

T.C.
ZONGULDAK KARAEELMAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

DİYABETİK FARELERDE MAKROFAJ DEPLESYONUNUN
YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ

Dr. Cem PAYASLI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Mübin HOŞNUTER

ZONGULDAK

2008

T.C.
ZONGULDAK KARAEMLAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

DİYABETİK FARELERDE MAKROFAJ DEPLESYONUNUN
YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ

Dr. Cem PAYASLI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Mübin HOŞNUTER

ZONGULDAK
2008

TEZ ONAY TUTANAĞI

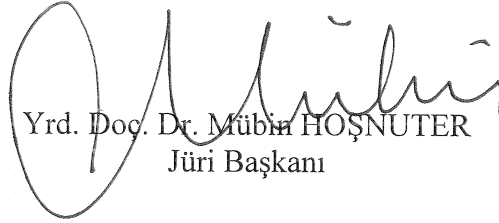
Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi

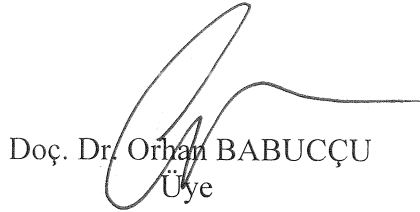
Tez Başlığı : Diyabetik Farelerde Makrofaj Deplesyonunun Yara İyileşmesine Etkisi

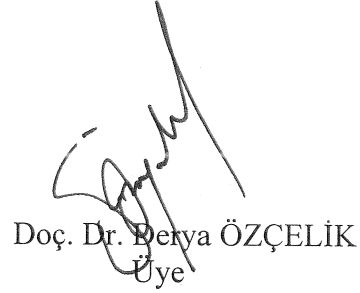
Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Cem PAYASLI

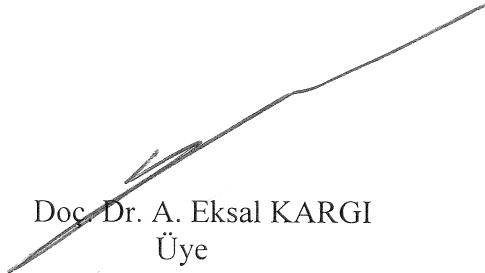
Tez Savunma Tarihi: 03/11/2008

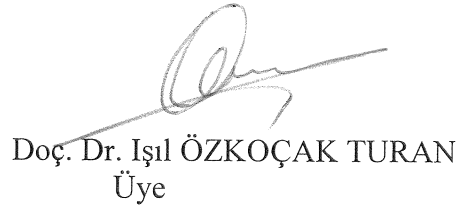
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mübin HOŞNUTER


Yrd. Doç. Dr. Mübin HOŞNUTER
Jüri Başkanı

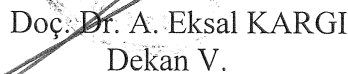

Doç. Dr. Orhan BABUCCU
Üye


Doç. Dr. Berya ÖZÇELİK
Üye


Doç. Dr. A. Eksal KARGI
Üye


Doç. Dr. Işıl ÖZKOÇAK TURAN
Üye

UYGUNDUR
03/11/2008


Doç. Dr. A. Eksal KARGI
Dekan V.

TEŞEKKÜR

Yıllar süren ihtisasım boyunca bilgi ve birikimini esirgemeyen, kendi alanımızda yetişmemize büyük katkı sağlayan değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Mübin Hoşnutter'e teşekkür ederim.

Eğitim sürecimde bana olan katkılarından dolayı anabilim dalı başkanımız, değerli hocam Doç.Dr.Orhan Babuçcu'ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışma şansına eriştiğim ve her zaman bize desteğini hissettiğim değerli hocam Doç.Dr. Eksal Kargı' ya teşekkür ederim.

Tüm zorluklara birlikte göğüs gerdigimiz, kader arkadaşlarım Dr.Ahmet Işıkdemir, Dr.Bülent Tekerekoğlu, Dr.Adnan Arslan, Dr. Ayhan Buz ve Dr. Sinan Kaya'ya ayrıca Dr. Yunus Baydilek'e teşekkür ederim.

Çalışmamın histopatolojik incelemelerinde kıymetli katkıları ile çalışmanın sağlıklı seyrine olumlu katkıları bulunan Dr.Burak Bahadır'ın, Dr.Gürdal Kertiş'in şahsında patoloji anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Şükrü Oğuz Özdamar başta olmak üzere tüm patoloji birimi çalışanlarına teşekkür ederim.

Fizyolojik değerlendirmelerde değerli katkılarını esirgemeyen Dr. Seyit Ankaralı'ya teşekkür ederim.

İstatistiksel analizlerde katkılarını sunan, yardımlarıyla çalışmanın önünü açan Dr.Handan Ankaralı'ya teşekkür ederim.

Bu günleri bana yaşatan ve hep arkamda itici güç olan, kalbimde büyük yer kaplayan anne ve babama, desteklerini hiç esirgemeyen kardeşlerime, Ufuk, İpek, Kemal Tuna, Nehir ve Derin'e teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan itibaren bana her konuda ivme kazandıran, dünyamı güzelleştiren, uzmanlık sürecinde sonsuz destek veren, motivasyon kaynağım, canım eşim Burcu Payaslı' ya teşekkür ederim.

ÖZET

Payaslı, C., Diyabetik farelerde makrofaj deplesyonunun yara iyileşmesine etkisizonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi tezi. Zonguldak 2008.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, yara iyileşmesi için “olmazsa olmaz” denilen makrofajların, diyabetik yaralarda -tam tersine- iyileşmeyi olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir.

Bu tezin amacı, makrofajların diyabetik yaradan uzaklaştırılmasının iyileşmeye katkıda bulunabileceği hipotezinden yola çıkarak diyabetik farelerde makrofaj deplesyonunun yara iyileşmesine etkisini incelemektir.

A) Cerrahi işlem: Balb/c cinsi farelerin sırt bölgesinde kare şeklinde (1x1cm) tam kat deri defekti oluşturuldu. Kaudalde 3 cm’lik insizyon yapıldı ve suture edildi.

B) Medikasyon: Makrofaj deplesyonu yapılacak farelere lipozomal klodronat (0,2ml/fare) kuyruk veninden preoperatif 2.gün ve postoperatif 4.gün enjekte edildi.

Diyabetize edilecek farelere ise 18 saat aç bırakıldıktan sonra 150mg/kg dozda, serum fizyolojikte (%0.9NaCl) çözülmüş alloksan periton içi yolla uygulandı. Bu uygulama 48 saatte bir toplam üç kez tekrarlandı.

C) Deney grupları:

GRUP 1 (kontrol grubu,n=16): Cerrahi yaralar oluşturularak serum fizyolojik dışında hiçbir medikasyon uygulanmadı.

GRUP 2 (diyabet grubu,n=20): Alloksan ile diyabetize edildi.

GRUP 3 (makrofaj deplesyon grubu,n=16): Makrofaj deplesyonu için lipozomal klodronat solusyonu kuyruk veninden enjekte edildi.

GRUP 4 (makrofaj deplesyonu+diyabet grubu,n=20): Alloksan ile diyabetize edilen farelere Lipozomal klodronat enjekte edilerek makrofaj deplesyonu uygulandı.

D) Ölçme-değerlendirme: Tüm gruplarda farklı günlerde yara alanı ölçümü (3.,5.,7.gün), yara kopma kuvveti ölçümü (5.,7. gün) ve histopatolojik değerlendirme(1.,3.,5.,7.gün) yapıldı.

Tüm günlerdeki ölçüm ve değerlendirmeler göz önüne alındığında beklendiği üzere en iyi yara iyileşmesi grup 1’de görüldü. En kötü yara iyileşmesi grup 2 ve grup 3’te görüldü. Makrofaj deplesyonu yapılmış diyabetik grup (grup 4) hipotezimize uygun olarak kontrol grubundan sonra en iyi iyileşen grup olarak tespit edildi.

Sonuç olarak; diyabetik yaralarda fonksiyonları bozulmuş olan makrofajların yara bölgesinden uzaklaştırılmasının, kronikleşme sürecini kırarak yara iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: diyabetes mellitus, makrofaj deplesyonu, lipozomal klodronat, yara iyileşmesi, diyabetik yara.

ABSTRACT

Payaslı, C., The effect of macrophage depletion on wound healing at diabetic mice. Karaelmas University School of Medicine, Thesis of Dept. of plastic, reconstructive and aesthetic surgery

As is known, macrophages are essential in wound healing process. However, in recent years, studies in the literature shows that macrophages in diabetic conditions are pernicious for wound healing process. As a hypothesis, we have thought that banising the macrophages from the wound site can improve wound healing process in diabetic conditions and the aim of this study is investigating the effect of macrophage depletion in wound healing process at diabetic mice.

A) Surgical procedure: In a square shaped (1x1 cm) full-layer skin defect formed on the back of mice. Caudally, 3 cm incision have been made and then sutured on the back of mice.

B) Medication: For macrophage depletion, liposomal clodronate (0,2ml/mouse) was injected from the tail vein of mice at preoperative 2. day and postoperative 4. day. For devoloping diabetes mellitus, 150mg/kg alloxan was injected intraperitoneally 3 times with 48 hours intervals.

C) Groups:

GROUP 1 (control group, n=16): Surgical wounds have been formed. No any medication applied except 0.9% sodium chloride.

GROUP 2 (diabetic group, n=20): Mice have been formed as diabetic by alloxan injection.

GROUP 3 (macrophage depletion group, n=16): Macrophage depletion have been formed by injection of liposomal clodronate from tail vein.

GROUP 4 (macrophage depletion + diabetic group, n=20): Mice have been formed as diabetic by alloxan injection and macrophage depletion have been formed by injection of liposomal clodronate from tail vein.

D) Measurment-Evaluation: Wound area measurements have been made in all groups at day 3, 5 and 7. wound tensile strength measurments have been made in all groups at day 5 and 7. Histopathological evaluation have made at day 1, 3, 5, 7.

When the all results have been evaluated, the best wound healing have been developed in group 1. The worst wound healing have been developed in group 2 and group 3. After the control group, the best wound healing have been developed in group 4 and this condition is compatible with our hypothesis.

As a result, we are thinking that banising the macrophages from the wound site can improve wound healing by breaking chronic inflammation process.

Key Words: diabetes mellitus, macrophage depletion, liposomal clodronate, wouhd healing, diabetic wound.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET.....	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER	x
TABLolar.....	xii
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. Yara İyileşmesi Fizyolojisi	2
1.1.1. Hemostaz	2
1.1.2. İnflamasyon.....	3
1.1.3. Büyüme Faktörleri (growth faktörler)	4
1.1.4. Epitelizasyon	5
1.1.5. Proliferasyon Fazı Granülasyon Dokusunun Oluşması.....	6
1.1.6. Matürasyon Fazı	7
1.1.7. Matriks Formasyonu.....	7
1.1.8. Yara Kontraksiyonu.....	7
1.1.9. Yara İyileşmesindeki Faktörler	7
1.1.9.1 Lokal Faktörler	8
1.1.9.2. Sistemik Faktörler.....	8
1.2. Makrofajlar	9
1.2.1. Mononükleer Fagositik Sistem Hücrelerinin Gelişimi	9
1.2.2. Makrofajların Aktivasyonu ve Fonksiyonları	10
1.2.2.1. Fagositoz	10
1.2.2.2. Salgılama.....	11
1.2.2.3. Antijen Sunma	12
1.3. Diyabetes Mellitus ve Yara İyileşmesi.....	12
1.3.1. Enzimatik Olmayan Glikozilasyon	13
1.3.2. Poliol Yolu	15

1.3.3. Protein Kinaz C Aktivasyonu	15
1.3.4. Artmış Hekzosamin Yolağı Aktivitesi	15
1.3.5. Mitokondrial Elektron Taşıma Zincirinde Süperoksid Anyonu Oluşumu	16
1.3.6. Diyabetik Nöropati	17
1.3.7. Nöropatik Eklem (Charcot ayağı)	18
1.3.8. İmmünolojik Bozukluklar	18
1.3.8.1. Diyabetin Makrofajlar Üzerine Etkileri	19
1.3.9. Vasküler Bozukluklar	20
1.3.10. Diyabette yara iyileşmesini etkileyen diğer risk faktörleri	21
1.4. Deneysel Diyabet Modeli	21
1.4.1. Alloksan Monohidrat	21
1.4.2. Alloksan İle Diyabet Oluşturma Tekniği	21
1.5. Lipozomal Klodronat (Bisfosfonat) İle Makrofaj Deplesyonu	22
2. MATERYAL METOD	24
2.1. Denekler	24
2.2. Cerrahi Teknik	26
2.2.1. Preoperatif Hazırlık	26
2.2.2. Cerrahi araç-gereç	26
2.3. Deney	27
2.3.1. Defekt Oluşturma ve İnsizyon Oluşturma	27
2.3.2. Diyabetes Mellitus Oluşturma İşlemi	28
2.3.3. Makrofaj Deplesyonunun Sağlanması	29
2.3.3.1. Lipozomal Klodronatın Hazırlanışı	29
2.3.3.2. Lipozomal Klodronatın Uygulanışı	29
2.4. Patolojik Değerlendirme	31
2.5. Yüzey Alanı Ölçümü	31
2.6. Yara Kopma Kuvveti Ölçümü	32
2.7. İstatiksel Değerlendirme Metodları	33
3. BULGULAR	34
3.1. Yüzey Alan Bulguları	34
3.2. Gruplardaki Yara Kopma Kuvvetleri	37
3.3. Histopatolojik Değerlendirme	39

3.4. İstatistiksel Bulgular.....	43
3.4.1. Yara Boyutu Ölçümlerinin İstatistiksel Bulguları.....	43
3.4.1.1. Postoperatif 3. günde	44
3.4.1.2. Postoperatif 5. günde	44
3.4.1.3. Postoperatif 7. günde	45
3.4.2. Yara Kopma Kuvveti (YKK) Ölçümlerinin İstatistiksel Bulguları	45
3.4.2.1. PO 5. günde	46
3.4.2.2. PO 7. günde	46
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	47
KAYNAKLAR.....	56
EK 1: ETİK KURUL ONAYI.....	63

KISALTMALAR

AGE:	İleri Glikozilasyon Ürünleri
CFU-M:	Monosit Colony Forming Unit
CSF:	Koloni stimüle edici faktör
DA:	Diyabetik Ayak
DAG:	Diaçilgliserol
DM:	Diyabetes Mellitus
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
GF:	Büyüme Faktörleri
GFAT:	Glutamin:Fruktoz-6-Fosfat Amidotransferaz
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IFN:	İnterferon
IL:	İnterlökin
İNOS:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LT:	Lökotrien
MMP:	Matriksmettaloproteinaz
NF-κB:	Nükleer Faktör Kappa-B
NO:	Nitrik Oksit
PBS:	Fosfat-Buffered Salin
PKC:	Protein Kinaz C
PDGF:	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PF:	Platelet faktör
PO:	Postoperatif
RAGE:	İleri Glikozilasyon Ürünü Reseptörü
ROS:	Reaktif Oksijen Türevleri
SOD:	Süperoksid Dismutaz
TGF:	Farklılaştırıcı Büyüme Faktörü
TNF-α:	Tümör Nekroze Edici Faktör- Alfa
UCP-1:	Proton Gradientini Azaltan Kenetlenmeyi Bozucu Protein
VEGF:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
YKK:	Yara Kopma Kuvveti

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1: Yara iyileşmesini etkileyen lokal faktörler.	8
Şekil 2: non enzimatik glukozilasyon şeması (32).	13
Şekil 3: (a) Solda kültüre edilmiş sağlıklı makrofajların, (b) ise kültüre edilmiş diyabetik makrofajların elektron mikroskobu ile görünümü mevcuttur. Şekillerde görüldüğü üzere diyabetten etkilenmiş makrofajların fenotipi bozulmuştur (53).	20
Şekil 4: Defekt ve suture edilmiş insizyonun görünümü.	28
Şekil 5: Lipozomal klodronat ve ambalajı.	29
Şekil 6: PO 3. günde Grup 1 (a) ile makrofaj deplesyonu yapılmış Grup 3 'den (b) alınmış dalak örneklerinin makrofaja yönelik immunohistokimyasal boya ile boyandıktan sonra karşılaştırılmasında makrofaj deplesyonunun sağlandığı görülmektedir (makrofajlar izole olarak kendisine özgü CD68 boyası ile boyanmıştır, makrofajlar okla işaretlendiği üzere şekillerde kahverengi olarak görülmektedir).	30
Şekil 7: PO 3. günde Grup 2 (a) ile makrofaj deplesyonu yapılmış Grup 4'den (b) alınmış karaciğer örneklerinin makrofaja yönelik immunohistokimyasal boya ile boyandıktan sonra karşılaştırılmasında makrofaj deplesyonunun oluşturulduğu görülmektedir. (makrofajlar izole olarak kendisine özgü CD68 boyası ile boyanmıştır, makrofajlar şekillerde okla gösterildiği üzere kahverengi olarak görülmektedir).	30
Şekil 8: AutoCAD ile yara yüzey alanı ölçümü	32
Şekil 9: gerilmenin tepe noktasını ölçen program.	33
Şekil 10: Grup 1'deki bir deneğin PO 7.gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.	34
Şekil 11: Grup 2'deki bir deneğin PO 7.gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.	35
Şekil 12: Grup 3'deki bir deneğin PO 7. gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.	36
Şekil 13: Grup 4'deki bir deneğin PO 7.gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.	37
Şekil 14: Grup 1 PO1. günde resmin sol tarafında sağlam epidermisin izlendiği yara yerinde yüzeyde nötrofillerden zengin eksüda karakterinde inflamasyon ile birlikte ülserasyon izlenmektedir (H&E, X100).	39
Şekil 15: Grup 1'deki deneğin PO5. gündeki preperatı grup 1 PO1. gün ile karşılaştırıldığında inflamatuvar reaksiyonu oluşturan hücrelere nötrofillerin yanı sıra çok sayıda lenfositlerin ve makrofajların katıldığı, fibroblastik aktivite ile kısmen damar proliferasyonunun (okla gösterilmiştir) bu inflamasyona eşlik ettiği dikkati çekmektedir (H&E,X200).	40

- Şekil 16: Grup 1’de PO7. günde grubunda inflamatuvar reaksiyonun daha çok mononükleer hücrelerden oluştuğu, azalan inflamatuvar zeminde fibroblastik aktivite ile damar proliferasyonunun (okla gösterilmiştir) daha belirgin hale geldiği görülmektedir (H&E, X200).41
- Şekil 17: PO7. günde grup 4’te grup 1 (K)’ya oranla mononükleer hücrelerden daha zengin inflamatuvar reaksiyon (okla gösterilmiştir) ile daha sınırlı düzeyde fibroblast aktivite ile damar proliferasyonu izlenmektedir (H&E, X200)..42
- Şekil 18: PO7. günde grup 2’de ülser alanında yoğun nötrofil içeren inflamatuvar hücre reaksiyonu (okla gösterilmiştir) izlenmektedir (H&E, X400).....42
- Şekil 19: PO7. günde grup 3’te fibrinoid nekroz ile yoğun nötrofilik inflamatuvar reaksiyon (okla gösterilmiştir) ve sınırlı fibroblastik aktivite izlenmektedir(H&E, X200).....43

TABLÖLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: inflamatuvar sitokinler ve fonksiyonları	6
Tablo 2: çalışmada kullanılan cerrahi araç gereçler	27
Tablo 3: Grupların günlere göre yara boyutu ölçüm sonuçları	44
Tablo 4: Grupların günlere göre ortalama yara kopma kuvvetleri ve standart deviasyonları verilmiştir (gr/cm ²).....	46

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM), hem akut hem kronik komplikasyonlara neden olabilen bir hastalıktır. Diyabetik ayak (DA) kronik komplikasyonlardandır. Periferik nöropati ve periferik damar hastalığına enfeksiyonun da eklenmesi ile oluşan, ekstremitayı tehdit edebilen multifaktöryel bir problemdir. Diabetik ayak, doku ve organ kayıplarına yol açabilmesi, enfeksiyon gelişimi gibi problemlerden dolayı hastalar için uzun ve zorlu bir süreç, hasta yakınları ve toplum içinse sosyal ve ekonomik yükü ağır olan zorlu bir antitedir ⁽¹⁻³⁾.

Alt ekstremita amputasyonu yapılmış olan hastaların yaklaşık %40 - %60'ının etyolojisinde DM vardır ^(4,5). Bu amputasyonların %85'inden fazlasında enfeksiyon ve gangrenin eşlik ettiği derin ayak yarası mevcuttur ⁽⁴⁾. Diyabetik yara, uzun ve zorlu tedavi sürecine neden olur. Amputasyonlardan sonra uzun hastanede yatma süresi, rehabilitasyon, ev bakımı ve iş gücü kaybı gibi nedenlerle masrafı ve zorluğu oldukça fazla olan bir problemdir. Multidisipliner bir yaklaşımla, Diyabetik yara oluşmadan alınabilecek koruyucu önlemler, amputasyonları ve morbiditeyi %50'ye yakın azaltmakta ve ciddi para kaybını önlemektedir ⁽⁴⁾.

Nörojenik, vasküler, infeksiyöz, immünolojik komplikasyonlar gibi bir çok neden birbiri ardına etki yaparak diyabetik yara oluşturmaktadır. DA etyolojisinde multi-sistem etkilenmeler olduğundan bu konuda yapılan çalışmalarda multi-disipliner olmaktadır ⁽⁶⁾.

Yara iyileşmesi oldukça kompleks ve her basamağı tehdiye açık ve halen günümüzde tam olarak açıklanamayan bir süreçtir ⁽⁷⁾.

Çalışmamızda diyabetik yarayı kronikleşmeye götüren sürece hücresel düzeyde müdahale etmeyi planladık. DM hastalığında etkilenen hücrelerden biri olan makrofajların diyabetik yaralara etkilerini araştırmak amaçlı makrofaj depleksiyonunun diyabetik yaralara etkisini fareler üzerinde yaptığımız bu çalışmada inceledik.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Yara İyileşmesi Fizyolojisi

Yara iyileşmesi esas olarak 4 ana olay çevresinde gerçekleşir. Olaylar ardışık bir düzen içinde değildir ve birbiri içerisinde sınırları tam olarak ayırt edilemez.

Bu evreler:

1. Hemostaz
2. İnflamasyon
3. Proliferasyon
4. Yeniden modellenme (remodeling, maturasyon) şeklinde sıralanmaktadır ⁽⁷⁾.

1.1.1. Hemostaz

Travmalar damar yaralanmasına neden olur. Damar bütünlüğünün bozulduğu bu durumlarda, kan kaybını durdurmaya yönelik mekanizmalar devreye girmektedir. Bu mekanizmalar:

- Vazokonstriksiyon
- Platelet tıkaçı
- Pıhtılaşma
- Fibröz organizasyon şeklinde sıralanabilir ⁽⁸⁾.

Endotel altında yerleşmiş bazal membrandaki trombojenik uyarılar, trombositlerdeki yüzey reseptörleri uyarak platelet adezyon ve agregasyonunu uyarır. Bu sırada plateletlerden salınan bazı sitokinler ve refleks arklar yoluyla vazokonstriksiyona neden olur. Bu faktörler aynı zamanda pıhtılaşma zincirini de aktive eder. Platelet tıkaç çevresinde fibrin tıkaç oluşur ve pıhtı denen kalıcı tıkaç ortaya çıkar. Pıhtı aynı zamanda erken yara matriksi olarak işlev görmektedir.

Plateletlerin içindeki alfa granüllerden; fibrinojen, albumin, fibronektin, immunglobulin G, faktör V ve faktör VIII' in dışında platelet kökenli büyüme faktörü (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), farklılaştırıcı büyüme faktörü alfa ve beta (Transforming Growth Factor α/β , TGF α/β), fibroblast büyüme faktörü-2 (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2) ve platelet kökenli epidermal büyüme

faktörleri (Epidermal Growth Factors, EGFs) ve endotel hücresi büyüme faktörleri salınmaktadır ⁽⁹⁾.

Plateletlerin içindeki yoğun cisimler içerisinde ise serotonin, adenosin trifosfat (ATP), adenosin difosfat (ADP), kalsiyum gibi pıhtılaşma zincirinde önemli roller alan faktörler bulunmaktadır ⁽⁹⁾.

Doku zedelenmesi esnasında bozulan damar bütünlüğü, pıhtılaşma mekanizmalarını aktive etmektedir. Yolaklar sonucunda trombin aktive olduktan sonra fibrinojeni fibrine dönüştürerek fibrin tıkaç oluşturur ⁽⁸⁾. Fibrin tıkaç sabitleştirildikten sonra vitronektin ile kaplanır. Vitronektin aracılığıyla fibronektin erken matrikste kendine yer bulur. Fibronektin üzerinde pek çok hücre için yapışma noktaları mevcuttur ve bu madde aynı zamanda matriks sitokinler için toplayıcı görevi görmektedir ⁽⁹⁾.

1.1.2. İnflamasyon

Yaralanmanın erken dönemlerinde gelişen vazokonstriksiyon 10–15 dakika içinde son bulur ve vazodilatasyon gelişir. Sonrasında yara çevresinde kırmızı-kızıl hale şeklinde bir görünüm oluşur. Plateletlerden salınan faktörler, pıhtılaşma zincirinde açığa çıkan bradikinin gibi ürünler ve doku hasarı sonucu gelişen nekrozdan kaynaklanan faktörler yaralanma çevresinde endotel geçirgenliğini değiştirerek damar dışı alana plazma geçişine ve ödeme neden olmaktadır. Vazodilatasyon endotel veya mast hücresi kaynaklı lökotrienler, prostaglandinler ve özellikle histamin kaynaklıdır. Trombin, kinin ve C3a/C5a da geçirgenliği arttıran ajanlardandır ^(9,10).

İnflamasyon evresinin ilk hücresi nötrofillerdir. Bunlar yaralanmadan sonraki ilk 24 saat içinde yara yerinde görülür. Bu hücreler hücre ve matriks yıkım ürünlerini, bakterileri ve yabancı cisimleri uzaklaştırmaya çalışır. Bu sırada ortama nötrofil granüllerinden jelatinaz, elastaz, kollajenaz gibi proteazlarla birlikte reaktif oksijen radikalleri de salınmakta ve bu da nekrozu debride etmektedir ⁽¹¹⁾.

Kollajen, elastin yıkım ürünleri, kompleman, TGF- β , tümör nekroz faktörü alfa (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), interlökin-1 (Interleukin-1, IL-1), PDGF,

lökotrien B4 (Leukotriene B4, LTB4) ve platelet faktörü IV (Platelet Factor IV, PF-IV) lökositler için kuvvetli kemoatraktandır ⁽⁹⁾.

Damar dışı alana çıkan monositler, T-lenfositlerden salınan IL-2 ve interferon α (Interferon α , IFN- α) ile aktive olur ve ortama TGF- β salarlar. TGF- β kuvvetli kemotaktik etki ile akut inflamasyonun tipik hücrelerinin toplanmasına katkıda bulunur ⁽⁹⁾.

Makrofajlar 48. saatten sonra yara yerinde görülmeye başlar ve genellikle dolaşımdaki monositlerden kaynak alırlar. Makrofajlar inflamasyonun en önemli hücrelerindendir. Nötrofillerin o döneme kadar gerçekleştirdiği görevleri daha kuvvetli şekilde devam ettirirler ve eş zamanlı olarak da saldıkları veya salınmasını düzenledikleri birçok büyüme faktörü ile yara iyileşmesinde “Orkestra şefi” görevi yapar. Makrofaj kaynaklı sitokinler yeniden damarlanma, fibroblast göçü ve çoğalması, kollajen üretimi ve yara kontraksiyonu ile ilişkilidir. TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü- I (Insulin-like growth factor-I/IGF-I), PDGF, FGF-2, TNF- α , IL-1 makrofajın salgıladığı önemli sitokinlerdendir ⁽¹²⁾.

Bağışıklık sisteminin önemli bir diğer hücresi de T-lenfositlerdir. CD 4+ T lenfositleri bağışıklık sisteminin ne tür bir cevap vereceğini planlayan ve düzenleyen hücre tipidir. IL-1, IL-2, TNF- α , EGF ve TGF- β gibi pek çok sitokinin ya kaynağı ya da salınımını kontrol eden en önemli üyedir ^(9,11). (Tablo 1)

1.1.3. Büyüme Faktörleri (growth faktörler)

Spesifik bir hedef doku yada hedef hücreye sahip, bunlar üzerinde büyüme ve proliferasyonu tetikleyici yada uyarıcı şekilde etki gösteren protein yapıda endokrin sistem molekülleri genel olarak büyüme faktörleri olarak adlandırılır. Gelismenin olduğu büyüme ve farklılaşma evrelerinde çok sayıda faktörün etkili olduğu, hücrenin büyüme ve çoğalmasında ise büyüme faktörlerinin temel rolü oynadığı gözlenmiştir ⁽¹³⁾.

Yaraya lokal olarak uygulanabilen büyüme faktörleri granülasyon dokusunun formasyonunu uyarak ve epitelizeasyonu hızlandırarak yara iyileşmesini her fazda olumlu yönde etkilerler. Esasında yara iyileşmesinin tüm fazları büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Büyüme faktörleri yara iyileşmesinin inflamasyon

fazında yaraya gelen ve yara iyileşmesi için hayati önem taşıyan makrofajların uyarısı ile üretilirler. Büyüme faktörleri hücre proliferasyonu, kemotaksis, haptotaksis (hücrelerin belirli bir yöne doğru motilitesi), angiogenezis, protein ekspresyonu ve enzim üretimini artırırlar ⁽¹⁴⁾. Tablo 1’de inflamatuvar sitokinlerin özeti verilmiştir ⁽¹⁵⁾.

1.1.4. Epitelizasyon

Kısmi kalınlıklı yaralarda epitel hücreleri, yara ve kenarlardan karşılıklı hareketle epitelizasyonu sağlarlar. Aynı şekilde kıl folikülleri, yağ ve ter bezlerinde de epitelium proliferasyonu başlayabilir. Tam kalınlıklı yaralarda epitel hücreleri kolaylıkla yara kenarlarından karşılıklı göç işlemini gerçekleştirirken alttaki dermal oluşumlarda iyileşme, çok daha uzun süre alabilir. Epitel iyileşmesi sağlıklı kişilerde 24-48 saatte tamamlanabilir. Daha sonra epidermisin bazal tabakası aşırı mitotik aktivite göstererek kalınlaşır. Ardından keratin üreterek normal deri rengini alır. Keratin üreten ve epitelium hücrelerinin öncüsü olan keratinositler epitelizasyonun yanında koloni stimulan faktör (CSF), IL-1,3,6 ve büyüme faktörü de salgılayarak yara iyileşmesine ek katkıda bulunurlar. Bu tip iyileşmede epitel altındaki bağ dokusu pek oluşmaz ve yara, minimal skar dokusu ile iyileşir ⁽¹⁴⁾.

1.1.5. Proliferasyon Fazı Granülasyon Dokusunun Oluşması

Bu faz yaralanmadan sonraki dördüncü günde başlar ve yaklaşık 21. günde tamamlanır. Bu fazın esas hücreleri fibroblastlardır. Bu dönemin diğer bir önemli hücresi de endotel hücreleridir. Fibroblastlar çevredeki perivasküler bağ dokusundan yaraya doğru hücum ederler, endotel hücreleri ise yara etrafındaki sağlam venüllerden proliferasyon olurlar ve yeni kapillerlerin yapımını sağlarlar. Önceden salgılanmış olan büyüme faktörleri ve sitokinler bu hücrelerin aktivasyonundan sorumludurlar. Her ne kadar yara iyileşmesinin 1. gününde yarada az miktarda fibroblast bulunsun da esas olarak 4. günde aktive olurlar ve yüksek miktarda fibronektin ve daha sonra da kollajen, elastin ve glukozaminoglikan üretirler. Kontraksiyon yara iyileşmesinin normal bir safhası olup 8-10. günlerde gelişmeye başlar ve yaranın kapanmasına yardımcı olur.

Yaralanma sonucu yara alanında oluşan rölatif hipoksemi, neovaskülarizasyon için bir uyarandır. Fibroblast proliferasyonu ile birlikte anjiogenezis, granülasyon dokusunun ana bulgularıdır. Yara çevresindeki kapillerlerden başlayan neovaskülarizasyon 6-7. günlerde tamamlanır. Yanık yaralarında ise bu dönem daha uzundur ⁽¹⁴⁾.

Tablo 1: inflamatuvar sitokinler ve fonksiyonları ⁽¹⁵⁾.

SİTOKİN	SALGILAYAN HÜCRE	FONKSİYON
EGF (epitelyal growth faktör)	Platelet, makrofaj	Keratinositler ve fibroblastlar için mitojenik etki yapar ve keratinosit migrasyonunu sağlar.
FGF (fibroblast growth faktör)	Makrofaj, mast hücresi, T lenfosit, endotelial hücreler	Fibroblastlar ve keratinositler için mitojenik ve kemotaktiktir ve anjiyogenezi stimüle eder.
IFN (interferon) (α , β , γ)	Lenfositler, fibroblastlar	Makrofajları aktive eder, fibroblast proliferasyonunu inhibe eder.
IL'ler (interlökinler) (1,2,6 ve 8)	Makrofajlar, mast hücreleri, keratinositler, lenfositler	IL-1: ateşi ve adrenokortikotropik hormon salınımını indükler; TNF- α , IFN- γ salınımını artırır, granüosit ve endotelial hücreleri aktive eder ve hematopoezi stimüle eder. IL-2: makrofajları, T h'leri, natural killer(NK) h'leri aktive eder, B h'lerin diferensasyonunu aktive eder. Aktive B ve T h'lerinin proliferasyonunu stimüle eder, ateşi indükler. IL-6: ateşi indükler ve akut-faz reaktanlarının karaciğerden salınımını artırır. IL-8: nötrofil aderansını, kemotaksisi ve granül salınımını artırır.
KGF (keratinosit growth faktör)	Fibroblastlar	Keratinosit migrasyonunu, diferensasyonunu ve proliferasyonunu stimüle eder.
PDGF (platelet-derived growth faktör)	Plateletler, makrofajlar, endotelial h'ler	Kemotaktiktir, fibroblastlar için mitojeniktir, anjiyogenezi ve yara kontraksiyonunu stimüle eder.
TGF- α (transforme edici growth faktör-alfa)	Makrofajlar, T- lenfositler, keratinositler	Keratinositler ve fibroblastlar için mitojeniktir ve keratinosit migrasyonunu stimüle eder.
TGF- β (transforme edici growth faktör-beta)	Plateletler, T-lenfositler, makrofajlar, endotelial h'ler, keratinositler	Hücelere kemotaktiktir ve anjiyogenezele fibroplaziyi stimüle eder.
Tromboxan A2	Zedelemiş yara h'leri	Potent vazokonstriktördür.
TNF (Tümör nekrozu faktörü)	Makrofaj, mast h'ler, T- lenfositler	Makrofajları aktive eder, fibroblastlar için mitojeniktir, anjiyogenezi stimüle eder.

1.1.6. Matürasyon Fazı

Bu dönemde esas olan kollajen sentezidir. Kollajen sentezi ilk olarak 7-10. gün başlar, 14-21'inci günlerde maksimaldir. Maturasyon fazı proliferasyon fazının son aşamasından, skar formasyonunun tamamlandığı zamana kadar devam eder (yaklaşık 21. gün – 6. ay). Bu fazda sentezlenen kollajenin yanında, oluşan kollajenin yıkımı da söz konusudur. Yara iyileşmesinin en önemli safhasıdır. Çünkü bu fazın hızı, kalitesi ve oluşan matriksin miktarı skar oluşumunu direkt olarak etkilemektedir. ⁽¹⁴⁾.

1.1.7. Matriks Formasyonu

Matriks yara içindeki hücre dışı yapıdır ve çoğunlukla protein yapısında moleküllerden oluşur. Tip 1 ve tip 3 kollajen, intersitisyel kollajen olup cildin major kollajenidir ve gerilme kuvvetinin oluşmasından sorumludur. Yaranın matürasyonu için kollajen sentezinin yanında, yıkım ve bu iki olay arasındaki denge de önemlidir ⁽¹⁴⁾.

1.1.8. Yara Kontraksiyonu

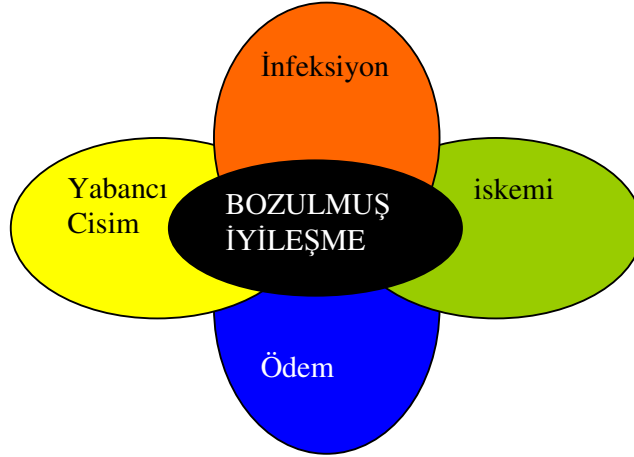
Yara uçlarının birbirine yaklaşmasıdır. Sonunda skar dokusunun küçülmesi sağlanır. Miyofibroblastların yara kontraksiyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir ⁽¹⁴⁾.

1.1.9. Yara İyileşmesindeki Faktörler

Yara iyileşmesi oldukça kompleks bir süreç olduğundan bir çok basamaktan herhangi birinin sekteye uğraması sonucu bozulmaya açıktır. Fizyolojik cevapları ve hücresel fonksiyonları etkileyen lokal yada sistemik faktörler yara iyileşmesini sekteye uğratabilir.

1.1.9.1 Lokal Faktörler

Birçok lokal faktör yara iyileşmesini sekteye uğratabilir. İskemik dokular, yara içindeki yabancı cisim, infeksiyon, kontaminasyon gibi durumlar yara iyileşmesini sekteye uğratabilir. Aşağıdaki Venn diagramında bu engelleyici lokal faktörlere dikkat çekilmiştir ⁽¹⁵⁾ (Şekil 1).



Şekil 1: Yara iyileşmesini etkileyen lokal faktörler.

1.1.9.2. Sistemik Faktörler

Birçok sistemik faktör yara iyileşmesini çeşitli basamaklarda sekteye uğratabilir. Bu faktörler aşağıda sıralanmaktadır:

- Obezite
- Kardiyovasküler hastalık (doku perfüzyonunu bozacak derecede) ve venöz yetmezlik,
- İlerlemiş solunumsal hastalık,
- Hipotiroidizm,
- İleri yaş,
- Majör travma ve yanıklar,
- Hipotermi,
- Sepsis,
- Gut hastalığı,

- Karaciğer ve böbrek yetmezlikleri,
- Beslenme bozukluğu ve sigara,
- Kortikosteroidler,
- İyinize radyasyon ve kemoterapi ve uzak malignite,
- Diyabetes Mellitus ⁽¹⁵⁾.

1.2. Makrofajlar

1.2.1. Mononükleer Fagositik Sistem Hücrelerinin Gelişimi

İmmün sistemin ikinci büyük hücre grubu Mononükleer fagositik sistemdir ve primer fonksiyonu fagositoz olan hücrelerden oluşur. Mononükleer fagositik sistemin tüm hücreleri kemik iliği kökenlidir. Kemik iliğinde bulunan öncü hücrelerden (pluripotent hücreler) multipotent miyeloid hücreler oluşur. Bu hücrelerden ise monosit colony forming unit (CFU-M) hücreleri meydana gelir. CFU-M hücreleri monoblastlara dönüşür. Monoblastların bölünmesiyle promonositler oluşur. Promonositlerde azurofil granüller oluşmaya başlar. Kemik iliğindeki promonositlerin yaklaşık yarısı hızlı bir şekilde bölünürler, küçülerek çoğalma yeteneğini kaybeden monositlere farklılaşırlar. Geri kalanlar ise ihtiyaç duyulduğunda kullanılabilecek bir depo oluştururlar. Kök hücreden monosite dönüşme süresi yaklaşık 55 saattir. Monositler kemik iliğinde 1-2 gün kaldıktan sonra kana geçerler ⁽¹⁶⁾. Monositlerin çapları yaklaşık 12-20 µm'dir. Büyük, eksantrik yerleşimli çekirdeğe sahiptir ve bir veya iki çekirdeğe sahip olabilirler. Çekirdekleri merkezden içe doğru çöküntü oluşturarak böbrek şeklinde bir görünüm verir. Sitoplazması bazofilik boyanır ve sitoplazmada ince azurofilik granüller (lizozom) bulunur. Monosit sitoplazmasının iyi gelişmiş Golgi kompleksi, ribozom ve poliribozomlar, çok sayıda küçük mitokondri içerir. Az sayıda granüllü endoplazmik retikulum içerirler. Hücrenin periferinde mikrotübül ve mikrofilamanlar, pinositik veziküller bulunur. Hücre yüzeyinde mikrovilluslar vardır. Dolaşımda sadece birkaç gün kalırlar. Bağ dokuya geçerek makrofajları oluştururlar ^(16,17). Monosit membranındaki ve endotel hücre membranlarındaki hücre adhezyon molekülleri monositlerin endotele tutunarak yavaşlamasını, durmasını ve endotel

hücreleri arasından diapedezini sağlar. Bu göç sırasında ilk adım intravasküler monositin, endotel hücresinin yüzeyine yapışmasıdır. Daha sonra vasküler yüzeyde yavaşça yuvarlanarak sürüklenir ve daha kuvvetle yapışarak durur. Bu olayda çeşitli adhezyon molekülleri görev alır. Selektinler, β -1 integrin ve endotel yüzeyindeki “Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1” (VCAM-1) ilk yapışmada görev alırlar. Monositin durmasını sağlayan adhezyon molekülleri ise lökosit β -2- integrin ile “İnter-Selüler Adezyon Molekülü 1-2” (ICAM-1-2)’ dir. Monosit daha sonra endotel hücreleri arasından, hem monosit hem endotel yüzeyinde bulunan “Platelet endotelyal adezyon molekülü-1” (PECAM-1) aracılığı ile geçer. Endotel bazal membranını da geçtikten sonra monositler makrofajlara dönüşecekleri bölgelere göç ederler^(18,19).

1.2.2. Makrofajların Aktivasyonu ve Fonksiyonları

Doku makrofajının ömrü yaklaşık 2-4 aydır. Bu dönemde bir kısmı hareketsiz kalır. Bunlara sabit makrofaj denir. Matrisdeki kollajen fibrillere tutunurlar. Diğerleri ise ameboid hareketle sürekli yer değiştirirler. Her iki durumda da yüzeyindeki reseptörlerle ve pinositoz yaparak çevrelerini denetlerler. Eğer çevreden gelen herhangi bir sinyalle veya inflamatuvar mediatörlerle karşılaşılırsa makrofaj aktivasyonu denilen bir süreç girerler. Bu süreçte büyüklükleri, metabolik hızları, motiliteleri ve fagositik aktiviteleri hızla artar. Büyüklüklerinin artmasının sebebi sitoplazmik hacmin artmasıdır. Aktivasyonla birlikte birçok yeni madde sentezlenmeye başlanır. Bunlar içinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) önemlidir. Bu enzimin ürünü olan nitrik oksit (NO) makrofajın bakterisit etkisinde büyük role sahiptir⁽²⁰⁾.

Makrofajların belli başlı fonksiyonları şunlardır:

1.2.2.1. Fagositoz

Makrofajlar bakteri, antijen gibi yabancı maddeleri, hasarlı, ölü hücre ve artıklarını fagosit etmekle görevlidir. Makrofajların hücre membranında spesifik reseptörler

bulunur. Makrofajların yabancı partikülleri ve hasarlı dokuları tanınmasında fosfolipid ve şeker reseptörleri rol oynar. Makrofajlar, antikorları ise yüzeylerindeki Fc reseptörleri ile tanır. Kompleman için de yüzeylerinde kompleman reseptörleri bulunur ⁽²¹⁾. Fagosit edilecek madde yüzey reseptörlerine bağlanır ve bu bağlanma ile hücre yüzeyinde pseudopodlar oluşarak, maddeyi çevreler. Komplemanlar ise hücreye hücre yüzeyinin içe doğru invajinasyonu ile alınır. Sindirilecek materyalin hücre içine alınmasıyla sitoplazmada fagozom denilen yapılar oluşur. Fagozomlar hücre içerisinde bulunan lizozomlarla birleşerek fagolizozomu (sekonder lizozom) oluşturur. Lizozomal enzimler sindirilecek materyalin komponentlerinin yıkılıp, sitoplazmaya verilmesine neden olur. Ayrıca makrofajlarda moleküler oksijen indirgenerek mikrobisidal özellik gösteren reaktif oksijen radikalleri üretilir. Bunlar fagozomlara verilir. Ortaya çıkan komponentler ve artık maddeler ekzositoz yolu ile hücreden atılır veya sitoplazma içerisinde artık olarak birikir. Makrofajların fagosit etmesi gereken hedefleri, fazla sayıda, büyük veya sindirilmeye dirençli ise bu bölgelerde çok sayıda makrofaj birikebilir. Bu bölgelerde lenfositler, fibroblastlar ve diğer hücreler de birikir. Bu şekilde oluşan yapıya granüloma denir. Granülomadaki makrofajlara epiteloid hücreler denir. Bunun sebebi makrofajların epitel hücrelerine benzer şekilde sıkıca yan yana gelerek, birbirlerine uzantılar göndermeleridir. Böylece granüloma dışına madde geçişini engellerler ⁽²²⁾.

1.2.2.2. Salgılama

Makrofajlar biyolojik olarak aktif olan pek çok madde salgırlar. Lizozim, hidrojen peroksit gibi maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri vardır. Elastaz ve kollajenazlar ekstrasellüler matriks döngüsünde görev alırlar. Bu döngü hücre göçünü kolaylaştırarak doku iyileşmesini hızlandırır. Makrofajlar ayrıca sitokin adı verilen sinyal molekülleri salgırlar ve immün reaksiyonları düzenlerler. Sitokinler, immün sistem hücreleri arasında iletişimi sağlayan küçük proteinlerdir. En önemlileri arasında fibroblast büyüme faktörü, TNF- α , interlökin-1 β , interferon α , β , interlökin 6, 10, 12, kemokinler, prostoglandinler, nitrik oksit vardır. Lizozim, nötrofil gibi diğer inflamatuvar hücrelerin inflamasyon bölgesine kemotaksisini sağlar. Sitokinler ayrıca inflamasyonun pek çok sistemik etkisinden sorumludurlar ⁽²³⁾. Makrofajlar

salgıladıkları platelet aktive edici faktör, prostoglandinler ve lökotrienler aracılığı ile akut inflamasyonu düzenlerler. Makrofajların dokuda uzamış aktiviteleri, yavaş aktiviteli sitokinler ve büyüme faktörleri salınımı ile kronik inflamasyona ve fibrotik doku gelişimine neden olabilir ⁽²⁴⁾.

Makrofajlar salgıladıkları “tümör nekrozis faktör” (TNF) ile malign tümör hücrelerini öldürürler ⁽²⁴⁾.

1.2.2.3. Antijen Sunma

Makrofajların antijen sunucu özellikleri vardır. Makrofajlar antijenlerle birleşen ilk hücrelerdir. Yabancı maddelerle birleşerek onların lenfositler tarafından tanınmalarını ve lenfosit cevabı oluşmasını sağlarlar ⁽²⁴⁾.

Organlara özelleşmiş makrofajlar vardır: Kupffer Hücreleri (karaciğer), Alveolar Makrofajlar (akciğer), Mikroglia (beyin), Osteoklast (kemik), Langerhans Hücreleri (deri).

1.3. Diyabetes Mellitus ve Yara İyileşmesi

DM, ciddi metabolik hastalıklar arasında en yaygın olanıdır. Hastalık, kalıtsal ve edinsel faktörlerin etkileşimi ile oluşan insülin hormonunun aktivitesindeki yetersizliğe bağlı olarak gelişen hiperglisemi ve yetersiz insülin aktivitesine bağlı olarak dokularda oluşan metabolik anormallikler ile karakterizedir. Yetersiz insülin aktivitesi, yetersiz insülin salınımı veya yokluğu, yada hedef hücrelerdeki insülin direncinden kaynaklanır. Akut komplikasyonları dışında, uzun sürede vücutta oluşturduğu metabolik anormalliklerden ve gözler, böbrekler, sinirler ve kan damarları gibi organlarda oluşturduğu hasarlardan dolayı, tek bir hastalıktan ziyade bir sendrom olarak kabul edilir ^(25,26).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre ülkemizde 2000 yılında 2.920.000 olan DM prevalansı, 2030 yılında 6.422.000’a ulaşacaktır ⁽²⁷⁾. DM’un etyolojisi tam bilinmemektedir. Suçlanan birçok etyolojik faktör vardır. Bununla beraber, Tip 1 diyabet ve Tip 2 diyabet için öne sürülen etyolojik faktörler arasında major farklılıklar mevcuttur ⁽²⁸⁾. DM tip 1’de çeşitli nedenlere bağlı pankreas β hücrelerinin

yıkımı söz konusu iken DM tip 2' de genetik faktörler ve obesiteye bağlı reseptörlerde insulin direnci söz konusudur ⁽²⁸⁾. Tipi ne olursa olsun sonuçta tüm DM' larda benzer sorunlar gelişmektedir.

Joslin, 20. yüzyılın başında, diyabetik hastalarda ayak ülseri ve gangren oluşumunun kaçınılmaz bir durum olduğunu vurgulamıştır ⁽²⁹⁾. Bu tespitten sonra son 70 yıl içinde diyabet tedavisinde önemli gelişmeler olmuştur. Maliyeti yükek olan diyabet komplikasyonların önlenmesi tedavide önemli bir yer tutmuştur. Tedavide, temel olarak uygun diyet, yoğunlaştırılmış insulin ve oral hipoglisemik ajanlar kullanılmaktadır.

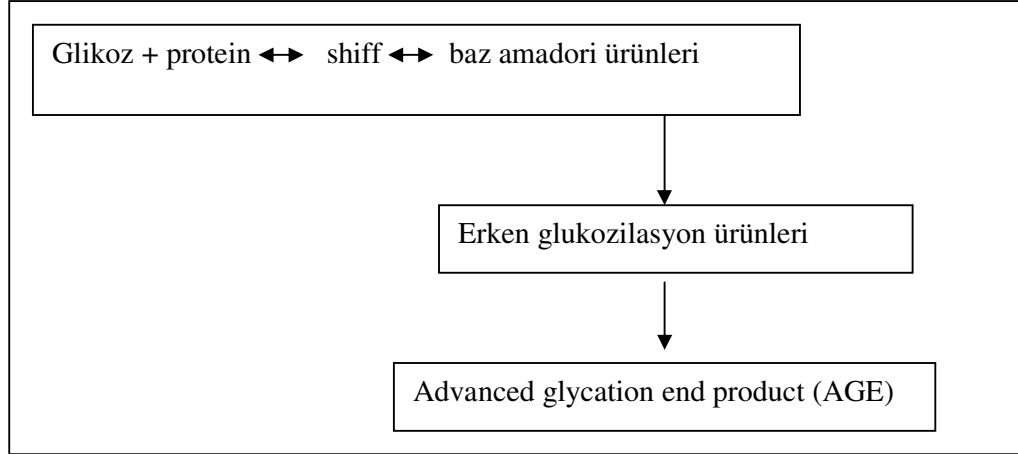
Diyabetik hastalarda diyabetik olmayan hastalara göre gangren gelişme riski 17 kat daha fazladır. A.B.D.'nde majör amputasyonların %66'sı diyabetik hastalarda uygulanmaktadır ⁽³⁰⁾.

Deneyisel ve klinik gözlemler, diyabetin tüm komplikasyonlarının metabolik bozukluklarla, özellikle de hiperglisemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Fizyopatolojik süreçlerin temelinde birkaç biyokimyasal olay yatmaktadır:

- 1) Enzimatik olmayan glikozilasyon
- 2) Poliol yolu
- 3) Protein kinaz C aktivasyonu
- 4) Hekzosamin yolu artmış aktivitesi
- 5) Mitokondrial elektron taşıma zincirinde süperoksit anyonu oluşumu ⁽³¹⁾.

1.3.1. Enzimatik Olmayan Glikozilasyon

Glikoz ile dolaşımdaki ve dokuların yapısındaki proteinler arasında gelişen bir reaksiyondur; sonuçta glikozilasyon ürünleri (AGE) ortaya çıkar (şekil 2). Bu reaksiyon, diyabetlilerde normal kişilere göre en az iki kat fazladır ve bu son ürün AGE'ler doku hasarına neden olur (şekil 3). Farelerle yapılan deneylerde, aminoguanidinlerin glisemi kontrolünden bağımsız olarak, albüminüriyi ve erken glikozilasyon ürünlerine geri dönüşsüz bağlanarak AGE'leri, basal membran kalınlaşmasını azalttığı gösterilmiştir; bu konuda, insanlarla ilgili yeterli veri yoktur ⁽³²⁾.



Şekil 2: non enzimatik glukozilasyon şeması ⁽³²⁾.

AGE proteinleri vücutta kendilerine reseptörlük yapan başka proteinlerle bağlanabilirler, bunlara da “AGE reseptörü” (Receptor for AGE-RAGE) denmektedir. RAGE, immünglobulin süpergen ailesinin bir üyesidir. 2 sabit (Constant-C) ve 1 adet de değişken (Variable-V) domaini mevcuttur. RAGE aktivasyonu, hücrede oksidan strese ve mitojen ile aktive olan protein kinaz aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Sonuçta, ilgili hücre tipinde yapısal bozukluk ve hücresel çoğalma meydana gelmektedir. Bu da kendini retinopati veya mezangial proliferasyon ile göstermektedir ⁽³³⁾.

RAGE’leri baskılayarak yara iyileşmesinin düzeldiğini gösterilmiştir ⁽³⁴⁾. Bu çalışmadan yola çıkarak RAGE’in fizyopatolojik açıdan önemli bir yer tuttuğu ileri sürülmüştür. Goova ve ark. çalışmalarında diyabetik yaralarda, inflamasyonun başlagıcının daha geç ve kronik fazın ise uzamış olduğunu söylemektedirler. RAGE, pek çok hücrede varlığı gösterilmişse de yara iyileşmesi ile doğrudan ilgili olarak fibroblastlarda, endotel hücrelerinde ve makrofajlardaki varlığı önemlidir. RAGE uyarımı, monositlerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır. Bu sitokinler inflamasyonun devamlılığını sağlamaktadır. RAGE’i uyaran proteinlerin yine monosit kaynaklı olması oldukça ilginçtir. Diyabetiklerde makrofajlar parakrin ve otokrin mekanizma ile kısır döngü oluşturarak inflamasyonun uzamasına neden olmaktadır ⁽³⁵⁾.

1.3.2. Poliöl Yolu

Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliöl yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve NO sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir. Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar. Vazodilatör mediatörlerin kaybı endonöronal kan akımının azalmasına dolayısıyla endonöronal hipoksi veya iskekiye yol açmaktadır. Bu olayın sonucunda nöronal hücre, schwann hücrelerde hasar meydana gelmektedir. Glukozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak hücrede miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na-K ATP-az enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir ki bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem taşımaktadır. Sorbitolun kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir ⁽³⁶⁾.

1.3.3. Protein Kinaz C Aktivasyonu

Hücre içi hiperglisemide glikoliz ara ürünlerinden olan gliseraldehit 3-fosfat , gliserol 3-fosfata indirgenir ve açillenir. Diaçilgliserol (DAG) protein kinaz C'nin aktivatörü olduğundan konsantrasyonunun artması enzimin aktivasyonuna yol açar. DAG öncelikle olarak PKC'nin beta ve alfa izoformlarını aktive eder. PKC aktivasyonu sonucunda damar geçirgenliği artar, vazoaktif hormonlar, kan akımı değişiklikleri olur ve bazal membran sentezi artar ⁽³⁷⁾.

1.3.4. Artmış Hekzosamin Yolağı Aktivitesi

İntraselüler hiperglisemide fruktoz-6-fosfat, glikoliz ile metabolize olmaz ve glukozamin 6- fosfata dönüşür. Glukozamin 6-fosfat, glutamin:fruktoz-6-fosfat

amidotransferaz (GFAT) tarafından katalize edilir. Glukozamin 6-fosfattan oluşan N-asetil glikozamin, TGF- β 1 ve benzeri faktörlerin sentezini aktive eden transkripsiyon faktörlerini kovalent olarak modifiye ederek aktifleştirir. Hiperglisemi ile heksozamin yolu aktivasyonunun gen ekspresyonunda ve protein fonksiyonunda değişikliklere neden olarak diyabetik komplikasyonların patogenezinin katkıda bulunma olasılığından bahsedilmektedir ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

1.3.5. Mitokondrial Elektron Taşıma Zincirinde Süperoksid Anyonu Oluşumu

Son araştırmalar hücre içi hiperglisemi ile indüklenen bu metabolik olayların mitokondrilerde aşırı süperoksid oluşumu ile aktive olduğunu göstermektedir. Endotel hücrelerinde hiperglisemi ile indüklenen reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumunun ana kaynağının trikarboksilik asid döngüsü olduğu, NADH ve prüvatin sitozolden mitokondriye taşınmaları inhibe edilerek gösterilmiştir. Kompleks V'ye alternatif olarak proton geçişini sağlayarak proton gradientini azaltan kenetlenmeyi bozucu protein (UCP-1) ve Süperoksid dismutazın (SOD) aşırı ekspresyonları hipergliseminin etkilerini engellemektedir. UCP-1 ve SOD' un endotel hücrelerinde hiperglisemiye bağlı olarak artan sorbitol birikimini, AGE oluşumunu ve PKC aktivasyonunu tamamen engelledikleri saptanmıştır. Hiperglisemi ile indüklenen “nükleer faktör kappa-B” (NF- κ B) aktivasyonunun mitokondrideki aşırı süperoksid oluşumunun inhibisyonu ile engellendiği gösterilmiştir. Mitokondride aşırı miktarlarda süperoksid oluşumu gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe eder. Bu inhibisyon glukoz ve glikoliz metabolitlerinin konsantrasyonlarının artmasına neden olur. Gliseraldehit 3- fosfattan parçalanma ile oluşan metil glioksalin artışı AGE'lerin artmasına neden olmaktadır ^(37,41-43).

Hiperglisemi ile indüklenen mikrovasküler değişiklikler daha sonraki normal glukoz homeostazı dönemlerinde de kalıcı olur veya ilerler. Mitokondride oluşan ROS'ların mitokondrial DNA'da hasara neden olduğu gösterilmiştir. Mitokondrial elektron transport sistem elemanlarından bazılarını kodlayan mitokondrial DNA'nın hasarlanması, bu elemanların yapılarının ve fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Hasarlı elemanlar nedeni ile normoglisemide bile süperoksid oluşumu artar.

Hiperglisemik hafızanın mitokondrial DNA'daki oksidatif hasar ile açıklanabileceği öne sürülmektedir ⁽⁴⁴⁾.

Günümüze kadar gelen araştırmaların ışığında yukarıdaki mekanizmalarla oluştuğu düşünülen yara iyileşmesini sekteye uğratan komplikasyonlar aşağıda sıralanmıştır:

Diabetik ayak ülserli hastaların % 60'ında periferik nöropati, % 20'sinde iskemi, % 20' sinde nöropati ve periferik arter hastalığı birlikte bulunur ⁽⁴⁵⁾.

1.3.6. Diyabetik Nöropati

Motor tutulum sonucunda ayaktaki intrinsek kaslarda zayıflık oluşur ve sonrasında fleksor ve ekstensor kaslarda uyumsuzluk oluşur. Bu uyumsuzluk sonucunda ayak 'pençe ayak' ve parmaklar da 'çekiç parmak' şeklini alarak deforme olur. Ayak tabanında yastık görevi yapan yağ tabakasının atrofisi sonucunda yüksek basınca maruz kalan bölgeler özellikle metatars başlarına uyan bölgelerde aşınma ve ülserasyonlar meydana gelir. Normalde ayağa binen yük tüm ayağa eşit miktarda dağılırken, deformite sonucunda yük tamamen metatars başlarının altına ve topuğa biner ^(46,47).

Diabetik hastalarda yüzeysel ve derin duyuda azalma oluşur ve tamamen yok olabilir. Bu nöropati tipik olarak “eldiven-çorap” tarzı bir dağılım gösterir. Ayakkabı vurmaları, yabancı cisim batması ve yanık gibi travmalar, protektif ağrı duyusunun olmaması nedeniyle hasta tarafından fark edilmez veya önemsenmez ⁽¹⁾.

Diyabetik hastalarda otosempatektomi gelişmesi sonucunda ayakla terleme kaybolur ve cilt ısı regülasyonu bozulur. Terlemenin olmaması nedeniyle ayak derisi kurur ve ayakla çatlaklar oluşur. Bu çatlaklar olası enfeksiyon etkenlerinin vücuda girişini kolaylaştırır. Sempatik tonusun kaybolması sonucu periferik kan akımı artar ve arteriovenöz şantlar meydana gelir ve ayakta yaraların oluşumuna katkıda bulunur ^(1,45).

Klasik nöropatik ülser pembe granülasyon, beyaz fibrotik yara dudağı olan etrafı hiperkeratotik doku ile çevrelenmiştir. Vasküler destek iyi ise ayak ılıktır. Enfeksiyon tabloya eklendiyse ayak sıcak hale gelir. Nöropatik ülserler basınca bağlı olarak gelişen sirküler, zımba deliği biçiminde, ağrısız kronik lezyonlardır ve hasta

bilinçli değilse uzun süre fark edemez. Ağrı başladığında hasta fark eder ve enfeksiyon başlamış demektir ⁽⁴⁸⁾. Diabetik ayak ülserlerinde tanı koydurucu en erken belirti aşil tendon refleksinin kaybıdır ⁽²⁾.

1.3.7. Nöropatik Eklem (Charcot ayağı)

Bazı evrelerin sonucunda Charcot ayağı gelişir. İlk evre akut evredir. Bu evrede ayak şiş, kırmızı ve sıcaktır. Ufak bir travma sonucu gelişebilir. Ağrı olaya eşlik eder. Bu evrede ayağa binen basıncın azaltılması faydalıdır, özel ayakkabı giyilmelidir. His kusuru nedeniyle ağrı fark edilmez ve yürüme ve basınç artımı devam ederse kemikte kırıklar oluşur. 3,4 haftada gelişen bu kırık evresi ikinci evre olarak değerlendirilir. Osteoliz, kemikte parçalı kırıklar, giderek yeni kemik oluşumu ve eklem dizilimin bozulması ve birleşmeleri ile subluksasyonlar meydana gelir. Bu evrede tanı kolaylaşır ancak klinik olarak geç kalınmıştır. Yaklaşık birkaç ay süren bu süreç sonrasında üçüncü evre olan ayakta kalıcı deformite gelişir. Dördüncü evrede ise ayakta deformite ve kemik kırıkları sonucunda ayak tabanında ülserler oluşur. Ülserler gangrenleşir ve amputasyona kadar ilerler ⁽⁴⁹⁾.

1.3.8. İmmünolojik Bozukluklar

Diabetik ülserlerde uygun tedaviyi uygulayabilmek için yara iyileşme sürecindeki bozuklukları anlamak çok önemlidir. Normal yara iyileşmesi için bağ doku formasyonu, hücresel aktivite, büyüme faktörleri uyum içinde olmalıdır. Diabetik yaralarda bu 3 süreçte hasarlandığından yara iyileşmesi gecikir ⁽⁵⁰⁾.

Kollajen bağ dokuda en çok bulunan proteindir ve dermis, kemik, tendon ve ligamanların integral konponentidir. Kollajen üretimi ve yıkımı yara onarımında travmadan sonra uzun süre devam eden kompleks bir olaydır. Travmatize olmuş yara yeri normal yara iyileşmesinde bile hiçbir zaman eski tensil kuvvetine ulaşmaz. Skar kollajeni orijinal kollajenin en fazla %80'i kadar tensil gücüne sahip olabilir. Normal yara iyileşmesinde kollajen yıkımı ve yapımı arasında hassas bir denge vardır ve DM hastalığında denge yara iyileşmesini sekteye uğratabilecek şekilde bir tarafa doğru bozulur ⁽⁵⁰⁾.

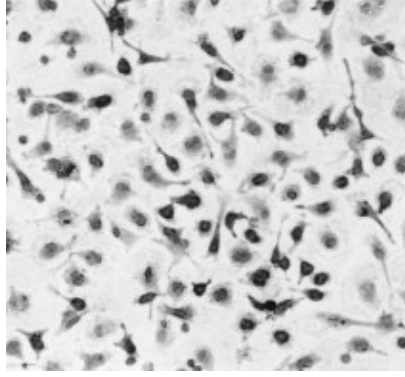
Yara iyileşmesinin inflamatuvar basamağı ilgili hücrelerin, GF'lerin ve biyokimyasal aktivitelerin orkestral biçimdeki çalışmasıyla oluşur. Plateletler, nötrofiller, T hücreleri, NK hücreleri ve makrofajlar yara yerine ilerlerler ve yara iyileşmesi sürecindeki inflamasyon, koagülasyon ve anjiyogenezi düzenlerler⁽⁵⁰⁾. Diyabetik yaralarda TNF- α ve IL-1 β düzeyleri artmıştır⁽⁵¹⁾. Bu artış matriksmetalloproteinaz (MMP) artışından sorumlu tutulmaktadır.

Deri keratinositlerinde de morfolojik değişiklikler görülür. Ek olarak DM'li hastalarda keratinosit proliferasyonu inhibe olur ve yara iyileşmesinin esas basamaklarından biri sekteye uğramış olur⁽⁵⁰⁾.

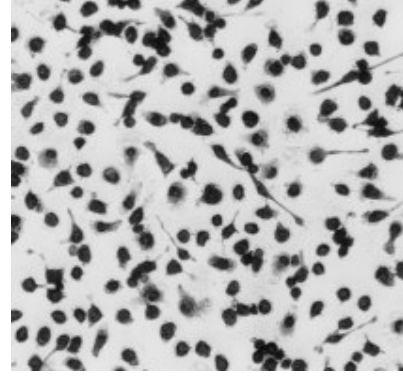
1.3.8.1. Diyabetin Makrofajlar Üzerine Etkileri

GF'ler yara iyileşme sürecini lokal yara çevresinde inhibitör ve stimulator etkilerle düzenler. PDGF, FGF, VEGF gibi GF'lerin hepsi yara sıvısında bulunmuştur. Günümüzde GF'lerin hücrelerin kemotaksis, migrasyon stimulasyon, ve proliferasyon süreçlerinde ve yara iyileşmesinde gerekli matriks maddelerinde gerekli olduğu bilinmektedir. Diyabetli hastalarda bu faktörler azalır ve yara iyileşmesi sekteye uğrar⁽⁵²⁾.

Diabetes mellitusta uzun süreli hiperglisemi inflamatuvar süreçteki hücrel aktiviteyi zayıflatabilir. Daha spesifik olarak, makrofajların morfolojisi değişir ve fonksiyonunun bozulduğu görülür (şekil 3, 4)⁽⁵³⁾. Makrofajların fagositoz, antijen sunma, reseptör fonksiyonları ve sitokin salınımları bozulur⁽⁵³⁾. Makrofaj ve B lenfositlerinden zengin kronik hücrel infiltrasyon yara iyileşmesinde önemli rolü olan CD4+ T lenfositlerinin sitokin repertuarını iyileşmeye yardımcı şekilde yönlendirmesini engeller⁽⁴⁴⁾.



(a)



(b)

Şekil 3: (a) Solda kültüre edilmiş sağlıklı makrofajların, (b) ise kültüre edilmiş diyabetik makrofajların elektron mikroskobu ile görünümü mevcuttur. Şekillerde görüldüğü üzere diyabetten etkilenmiş makrofajların fenotipi bozulmuştur ⁽⁵³⁾.

Diyabetiklerde, fonksiyonel olarak ayrımlanan makrofaj alt tiplerinde farklılıklar saptanmıştır. İnflamatuar ve hücre öldürücü makrofaj oranları artarken, tamir makrofajlarının oranı azalmaktadır. Bu değişim sitokin repertuarını da değiştirerek, fibroplazi ve anjiyogenezi uyaran ve proliferatif faza geçişi uyaran faktörleri baskılamaktadır. Diyabetiklerde, makrofajlardan PDGF ve IGF-1 salınımının azaldığı gösterilmiştir. Bunun yerine inflammatuar makrofaj fenotipinin saldıgı inflammatuar sitokinler artmaktadır ⁽¹²⁾.

1.3.9. Vasküler Bozukluklar

İskemik değişiklikler dejeneratif diyabetik ayakta görülen dinamik destrüktif sürecin bütünleyici bir parçasıdır. Hastalığın süresi ile orantılı olarak periferik vasküler hastalık oranı da artar. Genel olarak hastaların ortalama % 15'i teşhis edildikten sonraki 10 yıl içinde oklüziv problemlerle karşılaşır. Bazal membran kalınlaşması, anormal endotel hücre aktivitesi, eksik trombosit fonksiyonu, vasküler düz kas proliferasyonu, intimal hasarı olanlarda lipid depozisyonu ve trombosit agregasyonu ile ateromatöz plakaların oluşması sonucu oklüzyon ortaya çıkar. Bunun sonucunda doku perfüzyonunda azalma, besin ve oksijen değişiminde yetersizlik ve şiddetli hücresel hipoksi meydana gelir. Ayaktaki azalmış perfüzyonun sonucu doku

nekrozudur. Bu hastalarda büyük ve orta çaplı arter tutulmasına eşlik eden fiziksel bulgular; Kıl kaybı, ayakta soğukluk, atrofik cilt ve tırnak distrofisidir ⁽⁵⁴⁾.

Mikroanjiopatiye bağlı klinik bulgular genellikle ayağın majör komplikasyonlarından sorumludur. Kötü doku perfüzyonu ile yumuşak doku hasarı onarma kabiliyeti azalmıştır. Bu da ülserasyona yol açabilir ve açılan ülserin de beslenme bozukluğuna bağlı olarak iyileşmesi gecikir. Bu hastalarda alt ekstremitayı tutan vasküler lezyonlar sıklıkla multisegmental ve diffuz dağılımlıdır ⁽⁵⁴⁾.

1.3.10. Diyabette yara iyileşmesini etkileyen diğer risk faktörleri

Uzun hastalık süresi riski artırır. 20 yıldan fazla DM öyküsü olan hasta grubu, 9 yıldan az DM öyküsü olan hasta grubuyla karşılaştırılmış ve ülser oranının 6 kat fazla olduğu görülmüş ⁽⁵⁵⁾. Daha önce diyabetik yara öyküsü yada amputasyon varlığı olan hasta grubunda yeni yara oluşma riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiş ⁽⁵⁶⁾.

1.4. Deneysel Diyabet Modeli

1.4.1. Alloksan Monohidrat

Alloksan monohidrat [2,4,5,6(1H,3H) - pyimidinetetrone] yapısında bir ürik asit türevidir, suda kolayca erir, toz hali 2-8 oC’de, solüsyon hali ise 4 oC’nin altında saklanmalıdır. Selektif olarak pankreas beta hücrelerini hasarlayarak insüline bağımlı diyabete neden olduğu bildirilmiştir ⁽⁵⁷⁾.

1.4.2. Alloksan İle Diyabet Oluşturma Tekniği

Onsekiz saat aç bırakılan fareye 150 mg/kg dozda, serum fizyolojikte (% 0.9 NaCl) çözülmüş alloksan periton içi yolla uygulanır. Bu uygulama 48 saatte bir toplam üç kez tekrarlanır. Dolayısı ile her bir fareye total olarak 450 mg/kg alloksan uygulanmış olur. Son uygulamadan itibaren 7 gün geçtikten sonra fareler yine 18 saat aç bırakılır ve herbirinin kuyruk veninden kan alınarak açlık kan şekeri düzeyleri

ölçülür. Açlık kan şekeri düzeyi 200 mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabet oluşmuş fare olarak kabul edilir ve çalışmaya dahil edilir ⁽⁵⁷⁾.

1.5. Lipozomal Klodronat (Bisfosfonat) İle Makrofaj Deplesyonu

Klodronat (diklormetilen bisfosfonat) bisfosfonat grubundan bir ilaçtır. Bisfosfonatlar; pirofosfat analoglarıdır. Ana iskelette oksijenin yerini karbonun alması bisfosfonatları endojen hidrolize dirençli kılmıştır. Bisfosfonatlar; maligniteye sekonder hiperkalsemi tedavisinden meme kanserinin adjuvan tedavisine, standarda ek olarak uygulanan kemik metastazını engellemeyi veya geciktirmeyi amaçlayan tedaviye kadar uzanan yolu katetmişlerdir. Ayrıca, bisfosfonatlar üzerine yapılan çalışmalar, kemikteki metastatik süreci açıklamaya yönelik araştırmalar için bir temel oluşturmuştur. Klodronatın kalsiyuma güçlü affinitesi vardır ⁽⁵⁸⁾.

Bisfosfonatlar oral olarak alındıklarında emilimleri zayıftır (%10) ve oral biyoyararlanımları %1'den azdır. Oral dozun artırılması ise sıklıkla bulantı ve kusmanın öncülük ettiği gastrointestinal sistem toksisitesi ile sonuçlanır. Dolaşımdaki bisfosfonatların yarı ömrü 2 saatten daha azdır. Bisfosfonatlar, kemik "remodeling"inin aktif olduğu veya osteoklast aktivitesinin yüksek olduğu yerlerde toplanırlar. Kemikte uzun süre kalırlar ve ilk bağlandıkları kemik dokusundan yalnız "turnover" ile salınırlar. Tahmini olarak kemikteki yarı ömrü bir yıldır ⁽⁵⁸⁾.

Asıl etkisi osteoklast fonksiyonlarının inhibisyonu olmaktadır. Diğer spesifik mekanizmalar ise osteoklastlar tarafından haraplanmış dokudaki anatomik değişikliği, asit üretiminde ve lizozomal enzim prodüksiyonunda azalmayı, osteoklast hücrelerinin proliferasyonundaki inhibisyonu ve monosit-makrofaj göçünün inhibisyonunu içermektedir ⁽⁵⁸⁾.

Bisfosfonat tedavilerde kullanılırken uygulamasından sonra osteoklast sayısında bariz düşme görülmüş ve direk toksisite ve apoptosiz düşünülmüştür ⁽⁵⁹⁾. Bu etkisi görüldükten sonra deneysel anlamda makrofaj deplesyonu yapıcı etkisinden faydalanılmak istenmiş. Serbest klodronatın makrofaj içine girişi zordur. Serbest klodronat liposomların çift katlı fosfolipit tabakasını ve hücre membranını kolay geçemez. Bu nedenle deneysel anlamda faydalanabilmek için klodronatı makrofajın içine daha rahat ve daha çok sokulması amaçlı lipozomal hale getirilmiştir.

Lipozomal hale getirilmiş klodronat makrofajdan kaçamaz. Makrofaj lipozomal klodronatı içeri aldıktan sonra çift tabakalı fosfolipit tabakaları makrofajdaki lizozomal fosfolipaz sayesinde dağılır ve serbest klodronat hücre içinde açığa çıkar. Böylelikle klodronat makrofajların içine çok daha rahat ve daha yüksek miktarda girmiş olur. Hücre içinde yeterli miktara geldiğinde makrofaj klodronatı fagosite etmeye çalışır ancak edemez, dönüşümsüz zedelenmiş olur ve makrofaj apoptozis ile ölür. Sonuçta **selektif makrofaj deplesyonu** sağlanır. Ölü makrofajdan açığa çıkan serbest klodronatın dolaşımdaki yarılanma süresi çok kısadır ve kısa sürede renal yolla atılır ⁽⁶⁰⁾.

Lipozomlar vasküler bariyeri geçemez. Bu nedenle dolaşımdaki makrofajlara lipozomal klodronat erişemez. Makrofaj ölümleri karaciğerde (kupfer hücreleri), dalakta (farklı makrofaj subpopulasyonları), akciğerde (alveolar makrofaj), peritoneal kavitede, lenf nodlarında, eklemlerde (fagositik sinovyal hücreler) ve testislerde elimine edilir ⁽⁶¹⁾.

2. MATERYAL METOD

Çalışmamıza, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu toplantısında görüşülerek etik kurul onayı alındı. Çalışma Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Hastanesi Hayvanlarda Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.1. Denekler

Çalışmamızda denek hayvanı olarak 72 adet dişi erişkin, 30-40 gr ağırlığında Balb/c cinsi fare kullanıldı. Fareler rastgele 4 gruba ayrıldı. Gruplar şu şekilde sıralandı: Grup 1 (kontrol grubu, n=16), grup 2 (diyabetik grup, n=20), grup 3 (makrofaj deplesyon grubu, n=16), grup 4 (makrofaj deplesyonu + diyabetik grup, n= 20). Grup 2 ve grup 4'ün denek sayıları daha fazla tutulmuştur. Literatürde alloxan diyabeti yapılacak gruplarda bir kısım fare diyabetik hale gelmeme ihtimali bulunduğundan denek sayısının yaklaşık %30 yüksek tutulması önerilmiştir ⁽⁵⁷⁾.

I) GRUP 1 (kontrol grubu, n=16): 48 saat arayla 3 kez intraperitoneal 1 ml serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Preoperatif 2. gün ve postoperatif 4.gün 0,2 ml klodronatsız lipozom içeren “fosfat-buffered saline” solusyonu (PBS) farenin kuyruk veninden enjekte edildi. 8. hafta sonunda farelerin sırt bölgesinde panniculus carnosus'u da içerecek şekilde kare şeklinde (1x1 cm) tam kat deri defekti oluşturuldu. Inferiorunda 3 cm'lik tam kat epidermisten subkutan kas fasyasına uzanan vertikal düz insizyon yapıldı ve 4/0 ipekle yeniden suture edildi. Postoperatif (PO) 3., PO 5., PO 7. günlerde defekt alanları yüzey alanı ölçülmesi için fotoğrafları çekildi. PO 1.gün 1, PO 3.gün 4, PO 5. gün 5 ve PO 7. gün geriye kalan 6 denekten defekt alanından patolojik inceleme amaçlı yara biopsisi alındı. PO 5. gün ve PO 7. gün defekt alanından biopsi alınan deneklerin suture edilmiş vertikal insizyonlarından biopsi alınarak yine aynı sayıda olmak üzere (PO 5. gün 4, PO 7.gün 6 denek) yara kopma kuvveti ölçüldü.

II) GRUP 2 (diyabetik Grup , n=20): 48 saat arayla 3 kez intraperitoneal 1 ml serum fizyolojik içinde 150 mg/kg oranında Alloksan enjeksiyonu yapıldı. 1 denek alloksan uygulamasından sonra öldü, başka üç denek ise diyabetik yapılamadı. Bu nedenle 4 denek çalışmadan çıkarıldı ve çalışmaya kalan 16 denek ile devam edildi. Preoperatif 2. gün ve postoperatif 4.gün klodronatsız “fosfat-buffered saline”(PBS) lipozomu (0,2 ml) kontrol amaçlı farenin kuyruk veninden enjekte edildi. DM tablosunun oturması için 8 hafta beklendi. Süre tamamlandığında farelerin sırt bölgesinde panniculus carnosus’u da içerecek şekilde kare şeklinde (1x1 cm) tam kat deri defekti oluşturuldu. İnferiorunda 3 cm’lik tam kat epidermisten subkutan kas fasyasına uzanan vertikal düz insizyon yapıldı ve 4/0 ipekle yeniden suture edildi. PO 3., PO 5., PO 7. günlerde defekt alanları yüzey alanı ölçülmesi için fotoğrafları çekildi. PO 1.gün 1, PO 3.gün 4, PO 5. gün 5 ve PO 7. gün geriye kalan 6 denekten defekt alanından patolojik inceleme amaçlı yara biopsisi alındı. PO 5. gün ve PO 7. gün defekt alanından biopsi alınan deneklerin suture edilmiş vertikal insizyonlarından biopsi alınarak yine aynı sayıda olmak üzere (PO 5. gün 4, PO 7.gün 6 denek) yara kopma kuvveti ölçüldü.

III) GRUP 3 (makrofaj depleksyon grubu, n=16): 48 saat arayla 3 kez intraperitoneal 1 ml serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. 8 hafta tamamlandığında farelerin sırt bölgesinde panniculus carnosus’u da içerecek şekilde kare şeklinde (1x1 cm) tam kat deri defekti oluşturuldu. İnferiorunda 3 cm’lik tam kat epidermisten subkutan kas fasyasına uzanan vertikal düz insizyon yapıldı ve 4/0 ipekle yeniden suture edildi. Öncesinde preoperatif 2. gün ve postoperatif 4.gün makrofaj depleksyonu amaçlı **klodronatlı** lipozom solusyonu (0,2 ml/fare) farenin kuyruk veninden enjekte edildi. PO 3., PO 5., PO 7. günlerde defekt alanları yüzey alanı ölçülmesi için fotoğrafları çekildi. PO 1.gün 1, PO 3.gün 4, PO 5. gün 5 ve PO 7. gün geriye kalan 6 denekten defekt alanından patolojik inceleme amaçlı yara biopsisi alındı. PO 5. gün ve PO 7. gün defekt alanından biopsi alınan deneklerin suture edilmiş vertikal insizyonlarından biopsi alınarak yine aynı sayıda olmak üzere (PO 5. gün 4, PO 7.gün 6 denek) yara kopma kuvveti ölçüldü.

IV) GRUP 4 (makrofaj deplesyonu + diyabetik grup, n= 20): 48 saat arayla 3 kez intraperitoneal 1 ml serum fizyolojik içinde 150 mg/kg oranında Alloksan enjeksiyonu yapıldı. Üç denek ise diyabetik yapılamadı. Bu nedenle 3 denek çalışmadan çıkarıldı ve çalışmaya kalan 17 denek ile devam edildi. DM tablosunun oturması için 8 hafta beklendi. Süre tamamlandığında farelerin sırt bölgesinde panniculus carnosus'u da içerecek şekilde kare şeklinde (1x1 cm) tam kat deri defekti oluşturuldu. Inferiorunda 3 cm'lik tam kat epidermisten subkutan kas fasyasına uzanan vertikal düz insizyon yapıldı ve 4/0 ipekle yeniden suture edildi. Öncesinde preoperatif 2. gün ve postoperatif 4. gün makrofaj deplesyonu amaçlı **klodronatlı** lipozom solusyonu (0,2 ml/fare) farenin kuyruk veninden enjekte edildi. PO 3., PO 5., PO 7. günlerde defekt alanları yüzey alanı ölçülmesi için fotoğrafları çekildi. PO 1.gün 1, PO 3.gün 4, PO 5. gün 4 ve PO 7. gün geriye kalan 7 denekten defekt alanından patolojik inceleme amaçlı yara biopsisi alındı. PO 5. gün ve PO 7. gün defekt alanından biopsi alınan deneklerin suture edilmiş vertikal insizyonlarından biopsi alınarak yine aynı sayıda olmak üzere (PO 5. gün 4, PO 7.gün 7 denek) yara kopma kuvveti ölçüldü.

2.2. Cerrahi Teknik

2.2.1. Preoperatif Hazırlık

Preoperatif dönemde hayvanlar tek tek kafeslere yerleştirilip, ısı ve nem oranı sabit odaya alınarak aynı yiyeceklerle beslendiler. Hayvanlara intraperitoneal (0.8 mg/10 g) dozunda pentotal anestezisi yapıldı. Anestezi derinliği çene ve iskelet kas tonusuyla izlendikten sonra sırtlarındaki tüyler traşlandı. Polivinyilpirolidon iyod(batticon sol 1000ml Adeka) ile lokal saha temizliği yapıldı.

2.2.2. Cerrahi araç-gereç

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: çalışmada kullanılan cerrahi araç gereçler

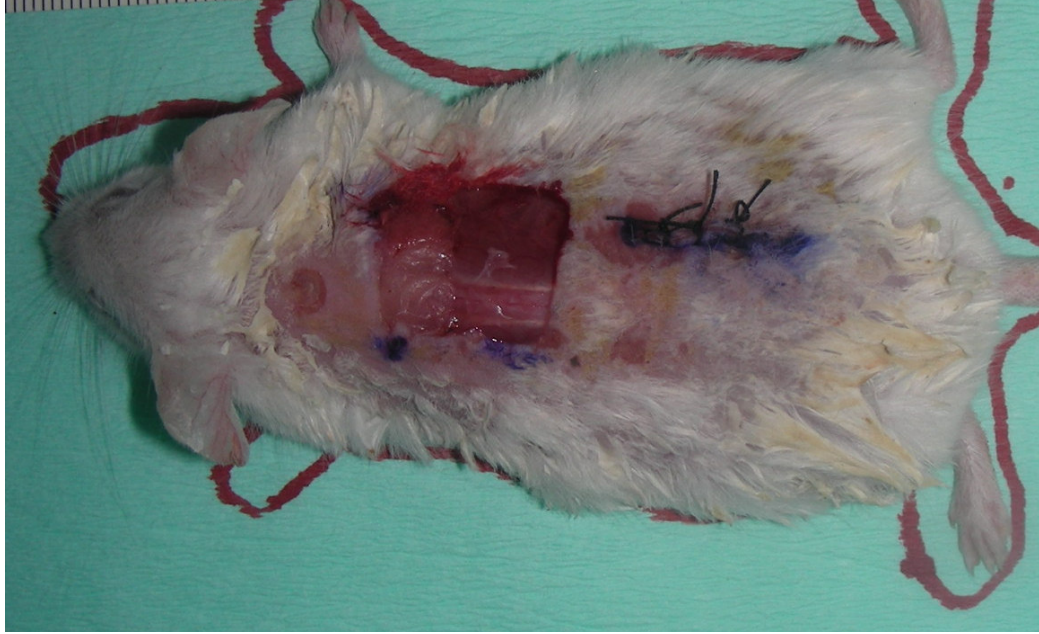
Cinsi	Adedi
Balb/c fare	70
Batticon sol 1000cc Adeka	1
İzotonik sodyum klorür % 0.9 1000ml Eczacıbaşı/Baxter	3
LİPOZOMAL KLODRONAT 12 ml Klodronat: Roche, Almanya Fosfotidil kolin: Lipoid GmbH, Almanya Kolesterol: SIGMA Chem. Co, ABD	1
Alloksan 10 gr SIGMA Chem. Co, ABD	1
Pental sodyum 0,5 gr Tiopental sodyum İE ULAGAY	3
4/0 ipek sütür Boz	5 kutu
15 no bisturi Meiyi	2 kutu
Steril enjektör Hayat	200
Steril eldiven Beybi	200
Non-steril eldiven Comfit	200
Histopatolojik boya	1
İmmunohistokimyasal boya	1
Adson çok dişli penset	1
Portegue Aygün	1
Cerrahi Mayo makas Aygün	1

2.3. Deney

2.3.1. Defekt Oluşturma ve İnsizyon Oluşturma

Ameliyat öncesi sıçanlara Pental Sodyum (İ.E. ULUGAY) ile 80 mg/kg dozunda anestezi uygulandı. Anestezi derinliği çene ve iskelet kas tonusuyla izlendikten sonra sırtlarındaki tüyler tıraşlandı. Polivinilpirolidon iyod (batticon sol 1000ml Adeka) ile uygun saha temizliği yapıldı. Denek sırtının kranial kısmına 15 numaralı bistüri ile 1x1 cm boyutlarında kare pannikulus karnosusu da içeren tam kat cilt defekti oluşturuldu ⁽⁶²⁾. Sonrasında 15 numara bisturi ile denek sırtının kaudal kısmına 3 cm'lik tam kat epidermisten subkutan kas fasyasına uzanan vertikal düz insizyon yapıldı. İnsizyon 4/0 ipek dikiş ipliği ile 3 adet primer sütür ile dikildi (şekil 5) ⁽⁶³⁾. İşlemler sırasında asepsi kurallarına uyuldu. Operasyon sırasında sıçanın idrar ve

dışkı çıkarması durumunda uygulanan ilk dozun üçte bir oranında yeniden anestezi ajan verilerek anestezinin devam sağlandı. Bu işlemlerin hepsi tüm deney Gruplarına aynen uygulandı.



Şekil 4: Defekt ve suture edilmiş insizyonun görünümü.

2.3.2. Diyabetes Mellitus Oluşturma İşlemi

D grubundaki ve MD grubundaki 18 saat aç bırakılan 20'er adet fareye 150 mg/kg dozda, serum fizyolojikte (% 0.9 NaCl) çözülmüş alloksan periton içi yolla uygulandı. Bu uygulama 48 saatte bir toplam üç kez tekrarlandı. Dolayısı ile her bir fareye total olarak 450 mg/kg alloksan uygulanmış oldu. Son uygulamadan itibaren 7 gün geçtikten sonra fareler yine 18 saat aç bırakıldı ve herbirinin kuyruk veninden kan alınarak Elite Glukometre (BayerTM) ile açlık kan şekeri düzeyleri ölçüldü. Açlık kan şekeri düzeyi 200 mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabet oluşmuş fare olarak kabul edildi ve çalışmaya dahil edildi ⁽⁵⁷⁾.

2.3.3. Makrofaj Depleksiyonunun Sağlanması

2.3.3.1. Lipozomal Klodronatın Hazırlanışı

Fosfatidilkolin (86mg; Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Almanya) ve kolesterol (8 mg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) kloroform içinde çözündürülür. Bu solüsyon 37 C'deki bir vakumda döndürülerek buharlaştırılır. Sonrasında 2,5 gr klodronat (roche, Almanya) içeren 10 ml 'lik PBS solusyonuna katılır. Bu karışım oda ısısında 3 dakika sonikatörde sonikaze edilir ve sonrasında 2 saat oda sıcaklığında bekletilir ve lipozomlar meydana gelir. Enkapsüle olmamış klodronatları ayırmak için 30 dakika 100000 devirle santrifüje edilir ve mevcut ürün 2-3 kez 30 dakika PBS ile 25000 devirlik santrifüla yıkanır. Böylelikle lipozomal klodronat 4 ml PBS içinde kullanıma hazır hale gelmiş olur (Şekil 5) ^(64,65).

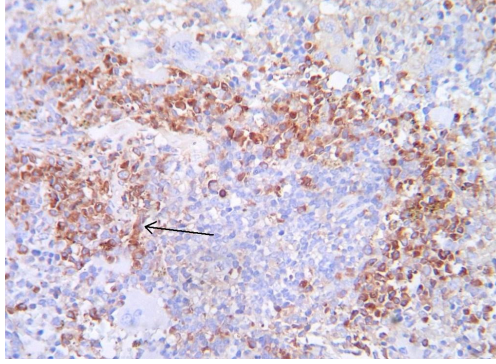


Şekil 5: Lipozomal klodronat ve ambalajı.

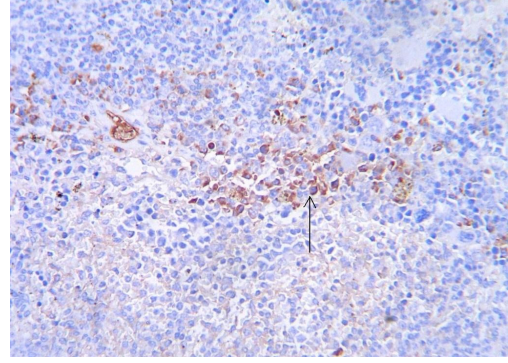
2.3.3.2. Lipozomal Klodronatın Uygulanışı

Literatürde lipozomal klodronatın uygun makrofaj depleksiyonunu sağlaması amaçlı 1'er hafta aralıklarla yapılması önerildiğinden, ilaç preop 2. gün 0,2 ml/fare dozunda intravenöz olarak grup 3 ve grup 4'teki tüm deneklere kuyruk veninden uygulandı ve PO 4. gün aynı enjeksiyon tekrar edildi ⁽⁶⁰⁾. Diğer 2 grubada kontrol amaçlı aynı günlerde kuyruk veninden denek başına bir dozda 0,2 ml'lik PBS enjekte edildi. PO 3. günde tüm gruplardan alınan dalak ve karaciğer doku örnekleri makrofajlara özgü immunohistokimyasal boyalarla karşılaştırılarak makrofaj depleksiyonu ispatlandı. Bilinmesi gerekir ki bu teknikle makrofajlar tamamen yok edilemez ancak çok düşük miktarlara indirilebilir ⁽⁶⁰⁾. Şekil 6 ve 7'de gruplara ait örnek şekiller verilmiştir.

(İmmunohistokimyasal boyama tekniğinin metodu patolojik değerlendirme bölümünde açıklanmıştır).

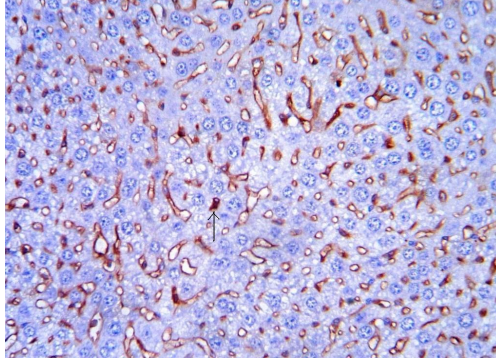


(a)

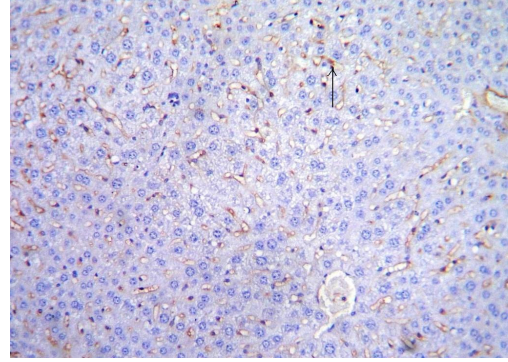


(b)

Şekil 6: PO 3. günde Grup 1 (a) ile makrofaj deplesyonu yapılmış grup 3'ten (b) alınmış dalak örneklerinin makrofaja yönelik immünohistokimyasal boya ile boyandıktan sonra karşılaştırılmasında makrofaj deplesyonunun sağlandığı görülmektedir (makrofajlar izole olarak kendisine özgü CD68 boyası ile boyanmıştır, makrofajlar okla işaretlendiği üzere şekillerde kahverengi olarak görülmektedir).



(a)



(b)

Şekil 7: PO 3. günde Grup 2 (a) ile makrofaj deplesyonu yapılmış Grup 4'ten (a) alınmış karaciğer örneklerinin makrofaja yönelik immünohistokimyasal boya ile boyandıktan sonra karşılaştırılmasında makrofaj deplesyonunun oluşturulduğu görülmektedir. (makrofajlar izole olarak kendisine özgü CD68 boyası ile boyanmıştır, makrofajlar şekillerde okla gösterildiği üzere kahverengi olarak görülmektedir).

2.4. Patolojik Değerlendirme

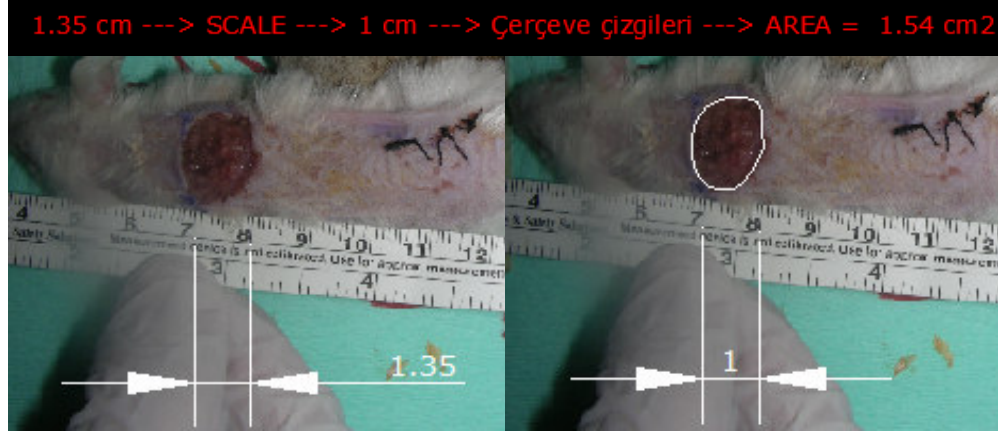
Altmışbeş adet fareye ait 65 adet yara alanını temsil eden deri örnekleri ile 65 adet karaciğer ve 65 adet dalak dokusu %10'luk nötral formalin solüsyonunda fiske edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardaki örneklerden mikrotom ile 5-µm kalınlıkta kesitler alındı. Her örnek rutin hematoksil-eozin boyası ile boyandı. Hematoksil-eozin boyalı kesitler ışık mikroskopisinde histopatolojik olarak değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal değerlendirme streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle gerçekleştirildi. Karaciğer ve dalak dokularından elde edilen kesitler poli-L-lizin ile kaplanmış lamaların üzerine alındıktan sonra kesitlerin sırasıyla deparafinizasyon ve rehidrasyonu sağlandı. %3'lük hidrojen peroksidaz ile doku kesitlerindeki endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. CD68 monosit/makrofajlar için spesifik bir belirteçtir ⁽⁶⁶⁾. Kesitlere primer antikör olarak CD68 (Dako; Carpinteria, CA, ABD) uygulandı. Karaciğer ve dalak dokuları makrofaj (karaciğerde Kupfer hücreleri) yoğunlukları açısından incelendi.

Tüm patolojik incelemeler Patoloji anabilim dalında yapılmıştır.

2.5. Yüzey Alanı Ölçümü

PO 3. gün, PO 5.gün ve PO 7.gün tüm gruplardaki mevcut tüm deneklerin defekt boyutlarının ölçülmesi amaçlı farelerin fotoğrafı Nikon Coolpix S10 marka ve modelli dijital fotoğraf makinası ile açı, yükseklik ve yakınlaştırma standardizasyonu sağlanarak çekildi. Fotoğraflar AutoCAD (Autodesk, ABD) programına aktarıldı. AutoCAD (Autodesk, ABD) programına aktarılan fotoğraftaki 1 cm'lik uzunluk AutoCAD' deki (Autodesk, ABD) ölçü olarak, fotoğraftaki cetvelde görünenden farklı boyutlardaydı. Örneğin gerçekte 1 cm olması gereken uzunluk 1,35 cm idi. Scale komutu kullanılarak 1,35 cm'lik uzunluk 1 cm'e düşürüldü. Daha sonra faredeki kesilen alan çizgilerle çevrelendi ve AREA komutu kullanılarak çizilen alanın cm karesi hesaplandı. (Şekil 8).



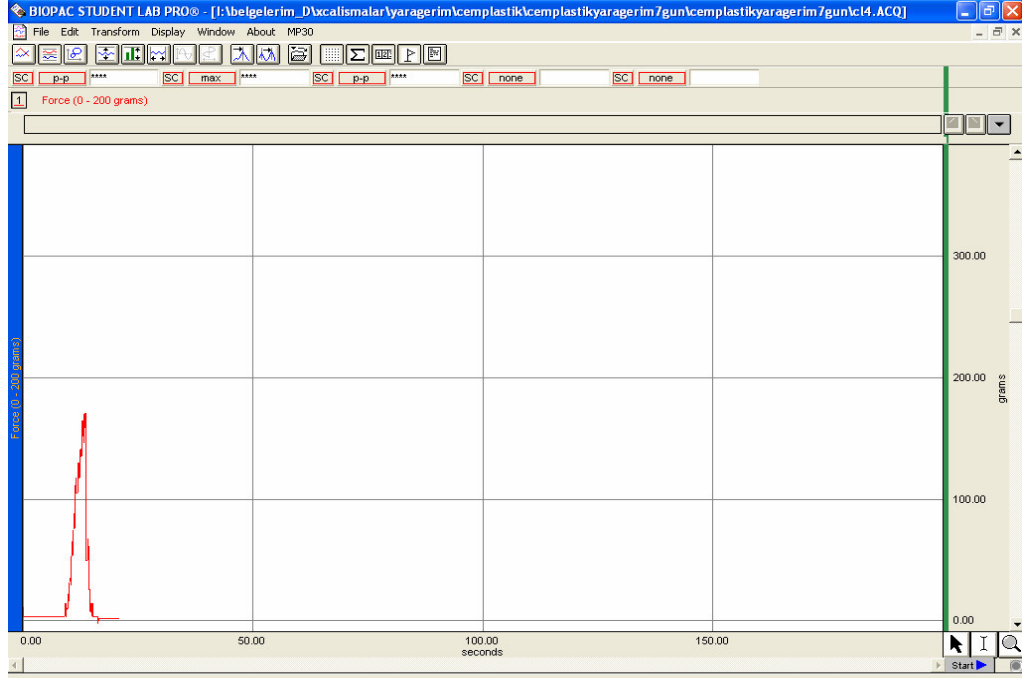
Şekil 8: AutoCAD ile yara yüzey alanı ölçümü

2.6. Yara Kopma Kuvveti Ölçümü

Yara kopma kuvvetini değerlendirmek için biyomekanik ölçümler Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Yara kopma kuvvetinin ölçümü için özel olarak hazırlanmış düzeneğe deri kesitinin uçlarını tutturmak için biri düzeneğin güç çevirgecine diğeri sabit tarafına SSLA12-S-Hooks tipi çengellerle bağlı dişli iki kısıkaç (kısıkaç genişliği 0,5 cm), Biopac MP30 veri kayıt birimine bağlı May IOBS 99 FDT10-A (Commat Ltd., Ankara) tipi bir güç çevirgeci, güç çevirgecinin takılı olduğu deri kesitini sabit hızda gererek kopartmak için bir mikrovidadan oluşmakta idi. Bilgisayar yazılımı olarak Biopac Student Lab Pro v. 3.6.7 programı kullanıldı. Güç çevirgecine uygulanan kuvveti ölçmek için Biopac Student Lab Pro programında bir kanal güç çevirgeci için ayarlandı. Ölçümler öncesinde kısıkaç ve kısıkaçın bağlı olduğu çengel güç çevirgecine takılarak gösterilen ağırlık 0 grama ayarlanmak suretiyle ağırlık etkisi giderildi. Daha sonra 5, 10 ve 20 şer gramlık ağırlıklar güç çevirgecine bağlanmak suretiyle kalibrasyonlar yapıldı. 5 ölçümde bir kalibrasyon tekrarlandı.

Ölçümler insizyon bölgesi uzun kenarın tam ortasına gelmek kaydıyla şerit şeklinde kesilen 1 cm uzunlukta ve 0,5 cm enindeki deri, deri altı kesitlerinden alındı. Alınan kesit kısıkaçlar vasıtasıyla uçlarından ölçüm düzeneğine bağlandı. Kayıt başlatıldıktan sonra mikrovida 20 mm/dk. lık sabit hızda yaranın her iki tarafı birbirinden ayrılıp kopana kadar çevrildi. Gerilmenin tepe noktası olan max. değer programdan okunarak kaydedildi (Şekil 9). Her kesitin alanı 0.5 cm^2 (en x boy= 0.5

$x_1=0.5$) olduğu için tepe değeri 2 ile çarpılarak g/cm^2 cinsinden yara kopma kuvveti hesaplandı. Ölçümler fizyoloji uzmanı tarafından kör olarak yapıldı.



Şekil 9: gerilmenin tepe noktasını ölçen program.

2.7. İstatiksel Değerlendirme Metodları

Deneklerin sırtındaki defektlerin alanlarının ölçüm değerleri ve her bir günde ayrı ayrı yara kopma kuvveti (YKK) ölçümleri bakımından grupların karşılaştırılmasında basit varyans analizi kullanıldı. Farklı olan gruplar Tukey post-Hoc testi ile belirlendi. P değerleri 0.05'ten küçük ise sonuç istatistik olarak anlamlı kabul edildi. Hesaplamalarda SPSS (ver. 11.5) programı kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Yüzey Alan Bulguları

Grup 1:

Bu Grupta PO 3. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n = 15);

Ortalama yara boyutu: $0.89 \pm 0.19 \text{ cm}^2$,

Minimum yara boyutu: $0,56 \text{ cm}^2$,

Maksimum yara boyutu: $1,26 \text{ cm}^2$ olarak tespit edildi.

PO 5. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=11);

Ortalama yara boyutu: $0.77 \pm 0.22 \text{ cm}^2$,

Minimum yara boyutu: $0,50 \text{ cm}^2$,

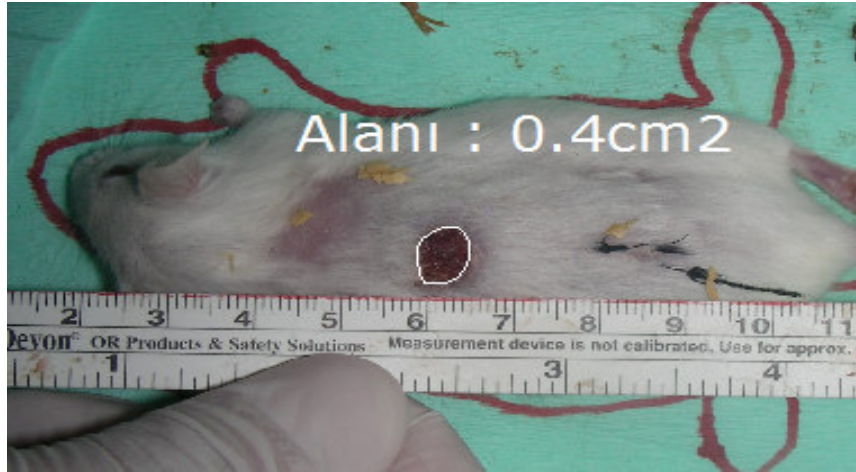
Maksimum yara boyutu: $1,06 \text{ cm}^2$ olarak tespit edildi.

PO 7. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=6) (Şekil 10);

Ortalama yara boyutu: $0.46 \pm 0.12 \text{ cm}^2$,

Minimum yara boyutu: $0,34 \text{ cm}^2$,

Maksimum yara boyutu: $0,65 \text{ cm}^2$ olarak tespit edildi.



Şekil 10: Grup 1'deki bir deneğin PO 7.gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.

Grup 2 :

Bu Grupta PO 3. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n = 15);

Ortalama yara boyutu: $01,37 \pm 0.37 \text{cm}^2$,

Minimum yara boyutu: $0,78 \text{cm}^2$,

Maksimum yara boyutu: $2,14 \text{cm}^2$ olarak tespit edildi.

PO 5. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=11);

Ortalama yara boyutu: $1,43 \pm 0.37 \text{cm}^2$,

Minimum yara boyutu: $1,07 \text{cm}^2$,

Maksimum yara boyutu: $2,10 \text{cm}^2$ olarak tespit edildi.

PO 7. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=6) (Şekil 11);

Ortalama yara boyutu: $0.89 \pm 0.22 \text{cm}^2$,

Minimum yara boyutu: $0,70 \text{cm}^2$,

Maksimum yara boyutu: $1,20 \text{cm}^2$ olarak tespit edildi.



Şekil 11: Grup 2'deki bir deneğin PO 7.gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.

Grup 3:

Bu Grupta PO 3. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n = 15);

Ortalama yara boyutu: $1,14 \pm 0.37 \text{cm}^2$,

Minimum yara boyutu: $0,59 \text{cm}^2$,

Maksimum yara boyutu: 1,89cm² olarak tespit edildi.

PO 5. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=11);

Ortalama yara boyutu: 1,20±0.23cm²,

Minimum yara boyutu: 0,90cm²,

Maksimum yara boyutu: 1,70cm² olarak tespit edildi.

PO 7. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=6) (Şekil 12);

Ortalama yara boyutu: 0.76±0.15 cm²,

Minimum yara boyutu: 0,50 cm²,

Maksimum yara boyutu: 0,88 cm² olarak tespit edildi.



Şekil 12: Grup 3'deki bir deneğin PO 7. gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.

Grup 4 :

Bu Grupta PO 3. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n = 16);

Ortalama yara boyutu: 1,06±0.19cm²,

Minimum yara boyutu: 0,58cm²,

Maksimum yara boyutu: 1,50cm² olarak tespit edildi.

PO 5. gündeki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=12);

Ortalama yara boyutu: 0.78±0.11 cm²,

Minimum yara boyutu: 0,63 cm²,

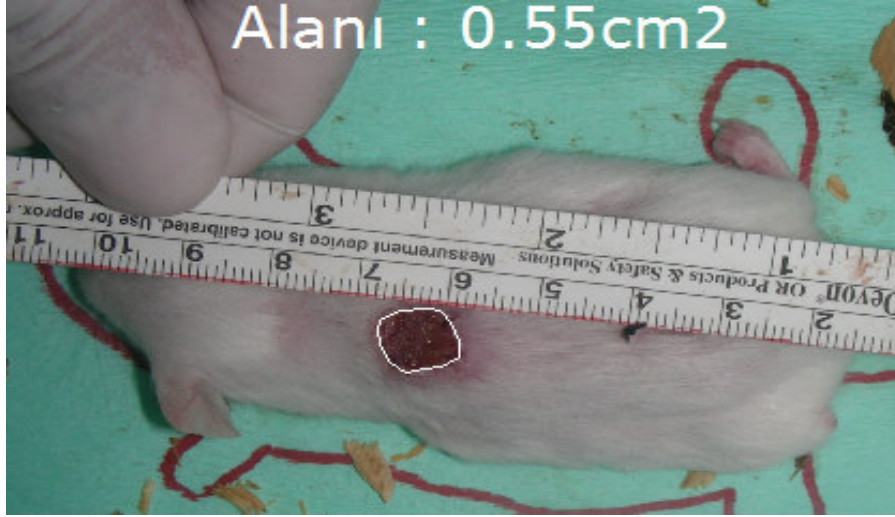
Maksimum yara boyutu: 1,0 cm² olarak tespit edildi.

PO 7. günde ki yüzey alanları ölçümü sonucunda (n=7)(Şekil 13);

Ortalama yara boyutu: 0.50±0.21 cm²,

Minimum yara boyutu: 0,33 cm²,

Maksimum yara boyutu: 0,90 cm² olarak tespit edildi.



Şekil 13: Grup 4'deki bir deneğin PO 7.gündeki ölçümü yapılmış yara yerinin görünümü.

3.2. Gruplardaki Yara Kopma Kuvvetleri

Grup 1:

PO 5. gün yapılan ölçümlerde (n=4):

Ortalama: 159,24 ± 64,11 gr/cm²,

Minimum: 108,16 gr/cm²,

Maksimum: 243,83 gr/cm² olarak tespit edildi.

PO 7. gün yapılan ölçümlerde (n=6):

Ortalama: 626,71 ± 294,17 gr/cm²,

Minimum: 238,58 gr/cm²,

Maksimum: 1013,95 gr/cm² olarak tespit edildi.

Grup 2:

PO 5. gün yapılan ölçümlerde (n=4):

Ortalama: $111,59 \pm 24,68 \text{ gr/cm}^2$,

Minimum: $80,20 \text{ gr/cm}^2$,

Maksimum: $138,90 \text{ gr/cm}^2$ olarak tespit edildi.

PO 7. gün yapılan ölçümlerde (n=6):

Ortalama: $345,29 \pm 164,35 \text{ gr/cm}^2$,

Minimum: $102,55 \text{ gr/cm}^2$,

Maksimum: $527,03 \text{ gr/cm}^2$ olarak tespit edildi.

Grup 3:

PO 5. gün yapılan ölçümlerde (n=4):

Ortalama: $119,76 \pm 35,39 \text{ gr/cm}^2$,

Minimum: $100,36 \text{ gr/cm}^2$,

Maksimum: $172,79 \text{ gr/cm}^2$ olarak tespit edildi.

PO 7. gün yapılan ölçümlerde (n=6):

Ortalama: $393,09 \pm 98,92 \text{ gr/cm}^2$,

Minimum: $219,32 \text{ gr/cm}^2$,

Maksimum: $517,09 \text{ gr/cm}^2$ olarak tespit edildi.

Grup 4:

PO 5. gün yapılan ölçümlerde (n=4):

Ortalama: $107,24 \pm 39,25 \text{ gr/cm}^2$,

Minimum: $69,95 \text{ gr/cm}^2$,

Maksimum: $146,08 \text{ gr/cm}^2$ olarak tespit edildi.

PO 7. gün yapılan ölçümlerde (n=7):

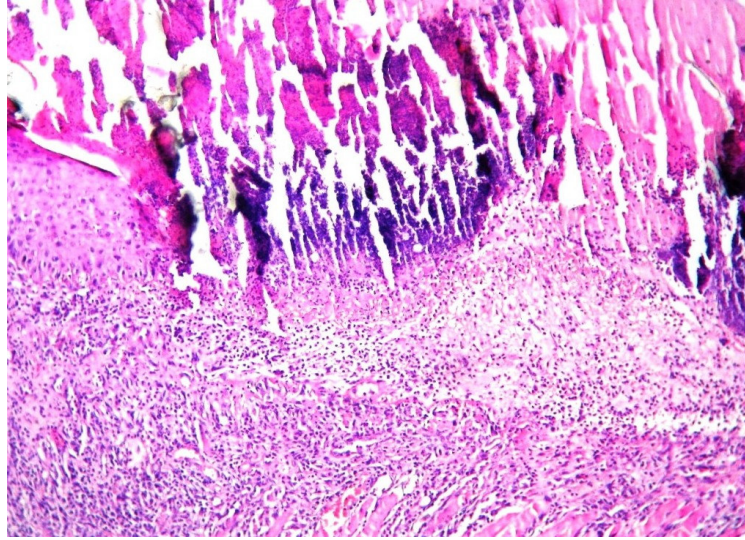
Ortalama: $578,02 \pm 111,28 \text{ gr/cm}^2$,

Minimum: $442,88 \text{ gr/cm}^2$,

Maksimum: $770,77 \text{ gr/cm}^2$ olarak tespit edildi.

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik olarak ışık mikroskopisinde değerlendirilen yara alanlarına ait deri-deri altı doku örneklerinde PO 1. gün değerlendiriliğinde grup 1’de yara yerinde ülserasyon, nötrofillerden zengin inflamasyon ile birlikte abse oluşumlarının varlığı izlenmiştir (Şekil 14). Aynı histolojik bulguların grup 2’de grup 1 göre görece daha şiddetli olduğu; grup 3’te ise hem grup 1’e hem de grup 2’ye göre daha hafif derecede gözlemlendiği dikkati çekmektedir. Grup 4’te ise ülserasyon ve nötrofillerden zengin inflamatuvar reaksiyon grup 1’e oranla daha yoğun olarak görülmüştür.

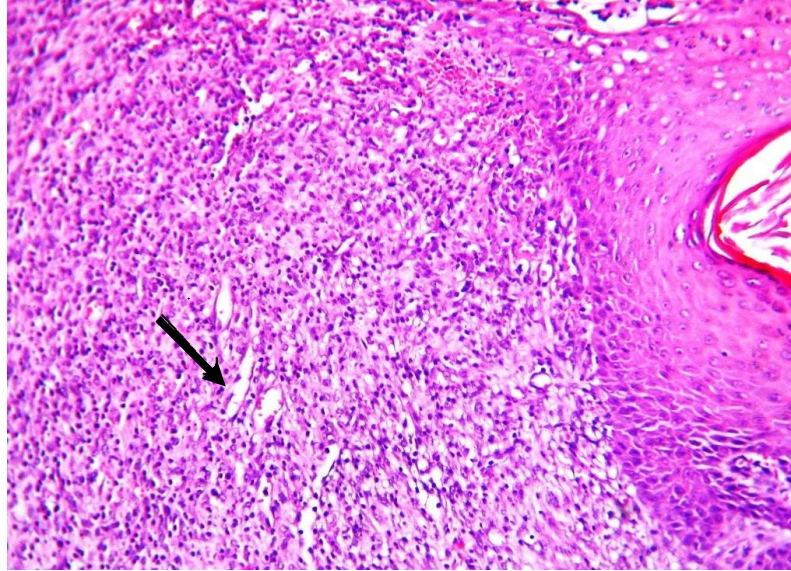


Şekil 14: Grup 1 PO1. günde resmin sol tarafında sağlam epidermin izlendiği yara yerinde yüzeyde nötrofillerden zengin eksüda karakterinde inflamasyon ile birlikte ülserasyon izlenmektedir (H&E, X100).

PO3. günde tüm gruplarda inflamatuvar reaksiyonun ve ülserasyonun yaygınlığı ve şiddeti PO1. günde tüm gruplara göre daha az yoğunlukta olup, ek olarak PO3. günde fibroblast ve damar proliferasyonu izlenmiştir. PO3. günde gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında grup 1 ile grup 4 arasında ve grup 2 ile grup 3 arasında farklılık olmadığı ayrıca grup 1 ile grup 4’te, grup 2 ile grup 3’e göre daha az inflamasyon ve daha sınırlı ülser alanları içerdiği, buna karşın daha çok fibroblast ve damar proliferasyonu gösterdiği saptanmıştır.

Benzer şekilde PO5. günde tüm gruplar PO3. günde kendi gruplarıyla karşılaştırıldığında PO5. günde tüm gruplar PO3. günde kendi gruplarına göre **daha az** ülserasyon ve inflamasyon ile birlikte **daha fazla** damar ve fibroblast proliferasyonu içermektedir.

PO 5. günde gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise grup 1 en az inflamasyon ve ülserasyonun, buna karşın en çok damar ve fibroblast proliferasyonu içeren grup olarak görülmektedir (Şekil 15). Grup 4 bu histolojik olarak özellikler açısından grup 1'den ülserasyon ve inflamasyonun biraz daha fazla olmasıyla ayrılmaktadır. Histolojik görünümün benzer olduğu grup 2 ve grup 3'te ise inflamatuvar bulgular diğer iki gruba göre daha şiddetlidir.

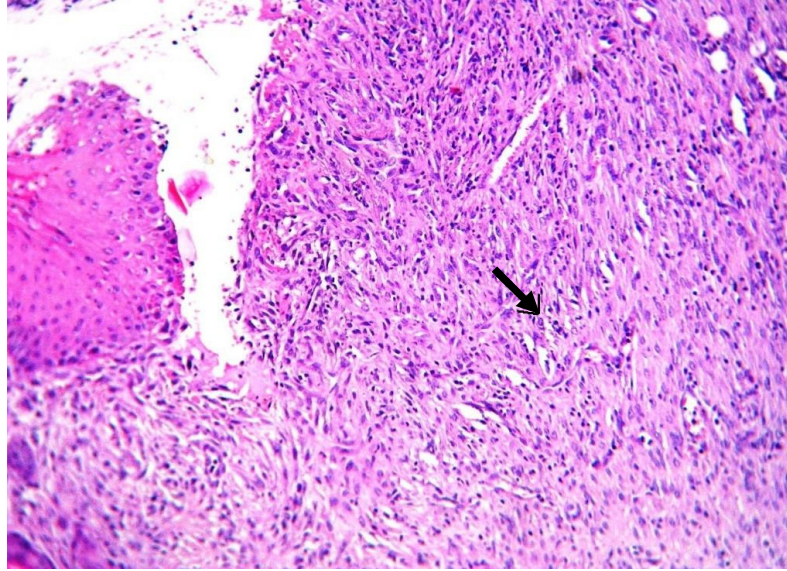


Şekil 15: Grup 1'deki deneğin PO5. gündeki preparatı grup 1'in PO1. gün preparatı ile karşılaştırıldığında inflamatuvar reaksiyonu oluşturan hücrelere nötrofillerin yanı sıra çok sayıda lenfositlerin ve makrofajların katıldığı, fibroblastik aktivite ile kısmen damar proliferasyonunun (okla gösterilmiştir) bu inflamasyona eşlik ettiği dikkati çekmektedir (H&E,X200).

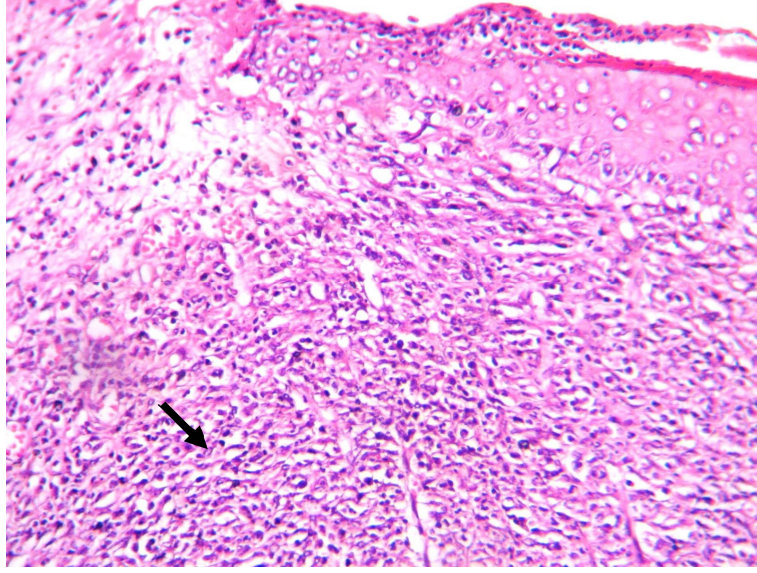
PO7. günde tüm gruplardaki doku örnekleri, önceki tüm günlerdeki kendi gruplarıyla karşılaştırıldığında, PO7. günde dokularda daha az ülserasyon ve

inflamasyon, buna karşılık daha çok damar ve fibroblast proliferasyonu ile karakterizedir.

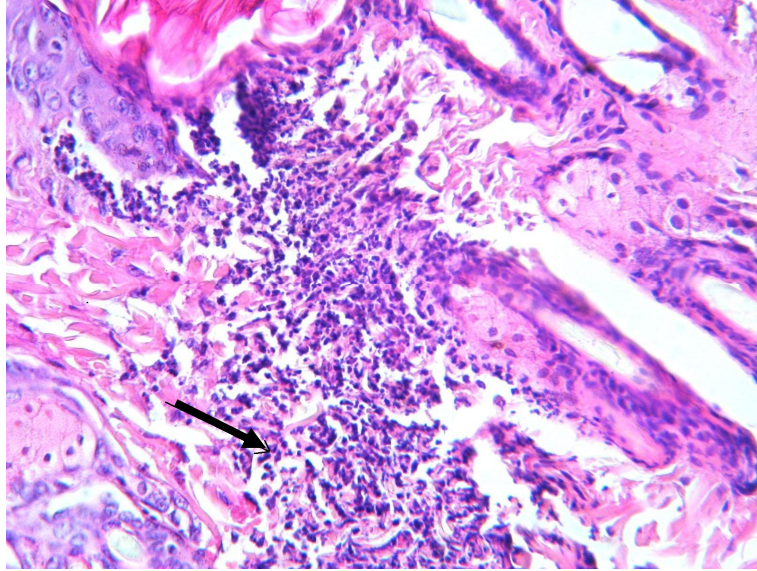
PO7. günde 4 grup karşılaştırıldığında histolojik görünümünün yoğunluğu açısından PO5. gün ile benzer dağılım özelliği göstermiştir. Grup 1 inflamasyon ve ülserasyonun en az (Şekil 16), buna karşın damar ve fibroblast proliferasyonunun en çok görüldüğü gruptur. Grup 4'te inflamasyon daha yoğun olarak izlenirken (Şekil 17) grup 2 (Şekil 18) ve grup 3'te (Şekil 19) ise en yoğundur.



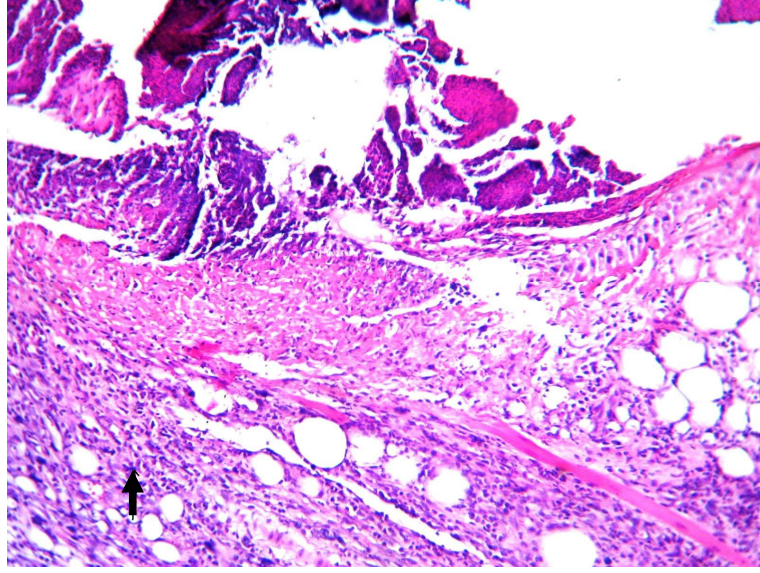
Şekil 16: Grup 1'de PO7. günde grubunda inflamatuvar reaksiyonun daha çok mononükleer hücrelerden oluştuğu, azalan inflamatuvar zeminde fibroblastik aktivite ile damar proliferasyonunun (okla gösterilmiştir) daha belirgin hale geldiği görülmektedir (H&E, X200).



Şekil 17: PO7. günde grup 4'te grup 1'e oranla mononükleer hücrelerden daha zengin inflamatuvar reaksiyon (okla gösterilmiştir) ile daha sınırlı düzeyde fibroblast aktivite ile damar proliferasyonu izlenmektedir (H&E, X200).



Şekil 18: PO7. günde grup 2'de ülser alanında yoğun nötrofil içeren inflamatuvar hücre reaksiyonu (okla gösterilmiştir) izlenmektedir (H&E, X400).



Şekil 19: PO7. günde grup 3'te fibrinoid nekroz ile yoğun nötrofilik inflamatuvar reaksiyon (okla gösterilmiştir) ve sınırlı fibroblastik aktivite izlenmektedir (H&E, X200).

İmmünohistokimyasal incelemede tüm günlerdeki preperatlarda grup 3 ve grup 4'te grup 1 ve grup 2 ile karşılaştırıldığında karaciğerde Kupfer hücrelerinin ve dalak sinüzoidlerinde makrofaj yoğunluğunun belirgin derecede azaldığı gözlemlendi (Şekil 6,7).

3.4. İstatistiksel Bulgular

3.4.1. Yara Boyutu Ölçümlerinin İstatistiksel Bulguları

Operasyondan sonra 3., 5, 7. günlerde Gruplarda canlı flep alan yüzdeleri ölçülüp, istatistiksel analizleri yapıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Grupların günlere göre yara boyutu ölçüm sonuçları

Günler	Gruplar	N	Ortalama±SD	Min - Max	P
3.gün	1	15	0.89±0.19	0.56-1.26	<0.0001
	2	15	1.37±0.37	0.78- 2.14	
	3	15	1.14±0.3	0.59- 1.89	
	4	15	1.06±0.19	0.68- 1.50	
5.gün	1	11	0.77±0.22	0.50- 1.06	0.001
	2	11	1.43±0.37	1.07- 2.10	
	3	11	1.20±0.23	0.90- 1.70	
	4	11	0.78±0.11	0.63- 1.00	
7.gün	1	6	0.46±0.12	0.34- 0.65	<0.0001
	2	6	0.89±0.22	0.70- 1.20	
	3	6	0.76±0.15	0.50- 0.88	
	4	6	0.50±0.21	0.33- 0.90	

3.4.1.1. Postoperatif 3. günde

Yara boyutu bakımından grup 1'in grup 2'den anlamlı düzeyde küçük olduğu görüldü ($P<0.0001$) ancak grup 1 ile grup 3 ve grup 4 arasında anlamlı fark yoktur. Ayrıca grup 2'nin grup 4'ten anlamlı düzeyde daha büyük olduğu görüldü ($P<0.0001$). Buna karşın grup 3 ile diğer gruplar arasında anlamlı farkının olmadığı belirlenmiştir. Grup 4 ise grup 2'den küçük yara boyutuna sahipti ($P<0.0001$).

3.4.1.2. Postoperatif 5. günde

Grup 1, anlamlı olarak grup 2 ve grup 3'ten düşüktür ($P=0.001$). Grup 4 (MD) ile arasında anlamlı fark yoktur.

Grup 2 ise anlamlı olarak grup 4'ten büyük yara boyutuna sahiptir ($P=0.001$), grup 3 ile arasında anlamlı fark yoktur. Ayrıca grup 3'ün yara boyutu anlamlı olarak grup 4 'ten büyüktür ($P=0.001$).

3.4.1.3. Postoperatif 7. günde

Yara boyutu açısından grup 1'in yaraları, anlamlı olarak grup 2 ve grup 3'ten küçüktür ($P<0.0001$). Grup 4 ile arasında anlamlı fark yoktur. Grup 2'nin ise grup 4'den anlamlı olarak büyük yara boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir ($P<0.0001$), grup 3 ile arasında anlamlı fark yoktur. Grup 3, grup 4'ten de anlamlı farklılık göstermemektedir.

Sonuç olarak;

PO 3. günde; grup 1'in yaraları anlamlı olarak grup 2'den daha çok kapanmıştır ancak grup 1 ile grup 3 ve grup 4 arasında anlamlı fark yoktur. Grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı fark yokken grup 2 ile grup 4 arasında anlamlı fark vardır dolayısıyla kontrol grubundan sonra en iyi yara iyileşmesi grup 4 ile grup 3'de olmuştur.

PO 5. günde grup 1 ile grup 4 arasında anlamlı fark yoktur ancak grup 1'deki deneklerin yaraları grup 2 ve grup 3'ten anlamlı olarak daha çok kapanmıştır. Grup 4'ün deneklerinin yaraları grup 2 ve grup 3'ten anlamlı olarak daha çok kapanmıştır. PO 3. güne göre daha net görülen bir şekilde grup 1 ve grup 4'teki deneklerinin yaraları anlamlı olarak grup 2 ve grup 3'ten daha çok kapanmıştır.

PO 7. günde grup 1'deki deneklerin yaraları anlamlı olarak grup 2 ve grup 3'ten iyi kapanmıştır ancak grup 4 ile arasında fark yoktur.

Dolayısıyla en iyi iyileşen 2 grup, grup 1 ve grup 4'tür ancak Grup 3 ile Grup 2 ve Grup 4 arasında anlamlı fark yoktur.

3.4.2. Yara Kopma Kuvveti (YKK) Ölçümlerinin İstatistiksel Bulguları

Yara kopma kuvveti (YKK) ölçümlerinin istatistiksel bulguları tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Grupların günlere göre ortalama yara kopma kuvvetleri ve standart deviasyonları verilmiştir (gr/cm2).

Gruplar	5. gün Ortalama±SD	7.gün Ortalama±SD
Grup 1	159,24±64,11	626,71±294,17
Grup 2	111,59±24,68	345,29±164,35
Grup 3	119,76±35,39	393,09±98,92
Grup 4	107,24±39,25	578,02±111,28

3.4.2.1. PO 5. günde

Gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (P=0.351).

3.4.2.2. PO 7. günde

Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (P<0.05) ancak Grup 1 ile Grup 4 arasında anlamlı fark yoktur.

Grup 2 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ve daha kolay koptuğu söylenebilir (P<0.05), Grup 2 ile Grup 3 arasında anlamlı fark yoktur. Ayrıca diğer grup farklılıkları da anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak suture edilmiş insizyonu en zor kopan dolayısı ile en iyi iyileşen grup, Grup 1'dir. Bu grubu grup 4 izlemektedir denilebilir. Grup 3 ve Grup 2 arasında anlamlı fark yoktur.

Histopatolojik değerlendirme bulguları, YKK ve yara alan ölçümünün sonuçlarının istatistiksel değerlendirmelerini desteklemektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Diyabetik hastaların en sık hastaneye başvurma ve yatış nedeni diyabetik yaralardır ⁽⁴⁾. Alt ekstremitte amputasyonu yapılan hastaların yaklaşık %40 - %60'ını diyabetik hastalar oluşturmaktadır. Amputasyonların % 85'inden fazlasında derin ayak yarası üzerinde gelişmiş infeksiyon ve gangren vardır ⁽⁴⁾. Diyabetik yaraların sadece 2/3'ü tam iyileşmektedir ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. Diyabetik ayak yaralarının %28'den fazlası amputasyonla sonuçlanmaktadır ⁽⁷⁰⁾.

Diyabetli hayvan ve insan modellerinde yapılan çalışmalar DM hastalığının yara iyileşmesinin her evresini (hemostaz, inflamasyon, migrasyon ve proliferasyon, kollajen sentezi, kollagenaz sentezi, yeniden yapılanma) olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir ⁽⁷¹⁻⁷³⁾. DM' de hücrelerin morfolojik yapılarında, proliferasyonlarında ve fonksiyonlarında farklılıklar oluşur ⁽⁷⁴⁾. Kollajen sentezi ve salınımı azalır ⁽⁷⁵⁾. Hücrelerarası matriks elemanlarının yıkımından sorumlu olan MMP'lar artar ⁽⁵¹⁾. Bu süreçlerin sonucunda yara iyilemesi sekteye uğrar.

Son yıllarda teknolojinin de ilerlemesiyle DM hastalığında makrofajların yara iyileşmesine etkisi irdelenmeye başlanmış ve literatüre pek çok detaylı bilgi kazandırılmıştır. Sonuçlar bildirilmiştir ^(12,44,53,76). Biz araştırmamızda yara iyileşmesinin en önemli hücrelerinden olan makrofajları hedef aldık ve makrofaj deplesyonunun diyabetik yaralar üzerine etkisini araştırdık.

Çalışmamızda denekleri diabetize ederken literatürde önerilen Alloksan (SIGMA) kullanıldı ^(57,77,78). Literatürde önerildiği üzere diabetize edilecek gruplarda denek sayısını diğer grup sayılarının üzerinde tutuldu ⁽⁵⁷⁾. Diyabetize edilmeye çalışılan 40 hayvandan 1'i öldü 6'sı ise diyabetik hale getirilemedi ve çalışmadan çıkarıldı. Bu nedenle biz de alloksan diyabeti planlanan çalışmalarda diabetize edilecek grupların planlanan denek sayısından yüksek tutulmasını öneriyoruz.

Makrofaj deplesyonu için van Rooijen ve arkadaşlarının tanımladığı lipozomal klodronat kullanıldı ^(60,61). Lipozomal klodronatla çalışmamızın nedeni, literatürde ispatlandığı üzere diğer hücreleri etkilemeden "selektif makrofaj deplesyonu" yapmasıdır ^(60,65,79). Yayınlarında önerilen dozlardan kuyruk veninden farelere uygulandı ve istenilen gruplarda makrofaj deplesyonu sağlandı ⁽⁸⁰⁾. Makrofaj

depleasyonu makrofaj spesifik immunohistokimyasal CD68 boyası ile dalak ve karaciğer preparatları boyanarak ispat edildi.

Çalışmamızın sonucunda son dönemlerde literatürde yapılan çalışmaların büyük bir kısmını destekleyici sonuçlar elde edildi.

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarını istatistiksel veriler ışığında günlere göre değerlendirdiğimizde;

A- PO 3. günde;

i) Yara alanı değerlendirmesinde; PO 3. günde grup 1'in yaraları anlamlı olarak grup 2'den daha hızlı kapanmıştır ancak grup 1 ile grup 3 ve grup 4 arasında anlamlı fark yoktur. Grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı fark yokken grup 2 ile grup 4 arasında anlamlı fark vardır dolayısıyla kontrol grubundan sonra en iyi yara iyileşmesi grup 4 ile grup 3'de olmuştur.

ii) Histopatolojik incelemede; gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında grup 1 ile grup 4 arasında ve grup 2 ile grup 3 arasında farklılık olmadığı ayrıca grup 1 ile grup 4'te grup 2 ile grup 3'e göre daha az inflamasyon ve daha sınırlı ülser alanları içerdiği, buna karşın daha çok fibroblast ve damar proliferasyonu gösterdiği saptandı. Yara boyutu ölçümleri ile histopatolojik değerlendirme sonuçlarının hemen hemen paralel seyrettiği görüldü.

Sonuç olarak PO 3. günde en hızlı iyileşme kontrol grubunda (grup 1) olmuştur. Bu grubu kombine diyabetik ve makrofaj depleasyonu yapılan grupla (grup 4), izole klodronat ile makrofaj depleasyonu yaptığımız grup (grup 3) takip etmiştir. En yavaş iyileşme izole diyabetik grupta (grup 2) olmuştur.

PO 3. günde en iyi iyileşen grup kontrol grubu olmasına rağmen istatistiksel olarak sadece grup 2 ile arasında anlamlı fark bulunması, grup 3 ile arasında anlamlı fark bulunmaması tarafımızca doğal karşılanmıştır. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi DM'nin moleküler ve hücresel fizyolojiyi bozarak yara iyileşmesinin tüm fazlarını etkilediği düşünülmektedir (14). Bu nedenle izole diyabetik olan grup 2'nin diğer grupları erken dönemde bile geriden takip etmesi beklenen bir tablo olmuştur.

B- PO 5. günde;

i) Yara alanı değerlendirmesinde; gruplar arası farklar yavaşça netleşmeye başlamıştır. Grup 1 ile grup 4 arasında anlamlı fark yoktur ancak grup 1'deki deneklerin yaraları grup 2 ve grup 3'ten anlamlı olarak daha çok kapanmıştır. Grup

4'ün deneklerinin yaraları grup 2 ve grup 3'den anlamlı olarak daha çok kapanmıştır.

PO 3. güne göre daha net görülen bir şekilde grup 1 ve grup 4'teki deneklerinin yaraları anlamlı olarak grup 2 ve grup 3'ten daha çok kapanmıştır.

ii) Yara kopma kuvveti değerlendirmesinde; PO 5. günde gruplar arasında yara kopma kuvveti açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

iii) Histopatolojik incelemede; bulgular yara boyutu sonuçlarına paralel seyretmiştir. Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında grup 1 en az inflamasyon ve ülserasyonun, buna karşın en çok damar ve fibroblast proliferasyonu içeren grup olarak görülmektedir (Şekil 15). Grup 4, bu histolojik olarak özellikler açısından grup 1'den ülserasyon ve inflamasyonun biraz daha fazla olmasıyla ayrılmaktadır. Histolojik görünümün benzer olduğu grup 2 ve grup 3'te ise inflamatuvar bulgular diğer iki gruba göre daha şiddetlidir.

Sonuç olarak PO 5. günde de en hızlı iyileşme kontrol grubu (grup 1) ile kombine diyabetik ve makrofaj depleksyonu yaptığımız grupta (grup 4) görülmüştür.

C- PO 7. günde;

Geride kalan tüm deneklerin sakrifiye edilip çalışmanın bitirildiği PO 7. günde tablo net olarak oturmuş ve gruplar arasındaki farklar belirginleşmiştir.

i) Yara alanı değerlendirmesinde; grup 1'deki deneklerin yaraları anlamlı olarak grup 2 ve grup 3'ten iyi kapanmıştır ancak grup 4 ile arasında fark yoktur.

ii) Yara kopma kuvveti değerlendirmesinde; **grup 1 ile grup 2 ve grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($P<0.05$) ancak grup 1 ile grup 4 arasında anlamlı fark yoktur.** Grup 2 ile grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ve daha kolay koptuğu söylenebilir ($P<0.05$), grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı fark yoktur.

iii) Histopatolojik incelemede; bulgular diğer değerlendirmeler destekler niteliktedir. Grup 1 inflamasyon ve ülserasyonun en az (Şekil 16), buna karşın damar ve fibroblast proliferasyonunun en çok görüldüğü gruptur. Grup 4'te inflamasyon biraz daha yoğun olarak izlenirken (Şekil 17) grup 2 (Şekil 18) ve grup 3'de (Şekil 19) ise en yoğundur.

Veriler, çalışmanın sonucunda beklendiği üzere, en iyi iyileşen grubun kontrol grubu (grup 1) olduğunu göstermektedir. Ancak kontrol grubundan sonra en iyi iyileşen grup hem diyabetik hem de makrofaj depleksyonu olan grup 4'dür. Geriye

kalan 2 grup (grup 2 ve grup 3) en kötü iyileşen gruplardır. Hem diyabetik hem de makrofaj depleksyonu olan grubun bu iki gruptan her bakımdan daha iyi iyileşmesi oldukça ilgi çekicidir. Ancak son yıllarda literatürde yayınlanan makalelerde aşağıda bahsettiğimiz üzere sonuçlarımızı destekler tespitler mevcuttur.

Monositler çeşitli kimyasal uyarılarla makrofaja dönüşürler. Riches 1996 yılında yara iyileşmesinde görevli 3 çeşit makrofaj tanımlamıştır. Bunlar sitosidal, inflamatuvar ve onarıcı makrofajlardır. Monositlerin 1,3- β -glukan varlığında inflamatuvar makrofaja, hyaluran varlığında onarıcı makrofaja ve poliinosinat-polisitilata cevap olarak öldürücü olan ve bakteri ile debrisleri temizleyen sitosidal makrofajlara dönüştüğünü yayınlamıştır ⁽⁸¹⁾.

Bu 3 farklı tipteki makrofajlar farklı sitokinler salgılamaktadır. Singer ve Clark 1999 yılında inflamatuvar makrofajların PDGF salgıladığını ⁽⁶²⁾ ve Robson ve ark ⁽⁸²⁾, yine inflamatuvar makrofajların TGF- β ve FGF salgıladığını tespit etmiş. Onarıcı makrofajlardan ise insulin-like growth faktör (ILGF) ile PDGF salgıladığı tespit edilmiştir. ^(62,82).

Yukarıda bahsi geçen iki çalışmaya paralel olarak 2006 yılında Waugh H.V. ve Sherratt J.A. tarafından yayınlanan makalede DM'ta makofaj dinamikleri incelenmiştir. Normal yara sürecinde makrofajlar bir süre sora yara yerinde yok denecek seviyeye inerken DM'ta makrofajların persistan kaldığını fark etmişlerdir. Bu yazarlara göre inflamatuvar makrofajlardan TGF- β 'nın aşırı salınması sonucu yeniden inflamatuvar makrofajlar oluşmakta ve sonucunda bir "kısır döngü" meydana gelmektedir. Dolayısıyla onarıcı ve inflamatuvar makrofajlar arasında inflamatuvar makrofajlar lehine dengenin bozulduğu ve sonucunda DM'li yara da kronik inflamasyon süreci oluşturduğu buna bağlı yara iyileşmesinin gecikebileceği ve bozulabileceği iddia edilmiştir ⁽¹²⁾.

Çalışmamızda yukarıdaki iddiaları destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Lipozomal klodronat etkisiyle artık yara yerinde olmaması gereken persistan inflamatuvar makrofajlar elimine edilip kronik inflamasyon zeminini oluşturan "kısır döngü"nün belirli bir ölçüde kırılmış olabileceği ileri sürülebilir. Çünkü makrofaj depleksyonu yapılan diyabetik grup olan grup 4'ün yara iyileşmesi hem makroskopik hem de histopatolojik açıdan grup 2'den daha iyi olmuştur.

Yine Wetzler ve ark.'ları diyabetik yaralarda normal yaralara göre çok daha fazla MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) ve MCP-1(macrophage chemoattractive protein-1) salındığını göstermiştir. Bunlarda aşırı makrofaj salınımına neden olmaktadır⁽⁴⁴⁾.

Greenhalgh ve ark. yaptığı bir çalışmada diyabetik farelerde yara yerinde zayıf selülarite, azalmış anjiogenez olduğu ve granülasyon dokusu formasyonu ile re-epitelizasyonda belirgin gecikme olduğu belirtilmiştir⁽⁸³⁾. Yapılan başka bir çalışmada makrofaj anti-serumu ile makrofaj deplesyonu yapılmış ve yara iyileşmesinin diyabetik yaralara benzer şekilde bozulduğu (yara yerinde zayıf selülarite, azalmış anjiogenez olduğu ve granülasyon dokusu formasyonu ile re-epitelizasyonda belirgin gecikme) tespit edilmiştir⁽⁸⁴⁾.

Çalışmamızda da yukarıdaki çalışmaları destekler nitelikte en kötü yara iyileşmesi grup 2 ve grup 3'te olmuştur. Ayrıca makrokobik açıdan, YKK açısından ve histopatolojik değerlendirme bakımından bu 2 grup arasında anlamlı fark görülmemiştir.

Loots ve ark.'nın yaptığı farklı bir çalışmada ise makrofajların yara iyileşmesinin başında olaya katılan bir hücre olduğu ve inflamasyon fazından proliferatif faza geçişte önemli rol oynadığı vurgulanmıştır. Diyabetik yaralarda makrofajların bol miktarda yara sınır bölgelerinde bulunduğu ancak yarayı proliferatif faza yönlendiremediği saptanmıştır. Ayrıca yara kenarında çok miktarda ve uzun süreli bulunmalarına rağmen fagositoz özelliğinin arttığına yada devam ettiğine dair herhangi bir kanıt bulamamışlardır⁽⁸⁵⁾. Bu bulguları bizim çalışmamızın sonucu desteklemektedir. Diyabetli farede görevi yapamayan çok sayıda makrofaj lipozomal klodronat yardımıyla apoptoza uğratarak yara iyileşmesine katkı sağlandığını düşünmekteyiz.

Goren ve ark. ise diyabetik farelerde yara yerinde ve kenarında çok sayıda makrofaj olduğunu ancak bu makrofajların inaktif durup işe yaramadığını vurgulamıştır. İnaktif durmalarını ise makrofajların yüzey reseptörlerinde “down-regulasyon” meydana gelmesiyle açıklamışlardır⁽⁷⁶⁾.

Zykova ve ark.'na göre diabetes mellitusta uzun süreli hiperglisemi inflamatuvar süreçteki hücrel aktiviteyi zayıflatır. Daha spesifik olarak, makrofajların morfolojisi değişir ve fonksiyonunun bozulduğu görülür⁽⁵³⁾. Aynı çalışmada in vitro

koşullarda genetik olarak diyabetik farelerde makrofajlardan TNF- α , IL-1 β ve VEGF salınımının azaldığı aksine NO salınımının arttığı iddia edilmiştir ⁽⁵³⁾. Bu durumun çalışmamızdaki diyabetik grupta da gözlemlendiği üzere yara iyileşmesini bozduğu düşünülmektedir.

Wetzler ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise diyabetli farelerde normal yara iyileşmesi olan normal fareler göre uzun süreli IL- β ve TNF- α salınımı tespit edilmiş. Normal yarada 5. günde bu sitokinler ortadan kaybolurken yara iyileşmesi bozuk diyabetik farelerde yaralanma sonrası 13. günde bile yara yerinde görülmüşlerdir ⁽⁴⁴⁾.

Doxey, D. ve ark. makrofajdan salınan toplam 6 temel sitokin (TNF- α , IL- β ve IL-6) ve growth faktörü (PDGF-B, bFGF, TGF- β 1) 3 farklı durumda değerlendirmiş. İn vitro ortamda yüksek lipit seviyesi ile indüklenmiş fare makrofajı ile diyabetik farenin makrofajlarını ve kontrol grubunu karşılaştırmış. Diyabette ve lipit zengin grupta kontrol grubuna göre tüm sitokin ve growth faktörlerin salınımında azalma tespit etmişler. Ayrıca diyabetteki bu azalmış sitokin ve GF salınımını lipit yüksekliğine bağlamışlar ve bu durumun ortamdaki yüksek AGE miktarından kaynaklanabileceğini iddia etmişlerdir ⁽⁸⁶⁾.

Diyabet komplikasyonlarına neden olduğuna dair güçlü ispatlar olan glikolizasyon son ürünü AGE'ler son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. AGE'ler lipit/aldoz etkilenmesiyle olur ve DM bu son ürünün oluşması için en uygun zemini hazırlar ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾. AGE-makrofaj etkilenmesi doku onarımında ve gecikmiş yara iyileşmesinde önemlidir. Monositler membrana yerleşmiş AGE reseptörü içerirler ⁽⁹⁰⁾. Monositlerle AGE etkileşimi sonucu doku destrüksiyonu ile ilişkili bir farklı makrofaj fenotipi ortaya çıkar ve morfolojisi bozulur ⁽⁹¹⁻⁹³⁾. Bu bozuk morfolojili ve fenotipli makrofajların lipozomal klodronatla selektif olarak yok edilmesi yara iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunacaktır.

Benzer bir çalışma olarak Chu, X. ve ark. diyabetlilerde yüksek lipit seviyesine bağlı olarak makrofaj fenotipinde ve sitokin salınımında normal yaralara göre farklılıklar olduğunu göstermişler. İnsan makrofajları diyabetik ortamda yüksek lipit altında kültüre edilmiş. Normal ortamdaki makrofajlara göre fenotipinin değiştiği ve sitokin salınımının azaldığı görülmüş. Homojen yuvarlak şekilli makrofajlar morfolojik olarak heterojen iğsi şekle dönüşmüş. 4 temel makrofajdan salınan sitokin ve growth faktör çalışmışlar. Bunlar; IL-1 β , IL-6, PDGF VE TGF- β 1 olarak

belirtilmiş. Çalışmanın sonucunda tüm bu sitokin ve growth faktörlerin salınımının azaldığı görülmüş⁽⁹⁴⁾.

Sitokinlerle ve growth faktörlerle ilgili çalışma sonuçları değerlendirildiğinde bu çok değerli çalışmaların verilerine göre çok kompleks bir yapı olan yara iyileşmesinde sitokinlerin ve growth faktörlerin durumu ve etkisi görüldüğü üzere oldukça karmaşıktır. Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında sitokinlerin azlığından yada çokluğundan daha önemlisi çok belirli bir düzen ve ahenk içinde yara yerinde bulunması gerektiği sonucu çıkarılabilir.

Maruyama, K. ve ark. yaptıkları araştırmada makrofajların lenfatik damar yapımında önemli rol oynadığını göstermişlerdir⁽⁹⁵⁾. Sonrasında Maruyama, K. ve ark. diyabetik farelerde makrofaj fonksiyonu ile ilgili yaptıkları geniş kapsamlı araştırmada çeşitli saptamalar yapmışlar⁽⁸⁴⁾. Çalışmalarının sonuçlarına göre; izole makrofaj deplesyonu sağlıklı yaralarda, bizim de çalışmamıza paralel olarak, yara iyileşmesini sekteye uğratmaktadır. Diyabetik farelerin kemik iliğinden alınan makrofajları in vitro şartlarda normal glukoz düzeylerinde tutup çoğaltmışlar. Sonuçta, makrofajların normal morfoloji ve fonksiyona sahip olduğu görülmüş. Bu makrofajların bir kısmı IL- β ile stimule edilmiş. IL- β ile stimule edilmiş olan makrofaj kültürünü diyabetik faredaki yaraya uygulamışlar ve yara iyileşmesinin düzeldiğini, lenfatik damar yapımının hızlandığını gözlemlemişler⁽⁸⁴⁾. Sonuçta yapılmış çalışmaların ışığında gelecekte diyabetik yaraların tedavisinde makrofaj deplesyonu tedavi edici bir yöntem olarak kullanılırsa ek olarak normal glukoz seviyesinde kültüre edilmiş makrofajın direk olarak yaraya verilmesi faydalı olabilir. Normal fareden alınan makrofajların in vitro yüksek glukoz seviyesinde yapılan kültürlerinde, hayvanın diyabetik olmamasına rağmen, morfolojilerinin diyabetiklere benzer olarak bozulduğu görülmüştür. Bu bulgu, diyabetik yarası olan hastaların kan şekerlerinin normal sınırlar içinde tutulmasının ne kadar faydalı olduğunun bir başka ispatıdır.

YKK yara iyileşmesini değerlendirmek için önemli bir ölçümdür. Çünkü YKK ile yara yerinde yeni depolanan kollajen ve subdermal kollajen fibrlerinin reorganizasyonu değerlendirilmiş olur. Kollajen üretilse bile yanlış reorganize olabilir ve yanlış reorganizasyon YKK'nin düşük olmasına neden olur^(96,97). Literatüre baktığımızda yapılan çalışmalar yara iyileşmesinde inflamatuvar fazın

sekteye uğraması direkt olarak fibroblast gelişmesinde ve kollajen sentezinde defekte neden olmaktadır ^(85,98,99). Bu bilgiler bizim çalışmamızın sonuçlarını doğrular niteliktedir. En düşük kopma kuvveti PO 7. günde grup 2 ve grup 3'te tespit edilmiştir. DM'nin yara iyileşmesinin her fazına etki ettiği bilinmektedir. Ancak grup 3'te sadece makrofaj deplesyonu olmasına rağmen kollajenasyonun zayıf olması yukarıdaki yayınları doğrular niteliktedir. Buna bağlı olarak yara iyileşmesinin fazlarını ayrı değerlendirmenin yanlış olacağı tüm fazlarının birbirine bağlı olduğu ve bir bütün halinde düşünmek gerektiği söylenebilir. Çalışmamızda PO 7. günde Grup 2 ile Grup 4 arasında YKK açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu ve Grup 2'deki yaraların daha kolay koptuğu görülmüştür ($P<0.05$). Bu durumda yukarıda açıkladığımız üzere lipozomal klodronatın inflamatuvar makrofajları yara yerinden uzaklaştırdığı dolayısıyla kronik inflamatuvar fazdaki kısır döngüyü kırıp, inflamasyon fazının proliferasyon fazını ve kollajen yapımını daha az sekteye uğrattığı düşünülebilir.

Amerongen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada farelerde kriyoterapi ile sol ventrikül myokardına hasar verilmiş. Lipozomal klodronatla makrofaj deplesyonunun myokardiyal iyileşmeye etkisi araştırılmış. Normal grupta yara yerinde makrofajlardan TGF- β ve VEGF salınımının hızla arttığı, hücre debrislerinin hızla ortadan kaldırıldığı ve granülasyon formasyonun geliştiği, vaskülaritenin arttığı görülmüş. Bu olayları myofibroblast infiltrasyonu ve kollajen depolanması takip etmiş. Makrofaj deplesyonu yapılan grupta ise rezorbe edilmemiş hücre debrisleri yaralanmadan 4 hafta sonra bile yara yerinde görülmüş. Buna ek olarak makrofajlardan TGF- β ve VEGF, granülasyon formasyonu, vaskülarite, myofibroblast invazyonu ve kollajenasyon belirgin ölçüde azalmış. Bu grupta artmış ventriküler dilatasyon ve ince ventrikül duvar kalınlığı nedeni ile denek mortalitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonucunda ise makrofaj düşüklüğünün yara iyileşmesini bozduğu, myokardiyal hasar sonrası mortaliteyi arttırdığı fikrine varılmıştır. Myokard infarktüsü sonrasında hastaya makrofaj takviyesinin faydalı olabileceğini iddia edilmektedir ⁽¹⁰⁰⁾.

Bizim çalışmamız da göstermektedir ki izole makrofaj deplesyonu sonrası yara iyileşmesi bozulmaktadır. Grup 3 hem makroskobik, hem fizyolojik hem de histopatolojik bulgular açısından en kötü iyileşen iki gruptan biridir.

Sonuç olarak yukarıdaki literatür bilgilerinin ışığında çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde en iyi iyileşen grubun kontrol grubu, en kötü iyileşen grupların ise izole makrofaj deplesyonu yapılan grupla izole diyabetik grubun olması doğaldır. DM hastalığından etkilenmiş makrofajların morfolojik ve fonksiyonel olarak bozulduğu, bu makrofajların sitokin ve growth faktör salınımında dengesizlikler olduğu ve inflamatuvar fazda bir kısır döngü oluşturduğu literatürde açıkça gösterilmiştir. Ancak makrofaj deplesyonu yapılan diyabetik grupta izole diyabetik ve izole makrofaj deplesyonu yapılan gruba göre tüm parametreler açısından daha iyi yara iyileşmesi olması oldukça çarpıcı bir tespit olarak karşımıza çıkmaktadır.

Literatür bilgileri ve çalışmamızın sonuçları bize diyabetik ortamdaki makrofajların yara iyileşmesine yarardan çok zarar verdiklerini düşündürmüştür.

Diyabetik yaralarda mevcut makrofajları apoptozise yönlendirerek olumsuz etkilerinin engellenebileceği, sonrasında kemik iliğinden alınan makrofaj öncüllerinin normal glukoz seviyeli in vitro ortamda kültüre edilip intravenöz yolla yada doğrudan yaraya verilmesinin diyabetik yaraların tedavisinde yeni ve etkili bir tedavi yöntemi olabileceği gerçekçi bir tez olarak önümüzde durmaktadır. Bizim çalışmamız bu konuda fikir verebilir ancak bu iddiaları güçlendirmek ve kanıtlamak için ileri deneysel ve klinik çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Laing,P. The development and complications of diabetic foot ulcers, Am. J. Surg. 176(2A Suppl) 11S-19S, 1998.
2. Levin,M.E. Foot lesions in patients with diabetes mellitus, Endocrinol. Metab Clin. North Am. 25(2):447-462, 1996.
3. Slovenkai,M.P. Foot problems in diabetes, Med. Clin. North Am. 82(4):949-971, 1998.
4. Apelqvist,J. and Larsson,J. What is the most effective way to reduce incidence of amputation in the diabetic foot?, Diabetes Metab Res. Rev. 16 Suppl 1 S75-S83, 2000.
5. Tentolouris,N., Al-Sabbagh,S., Walker,M.G., Boulton,A.J., and Jude,E.B. Mortality in diabetic and nondiabetic patients after amputations performed from 1990 to 1995: a 5-year follow-up study, Diabetes Care 27(7):1598-1604, 2004.
6. Bentley,J. and Foster,A. Multidisciplinary management of the diabetic foot ulcer, Br. J. Community Nurs. 12(12):S6, S8, S10, 2007.
7. Broughton,G., Janis,J.E., and Attinger,C.E. The basic science of wound healing, Plast. Reconstr. Surg. 117(7 Suppl):12S-34S, 2006.
8. Çavuşoğlu, H. (çeviri editörü) Tıbbi Fizyoloji (Textbook of Medical Physiology 1996 - A. C. Guyton). 9. Baskı. İstanbul, Yüce Yayınevi, 1996.
9. Monaco,J.L. and Lawrence,W.T. Acute wound healing an overview, Clin. Plast. Surg. 30(1):1-12,2003.
10. Mast,B.A.C.I.K. Normal wound healing . Achauer, B. M. Eriksson E. Kolk C. V. Russell R. C. Plastic Surgery: Indications, Operations, Outcomes. 5. baskı, St. louis, Mosby, 37-52, 2000.
11. Parslow,T.G. and Bainton,D.F. Innate immunity. Stites, D. B., Terr, A. I., and Parslow, T. G. Medical Immunology. Stamford, Appelton&Lange. 9[2], 25-42, 1997.
12. Waugh,H.V. and Sherratt,J.A. Macrophage dynamics in diabetic wound dealing, Bull. Math. Biol. 68(1):197-207, 2006.
13. Burçak,G.C. and Abbas,AK. hormonların genel özellikleri. Onat, T., Emerk, K., and Sözman, E. Y. İnsan Biyokimyası. Ankara . 437, 2002..
14. Kaya,E. yara iyileşmesi. Ertekin, C, Taviloğlu, K., Güloğlu, R., ve Kurtoğlu, M. Travma, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 1, 488-501. 2005.
15. Broughton,G., Janis,J.E., and Attinger,C.E. Wound healing: an overview, Plast. Reconstr. Surg. 117(7 Suppl): 1e-32e, 2006.
16. Junqueira,LC. and Carneiro,J. Basic Histology: Text & Atlas, Mc Graw Hill, USA, 2003.
17. Eşrefoğlu,M. Genel ve Özel Histoloji. Pelikan Yayınevi, Ankara. 2004.

18. Bianco,C., Gotze,O., and Cohn,Z.A. Regulation of macrophage migration by products of the complement system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76(2): 888-891, 1979.
19. Maslin,C.L., Kedzierska,K., Webster,N.L., Muller,W.A., and Crowe,S.M. Transendothelial migration of monocytes: the underlying molecular mechanisms and consequences of HIV-1 infection, *Curr. HIV. Res.* 3(4): 303-317, 2005.
20. Nathan,C. and Xie,Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide, *J Biol. Chem.* 269(19): 13725-13728, 1994.
21. Gartner,L. and Hiatt,JL. *Colour Textbook of Histology.* W.B. Saunders.USA, 2001.
22. Parslow,T.G., Stites,D.B., Terr,A.I., and Imboden,JB. *Medical Immunology .* Mc Graw Hill, Newyork, USA, 2001.
23. Nathan,C.F. Secretory products of macrophages, *J Clin. Invest* 79(2):319-326, 1987.
24. Abbas,AK., Lichtman,AH., and Poper,J. *Cellular and Molecular Immunology .* W.B. Saunders, Philedelphia, USA, 1994.
25. Foster,D.W. *Diabetes Mellitus.* Braunwald, E., Isselbacher, K. J., Petersdorf, R. G., Wilson, J. D., Martin, J. B., and Fauci, A. S. *Harrison's Prenciples of Internal Medicine.* 11, 1779-1797. 1987. Hamburg, McGraw-Hill Book Company.
26. Wood,F.C. *Disorders of Carbohydrate Metabolism.* Berkow, R., Fletcher, A. J., Bondy, P. K., Faling, L. J., Feinstein, A. R., and et, al. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy.* 15, 1069-1088. 1987. Rahway, N.J.,U.S.A., Merck & Co.,Inc.
27. WHO Diabetes Programme, prevalence data. http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index4.html . 2006. Internet Communication
28. Adlin,E.V. *Endocrine and Metabolic Diseases.* Myers, A. R. *The National Medical Series for Independent Study, Medicine.* 2, 401-463. 1994.
29. Joslin,E.P. THE RELATION OF TRAUMA TO DIABETES, *Ann. Surg.* 117(4): 607-622, 1943.
30. Gibbons,G.W. *The Diyabetic Foot.* Becker, K. L. and eds. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism.* Lippincott Williams & Wilkins. 3. 2001.
31. Yonekura,H., Yamamoto,Y., Sakurai,S., Watanabe,T., and Yamamoto,H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury, *J. Pharmacol. Sci.* 97(3):305-311, 2005.
32. Tuğrul,A. Diyabetik nefropati, trakya üniversitesi tıp fakültesi dergisi 19(2): 113-121, 2002.
33. Jakus,V. and Rietbrock,N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications, *Physiol Res.* 53(2): 131-142, 2004.

34. Goova,M.T. et al. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice, *Am. J. Pathol.* 159(2): 513-525, 2001.
35. Pierce,G.F. Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter, *Am. J. Pathol.* 159(2):399-403, 2001.
36. Altan,N., Sepici,A., and Koca,A. diabetes mellitus ve oksidatif stres, *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]. 31(2):51-56, 2006.
37. Koya,D. and King,G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications, *Diabetes* 47(6):859-866, 1998.
38. Hart,G.W. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins, *Annu. Rev. Biochem* 66:315-335, 1997.
39. Hawkins,M., Barzilai,N., Liu,R., Hu,M., Chen,W., and Rossetti,L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance, *J Clin. Invest* 99(9): 2173-2182, 1997.
40. Sayeski,P.P. and Kudlow,J.E. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription, *J Biol. Chem.* 271(25): 15237-15243, 1996.
41. Brownlee,M., Aiello,LP., Friedman,E., Vinik,AI., Nesto,RW., and Boulton,A. Complications of diabetes mellitus. Larsen, PR., Kronenberg, HM., Melmed, S., and Polonsky, KS. *Williams Textbook of Endocrinology.* 1510-1522. 2003. Philadelphia, W. B. Saunders.
42. Knight,R.J., Kofoed,K.F., Schelbert,H.R., and Buxton,D.B. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in post-ischaemic myocardium, *Cardiovasc. Res.* 32(6): 1016-1023, 1996.
43. Korshunov,S.S., Skulachev,V.P., and Starkov,A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.* 416(1): 15-18, 1997.
44. Wetzler,C., Kampfer,H., Stallmeyer,B., Pfeilschifter,J., and Frank,S. 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, *J Invest Dermatol.* 115(2): 245-253, 2000.
45. Eren,Z., Davutoğlu,M., Ulay,M., Özsoy,Z., and Bayca,OE. Diabetik ayak infeksiyonları, *Türk Diyabet Yıllığı.* 323-327, 1998.
46. Boulton,A.J., Hardisty,C.A., Betts,R.P., Franks,C.I., Worth,R.C., Ward,J.D., and Duckworth,T. Dynamic foot pressure and other studies as diagnostic and management aids in diabetic neuropathy, *Diabetes Care* 6(1): 26-33, 1983.
47. Ellenberg,M. Diabetic neuropathy, *Compr. Ther.* 8(1): 21-31: 1982.
48. Veves,A., Manes,C., Murray,H.J., Young,M.J., and Boulton,A.J. Painful neuropathy and foot ulceration in diabetic patients, *Diabetes Care* 16(8): 1187-1189, 1993.

49. Quebedeaux,T.L., Lavery,L.A., and Lavery,D.C. The development of foot deformities and ulcers after great toe amputation in diabetes, *Diabetes Care* 19(2): 165-167, 1996.
50. Dinh,T.L. and Veves,A. A review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot, *Int J Low Extrem. Wounds.* 4(3): 154-159, 2005.
51. Wall,S.J., Sampson,M.J., Levell,N., and Murphy,G. Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts, *Br. J Dermatol.* 149(1): 13-16, 2003.
52. Cooper,D.M., Yu,E.Z., Hennessey,P., Ko,F., and Robson,M.C. Determination of endogenous cytokines in chronic wounds, *Ann. Surg.* 219(6): 688-691, 1994.
53. Zykova,S.N., Jenssen,T.G., Berdal,M., Olsen,R., Myklebust,R., and Seljelid,R. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice, *Diabetes* 49(9): 1451-1458, 2000.
54. Glynn,J.R., Carr,E.K., and Jeffcoate,W.J. Foot ulcers in previously undiagnosed diabetes mellitus, *BMJ* 300(6731): 1046-1047, 1990.
55. Rith-Najarian,S.J., Stolusky,T., and Gohdes,D.M. Identifying diabetic patients at high risk for lower-extremity amputation in a primary health care setting. A prospective evaluation of simple screening criteria, *Diabetes Care* 15(10): 1386-1389, 1992.
56. Boyko,E.J., Ahroni,J.H., Stensel,V., Forsberg,R.C., Davignon,D.R., and Smith,D.G. A prospective study of risk factors for diabetic foot ulcer. The Seattle Diabetic Foot Study, *Diabetes Care* 22(7): 1036-1042, 1999.
57. Öntürk,H. and Özbek,H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin Ölçülmesi, *Genel Tıp Dergisi* 17(4): 231-236, 2007.
58. Hughes,D.E., Wright,K.R., Uy,H.L., Sasaki,A., Yoneda,T., Roodman,G.D., Mundy,G.R., and Boyce,B.F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo, *J Bone Miner. Res.* 10(10): 1478-1487, 1995.
59. Alıcı,S. and Çekici,S. Malign Hastalıklarda Bisfosfonatların Rolü, *Van Tıp Dergisi* 9(2): 66-72, 2002.
60. Van,R.N., Sanders,A., and van den Berg,T.K. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine, *J Immunol. Methods* 193(1): 93-99, 1996.
61. Van,R.N., Bakker,J., and Sanders,A. Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drugs, *Trends Biotechnol.* 15(5): 178-185, 1997.
62. Singer,A.J. and Clark,R.A. Cutaneous wound healing, *N. Engl. J Med.* 341(10): 738-746, 1999.
63. Jimenez,P.A. and Rampy,M.A. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds, *J Surg. Res.* 81(2): 238-242, 1999.

64. Chung,Y.H., Jun,H.S., Kang,Y., Hirasawa,K., Lee,B.R., van,R.N., and Yoon,J.W. Role of macrophages and macrophage-derived cytokines in the pathogenesis of Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in diabetes-resistant BioBreeding rats, *J Immunol.* 159(1): 466-471, 1997.
65. Van,R.N. and Sanders,A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications, *J Immunol. Methods* 174(1-2): 83-93, 1994.
66. Farrell,A.M., Marren,P., Dean,D., and Wojnarowska,F. Lichen sclerosis: evidence that immunological changes occur at all levels of the skin, *Br. J Dermatol.* 140(6): 1087-1092, 1999.
67. Apelqvist,J., Larsson,J., and Agardh,C.D. Long-term prognosis for diabetic patients with foot ulcers, *J Intern. Med.* 233(6): 485-491, 1993.
68. Jeffcoate,W.J., Chipchase,S.Y., Ince,P., and Game,F.L. Assessing the outcome of the management of diabetic foot ulcers using ulcer-related and person-related measures, *Diabetes Care* 29(8): 1784-1787, 2006.
69. Oyibo,S.O., Jude,E.B., Tarawneh,I., Nguyen,H.C., Armstrong,D.G., Harkless,L.B., and Boulton,A.J. The effects of ulcer size and site, patient's age, sex and type and duration of diabetes on the outcome of diabetic foot ulcers, *Diabet. Med.* 18(2): 133-138, 2001.
70. Armstrong,D.G., Lavery,L.A., and Harkless,L.B. Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation, *Diabetes Care* 21(5): 855-859, 1998.
71. Fahey,T.J., III, Sadaty,A., Jones,W.G., Barber,A., Smoller,B., and Shires,G.T. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing, *J Surg. Res.* 50(4): 308-313, 1991.
72. King,L. Impaired wound healing in patients with diabetes, *Nurs. Stand.* 15(38): 39-45, 2001.
73. Sato,N., Nakamura,M., Chikama,T., and Nishida,T. Abnormal deposition of laminin and type IV collagen at corneal epithelial basement membrane during wound healing in diabetic rats, *Jpn. J Ophthalmol.* 43(5): 343-347, 1999.
74. Lerman,O.Z., Galiano,R.D., Armour,M., Levine,J.P., and Gurtner,G.C. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia, *Am. J Pathol.* 162(1): 303-312, 2003.
75. Bitar,M.S., Farook,T., Wahid,S., and Francis,I.M. Glucocorticoid-dependent impairment of wound healing in experimental diabetes: amelioration by adrenalectomy and RU 486, *J Surg. Res.* 82(2): 234-243, 1999.
76. Goren,I., Kampf,H., Podda,M., Pfeilschifter,J., and Frank,S. Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators, *Diabetes* 52(11): 2821-2832, 2003.

77. Barreto,E.O., Riederer,I., Arantes,A.C., Carvalho,V.F., Farias-Filho,F.A., Cordeiro,R.S., Martins,M.A., Savino,W., and Silva,P.M. Thymus involution in alloxan diabetes: analysis of mast cells, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1: 127-130, 2005.
78. Komesu,M.C., Tanga,M.B., Buttros,K.R., and Nakao,C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing, *Pathophysiology*. 11(2): 63-67, 2004.
79. Naito,M., Nagai,H., Kawano,S., Umezu,H., Zhu,H., Moriyama,H., Yamamoto,T., Takatsuka,H., and Takei,Y. Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis in vivo and in vitro, *J Leukoc. Biol.* 60(3): 337-344, 1996.
80. Jun,H.S., Yoon,C.S., Zbytnuik,L., van,R.N., and Yoon,J.W. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice, *J Exp. Med.* 189(2): 347-358, 1999.
81. Riches,D.W.H. Macrophage involvement in wound repair, modelling and fibrosis. Clark, R. A. F. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 2, 95-142. 1996.
82. Robson,M.C., Steed,D.L., and Franz,M.G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories, *Curr. Probl. Surg.* 38(2): 72-140, 2001.
83. Greenhalgh,D.G., Sprugel,K.H., Murray,M.J., and Ross,R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse, *Am. J Pathol.* 136(6): 1235-1246, 1990.
84. Maruyama,K., Asai,J., Ii,M., Thorne,T., Losordo,D.W., and D'Amore,P.A. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing, *Am. J Pathol.* 170(4): 1178-1191, 2007.
85. Loots,M.A., Lamme,E.N., Zeegelaar,J., Mekkes,J.R., Bos,J.D., and Middelkoop,E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds, *J Invest Dermatol.* 111(5): 850-857, 1998.
86. Doxey,D.L., Nares,S., Park,B., Trieu,C., Cutler,C.W., and Iacopino,A.M. Diabetes-induced impairment of macrophage cytokine release in a rat model: potential role of serum lipids, *Life Sci.* 63(13): 1127-1136, 1998.
87. Dyer,D.G., Dunn,J.A., Thorpe,S.R., Bailie,K.E., Lyons,T.J., McCance,D.R., and Baynes,J.W. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging, *J Clin. Invest* 91(6): 2463-2469, 1993.
88. McCance,D.R., Dyer,D.G., Dunn,J.A., Bailie,K.E., Thorpe,S.R., Baynes,J.W., and Lyons,T.J. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus, *J Clin. Invest* 91(6): 2470-2478, 1993.
89. Nakamura,Y., Horii,Y., Nishino,T., Shiiki,H., Sakaguchi,Y., Kagoshima,T., Dohi,K., Makita,Z., Vlassara,H., and Bucala,R. Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus, *Am. J Pathol.* 143(6): 1649-1656, 1993.

90. Schmidt,A.M., Hori,O., Brett,J., Yan,S.D., Wautier,J.L., and Stern,D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions, *Arterioscler. Thromb.* 14(10): 1521-1528, 1994.
91. Kirsstein,M., Brett,J., Radoff,S., Ogawa,S., Stern,D., and Vlassara,H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87(22): 9010-9014, 1990.
92. Morohoshi,M., Fujisawa,K., Uchimura,I., and Numano,F. The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748: 562-570, 1995.
93. Schmidt,A.M., Yan,S.D., Brett,J., Mora,R., Nowygrod,R., and Stern,D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products, *J Clin. Invest* 91(5): 2155-2168, 1993.
94. Chu,X., Newman,J., Park,B., Nares,S., Ordonez,G., and Iacopino,A.M. In vitro alteration of macrophage phenotype and function by serum lipids, *Cell Tissue Res.* 296(2): 331-337, 1999.
95. Maruyama,K. et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages, *J Clin. Invest* 115(9): 2363-2372, 2005.
96. Kirsner,R.S. and Eaglstein,W.H. The wound healing process, *Dermatol. Clin.* 11(4): 629-640, 1993.
97. Sussman,M.D. Aging of connective tissue: physical properties of healing wounds in young and old rats, *Am. J Physiol* 224(5): 1167-1171, 1973.
98. Goodson,W.H., III and Hunt,T.K. Wound healing and the diabetic patient, *Surg. Gynecol. Obstet.* 149(4): 600-608, 1979.
99. Moore,K., Ruge,F., and Harding,K.G. T lymphocytes and the lack of activated macrophages in wound margin biopsies from chronic leg ulcers, *Br. J Dermatol.* 137(2): 188-194, 1997.
100. van Amerongen,M.J., Harmsen,M.C., van,R.N., Petersen,A.H., and van Luyn,M.J. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice, *Am. J Pathol.* 170(3): 818-829, 2007.

EK 1: ETİK KURUL ONAYI



T.C.
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi
Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi
Etik Kurulu

TOPLANTI TARİHİ : 07/05/2008
TOPLANTI NO : 2008/04

9- Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığı'nın, "Diyabetik Ratlarda Makrofaj Deplesyonunun Yara İyileşmesine Etkisi" konulu çalışma isminin "Diyabetik Farelerde Makrofaj Deplesyonunun Yara İyileşmesine Etkisi" olarak değiştirilmesinin Z.K.Ü. Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU
Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanı