözeltisi uygulanmaya ve aynı şekilde yara örtüsü ile üzerleri kapatılarak yara iyileşme takiplerine devam edildi.

Yara iyileşme fizyolojisinin evrelerine göre diğer biyopsi günleri 3., 7. ve 14. gün olmak üzere planlandı. 3. gün, 7. gün ve 14. gün sıçanlar yara iyileşmesi takiplerinin yapılması ve yara biyopsi örneklerinin alınması için tekrar deneye alındı. 3.günde sol üstteki yara dokusu, 7.günde sağ üstteki yara dokusu ve 14.günde ise iki yaranın alt kısmında ve orta hattındaki yara dokusu anestezi altında ve steril şartlarda alındı (Şekil 3-3). İşlemlere başlanmadan önce yara bölgesinin fotoğrafı çekildi. Biyopsi alınacak olan yaranın etrafı povidin iyot ile dezenfekte edildi. Steril makas ve pens kullanılarak 3. gün yara dokusu alındı. Yapılacak in-vitro analizler için bistüri ile doku 2 parçaya ayrıldı ve -80°C'de saklanmak üzere kaldırıldı. İlk gün de (0. gün) yapıldığı gibi yaralar FTS ile temizlendi ve tedavi gruplarına 3mM metformin çözeltisi kontrol gruplarına ise FTS eriyebilir cerrahi süngerlere emdirilerek kalan iki yaraya uygulandı. Aynı işlemler 7. gün ve 14. gün için de tekrar edildi (Şekil 3-4, Tablo 3-1, Tablo 3-2). Ancak 14. günde son yara biyopsisi alındıktan sonra hayvanlara herhangi bir tedavi işlemi uygulanmadan deney sonlandırılarak sıçanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. 0., 3., 7. ve 14. günlerde alınan yara biyopsi örnekleri DNase-free ve RNase-free özellikteki ependorflara alınarak vakit kaybetmeden -80°C'ye kaldırıldı ve deney gününe kadar muhafaza edildi.



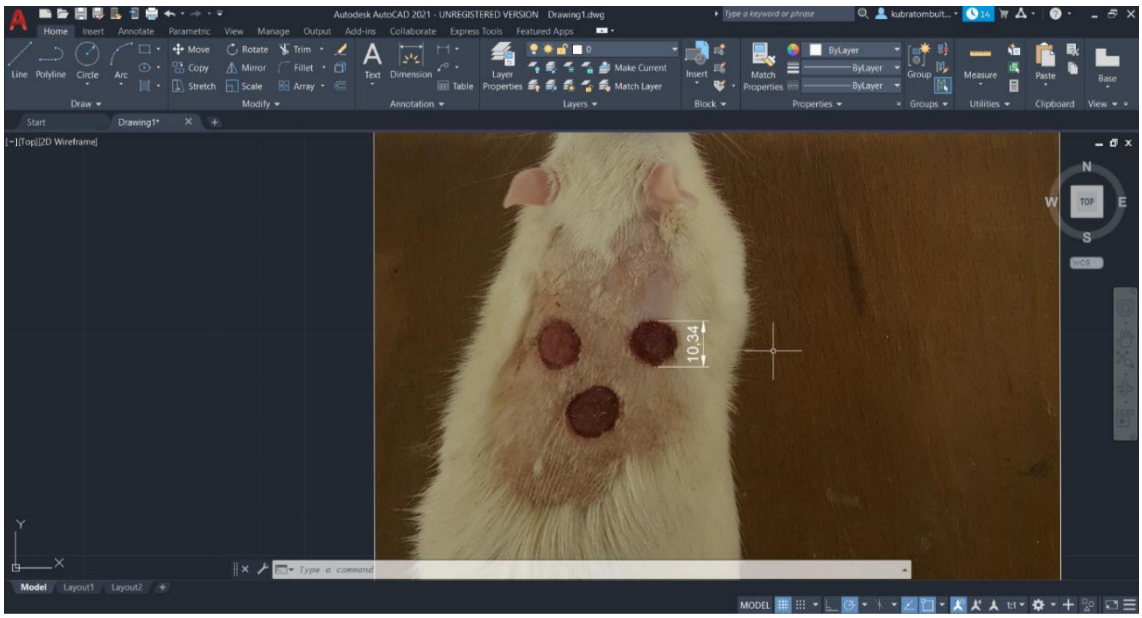
Şekil 3-3: Cerrahi işlem anı



Şekil 3-4: İn vivo yara modelinin özet gösterimi

3.1.6. Yara Kontraksiyon Alanının Takibi ve Ölçümü

0.günden itibaren biyopsi günleri olan 3. gün, 7. gün ve 14. günde biyopsi dokuları alınmadan hemen önce sıçanların yara bölgelerinin fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar Autodesk® Autocad® 2021 programına yüklenerek istatistik hesaplamaları yapılmak üzere yara çapı ölçümleri yapıldı (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: Yara boyutlarının AutoCAD ile ölçülmesi

Tablo 3-1: Kontrol gruplarının deney planı

Grup adı	Gün	Fotoğraf	Biyopsi	3 mM metformin	FTS
Non-diyabetik kontrol grubu (NK) + Diyabetik kontrol grubu (DK)	0	✓	✓	×	✓
	1	×	×	×	✓
	2	×	×	×	✓
	3	✓	✓	×	✓
	4	×	×	×	✓
	5	×	×	×	✓
	6	×	×	×	✓
	7	✓	✓	×	✓
	8	×	×	×	✓
	9	×	×	×	✓
	10	×	×	×	✓
	11	×	×	×	✓
	12	×	×	×	✓
	13	×	×	×	✓
	14	✓	✓	-	-

Tablo 3-2: Tedavi gruplarının deney planı

Grup adı	Gün	Fotoğraf	Biyopsi	3 mM metformin	FTS
Non diyabetik Metformin tedavi grubu (NT) + Diyabetik Metformin tedavi grubu (DT)	0	✓	✓	✓	×
	1	×	×	✓	×
	2	×	×	✓	×
	3	✓	✓	✓	×
	4	×	×	✓	×
	5	×	×	✓	×
	6	×	×	✓	×
	7	✓	✓	✓	×
	8	×	×	✓	×
	9	×	×	✓	×
	10	×	×	✓	×
	11	×	×	✓	×
	12	×	×	✓	×
	13	×	×	✓	×
	14	✓	✓	-	-

3.2. Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Yöntemiyle RELA, MMP2 ve MMP9 Gen Ekspresyonu Tayini

3.2.1. Dokuların Homojenizasyonu

Dokudan total RNA izolasyonu yapabilmek için başlangıç materyalinin etkin şekilde parçalanması ve homojenleştirilmesi önemlidir. Örnekte bulunan total RNA'yı saflaştırabilmek için hücresel elemanların tamamen bozulması gereklidir. Homojenizasyon işlemindeki bir aksama önemli ölçüde azalmış verimle sonuçlanabilir. DNase-free ve RNase-free özellikteki ependorflarda ve -80°C'de saklanan 0., 3., 7. ve 14. günlerde alınan yara biyopsi örnekleri NF-κB p65 aktivitesinin ELISA yöntemi ile tayin edilmesi ve RELA, MMP2 ve MMP9'un kantitatif gen ekspresyonun RT-qPCR yöntemi ile ölçümü için homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi aşağıdaki basamaklarda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi.

- Her bir örnek buz aküsü üzerindeki steril bir petri kabı içerisinde bistüri ile ~30-35 mg olacak şekilde ayarlandı.
- Örneğin bulunduğu her bir ependorfa 500 µl lizis tamponu eklendi.
- Doku ve lizis tamponunun bulunduğu her bir ependorfa DNase-free, RNase-free özellikteki ve 1.6 mm çapındaki paslanmaz çelik boncuklardan (Next Advance) 4-5 adet eklendi.
- Ependorfların kapakları sıkıca kapatılarak homojenizatöre (MagNA Lyser-Roche) konuldu.
- Homojenizatör hacim haybını en aza indirmek amacıyla 5500 RPM'de 3x30 sn olacak şekilde çalıştırıldı.
- Her 30 sn'de bir ependorflar buz aküsü üzerine konularak örneklerin ısınarak bozunması engellendi.
- Örnekler 2 dk boyunca mikrosantrifüjde (Hitachi) en yüksek devirde santrifüj edildi.
- Süpernatant kullanılacağından ayrı ependorflara alınarak her bir örnek analiz gününe kadar -80°C'de saklandı.

3.2.2. Dokudan RNA İzolasyonu

Toplam RNA verimi, başlangıç materyaline ve kullanılan doku miktarına ve uygulanan homojenizasyon yöntemine bağlı olduğundan standardizasyon sağlanması

amacıyla tüm örnekler aynı gün çalışıldı. Kontaminasyonu engellemek için analizler çeker ocakta gerçekleştirildi.

Dokuların homojenizasyonunun ardından elde edilen lizatlardan "dokudan total RNA izolasyonu kiti (High Pure RNA Tissue Kit-Roche)" kullanılarak aşağıdaki basamaklarda anlatıldığı şekilde RNA saflaştırıldı.

- Lizatların üzerine toplam hacminin 0,5 hacmi kadar saf etanol (Merck) eklendi (~200 µl) ve iyi karıştırıldı.
- Etanol eklenmiş lizat filtrenin bulunduğu kolonun yerleştirildiği toplama tüpü içerisine aktarıldı.
- Örnekler mikrosantrifüjde (Hitachi) 13000 g devirde 30 sn boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrası filtrenin bulunduğu kolon, toplama tüpünden dikkatlice çıkarıldı ve toplama tüpünde biriken sıvı kısım atıldı.
- Kolon kullanılmış olan toplama tüpü ile yeniden birleştirildi.
- Her bir örnek için 90 µl DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µl DNaz I enzimi olacak şekilde toplam örnek hacmi kadar hazırlandı ve karıştırıldı.
- Hazırlanan bu solüsyon filtrelerin üzerine 100 µl eklendi ve 15 dk boyunca oda ısısında inkübe edildi.
- Filtre üzerine 500 µl Yıkama tamponu I eklendi.
- Mikrosantrifüjde 8000 g devirde 15 sn boyunca tüpler santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrası kolon, toplama tüpünden dikkatlice çıkarıldı ve toplama tüpünde biriken sıvı kısım atıldı.
- Kolon kullanılmış olan toplama tüpü ile yeniden birleştirildi.
- Filtre üzerine 500 µl Yıkama tamponu II eklendi.
- Mikrosantrifüjde 8000 g devirde 15 sn boyunca tüpler santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrası kolon, toplama tüpünden dikkatlice çıkarıldı ve toplama tüpünde biriken sıvı kısım atıldı.
- Kolon kullanılmış olan toplama tüpü ile yeniden birleştirildi.

- Filtre üzerine 300 µl Yıkama tamponu II eklendi.
- Mikrosantrifüjün maksimum devrinde (~13000 g) 2 dk boyunca santrifüj edildi.
- Kolon toplama tüpünden dikkatlice çıkarılarak nükleaz-free bir ependorfa aktarıldı.
- Filtrenin üzerine RNA'yı çözmek için her bir örnek için 100 µl elüsyon tamponu eklendi.
- Mikrosantrifüjde 8000 g devirde 1 dk boyunca tüpler santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrası ependorfta bulunan sıvı ile total RNAelde edildi.
- Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre (NanoDrop One-Thermo Scientific) ile 260 nm ve 280 nm'de absorbansı ölçülerek belirlendi.
- Deney gününe kadar elde edilen RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Saflaştırılarak elde edilen RNA'lar muhafaza edildiği -80°C'den alınarak örneklerin çözülmesi sağlandı ve ters transkripsiyon gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile RELA, MMP2 ve MMP9 mRNA miktarlarındaki kalitatif değişimler belirlendi. Bu analiz LightCycler® EvoScript RNA SYBR® Green I Master kiti ve Primer3 programı ile dizayn edilen primerler (Merck) kullanılarak Roche LightCycler 480 II cihazında gerçekleştirildi. mRNA düzeylerinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için referans gen olarak ß-aktin geni (ACTB) kullanıldı ve primerler aynı şekilde dizayn edildi (Tablo 1-3). Her bir reaksiyonda kontaminasyonun olup olmadığını kontrol edebilmek için RNA eklenmeyen reaksiyon karışımı negatif kontrol olarak eklendi. Her bir reaksiyon 96 kuyulu PCR plaklarında gerçekleştirildi. Primerlerin spesifitesini kontrol etmek için amplifikasyon sonrasına melting curve eklenerek, Tm analizi ile primerlerin bağlanmaları kontrol edildi. Her primerde uygun ara stok konsantrasyonu bulunarak çalışmaya devam edildi.

Tablo 3-3: Primerlerin dizileri

Primer adı	Gen adı	Primer Sekansı (5'→ 3')
NF-κB1 RelA Forward	RELA	ACG CAA AAG GAC CTA CGA GA
NF-κB1 RelA Reverse		ATG GTG CTG AGG GAT GTT GA
MMP2 Forward	MMP2	CAA GGA TGG AGG CAC GAT TG
MMP2 Reverse		GGA ACT TGA TGA TGG GCG AC
MMP9 Forward	MMP9	AGG ATG GTC TAC TGG CAC AC
MMP9 Reverse		GTG CAG GAC AAA TAG GAG CG
β-aktin Forward	ACTB (Housekeeping)	CCT CTG AAC CCT AAG GCC AA
β-aktin Reverse		AGG CAT ACA GGG ACA ACA CA

Öncesinde dizayn edilerek sipariş edilen primerler sentezi gerçekleştiren firmanın direktifleri doğrultusunda PCR grade su ile 100 pmol olacak şekilde çözüldü ve 10 pmol olacak şekilde ayrı ependorflara alikotlandı. Stok primer çözeltisi ise -20°C'de mufafaza edildi.

Toplam örnek miktarına göre total hacimde hazırlanan reaksiyon karışımı 96 kuyulu plaklardaki her bir kuyuya 15'er µl dağıtıldı. Daha sonra reaksiyon karışımı eklenen her bir kuyuya RNA örnekleri ayrı ayrı 5'er µl eklendi (Tablo 1-4). 1 kuyucuğa RNA eklenmeyerek sadece reaksiyon karışımı eklenerek kontaminasyonun kontrolünün sağlanması amaçlandı. Her bir örnek için hedef genlerin miktarlarını kıyaslayabilmek amacıyla ACTB çalışıldı. Kontaminasyonun önlenmesi ve hacim kaybının engellenmesi amacıyla plakaların üzeri sealing foil ile kapatılarak tüm kenarlarının sıkıca yapışması sağlandı. Daha sonra plate 1500 g'de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Ardından plaka cihaza

yerleştirildi ve tabloda belirtilen deney protokolü LightCycler 480 System 1.5 yazılımına kaydı kuruldu ve reaksiyon başlatıldı. Sistem 15 dakikalık bir ters transkripsiyon işleminden sonra PCR aşamasına geçti (Tablo 1-5, Tablo 1-6). RELA, MMP2 ve MMP9 relatif mRNA ekspresyon düzeylerinin $2^{-\Delta Ct}$ sonuçları ACTB'ye kıyasla sistem tarafından hesaplandı.

Tablo 3-4: Tek bir örnek için gereken RT-qPCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
SYBR Green I Master Mix	4 µl
Primer F (10 pmol)	0,5 µl
Primer R (10 pmol)	0,5 µl
PCR grade su	10 µl
RNA	5 µl
Total Hacim	20 µl

Tablo 3-5: ACTB, RELA ve MMP2 ekspresyonu için RT-qPCR deney planı

	Sıcaklık (°C)	Süre
Ters transkripsiyon	60	15 dk
Denatürasyon	95	10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	95	10 sn
	61	30 sn
Melting curve	95	1 dk
	25	1 dk
	95	-
Soğutma	40	30 sn

Tablo 3-6: MMP9 ekspresyonu için RT-qPCR deney planı

	Sıcaklık (°C)	Süre
Ters transkripsiyon	60	15 dk
Denatürasyon	95	10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	95	10 sn
	64	30 sn
Melting curve	95	1 dk
	25	1 dk
	95	-
Soğutma	40	30 sn

3.3. NF-κB1 (p65) Aktivasyonunun ELISA ile Tayin Edilmesi

3.3.1. Homojenatların ektraksiyonu

Homojenatlardan nükleer protein ekstraksiyonu için kullanılan "Nuclear Extract Kit" (ab221978) kiti , hayvan dokusu ve memeli hücrelerinden nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların verimli bir şekilde ayrılması için tasarlanmış olup, ekstrakte edilen bu nükleer ve sitoplazmik proteinler fonksiyoneldir ve transkripsiyonel aktivite analizleriyle uyumludur.

Kitin prosedürüne göre aşağıdaki basamaklarda ayrıntılı şekilde belirtildiği üzere dokulardan elde edilen homojenatlar kullanılarak nükleer ekstraktlar elde edildi.

- **Deneye başlanmadan önce kullanılacak reaktiflerin hazırlanması:**

  Complete Hypotonic Buffer (1X)

Aşağıdaki tabloya göre çalışma için gerekli olan hacim belirlenerek hazırlandı (Tablo 1-7). Analizin olduğu aynı gün içinde kullanıldı ve çalışma boyunca buz üzerinde tutuldu.

Tablo 3-7: Complete Hypotonic Buffer (1X)'ın hazırlanması

Reaktif	Miktar
Nuclear Extraction Hypotonic Buffer (10X)	100 µL
Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitors (50X)	20 µL
Nuclear Extraction Protease Inhibitors (100X)	10 µL
Distile su	870 µL
Total hacim	1000 µL

Nuclear Extraction Dithiothreitol

10 mM ditiyotreitol (DTT) hazırlamak için, distile su ile 1:100 oranında seyreltildi. Hem 1 M hem de 10 mM DTT solüsyonları -20 ° C'de saklandığında altı ay stabil olduğundan çalışmadan önce hazırlanarak bekletildi.

Complete Nuclear Extraction Buffer (1X)

Aşağıdaki tabloya göre çalışma için gerekli olan hacim belirlenerek hazırlandı (Tablo 1-8). Analizin olduğu aynı gün içinde kullanıldı ve çalışma boyunca buz üzerinde tutuldu.

Tablo 3-8: Complete Nuclear Extraction Buffer (1X)'ın hazırlanması

Reaktif	Miktar
Nuclear Extraction Buffer (2X)	50 µL
Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitors (50X)	2 µL
Nuclear Extraction Protease Inhibitors (100X)	1 µL
DTT (10 mM)	10 µL
Distile su	37 µL
Total hacim	100 µL

- **Deney Protokolü**

1. Doku örneği tartıldı ve bir bistüri kullanarak çok küçük parçalar halinde kesildi.
2. Küçük parçalara ayrılmış olan doku parçaları buz üzerinde bekletildi. Bu esnada gram doku başına; DTT ve NP-40 (3 µL 1M DTT ve 3 µL% 10 NP-40) eklenmiş 3 mL önceden soğutulmuş 1X Complete Hypotonic Buffer eklendi.
3. Örnekler bir homojenizatör aracılığı ile homojenize edildi ve 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
4. Önceden soğutulmuş mikro santrifüj tüplerine aktarıldı ve 300 g'de 10 dakika boyunca 4° C'de santrifüj edidi ve süpernatant "sitozolik fraksiyon" olarak etiketlenmiş ve önceden soğutulmuş bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Bu fraksiyon buz üzerinde tutulmaya devam edildi.
5. Doku homojenize edilmiş olmasına rağmen, 4. adımdaki pellet halindeki hücrelerin çoğu henüz parçalanmamış olduğundan bu hücreler 500 µL 1X Complete Hypotonic Buffer içinde birkaç kez yavaşça pipetaj yapılarak

yeniden süspanse edildi. Daha sonra bu süspansiyon önceden soğutulmuş bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı.

6. Hücreler 15 dakika daha buz üzerinde inkübe edildi.
7. 50 µL % 10 NP-40 eklendi. Yavaşça pipetaj yapılarak süspanse edildi.
8. Bir mikrosantrifüjde 4° C'de 30 saniye boyunca 14.000 g'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 4. adımda oluşturulan sitozolik fraksiyon tüpüne aktarıldı ve -80 ° C'de saklanmak üzere kaldırıldı.
9. Her bir pellet 100 µL önceden soğutulmuş Complete Nuclear Extraction Buffer (1X) ile yeniden süspanse edildi.
10. 15 saniye boyunca en yüksek devirde vortekslendi ve 15 dakika buz üzerinde bir çalkalayıcı aracılığıyla düşük hızda yavaşça çalkalandı. Ardından 30 saniye daha en yüksek devirde vortekslendi ve 15 dakika daha yavaşça çalkalayıcıda çalkalandı.

İnkübasyon sonrası örnekler 14.000 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatant, nükleer fraksiyonu içerdiğinden önceden soğutulmuş yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hızlıca dondurularak çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı. Donma / çözme döngülerinden özellikle kaçınıldı.

3.3.2. ELISA ile NF-κB p65 Aktivasyon Ölçümü

Örneklerin NF-κB p65 aktivitesini ölçmek için "NF-κB p65 Transcription Factor Assay Kit (Abcam-ab133122)" kullanıldı. Kitin çalışma prosedürü, nükleer ekstraktlarda spesifik transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma aktivitesini saptamak için radyoaktif olmayan, hassas bir yöntemdir ve radyoaktif elektroforetik mobilite kaydırma analizinin (EMSA) yerine kullanılmaktadır. NF-κB yanıt elemanını içeren özel bir çift sarmallı DNA (dsDNA) dizisi, 96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuk diplerine sabitlenmiştir. Nükleer ekstraktta bulunan NF-κB, spesifik olarak NF-κB yanıt elemanına bağlanır. Böylelikle NF-κB (p65), NF-κB'ye (p65) yönelik spesifik primer antikor eklenmesiyle saptanır.

Kitin prosedürüne göre reaktiflerin hazırlanması ve deney aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Reaktifler her çalışma öncesi deneyin hemen başlangıcında günlük olarak hazırlandı.

➢ **Deneye başlanmadan önce kullanılacak reaktiflerin hazırlanması:**

- **Transcription Factor Antibody Binding Buffer (ABB) (10X)**

Primer ve sekonder antikorları seyreltmek amacıyla kullanılan 1X ABB'yi hazırlamak için 1:10 oranında ultra saf su eklenerek seyreltildi.

- **Yıkama Tamponu (400X)**

Yıkama Tamponu 1:400 oranında ultra saf su ile seyreltilerek 1 litre Yıkama Tamponu için 0.5 ml olacak şekilde Polisorbat 20 ilave edildi. Polisorbat 20 viskoz bir sıvı olduğundan hacim çekerken otomatik pipet yerine enjektör kullanıldı.

- **Transcription Factor Binding Assay Buffer (TFB) (4X)**

4X Transcription Factor Binding Assay Buffer (TFB) kullanılarak Tablo 1-9'da belirtildiği gibi 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerinde veya 15 ml falkonda kullanımdan hemen önce Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer (CTFB) hazırlandı (Tablo 1-9). CTFB'nin özellikle hazırlandığı gün kullanılmasına dikkat edildi.

Tablo 3-9: Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer (CTFB) hazırlanması

İçerik	Hacim/Kuyucuk
Ultra saf su	73 µl
4X Transcription Factor Binding Assay Buffer (TFB)	25 µl
A Reaktifi	1 µl
300 mM DTT	1 µl
Total hacim	100 µl

- **Transkripsiyon Faktörü NF-κB (p65) Pozitif Kontrol**

Pozitif Kontrolü kullanırken, tekrarlanan dondurma / çözme döngüleri ile sinyalde bir azalma meydana getirebilme ihtimalinden dolayı Pozitif Kontrolün 20'şer µl olarak

alikotlanarak ve tekrarlanan dondurma/çözme döngülerinden gelen sinyal kaybını önlemek için -80°C'de saklandı.

- **Transkripsiyon Faktörü NF-κB (p65) Primer Antikor**

Transkripsiyon Faktörü NF-κB (p65) Primer Antikoru, 1X ABB içerisinde 1:100 oranında seyreltilerek deneyden hemen önce hazırlandı.

- **Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate (Sekonder Antikor)**

Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate, 1X ABB içerisinde 1:100 oranında seyreltilerek deneyden hemen önce hazırlandı.

➢ **Deney Protokolü**

1. Deneye başlamadan önce plaka ve tamponlar oda sıcaklığına getirildi.
2. Plaka folyodan çıkarılarak deneyde kullanılacak örnek sayısı kadar gereken şerit hazırlandı.
3. CTFB daha önce belirtildiği gibi hazırlandı.
4. Aşağıda listelenen kuyucuklara belirtilen miktarda reaktif eklendi:

   Referans olması amacıyla negatif kontrol olarak belirlenen kuyucuklara 100 µl CTFB eklendi. Bu kuyucuklara NF-κB (p65) eklenmedi.

   Pozitif kontrol olarak belirlenen kuyucuklara 90 µl CTFB ve ardından 10 µl Pozitif kontrol eklendi.

   Örneklerin çalışılacağı kuyucuklara 90 µl CTFB ve ardından 10 µl nüklear ekstraktlar eklendi.

5. Plakanın üzeri kit tarafından sağlanan kapakla örtüldü. Gece boyunca 4°C'de inkübe edildi.
6. Ertesi gün kuyucukların içi tek hamleyle lavaboya boşaltıldı ve beş kez 200 µl 1X Yıkama Tamponu ile yıkandı. Her yıkama işleminden sonra kuyular tekrar boşaltıldı. Son yıkamadan sonra (5. yıkama), kalan Yıkama Tamponunu çıkarmak için bir kağıt havlu üzerine plaka 3-5 kez hafifçe vuruldu.

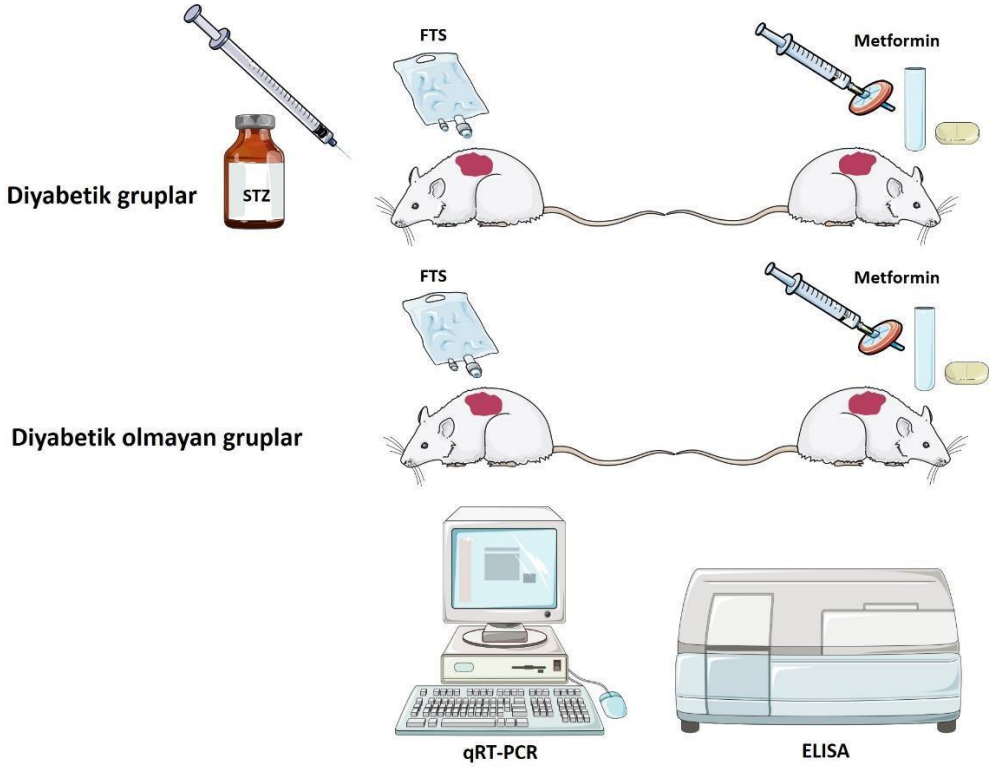
7. 1: 100 oranında 1X ABB içinde seyreltilen Transkripsiyon Faktörü NF-κB (p65) Primer Antikor her kuyucuğa 100 µl hacminde eklendi.
8. Plakanın üzerini kapatmak için kit tarafından sağlanan yapışkan kapak kullanılarak üzeri örtüldü.
9. Plaka orbital bir çalkalayıcıda oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edildi.
10. Kuyucukların içi tek hamleyle lavaboya boşaltıldı ve beş kez 200 µl 1X Yıkama Tamponu ile yıkandı. Her yıkama işleminden sonra kuyular tekrar boşaltıldı. Son yıkamadan sonra (5. yıkama), kalan Yıkama Tamponunu çıkarmak için bir kağıt havlu üzerine plaka 3-5 kez hafifçe vuruldu.
11. 1: 100 oranında 1X ABB içinde seyreltilen Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate, her kuyucuğa 100 µl hacminde olacak şekilde ilave edilerek sekonder antikor eklenmiş oldu.
12. Plakanın üzeri yapışkan kapakla kapatıldı.
13. Plaka orbital bir çalkalayıcıda oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edildi.
14. Kuyucukların içi tek hamleyle lavaboya boşaltıldı ve beş kez 200 µl 1X Yıkama Tamponu ile yıkandı. Her yıkama işleminden sonra kuyular tekrar boşaltıldı. Son yıkamadan sonra (5. yıkama), kalan Yıkama Tamponunu çıkarmak için bir kağıt havlu üzerine plaka 3-5 kez hafifçe vuruldu.
15. Ardından kullanılan her kuyucuğa, oda sıcaklığına getirilmiş 100 µl Transcription Factor Developing Solution eklendi.
16. Plakanın üzeri yapışkan kapakla kapatıldı ve plaka 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ışıktan korunan bir orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
17. İnkübasyon süresi sonunda kullanılan kuyucuk başına direkt 100 µl Durdurma Solüsyonu eklendi. Bu ilaveden sonra inkübasyon sonucu oluşan mavi renk sarıya dönüştü.
18. Durdurma Solüsyonunu eklendikten sonra beş dakika içinde 450 nm'de ölçüm yapabilen bir ELISA okuyucuda (LUMIstar Omega-BMG Labtech) absorbans değeri okutuldu. MARS 3.20 R2 data analiz yazılımı ile çıkan sonuçlar analiz edildi.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Daha önce yapılmış olan benzer bir çalışmamızın (213) ortalama±SD değerleri 2,44±0,45 bulundu. Bu verilere göre G Power 3.1 programı kullanılarak 0,5 mm'lik bir farkın (α=0,05, β=0,20 için) anlamlı olabilmesi için her bir grupta minimum n=6 hesaplandı.

Çalışma sonunda elde edilen tüm veriler Graphpad Prism 8.0.2 paket programı ile analiz edildi, gruplar arası farklara ANOVA testi ile bakıldı, anlamlı çıkan sonuçlar için ikili kıyaslamalar Tukey testi ile yapıldı. 0. gündeki normal grup ve diyabetik grupların ikili kıyaslaması t testi ile analiz edildi. Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama standart hata değeri verildi. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çalışmanın özet gösterimi aşağıda verilmiştir (Şekil 3-6).

Hayvan deneyleri ve laboratuvar çalışmalarını içeren özet deney planı aşağıdaki şekilde görsel olarak ifade edilmiştir (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: Deney planının özet gösterimi

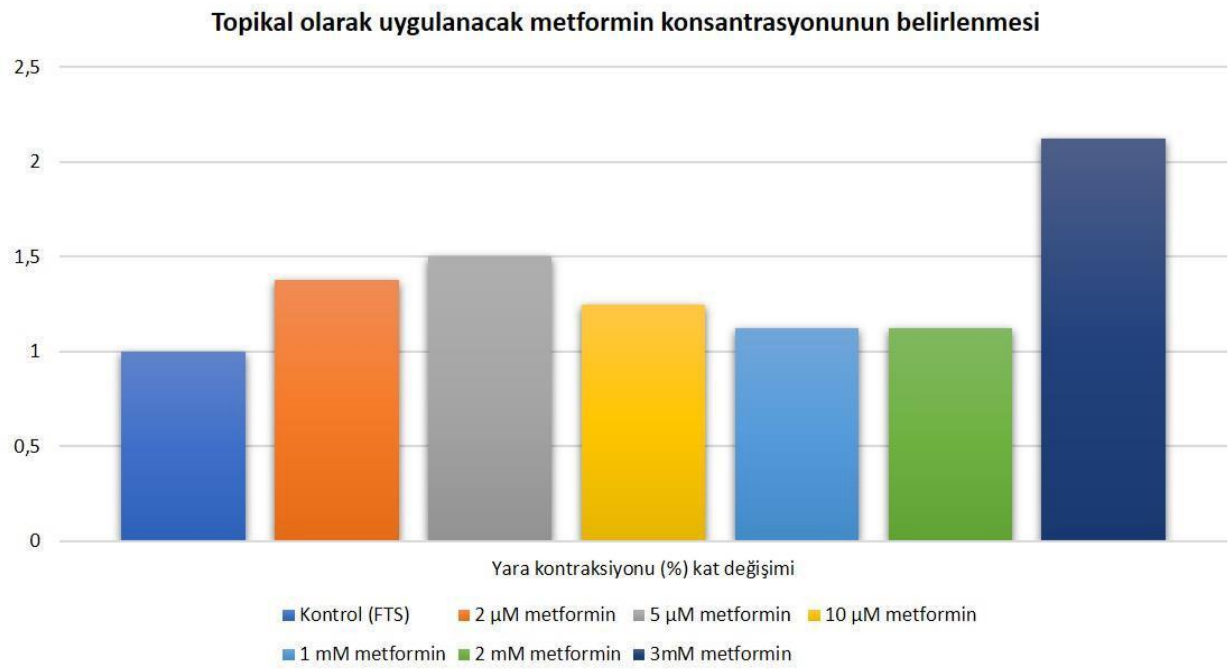
4. BULGULAR

4.1. Tam Kat Eksizyon Yara Modeli Oluşturulan Sıçanlara Topikal Olarak Uygulanacak Metformin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada STZ ile diyabet indüklenen ve diyabet olmayan sıçanlarda topikal yolla uygulanacak olan metformin konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla 6 farklı doz denemesi yapıldı. Dorsal bölgede açılan tam kat eksizyonel yaralar üzerine metformin 14 gün boyunca uygulandı ve yara iyileşmesi takip sürecinde kontrole kıyasla daha hızlı yara kontraksiyonu sağlayan optimal doz 3 mM olarak belirlendi. Diğer dozların yara kontraksiyon sonuçları aşağıdaki tabloda ve grafikte belirtilmiştir (Şekil 4-1, Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Yaralara uygulanacak olan dozun belirlenmesi için ön deneme sonuçları

Uygulanan Metformin Dozu	Yara kontraksiyonu (%)
Kontrol (FTS)	%25
2 μM metformin	%34,38
5 μM metformin	%37,5
10 μM metformin	%31,25
1 mM metformin	%28,13
2 mM metformin	%28,13
3mM metformin	%53,13

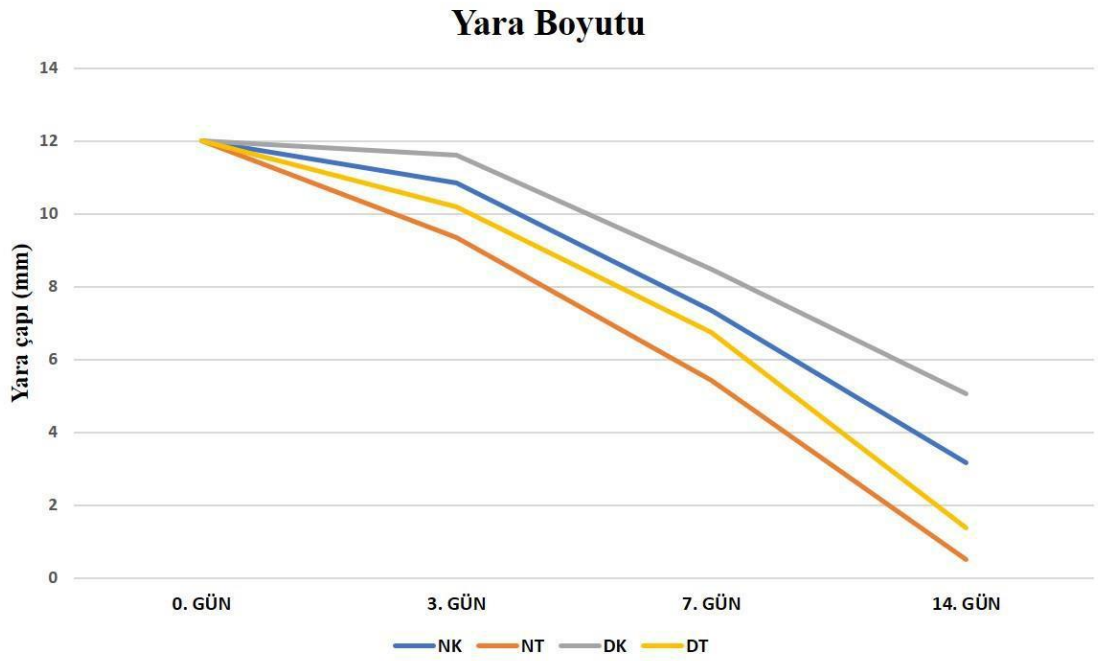


Şekil 4-1: Topikal olarak uygulanacak metforminin doz denemesi sonucu kontrole kıyasla kat değişim grafiği

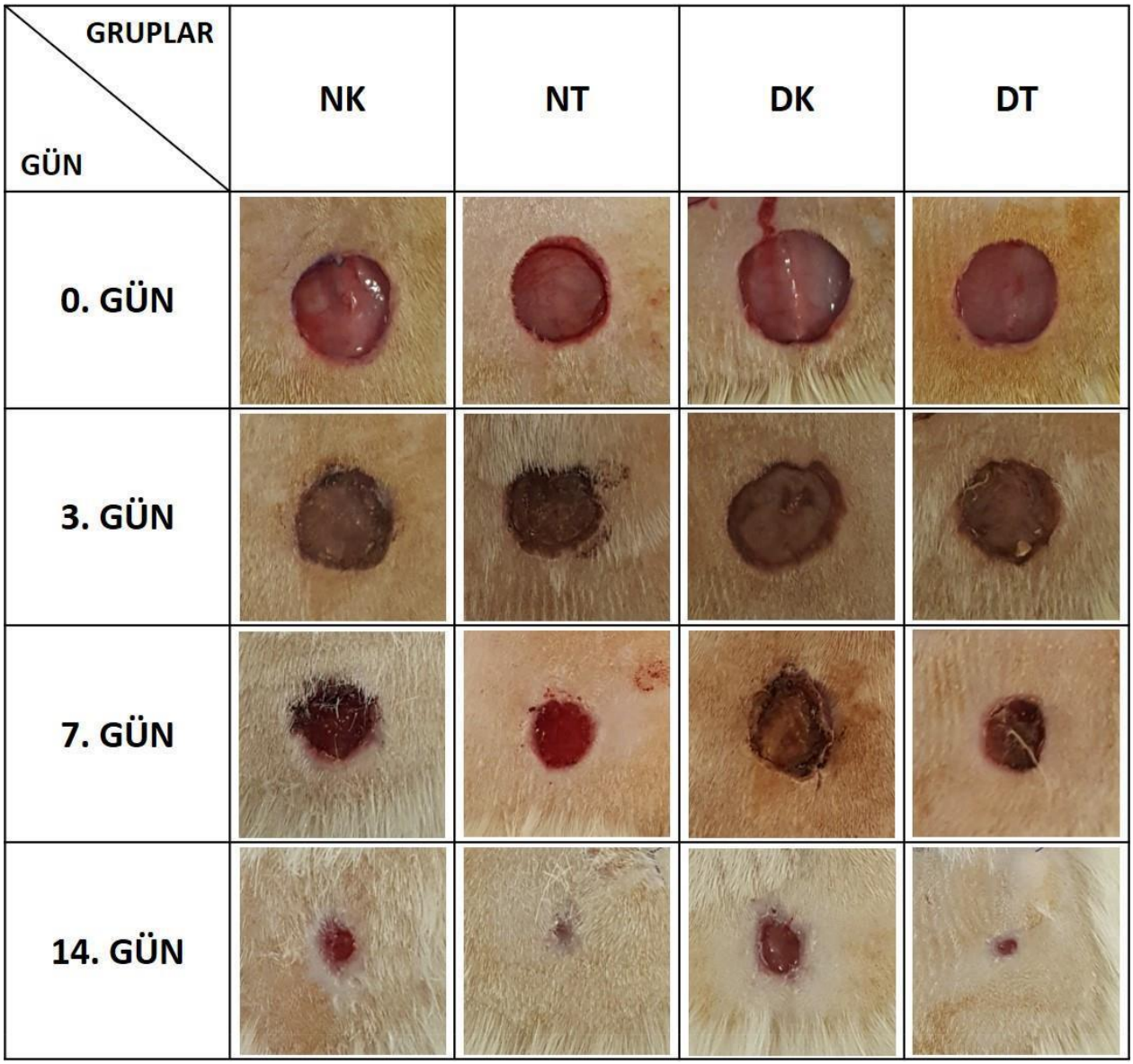
4.2. Topikal Olarak Uygulanan Metforminin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmada uygulanacak olan metformin konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla; 14 günlük yara iyileşmesi takip sürecinde doz denemesi yapılarak kontrole kıyasla daha hızlı yara kontraksiyonu sağlayan optimal dozun 3 mM olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılan Wistar hannover türü sıçanlar diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlar olmak üzere ana 2 gruba ayrıldı ve her bir grup da kendi arasında metformin uygulanan ve FTS uygulanan gruplar (kontrol grubu) olarak toplamda 4 gruba ayrıldı. Diyabetik olarak ayrılan gruplara tek doz (IP) yoldan 60 mg/kg Streptozotocin (STZ) ile diyabet indüklendi. Deney gruplarındaki her bir hayvanın sırt bölgesinde 12 mm çapında sirküler 3 adet tam kat eksizyonel yara modeli oluşturuldu ve kontrol gruplarına FTS, tedavi gruplarına 3mM metformin uygulanarak 3., 7., ve 14. günlerde hem manuel hem de çalışma sonrası AutuCAD ile yara çapları ölçüldü. Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te görüldüğü üzere diyabet kontrol grubunda (DK) 14. günde diğer gruplara kıyasla iyileşme çok geridedir. Normal tedavi grubunda (NT) 14. günde neredeyse tüm hayvanlarda yaralar kapanmış durumda iken, diyabet tedavi grubu (DT) spontane tedavi sürecini temsil eden

normal kontrol grubundan (NK) bile daha hızlı bir yara iyileşmesi gözlemlenmiştir. (Şekil 4-3)



Şekil 4-2: Topikal olarak uygulanan metforminin deney gruplarında 0., 3., 7., ve 14. günlerdeki yara kapanması üzerindeki iyileştirici etkisinin gösterilmesi. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.



Şekil 4-3: Metformin ile tedavi edilen sıçanların yara kasılmasının 0., 3., 7. ve 14. günlerde fotoğraf görüntüleri. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

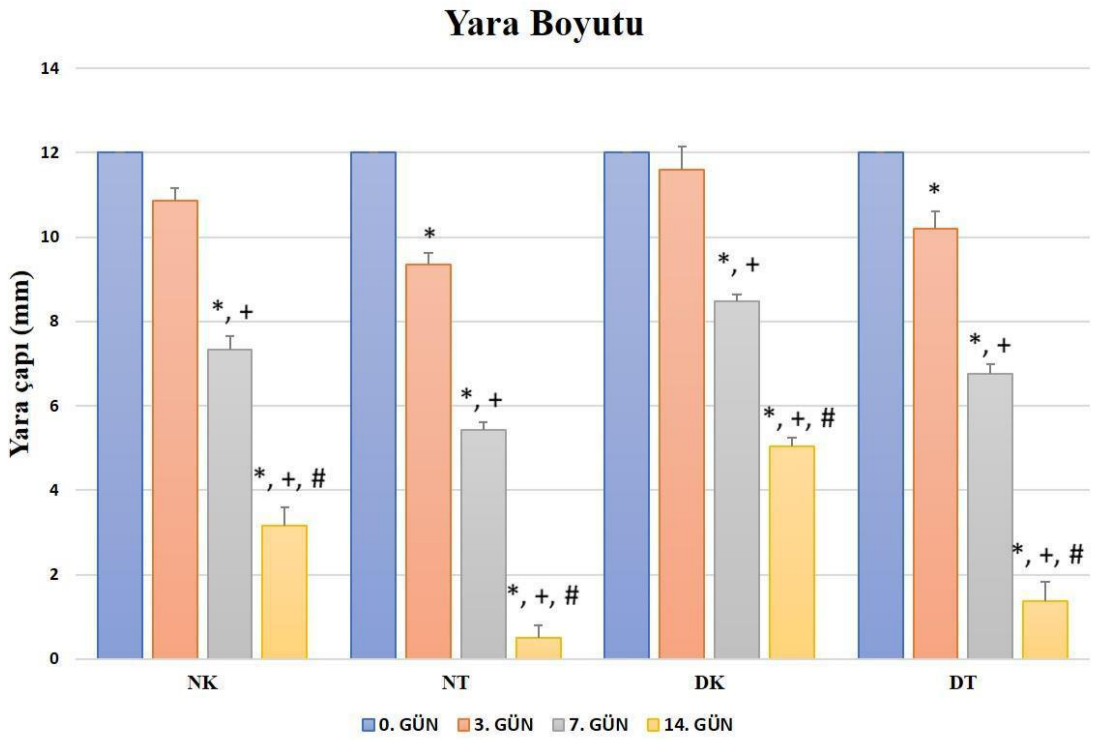
Tablo 4-2 ve Şekil 4-4'te görüldüğü üzere her bir grup kendi içerisinde günlere kıyasla değerlendirildi (Şekil 4-4, Tablo 4-2). NK grubunda 3. günde yara çapı ölçümlerine göre anlamlılık saptanmadı. 7. günde ve 14. günde ise 0. güne kıyasla anlamlı bir düşüş görülmektedir ($p < 0,0001$). NT grubunda ise 3., 7., ve 14. günde de 0. güne kıyasla istatiksel olarak anlamlı düzeyde ($p < 0,0001$) metforminin yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmektedir. DK grubunda ise yara iyileşme hızı oldukça yavaş seyretmiş olup 3. günde istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmadı, ancak 7., ve

14.günlerde yara iyileşmesi anlamlı bir düşüş gösterdi (p <0,0001). DT grubunda metformin uygulanması sonucu 3. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir düşüş (p=0,0049), 7. ve 14. günlerde ise 0. güne kıyasla istatiksel olarak anlamlı bir yara iyileşmesi sonucu gözlendi.

İyileşmenin 3., 7., ve 14. günlerinde gruplar arası kıyaslama yapıldığında; 3. gündeki yara ölçümleri tedavi gruplarında kontrollerine kıyasla belirgin bir azalma gösteriyor olsa da istatistiki olarak bir anlamlılık saptanmadı. DK ve NT arasında ise p=0,0081 olarak bir anlamlılık görülmektedir. 7. gündeki yara ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde; DK grubu ve NK grubu arasında anlamlılık bulunmaktadır (p= 0,0119), bu bulgu diyabetin yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkisini göstermektedir. NT grubu kontrolüne kıyasla (NK) istatistiki olarak anlamlı bir iyileşme sergiledi (p=0,0001). DT grubu da kontrolüne kıyasla (DK) anlamlı bir yara iyileşme sonucu gösterdi (p=0,0001). Ayrıca her iki tedavi grubu arasında da anlamlı bir fark bulunmaktadır (p=0,0038). 14. günde ise; NT grubu kontrolüne kıyasla (NK) dramatik bir azalma göstererek anlamlılık gösterdi (p=0,0005), DT grubunda da yine kontrolüne kıyasla (DK) anlamlı bir iyileşme saptandı (p<0,0001). Her iki kontrol kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunurken (p=0,0083), her iki tedavi grubu birbiriyle kıyaslandığında herhangi bir anlamlılık saptanmadı.

Tablo 4-2: Deney gruplarının 0., 3., 7., ve 14. günlerdeki yara boyutu (mm) verileri. Sonuçlar ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla - Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

	NK	**NT**	**DK**	**DT**
0. gün	12±0		12±0	
3. gün	10,86±0,34	9,34±0,29	11,6±0,55§	10,19±0,42
7. gün	7,34±0,32	5,43±0,19$^{¤}$	8,49±0,16$^{¤, \S}$	6,75±0,24$^{\S, ¥}$
14. gün	3,17±0,42	0,50±0,31$^{¤}$	5,05±0,19$^{¤, \S}$	1,37±0,46$^{¤, ¥}$

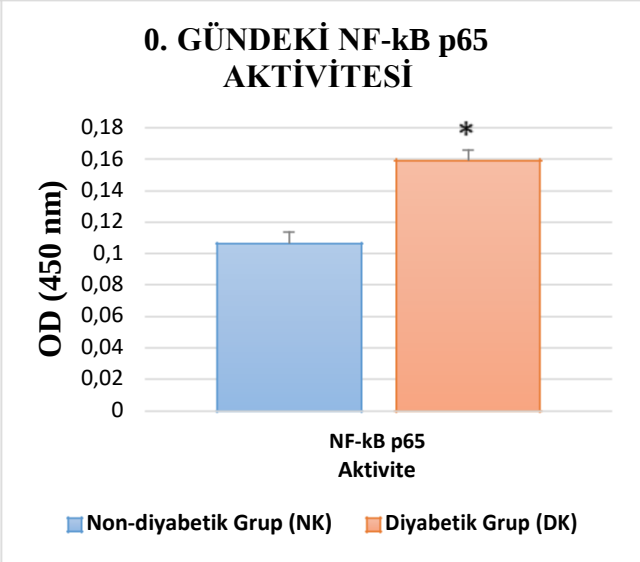


Şekil 4-4: Topikal olarak uygulanan metforminin deney gruplarında kutanöz yara iyileşmesi üzerindeki iyileştirici etkisinin grafiksel olarak değerlendirilmesi (*; 0. güne kıyasla, +; 3. güne kıyasla, #; 7. güne kıyasla – Grup içi anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

4.3. Metforminin NF-κB p65 Aktivitesi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi

Metforminin tüm gruplardaki 0., 3., 7. ve 14. günlerdeki yara iyileşmesinde NF-κB p65 aktivasyon düzeyi üzerine etkisi ELISA tekniği ile belirlendi.

Normal grupların ve STZ ile diyabet indüklenmiş diyabetik grupların ilk yaranın açıldığı gün (0. gün) herhangi bir tedavi uygulamadan alınan doku örneklerinde yapılan analizler sonucunda her bir parametre için t testi kullanılarak ikili kıyaslamalar yapıldı ve diyabetin etkileri Şekil 4-5'te gösterildi (Şekil 4-5). Ortaya çıkan bulgular diyabetik grupta normal gruba kıyasla anlamlı bir artış olduğunu gösterdi (p=0,0001).



Şekil 4-5: Deney gruplarının 0. gündeki NF-κB p65 aktivitesi sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (*; NK grubuna kıyasla)

Tablo 4-3 ve Şekil 4-6'da deney gruplarının yara iyileşmesinin takip edildiği günlerdeki bulguları gösterilmektedir (Şekil 4-6, Tablo 4-3).

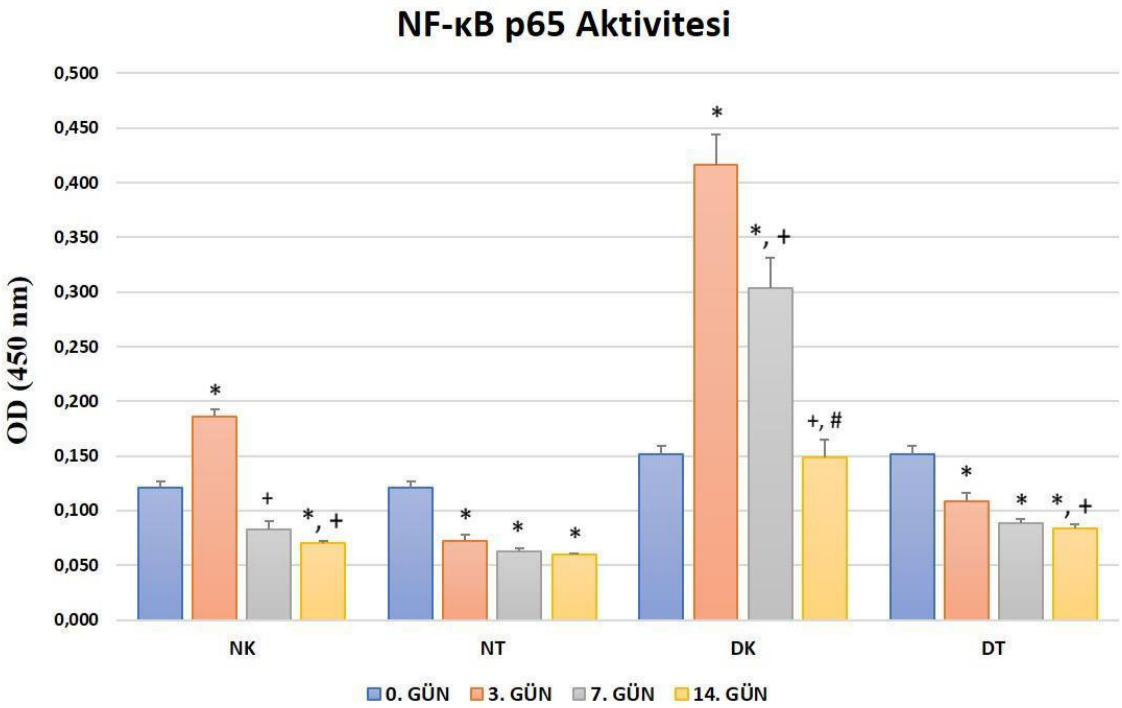
Bu sonuçlara göre her bir grup kendi içerisinde günler düzeyinde kıyaslandığında; NK grubunda 3. gündeki p65 aktivitesi 0. güne kıyasla anlamlı şekilde arttı ($p<0,0001$), ancak 7. günde azalma olmasına rağmen bir fark bulunmazken; 14. günde ise 0. güne kıyasla anlamlı düzeyde azalma gösterdi (sırasıyla; $p=0,0026$). Ayrıca 7. ve 14. günlerde 3. güne kıyasla anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,0001$), 7. ve 14. günler arasında ise anlamlılık saptanmadı. NT grubunda 3., 7. ve 14. günlerde 0. güne kıyasla ciddi bir azalma görüldü ve anlamlı olarak değerlendirildi ($p<0,0001$). 3., 7. ve 14. günlerde ise kendi aralarında bir anlamlılık saptanmadı. DK grubunda 3. günde ve 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı düzeyde arttığı izlendi (sırasıyla; $p<0,0001$, $p=0,0005$). 14. günde ise 0. güne kıyasla herhangi bir anlamlılık saptanmayarak aynı düzeyde olduğu gözlendi. DT grubunda 3., 7., ve 14. günlerdeki ekspresyon değerleri 0. güne kıyasla anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,0001$). Ayrıca 14. gündeki azalma 3. güne kıyasla anlamlı bir azalma gösterdi ($p=0,0172$).

Yara iyileşmenin 3., 7., ve 14. günlerinde gruplar arası kıyaslama yapıldığında; yara iyileşmesinin 3. gününde NT grubu kontrolüne kıyasla (NK) anlamlı düzeyde azalma gözlendi ($p<0,0001$). DT grubu ise kontrolüne kıyasla (DK) dramatik düzeyde azalarak

istatistiksel olarak anlamlılık saptandı (p<0,0001). Tedavi grupları (NT ve DT) arasında herhangi bir anlamlılık saptanmazken, kontrol grupları (NK ve DK) arasında anlamlı bir fark bulundu (p<0,0001). 7. gündeki değerlendirme sonuçlarına göre; NT grubu ile kontrolü (NK) arasında bir anlamlılık saptanmadı. DT grubunda ise kontrolüne kıyasla (DK) anlamlı düzeydeki düşüşünü devam ettirdi (p<0,0001). Tedavi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, kontrol grupları arasında DK grubu NK grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olarak izlendi (p<0,0001). Yara iyileşmesinin 14. günündeki değerlendirilmesine göre; NT grubu ile kontrolü (NK) arasında bir anlamlılık bulunmadı. DT grubu kontrolüne kıyasla (DK) yine anlamlı bir azalma görüldü (p<0,0001). Tedavi grupları arasında anlamlılık saptanmadı, ancak kontrol grupları arasında DK grubu NK grubuna kıyasla p65 aktivitesi anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu (p<0,0001).

Tablo 4-3: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının ELISA yöntemi ile saptanan NF-κB (p65) aktivasyon sonuçları. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

	NK	NT	DK	DT
0. gün	0,106±0,007		0,159±0,006$^{¤}$	
3. gün	0,186±0,007	0,071±0,004$^{¤}$	0,4164±0,028$^{¤, §}$	0,1089±0,007$^{¤, §, ¥}$
7. gün	0,083±0,007	0,063±0,003	0,3031±0,028$^{¤, §}$	0,08843±0,004$^{¥}$
14. gün	0,07±0,002	0,0596±0,001	0,149±0,016$^{¤, §}$	0,084±0,004$^{¥}$

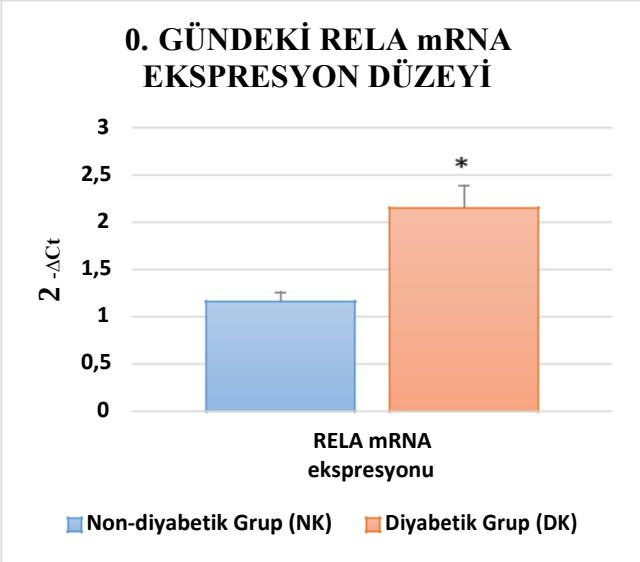


Şekil 4-6: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının ELISA yöntemi ile saptanan NF-κB (p65) aktivasyon sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi (*; 0. güne kıyasla, +; 3. güne kıyasla, #; 7. güne kıyasla – Grup içi anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

4.4. Metforminin RELA, MMP2 VE MMP9 mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi

4.4.1. Metforminin RELA (p65) mRNA Düzeyi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi

Normal grupların ve STZ ile diyabet indüklenmiş diyabetik grupların ilk yaranın açıldığı gün (0. gün) herhangi bir tedavi uygulamadan alınan doku örneklerinde yapılan analizler sonucunda her bir parametre için t testi kullanılarak ikili kıyaslamalar yapıldı ve diyabetin etkileri Şekil 4-7'de gösterildi (Şekil 4-7). RT-qPCR tekniği uygulanarak RELA mRNA ekspresyon seviyeleri diyabet olan ve diyabet olmayan kontrol ve tedavi gruplarında analiz edildi. Ortaya çıkan verilere göre; Diyabetik grupta normal gruba kıyasla RELA mRNA seviyesinde (p=0,0007) istatistiksel olarak anlamlı bir sonuçla artış gösterdiği saptandı.

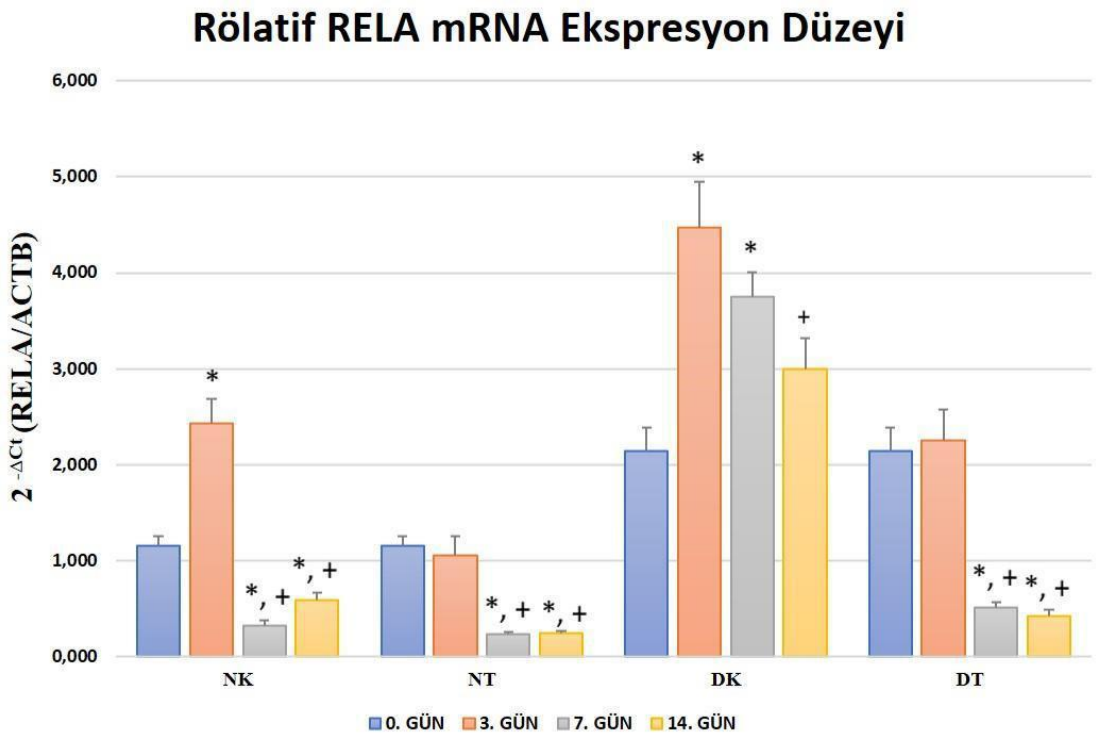


Şekil 4-7: Deney gruplarının 0. gündeki RELA ekspresyon sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (*; NK grubuna kıyasla)

Yara iyileşmesinin takip edildiği 0., 3., 7., ve 14. günlerde metforminin tüm gruplardaki RELA (p65) mRNA ekspresyonu düzeyleri Tablo 4-4 ve Şekil 4-8'te gösterilmiştir (Şekil 4-8, Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan RELA mRNA ekspresyon düzeyleri. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

	NK	NT	DK	DT
0. gün	1,159±0,098		2,148±0,236$^{¤}$	
3. gün	2,436±0,253	1,052±0,199$^{¤}$	4,471±0,481$^{¤, §}$	2,257±0,322$^{¥}$
7. gün	0,327±0,051	0,232±0,026	3,751±0,259$^{¤, §}$	0,508±0,059$^{¥}$
14. gün	0,585±0,085	0,243±0,030	2,998±0,321$^{¤, §}$	0,421±0,071$^{¥}$



Şekil 4-8: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan RELA mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel olarak değerlendirilmesi. (*; 0. güne kıyasla, +; 3. güne kıyasla, #; 7. güne kıyasla – Grup içi anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

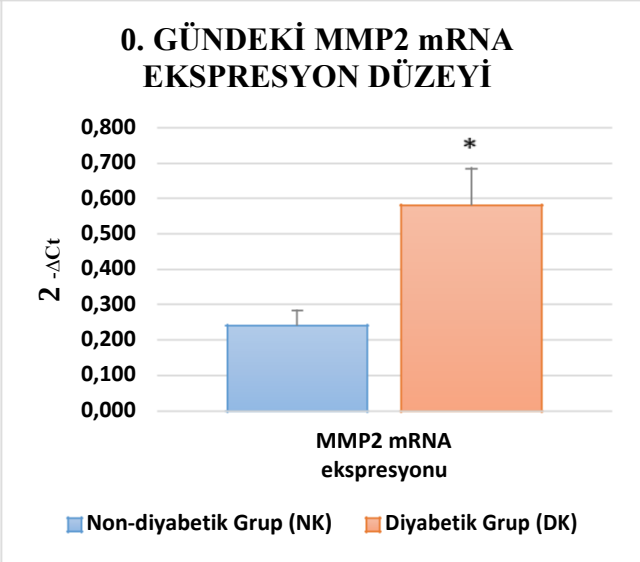
Bu bulgulara göre; NK grubunda günlere göre grup içi kıyaslama yapıldığında, 3. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir artış gösterirken ($p<0,0001$); 7., ve 14. günlerde ise 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma izlendi (sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,0259$). 7. ve 14. günlerde ise 3. güne kıyasla dramatik bir azalma seyredildi ($p<0,0001$). 7. ve 14. günler arasında bir anlamlılık bulunmadı. NT grubunda yara iyileşmesinin 3. gününde 0. güne kıyasla bir anlamlılık gözlenmedi. 7. ve 14. günlerde ise 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma izlendi ($p<0,0001$), yine 7. ve 14. günlerde yara iyileşmesinin 3. gününe kıyasla anlamlı bir fark gözlendi (sırasıyla; $p=0,0003$, $p=0,0004$). DK grubunda 3. günde ve 7. günde 0. güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (sırasıyla; $p=0,0005$, $p=0,0155$). 14. günde de 0. güne kıyasla artış görülmesine rağmen istatistiki olarak bir fark bulunmadı, ancak 14. gündeki sonucun 3. güne kıyasla azalması anlamlı olarak saptandı ($p=0,0278$). DT grubu günlere kıyasla değerlendirildiğinde 3. günde 0. güne kıyasla bir fark bulunmadı. Ancak 7. ve 14. günde 0. güne kıyasla dramatik olarak düşük seviyelerde

olması istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi ($p<0,0001$). 7. ve 14. günlerde 3. güne kıyasla da anlamlı düzeyde bir azalma izlendi ($p<0,0001$).

Günlere göre gruplararası değerlendirme sonuçlarına göre; 3. gündeki sonuçlar NT grubunun kontrolüne kıyasla (NK) ($p=0,036$), DT grubunun da kontrolüne kıyasla (DK) anlamlı düzeyde bir azalma ($p=0,0007$) olduğunu gösterdi. Kontrol grupları arasında da DK grubu NK grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğu gözlemlendi ($p=0,0016$). 7. gündeki sonuçlara göre; DT grubundaki ekspresyon düzeyinin kontrolüne kıyasla (DK) anlamlı derecede dramatik olarak azaldığı tespit edildi ($p<0,0001$). NT grubu ve kontrolü (NK) arasında ise herhangi bir anlamlılık saptanmadı. Kontrol grupları arasında da (NK ve DK) diyabetin ekspresyon düzeyini artırmasına bağlı olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,0001$). Yara iyileşmesinin 14. günündeki RELA mRNA ekspresyon düzeyi sonuçları DT grubunun kontrolüne kıyasla (DK) anlamlı seviyede bir azalma olduğunu gösterdi ($p<0,0001$). Ancak NT grubunda kontrolüne kıyasla (NK) anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. DK grubu NK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,0001$).

4.4.2. Metforminin MMP2 mRNA Düzeyi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi

Normal grupların ve STZ ile diyabet indüklenmiş diyabetik grupların ilk yaranın açıldığı gün (0. gün) herhangi bir tedavi uygulamadan alınan doku örneklerinde yapılan analizler sonucunda her bir parametre için t testi kullanılarak ikili kıyasla yapıldı ve diyabetin etkileri Şekil 4-9'da gösterildi (Şekil 4-9). RT-qPCR tekniği uygulanarak MMP2 mRNA ekspresyon seviyeleri diyabet olan ve diyabet olmayan kontrol ve tedavi gruplarında analiz edildi. Ortaya çıkan verilere göre; Diyabetik grupta normal gruba kıyasla MMP2 mRNA seviyesinde ($p=0,0124$) istatistiksel olarak anlamlı bir sonuçla artış gösterdiği saptandı.

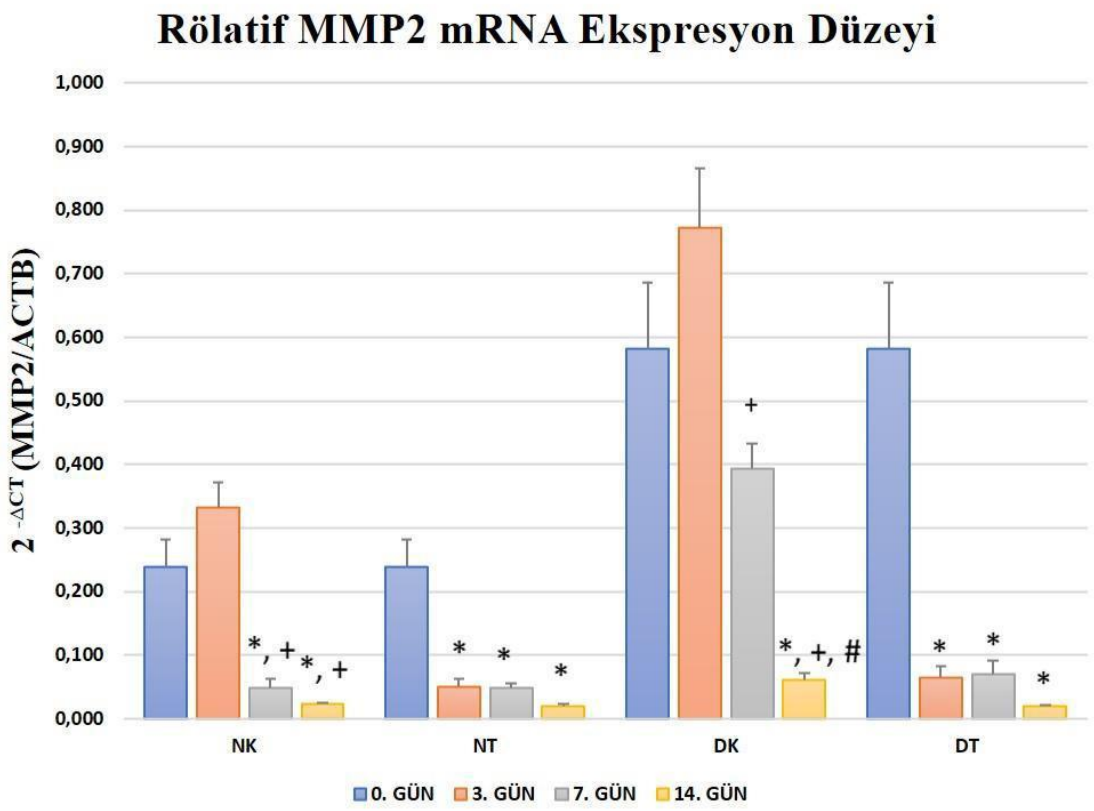


Şekil 4-9: Deney gruplarının 0. gündeki MMP2 ekspresyon sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (¤; NK grubuna kıyasla). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

Yara iyileşmesinin takip edildiği 0., 3., 7., ve 14. günlerde metforminin tüm gruplardaki MMP2 mRNA ekspresyonu düzeyleri Tablo 4-5 ve Şekil 4-10'da gösterilmiştir (Şekil 4-10, Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP2 mRNA ekspresyon düzeyleri. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

	NK	NT	DK	DT
0. gün	0,240±0,043		0,582±0,104$^{¤}$	
3. gün	0,333±0,039	0,050±0,013$^{¤}$	0,773±0,093$^{¤, §}$	0,065±0,018$^{¤, ¥}$
7. gün	0,049±0,014	0,049±0,007	0,393±0,040$^{¤, §}$	0,070±0,021$^{¥}$
14. gün	0,024±0,002	0,020±0,004	0,061±0,011$^{¤, §}$	0,020±0,002$^{¥}$



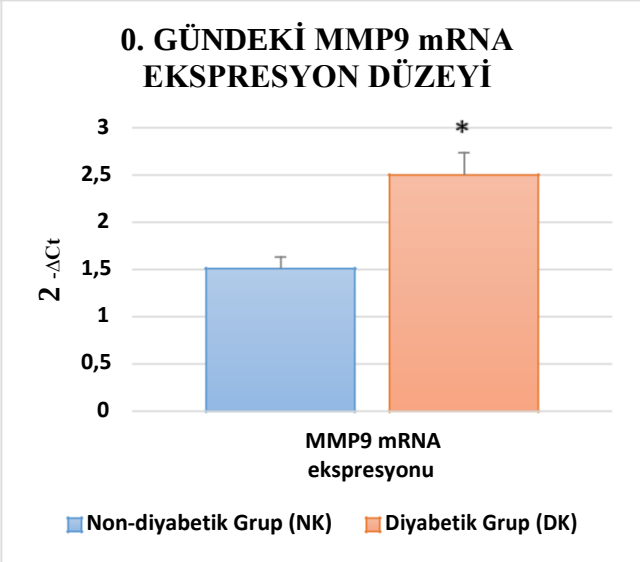
Şekil 4-10: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP2 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel olarak değerlendirilmesi. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

Deney gruplarının günlere göre grup içi kıyaslama sonuçları değerlendirildiğinde; NK grubunda 7. ve 14. günlerdeki sonuçların 0. güne kıyasla (sırasıyla; p=0,0012, p=0,0003) ve 3. güne kıyasla (p<0,0001) dramatik seviyede anlamlı bir azalma gösterdi. 3. günde ise 0. güne kıyasla bir artış görülmesine ragmen bir anlamlılık bulunmadı. NT grubunda 3., 7. ve 14. günlerde 0. güne kıyasla oldukça anlamlı bir azalma izlendi (p<0,0001). DK grubunda 0. güne kıyasla 3. günde bir artış ve 7. günde bir azalma görülmesine rağmen anlamlılık saptanmadı. Ancak 14. günde 0. güne kıyasla anlamlı düzeyde bir azalma gözlendi (p=0,0003). 7. ve 14. günde 3. güne kıyasla (sırasıyla; p=0,0072, p<0,0001) ve 14. günde 7. güne kıyasla (p=0,0201) anlamlı düzeyde bir azalma izlendi. DT grubu sonuçları değerlendirildiğinde 3., 7. ve 14. günlerde 0. güne kıyasla dramatik bir azalma görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı saptandı (p<0,0001).

İyileşmenin 3., 7., ve 14. günlerinde gruplar arası kıyaslama yapıldığında; 3. günde NT grubu kontrolüne kıyasla (NK) anlamlı bir azalma gösterdi (p=0,0051). DT grubu da kontrolüne kıyasla (DK) MMP2 gen ekspresyon düzeyinin oldukça azaldığı ve anlamlı olarak değerlendirildiği bulundu (p<0,0001). Kontrol grupları olan NK ve DK gruplarının ekspresyon düzeyleri ise DK grubunun NK grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği saptandı (p<0,0001). Tedavi gruplarının arasında birbirleriyle kıyaslandığında ise (NT ve DT) herhangi bir anlamlılık saptanmadı. 7. gündeki sonuçlara göre; DT grubu kontrolüne kıyasla (DK) ekspresyon düzeyinde azalma yönünde anlamlı bir fark olduğu saptandı (p<0,0001). NT grubunda kontrolüne kıyasla (NK) metforminin MMP2 ekspresyonuna anlamlı bir etkisi olmadığı gözlendi. Ayrıca kontrol grupları (NK ve DK) arasında da anlamlı bir değişiklik bulundu (p<0,0001). 14. günün sonuçlarına bakıldığında; DT grubundaki azalma kontrolüne kıyasla (DK) anlamlı düzeyde devam etti (p=0,0005). NT grubunda kontrolüne kıyasla (NK) anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, kontrol grupları arasındaki (NK ve DK) anlamlı fark yine gözlendi (p=0,0014).

4.4.3. Metforminin MMP9 mRNA Düzeyi Üzerine Etkisinin Diyabet ve Diyabet Olmayan Yaralarda Gösterilmesi

Normal grupların ve STZ ile diyabet indüklenmiş diyabetik grupların ilk yaranın açıldığı gün (0. gün) herhangi bir tedavi uygulamadan alınan doku örneklerinde yapılan analizler sonucunda her bir parametre için t testi kullanılarak ikili kıyasla yapıldı ve diyabetin etkileri Şekil 4-11'de gösterildi (Şekil 4-11). RT-qPCR tekniği uygulanarak MMP9 mRNA ekspresyon seviyeleri diyabet olan ve diyabet olmayan kontrol ve tedavi gruplarında analiz edildi. Ortaya çıkan verilere göre; Diyabetik grupta normal gruba kıyasla MMP9 mRNA seviyesinde (p=0,0045) istatistiksel olarak anlamlı bir sonuçla artış gösterdiği saptandı.

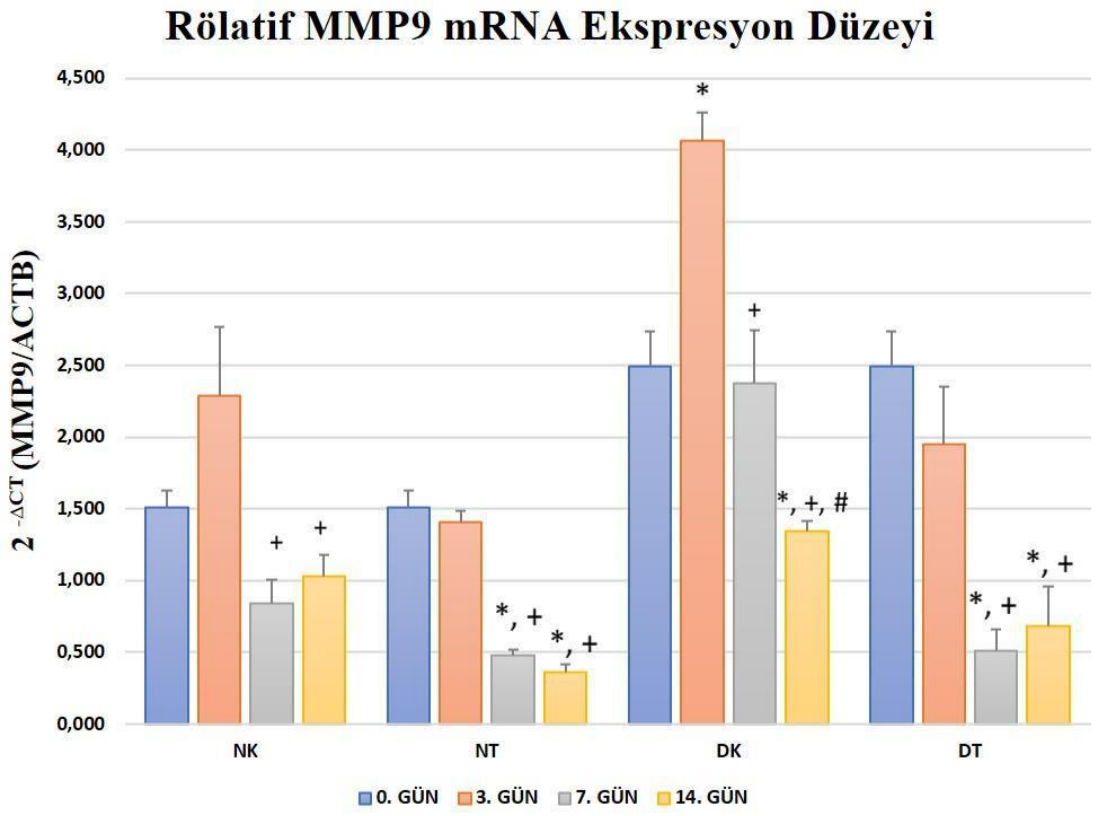


Şekil 4-11: Deney gruplarının 0. gündeki MMP9 ekspresyon sonuçlarının grafiksel olarak değerlendirilmesi. (¤; NK grubuna kıyasla). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

Yara iyileşmesinin takip edildiği 0., 3., 7., ve 14. günlerde metforminin tüm gruplardaki MMP9 mRNA ekspresyonu düzeyleri Tablo 4-6 ve Şekil 4-12'de gösterilmiştir (Şekil 4-12, Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP9 mRNA ekspresyon düzeyleri. Sonuçlar Ortalama ± standart hata değerleri (Mean±SEM) olarak belirtilmiştir. (¤; NK grubuna kıyasla, ¥; DK grubuna kıyasla, §; NT grubuna kıyasla – Gruplar arası anlamlılık düzeyi belirtilmiştir.). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

	NK	NT	DK	DT
0. gün	1,507±0,121		2,494±0,242$^{¤}$	
3. gün	2,284±0,485	1,404±0,079	4,064±0,197$^{¤, §}$	1,950±0,401$^{¥}$
7. gün	0,839±0,164	0,477±0,040	2,373±0,373$^{¤, §}$	0,510±0,146$^{¥}$
14. gün	1,026±0,151	0,362±0,054$^{¤}$	1,343±0,071§	0,683±0,273$^{¥}$



Şekil 4-12: Yara iyileşmesinin 0., 3., 7., ve 14. günlerinde deney gruplarının RT-qPCR yöntemi ile saptanan MMP9 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel olarak değerlendirilmesi. NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

MMP9 ekspresyon düzeylerinin günlere kıyasla grup içi değerlendirme sonuçları; NK grubunda 0. güne kıyasla 3. gündeki artışın ve 7. ile 14. günlerdeki azalışın anlamlı bir etkisi olmadığını gösterdi. Ancak 7. ve 14. günlerde 3. güne kıyasla görülen azalmanın anlamlı bir fark olduğu saptandı (sırasıyla; p=0,0066, p=0,0192). NT grubunda 7. ve 14. günlerdeki azalma istatiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi (p<0,0001). Benzer şekilde yine 7. ve 14. günlerdeki ekspresyon düzeylerinin 3. güne kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı bulundu (p<0,0001). Ancak 3. günün 0. güne ve 14. günün de 7. güne kıyasla anlamlı bir fark ortaya koymadığı gözlendi. DK grubunun sonuçları; 3. gündeki ekspresyon düzeylerinin 0. güne anlamlı düzeyde arttığını gösterdi (p=0,0011). 7. günün sonuçları 0. güne kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermedi. 14. günde ise 0. güne kıyasla görülen azalmanın da anlamlı olduğu belirlendi (p=0,0169).7. ve 14. günün 3. güne kıyasla (sırasıyla; p=0,0005, p<0,0001) ve 14. günün de 7. güne kıyasla (p=0,0356) anlamlı düzeyde azaldığı saptandı. DT grubunda; 7. ve 14. günün sonuçları 0. güne

kıyasla anlamlı düzeyde azaldı (sırasıyla; p=0,0004, p=0,001). 3. günde ise 0. güne kıyasla anlamlı bir azalış saptanmadı. 7. ve 14. günlerde 3. güne kıyasla görülen azalmanın anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla; p=0,0083, p=0,0218).

Günlere kıyasla gruplar arası değerlendirme sonuçlarına göre; 3. günde, DT grubu kontrolüne kıyasla (DK) göstermiş olduğu azalmış ekspresyon seviyesi istatiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,0012). NT grubunda ise kontrolüne kıyasla (NK) belirgin bir azalma göstermesine rağmen anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol gruplarının sonuçları DK grubunun NK grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptandı (p=0,0058). MMP9 ekspresyon düzeyi 7. günde de 3. güne benzer şekilde NT grubunda kontrolüne kıyasla (NK) anlamlı bir değişiklik göstermezken, DT grubu kontrolüne kıyasla (DK) dramatik bir azalma göstererek anlamlı bir fark gösterdiği saptandı (p<0,0001). Kontrol gruplarındaki fark ise DK grubunun NK grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği bulundu (p=0,0004). 14. gündeki ekspresyon sonuçları NT grubunun kontrolüne kıyasla (NK) azalma göstererek anlamlı bir değişiklik gösterdiği izlendi. DT grubu da kontrolüne kıyasla (DK) istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği saptandı (p=0,0427).

Yara iyileşme sürecinin takibi amacıyla yara iyileşmesinin fizyolojik fazları olarak seçilmiş olan 3. gün inflamatuvar fazı, 7. gün proliferatif fazı ve 14. gün ise remodelizasyon fazı temsil etmektedir. Sonuçlarımızın kombine hali; metforminin çalışılan parametrelerdeki etkinliği yara iyileşme fazlarındaki günlere göre Tablo 4-7'de gösterilmektedir (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: Yara iyileşmesinin fizyolojik fazlarına göre çalışılan parametrelerin düzeylerinin gösterilmesi (Başlangıç düzeylerine göre). NK: Non-diyabetik kontrol grubu, NT: Non-diyabetik tedavi grubu, DK: Diyabetik kontrol grubu, DT: Diyabetik tedavi grubu.

		PARAMETRELER			
GÜNLER	**GRUPLAR**	**p65 AKTİVİTE**	**RELA**	**MMP2**	**MMP9**
3. gün	**NK**	↑	↑	↑	↑
	NT	↓	↔	↓	↔
	DK	↑	↑	↑	↑
	DT	↓	↔	↓	↓
7. gün	**NK**	↓	↓	↓	↓
	NT	↓	↓	↓	↓
	DK	↑	↑	↓	↔
	DT	↓	↓	↓	↓
14. gün	**NK**	↓	↓	↓	↓
	NT	↓	↓	↓	↓
	DK	↔	↑	↓	↓
	DT	↓	↓	↓	↓

5. TARTIŞMA

Diabetes mellitus, insülin hormonunun azlığı veya tamamen eksikliğine bağlı hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Tip 1 diyabet, insülin eksikliği ile ortaya çıkarken, Tip 2 diyabet insülin direnci ve insülin salınımında azalma ile karakterize edilir. Her iki durumda da hiperglisemik tablo ortaya çıkar. Kronik hiperglisemi, nöropati, nefropati ve retinopati gibi çeşitli komplikasyonlara yol açar. Diyabetik kişilerde hiperglisemiye bağlı olarak yara iyileşmesinde gecikmeler çok yaygındır (4, 50, 214-216). Yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma (217) gibi çeşitli aşamaları içeren patofizyolojik bir süreçtir. DM'de yara iyileşme evrelerinde bozulmalar görülür ve hiperglisemiye bağlı olarak normal iyileşme süreci görülmez (95). Diyabetle ortaya çıkan Hiperglisemi, proinflamatuar sitokinleri ve ekstraselüler matriksin (ECM) bileşenlerini ve yaranın iyileşmesi için gerekli büyüme faktörlerini bozan inflamatuar hücrelerin artışını indükler (218). Sonuç olarak iyileşmenin inflamatuvar fazı uzar, granülasyon dokuları gelişemez ve sonunda kronik yaralar oluşur (219). Bu bulgular Hipergliseminin, diyabetik hastalarda gecikmiş yara iyileşme sürecinden sorumlu olduğunu göstermektedir (220). Biz de çalışmamızda STZ diyabetik sıçanlarda açılan yara iyileşmesinin diyabetik olmayan gruba kıyasla hiperglisemiye bağlı olarak geciktiğini gösterdik (Şekil 4-4).

Bilindiği gibi biguanid türevi olan Metformin tip 2 diyabet tedavisi için en sık kullanılan ilaçlardan biridir (221). Metforminin, hiperglisemi ile ortaya çıkan oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğunu ve pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ettiğini in vitro ve in vivo çalışmalar göstermiştir (222-224). Bu bulgular, metforminin immünomodülatör özelliklere sahip olduğu hipotezini de desteklemektedir (222, 225). Son zamanlarda, Anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle metformine olan ilgi giderek artmaktadır (26, 222, 226). Metformin, tip 2 diyabet hastaları için öngörülen en eski hipoglisemik ajanlardan biri olmasına rağmen, az sayıda çalışma, metforminin yara iyileşmesini üzerine etkilerini araştırmıştır. Metformin, yara iyileşmesi üzerindeki etkisini sitokin ve kemokin ekspresyon modellerini değiştirerek ve bazı pleiotropik etkileri ortaya çıkararak gerçekleştirdiği tezi öngörülmektedir (227).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda STZ diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlarda tam kat eksizyonel yara modeli oluşturduk. Diyabetik yaraların iyileşme süreci üzerine metforminin etkisini göstermek amacıyla 2 μM ile 3 mM metformin doz aralığına bağlı

olarak yaptığımız doz çalışmalarında etkin dozu 3 mM olarak tespit eddik. 3 mM metformin konsantrasyonu diyabetik ve diyabetik olmıyan gruplarda açılan yaralar üzerine her gün aynı saatlerde 14 gün boyunca topikal olarak uygulandı. Yara iyileşmesi takibi amacıyla hem manuel olarak yara çapları ölçüldü, hem de fotoğrafik görüntüler alındı. Akabinde alınan görüntüler teyit amaçlı AutoCAD programında da işlenerek yara çapları belirlendi. Metformin uygulanan tedavi gruplarında iyileşme istatistik olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu görüldü. Çarpıcı bulgumuz diyabetik yaraların metformin uyguşlanmasıyla kontrol grubundan dahi daha kısa sürede iyileşme göstermesiydi. Metformin ile tedavi edilen diyabetik grupta kontrollere kıyasla 3. günden itibaren yara iyileşmesinde bir hızlanma mevcutken, 7. ve 14 günlerdede yara iyileşmesinin hızlandığını gösterdik.

Yara çapları ölçüleri sonuçları değerlendirildiğinde; 14. gündeki yara çapları (mm); NK: 3,17; NT: 0,50; DK: 5,05; DT:1,37 metformin tedavisinin hem diyabetik hem de kontrol gruptaki yara çaplarını istatistik açıdan anlamlı olarak düşürdüğünü tespit ettik. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, metforminin, kontrol yaralarına kıyasla 7. günde %85'e karşı %67'lik bir yara kapanmasına ve 14. günde %97'ye karşı %85'lik bir kapanmaya neden olduğu gösterilmiştir (228). Bu çalışma bizim bulguları destekler niteliktedir.

Başka benzer bir çalışmada Qing ve ark., tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda oluşturulan yaralarda pluronik jel formülasyonunda topikal olarak uygulanan Metformin (2 mM) tedavisi kontrol grubuna kıyasla sıçan derisindeki eksizyonel yaraların iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (229). Yapılan başka bir çalışmada, lokal olarak uygulanan metforminin yaşlı ciltte yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kutanöz yara iyileşme oranları ile ilgili olarak metformin, yaşlı sıçanlarda yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırmıştır. Ayrıca, yaşlı ciltte metformin tedavisi ile epidermisin kalınlığında, kontrol gruplarına kıyasla neredeyse dört kat daha kalın olan önemli bir artış göstermiştir. Ayrıca, metformin yaşlanmış ciltteki kollajen depolarizasyonunu da arttırmıştır (223).

Metforminin yara iyileşmesindeki potansiyel etkisini gösteren az sayıda çalışma olsa veriler bizim çalışmamızın sonucunda aldığımız verilerle uyumluluk göstermektedir. Son senelerde yapılan klinik çalışmalar, anjiyogenez, inflamatuar reaksiyon, granülasyon dokusu oluşumu, ECM birikimi, yeniden epitelizasyon ve yeniden şekillenmeyi

etkileyerek iyileşme sürecini hızlandırdığını göstermiştir. Zhao ve ark. çalışmalarına göre iyileşmeyen alt ekstremite travmatik yaraları veya ülserleri taşıyan hastalarda da metforminin etkinliğini ispatlanmıştır. Özellikle, metformin, eksizyon yara modeli oluşturulan genç sıçanlarda topikal olarak uygulandığında da epidermisi, kıl foliküllerini ve kollajen birikimini iyileştirerek yara iyileşmesini hızlandırmada etkili olmuştur (223, 228, 230-233).

Metforminin inflamasyonu iyileştirme potansiyelini gösteren çalışmalara rağmen, metforminin yara iyileşmesini etkileme potansiyeli hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bagheri ve ark. nın çalışması sonucunda, metformin uygulamasının 4. günde nötrofilleri ve 7. günde makrofajları önemli ölçüde azalttığı ve yeni epidermal bazal hücre, fibroblastlar ve yeni kan damarlarını önemli ölçüde artırdığını gösterdi (234). db / db diyabetik sıçanlar la yapılan çalışmalar 14 gün sistemik metformin uygulamasını takiben artmış anjiyogeneze bağlı olarak daha hızlı yara iyileşmesi gözlenmiştir (221). STZ diyabetik sıçanlarla yaptığımız çalışmamızla tutarlı olarak, T2DM modeli oluşturulmuş sıçan yaralarında metformin ile indüklenen antiinflamatuvar etki gösterilmiştir. Bu çalışmalar, metforminin inflamatuar sitokin düzeylerini ve matriks-metaloproteinazları azalttığını, yeni kan damarı oluşumunu tetiklediğini göstermektedir (208, 235, 236).

Bu çalışmalara ek olarak diyabetik yaralarda metforminin oral yolla uygulandığındaki etkisini gösterebilmek amacıyla yapılan farklı diyabet modellerinde diyabetik kontrol gruplarına göre yara iyileşmesini hızlandırdığı ancak metforminin yara üzerine topikal olarak uygulandığında oral olarak kullanımından daha etkili sonuç verdiğini göstermektedir (221, 237).

Hipergliseminin hücre içi oksidatif strese yol açtığı (238) ve de oksidatif stres sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin (ROS) kronik veya bozulmuş akut yaralarda hücrelerin daha fazla zarar görmesine ve yara iyileşmesinin gecikmesine neden olduğu bilinmektedir (239). Son çalışmalar oksidatif stres sonucu, bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB'nin aktive olduğu bu aktivasyonun proinflamatuar sitokin seviyelerinin daha da artmasına inflamasyona ve doku hasarına yol açtığını ortaya koymuştur (240). Bu durumda NF-κB sinyallerinin kutanöz yara iyileşmesi ile direkt ilişkili olduğu söylenebilir. NF-κB, inflamasyon ve oksidatif stresin bir biyobelirtecidir ve hiperglisemiye bağlı sürekli oksidatif stres, NF-κB dahil çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve kronik inflamasyona yol açabilir (241-244).

Çalışmalar, diyabetik yaralarda NF-κB'nin kronik inflamasyonla ilişkisini ortaya koymaktadır. NF-κB transkripsiyon faktörünün uyarılmasının proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve antiinflamatuvar moleküllerin ekspresyonuna yol açtığı bilinmektedir (245, 246).

Şekil 4-6'da görüldüğü gibi diyabet olan yaralarda diyabet olmayan gruptaki yaralara kıyasla NF-κB aktivitesinin 0. 3, 7 ve 14. günde anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi. Metformin uygulanması sonucunda her iki grupta da NF-κB p65 aktivitesi kontrollere kıyasla istatistiki açıdan anlamlı derecede azaldığı görülmektedir (3. günde: $p<0,0001$ (NK/NT), $p<0,0001$ (DK/DT); 7. günde: $p<0,0001$ (DK/DT); 14. günde: $p<0,0001$ (DK/DT)). NK grubunda 3. günde, DK grubunda 3 ve 7. günde anlamlı düzeyde artan aktivite tedavi gruplarında oldukça düşüktür. Sadece günlere göre değil grup içerisinde de başlangıç gününe kıyasla her 3 günde de anlamlı düşüş dikkat çekmektedir. Dahası DT grubundaki aktivite değerleri 3. günde NK grubundan dahi daha düşük olup 7 ve 14. günlerde neredeyse spontane yara iyileşmesi ile aynı düzeyde bulunmaktadır. RELA ekspresyonu ise; Metforminle tedavi edildikten sonra hem normal hem de diyabetik gruplarda 3. günde başlangıca kıyasla herhangi bir değişiklik gözlenmezken, kontrollerinin 3. günlerine kıyasla anlamlı derecede düşük olarak yansımıştır. Öyle ki DT grubunun 3. gündeki mRNA ekspresyon düzeyi NK grubundaki 3. günün ekspresyon seviyesinden daha düşüktür. Bu da metformin ile tedavi sonucunda diyabetik tedavi grubunun sadece kontrolüne kıyasla değil spontane iyileşmeyi taklit eden normal kontrol grubundan dahi daha hızlı bir iyileşmeye neden olduğunu gösterir. Bizim çalışmamıza oldukça benzer şekilde Cam ve ark'nın yaptığı çalışmada metforminin tek başına uygulandığı ve metformin ile pioglitazone un kombine olarak verildiği tedavi gruplarında kontrole kıyasla NF-κB seviyesi, önemli ölçüde daha düşüktü. Dahası sadece metformin uygulanan grup, sadece pioglitazone uygulanan gruba göre daha iyi antiinflamatuar etkiler gösterdiğini ortaya koymuşlardır (233).

Ayrıca bahsi geçen çalışma ve bizim çalışmamıza paralel doğrultuda farklı etken maddelerin kullanıldığı son çalışmalarda da bu maddelerin metformin kullanımında olduğu gibi NF-κB inhibitörü olarak NF-κB üzerinden inflamasyonu azalttığı ve yara iyileşmesinin hızlanmasına neden olduğu gösterilmiştir (247-249).

İnflamatuar fazın bir sonraki aşaması olan proliferatif faza geçişi, iyileşme sırasında önemli bir adımdır. Yara yatağındaki proinflamatuar ve antiinflamatuar

sitokinler arasındaki denge, uygun yara iyileşmesi için çok önemlidir (174, 175, 250-252). İnflamatuar markırları olarak MMP ler bilinmektedir.

MMP'lerin ve inhibitörlerinin konsantrasyonları arasındaki dengenin hem akut hem de kronik yaralarda yara iyileşmesi için elzem olan ekstraselüler matriks yıkımı ve birikimini düzenlemede önemli bir rol oynadığı açıktır. Yara iyileşmesi sırasında farklı aşamalarda ve lokasyonlarda keratinositler, fibroblastlar ve inflamatuar hücreler gibi farklı hücre tipleri tarafından salgılanarak bu süreci oldukça koordineli ve kontrollü bir şekilde düzenler (252). Normal koşullar altında, MMP'ler deride bazal seviyede eksprese edilirken, yara iyileşme sürecinde çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, hücre-matriks etkileşimleri ve değiştirilmiş hücre-hücre teması gibi eksojen sinyallere yanıt olarak MMP'leri farklı yolaklar üzerinden geçici olarak indükleyerek transkripsiyonel olarak aktive eder (253, 254). Kontrolsüz MMP aktivitesi, doku hasarına ve fonksiyonel değişikliklere yol açtığı, aşırı üretimi nedeniyle yara iyileşmesini zarara uğrattığı gösterildi (253, 255, 256).

Yara sıvısındaki aktif MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (tip IV Kolajenaz / Jelatinaz B), yara iyileşmesinde önemli rol oynar (257, 258). Akut yaraların kenarındaki MMP-2 ekspresyonu, artan keratinosit göçü ile bağlantılıdır (259). MMP-9 ayrıca yara iyileşmesinde ve hücre sinyalizasyounda rol oynadığı bilinmektedir (260). MMP'ler ve bunların endojen inhibitörleri arasındaki aşırı aktivite veya dengesizlik, ECM'nin geniş ölçüde bozunmasına neden olur ve ayrıca daha fazla inflamatuar hücreyi bölgeye çeker ve böylece yara yatağında kronik inflamatuar yanıtı şiddetlendirir (261-263). Yara iyileşme sürecinde çok önemli bir rol oynayan MMP'nin diyabetik yarada İnflamatuvar sitokin düzeylerindeki artışa bağlı olarak yüksek olduğu, buna bağlı olarak iyileşme sürecini bozabilecek ekstraselüler matriksin (ECM) orantısız bozunmasına yol açabildiği bildirilmektedir. Artmış MMP, granülasyon dokusu oluşumu için gerekli olan fibroblastik doku oluşumunun başarısız olmasına yol açar. Kronik ve kontrolsüz inflamasyon bu homeostazı bozar ve aşırı kollajen birikimine neden olarak fibrozise neden olur (174, 264). Birkaç çalışma, artan MMP seviyelerinin (özellikle MMP-2 ve MMP-9) yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkisini doğrulamıştır (265). MMP inhibitörlerinin topikal uygulaması ise, reepitelizasyon ile gösterildiği gibi diyabetik yara iyileşmesini hızlandırır, inflamasyonu azaltır, fibroblast doku oluşumunu artırır ve gelişmiş anjiyojeneze neden olur (266, 267).

Çalışmamızda diyabet olan ve diyabet olmayan kontrol grupları ile metforminle tedavi edilen Diyabet olan ve diyabet olmayan gruptaki sıçanlardan 0., 3., 7. ve 14. günlerde alınan yara biyopsi örneklerinde RT-qPCR ile MMP2 ve MMP9 mRNA ekspresyon seviyelerini analiz ettik. MMP2 ekspresyon sonuçlarına göre; diyabet olan ve diyabet olmayan tedavi gruplarının her 3 gününde de hem grup içi başlangıç gününe göre hem de her bir günün kontrolüne kıyasla istatistiki olarak anlamlı düzeyde bir azalma olduğu ($p<0,0001$) ve ekspresyon düzeylerinin yakın seviyelerde olduğu dikkat çekmektedir. MMP9 düzeyine bakıldığında; tedavi uygulandıktan sonra diyabet olmayan grupta 3. gün seviyesi başlangıçtaki ile hemen hemen aynı iken diyabetik grupta 3. günde başlangıca kıyasla anlamlı olmasa da belirgin bir azalma görülmektedir. Çalışmamızda diyabetik ve diyabetik olmayan grupta topikal yolla metformin uygulaması sonucunda başlangıca kıyasla 7. ve 14. günlerde hem MMP2 hem de MMP9'un mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiki açıdan anlamlı bir azalma olduğu da görülmüştür. MMP'ların akut ya da kronik yara fark etmeksizin ne denli önemli bir medyatör olduğu bu bilgiler ışığında aşikardır. Dolayısıyla yara iyileşmesi süreçlerinin terapötik etkinlikleri analiz edilirken MMP seviyeleri kritik biyobelirteçlerdir. Özellikle MMP'leri inhibe etmeye yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla da paralellik göstermektedir.

MMP ve inhibitörü arasındaki bozulan denge, anormal kollajen üretimi, epitelizasyon ve granülasyon gibi diyabetteki gecikmiş yara iyileşmesindeki histopatolojik değişiklikleri açıklıyor gibi görünmektedir. siRNAlarla yapılan bir çalışmada, MMP9 ekspresyonun baskılanması sonucu diyabetik sıçanların yarasında MMP-9'un gen ekspresyonunu ve protein seviyesini etkili bir şekilde azalttığı ve buna bağlı olarak diyabetik yara iyileşmesini desteklediğine dair ortaya çıkan sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyum göstermektedir (268). Bu yaklaşıma göre MMP9 geninin susturulmasına dair terapötik yöntemler diyabetik yara iyileşmesi için umut verici görünmektedir. Aparecida Da Silva ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği ve bizim çalışmamızın sonuçlarıyla oldukça paralellik gösteren bir çalışmada diyabetik ve diyabetik olmayan yaraların iyileşme sürecinde düşük seviyeli lazer terapi uygulaması sonucunda hem diyabetik yaralarda hem de diyabetik olmayan yaralarda kontrollerine kıyasla MMP2 ve MMP9'un mRNA ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde azalttığını ve buna paralel olarak yara iyileşme hızını artırdığını göstermişlerdir (269).

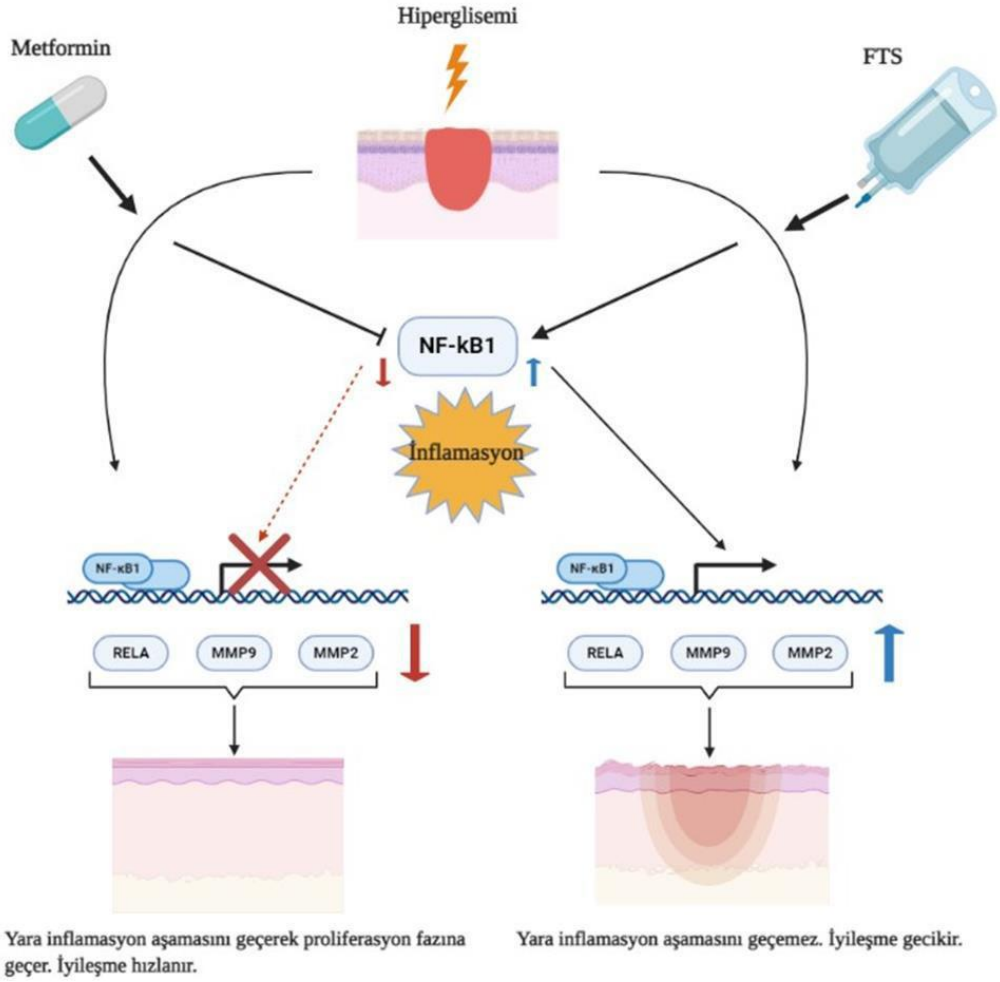
Diyabetik yaradaki düşük NF-κB seviyesi, makro ve mikrovasküler diyabetik komplikasyonların gelişimini başlatan sistemik inflamasyona ilerlemeyi önlemeye yardımcı olabilir. NF-κB aynı zamanda MMP'lerin ekspresyonunu düzenler, NF-κB'nin özellikle MMP-2 ve MMP-9'dan sorumlu hücre içi sinyal yollarının ana bileşenlerinden biri olduğu bildirilmiştir (270-272).

Topikal olarak uygulanan metforminin, hem diyabetik sıçanlar hem de diyabet olmayan sıçanlar üzerinde oluşturulan tam kat eksizyonel yara modelindeki iyileştirici etkisi NF-κB aktivitesine bağıl olarak MMP2, MMP9 ve RELA ekspresyonunun ne ölçüde değiştiğine dair sunduğumuz bu çalışma dünyadaki ilk çalışmadır. Dolayısıyla metforminin topikal uygulamasının NF-κB ve MMP'lere birlikte etki ettiğine dair çalışma olmadığından farklı maddelerin uygulandığı çalışmalar kıyaslanmıştır. 2019'da yayınlanan bir çalışmada, Sıçanlarda oluşturulan yara modeli üzerinde icariin molekülünün 4 farklı dozu denenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlar kontrol grubuna kıyasla özellikle icariin ile tedavi edilen gruplarda yaralardan alınan doku örneklerinde NF-κB protein ekspresyonunun düştüğünü ve buna ek olarak hem MMP-2 hem de MMP-9 aktivitelerini azalttığını göstermektedir. Böylelikle kontrole kıyasla icariin ile yara iyileşmesinin hızlandırılmasına sebep olduğu düşülmektedir (273).

Tip 2 diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda oluşturulan eksizyonel yara modelinde topikal yolla uygulanan mangiferin molekülünün etkileri araştırılmıştır. İmmünofloresan görüntülerinin Sonuçlarına göre MMP-2 proteininin kontrole kıyasla mangiferin ile muamele edilmiş yaranın dermisinde düşük seviyede dağıldığı gösterilmiştir. İmmünohistokimya görüntülerinin sonuçları ise NF-κB p65 proteininin kontrole kıyasla pozitif kontroldeki sıçanların ve %2'lik mangiferin ile muamele edilmiş yaraların dermisinde hiçbir dağılımı görülmezken kontrolde ve %1'lik mangiferin ile muamele edilmiş yaraların dermisinde düşük NF-κB p65 dağılımı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, MMP ekspresyonunun topikal mangiferin tedavisi sonrasında azaldığını ve bu da yara iyileşme sürecini hızlandıracağı fikrini vermektedir (274). Durmuş ve arkadaşlarının sıçanlarda oluşturulmuş kutanöz yara modelinde arjinin silikat inozitolü topikal olarak uygulayarak yara iyileşmesinin farklı aşamalarındaki etkilerini değerlendirmişlerdir. Özellikle arjinin silikat inozitol ile tedavi edilen gruplarda Hem MMP-2 hem de MMP-9 miktarının 5., 10., ve 15. günlerde giderek önemli ölçüde

azaldığı, ayrıca paralel olarak NF-κB'nin miktarında ciddi bir azalma olduğunu buna bağlı olarak yara iyileşmesinin hızlandığını ortaya koydular (275).

Bizim çalışmamızın yakın paralellikte olan bir araştırmada siringik asitin topikal uygulamasının diyabetik sıçanlarda daha hızlı yara kapanması ve yeniden epitelizasyona yardımcı olarak yara iyileşme sürecini etkili bir şekilde arttırdığını göstermektedir. Mevcut çalışmanın verilerine göre; NF-κB p65 DNA bağlanma aktivitesi 14 gün boyunca diyabetik yaralara siringik asitin uygulamasının, kontrole kıyasla NF-κB p65'in DNA bağlanma aktivitesinin azalmasına neden olduğunu gösterdi. Ek olarak qPCR analizi ile MMP-2, MMP-9 mRNA ekspresyon seviyeleri ölçülmüş; Diyabetik yaraların siringik asit ile tedavisi, kontrollerine kıyasla MMP-2 ve MMP-9'un mRNA ekspresyon seviyelerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (276). Bu bağlamda, bizim çalışmamızın sonuçları ile aynı doğrultuda; hiperglisemik sıçanlarda yara iyileşme sürecinin iyileştirilmesi için, NF-κB aktivasyonunun ve inflamatuar yanıtın baskılanmasını sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Bu durum anti-inflamatuar (NF-κB p65 aktivitesinin azaltılması) özellikleri ve matriks metaloproteinazların inhibisyonu (MMP-2 ve MMP-9 mRNA'da aşağı regülasyon) ile ilişkili olabilir (Şekil 5-1).



Şekil 5-1: Çalışmamızın sonuçlarının şekilsel olarak değerlendirilmesi

Yara iyileşmesinde her ne kadar ikisi de inflamatuvar süreçlerde rol aldığı biliniyor olsa da MMP2'nin migrasyonla, MMP9'un ise hücre sinyalizasyonuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (253, 255, 256, 260-263). NF-κB ise inflamatuvar sürecin ana biyobelirtecidir ve yara iyileşmesinde oldukça kritik bir öneme sahiptir (241, 242, 277). Çalışma sürecinde seçilmiş olan 3. gün yara iyileşmesinin inflamatuvar fazını, 7. gün proliferatif fazını ve 14. gün ise remodelizasyon fazınını temsil etmektedir. Dolayısıyla metforminin çalışılan parametrelerdeki etkinliği yara iyileşme fazlarındaki günlere göre Tablo 4-2'de gösterilmektedir. Bu bağlamda tedavi gruplarında tüm tedavi günlerindeki MMP2 seviyelerinin ciddi düşüşünün migrasyonun kontrollere kıyasla daha önce tamamlandığı ile ilişkili olabilir. MMP9 ve RELA seviyelerinde ise tedavi gruplarının 3.

gününde başlangıç ile aynı miktarda olması reepitelizasyon oluşumu için hücre sinyalizasyonunun aşırı inflamasyona neden olmadan bazal seviyede sürdüğü şeklinde yorumlanabilir. Sonuç olarak; Metforminin topikal olarak yaralar üzerine uygulanması sonucu diyabetik yaralarda çok daha etkin olmasına karşın, diyabetik olmayan yaralarda da NF-κB p65 aktivitesini inhibe ederek, MMP2, MMP9 ve RELA ekspresyon seviyelerini azaltarak yara iyileşme hızını artırdığını gösterdik.

KAYNAKLAR

1. Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., ... & Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose. (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2· 7 million participants. *The Lancet*, 378(9785), 31-40.
2. Bluestone, J. A., Herold, K., & Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464(7293), 1293-1300.
3. Todd, J. A. (2010). Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*, 32(4), 457-467.
4. Hyttinen, V., Kaprio, J., Kinnunen, L., Koskenvuo, M., & Tuomilehto, J. (2003). Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*, 52(4), 1052-1055.
5. Tao, B., Pietropaolo, M., Atkinson, M., Schatz, D., & Taylor, D. (2010). Estimating the cost of type 1 diabetes in the US: a propensity score matching method. *PloS one*, 5(7), e11501.
6. Nasr, M. B., D'Addio, F., Usuelli, V., Tezza, S., Abdi, R., & Fiorina, P. (2015). The rise, fall, and resurgence of immunotherapy in type 1 diabetes. *Pharmacological research*, 98, 31-38.
7. Solomon, T. P., Sistrun, S. N., Krishnan, R. K., Del Aguila, L. F., Marchetti, C. M., O'Carroll, S. M., ... & Kirwan, J. P. (2008). Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *Journal of applied physiology*, 104(5), 1313-1319.
8. World Health Organisation. (2017, November 15). Diabetes. Retrieved September 18, 2018, from http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes
9. Brown, D. L., Kao, W. W., & Greenhalgh, D. G. (1997). Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surgery*, 121(4), 372-380.

10. Verhofstad, M. H., & Hendriks, T. (1996). Complete prevention of impaired anastomotic healing in diabetic rats requires preoperative blood glucose control. *British journal of surgery*, 83(12), 1717-1721.
11. Jabbur, N. S., Chicani, C. F., & Kuo, I. C. (2004). Risk factors in interface epithelialization after laser in situ keratomileusis. *Journal of Refractive Surgery*, 20(4), 343-348.
12. Goren, I., Müller, E., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2006). Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-α. *The American journal of pathology*, 168(3), 765-777.
13. Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), 1736-1743.
14. Bowling, F. L., Rashid, S. T., & Boulton, A. J. (2015). Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 606.
15. Lan, C. C. E., Wu, C. S., Huang, S. M., Wu, I. H., & Chen, G. S. (2013). High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: new insights into impaired diabetic wound healing. *Diabetes*, 62(7), 2530-2538.
16. Xu, K., & Fu-Shin, X. Y. (2011). Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(6), 3301-3308.
17. Martí- Carvajal, A. J., Gluud, C., Nicola, S., Simancas- Racines, D., Reveiz, L., Oliva, P., & Cedeño-Taborda, J. (2015). Growth factors for treating diabetic foot ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).
18. Chiarelli, F., Giannini, C., & Mohn, A. (2004). Growth, growth factors and diabetes. *European Journal of Endocrinology*, 151(Suppl_3), U109-U117.
19. Howlett HCS, Bailey CJ (2007). Galegine and antidiabetic plants. In: Bailey CJ, Campbell IW, Chan JCN, Davidson JA, Howlett HCS, Ritz P (eds) Metformin—the gold standard. *Wiley*, *Chichester*, pp 3–9.
20. Muller H, Reinwein H (1927). Zur pharmakologie des Galegins. *Arch Exp Pathol Pharmakol* 125:212–228
21. Graham GG, Punt J, Arora M et al (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 50:81–98

22. Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577-1585.
23. Owen, M. R., Doran, E., & Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal*, 348(3), 607-614.
24. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., ... & Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*, 108(8), 1167-1174.
25. Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1), 21-35.
26. Ursini, F., Russo, E., Pellino, G., D'Angelo, S., Chiaravalloti, A., De Sarro, G., ... & De Giorgio, R. (2018). Metformin and autoimmunity: a "new deal" of an old drug. *Frontiers in immunology*, 9, 1236.
27. American Diabetes Association. (2018). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2018. *Diabetes care*, 41(Supplement 1), S13-S27.
28. Thomas, C. C., & Philipson, L. H. (2015). Update on diabetes classification. *Medical Clinics*, 99(1), 1-16.
29. Pihoker, C., Gilliam, L. K., Hampe, C. S., & Lernmark, Å. (2005). Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*, 54(suppl 2), S52-S61.
30. Atkinson, M. A., & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, 358(9277), 221-229.
31. Zimmet, P. Z., Tuomi, T., Mackay, I. R., Rowley, M. J., Knowles, W., Cohen, M., & Lang, D. A. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic medicine*, 11(3), 299-303.
32. Michels A, Gottlieb P. Pathogenesis of Type 1A Diabetes. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-2015 Mar 4.

33. Yau M, Maclaren NK, Sperling M. Etiology and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000- 2015 Mar 4.
34. DeFronzo, R. A. (1988). The triumvirate: β-cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, 37(6), 667-687.
35. DeFronzo, R. A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes reviews*, 5, 177-266.
36. Abdul-Ghani, M. A., & DeFronzo, R. A. (2008). Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Current diabetes reports*, 8(3), 173.
37. DeFronzo, R. A. (2009). From the triumvirate to the „ominous octet": a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical Diabetology*, 10(3), 101-128.
38. Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., ... & DeFronzo, R. A. (2002). Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), 2784-2791.
39. Cersosimo, E., & DeFronzo, R. A. (2006). Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 22(6), 423-436.
40. Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.
41. DeFronzo, R. A., & Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care*, 14(3), 173-194.
42. van Tilburg, J., Van Haeften, T. W., Pearson, P., & Wijmenga, C. (2001). Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus. *Journal of medical genetics*, 38(9), 569-578.
43. DeSisto, C. L., Kim, S. Y., & Sharma, A. J. (2014). Peer reviewed: Prevalence estimates of gestational diabetes mellitus in the United States, pregnancy risk

assessment monitoring system (prams), 2007–2010. *Preventing chronic disease*, 11.

44. Renner, S., Dobenecker, B., Blutke, A., Zoels, S., Wanke, R., Ritzmann, M., & Wolf, E. (2016). Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research. *Theriogenology*, 86(1), 406-421.
45. King, A., Bowe, J. (2016). Animal models for diabetes: understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem. Pharmacol*, 99, 1–10.
46. Arndt, T., Jörns, A., Weiss, H., Tiedge, M., Hedrich, H. J., Lenzen, S., & Wedekind, D. (2013). A variable CD3+ T-cell frequency in peripheral blood lymphocytes associated with type 1 diabetes mellitus development in the LEW. 1AR1-iddm rat. *PLoS One*, 8(5), e64305.
47. Phillips, B., Trucco, M., & Giannoukakis, N. (2011). Current state of type 1 diabetes immunotherapy: incremental advances, huge leaps, or more of the same?. *Clinical and developmental immunology*, 2011.
48. Calcutt, N. A., Cooper, M. E., Kern, T. S., & Schmidt, A. M. (2009). Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(5), 417-430.
49. Kawano, K., Mori, S., Hirashima, T., Man, Z. W., & Natori, T. (1999). Examination of the pathogenesis of diabetic nephropathy in OLETF rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(11), 1219-1228.
50. Wilcox, N.S., Rui, J., Hebrok, M., Herold, K.C. (2016). Life and death of beta cells in Type 1 diabetes: a comprehensive review. *J. Autoimmun*. 71, 51–58.
51. King, A. (2017). Animal models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. In Animal models for the study of human disease. Academic Press. 245-265.
52. Elsner, M., Tiedge, M., Guldbakke, B., Munday, R., Lenzen, S. (2002). Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia.* 45 (11), 1542–1549.
53. Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H., Newgard, C.B. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 43 (11), 1326–1333.
54. Deeds, M.C., Anderson, J.M., Armstrong, A.S., Gastineau, D.A., Hiddinga, H.J., Jahangir, A., et al. (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes:

considerations for study design in islet transplantation models. *Lab. Anim*. 45 (3), 131–140.

55. De Haro-Hernandez, R., Cabrera-Munoz, L., Mendez, J.D. (2004). Regeneration of beta-cells and neogenesis from small ducts or acinar cells promote recovery of endocrine pancreatic function in alloxan-treated rats. *Arch. Med. Res*. 35 (2), 114– 120.
56. Yin, D., Tao, J., Lee, D.D., Shen, J., Hara, M., Lopez, J., et al. (2006). Recovery of islet beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice: an indirect role for the spleen. *Diabetes*. 55 (12), 3256–3263.
57. Goyal, S.N., Reddy, N.M., Patil, K.R., Nakhate, K.T., Ojha, S., Patil, C.R., Agrawal, Y.O. (2016). Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes—a clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem. Biol. Interact*. 244, 49–63.
58. Leiter, E.H. (1982). Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 (2), 630–634.
59. Riazi, S., Maric, C., Ecelbarger, C.A. (2006). 17-beta Estradiol attenuates streptozotocin-induced diabetes and regulates the expression of renal sodium transporters. *Kidney Int.*, 69 (3), 471–480.
60. El-Hawari, A.M., Plaa, G.L. (1983). Potentiation of thioacetamide-induced hepatotoxicity in alloxan- and streptozotocin-diabetic rats. *Toxicol. Lett*., 17 (3–4), 293–300.
61. Muller, Y.D., Golshayan, D., Ehirchiou, D., Wyss, J.C., Giovannoni, L., Meier, R., et al. (2011). Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. *Diabetes*, 60 (9), 2331–2340.
62. Lukic, M.L., Stosic-Grujicic, S., Ostojic, N., Chan, W.L., Liew, F.Y. (1991). Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozocin in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 178 (3), 913–920.
63. Sandberg, J.O., Andersson, A., Eizirik, D.L., Sandler, S. (1994). Interleukin-1 receptor antagonist prevents low dose streptozotocin induced diabetes in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 202 (1), 543–548.

64. Yang, Z., Chen, M., Fialkow, L.B., Ellett, J.D., Wu, R., Nadler, J.L. (2003). The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas,* 26 (4), e99–e104.
65. Mabley, J.G., Hasko, G., Liaudet, L., Soriano, F.G., Southan, G.J., Salzman, A.L., Szabo, C. (2002). NFkappaB1 (p50)-deficient mice are not susceptible to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *J. Endocrinol*, 173 (3), 457–464.
66. Bonnevie-Nielsen, V., Steffes, M.W., Lernmark, A. (1981). A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes*, 30 (5), 424–429.
67. Marques-Vidal, P., Schmid, R., Bochud, M., Bastardot, F., Von Känel, R., Paccaud, F., ... & Vollenweider, P. (2012). Adipocytokines, hepatic and inflammatory biomarkers and incidence of type 2 diabetes. The CoLaus study. *PloS one*, 7(12), e51768.
68. Kengne, A. P., Batty, G. D., Hamer, M., Stamatakis, E., & Czernichow, S. (2012). Association of C-reactive protein with cardiovascular disease mortality according to diabetes status: pooled analyses of 25,979 participants from four UK prospective cohort studies. *Diabetes care*, 35(2), 396-403.
69. Willcox, A., Richardson, S. J., Bone, A. J., Foulis, A. K., & Morgan, N. G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*, 155(2), 173-181.
70. Goldfine, A. B., Fonseca, V., & Shoelson, S. E. (2011). Therapeutic approaches to target inflammation in type 2 diabetes. *Clinical chemistry*, 57(2), 162-167.
71. Bottazzo, G., Florin-Christensen, A., & Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *The Lancet*, 304(7892), 1279-1283.
72. Beckman, J. A., Paneni, F., Cosentino, F., & Creager, M. A. (2013). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *European heart journal*, 34(31), 2444-2452.
73. WHO. Global report on diabetes. Geneva: WHO, 2016.
74. Alam, U., Asghar, O., Azmi, S., & Malik, R. A. (2014). General aspects of diabetes mellitus. *Handbook of clinical neurology*, 126, 211-222.

75. Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 87(1), 4-14.
76. Chan, J. C., Malik, V., Jia, W., Kadowaki, T., Yajnik, C. S., Yoon, K. H., & Hu, F. B. (2009). Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Jama*, 301(20), 2129-2140.
77. Gregg, E. W., Li, Y., Wang, J., Rios Burrows, N., Ali, M. K., Rolka, D., ... & Geiss, L. (2014). Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990–2010. *New England Journal of Medicine*, 370(16), 1514-1523.
78. Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 116(7), 1793-1801.
79. Williamson, R. T. (1901). On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate. *British medical journal*, 1(2100), 760.
80. Reid, J., Macdougall, A. I., & Andrews, M. M. (1957). Aspirin and diabetes mellitus. *British medical journal*, 2(5053), 1071.
81. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. (2010). C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*, 375(9709):132-40.
82. Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., & Hennekens, C. H. (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England journal of medicine*, 336(14), 973-979.
83. Brown, D. L., Kane, C. D., Chernausek, S. D., & Greenhalgh, D. G. (1997). Differential expression and localization of insulin-like growth factors I and II in cutaneous wounds of diabetic and nondiabetic mice. *The American journal of pathology*, 151(3), 715.
84. Guo, S. A., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
85. Wieman, T. J. (1998). Clinical efficacy of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. The *American journal of surgery*, 176(2), 74S-79S.
86. Chromy, B. A., Eldridge, A., Forsberg, J. A., Brown, T. S., Kirkup, B. C., Jaing, C., ... & Luciw, P. A. (2013). Wound outcome in combat injuries is associated

with a unique set of protein biomarkers. *Journal of translational medicine*, 11(1), 1-12.

87. Gosain, A., & DiPietro, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World journal of surgery*, 28(3), 321-326.
88. Shah, J. M. Y., Omar, E., Pai, D. R., & Sood, S. (2012). Cellular events and biomarkers of wound healing. Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India, 45(2), 220.
89. Bucalo, B., Eaglstein, W. H., & Falanga, V. (1993). Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound repair and regeneration*, 1(3), 181-186.
90. Chin, G.A., Diegelmann, R.F., Schultz, G.S. Cellular and molecular regulation of wound healing. In: Falabella, A.F., Kirsner, R.S. (eds). Wound Healing. Taylor & Francis Group, 2005.
91. Yager, D. R., Zhang, L. Y., Liang, H. X., Diegelmann, R. F., & Cohen, I. K. (1996). Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(5), 743-748.
92. Snyder, R. J., Driver, V., Fife, C. E., Lantis, J., Peirce, B., Serena, T., & Weir, D. (2011). Using a diagnostic tool to identify elevated protease activity levels in chronic and stalled wounds: a consensus panel discussion. *Ostomy/wound management*, 57(12), 36-46.
93. Ladwig, G. P., Robson, M. C., Liu, R. A. N., Kuhn, M. A., Muir, D. F., & Schultz, G. S. (2002). Ratios of activated matrix metalloproteinase- 9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase- 1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound repair and regeneration*, 10(1), 26-37.
94. International consensus. The role of proteases in wound diagnostics. An expert working group review. London: Wounds International 2011.
95. Frykberg, R. G., & Banks, J. (2015). Challenges in the treatment of chronic wounds. *Advances in wound care*, 4(9), 560-582.
96. CDC. *National Diabetes Statistics Report* (Online). https://www.cdc.gov/diabetes/data/ statistics/statistics-report.html. [16 June 2019].
97. Pradhan, L., Nabzdyk, C., Andersen, N. D., LoGerfo, F. W., & Veves, A. (2009). Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, e2.

98. Blakytny, R., & Jude, E. (2006). The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic Medicine*, 23(6), 594-608.

99. Rodrigues, M., Wong, V. W., Rennert, R. C., Davis, C. R., Longaker, M. T., & Gurtner, G. C. (2015). Progenitor cell dysfunctions underlie some diabetic complications. *The American journal of pathology*, 185(10), 2607-2618.

100. Altabas, V. (2015). Diabetes, Endothelial Dysfunction, and Vascular Repair: What Should a Diabetologist Keep His Eye on? *International Journal of Endocrinology*, 2015, 848272.

101. Okonkwo, U. A., & DiPietro, L. A. (2017). Diabetes and Wound Angiogenesis.

102. Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvasular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(4), 546–51.

103. Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., ... & Gurtner, G. C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine*, 10(8), 858-864.

104. Januszyk, M., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Vial, I. N., Maan, Z. N., Rennert, R. C., ... & Gurtner, G. C. (2014). Diabetes irreversibly depletes bone marrow–derived Mesenchymal progenitor cell subpopulations. *Diabetes*, 63(9), 3047-3056.

105. Rennert, R. C., Januszyk, M., Sorkin, M., Rodrigues, M., Maan, Z. N., Duscher, D., ... & Gurtner, G. C. (2016). Microfluidic single-cell transcriptional analysis rationally identifies novel surface marker profiles to enhance cell-based therapies.

106. Rennert, R. C., Sorkin, M., Januszyk, M., Duscher, D., Kosaraju, R., Chung, M. T., ... & Gurtner, G. C. (2014). Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem cell research & therapy*, 5(3), 1-12.

107. Wetzler, C., Kämpfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(2), 245-253.

108. Khanna, S., Biswas, S., Shang, Y., Collard, E., Azad, A., Kauh, C., ... & Roy, S. (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PloS one*, 5(3), e9539.

109. Lerman, O. Z., Galiano, R. D., Armour, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2003). Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *The American journal of pathology*, 162(1), 303-312.

110. Hu, S. C. S., & Lan, C. C. E. (2016). High-glucose environment disturbs the physiologic functions of keratinocytes: focusing on diabetic wound healing.

111. Chiller, K., Selkin, B. A., Murakawa, G. J. (2001). Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 6: 170–174.

112. Edwards, C., & Marks, R. (1995). Evaluation of biomechanical properties of human skin. *Clinics in dermatology*, 13(4), 375-380.

113. Kong, H. H., & Segre, J. A. (2012). Skin microbiome: looking back to move forward. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 933-939.

114. Cefalu, W. T., Rosenstock, J., LeRoith, D., Blonde, L., & Riddle, M. C. (2016). Getting to the "heart" of the matter on diabetic cardiovascular disease:"thanks for the memory". *Diabetes care*, 39(5), 664-667.

115. Nathan, D. M., & DCCT/Edic Research Group. (2014). The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes care*, 37(1), 9-16.

116. Fife, C. E., & Carter, M. J. (2012). Wound care outcomes and associated cost among patients treated in US outpatient wound centers: data from the US wound registry. Wounds: a compendium of clinical research and practice, 24(1), 10-17.

117. Leavitt, T., Hu, M. S., Marshall, C. D., Barnes, L. A., Lorenz, H. P., & Longaker, M. T. (2016). Scarless wound healing: finding the right cells and signals. *Cell and tissue research*, 365(3), 483-493.

118. Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound repair and regeneration*, 2(3), 165-170.

119. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321.

120. Clark, R. A. (2003). Fibrin is a many splendored thing. Journal of Investigative

121. Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Advances in wound care*, 2(7), 379-388.

122. Park, J. E., & Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, 187(5), S11-S16.

123. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature immunology*, 14(10), 986.

124. Davies, L. C., Rosas, M., Jenkins, S. J., Liao, C. T., Scurr, M. J., Brombacher, F., ... & Taylor, P. R. (2013). Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nature communications*, 4(1), 1-10.

125. Ansell, D. M., & Izeta, A. (2015). Pericytes in wound healing: friend or foe?.

126. Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises.

127. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., ... & Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302), 964-966.

128. Kosaraju, R., Rennert, R. C., Maan, Z. N., Duscher, D., Barrera, J., Whittam, A. J., ... & Gurtner, G. C. (2016). Adipose-derived stem cell-seeded hydrogels increase endogenous progenitor cell recruitment and neovascularization in wounds. *Tissue Engineering Part A*, 22(3-4), 295-305.

129. Tepper, O. M., Capla, J. M., Galiano, R. D., Ceradini, D. J., Callaghan, M. J., Kleinman, M. E., & Gurtner, G. C. (2005). Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow–derived cells. *Blood*, 105(3), 1068-1077.

130. Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81.

131. Werner, S., Krieg, T., & Smola, H. (2007). Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), 998-1008.

132. Donati, G., Rognoni, E., Hiratsuka, T., Liakath-Ali, K., Hoste, E., Kar, G., ... & Watt, F. M. (2017). Wounding induces dedifferentiation of epidermal Gata6+ cells and acquisition of stem cell properties. *Nature cell biology*, 19(6), 603-613.

133. Blanpain, C., Horsley, V., & Fuchs, E. (2007). Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*, 128(3), 445-458.

134. Fuchs, E. (2009). Finding one's niche in the skin. *Cell stem cell*, 4(6), 499-502.

135. Jung, K., Covington, S., Sen, C. K., Januszyk, M., Kirsner, R. S., Gurtner, G. C., & Shah, N. H. (2016). Rapid identification of slow healing wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 24(1), 181-188.

136. Galiano, R. D., Michaels, V, J., Dobryansky, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing.

137. Pastar, I., Wong, L. L., Egger, A. N., & Tomic- Canic, M. (2018). Descriptive vs mechanistic scientific approach to study wound healing and its inhibition: Is there a value of translational research involving human subjects?. *Experimental dermatology*, 27(5), 551-562.

138. George Broughton, I. I., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 12S-34S.

139. Buchanan, E.P., Lorenz, H.P. Wound healing, including fetal skin healing. In: Bahman, G., Eriksson, E., Persing, J.A. (eds). et al. Plastic Surgery: Indications and Practice. *Elsevier*, 2009.

140. Pool, J. G. (1977). Normal hemostatic mechanisms: a review. *The American journal of medical technology*, 43(8), 776-780.

141. Rumbaut, R. E., & Thiagarajan, P. (2010). Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. Synthesis Lectures on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function, 2(1), 1-75.

142. Tennent, G. A., Brennan, S. O., Stangou, A. J., O'Grady, J., Hawkins, P. N., & Pepys, M. B. (2007). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*, 109(5), 1971-1974.

143. Kaplan, K. L., Broekman, M. J., Chernoff, A., Lesznik, G. R., & Drillings, M. (1979). Platelet α-GranuIe Proteins: Studies on Release and Subcellular Localization. *Blood*, 53(4), 604-618.

144. Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*, 359(9), 938-949.

145. Lansdown, A. B. (2002). Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound repair and regeneration*, 10(5), 271-285.

146. van der Vliet, A., & Janssen- Heininger, Y. M. (2014). Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger?. *Journal of cellular biochemistry*, 115(3), 427-435.

147. Oskeritzian, C. A. (2012). Mast cells and wound healing. *Advances in wound care*, 1(1), 23-28.

148. Gillitzer, R., & Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing.

149. Dovi, J. V., Szpaderska, A. M., & DiPietro, L. A. (2004). Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury?. *Thrombosis and haemostasis*, 92(08), 275-280.

150. Glat PM., Longaker M.T. (1997). Wound Healing. Grabb and Smith's Plastic Surgery Ed. Aston S.J., Beasley R.W., Thorne C.H.M. Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, New York 5th. Ed.4-12.

151. Parslow, T. G., Bainton, D. F. (1997). Innate immunity. Stites, D. B., Terr, A. I., and Parslow, T. G. Medical Immunology. Stamford, Appelton&Lange. 9(2), 25-42.

152. Segel, G. B., Halterman, M. W., & Lichtman, M. A. (2011). The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of leukocyte biology*, 89(3), 359-372.

153. He, L., & Marneros, A. G. (2013). Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. *The American journal of pathology*, 182(6), 2407-2417.

154. Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13.

155. Monaco, J. L., & Lawrence, W. T. (2003). Acute wound healing an overview. *Clinics in plastic surgery*, 30(1), 1-12.

156. Barbul A. (1990). İmmun aspects of wound repair. Clin. Plas. Surg. 17:433-439.

157. Weller, K., Foitzik, K., Paus, R., Syska, W., Maurer, M., Weller, K., ... & Maurer, M. (2006). Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *The FASEB journal*, 20(13), 2366-2368.

158. Egozi, E. I., Ferreira, A. M., Burns, A. L., Gamelli, R. L., & Dipietro, L. A. (2003). Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 11(1), 46-54.

159. Yanez, D. A., Lacher, R. K., Vidyarthi, A., & Colegio, O. R. (2017). The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469(3-4), 455-463.

160. Goren, I., Allmann, N., Yogev, N., Schürmann, C., Linke, A., Holdener, M., ... & Frank, S. (2009). A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *The American journal of pathology*, 175(1), 132-147.

161. Mirza, R., DiPietro, L. A., & Koh, T. J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *The American journal of pathology*, 175(6), 2454-2462.

162. Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., ... & Eming, S. A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3964-3977.

163. Zhu, Z., Ding, J., Ma, Z., Iwashina, T., & Tredget, E. E. (2016). Systemic depletion of macrophages in the subacute phase of wound healing reduces hypertrophic scar formation. *Wound Repair and Regeneration*, 24(4), 644-656.

164. Hu, M. S., Walmsley, G. G., Barnes, L. A., Weiskopf, K., Rennert, R. C., Duscher, D., ... & Longaker, M. T. (2017). Delivery of monocyte lineage cells in a biomimetic scaffold enhances tissue repair. *JCI insight*, 2(19).

165. Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation.

166. Maruyama, K., Asai, J., Ii, M., Thorne, T., Losordo, D. W., & D'Amore, P. A. (2007). Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *The American journal of pathology*, 170(4), 1178-1191.

167. Kaya, E. Yara İyilesmesi Travma. Ertekin, C, Taviloglu, K., Güloglu, R., ve Kurtoglu, M., (2005). İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 1, 488-501.

168. Singhal, P. K., Sassi, S., Lan, L., Au, P., Halvorsen, S. C., Fukumura, D., ... & Seed, B. (2016). Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(1), 122-127.

169. Fries, K. M., Blieden, T., Looney, R. J., Sempowski, G. D., Silvera, M. R., Willis, R. A., & Phipps, R. P. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clinical immunology and immunopathology*, 72(3), 283-292.

170. Plikus, M. V., Guerrero-Juarez, C. F., Ito, M., Li, Y. R., Dedhia, P. H., Zheng, Y., ... & Cotsarelis, G. (2017). Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*, 355(6326), 748-752.

171. Schmidt, B. A., & Horsley, V. (2013). Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development*, 140(7), 1517-1527.

172. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(5), 349-363.

173. Lobmann, R., Schultz, G., & Lehnert, H. (2005). Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes care*, 28(2), 461-471.

174. Caley, M. P., Martins, V. L., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and wound healing. *Advances in wound care*, 4(4), 225-234.

175. Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827-839.

176. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 301-311.

177. Gill, S. E., Pape, M. C., Khokha, R., Watson, A. J., & Leco, K. J. (2003). A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. *Developmental biology*, 261(2), 313-323.

178. Telgenhoff D, Shroot B. (2005). Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. *Cell Death Differ*, 12: 695–698.

179. Hinz B, Gabbiani G. (2003). Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost*, 90: 993–1002.

180. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 146:56–66.

181. Utz, E. R., Elster, E. A., Tadaki, D. K., Gage, F., Perdue, P. W., Forsberg, J. A., ... & Brown, T. S. (2010). Metalloproteinase expression is associated with traumatic wound failure. *Journal of Surgical Research*, 159(2), 633-639.

182. Snyder, R. J., Driver, V., Fife, C. E., Lantis, J., Peirce, B., Serena, T., & Weir, D. (2011). Using a diagnostic tool to identify elevated protease activity levels in chronic and stalled wounds: a consensus panel discussion. *Ostomy/wound management*, 57(12), 36-46.

183. Tanret, G. (1914). An alkaloid extracted from Galega officinalis. *Compt. rend*, 158, 1182-1184.

184. Watanabe, C. K. (1918). Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. *Journal of Biological Chemistry*, 36(3), 531-546.

185. Sterne, J. (1957). Innovations in antidiabetics. nn dimethylamine guanyl guanidine [NNDG]. *Maroc Med*, 36, 1295-1296.

186. He, L., Wondisford, F. E. (2015). Metformin action: concentrations matter. *Cell Metab*. 21, 159–162.

187. Evans, J.M. et al. (2005) Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304–1305.

188. Landman, G.W. et al. (2010). Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care*, 33, 322–326

189. Cabreiro, F. et al. (2013). Metformin retards aging in C. Elegans by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell*, 153, 228–239

190. Martin-Montalvo, A. et al. (2013). Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat. Commun*. 4, 2192.

191. Bannister, C.A. et al. (2014). Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or

sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes Obes. Metab*. 16, 1165–1173.

192. Anabtawi, A., & Miles, J. M. (2016). Metformin: nonglycemic effects and potential novel indications. *Endocrine Practice*, 22(8), 999-1007.

193. Chen, L. L., Liao, Y. F., Zeng, T. S., Yu, F., Li, H. Q., & Feng, Y. (2010). Effects of metformin plus gliclazide compared with metformin alone on circulating endothelial progenitor cell in type 2 diabetic patients. *Endocrine*, 38(2), 266-275.

194. Lin, J. T., Chen, H. M., Chiu, C. H., & Liang, Y. J. (2014). AMP-activated protein kinase activators in diabetic ulcers: from animal studies to Phase II drugs under investigation. *Expert opinion on investigational drugs*, 23(9), 1253-1265.

195. Saisho, Y. (2015). Metformin and inflammation: its potential beyond glucose-lowering effect. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders), 15(3), 196-205.

196. Salt, I. P., & Palmer, T. M. (2012). Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. *Expert opinion on investigational drugs*, 21(8), 1155-1167.

197. Gejjalagere Honnappa, C., & Mazhuvancherry Kesavan, U. (2016). A concise review on advances in development of small molecule anti-inflammatory therapeutics emphasising AMPK: An emerging target. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 29(4), 562-571.

198. Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 774-785.

199. Speirs, C., Williams, J. J., Riches, K., Salt, I. P., & Palmer, T. M. (2018). Linking energy sensing to suppression of JAK-STAT signalling: a potential route for repurposing AMPK activators?. *Pharmacological research*, 128, 88-100.

200. Antonioli, L., Colucci, R., Pellegrini, C., Giustarini, G., Sacco, D., Tirotta, E., ... & Fornai, M. (2016). The AMPK enzyme-complex: from the regulation of cellular energy homeostasis to a possible new molecular target in the management of chronic inflammatory disorders. *Expert opinion on therapeutic targets*, 20(2), 179-191.

201. Vasamsetti, S. B., Karnewar, S., Kanugula, A. K., Thatipalli, A. R., Kumar, J. M., & Kotamraju, S. (2015). Metformin inhibits monocyte-to-macrophage

differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. Diabetes, 64(6), 2028-2041.

202. Cameron AR, Morrison VL, Levin D et al. (2016). Antiinflammatory effects of metformin irrespective of diabetes status. *Circ Res,* 119:652–665.

203. Arai, M., Uchiba, M., Komura, H., Mizuochi, Y., Harada, N., & Okajima, K. (2010). Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334(1), 206-213.

204. Hattori, Y. et al. (2006). Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*, 47, 1183–1188.

205. Salminen, A., Hyttinen, J. M., & Kaarniranta, K. (2011). AMP-activated protein kinase inhibits NF-κB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *Journal of molecular medicine*, 89(7), 667-676.

206. Akbar, D. H. (2003). Effect of metformin and sulfonylurea on C-reactive protein level in well-controlled type 2 diabetics with metabolic syndrome. *Endocrine*, 20(3), 215-218.

207. Wang, T., Zhao, J., Zhang, J., Mei, J., Shao, M., Pan, Y., ... & Jia, W. (2018). Heparan sulfate inhibits inflammation and improves wound healing by downregulating the NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in diabetic rats. *Journal of diabetes*, 10(7), 556-563.

208. Salazar, J. J., Ennis, W. J., & Koh, T. J. (2016). Diabetes medications: impact on inflammation and wound healing. *Journal of Diabetes and its Complications*, 30(4), 746-752.

209. Metwally, M. M., Ebraheim, L. L., & Galal, A. A. (2018). Potential therapeutic role of melatonin on STZ-induced diabetic central neuropathy: a biochemical, histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta histochemica,* 120(8), 828-836.

210. Elsharawy, M. A., Naim, M., & Greish, S. (2012). Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 14(3), 288-293.

211. Stuart K, Paderi J, et al. (2011). Collagen-binding peptidoglycans inhibit MMP mediated collagen degradation and reduce dermal scarring. *Plos One*, 6(7), e22139.

212. Sumitra M, Manikandan P, Suguna L. (2005). Efficacy of Butea monosperma on dermal wound healing in rats. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*, 37, 566-573.

213. Tombulturk, F. K., Soydas, T., Sarac, E. Y., Tuncdemir, M., Coskunpinar, E., Polat, E., ... &Kanigur-Sultuybek, G. (2019). Regulation of MMP 2 and MMP 9 expressions modulated by AP-1 (c-jun) in wound healing: improving role of Lucilia sericata in diabetic rats. *Acta diabetologica*, 56(2), 177-186.

214. Weir, G. C., Bonner-Weir, S., (2004). Five stages of evolving beta-cell dys-function during progression to diabetes. *Diabetes*, 53(3), 16-21.

215. Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., ... & Makaroff, L. E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice*, 128, 40-50.

216. Krzyszczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., & Berthiaume, F. (2018). The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in physiology*, 9, 419.

217. Reinke, J.M., Sorg, H., (2012). Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* 49, 35-43.

218. Serra, M. B., Barroso, W. A., Silva, N. N. D., Silva, S. D. N., Borges, A. C. R., Abreu, I. C., & Borges, M. O. D. R. (2017). From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. *International Journal of Inflammation*, 2017: 1-17.

219. Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.

220. Duraisamy, Y., Slevin, M., Smith, N., Bailey, J., Zweit, J., Smith, C., ... & Gaffney, J. (2001). Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes. *Angiogenesis*, 4(4), 277-288.

221. Han, X., Tao, Y., Deng, Y., Yu, J., Sun, Y., & Jiang, G. (2017). Metformin accelerates wound healing in type 2 diabetic db/db mice. *Molecular medicine reports*, 16(6), 8691-8698.

222. Schuiveling, M., Vazirpanah, N., Radstake, T. R., Zimmermann, M., & Broen, J. C. (2018). Metformin, a new era for an old drug in the treatment of immune mediated disease?. *Current drug targets*, 19(8), 945-959.

223. Zhao, P., Sui, B. D., Liu, N., Lv, Y. J., Zheng, C. X., Lu, Y. B., ... & Jin, Y. (2017). Anti- aging pharmacology in cutaneous wound healing: effects of metformin, resveratrol, and rapamycin by local application. *Aging cell*, 16(5), 1083-1093.

224. El-Bahy, A. A. Z., Aboulmagd, Y. M., & Zaki, M. (2018). Diabetex: a novel approach for diabetic wound healing. *Life sciences*, 207, 332-339.

225. Jing, Y., Wu, F., Li, D., Yang, L., Li, Q., & Li, R. (2018). Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. *Molecular and cellular endocrinology*, 461, 256-264.

226. Yang, Q., Yuan, H., Chen, M., Qu, J., Wang, H., Yu, B., ... & Ren, W. (2018). Metformin ameliorates the progression of atherosclerosis via suppressing macrophage infiltration and inflammatory responses in rabbits. *Life sciences*, 198, 56-64.

227. Schiefelbein, D., Seitz, O., Goren, I., Dißmann, J. P., Schmidt, H., Bachmann, M., ... & Frank, S. (2008). Keratinocyte-derived vascular endothelial growth factor biosynthesis represents a pleiotropic side effect of peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist troglitazone but not rosiglitazone and involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase: implications for diabetes-impaired skin repair. *Molecular pharmacology*, 74(4), 952-963.

228. Lee, C. H., Hsieh, M. J., Chang, S. H., Lin, Y. H., Liu, S. J., Lin, T. Y., ... & Juang, J. H. (2014). Enhancement of diabetic wound repair using biodegradable nanofibrous metformin-eluting membranes: in vitro and in vivo. *ACS applied materials & interfaces*, *6*(6), 3979-3986.

229. Qing, L., Fu, J., Wu, P., Zhou, Z., Yu, F., & Tang, J. (2019). Metformin induces the M2 macrophage polarization to accelerate the wound healing via regulating AMPK/mTOR/NLRP3 inflammasome singling pathway. *American journal of translational research*, *11*(2), 655.

230. Tawfeek, H. M., Abou-Taleb, D. A., Badary, D. M., Ibrahim, M., & Abdellatif, A. A. (2020). Pharmaceutical, clinical, and immunohistochemical studies of metformin hydrochloride topical hydrogel for wound healing application. *Archives of dermatological research*, 312(2), 113-121.

231. El Gazaerly, H., Elbardisey, D. M., Eltokhy, H. M., & Teaama, D. (2013). Effect of transforming growth factor Beta 1 on wound healing in induced diabetic rats.

232. Chogan, F., Mirmajidi, T., Rezayan, A. H., Sharifi, A. M., Ghahary, A., Nourmohammadi, J., ... & Rahaie, M. (2020). Design, fabrication, and optimization of a dual function three-layer scaffold for controlled release of metformin hydrochloride to alleviate fibrosis and accelerate wound healing. *Acta Biomaterialia*, *113*, 144-163

233. Cam, M. E., Ertas, B., Alenezi, H., Hazar-Yavuz, A. N., Cesur, S., Ozcan, G. S., ... & Edirisinghe, M. (2020). Accelerated diabetic wound healing by topical application of combination oral antidiabetic agents-loaded nanofibrous scaffolds: An in vitro and in vivo evaluation study. *Materials Science and Engineering: C*, *119*, 111586.

234. Bagheri, M., Mostafavinia, A., Abdollahifar, M. A., Amini, A., Ghoreishi, S. K., Chien, S., ... & Bayat, M. (2020). Combined effects of metformin and photobiomodulation improve the proliferation phase of wound healing in type 2 diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *123*, 109776.

235. Zhang, S., Xu, H., Yu, X., Wu, Y. I., & Sui, D. (2017). Metformin ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of low-dose streptozotocin-induced diabetes.

236. Hasanvand, A., Amini-Khoei, H., Hadian, M. R., Abdollahi, A., Tavangar, S. M., Dehpour, A. R., ... & Mehr, S. E. (2016). Anti-inflammatory effect of AMPK signaling pathway in rat model of diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*, 24(5), 207-219.

237. Ochoa-Gonzalez, F., Cervantes-Villagrana, A. R., Fernandez-Ruiz, J. C., Nava-Ramirez, H. S., Hernandez-Correa, A. C., Enciso-Moreno, J. A., & Castañeda-Delgado, J. E. (2016). Metformin induces cell cycle arrest, reduced proliferation, wound healing impairment in vivo and is associated to clinical outcomes in diabetic foot ulcer patients. *PloS one*, *11*(3), e0150900.

238. Schiekofer, S., Andrassy, M., Chen, J., Rudofsky, G., Schneider, J., Wendt, T., ... & Bierhaus, A. (2003). Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor κB in PBMCs. *Diabetes*, 52(3), 621-633.

239. Schäfer, M., Werner, S. (2008). Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol. Res*., 58, 165–171.

240. Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med*. 49, 1603–1616.

241. Chen, J., Chen, Y., Chen, Y., Yang, Z., You, B., Ruan, Y. C., & Peng, Y. (2016). Epidermal CFTR suppresses MAPK/NF-κB to promote cutaneous wound healing.

242. Heo, S. C., Jeon, E. S., Lee, I. H., Kim, H. S., Kim, M. B., & Kim, J. H. (2011). Tumor necrosis factor-α-activated human adipose tissue–derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms.

243. Mirza, R. E., Fang, M. M., Ennis, W. J., & Koh, T. J. (2013). Blocking interleukin-1β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 62(7), 2579-2587.

244. Eming, S. A., Werner, S., Bugnon, P., Wickenhauser, C., Siewe, L., Utermöhlen, O., ... & Roers, A. (2007). Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. *The American journal of pathology*, 170(1), 188-202.

245. Xu, F., Zhang, C., & Graves, D. T. (2013). Abnormal cell responses and role of TNF-in impaired diabetic wound healing. *BioMed research international*, 2013, 754802-754802.

246. Sallam, A. A. W., El-Sharawy, A. (2012). Role of interleukin-6 (IL-6) and indicators of inflammation in the pathogenesis of diabetic foot ulcers. *AJBAS*, 6, 430-435.

247. Beserra, F. P., Vieira, A. J., Gushiken, L. F. S., de Souza, E. O., Hussni, M. F., Hussni, C. A., ... & Pellizzon, C. H. (2019). Lupeol, a dietary Triterpene, enhances wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats with modulatory effects on inflammation, oxidative Stress, and angiogenesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2019*.

248. Park, Y. R., Sultan, M. T., Park, H. J., Lee, J. M., Ju, H. W., Lee, O. J., ... & Park, C. H. (2018). NF-κB signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta biomaterialia*, *67*, 183-195.

249. Ma, Q., Wu, Y. S., Shen, J. Y., Yang, Z. B., Shen, H. X., Yao, M., & Yu, C. H. (2018). Walnut oil promotes healing of wounds and skin defects in rats via regulating the NF-kB pathway. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *73*(12), 721-724.

250. Raffetto, J. D., Khalil, R. A., (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem. Pharmacol*. 75, 346–359.

251. Landén, N.X., Li, D., Ståhle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci*. 73, 3861–3885.

252. Martins, V. L., Caley, M., & O'Toole, E. A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and tissue research*, 351(2), 255-268.

253. Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., & Lehnert, H. (2002). Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*, 45(7), 1011-1016.

254. Davis, G. E., & Saunders, W. B. (2006, September). Molecular balance of capillary tube formation versus regression in wound repair: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. In Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 11(1), 44-56.

255. Yang, L., Zheng, Z., Zhou, Q., Bai, X., Fan, L., Yang, C., ... & Hu, D. (2017). miR-155 promotes cutaneous wound healing through enhanced keratinocytes migration by MMP-2. *Journal of molecular histology*, 48(2), 147-155.

256. Reiss, M. J., Han, Y. P., Garcia, E., Goldberg, M., Yu, H., & Garner, W. L. (2010). Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model.

257. Salo, T., Mäkelä, M., Kylmäniemi, M., Autio-Harmainen, H., & Larjava, H. (1994). Expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 during early human wound healing. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 70(2), 176-182.

258. Gill, S. E., & Parks, W. C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(6-7), 1334-1347.

259. Moses, M. A., Marikovsky, M., Harper, J. W., Vogt, P., Eriksson, E., Klagsbrun, M., & Langer, R. (1996). Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. *Journal of cellular biochemistry*, 60(3), 379-386.

260. Betsuyaku, T., Fukuda, Y., Parks, W. C., Shipley, J. M., & Senior, R. M. (2000). Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin.

261. Schultz, G. S., Sibbald, R. G., Falanga, V., Ayello, E. A., Dowsett, C., Harding, K., ... & Vanscheidt, W. (2003). Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound repair and regeneration*, 11, S1-S28.

262. Basu, R., Lee, J., Morton, J. S., Takawale, A., Fan, D., Kandalam, V., ... & Kassiri, Z. (2013). TIMP3 is the primary TIMP to regulate agonist-induced vascular remodelling and hypertension. *Cardiovascular research*, 98(3), 360-371.

263. McCarty, S. M., & Percival, S. L. (2013). Proteases and delayed wound healing.

264. Higashiyama, R., Nakao, S., Shibusawa, Y., Ishikawa, O., Moro, T., Mikami, K., ... & Inagaki, Y. (2011). Differential contribution of dermal resident and bone marrow–derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(2), 529-536.

265. Serra, R., Buffone, G., Falcone, D., Molinari, V., Scaramuzzino, M., Gallelli, L., & de Franciscis, S. (2013). Chronic venous leg ulcers are associated with high levels of metalloproteinases- 9 and neutrophil gelatinase- associated lipocalin.

266. Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in wound care*, 4(3), 119-136.

267. Ayuk, S. M., Abrahamse, H., & Houreld, N. N. (2016). The role of matrix metalloproteinases in diabetic wound healing in relation to photobiomodulation. *Journal of diabetes research*, 2016, 1–9.

268. Li, N., Yang, L., Pan, C., Saw, P. E., Ren, M., Lan, B., ... & Yan, L. (2020). Naturally-occurring bacterial cellulose-hyperbranched cationic polysaccharide derivative/MMP-9 siRNA composite dressing for wound healing enhancement in diabetic rats. *Acta Biomaterialia*, *102*, 298-314.

269. Aparecida Da Silva, A., Leal-Junior, E. C. P., Alves, A. C. A., Rambo, C. S., Dos Santos, S. A., Vieira, R. P., & De Carvalho, P. D. T. C. (2013). Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, *15*(4), 210-216.

270. Negrean, M., Stirban, A., Stratmann, B., Gawlowski, T., Horstmann, T., Götting, C., ... & Tschoepe, D. (2007). Effects of low-and high-advanced glycation endproduct meals on macro-and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition*, 85(5), 1236-1243.

271. Na, J., Lee, K., Na, W., Shin, J. Y., Lee, M. J., Yune, T. Y., ... & Ju, B. G. (2016). Histone H3K27 demethylase JMJD3 in cooperation with NF-κB regulates keratinocyte wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(4), 847-858.

272. Lee, K. W., Lee, C. Y. (2002). Vitamins, diet, and cancer prevention. *Am J Clin Nutr*., 75(6), 1122-3.

273. Singh, W. R., Devi, H. S., Kumawat, S., Sadam, A., Appukuttan, A. V., Patel, M. R., ... & Kumar, D. (2019). Angiogenic and MMPs modulatory effects of icariin improved cutaneous wound healing in rats. *European Journal of Pharmacology*, *858*, 172466.

274. Lwin, O. M., Giribabu, N., Kilari, E. K., & Salleh, N. (2020). Topical administration of mangiferin promotes healing of the wound of streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic male rats. *Journal of Dermatological Treatment*, 1-10.

275. Durmus, A. S., Tuzcu, M., Ozdemir, O., Orhan, C., Sahin, N., Ozercan, I. H., ... & Sahin, K. (2017). Arginine silicate inositol complex accelerates cutaneous wound healing. *Biological trace element research*, *177*(1), 122-131.

276. Ren, J., Yang, M., Xu, F., Chen, J., & Ma, S. (2019). Acceleration of wound healing activity with syringic acid in streptozotocin induced diabetic rats. *Life sciences*, *233*, 116728.

277. Ghasemi, A., Khalifi, S., & Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), 408-420.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METFORMİNİN DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%6	%5	%2	%2
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Yüzüncü Yıl Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	nobel.gen.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
8	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1