



TC.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL DİABETLİ SIÇANLARDA KİTOSAN'IN YARA
İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ZEYNEP DENİZ ŞAHİN İNAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SERPİL ÜNVER SARAYDIN

SİVAS 2009

TC
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL DİABETLİ SIÇANLARDA KİTOSAN'IN YARA
İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ZEYNEP DENİZ ŞAHİN İNAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SERPİL ÜNVER SARAYDIN

SİVAS

EYLÜL 2009

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

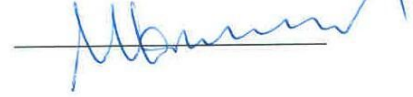
Başkan Doç. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN



Üye Prof. Dr.Emel KOPTAGEL



Üye Doç. Dr. Muhittin SÖNMEZ



ONAY

Bu tez çalışması, 03.07.2009 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Destekleriyle her zaman yanımda olan Dedem ve Ananem;

Muzaffer-Şükran ÖZDEN,

Ve canım aileme...

ÖZET

DENEYSEL DİABETLİ SIÇANLARDA KİTOSAN'IN YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji-Embriyoloji AD.

Danışman: Doç. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN

2009

Bu çalışmada deneysel diabetes oluşturulmuş sıçanların sırtlarında oluşturulan yaralara kitosan uygulanarak yara iyileşmesine etkisinin, histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır. Deneysel diabetesli gruplara streptozotosin 60 mg/kg intraperitoneal tek doz olarak, kontrol grubuna ise yalnızca sitrat tamponu uygulanmıştır. Streptozotosin uygulamasından 24 saat sonra kan şekeri seviyeleri 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diabetesli kabul edilerek, tüm grupların sırt bölgelerinde 2 cm'lik tam kat kesi oluşturulmuştur. Açılan yara deney süresince kapatılmamıştır. Kitosan, asetik asitte çözülerek %0,8'lik hazırlanıp uygulanmıştır. Yara bölgelerine kitosan, asetik asit ve betadin uygulanan hayvan grupları operasyondan sonraki 3. 7. ve 14. günlerde yüksek doz sodyum penta-barbital (200 mg/kg) intraperitoneal yolla verilerek sakrifiye edilmişler ve kesi bölgelerinden doku örnekleri alınarak ışık mikroskobu ve immünohistokimyasal incelemeler için hazırlanmıştır. Diabetes+asetik asit ve diabetes+kontrol gruplarının histolojik bulguları benzer olduğu için ortak değerlendirilmiştir. Diabetes+asetik asit ve diabetes+kontrol grubunda yara iyileşme sürecinin her aşamasında (hemostaz ve inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu, yeni epitel oluşumunu, anjiyogenez, skar doku oluşumu) diğer gruplarla karşılaştırıldığında bozukluklar görülmüştür. Diabetes+asetik asit ve diabetes+kontrol gruplarında iyileşme alanında inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri, yeni oluşan kan damarları, retiküler ve kollajen lifler, yara yüzeyine kitosan uygulanan gruplara ve kontrol gruplarına göre daha az bulunmuştur. Yara alanı yakınındaki epitel hücrelerinin altındaki bazal membran bütünlüğü bozulmuş, papiller dermiste inflamatuvar hücrelerin sayısı azalmıştır. Diabetes+kontrol ve

diabet+asetik asit uygulanan gruplarda, kontrol ve kitosan gruplarıyla karşılaştırıldığında, iyileşme alanında daha az yoğun VEGF ve FGFR3 immüno lokalizasyonu görülmüştür. Kitosan uygulanan grupta ise kontrol ve diabetli diğer gruplarla karşılaştırıldığında yara alanı 3. günden itibaren 7. ve 14. günlerde giderek birbirine daha yakın halde ve iyileşme alanında inflamatuvar hücreler, endotel hücreler, yeni oluşan kan damarları, retiküler ve kollajen lifler daha fazladır. Kitosan uygulanan grupta VEGF ve FGFR3 immüno lokalizasyonu daha yoğun haldedir. Yara iyileşmesinin her evresi düzenlidir.

Kitosan, kullanımı ve elde edilmesi kolay, doğal bir polisakkarittir. Aynı zamanda yara iyileşmesini hızlandırıcı pek çok etkisi gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, diabetli hastaların yara iyileşmesinde meydana gelen bozukluklarda kitosan uygulamanın yararlı olabileceği düşünülmektedir

Anahtar sözcükler: Diabet, yara iyileşmesi, kitosan, VEGF, FGFR3.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CHITOSAN ON WOUND HEALING IN EXPERIMENTALLY DIABETIC RATS

Zeynep Deniz Şahin İNAN

Master of Sciences Thesis, Department of Histology-Embryology

Supervisor: Assoc. Prof. Serpil Ünver SARAYDIN

2009

The aim of the present study was to investigate, histologically and histochemically, the effect of chitosan on wound healing in experimentally diabetic rats which were divided into four groups. While the experimental diabetes groups received 60 mg/kg streptozotocin intraperitoneally, the control group animals received citrate buffer only. Twentyfour hours after streptozotocin injection, animals that had blood sugar levels higher than 250 mg/dl were accepted as diabetic, and 2 cm full-thickness wounds were done onto the back of those diabetic animals. Wounds were left open until the end of the experiment. Chitosan was prepared 0.8% in acetic acid, and was applied to the wounds. Animals which received chitosan, acetic acid and betadin to their wounds were sacrificed under high dose (200 mg/kg) penta-barbital (IP) 3, 7 and 14 days after operation. Tissue samples were obtained from the wound regions of each animal, and they were processed for both light and electron microscopical evaluations. Since histological findings of the diabetes+acetic acid group and the diabetes+control group were similar, they were considered together. The diabetes+acetic acid and the diabetes+control group animals had an impairment in each step of the wound healing process such as haemostasis-inflammation, granulation tissue formation, re-epithelization, angiogenesis and scab tissue formation when compared to the other groups. In addition the above mentioned two groups also had less number of inflammatory cells, fibroblasts, endothelial cells, newly formed blood vessels and reticular - collagen fibres than the chitosan application and the control groups. The integrity of the basement membrane of the epithelium seemed to be lost, and the inflammatory cell number was

dramatically decreased around the wound region. A low VEGF and FGFR3 immunolocalizations were observed in the wound region of the diabetes+acetic acid and the diabetes+control groups than the other groups. On the other hand, the chitosan application groups had more inflammatory cells, endothelial cells, newly formed blood vessels and reticular –collagen fibres in the wound healing area from the 3rd day of operatin when compared to the diabetes and the control groups. Stronger VEGF and FGFR3 immunolocalizations were also evident in the chitosan application groups and all steps of wound healing process were ore regular in the these groups. Citosan is an easily obtained natural polimer, and it has a positive effect on wound healing process. In conclusion, the application of chitosan would be essential for the accelaration of wound healing process in diabetic patients.

Key words: Diabetes, wound healing, chitosan, VEGF, FGFR3

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında bana önderlik eden ve her konuda yol gösteren danışman hocam;

Doç. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN'a,

Çalışmam boyunca desteklerini gördüğüm ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım;

Prof.Dr.Emel KOPTAGEL'e

Prof.Dr.H.Eray BULUT'a

Histoloji Embriyoloji Bölümü çalışma arkadaşlarıma

Deneysel çalışmalar boyunca yardım eden;

Veteriner Hekim Yücel YALMAN'a

Teknisyen Seyfettin ŞENEL'e

Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarından arkadaşım;

Biolog Tuğba BİLGİN'e

Tez düzeltmelerime yardım eden Dayım;

Erdem ÖZDEN'e

Her zaman hayatıma ve çalışmalarına maddi manevi destek ve yoluma ışık tutan;

Anneciğim ve Babacığım'a

Çok sevgili eşim;

S. Cem İNAN'a

Neşe ve enerji kaynağım, minik kızım;

Berru İdil İNAN'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN

İÇİNDEKİLER	SAYFA
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Diabetes Mellitus	3
2. 1. 1. Diabetes Mellitus'un Patofizyolojisi	3
2. 1. 2. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	5
2. 2. Deneysel Diabet Oluşturma	5
2. 3. Derinin Yapısı	7
2. 3. 1. Epidermis	8
2. 3. 2. Dermis	10
2. 3. 3. Hipodermis	11
2. 4. Yara İyileşmesi	11
2. 5. Yara İyileşme Bozuklukları	19
2. 6. Yara İyileştirmede Kullanılan Maddeler	21
2. 6. 1. Kitosan	21
2. 6. 2. Kitosan Uygulama Şekilleri	23
2. 6. 2. 1. Jel	23
2. 6. 2. 2. Film	23
2. 6. 2. 3. Sünger	23
2. 6. 2. 4. Mikropartiküler Sistemler	24
2. 6. 2. 5. Tablet	24
2. 6. 3. Kitosanın Uygulama Alanları	24
2. 6. 3. 1. Kitosanın Yara İyileşmesine Etkisi	24
2. 6. 3. 2. Antimikrobiyal Etkisi	25
2. 6. 3. 3. Hemostatik Etkisi	26
2. 6. 3. 4. Analjezik Etkisi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3. 1. Kontrol ve Deney Grupları	27
3. 2. Deneysel Diabet Oluşturulması	27
3. 3. Kitosan Hazırlanması	28

3. 4. Cerrahi İşlem	28
3. 5. Işık Mikroskopisi	29
3. 6. İmmünohistokimya	30
3. 7. İstatistiksel Yöntem	31
4. BULGULAR	33
4. 1. Makroskobik Bulgular	33
4. 2. Mikroskobik Bulgular	38
4. 2. 1. Kontrol Grubu 3 Günlük Yara İyileşmesi	38
4. 2. 2. Kontrol Grubu 3 Günlük Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular	41
4. 3. 1. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 3 Günlük Gruplar	45
4. 3. 2. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 3 Günlük Gruplarda Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular	48
4. 4. 1. Diabet+Kitosan 3 Günlük Grupta Yara İyileşmesi	51
4. 4. 2. Diabet+Kitosan 3 Günlük Grubun İmmünohistokimyasal Bulguları	55
4. 5. 1. Kontrol Grubu 7 Günlük Yara İyileşmesi	58
4. 5. 2. Kontrol grubu 7 Günlük Yara İyileşmesi İmmünohistokimyasal Bulgular	62
4. 6. 1. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 Günlük Yara İyileşmesi	66
4. 6. 2. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 Günlük Yara İyileşmesine Ait İmmünohistokimyasal Bulgular	70
4. 7. 1. Diabet+Kitosan 7 Günlük Yara İyileşmesi	73
4. 7. 2. Diabet+Kitosan 7 Günlük Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular	76
4. 8. 1. Kontrol Grubu 14 Günlük Yara İyileşmesi	80
4. 8. 2. Kontrol Grubu 14 Günlük Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular	83

4. 9. 1. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol Grubu	
14 Günlük Yara İyileşmesi	85
4. 9. 2. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 Günlük	
Gruplarda Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal	
Bulgular	89
4. 10. 1. Diabet+Kitosan grubu 14 günlük Yara İyileşmesi	93
4. 10. 2. Diabet+Kitosan grubu 14 Günlük Yara İyileşmesinde	
İmmünohistokimyasal Bulgular	97
5. TARTIŞMA	103
6. KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ	139

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1. Streptozotosin'in kimyasal yapısı	6
Şekil 2. Yara iyileşmesinin klasik fazları	12
Şekil 3. Yara tamir süreçleri	13
Şekil 4. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı	22
Şekil 5. Kontrol grubu 3.günde henüz kaynaşmamış yara alanı , iyileşme alanı , epidermis , dermis bölgeleri ve kabuk	38
Şekil 6. Kontrol grubu 3.günde yara alanına yakın epitel, dermis, düzensiz bazal membran yağ bezi	39
Şekil 7. Kontrol grubu 3.günde papiller dermis, epidermis, dermis, kollajen lifler , yağ bezleri	39
Şekil 8a, b. Kontrol grubu 3.günde dermiste kollajen lifler arasında fibroblastlar , kan hücreleri	40
Şekil 9. Kontrol grubu 3.günde yara alanı, epitel, dermiste retiküler lifler	40
Şekil 10. Kontrol grubu 3.günde iyileşme alanında mast hücreleri	41
Şekil 11. Kontrol grubu 3.günde yara alanı, iyileşme alanı, epidermis, dermiste VEGF immünolokalizasyonu	42
Şekil 12. Kontrol grubu 3.günde iyileşme alanında VEGF immünolokalizasyonu	42
Şekil 13. Kontrol grubu 3.günde yağ bezleri ve kıl folliküllerinde VEGF immünolokalizasyonu	43
Şekil 14. Kontrol grubu 3.günde iyileşme alanında FGFR3 immünolokalizasyonu	43
Şekil 15. Kontrol grubu 3. günde epidermiste ve kıl follikülünde FGFR3 immünolokalizasyonu	44
Şekil 16 a, b. Kontrol grubu 3.günde kan damarı çevresinde (a), yağ bezinde (b), FGFR3 immünolokalizasyonu	44
Şekil 17. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde yara kabuğu (skab), epitel, dermis, yağ bezleri, kıl follikülleri	45
Şekil 18. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epitel, dermis	46
Şekil 19. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde papiller dermiste inflamatuvar hücreler	46
Şekil 20. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde iyileşme alanında kollajen lifler, fibroblastlar	47
Şekil 21. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epitel, dermis ve iyileşme alanında retiküler lifler	47
Şekil 22. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde iyileşme alanında VEGF immünolokalizasyonu	48
Şekil 23. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epitel, dermis, yağ bezlerinde ve kıl folliküllerinde VEGF immünolokalizasyonu	49

Şekil 24 a, b. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde kan damarlarında (a) kıl follüküllerinde ve yağ bezlerinde (b), VEGF immünolokalizasyonu	49
Şekil 25. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde iyileşme alanında FGFR3 immünolokalizasyonu	50
Şekil 26. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epidermis ve inflamasyon alanında FGFR3 immünolokalizasyonu	50
Şekil 27. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde kıl follükülünde FGFR3 immünolokalizasyonu	51
Şekil 28. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta yara alanı, kaynaşmamış epidermis ve dermis, granülasyon dokusu	52
Şekil 29. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta yara iyileşme bölgesinde granülasyon dokusu, yara kabuğu (skab) ve kan damarları	52
Şekil 30. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta epiteldeki hücreler, yara alanına yakın bölgede düzensiz bazal membran	53
Şekil 31. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta papiller dermiste yoğun inflamatuvar hücreler, retiküler dermiste kollajen lifler	53
Şekil 32. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta iyileşme alanında epitel, dermis ve retiküler lifler	54
Şekil 33. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta iyileşme alanında mast hücreleri	54
Şekil 34 a, b. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta epitelde VEGF immünolokalizasyonu	55
Şekil 35. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta kan damarı çevresinde VEGF immunolokalizasyonu	56
Şekil 36. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta yağ bezlerinde VEGF immünolokalizasyonu	56
Şekil 37. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta kan damarı duvarında VEGF immünolokalizasyonu,	57
Şekil 38. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta epitelde FGFR-3 immünolokalizasyonu	57
Şekil 39. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta iyileşme alanında (a), kıl follükülünde ve yağ bezinde (b), FGFR-3 immünolokalizasyonu	58
Şekil 40. Kontrol grubu 7. günde yara alanı epidermis, dermis ve yara kabuğu	59
Şekil 41. Kontrol grubu 7. günde stratum bazale tabakasında hücreler	59
Şekil 42. Kontrol grubu 7. günde epitel, bazal membran	60
Şekil 43. Kontrol grubu 7. günde retiküler dermiste inflamatuvar hücreler, dermis, epidermis	60
Şekil 44. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında kan damarları	61
Şekil 45. Kontrol grubu 7. günde retiküler lifler	61
Şekil 46. Kontrol grubu 7. günde, iyileşme alanında mast hücreler	62
Şekil 47. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında, epitelde, dermiste VEGF immünolokalizasyonu	63
Şekil 48. Kontrol grubu 7. günde yara alanına yakın epitelde, yağ bezinde, VEGF immünolokalizasyonu	63

Şekil 49. Kontrol grubu 7. günde kan damarında VEGF immünolokalizasyonu	64
Şekil 50. Kontrol grubu 7. günde kıl follikülünde VEGF immünolokalizasyonu	64
Şekil 51. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında, epidermis ve dermiste FGFR3 immünolokalizasyonu	65
Şekil 52. Kontrol grubu 7. günde epitelde, kıl folliküllerinde, yağ bezlerinde FGFR3 immünolokalizasyonu	65
Şekil 53. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında, fibroblast sitoplazmasında FGFR3 immünolokalizasyonu	66
Şekil 54. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda yara alanı, iyileşme alanı, yara kabuğu, epidermis ve dermis	67
Şekil 55. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda bazal membran	67
Şekil 56. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda epitel, dermis, papiller dermiste yoğun kan hücreleri	68
Şekil 57. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında, kan damarları, kollajen lifler ve fibroblastlar	68
Şekil 58. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında retiküler lifler	69
Şekil 59. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında mast hücreleri	69
Şekil 60. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında, epitelde, dermiste, kıl folliküllerinde, VEGF immünolokalizasyonu	70
Şekil 61. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda epitelde, kıl folliküllerinde, yağ bezlerinde VEGF immünolokalizasyonu	71
Şekil 62. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında, kan damarlarında VEGF immünolokalizasyonu	71
Şekil 63. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında, epidermiste, dermiste, kıl folliküllerinde, yağ bezlerinde FGFR3 immünolokalizasyonu	72
Şekil 64. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında, epitelde FGFR3 immünolokalizasyonu	72
Şekil 65. Diabet+Asetikası ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda kıl follikülünde yağ bezinde FGFR3 immünolokalizasyonu	73
Şekil 66. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde yara alanı, iyileşme alanı, skab, ganülasyon dokusu	74
Şekil 67. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde epitel, stratum bazalede hücreler, bazal membran	74
Şekil 68. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde papiller dermiste inflamatuvar hücreler	75
Şekil 69. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde epitel, dermis ve retiküler lifler	75

Şekil 70. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında mast hücreleri	76
Şekil 71. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında VEGF immüno­lokalizasyonu	77
Şekil 72. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde epitelde VEGF immüno­lokalizasyonu,	77
Şekil 73. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında kan damarları, VEGF immüno­lokalizasyonu	78
Şekil 74. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde kıl follikülünde, yağ bezinde VEGF immüno­lokalizasyonu	78
Şekil 75. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde epitelde, kıl follikülünde FGFR3 immüno­lokalizasyonu	79
Şekil 76. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde kıl follikülünde, yağ bezinde FGFR3 immüno­lokalizasyonu	79
Şekil 77. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında kan damarları çevresinde FGFR3 immüno­lokalizasyonu	80
Şekil 78. Kontrol grubu 14 günlük grupta epitel, dermis, granülasyon dokusunda kollajen lifler	81
Şekil 79. Kontrol grubu 14 günlük grupta a) Epitel altında bazal membran b) Stratum bazaledeki hücreler	81
Şekil 80. Kontrol grubu 14. günde epidermis , dermis, retiküler lifler	82
Şekil 81. Kontrol grubu 14. günde iyileşme alanında mast hücreleri	82
Şekil 82. Kontrol grubu 14. günde epitelde, dermiste, granülasyon dokusunda, kıl folliküllerinde, yağ bezlerinde VEGF immüno­lokalizasyonu	83
Şekil 83. Kontrol grubu 14. günde kan damarında VEGF immüno­lokalizasyonu	84
Şekil 84. Kontrol grubu 14. günde epitelde, granülasyon dokusunda, kıl follikülünde, yağ bezinde FGFR3 immüno­lokalizasyonu	84
Şekil 85. Kontrol grubu 14. günde granülasyon dokusunda FGFR3 immüno­lokalizasyonu	85
Şekil 86. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda yara alanı, iyileşme alanı, epitel, dermis	86
Şekil 87. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda granülasyon dokusu, kan damarları, kollajen lifler	86
Şekil 88. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda bazal membran, stratum bazale hücreleri	87
Şekil 89. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda papiller dermiste inflamatuvar hücreler	87
Şekil 90. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda epitel, dermis ve retiküler lifler	88
Şekil 91. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda iyileşme alanında mast hücreleri	88

Şekil 92. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda epitelde, dermiste, granülasyon dokusunda VEGF immünolokalizasyonu	89
Şekil 93. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda yara alanından uzaktaki epitelde VEGF immünolokalizasyonu	90
Şekil 94. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda iyileşme alanında kan damarları ve fibroblastlarda VEGF immünolokalizasyonu	90
Şekil 95. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda yağ bezinde VEGF immünolokalizasyonu	91
Şekil 96. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda granülasyon dokusundaki kan damarlarında VEGF immünolokalizasyonu	91
Şekil 97. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda epitelde FGFR3 immünolokalizasyonu	92
Şekil 98. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda granülasyon dokusu içinde kan damarlarında FGFR3 immünolokalizasyonu	92
Şekil 99. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda kıl follikülünde FGFR3 immünolokalizasyonu	93
Şekil 100. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda iyileşme alanı, skar doku, epidermis, dermis	94
Şekil 101. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda skar dokusunda fibroblastlar, kan damarları	94
Şekil 102. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda bazal membran	95
Şekil 103. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda papiller dermiste inflamatuvar hücreler	95
Şekil 104. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda epitel, dermis ve retiküler lifler	96
Şekil 105. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda mast hücreleri	96
Şekil 106. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda iyileşmiş alanda, epidermiste, dermiste , kıl folliküllerinde, yağ bezlerinde VEGF immünolokalizasyonu	97
Şekil 107. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda kan damarında VEGF immünolokalizasyonu	98
Şekil 108. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda epitelin stratum bazale tabakasında FGFR3 immünolokalizasyonu	98
Şekil 109. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda skar doku altında FGFR3 immünolokalizasyonu	99

Tablolar, Grafikler, Resimler, Çizelgeler Dizini	Sayfa
Tablo 1. Uygulanan Histolojik Boyalar	30
Grafik 1. Gruplara ait ağırlığın zamanla değişimi	33
Grafik 2. Gruplara ait kan şekeri seviyelerinin zamanla değişimi	34
Grafik 3. Ağırlığın gruplar arası değişimi	35
Grafik 4. Kan şekeri değerinin gruplar arası değişimi	36
Resim 1. Sıçanın sırt bölgesinde oluşturulan 2 cm'lik kesi alanı	29
Resim 2. Yara iyileşme sürecinin 7. gününde yara alanında gruplar arası farklılık	37
Resim 3. İyileşme sürecinin 10. gününde yara alanında gruplar arası farklılık	37
Çizelge 1. Deney gruplarının 3. 7. ve 14 . günlerde histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak toplu değerlendirmesi	100

KISALTMALAR

ADP	Adenozin Difosfat
aFGF, FGF-1	Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü
ALX	Alloksan
AT	Azan Trikrom
ATP	Adenozin Trifosfat
bFGF, FGF-1	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BM	Bazal Membran
D	Dermis
Da	Diabet + Asetik asit
Dc	Diabet + Kitosan
DM	Diabetes mellitus
Do	Diabetli kontrol
E	Epitel
ECM	Ekstraselüler matriks
EGFs	Epidermal Büyüme Faktörleri
EPO	Eritropoetin
FGFR-3	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptör-3
GCSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
H&E	Hematoksilen Eozin
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF-1	Hipoksi-İndüklenebilir Faktor-1
HSP60	Isı Şok Protein 60
HSPG	Düşük Afiniteli Reseptörler
IFn- α	İnterferon α
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I
IL-1	İnterlökin-1
IL-8	İnterlökin 8
İ	İyileşme Alanı
KF	Kıl Folikülü
LTB4	Lökotrien B4
MHC1-MHC2	Major Histokompatibilite Kompleksi
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NOD	Nonobes diabetik
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PAS	Periyodik Asit Schiff

PDGF	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PF-IV	Trombosit Faktörü IV
PGF	Plasental Büyüme Faktörü
PMN	Polimorfonükleer hücre
STZ	Streptozotosin
TGF α/β	Farklılaştırıcı Büyüme Faktörü Alfa ve Beta
TIMP	Doku Metalloproteaz İnhibitörü
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörleri
YB	Yağ Bezi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), pankreasın insülin salgılama yetersizliği ve/veya dokuların insüline yanıtının bozulmasıyla oluşan, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen metabolik bir hastalıktır (1). Diabetli hastalarda yara iyileşmesi engellenmiştir (2). İyileşme süreci de diabetik olmayanlarla karşılaştırıldığında oldukça farklıdır (3). Diabetin neden olduğu yan etkileri ortaya koyabilmek için pankreas β hücreleri için toksik ajanlar olan alloxan (ALX) ve streptozotosin (STZ) (4, 5) kullanılarak deney hayvanlarında diabet modelleri oluşturulur.

Yara iyileşmesi, hemostaz-inflamasyon, proliferasyon, olgunlaşma ve yeniden yapılanma olarak adlandırılan birbiriyle bağlantılı üç ana faza ayrılır. Yaralanma başladığı anda ilk faz devreye girer. Yara iyileşmesinde interlekin 1 (IL-1), tümör nekroz faktör (TNF- α), trombosit aktive edici büyüme faktörü (PDGF), farklılaştırıcı büyüme faktörü (TGF- β), trombosit aktive edici faktör (PAF), histamin, prostaglandin, prostasiklin, fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü gibi daha birçok faktör etkilidir (6, 7). Diabetli insan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar diabetin organizmada oluşturduğu olumsuz koşulların yara iyileşmesinin her evresini (yangı, hücre göçü ve çoğalması, kollajen sentezi, kollajenaz sentezi, yeniden yapılanma) olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir (8–10). Diabetli organizmada yangı alanına kan hücrelerinin göçü yavaşlar (8, 11). Hücrelerin morfolojisi ve çoğalma işlevinde değişimler meydana gelir (12, 13). Yara iyileşmesinde etkin rol oynayan proteinlerin (örn: kollajen) hücreler tarafından üretilmesi ve hücreler arası alana salınımında azalma görülür (9, 14). Yara iyileşme evrelerinde önemli olan çeşitli büyüme faktörlerinin (VEGF ve FGF) ve reseptörlerinin (FGFR-3 gibi) lokalizasyonunda değişimler izlenir (3).

Kitosan, mühendislikten tıp alanlarına kadar geniş kullanım özelliğine sahip bir polimerdir. Tıp alanında yara iyileşmesine etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (15). İyileşme sürecini hızlandırır (15, 16), tedavi frekansını ve ağrıyı azaltır (16), yara yüzeyini korur (17). Kitosan, yara iyileşme sürecinde polimorfonükleer hücre ve makrofajların aktivasyonu, sitokin üretimi, dev hücre

göçü ve kollajen sentezini uyarma gibi aşamalarda önemli rol oynar. Ayrıca mikroorganizmalara karşı koruyucu etki göstermekte, damar oluşumunu ve granül doku oluşumunu stimüle etmektedir (15).

Kitosan'ın yara iyileşmesine etkisi ile ilgili çalışmalar dikkat çekicidir. Çalışmalar doku reaksiyonlarını artırdığını destekler. Deneysel hayvan modellerinde kitosan'ın, yara iyileşmesinin tüm fazlarında etki ettiği gösterilmiştir. İnflamatuvar fazda kitosan'ın hemostatik aktivitesi gösterilmiş, ayrıca makrofaj ve nötrofillerin göçünü ve ilişkisini düzenlediği, graranülasyon doku oluşumunu ve yeniden şekillenme gibi süreçlerde etki ettiği belirlenmiştir (16). Ayrıca kitosan jeli ideal bir yara pansumanıdır. Kitosan, biyouyumlu, biyoparçalanabilir, kanamayı durdurucu, enfeksiyon oluşturmeyen ve en önemlisi yara iyileşmesini hızlandırıcıdır. Kitosan jeli, doku yapıştırıcı özelliğe de sahiptir (16, 17).

Bu çalışmada, kitosan'ı, diabetli sıçanların yara bölgesine uygulayarak, yukarıda özelliklerini belirttiğimiz büyüme faktörlerinden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü reseptör-3 (FGFR3) lokalizasyonlarını göstermeyi, böylece kitosan'ın diabetli deneklerdeki yara iyileşmesine katkısını belirlemeyi amaçlıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus, dünya nüfusunun önemli bir kısmını etkileyen hiperglisemi ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır. İnsülin eksikliği (Tip 1) ya da insüline karşı direnç gelişmesi (Tip 2) temel bozukluktur. Tip 1 diabet; çocukluk ve genç erişkin döneminde başlayan, etyolojisi kesin olarak bilinmeyen, genetik yatkınlıkla pankreasın β hücrelerinde zedelenme ile sonuçlanan otoimmün bir hastalıktır. Tüm diabetlilerin yaklaşık olarak %10-15'ini oluşturur. Tip 2 diabet ise; genellikle 40 yaşlarından sonra başlayan, esas nedeni tam olarak bilinmeyen, genetik yatkınlıkla beraber sıklıkla obesite ile ilişkili, insüline direnç ya da insülin salınımında bozulma ile karakterize kronik bir hastalıktır. Tüm diabetlilerin yaklaşık olarak % 85-90'ini oluşturmaktadır (18-20).

Tipi ne olursa olsun diabetteki hücrenel ve hücre dışı bozukluklar hastanın savunma mekanizmalarını bozmaktadır. Bu yönüyle diabet sekonder bir immün yetersizlik hastalığı olarak nitelendirilebilir (21).

Diabetli insan sayısı; nüfus artışına, yaşlanmaya, kentleşmeye, fiziksel aktiviteye ve obesite prevalansının yükselmesine bağlı olarak artmaktadır. Diabetli hasta sayısı ve diabet prevalans hesaplamaları, hem günümüzde hem de gelecekte, rasyonel planlamalar ve soruna çare bulabilmek açısından son derece önemlidir (22-25). Diabet sıklığındaki artışla, diabetin tüm komplikasyonlarının sıklığı da artacaktır (23). Türkiye Diabet Epidemiyoloji Grubunun verilerine göre ülkemizde 2000 yılında 2 920 000 olan DM sıklığı, 2030 yılında 6 422 000'a ulaşacaktır (25, 26).

2. 1. 1 Diabetes Mellitus'un Patofizyolojisi

Pankreasta bir milyon civarı Langerhans adacığı vardır. İnsülin salgısından sorumlu beta adacık hücreleri, Langerhans adacıklarının % 60'ını oluşturur (27). Diabetes mellitusTa; insülinin azlığı veya yokluğu, ya da hedef hücrelerin insüline yanıtızlığı nedeniyle dokularda insülin açlığı söz konusudur. Diabetteki patolojik olaylar, insülin eksikliğine bağlı üç major etki sonucu oluşur:

- 300 ile 1200 mg/dl aralığında değişen kan glukoz düzeyi yüksekliği ile birlikte, vücut hücrelerinin glukozdan yararlanımlarının düşmesi,

- Yağ depolarından, yağ mobilizasyonunun belirgin olarak artması ve bunun sonucunda atheroskleroza yol açan vasküler duvarlarda lipidlerin depolanması ile karakterize anormal yağ metabolizması,

- Dokulardan protein yıkımı (28)

İnsülin, disülfat bağları ile birbirine bağlı iki adet aminoasid zinciri içeren bir polipeptiddir. Beta hücrelerinin endoplazmik retikulumunda sentezlenir. Ekzositoz yolu ile komşu kapiller endoteline ulaşır ve oradan da kana karışır. İnsülin, hedef hücrelerinin hücre membranlarındaki insülin reseptörlerine bağlanarak metabolizmadaki etkilerini tetikleyen ilk adımı atar. Beta hücrelerinden salgılanma bifazik bir süreç ile oluşur. İnsülin salınımını tetikleyen en önemli uyarı glukozdur ve aynı zamanda insülin sentezini de başlatır (28). İnsülinin dokulardaki temel etkileri şunlardır:

A) Yağ Dokusu

- Hücreye glukoz girişini arttırır.
- Yağ asidi sentezini arttırır.
- Gliserol fosfat sentezini arttırır.
- Trigliserid depolanmasını arttırır.
- Lipoprotein lipazı aktive eder.
- Hormona duyarlı lipazı inhibe eder.
- Potasyum alımını arttırır.

B) Kas Dokusu

- Hücreye glukoz girişini arttırır.
- Glikojen sentezini arttırır.
- Aminoasid alımını arttırır.
- Ribozomlarda protein sentezini arttırır.
- Protein katabolizmasını azaltır.
- Glukoneogenik aminoasid salınımını azaltır
- Keton alımını arttırır.
- Potasyum alımını arttırır.

C) Karaciğer

- Ketogenezi azaltır.
- Protein sentezini arttırır.
- Lipid sentezini arttırır.
- Glukoneogenezi azaltarak ve glikojen sentezini arttırarak glukoz miktarını düşürür.

D) Genel

- Hücre büyümesini arttırır (28).

2. 1. 2. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

A) Diabetes Mellitus'un Akut Komplikasyonları

- Diabetik Ketoasidoz
- Hiperosmolar non-ketotik koma
- Hipoglisemi

B) Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları

- Diabetik mikroanjiopati
- Diabetik makroanjiopati (ateroskleroz)
- Diabetik nöropati
- İnfeksiyonlar
- Dermopatiler
- Depresyon
- Diabetik ayak yaraları (28).

2. 2. Deneysel Diabet Oluşturma

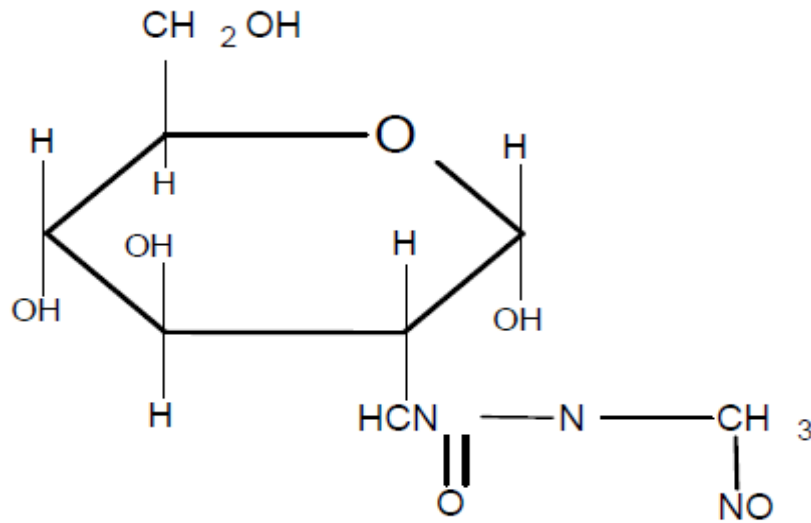
Diabet kronik bir hastalık olup, uzun dönem incelemeler veri toplama açısından çok vakit alacağından hayvan modelleri üzerinde çalışılmaktadır. Çok çeşitli diabet modelleri vardır. Bunlardan hayvan diabet modelleri genelde insan diabet modellerine benzer yönlere sahipse de, kesinlikle tıpatıp aynı olmadığı unutulmamalıdır. Bunlar;

- Kimyasal diabet
- Cerrahi diabet

- Spontan diabet
- Viral diabet
- Transgenik diabet'tir.

En çok tercih edilen yöntem kimyasal diabettir. Deneysel çalışmalarda kullanılan çeşitli ilaçlar ve kimyasallar diabet benzeri tabloya neden olur. Bunlardan streptozotosin ve alloksan en kullanışlı olanlarıdır. Beta hücre yıkımı ile insanlardaki Tip I diabet benzer şekilde diabet oluştururlar (4, 27).

Streptozotosin, diabetojenik özelliği olan dar spektrumlu bir antibiyotiktir. *Streptomyces achromogenes* kültürlerinden 1959 yılında Herr ve Eble tarafından elde edilmiş, 265 D molekül ağırlığında, 2-deoksiglikoz'un nitroz üre türevidir. 2-deoksi-2-(3-metil-3 nitroz üre) 1-d-glikopiranoz ($\alpha+\beta$) yapısında olan ve başka bir adlandırma ile adı N-methylnitrosocarbamoyl- α -D-glucosamine olan streptozotosin (STZ), Langerhans adacıklarının β hücreleri için özgün toksik etki gösteren bir maddedir (Şekil 1). Streptozotosinin 2-deoksiglikoz bileşeni β hücre özgünlüğünden, nitrozüre bileşeni ise toksik etkiden sorumludur. Deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda orta derecede bir insan karsinojeni olduğu tespit edilmiştir (29). Streptozotosinin sıçan, fare, hamster, köpek, kuzu ve maymunlarda diabet yapıcı etkisi saptanmıştır. Beta hücrelerine etkisinin alloksan'dan daha kuvvetli olduğu bilinmektedir (30).



Şekil 1. Streptozotosin'in kimyasal yapısı (29).

Streptozotosin, açık sarı renkte, suda ve alkolde kolayca çözünebilen bir maddedir. Nötral pH'da hızla dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için ortamın pH'sı 4-4.5 olmalıdır. Bu nedenle STZ çözülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır (5, 15, 31). Önceleri antibiyotik olarak kullanılırken antitümoral etkiye sahip olduğu bulunmuştur, daha sonra kanserojen etkisi tesbit edilmiştir. Bugün ise diabetojenik etkisinden yararlanılmakta ve deneysel diabetik çalışmalarında kullanılmaktadır. Kan glikozunu en yüksek düzeye çıkaran STZ dozu genellikle 60-65 mg/kg'dır. Saf bileşik nem ve ışığa duyarlıdır.

Diabetojenik dozda STZ verilmiş hayvanlarda genellikle 24 saatten sonra kalıcı bir diabet meydana gelmektedir. Streptozotosin verilmesinden sonra kan şekerinde üç devreye ayrılan bir değişim gözlenir. İlk iki saat sonunda hiperglisemi görülürken, 6-12. saatleri arasında hipoglisemiye ve 18-24. saatler arasında ise kalıcı bir hiperglisemiye neden olduğu belirlenmiştir (32).

Streptozotosin, hayvan ya da insana enjekte edildiğinde ilacın en fazla biriktiği alanların karaciğer ve böbrek olduğu görülmüş, ancak daha öncesinde antitümöral ajan olarak bu ilacı alan kişilerde renal ya da hepatik sitotoksik semptomların ortaya çıktığı tesbit edilmiştir (33, 34). Streptozotosin tarafından oluşturulan diabet ile kendiliğinden gelişen diabetin arasındaki immunolojik farklılık önemli bir sorundur. Nonobes diabetik (NOD) farelerdeki diabette, diabetten önce ortaya çıkan insulitis periyodunda insüline ve ısı şok protein 60 (HSP60)'a karşı oluşmuş immunité bildirilmiştir. Bu tür farelerde HSP60'ın p277 peptidi için spesifik T lenfositler bulunmuştur. Bu peptidler diabetin nedeni olabilirler (35). Bu ajan, poli (ADP-riboz) sentetaz enzimini baskılar ve β -hücrelerinde NAD'nin hücresel seviyesini düzenler (36).

2. 3. Derinin Yapısı

Deri, vücudun en büyük organıdır ve vücuda mekanik destek sağlama (koruma), su bariyeri oluşturma, vücut ısısının düzenlenmesi, özgün olmayan savunma, tuz atılımı, D vitamini sentezi, duyu algılama ve uyarı gibi görevleri vardır (37).

Deri birbirine sıkıca bağlı üç tabakadan meydana gelir.

- En dışta ekdoderm kökenli **epidermis**
- Daha derinde mezoderm kökenli **dermis**
- Anatomide yüzeyel fasia olarak adlandırılan **hipodermis** veya **subkutanöz tabaka (38)**.

2. 3. 1. Epidermis

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

Keratonositler: Hakim olan hücre tipi keratinositlerdir. Başlıca rnleri olan ara filaman proteini keratin nedeniyle bu ismi almışlardır. İçten dışa beş tabaka şeklinde düzenlenirler.

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

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

Stratum spinosum: Bu tabakada bulunan hücreler oval merkezi bir nukleusa sahiptir ve kübik şekillidirler. Hücre içinde bol miktarda bulunan keratin

filaman demetleri hücrelerin sitoplazmik uzantılarının ucunda yerleşmiş olan dezmozomlarda sonlanırlar. Bu tabakada hücreler birbirlerine içi filaman dolu dikensi çıkıntılarla sıkı sıkıya bağlanırlar.

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

Stratum lusidum ve Stratum korneum tabakaları nukleussuz ve organelsiz hücrelerden oluşurlar (38).

Melanositler: Melanin üretiminden sorumlu nöral krista kökenli hücrelerdir. Epidermisen stratum bazale tabakasına yerleşmiş, uzantılı hücrelerdir. Melanositler, nöral kristadan göç eden öncü hücreler olan melanoblastlardan köken alırlar. Melanoblastın, melanositlere dönüşmesi, membrana bağlı bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörüyle etkileşime giren kök hücre faktörünün kontrolü altında gerçekleşir. Mast hücreleri, primordiyal germ hücreleri ve kan yapıcı kök hücrelerin gelişimi de kök hücre faktörünün, c-kit reseptörüyle olan etkileşimine bağlıdır. Melanositler, gelişmekte olan epidermis içine girerler ve farklılaşmakta olan keratinositlerle herhangi bir desmozom bağlantısı kurmadan bağımsız hücreler olarak kalırlar. Melanositlerin hayat döngüsü, keratinositlerden daha yavaştır. Melanositler, melanin granülleri içinde paketlenmiş olarak melanin pigmentini üretirler. Bu granüller de, dallanan hücre uzantıları aracılığı ile sitokrin salınım ile komşu keratinositlere aktarılır.

Langerhans hücreleri (dendritik hücreler): Epidermiste bulunan kemik iliği kökenli dendritik hücrelerdir. Bu hücreler, immün cevapta, özellikle derinin aşırı duyarlılık reaksiyonlarının başlangıcında, T lenfositlere antijen sunumunda rol oynarlar. Langerhans hücreleri epidermisten lenf düğümlerine göç ederek, burada MHC1-MHC2 (major histokompatibilite kompleksi) ile B7 hücre yüzey antijenlerini taşıyan aktif dendritik hücrelere dönüşürler. Aktif dendritik hücreler de, T lenfositleri uyatarak onları aktif hale getirirler. Melanositler gibi Langerhans hücreleri de stratum spinozumdaki keratinositler arasında uzanan sitoplazmik uzantıları (dendritik hücreler) vardır. Bu uzantılarla keratinositler arasında desmozomal bağlantı yerine E-kadherin aracılığıyla temas sağlanır. Langerhans hücre çekirdeği çentiklidir ve sitoplazmasında tipik çubuk şeklinde granüller bulunur.

Merkel hücreleri: Dokunma duyusunun alınmasında rol alan nöral krista kökenli hücrelerdir. Stratum bazalede bulunan ve modifiye keratinositlere benzeyen hücrelerdir. Parmak uçlarında daha çok bulunurlar. Merkel hücreleri, komşu keratinositlere desmozomlarla bağlı bulunan ve dermisten epidermise uzanan miyelinli afferent sinir lifleriyle irtibatlı mekanoreseptör hücreleridir. Sinir lifi, epidermisen bazal laminasını geçtikten sonra miyelin kılıfını kaybeder ve plak benzeri bir duyuşal sonlanma şekline dönüşerek, Merkel hücreleriyle temas eden bir sinir plağı oluşturur. Çekirdeğin şekli düzensizdir ve sitoplazmada nörotransmitter içeren çok sayıda granüller bulunur (38).

2. 3. 2. Dermis

Dermis, sınırları belirgin olmayan papiller ve retiküler tabaka olmak üzere iki tabakadan meydana gelir. Papiller tabaka, epidermisle temasta olan gevşek bağ dokusu (fibroblastlar, kollajen lifler ve ince elastik lifler) yapısındadır. Retiküler tabaka, kalın kollajen lif demetleri ve kaba elastik lifleri içerir. Stratum bazaledeki keratinositlerin bazal yüzeylerinde bulunan hemidesmozomlar, epidermisen bazal membrana bağlayıcı filamanlarla, dermisen papillalı tabakasına ise bağlayıcı liflerle bağlanırlar (38).

Bağ dokuları hücreler, lifler ve ara maddeden oluşur. Bağ dokusunun fazlaca çeşitlilik gösteren hücreleri metabolitlerin depolanmasında, immün ve yangısal cevaplarda ve yaralanmadan sonra doku onarımında önemli rollere sahiplerdir (4, 38).

Yara iyileşmesinde esas rolü oynayan bağ dokusunun en önemli hücrelerinden birisi olan fibroblastlar, en fazla bulunan hücrelerdir. Bu hücreler yara iyileşmesi sırasında hücreler arası matriks depolanması ve yenilenmesinde esas rolü oynayan hücrelerdir. Ayrıca yara iyileşme sürecinde hücreler arası iletişimin gerçekleşmesi için gerekli olan VEGF, TGF, FGF gibi büyüme faktörlerini de salgırlar (12, 39). Fibroblastlar bol, düzensiz dallanmış bir sitoplazmaya sahiptir. Ovoid ince kromatinli ve belirgin çekirdekçiği olan bir çekirdeği vardır. Hücre elemanları gördüğü işlevlere uyumludur (12, 38).

Kıl follikülleri, ter ve yağ bezleri, dermisin çeşitli seviyelerinde bulunan epidermal türevlerdir (38).

2. 3. 3. Hipodermis

Hipodermis veya derinin subkütanöz tabakası, dermisin derindeki devamıdır. Vücuttaki lokalizasyona bağlı olarak değişen kalınlıklarda bir tabaka oluşturan, gevşek bağ dokusu ve yağ hücrelerinden meydana gelir (38).

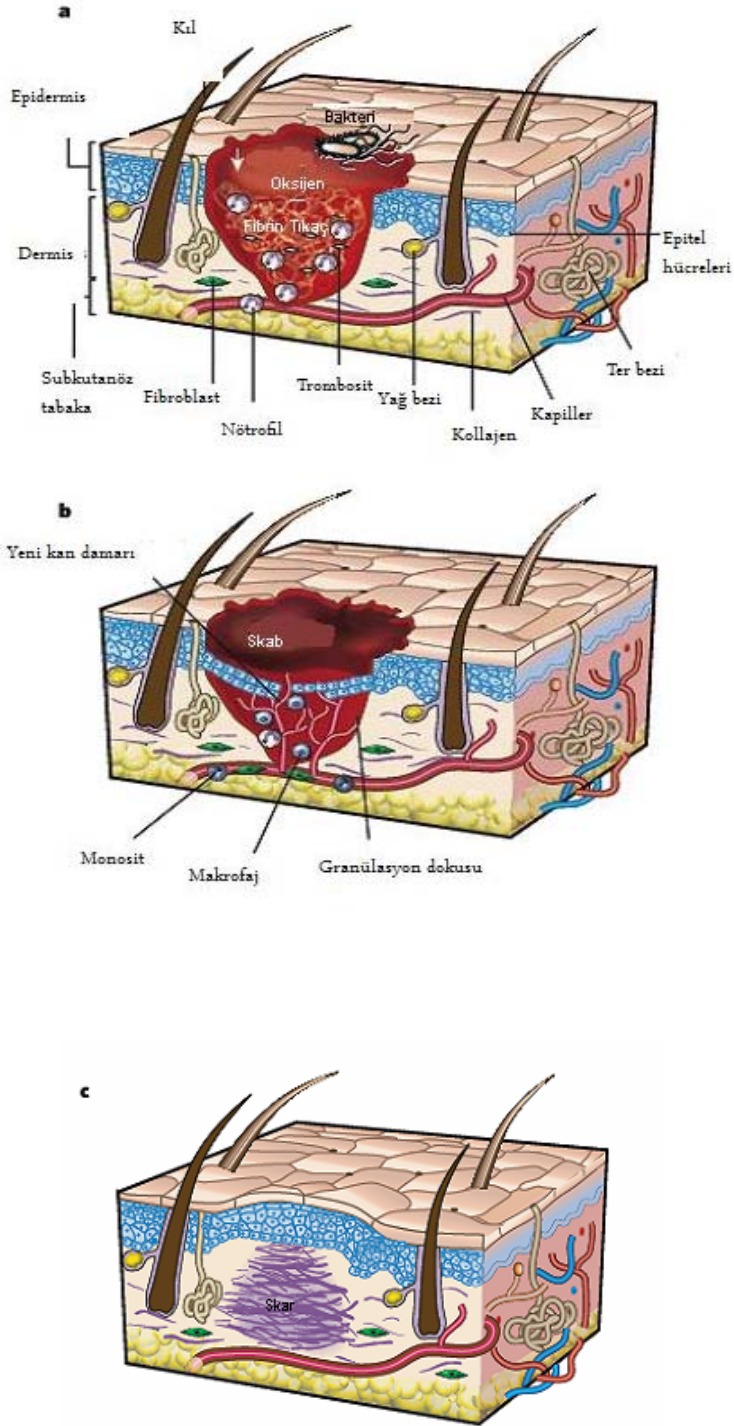
2. 4. Yara İyileşmesi

Cilt ve/veya mukozayı oluşturan yapıların farklı nedenlerle bütünlüğünün bozulması ya da kaybı ile var olan fizyolojik özelliklerinin geçici veya tamamen kaybolmasına **yara** adı verilir.

Dokularda meydana gelen yaraların iyileşme mekanizmaları bazı farklılıklar göstermesine rağmen, hepsinde ortak olan ve bilinen klasik özellikler mevcuttur. Yara iyileşmesinde genellikle vücudun bozulan bütünlüğünü skar (yara izi) olarak adlandırılan fonksiyonel olmayan bir fibrotik kütle ile sağlar (40-42).

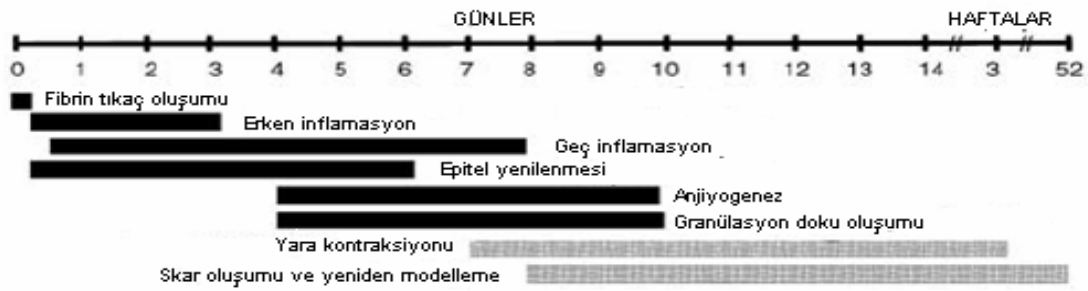
Normal yara iyileşmesi, inflamatuvar hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve endotelial hücreleri gibi pek çok hücre tipinin hareketinin sağlandığı hatta enzim ve büyüme faktörlerini gerektiren ve sinyal yollarının ileri derecede birbiriyle ilişkilendirildiği karmaşık bir süreçtir (3, 43, 44). Yara iyileşmesi, yaralı dokunun yapı ve fonksiyonunun düzeltilmesidir. İyileşme süreci yaranın anında başlar, günler haftalar hatta yıllarca sürebilir (43).

Yara iyileşmesi esas olarak 3 ana olay çerçevesinde gerçekleşir (3-48). Olaylar ardışık bir düzen içinde değil, birbiri içerisinde sınırları tam olarak ayırt edilemeyecek özelliktedir. Bu evreler Şekil 2'de gösterilmiştir. Ancak bazı kaynaklar yara iyileşme aşamalarını tıkaç oluşturulması, inflamasyon, proliferasyon, epitel çoğalması, damar oluşumu (anjioenez), granülasyon ve yeniden modelleme olarak almışlardır (48-50) (Şekil 2).



Şekil 2: Yara iyileşmesinin klasik fazları. Klasik bir iyileşme sürecinde 3 faz vardır. Hemostaz ve inflamasyon (a), yeni doku oluşumu (b), yeniden modelleme (c), İnflamasyon (a) süreci yaralanmadan 48 saat sonraya kadar sürer. Yara, bir fibrin tıkaçla kapatılmış olan hipoksik (iskemi) durumu ile karakterizedir. Bakteri, nötrofil ve trombositler yarada bol miktarda

bulunur. Normal deri ekleri (kıl follikülleri ve ter bezleri) yara alanı dışında yer alır. Yeni doku oluşum (b) süreci yaralanmadan sonra 2- 10 gün devam eder. Yara yüzeyinde bir yara kabuğu (escar, scab) oluşur. Pek çok hücre bir önceki fazdan yaraya doğru göçetmiştir ve artık yeni kan damarları da bu alanda görülmeye başlar. Yeniden modelleme (remodelling) (c) bu faz bir yıl veya daha fazla sürebilir. Organizasyonu bozulmuş kollajenler yara alanına göç eden fibroblastlar tarafından oluşturulmuştur. Yara kendine yakın yüzeyi kasmıştır ve artık yara daha derinlerdedir. Yara epitelinin yeniden oluşmasıyla tamir edilen bölge çevredeki yara olmayan bölgelere göre daha yukardadır ve iyileşmiş alan normal deri eklentilerini içermez (42).



Şekil 3. Yara tamir süreçleri (3).

Yara iyileşme süreci, **hemostaz ve inflamasyon**, yeni doku oluşumu (**proliferasyon**) ve **yeniden modelleme** şeklinde sıralanabilir (40-53) (Şekil 2 ve 3).

Hemostaz ve inflamasyon; yara iyileşmesinin bu ilk fazında fibrin tıkaç oluşumu ve inflamasyonda doku hasarlandıktan hemen sonra pıhtılaşma basamaklarının elemanları, inflamasyon yolakları ve immün sistem ölmüş dokuyu uzaklaştırmak ve enfeksiyondan korumak için hızla kan akışını ve sıvı kaybını önlemeye ihtiyaç duyar (51). Damar bütünlüğünün bozulduğu bu durumlarda, kan kaybını durdurmaya yönelik mekanizmalar devreye girmektedir. Bu mekanizmalar:

- Vazokonstriksiyon
- Trombosit tıkaçı
- Pıhtılaşma
- Fibröz organizasyon şeklinde sıralanabilir (27).

Endotel altında yerleşmiş bazal membrandaki trombojenik uyarılar, trombositlerde bulunan yüzey reseptörleri uyararak trombosit adezyon ve

agregasyonunu uyarır. Bu sırada trombositlerden salınan bazı sitokinler ve refleks arklar yoluyla vazokonstrüksiyon gerçekleşir.

Bu faktörler aynı zamanda pıhtılaşma zincirini de aktive eder. Trombosit tıkaç çevresinde fibrin tıkaç oluşur ve pıhtı denen kalıcı tıkaç ortaya çıkar. Pıhtı aynı zamanda erken yara matriksi olarak işlev görmektedir.

Trombositlerin içindeki alfa granüllerden; albumin, fibrinojen, fibronektin, immunglobulin G, faktör V ve faktör VIII'in yanı sıra trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), farklılaştırıcı büyüme faktörü alfa ve beta (TGF α/β), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ve epidermal büyüme faktörleri (EGFs) ve endotel hücresi büyüme faktörleri salınmaktadır.

Trombositlerin içindeki yoğun cisimler içerisinde ise serotonin, adenzin trifosfat (ATP), adenzin difosfat (ADP), kalsiyum gibi pıhtılaşma zincirinde önemli rolleri olan faktörler bulunmaktadır (54). Doku hasarlanması sırasında bozulan damar bütünlüğü, pıhtılaşma mekanizmalarını aktive etmektedir. İntrensek ve ekstrensek mekanizmalar pıhtılaşma sisteminin temelini oluşturmaktadır. İntrensek yolak, yara iyileşmesi için ekstrensek yolak kadar etkin değildir (55). Ekstrensek yolak, doku faktörünün faktör VII veya faktör VIIa'nın teması ile uyarılır ve sonuçta protrombin trombine dönüşerek aktive olur. Aktive olan trombin, fibrinojeni fibrine çevirerek fibrin tıkaç oluşumuna neden olur (27, 55).

Fibrin tıkaç sabitleştirildikten sonra vitronektin ile kaplanır. Vitronektin aracılığıyla fibronektin erken matrikste kendine yer bulur. Fibronektin üzerinde pek çok hücre için yapışma noktaları mevcuttur. Ayrıca fibrin, fibronektin matriks ve sitokinler için toplayıcı görevi görmektedir (54, 55).

Yaralanmanın erken dönemlerinde gelişen vazokonstrüksiyon 10–15 dakika içinde son bulur ve vazodilatasyon gelişir. Bu kendisini yara çevresinde kırmızı-kızıl bir hale şeklinde gösterir. Trombositlerden 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 artırıcı kuvvetli ajanlardır (27, 51).

Bu aşamayı **inflamasyon** olarak adlandırılan, büyüme faktörlerini yara alanına çeken inflamatuvar hücrelerin göçü izler. İnflamasyon evresinin hücrelerinden biri, patojenik organizmalardan enfeksiyonu engellemek için yara bölgesine gelen nötrofillerdir (Şekil 2, 3). Bu sırada ortama nötrofil granüllerinden jelatinaz, kollajenaz, elastaz gibi proteazlarla birlikte reaktif oksijen radikalleri de salınmakta ve bu da nekrozu debride etmektedir (56).

Kollajen, elastin yıkım ürünleri, TGF- β , tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), PDGF, lökotrien B4 (LTB4) ve trombosit faktörü IV (PF-IV) lökositler için kuvvetli kemoatraktandır. Trombosit faktörü IV, CD11/CD8 ekspresyonunu artırarak diapedezi kolaylaştırır. Damar dışı alana çıkan monositler, T-lenfositlerinde salınan IL-2 ve interferon α (IFN- α) ile aktive olur ve ortama TGF- β salarlar. Farklılaştırıcı büyüme faktörü beta da (TGF β) kuvvetli kemotaktik etki ile akut inflamasyonun tipik hücrelerinin toplanmasına katkıda bulunur (27).

Makrofajlar, inflamasyonun en önemli hücrelerindedir. Yaralanmadan 48 saat sonra ortaya çıkmaya başlar ve çoğunlukla dolaşımdaki monositlerden köken alırlar. Nötrofiller, o zamana kadar gerçekleştirdikleri görevleri daha kuvvetli şekilde devam ettirirken, eş zamanlı olarak da saldıkları veya salınmasını düzenledikleri pek çok büyüme faktörü ile yara iyileşmesinin düzenlenmesinde orkestra şefi gibi görev yapar. Makrofaj kaynaklı sitokinler yeniden damarlanma, fibroblast göçü ve çoğalması, kollajen üretimi ve yara kontraksiyonu ile ilişkilidir. Farklılaştırıcı büyüme faktörü beta, insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), FGF-2, PDGF, TNF- α , IL-1 makrofaj sitokinlerinin önemli üyelerindedir. Diabetiklerde, fonksiyonel olarak ayrımlanan makrofaj alt tiplerinde farklılıklar saptanmıştır. İnflamatuvar ve hücre öldürücü makrofaj oranları artarken, tamir makrofajlarının oranı azalmaktadır. Bu değişim sitokinleri de değiştirerek, fibroplazi, yeni damar oluşumu ve proliferatif faza geçişi uyaran faktörleri baskılamaktadır. Diabetiklerde, makrofajlardan PDGF ve IGF-1 salınımının azaldığı gösterilmiştir. Bunun yerine inflamatuvar makrofaj fenotipinin saldıgı inflamatuvar sitokinler artmaktadır (57). İki-üç gün sonra monositlerden farklı olan makrofajlar belirir. Makrofajların yaralanmalarda son

olayları koordine etmede çok önemli olduğu düşünülür. Son veriler, monositlerin inflamatuvar cevapta gereğinden fazla hücrenin yara alanına gelmesini engellediğini ve diğer hücre tiplerinin eksikliğini dengelediğini bildirir (58).

Proliferasyon; yara iyileşmesinin başlangıç safhalarında fibrince zengin bir matriks içerisinde inflamatuvar hücreler henüz etkin iken, temiz yaralarda 3–5. günden başlayarak makrofajlarca salınan PDGF, TGF- β gibi sitokinler tarafından fibroblastlar harekete geçirilir ve bölünerek çoğalmaya yönlendirilir. Bu dönemden itibaren, fibroblastlar yara ortamındaki baskın hücre haline gelmektedir.

Fibroblastların tek kaynağı çoğalma değildir. Bunun yanında çevre dokudaki fibroblastlar, PDGF, TGF- β , EGF ve fibronektin tarafından aktive edilerek erken yara matriksi içinde ilerlemesi sağlanır (3, 36). Mezenşim kökenli kök hücreden ortam uyaranlarına bağlı olarak fibroblasta farklılaşma da diğer bir kaynaktır (27).

Yara iyileşmesi sırasında yeni damarların oluşması (anjyogenez) ile ilgili üç süreç vardır. Bunlar yeni damar oluşumu, arteriyogenez ve vaskülogenezdir (59, 60). Anjiogenik faktörler; VEGF, PGF (plasental büyüme faktörü), FGF1-4, TGF α - β , EGF, HGF (hepatosit büyüme faktörü), anjiyogenin, PDGF, GCSF (granüosit koloni uyaran faktör), IL-8 (interlökin 8), TNF- α (tümör nekroz faktör- α), proliferindir (57).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Vasküler endotelial büyüme faktörü ailesi, VEGF A dan başlayarak VEGF F'ye ve PlGF (plasental büyüme faktörü) içeren değişik tiplerdedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü hücre yüzeyine üç farklı tirozin kinaz yapılı reseptörle bağlanır. Bunlar VEGFR1-2 ve 3 dür. Vasküler endotelial büyüme faktörleri reseptörlerine karmaşık bir sistemle bağlanarak damar oluşumunu düzenler (59-62).

Vasküler endotelial büyüme faktörü yara iyileşmesinde endotel hücreleri (63), fibroblastlar (64), düz kas hücreleri (65), trombositler (66), nötrofiller (67) ve makrofajlar gibi (68) pek çok hücre tarafından üretilir. Görevi, endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiyasyonuna sebep olmaktır. Endotel hücrelerinin yaptığı pek çok fonksiyonda (embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör

büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylar) gerekli olduğu düşünüldüğü için son yıllarda ilgi odağı haline gelmekte ve pek çok araştırmaya konu olmaktadır (69-71). Vasküler endotelyal büyüme faktörü, hücreye VEGFR1, VEGFR2 gibi yüksek afinitesi olan reseptörlerle bağlanır (72). Bu reseptörler tip 3 tirozin kinaz yolağını kullanırlar (73, 74).

Vasküler endotelyal büyüme faktörünün salınımının kontrolü eritropoetin (EPO) kontrolü ile benzer özelliktedir. Doku hipoksisi ile ortamda bulunan fibroblastlarda, keratinositlerde ve makrofajlarda hipoksi indüklenebilir faktör-1 (Hypoxia-inducible factor-1/ HIF-1) denilen bir protein aktive olur ve bu protein VEGF promotör bölgesinin 5' ucundaki 28 baz çifti uzunluğundaki parçasına bağlanır. Yirmi sekiz baz çifti uzunluğundaki bu bölge EPO kontrolünü sağlayan promotör bölge ile büyük homoloji göstermektedir. Bu bağlanma sonucunda VEGF promotörü aktive olur ve VEGF salgınır. Ortamda oksijen yoğunluğu arttığında ise hidroksillenir ve aktivitesini kaybeder (61).

VEGF kadar FGF ailesinin bir üyesi olan bFGF' nin de potansiyel bir damar oluşturucu faktör olduğu bildirilmiştir (52, 75, 76).

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF), polipeptit büyüme faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturmaktadır. Fibroblast büyüme faktörleri nematodlardan insanlara kadar değişik organizmalarda bulunmaktadır (77). Fibroblast büyüme faktörleri çeşitli mezoderm ve fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kondrositler, melanositler gibi nöroektodermden türeyen hücreler için kuvvetli mitojenik aktiviteleri, nörotropik özellikleri ve heparin bağlama özellikleri ile karakterizedir (78). Çok bilinen iki FGF, izoelektrik noktalarının farklı olması nedeni ile birbirinden ayırt edilmiştir. Asidik FGF (aFGF, FGF-1)'nin izoelektrik noktası 4.5-6, bazik FGF (bFGF, FGF-2)'nin ise 9.6-9.8'dir. Bu iki büyüme faktörü % 55 sıra benzerliğine sahiptir (79, 80).

Genom taraması ile birçok FGF geni bulunmuştur. İnsanda 22 tane FGF geni tanımlanmıştır (81). Yirmiden fazla farklı FGF proteinin içinde bulunduğu heparin bağlayıcı büyüme faktörleri ailesinde yer alır ve 16,5 kDA molekül ağırlığına sahiptir (82, 83). Bazik veya asidik FGF'ye cevap veren tüm hücre tipleri,

spesifik FGF hücre yüzey reseptörleri taşımaktadırlar. Bazik FGF yüksek (FGFRs, tirozin kinaz (TK) aktiviteli FGF reseptörleri) ve düşük afiniteli reseptörlere (HSPG) bağlanmaktadır (84). Fibroblast büyüme faktörlerinde parakrin ve otokrin faktörlerin çok önemli gruplarından birisidir (85). Fibroblast büyüme faktörlerinin reseptöre bağlanması ile reseptörler dimerize olmakta ve bunun sonucunda tirozin kinaz aktivitesi gerçekleşmektedir. Bu kinazlar birbirlerini fosforilleyerek sinyal iletimini başlatmaktadırlar (86). *In vivo* olarak her iki tip FGF'nin granülasyon doku oluşumunu, fibroblast proliferasyonunu hızlandırdığı, kollajen birikimini, vaskülarizasyonu ve epitel yenilenmesini artırdığı da gösterilmiştir (87). Bazik FGF; endoderm, mezoderm ve ektoderm kökenli birçok hücrenin proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkileyen bir büyüme faktörüdür. Bazik FGF; yeni damar oluşumunu, hücre çoğalmasını ve kollajen dışı protein sentezini artırarak yara iyileşmesini etkilerken TGF- β , VEGF, IGF gibi büyüme faktörlerinin salınımını artırarak indirekt olarak da etki gösterirler (88). Bazik FGF'nin osteoblastik hücreler üzerindeki çift yönlü etkisi FGFR'lere bağlanmalarında yarıştıkları sindekanların dokulardaki varlığına ve salınımlarını etkiledikleri diğer sitokinlere bağlı olabileceği öne sürülmüştür (89).

VEGF tarafından aktive olan endotel hücreleri bazal membranı parçalayan matriks metalloproteinazlar (MMPs) salgırlar ve enzimler tarafından delikler açılan bazal membranı geçen endotel hücreleri hızla kemotaktik uyarana doğru çoğalarak göç ederler. Bu esnada yeni damar tüpünü de şekillendirirler. Karşı yönden gelen benzer damar filizi ile birleştikten sonra endotel ilerlemesi durur ve yeni bazal membran sentezlenir (90-92).

Yeniden modellenme: Proliferasyon ve neovaskülarizasyonun sona ermesiyle yeniden yapılanma fazı başlar. Yara iyileşmesinde yeniden yapılanma ve proliferasyon fazındaki olaylar inflamatuvar ve proliferatif fazlardaki gibi iç içe oluşup gelişir. Proliferasyon evresinde artan fibroblastlar kollajen sentezleyerek yara bölgesinde birikime neden olur. Granülasyon doku oluşumu bu evre içinde gerçekleşir (3). Yeniden modellenme evresinde, kollajen sentez ve yıkımı bir denge noktasına ulaşır. Gama (γ)-interferon, TNF- α , ve kollajenin kendisi sentezini baskılar.

Kollajen yıkımından sorumlu olan ise MMP'lerdir. Matriks metalloproteinazlar pek çok hücre dışı amtriks elemanını parçalayabilen bir enzim grubudur. Farklı hücreler tarafından farklı tipleri salınır. Ortamda bulunan doku MMP baskılayıcıları (TIMPs) tarafından kontrol edilirler (54). Erken dönemde düzensiz biçimde depolanan kollajenle bir yara izi (scar) oluşur. Yeniden modellenme evresinde MMP'ler tarafından yıkılır. Fibroblastlar tarafından yeniden sentezlenen kollajen, daha düzenli ve epitele paralel şekilde dizilir. Yara gerim gücü giderek artar (3, 93), böylece iyileşme süreci gerçekleşir.

2. 5. Yara İyileşme Bozuklukları

Pek çok nedenle açılan yaralarda, normal fizyolojik süreçte gelişmesi gereken olaylar zincirine etki eden metabolik bozukluklardan dolayı kapanma problemi ortaya çıkmaktadır. İyileşme sekteye uğradığında kronik yara haline gelmektedir. Zinciri bozan bu faktörler bölgesel, sistemik veya sistemik bir hastalığın bölgesel etkileri olabilmektedir.

Diabetin yara iyileşmesi üzerine olumsuz etkisi olduğu uzun süredir bilinmektedir. Diabetlilerde yara iyileşmesi yavaşlamakta ve sıklıkla istenmeyen durumlar eşlik etmektedir. Diabetiklerde oluşan yaralarda, diabetik olmayanlara göre enfeksiyon riskinin altı kat arttığı saptanmıştır (94). Birçok yazar diabetin yara iyileşmesi üzerine olumsuz etkisini açıklamışlardır (14, 95-98). Diabette yara iyileşmemesinin nedeni, kollajen sentezinin seçici inhibisyonu yüzündendir (14). Farmakolojik olarak diabet oluşturulmuş hayvanlarda kontrol grubuna göre % 30 daha az kollajen içeriği saptanmıştır (95). Azalmış kollajenin, diabetik hayvanlarda artmış yıkımla olan ilişkisi olduğu gösterilmiştir (96). Diabet, kollajen oranına olduğu gibi kalitesine de etki eder. Yapılan bir çalışmada Diabetes Mellitus'ta insan kollajeninin daha çabuk yaşlandığı gösterilmiştir (97). Diabetlilerde kollajenin glikolizasyonu da diabetik olmayanlara göre daha fazla artış göstermiştir (96). Kollajen sentezindeki azalmaya bağlı olarak diabette yaranın gerim kuvvetinde özellikle tedavi edilmemiş diabetli hayvanlarda azalma belirlenmiştir. Diabette yara iyileşmesinin olumsuz etkilenmesinin bir diğer nedeni de glikokortikoid mekanizmalarının aktifleşerek, yara gerim kuvvetini azaltması olmuştur.

Adrenalektomi sonrası veya glukokortikoid reseptör bloklarının kullanılması ile diabetik sıçanlarda, yara gerim kuvvetinin arttığı gösterilmiştir (9, 98).

Reolojik Bozukluklar: Diabet hastalarında trombosit agregasyonu ve adezyonu artmakta ve eritrosit deformasyon yeteneği azalmaktadır. Ayrıca bazal membrandaki bozukluğa bağlı olarak hücreler arası alana sıvı kaçıışı olmakta bu da viskoziteyi arttırmaktadır. Sonuçta yer yer dolaşım problemleri gelişmektedir (99, 100). Diabet hastalarında, ankrin ve spektrin gibi eritrosit iskelet proteinleri de enzimatik olmayan glikozilasyon ve artmış oksidatif yükten etkilenmektedir. Bu etkilenim eritrosit duvar kırılabilirliğini arttırmakta ve reolojik bozukluklar gelişmektedir (101). Yine endotelde gelişen diabetik etkilenim sonucu trombosit agregasyonu ve adezyonu artmaktadır (102, 103).

İmmünolojik Bozukluklar: Yara iyileşmesi sürecinde inflamasyon önemli yer tutmaktadır. Bu evrenin düzenlenmesinde bozukluklar ciddi iyileşme sorunlarına yol açmaktadır (104). Yaralanmadan sonra erken dönemde yara bölgesinde akut inflamasyon özellikleri baskınken, 48. saatten sonra yavaş yavaş kronik inflamasyon hücreleri çoğunluğu ve kontrolü ele geçirir. Normal yara iyileşmesinde izlenen bu yapay akış şeması, diabetiklerde değişiklikler göstermektedir (105).

Diabetiklerde kemotaksis, diapedez fonksiyonlarında izlenen bozukluklar, tüm bağışıklık fonksiyonlarında genel baskılanmaya neden olmaktadır. Bu bozukluklar yara iyileşmesinde kendini göstererek, inflamasyon aşamasında yetersizlikle sonuçlanmaktadır (106, 107). Diabetik yaralarda, inflamasyon geç başlamakta, düşük şiddetle uzun süre devam etmektedir (106). Makrofaj ve B lenfositlerden zengin kronik hücrel infiltrasyon yara iyileşmesinde önemli rolü olan CD4⁺ T lenfositlerinin sitokinleri iyileşmeye yardımcı şekilde yönlendirmesini engeller (108).

Fenotipik olarak farklı tiplerinden olan inflamatuvar, tamir ve hücre öldürücü tip makrofajların oranı değişerek inflamatuvar makrofajların sayısı artar (58). Diabetik yaralarda TNF- α ve IL-1 β düzeyleri artmıştır (109). Bu artıştan MMP artışından sorumlu tutulmaktadır. Enzimatik olmayan glikozilasyon ürünlerine karşı gelişen reaksiyonlar nedeniyle otoimmün hastalıklar görülebilir (99, 100).

Hücresel bozukluklar: Hiperglisemi ve onun yol açtığı biyokimyasal bozuklukların temelinde, şimdiye kadar bahsedilen sistemlerin yanı sıra pek çok hücre tipi ve bunların işlevlerinde bozukluklar gözlenir. Yara iyileşmesi sürecinde, en önemli rollerden birine sahip olan fibroblastlar ve keratinositler de bu grup içindedir. Diabetik farelerde yapılan in vitro çalışmada (12), diabetik fibroblastların hücresel göç yeteneklerinin normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında daha zayıf olduğunu göstermiştir. Ayrıca, diabetik fibroblastların artmış MMP-9 sentezi ve azalmış VEGF salınımı da in vitro olarak gösterilmiştir. Fibroblast fonksiyonlarından bir diğeri de MMP düzenlemesidir. Diabetiklerde MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 sentezinde artış, MMP aktivitesini kontrol eden doku metalloproteaz inhibitörü-2' de ise (TIMP-2) azalma saptanmıştır (100, 109, 110).

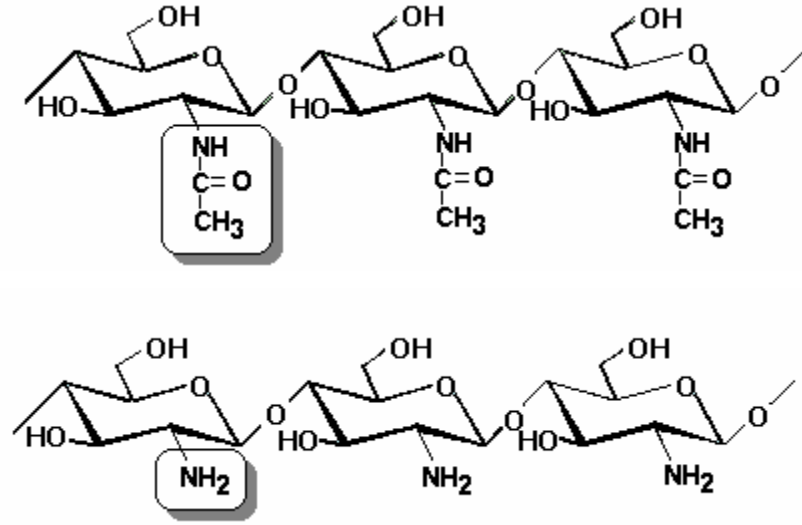
Fibroblastlar kadar önemli diğeri bir hücre türü de keratinositlerdir. Yara iyileşmesinde VEGF'nin en önemli kaynaklarından. Genetik olarak diabetik farelerde keratinositlerde VEGF mRNA'sının sentezinin belirgin derecede düştüğü gösterilmiştir (110). Terashi ve ark, hipergliseminin keratinositlerin çoğalmasına negatif etkisini in vitro olarak göstermişlerdir (111).

2. 6. Yara İyileştirmede Kullanılan Maddeler

Yara iyileşmesinde çok çeşitli maddeler kullanılır (112). Bitki veya hayvanlardan elde edilen polisakkaritler tek başlarına (113, 114), polisakkaritlere çeşitli büyüme faktörleri bağlanarak (115), veya sadece büyüme faktörlerini uygulayarak (116) yara iyileştirme çalışmaları yapılabilmektedir. Tüm bu maddeler içinde kitosan, yara iyileştirme sürecinde çok önemli bir yere sahiptir.

2. 6. 1. Kitosan

Kitin, [β -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin], eklem bacaklıların iskeletlerinin temel maddesi olup bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında da yer almaktadır. Selülozda C2 karbonundaki hidroksil grubu yerine kitinde asetamido grubu yer alır (Şekil 4) (117, 118). Kitosan ise kitinin alkali ortamda deasetilasyonu sonucu elde edilen (1-4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan lineer bir polisakkarittir.



Şekil 4. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı (117).

Kitosan, nötral ve alkali pH'da çözünmez, fakat glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi inorganik ve organik asitlerle suda çözünebilen formlara dönüşür. Asidik ortamda ise, çözünmeyi takiben polimerin amino grupları protonlanır, böylece molekül pozitif yüklenir. Her glukozamin ünitesinde bir yük olduğundan kitosan yüksek yük dansitesine sahiptir, negatif yüzeylerle güçlü bir şekilde etkileşir. Birçok metal iyonları ile birleşir. Genel olarak, kitin ve kitosanın çözünürlüğü molekül ağırlığının artmasıyla azalmaktadır. Kitosanın pH 7'nin üzerindeki sulu çözeltilerde çözünmemesinin nedeni sabit kristal yapısından dolayıdır (118, 119).

Yüksek molekül ağırlığı ve dallanmamış düz yapısı kitosanı asidik ortamlarda mükemmel bir viskozite artırıcı madde yapmaktadır. Kitosan psödoplastik davranış gösterir ve kayma hızının artması ile viskozite azalır. Kitosan'ın derişimi arttıkça, ortam sıcaklığı azaldıkça veya asetilasyon derecesi arttıkça viskozitesi değişir. Kitosan çözeltilisinin hazırlandığı asit türüne bağlı olarak da viskozite değişir (119). Biyoparçalanabilir ve biyoadezif bir polimer olan kitosan, toksik, iritan ve alerjik değildir (120, 121). Bu özellikleriyle kitosanın, farmakoloji ve tıpta önemli kullanım alanları mevcuttur. Bunun yanı sıra veterinerlik, tarım, ziraat, tekstil, kozmetik, dişçilik, besin endüstrisi, fotoğrafçılık gibi alanlarda çok sayıda uygulamaları vardır. Kitosan farmakoloji alanında tablet içeriğinde ve ilaç

taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında; kozmetik alanda, saç, deri ve diş bakım ürünlerinde; tıp/dişçilik alanında yapay deri, cerrahi iplik, kontakt lens, antikoagulan, diş dolgu maddesi olarak; biyoteknoloji alanında, enzim, canlı hücre immobilizasyonu, hücre enkapsülasyonu gibi alanlarda kullanılmaktadır (118, 122-124).

2. 6. 2. Kitosan Uygulama Şekilleri

Farmakolojide kitosan jel, film, sünger, tablet ve mikropartiküler sistemler (mikroküre, mikroboncuk vb.) şeklinde hazırlanabilir (125).

2. 6. 2. 1. Jel

Hidrojeller, üç boyutlu, su ve biyolojik sıvı varlığında şişebilen, çok miktarda sıvı tutabilen hidrofilik polimer yapılarıdır (126, 127). İyonik, kovalent ve kovalent olmayan çapraz bağlama gibi yöntemlerle kitosan hidrojeller hazırlanmaktadır (128, 129). Hidrojellerdeki su içeriği, hidrojinin permeabilitesini, mekanik ve yüzey özelliklerini ve biyoyumluluğunu etkilemektedir (126, 127). Hazırlanan kitosan jellerde kitosan konsantrasyonu jelin viskozitesini ve madde salımını etkilemektedir (130).

2. 6. 2. 2. Film

Kitosan filmler genellikle kitosan çözeltisinden hareketle çözücü uçurma yöntemiyle hazırlanır. Kurutma, etüvde, infrared yardımıyla ya da oda sıcaklığında 30-36 saat bekletilerek yapılır (131). Filmler, kitosan çözeltisinin belli bir süre çapraz bağlayıcı çözeltiye batırılması ile çapraz bağlanmaktadır (130, 132).

2. 6. 2. 3. Sünger

Süngerler, polimer dispersiyonları veya çözeltilerinin poröz yapının oluşması ve korunması için uygun şartlar altında kurutulması (liyofilizasyon) ile oluşan kserojeller (kuru jeller) olarak tanımlanabilir. Süngerler, düşük ağırlık/hacim oranı göstermekte olup poroziteleri, elastikiyetleri ve biyoparçalanabilirlikleri üretim parametrelerinde yapılan değişikliklerle modifiye edilebilir (133–135). Son

zamanlarda farmakoloji ve biyomedikal alanlarda, özellikle kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde matriks olarak, yara bandajı olarak, doku mühendisliği alanında hücre büyümesi için iskelet (scaffold) olarak süngerlerin kullanımı önem kazanmıştır. Kitosan ile hazırlanan süngerler düşük toksisiteli, önemli mekanik özellikleri (135) ve içerdiği maddelerin biyorezorpsiyon kapasiteleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (135–137).

2. 6. 2. 4. Mikropartiküler Sistemler

Mikropartiküler sistemler, çapları birkaç nm'den birkaç yüz µm'ye kadar değişebilen, farklı yapıdaki matriks maddelerinin kullanılması ile hazırlanan dozaj şekilleridir. Mikroküreler, mikrokapsüller, boncuk ve mikrogranüller bu tip dozaj şekilleri arasındadır. Kitosan, mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosan mikrokürelerinde ilaç yükleme etkinliğini etkin maddenin özellikleri, kitosan yoğunluğu, ilaç polimer oranı gibi faktörlerin etkilediği bildirilmiştir. Kitosan mikrokürelerden etkin madde salınımını etkileyen parametreler arasında kitosanın molekül ağırlığı, yoğunluğu, mikrokürelerin herbirine yüklenen etkin madde miktarı, çapraz bağlanma oranı, kullanılan çapraz bağlayıcı ve ilaç-kitosan oranı olduğu bildirilmiştir (138).

2. 6. 2. 5. Tablet

Kitosan, tablet imalatında yardımcı madde olarak dolgu maddesi, dağıtıcı, bağlayıcı, kaydırıcı olarak ve kontrollü salım amacıyla kullanılmaktadır (139).

2. 6. 3. Kitosanın Uygulama Alanları

2. 6. 3. 1. Kitosanın Yara İyileşmesine Etkisi

Kitosan, yara iyileşmesinde etkilidir. Yara iyileşme sürecini hızlandırır, tedavi frekansını ve ağrıyı azaltır, yara yüzeyini koruyarak rahatlık ve uygulama kolaylığı sağlar. Kitosan yara iyileşme sürecinde; kompleman aktivasyonu, polimorfonükleer hücre (PMN) ve makrofajların aktivasyonu, fibroblast aktivasyonu, sitokin üretimi, dev hücre göçü ve tip IV kollajen sentezini uyarma gibi aşamalarda

önemli rol oynar. Ayrıca, mikroorganizmalara karşı koruyucu etki göstermekte ve anjiyogenez ile granüle olan doku şeklini uyarmaktadır (140).

Japonya’da yara iyileştirici amaçla kullanılmak üzere piyasada pamuk benzeri kitosan (Chitopack C® ; DD: % 82, MA: 80 000 Da), sünger benzeri kitin (Chitipack S® ; DD: %9, MA>100 000 Da), kompozit kitin tabakası (Chitipack P® ; DD: %9, MA>100 000 Da), Chitofine P®, Chitofine ürünleri mevcuttur (141, 142).

Kitosan hidrojeller, yara yüzeyini korumada, nemli ve uygun bir iyileştirici çevre sağlamaktadır. Yara kapanmasında ve yara kontraksiyonunda etkilidir (143). Biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olmasının yanı sıra doku yenilenmesini hızlandırıcı olması nedeniyle kitosan ve türevleri kemik ve kırıkta iyileşmesinde kullanım yeri bulmuştur (144).

2. 6. 3. 2. Antimikrobiyal Etkisi

Kitosan, gram pozitif, gram negatif, anaerob bakteriler ve mantarların birçok türüne karşı etkilidir. Kitosanın bu antimikrobiyal etkisi, molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi, pH’sı, ortam sıcaklığı gibi faktörlerden etkilenmektedir. Kitosan, kitosan oligomerlerine göre bakteri çoğalmasını engellemede daha etkin olup inhibitör etkisi kitosanın molekül ağırlığına ve bakteri türüne göre değişmektedir (145–147). Genel olarak kitosan, gram pozitif bakterilere karşı daha etkilidir etkindir (145). Genellikle bakteri yüzeyi negatif yüklü olduğundan kitosandaki pozitif yüklü serbest amino gruplarının miktarı antibakteriyel etkide önemlidir. Daha yüksek derişim ve deasetilasyon derecesine sahip kitosanın antibakteriyel etkisi daha fazla olmaktadır (146, 147).

Kitosanın antibakteriyel etkinliği pH’dan da etkilenmektedir (148). Düşük pH değerlerinde daha yüksek aktivite gözlenmektedir. Bunun nedeni, seyreltik asit çözeltilerinde kitosanın pozitif yüklenmesi ve bakteri hücre duvarındaki makromoleküllerin negatif yüklü kalıntıları ile etkileşmesidir. Daha etkin bir antimikrobiyal aktivite için kitosanın molekül ağırlığının 10.000’in üzerinde olması gerektiği bildirilmiştir (149-150).

2. 6. 3. 3. Hemostatik Etkisi

Kitosan hemostatik özelliğe sahiptir. Hemostatik mekanizması klasik pıhtılaşma yolundan bağımsız olup eritrosit hücre membranı ile kitosan arasındaki etkileşime bağlıdır (121). Kitosan, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan trombosit kökenli büyüme faktörü-AB (PDGF-AB) ve TGF- β 1'in salımını artırmaktadır (151).

2. 6. 3. 4. Analjezik Etkisi

Kitosanın inflamatuvar ağrı üzerine analjezik etkisi olduğu gösterilmiştir. Farelerle yapılan ağrı çalışmalarında kitosanın inflamatuvar bölgede salınan proton iyonlarını absorblayarak ağrıyı azalttığı bildirilmiştir (152).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında üretilen yaklaşık 250-300 gram ağırlığındaki, 51 adet dişi ve erkek *Wistar albino* türü sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar standart şartlar altında, su ve yiyeceğe serbest erişim imkanı sağlanarak 15'er, kontrol grubunda ise 6'şar hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Tüm hayvanlara, deney hayvanları bakım kurallarına uygun muamele edildi (151). Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 01/11/2007 tarih ve B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/214 sayılı onay belgesi alınmıştır (Onay belgesi EK 1'de verilmiştir.)

3. 1. Kontrol ve Deney Grupları

Diabetli+Kitosan (DC) (n=15): Diabetik sıçanların sırtlarında 2 cm tam kat kesi oluşturularak kesi bölgesine her gün kitosan (Sigma) uygulandı.

Diabetli+Asetik asit (DA) (n=15): Diabetik sıçanların sırtlarında 2 cm tam kat kesi oluşturuldu. Kesi bölgesine sadece asetik asit her gün uygulandı.

Diabetli+Kontrol (DO) (n=15): Diabetik sıçanlara sitrat tampon verildi, 2 cm tam kat kesi oluşturuldu ve herhangi bir şey uygulanmadı.

Kontrol (K) (n=6): Sadece sitrat tampon verildi, sırtlarında 2 cm tam kat kesi oluşturuldu ve kesi bölgeleri üzerine deney süresince batikon (betadin) her gün uygulandı.

3. 2. Deneysel Diabet Oluşturulması

Deney öncesi sıçanlar bir gece aç bırakıldıktan sonra kan şekerleri (Lever Check TD-4222) ölçüldü. Kan glikoz değeri 80-110 mg/dl olanlar normal kabul edildi.

Cinsiyet ayrımı yapılmadan deney grubu hayvanlarda diabet oluşturmak için pH=4.5 0.1 M sitrat tamponda çözülmüş 60 mg/kg streptozotosin (STZ; Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, ABD), intraperitoneal yolla tek doz olarak uygulandı (5, 143, 151-158). Streptozotosin enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların kuyruklarından intravenöz yolla alınan kanların şeker düzeylerine bakıldı.

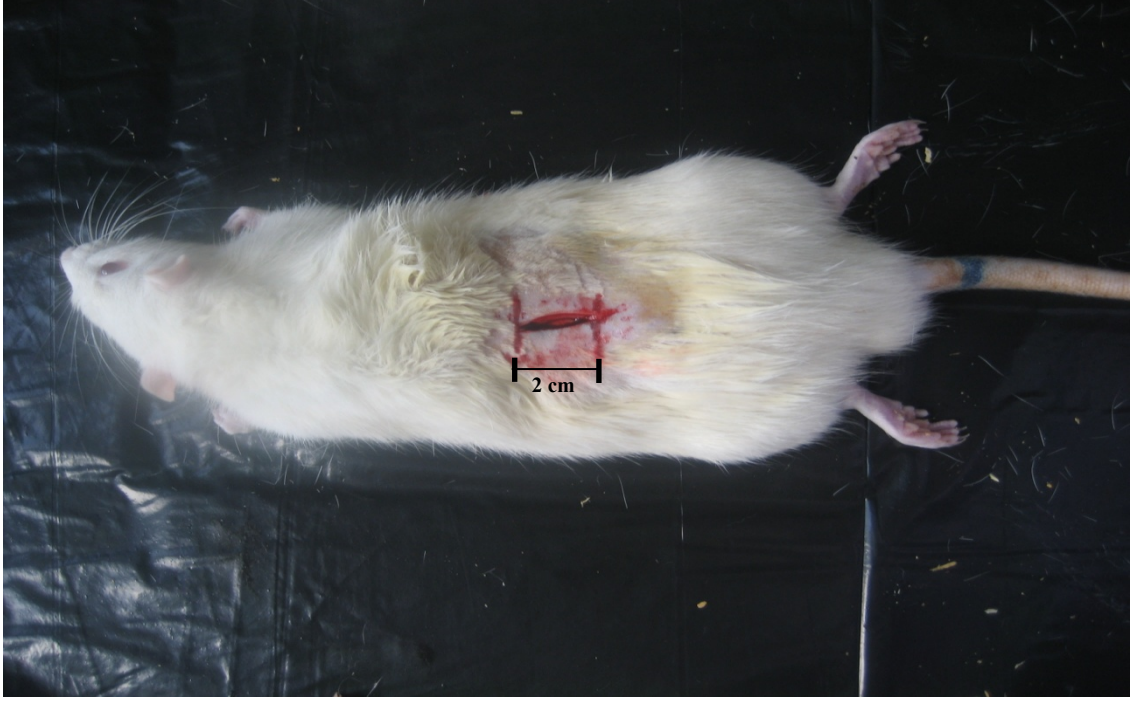
Kan şekerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diabetik olarak kabul edildi. STZ uygulamasından sonra yem ve su alımı serbest bırakılmıştır (153).

3. 3. Kitosan Hazırlanması

%1'lik 100 cc asetik asitte 1 g kitosan birkaç saat karıştırılarak % 0.8'lik kitosan çözeltisi hazırlandı (159, 160). Çözeltinin pH'sı 5,5'a ayarlandı. İçindeki hava kabarcıklarından arındırılması ve sterilizasyon için 1 gece UV de bırakıldı. Sonuçta jel formda hazırlanan kitosan, ağzı kapalı steril cam kavanozlara alınarak uygulamaya hazır hale getirildi.

3. 4. Cerrahi işlem

Deneye başlamadan önce tüm sıçanlara 90 mg/kg ketamine hidroklorid, 3 mg/kg xylazine hidroklorid sol ön ayak adalesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi yapıldı. İşlem boyunca sıçanlar solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Operasyondan sonra sıçanların ağrı duymaması için rimadyl 3 gün süreyle 4 mg/kg dozunda subkutan olarak uygulandı. Sıçanların sırtlarında 10 nolu cerrahi bıçak ile 2 cm'lik tam kat kesi (161) oluşturuldu. Açılan yara deney süresince kapatılmadı. Yara bölgelerine her gün kitosan, asetik asit ve betadin uygulanan hayvan grupları operasyondan sonraki 3., 7. ve 14. günlerde, her grupta 5'er tane hayvan olacak şekilde, yüksek doz sodyum penta-barbital (200 mg/kg) intraperitoneal yolla verilerek sakrifiye edildiler. Kesi bölgelerinden örnekler alınarak ışık mikroskobu incelemesi için hazırlandı.



Resim 1. Sıçanın sırt bölgesinde oluşturulan 2 cm'lik kesi alanı.

3. 5. Işık Mikroskopi

Yaralı alandan alınan deri örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formalinde 48 saat fikse edildi ve rutin histolojik yöntemler uygulanarak dokular bloklandı. Dokulardan Leica RM 2125 RT marka mikrotom ile histokimyasal boyamalar için 3-4 μm ve immünohistokimyasal boyamalar için 2-3 μm kalınlığında kesitler alındı. Doku, görmek istediğimiz yapıya özgün histolojik boyalar ve immünohistokimyasal boyalar ile boyandı (Tablo 1). Doku kesitleri, Olympus BX51 (Japan) marka ışık mikroskobu kullanılarak histolojik açıdan değerlendirildi. Dominiçi boyama tekniği ile mast hücrelerinin yoğunluğu skorlama yöntemi uygulanarak her grup için ayrı ayrı saptandı.

Tablo 1. Uygulanan Histolojik Boyalar

Boyalar	Özgün bölge	Firmalar
Hematoksilen	Genel görünüm	Merck (Germany)
Eozin Y	Genel görünüm	Bio Optica (İtaly)
Periyodik asit-Schiff (PAS)	Bazal membran	Scy Tek (USA)
Dominiçi *	Mast hücreleri	Laboratuarda hazırlandı
Gümüşleme	Retiküler lifler	Bio Optica (İtaly)
Azan Trikrom	Genel bağ dokusu	Bio Optica (İtaly)

*Dominiçi boyası hazırlama yöntemi EK 2’de verilmiştir.

3. 6. İmmünohistokimya

Yara alanında VEGF ve FGFR-3 belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama yapıldı. Parafin bloklardan alınan kesitler poly-L-lysine kaplı adhezivli lamalar (Marienfeld) üzerine alındı. Bir gece 56 °C’lik etüvde tutularak parafini giderildi. Kesitler aşağıdaki serilerden geçirilerek saf suya indirildi.

- %70 Alkol ... 5 dk
- Distile su 1-2 dk
- %70 Alkol ... 5 dk
- Distile su 1-2 dk
- %70 Alkol ... 5 dk
- Distile su 1-2 dk
- %70 Alkol ... 5 dk
- Distile su 1-2 dk
- %70 Alkol ... 5 dk
- Distile su 5 dk
- Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler oda ısısında H₂O₂ de (hidrojen peroksit) 10 dakika bekletildi.
- 2 defa PBS ile yıkandı.

- Antijenin geri dönüşümünü sağlamak için kesitler, içinde EDTA tamponu (pH=8.5) olan şaleye konarak mikrodalga fırında maksimum ayarda 5 dakikalık, orta ayarda 15 dakika periyotlarla kaynatıldı.
 - Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı.
 - 2 defa PBS ile yıkandı.
 - İmmünohistokimya kabına konulan kesitlere 30 dakika Ultra V Block (Lab Vision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) uygulandı.
 - 90 dakika kullanıma hazır primer antikor (VEGF Ab-1 ve FGFR-3) uygulandı.
 - 2 kere PBS ile yıkandı.
 - 20 dakika Biotinlated Goat anti-Rabbit (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) sekonder antikorunu uygulandı.
 - 2 kere PBS ile yıkandı.
 - 20 dakika Streptavidin Peroxidase (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) uygulandı.
 - 2 kere PBS ile yıkandı.
 - 20 dakika kromojen (LabVision marka AEC Substrat System) dokulara uygulandı (20 ml AEC kromojen + 1 ml AEC substrat iyice karıştırıldı).
 - Saf su ile çalkalandı.
 - 10 dakika Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
 - Çeşme suyunda yıkandı.
 - Preperatlar kurulanıp kapatıcı (ScyTek marka Aqueous Mounting Medium) ile kapatıldı.
 - VEGF ve FGFR3 immüno lokalizasyonları skorlama yöntemi ile her grup için ayrı ayrı saptandı.

3. 7. İstatistiksel Yöntem

Çalışmamızın verileri; SPSS (Ver 14.0) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde ağırlık ve kan şekeri yönünden gruplar arası farklılıklar

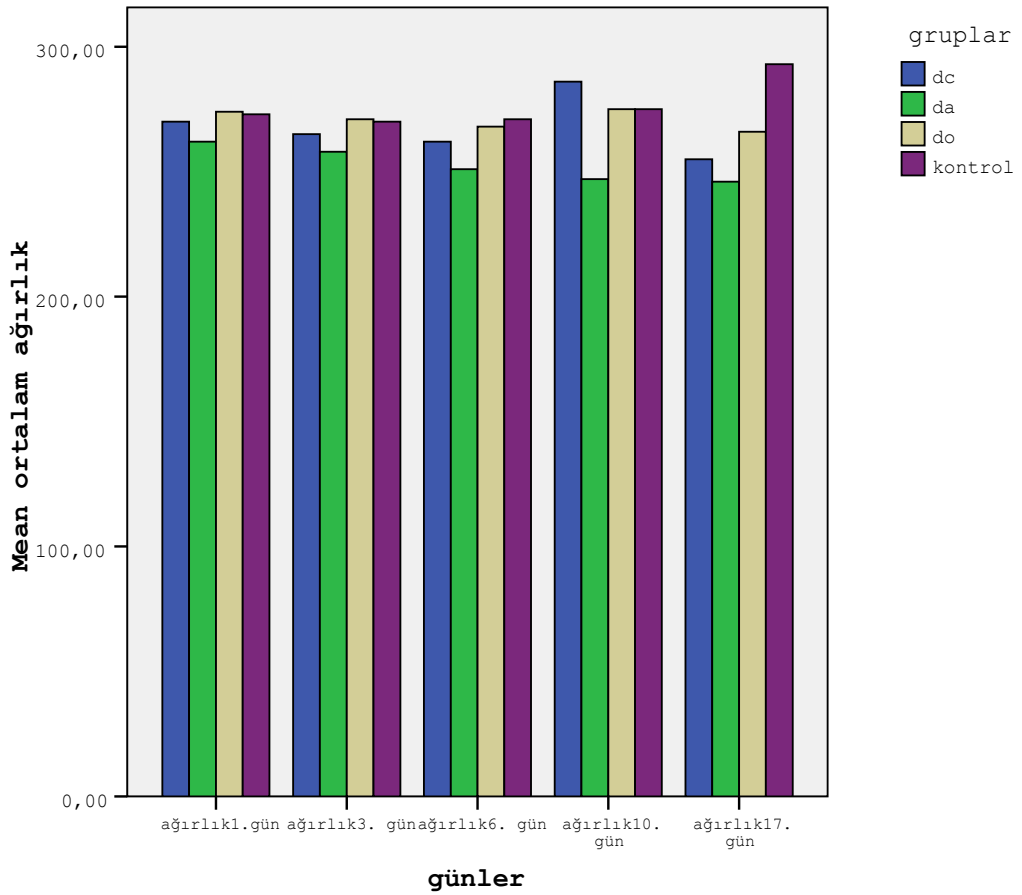
araştırılırken Kruskal-Wallis ve Man Whitney U testleri kullanılmıştır. Her grupta farklı günlerdeki ölçüm ağırlık ve kan şekerleri değerleri için Friedman ve Wilcoxon testleri uygulanmıştır. Yanılma düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4. 1. Makroskobik Bulgular

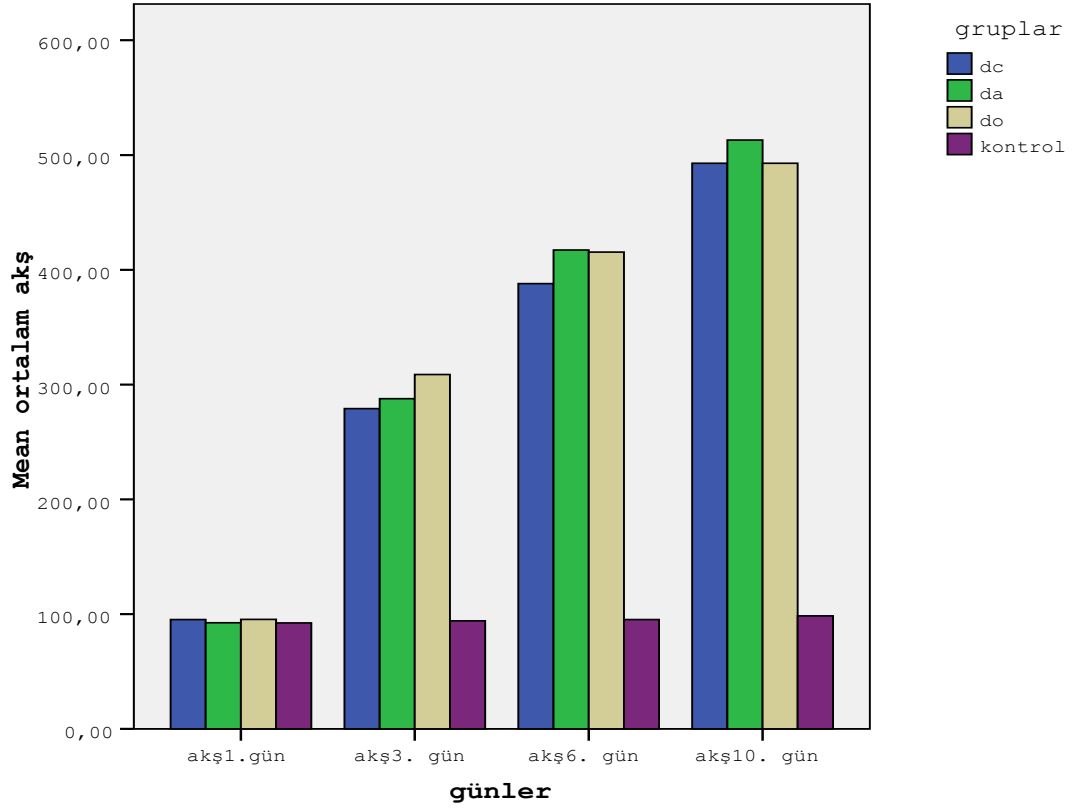
Deney gruplarındaki hayvanlarda, deneysel diabet oluşturulmasının ardından sırt bölgelerine 2 cm tam kat kesi oluşturuldu. Hazırlanan kitosan bu bölgeye her gün uygulandı ve yara iyileşmesine bakıldı. Deneysel çalışmamızda STZ verildikten sonra 24 saat içinde hayvanların 4 tanesi ölmüştür.

Deney gruplarındaki sıçanların 1. gün, 3. gün, 6. gün, 10. gün ve 17. günde deney gruplarındaki sıçanların vücut ağırlığı ve kan glikoz değerlerine bakılmıştır. Buna göre grafikler oluşturulmuştur (Grafik 1, 2, 3, 4).



Grafik 1. Gruplara ait ağırlık değerlerinin zamanla değişimi

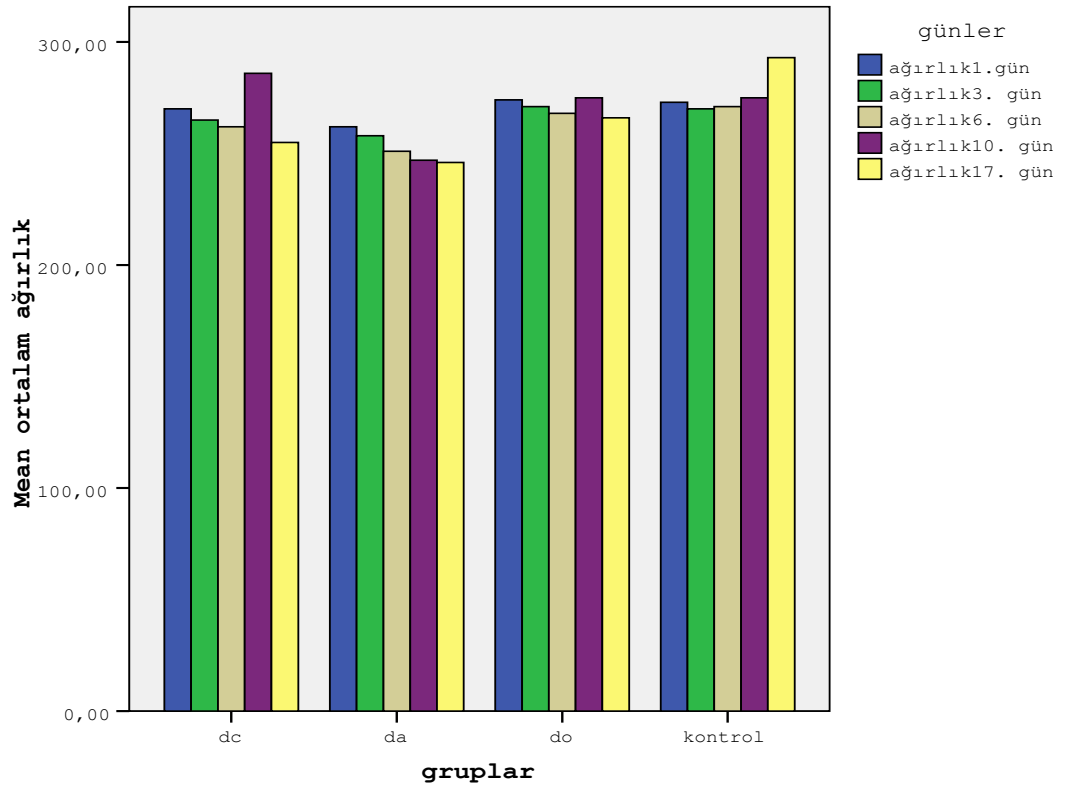
Gruplara ait ağırlık değerleri karşılaştırıldığında 1., 3. ve 6. günlerde gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Gruplara ait 10. gün değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur. Gruplara ait 2'şerli karşılaştırmada Diabet + Kitosan (Dc) grubu ile Diabet + Asetik asit (Da), Diabet + Asetik asit (Da) ile Diabetli kontrol (Do) arasında fark önemli bulunurken ($p<0.05$), diğer gruplar arası fark önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). 17. gün değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplara ait değerler 2'şerli karşılaştırıldığında Diabet + Asetik asit (Da) ile Diabet + Kontrol (Do) arasında fark önemli bulunurken ($p<0.05$), diğer gruplar arası fark önemsizdir ($p>0.05$). Kontrol grubunda 17. günde 2 deney hayvanı analiz dışı bırakılmıştır.



Grafik 2. Gruplara ait kan şekeri seviyelerinin zamanla değişimi.

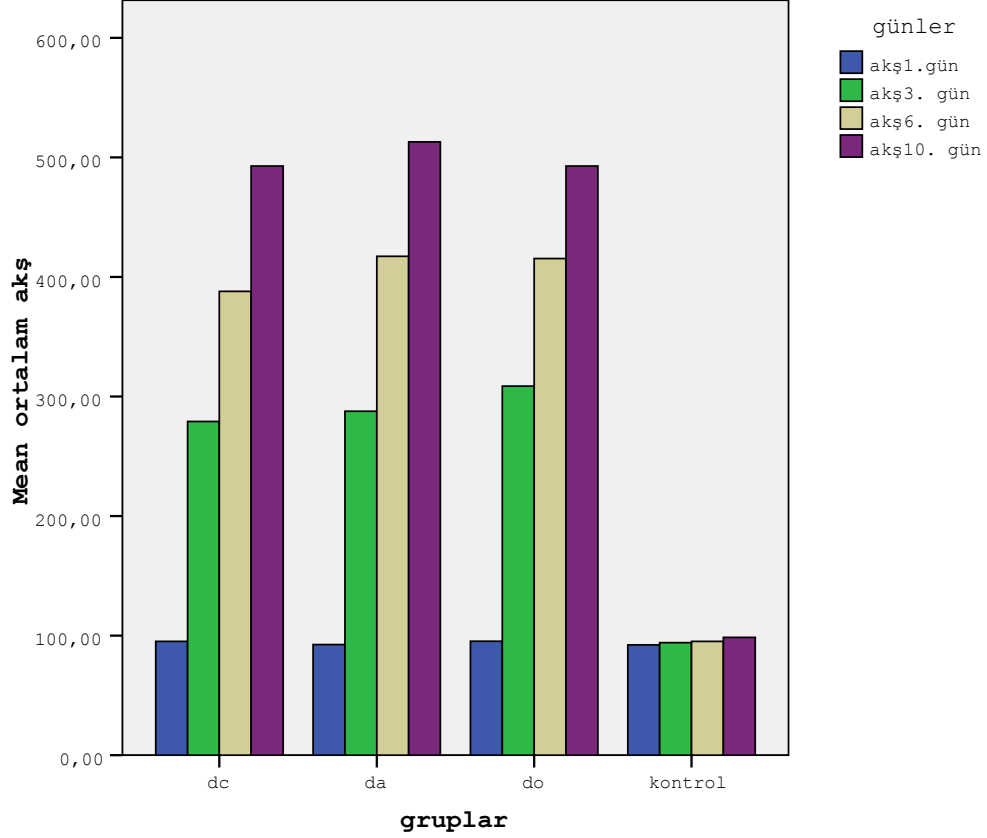
Gruplara ait 1.gün kan şekeri seviyeleri karşılaştırıldığında fark önemsiz bulunmuştur. Gruplara ait 3.gün kan şekeri seviyeleri karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplar 2'şerli karşılaştırıldığında Diabet +

Kitosan (Dc) ile kontrol, Diabet + Asetik asit (Da) ile kontrol, Diabetli kontrol (Do) ile kontrol değerleri arası fark önemli bulunurken ($p<0.05$) diğer gruplar arası fark önemsizdir ($p>0.05$). Gruplara ait 6. gün kan şeker değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemlidir ($p<0.05$). Gruplara ait değerler 2'şerli karşılaştırıldığında Diabet + Kitosan (Dc) ile kontrol, Diabet + Asetik asit (Da) ile kontrol, Diabetli kontrol ile kontrol arasında fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$).



Grafik 3. Ağırlığın gruplar arası değişimi

Diabet + Kitosan (Dc) ve Diabet + Asetikasit (Da) grubunda değişik zamanlarda ölçülen ağırlık değerleri karşılaştırıldığında ölçümler arası fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Gruba ait değerler 2'şerli karşılaştırıldığında; Diabet + Kitosan, 1.gün ve 3.gün, 1.gün ve 6.gün, 3.gün ve 6.gün arasında fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Diabetli kontrol (Do), 1.gün ve 3.gün, 1.gün ve 6.gün arası farklılık bulunurken ($p<0.05$), 3.gün ve 6.gün arası arası farklılık önemsizdir ($p>0.05$).



Grafik 4. Kan şeker değerinin gruplar arası değişimi

Diabet + Kitosan (Dc), Diabet + Asetikasit (Da), Diabetli kontrol (Do) gruplarında kan şeker değerleri 2'şerli karşılaştırıldığında 1.gün ile 3.gün, 1.gün ile 6.gün, 3.gün ile 6.gün arasındaki fark önemlidir ($p>0.05$). Kontrol grubunda farklılık önemsiz bulunmuştur ($p<0.05$).

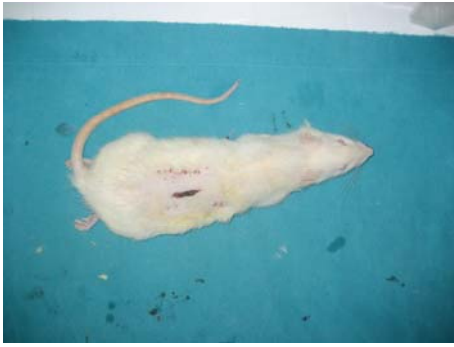
Deney hayvanlarının yara kapanma düzeyleri fotoğraflanmıştır. Buna göre 3. günde Diabet + Kitosan (Dc), Diabet + Asetik asit (Da), Diabetli kontrol (Do) ve kontrol gruplarının yaralarında herhangi bir fark belirlenmemiştir. Yedinci günde, Diabet + Kitosan (Dc) ile kontrol, Diabet + Asetikasit (Da) ile Diabetli kontrol (Do) gruplarına göre daha hızlı iyileşmiştir (Resim 1). Onuncu günde Diabet + Kitosan (Dc) ile kontrol gruplarının yaralarında tam iyileşme sağlanırken Diabet + Asetik asit (Da), Diabetli kontrol (Do) gruplarında iyileşme daha yavaştır (Resim2).



Diabet +Asetik asit



Diabet +Kontrol

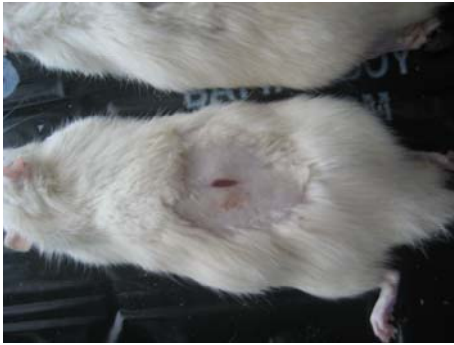


Diabet +Kitosan



Diabet +Kontrol

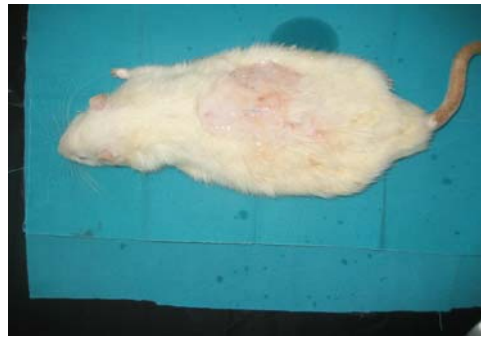
Resim 2. Yara iyileşme sürecinin 7. gününde yara alanında gruplar arası farklılık.



Diabet +Asetik asit



Diabet +Kontrol



Diabet +Kitosan



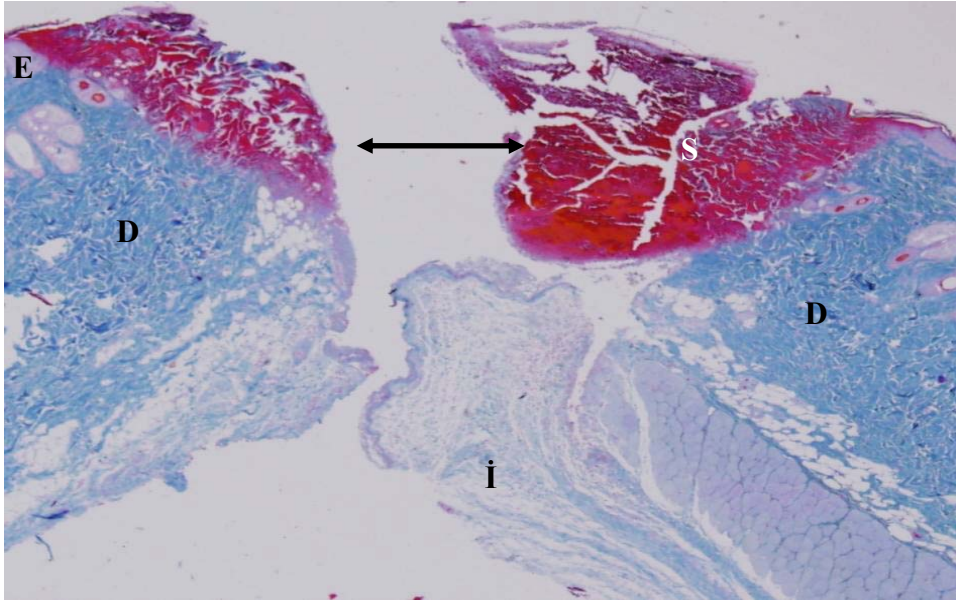
Diabet +Kontrol

Resim 3. İyileşme sürecinin 10. gününde yara alanında gruplar arasında farklılık.

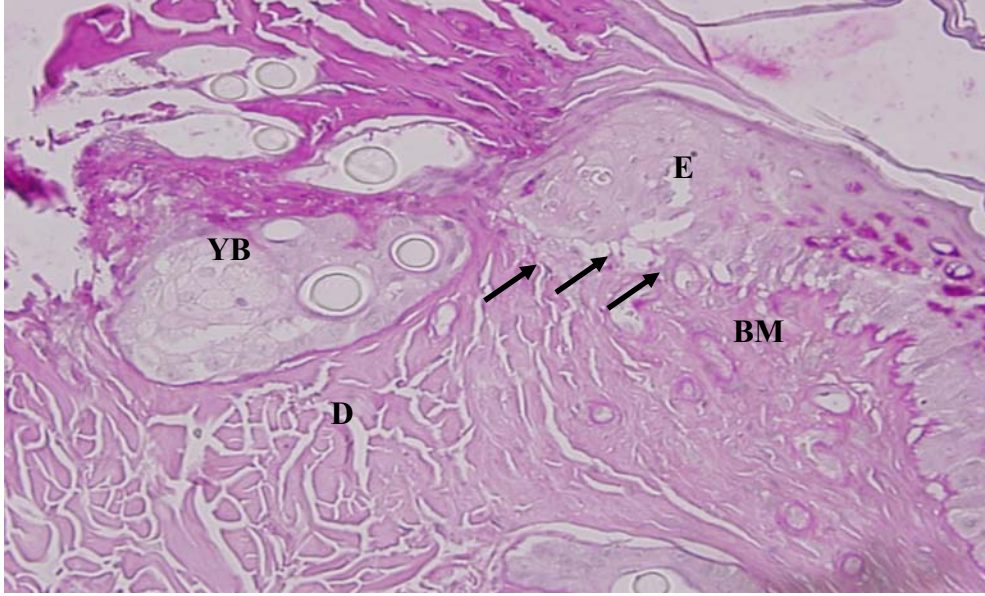
4. 2. Mikroskopik Bulgular

4. 2. 1. Kontrol Grubu 3 Günlük Yara İyileşmesi

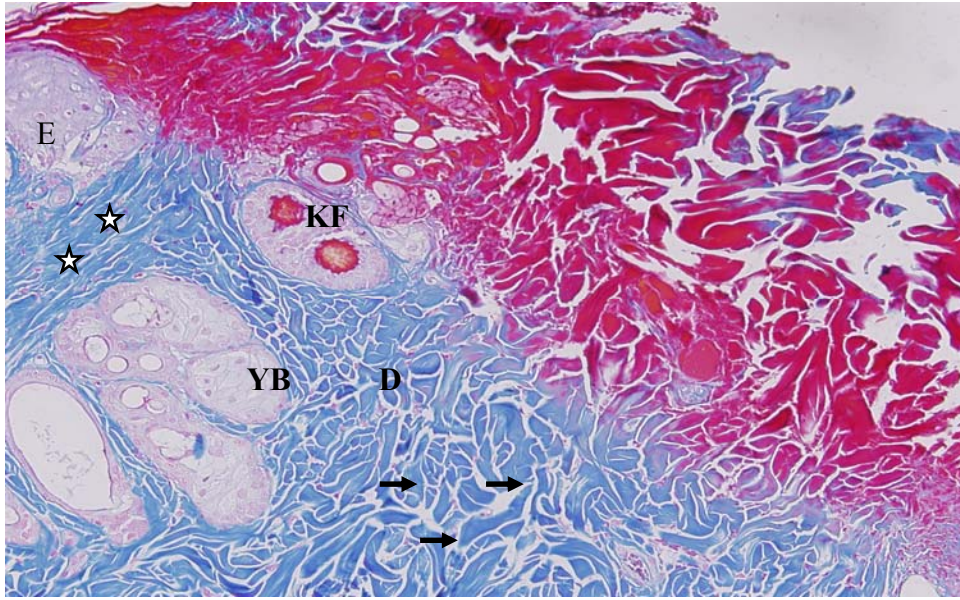
Işık mikroskopik olarak Azan trikrom (AT) boyası ile yara alanının sınırları görülmektedir. İyileşme alanında karşılıklı olarak hem epidermis hem de dermis bölgeleri henüz birbiri ile kaynaşmamıştır. Yaranın üst kısmında trombositlerden oluşan kabuk (skab) bulunmaktadır (Şekil 5). Periyodik asit Schiff (PAS) reaksiyonu ile yara alanında deforme olmuş epitelde herhangi bir bazal membran oluşumu izlenmezken, yara alanı yakınında epitel altında düzeni bozulmuş şekilde bazal membran izlendi (Şekil 6). Papiller dermiste az sayıda inflamatuvar hücre bulunurken, dermal tabakada kollajen lif demetlerinin yoğunluğu az sayıda ve açık renkte boyanmıştı (Şekil 7). Dermiste kollajen lifler arasında fibroblastlar, yoğun kan hücreleri, inflamatuvar hücreler (Şekil 8a, b) ve az miktarda retiküler lif görüldü (Şekil 9). Mast hücreleri iyileşme alanında az sayıda izlenmiştir (Şekil 10).



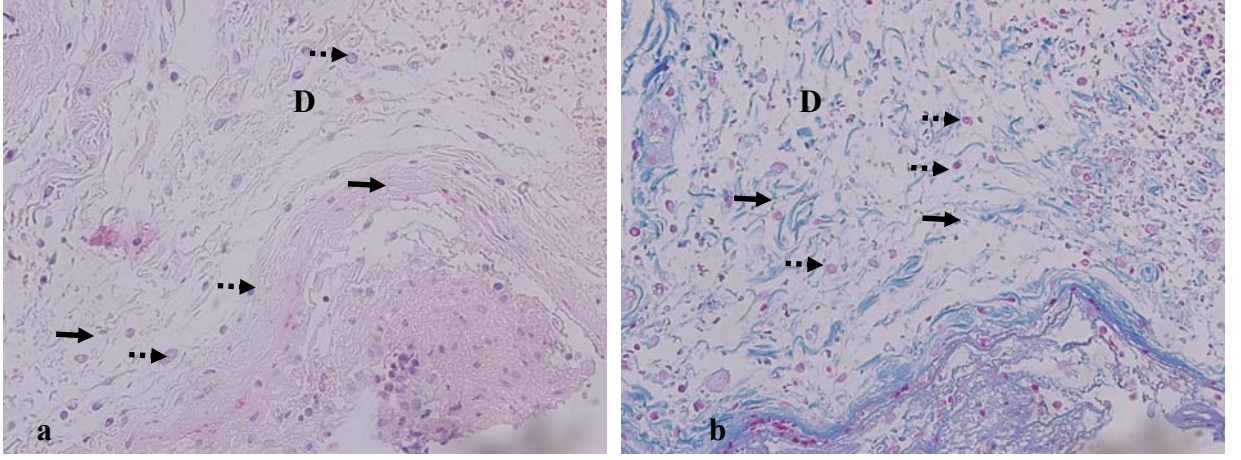
Şekil 5. Kontrol 3.günde henüz kaynaşmamış yara alanı (↔), iyileşme alanı (İ), epidermis (E), dermis (D) bölgeleri ve kabuk (skab) (S). AT, X40.



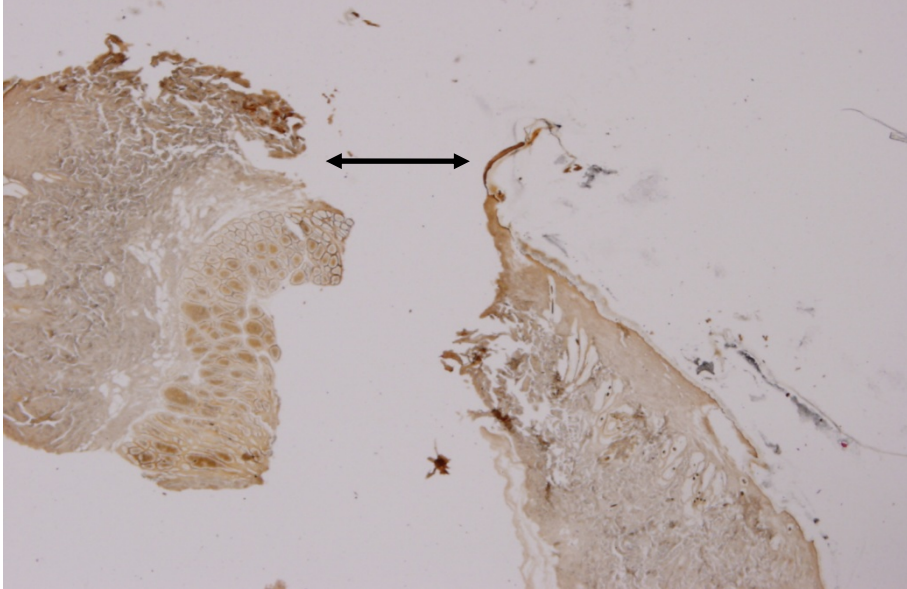
Şekil 6. Kontrol grubu 3.günde yara alanına yakın epitel (E), dermis (D), düzensiz bazal membran (→) (BM), yağ bezi (YB). PAS, X40.



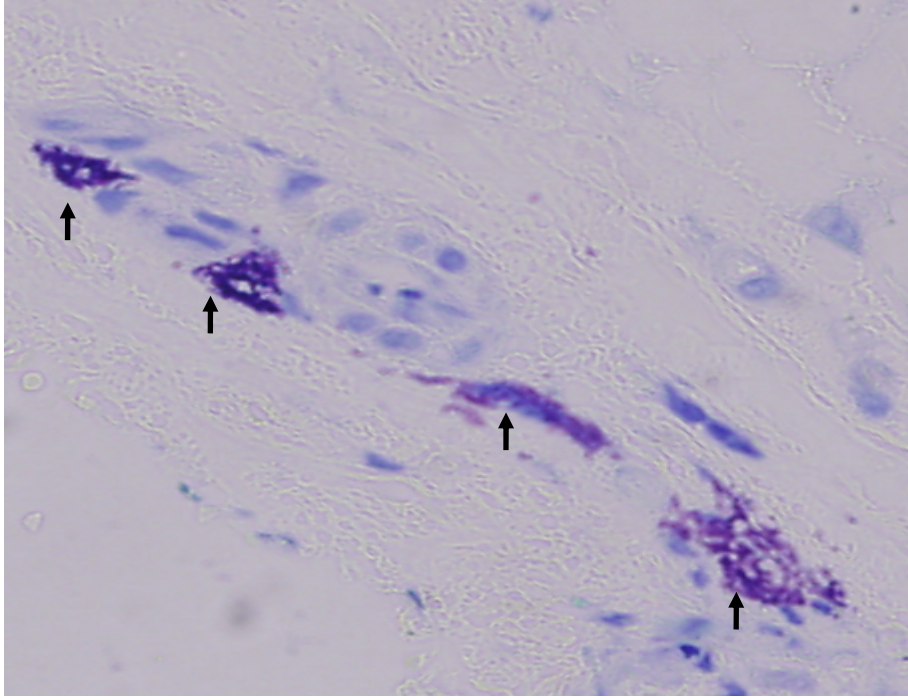
Şekil 7. Kontrol grubu 3.günde papiller dermiste (☆), epidermis (E) dermis (D), kollajen lifler (→), yağ bezleri (YB). AT, X20.



Şekil 8a, b. Kontrol grubu 3.günde dermiste (D) kollajen lifler (→) arasında fibroblastlar (⇢), kan hücreleri. a) H&E , X40, b) AT, X40.



Şekil 9. Kontrol grubu 3.günde epitel (E), dermis (D) ve yara alanında (↔) retiküler lifler. Gümüşleme, X4.

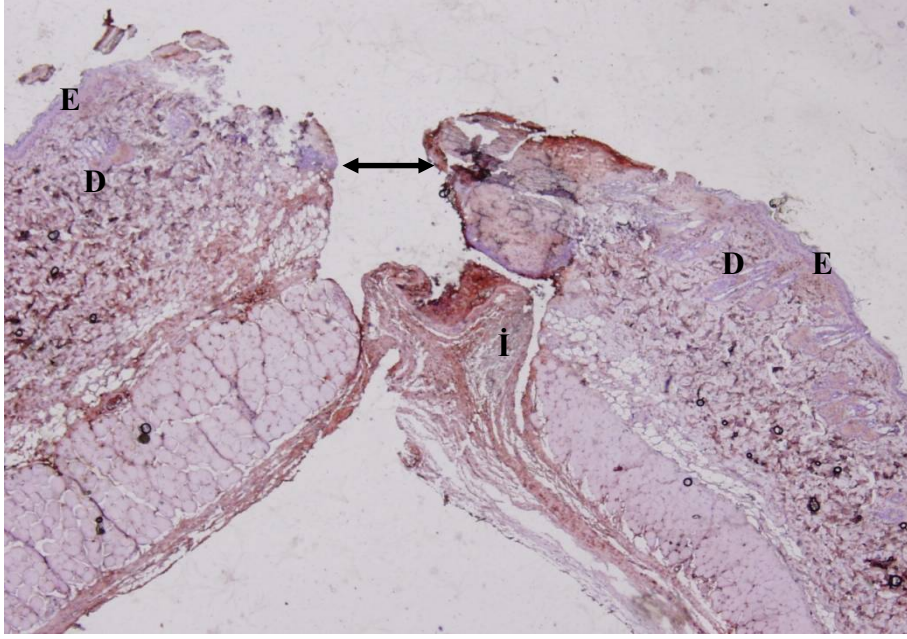


Şekil 10. Kontrol grubu 3.günde iyileşme alanında mast hücreleri (→) . Dominiçi, X40.

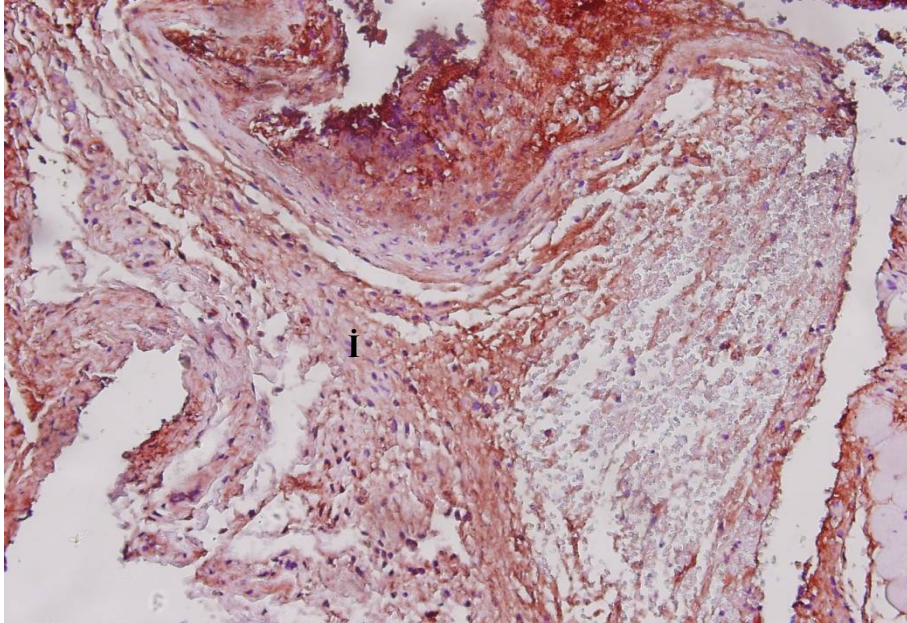
4. 2. 2. Kontrol Grubu 3 Günlük Yara İyileşmesinde

İmmünohistokimyasal Bulgular

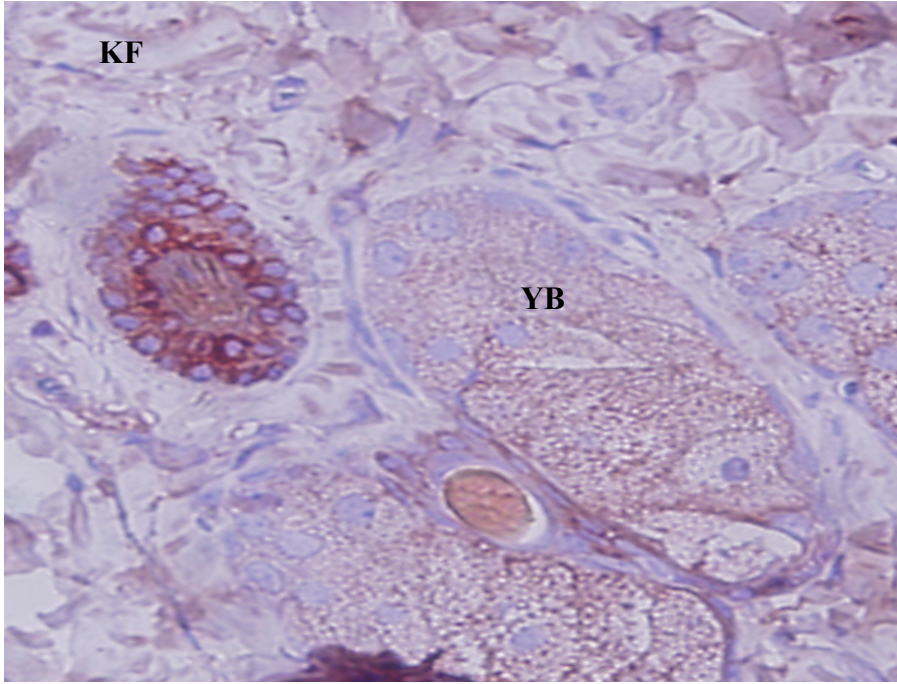
Kontrol grubu 3 günlük yara iyileşmesinde VEGF, iyileşme alanında yoğun (Şekil 11,12), epidermiste ve epitelin altındaki bağ dokuda (Şekil 11) az yoğun immüno lokalizasyon gösterdi. Dermis bölgesinde, kıl follikülleri çevresinde, yağ bezlerinde VEGF lokalizasyonu izlendi (Şekil 13). Yapılan FGFR3 immünohistokimyasal boyaması ile, yara yüzeyinde, inflamasyon alanında, fibroblast sitoplazmalarında (Şekil 14), epitelin stratum bazale tabakasında, kıl folliküllerinin epidermal kök kılıfında (Şekil 15), kan damarları çevresinde (Şekil 16a), yağ bezlerinde (Şekil 16b) lokalizasyon belirlendi.



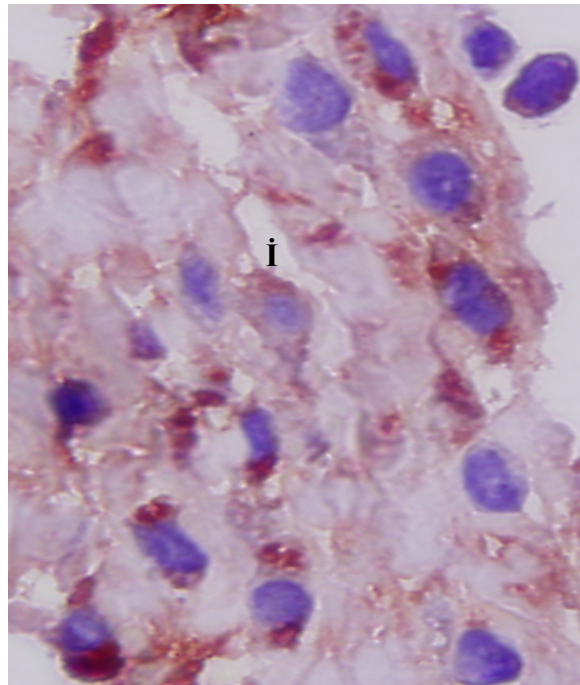
Şekil 11. Kontrol grubu 3.günde yara alanı (\leftrightarrow), iyileşme alanı (İ), epidermis (E), dermiste (D) VEGF immünolokalizasyonu, X4.



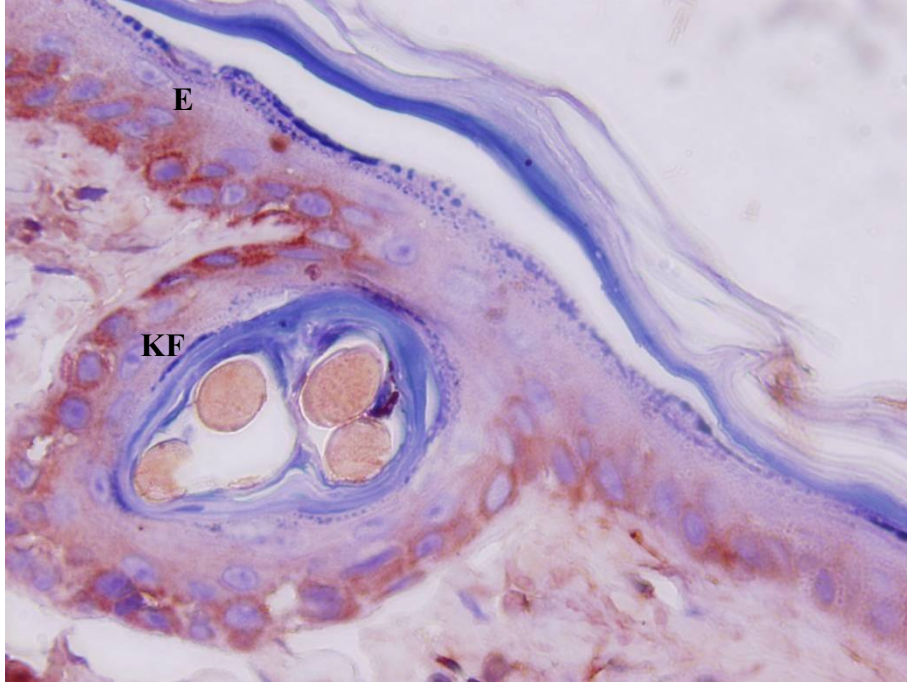
Şekil 12 . Kontrol grubu 3.günde iyileşme alanında (İ) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



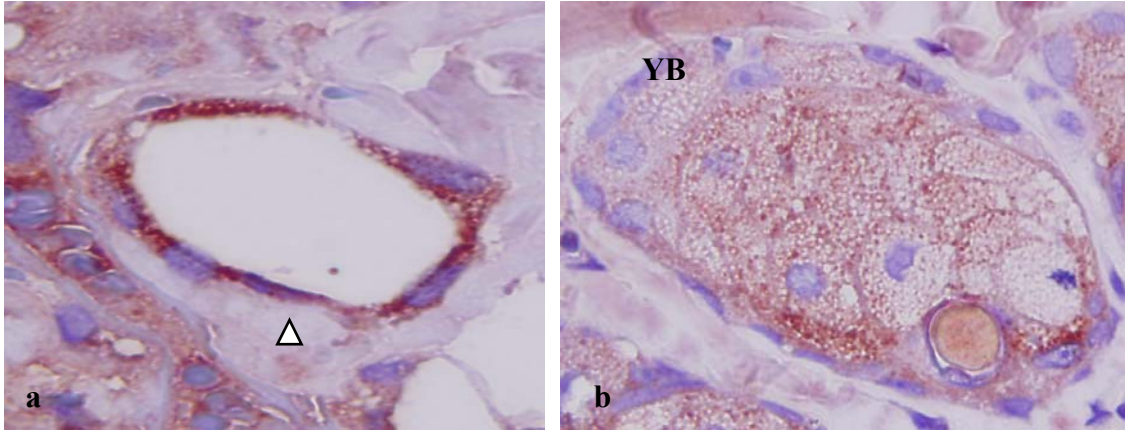
Şekil 13. Kontrol grubu 3.günde yağ bezleri (YB) ve kıl folliküllerinde (KF) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 14. Kontrol grubu 3.günde iyileşme alanında (İ) FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



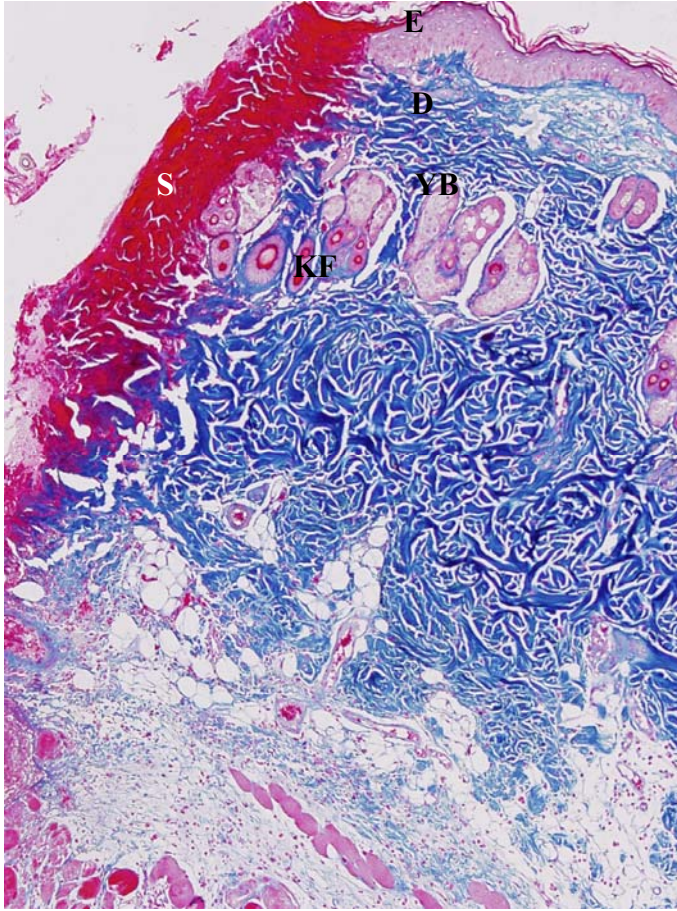
Şekil 15. Kontrol grubu 3. günde epidermiste (E) ve kıl follikülünde (KF), FGFR3 immünolokalizasyonu, X100.



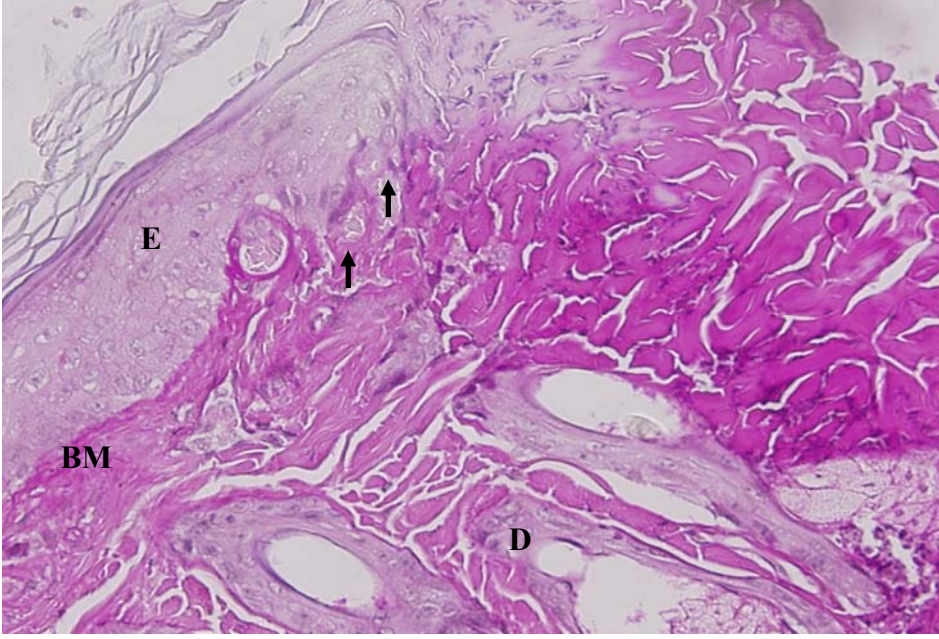
Şekil 16 a, b. Kontrol grubu 3.günde kan damarı çevresinde (Δ) (a), yağ bezinde (YB) (b) FGFR3 immünolokalizasyonu, X100.

4. 3. 1. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 3 Günlük Gruplar

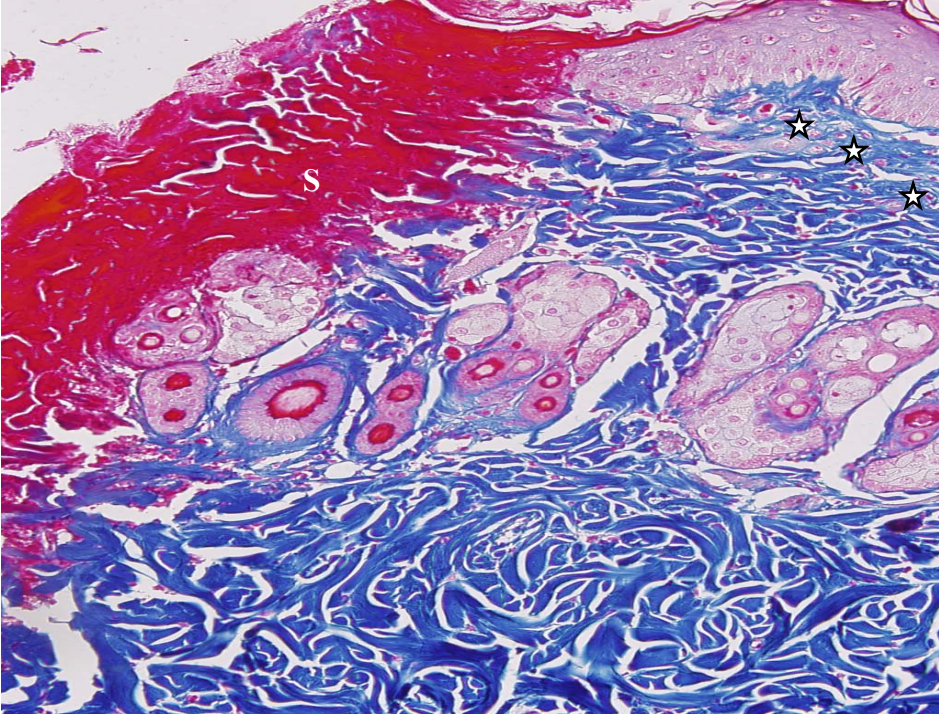
Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol gruplarından alınan doku örneklerinde benzer bulgular görülmüştür. Bu nedenle bu iki grup ortak değerlendirilmiştir. 3. günde iyileşme alanı üzerinde oluşması gereken kabuk (skab) dar bir alanda izlendi (Şekil 13). Yara alanına yakın epitelin bazal membranı düzensiz halde (Şekil 14) ve papiller dermiste az sayıda inflamatuvar hücre bulundu. Kollajen lif demetleri gevşek halde görüldü (Şekil 15). İyileşme alanında zayıf kollajen lifler arasında fibroblastlar, kan hücreleri ve çok miktarda retiküler lif izlendi (Şekil 16). İyileşme alanında mast hücresi bulunmamakta ancak iyileşme alanına yakın yerlerde mast hücresi bulunmaktaydı (Şekil 17).



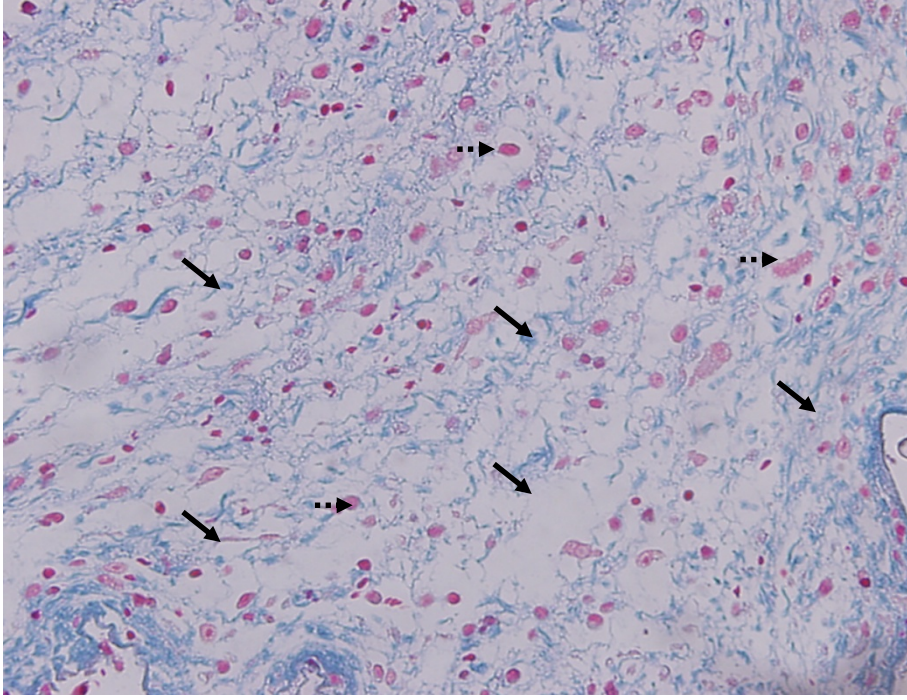
Şekil 17. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde yara kabuğu (skab) (S), epitel (E), dermis (D), yağ bezleri (YB), kıl follikülleri (KF). AT, X4



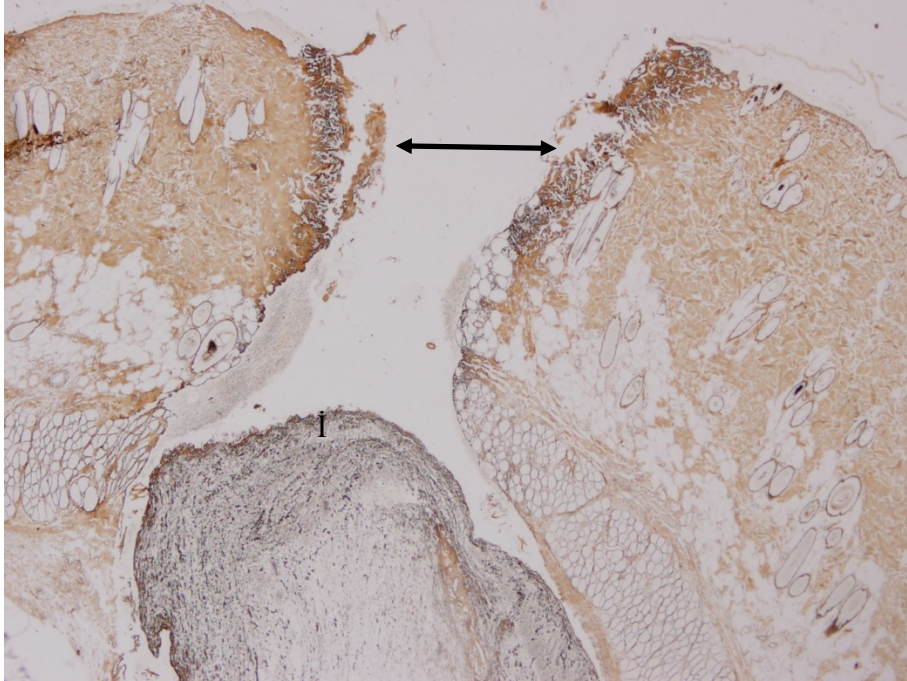
Şekil 18. Diabet+Asetikisit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epitel (E), dermis (D), yara alanına yakın bazal membran (BM) (→), PAS, X40.



Şekil 19. Diabet+Asetikisit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde papiller dermiste (☆) inflamatuvar hücreler, AT, X20.



Şekil 20. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde iyileşme alanında kollajen lifler (→), fibroblastlar (..→). Dominiçi, X40.

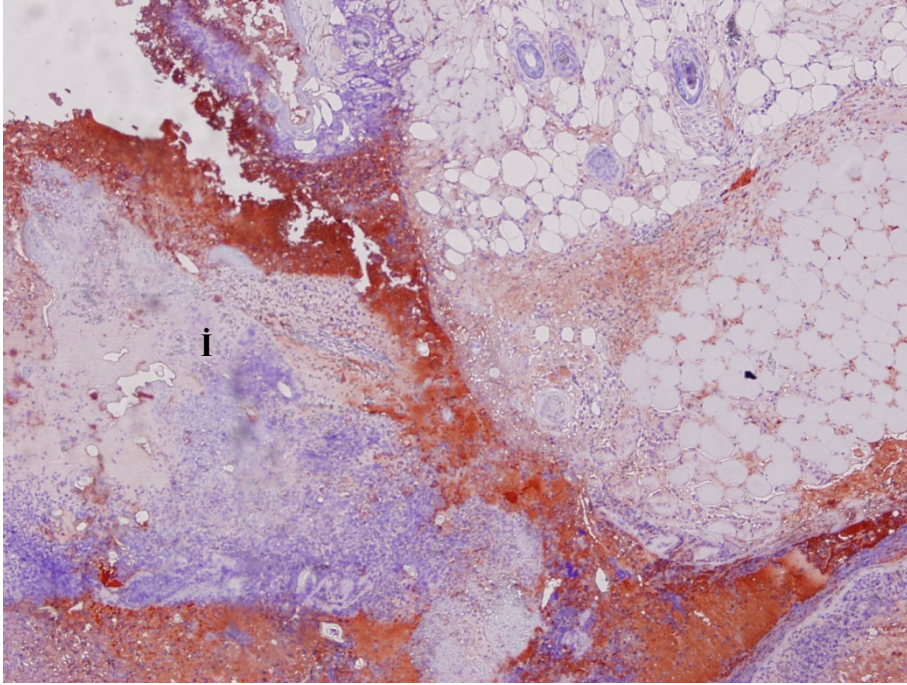


Şekil 21. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epitel (E), dermis (D) ve iyileşme alanında (İ) retiküler lifler. Gümüşleme, X4.

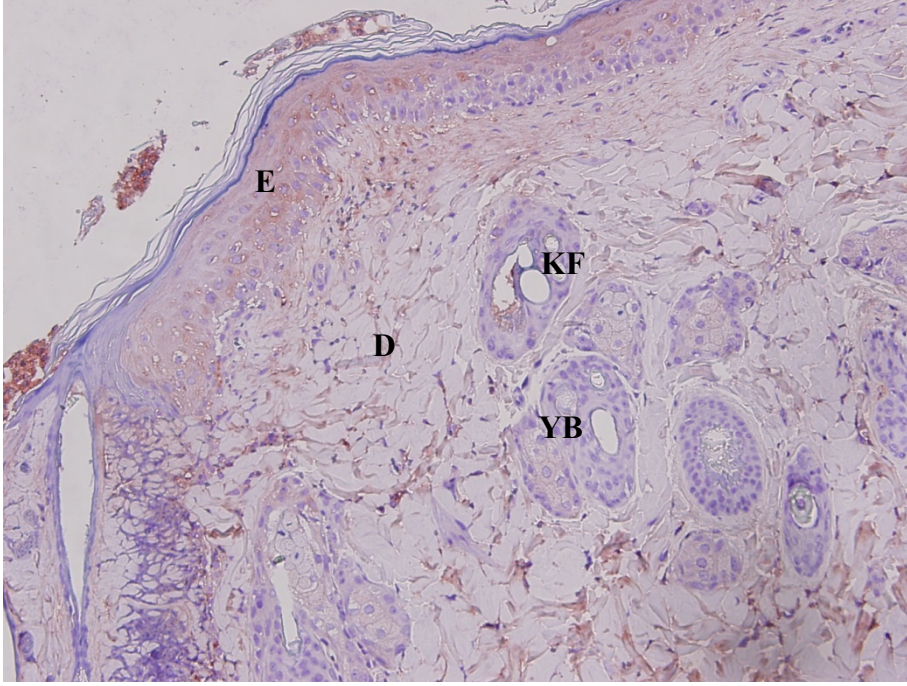
4. 3. 2. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 3 Günlük Graplarda

Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular

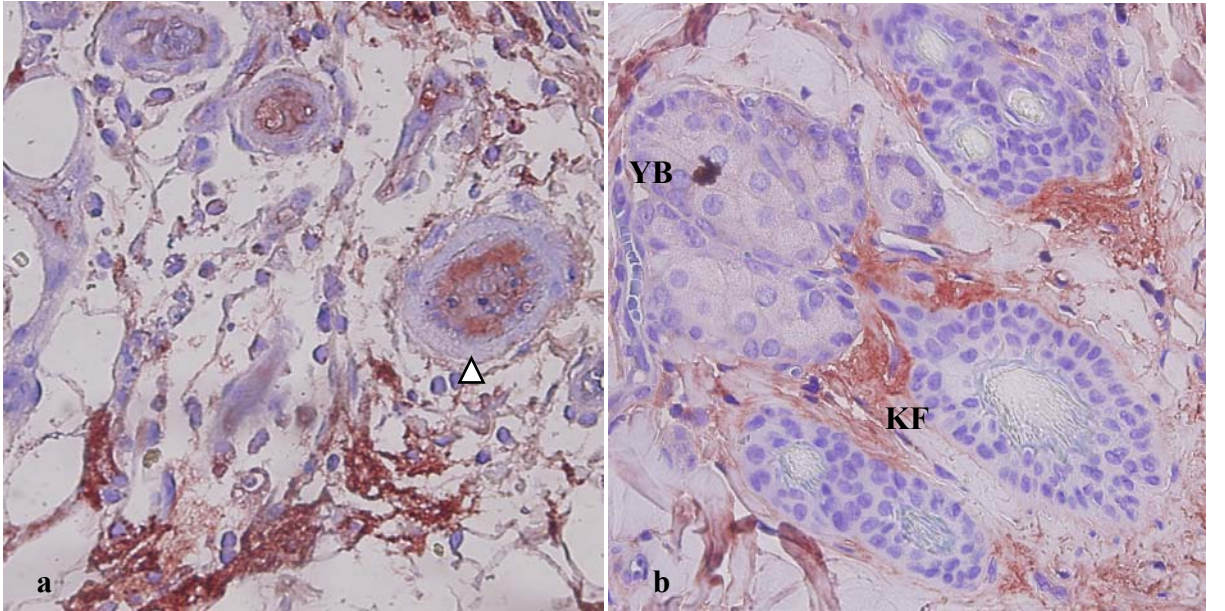
Yapılan VEGF boyaması ile, iyileşme alanında (Şekil 22), epitelde (Şekil 23), kan damarları çevresinde (Şekil 24 a), yağ bezlerinde az yoğun immüno lokalizasyon izlendi (Şekil 24 b). FGFR-3 boyamasında ise; genel olarak iyileşme alanında (Şekil 25), epitelin yara alanına yakın tüm tabakalarında (Şekil 26), kıl folliküllerinin dermal tabakalarında lokalizasyonlar görüldü (Şekil 27).



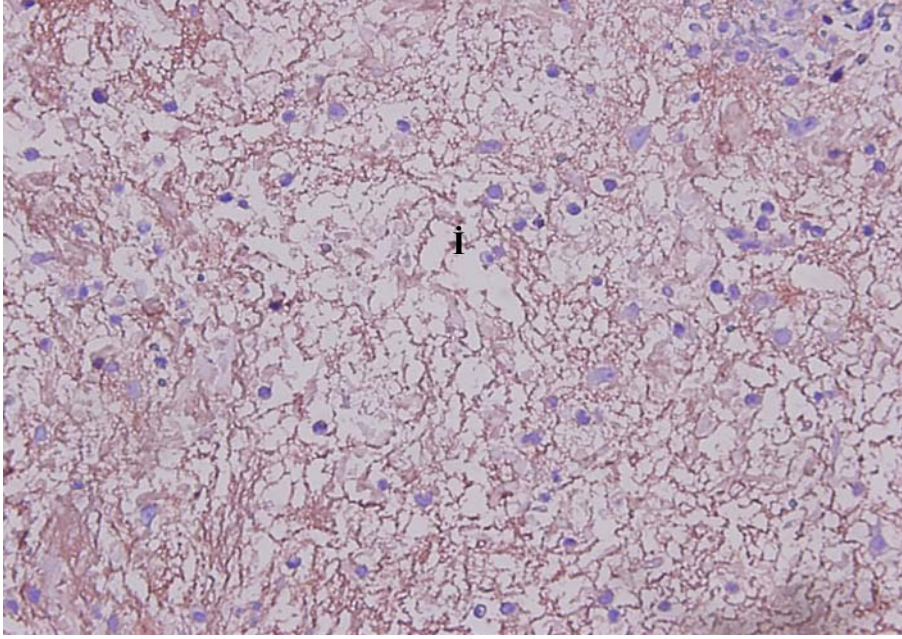
Şekil 22. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde iyileşme alanında (İ) VEGF immüno lokalizasyonu, X10.



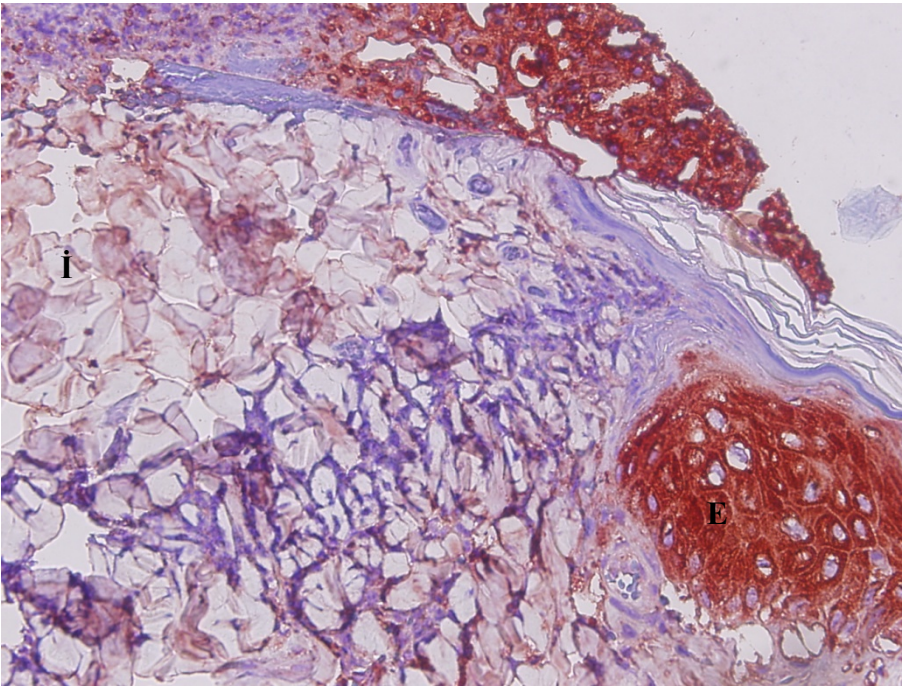
Şekil 23. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epitel (E), dermis (D), yağ bezlerinde (YB) ve kıl folikülünde (KF) VEGF immünolokalizasyonu, X20.



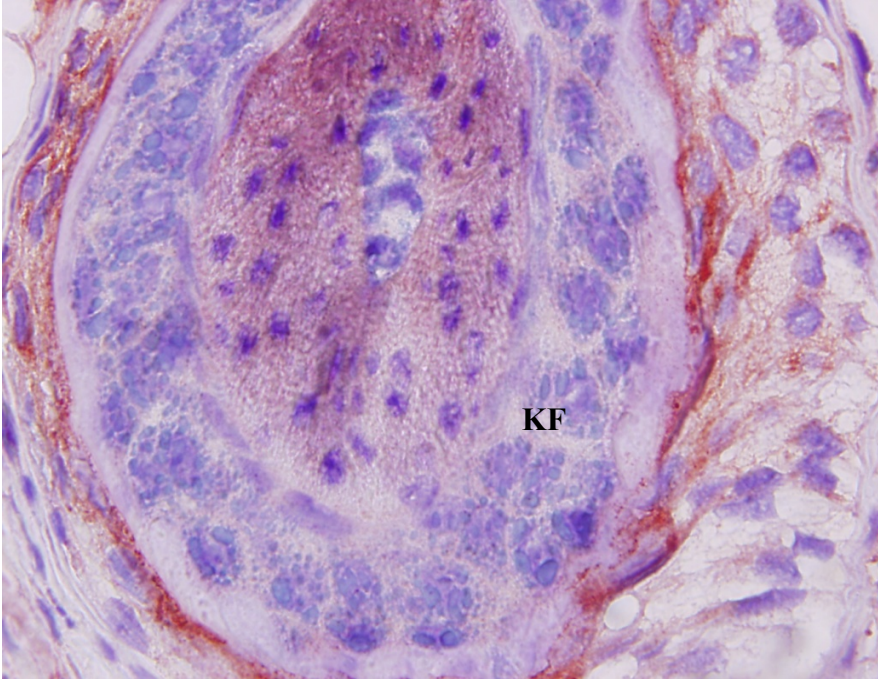
Şekil 24 a, b. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde kan damarı çevresinde (Δ) (a), kıl folliküllerinde (KF) ve yağ bezlerinde (YB) (b) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 25. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde iyileşme alanında (İ), FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



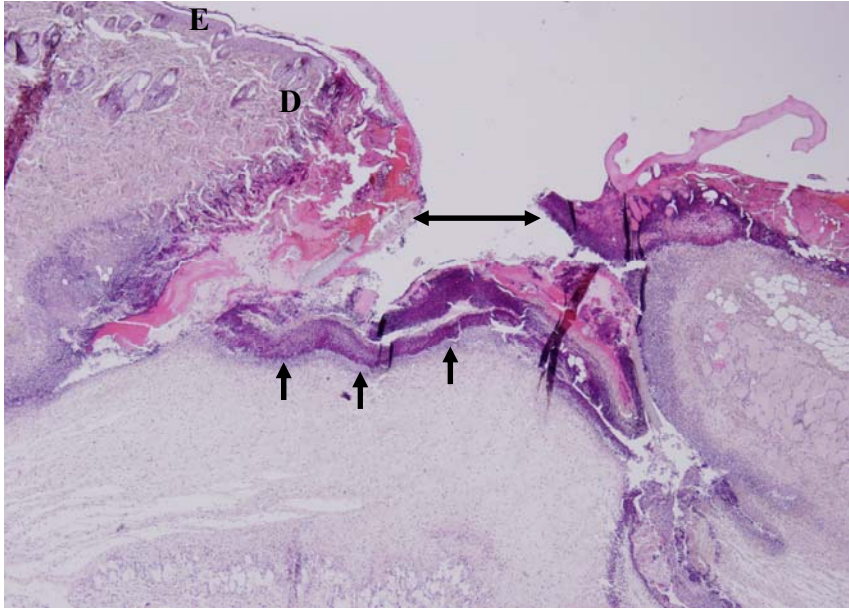
Şekil 26. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde epidermis (E) ve iyileşme alanında (İ) FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



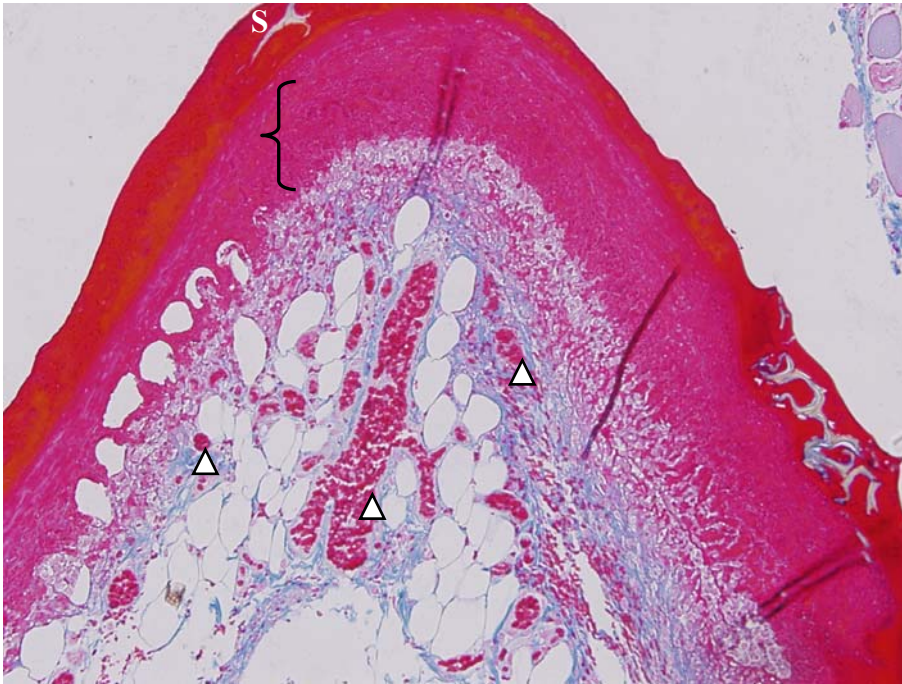
Şekil 27. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol grupları 3. günde, kıl follükülünde FGFR3 immünolokalizasyonu, X100.

4. 4. 1. Diabet+Kitosan 3 Günlük Grupta Yara İyileşmesi:

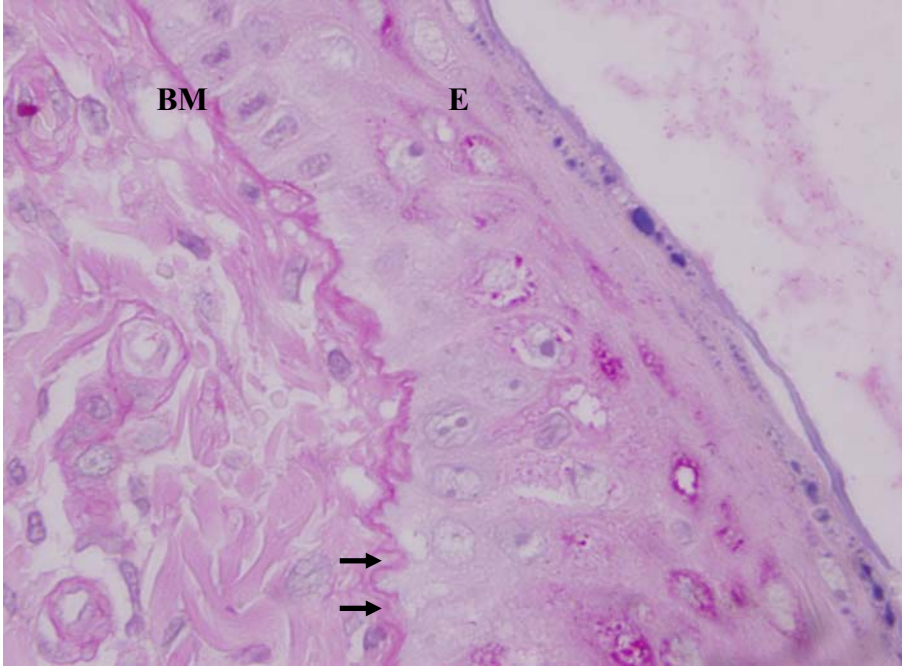
Epidermis ve dermiste kaynaşmanın olmadığı görülmektedir (Şekil 28). Granülasyon dokusu ve yeni kan damarlarının oluşumu belirgin şekilde izlenmektedir (Şekil 29). Epitelin stratum bazale tabakasının tek katlı alçak prizmatik veya kübik olan epitel tabakasının ayrımı seçilmekte ve epitel altı bazal membran, yara alanına yakın bölgelerde düzenini kaybetmiştir (Şekil 30). Papiller dermiste çok sayıda inflamatuvar hücre, dermal tabakada yoğun ve kalın kollajen lif demetleri izlenmiştir (Şekil 31). Yara yüzeyinin altındaki tabakada yoğun ancak iyileşme alanında az, ince retiküler lifler görülmüştür (Şekil 32). Mast hücreler iyileşme alanı altında izlenmiştir (Şekil 33).



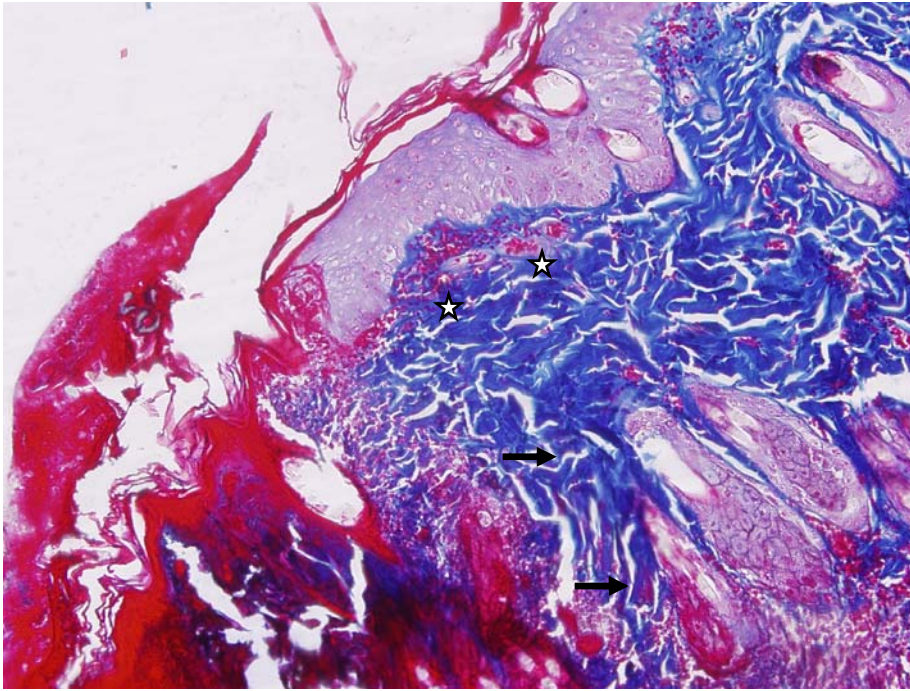
Şekil 28. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta yara alanı (↔), kaynaşmamış epidermis (E) ve dermis (D), granülasyon dokusu (→). H&E, X4.



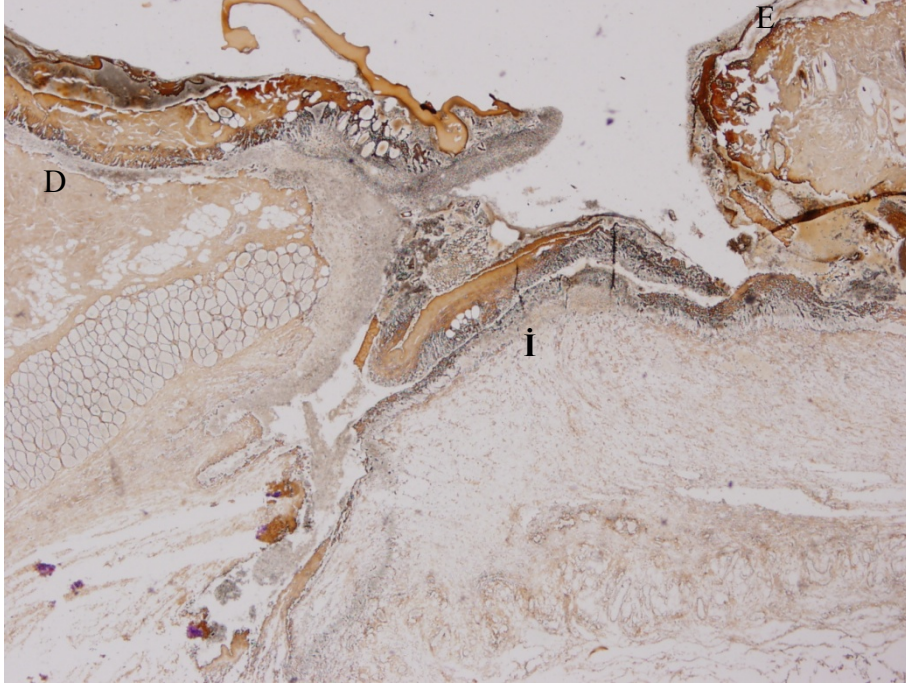
Şekil 29. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta yara iyileşme bölgesinde granülasyon dokusu ({ }, yara kabuğu (S) ve kan damarları (Δ). AT, X20.



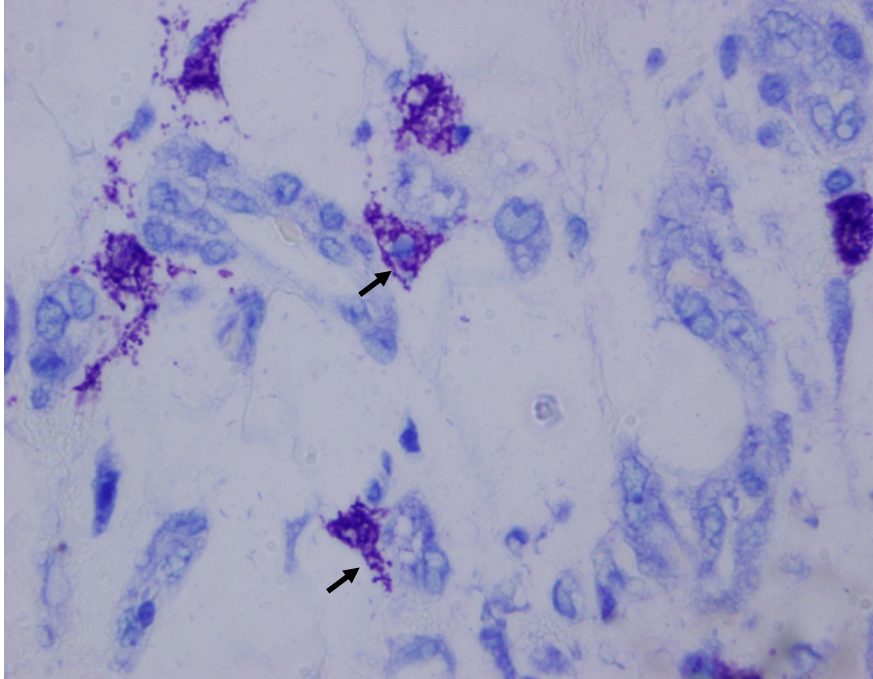
Şekil 30. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta epiteldeki (E) hücreler, yara alanına yakın bölgede düzensiz (→) bazal membran (BM). PAS, X40.



Şekil 31. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta papiller dermiste yoğun inflamatuvar hücreler (☆), retiküler dermiste kollajen lifler (→). AT, X40.



Şekil 32. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta, epitel (E), dermis (D) ve iyileşme alanında (İ), retiküler lifler. Gümüşleme, X4.

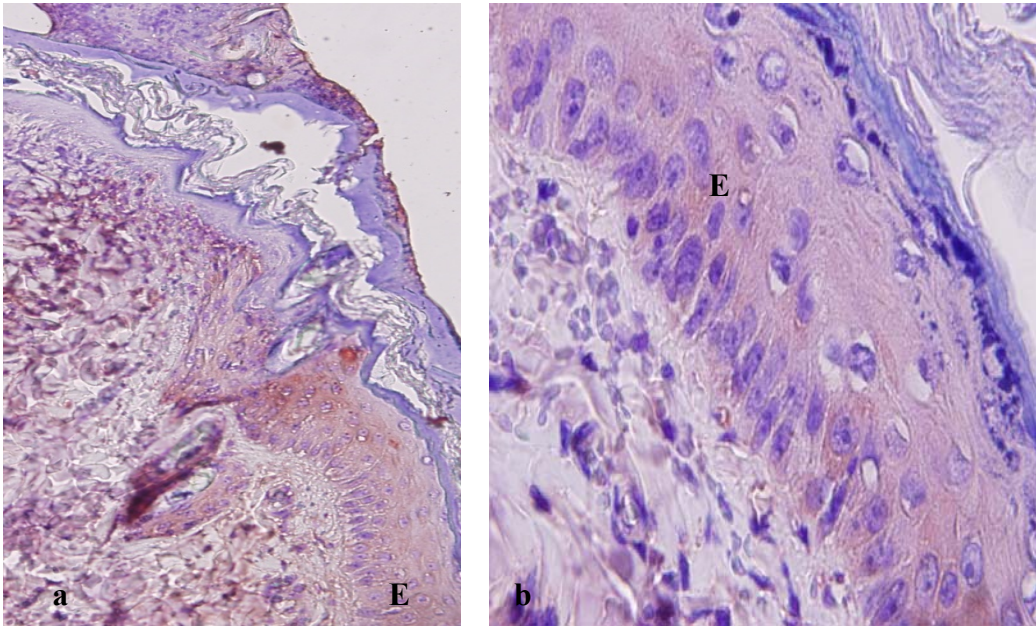


Şekil 33. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta iyileşme alanında mast hücreleri (→). Dominiçi, X100.

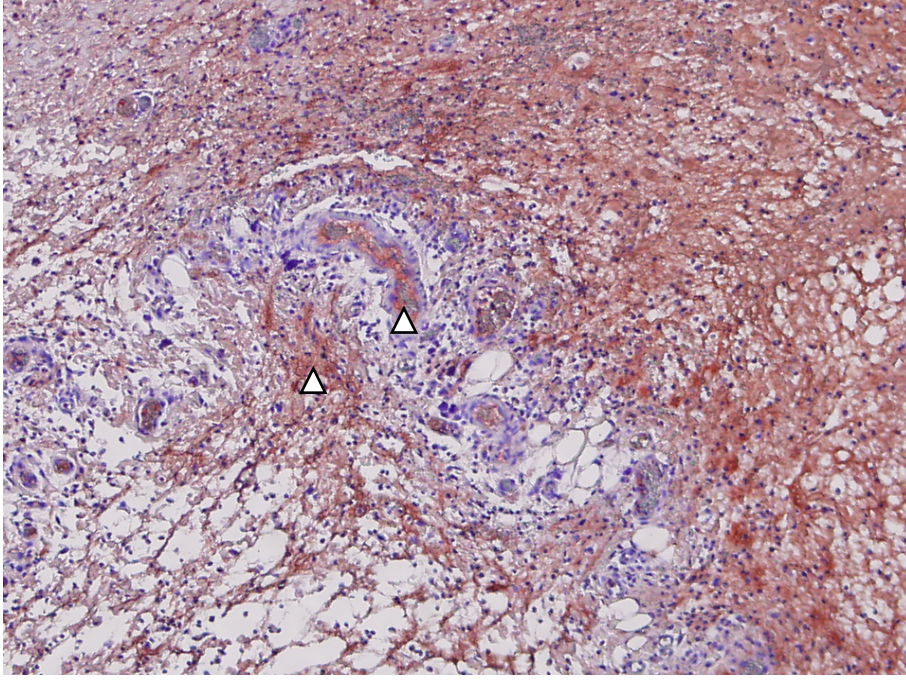
4. 4. 2. Diabet+Kitosan 3 Günlük Grubun İmmünohistokimyasal

Bulguları

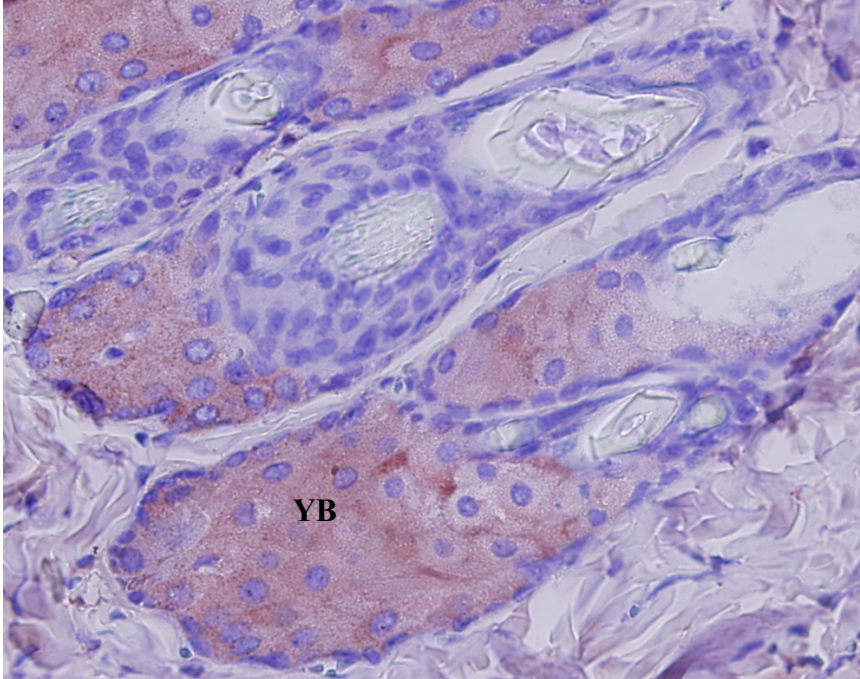
VEGF, yara alanına yakın epitelde (Şekil 34 a,b), iyileşme alanında (Şekil 35), yağ bezlerinde (Şekil 36) ve kan damarı duvarında (Şekil 37) immüno lokalizasyon gösterdi. Yapılan FGFR-3 boyası ise yara alanına yakın bölgedeki epitelde (Şekil 38), kıl follikülleri, yağ bezleri, kan damarları çevresinde lokalizasyon izlendi (Şekil 39 a, b).



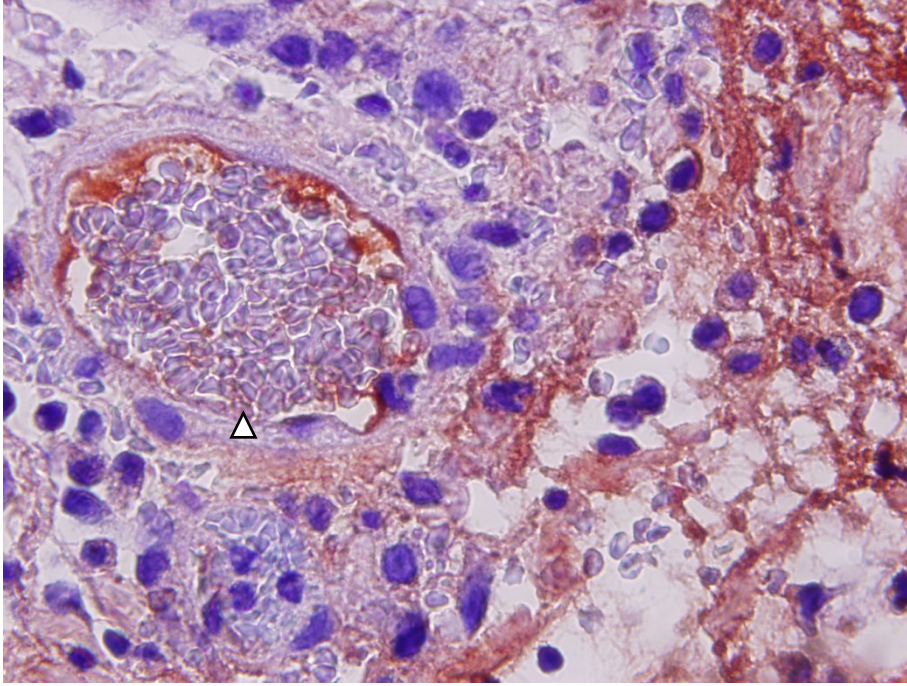
Şekil 34 a, b. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta, epitelde (E) VEGF immüno lokalizasyonu, a) X20, b) X100.



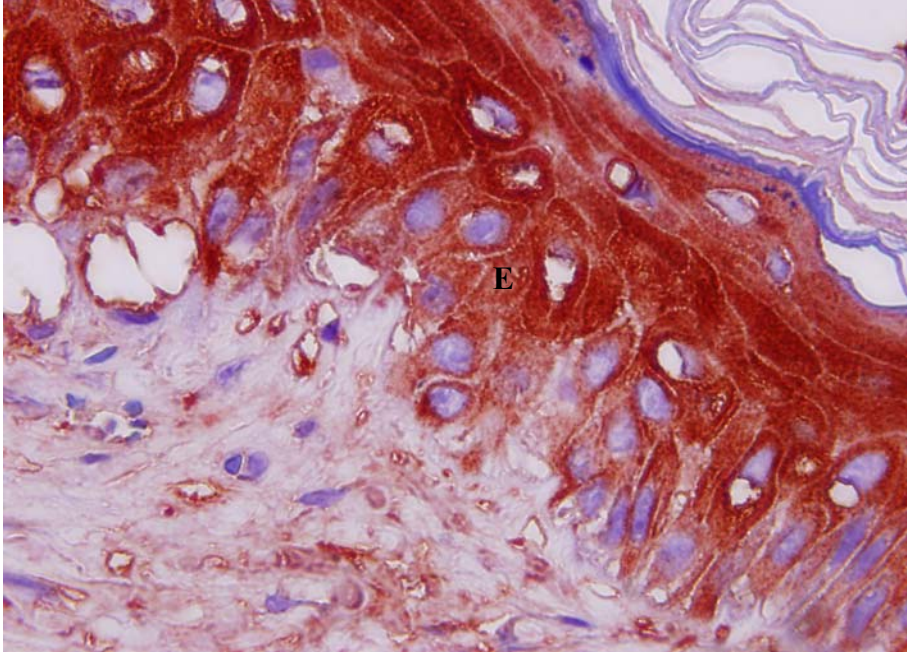
Şekil 35. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta kan damarı çevresinde (Δ), VEGF immunolokalizasyonu, X10.



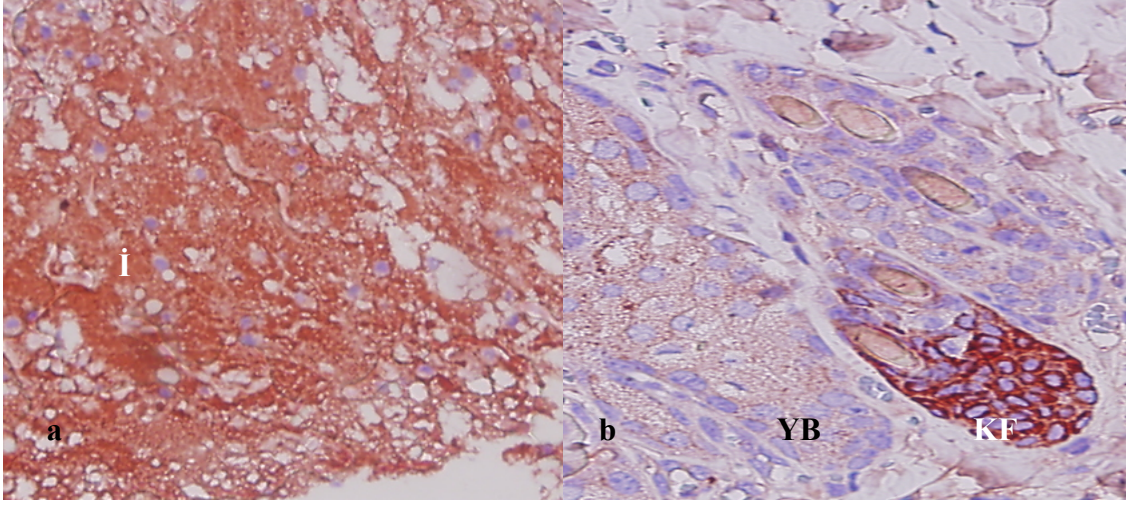
Şekil 36. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta, yağ bezlerinde (YB) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 37. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta kan damarı duvarında (Δ) VEGF immünolokalizasyonu, X100.



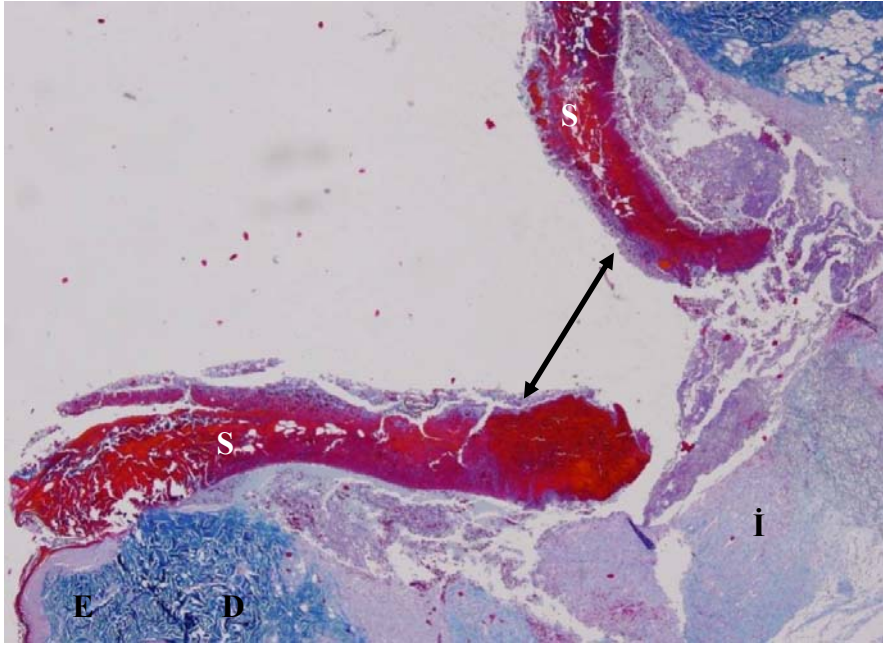
Şekil 38. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta epitelde (E) FGFR-3 immünolokalizasyonu, X100.



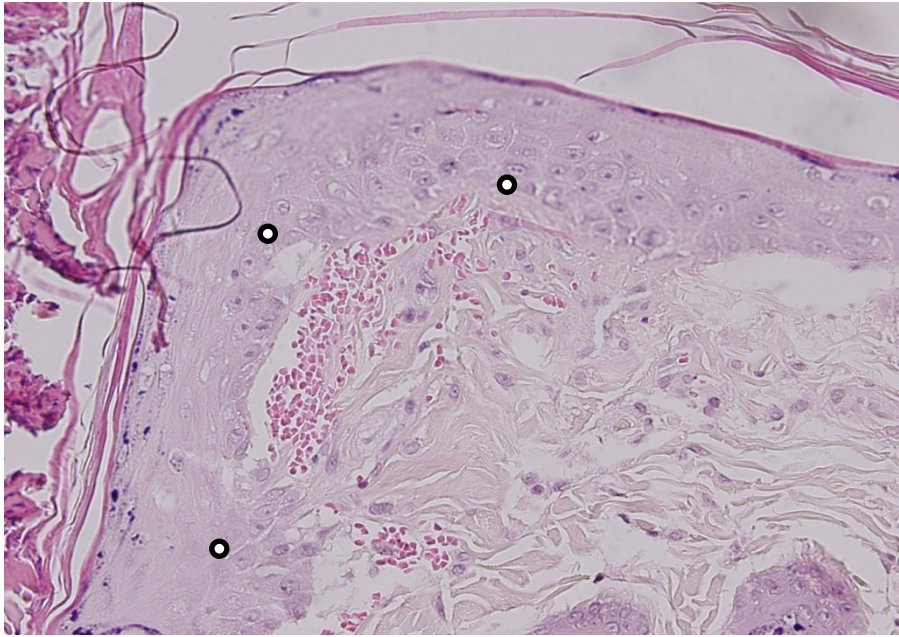
Şekil 39. Diabet+Kitosan 3 günlük grupta iyileşme alanında (İ) (a), kıl follikülünde (KF) ve yağ bezinde (YB) (b), FGFR-3 immünolokalizasyonu, X40.

4. 5. 1. Kontrol Grubu 7 Günlük Yara İyileşmesi:

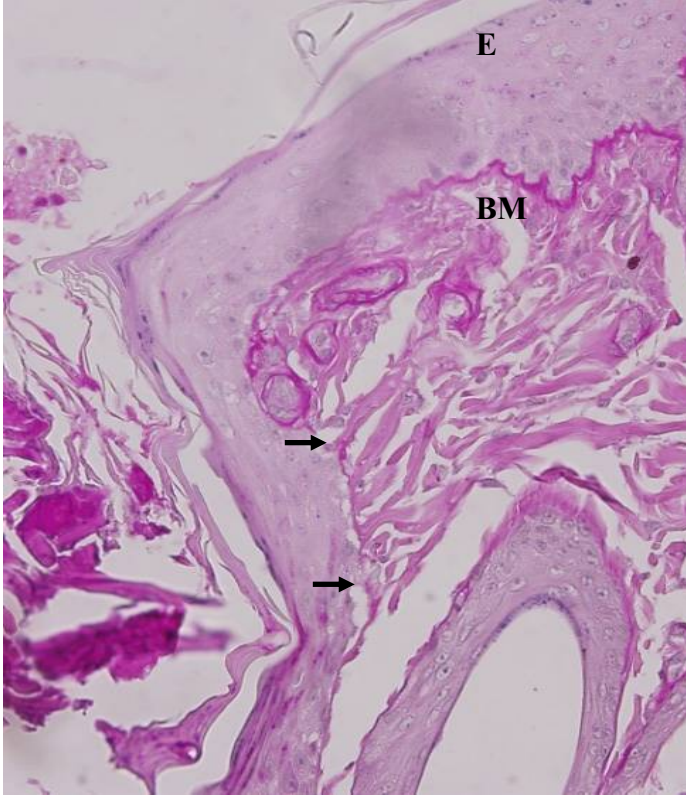
Işık mikroskopik olarak azan trikrom (AT) boyası ile yara alanının sınırları görülmektedir (\leftrightarrow). Yara alanında karşılıklı olarak hem epidermis hem de dermis bölgeleri daha yakın ancak kaynaşma olmamış şekilde izlendi. Yaranın üzerindeki skab, kontrole göre daha geniş bir alanda bulunmakta idi (Şekil 40). Epitelin stratum bazalesinde bulunan yüksek prizmatik hücreler (Şekil 41) ve epitel altı bazal membran düzensiz izlendi (Şekil 42). Yara iyileşmesinin 7. gününde fibroblastlardan, yeni oluşan kan damarlarından, kollajen liflerden zengin granülasyon dokusu belirgin şekilde gözlemlendi. Papiller dermiste fazla sayıda inflamatuvar hücre bulunurken, dermal tabakada kollajen lif demetleri yoğun ve kalın halde bulunmaktaydı (Şekil 43). İyileşme alanında, kollajen lifler arasında fibroblastlar, kan hücreleri, inflamatuvar hücreler, kan damarları (Şekil 44 a, b) ve retiküler lifler yoğun halde görüldü (Şekil 45). Mast hücreleri iyileşme alanında izlendi (Şekil 46).



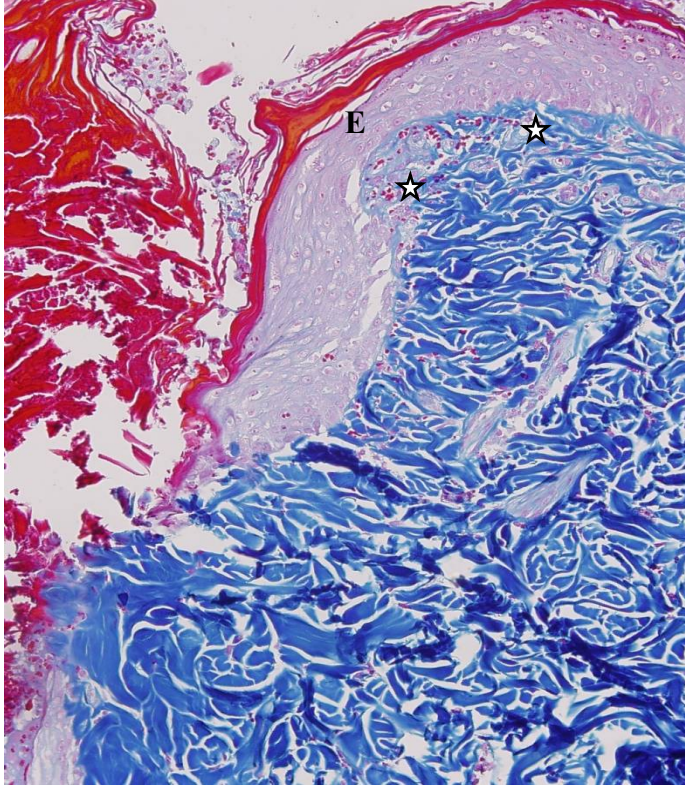
Şekil 40. Kontrol grubu 7. günde, yara alanı (↔) epidermis (E), dermis (D) ve yara kabuğu (S), AT, X10.



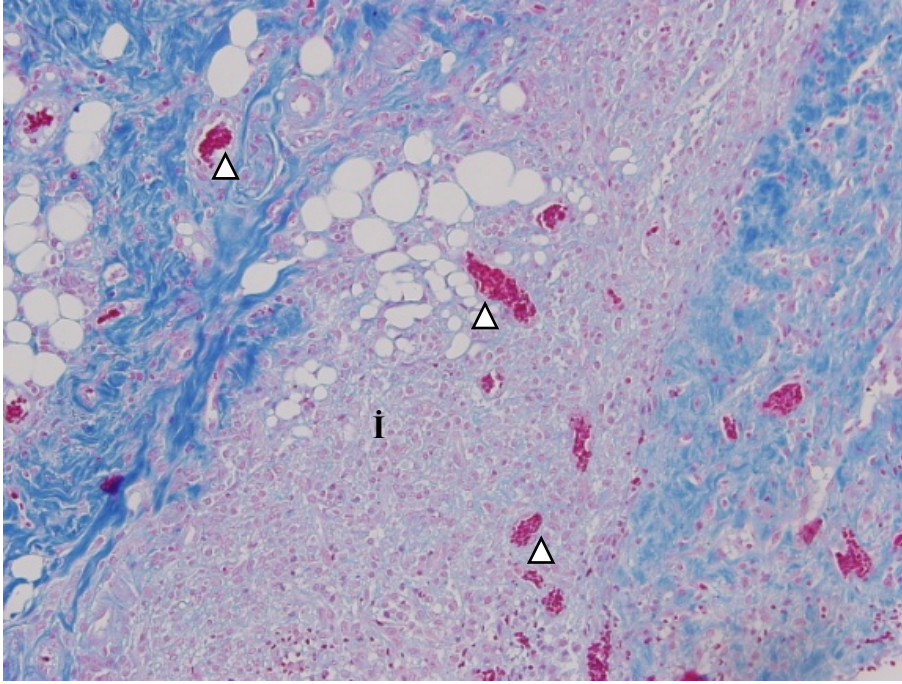
Şekil 41. Kontrol grubu 7.günde stratum bazale tabakasında hücreler (●) H&E, X40.



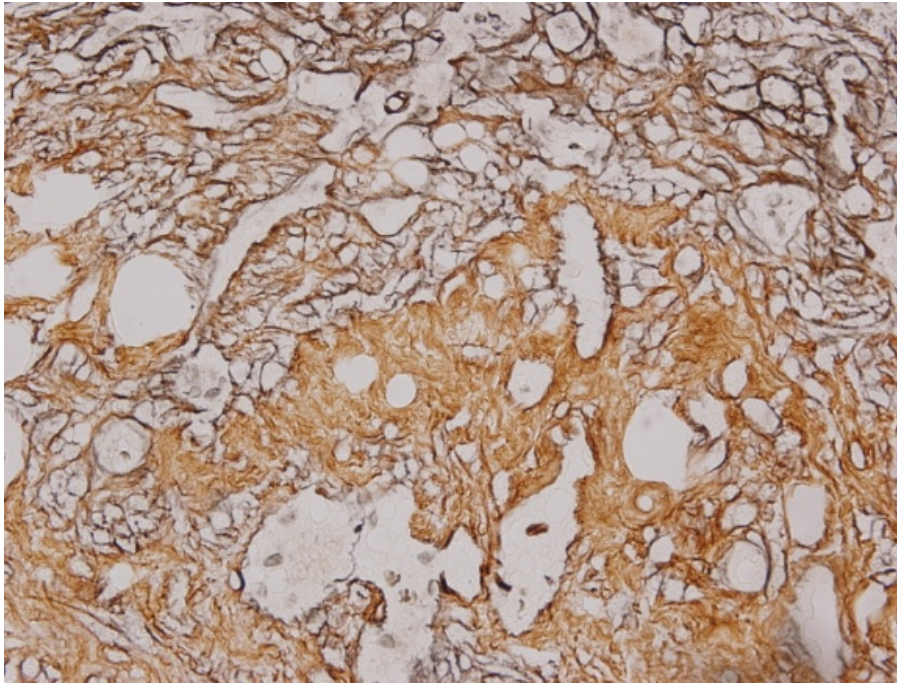
Şekil 42. Kontrol grubu 7. günde, epitel (E), bazal membran (BM) (→). PAS, X40.



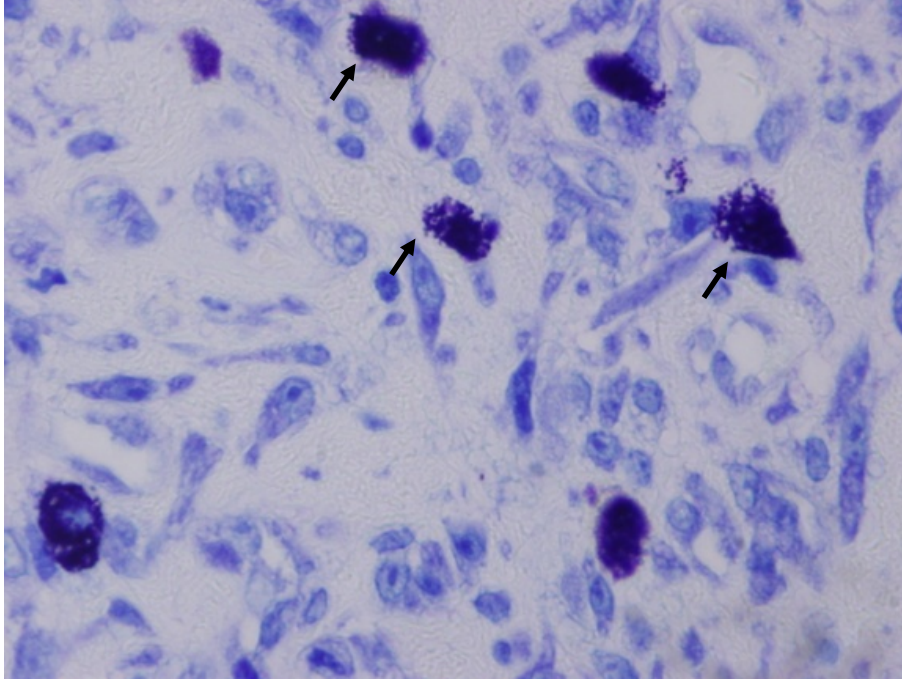
Şekil 43. Kontrol grubu 7. günde retiküler dermiste inflamatuvar hücreler (☆), dermis (D), epidermis (E), AT, X20.



Şekil 44. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında (I) , kan damarları (Δ). AT, X20.



Şekil 45. Kontrol grubu 7. günde grupta, retiküler lifler. Gümüşleme, X40.

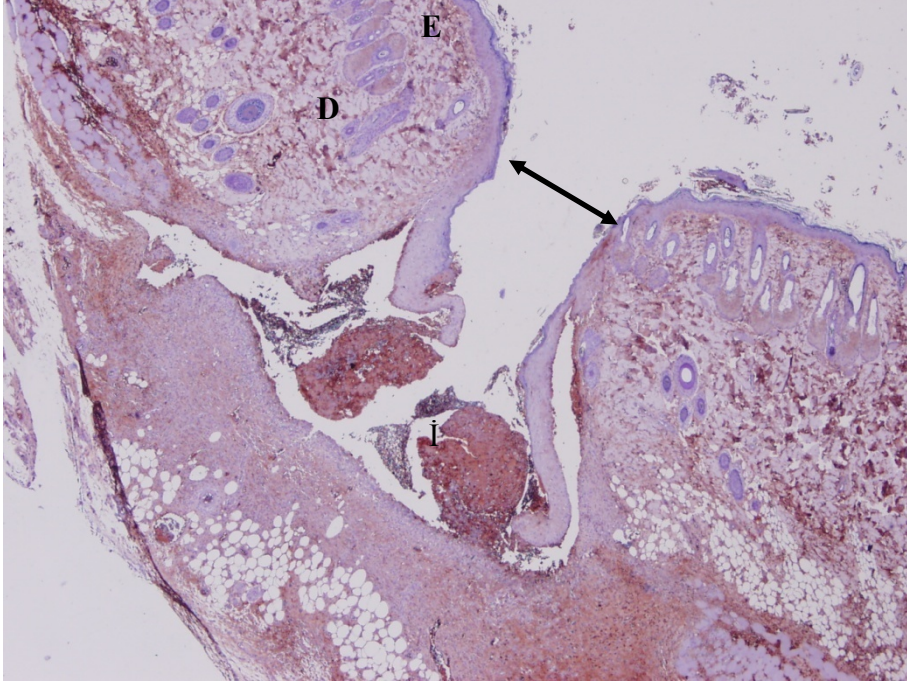


Şekil 46. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında mast hücreleri (→). Dominiçi, X100.

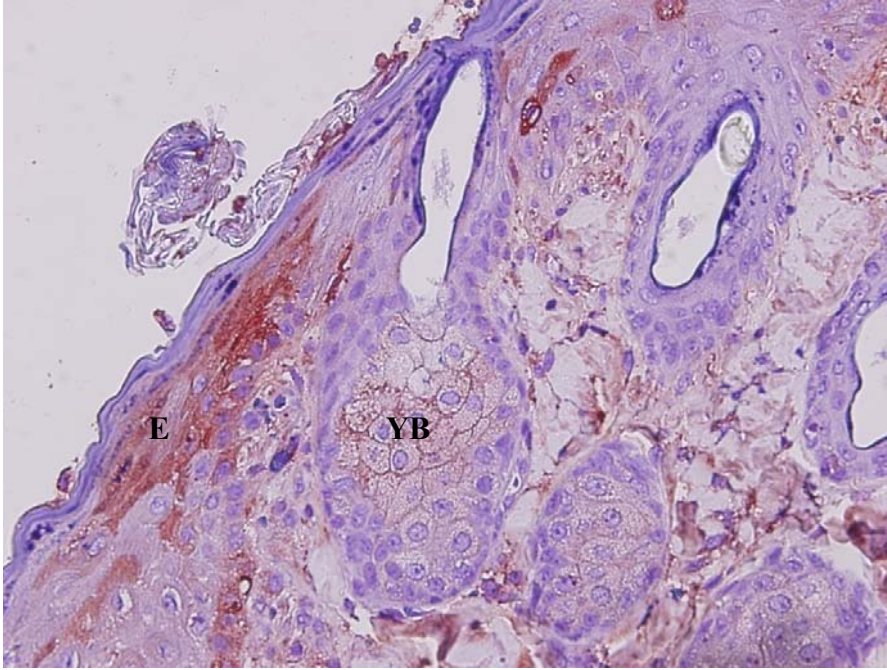
4.5.2. Kontrol Grubu 7 Günlük Yara İyileşmesi İmmünohistokimyasal Bulgular

VEGF, yara alanına yakın epitelde birkaç hücrede (Şekil 47, 48) ve kan damarı çevresinde (Şekil 49) yoğun immüno lokalizasyon gösterdi. Dermis bölgesinde, kıl follikülleri çevresinde (Şekil 50), yağ bezlerinde lokalize olmuş şekilde izlendi (Şekil 51).

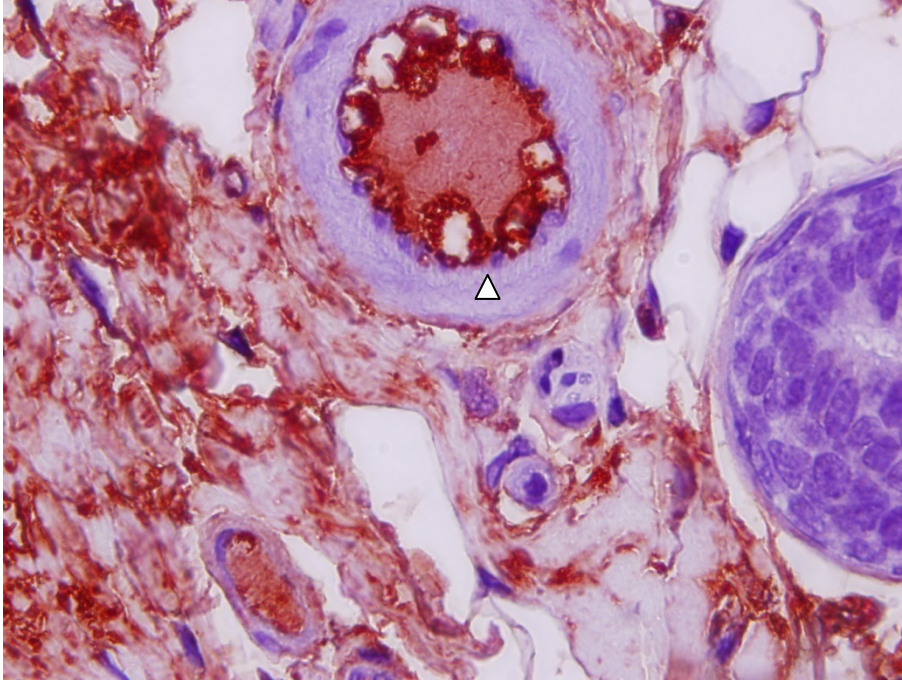
İyileşme alanında, yara alanına yakın epitelin tüm tabakalarında, yara alanından uzaktaki epitelin stratum bazale tabakasında, kan damarları çevresinde, kıl folliküllerinin epidermal kök kılıfında, yağ bezlerinde, fibroblast sitoplazmalarında yoğun FGFR3 immüno lokalizasyon gözlemlendi (Şekil 51- 53).



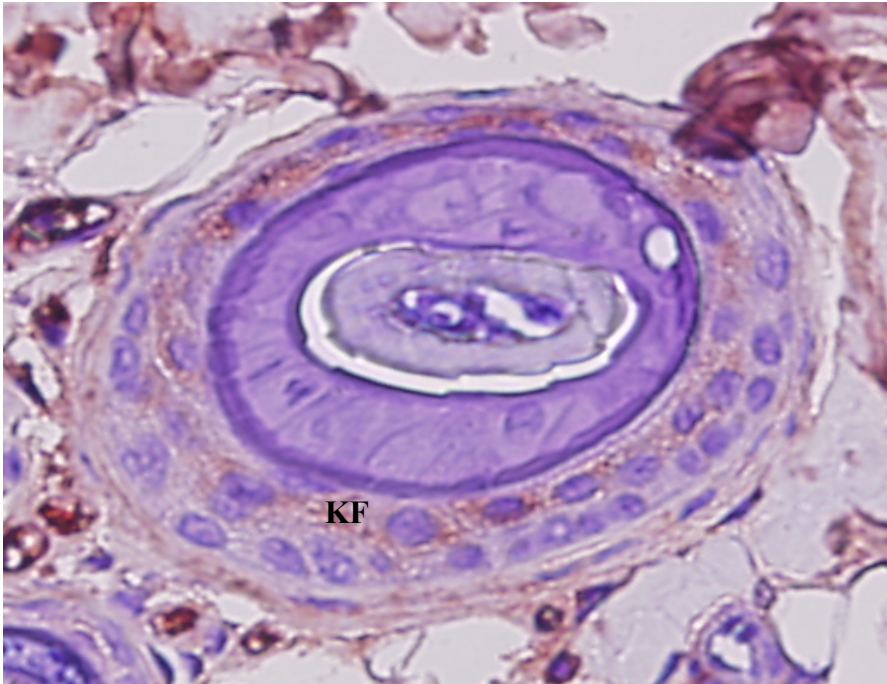
Şekil 47. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında (İ), epitelde (E), dermiste (D) VEGF immünolokalizasyonu, X4.



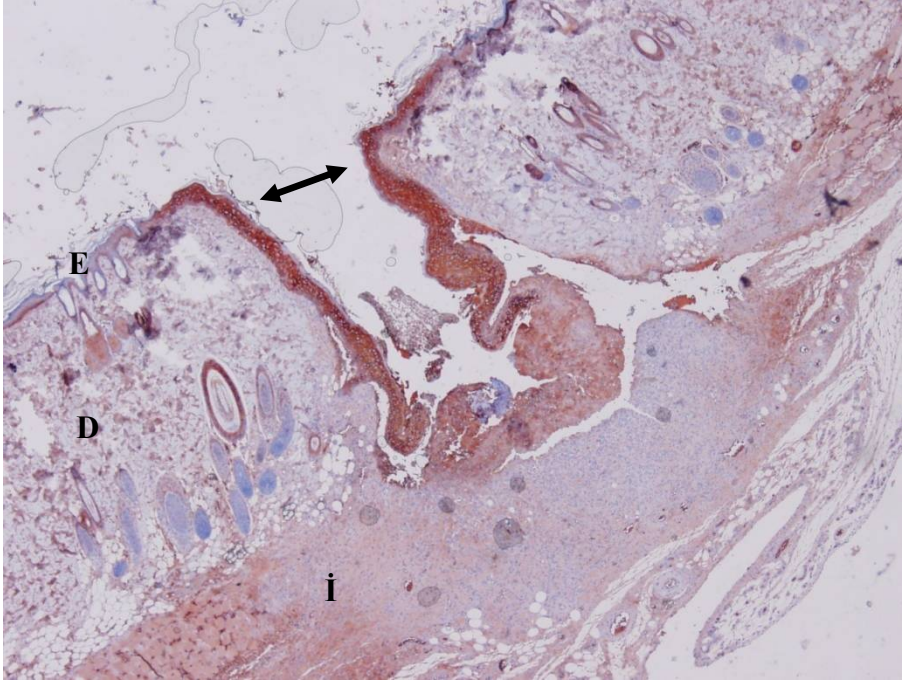
Şekil 48. Kontrol grubu 7. günde yara alanına yakın epitelde (E), yağ bezinde (YB), VEGF immünolokalizasyonu, X40.



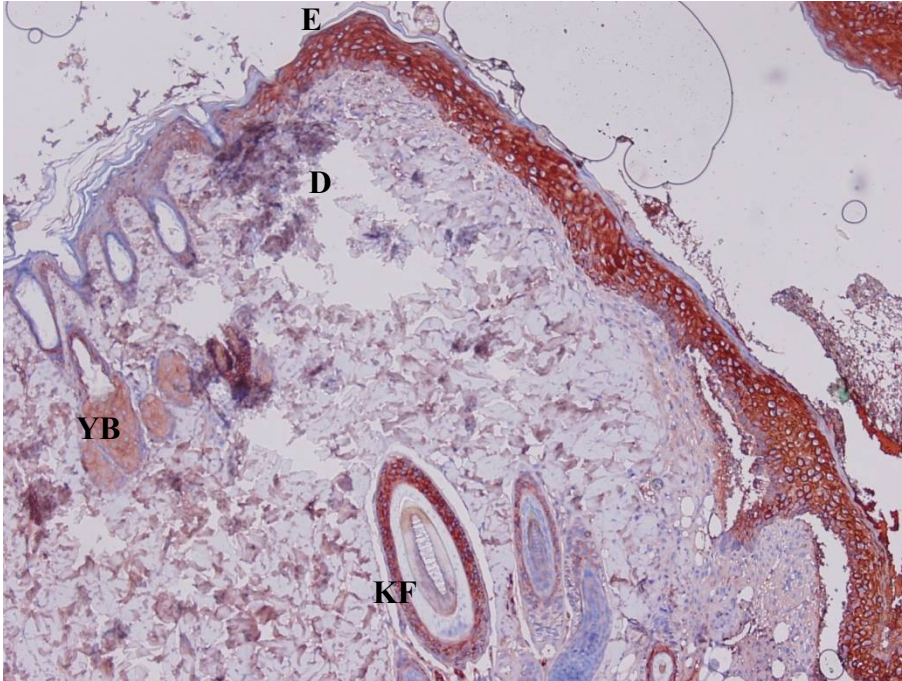
Şekil 49. Kontrol grubu 7. günde kan damarında (Δ) VEGF immünolokalizasyonu, X100.



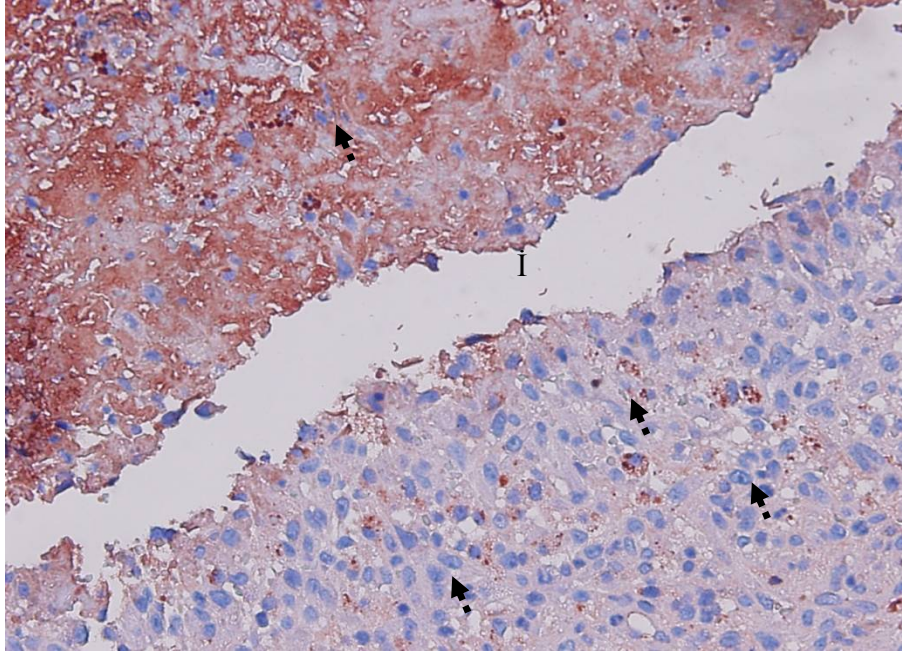
Şekil 50. Kontrol grubu 7. günde kıl follikülünde VEGF immünolokalizasyonu, X100.



Şekil 51. Kontrol grubu 7. günde, iyileşme alanında (İ), epidermis (E) ve dermiste (D) FGFR3 immünolokalizasyonu, X4.



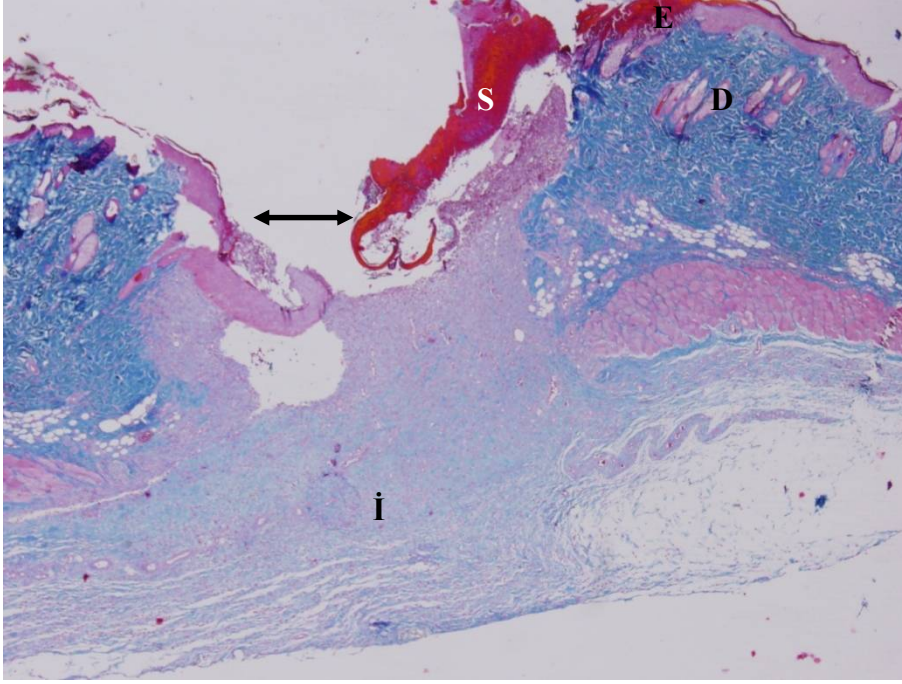
Şekil 52. Kontrol grubu 7. günde epitelde (E), kıl folliküllerinde (KF), yağ bezlerinde (YB) FGFR3 immünolokalizasyonu, X20.



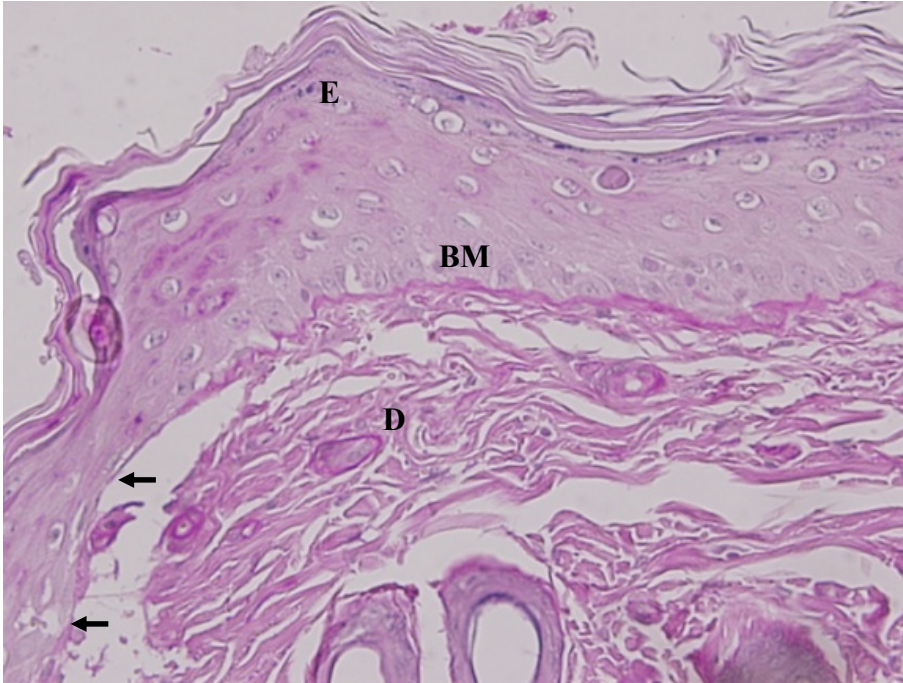
Şekil 53. Kontrol grubu 7. günde iyileşme alanında (İ), fibroblast (■➔) sitoplazmasında FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.

4. 6. 1. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 Günlük Yara İyileşmesi:

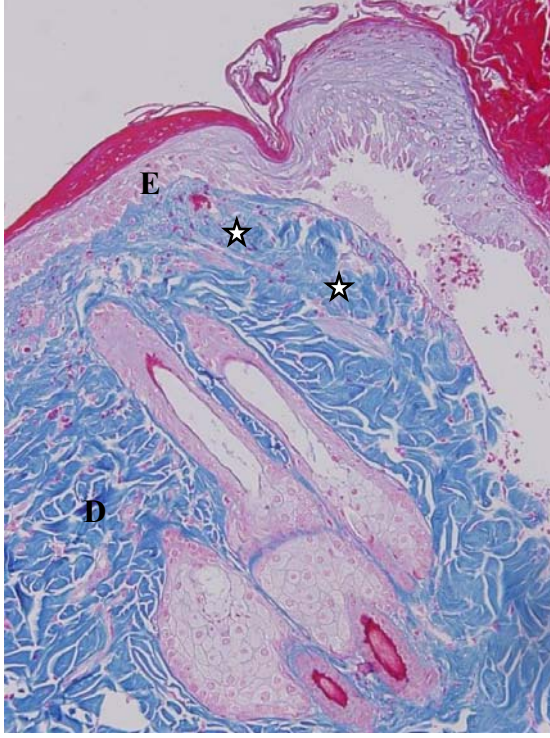
Yaranın üst kısmında oluşan skab dar bir alanda, ince olarak izlenmiştir (Şekil 54). Bu grupta belirgin bir granülasyon dokusu izlenmedi. İyileşme bölgesine yakın alanda kesintiye uğramış bazal membran izlendi (Şekil 55). Papiller dermiste kontrol grubu ile karşılaştırıldığında az sayıda inflamatuvar hücre olduğu görüldü (Şekil 56). Dermal tabakada kontrol grubuna göre kollajen lif demetlerinin yoğunluğu daha az ve açık renkte boyanmış idi. İyileşme alanında dağınık ve düzensiz yerleşim gösteren kollajen lifler arasında fibroblastlar, yoğun kan hücreleri, inflamatuvar hücreler, az sayıda kan damarı (Şekil 57) ve az miktarda retiküler lif görüldü (Şekil 58). Mast hücreleri iyileşme alanında ve az sayıda izlendi (Şekil 59).



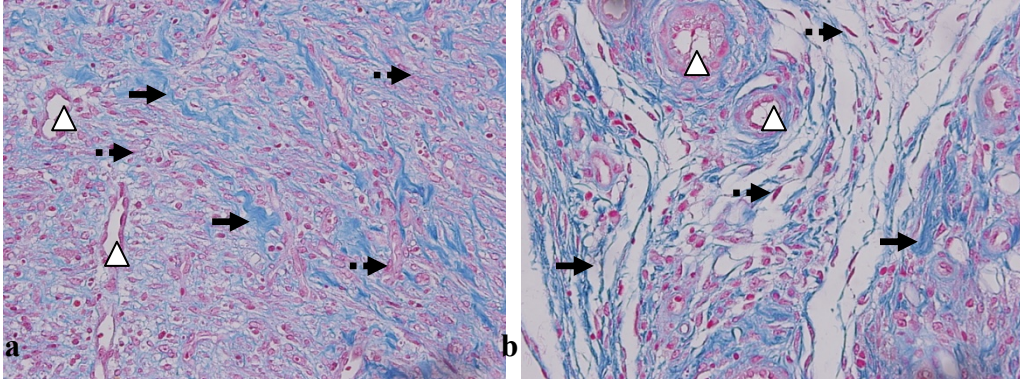
Şekil 54. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda yara alanı (↔), iyileşme alanı (İ), yara kabuğu (S), epidermis (E) ve dermis (D). AT, X4.



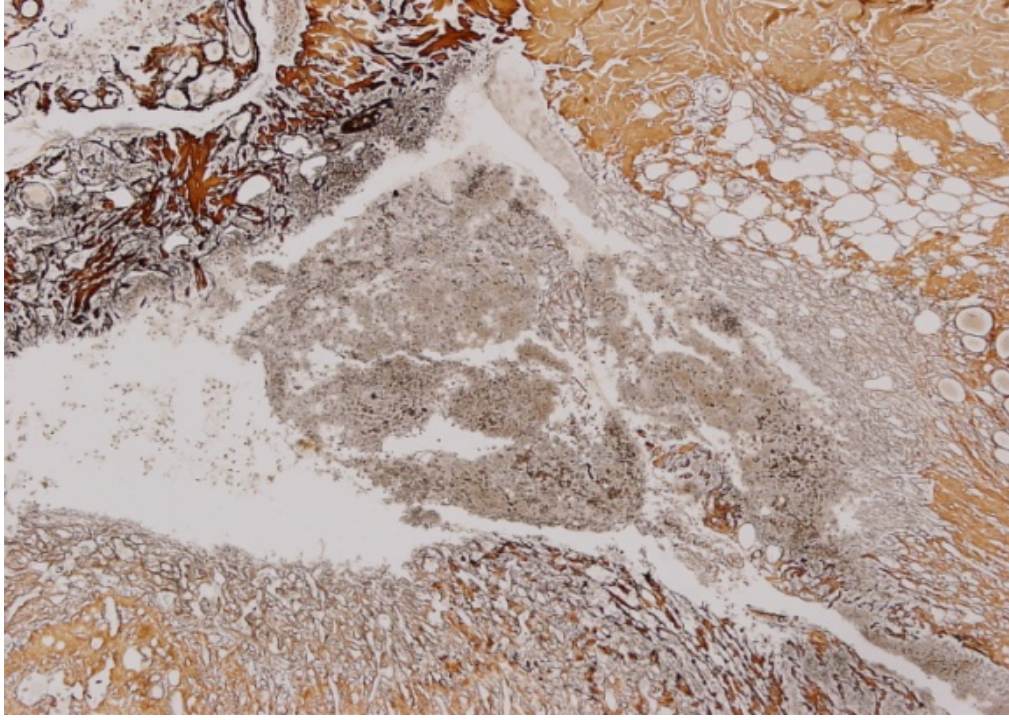
Şekil 55. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda bazal membran (BM) (←). PAS, X40.



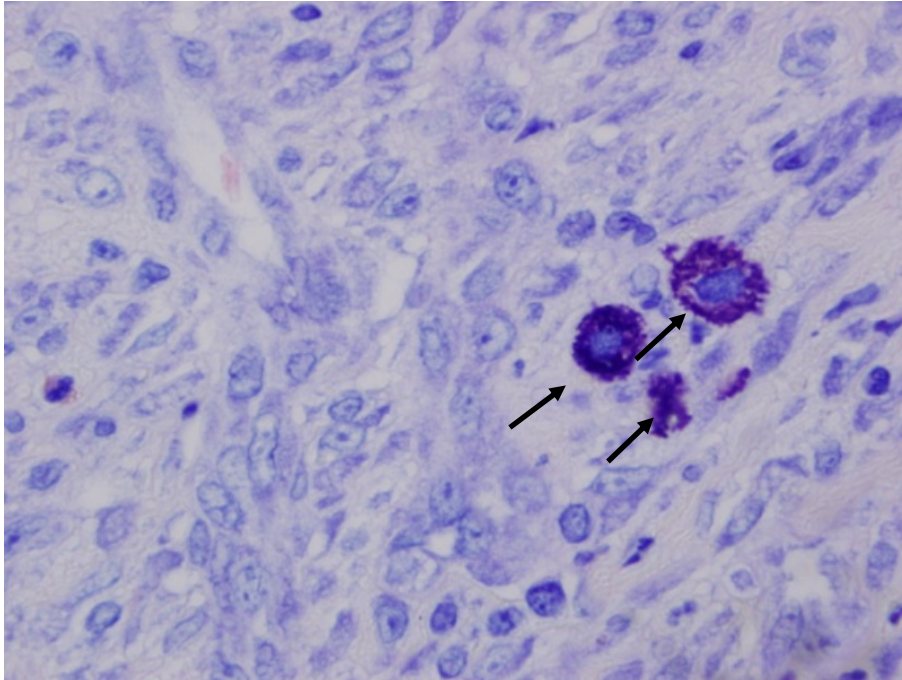
Şekil 56. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda epitel (E), retiküler dermis (D), papiller dermis tabakalarında yoğun kan hücreleri (☆). AT, X20.



Şekil 57. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında kan damarları (△), kollajen lifler (→) ve fibroblastlar (•→). AT, X20.



Şekil 58. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda, iyileşme alanında retiküler lifler. Gümüşleme, X40.

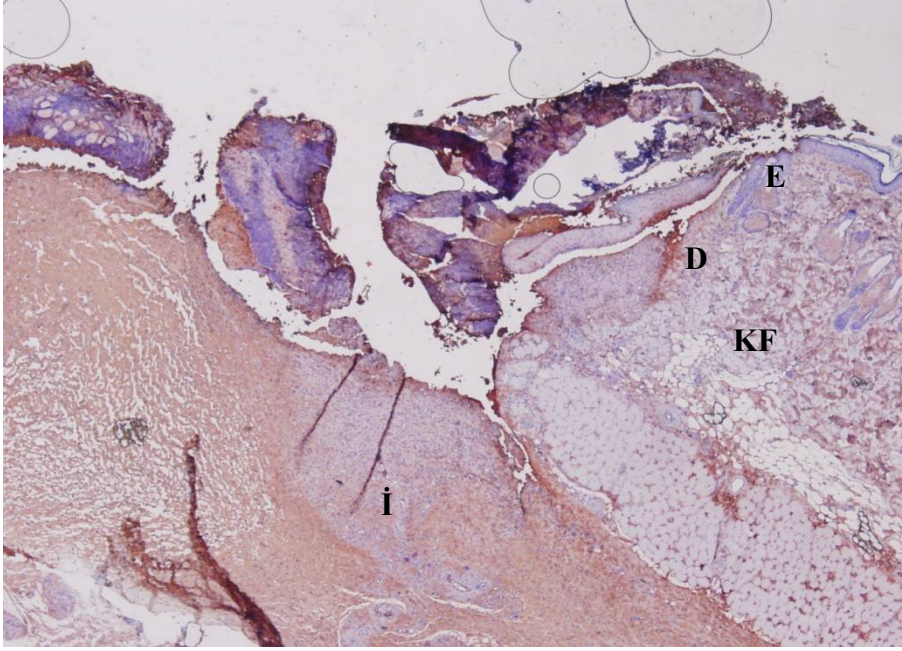


Şekil 59. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında mast hücreleri. Dominiçi, X100.

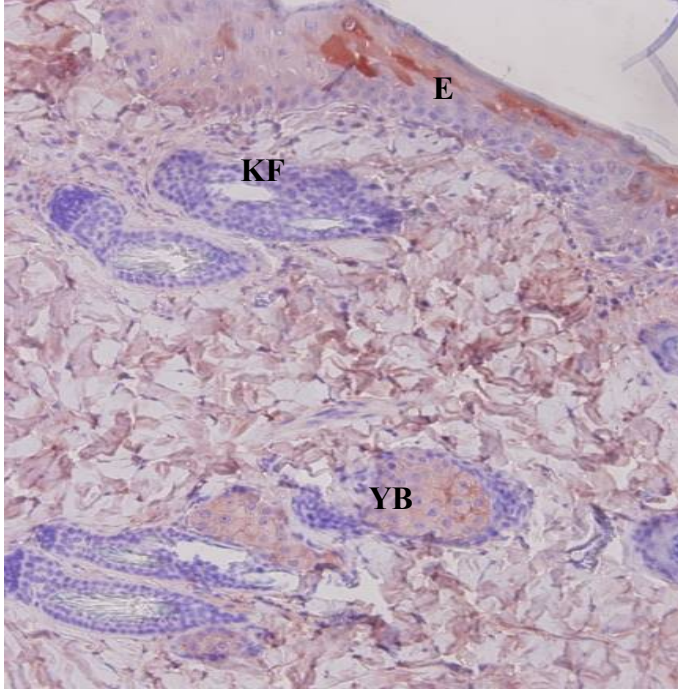
4. 6. 2. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 Günlük Yara İyileşmesine Ait İmmünohistokimyasal Bulgular:

VEGF, iyileşme alanında fazla (Şekil 60), epitelde (Şekil 61), kan damarları çevresinde (Şekil 62), yağ bezlerinde (Şekil 61) az yoğun immüno lokalizasyon gösterdi.

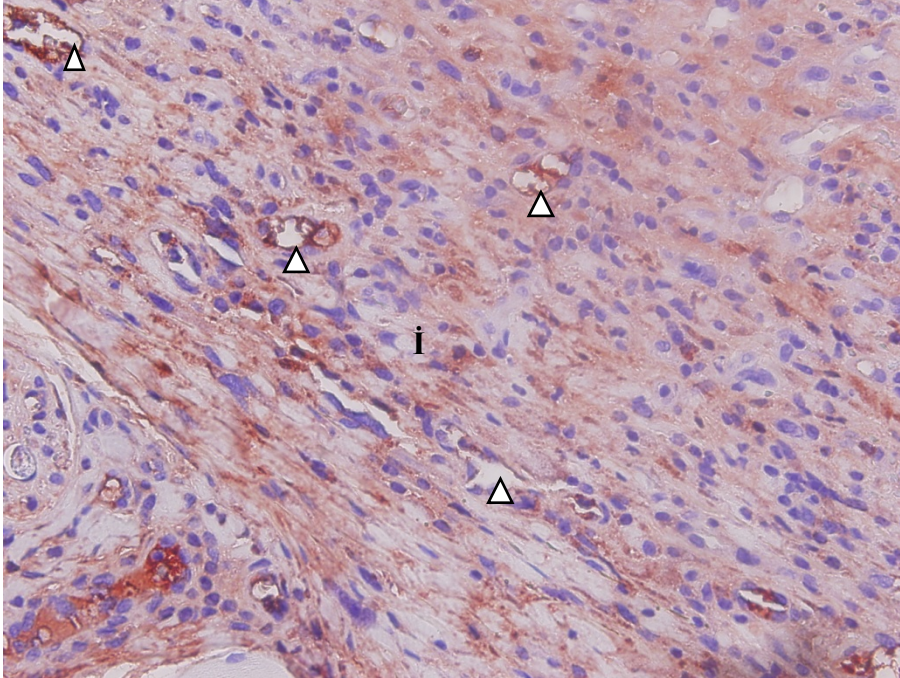
Yara alanına yakın alanlarda (Şekil 63), epitelin tüm tabakalarında kıl folliküllerinin dermal tabakalarında az yoğun FGFR3 lokalizasyonu görüldü (Şekil 64, 65).



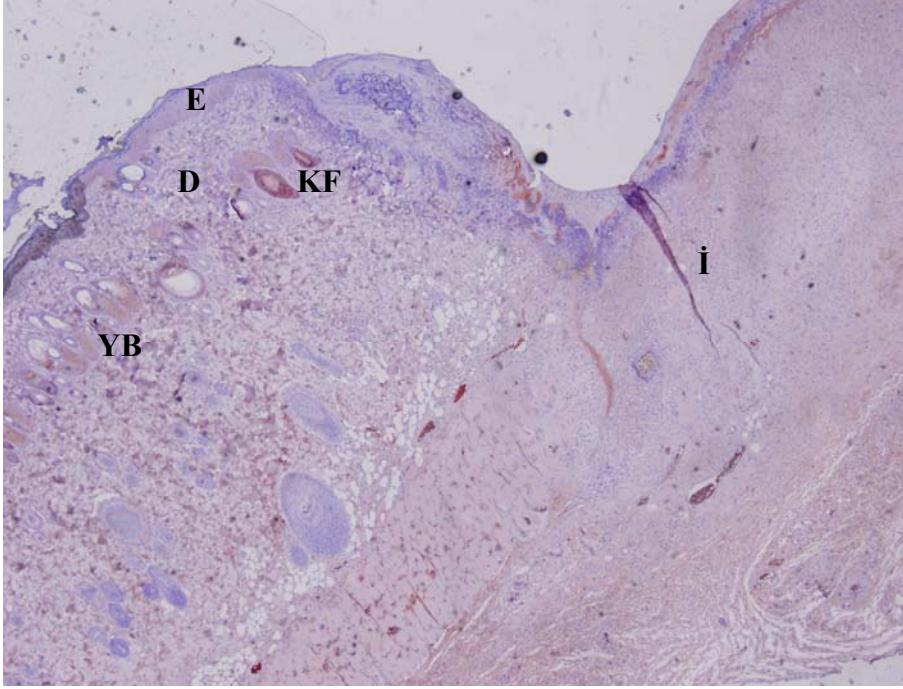
Şekil 60. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında (İ), epitelde (E), dermiste (D), kıl folliküllerinde (KF), VEGF immüno lokalizasyonu, X4.



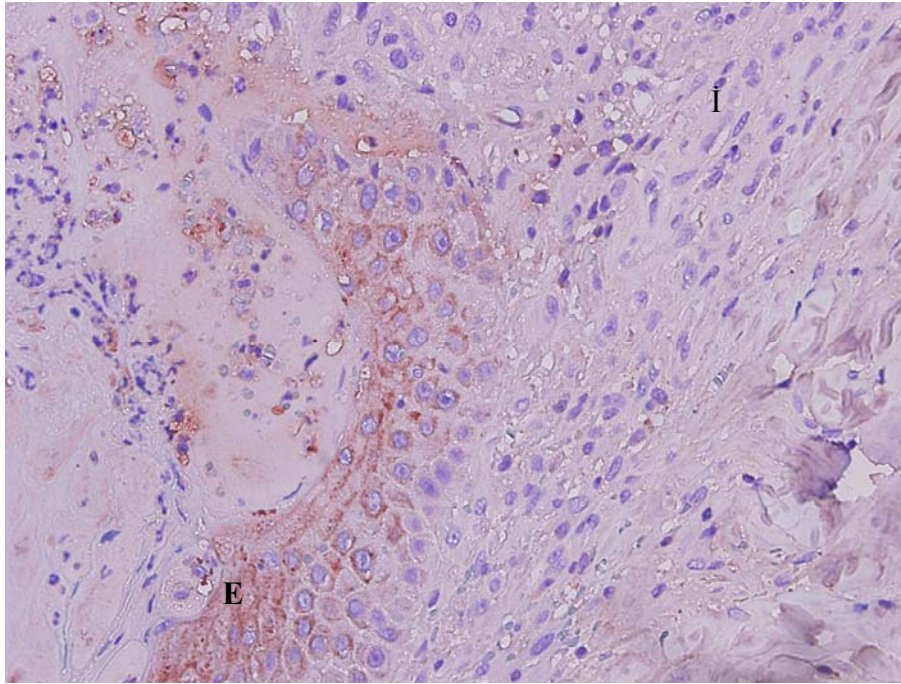
Şekil 61. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda epitelde (E), kıl follüküllerinde (KF), yağ bezlerinde (YB) VEGF immünolokalizasyonu, X20.



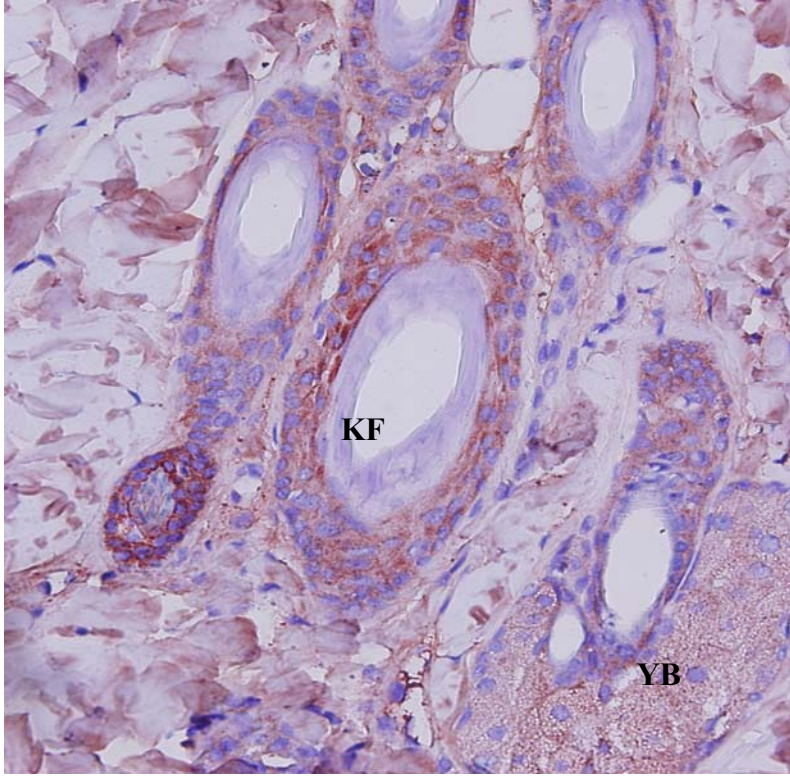
Şekil 62. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında (İ), kan damarlarında (Δ) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 63. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında (İ), epidermiste (E), dermiste (D), kıl folliküllerinde (KF), yağ bezlerinde (YB) FGFR3 immünolokalizasyonu, X4.



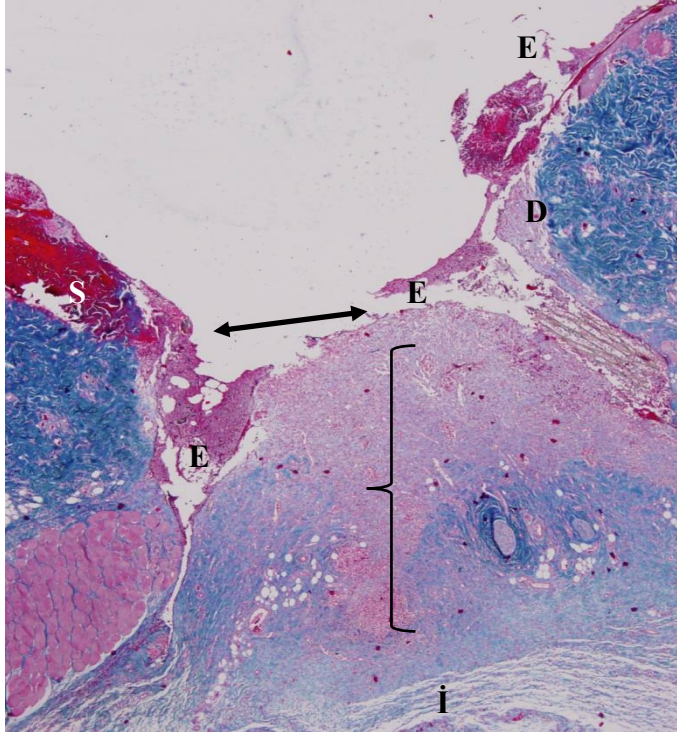
Şekil 64. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda iyileşme alanında (İ), epitelde (E), FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



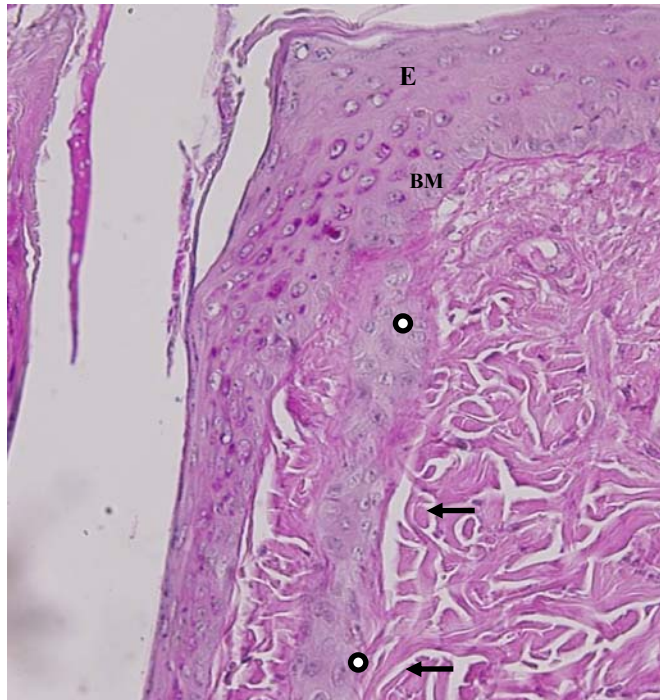
Şekil 65. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 7 günlük gruplarda kıl follükülünde (KF), yağ bezinde (YB), FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.

4. 7. 1. Diabet+Kitosan 7 Günlük Yara İyileşmesi

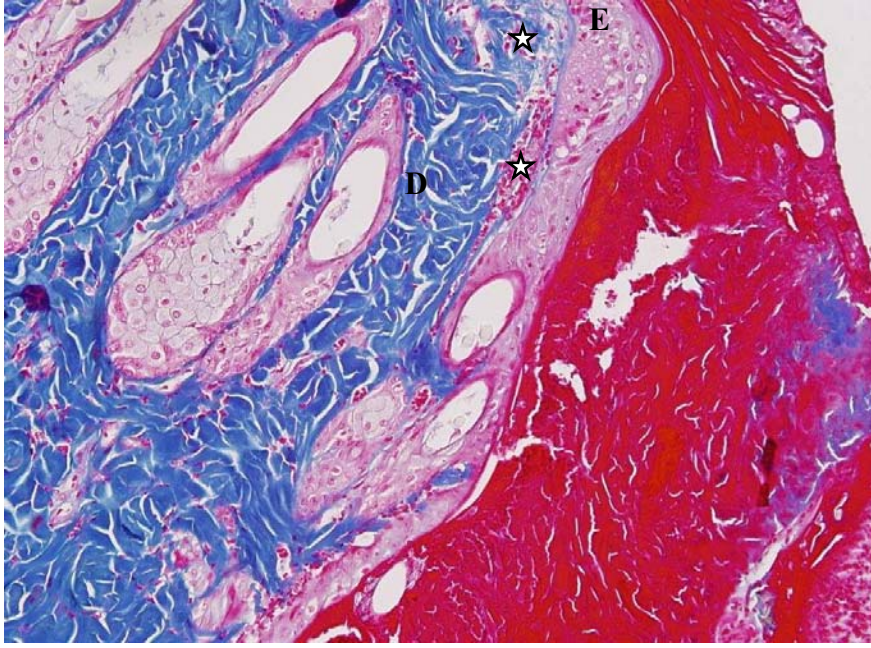
Yara alanı, epidermis ve dermiste kaynaşmanın olmadığı görülmektedir ancak yara alanı birbirine yaklaşmış, skab azalmıştır (Şekil 66). Epitel tabakasının stratum bazale hücrelerinin ayrımı daha iyi yapılabilmekte ve epitel altında yara alanına yakın alanlarda daha düzenli bazal membran bulunmaktaydı (Şekil 67). Papiller dermiste çok sayıda inflamatuvar hücre, dermal tabakada yoğun ve kalın kollajen lif demetleri görüldü (Şekil 68). Retiküler lifler iyileşme bölgesinin üst katlarında bulunmaktaydı (Şekil 69). İyileşme alanında daha fazla mast hücresi izlenmiştir (Şekil 70).



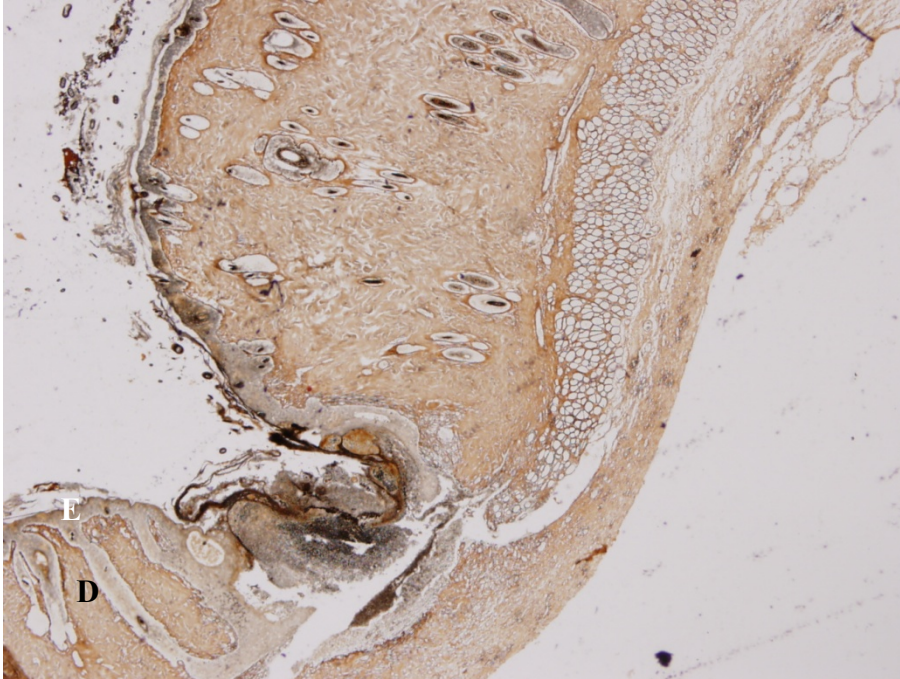
Şekil 66. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde, yara alanı (↔), iyileşme alanı (İ), skab (S), granülasyon dokusu (┌). AT, X4.



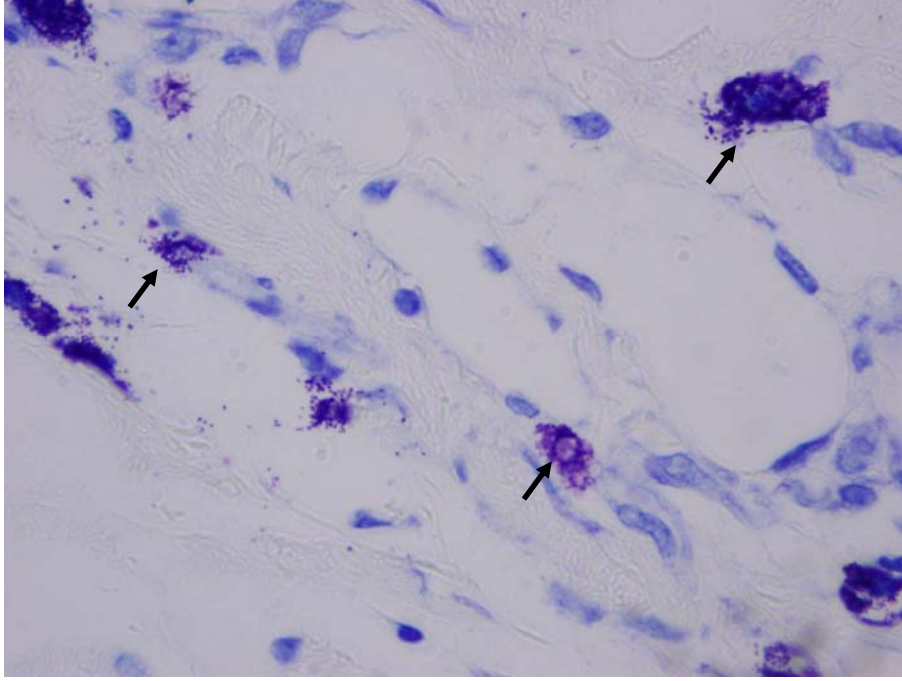
Şekil 67. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde, epitel (E), stratum bazalede hücreler (●), bazal membran (BM). PAS, X40



Şekil 68. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde papiller dermiste inflamatuvar hücreler (☆). AT, X40.



Şekil 69. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde epitel (E), dermis (D) ve retiküler lifler.
Gümüşleme, X4.

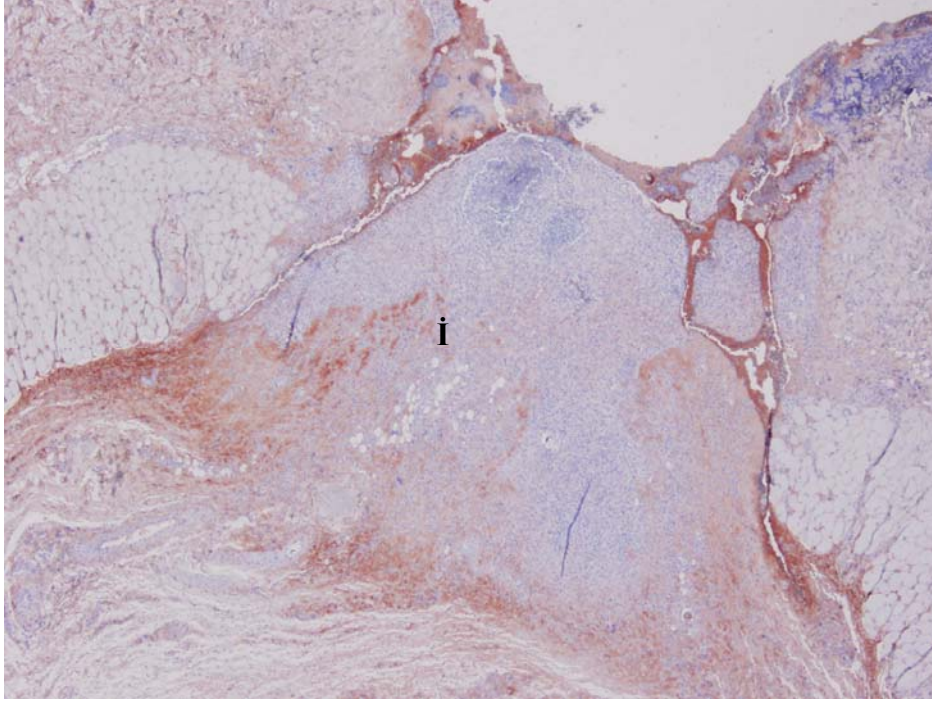


Şekil 70. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında mast hücreleri (→).
Dominiçi, X100.

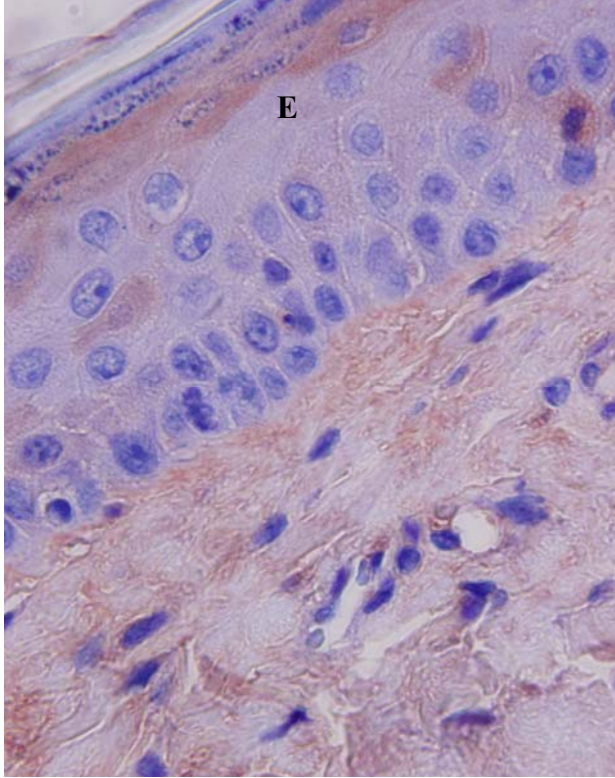
4. 7. 2. Diabet+Kitosan 7 Günlük Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular

VEGF, iyileşme alanında (Şekil 71), epidermiste (Şekil 72) az yoğun immüno lokalizasyon göstermektedir. İyileşme alanının alt tabakalarında özellikle yeni oluşan kan damarları çevresinde (Şekil 73) ve yağ bezlerinde (Şekil 74) biraz daha yoğun lokalizasyon izlenmektedir.

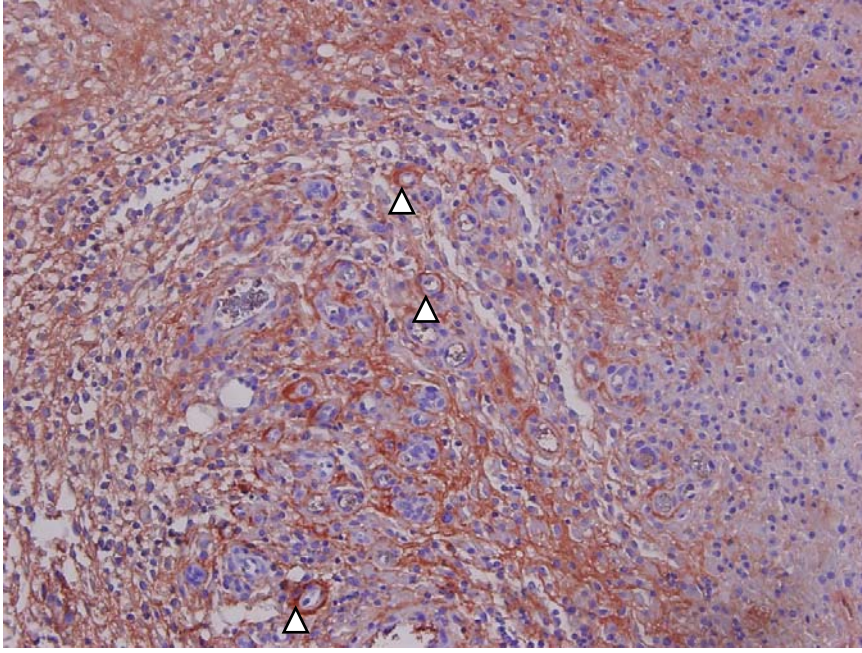
İyileşme alanında, yara alanına yakın epitelde, kıl follikülleri (Şekil 75), ve yağ bezlerinde (Şekil 76) ve iyileşme alanındaki kan damarları çevresinde (Şekil 77) yoğun FGFR3 immüno lokalizasyonu izlenmiştir.



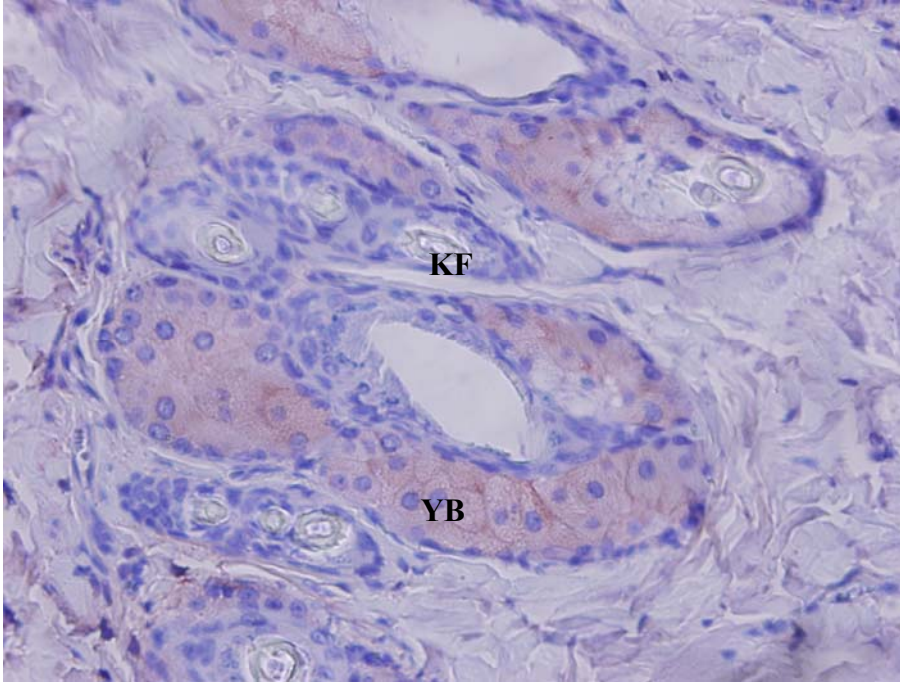
Şekil 71. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında (İ) VEGF immünolokalizasyonu, X4.



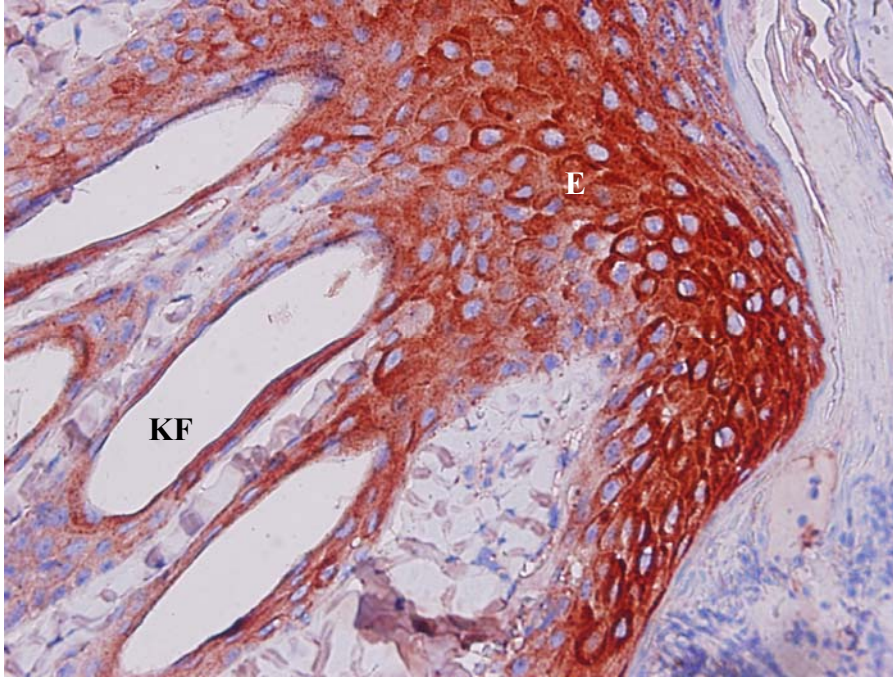
Şekil 72. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde epitelde (E) VEGF immünolokalizasyonu, X100.



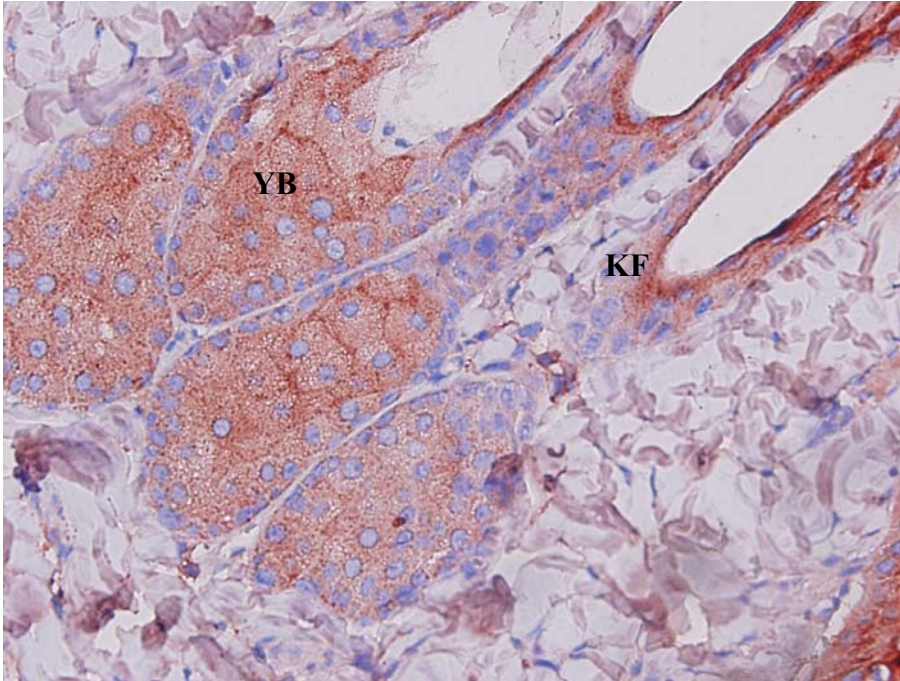
Şekil 73. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında ve kan damarlarında (Δ) VEGF immünolokalizasyonu, X20.



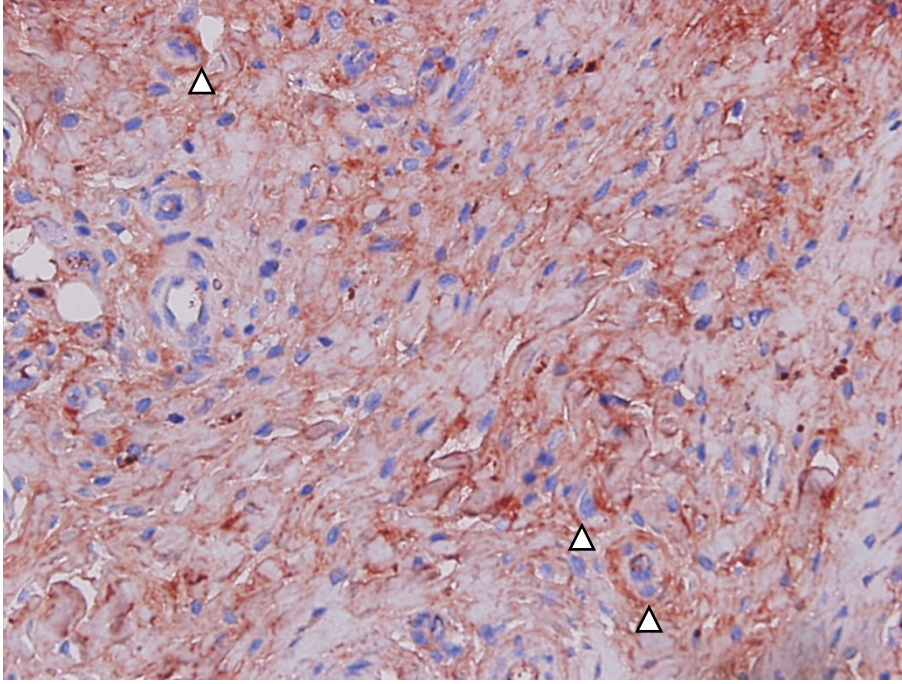
Şekil 74. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde kıl follikülünde (KF), yağ bezinde (YB) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 75. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde epitelde (E), kıl follikülünde (KF) FGFR3 immünolokalizasyonu, X100.



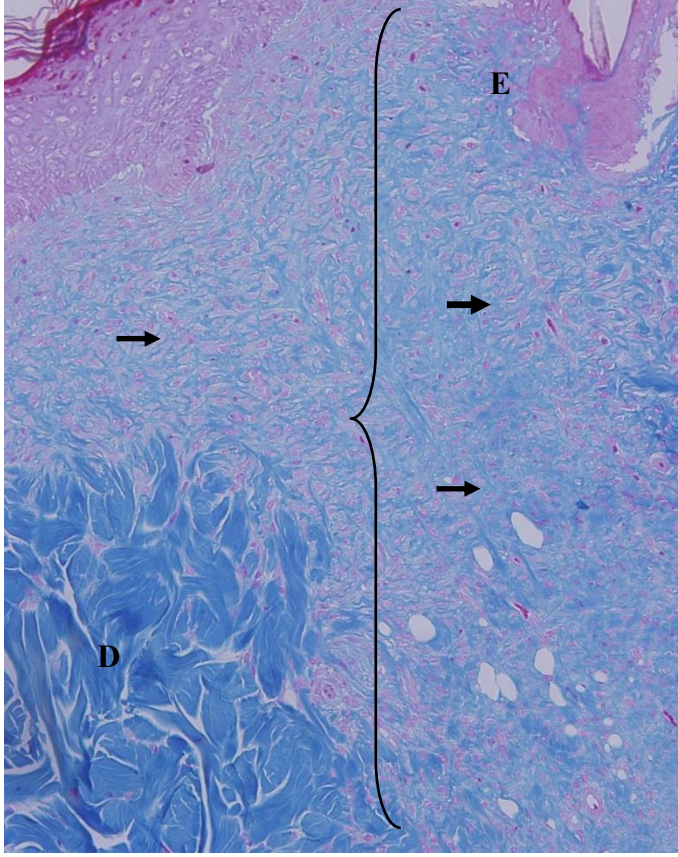
Şekil 76. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde kıl follikülünde (KF), yağ bezinde (YB) FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



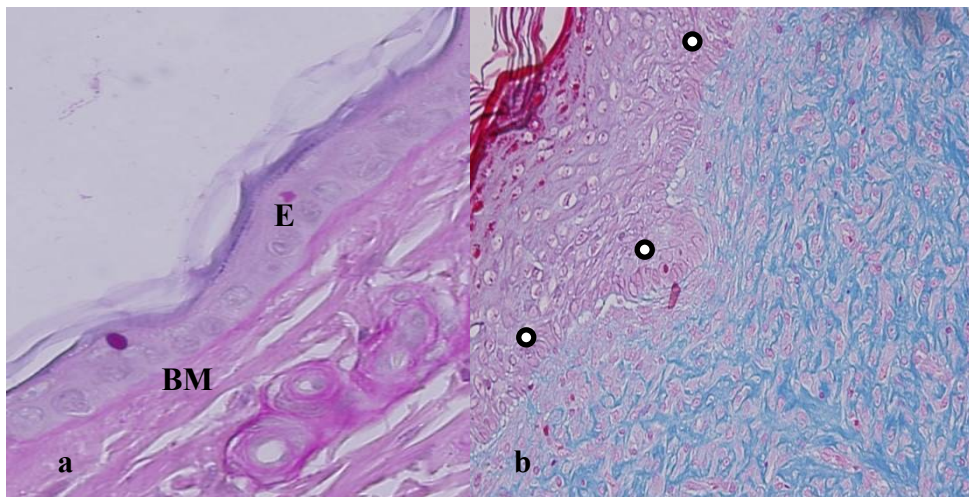
Şekil 77. Diabet+Kitosan grubunda 7. günde iyileşme alanında kan damarları çevresinde (Δ) FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.

4. 8. 1. Kontrol Grubu 14 Günlük Yara İyileşmesi

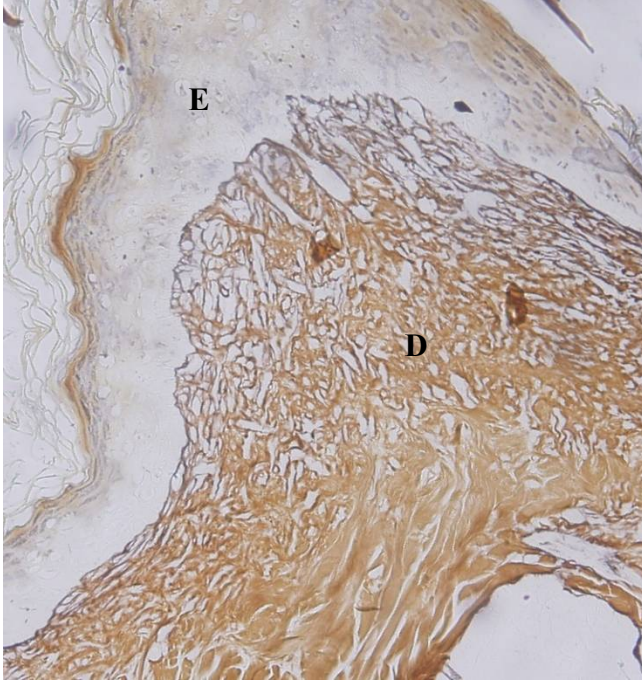
İyileşme süreci neredeyse tamamlanmıştır. Epidermis ve dermis birbirine yaklaşmış, epitel yenilenmiştir. İyileşme alanında granülasyon dokusu bulunmaktadır ve granülasyon dokusu çevresinde dermisin kalın kollajen lifleri oluşmuştur. Granülasyon dokusunda kan damarları yoğun halde izlenmektedir (Şekil 78). Epitel altında bazal membran düzenli ve stratum bazaledeki hücreler yüksek prizmatik şekilli olarak görülmektedir. Papiller dermiste inflamatuvar hücre sayısı (Şekil 79 a, b) ve retiküler lif miktarı az izlenmektedir (Şekil 80). Mast hücreleri granülasyon dokusunun altında az yoğun halde bulunmaktadır (Şekil 81).



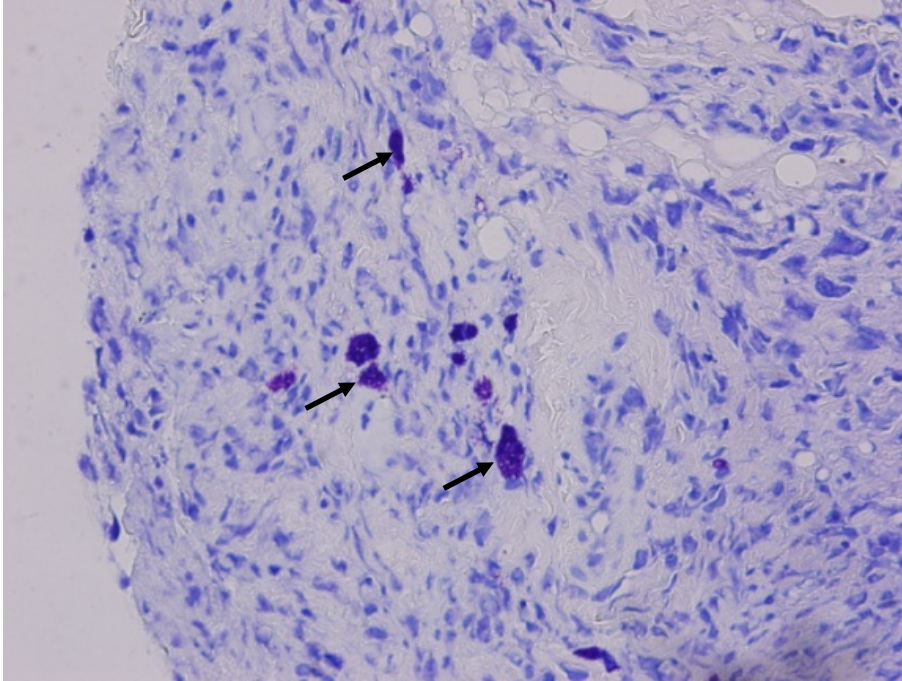
Şekil 78. Kontrol grubu 14. günde epitel (E), dermis (D), granülasyon dokusunda ({)kollajen lifler (→). AT, X20.



Şekil 79. Kontrol grubu 14. günde a) Epitel altında bazal membran (BM). PAS, 40X. b) Stratum bazaledeki hücreler (○). AT, X40.



Şekil 80. Kontrol grubu 14. günde epitel (E), dermis (D) retiküler lifler. Gümüşleme, X40.

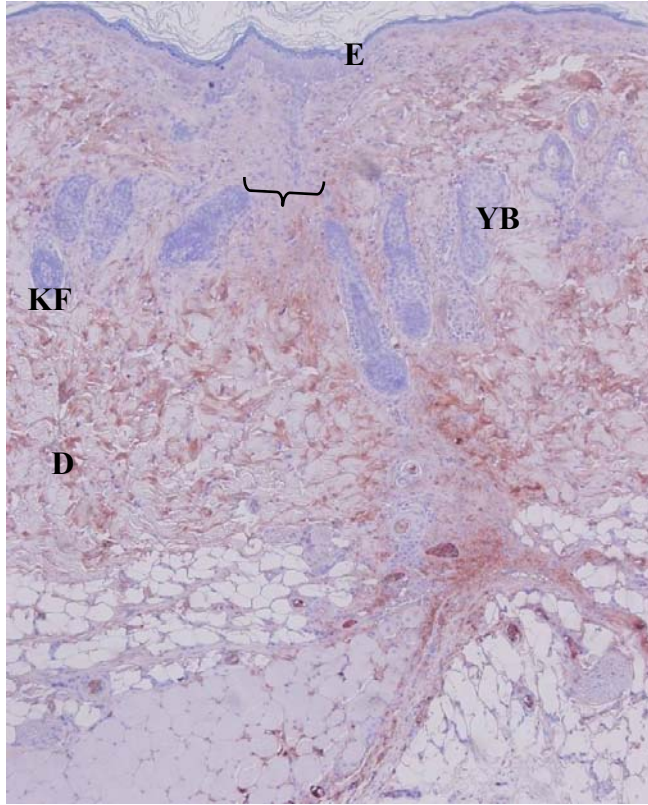


Şekil 81. Kontrol grubu 14 günde iyileşme alanında mast hücreleri (→). Dominiçi, X40.

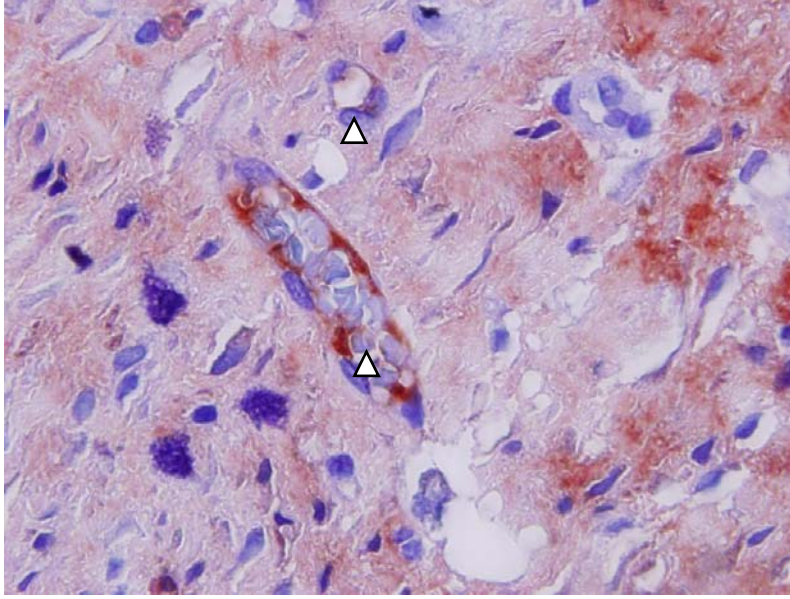
4. 8. 2. Kontrol Grubu 14 Günlük Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular

VEGF immüno lokalizasyonu epidermiste, kıl folliküllerinde ve yağ bezlerinde (Şekil 82) izlenmezken, granülasyon dokusu yerini skar dokusuna bırakmıştır. Skar doku içinde, kan damarları çevresinde (Şekil 79) zayıf izlendi.

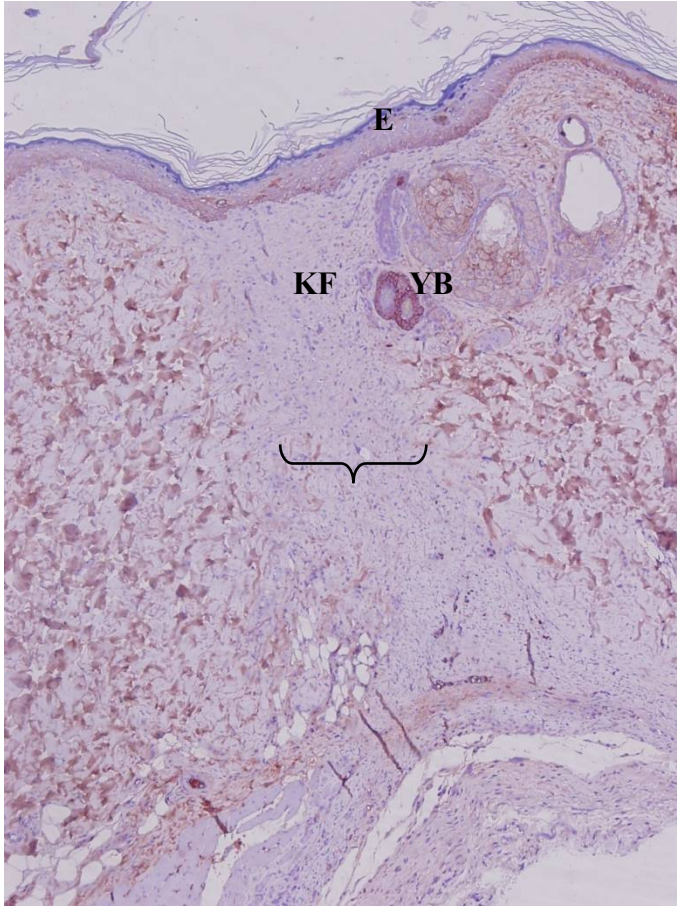
FGFR3 immüno lokalizasyonu, stratum bazale tabakasında, iyileşme alanındaki granülasyon dokusunda, kıl folliküllerinde az yoğun izlenmekteydi (Şekil 83, 84).



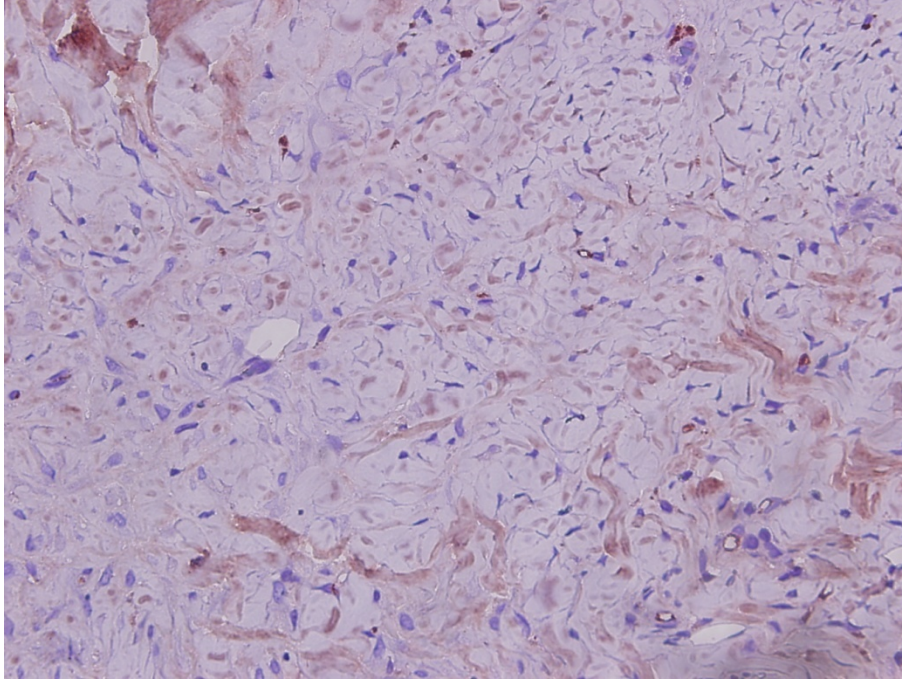
Şekil 82. Kontrol grubu 14 günde epitelde (E), dermiste (D), granülasyon dokusunda (), kıl folliküllerinde (KF), yağ bezlerinde (YB), VEGF immüno lokalizasyonu, X10.



Şekil 83. Kontrol grubu 14 günde kan damarında (Δ) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



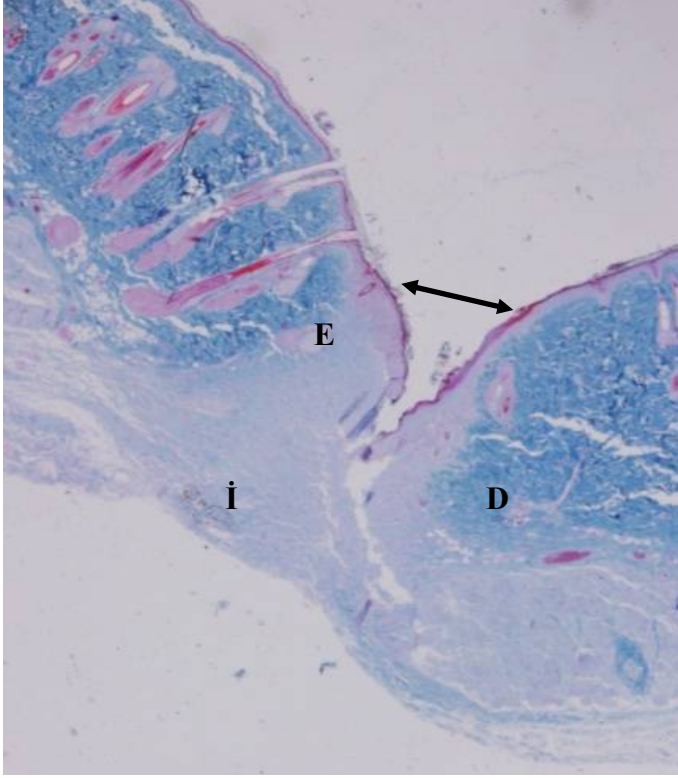
Şekil 84. Kontrol grubu 14. günde epitelde (E), granülasyon dokusunda (—), kıl follikülünde (KF), yağ bezinde (YB), FGFR3 immünolokalizasyonu, X20.



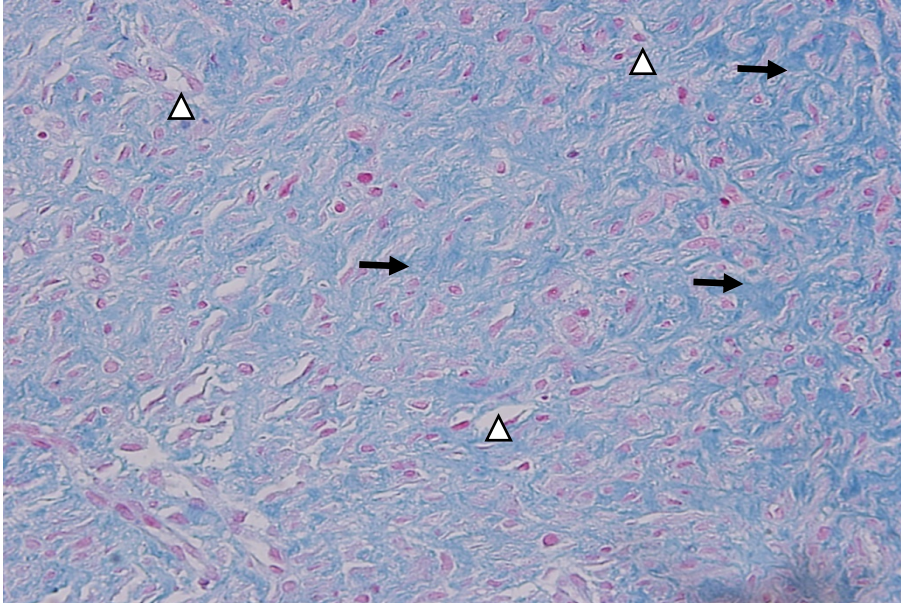
Şekil 85. Kontrol grubu 14. günde granülasyon dokusunda FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.

4. 9. 1. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol Grubu 14 Günlük Yara İyileşmesi

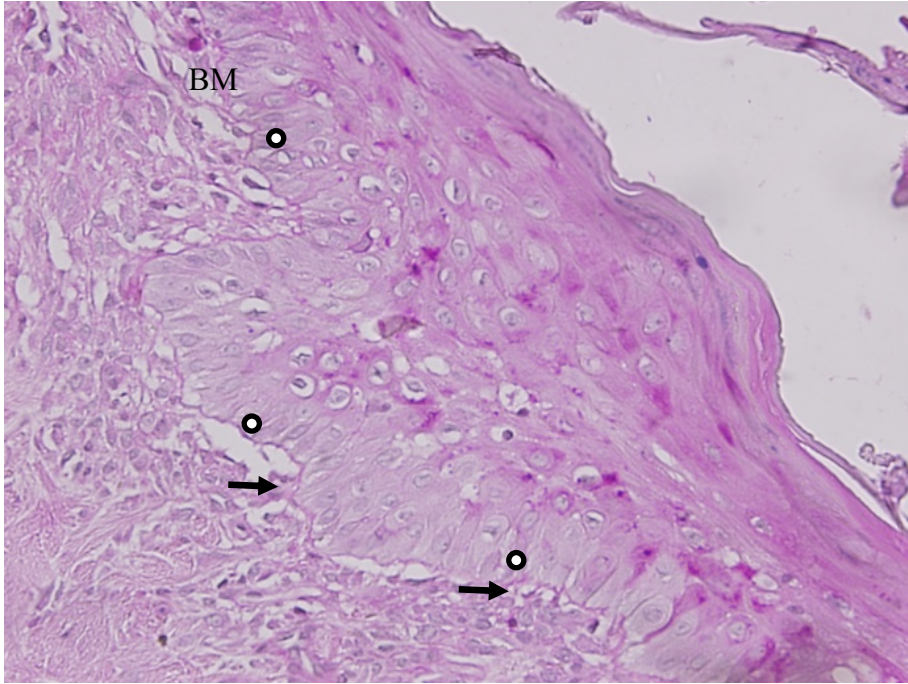
İyileşme süreci tamamlanmamış (Şekil 86 a, b), epidermis ve dermis birbirine yaklaşmamış ve iyileşme alanı granülasyon dokusundan zengin halde bulunmaktaydı. Granülasyon dokusu çevresinde dermiste, az, ince kollajen lif izlendi (Şekil 87). Epitel altında bazal membran ve stratum bazale hücreleri düzensiz gözlendi (Şekil 88). Papiller dermiste inflamatuvar hücreler çok (Şekil 89) ve retiküler lifler fazlaydı (Şekil 90). Mast hücreleri granülasyon dokusunun altında çok sayıda idi (Şekil 91).



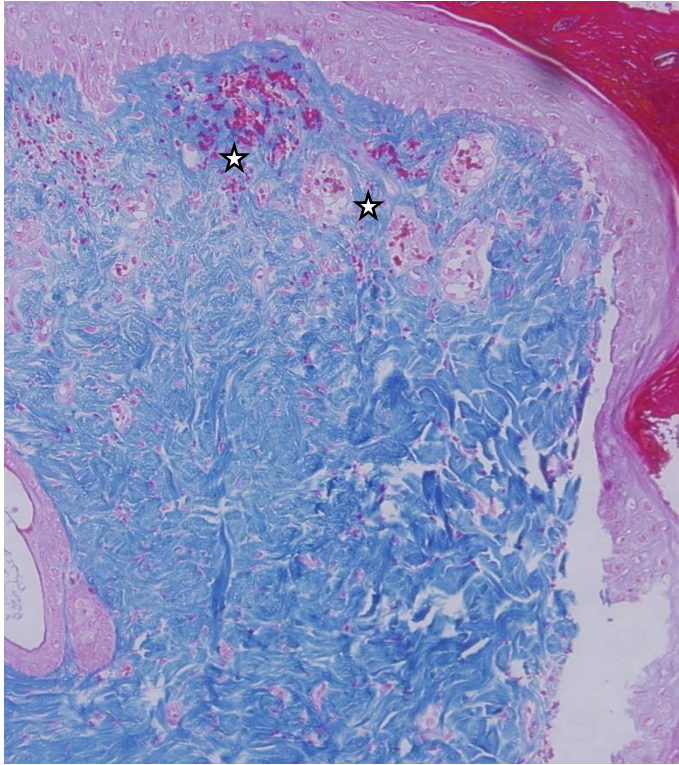
Şekil 86. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda yara alanı (↔), iyileşme alanı (İ), epitel (E), dermis (D). AT, X4.



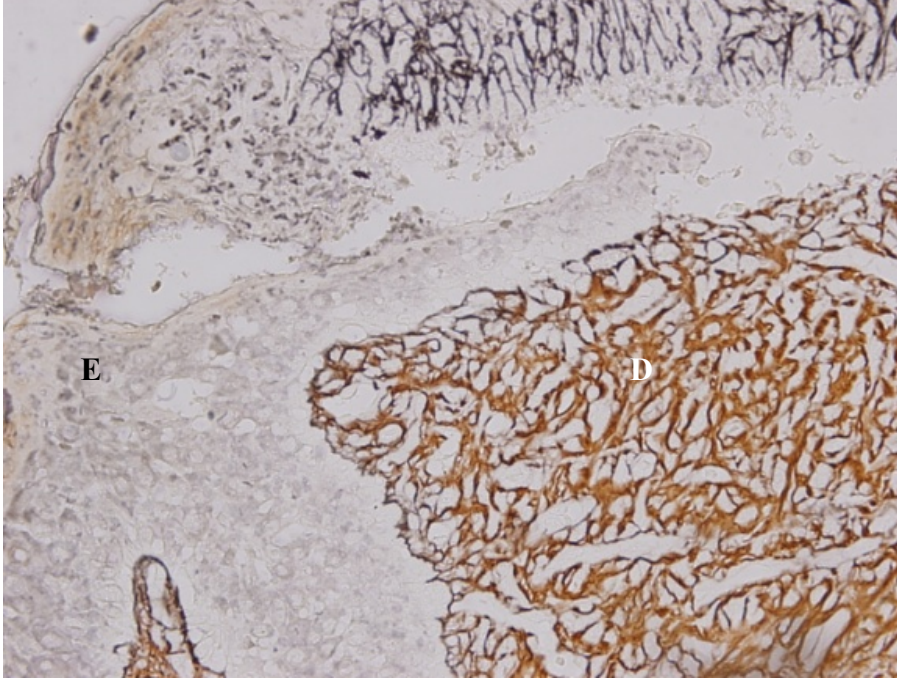
Şekil 87. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda granülasyon dokusu, kan damarları (Δ), kollajen lifler. AT, X40.



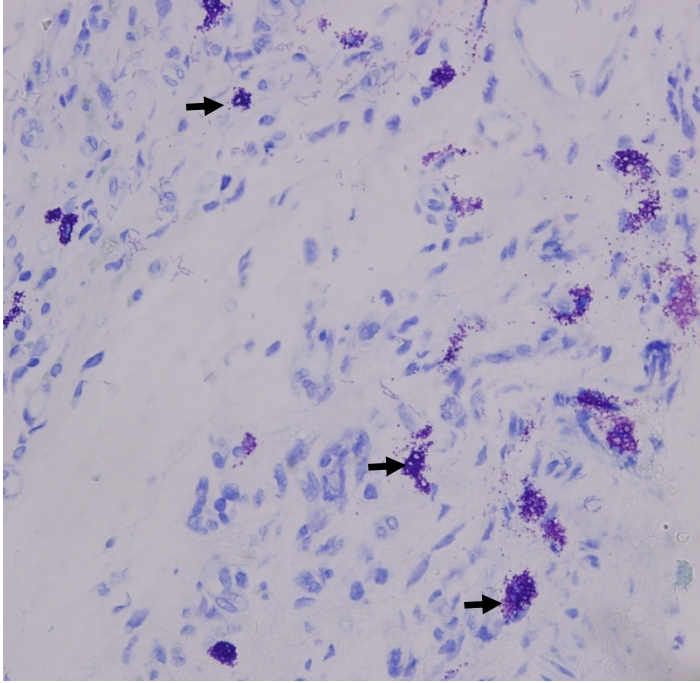
Şekil 88. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda bazal membran (BM) (→), stratum bazale hücreleri (●). PAS, X40.



Şekil 89. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda papiller dermiste inflamatuvar hücreler (☆). AT, X20.



Şekil 90. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda epitel (E), dermis (D) ve retiküler lifler. Gümüşleme, X100.

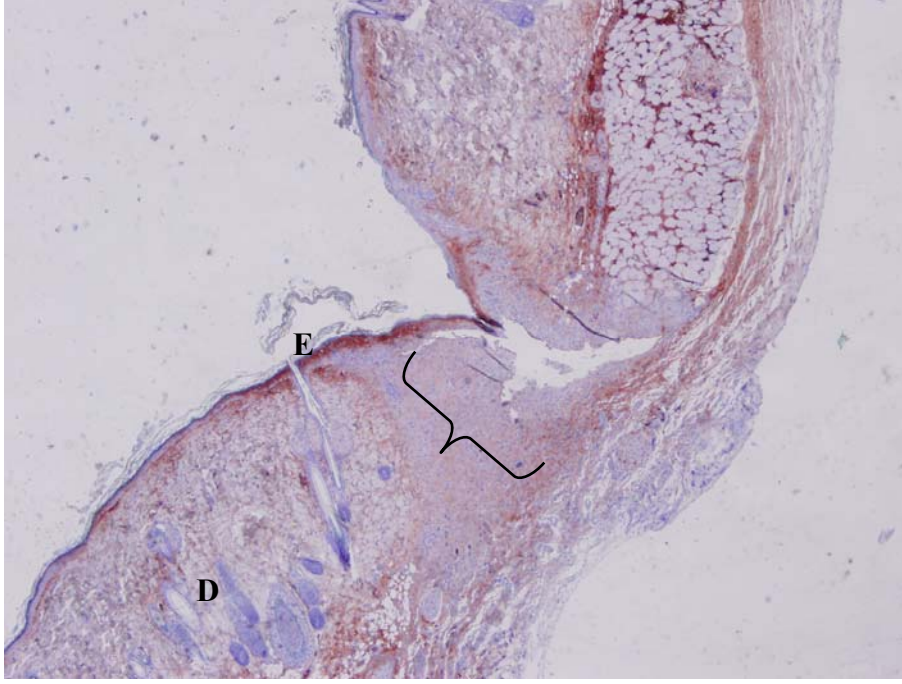


Şekil 91. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda iyileşme alanında mast hücreleri. Dominiçi, X40.

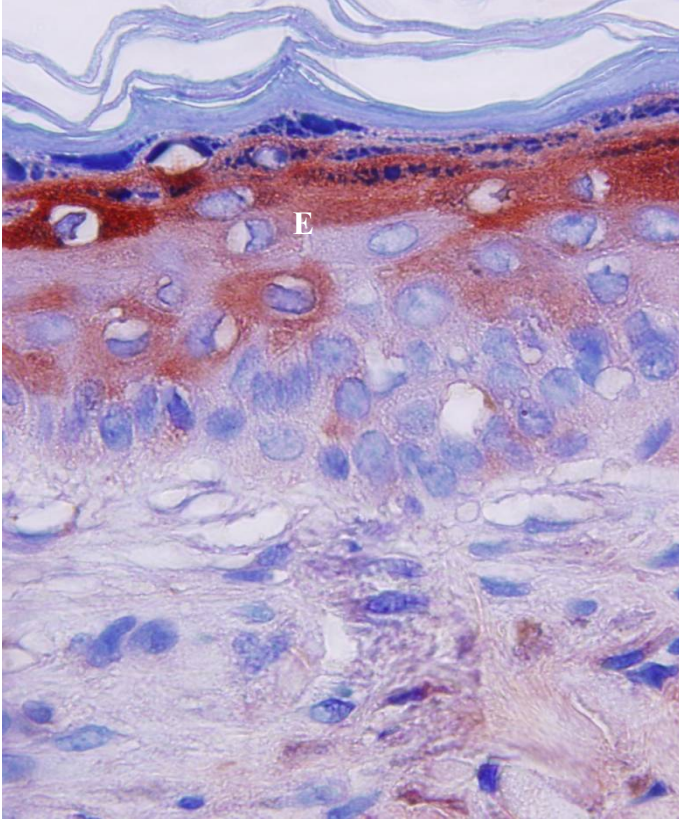
4. 9. 2. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 Günlük Grumlarda Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular

İyileşme süreci tamamlanmamış olan bu grubun yara alanına yakın epitelinde (Şekil 92, 93), iyileşme alanında (Şekil 94), yağ bezlerinde (Şekil 95), kan damarları çevresinde (Şekil 96) VEGF immüno lokalizasyonu yoğun izlendi.

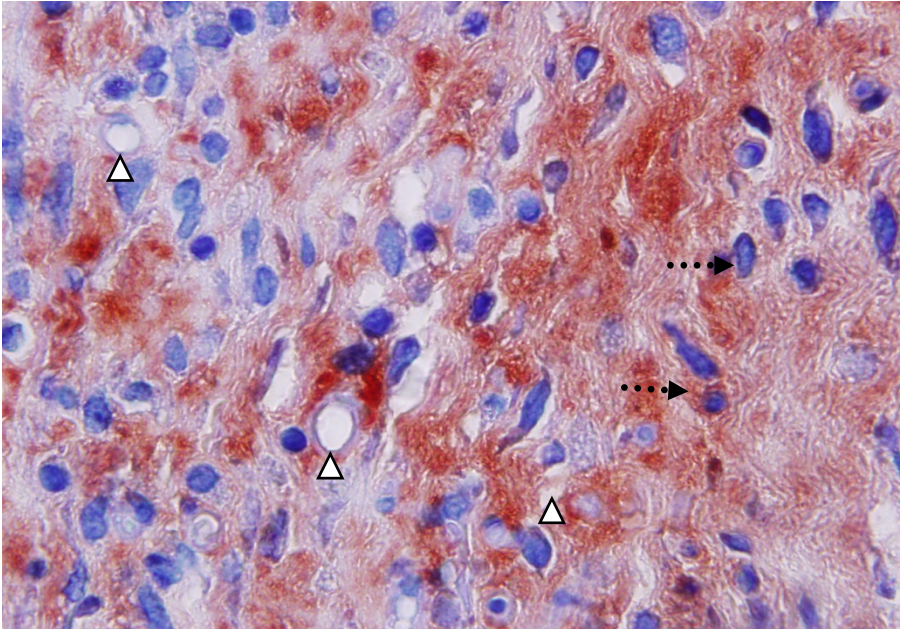
FGFR3 immüno lokalizasyonu, epitelin stratum bazale tabakasında (Şekil 97), iyileşme alanında granülasyon dokusunda (Şekil 98) orta yoğunlukta ve kıl folliküllerinde (Şekil 99) az yoğun izlendi.



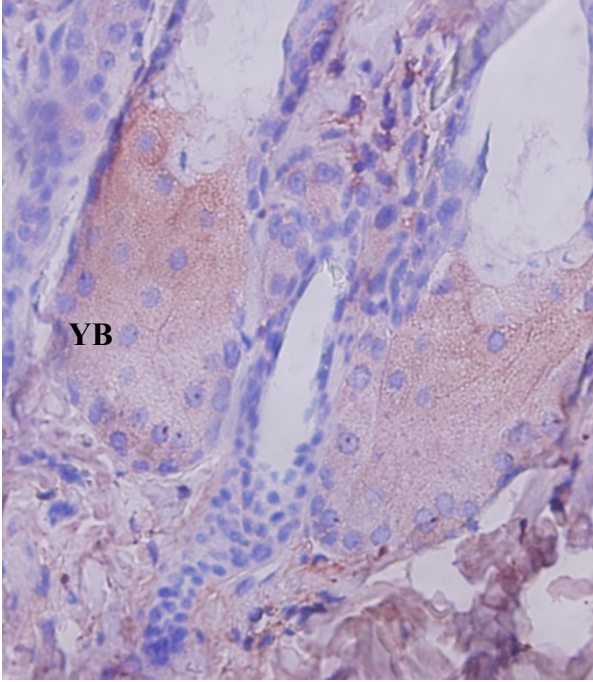
Şekil 92. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük grumlarda epitelde (E), dermiste (D), granülasyon dokusunda ({) VEGF immüno lokalizasyonu, X4.



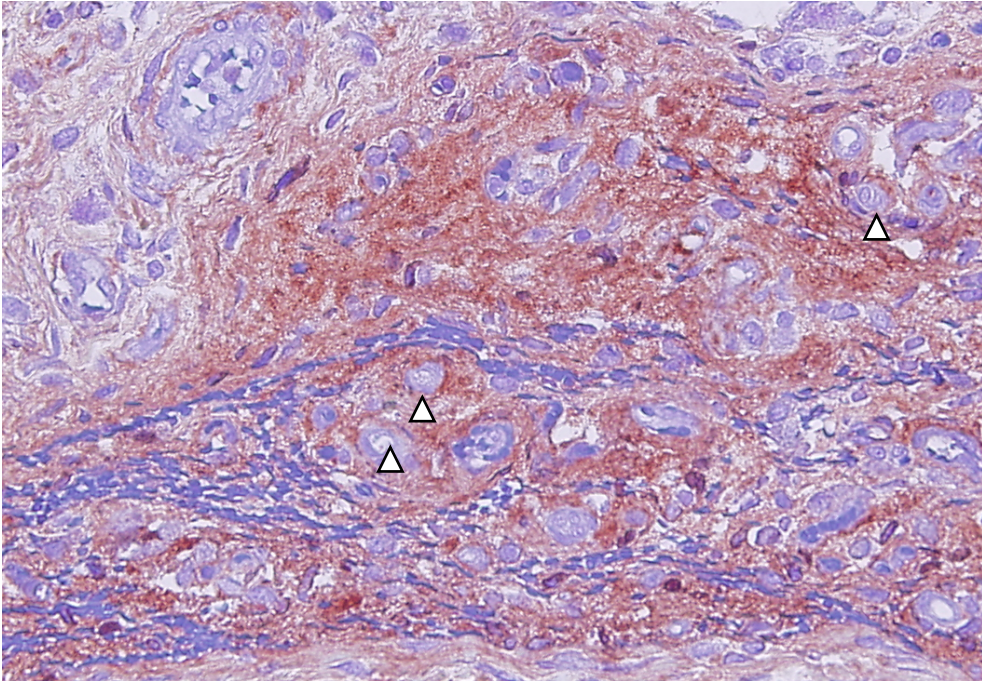
Şekil 93. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda yara alanından uzaktaki epitelde (E) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



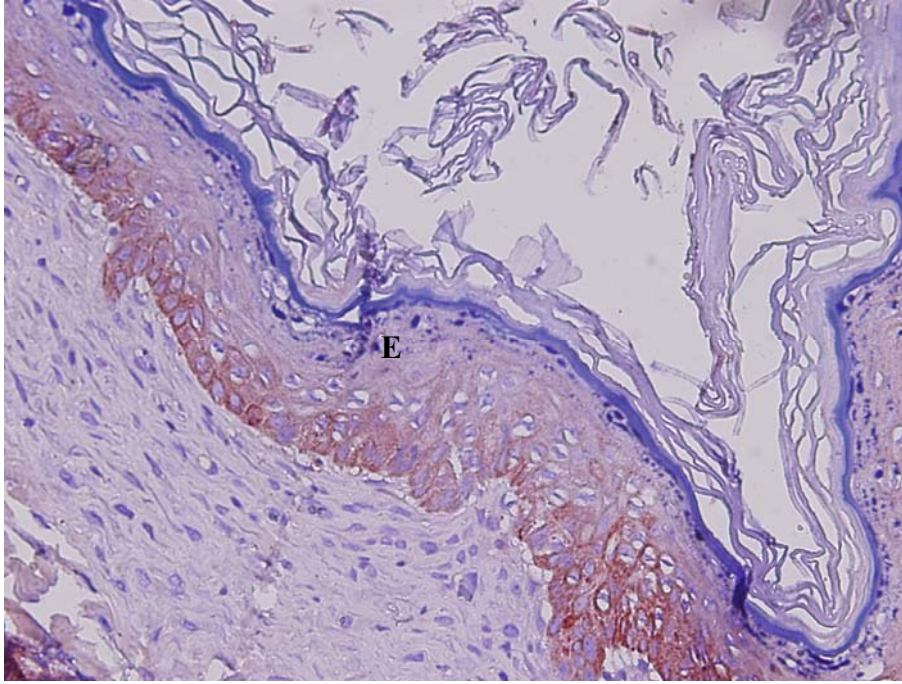
Şekil 94. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda, iyileşme alanında kan damarları (Δ) ve fibroblastlarda (•▶) VEGF immünolokalizasyonu, X100.



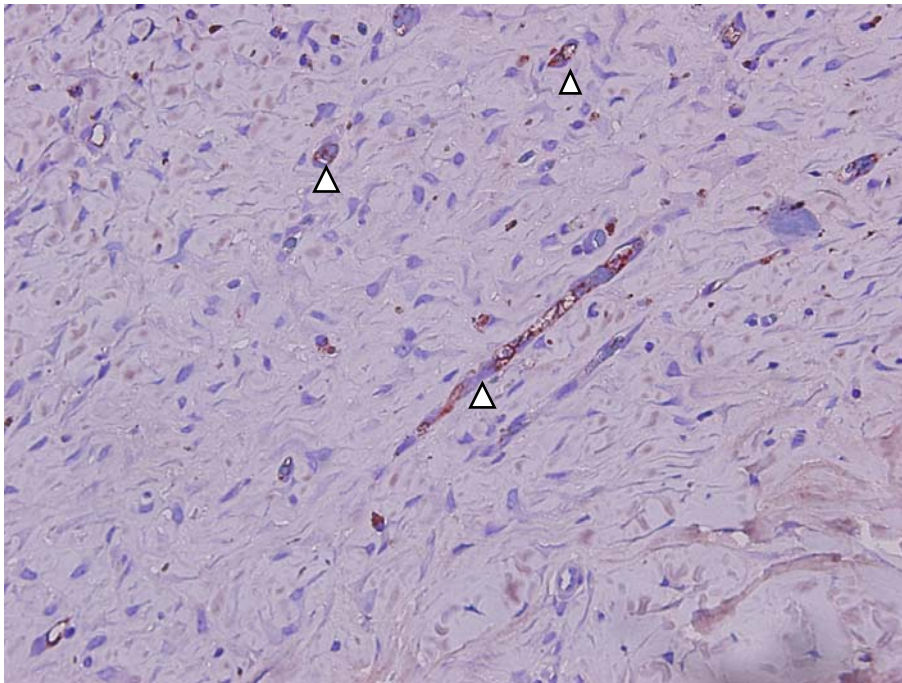
Şekil 95. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda yağ bezinde (YB) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



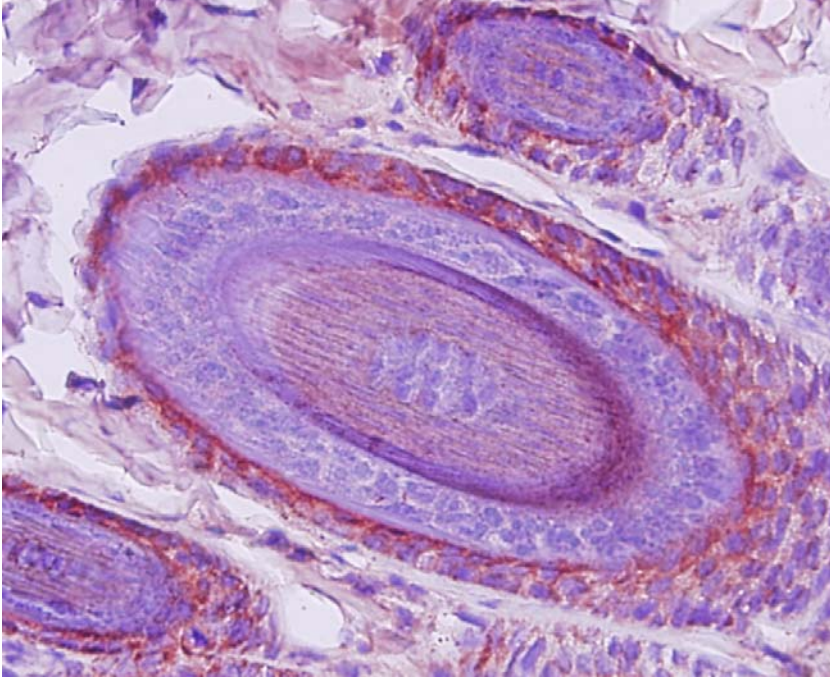
Şekil 96. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda granülasyon dokusundaki kan damarlarında (Δ) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 97. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda epitelde (E) FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



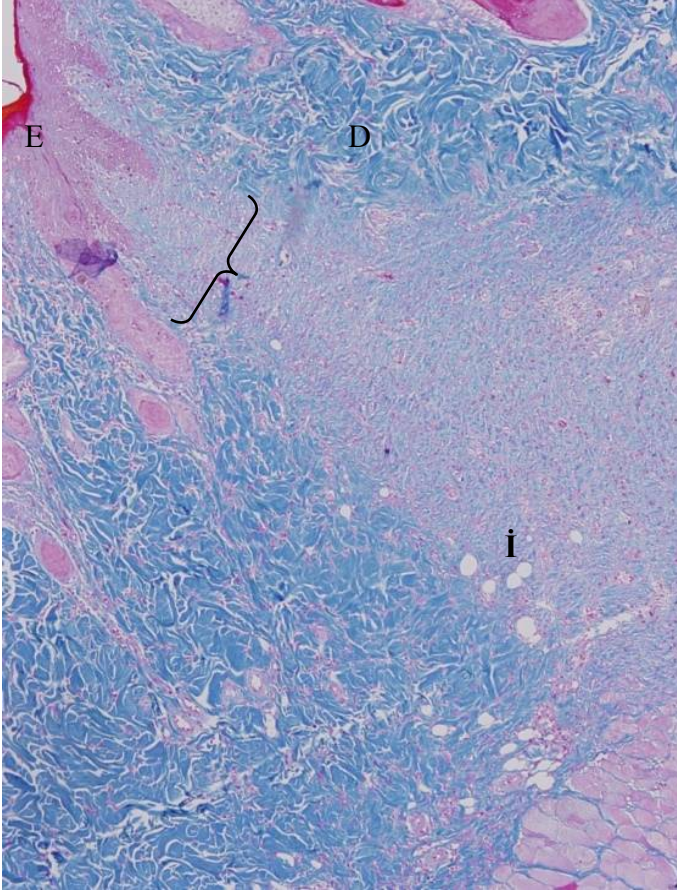
Şekil 98. Diabet+Asetikasıit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda granülasyon dokusu içinde kan damarlarında (Δ) FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



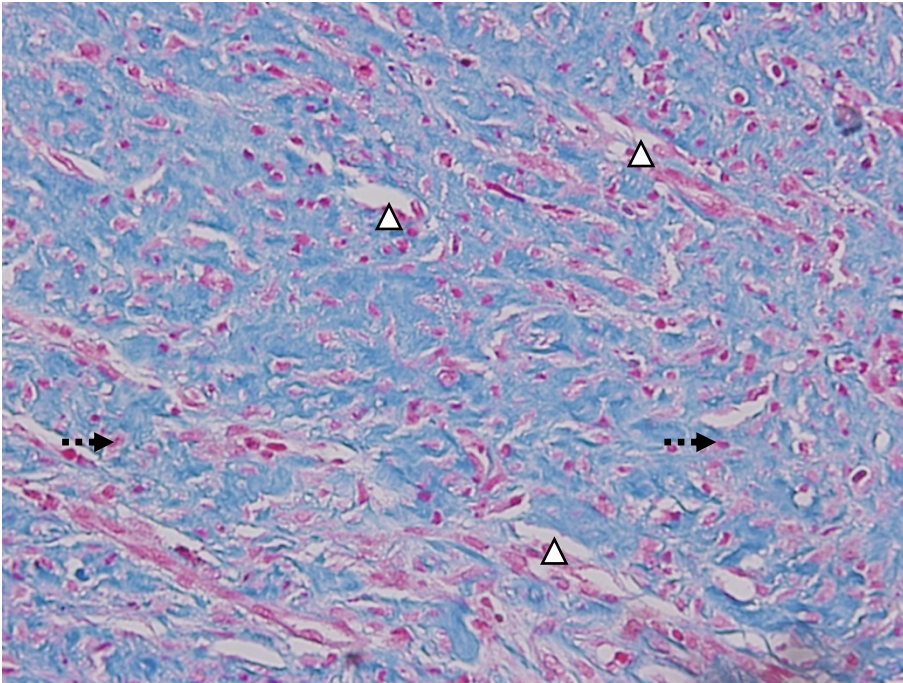
Şekil 99. Diabet+Asetikasit ve Diabet+Kontrol 14 günlük gruplarda kıl follikülünde FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.

4. 10. 1. Diabet+Kitosan Grubu 14 Günlük Yara İyileşmesi

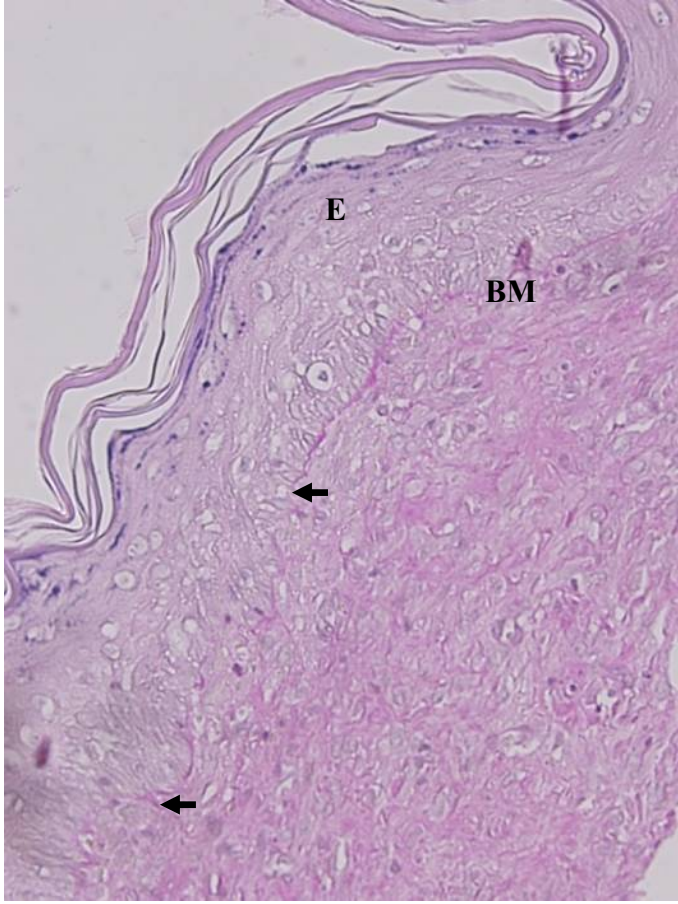
İyileşme süreci tamamlanmış, epidermis ve dermis birbirine yaklaşmış, epitel yenilenmesi tamamlanmış, iyileşme alanında granülasyon dokusunun yerini kollajen ve fibroblastlardan zengin skar doku almış halde izlendi. Skar dokusu çevresinde dermisin kalın kollajen lifleri, kan damarları görülmüyordu (Şekil 100, 101). Epitel altında bazal membran düzenli, stratum bazaledeki hücreler yüksek prizmatik şekilli gözlemlendi (Şekil 103). Papiller dermiste inflamatuvar hücreler (Şekil 102), retiküler lifler az sayıda görüldü (Şekil 104). Mast hücreler skar doku altında yerleşmekteydi (Şekil 105).



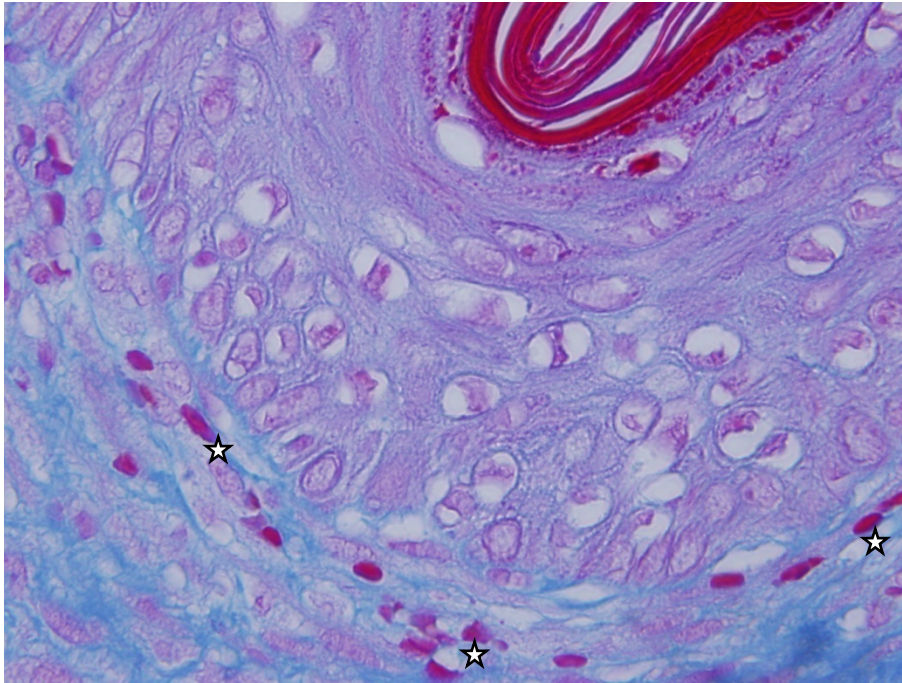
Şekil 100. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda iyileşme alanı (İ) skar doku (}), epidermis (E), dermis (D). AT, X10.



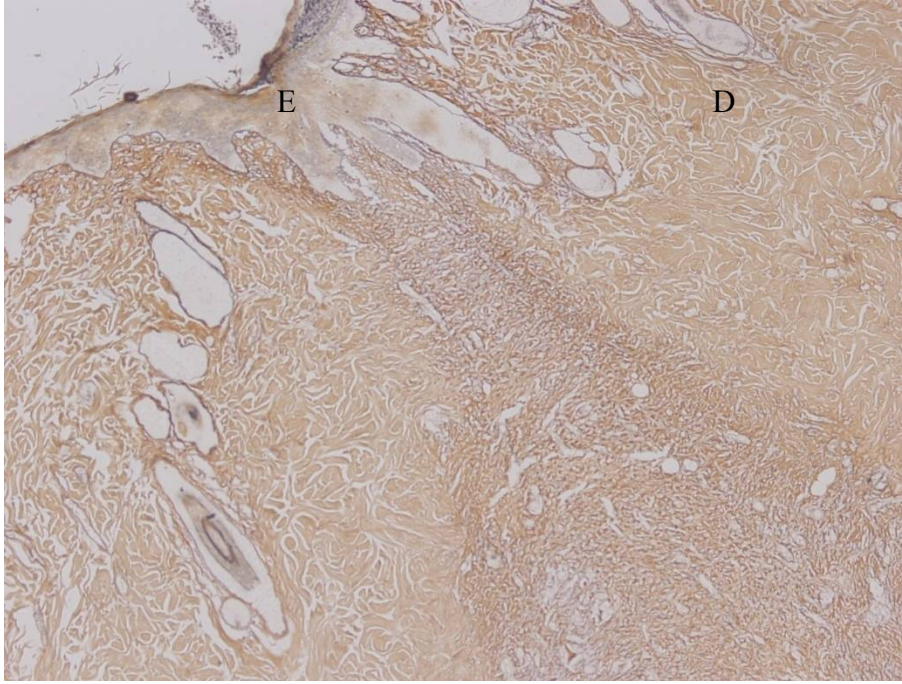
Şekil 101. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda skar dokusunda fibroblastlar (▪➔), kan damarları (Δ). AT, X40.



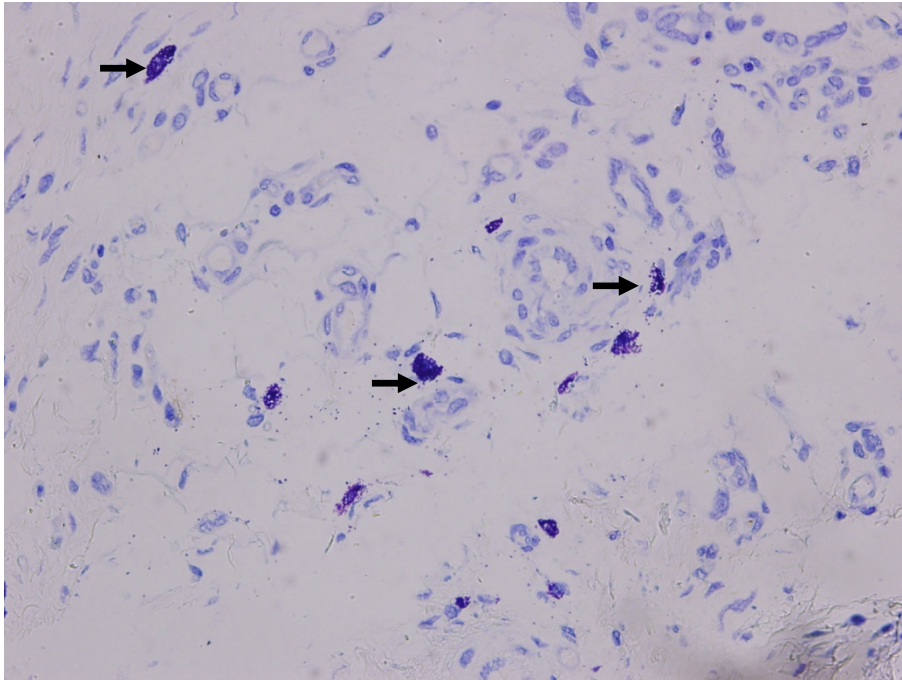
Şekil 102. Diabet + Kitosan 14 günlük grupta bazal membran (BM) (←). PAS, X40.



Şekil 103. Diabet + Kitosan 14 günlük grupta papiller dermiste inflamatuvar hücreler (☆). AT, X100.



Şekil 104. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda epitel (E), dermis (D) ve retiküler lifler. Gümüşleme, X20.

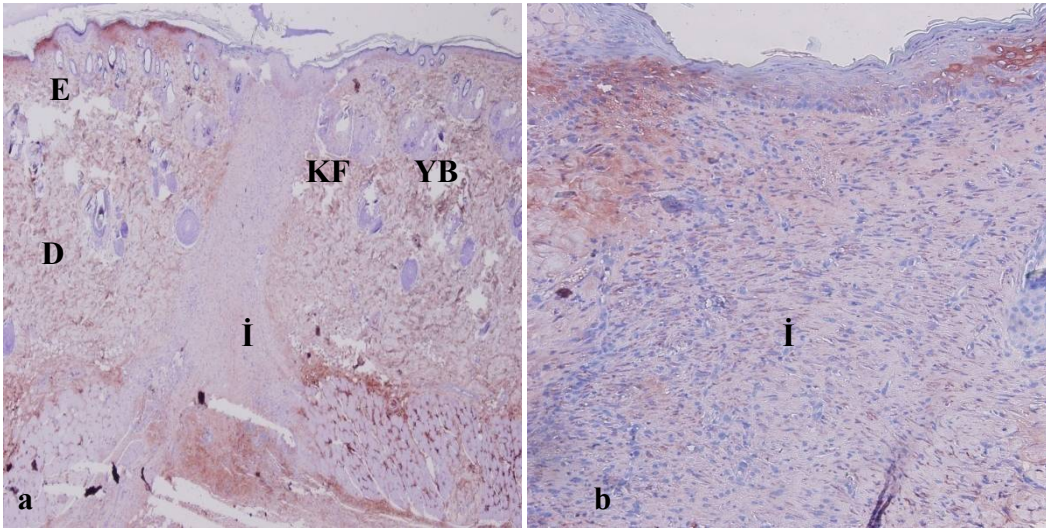


Şekil 105. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda mast hücreleri (→). Dominiçi, X40.

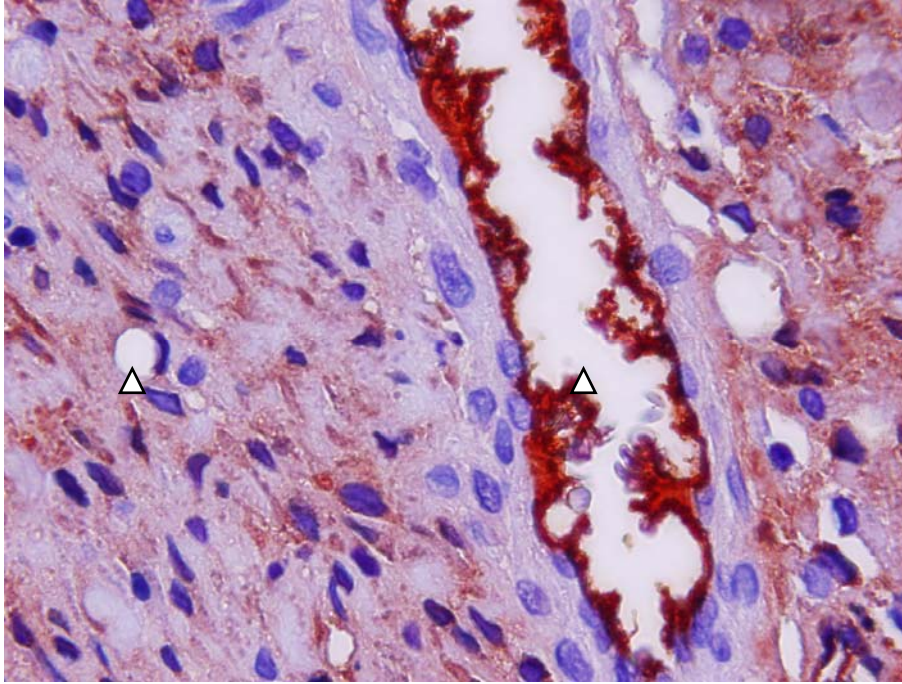
4. 10. 2. Diabet+Kitosan Grubu 14 Günlük Yara İyileşmesinde İmmünohistokimyasal Bulgular

İyileşmiş bölge üzerindeki epidermiste lokalizasyon izlenmezken, bu alana yakın epidermin stratum spinosum bölgesinde, granülasyon dokusu çevresinde yer yer VEGF immüno lokalizasyonları bulunuyordu (Şekil 106). Kıl folliküllerinde, yağ bezlerinde VEGF lokalizasyonu izlenmezken hipodermiste bazı kan damarlarında izlendi (Şekil 107).

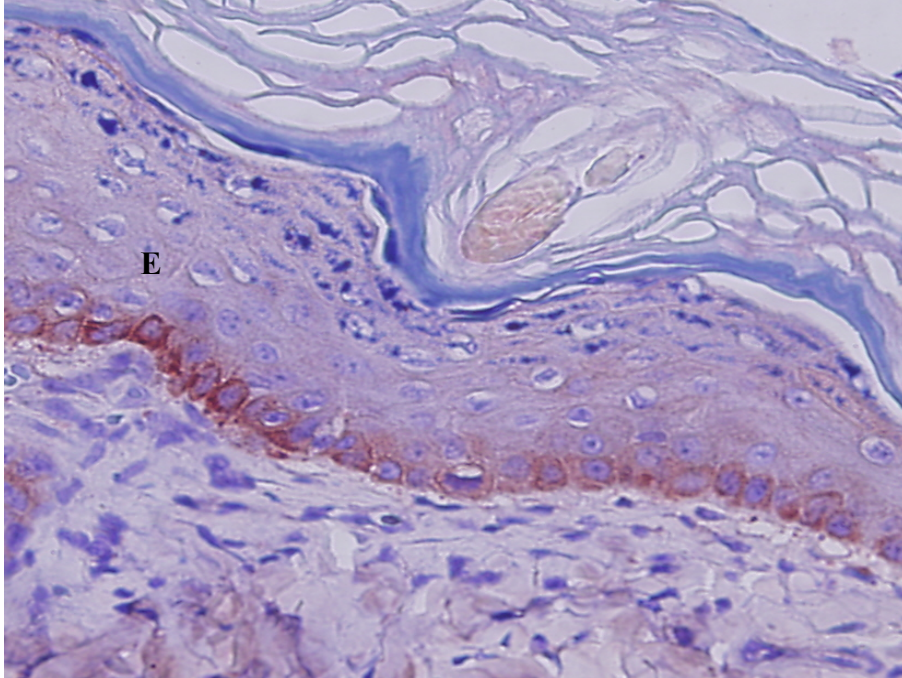
Tam olarak kapanmış epitelin sadece stratum bazalesinde FGFR3 lokalizasyonu izlendi. İnflamasyon alanında lokalizasyon görülmedi (Şekil 108, 109).



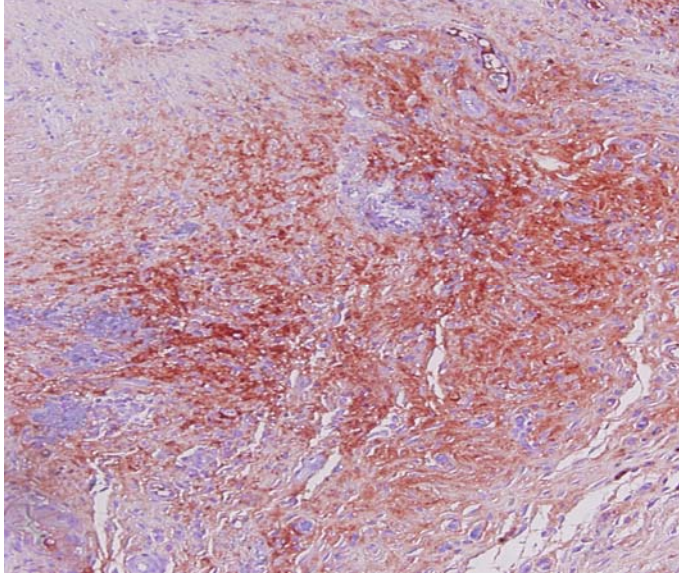
Şekil 106. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda iyileşmiş alanda (İ), epidermiste (E), dermiste (D), kıl folliküllerinde (KF), yağ bezlerinde (YB) VEGF immüno lokalizasyonu, a) X4, b) X10.



Şekil 107. Diabet + Kitosan 14 günlük grupta kan damarında (Δ) VEGF immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 108. Diabet + Kitosan 14 günlük grupta epitelin stratum bazale tabakasında FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.



Şekil 109. Diabet + Kitosan 14 günlük gruplarda skar doku altında FGFR3 immünolokalizasyonu, X40.

Çizelge 1. Deney gruplarının 3. 7. ve 14 . günlerde hisyokimyasal ve immünohistokimyasal olarak bulguların toplu olarak değerlendirmesi.

	3K	3DA-DO	3DC
Yara alanı genişliği	++++	+++++	++++
Skab	++++	++++	+++++
Reepitelizasyon	-	-	-
Bazal membran	-	-	-
Papiller dermiste inflamatuvar hücreler	+++	++	+++++
İyileşme alanında kollajen lifler, fibroblastlar	+++	++	+++
İyileşme alanında inflamatuvar hücreler	++++	++++	+++++
Anjiogenez	++	+	++
Granülasyon dokusu	-	-	+
Skar	-	-	-
Retiküler lifler	+++	+++++	+++
Mast hücreleri	++	+	+++

VEGF	3K	3DA-DO	3DC
GENEL LOKALİZASYON	++++	++	+++++

FGFR3	3K	3DA-DO	3DC
GENEL LOKALİZASON	++++	+	+++++

	7K	7DA-DO	7DC
Yara alanı genişliği	++	+++	++
Skab	+++	+++	++
Reepitelizasyon	++	+	++
Bazal membran	++	+	+++
Papiller dermiste inflamatuvar hücreler	+++	++	++++
İyileşme alanında kollajen lifler, fibroblastlar	+++	++	++++
İyileşme alanında inflamatuvar hücreler	++++	++++	+++
Anjiogenez	+++	+	+++
Granülasyon dokusu	+	-	+++
Skar	-	-	-
Retiküler lifler	++	+++	++
Mast hücreleri	++++	+++	+++++

VEGF	7K	7DA-DO	7DC
GENEL LOKALİZASYON	+++	+++	++++

FGFR3	7K	7DA-DO	7DC
GENEL LOKALİZASON	+++	+++	++

	14K	14DA-DO	14DC
Yara alanı genişliği	+	++	-
Skab	-	+	-
Reepitelizasyon	++++	+++	+++++
Bazal membran	++++	+++	+++++
Papiller dermisde inflamatuvar hücreler	+	++	-
İyileşme alanında kollajen lifler, fibroblastlar	+++++	+++	+++++
İyileşme alanında inflamatuvar hücreler	+	+	-
Anjiogenez	+++++	+++	+++++
Granülasyon dokusu	++	+++++	+
Skar	++++	-	+++++
Retiküler lifler	+	++	+
Mast hücreleri	+++	++	++++

VEGF	14K	14DA-DO	14DC
GENEL LOKALİZASYON	++	++++	++

FGFR3	3K	14DA-DO	14DC
GENEL LOKALİZASYON	++++	+++	++++

+++++ çok yoğun, ++++ yoğun, +++ orta, ++az, + çok az

5. TARTIŞMA

Diabet dünya nüfusunun önemli bir kısmını etkileyen kronik metabolik bir hastalıktır. Pankreasın insülin yetersizliği ve/veya dokuların insülin cevabının bozulmasıyla oluşan protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarını etkileyen bir hastalıktır (19, 158, 162). Diabetli insan sayısı; nüfus artışı, yaşlanma, kentleşme, fiziksel aktivite ve obezite sıklığının yükselmesi gibi faktörlere bağlı olarak artmaktadır. Diabet sıklığındaki artışla birlikte, diabetin tüm komplikasyonlarının sıklığı da artmaktadır (22-25). Diabetli hastalarda ortaya çıkan ciddi komplikasyonlardan birisi de bozulmuş yara iyileşmesidir (162, 163).

Yara iyileşmesi esas olarak hemostaz - inflamasyon, yeni doku oluşumu ve yeniden modellenme olmak üzere 3 ana olay çevresinde gerçekleşir (45-47, 52, 54). Olaylar, ardışık bir düzen içinde değil, birbiri içerisine girmiş, sınırları tam olarak ayırt edilemeyecek şekilde gerçekleşir. İnflamasyon süreci yaralanmadan 48 saat sonraya kadar sürer. Yara, bir fibrin tıkaçla kapatılmış olan hipoksi (iskemi) durumu ile karakterizedir. Bakteri, nötrofil ve trombositler yarada bol miktarda bulunur. Normal deri ekleri (kıl follikülleri ve ter bezleri) yara alanı dışında yer alır. Yeni doku oluşum süreci yaralanmadan sonra 2-10 gün kadar devam eder. Yara yüzeyinde bir yara kabuğu (escar, scab) oluşur. Pek çok hücre, bir önceki fazdan yaraya doğru göç eder ve artık yeni kan damarları da bu alanda görülmeye başlar. Yeniden modelleme (remodelling) fazı bir yıl veya daha fazla sürebilir. Organizasyonu bozulmuş kollajenler yara alanına göç eden fibroblastlar tarafından oluşturulur. Yara kendine yakın yüzeyi kasar ve artık yara daha derinlerdedir. Yara epitelinin yeniden oluşmasıyla tamir edilen bölge çevredeki yara olmayan bölgelere göre daha yukarıdadır ve iyileşmiş alan normal deri eklentilerini içermez (42).

Hemostazi ve inflamasyon, yeni doku oluşumu (granülasyon doku oluşumu, anjiogenez, epitelizasyon) ve yeniden modelleme gibi normal yara tamir süreçleri için ihtiyaç duyulan moleküler ve hücrel sinyallerde diabete bağlı olarak meydana gelen eksiklik, yaraların iyileşme sürecini negatif yönde etkiler (3, 15, 164, 165). Sitokinler, özellikle de çeşitli büyüme faktörleri normal iyileşme süreci için gerekli

moleküler ve hücrel sinyalleri sağlar ancak diabetik yaralarda etkileri daha azdır (3, 15, 162, 164).

Diabetik yaraların tedavisindeki zorlukların üstesinden gelebilmek amacıyla, tedavi olanaklarını incelemek için deney hayvan modelleri geliştirilmiştir. Çok çeşitli deneysel diabet modelleri vardır. En çok tercih edilen Streptozotosin ve Alloksan'ın kullanıldığı yöntemlerdir. Beta hücre yıkımı ile insanlardaki tip I diabet'e benzer şekilde diabet oluştururlar (4, 29-33). Streptozotosin, Langerhans adacıklarının β hücreleri için özgün toksik etki gösteren bir maddedir (4, 29, 30-33, 158). Streptozotosinin sıçan, fare, hamster, köpek, kuzu ve maymunlarda diabet yapıcı etkisi gösterilmiş ve β hücrelerine etkisinin alloksan'dan daha kuvvetli olduğu bilinmektedir (166). Biz de çalışmamızda pH=4.5, 0.1 M sitrat tamponda (158, 167) çözülmüş streptozotosin (STZ), 60 mg/kg (15, 168) intraperitoneal tek doz olacak şekilde uyguladık. Kontrol grubuna ise sadece pH=4.5, 0.1 M sitrat tampon uygulandı. Deney öncesi sıçanlar bir gece aç bırakıldıktan sonra kan şekerleri ölçülerek, kan glikoz değeri 80-110 mg/dl olanlar normal kabul edildi ve streptozotosin enjeksiyonundan 24 saat sonra kan şeker seviyelerine bakıldığında 250 mg/dl olanlar diabetli kabul edilerek deneye dahil edildi (165). Deneysel diabet oluşturulduktan sonra sıçanların sırt derilerine tam kat kesi (161) oluşturuldu.

Günümüzde diabetik yara iyileşmesine yardımcı pek çok biyomateryal kullanılmaktadır. Kitosan bunlardan birisidir ve kitosan; kitin maddesinden elde edilebilen doğal bir polimerdir. Doğada selülozdan sonra en çok bulunan protein olan kitin, deniz kabuklularının ve mantarların hücre duvarında yer alır (139). Kitosan, kristalin yapıda bir amino-polisakkarit olup pH:7'nin üstünde suda çözünmez yapıdadır. Bununla beraber, seyreltik asitlerde (pH<6), serbest amino grupları proton kazanır ve kitosan suda çözünebilir. Bu pH bağımlı çözünürlük, kitosana kolay işlenebilme özelliği sağlamaktadır (118). Herhangi bir toksisitesinin bulunmaması, alerji ve iritasyon yapıcı olmaması, biyoparçalanabilir ve biyoyumlu olması farmakoloji ve medikal alanda kitosanı önemli ve vazgeçilmez bir biyomateryal yapmaktadır. Kitosan aynı zamanda önemli biyoaktif özelliklere sahiptir. Bunlardan bazıları, hemostatik, antibakteriyel, antifungal, yara iyileşmesini hızlandırıcı, kemik iyileşmesini hızlandırıcı ve immün sistem uyarıcı olmasıdır. Biyoparçalanabilir ve

biyoadeziv bir polimer olan kitosan, toksik, iritan ve alerjik değildir (120, 121). Kitosan pek çok hazırlama şekline sahiptir (125). Çalışmamızda hazırlama ve kullanım kolaylığı açısından jel formu tercih edilmiştir.

Yara iyileşmesinin ilk aşaması hemostaz ve inflamasyondur. Hemostaz, birbirini takip eden, karmaşık bir mekanizmadır. Yaralanmadan 1-2 saniye sonra zedelenen damarda vazokonstriksiyon ile kan akımı yavaşlar. Dolaşımdaki trombositler, endoteldeki hasarı, reseptörleri aracılığı ile fark eder ve damar endoteline yapışır. Trombositlerin granüllerinden salınan faktörlerle şekil değişimi meydana gelir ve küme oluşturabilme özelliği belirginleşir. Bundan sonra inaktif pıhtılaşma proteinleri aktif hale gelir ve bir dizi olayı başlatır. Fibrinojen fibrine dönüşerek pıhtı oluşur. Pıhtı daha sonra trombositlerin ve endotel yardımıyla ortadan kaldırılır (169). Diabette endotel hücrelerinde, trombositlerde, makrofajlarda, bunlardan salınan büyüme faktörlerinde, fibrin yapıda, lipid ve glikoz metabolizmasındaki bozukluklar yara iyileşmesinin ilk aşamasını etkilemektedir (8, 13, 170). Yara iyileşmesinin ilk aşamasında trombositler skab (yara kabuğu) oluştururlar (42). Çalışmamızda 3. günde kontrol, diabet+kontrol, diabet+asetik asit gruplarında, histolojik olarak skab dokusu izlenmemiştir. Bu gruplarda 7. günde skab dokusu izlenmeye başlanmıştır. Diabette hemostazi sürecinde trombositlerin ve endotel hücrelerinin fonksiyonundaki değişimden kaynaklı olarak skab dokusu oluşumu da gecikmiş olabilir. Diabetik yara iyileşmesinin ilk evresindeki eksiklikleri anlayabilmek için yapılan deneysel çalışmalar, büyüme faktörlerinin eksikliğini ortaya koymaktadır. Damarlardan yeterli kanlanma sağlanamamakta, böylece yeterince trombosit yara alanına gelememekte, yapısındaki anormallikler nedeniyle trombositler yara alanında toplanamamakta ve fibrin tıkaç oluşmamaktadır. Diabetli hastaların %98'inde kapiller endotelinin bazal membranının sertliği yüzünden damar genişletici cevap bozuktur (11). Bu sertleşmenin sebebi protein glikolizasyonudur (11, 170-172). Kitosan uyguladığımız grupta ise, skab dokusu 3. günden itibaren belirgin biçimde izlenmiştir. Bu bulgu bize kitosanın, yara alanına trombositleri ve endoteli aktive eden büyüme faktörlerini hızla çektiğini böylece skab dokusunu oluşturarak yarayı kapattığını düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar hemostatik mekanizmada kitosanın eritrosit hücre membranı ile etkileştiğini bildirir (121).

Epoprostenol ile indüklenerek trombosit fonksiyonu engellenen tavşanların dillerinde yapılan kesiklerde kitosan uygulanan grupta, kitosan içermeyen çözelti uygulanan gruba göre kanama zamanında azalma olduğu gösterilmiştir (173). Heparin verilmiş ratlarda ve köpeklerde mikrokristal kitosan çabuk ve güvenli bir arteriyel hemostazis sağlamıştır (174). Foto çapraz bağlanabilen kitosan çözeltisine UV radyasyon uygulanmasıyla hazırlanan hidrojelin farenin kesik kuyruğunda kanamayı tamamen durdurduğu gösterilmiştir (17). Kitosanın kanın pıhtılaşmasını arttırıcı etkisi kitine göre daha belirgindir buna karşın, kitinin trombositleri bir araya getirme özelliği kitosandan daha fazladır. Kan pıhtılaşma zamanının kitosan tarafından kısaltılmasının nedeni trombosit ve eritrositlerin bir araya toplanmasıdır. Kitin ve kitosan, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan trombosit kökenli büyüme faktörü-AB (PDGF-AB) ve TGF- β 1'in salınımını arttırmaktadırlar. Kitin ve kitosan, köpek kanında pıhtılaşma zamanını doza bağımlı olarak azaltmıştır (150). Tavşan trombosit süspansiyonlarında kitosanın trombosit tutunmasını, bir araya gelmesini etkin bir şekilde artırdığı gösterilmiştir. Kitosan bu etkisini, hücre içi serbest kalsiyumun artışı, trombosit membran yüzeylerine GPIIb/IIIa (platelet glikoprotein IIb/IIIa) ekspresyonunu ve mobilizasyonunu artırması yoluyla sağlamaktadır (175). Kitosana sülfat ve karboksil grupları eklendiğinde heparine benzer bir özellik gösterdiği ve antikoagülan etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (176-178).

Bazal membran pek çok hastalıkta temel olayların görüldüğü bölgedir. Bazal membranın temel fonksiyonu epidermis ile dermis arasındaki bağlantıyı sağlamak, çok katlı epidermis hücreleri ile dermisi birbirinden ayırmak aynı zamanda seçici permeabilite bariyeri oluşturmaktır. Derinin yapısal açıdan en karmaşık bölgesi olan bazal membranda tip IV kollajen, laminin, nidojen ve heparan sülfat bulunur (179). Bazal membran vücuttaki en büyük epitelyomezenkimal bileşke olup, epidermis ve dermis arasında çok geniş bir yüzey sağlar. Bu bileşkenin başlıca hücresi bazal keratinositlerdir. Bu hücreler, keratin 5 ve 14 içeren tonofilamentler aracılığıyla hemidesmozomlara bağlanır. Hemidesmozomlar bazal membran boyunca aralıklı olarak bulunurlar. Membran kalınlaşmasından sorumlu görünmekle birlikte oldukça karmaşık bir yapıya sahiptirler. Bazal membran yapısında bulunan yoğun nötral polisakkaritler nedeniyle, PAS pozitif boyanma gösterir (180). Bazal membran

lamina lusida, lamina densa, lamina fibroretikularis olmak üzere üç tabakadan oluşur. Lamina lusida 20-40 nm kalınlığında, en zayıf bölgedir. Laminin 1, fibronektin, tip 5 kollajen ve nidojen içerir (180-182). Lamina densa yoğun bir tabakadır. Tip IV kollajen yoğun olmak üzere, ankring fibrillerin temel bileşkesi olan tip VII kollajen bulunur. Lamina densadan başlayarak üst dermise kadar uzanır ve burada ankring plakları oluşturur. Bu tabakadaki bir diğer yapı elastik mikrofibrillerdir. Epidermis ve dermis arasındaki bağlanmada ankring fibriller ve elastik mikrofibriller rol oynamaktadır (182-184). Diabetik hayvanlarla yapılan çalışmalarda bazal membranın önemi belirtilmiştir. Deneysel diabet oluşturulmuş ratlarda kornea epitel hücrelerinde ve bazal membranda değişimler gözlenmiştir. Streptozosin enjeksiyonundan 1 ay sonra bazal epitelde glikojen granüllerinde herhangi bir artış ve bazal membranda da bir değişim izlenmemiştir. Ancak 8 ay sonra bazal epitelin glikojen granüllerinde artış ve bazal membranda kalınlaşma izlenmiştir (185). Bizim çalışmamızda tüm gruplarda bazal membranda kalınlaşma izlenmedi. Bunun nedeni deneysel diabet ile yara iyileşmesi çalışmasının iki hafta sürdürülmesi ve bu sürenin bazal membranda kalınlaşma olması için yetersiz bir süre olması olabilir. Başka bir çalışmada ise STZ ile diabet oluşturulmuş ratlarda, bazal membranda bulunan hemidesmozomlarda azalma, hiperglisemi nedeniyle bazal membranın ECM içeriğinin biyokimyasal bileşenlerinde değişiklik histolojik olarak gösterilmiştir (186). Çalışmamızda kitosan uygulanmamış diabetli gruplarda, yara alanına yakın epitelin altında bazal membranda kontrole göre daha düzensiz bir yapı izlenmiştir. Epidermis ve dermis birbirinden ayrılmış halde idi. Kitosan uyguladığımız diabetli gruplarda ise yara alanına yakın bölgedeki bazal membranda, çok daha düzenli bir yapı izlenmektedir. Diabette hiperglisemi bazal membranın ECM bileşenlerinde değişime neden olduğu için epidermis-dermis bütünlüğü sağlanamıyor olabilir. Kitosan bazal membranın bileşenlerinden biri olan tip IV kollajen oluşumunu aktive etmektedir. Sato ve ark. (171) korneada yara iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışmada kriyostat kesitlerde immünfloresan tekniği ile bazal lamina proteinlerinin üretimini incelemişler ve kontrol grubuna göre diabetlilerde tip IV kollajen oluşumunun geciktiğini ve düzensiz olduğunu göstermişlerdir.

Yara iyileşme sürecinde kollajen lif sentezi sırasında iyileşmenin ilk aşamalarında oluşan lifler, tip III kollajen bakımından zengin iken ilerleyen evrelerde liflerin olgunlaşması ile tip III kollajen yerini tip I kollajene bırakır. Rapor edilen bir çalışmada yaralanma sonrası sentezlenen tip I ve tip III kollajen oranları belirlenmiştir. Bulgular tip III kollajen sentezinin yaralanmayı takiben ilk 10. saatte başladığını ve 24. saatten sonra üretimin normal derideki düzeyine indiğini belirtmiştir (187). Çalışmamızda tip III kollajen belirteci olarak gümüşleme boyası kullanılmıştır. Diabet+kontrol, diabet+asetik asit ve kontrol grubunda yara iyileşmesinin 3. gününden itibaren retiküler lifler açısından fark gözlenmedi. Ancak 7. günden itibaren kontrol grubunda çok belirgin retiküler lif birikimi izlenmiştir. Bu bulgu da diabetin yara iyileşmesini geciktirdiğini düşündürmektedir. Diabetlilerde kollajen liflerin üretimindeki eksiklik, yara bölgesinde yetersiz büyüme faktörlerinin bulunması, fibroblastlarda apoptosisin artması (10, 188), bu hücrelerin çoğalma kapasitelerinin azalması ya da kollajen sentez kapasitelerinin yetersiz olması gibi birçok faktöre bağlanabilir. Darby ve ark.'nın (10) genetik açıdan diabetli sıçanlar üzerinde yaptıkları yara iyileşmesi çalışmasında, BrdU (Bromodeoxyuridine) ile işaretlenmiş fibroblast hücrelerinin az sayıda olduğu bildirilmiştir. Ayrıca TUNEL metodu kullanılarak hücrelerde apoptosisin arttığı ve bu bulgulara bağlı olarak prokollajen I üretiminin azaldığı rapor edilmiştir. Liu ve ark. (188) yaptıkları çalışmada TUNEL metodu ile belirlenen apoptosisin ve apoptosiste önemli rol oynayan kaspaz-3 ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş hücrelerin diabetli farelerde kontrol grubu farelerden daha fazla olduğu belirtilmiştir. Kitosan uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 3. günde, retiküler lifler daha yoğun izlenmiştir ve ilerleyen günlerde yerini daha erken kollajen liflere bırakmıştır. Yapılan çalışmalarda kitosanın tip I, III ve tip IV kollajen sentezini artırdığı ifade edilmektedir (140, 141, 189-191).

Yara iyileşmesinde retiküler liflerden sonra kollajen lifler yara alanında bulunurlar. Çalışmamızdaki gruplar, kollajen lif görünümü açısından değerlendirildiğinde 3. günde yara alanında, diabet+kontrol, diabet+asetik asit ve kontrolde belirgin kollajen lif birikimi izlenmemiştir. Kontrol grubunda, 7. ve 14. günlerde kollajen lifler, diabet+kontrol, diabet+asetik asit gruplarına göre daha

belirgin, kalın ve giderek düzenli olarak izlenmiştir. Bizim bulgularımıza paralel olarak daha önce yapılan birçok çalışmada diabetli hayvanlarda kollajen sentezinin yavaşladığı ve azaldığı görülmüştür. Bitar ve ark. (9) yaptıkları çalışmada, diabetli sıçanlarda PCR ile baktıkları tip-I ve tip-III kollajen sentezi takibinde, mRNA çevrimi düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca “Sirius red” boyası ile diabetli gruplarda yara alanında yaptıkları histolojik gözlemlerde kollajen liflerin seyrek olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada deneysel diabetli sıçanlarda duodenum ve karın bölgesindeki yaralarda iyileşme ile artan mekanik dayanıklılığın, kollajen içeriğinin az olması nedeni ile düşük kaldığı sonucuna varılmıştır (192). Rapor edilen diğer çalışmalarda deneysel diabetli sıçanların kemik, kıkırdak ve deri dokularındaki kollajen ve prokollajen mRNA sının üretimi incelenmiştir. Buna göre diabetli sıçanların kemik, kıkırdak ve deri dokularında kollajen miktarının kontrole göre az olduğu belirtilmiştir (14, 193). Diabetlilerde etkinlik gösteremeyen insülin hormonunun kollajen üretimi üzerine etkisi vardır. İnsülinin fizyolojik konsantrasyonu tip 1 kollajen üretimini artırır (194, 195). Diabetlilerde glikokortikoid miktarı artar. Glikokortikoidler prokollajen mRNA üretimini dolayısıyla tip I ve tip III kollajen üretimini olumsuz yönde etkilemektedir (9, 196, 197). C vitamini yara iyileşmesi sürecinde kollajen sentezinde önemli rol üstlenir (198). Diabetlilerde görülen yetersiz C vitamini (199), kollajen sentezinde çapraz bağlanmayı azaltır, 3’lü helix yapısının oluşumu gecikir (11). Diabette fibroblast sayısındaki azalma da kollajen liflerin az sayıda olmasına neden olur. Yapılan bir çalışmada, in vitro ortamda kültüre edilen diabetik yara fibroblastlarının DNA ölçümleri yapılarak çoğalma kapasitelerinin kontrol grubuna göre oldukça düşük olduğu rapor edilmiştir (13). Başka bir çalışmada kültüre edilen diabetik fibroblastların kontrole göre ışık mikroskop bulgularında genellikle geniş ve yaygın, hipertrofik fenotipli ve aynı zamanda asimetrik olduğu, elektron mikroskop bulgularında ise bozulmuş mikrotübül yapısının olduğu belirlenmiştir (200, 201). Bu çalışmada da yara iyileşme alanında bulunan fibroblastlar, kontrol grubunda, diabet+asetik asit ve diabet+kontrol gruplarına göre daha fazla izlenmiştir. Diabetli sıçanlarda yara iyileşmesinde fibroblastların az sayıda ve bozulmuş yapıda olması, hücrenin kollajen üretimi için gerekli olan insülini kullanamaması, C vitamini

eksikliği, yara iyileşme ortamındaki büyüme faktörü üretimi ve salınımındaki eksikler kollajen liflerin kontrole göre az olmasının nedeni olabilir.

Çalışmamızda diabet+kitosan grubunda yara alanında kollajen lifler 3. 7. ve 14. günlerde diğer deney gruplarına göre çok daha belirgin, düzenli ve kalın şekilde izlenmiştir. Kitosan iyileşme alanında kollajen lif miktarını artırmıştır. Bunun nedeni ise, fibroblast sayısının artışının yanısıra fibroblastların kollajen sentez aktivitesinin artışı olabilir. Yapılan bir çalışmada kitosana çapraz bağlanan kollajen ve FGF içeren süngerlerin diabetik yara iyileşmesine etkisi sıçanlarda araştırılmış ve kitosan içeren grubun diğer gruplara göre çok daha iyi kollajen sentezlediği belirtilmiştir (15).

Diabette yukarıda belirtildiği gibi yara iyileşmesinin ilk evresinde inflamatuvar hücrelerin yara alanına ulaşması gecikir. İlk evredeki bu eksiklikler diğer evrelerde de aksamalara neden olarak yara iyileşme sürecini uzatır (8, 11, 15, 172). Kitosan yara iyileşmesi sürecinde; kompleman aktivasyonu, polimorfonükleer hücre (PMN) ve makrofajların aktivasyonu, fibroblast aktivasyonu, sitokin üretimi, dev hücre migrasyonu ve tip IV kollajen sentezinin stimülasyonu gibi aşamalarda önemli rol oynar. Ayrıca, mikroorganizmalara karşı koruyucu etki göstermektedir (140, 141, 189-191). Polimorfonükleer hücre göçü yara iyileşmesinde önemli adımlardan birisi olup, PMN hücre göçünde oluşan sorunlar yara iyileşmesini geciktirmenin yanı sıra birçok enfeksiyonu da indüklemektedir. Kitin ve kitosanın in vitro olarak köpek PMN hücrelerini aktive ettiği, in vivo olarak, direkt ya da kompleman aktivasyonu yoluyla, köpek PMN hücrelerinin sitokin üretimini artırdığı gösterilmiştir (202).

Mast hücresi farklanmamış kemik iliğinin kök hücrelerinden kaynaklanır. Mast hücreleri IgE aracılığı ile veya ondan bağımsız olarak aktive edildikleri zaman çeşitli mediatörler salgırlar. Bu mediatörler kan damarlarını, duyu sinir sonlanmalarını ve inflamatuvar hücrelerini etkilemektedir (39). Mast hücreleri alerjenler tarafından aktive edilebileceği gibi makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-1 ve C3a, C4a, C5a gibi komplement sistem de mast hücrelerini uyarabilmektedir. Mast hücreleri bağışıklık, doku tamiri ve anjiogenezde rol oynar (203). Mast hücreleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Mast hücreleri akut alerjik cevaplar kadar multiple sklerozis, migren, artrit, kardiovasküler hastalıklar gibi hastalıkları da içine alan inflamatuvar hastalıklarda rol oynamaktadır

(204). Mast hücreleri, aktivasyonda üç grup biyoaktif molekül salgılar. Bunlar önceden sentezlenmiş ve granüllerinde depo edilmiş olanlar (histamin, proteazlar, proteoglikanlar), yeni oluşturulmuş membran kaynaklı moleküller (lökotrienler) ve yeni oluşturulmuş sitokinlerdir (tümör nekrozis faktör) (205). Deri mast hücreleri başlıca papiller dermiste bulunur. Dermiste özellikle kılcal damarlar, lenfatik ve miyelinsiz sinirler yakınında bulunmaktadır (206). Mast hücreleri damar permabilitesini artırır ve plazmada bulunan antikorlar ve diğer savunma moleküllerinin hasar gören dokuya geçmesini, lökositlerin damar duvarından geçişini kolaylaştırarak hasarlı bölgede toplanmalarını sağlamaktadır (205). Mast hücreleri bağ dokuda genellikle damarlar yanında bulunur ve dolaşımın düzenlenmesinde ve dokularda hücre trafiğinde rol oynarlar. Ayrıca mast hücrelerinin yeni damar oluşumuyla ilgili olabileceği de bildirilmiştir (203, 207). Çalışmamızda kontrol grubunda 3. günde iyileşme alanı yakınlarındaki bağ dokuda, 7. ve 14.günlerde iyileşme alanı içinde, diabet+asetik asit ve diabet+kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha fazla mast hücresi izlenmektedir. Bu bulgular bize diabetin kan akımı ve damarlar üzerindeki negatif etkilerinden dolayı mast hücrelerinin yara alanına gelmesini geciktirdiğini düşündürdü. Kitosan uyguladığımız gruplarda ise 3., 7. ve 14. günlerde iyileşme alanında mast hücre sayısı diğer gruplarla karşılaştırıldığında giderek artmıştır. Kitosan damar oluşumunda etkilidir (208, 209). Damar oluşumu için büyüme faktörlerini iyileşme alanına çeker. Böylece kitosan uygulanan gruplarda iyileşme alanında damarlanma ve buna bağlı olarak da mast hücrelerinin sayısının artacağı düşünülür.

Granülasyon dokusu, normal yara iyileşme sürecinde, hemostaz ve inflamasyon evresi sonrası, 5–7. günlerde yoğun makrofaj, fibroblast, mast hücreleri, yeni kan damarlarından zengin, fibronektin, kollajen ve bol miktarda hiyaluronik asit içeren gevşek bir bağ dokusundan meydana gelir (7, 21, 49, 80). Çalışmamızda kontrol grubu 7. günde diabet+kontrol ve diabet+asetik asit gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin bir granülasyon dokusu ve granülasyon dokusu içinde daha fazla kan damarı izlenmiştir. Diabetlilerde 7. günde oluşması gereken granülasyon dokusunun ve yeni kan damarlarının oluşmaması, yara iyileşme sürecinin başlangıç aşamalarından itibaren meydana gelen aksamalarla ilişkili

olabilir. Diabetli gruplarda hasar görmüş endotel tamir edilirken hücre içi yüksek glikoz, endotel hücrelerinde bazal membran sentezini uyarır. Aşırı protein birikimi ile yeni oluşan bazal membran kalınlaşır ve kapiller geçirgenliği azalır. Sonuç olarak lökosit ve eritrosit göçü yavaşlar (21). Ayrıca yara alanına gelen inflamatuvar hücrelerin yara alanını terk etmeleri gecikir ve kronik inflamasyon oluşur (8, 172). Diabette yara iyileşmesinin erken evrelerinde lökosit aktivitesinin bozulması daha sonraki evrelere etki eder (172) ve fibroblast çoğalması ve kollajen sentezini de önler (11, 13, 14, 21). Böylece diabetli hastaların yaralarında bozuk granülasyon dokusu oluşur (11, 13), granülasyon dokusu içinde kollajen sentezi azdır (13, 14), anormal çapraz bağlar görülür ve yara gerilim kuvveti azalır (192). Kollajen sentezindeki bozulma, fibroblastların çoğalma kapasitelerindeki yetersizliğe, hücrelerin sentez aktivitelerinin bozulmasına ve yeni sentezlenen kollajenin katabolizmasındaki artışa bağlanabilir (12). Granülasyon dokusu içindeki kan damarlarının azlığı ise, yüksek kan şeker düzeyinin damar oluşumuna olan negatif etkisinden, fibroblast, endotel gibi yeni damar oluşumunda önemli hücrelerin salgıladığı büyüme faktörlerindeki azlıktan kaynaklanmaktadır (210). Tüm bu etkenlerin birbiriyle ilişkisi bozulduğunda granülasyon doku oluşumu gecikir, granülasyon dokusu içinde yeni oluşan kan damarı miktarı azalır. Kitosan uyguladığımız grupta ise iyileşme alanında granülasyon dokusu 3. günde az bir bölgede izlenmeye başlanmış 7. günde ise kontrole göre çok daha geniş bir alanda izlenmiştir. Kitosan, anjiyogenez ile granüle olan doku formasyonunu büyüme faktörlerini yara alanına çekerek stimüle etmektedir (208, 209). Kitosanın granülasyon ve organizasyonu aktive etmesi nedeniyle hayvanlarda büyük açık yaraların iyileştirilmesinde faydalı olduğu bildirilmiştir (191). Kitin veya kitosan kaplı poliyester kumaş (kitin-NWF, kitosan-NWF) ve kaplanmamış NWF (kontrol) implante edilen kedi abdominal duvarında kitin-NWF, kitosan-NWF tarafından indüklenen granülasyon dokusu makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiş, implant etrafında doku büyümesinin en fazla kitosan-NWF ile olduğu, tip I, III ve IV kollajenlerin, NWF ile daha yüksek seviyelerde sentezlendiği gösterilmiştir (211). Köpeklerde yapılan açık yara iyileşmesi çalışmasında, kitin ve kitosan uygulanan grupta hiç bir şey uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla yaralarda reepitelizasyonun daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Kontrol grubunda, yaranın oluşmasından sonra 28. günde kitin ve kitosan grubuna göre inflamatuvar hücrelerin sayısının daha fazla olduğu görülmüştür (16). Kitosan hidrojel, yara yüzeyini korumada nemli, uygun bir iyileştirici çevre sağlamaktadır. İyileşme sürecinde yara kabuğu oluşturmada ve yara iyileşmesini hızlandırıcı bandaj maddesi olarak fotoçapraz bağlanabilen kitosan ve UV radyasyon uygulaması ile elde edilen kitosan hidrojel uygulananabilirliği, fare modeli kullanılarak incelenmiş ve açık yaraya uygulanan kitosan hidrojel, belirgin yara kontraksiyonu, yara kapanması ve yara iyileşmesini arttırdığı gösterilmiştir (144). Fotoçapraz bağlanabilen kitosan hidrojel kanamayı durdurmadaki etkisi nedeniyle acil hemostazis gerektiren durumlarda yara oklüzyonu ve doku adezyonu için yeni bir bandaj maddesi olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (17). Diabetik farelere fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) yüklenmiş fotoçapraz bağlanabilen kitosan hidrojel uygulandığında yara kapanma hızının arttığı ve yara kontraksiyonunun indüklendiği bildirilmiştir (134).

Diabetlilerde yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin sentezi ve bu maddelerin dışarıdan ortama verilerek iyileşme üzerinde ne gibi etkiler gösterdiklerinin incelendiği birçok çalışma vardır. Rapor edilen çalışmalarda, diabetli yara iyileşmesinde işlev gören makrofajların ürettikleri sitokin miktarı incelenmiş ve kontrol grubuna göre sitokin miktarının az olduğu görülmüştür (212, 213). Streptozotosin uygulaması ile oluşturulmuş diabet modelinde epidermal büyüme faktörünün (EGF) kollajen içeriği, tip I ve tip III kollajen üzerine etkisine bakılmıştır. Kollajen içeriğinin EGF uygulanmamış deneysel diabetli hayvanlara göre arttığı ve EGF uygulaması ile tip III kollajenin, toplam kollajene olan oranının azaldığı gösterilmiştir (96). Grotendorst ve ark. ise trombosit kökenli büyüme faktörünün (PDGF) normal iyileşme ve diabetlilerdeki bozulan iyileşme üzerine uyarıcı etkisine bakmışlar, diabetli sıçanlarda PDGF uygulaması ile hücre göçü, DNA sentezi ve kollajen birikiminin arttığını rapor etmişlerdir (214). Bir başka çalışmada, epidermal büyüme faktörünün, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), bazik-fibroblast büyüme faktörünün (bFGF), trombosit kökenli büyüme faktörünün (PDGF-AB) tek tek ve çeşitli kombinasyonlar halinde diabetli fibroblastlar üzerindeki mitoz uyarıcı etkilerine bakılmıştır. Bu büyüme faktörlerinin fibroblast hücrelerinin çoğalma

kapasitelerini arttırıcı etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (201). Galiano ve ark. ile Kirchner ve ark. da topikal olarak uygulanan VEGF'nin diabetik yara iyileşmesini hızlandırdığını saptamışlardır (106, 215). Diabetik farelerde yapılan diğer bir in vitro çalışmada (12), diabetik fibroblastların hücre sel göç yeteneklerinin normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında daha zayıf olduğunu göstermiştir. Ayrıca, diabetik fibroblastların artmış MMP-9 (matriks metalloproteinaz 9) sentezi ve azalmış VEGF salınımı da in vitro olarak gösterilmiştir (12).

Yara iyileşmesi sırasında anjiogenik büyüme faktörleri önemlidir. Anjiogenik büyüme faktörlerinden bazıları; VEGF, PGF (plasental büyüme faktörü), FGF1 ve 2 (asidik, bazik fibroblast büyüme faktörü), FGF3-FGF4 (fibroblast büyüme faktörü 3 ve 4), FGF reseptörleri, TGF α - β (transforme edici büyüme faktörü α ve β), EGF, HGF (hepatosit büyüme faktörü), anjiyogenin, PDGF, GCSF (granülosit koloni uyaran faktör), IL-8 (interlökin 8), TNF- α (tümör nekroz faktör α) ve proliferindir (58-60).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Vasküler endotelial büyüme faktörleri reseptörlerine karmaşık bir sistemle bağlanarak damar oluşumunu düzenler (59-62). VEGF, yara iyileşmesinde endotel hücreleri (63), fibroblastlar (64), düz kas hücreleri (65), trombositler (66), nötrofiller (67) ve makrofajlar gibi (68) pek çok hücre tarafından üretilir. Görevi, endotel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve differansiyasyonunu sağlamaktır (69-71). Yapılan bir çalışmada VEGF immünoreaktivitesi ve damar oluşumuyla ilgisi glioma hücrelerinde gösterilmiştir (216). Son çalışmalar VEGF'nin aynı zamanda kollajen depozisyonunda ve epitel oluşumunda da etkili olduğunu bildirmektedir (217). Yara iyileşmesinin ilk fazında VEGF, endotel hücrelerinden koagulan faktörlerini uyarır. Böylece trombositlerin birikimi ve yapışması sağlanır (218, 219). Vasküler endotelial büyüme faktörünün yara iyileşmesinin inflamasyon evresinde damar oluşumunu sağlamak için inflamatuvar hücreler ve sonraki evrelerde yara alanına gelen fibroblast, endotel ve makrofajlardan da salınmasıyla immünolokalizasyonunun giderek arttığı bildirilmiştir (220). Yara iyileşmesinde anjiogene z ile kan damarları 3. günden itibaren oluşmaya başlar (221). Granülasyon

dokusu içinde kapillerler giderek daha da artar, yara tamiri için gerekli metabolitleri, besinleri ve yeterli oksijeni iyileşme alanına getirirler (220, 221). Yapılan araştırmalar, tam kat kesilerde, 1 gün sonra, yara yakınındaki keratinositlerden, iyileşme alanı içindeki fibroblast ve makrofajlardan ve büyüyen kan damarları çevresinden VEGF salınmaya başladığını ve 3-7. günlerde en fazla seviyeye ulaştığını bildirmiştir (222-224). Çalışmamızda kontrol grubunda, 3. günde, iyileşme alanı içindeki hücrelerde ve büyüyen kan damarları çevresinde VEGF immüno lokalizasyonu izlenmiştir. Kontrol grubunda 7. ve 14. günde VEGF immüno lokalizasyonu giderek azalmıştır. Yapılan çalışmalarda VEGF nin 3-7. günler arası en fazla seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (223). Yara iyileşmesinin 3-7. günleri, fibroblastların, makrofajların, endotel hücrelerinin bol bulunduğu granülasyon dokusunun oluştuğu evredir ve bu hücreler VEGF'nin kaynağıdır (223). Diabet+kontrol ve diabet+asetik asit grubunda ise 3. günde az yoğun, 7. günde orta yoğun ve 14. günde yoğun olarak izlendi. Diabette tüm büyüme faktörleri gibi VEGF nin de salınımı engellenir (225). Diabetiklerde fibroblastlardan ve keratinositlerden VEGF salınımının belirgin düzeyde azaldığı gösterilmiştir (12, 223). Altavilla ve ark. da diabetiklerde oksidatif stresin VEGF salınım ve düzenlenmesinde bozukluklara yol açtığını göstermiştir (226). Komesu ve ark. (8) da alloksana bağlı diabet gelişen farelerde yaptıkları çalışmada, 1.,3. ve 7. günlerde aldıkları histopatolojik örneklerde, mikroskop alanında inflamatuvar hücre sayarak inflamasyon derecesini değerlendirmişler ve diabetik farelerde inflamasyon fazının daha geç başladığını ve kronik inflamasyon özelliklerinin daha uzun sürme eğiliminde olduğunu göstermişlerdir. İnflamatuvar süreçteki bu gecikme ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, diabetik fare modelinde makrofaj kemoatraktan protein-1 (MCP-1) sentezinin 1. günde yapması gereken pikin 5. güne sarktığını göstermişlerdir. Bu bulgu inflamatuvar sürecin gecikmesini açıklamaktadır (118). Böylece 3-7. günlerde en fazla olması gereken VEGF immüno lokalizasyonu diabet+kontrol ve diabet+asetik asit gruplarında engellenmiştir. Diabet + kitosan uygulanan grupta ise 3. günde VEGF immüno lokalizasyonu çok yoğun, 7. günde yoğun ve 14. günde az yoğun olarak literatürle uyumlu şekilde izlenmiştir. Kitosanla tedavi edilmiş yaraların histolojik bulgularında kontrolle karşılaştırıldığında lökositlerin ve

makrofajların iyileşme alanına daha çabuk geldiği bildirilmiştir. Bu bulgular kitosanın yara iyileşmesinin erken döneminde inflamatuvar hücrelerin ve onlardan salınan büyüme faktörlerini yara alanına çektiğini gösterir. Kitosanın yara iyileşmesinin erken döneminde görevli olan hücreleri ve onlardan salınan büyüme faktörlerinden biri olan VEGF'yi de iyileşme alanına çeker (189, 191). H. Ueno ve arkadaşları (191) yaptıkları çalışmada kitosanın granülasyon doku oluşumunu hızlandırdığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda kitosan, granülasyon dokusu içinde bulunan fibroblastları aktive eder, çoğalmasını sağlar ve ECM üretimini hızlandırır. Bu çalışmada kitosan uygulanan gruplarda, diabetin olumsuz etkilerine karşın VEGF salınımını artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığını düşünmekteyiz.

Diabetlilerde VEGF kadar FGF ailesinin üyelerinden olan asidik FGF'nin (aFGF veya FGF1) ve bazik FGF (bFGF veya FGF2) de potansiyel bir anjiyogenik faktör olduğu bildirilmiştir (55, 78, 79). Fibroblast büyüme faktörlerin reseptöre bağlanması ile reseptörler dimerize olmakta ve bunun sonucunda tirozin kinaz aktivitesi gerçekleşmektedir. Bu kinazlar birbirlerini fosforilleyerek sinyal iletimini başlatmaktadırlar (118). *In vivo* olarak her iki tip FGF'nin granülasyon doku oluşumunu, fibroblast çoğalmasını hızlandırdığı ve kollajen birikiminin yanı sıra damarlanmayı ve epitel yenilenmesini artırdığı gösterilmiştir (52, 227, 228). Her iki tip FGF; TGF- β , VEGF, IGF gibi büyüme faktörlerinin salınımını artırarak indirekt olarak etki gösterirler (227, 228). Yara iyileşme sürecinde FGF kadar reseptörleri de anahtar rol oynar (229-233).

Normal ve yaralı dokuda bilinen dört adet FGFR bulunur. Bu reseptörler epiderminin tabakalarında, kas tabakasında, kan damarlarında, fibroblastlarda, kıl folliküllerinde, granülasyon ve inflamasyon dokularında bulunur (230-233). Takenaka ve arkadaşları insan yanık yaralarından ve normal dokulardan aldıkları örnekleri değerlendirmişlerdir. Bu çalışmaya göre iyileşmenin ilk evresinde FGFR1 ve FGFR3'ün güçlü lokalizasyon gösterdiğini, granülasyon doku oluşumu ile beraber bu reseptörlerin daha zayıf lokalizasyon gösterdiğini ve bu aşamada FGFR2 ve FGFR4'ün güçlü lokalizasyon gösterdiğini bildirmiştir. İyileşmenin son aşamasında ise FGFR1 ve FGFR3'ün orta yoğunlukta lokalizasyon izlediğini göstermiştir (233). Komi-Kuramochi ve arkadaşları genç ve yaşlı farelerin sırtlarında oluşturdukları tam

kat kesilerle, FGF ve FGFR'lerin mRNA seviyeleri ile ilgili yaptıkları çalışmada FGFR3'ün özellikle yara iyileşmesinin ilk 3 gününde yüksek seviyede bulunduğunu 7. güne kadar giderek azaldığını ve 7. günden sonra tekrar arttığını bildirmişlerdi (232). Bizim çalışmamızda kontrol grubunda epitelin stratum bazale tabakasında, kıl folliküllerinin epidermal kök kılıfında, kan damarları çevresinde, yağ bezlerinde ve iyileşme alanında FGFR3 immünolokalizasyonu yoğun şekilde izlenmiştir. Diabet +asetik asit ve diabet+kontrol gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha az yoğun FGFR3 immünolokalizasyonu izlenmiştir. Bunun nedeni diabetlilerde ilk 3 günde inflamatuvar hücreler tarafından salınması gereken büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin iyileşme alanında bulunmamasıdır ve devamında iyileşme sürecinin gecikmesidir. Kitosan uyguladığımız grupta ise kontrole göre daha yoğun FGFR3 immünolokalizasyonu izlenmiştir. Kitosan yara iyileşmesinin her aşamasındaki hücrelerden büyüme faktörleri salınımında etkindir (17, 114, 117, 118, 125, 160, 189, 191). Bizim çalışmamızda da yara iyileşmesini hızlandırıcı yönü FGFR3'ün iyileşme alanında yoğun bulunmasıyla görülmüştür.

Bu çalışmada diabetik sıçanlarda oluşturulan tam kat kesilerin iyileşme sürecinin kitosan uygulaması ile olumlu yönde etkilendiği gösterilmiştir. Yara iyileşmesi pek çok hücre ve bu hücrelerden salınan birçok farklı büyüme faktörünün rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Diabete bağlı olarak yara iyileşme mekanizmalarında ortaya çıkan bozukluk ve gecikmelerin kitosan uygulaması ile giderilebildiği gösterilmiştir. Kitosan ucuz ve kolay elde edilebilirliğinin yanı sıra hemostatik, antibakteriyel ve antifungal bir doğal polimerdir. Sonuç olarak bu çalışma kitosanın yara iyileşme sürecinde olumlu etkilerini göstermiş ve özellikle diabetik hastalarda kullanımının yararlarını ortaya koymuştur.

6. KAYNAKLAR

1. Hand, A.R. and Weiss, R.E. (1984). Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland, *Lab Invest*, 51:429–40.
2. Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic food, *Lancet*, 366:1736–43.
3. Blakytyny and E. Jude. (2006). The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes, *Diabetic Medicine*, 23:594–608.
4. Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, *Physiol Res.*, 50:536–46.
5. Geethan, A., Prince, S.M. (2008). Antihyperlipidemic effect of d-pinitol on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats, *J Biochem Molecular Toxicology*, 22:220–225.
6. Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms, *Journal of Investigative Dermatology*, 127:514–525.
7. Clark, R., Ghosh, K., Tonnesen, M. (2007). Tissue engineering for cutaneous wounds, *Journal of Investigative Dermatology*, 127:1018-1029.
8. Komesu, M.C., Tanga, M.B., Buttros, K.R., et all. (2004). Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing, *Pathophysiology*, 11:63–67.
9. Bitar, M.S., Farook, T., Wahid, S., et all. (1999). Glucocorticoid- dependent impairment of wound healing in experimental diabetes: amelioration by adrenalectomy and RU 486, *J Surg Res.*, 82:234–243.
10. Darby, I.A., Bisucci, T., Hewitson, T.D., et all. (1997). Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice, *Int J Biochem Cell Biol.*, 29 (1):191–200.
11. King, L. (2001). Impaired wound healing in patients with diabetes, *Nursing Standart*, 15(38):39–45.
12. Lerman, O.Z., Galiano, R.D., Armour, M., et all. (2003). Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast, *Am J Pathol.*, 162(1):303–312.

13. Hehenberger, K., Kratz, G., Hansson, A., et al. (1998). Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate which is recovered by the addition of heparin, *J Dermatol Sci.*, 16:144–151.
14. Spanheimer, R.G., Umpierrez, G.E., Stumpf, V. (1988). Decreased collagen production in diabetic rats, *Diabetes*, 37:371–76.
15. Wang, W., Lin, S., Xiao, Y., et al. (2008). Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats, *Life Sciences*, 82:190–204.
16. Okamoto, Y., Shibasaki, K., Minami, S., et al (1995). Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs, *J. Vet. Med. Sci.*, 57:851–854.
17. Ishihara, M., Nakanishi, K., Ono, K., et al (2002). Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, *Biomaterials*, 23:833-840.
18. Adlin, E. V. (1996). Endocrine and metabolic diseases. In: Myers, A. R., editor. *The National Medical Series for Independent Study, Medicine*. Middle East 2'nd ed. Giza, Egypt: Mass Publishing Co., 401–463.
19. Sağlam, H. (2004). Diabet ve enfeksiyonlar, *Güncel Pediatri*, 2:44–52.
20. Schwartz, H.J. and Rutledge, J.C. (2004). The challenge of type I diabetes mellitus. *Ilar J.*, 45(3):231-236.
21. Edwards, J.E., Tillman, D.B., Miller, M.E., et al. (1979). Infection and diabetes mellitus, *West J Med.*, 130:515–521.
22. World Health Organization. *Diabetes Mellitus. Report of WHO Study Group*. Geneva, World Health Org., 1985.
23. American Diabetes Association (2005). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, *Diabetes Care*, 28:37–42.
24. Wild, S., Roglic, G., Gren, A., et al. (2004). Global Prevalance of Diabetes, Estimates for the year 2000 and projection for 2030, *Diabetes Care*, 27:1047-1053.

25. Başaran, N.A.(2008). Diabetik ve nondiabetik böbrek yetmezliği olan hastalarda sistein C düzeyleri, Uzmanlık Tezi, TC Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, sf. 8.
26. King, H., Rewers, M. (1993). Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults, The WHO Adhoc Diabetes Reporting Group, Diabetes Care, 16:157–177.
27. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (1994). Pankreas. In: Mitchell, J., editor. Temel Patoloji. 5'th ed. İstanbul: W B Saunders Company-Nobel Tıp Kitabevleri Ltd şti & Yüce Yayınları AŞ., 569–587.
28. Guyton, A.C., Hall, J.E. (2001). Tıbbi Fizyoloji, (Çeviri editörü: Çavuşoğlu H.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000. Nobel Tıp Kitabevleri, 419–422.
29. Bozlan, A.D., Bianchi, M.S. (2002). Genotoxicity of Streptozotocin, Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 512:121–134.
30. Öztürk, Y., Atlan, V., Yıldızoğlu, N. (1996). Effects of experimental diabetes and insülin on smooth muscle functions, Pharmacological Reviews, 48:69–112.
31. Fox, C., Doyel, D. (1981). Islet cell hyperplasia in long term streptozotocin rats, In Streptozotocin Fundamentals and Therapy, Elsevier North Holland Biomedical Press, 263–274 p.
32. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/productinformationsheet2/s0130pis.Par.0001.File.tmp/s0130pis.pdf>
33. HSDB (Hazardus Substances Data Bank).(2009). Online database produced by the National Library of Medicine. Streptozotocin.
34. Özkan, S.N., Emekli, N.,Yarat, A. (1995). Nonenzymatic glycosylation of protrombin complex of diabetic patients. National Diabetes Congress and Towards The Discovery of Insülin 75th Anniversary Symposium Abstract, 62p.
35. Schnedel, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H., et all.STZ transport and cytotoxicity: Specific enhancement in GLUT2-expressing cells, Diabetes, 3:1326–1333.

36. Sato, N., Shimizu, H. (1993). Granulocyte-colony stimulating factor improves an impaired bactericidal function in neutrophils from STZ-induced diabetic rats, *Diabetes*, 42:470–473.
37. Macri, L., Silverstein, D., Clark, A.F.R. (2007). Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59:1366–1381.
38. Kierszenbaum, A.L. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık (Çeviri Editörü Ramazan Demir), sf 300–307.
39. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2006). Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevleri (Çeviri: AYTEKİN, Y., SOLAKOĞLU, S.), sf 43-51.
40. Reimer, K., Vogt, P.M., Broegmann, B., et all. (2000). An innovative topical drug formulation for wound healing and infection treatment: in vivo and in vitro investigations of a providone- iodine liposome hydrogel, *Dermatology*, 201:235–241.
41. Kılıçoğlu, B., Kılıçoğlu, S.S., Eren, Ç.V. (2005). Gastrointestinal sistemde yara iyileşmesi, *SDÜ Tıp Fak Derg.*, 12 (1):67–76.
42. Geoffrey, C.G., Sabine, W., Yann, B., et all. (2008), Wound repair and regeneration, *Nature*, 453:314-321.
43. Chettibi, S., Ferguson, M.W.J. (1999). Wound repair: an overview. In: Gallin, J.I., Snyderman, R, eds. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 3rd edn. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 865–881p.
44. Marks, R., Dykes, P., Motley, R. (1993) *Clinical signs and procedures in dermatology*, 1st ed. London, 35 p.
45. Acosta, J.B., Barco, D.G., Vera, D.C., et all. (2008). The proinflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds, *International Wound Journal*, 5:530–630.
46. Sabine, A.E., Thomas, K., Jeffrey, M.D. (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms, *Journal of Investigative Dermatology*, 127:514–525.
47. Richard, A.F., Ghosh, C.K., Tonnesen, M.G. (2007). Tissue engineering for cutaneous wounds, *Journal of Investigative Dermatology*, 127:1018-1029.

48. Liu, Y., Petreaca, M., Yao, M., et al. (2009). Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing, *BMC Cell Biology*, 10:1-15.
49. Singer, A.J., Clark, R.A.F. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.*, 341:738–746.
50. Brunner, G., Blakytyn, R. (2004). Extracellular regulation of TGF- α activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury, *Thromb Haemost.*, 92:253–261.
51. Mast, B.A., Cohen, I.K. (2000). Normal wound healing, (Bruce, M., Achauer, Eriksson, E., Vander Kolk, C., Russell, R.C., *Plastic Surgery: Indications, Operations, Outcomes*, Mosby, St Louis. 1:37–52.
52. Turan, M., Saraydin, U.S., Bulut, E., et al. (2004). Do vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor promote phenytoin's wound healing effect in rat? An immunohistochemical and histopathologic study, *Dermatol Surg.*, 30:1303–1309.
53. Grose, R. And Werner, S. (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice, *Mol Biotechnol.*, 28: 147–166.
54. Monaco, J.L. and Lawrence, W.T. (2003). Acute wound healing: An overview, *Clinics in Plastic Surgery*, 30(1):1–12.
55. Dahlback, B. (2000). Blood coagulation, *Lancet*, 355:1627-32.
56. Parslow, T.G., Bainton, D. F., (1993). Innate immunity (Eds: Stites, D.B., Terr, AI., Parslow, T.G.), *Medical Immunology*, Appelton&Lange, 9th Ed., Stanford. Chap 2:25-42 p.
57. Waugh, H.V. and Sherratt, J.A. (2006). Macrophage dynamics in diabetic wound healing, *Bulletin of Mathematical Biology*, 68:197–222.
58. Martin, P. and Leibovich, S. J. (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly, *Trends Cell Biol.*, 15:599-607.
59. Simons, M. (2005). Angiogenesis where do we stand now?, *Circulation*, 111:1556-1566.
60. Konukoğlu, D. and Turhan, S. M. (2005). Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi, *Cerrahpaşa J Med.*, 36: 42-48.

61. Ferrara, N. (2004). VEGF: basic science and clinical progress, *Endocrine Rev.*, 25:581-611.
62. Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, et al. (2006). VEGF receptor. Signalling—in control of vascular function, *Nat Rev Mol Cell*, 7:359-564
63. Namiki, A., Brogi, E., Kearney, M., et al. (1995). Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells, *J Biol Chem*, 270:311-320.
64. Nissen, N.N., Polverini, P.J., Koch, A.E., et al. (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing, *Am J Pathol.*, 152:1445-50.
65. Stavri, G.T., Zachary, I.C., Baskerville, P.A., et al. (1995). Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: synergistic interaction with hypoxia, *Circulation*, 92:11-18.
66. Banks, R.E., Forbes, M.A., Kinsey, S.E., et al. (1998). Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: Significance for VEGF measurements and cancer biology, *Br J Cancer*, 77:956-559.
67. Gaudry, M., Bregerie, O., Andrieu, V., et al. (1997). Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils, *Blood*, 90:4153-4158.
68. Berse, B., Brown, L.F., Van de Water, L., et al. (1992). Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors, *Mol Biol Cell*, 3:211-216.
69. Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin, *Nat Cell Biol.*, 8:1223-1228.
70. Brkovic, A., and Sirois, M.G. (2007). Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: Role of endogenous PAF and NO synthesis, *J Cell Biochem*, 100:707-210.

71. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, B.A.M., et al. (2008). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing, doi: 10.1016/j.jss. 04. 023.
72. Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., et al. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor, *Biochem Biophys Res Commun*, 187:1579-1583.
73. Soker, S., Fidder, H., Neufeld, G., et al. (1996). Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain, *J Biol Chem.*, 271:5761-5766.
74. Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., et al. (1992). FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines, *Cancer Res.*, 52:5738-5745.
75. Takamiya, M., Saigusa, K., Aoki, Y. (2002). Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determination of cutaneous wounds, *Am J Forensic Med Pathol.*, 23:264-270.
76. Kondo, T. (2007). Timing of skin wounds, *Legal Medicine*, 9: 109-114.
77. Ornitz, D.M., Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors, *Genome Biol.*, 2(1):3005- 12.
78. Vemuri, S., Beylin, I., Sluzky, V., et al. (1994). The stability of bFGF against thermal denaturation, *J Pharm Pharmacol.*, 46, 481-486.
79. Nugent, M.N., Iozzo, R.V. (2000). Fibroblast growth factor-2, *IJBCB*, 32:115-120.
80. Mutsaers, S.E., Bishop, J.E., McGrouther, et al. (1997). Mechanism of tissue repair: from wound healing fibrosis, *Int J Biochem Cell Biol.*, 29:5-17.
81. Çetin, M., Çapan, Y. (2004). bBFGF (bazik fibroblast büyüme faktörü) yeni yaklaşımlar, *Hacettepe Ecz Fak Derg.*, 24:107-124.
82. Tang, C.H., Yang, R.S., Chen, Y.F., et al. (2007). Basic fibroblast growth factor stimulates fibronectin expression through phospholipase C gamma, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappaB, and p300 pathway in osteoblasts, *Journal of Cellular Physiology*, 211:45–55.

83. Marie, P.J. (2003). Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation, *Gene*, 316:23–32.
84. Mohammadi, M., Froum, S., Hamby, J.M., et al. (1998). Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain, *EMBO J.*, 17(10):5896-5904.
85. Delrieu, I. (2000). The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism, *FEBS Letters*, 468:6-10.
86. Moroni, E., Dell’Era, P., Rusnati, M., et al. (2002). Fibroblast growth factors and their receptors in hematopoiesis and hematological tumors, *J. Hematother. & Stem Cell Res.*, 11:19–32.
87. Muller, E., Courtois, Y., Prunieras, M., et al. (1986). Eye derived growth factor isolated from bovine retina and used for epidermal wound healing *In vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, 87:76-80.
88. Farhadi, J., Jaquier, C., Barbero, A., et al. (2005). Differentiation-dependent up-regulation of BMP-2, TGFbeta1, and VEGF expression by FGF-2 in human bone marrow stromal cells, *Plastic Reconstructive Surgery*, 116:1379-86.
89. Marie, P.J., Debiais, F., Hay, E. (2002). Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling, *Histology and Histopathology*, 17:877-85.
90. Felmeden, D.C., Blann, A.D., Lip, G.Y.H. (2003). Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease, *European Heart Journal*, 24:586–603.
91. Folkman, J., D’Amore, P.A. (1996). Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 87:1153–5.
92. Hanahan, D. (1997). Signalling vascular morphogenesis and maintenance, *Science*, 48–50.
93. Rohrich, R. J., Robinson, J.B. (1999). Wound healing, *Selected Readings in Plastic Surgery*, 9(3):8-16.

94. Cruse, P.J., and Foord, R., (1973). A five- year prospective study of 23469 surgical wounds, *Arch. Surg.*, 107:206-210.
95. Andreassen, T.T., Seyer-Hansen, K., Oxlund, H. (1981). Biomechanical changes in connective tissues induced by experimental diabetes, *Acta Endocrinol (Copenh.)*, 98:432–436.
96. Hennessey, P.J., Ford, E.G., Black, C.T., et all.(1990). Wound collagenase activity correlates directly with collagen glycosylation in diabetic rats, *J. Pediatr. Surg.*, 25(1):75-78.
97. Hamlin, C.R., Kohn, R.R., Luschin, J.H. (1975). Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus, *Diabetes*, 24:902-910.
98. Bitar, M.S., (1998). Glucocorticoid dynamics and impaired wound healing in diabetes mellitus, *Am J Pathol.*, 152(2):547-554.
99. Colen, L.B. (2000). Diabetes and lower extremity reconstruction (Eds. Achauer, B.M., Eriksson, E., Vander Kolk, C., Russell, R.C.), *Plastic Surgery: Indications, Operations, Outcomes*, chapter 33, Mosby, St Louis. 1:37-52 pp,
100. Greenhalgh, D.G. (2003). Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plas Surg.*, 30:37–45.
101. Resmi, H., Pekçetin, Ç., Güner, G. (2001). Erythrocyte membrane and cytoskeletal protein glycation and oxidation in short-term diabetic rabbits, *Clin Exp Med.*, 1:87–193.
102. Vinik, A.I., Erbas, T., Park, T.S., et all. (2001). Dermal neurovascular dysfunction in type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 24:1468–1475.
103. Holmberg, A., Sandhagen, B., Bergqvist, D. (2000). Hemorheologic variables in critical limb ischemia before and after infrainguinal reconstruction, *J Vasc Surg.*, 31(4):691–5.
104. Park, J.E., Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing, *The American Journal of Surgery*, 187:11-16.
105. Medina, A., Scott, P.G., Ghahary, A., et all. (2005). Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds, *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 26(4):306–319.

106. Loren, M., Kirchner, M.D., Sharon, O., et al. (2003). Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model, *Wound Rep. Reg.*, 11:127–131.
107. Bruna, Romana-Souza Adriana PÇ (2009). Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nascimento and Andréa Monte-Alto-Costa*, 6(11):77–84.
118. Wetzler, C., Kampfer, H., Stallmeyer, B., et al. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair, *J Invest Dermatol.*, 115:245–53.
109. Wall, S.J., Sampson, M.J., Levell, N., Murphy G. (2003). Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts, *Br J Dermatol.*, 149:13-16.
110. Frank, S., Hubner, G., Breier, G., et al. (1995). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing, *J Biol Chem.*, 270:07–13.
111. Terashi, H., Izumi, K., Deveci, M. et al. (2005). High glucose inhibits human epidermal keratinocyte proliferation for cellular studies on diabetes mellitus, *Int Wound J.*, 2:298–304.
112. Steed, D.L.(1998). Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg.*, 25:397-405.
113. Bae, J.S., Jang, K.H., Jin, H.K. (2005). Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* enhances dermal wound healing in streptozotocin induced diabetic rats. *6(2):161-164.*
114. Azad, A.K., Sermssintham, N., Chandkrachang, S., et al. (2004). Chitosan membrane as a wound healing dressing: characterization and clinical Apl, Wiley Inter Science, DOI: 10.1002/jbm.b.30000.
115. Fujita, M., Ishihara, M., Simizu, M. et al.(2004). Vascularization in vivo caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel. *Biomaterials*, 25:699-706.

116. Çınar, C. Yara iyileşmesinde destek sağlayan yöntemler. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu 18-19 Ekim 2001, İstanbul, sf. 165-171.
117. Sandford, P.A. (1989). Chitosan: commercial uses and potential applications, in: Skjak-Brack, G., Anthonsen, T., Sandford P. (Eds.). Chitin and chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications, Elsevier Science Publishers Ltd, England,. 51–69 pp.
118. Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.*, 15:326-1331.
119. Singla, A.K., Chawla, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update, *J. Pharm. Pharmacol.*, 53:1047-1067.
120. Onishi, H., Machida, Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice, *Biomaterials*, 20:175-182.
121. Rao, S.B. and Sharma, C.P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential, *J. Biomed. Mater. Res.*, 34:21-28.
122. Ravikumar, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46:1–27.
123. Shigemasa, Y., Minami, S., (1995): Applications of chitin and chitosan for biomaterials, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13:383-420.
124. Senel, S., Kas, H.S., Squier, C.A. (2000). Application of chitosan in dental drug delivery and therapy, in: Muzzarelli, R. A. A. (Ed), *Chitosan per os: From Dietary Supplement to Drug Carrier*, Atec, Grottammare, 241-256 pp.
125. Duman, S.S., Şenel, S. (2004). Chitosan ve veteriner alandaki uygulamaları, *Veteriner Cerrahi Derg.*, 10(3-4):62-67.
126. Drury, J.L. and Money, D.J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials*, 24:4337-4351.
127. Hoffman, A.S. (2002). Hydrogels for biomedical applications, *Adv Drug Del Rev.*, 43:3-12.
128. Berger, J., Reist, M.J., Mayer, M., et all. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57:19-34.

129. Noble, L., Gray, A.I., Sadiq, L., et al. (1999). A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel, *Int. J. Pharm.*, 192:173-182.
130. Aksungur, P., Sungur, A., Ünal, S., et al.(2004). Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: In vitro and in vivo studies, *J. Control. Release*, 98:269-279.
131. Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar, K.R., et al (2004). Properties of chitosan films prepared under different drying conditions, *J Food Eng.*, 63:79-85.
132. İkinci, G., Senel, S., Kas, H.S., et al. (2000). Antifungal activity and release behaviour of cross-linked chitosan films incorporated with chlorhexidine gluconate, in: Peter, M.G., Muzzarelli, R.A.A., Domard, A. (Eds.), *Advances in Chitin Sciences*, Vol. IV, University of Postdam, 287-290 pp.
133. Oungbho, K., Müller, B.W., (1997). Chitosan sponges as sustained release drug carriers, *Int. J. Pharm.*,156:229-237.
134. Lai, H.L., Abu’Khalil, A., Craig, D.Q.M. (2003). The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges, *Int. J. Pharm.*, 251:175-181.
135. Madihally, S.V., Matthew, H.W.T., (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 20:1133-1142
136. Ehrenfreund-Kleinman, T., Gazit, Z., Gazit, D., et al. (2002). Synthesis and biodegradation of arabinogalactan sponges prepared by reductive amination, *Biomaterials*, 23:4621-4631.
137. Yang, J., Chung, T.W., Nagaoka, M., et al. (2001). Hepatocyte-specific porous polymer-scaffolds of alginate/galactosylated chitosan sponge for liver-tissue engineering, *Biotechnology Letters*, 23:1385-1389.
138. Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, et al. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.*, 274:1-33.
139. Nigalaye, A.G., Adusumuli, P., Bolton, S. (1990). Investigation of prolonged drug release from matrix formulations of chitosan, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 16:449-467.

140. Minami, S., Suzuki, H., Okamoto, Y., et al. (1998). Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway, *Carbonhydr. Polym.*, 36:151-155.
141. Minami, S., Okamoto, Y., Hamada, K., et al. (1999). Veterinary practice with chitin and chitosan, in: Jolles, P., Muzzarelli, R.A.A. (Eds.), *Chitin and chitinases*, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 265-277 pp.
142. Okamoto, Y., Tomita, T., Minami, S., et al. (1994). Dramatic effect of chitosan on infection, in: Karnicki, Z.S., Brzeski, M.M., Byowski, P.J. Wojatasz-Pajak, A (Eds.), *Chitin World*, Wirtschaftsverlag NW, Germany, 504–511 pp.
143. Obara, K., Ishihara, M., Ishizuka, T., et al. (2003). Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice, *Biomaterials*, 24:3437- 3444.
144. Ishihara, M., Ono, K., Ato, M., et al. (2001). Acceleration of wound contraction and healing with a photocrosslinkable chitosan hydrogel, *Wound Repair and Regeneration*, 9:513–521.
145. No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., et al. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan, oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food. Microbiol.*, 74:65-72.
146. Omura, Y., Shigemoto, M., Akiyama, T., et al. (2000). Reexamination of antimicrobial activity of chitosan having different degrees of acetylation and molecular weights, in: K. M. Varum, A. Domard, O. Smidsrod (Eds), *Advances in Chitin Sciences, Vol. IV*, University of Postdam, Norway, 273–274 pp.
147. Zheng, L-Y., Zhu, J-F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbonhydr. Polym.*, 54:527-530.
148. Lim, S.H. and Hudson, S.M. (2003). Review of chitosan and its derivatives as microbial agents and their uses as textile chemicals, *J. Macromol. Sci., Part C Polym. Rev.*, 43:223-269.
149. Begin, A. and Calsteren, M.R.V. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 26:63-67.
150. Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., et al. (2003). Effects of chitin and chitosan on blood coagulation, *Carbonhydr. Polym.*, 53:337-342.

151. Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., et all. (2002). Analgesic effects of chitin and chitosan, *Carbonhydr. Polym.*, 49:249-252.
152. Özelmas, Ü. Deney hayvanları biyolojisi ders notları, Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskisehir.1992; 62 s.
153. Karabay, G., Zağyapan, R., Take, G. (2006). Streptozotosinle oluşturulan diabetin sıçan periferik sinirleri üzerine etkisinin elektron mikroskopik incelenmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.*, 32(3):77-81.
154. Saeed, M.K., Deng, Y., Dai, R. (2008). Attenuation of biochemical parameters in streptozotocin-induced rats by oral administration of extracts and fractions of *Cephalotaxus sinensis*. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 42:21–32.
155. Wua, Y., Dong, J., Yuan, A., et all (2008). Nephlin and podocin is prevented by mycophenolate mofetil in early experimental diabetic nephropathy. *Cytokine*, baskıda 1-7.
156. Öztürk, Y. (1999). Neden şeker hastalığı? Neden deneysel diabet modelleri? *TFD Bülteni*, 55:18-19.
157. Cetto, AA., Wiedenfeld, H., Revilla, M.C., et all. (2000). Hypolycemic effect of *Equisetum myriochaetumaerial* parts on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 72:129-133.
158. Öntürk, H., Özbek, H. (2007). Deneysel diabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg.*,17(4):231-236
159. Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G. et all. (2006). Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers os biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*, 27:269–274.
160. Kuo, S.M., Chang, S.J., Chen, T.W., et all. (2005). Guided tissue regeneration for using a chitosan membrane: an experimental study in rats. DOI: 10.1002/jbm.a.305-340.
161. Matsuda, B.H., Koyama, H., Sato, H. et all. (1998). Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J. Exp. Med.*, 187:297-306.
162. Brem, H., Tomic-Canic, M., (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Invest.*, 117(5):1219–1222.

163. Pavlovic, M.D., Milenkovic, T., Dinic, M., et all. (2007). The prevalence of cutaneous manifestations in young patients with IDDM. *Diabetes Care*, 30(8):1964–1967.
164. Blakytyn, R., Jude, E.B., Martin G., et all. (2000). Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *Journal of Pathology*, 190(5):589–59.
165. Jude, E.B., Blakytyn, R., Bulmer, J., et all. (2002). Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*, 19(6):440–447.
166. Şahin, İ.K. Streptozotocin ile akut diabet oluşturulmuş erkek sıçanlarda yara iyileşmesinde elektirik akımının etkisi. Doktora Tezi, Osmangazi Üniv. Fen Bil. Enstitüsü. Bioloji AD. Eskişehir (2005), 19.sf.
167. Pushparaj, P., Tan, C.H., Tan, B.K.H. (2000). Effects of Averhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 72:69–76.
168. Benwahhoud, M., Jouad, H., Eddouks, M., Lyoussi, B.(2001) Hypoglycemic effect of Suaeda fruticosa in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 76:35-8.
169. Hoffman, M., Monroe, D.M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.*, 85:958– 65.
170. Fahey, T.J., Sadaty, A., Jones, W.G. et all. (1991). Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *J Surg Res.*, 50:308–313.
171. Sato, N., Nakamura, M., Chikama, T., et all. (1999). Abnormal deposition of laminin and type IV collagen at corneal epithelial basement membrane during wound healing in diabetic rats. *Jpn J Ophthalmol.*, 43:343-347.
172. Ahmed, N. (2005). Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pr.*, 67:3-21.
173. Klokkevold, P.R., Subar, P., Fukayama, H., et all. (1992): Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits with platelet dysfunction induced by epoprostenol, *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 50:41-45.

174. Ito, M., (1991). In vitro properties of a chitosanbonded hydroxyapatite bone-filling paste, *Biomaterials*, 12:41-45.
175. Chou, T.C., Fu, E., Wu, C.J., et all. (2003). Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 302:480-483.
176. Huang, R., Du, Y., Yang, J., Fan, L., (2003). Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate, *Carbonhydr. Res.*, 338:483-489.
177. Ronghua, H., Yumin, D., Jianhong, Y., (2003). Preparation and anticoagulant activity of carboxybutyrylated hydroxyethyl chitosan sulfates, *Carbonhydr. Polym.*, 51:431-438.
178. Vongchan, P., Sajomsang, W., Subyen, D., et all. (2002). Anticoagulant activity of a sulfated chitosan. *Carbonhydr. Res.*, 337:1239-1242.
179. Hernandez, A.M. (1983). The basement membrane in pathology. *Lab Invest.*, 48:656-672.
180. Fine, D. J. (1988). Antigenic features and structural correlates of basement membranes. *Arch Dermatol.*,124:713-6.
181. Rouselle, P., Lunstrum, G.P. (1991). Kalinin: An epithelium spesific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol.*, 114:567-75.
182. Hultsch, N.D., Gammon, W.R.(1992). Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering disease. *J Clin Inv.*, 90:1628-33.
183. Zillikens, D. (1999). Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci.*, 20:134-54.
184. Chan, LS. (2000) Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci.*, 15:343–52.
185. Friend, J., Kiorpes, T.C., Thoft, R.A. (1981). Diabetes mellitus and the rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 21:317–321.
186. Dimitri, T. Azar, M.D. Sandra, J., et all (1992). Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch Ophtalmol.*, 110:537-541.

187. Clore, J.N., Cohen, I.K., Diegelmann, R.F. (1979). Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *P Soc Exp Biol Med.*, 161:337–340.
188. Liu, R., Desta, T., He, H., et al. (2004). Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology*, 145:2997–3003.
189. Ueno, H., Yamada, H., Tanaka, I., et al. (1999). Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 20:1407–14.
190. Suzuki, Y., Okamoto, Y., Morimoto, et al. (2000). Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation, *Carbonhydr. Polym.*, 42:307–310.
191. Ueno, H., Mori, T., Fujinaga, T., (2001). Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 52:105–115.
192. Gottrup, F., Andreassen, T.T. (1981). Healing of incisional wounds in stomach and duodenum: The influence of experimental diabetes. *J Surg Res.*, 31:61–68.
193. Craig, R.G., Yu, Z., Xu, L., et al (1998). A chemically modified tetracycline inhibits streptozotocin-induced diabetic depression of skin collagen synthesis and steady-state type I procollagen mRNA. *Biochim Biophys Acta*, 1402:250–260.
194. Schaffer, M.R., Tantry, U., Efron, P.A., et al. (1997). Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery*, 121: 513–519.
195. Tokudome, T., Horio, T., Yoshihara, F., et al (2004). Direct effects of high glucose and insulin on protein synthesis in cultured cardiac myocytes and DNA and collagen synthesis in cardiac fibroblasts. *Metabol.*, 53:710–715.
196. Oishi, Y., Fu, Z.W., Ohnuki, Y., et al. (2002). Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Br J Dermatol.*, 147(5):859–868.
197. Slavin, J., Unemori, E., Hunt, T.K., et al. (1994). Transforming growth factor beta (TGF-beta) and dexamethasone have direct opposing effects on collagen

- metabolism in low passage human dermal fibroblasts in vitro. *Growth Factors*, 11(3):205–213.
198. Wahli, T., Verlhac, V., Girling, P., et al. (2003). Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 225:371–386.
 199. Kashiba, M., Oka, J., Ichikawa, R., Kasahara, E., et al. (2002). Impaired ascorbic acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radical Bio Med.*, 33:1221–1230.
 200. Casson, I.F., Beahon, S.J., McLean, E.G. (1987): A factor in the serum of diabetic patients inhibits microtubule formation. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 89:225–228.
 201. Loots, M.A.M, Kenter, S.B., Au, F.L., et al. (2002). Fibroblast derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with egf, igf-1, bFGF and PDGFR-AB compared controls. *European Journal of Cell Biology*, 81:153–160.
 202. Usami, Y., Okamoto, Y., Takayama, T., et al. (1998). Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2. *J. Biomed. Mat. Res.*, 42:517–522.
 203. Hiromatsu, Y. and Toda, S. (2003). Mast cell and angiogenesis. *Microsc. Res. Tech.*, 60:64-669.
 204. Theoharides, T.C. and Cochrane, D.E. (2004). Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J. Neuroimmun.* 146:1-12.
 205. Cross, P.C. and Mercer, K.L. (1993). *Cell and tissue ultrastructure; a functional perspective*. 3.Edition. W.H. Freeman and Company, U.S.A.
 206. Senol, M. and Fireman, P. (1997). Human skin mast cell: Current. Concepts. *Turkish J. Dermatopathol.*, 6:1-5.
 207. Blair, R.J., Meng, H., Marchese, M.J., et al. (1997). Human mast cells stimulate vascular tube formation. *J. Clin. Invest.*, 99:2691-2700.
 208. Drewa, T., Adamowicz, J., Krawczyk, A., et al. (2007). Chitosan scaffold enhances angiogenesis within an in vitro reconstructed bladder wall, an Animal Study. *Curr Urol.*, 1(2):72-76.

209. Diegelman, F.R., Dunn, J.D., Lindblad, W.J., et al. (2002). Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasia and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 4:48-52.
210. Skljarevski, V., and Veves, A. (2005). Impact of diabetes on vasculature. Focus on nervous system. *Curr. Diabetes Rev.*, 1:245-253.
211. Kojima, K., Okamoto, Y., Miyatake, K., Kitamura, Y., Minami, S., (1998). Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan, *Carbonhydr. Polym.*, 37:109–113.
212. Doxey, D.L., Nares, S., Park, B., et al. (1998). Diabetes-induced impairment of macrophage cytokine release in a rat model: potential role of serum lipids. *Life Sci.*, 63:1127–1136.
213. Zykova, S.N., Jenssen, T.G., Berdal, M., et al. (2000). Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. *Diabetes*, 49:1451–1458.
214. Grotendorst, G.R., Martin, G.R., Pancev, D., et al. (1985). Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. *J Clin Invest.*, 76:2323–2329.
215. Galiano, R.D., Teper, O.M., Pelo, C.R., et al. (2004). Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol.*, 164:1935–1947.
216. Miyagami, M., Katayama, Y. (2005) Angiogenesis of glioma: evaluation of ultrastructural characteristics of microvessels and tubular bodies (Weibel–Palade) in endothelial cells and immunohistochemical findings with VEGF and p53 protein. *Med Mol Morphol.*, 38:36–42.
217. Stojadinovic, O.K.A., Golinko, M., Tomic-Canic, M., et al. (2007). A novel, non-angiogenic mechanism of VEGF: Stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. *Wound Repair Regen.*, 15:21-30.

218. Brock, T.A., Dvorak, H.F., Senger, D.R.(1991). Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol.*, 138:213–217.
219. Banks, R.E., Forbes, M.A., Kinsey, S.E., et al.(1998). Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: Significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*, 77:956–960.
220. Nogami, M., Hoshi, T., Kinoshita, M., et al. (2007). Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound. *Med Mol Morphol.*, 40:82–87.
221. Brem, H., Folkman, J.(1994). Angiogenesis and basic fibroblast growth factor during wound healing. In: Friedlander GE, Lane JM, Eds. *Bone Formation and Repair*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons., 213–222 pp.
222. Frank, S., Hubner, G., Breier, G., et al.(1995). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.*, 270:126-234.
223. Nissen, N.N., Polverini, P.J., Koch, A.E., et al.(1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol.*,152:1445-1450.
224. Peters, K.G., De Vries, C., Williams, L.T.(1993). Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* , 90:8915-8920.
225. Shukla, A., Dubey, M.P., Srivastava, R., et al.(1998). Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Commun.*, 244: 434-460.
226. Altavilla, D., Saitta, A., Cucinotta, D., et al. (2001). Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis. *Diabetes*, 50:667–670.
227. Duraisamy, Y., Slevin, M., Smith, N., et al.(2001). Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated

- signal transduction pathways in vascular endothelial cells: Possible relevance to wound healing in diabetes. *Angiogenesis*, 4:277–288.
228. Mellin, T.N., Cashen, D.E., Ronan, J.J., et al. (1995). Asidik fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice. *J.Invest Dermatol.*, 104:850-855.
229. Takenaka, H., Kishimoto, S., Tooyama, I., et al. (1997). Protein expression of fibroblast growth factor receptor-1 in keratinocytes during wound healing in rat skin. *J Invest Dermatol.*, 109:108–112.
230. Hauges, S. (1997). Differential expression of the FGFR multigene family in normal adult tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45(7):1005-1019.
231. Hamada, T., Suda, N., Kurado, T. (2002). Immunohistochemical localization of FGFR in the rat mandibular condylar cartilage and tibial cartilage. *J. Bone Miner Metab.*, 17:274-282.
232. Komi-Kuramochi, A., Kawano, M., Oda, Y., et al. (2005). Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *Journal of Endocrinology*, 186:273–289.
233. Takenaka, H., Yasuno, H., Kishimoto, S.(2002). Immunolocalization of fibroblast growth factor receptors in normal and wounded human skin. *Arch Dermatol Res.*, 294:331–338.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 06/04/1980
Medeni Hali	Evli-Bir kız çocuk annesi
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	zinan@cumhuriyet.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Lisesi, 1998
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2005
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2006

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma görevlisi, 2008

Ödüller, Teşvikler ve Üyelikler

Bu çalışma (T354), CÜBAP tarafından desteklenmiştir.

EK-1

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DENEY HAYVANLARI
ETİK KURULU

Sayı : :B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/214
Konu : Hayvan Etik Kurul Hk.

01/11/2007

Sayın Doç.Dr.Serpil ÜNVER SARAYDIN

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA;

01/11/2007 tarih ve 113 sayılı "Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda chitosan'ın yara iyileşmesine etkisi" isimli Yüksek Lisans Tezi Araştırma Projesi Etik Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Erol SEZER(üye)

Doç.Dr. Sinan GÜR SOY (üye)

Prof.Dr. Dilek ÖZTÜRK (üye)

Yrd.Doç.Dr. İhsan HUBBEZOĞLU (üye)

Doç.Dr. Tamer ERSEL CAN (üye)

Yrd.Doç.Dr. Yavuz SİLİĞ (üye)

Doç.Dr.Eray BULUT (üye)

Uzm.Vet.Dr. Yücel YALMAN(Başkan Yrd.)

Yrd.Doç.Dr.Ersin TUNCER (üye)

Doç.Dr. M.Kemal YILDIRIM (Başkan)

EK-2

Dominiçi boyası ile mast hücreleri gösterimi;

Solüsyon 1:

%0.5 Eozin Y 100ml

%0.5 Orange G 100ml

Bu ikisi karıştırılır.

Solüsyon 2:

%0.5 Tol.Blue 100ml

Solüsyon 1 de 7 dk bekletilir, hızla çeşme suyunda yıkanır, sol 2 de 20 sn bekletilir.

Yıkanır, kapatılır.