

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

DİYABETİK TAVŞANLARDA YAĞ DOKU KAYNAKLI  
KÖK HÜCRE LOKAL UYGULAMASININ  
İSKEMİK VE İSKEMİK OLMAYAN YARALARIN  
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr.Abdullah ÇALIK

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2021



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

DİYABETİK TAVŞANLARDA YAĞ DOKU KAYNAKLI  
KÖK HÜCRE LOKAL UYGULAMASININ  
İSKEMİK VE İSKEMİK OLMAYAN YARALARIN  
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr.Abdullah ÇALIK

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI

Prof.Dr.Aydan Ayşe KÖSE

ESKİŞEHİR

2021

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr.Abdullah ÇALIK'a ait 'Diyabetik tavşanlarda yağ doku kaynaklı kök hücre lokal uygulamasının iskemik ve iskemik olmayan yaraların iyileşmesi üzerine etkinliğinin araştırılması: deneysel çalışma' adlı çalışma jürimiz tarafından Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda tıpta uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

İmza

Jüri Başkanı Prof.Dr.Cengiz ÇETİN

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D.

Üye Prof.Dr.Aydan Ayşe KÖSE

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D.

Üye Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun  
ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

tarih

Prof. Dr. İ.Özkan ALATAŞ

Dekan

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde tüm bilgi ve deneyimleri ile bana rehberlik eden saygıdeğer hocalarım Prof.Dr.Cengiz ÇETİN'e, Prof.Dr.Aydan Ayşe KÖSE'ye, Prof.Dr.Yakup KARABAĞLI'ya, Doç.Dr.Atacan Emre KOÇMAN'a ve 5 yıl boyunca beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.Yine bu süreçte desteklerini esirgemeyen ve sürece katkıda bulunan Kök Hücre Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç.Dr.Ayla EKER SARIBOYACI'ya, Dr.Öğr.Üyesi Onur UYSAL'a ve beraber çalışma fırsatı bulduğum doktora öğrencilerine, son olarak da yalnızca bu dönem değil yanımda olduğu her zaman en büyük desteğim olan sevgili eşime, bugünlere gelmem de en önemli paya sahip başta annem ve babam olmak üzere değerli aileme sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

## ÖZET

**Çalık,A. Diyabetik tavşanlarda yağ doku kaynaklı kök hücre lokal uygulamasının iskemik ve iskemik olmayan yaraların iyileşmesi üzerine etkinliğinin araştırılması: deneysel çalışma. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2021.** Diyabetes mellitus dünya genelinde çok sayıda kişiyi etkileyen, ağır komplikasyonlara yol açan metabolik bir bozukluktur. Diyabetik ayak yaraları da bu komplikasyonlardan bir tanesidir. Literatürdeki çalışmaların deney modelleri, klinikte karşımıza çıkan diyabetik ayak yaralarını yansıtmaktan uzaktır. Çalışmamızda, kliniği oldukça iyi yansıtan deney modelimizde oluşturulan diyabetik, iskemik yaralar üzerinde tavşan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, rejeneratif, anjiyogenetik ve anti-inflamatuvar etkilerini analiz etmeyi amaçladık. Diyabetik ayak yaralarındaki nöropati ve anjiyopatiyi taklit etmek amacıyla deney modelimizde, tavşanların sağ kulaklarında damar ve sinir paketleri bağlanıp kesilirken, sol kulaklarının kontrol grubu olması amacıyla nörovasküler yapılar sağlam bırakıldı. Klinikte karşımıza çıkan yaralarda olduğu gibi kartilajın ekspoze olduğu, 6 mm çaplı sirküler yaralar oluşturuldu. Cerrahi prosedür sonrası mezenkimal kök hücre ve serum fizyolojik uygulamalarını takiben 7 ve 14.günlerde biyopsiler alındı. Bu biyopsilerde yara alan ölçümleri ve histolojik iyileşme parametreleri incelenerek, gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. Alan ölçümleri sonucunda mezenkimal kök hücre uygulanan grupların yara boyutlarında azalmanın diğer gruplara göre daha fazla olduğu tespit edildi. Histopatolojik incelemelerde de mezenkimal kök hücre uygulanan gruplarda granülasyon dokusu oluşumunda, anjiyogenezde ve re-epitelizasyonda artış izlendi. Bu gruplarda inflamasyon, konjesyon, hemoraji ve ödemde daha fazla azalma dikkat çekti. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızın literatüre önemli katkılar sağlayacağını ve yapılacak diğer çalışmalara yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Yağ doku, Yara iyileşmesi, Diyabetes mellitus.

Destekleyen Kurum: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, 2019-2610 A2 projesi.

## ABSTRACT

**Calik,A. Effect of Local Administration of Adipose Tissue Stem Cells on Ischemic and Non-Ischemic Wounds in Diabetic Rabbits: Research Study. Eskisehir Osmangazi University;School of Medicine; Department of Plastic,Reconstructive and Esthetic Surgery;Specialty Thesis in Medicine, Eskisehir, 2021.** Diabetes mellitus is a medical disease with severe complications, including diabetic foot ulcers, affecting a lot of people globally. There is not enough studies in the literature properly representing diabetic foot ulcers in experimental models in vivo. Therefore, in our study, we aimed to conduct an experimental study representing real-life clinical picture of diabetic ulcers. Regenerative, angiogenic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells (MSCs) of rabbit adipose tissue were observed and analyzed on chronic diabetic wounds. To mimic diabetic neuropathy and angiopathy of diabetic foot ulcers, the bundles of nerves and vessels were injured in the right ear of the rabbits where on the left they were left intact as the control group. Similar to diabetic ulcers seen in daily life, cartilage-exposed circular wounds which are 6 mm in diameter are formed. After the surgical procedure injuring the bundles on one side, injections of 0.9% saline and MSCs were performed. After these injections, biopsies are performed on the 7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day. In these biopsies, assessments of the wound areas and histopathological healing parameters were compared between saline and MSCs injected groups. After this comparison, it was seen that MSCs-injected group had more accelerated wound healing. Histopathologically,more granulation tissue formation and higher rates of angiogenesis and epithelization were seen in MSCs-injected group.Furthermore, less inflammation, congestion, hemorrhage and edema were seen in this group. As a result, in our study, we intend to make an important contribution to the literature and guide further studies in this field.

**Key Words:** Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Wound healing, Diabetes Mellitus.

**Supporting Institution:** Eskisehir Osmangazi University Scientific Research Projects, 2019-2610 A2 project.

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yara	3
2.1.1. Yara ve Yaraya Yaklaşımın Tarihçesi	3
2.1.2. Yara İyileşmesi	4
2.1.3. Yara İyileşmesinin Tipleri	11
2.1.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	13
2.2. Diyabetes Mellitus	14
2.2.1. Diyabetes Mellitus ve Metabolik Patolojiler	16
2.2.2. Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları	18
2.2.3. Diyabetes Mellitus ve Yara İyileşmesi	19
2.2.4. Diyabetik Ayak Yarası	20
2.2.5. Diyabetik Ayak Yaralarında Enfeksiyon Gelişimi	24
2.2.6. Diyabetik Ayakta Klinik Değerlendirme	27
2.3. Kök Hücre	29
2.3.1. Kök Hücrenin Tarihsel Gelişimi	30
2.3.2. Kök Hücre Türleri	31
2.3.3. Kök Hücre Kaynakları	33
2.3.4. Mezenkimal Kök Hücre Kavramı	34
2.3.5. Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Plastik Cerrahideki Yeri	36
2.4. Çalışmamızda Kullanılan Belirteçler	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40



3.1. Deney Aşamaları	40
3.1.1. Deney Hayvanları	40
3.1.2. Deney Grupları	40
3.1.3. Diyabet Oluşturulması	41
3.1.4. Deney Hayvanlarında Cerrahi Öncesi Anestezi Uygulaması	42
3.1.5. Cerrahi Prosedür	42
3.1.6. Kulaklarda Yara Oluşturulması	43
3.1.7. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması	43
3.2. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	45
3.2.1. Tavşan Yağ Dokusunun Diseksiyonu	45
3.2.2. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yağ Dokudan İzolasyonu ve Kültürü	45
3.2.3. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile İmmünofenotipik Analizi	45
3.2.4. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırma Analizi	46
3.3. Biyopsi Alınması ve Sakrifikasyon	47
3.4. Yara Alanlarının Ölçülmesi	47
3.5. Yara Dokularının Histolojik İncelemesi	48
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	48
4. BULGULAR	49
4.1. Kan Şeker Düzeyleri	49
4.2. Yara Alan Ölçümleri	50
4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	60
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	93

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABI	Ankle-brachial indeks
AGE	İleri glikozilasyon ürünleri
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CNO	Charcot nöropatik osteoartropatisi
CTAP	Kemokin bağ doku aktive edici peptid
DAG	Diaçilgliserol
DM	Diyabetes Mellitus
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF-2	Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü 2
GRO	Büyüme ile ilişkili onkogen
H&E	Hematoksilen eozin
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HLA	İnsan lökosit antijeni
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IL-1	İnterlökin-1
IL-4	İnterlökin-4
IL-8	İnterlökin -8
KİKKH	Kemik iliği kaynaklı kök hücre
kg	Kilogram
KGF	Keratinosit kaynaklı büyüme faktörü
LDGF	Lökosit kaynaklı büyüme faktörü
MCP-1	Monosit-makrofaj atraktan protein-1
mg	Miligram
MKH	Mezenkimal kök hücre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mm <sup>2</sup>	Milimetre kare

MMP	Matriks metalloproteinaz
MÖ	Milattan önce
NAP	Nötrofil aktive edici peptid
NF-KB	Nükleer transkripsiyon faktör kappa B
nmol	Nanomol
NO	Nitrik oksit
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platalet derive büyüme faktörü
PF 4	Platelet faktör 4
PMNL	Polimorfonüveli lökosit
RAGE	İleri glikozilasyon ürünleri reseptörü
RANKL/OPG	Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B ligand/Osteoprotegerin
SF	Serum fizyolojik
SOD	Süperoksid dismutaz
tAD-MKH	Tavşan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
TGF- b	Dönüştürücü büyüme faktörü b
TNF alfa	Tümör nekrozis faktör alfa
TXA2	Tromboksan A2
UCP	Proton gradientini azaltan kenetlenmeyi bozucu protein
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
vWF	Von willebrand faktör
YDKKH	Yağ doku kaynaklı kök hücre
µmol	Mikromol

## ŞEKİLLER

	<b>sayfa</b>
2.1. Maillard reaksiyonu	17
2.2. Diyabetik ayak yarası patogenezi	21
2.3. Naylon monofilament testi	28
2.4. Pluripotent kök hücre	32
2.5. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri	33
2.6. MKH'lerin farklılaşma kapasitesi	35
3.1. Deney gruplarının oluşturulduğu 4-6 aylık, sağlıklı, erkek Yeni Zelanda tavşanı	41
3.2. Tavşan kulağının nörovasküler haritası ve insizyon planı	43
3.3. Nöropati ve iskemiye bağlı kulakta düşme, hareket kaybı, renk değişikliği	44
3.4. Kulaklarda oluşturulan 6 mm çaplı dairesel yaralar	44
3.5. Yedinci gün biyopsi materyali	47
4.1. A ve C grubu ortalama kan şekeri düzeyleri	49
4.2. A grubu ilk 72 saat kan şekeri düzeyleri	50
4.3. C grubu ilk 72 saat kan şekeri düzeyleri	50
4.4. İskemik kulak yaraları 7.gün alan ölçümleri	51
4.5. İskemik kulak yaraları 14.gün alan ölçümleri	52
4.6. İskemik olmayan kulak yaraları 7.gün alan ölçümleri	53
4.7. İskemik olmayan kulak yaraları 14.gün alan ölçümleri	53
4.8. A grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm	56
4.9. B grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm	57
4.10. C grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm	58
4.11. D grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm	59
4.12. A grubu 7.gün Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri	62
4.13. A grubu 7.gün Masson's-Trichrome boyama görüntüleri	63
4.14. A grubu 14.gün Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri	64
4.15. A grubu 14.gün Masson's Trichrome boyama görüntüleri	65
4.16. B grubu 7.gün Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri	67
4.17. B grubu 7.gün Masson's Trichrome boyama görüntüleri	68
4.18. B grubu 14.gün Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri	69

4.19. B grubu 14.gün Masson's Trichrome boyama görüntüleri	70
4.20. C grubu 7.gün Hematoksilen-Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri	72
4.21. C grubu 14.gün Hematoksilen-Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri	73
4.22. D grubu 7.gün Hematoksilen-Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri	75
4.23. D grubu 14.gün Hematoksilen-Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri	76

**TABLÖLAR**

	<b>sayfa</b>
2.1. Ana ekstrasellüler matriks proteinleri	10
2.2. Sitokin ve büyüme faktörleri	12
2.3. IDF diyabet atlası 2015 yılı verileri ve 2040 yılı küresel tahminleri	15
4.1. İskemik kulak yaraları 7 ve 14.gün ortalama ölçüm değerleri	54
4.2. İskemik olmayan kulak yaraları 7 ve 14.gün ortalama ölçüm değerleri	55
4.3. Hematoksilen-Eozin boyaması teşhis kriterleri	60
4.4. Masson's Trichrome boyaması teşhis kriterleri	61

## 1. GİRİŞ

Deri ve/veya mukozanın; travma, cerrahi girişim, sistemik/lokal hastalıklar veya başka sebeplerle anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması ya da kaybı sonucu var olan fizyolojik özelliklerini geçici/kalıcı olarak kaybetmesine 'yara' denir [1-5]. Organizma doku hasarı sonucu dokunun yapı ve fonksiyonunun düzeltilmesi amacıyla bir onarım süreci başlatmaktadır. Bu süreç, yaralanma anından itibaren başlayan; günler, aylar hatta yıllar sürebilen dinamik bir süreçtir [1-6].

Diyabetes mellitus (DM), kan glikoz değerinin normal sınırlar dışına çıkacak şekilde yükselmesi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. DM nedeni olarak pankreastan salgılanan insülin hormonunun eksikliği veya etkisinin ortadan kalkması gösterilmektedir [7,8]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre ülkemizde 2000 yılında 2.920.000 olan DM prevalansı, 2030 yılında 6.422.000'e ulaşacaktır [9]. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin 2015 verilerine göre küresel sağlık harcamalarının %12 sini DM' a bağlı yapılan harcamalar oluşturmaktadır [10]. DM gibi kronik hastalıklar, bozulmuş immün yanıt, uzamış inflamasyon, büyüme faktör sentezinin azalması, ekstrasellüler matriks oluşumunda dengesizlikler/ yetersizlikler ile karakterizedir. Uzun süreli diyabetik hastalarda; anjiyopati, nöropati, nefropati ve retinopati gibi önce yavaş ve sinsi seyirli, sonrasında ise şiddetlenerek organ ve fonksiyon kayıplarına neden olan komplikasyonlar görülebilmektedir. Bu komplikasyonlarla beraber en sık karşılaşılan sorunlardan biri de diyabetik ayak yaralarıdır. Diyabetik yaralara enfeksiyon ilave olması sonucu, bu yaralar yıllarca iyileşmeyen kronik lezyonlara dönüşebilmekte ve insan hayatını tehdit edici boyutlara ulaşabilmektedir. Üstelik kronik diyabetik yaralar hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda önemli bir ekonomik yükü de beraberinde getirmektedir. Çoğu durumda yara debridmanı ve bakımı gibi konvansiyonel tedaviler uygulanmakta ancak bu tedaviler tatmin edici sonuçlar vermemektedir. Bu tedaviler hastaların tedavisini uzun, zahmetli ve çok masraflı hale getirmektedir.

Kök hücre, belli bir dokuya ait hücrenin karakteristik özelliklerini taşımayan, uygun sinyal ortaya çıkana kadar farklılaşmamış fenotipini koruyan hücredir. Kök hücreler, organizmanın tüm yaşamı boyunca, kendilerini yenileme özelliğine sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı in vitro kültürlerde kolaylıkla çoğalabilirler. Belirli biyolojik sinyaller altında fenotiplerinden tamamen farklı bir hücre tipine dönüşebilme

potansiyelleri mevcuttur. Kök hücre, doku ve organları yenileme anlamındaki üstün potansiyeli sayesinde, doku harabiyeti veya kaybı sonucunda ortaya çıkan pek çok hastalığın tedavisine yönelik tıp dünyasında ve toplumda büyük beklentiler sebep olmaktadır. İşte buradan yola çıkarak diyabetik ayak yaralı hastalarda iyileşmeyi hızlandıracak bir tedavi alternatifi pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Diyabetik yara iyileşmesini destekleyecek yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mezenkimal kök hücre çalışmaları da bunlardan bir tanesidir.

Diyabetik ayak yarasında olduğu gibi iskeminin yanı sıra nöropati de içeren, zemininde enfekte/kontamine avasküler kıkırdak veya kemik yapılar olan yaralar, klinikte gördüğümüz diyabetik ayak yaralarını daha çok temsil etme kapasitesi taşımaktadır. Buradan yola çıkarak mevcut çalışmalardaki eksik yönleri de tespit ederek, Chien ve Wilhelmi'nin tarif ettiği tavşan kulağında oluşturulan iskemik, nöropatik yara modelinin çalışmamız açısından en uygun model olduğunu tespit ettik [11]. Bu modelde diyabetik ve diyabetik olmayan tavşanlarda yara iyileşmesi karşılaştırılabilirken, aynı tavşanda iskemik-nöropatik/iskemik ve nöropatik olmayan yaraların karşılaştırmasının yapılabilmesi de çalışmanın kapsamını güçlendiren ve modeli klinikte karşımıza çıkan yaralara benzer hale getiren parametrelerdir. Çalışmamızda diyabetik hale getirilen tavşanların kulaklarında diyabetik, iskemik ve nöropatik yara modeli oluşturularak, bu yaralar üzerinde tavşan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif, anjiyogenetik ve anti-inflamatuar etkileri analiz etmeyi amaçladık.

Birçok özgün değer barındıran çalışmamızın; yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin diyabetik ve non diyabetik tavşanlarda iskemik nöropatik yara iyileşmesi üzerine etkisi konusunda literatüre önemli katkılar sağlayacağını düşünüyoruz. Araştırmamızdan elde ettiğimiz pozitif veriler kliniğe en yakın modelde test edilerek elde edilen verilerdir. Bu sebeple sonuçlarımız pre-klinik çalışma niteliğinde olup, klinik uygulamaya kolay adapte edilebilir sonuçlardır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yara

Deri ve/veya mukozanın; travma, cerrahi girişim, sistemik/lokal hastalıklar veya başka sebeplerle anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması ya da kaybı sonucu var olan fizyolojik özelliklerini geçici/kalıcı olarak kaybetmesine 'yara' denir [1-5].

#### 2.1.1. Yara ve Yaraya Yaklaşımın Tarihçesi

Yara ve yaraya yaklaşım insanlığın var olduğu tarihten itibaren var olmuştur. Eski Mısır döneminde Ebers papirüsleri içerisinde 900 kadar reçete olarak nitelendirilebilecek belgeye rastlanmıştır. Bu papirüslerde hint yağının, asilbent adlı maddenin yaralar/yanıklarda ilaç olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Yine bu dönemdeki belgelerde inflamatuvar ve enfeksiyöz süreçlere ait temel bulgulardan bahsedilmektedir [12-14].

Eski Yunan tıbbına bakıldığında Aesculapius döneminde zehirli olmayan yılanların tükrük salgıları, hastaların yara tedavilerinde kullanılmıştır. Hipokrat ise yaralarda katran kullanarak antisepsi kavramını ortaya çıkarmış, yarada primer ve sekonder iyileşmeyi ilk kez tanımlamıştır. Bazı belgeler M.Ö. 700'lü yıllarda savaş cerrahisi ve travmalardan bahsetmektedir [15]. Roma döneminde ise Celsus yara kavramından bahsetmiş; yaralarda debritman, yabancı cisimlerin uzaklaştırılması gerekliliği ve primer onarımı önermiştir [13]. Aynı eserinde travmatolojik bazı tablolar açıklanmıştır [15, 16].

Orta çağda ise Theodoric de Luca, asepsi ve antisepsi kavramlarına dikkat çekmiştir [16]. Fransız cerrah Guy de Chauliac da yara pansumanı ve iyileşme sürecinde beslenme kavramının önemi üzerinde durmuştur [12]. Ross Harrison büyük yaraların kapatılması amacıyla doku nakli fikrini ortaya atmış ve doku kültürü çalışmalarında bulunmuştur. Pasteur, Koch ve Fleming'in bakteriyoloji alanındaki çalışmaları da yara tedavisinde önemli adımlar olmuştur [12, 13].

Tarih boyunca yaraya yaklaşım konusunda olduğu gibi debritman ve antimikrobiyal ajanlar konusunda da gelişmeler olmuştur. Iodine ve gümüş 19.yüzyılda keşfedilerek yara tedavisinde kullanım alanı bulmuşlardır, debritman konusunda ise ilk adım larva tedavisi (maggot tedavisi) olup biyolojik bir yöntem olarak karşımıza

çıkıştır. Buna dair ilgili ilk bilgiler 16.yüzyıla aittir [17, 18]. Klorheksidin de 20.yüzyılda keşfedilerek yakın geçmişte kullanıma sunulmuştur. Türk dünyasında ise konuyla alakalı gelişmeler tarih boyu devam etmiştir. El-Zehravi hemostaz kavramından söz etmiş olup, İbn-i Sina'ya ait Kanun eseri dermatolojik patolojilerle alakalı bilgiler ve dönemin bu konuda etkili olduğu bilinen çok sayıda reçete de içermektedir [13].

### 2.1.2. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi birbiri ile iç içe geçen üç evreden oluşur; bunlar hemostaz ve inflamasyon evresi, proliferasyon evresi, maturasyon ve yeniden şekillenme (remodeling) evresidir.

Hemostaz ve inflamasyon doku hasarına karşı organizma tarafından verilen ilk yanıttır. Bu evrede meydana gelen başlıca olaylar; vasküler permeabilite artışı, yara alanına hücre kemotaksisi, sitokin salınımı ve büyüme faktörlerinin açığa çıkmasıdır. Hemostaz, yaralanma sonrası meydana gelen kanamaya yanıt olarak katekolamin salınımı ve takiben ortaya çıkan geçici vazokonstriksiyon ile başlamaktadır. Damar duvar bütünlüğünün bozulmasıyla ortaya çıkan subendotelyal kollajenlerin trombositlerle teması sonucu Hageman faktör (faktör XII) aktive olmaktadır. Bu aktivasyon da trombositlerin yara alanına göçüne ve sitokinlerin salgılanmasına yol açmaktadır [1-4, 6]. Aktive olmuş hageman faktör (faktör XII) major olarak dört ana biyokimyasal kaskadı aktifleştirmektedir; bunlar pıhtılaşma, kompleman sistemi ve kinin sisteminin aktifleşmesi, plazmin yapımı şeklinde sıralanabilir [1, 6]. Açığa çıkan tromboksan A2 (TXA2), vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonuna neden olarak trombosit tıkaçını meydana getirmektedir. Bu süreçte ortaya çıkan fibrin, hem bir bariyer görevi görmekte, hem de inflamatuvar hücre, fibroblast göçü için uygun bir saha hazırlamaktadır [2, 3]. Pıhtı oluşumu ile hemostaz sağlandıktan sonra, endotel hücrelerinden salgılanan histamin, prostoglandin E2, prostosiklin ve endotelyal büyüme faktörü aracılığı ile başlangıçtaki vazokonstriksiyonun aksine vazodilatasyon meydana gelmektedir [19, 20]. Yara bölgesinde bulunan mast hücreleri de salgıladıkları aktif aminler aracılığıyla çevre dokulardan yara alanına hücre göçünü uyarmaktadır. Polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) yara bölgesine göç etmesi sonucunda ise inflamatuvar medyatörler serbestleşmektedir [2, 3]. İnflamasyon evresinin, kapiller permeabilite artışıyla başladığı kabul edilmektedir. Trombositlerin

damar endoteli bazal membranına yapışıp fosfolipaz A2'yi aktive etmesiyle ekstrasellüler aralığa araziidonik asit serbestlenmekte prostoglandin E1 ve E2 salınımı artmaktadır [2, 3]. Alandaki kan akımının da artışı ve trombositlerden salınan kemotaktik faktörler aracılığı ile bölgeye yoğun inflamatuvar hücre göçü meydana gelmektedir. Trombositlerden salınan en önemli iki kemotaktik faktör trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü betadır (TGF-beta). İnflamasyonun neden olduğu artmış damar geçirgenliği, kompleman faktörler, interlökin-1, tümör nekroz faktör- alfa(TNF- $\alpha$ ), transforming growth faktör- $\beta$ , trombosit faktör 4 (PF-4) gibi kemotaktik maddeler, nötrofil kemotaksisini uyarmaktadır [2, 3]. Nötrofiller yara alanına vasküler permeabilite artışı ve kemotaktik uyaranlar sonucunda ilk gelen ve inflamasyonun erken fazında baskın olan hücrelerdir. Diapedez olayı sonucu sahaya gelen nötrofiller travmayı takiben 6 saat sonra yara da görülmekte ve ilk 24-48 saat boyunca yara alanında baskın olan hücre olmayı sürdürmektedir. Nötrofillerin yara yüzeyindeki ana görevleri; yabancı cisimlerin ve mikrobiyal ajanları fagosite etmek, proteaz salınımıyla yaralanma sebebi ile zarar gören hücre kalıntılarını debride etmek ve yara bölgesinden uzaklaştırmaktır [1-3, 19, 20]. Yara bölgesinde 2-3. günlerde monosit yoğunluğu görülmeye başlamaktadır. Nötrofil sayısındaki azalmayla beraber monosit/makrofaj sayısındaki artış dikkat çekmekte, makrofajlar 3-5. günlerde yara bölgesindeki hakim hücre haline gelmektedir. Aktif makrofajların yara bölgesinde bulunması yara iyileşmesi için oldukça önemli bir basamaktır. Makrofajların yara alanındaki hakimiyeti aynı zamanda inflamatuvar evrenin sonuna yaklaşıldığının ve proliferasyon evresinin başlayacağına da bir işarettir. Makrofajların yara iyileşmesindeki temel görevleri; ana hatları ile fagositoz ve antimikrobiyal etki, yara debridmanı, matriks sentezinin regülasyonu, hücre aktivasyonu ve anjiogenezdir [2-4].

Yara yüzeyine yakın bölgede yer alan nötrofil ve makrofajlar band paterni göstererek güçlü şekilde interlökin-8 (İL-8) eksprese etmektedir. İL-8 salınımı hipoksi, interlökin-1, tümör nekroz faktör alfa ve bakteriyal ürünler ile stimüle olmaktadır. Yara yüzeyinde pik düzeye ulaşan İL-8 yara kenarından keratinositlerin proliferasyonunu yani epitelizasyonu aktive etmektedir. Makrofajlar, fagositoz görevlerinin yanı sıra , aynı zamanda antijen sunumu, çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımından da sorumludur [1]. Ayrıca keratinosit ve fibroblast

aktivasyonunu, proliferasyonunu artırmakta [21], nötral proteazlar aracılığı ile plazminojenin plazmine dönüşüm reaksiyonunu düzenlemekte, kompleman ve pre-hageman faktörü aktive etmektedir [2-4]. Yara bölgesine lenfositlerin gelişi makrofajlarla birlikte ortaya çıkmaktadır. Aktivasyonlarından ve yara alanına göçlerinden makrofajlar sorumludur. Lenfositlerden salınan lenfokinler, fibroblast proliferasyonunu, migrasyonunu ve kollajen sentezini regüle etmektedir. Lenfositler immunolojik hücreler olmalarının yanında fibroblast büyüme faktör 2 (FGF 2) ve lökosit kaynaklı büyüme faktörlerine (LDGF) sahiptir.

Monosit-makrofaj atraktan kemokin (MCP-1); keratinosit, makrofaj ve endotel hücrelerince salınarak, yara alanına makrofaj, lenfosit ve mast hücre göçünü artırmaktadır. MCP-1 ekspresyonu yaralanmadan sonraki 1. haftada sınırlanmaktadır. İlk gün endotel hücre, mononükleer hücre kaynaklı iken 2. günden itibaren bazal tabaka kaynaklı keratinositler tarafından salınmaktadır. Yara iyileşmesinin bu safhasında mast hücre sayısı, proliferasyondan çok kemotaksi aracılığı ile yaklaşık 5 kat artmaktadır. Mast hücreleri salgıladıkları interlökin-4 (İL-4) ile fibroblast proliferasyonunu artırmakta, MCP-1 ve İL-8 salınımını sınırlayarak inflamasyonu azaltmaktadır. İnflamatuar fazın sonlarına doğru ortamdaki sitokin düzeylerinin düşmesiyle monosit/makrofajların ağırlıkta olduğu hücre infiltrasyonu giderek azalmaktadır. İnflamatuar faz, yaranın derinliğine ve genişliğine göre değişmekle beraber ortalama 3-5 gün devam etmektedir [6, 22].

Proliferasyon evresinde ise trombosit ve aktive makrofajlardan salınan sitokin ve büyüme faktörlerinin aracılığı ile fibroblast ve endoteliyal hücrelerin yara alanına göçü ve çoğalması ön plandadır. Travmadan sonraki 36-72. saatler içerisinde damar adventisyasına komşu mezankimal hücrelerin diferansiasyonu ile fibroblastlar ortaya çıkmaktadır. Fibroblastların yaraya göçünü uyaran ana sitokinler, makrofaj ve trombositlerden salgılanan; PDGF, TGF- $\beta$ , EGF ve fibronektin'dir [19]. PDGF; aynı zamanda nötrofillerin, makrofajların ve düz kas hücrelerinin kemotaksisini indüklemekte, fibroblast ve düz kas hücre mitojen aktivitesini artırmaktadır. TGF- $\beta$ , makrofajları indükleyerek FGF2, PDGF, TNF alfa ve İnterlökin-1 gibi sitokinlerin salınımını artırmaktadır. Yara bölgesindeki nekrotik dokuların temizlenmesi ve yaralanma bölgesine fibroblastların ulaşabilmesi için alandaki fibroblastlar, TGF- $\beta$ 'nin uyarımı ile ortama matrix metalloproteinaz (MMP) denen proteolitik enzimler

salgılamaktadır [19]. MMP-1, jelatinaz (MMP-2) ve stromelisin (MMP-3) ortamdaki nekrotik dokuların debritlemesini yapmaktadır. Fibroblast yoğunluğu, yara alanında yaklaşık 6. günde maksimum düzeye ulaşmaktadır. Fibroplazi safhası, fibroblastların aktivite gösterdiği ve bağ dokunun sentezlendiği evredir. Yara gerilim gücünde belirgin bir artış meydana gelmektedir. Bu fazda; epitel, fibroblast ve endotel hücreler yoğun izlenmektedir. Endotel hücreleri, venüllerin tomurcuklanması veya anjiyogenezle meydana gelen kapiller yapılardan meydana gelmektedir [1]. Fibroblastların ana görevi kollajen sentezidir [1, 4]. Kollajen sentezini uyaran sitokinlerin başında ise TGF- $\beta$ , PDGF ve EGF gelmektedir [23]. Kollajen sentezi yaralanmanın 5-7. günlerinde en üst seviye çıkmakta ve fibroblastlar kollajenin yanı sıra fibronektin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar gibi proteinler de sentezlemektedir [19]. Bu maddeler kollajen fibrillerinin kümelenmesi esnasında çapını ve büyüklüğünü etkileyerek bağ dokusunun fiziksel özelliklerinin oluşmasında rol oynamaktadır [1, 4]. Ekstrasellüler matriks sentezi 2-3. günlerde başlayıp, 15-20. güne kadar devam etmektedir. Bu dönemin en önemli hücre ürünü kollajendir. Vücut ısısında proteolitik enzimlerin etkisine dayanıklı olan kollajen, tüm vücut proteininin %30'unu oluşturmaktadır [1, 4].

Kollajenin yapısına bakacak olursak, üç polipeptit alt biriminden oluşan üçlü sarmal yapıdadır. Polipeptit alt birimler olan  $\alpha$ -zincirler, bir ortak eksen etrafında dönerek 3000 amstrong uzunluğunda ve 15 amstrong çapında katı bir çubuk benzeri molekül oluşturmakta; bunlar da fibrilleri meydana getirmektedir. Fibriller de kümelenerek fiberleri oluşturmaktadır. Kollajen moleküllerinin ikinci bir özelliği ise, aminoasit dizisinin tekrarlayan tripeptit olmasıdır. Birinci aminoasit glisin, ikincisi genelde prolin, üçüncüsü ise hidroksiprolindir [24, 25]. Sağlam deride %80-90 tip-I kollajen geri kalan %10-20'lik kısmı ise tip-III kollajen oluştururken, granülasyon dokusunun %30'u tip-III kollajenden oluşmaktadır [19].

Doku kaybı olan yaralarda, sıvı kaybını engellemede ve enfeksiyona karşı bariyer oluşumunda epitelyal hücre artışı oldukça önemlidir. Epitelizasyon, primer kapanan yaralarda, yaralanmadan hemen sonra başlamakta ve 24-48 saat içinde tamamlanmaktadır [19]. Yaranın temiz ve nemli, bazal laminanın hasarlı olmadığı durumda epitelizasyon süresi oldukça kısalmaktadır. Epitelizasyonda, EGF, TGF- $\alpha$ , platelet kaynaklı EGF ve keratinosit growth faktör (KGF) etkili olmaktadır. Epitelyal

hücrelerin migrasyonu için uyarıcı olan en önemli faktörler; ekstraselüler matriks sentezi, büyüme faktörleri ve yaranın oluşturduğu elektriksel alandaki değişikliklerdir. Tam kat yaralarda epitel yalnızca yara kenarlarından ilerlerken, tam kat olmayanlarda epitelizasyonun yanı sıra dermal eklerde de çoğalma görülmektedir. Fibroblastların yara alanına ulaşması anjiyogenezle paralel seyretmektedir. Gerek serum gerekse yaranın sekresyon sıvısı, hem fibroblastlar hem de endotelial hücreler için kemotaktik etki göstermektedir [1]. Aktif makrofajlarca ortaya çıkarılan anjiyogenetik maddelerin indüklemesi aracılığı anjiyogenez olayı ortaya çıkmaktadır [9]. Anjiyogenez olayı dördüncü günde belirginleşmekte ve yara iyileşmesinin sonuna kadar devam etmektedir. Ana uyarıcısı vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve FGF-2'dir [1-4, 9]. Erken dönemde trombositlerce salgılanan transforming büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) ve PDGF de dolaylı olarak anjiyogenez uyarılmaktadır [2, 3, 9]. Kemokinler, İL-8, büyüme ile ilişkili onkogen- $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ), GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$ , kemokin bağ doku aktive edici peptid 3 (chemokine-connective tissue- activating peptide 3: CTAP3),  $\beta$ -tromboglobulin ve nötrofil aktive edici peptid-2 (NAP-2) in vitro endotelial hücre proliferasyonunu ve in vivo anjiyogenez uyarılmaktadır. Makrofajlar salgıladıkları TNF- $\alpha$  ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleriyle anjiyogenezde de anahtar rol oynamakta ve NO sentezini sağlamaktadır [1, 26].

Açık yaralarda granülasyon dokusu, hasardan yaklaşık 5 gün sonra yeni damar oluşumu ile başlamaktadır. Yeni kan damarlarının yanında makrofaj, fibroblast ve gevşek bağ dokusu içermektedir. Granülasyon dokusunda hemen her zaman bulunan makrofajlara ek olarak uygun kemotaktik uyarı varlığında nötrofil, eozinofil, mast hücreleri ve lenfositler de görülebilmektedir.

Yara kontraksiyonu primer kapanan yaralar için daha az önemli olmakla beraber sekonder iyileşmeye bırakılan yaralar için büyük önem arz etmektedir. Bu evrenin ilerleyen aşamalarında makrofajlar tarafından stimüle edilerek yara kenarından veya kemik iliğinden gelen fibroblastların bazılarının miyofibroblastlara dönüştüğü görülmektedir [27]. Granülasyon dokusunun gelişimi ile eş zamanlı olarak yara kontraksiyonu da ortaya çıkmaya başlamaktadır [1, 4, 19]. Özellikle de doku kaybı olan yaralanmalarda, aktin filamentlerinden zengin miyofibroblastlarca başlatılan yara kontraksiyon hareketi, yaranın lokalizasyonuna bağlı olmakla beraber günlük 0,6-0,7 milimetrelilik kontraksiyonlar şeklinde yara kenarlarını yaranın geometrik merkezine

doğru çekmektedir [19]. İlerleyici kontraksiyon yara boyutunu küçültmekte, ilerleyen epidermis granülyasyon dokusunu tamamen örtmektedir. Primer kapanan yaralarda myofibroblastlar, yaralanmanın 4-6. günlerinde yaranın santral bölgesinde ortaya çıkmakta ve 2-3 hafta sonra kaybolmaktadır [19]. Yara kontraksiyonu hücre aracılı bir durum olup kollajen sentezine ihtiyaç duymamaktadır. Yara kontraksiyonunda TGF- $\beta$  anahtar rol oynamaktadır. Epitelizasyon, aktif makrofajlar, trombositler ve keratinositlerden salgılanan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ :TGF- $\alpha$ ) tarafından stimüle edilmektedir [28]. Epitelizasyonu düzenleyen diğer faktörler, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi, epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi ve hepatosit büyüme faktörü (HGF)'dür. Bunlar, keratinositlerin migrasyonu, proliferasyonu ve yaşayabilirliğini, stimüle eden tirozin kinaz reseptörünün ligandlarıdır [27]. İn vitro çalışmalar İL-8'in insan keratinosit migrasyonunu ve proliferasyonunu stimüle ettiğini göstermektedir. İnsizyonel yaraların iyileşmesinde İL-8, epidermal defekti kapatmak için yara kenarından keratinositlerin göç ettiği yerde yara yüzeyi boyunca oldukça yüksek seviyede eksprese edilmektedir [29]. Yara yüzeyinin örtülmesinin tamamlanmasını takiben epidermis keratinize olmaya başlamaktadır.

Maturasyon ve remodeling evresi;kollajenin ortaya çıkması ile başlayan ve ana özelliği kollajen depolanması, kollajenin organize olarak bir aç yapı oluşturması olan evredir. Bu evrede hücresele ve vasküler olarak oldukça zengin olan doku, daha az hücre ve vasküler yapı içeren skar dokusu ile yer değiştirmektedir. Evrenin sonunda kollajen depo miktarı, oranı ve kalitesi ile bağlantılı olarak iyi ya da kötü skar dokusu oluşabilmektedir. Yara gerilim kuvveti de bu evrede gelişmektedir. Endotel hücrelerinin büyük kısmı, makrofajlar ve miyofibroblastlar apoptozis yoluyla giderek azalırken yarada fibroblastlar tarafından sentezlenen ilk kollajen olan tip III kollajen ortaya çıkmaktadır. Bu kollajen, organize olmamış ve daha çok jel kıvamındadır. Bu fazda tip III kollajen giderek yıkılmakta ve yerini tip I kollajene bırakmaktadır. Oluşan bu yeni kollajen lifleri uygulanan stres çizgilerine uygun dizilerek ve organize olmaktadır [19]. Yara alanında ortaya çıkan kollajen lifler, önce kendi aralarında kovalent bağlarla bağlanmakta ardından çevre dokularda yer alan kollajen liflerine bağlanmaktadır. Ortaya çıkan yara iyileşme dokusunun gerginliği, sağlamliğı ve mekanik etkilere karşı vereceği tepkilerde en önemli faktör kollajen miktarı ve bunun

niteliğidir. Kollajen miktarı, çapraz bağlanma yoğunluğu ve yapım yıkım arasındaki denge yaranın gücünü belirlemektedir. Kopmaya karşı direnç ile kollajen fibrillerinin kalınlığı arasında ise doğru orantı vardır. Kollajen fibrillerin yerini daha fazla moleküller bağ içeren organize fibrillerin alması ile gerim kuvveti yavaş yavaş artmaktadır [1, 2, 4].

Olgunlaşma fazının süresini; hastanın yaşı, genetik yapısı, yaranın tipi, vücuttaki yerleşimi ve inflamasyon periyodunun süresi/yoğunluğu gibi birçok faktör belirlemektedir. İyileşme ilerledikçe kollajende artış, fibroblast ve damar sayısında azalma gerçekleşmektedir. Damarların büyük kısmı trombozis ve dejenerasyon gelişmesiyle sahadan uzaklaşmaktadır.

Tablo 2.1. Ana ekstrasellüler matriks proteinleri [30].

Kollajen
Laminin
Fibronektin
Vitronektin
Matriks proteinleri; Trombospondin, Tenaskin, SPARC(Secreted protein acidic and rich in cysteine)

Gelişen skar dokusu başlangıçta pembe parlak görünümündedir, ileriki aylarda vasküler yapıların azalması ile giderek solmaktadır [1, 4]. Cerrahi açıdan yara iyileşmesinde meydana gelebilecek bütün morfolojik ve kimyasal olayların en önemli sonucu, yara gerilim kuvvetinin normal doku düzeyine gelmesidir. Ancak yara gerilim kuvveti hiçbir zaman normal derinin % 80'ini geçmemektedir. Deri elastisitesi ve enerji absorpsiyon kapasitesi dokunun yara oluşumundan önceki seviyesine hiçbir zaman dönmemektedir [1, 4, 19]. Yara iyileşmesinin tüm safhaların sonunda yaralarda morfolojik olarak üç ana özellik olan; bağ dokusu birikimi, yara kontraksiyonu ve epitelizasyon sağlanmasıyla yara iyileşmesi süreci tamamlanmaktadır [1-4].



### 2.1.3. Yara İyileşmesinin Tipleri

Yara iyileşmesinin primer, sekonder ve tersiyer yara iyileşmesi olarak adlandırılan 3 tipi bulunmaktadır. Primer yara iyileşmesi; yarada epitel ve bağ doku kaybının az olduğu, bazal membran gibi doku yapısal elemanlarının göreceli olarak az etkilendiği ve yara kenarlarının cerrahi yöntemler kullanılarak uc uca getirilerek kapatılması esasına dayanan yara iyileşmesidir [1]. Primer yara iyileşmesinde insizyona komşu epidermis bazal tabakasında proliferen olan keratinositler önemli rol oynamaktadır [1, 4, 31]. Yara dudaklarındaki epidermis dokusu primer kapama sonrası saatler içinde kalınlaşmakta, kesi boyunca insizyon hattının derinine doğru ilerlemekte ve yaklaşık 48 saatin sonunda fibrin tabakanın dış ortamla teması sonrasında gelişen yüzeyel krut benzeri tabakanın altında birleşmektedir. Bu ince tabaka bakteriyel invazyon için bariyer görevi görmektedir. 3. günden itibaren ise makrofajların yara ortamında görülmesi ile kollajen sentezi başlamakta, 5. günde kollajen sentezi yoğunlaşmakta ve her iki yara dudağı arasındaki kollajen lifler arası bağlar oluşmaktadır. Epitel bu aşamada matüre olmakta ve maturasyonun sonunda üzeri sağlam epidermis ile kaplı, inflamatuvar hücre içermeyen, insizyon hattı boyunca deri eklerinin görülmediği skar dokusu ortaya çıkmaktadır.

Sekonder yara iyileşmesi; yoğun inflamatuvar durum, ülserasyon, abse oluşumu ya da fazla miktarda epitel ve bağ doku kaybı gibi durumlarda meydana gelen yara iyileşmesidir. Sekonder iyileşme süreci daha uzun süre gerektirmektedir. Yara iyileşmesi yara dudaklarının kontraksiyonu ve yüzey epitelizasyonu temelinde gerçekleşmektedir. Primer iyileşmeden farklı olarak burada ortamdaki uzaklaştırılması gereken nekrotik doku ve eksuda varlığı nedeniyle inflamatuvar yanıt daha şiddetli olmaktadır. İnflamasyonun şiddetli olması, parankimal hücrelerde rejenerasyonun olmaması ya da yavaş olması ve doku defekti nedeniyle daha fazla granülasyon dokusu ile karakterizedir [1, 4].

Tersiyer yara iyileşmesi (gecikmiş primer yara iyileşmesi); başlangıçta yoğun inflamatuvar durum, ülserasyon, abse oluşumu ya da fazla miktarda epitel ve bağ doku kaybı gibi durumların olduğu çok ileri derecede enfekte ve nekrotik dokular içeren yaraların primer kapatılmayıp ancak 4-5 günlük açık yara olarak takip edilerek, bazı işlemlerden sonra sonra dolaşımın da iyi olduğu dokularda uygulanan yara iyileşmesi tipidir. Bu yöntem, yara yatağındaki inflamatuvar sürece, bakteri konsantrasyonunu en

aza indirmek için zaman tanımaktadır. Bu süreç tamamlandığında genellikle primer kapama uygulanmaktadır [1, 4].

Tablo 2.2. Sitokin ve büyüme faktörleri [30].

	SINIF	ÜRETİM	ETKİNLİK
İL 1,6,8	Sitokin	Makrofaj, keratinosit	Proinflamatuar (fibroblast ve keratinosit)
İL 2	Sitokin	T lenfosit	Fibroblast kemotaktik
TNF	Sitokin	Makrofaj	Proinflamatuar ve kollajen sentezi yardımcı
İL 4	Büyüme Faktörü	T lenfosit	TNF, İL 1, İL 6, Fibroblast proliferasyon inhibisyonu
FGF A-B	Büyüme Faktörü	Fibroblast, Makrofaj, T lenfosit, endotelial hücre	Fibroblast kemotaksis ve proliferasyonu, Anjiogenez
KGf 1, 2	Büyüme Faktörü	Fibroblast	Keratinosit bölünmesi ve diferansiyasyonu situmulasyonu
PDGF AA BB, AB, diğerleri	Büyüme Faktörü	Fibroblast, Makrofaj, trombosit, endotelial hücre	Nötrofil-fibroblast kemotaksisi, anjiogenez uyarılması, MMP upregülasyonu
TGFALFA-BETA	Büyüme Faktörü	Fibroblast, Makrofaj, trombosit, keratinosit, T lenfosit	Nötrofil-keratinosit kemotaksisi, anjiogenez, TIMP upregülasyonu, MMP inhibisyonu, keratinosit proliferasyonu ve TGFb üretimi
VEGF	Büyüme Faktörü	Fibroblast, Makrofaj, trombosit, endotelial hücre, keratinosit	Anjiogenez, endotelial hücreler için mitojenik etki
TIMP	Büyüme Faktörü	Mezenkimal hücrelerin çoğunluğu	MMP's inhibisyonu
MMP's	Büyüme Faktörü	Monosit, makrofaj, endotelial hücre	Ekstrasellüler matris degrade edilmesi
EGF	Büyüme Faktörü	Makrofaj, keratinosit	Keratinosit ve fibroblast proliferasyonu, keratinosit migrasyon uyarılması, skar doku formasyonunda

#### 2.1.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Klinik ve cerrahi uygulamalarda yara iyileşmesini etkileyen birçok lokal ve sistemik faktör bulunmaktadır. Günümüzde birçok alanda yapılan keşifler sayesinde yara iyileşmesinin birçok gizli yönü ortaya konulabilmiş bu bilgiler ışığında da moleküler düzeyde yorumlar yapılabilmektedir. Yara iyileşmesinde etkili olduğu düşünülen lokal ve sistemik faktörlere göz atacak olursak [1, 4, 25, 31];

Lokal faktörler;

- Yara alanının lokal kan akımı,
- Alanın iskemisi ya da alanda iskemiye yol açacak faktörler (vasküler patolojiler vb.),
- Enfeksiyon,
- Debritleme gerektiren nekrotik doku varlığı,
- Alanda yabancı isim varlığı,
- Ödem/artmış çevre doku basıncı,
- Yara yerinde hematoma veya seroma gelişmiş olması,
- Cerrahi teknikte yetersizlik ve/veya yanlış suture materyali ve bu materyale bağlı ortaya çıkabilecek reaksiyonlar,
- Sıkı pansumandır.

Sistemik faktörler ise;

- Doku perfüzyonunu etkileyen kardiyovasküler sistem hastalıkları,
- Kan oksijenizasyonunu etkileyen respiratuar sistem hastalıkları,
- Obezite ,
- Metabolik hastalıklar (üremi, kronik anemi) ,
- Endokrin hastalıklar (DM, hipotiroidizm) ,
- Renal ve hepatik hastalıklar ,
- Geriatric durum,
- Hipotermi ,
- Ek romatizmal veya otoimmün sebepli hastalıklar,
- SIRS veya sepsis tablosu,
- Beslenme bozuklukları (protein-kalori eksikliği, vitamin eksikliği, eser element eksikliği vb.) ve dehidratasyon ,
- Sigara ve kronik alkol kullanımı,
- Kortikosteroid kullanımı,

- İyonize radyasyon maruziyeti ya da öyküsü,
- Kemoterapotik ilaçlar (kolşisin, metotreksat, 5-florourasil, siklofosamid vb.) ,
- Non steroid anti-inflamatuar ilaçlar,
- Bağ doku bozukluğuna sebep olan hastalıklardır (kutis laxa, ehler-danlos sendromu, osteogenezis imperfekta, marfan sendromu) [1, 4, 25, 31].

İyi bir yara iyileşmesi için, tedavi yöntemlerinin uygulanmasının yanı sıra bu süreci olumsuz etkileyecek faktörlerin de ortadan kaldırılması veya kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu faktörler arasında oldukça sık karşımıza çıkan DM, yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen en önemli hastalıklardan bir tanesidir [32]. Yara iyileşme süreçlerinde aksaklıklara sebep olan DM, klinikte sıklıkla yara iyileşmesinde problemlerle ve hastalığın etkileri sebebiyle yeni yaralarla karşımıza çıkmaktadır.

## 2.2. Diyabetes Mellitus

DM, kan glukoz değerinin anormal bir şekilde yükselmesi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. DM nedeni olarak pankreastan salgılanan insülin hormonunun eksikliği veya etkinliğinin ortadan kalkması olarak gösterilmektedir [7, 8]. Hastalık, kalıtsal ve edinsel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan ve insülin hormon aktivitesindeki yetersizliğe bağlı gelişen hiperglisemi ve dokularda oluşan metabolik anomaliler ile karakterizedir [33, 34]. DM zamanla nörovasküler yapılar, kardiyak sistem, gözler ve renal sisteme ciddi zararlar vermekte ve bu zararlar geri dönüşsüz olmaktadır [7, 8].

DSÖ'nün 2018 yılı verilerine göre tüm dünya çapında 422 milyon diyabet hastası bulunmakta ve her yıl 1.6 milyonu DM nedeni ile hayatını kaybetmektedir. Yine DSÖ verilerine göre ülkemizde 2000 yılında 2.920.000 olan DM prevalansı, 2030 yılında 6.422.000'a ulaşacaktır [9]. Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması)'nin saha araştırması 2010 verilerine göre Türkiye'de DM sıklığı %10'un üzerindedir ve TURDEP-I'e göre DM prevalansı %90 oranında artmıştır [35].

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin diyabet atlasına göre 2015'te;11 yetişkinden 1'i DM hastasıdır. 2 diyabetli yetişkinden 1'i ise (%46,5) DM hastası olduğunu bilmemektedir. Küresel sağlık harcamalarının %12'sini diyabet harcamaları oluşturmaktadır. 542,000 çocuk tip 1 DM hastasıdır. Ayrıca her 6 saniyede 1 kişi DM nedeniyle yaşamını yitirmektedir [10]. IDF tahminlerine göre 2040'da, 10 yetişkinden

1'i DM hastası olacaktır (toplam 642 milyon hasta). DM ve DM ile ilişkili hastalıkların sağlık harcamaları 802 milyar doları aşacaktır [10].

DM'un etiolojisi tam bilinmemekle beraber suçlanan birçok etyolojik faktör bulunmaktadır. DM genel olarak Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Tip 1 DM, insülin-bağımlı olarak bilinen tip, pankreasın yaşam için olmazsa olmaz bir hormon olan insülin üretememesinden kaynaklanmaktadır. Tip 1 DM daha çok çocuklukta ve ergenlikte ortaya çıkmakta ve zamanla etkileri daha şiddetlenmektedir. Tip 2 DM ise, insülin-bağımlı olmayan tip olarak bilinmekte ve vücudun pankreas tarafından üretilen insüline karşı anlamlı bir yanıt oluşturamamasından kaynaklanmaktadır. Tip 2 DM daha yaygın görülmekte ve dünyadaki tüm DM hastalarının %90'ını oluşturmaktadır. Daha çok erişkinlerde karşımıza çıkmasına karşın ergenlikte de görülme sıklığı son yıllarda artmaktadır.

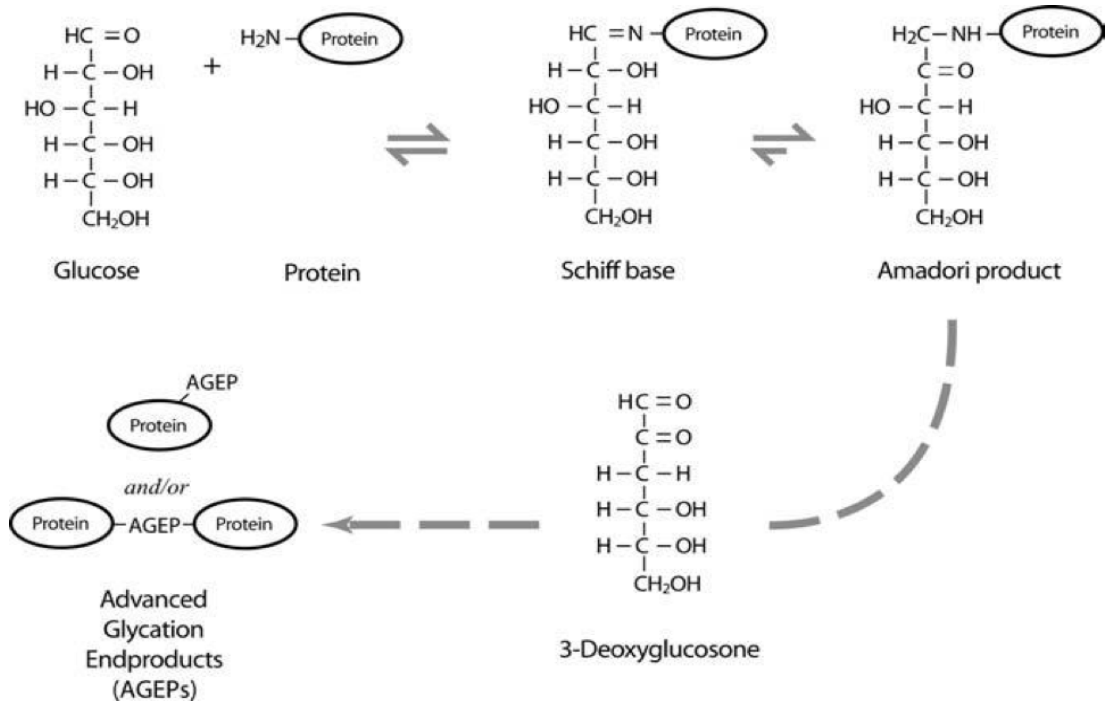
Tablo 2.3. IDF diyabet atlası 2015 yılı verileri ve 2040 yılı küresel tahminleri [10].

	2015	2040
Toplam dünya nüfusu	7,3 milyar	9,0 milyar
Yetişkin nüfus (20-79 aralığı)	4,72 milyar	6,16 milyar
Çocuk nüfusu (0-14 aralığı)	1,92 milyar	-
<b>Şeker hastalığı (20-79 aralığı)</b>		
Küresel prevalans	%8,8 (%7,2-11,4")	%10,4 (%8,5-13,5")
Diyabetli birey sayısı	415 milyon (340-536 milyon arası")	642 milyon (521-829 milyon arası")
Diyabete bağlı hayatını kaybedenlerin sayısı	5.0 milyon	-
<b>Diyabete bağlı sağlık harcamaları (20-79 arası)</b>		
Toplam sağlık harcamaları, R=2* 2015 ABD Doları	673 milyar	802 milyar
<b>Gebelikte hiperglisemi (20-49 aralığı)</b>		
Etkilenen canlı doğumların oranı	%16,2	-
Etkilenen canlı doğumların sayısı	20,9 milyon	-
<b>Bozulmuş Glukoz Toleransı (20-79 arası)</b>		
Küresel prevalans	%6,7	%7,8
Bozulmuş glukoz toleransı olan kişi sayısı	318 milyon	481 milyon
<b>Tip1 Diyabetliler (0-14 aralığı)</b>		
Tip1 diyabetli çocuk sayısı	542,000	-
Her yıl yeni teşhis konulanların sayısı	86,000	-

### 2.2.1. Diyabetes Mellitus ve Metabolik Patolojiler

DM'un tüm komplikasyonlarının temelinde; deneysel çalışmalar ve klinik gözlemlere dayanarak hiperglisemi ile bunun sebep olduğu hücresel hasarlar ve metabolik bozuklukların yattığı düşünülmektedir. Tüm bu süreçlerin temelinde ise birkaç biyokimyasal olay yatmaktadır. Bunlar; enzimatik olmayan glikozilasyon, poliol yolu aktivasyonu, protein kinaz C aktivasyonu, hekzosamin yolu artmış aktivitesi, mitokondrial elektron taşıma zincirinde süperoksit anyonu oluşumudur [36].

Enzimatik olmayan glikozilasyonda Maillard reaksiyonu denen ve sonucunda ileri glikozilasyon ürünleri (AGE) ortaya çıkan bir reaksiyon söz konusudur. Bu reaksiyon regüle olmayan ve dolaşımında yüksek miktarda yer alan glikoz ile dolaşım ve dokularda bulunan yapısal proteinler arasında gerçekleşmektedir [36, 37]. Bu reaksiyon spontan olarak ortaya çıkmakta şiddeti ise hipergliseminin boyutu ve süresine göre değişebilmektedir. AGE'ler transisyon metalleri ile etkileşime girerek serbest radikaller ortaya çıkarmakta ve doku hasarına neden olmaktadır. AGE'ler dokularda bazı proteinlere bağlanabilmektedir, 'AGE reseptörü' (RAGE) denen bu yapıların aktivasyonu sonucu, intrasellüler oksidatif stres ve nükleer faktör kapa B aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu aktivasyonun sonucunda ortaya çıkan proinflamatuvar sitokin artışı, vasküler permeabilite artışı, mikroanjiopati DM'un komplikasyonlarına zemin hazırlamaktadır [36, 37]. RAGE'ler, pek çok hücrede bulunmakla beraber yara iyileşmesi sürecinde oldukça önemli rol alan fibroblastlar, endotel hücreleri ve makrofajlarda yoğun miktarda bulunmaktadır.



Şekil 2.1. Maillard reaksiyonu.

Poliol yolunda ise yüksek glukoz konsantrasyonu durumunda, aldoz redüktaz enzim aktivitesi ile sorbitol üretimi meydana gelmektedir. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH gerekmektedir ve hücre içi NADPH miktarı bu yolağın çalışmasına bağlı azalmaktadır. Okside glutatyonun redükte forma dönüşümü ve NO sentezi için NADPH gerekli olup, sorbitol yolunun normalden daha aktif olması ve buna bağlı NADPH'ın azalması hücrenin antioksidan kapasitesini sınırlamaktadır. Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO'nin sentezinin azalması, DM'un komplikasyonlarının özellikle de vasküler komplikasyonların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır. Yine vazodilatör medyatörlerin kaybı endonöronal kan akımının azalmasına yol açmakta nöronlarda hipoksi ve iskemiye sebep olmaktadır. Bu durum sinirlerde duyu iletim aşamasında kusurlara sebep olmaktadır. Ayrıca sorbitolün doku toksisitesi de oldukça yüksektir. Tüm bu bilgiler ışığında polioliol yolundaki aktivite artışının DM'ta karşımıza çıkan önemli komplikasyonlar olan retinopati ve katarakt oluşumu, nöropati, nefropati ve kardiyovasküler olayların patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir [37, 38].

Protein Kinaz C aktivasyonu; hücre içi hiperglisemi durumunda glikoliz ara ürünlerinden olan gliseraldehit 3-fosfat,gliserol 3-fosfata indirgenmekte ve açillenmektedir. Diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C'nin aktivatörü olduğundan protein kinaz C aktivasyonu sonucunda damar permeabilitesi artmaktadır. Bu durum vazoaaktif hormonların geçişinde artış,kan akımında değişiklikler ortaya çıkarmakta, bazal membran sentezini artırmaktadır [36].

Artmış heksosamin yolağı aktivitesi; Fruktoz-6-fosfat, intrasellüler hiperglisemi durumunda glikoliz ile metabolize olamaz ve glukozamin 6- fosfata dönüşmektedir. Glukozamin 6-fosfattan N- asetil glikozamin oluşmakta,bu madde de TGF-1 ve benzeri faktörlerin sentezini aktive eden transkripsiyon faktörlerini modifiye ederek indüklemektedir. Hiperglisemi sonucu heksozamin yolu aktivasyonunun gen ekspresyonunda, proteinlerin üretim ve fonksiyonlarında değişikliklere neden olması DM komplikasyonlarına zemin hazırlayan bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır [36].

Mitokondriyal elektron taşıma zincirinde süperoksid anyonu oluşumu; gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe etmekte, bu inhibisyon glukoz ve glikoliz metabolitlerinin konsantrasyonlarının artmasına neden olmaktadır. Gliseraldehit 3- fosfattan parçalanma ile oluşan metil glioksalin artışı AGE'lerin artmasına neden olmaktadır [36]. Ayrıca mitokondride oluşan reaktif oksijen türevlerinin mitokondrial DNA'da hasara neden olduğu gösterilmiştir. Mitokondrial elektron transport sistem elemanlarından bazılarını kodlayan mitokondrial DNA'nın hasarlanması, bu elemanların yapılarının ve fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır. Hasarlı elemanlar nedeni ile normoglisemide bile süperoksid oluşumu artmaktadır.

### **2.2.2. Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları**

DM'un komplikasyonları, belirli bir sistemi etkileyebildiği gibi tüm vücudu etkileyen sistemik komplikasyonlar şeklinde de oldukça sık karşımıza çıkmaktadır.Bu komplikasyonlar genellikle akut ve kronik komplikasyonlar şeklinde birbirinden ayrılmaktadır.Akut komplikasyonlar; ketoasidoz , hiperosmolar nonketotik koma, laktik asidoz, hipoglisemiye sekonder koma iken kronik komplikasyonlar; diyabetik ayak sendromu, diyabetik dermopati, diyabet nefropatisi, diyabetik nöropati, diyabetik retinopatidir [36]. Bunlar arasındaki diyabetik ayak sendromu; ortaya çıkan diyabetik



ayak yaraları ve DM'un yara iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkilerine bağlı bu yaraların kronik sürece ilerlemesiyle ortaya çıkmaktadır.

### 2.2.3. Diyabetes Mellitus ve Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi moleküler düzeyde pek çok büyüme faktörünün organize ettiği inflamasyon, yeni vasküler yapılar, ekstrasellüler matriks dokusu ve örtücü epitel oluşumu ve remodeling süreçleri ile seyreden kompleks olaylar bütünüdür. Birçok doku tabakasının yenilenmesini gerektiren dinamik bir süreç olduğu bilinmektedir. DM gibi kronik hastalıklarda bozulmuş immün yanıt, uzamış inflamasyon, büyüme faktör sentezinin azalması, ekstrasellüler matriks oluşumunda dengesizlikler/yetersizlikler bu kompleks zincirin bozulmasına neden olmaktadır.

DM, yara iyileşmesi için çok önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmesine rağmen yara iyileşmesini hangi mekanizmalarla aksattığı halen kesin şekilde ortaya konulamamaktadır. Bu sebeple konu yeni çalışmalara açık bir alandır [33]. Yara iyileşme bozukluklarının, hipergliseminin hücre davranışları üzerindeki etkileri sebebiyle ortaya çıkmakta olduğuna dair güçlü deliller bulunmaktadır [34]. Diyabetik hastalarda görülen yetersiz yara iyileşmesinin inflamatuvar faz sırasındaki anormal doku cevapları ile ilgili olduğu düşünülmektedir [33, 39]. Yara iyileşme sürecinde diyabetik insanlarda ve hayvan modellerinde yapılan bir çok çalışma; inflamatuvar faz, fibroblast çoğalması, kollajen birikimi, hücrelerarası matriks farklılaşması, ve yara kontraksiyonu gibi aşamalarda bozukluklar olduğunu göstermektedir [39]. Azalmış anjiyogenezin yol açtığı hipoksi ve enfeksiyon riskinin artışı dışında DM hastalarında yara iyileşmesinde bahsedilen problemlerin çoğu inflamatuvar fazdaki aksamalardan kaynaklanmaktadır. DM hastasında inflamasyon fazında yara bölgesinde hücre birikiminin azalması inflamatuvar mediyatörlerin azalmasına neden olmaktadır. Bu periyodun dengesi yara iyileşmesinin temelini oluşturmaktadır [30]. Yine DM hastalarının %98'inde kapiller endotelin bazal membranında fonksiyon bozukluğu sebebiyle vazodilatasyon cevabı bozuktur [32].

Ayrıca diyabetik hastalarda hasarlı endotel tamiri esnasında hücre içi yüksek glikoz düzeyleri endotel hücrelerince bazal membran sentezini indüklemekte, böylece aşırı protein birikimi sonucu oluşan bazal membran kalınlaşmaktadır. Bu kalınlaşmadan dolayı kapiller geçirgenlik, lökosit ve eritrosit göçü azalmaktadır [32]. Yara bölgesine gelen inflamatuvar hücrelerin yara alanını terk etmeleri gecikmekte ve

kronik inflamasyon süreci ortaya çıkmaktadır [39, 40]. Bozulan hücresel fonksiyonlar sonucunda yara iyileşmesi sürecinde bozuk yapıda bir granülasyon dokusu ortaya çıkmaktadır [32, 40-42].

DM'da glukokortikoid miktarının arttığı ve glukokortikoidlerin, prokollajen mRNA üretimini, tip I ve tip III kollajen üretimini negatif yönde etkilediği bilinmektedir [43]. Ayrıca MMP üretiminin arttığı ve matris metalloproteinaz doku inhibitörlerinin üretimini azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [34, 44]. Yani bu hastalarda MMP seviyelerinde artış, MMP'leri ve inhibitörleri oranında artış, sitokin seviyesinde artış, prokalsitonin seviyesinde artış görülmektedir.

Tüm bunlar dışında DM'a bağlı immun fonksiyon bozukluğu da yara iyileşme sürecindeki aksaklıklara katkıda bulunmaktadır. Yara iyileşme sürecindeki bu aksaklıklar sebebiyle DM'lu hastalarda; yara yeri dehisansı, hipertrofik skar ve keloid oluşumu, kronik ülser dönüşüm daha sık görülmektedir [25].

#### **2.2.4. Diyabetik Ayak Yarası**

Diyabetik ayak yarası, DM'un en önemli komplikasyonlarından bir tanesidir. DM'lu bir hastada nöropati ve / veya alt ekstremitenin periferik arter hastalığı ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır.

Diyabetik ayak yaraları, dermise veya daha derin dokulara uzanan epitel kaybı ile karakterize lezyonlardır. Bu yaralar çeşitli etiyolojik faktörlerden kaynaklanmakta ve organizmanın düzenli bir yara iyileşmesini hayata geçirememesi sonucu kronik sürece ilerlemektedir [45, 46].

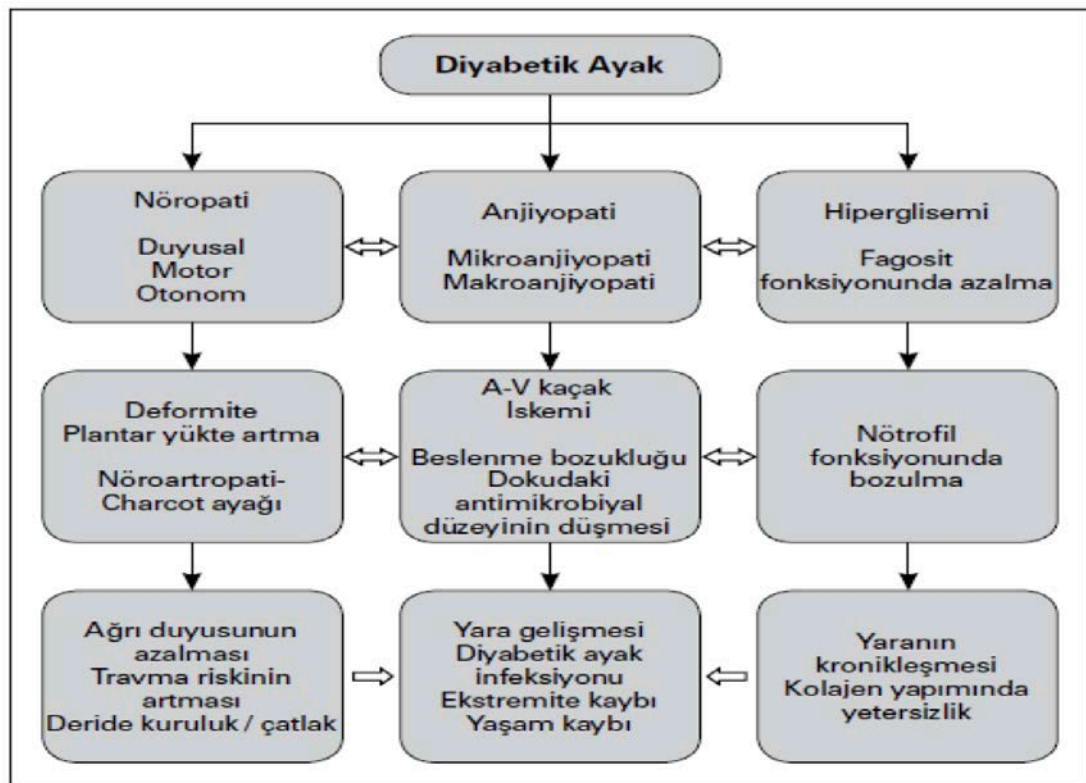
Diyabetik popülasyonda diyabetik ayak yarası prevalansı % 4-10'dur; bu oran yaş ile artış göstermektedir [47-49]. Diyabetik popülasyonun yaklaşık % 5'inin ayak yarası öyküsü olduğu tahmin edilmekte, bu hastalarda ömür boyu bu komplikasyonun gelişme riskinin % 15 olduğu tahmin edilmektedir [47-49].

Diyabetik ayak yarası için risk faktörleri; ayak yarası öyküsü, alt ekstremitte amputasyon öyküsü, periferik vasküler hastalık varlığı, yapısal deformitelerin varlığı, diyabetik retinopati varlığı, diyabetik nefropati varlığı (özellikle diyalize giren hastalar), diyabetik nöropati varlığı, kan şekeri regülasyonunun bozuk olması ve sigara kullanım öyküsüdür [50]. Bazı çalışmalar diyabetik ayak yarasının diyabetik erkeklerde kadınlara oranla daha sık görüldüğünü ifade etmektedir [51-53].

Diyabetik ayak yaraları % 60-80 oranında iyileşirken,% 10-15'i aktif kalarak kronik bir sürece devam etmektedir. Sadece nöropatik zeminde gelişen yaraların 20 haftalık bir süre içinde iyileşme olasılığı daha yüksekken, hem nöropatik hem iskemik zeminde gelişen yaraların iyileşmesi daha uzun zaman almakta ve amputasyona gidiş ihtimali daha yüksek olmaktadır [54].

Oluşan lezyonlar zamanında tedavi edilmediğinde iskeminin ilerlemesine sekonder nekrozlar meydana gelmekte, bu süreç de ampütasyonlara hatta ölüme dahi yol açabilmektedir [55]. Diyabetik hastalarda diyabetik olmayan hastalara göre gangren gelişme riski 17 kat daha fazla olup, Amerika Birleşik Devletleri'nde majör amputasyonların %66'sı diyabetik hastalarda uygulanmaktadır [37].

Üstelik kronik diyabetik yaralar hastanın yaşam kalitesini olumsuz bir şekilde etkilemekle kalmamakta, aynı zamanda ülkenin ekonomik yükünü de önemli derece arttırmaktadır. Çoğu durumda yara debridman ve bakımı gibi konvansiyonel tedaviler uygulanmakta ancak bu tedaviler tatmin edici sonuçlar vermemektedir. Bu tedaviler hastaların tedavisini uzun, zahmetli ve çok masraflı hale getirmektedir.



Şekil 2.2. Diyabetik ayak yarası patogenezi [56].

Diyabetik ayak yarası gelişme ve bu sürecin ekstremitte amputasyonu ile sonuçlanma riski yaş ve diyabete maruz kalma süresi ile artmaktadır [50, 57]. Diyabetik ayak yaralarının önlenmesi, hastanın yaşam kalitesini de artıracak ve sağlık sistemi üzerindeki ekonomik yükü de önemli oranda azaltacaktır [51].

Diyabetik ayak yarası patogeneğinde nöropati önemli bir role sahiptir ve bu süreçteki en erken karşımıza çıkan risk faktörüdür. Diyabetik ayak yarası görülen hastaların neredeyse tamamında görülen yaygın bir altta yatan faktördür [58, 59]. DM'daki sinir hasarı motor, duyu ve otonom lifleri etkilemektedir. Motor nöropati, kaslarda zayıflamaya, atrofiye ve pareziye neden olmaktadır; duyu nöropati, ağrı, basınç ve ısıya karşı koruyucu his kaybına yol açmakta; otonom disfonksiyon ise vazodilatasyona ve terlemenin azalmasına sebep olmaktadır [60]. Terlemenin azalması cilt bütünlüğünün bozulmasına neden olarak mikrobiyal enfeksiyona karşı mevcut bariyerden yoksun bir alana sebep olmaktadır [61]. Periferik diyabetik nöropatisi olan hastalarda, ayaklarda duyu kaybı; kişisel (nasırlar, tırnaklar, ayak deformiteleri) veya dış nedenlerden (ayakkabı, yanıklar, yabancı cisimler) dolayı tekrarlayan mikro travmalara sebep olmaktadır. Bu süreci özellikle periferik arter hastalığı olan hastalarda, yara oluşumu ve bunun enfeksiyonu takip edebilmektedir. Pes planus, halluks valgus, pençe ayak parmakları, charcot nöroartropati ve çekiç ayak gibi yapısal ayak deformiteleri de anormal plantar basınçlara sebep olmakta ve diyabetik ayak yarası oluşum sürecine katkıda bulunmaktadır. Diyabetik nöropatinin karşımıza çıkış şekli ise distal simetrik periferik nöropati, proksimal nöropati, kranial ya da trunkal nöropati veya mononöropati multipleks şeklinde olabilmektedir. En sık karşımıza çıkan şekli, %75 oranla distal simetrik periferik nöropatidir [62].

Diyabetik nöropati sürecinde uzun süreli DM hastalarında daha sık olmakla beraber karşımıza ilk olarak otonom nöropati çıkmaktadır. Otonom nöropati sebepli ortaya çıkan otosempatektomi; medial arter kalsifikasyonu, mikrovasküler termoregülasyonda bozulma ve arteriyovenöz şantlara neden olmaktadır. Küçük arterlerde ve ayak venlerinde meydana gelen vazodilatasyon, diüretiklerle düzelmeyen nöropatik ödem ve ısı artışına neden olmaktadır. Ayrıca ter ve yağ içerikli salgı bezlerinin de otonom uyarı sisteminin bozulması sonucu bezlerin aktivitesi azalmaktadır. Sonuç olarak deri kurumakta, solmakta ve elastikiyeti bozulmaktadır [63]. Etkilenen deride fissür oluşumu, hiperkeratoz meydana gelmekte, hasarlı

alanların çevresinde kallus formasyonu ortaya çıkmaktadır. Oluşan bu hiperkeratotik lezyonlar (kallus) yabancı cisim gibi davranarak ve plantar alanda ek bası ve travmalara sebep olmaktadır [64].

Duyusal nöropati; DM hastalarının %30-50'sinde,diyabetik ayak yaralı hastaların ise yaklaşık %78'inde karşımıza çıkan, diyabetik ayak yarası oluşumu için tanımlanan risk faktörleri arasında en belirleyici risk faktörüdür. Alt ekstremite distalinde belirgindir; tipik olarak çorap şeklinde dağılım göstermektedir. Parestezi ve hipersensitivite ile başlayan süreç, miyelinli liflerde yapısal değişiklikler sonucu tam duyu kaybı (yüzeysel, derin duyu) ile sonuçlanmaktadır [65]. Koruyucu ağrı duyusunun azalması ve ağrıya cevabın değişmesi sonucu hastanın farkına varmadığı mekanik veya termal travmalar ortaya çıkmakta, ayakta deri bütünlüğünün bozulması ile diyabetik ayak yaralarına zemin hazırlanmaktadır. Yürüyüş sırasında ortaya çıkan sürekli bası nedeniyle de iyileşme süreci sürekli sekteye uğramaktadır [66].

Motor nöropati süreci ise miyelinli motor liflerin aksonal dejenerasyonu sonucunda ortaya çıkmakta ve ayaktaki küçük intrensek ve interosseöz kaslarda zayıflık,atrofi oluşumuna sebep olmaktadır. Fleksör ve ekstansör kaslar arasındaki dengenin bozulması nedeniyle eklemlerin dinamik anatomisinde yapısal değişimler meydana gelmektedir [66]. Hastaların yaklaşık %50'sinde çekiç parmak, plantar fleksiyon, parmaklarda pençeleşme ve metatarsal yağ yastıkçığının distale kayması gibi yapısal değişiklikler ortaya çıkmaktadır [63, 67, 68]. Meydana gelen bu değişiklikler ve eklem hareketlerinde oluşan kısıtlılık, fizyolojik yürüme sürecinde bozulmalara, yürüme esnasında ortaya çıkan basıncın uygun şekilde dağıtılmasına ve basıncın absorpsiyonunun bozulmasına neden olmaktadır [66].

Periferik arter hastalığı, diyabetik hastalarda 2-8 kat daha yaygındır ve daha erken yaşta başlayarak, daha hızlı ve şiddetli seyir göstermektedir. Genellikle diz ve ayak bileği arasındaki vasküler segmentleri etkilemektedir. DM hastalarında ortaya çıkan bu sürecin kardiyovasküler hastalık için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve aynı zamanda ayak yarasına zemin hazırlayıcı olduğu kanıtlanmıştır [69]. Özellikle enfeksiyonla komplike olduğunda küçük yaralanmalar bile, ayaktaki dolaşım ihtiyacını arttırmakta ve yetersiz kan akımı, bu süreçte amputasyona yol açabilecek şekilde şiddetli diyabetik ayak yaralarına sebep olabilmektedir [51]. Diyabetik hastalarda etkilenen damar çapına göre periferik vasküler hastalık ve mikrosirkülatuar

damar hastalıkları ortaya çıkmaktadır [70]. Büyük çaplı damarlarda oluşan ateroskleroz sonucu gelişen periferik vasküler hastalık, iskemide gelişen diyabetik ayak yaralarının temel nedenlerinden biridir [65]. Tipik olarak diyabetik hastalarda infrapopliteal damarlar sık tutulmakta ve bu tutulum diffüz multisegmenter bir dağılım göstermektedir. Süreç diyabetin erken dönemlerinde başlamaktadır [71]. Mikrosirkülatuar damar patolojileri diyabete özgüdür. Bu durumun temelinde otonom nöropati yatmaktadır. Otonom nöropati sebepli küçük çaplı damarlarda yapısal ve fonksiyonel değişimler ortaya çıkmaktadır. Söz konusu değişiklikler bazal membran seviyesinde kalsifikasyon (Mönckeberg kalsifikasyonu) ve kalınlaşmayla karşımıza çıkmaktadır. Bu vasküler değişimler kapiller daralmaya neden olmamakla beraber bazal membrandaki kalınlaşma ve normal besin maddelerinin değişimini (nütrisyon), hücre geçişlerini engelleyebilmektedir. Küçük damarlardaki fonksiyonel değişiklikler, vazodilatasyon kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu damarların beslediği alanlarda doku beslenmesinin bozulmasıyla, diyabetik hastadaki yara alanında konağın enfeksiyonlara karşı savunma yeteneği azalmaktadır [72]. Sonuç olarak bakıldığında diyabetik ayak yarası, nöropatik ve nöroiskemik faktörlerin kompleks bir etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır.

### **2.2.5. Diyabetik Ayak Yaralarında Enfeksiyon Gelişimi**

DM hastalarında bağışıklık sistemindeki bazı kusurlar, diyabetik olmayan bireylere göre daha fazladır. Hücre göçü, fagositoz, hücre içi öldürme ve kemotaksi yeteneği gibi bazı polimorfonükleer lökosit fonksiyonlarının bozulması diyabetik hastalarda daha sık ve şiddetli görülmektedir. Bazı kanıtlar, hücre bağışıklık yanıtlarının da azaldığını göstermektedir. Zayıf granülasyon dokusu oluşumu ve yara iyileşmesinde meydana gelen bozukluklar diyabetik hastaları enfeksiyöz komplikasyonlara daha açık hale getirmektedir. Bu immün defisitlerin çoğu, kontrolsüz DM'un neden olduğu metabolik bozukluklarla doğrudan ilişkilidir. Bu immünolojik bozukluklar nedeniyle DM, DSÖ tarafından ikincil bir immün yetmezlik hastalığı olarak da tanımlanmaktadır [73]. Kontrolsüz yüzeysel enfeksiyonlar diyabetik hastalarda kolaylıkla ve hızla daha derin dokulara ilerleyebilmektedir.

DM hastalarında diyabetik ayak yaralarında ortaya çıkan enfeksiyöz tablolara neden olan etyolojik ajanlar iyi bilinmektedir. Sistemik antibiyotik tedavisi gerektirmeyen akut enfeksiyonlara genellikle tek bir mikroorganizma sebep olurken;

kronik, daha derin dokulara uzanan ve sistemik antibiyotik tedavisi gerektiren enfeksiyonlar tipik olarak 3 ila 6 farklı türe sahip polimikrobiyal tablolar olarak karşımıza çıkmaktadır [74, 75].

Başta *Staphylococcus aureus*, *Beta hemolitik streptokoklar* (grup A, B ve diğer) olmak üzere, aerop gram pozitif bakteriler ilk sırada karşımıza çıkan ajanlardır. *Staphylococcus aureus*'un diyabetik ayak yarası enfeksiyonlarının %50-84'ünde sorumlu etkenler arasında yer aldığı, %35'inde ise tek başına sorumlu olduğu bildirilmiştir [65]. *Enterobacteriaceae* türleri, *Enterokok* türleri, *Proteus* türleri, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Corynebacterium* türleri de tanımlanan enfeksiyonlarda sıkça izole edilen diğer gram pozitif ve negatif bakterileridir [76]. Bu mikroorganizmalar aynı zamanda kronik yaralarda ortaya çıkan polimikrobiyal enfeksiyonlarda da sıklıkla izole edilen etkenlerdir [77].

Ekstremitte veya hayatı tehdit eden boyutta yara enfeksiyonu olan hastalar intravenöz geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi ve cerrahi müdahaleler gerekliliği açısından hastanede takip edilmelidir. Yumuşak doku enfeksiyonunun derin yayılımı osteomyelite yol açabilmektedir. Bu durumlarda izole yumuşak doku enfeksiyonundan, diyabetik veya diyabet olmaksızın gelişen nöropatili hastalarda ortaya çıkabilen kemik deformitelerinin (örneğin; CNO) ayrımı yapılmalıdır. Derin doku enfeksiyonu ve osteomyelit varlığında, önceden antibiyotik tedavisi uygulanmış kronik yaralar söz konusudur ve bu yaralarda aerop gram pozitif, gram negatif (*Escherichia coli*, *Proteus* türleri, *Klebsiella* türleri) ve anaerop bakteriler (*Bacteroides* türleri, *Clostridium* türleri, *Peptococcus* türleri ve *Peptostreptococcus* türleri) olmak üzere birden çok mikroorganizmanın sorumlu olduğu enfeksiyonlar gelişebilmektedir [76, 78, 79]. Anaerop mikroorganizmalar, özellikle iskemik ve/veya nekrotik yaralarda gelişen miks enfeksiyonların önemli patojenlerindedir. *Peptostreptokok*, *Bacteroides* ve *Clostridium* türleri en sık izole edilen anaerop bakterilerdir.

Bu noktada patogeneizde sıkça bahsi geçen bir kavramdan da bahsetmek faydalı olacaktır: Charcot nöropatik osteoartropatisi (CNO).

Charcot nöropatik osteoartropatisi ilk olarak 1868'de Jean Martin Charcot tarafından 'denervasyona bağlı eklem destrüksiyonu' olarak tanımlanmıştır. CNO; eklem dislokasyonu, patolojik kırıklar ve ayak yapısının ciddi destrüksiyonuna sebep

olan kliniğinde inatçı ödem, eritem, ısı artışı, ağrı, eklemlerde efüzyon, kötü kokulu yaralar ve radyolojik olarak kemiklerde fragmantasyon, eklem patolojilerinin görüldüğü bir tablodur. Enfeksiyon ile komplike olmadığı sürece akut faz reaktanlarında (eritrosit sedimentasyon hızı ve c-reaktif protein) yükselme ve sistemik ateş görülmemektedir.

CNO sinir sistemini tutan tüm hastalıklarla beraber görülebilmekte olup tüm DM hastalarının %0,15–2,5'inde karşımıza çıkmaktadır. Bu hastaların ise %30'unda bilateral olarak görülmektedir [80]. CNO'da yara gelişme riski %40–63 olarak bilinmektedir [81, 82]. CNO'nun moleküler düzeydeki patogenezinde [83], glukoz metabolizmasının bozulması, minör travma ve nöropatik kırığın açığa çıkardığı proinflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  önemli rol oynamaktadır. Bu sitokinler reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG) sistemini aktive etmektedir. RANKL ekspresyonunun artması nükleer transkripsiyon faktör kappa B (NF-KB) aktivasyonuna, bu da osteoklast olgunlaşmasının hızlanmasına ve osteolize neden olmaktadır. Moleküler düzeydeki bu reaksiyonları dengeleyen sinir uçlarından salgılanan RANKL antagonisti kalsitonin gen related peptid miktarı da polinöropati nedeniyle azaldığından yıkım daha da artmaktadır. Diğer yandan, RANKL/NF-KB döngüsü arter duvarındaki düz kasları da etkileyerek CNO'lu hastaların %90'ından fazlasında görülen vasküler kalsifikasyona (Mönckeberg sklerozu) neden olmaktadır [84]. Mönckeberg sklerozu ve sempatik denervasyon periferik vasküler dirençte azalmaya, arteriovenöz şanta ve hiperemiye yol açmaktadır. Arteriovenöz şant ve buna ek olarak pankreastan salınan kemiğin büyüme faktörleri olarak gösterilen insülin ve amilin düzeylerindeki azalma osteopeniye neden olmaktadır [84]. Sonuç olarak CNO patogenezinde kontrolsüz inflamasyon, diyabetik nöropati, mikrovasküler işlev bozukluğu ve osteopeni yer almaktadır.

CNO'nun klinik evrelemesi Eichenholtz tarafından yapılmıştır [79]. Evre 1 akut inflamatuvar dönemdir, radyografide kemiklerde fragmantasyon, eklemlerde luksasyon görülmektedir. Klinik muayenede ayak şiş, sıcak ve kızarıktır. Evre 2 kırık parçalarda birleşme evresidir, radyografide yeni kemik yapımı görülmektedir. Evre 3 iyileşme evresidir, kalıcı deformite ile kırık iyileşmektedir.



### 2.2.6. Diyabetik Ayakta Klinik Değerlendirme

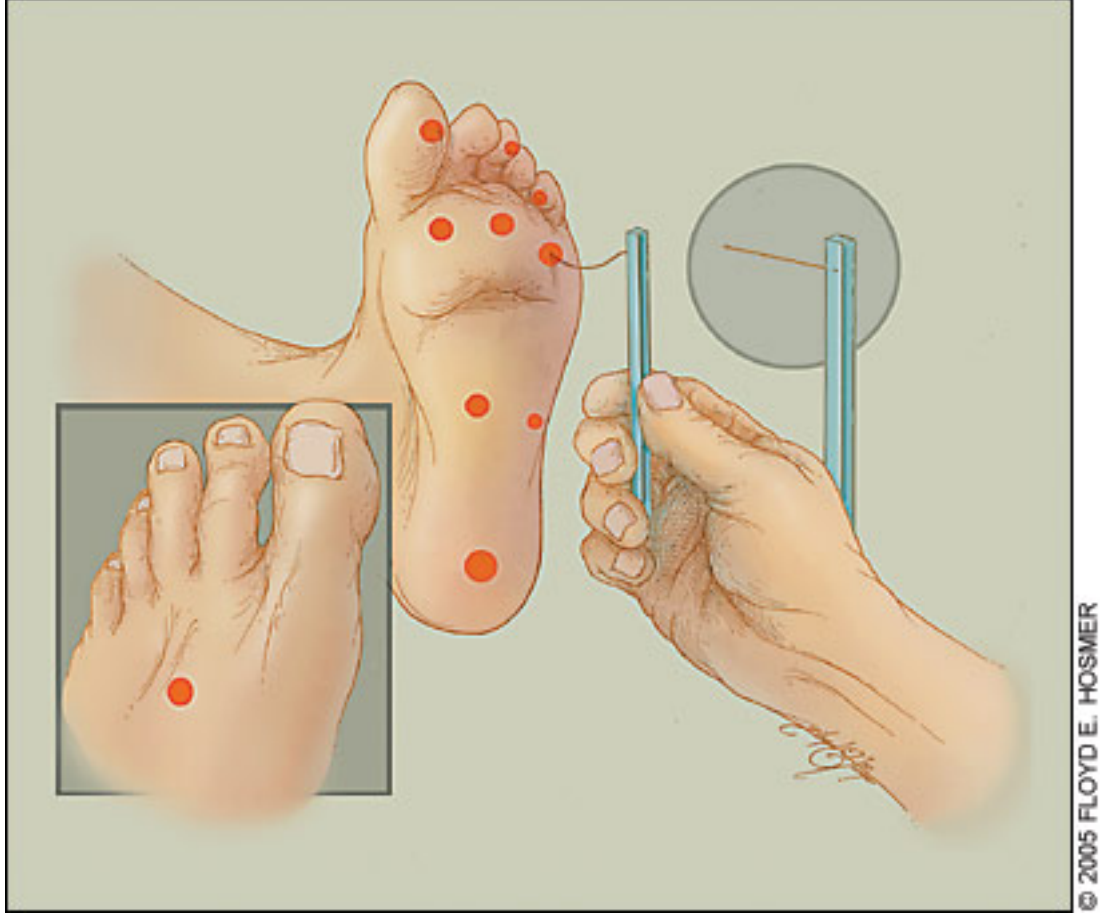
Anamnezde; özgeçmiş detaylı şekilde (geçirilmiş yara öyküsü, amputasyon öyküsü, CNO öyküsü, geçirilmiş vasküler cerrahi, sigara kullanımı), nöropati belirtileri (ayakta yanma, elektriklenme, keskin ağrılar ya da ayağını hissetmeme), vaskülopati semptomları (klaudikasyon, istirahat ağrısı, iyileşmeyen yara) ve diğer DM komplikasyonları (renal, retinal, kardiovasküler) sorgulanmalıdır.

Fizik muayenede; inspeksiyonda diyabetik ayak yarasına sebep olabilecek uygun olmayan ayakkabı ve çorap kullanımı olup olmadığına dikkat edilmelidir. Diyabetik ayak yaralarının %70–90'ı ayağın ön kısmında görülmekte; bunu sıklık sırasına göre topuk ve orta plantar yüzey bunu izlemektedir [85]. Dermatolojik açıdan cilt durumuna (rengi, kalınlığı, kuruluğu, fissür varlığı), terleme olup olmadığına, enfeksiyon belirtilerinin varlığına (şişlik, kızarıklık, parmak aralarında mantar enfeksiyonu), yara, kallus ve bül oluşumu olup olmadığına detaylıca bakılmalıdır. Kas-iskelet sistemi değerlendirmesi açısından; mevcut anomali veya deformateler (pençe parmak, belirgin metatars başları, CNO (en tipik görüntü kayak ayak)), kas atrofileri (metatarslar arası çöküntü) dikkatle incelenmelidir.

Nörolojik değerlendirmede ise; koruyucu duyunun değerlendirmesi oldukça önemlidir ve bu amaçla beş test tarif edilmiştir. 10 gauge monofilament (Semmes-Weinstein testi) testi; basınç duyusunu test etmektedir. Hastanın ayağına filaman ile filamanı bükme için yeterli basınçla basıldığında monofilamanı hissedememesi artmış diyabetik ayak yarası oluşma riskini göstermektedir. Hastadan filamanı her hissettiğinde 'evet' demesi istenmektedir. Hastanın filamanı 10 alanın dördünde hissedememesi, koruyucu duyu kaybını göstermek için yüzde 97 oranında duyarlı ve yüzde 83 oranında spesifik bir bulgudur.

İkinci olarak 128 hertz diyapazon testi; ayak başparmağının uç kısmında hissedilen titreşim duyusunu test etmektedir. Üçüncü testimiz iğne ile duyu kontrolüdür ve iğne duyusu-dokunma duyusu farkını, hastanın sivri cisimleri ayırt edebilmesini test etmektedir. Test yeri ayak parmaklarının dorsumunda tırnağın başladığı yerin hemen proksimalidir. Dördüncü test olarak ayak bileği refleksleri değerlendirilmektedir. Son testimiz ise titreşim algılaması eşik testi (*vibration perception threshold: VPT testing*)'dir. Bu test de titreşim duyusunu ölçen bir testtir ve 'biothesiometer' cihazı

ile ayak parmak ucundan ölçümler yapılmaktadır. VPT >25 olması testin anormal olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.3. Naylon monofilament testi [86].

Sıklıkla 10 gauge monofilaman testi ile diğer testlerden yalnız birini uygulamak yeterli olmaktadır. Bir ya da birden fazla testin pozitif olması polinöropati olduğunu, iki testin negatif olması polinöropati olmadığını göstermektedir.

Vasküler değerlendirme; oldukça önemli bir basamak olup bu aşamada palpasyonla distal alt ekstremitte nabızlarına (dorsalis pedis ve tibialis anterior) bakılmalı ve ankle-brachial indeks (ABI) ölçülmelidir. ABI doppler ile ölçülen ayak bileği sistolik basıncının yüksek olan brakial arter sistolik basıncına bölünmesiyle bulunmaktadır. ABI'in normal değerleri 0,9–1,3 arasındır. Hastanın ABI değerinin 0,9'dan düşük olması periferik vasküler hastalığı için riskli olduğunu, 0,8'den düşük olması orta şiddette arter hastalığını 0,5'ten düşük olması ise şiddetli arteriyel hastalığı ifade

etmektedir. ABI değerinin 1,3'ten yüksek olması ise arter duvarında mediyal skleroz ("tunica media" kalsifikasyonu: Mönckeberg sklerozu) varlığını ve arter duvarının esnekliğini kaybetmiş olduğunu göstermektedir. ABI değeri 1,3'ten yüksek olan olgularda ayak parmağı sistolik basıncı ve transkutanöz oksijen basıncı ölçülmesi uygundur.

Bu kısımda klinikte en sık kullanılan diyabetik ayak yarası sınıflamalarından da kısaca bahsetmek faydalı olacaktır. Başlıcaları; Wagner, Brodsky, University of Texas, PEDIS ve SINBAD sınıflandırmalarıdır.

Wagner diyabetik ayak ülseri sınıflandırma sistemi; yara derinliğini ve osteomyelit veya gangren varlığını aşağıdaki dereceleri kullanarak değerlendirmektedir:

- Grade 0 - sağlam cilt,
- Grade 1 - cilt veya deri altı dokunun yüzeysel yarası,
- Grade 2 – yaralar tendon, kemik veya kapsüle uzanır,
- Grade 3 - osteomyelit veya apse ile birlikte derin yara,
- Grade 4 - kısmi ayak gangreni,
- Grade 5 - tüm ayak gangreni.

Tektaş Üniversitesi diyabetik ayak yarası sınıflandırma sistemi; diyabetik ayak yaralarını derinliklerine göre derecelendirmekte ve daha sonra bunları enfeksiyon ve iskeminin varlığı veya yokluğu ile aşamalandırmaktadır:

- Grade 0 - pre ülseratif veya post ülseratif iyileşmiş bölge,
  - Grade 1 - tendon, kapsül veya kemiğe uzanmayan yüzeysel yara,
  - Grade 2 - tendon veya kapsüle uzanan yara,
  - Grade 3 - kemik veya ekleme uzanan yara.
- Her yara derecesi içinde dört aşama vardır:
- Stage A - temiz yaralar,
  - Stage B - iskemik olmayan enfekte yaralar,
  - Stage C - iskemik olup enfekte olmayan yaralar,
  - Stage D - hem iskemik hem enfekte yaralar.

### 2.3. Kök Hücre

Kök hücre, belli bir dokuya ait hücre karakteristiği taşımayan ve uygun sinyal ortaya çıkana kadar farklılaşmamış fenotipini koruyan hücredir. Kök hücreler, organizmanın tüm yaşamı boyunca kendini yenileme özelliğine sahiptir. Kök hücreler

bu özelliklerinden dolayı in vitro kültürlerde kolaylıkla çoğalabilmektedir. Belirli biyolojik sinyaller altında fenotiplerinden tamamen farklı bir hücre tipine dönüşebilme potansiyelleri mevcuttur. Embriyonel gelişme mekanizmalarının incelenmesini mümkün kılan çok ayrıntılı bir model sunmasının ötesinde kök hücre, doku ve organları yenileme anlamındaki üstün potansiyeli sayesinde, doku harabiyeti veya kaybı sonucunda ortaya çıkan pek çok hastalığın tedavisine yönelik tıp dünyasında ve toplumda büyük beklentiler ortaya çıkarmaktadır. Örneğin; tip 1 diyabet hastalığında pankreasta insülin salgılayan beta hücrelerinin, parkinson hastalığında beyinde dopamin salgılayan sinir hücrelerin hasarı söz konusudur. İşte, bu tür hastalıkların (alzheimer, multiple skleroz, amyotrofik lateral skleroz, omurilik zedelenmesi, purkinje hücre bozunumu-hasarlanması, duchenn's müsküler distrofisi gibi) kesin tedavisini sağlamak amacıyla araştırmacılar hasar gören hücre-doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine koymak (rejeneratif tıp) ya da tamir etmek (reparatif tıp) kavramlarını ortaya attı. Bir hedef doku veya organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek kadar sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabileceği düşünülmektedir. Kök hücreler, bu amaca hizmet edebilecek yani hücre tabanlı tedavide kullanılacak başlıca unsur olarak karşımıza çıkmaktadır [87].

### 2.3.1. Kök Hücrenin Tarihsel Gelişimi

1878 yılında memeli yumurtasının ilk kez vücut dışında döllenmesi çalışmaları başlamış olup, 1908 yılında histolog Alexander Maximow kök hücreleri kandaki hücrelerin kaynağı olarak tanıtarak, bitkiler dışında ilk kez kök hücre kavramını öne sürmüştür. 1949 yılında Jacobson ve arkadaşları, 1951'de Lorenz ve arkadaşları, ilk kez ölümcül dozda ışınlanmış hayvanları kurtarmak için intravenöz kemik iliği infüzyonu seçeneğini gündeme taşımışlardır [88, 89].

1951 yılında ilk kez insan hücreleri ölümsüz bir hücre dizisi (HeLa) olarak kültüre edilmiş, 1959 yılında in-vitro fertilizasyon yöntemi ile ilk hayvan (tavşan) üretilmiştir. 1961 yılında Till ve McCulloch hematopoetik kök hücrelerin sıçanlardaki radyasyona bağlı gelişen hematopoetik yetmezliği düzeltebileceğini öne sürmüşlerdir. 1962 yılının sonlarında J.Gurdon kurbağa bağırsak hücrelerinden elde ettiği bir çekirdeği kurbağa yumurtasına naklederek kurbağayı kolonlamayı başarmış ve bilim dünyasında bu gelişme klonlamanın başlangıcı kabul edilmiştir. 1968 yılında ise

Edwards ve Bavister ilk insan ovumunu in vitro olarak fertilize etmişlerdir. 1978 yılında ilk in-vitro fertilizasyon bebek İngiltere’de doğmuştur.

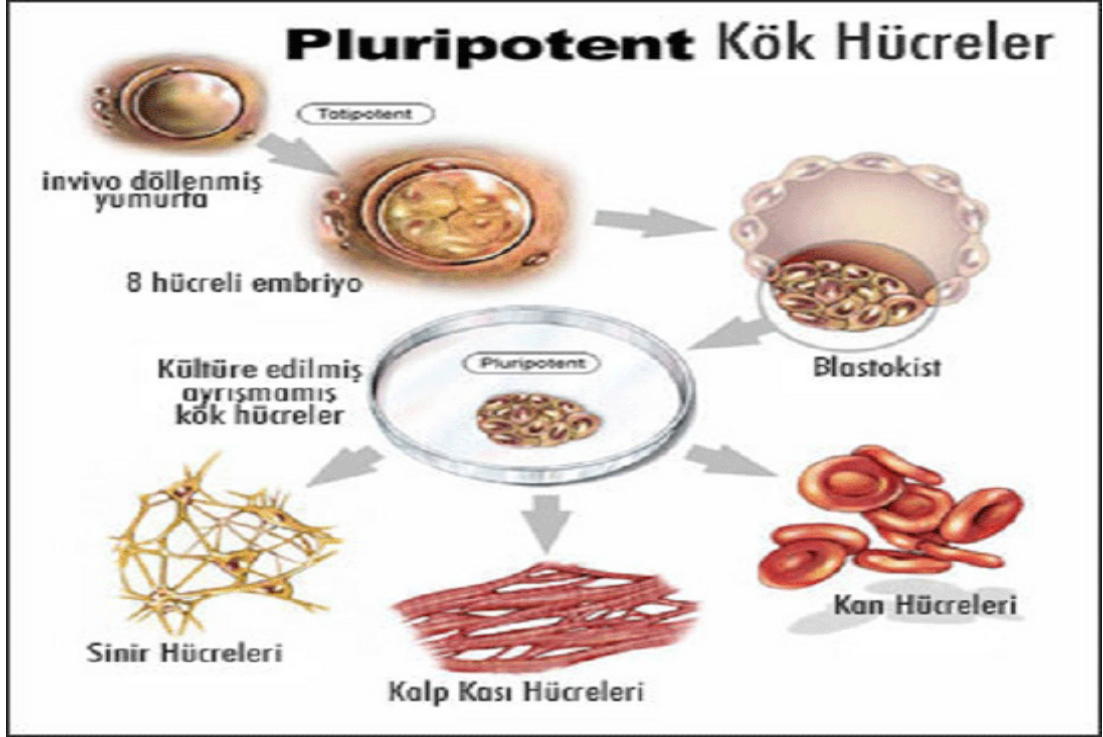
1981 yılında Evans ve Kaufman fare embriyonik kök hücrelerini elde ederken 1988 yılında kordon kanı transplantasyonu, ilk kez fanconi anemili bir hastaya uygulanmıştır. 1996 yılında rhesus maymunlarının embriyonik kök hücreleri elde edilmiştir. Bu gelişmelerin üzerine 1998 yılında ise Thomson ve arkadaşları ilk insan embriyonik kök hücrelerini elde etmişlerdir. 2000 yılında insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent olduğu keşfedilmiştir.

2006 yılında S.Yamanaka ve K.Takahashi farelerde deri kaynaklı somatik hücreleri transkripsiyon faktörleriyle yeniden programlayarak embriyonik kök hücreye benzer uyarılmış pluripotent kök hücreler üretmişlerdir [90]. Bu hücrelerle elde edilen embriyolardan canlı doğumlar gerçekleştirmiştir. 2010 yılı ortalarından A.Baker ve grubu,bilinenin aksine uyarılmış pluripotent kök hücre üretimi için genlere gerek olmadığı sadece virüslerle bunu yapılabileceğini ifade ederek lentivirüsleri bu üretim için kullanmıştır. 2013 yılında S.Mitalipov ve grubu,ilk kez insanda çekirdek nakli ile embriyo kök hücresi üretmiş, blastokist aşamasına getirilen embriyolardan yine embriyonik kök hücre elde edilmiş ve hücre dizileri oluşturulmuştur [91].

### 2.3.2. Kök Hücre Türleri

Totipotent kök hücreler; her yöne farklılaşma yeteneği olan kök hücrelerdir. Sperm ile yumurta birleşip döllenme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu hücrelere her şeyi yapabilen anlamına gelen totipotent hücre adı verilmektedir [87]. Bu kavram embriyonun 5. gününe kadar tüm blastomerler için geçerlidir (erken embriyonik dönem). Döllenmeden sonraki ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücrelerdir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilecek kapasiteye sahiptir.

Pluripotent kök hücreler; döllenme sonrası 5.günde ortaya çıkan blastosist adı verilen hücre topluluğunun içerdiği hücre tipidir. Bu hücreler organizmanın tüm hücre tiplerine diferansiye olabilecek kapasitededir, fakat tek başına tüm organizmayı oluşturamazlar. Embriyonel kök hücreler, blastosist içindeki hücrelerden meydana gelmekte ve pluripotenttir [87].

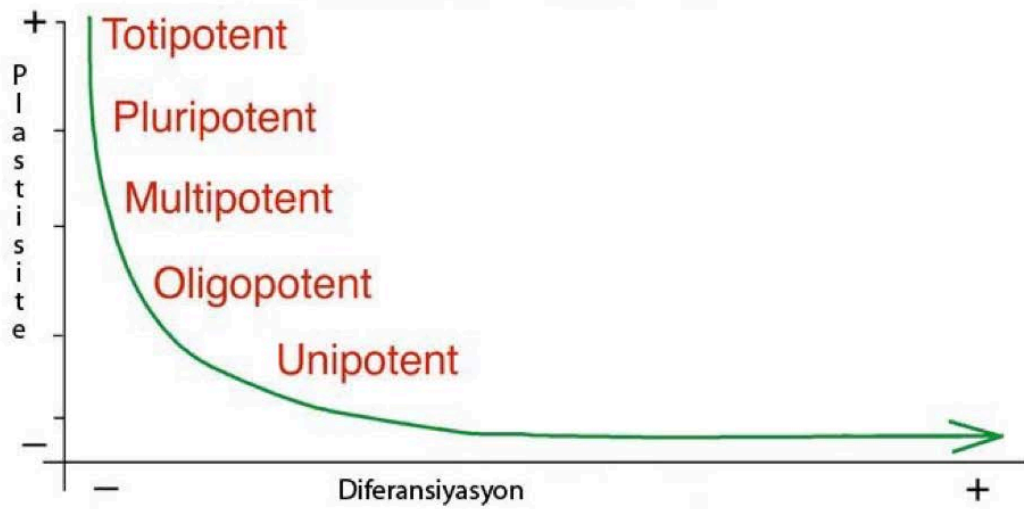


Şekil 2.4. Pluripotent kök hücre [92].

Multipotent kök hücreler; birbirine yapı ve fonksiyon olarak yakın hücre gruplarını oluşturabilen kök hücrelerdir. Örneğin; kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunmakta ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilmektedir [87]. Multipotent kök hücrelerin farklılaşması, daha sınırlı sayıda hücre tipine olabilmektedir [93].

Oligopotent kök hücre; lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu üzere sadece birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir [87]. Unipotent kök hücre; kas ana hücresinde olduğu üzere belirli bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir [87].

Multipotent kök hücreler, laboratuvar koşullarında gerekli destekleyici ortam ve sinyaller sağlandığında çok daha fazla hücre tipine dönüşebilmektedir. Bu noktada hasara uğrayan bir organın fonksiyonlarını düzeltebilmek, hatta bir organa bozulan fonksiyonları yapacak hücreler oluşturabilmenin mümkün olabileceği fikri oldukça önem kazanmakta ve büyük bir umut vaad etmektedir.



Şekil 2.5. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyalleri [94].

### 2.3.3. Kök Hücre Kaynakları

Kemik iliği; oldukça sık kullanılan bir kaynak olup, heterojen yapıda hematopoetik hücre grubundan meydana gelmektedir. Hücre gruplarının bir kısmını progenitor kök hücreler oluşturmaktadır. Kemik iliğinden genellikle iliak kemik veya sternumdan kemik iliği aspirasyonu ile 10-20 ml hacimde materyal elde edilmektedir [95]. Buradan kök hücre elde edilmesi işlemi invaziv ve ağırlı bir işlem ile mümkün olabilmektedir.

Periferik kandan yeterli sayıda hücre elde etmek, diğer kaynaklara göre daha kolay olmasına rağmen mobilize edilmeyen periferik kan çok az miktarda hematopoetik kök hücre içermektedir [95]. Hematopoetik kök hücreler, kemoterapi veya büyüme faktörü ile mobilize edilerek periferik kandan aferez yöntemiyle toplanabilmektedir. Periferik kan kaynaklı kök hücreler, alıcıya verilmeden önce yeterli sayıyı elde etmek için in-vitro çoğaltılabilmektedir. Periferik kan kullanımının önemli bir avantajı özellikle lenfoma, solid tümörler ve remisyonadaki lösemik hastalarda kemik iliğine göre daha az oranda malign hücre içermesidir.

Kordon kanı kaynaklı kök hücreler heterojen bir hücre grubudur. Yetişkin kemik iliğindeki sayılara yakın miktarda kök hücre içermektedir [95]. Hem term hem de preterm kordon kanının erişkin periferik kanına göre anlamlı olarak daha fazla sayıda progenitor kök hücre içerdiği bilinmektedir [87]. İlk kordon kanı transplantasyonu,

1988 yılında fanconi anemili bir hastaya uygulanmıştır. Yeterli hematopoetik kök hücreye sahip olan kordon kanı toplanarak insan lökosit antijeni (HLA) uyumlu hastaya transplante edilmiş ve hastada kür sağlanmıştır. Bu olgu sonrasında kordon kanı toplama, kordon kanı bankacılığı konusunda gelişmeler olmuş ve transplantasyon sayısı hızla artmıştır. Başlangıç çalışmalarından çıkan ilk sonuçlar, kordon kanı transplantasyonunun kemik iliği transplantasyonuna iyi bir alternatif olabileceği şeklindedir. Ancak burada da bazı hücre tiplerine diferansiyonda eksiklikler ve kaynak bulunmasında kısıtlılıklar mevcuttur. HLA uyumlu kordon kanı transplantasyonu yapılan hastalarda kemik iliğine göre enfeksiyon gelişimi ve greft versus-host hastalığı daha az oranda görülmektedir [95].

Yağ doku; bugüne kadar mezenkimal kök hücre kaynağı olarak çoğunlukla kemik iliği kullanılmasına karşın son çalışmalarda ön plana çıkan bir kaynaktır. Zuk ve arkadaşlarının [96] yaptığı çalışmada yağ dokunun mezenkimal kök hücrelerden oldukça zengin olduğu görülmüştür. Yağ dokudan mezenkimal kök hücre elde edilmesinin kemik iliğine göre daha kolay ve daha az ağrı verici olması, lipoaspirasyon yöntemi ile kolayca ve bol miktarda elde edilebilmeleri nedeniyle yağ dokunun plastik cerrahide son yıllarda kök hücre kaynağı olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda da yağ dokusunun mezenkimal kök hücre bakımından oldukça zengin bir doku olduğu teyit edilmiştir, ayrıca yağ dokuda santimetre küp başına kemik iliğine göre 100 ila 1000 kat daha fazla kök hücre bulunduğu ifade edilmektedir [97, 98].

#### **2.3.4. Mezenkimal Kök Hücre Kavramı**

Pek çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip multipotent kök hücrelerdir. Önceleri, mezenkimal kök hücreler (MKH), hematopoezi indüklemek amacıyla kullanılmış daha sonra in vivo ve in vitro çalışmalarla kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, yağ doku, böbrek, akciğer ve bağırsak gibi çeşitli hematopoetik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir [99-101]

MKH'ler, Fridenshtein tarafından kemik iliğinden osteosit ve adipositlere dönüşen ve fibroblast gibi görünen yapışkan hücre kolonileri ortaya çıkmasıyla tanımlanmıştır [102]. Daha sonra yapılan tüm araştırmalar, MKH'lerin tüm germ tabakalarından köken alan hücre, doku gibi yapıları meydana getirebilen multipotent kök hücre kaynağı olduğunu ortaya koymuştur. Önceleri yalnızca kemik iliğinden elde

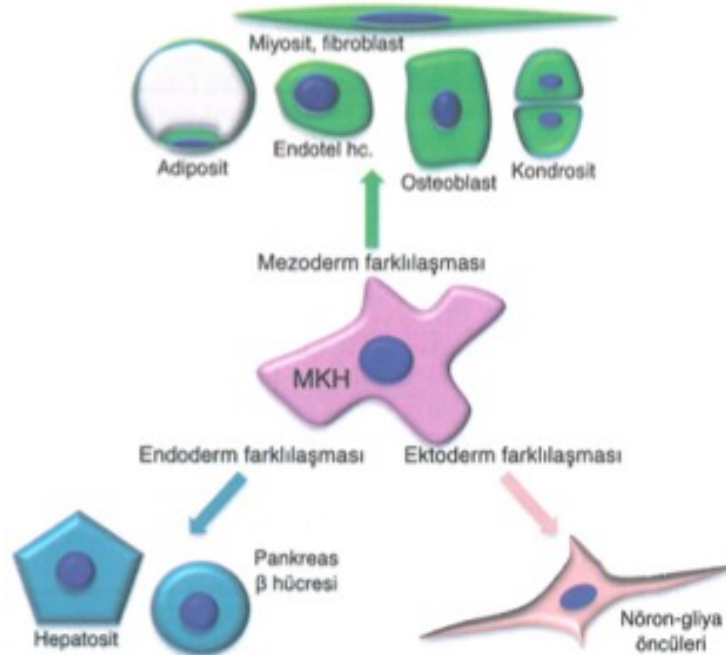


edilebilen MKH'ler günümüzde vücut sıvılarının da dahil olduğu birçok doku ve organdan izole edilebilmektedir. Bu dokuların başlıcaları kas, kemik, kıkırdak ve yağ doku, diş pulpası ve periodontal ligament, karaciğer, timus, paratiroid, tonsilla palatina, akciğer, dalak gibi solid organlar, endometriyum, over ve testis gibi üreme organları, amniyon sıvısı, plasenta, kordon kanı ve matriksi gibi fetal doku ve/veya organlardır [87].

Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği (The International Society for Cellular Therapy-ISCT) yayımlandığı kılavuzda MKH'lerin tanımı için 3 kritere sahip olması gerektiği vurgulanmıştır;

- plastik hücre kültür kabına adhere olma (yapışabilme) özelliğinin olması;
- in vitro koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilme yeteneğinin olması,

-CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini %95'in üzerinde, CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçlerini % 2'nin altında eksprese ediyor olması gerekmektedir.



Şekil 2.6. MKH'lerin farklılaşma kapasitesi [95].

MKH'lerin başta hücrel tedaviler, doku mühendisliği, bağışık baskılayıcı ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek artırmaktadır [103]. İlk tanımlandığından bu yana yağ MKH'lerle çok sayıda çalışma yapılmıştır. En yaygın araştırma konuları doku iyileşmesi ve rejenerasyonudur. İskemi sonrası revaskülarizasyon, kalp-damar sistemi rejenerasyonu, kemik-kıkırdak defektlerinin onarımı, intervertebral disk yenilenmesi ve üriner sistem rekonstrüksiyonu sıkça araştırılan konulardır. Bunların dışında deney hayvanlarında tendon iyileşmesi, periferik sinir iyileşmesi, akut spinal kord yaralanmalarında iyileşme ile diyabetik hayvanlarda kan şekeri ve karaciğer hasarlı hayvanlarda karaciğer enzim düzeylerinde düşme sağlanmıştır [104].

Ayrıca MKH'lerin yapılan çalışmalarda lenfosit proliferasyonunu engelleyerek immün sistemi düzenlediği, HLA özdeş hematopoetik kök hücrelerle birlikte nakledildiklerinde akut ve kronik greft versus host hastalığını azattığı görülmüştür. MKH'lerin kardiyak rejenerasyonda iskemik kalp hastalarında ventriküler yeniden düzenlenme ve diyastolik fonksiyonların yeniden düzenlenmesi gibi olumlu etkiler oluşturabileceği rapor edilmiştir [105]. Tüm bu etkilerin temelinde; apoptozise karşı artan direnç, VEGF düzeylerinin yükselmesi, hücrelerin kan akımında artış meydana gelmesi, mikrovasküleritenin artması, hücreler arası gap junction ilişkisi ve füzyon gibi mekanizmalar yatmaktadır.

Mezenkimal kök hücre araştırmaları ile son yıllarda ortaya çıkan gelişmeler bu hücrelerin birçok hastalıkta hücrel tedavi ve doku mühendisliği uygulamalarının önemli biyolojik araçları olacağını göstermektedir.

### **2.3.5. Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Plastik Cerrahi'deki Yeri**

Yağ dokunun kolay elde edilebilir oluşu, kemik iliğine göre daha fazla kök hücre sağlayabilmesi, ayrıca YDKKH etkinliğinin in-vivo ve in-vitro çalışmalarda kanıtlanmasını takiben, YDKKH plastik cerrahi başta olmak üzere birçok alanın ilgisini çekmiştir. YDKKH'ler ile yapılan klinik çalışmalar da başta yağ dokusu olmak üzere doku transferleri ile daha iyi sonuçlar alınmaya çalışılmıştır. Plastik cerrahide YDKKH'ler sıklıkla stromal vasküler fraksiyon veya izole edilmiş fakat kültüre edilmemiş hücreler olarak kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalar ise YDKKH'lerin yeni damar oluşumu, doku veya doku onarımları için kemik, kıkırdak, kas ve yağ dokusuna farklılaşma potansiyellerine yönelik olmuştur [106]. YDKKH elde etmek

için lipoaspirasyon yöntemi ile alınan yağda hemen çalışılmaya başlanabilirken, eğer yağ dokusu abdominoplasti ya da başka bir tür vücut şekillendirme ameliyatı ile elde edilmişse çalışmaya başlamadan önce yağ dokunun çok küçük parçalara bölünmesi gerekmektedir. Bu işlemler sonrası YDKKH'ler, lipoaspirasyon materyallerinin kollajenaz ile enzimatik parçalanma sonrası santrifüj işleminden geçirilme ve kültüre edilerek çoğaltılmasıyla elde edilmektedir [107, 108].

Ullman ve arkadaşlarının çalışmasına göre karın, uyluk, bel ve diz bölgelerinden elde edilen yağ dokularının transferi sonrası yaşayabilirlik oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır [109]. Bir diğer çalışmada ise karın bölgesi yüzeysel bölümünde (skarpa fasyası) yerleşmiş olan YDKKH'in apopitoza diğer anatomik bölgelerde yerleşen kök hücrelere nazaran daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir [110].

Kök hücrelerin elde edildiği birey yaşının, YDKKH sağ kalımı ve adipojenik potansiyeli üzerinde etkisi olmadığı bilinmektedir [111]. Stromal vasküler fraksiyon ile zenginleştirilmiş yağ dokusu transferlerinin, yüz atrofisi, estetik amaçlı meme büyütme gibi alanlarda başarılı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir [112, 113].

Otojen yağ doku transferleri plastik cerrahide rekonstrüktif ve estetik amaçla sıklıkla kullanılan bir tekniktir ve özellikle meme rekonstrüksiyonunda kullanımı popülerite kazanmıştır. Ancak transfer edilen yağ dokusunun % 40-70 oranlarında atrofiye uğraması, sağ kalımın belirsizliği ve buna bağlı olarak sonuçların belirsizliği önemli bir handikaptır, uygulama bu sebeple tekrarlayan seanslara gerek duyabilmektedir [114, 115].

Matür hücrelerin dayanıklı olmaması ve özellikle hipoksiye olan duyarlılıklarının YDKKH'lere göre fazla olması nedeniyle, matür yağ dokunun kök hücreden zenginleştirilerek uygulanması önerilmektedir [116]. Yoshimura ve arkadaşlarının YDKKH'ler ile zenginleştirilmiş yağ transferi uygulamalarının sonuçlarının klasik yağ enjeksiyonlarına göre daha başarılı olduğu ortaya çıkmıştır [117-119]. Tiryaki ve arkadaşları da yağ grefti uygulanmış ama istenen sonuç alınamayan olgulara YDKKH ile zenginleştirilmiş yağ greftlemesinin daha başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir [120]. Yine Kim ve arkadaşları lipoaspirasyonla elde ettikleri YDKKH'leri kültür ortamında çoğalttıktan sonra deprese skarlı alanlara uygulamış ve alanda maturasyon gözlemlemişlerdir [121].

Yara iyileşmesi alanında ise 2007 yılında Rigotti tarafından yayınlanan çalışmada lipoaspirasyonla alınan ve işlemde geçirilen yağ dokunun tekrarlayan seanslarla radyoterapiye bağlı hasarlı dokulara uygulanmasını takiben dokuda görülen iyileşme kök hücrelere bağlanmaktadır [122]. Lendeckel ve arkadaşları ise YDKKH'leri travmaya bağlı kalvarial defekti olan bir hastada kanselöz kemik greftleriyle birlikte uygulanmış ve belirgin ossifikasyon tespit etmişlerdir [123]. Mesimaki ve arkadaşları geniş keratokist nedeniyle hemimaksillektomi uygulanan bir hastada YDKKH'leri ile trikalsiyum fosfat granüllerini titanyum mesh içinde prefabrike etmiş ve daha sonra elde edilen doku mikrovasküler flep olarak maksillaya transplante etmiştir. Doku biyopsilerinde kemiğin yeniden şekillendiği saptanmıştır [124]. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda; YDKKH'lerin fibroblastlardan kollajen sentezini uyararak dermis kalınlığını arttırdığı [125, 126], güçlü bir antioksidan aktivite göstererek dermal fibroblastları oksidatif hasardan koruduğu [127], serbest radikallere bağlı oluşan cilt hasarını önlediği ve farelerde oluşturulan tam kat yanık yaralarının iyileşmesini belirgin derecede artırdığı ifade edilmektedir [128]. Park ve arkadaşları'nın YDKKH'lerin salgı fonksiyonlarını araştırmak için yaptıkları çalışmada YDKKH'lerin PDGF, plasental büyüme faktörü, FGF2, KGF, TGF  $\beta$ 1 -  $\beta$ 2, HGF ve VEGF, kollajen ve fibronektin salgıladıkları gösterilmiştir [126]. Lu F ve ark. tarafından yapılan çalışmada random patern deri fleplerine lokal olarak YDKKH uygulanmış; kan akımında ve flep canlılığında belirgin artış olduğu gözlenmiştir. Bu artışın hem YDKKH'lerin direkt olarak endotel hücrelere farklılaşması hem de indirekt olarak salgıladıkları anjiogenik büyüme faktörlerine bağlı ortaya çıktığı düşünülmektedir [113]. Ebrahimian ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da yaralara lokal olarak YDKKH uygulanmış ve yeşil floresan protein ile işaretli YDKKH'lerin dermal ve epidermal dokulara yerleştiği ve epidermal marker olan K5 ve K14 sentezlediği gösterilmiştir [129]. Tüm bu konular ve benzeri çok sayıda konuda YDKKH'ler plastik cerrahide oldukça fazla araştırma ve uygulama alanı bulmaktadır.

#### 2.4. Çalışmamızda Kullanılan Belirteçler

Histolojik olarak re-epitelizasyon, PMNL infiltrasyonu, hemoraji, konjesyon, ödem, granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez ve kollajen birikimi değerlendirmeye alındı. Bu kriterler göz önüne alınarak skorlamalar yapıldı ve skorlama sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Histolojik analizler için Hematoksilen-Eozin ve Masson's Trichrome ile boyamalar sonrasında, elde edilen kesitlerde yara iyileşme kriterleri incelenerek fotoğraf çekimi yapıldı.

Tüm bu genel bilgiler doğrultusunda klinikte karşımıza çıkan diyabetik ayak yaralarında olduğu gibi iskemi ve nöropatinin bir arada olduğu, zemininde enfekte/kontamine avasküler kıkırdak ve/veya kemik olan yaralar üzerinde MKH'lerin yara iyileşmesine etkilerinin gösterilmesi oldukça önemlidir. Literatürde Pelizzo ve arkadaşlarının çalışmasında sağlıklı tavşanların sırtında tam kat cilt defekti şeklinde oluşturulan yaralarda, otolog YDKKH, allojenik YDKKH ve KİKKH'ler yara iyileşmesi üzerine etkileri açısından incelenmiştir [130]. Deney modelinde yaraların sırtta oluşturulması sebebi ile kontraksiyonun yara kapanması üzerine etkisinin olması mümkündür. Yine Hong ve arkadaşlarının çalışmasında ise tavşan kulaklarında oluşturulan tam kat cilt defekti şeklindeki yaralarda, yara iyileşmesi üzerinde YDKKH, KİKKH ve dermal fibroblastların etkileri karşılaştırılmıştır. Ancak deney modelinde yaralar oluşturulurken zeminde perikondrium sağlam bırakılmıştır. Burada iyileşmeyi gösteren parametrelere sağlam perikondriumun katkısı göz ardı edilemez bir gerçektir [131]. Bu bilgilere bakıldığında mevcut çalışmaların kliniği temsil etmekten uzak oldukları görülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız bir sonraki bölümde de detaylı olarak bahsedeceğimiz deney modeli, mevcut literatür çalışmalarındaki handikapları içermemekte ve özgün değerler barındırmaktadır. Bu deney modelinde kullanılan herhangi bir ürün kliniğe en yakın deney modelinde test edilmiş olacaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kapsamınca 10.12.2018 tarihinde gerçekleştirilen toplantıda 683-1 karar numaralı etik kurul izni alındı.

#### 3.1. Deney Aşamaları

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Deneyler için her grupta 5'er adet, 2 adet de yağ doku elde etmek amacıyla toplam 22 adet sağlıklı, 4-6 aylık, ortalama 2,5-4 kg ağırlığında, erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Deney hayvanları özel Saki Yenilli Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan tedarik edildi, ayrı kafeslere yerleştirilerek, ısı ve nem oranı sabit odaya alındı. Denekler serbest su ve standart gıda erişimi olan ortamda, 12 saatlik aydınlık ve karanlık siklusunun tekrarlandığı bir odada tutulup çevresel etkenler açısından standardize edildi.

##### 3.1.2. Deney Grupları

Çalışmada toplam 20 adet sağlıklı 4-6 aylık ortalama 2.5-4 kg ağırlığında erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Gruplar oluşturulurken tavşanlar rastgele dört gruba ayrıldı. Deney grupları belirlenirken; A ve C grubu diyabetik deney hayvanlarından, B ve D grubu ise diyabetik olmayan deney hayvanlarından oluşturuldu. Her deney hayvanının sağ kulağı iskemik ve nöropatik, sol kulağı iskemik ve nöropatik olmayan taraf olarak planlandı.

A Grubu: Diyabetik olup, yaralara MKH uygulanan deney grubu (n:5). Bu gruptaki tavşanların kulaklarının diyabetik, iskemik ve nöropatik ayak yarasını temsil etmesi planlandı.

B Grubu: Diyabetik olmayıp, yaralara MKH uygulanan deney grubu (n:5). Bu gruptaki tavşanların kulak yaralarının iskemik ve nöropatik yaraları temsil etmesi planlandı.

C Grubu: Diyabetik olup, yaralara SF uygulanan kontrol deney grubu (n:5). Bu gruptaki tavşanların kulaklarının diyabetik, iskemik ve nöropatik ayak yarasını temsil etmesi planlandı.

D Grubu: Diyabetik olmayıp, yaralara SF uygulanan sham deney grubu (n: 5). Bu gruptaki tavşanların kulak yaralarının iskemik ve nöropatik yaraları temsil etmesi planlandı.



Şekil.3.1. Deney gruplarının oluşturulduğu 4-6 aylık, sağlıklı, erkek Yeni Zelanda tavşanı.

### 3.1.3. Diyabet Oluşturulması

A ve C grubundaki denekler diyabet oluşturma işleminden 8-12 saat önce aç bırakıldı. Çalışmanın başlangıcında kulaklarının dorsalinde yer alan tüyler tıraşlandı. Tavşanlarda diyabet oluşturmak için 5'er adet tavşandan oluşan A ve C grubuna alloksan monohidrat (150 mg/kg) (Sigma-Aldrich) 3 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra, her tavşanın dorsal kranial kulak venine 1,5 ml/dk oranında tek doz olacak şekilde uygulandı. Enjeksiyon sonrası hayvanları hipoglisemi ve hipoglisemik şoktan korumak için 10 ml %5'lik glukoz solüsyonu yine intravenöz olarak enjekte edildi. Bu tavşanların ilk 24 saatlik içme suyu %10'luk glukoz solüsyonu olarak verildi. Alloksan monohidrat enjeksiyonundan 24, 48, 72 saat sonra kulak veninden alınan kanda glukometre cihazı ile ölçüm sonucunda kan glukoz

değeri 200 mg/dL'yi geçen tavşanlar, diyabetik olarak kabul edildi. Diyabet oluşturulan tavşanların haftalık ağırlık ve kan şekeri ölçümleri yapıldı.

### **3.1.4. Deney Hayvanlarında Cerrahi Öncesi Anestezi Uygulaması**

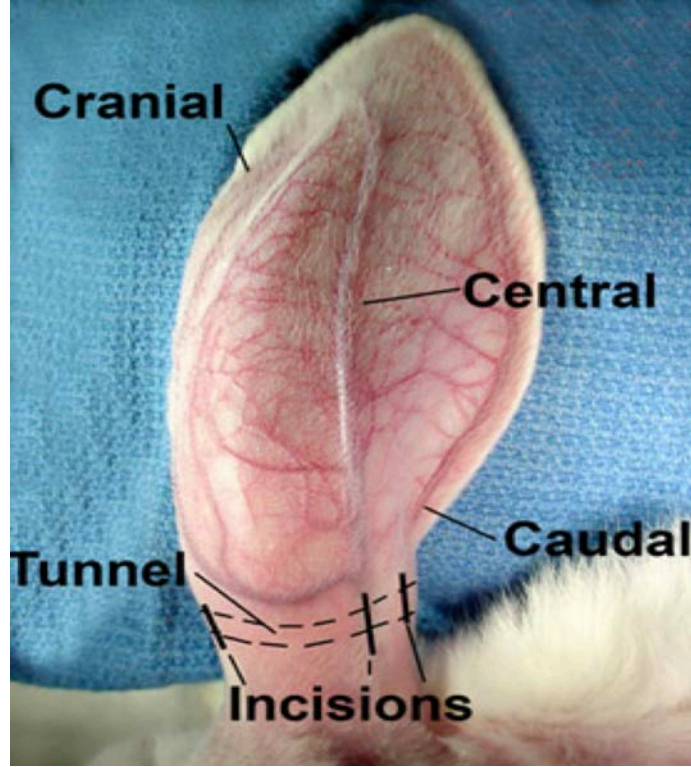
Anestezi öncesi tüm deney hayvanları sessiz bir ortamda ve 22-24 derece oda sıcaklığına alınarak, genel anestezi için ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) intramüsküler olarak uygulandı.

### **3.1.5. Cerrahi Prosedür**

#### **Kulaklarda İskemi Oluşturulması:**

Diyabet oluşturma işleminden 4 hafta sonra kulaklarda iskemi ve yara oluşturma işlemlerine başlandı. Anestezi uygulandıktan sonra preoperatif antibiyotik profilaksisini (sefazol 40 mg/kg) takiben steril koşullarda cerrahi prosedüre başlandı. Tüm hayvanların sağ kulaklarında iskemi oluşturulması, sol kulaklar ise iskemik olmayan kontrol grubu olarak planlandı. Kulaklarda iskemi oluşturmak için Chien ve Wilhelmi [11] tarafından tarif edildiği gibi kulağın kafa ile birleştiği kök kısmının dorsalinde orta hat, kranial ve kaudal kenarlar üzerinde yapılan üç vertikal insizyon sonrası sırası ile santral arter ve ven, kranial damarlar ve kaudal damarlara ulaşıldı. Santral arter, sinir ve kranial damarlar bağlanıp kesilerek, kaudal damarlar ve santral ven sağlam bırakıldı. Böylece majör besleyici damarlar devre dışı bırakılarak iskemik kulak tablosu oluşturuldu. Sağlam bırakılan damarlar sayesinde ise diyabetik ayaklardaki görülen kollaterallerle beslenme taklit edildi. Üç insizyon cilt altı tüneller ile birleştirildi, tüm cilt altı dokular, kaslar, küçük damar dalları ve sinirler kesildi; tüneller altında perikondrium ve üzerindeki yumuşak dokular yaklaşık 1,5 cm'lik bir genişlikte çepeçevre olarak kartilajdan sıyrıldı; böylelikle tüm subkutan vasküler yapılar kesildiği için erken dönemde yeni kollateral gelişiminin önüne geçildi. İskemik ve nöropatik kulaklarda renk değişikliği, kulakta düşme ve hareket kaybı izlendi.





Şekil 3.2. Tavşan kulağının nörovasküler haritası ve insizyon planı [11].

### 3.1.6. Kulaklarda Yara Oluşturulması

Yara oluşturulması aşamasına iskemi oluşturulmasından hemen sonra tavşanlar anestezi altında iken başlandı. Her iki kulağın ventral yüzünde kulağın boyutuna göre kulak kökünden yaklaşık 3-4 cm proksimalde, aralarında minimum 2,5 cm olacak şekilde 2 adet 6 milimetre çaplı dairesel yaralar punch biyopsi kalemi yardımı ile kıkırdak doku ekspozе olacak şekilde açıldı; perikondriyum sıyrıldı. Kartilajın zedelenmemesine özen gösterildi.

İşlem tamamlandıktan sonra tüm tavşanlara; steril yara bandı ile pansuman yapılarak kulaklar sarıldı, post-operatif ağrı kontrolünün sağlanması amacıyla 10 mg/ml parasetamol içeren 100 ml flakon içme sularına katıldı ve günlük uygun pansuman değişimi sağlandı.

### 3.1.7. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması

A ve B grubuna tAD-MKH, toplam 1ml,  $1 \times 10^6$  hücre içerecek şekilde PBS içinde cerrahinin yapıldığı gün 0. gün olmak üzere 0, 2 ve 4. günlerde oluşturulan sirküler yaraların dört kadrana eşit miktarda 30 gauge iğne ile cilt altı enjekte edildi.

C ve D grubundaki deneklerde oluşturulan yaralara ise plasebo olarak 4 kadrana eşit şekilde 30 gauge iğne ile toplam 1 ml SF 0, 2 ve 4. günlerde uygulandı.



Şekil 3.3. Nöropati ve iskemiye bağlı kulakta düşme, hareket kaybı, renk değişikliği.



Şekil 3.4. Kulaklarda oluşturulan 6 mm çaplı dairesel yaralar.

## **3.2. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Karakterizasyonu**

### **3.2.1. Tavşan Yağ Dokusunun Diseksiyonu**

2 adet tavşana (2.5-4 kg ağırlığında) intramüsküler 50 mg/kg dozunda ketamin ve 5 mg/kg dozunda ksilazin ile anestezi uygulamasını takiben cerrahi alan temizliklerinin ardından interskapular ve inguinal alanlara minimal insizyonlar uygulandı. Yağ dokular, interskapular subkutan yağ dokusu ve inguinal yağ yastıkçıklarından aseptik koşullarda alındı. Alınan yağ dokusu, içerisinde %10 penisilin-streptomisin bulunan PBS solüsyonuna aktarıldı.

### **3.2.2. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yağ Dokudan İzolasyonu ve Kültürü**

Aseptik koşullarda genel anestezi altında alınan tavşan adipoz dokusu, 2 kez yıkandı, çok küçük boyutlara bölünüp, 1 saat boyunca 37 °C, %0.1 collagenase type I (Gibco, Grand Island, New York, United States of America) ile inkübe edildi. Enzimatik parçalanma sonunda örnekler santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti, içerisinde %10 fetal bovine serum, %0,2 primosin (Invivogen), %1 Glutamax (Sigma) bulunan Gibco besiyeri ile resüspanse edildi. Ardından 37 °C, %5 CO<sup>2</sup> ile inkübe edildi. Daha sonra tutunan hücreler gözlendikten sonra, 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi. %70-80 konfluensiye ulaştığında, hücreler tripsinize edilip subkültüre alındı. Deneyler için 3.pasajdaki hücreler kullanıldı.

### **3.2.3. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Analizi**

3. pasaja kadar kültür edilen tAD-MKH'lerde, karakterizasyon analizleri yapıldı. Elde edilen MKH'lerin yüzey belirteçleri bakımından CD73, CD90, CD105 pozitif ve CD45, CD34 negatifliği akım sitometri (flow sitometri) ile gösterildi. Bunun için pasaj 3'e gelmiş olan hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldıktan sonra, besiyeri içeren tüplere aktarılıp santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet resüspanse edilip sayıldıktan sonra 1x10<sup>6</sup>/ml olacak şekilde kendi medyumunda süspanse edildi. Hücreler daha sonra, belirlenen hücre yüzey işaretçilerine özel fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin ve PerCP-konjuge monoklonal antikoları; CD73, CD90, CD105, CD45, CD34 antikoları ile oda ısısında (karanlıkta) 45 dakika inkübe edildi. Yıkama

solüsyonu ilave edilip 5 dakika süreyle x500 g de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pellet 400 mikrolitre yıkama solüsyonunda resüspanse edildikten sonra FACSCalibur (BD Biosciences) cihazında okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

### **3.2.4. Tavşan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırma Analizi**

Bir başka karakterizasyon analizi olarak hücreler farklılaştırma kültür ortamına alındı ve tAD-MKH'ler kemik, kıkırdak ve adipoz hücre hatlarına farklılaştırmak üzere uygun sürelerde kültür edildi. Farklılaştırma sonrasında adipojenik hücreler Oil Red-O boyası, osteojenik hücreler Alirazin Red-S boyası, kondrojenik hücreler de Safranin-O boyası ile gösterilerek elde edilen hücrelerin MKH karakterinde oldukları doğrulandı.

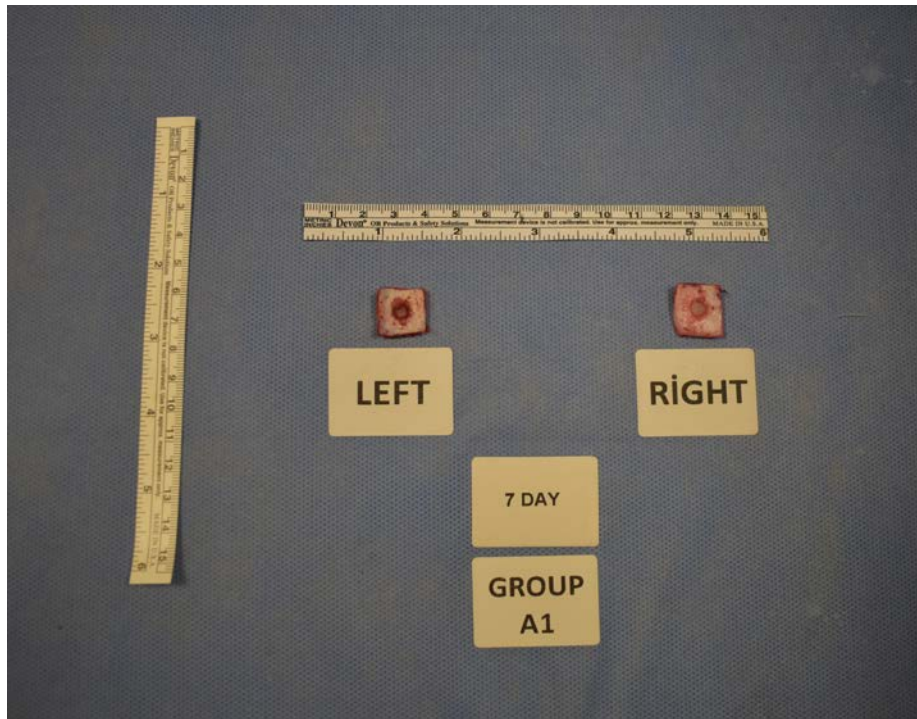
Adipojenik farklılaşma; kültür kabına  $cm^2$ 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen MKH'leri; içinde %10 fetal bovine serum, 0.5  $\mu$ mol isobutyl-methylxanthine,  $10^{-6}$  molar dexamethasone, 10 mikrogram/ml insülin, 200  $\mu$ mol indomethacin ve 1% penisilin-streptomisin bulunan MEM (minimum essential medium) besiyerinde iki hafta kültüre edildi ve kültür sonrası hücre içi biriken lipidler, Oil Red O histolojik boyaması yapılarak pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterildi. Ayrıca adipojenik farklılaşma sonrasında MKH hücrelerinde adiponektin antikoru ile işaretlenerek ekspresyon seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Osteojenik farklılaşma; kültür kabının  $cm^2$ 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen MKH'leri; 100 nmol dexamethasone, 0.05  $\mu$ mol ascorbate-2-phosphate, 10  $\mu$ mol beta-glycerophosphate, %1 penisilin- streptomisin ve %10 fetal bovine serum içeren MEM (minimum essential medium) besiyerinde 4 hafta boyunca kültüre edildi. Ayrıca osteojenik farklılaşma Alizarin Red-S ile boyanacak ve bu histolojik boyamanın pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterildi. Farklılaşmış ve farklılaşmamış MKH hücrelerinde osteonektin ve osteopontin proteinleri, immunofluoresan işaretlenerek belirlendi.

### 3.3. Biyopsi Alınması ve Sakrifikasyon

İlk MKH ve SF uygulamasından sonra 7. gün ve 14. günlere denk gelen günlerde genel anestezi altında olacak şekilde 6 milimetrelik punch biyopsi kalemi yardımı ile oluşturulan yaralar 1,5x1,5 cm'lik bir karenin ortasına denk gelecek şekilde kartilaj ve dorsal cilt ile beraber tam kat eksize edildi. 7. gün kulağın kranial tarafındaki, 14. gün kulağın kaudal tarafındaki yaralar eksize edildi. Alan ölçümleri için standart olarak fotoğraflandı ve histolojik incelemeler için ayrıldı.

Biyopsiler tamamlandıktan sonra hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildiler.



Şekil 3.5. Yedinci gün biyopsi materyali.

### 3.4. Yara Alanlarının Ölçülmesi

Yaraların yüzey alan ölçümleri ImageJ programı üzerinden yapıldı. 6 milimetre çaplı punch biyopsi kalemi ile oluşturulan yara alanının yüzölçümü 28.26 mm<sup>2</sup> dir. Yaralardaki açık alanların yüzölçümleri fotoğraf üzerinden hesaplandı. Fotoğraf çekiminden sonra yara bölgesi dokuları, rutin histolojik takip amacıyla %10'luk nötral formalin fiksatifine koyuldu.

### 3.5. Yara Dokularının Histolojik İncelemesi

Deney hayvanlarından alınıp fikse edilen tüm yara dokuları, rutin histolojik takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Daha sonra kesitlerin bir kısmı histokimyasal boyamalar yapılarak analiz edildi. Elde edilen preparatlardan yapılan mikroskopik incelemede dermis ve epidermiste meydana gelen değişiklikler tespit edildi. Histopatolojik değerlendirmede; hemoraji, konjesyon ve ödem, re-epitelizasyon, inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez ve kollajen miktarı değerlendirmeye alındı. Bu kriterler göz önüne alınarak skorlama yapıldı. Skorlama sonucu elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Histolojik analizler için Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson's Trichrome ile boyanmış kesitlerde yara iyileşmesi kriterleri histolojik olarak değerlendirilerek fotoğraflama yapıldı.

### 3.6. İstatistiksel Değerlendirme

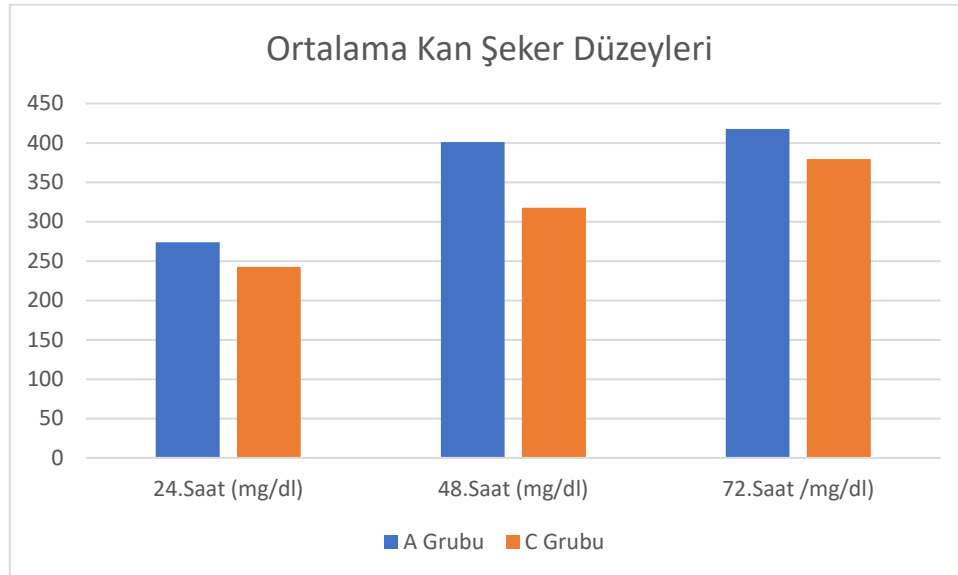
Çalışmaların verileri, standart hata göz önünde bulundurularak raporlandı. Verilerin analizinde 'IBM SPSS for Windows 21' kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğunun belirlenmesinde Shapiro Wilk's testi kullanıldı. Bağımlı örneklerin test edilmesinde (7. ve 14. gün farklarının belirlenmesinde) paired samples t test (eşleştirilmiş t test, bağımlı örnekler t testi), A, B, C ve D gruplarının karşılaştırılmasında one way ANOVA testi, farklı grupların belirlenmesinde ise post hoc testlerden Tukey testi kullanıldı. Verilerin özetlenmesinde mean±sd istatistikleri hesaplandı.  $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

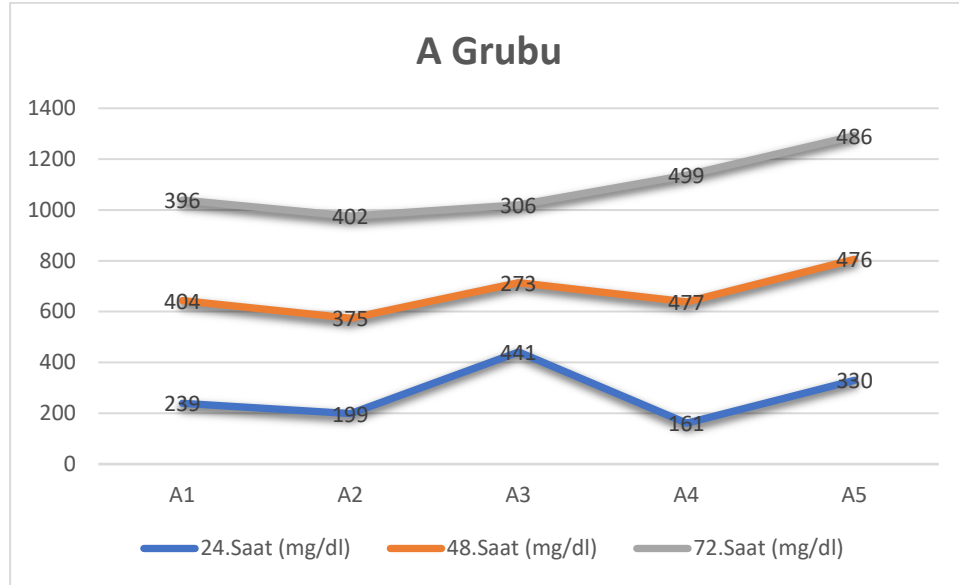
### 4.1. Kan Şeker Düzeyleri

Çalışmamızda diyabetik deney hayvanlarının kullanıldığı deney grupları, MKH uygulaması yapılan A grubu ve SF uygulaması yapılan C grubu idi. Bu gruplarda yer alan deney hayvanlarına 150 mg/kg alloksan monohidrat intravenöz uygulamasını takiben 24, 48 ve 72. saatte glukometre cihazı ile kan şekeri düzeyleri ölçüldü. A grubunda 24. saat kan şekeri düzeyi ortalama değeri 274 mg/dl iken, grupta tüm değerler 161 ile 441 mg/dl arasında ölçüldü. Aynı grubun 48. saat ortalama değeri 401 mg/dl olup, değerler 273 ile 477 mg/dl arasındaydı. 72. saat ortalamasına baktığımızda ise ortalama kan şekeri düzeyi 417,8 mg/dl, tüm değerler 306 mg/dl ile 499 mg/dl arasında ölçüldü.

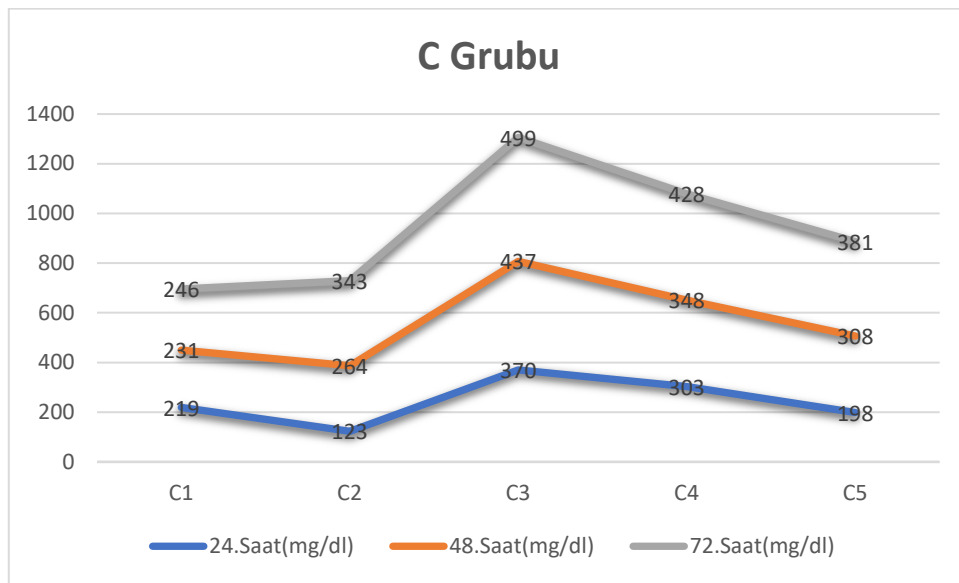
Benzer şekilde diyabetik hayvanlardan oluşan diğer grubumuz olan C grubunda 24. saat ortalama kan şekeri düzeyi 242,6 mg/dl ölçüldü. En düşük ve en yüksek değerler 123 ve 370 mg/dl ölçüldü. 48. saate baktığımızda ortalama kan şekeri düzeyi 317,6 mg/dl iken tüm değerler en düşük 231 mg/dl en yüksek 437 mg/dl arasında ölçüldü. 72. saatte ise ortalama kan şekeri düzeyi 379,4 mg/dl, ölçülen en düşük değer 246, en yüksek değer 499 mg/dl idi.



Şekil 4.1. A ve C grubu ortalama kan şekeri düzeyleri.



Şekil 4.2. A grubu ilk 72 saat kan şekeri düzeyleri.



Şekil 4.3. C grubu ilk 72 saat kan şekeri düzeyleri.

#### 4.2. Yara Alan Ölçümleri

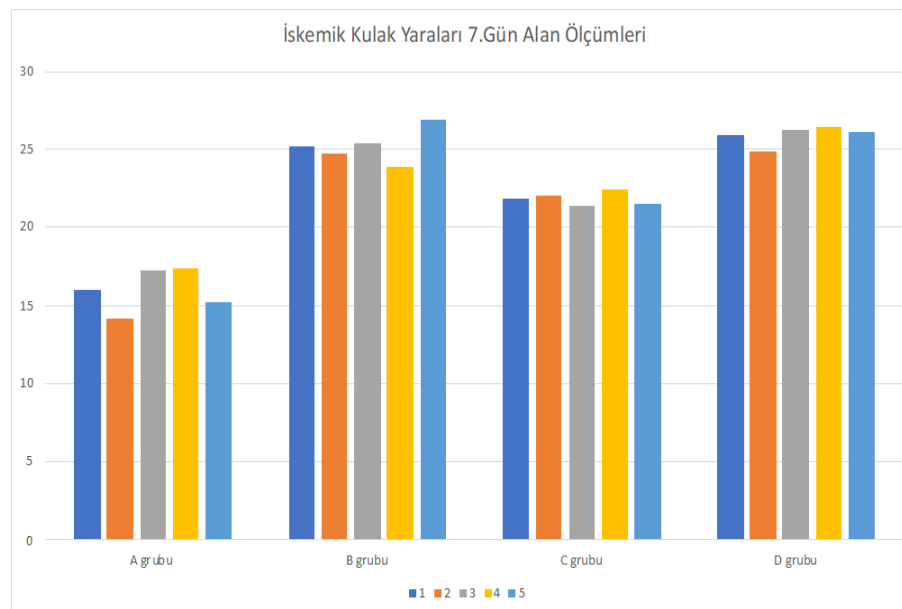
Yaraların yüzey alan ölçümleri ImageJ programı üzerinden yapıldı. 6 milimetre çaplı punch biyopsi kalemi ile oluşturulan yaraların yüzey alanının yüzölçümü 28.26 mm<sup>2</sup> ölçüldü. Tüm gruplarda hem iskemik kulak hem de iskemik olmayan



kulakların 7 ve 14. günlerdeki alan ölçüm verilerinin Shapiro Wilk's testine göre normal dağılım gösterdiği görüldü.

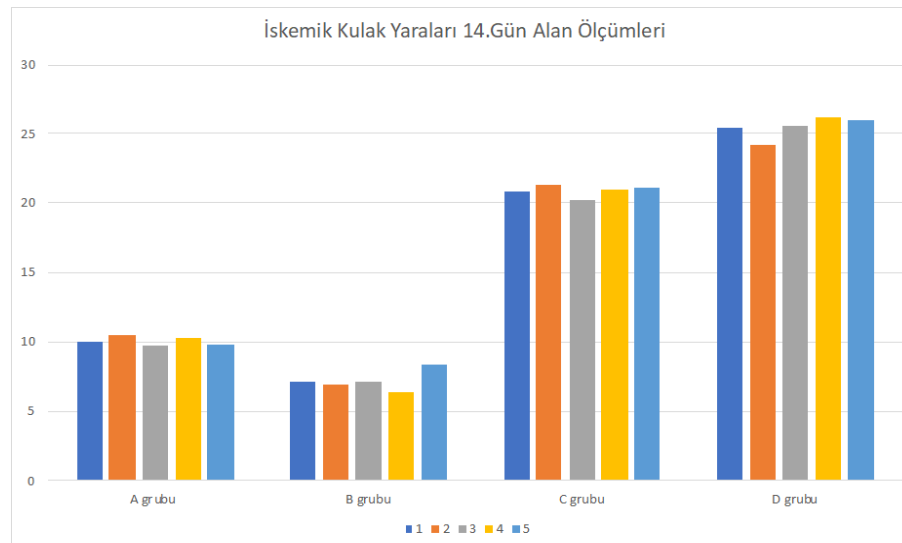
Her tavşanın iskemik ve iskemik olmayan kulaklarında hem 7. ve hem de 14. gün yara alanları karşılaştırıldı. Diyabetik olan hayvanlara MKH uygulanan A grubunda 7. gün iskemik taraf yaralarda ortalama alan  $15,99 \pm 1,38 \text{ mm}^2$  iken iskemik olmayan tarafta  $12,47 \pm 0,52 \text{ mm}^2$  ölçüldü. Aynı grubun 14. günündeki iskemik taraf yaralarda  $10,07 \pm 0,30 \text{ mm}^2$  non iskemik taraf yaralarda  $6,69 \pm 0,39 \text{ mm}^2$  ortalama yara alanı ölçüldü. A grubunda iskemik kulaklardaki yaralarda iyileşme miktarları karşılaştırıldığında hem 7. günde hem de 14. günde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). İskemik olmayan kulaklarda da benzer şekilde iyileşme miktarları arasında istatistiksel fark saptandı ( $p < 0,001$ ).

Diyabetik olmayan hayvanlara MKH uygulanan B grubunda ise 7. gün iskemik taraf yaralarda ortalama alan  $25,2 \pm 1,11 \text{ mm}^2$  iken iskemik olmayan tarafta  $14,6 \pm 0,75 \text{ mm}^2$  ölçüldü. Aynı grubun 14. günündeki iskemik taraf yaralarda  $7,19 \pm 0,74 \text{ mm}^2$  non iskemik taraf yaralarda  $5,15 \pm 0,27 \text{ mm}^2$  ortalama yara alanı ölçüldü. B grubunda iskemik kulaklarda iyileşme miktarları karşılaştırıldığında hem 7. günde hem de 14. günde istatistiksel olarak fark bulundu ( $p < 0,001$ ). İskemik olmayan kulaklarda da benzer şekilde iyileşme miktarları arasında istatistiksel fark saptandı ( $p < 0,001$ ).



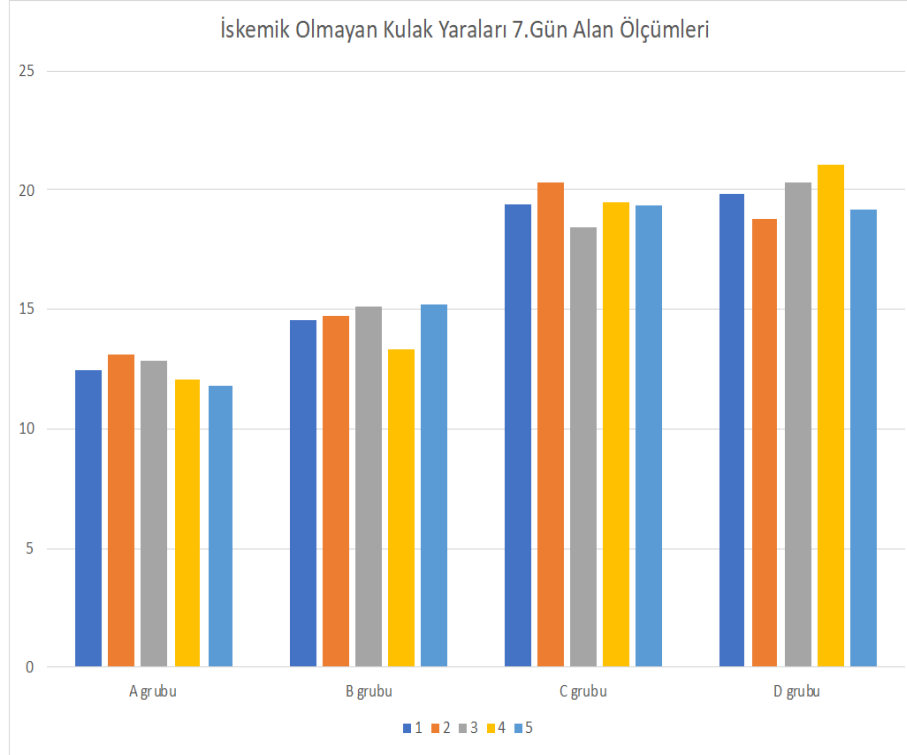
Şekil 4.4. İskemik kulak yaraları 7.gün alan ölçümleri.

Diyabetik olup yaralara SF uygulanan C grubunda ise 7. gün iskemik taraf yaralarda ortalama alan  $21,85 \pm 0,44 \text{ mm}^2$  iken iskemik olmayan tarafta  $19,40 \pm 0,65 \text{ mm}^2$  ölçüldü. Aynı grubun 14. gündeki iskemik taraf yaralarda  $20,90 \pm 0,43 \text{ mm}^2$  non iskemik taraf yaralarda  $19,09 \pm 0,70 \text{ mm}^2$  ortalama yara alanı ölçüldü. C grubunda iskemik kulaklarda iyileşme miktarları karşılaştırıldığında hem 7. günde hem de 14. günde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). İskemik olmayan kulaklarda da iyileşme miktarları arasında benzer şekilde istatistiksel fark saptandı ( $p < 0,001$ ).

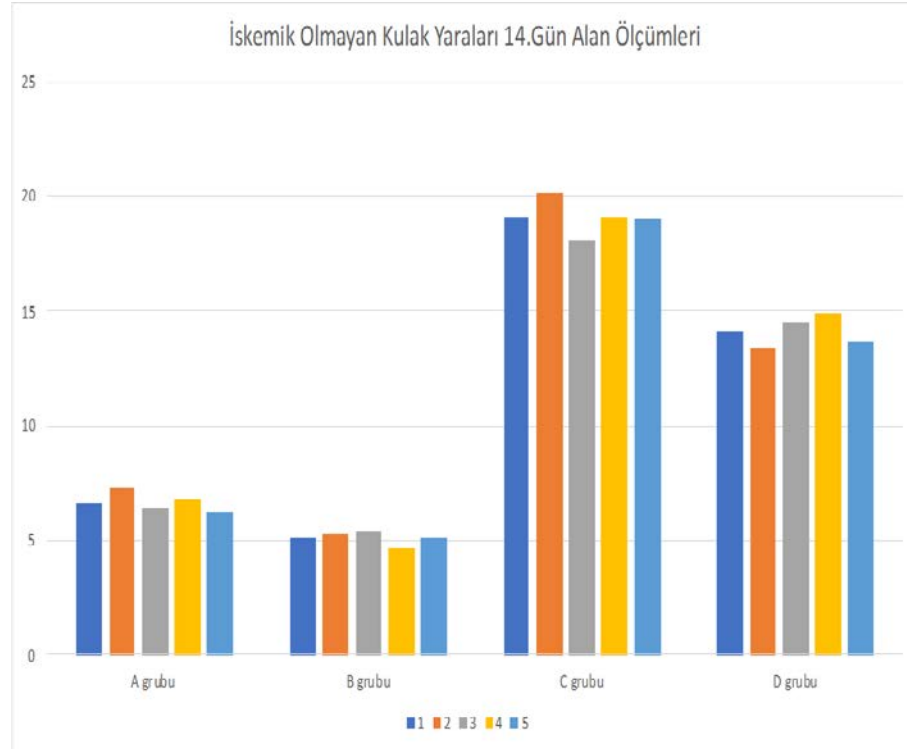


Şekil 4.5. İskemik kulak yaraları 14.gün alan ölçümleri.

Diyabetik olmayan ve yaralara SF uygulanan D grubu tavşanların 7. günde sağ kulaklarında yani iskemik olan taraf yaralarında ortalama alan  $25,91 \pm 0,65 \text{ mm}^2$ , sol kulaklarda yani iskemik olmayan taraftaki yaralarda ortalama alan  $19,82 \pm 0,91 \text{ mm}^2$  ölçüldü. 14. günde ise iskemik kulak yaralarında  $25,48 \pm 0,78 \text{ mm}^2$ , iskemik olmayan kulak yaralarında ise ortalama  $14,13 \pm 0,61 \text{ mm}^2$  olarak ölçüldü. D grubunda iskemik kulaklarda iyileşme miktarları karşılaştırıldığında hem 7. günde hem de 14. günde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ). İskemik olmayan kulaklarda da benzer şekilde istatistiksel fark saptandı ( $p < 0,001$ ).



Şekil 4.6. İskemik olmayan kulak yaraları 7.gün alan ölçümleri.



Şekil 4.7. İskemik olmayan kulak yaraları 14.gün alan ölçümleri.

Gruplar arası kıyaslamalara baktığımızda; iskemik kulak yaraları alan ölçümleri kıyaslandığında hem 7. gün hem 14. günde tüm gruplar arasında iyileşme miktarları arasında anlamlı fark bulundu ( $p<0,001$ ). Teker teker grupların kendi aralarında alan ölçümleri karşılaştırıldığında; iskemik kulak yaralarında 7. günde A grubunun yani diyabetik hayvanlara MKH uygulanan grubun yaralarındaki kapanma miktarları daha fazlaydı. A grubundaki karşımıza çıkan daha iyi yara iyileşmesi B, C ve D grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ). 7. günde B grubu yani diyabetik olmayan MKH grubunda D grubundan daha fazla miktarda yara kapanması görülmesine karşın B grubu ile D grubu arasında istatistiksel anlamda fark görülmedi ( $p>0,05$ ). C grubunda B ve D gruplarına göre iyileşme daha fazla olduğu görüldü. Buradaki farklar istatistiksel açıdan da anlamlı fark ortaya çıkardı ( $p<0,001$ ). Tüm bu istatistiksel veriler ve alan ölçümlerimize bakıldığında 7.günde sonuçlar A grubu yani MKH uygulanan grup lehinedir. İskemik kulaklarda 14.günde yapılan ölçümlerin gruplar arası karşılaştırmasında ise; en fazla yara iyileşmesi B grubu ardından A grubunda karşımıza çıktı. Yani alan ölçümlerinden yola çıkarak 14. günde iskemik kulaklarda diyabetik ve diyabetik olmayan gruplarda MKH uygulamasının (A ve B grupları) oldukça etkili olduğu sonucuna varıldı. Bu ölçümlerde de istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ).

Tablo 4.1. İskemik kulak yaraları 7 ve 14.gün ortalama ölçüm değerleri.

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Alan_7gun	A	5	15,9920	1,38832	,62087	14,2682	17,7158	14,11	17,36
	B	5	25,2000	1,11337	,49792	23,8176	26,5824	23,82	26,86
	C	5	21,8500	,44215	,19774	21,3010	22,3990	21,36	22,48
	D	5	25,9100	,65261	,29186	25,0997	26,7203	24,80	26,48
	Total	20	22,2380	4,11834	,92089	20,3106	24,1654	14,11	26,86
Alan_14gun	A	5	10,0700	,30438	,13612	9,6921	10,4479	9,70	10,44
	B	5	7,1900	,74223	,33193	6,2684	8,1116	6,34	8,38
	C	5	20,9000	,43428	,19422	20,3608	21,4392	20,18	21,34
	D	5	25,4800	,78892	,35282	24,5004	26,4596	24,16	26,16
	Total	20	15,9100	7,74244	1,73126	12,2864	19,5336	6,34	26,16

İskemik olmayan kulaklarda gruplar arası kıyaslamaya baktığımızda; hem 7. gün hem de 14. günde tüm gruplar arasında iyileşme miktarlarında anlamlı fark bulundu ( $p<0,001$ ). Teker teker grupların kendi aralarında alan ölçümleri

karşılaştırıldığında; A grubunda 7. günde yara iyileşme miktarının yine en fazla olduğu görüldü. Bu iyileşme miktarları A ve B arasında  $p<0,05$  olup diğer gruplarla karşılaştırmada  $p<0,001$  olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıkardı. A grubundan sonra en fazla yara iyileşmesi B grubunda ortaya çıktı. Bu iyileşme miktarı farkı da C ve D gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark yarattı ( $p<0,001$ ). Sadece C ve D grubunun karşılaştırılmasında  $p>0,05$  olup anlamlı fark saptanmadı. 14. gün alan ölçümlerinin gruplar arası karşılaştırmasına baktığımızda ise; en fazla yara iyileşme miktarı diyabetik olmayan hayvanlara MKH uygulanan B grubu ardından diyabetik hayvanlara MKH uygulanan A grubunda meydana geldi. Bu iyileşme miktarları arasındaki farklar tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yarattı (A ve B arasında  $p<0,05$ ; diğer karşılaştırmalarda  $p<0,001$ ).

Tablo 4.2. İskemik olmayan kulak yaraları 7 ve 14.gün ortalama ölçüm değerleri.

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Alan_7gun	A	5	12,4700	,52882	,23650	11,8134	13,1266	11,83	13,10
	B	5	14,6000	,75736	,33870	13,6596	15,5404	13,32	15,20
	C	5	19,4000	,65799	,29426	18,5830	20,2170	18,45	20,30
	D	5	19,8200	,91834	,41069	18,6797	20,9603	18,75	21,07
	Total	20	16,5725	3,28337	,73418	15,0358	18,1092	11,83	21,07
Alan_14gun	A	5	6,6900	,39956	,17869	6,1939	7,1861	6,25	7,29
	B	5	5,1500	,27586	,12337	4,8075	5,4925	4,72	5,46
	C	5	19,0900	,70551	,31552	18,2140	19,9660	18,12	20,11
	D	5	14,1300	,61086	,27318	13,3715	14,8885	13,43	14,89
	Total	20	11,2650	5,81848	1,30105	8,5419	13,9881	4,72	20,11

Tüm bu ölçümlere bakıldığında; iskemik taraf yaralarında non iskemik taraf yaralarına göre beklenildiği şekilde iyileşme yavaş ve belirlenen sürede daha az oldu. D grubunda ortaya çıkan alan ölçümlerinden yola çıkarak iyileşme oranlarına bakıldığında iskemik olmayan tarafki yaralarda iyileşme oranlarının yüksek olduğu sonucuna varılabilmektedir. Bu sonucu diğer grupların iskemik ve iskemik olmayan kulak yaralarının iyileşme oranlarına bakıldığında da görebilmekteyiz.

A ve C gruplarının sonuçları kıyaslandığında ise hem iskemik hem de iskemik olmayan kulakların ayrı ayrı 7 ve 14. gün yara alan ölçümü ortalama değerlerine ve istatistiksel olarak farklarına bakıldığında tüm kıyaslamalarda A grubunda iyileşme

miktarları daha yüksek bulundu. Bu farklar istatistiksel olarak A grubu lehine yani MKH uygulamasının olumlu etkisi üzerine anlamlı fark ortaya çıkardı ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde B ve D gruplarının da hem iskemik hem de iskemik olmayan kulakların ayrı ayrı 7 ve 14. gün yara alan ölçümü ortalama değerlerine ve istatistiksel olarak farklarına bakıldığında tüm kıyaslamalarda B grubunda yara iyileşme miktarlarının daha fazla olduğu görüldü. Bu iyileşme miktarı farkları, B grubu lehine yani MKH uygulamasının olumlu etkisi üzerine istatistiksel açıdan da anlamlı fark ortaya çıkardı ( $p<0,001$ ). Sadece iskemik kulaklarda 7. günde ortalama alan ölçümlerinde yüksek yara iyileşme oranı B grubu lehine iken bu durum istatistiksel açıdan fark olarak yansımada ( $p>0,05$ ).



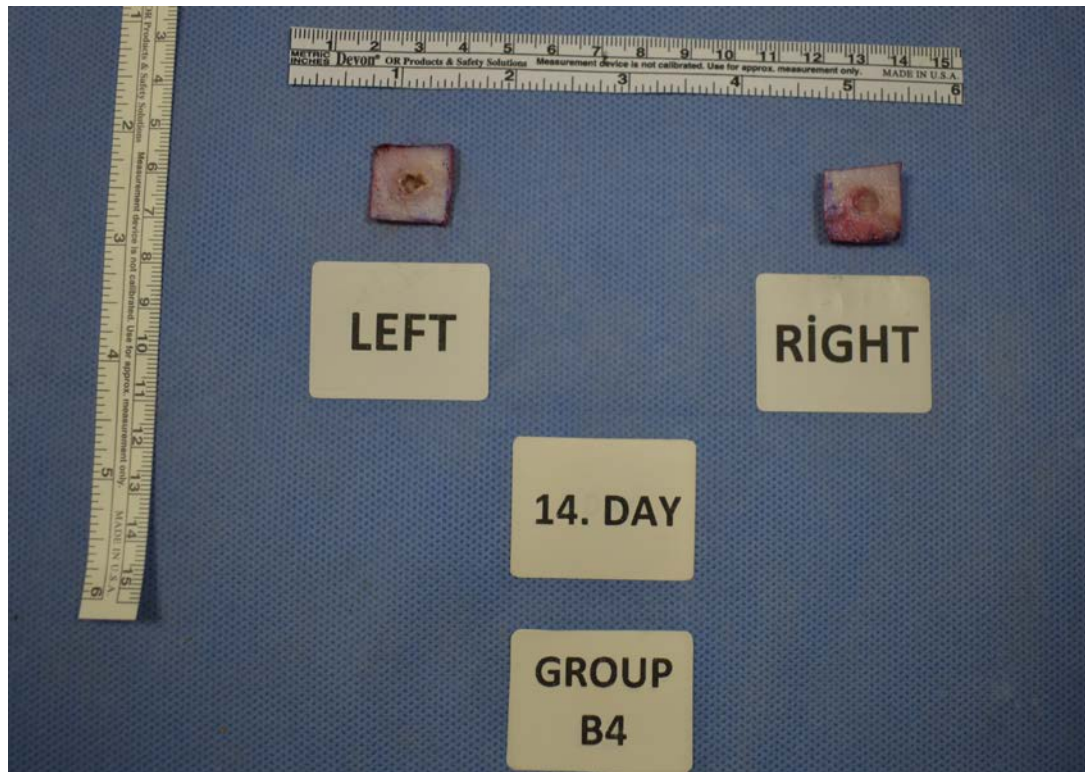
Şekil 4.8. A grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm (hem iskemik hem de non iskemik kulak yaralarında tama yakın re-epitelizasyon görülebilmekte).

Bu sonuçlar ışığında en fazla yara alanı azalması yani yara iyileşmesi ise MKH uygulanan ve diyabetik olmayan B grubunda, ardından yine MKH uygulanan ve diyabetik hayvanlardan oluşan A grubunda karşımıza çıktı.

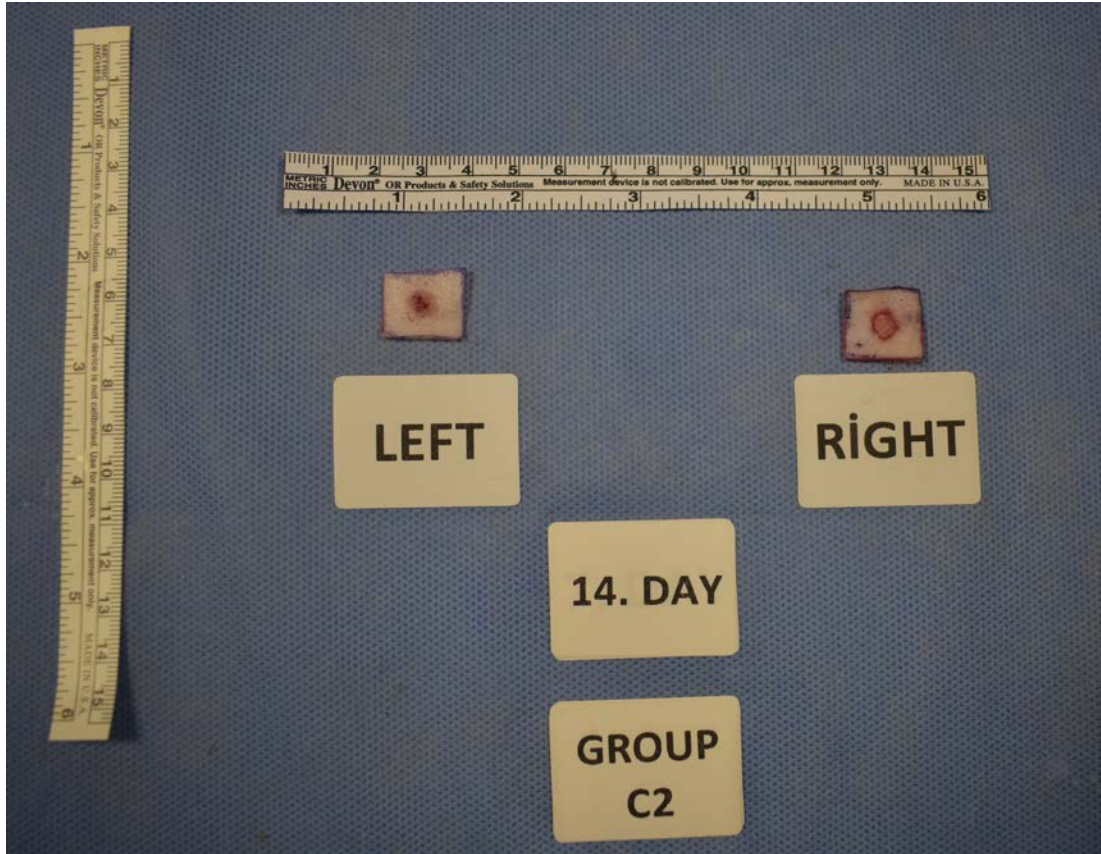
A ve B grubu iskemik olmayan kulaklar arası yara alan ölçümleri karşılaştırıl-

dığında 7 ve 14. günler arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ ). Ancak burada 7. günde yara iyileşme oranı A grubunda yüksek iken 14. günde B grubunda iyileşme hızı ve yara kapanma oranının arttığı; bunun hem ortalama alan ölçümlerine yansıdığı hem de istatistiksel olarak anlam ifade ettiği görüldü. C ve D gruplarının kıyaslanması sonucu ise iskemik olmayan kulaklar arasında 7. günde anlamlı fark yok iken ( $p>0,05$ ) ortalama yara iyileşme miktarları C grubunda daha fazlaydı. 14. günde ise D grubunun iyileşme hızı artarak C grubuna göre daha fazla oranda yara iyileşmesine ulaştığı, istatistiksel olarak da anlamlı fark ortaya çıktığı görüldü ( $p<0,001$ ).

Bu sonuçlara bakıldığında tek değişkenin diyabet olduğu durumda ilk 7 günde diyabet yara iyileşmesini olumsuz etkilememekte; hatta diyabetik hayvanlarda daha yüksek oranda iyileşme dikkat çekmektedir. Ancak 14. günde diyabetik olmayan hayvanların 7. günün aksine iyileşmelerinin hızlanarak iyileşmenin daha yüksek orana ulaştığı ve bunun da tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark yarattığı görülmektedir.



Şekil 4.9. B grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm (özellikle non iskemik kulak yarasında tama yakın re-epitelizasyon dikkat çekici).



Şekil 4.10. C grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm (iskemik kulaktaki iyileşmede büyük miktarda gecikme görülmekte).





Şekil 4.11. D grubu 14.gün biyopsi makroskopik görünüm (iskemik kulaktaki iyileşmede büyük miktarda gecikme görülmekte).

### 4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Hematoksilen-Eozin boyamasında incelemeler yapılırken teşhis kriterlerinde; Tan 2019, Doğan 2009 ve Abegao 2015 değerlendirme kriterleri modifiye edildi.

Buna göre; inflamasyon, konjesyon, hemoraji, ödem, granülasyon dokusu oluşumu ve re-epitelizasyon; 0-4 arasında skorlandı, anjiyogenez; 0-4 arasında skorlanarak, x100 büyütmede sadece eritrosit içeren olgun damarlar sayıldı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hematoksilen-Eozin boyaması teşhis kriterleri.

İnflamasyon	Konjesyon,hemoraji ve ödem	Granülasyon dokusu	Anjiyogenez	Re-epitelizasyon
0: yok	0: yok	0: yok	0: yok	0:kapanma yok
1: nadiren var	1: nadiren var	1: ince	1: nadiren var (0-4 kapiller)	1: hafif (<%30)
2: hafif	2: hafif	2: orta	2: nadiren var (5-14 kapiller)	2: orta (>%31-60)
3: yoğun	3: yoğun	3: kalın	3: yoğun (15-24 kapiller)	3: tam (> %61-99)
4: çok yoğun	4: çok yoğun	4: çok kalın	4: tam yoğun (>24 kapiller)	4: keratinositler tarafından tam re-epitelizasyon

Masson's Trichrome boyamasında ise inceleme esnasında teşhis kriterlerinde; Abreu 2012 değerlendirme kriterleri kullanıldı. Buna göre kollajen miktarı değerlendirildi (Tablo 4.4).

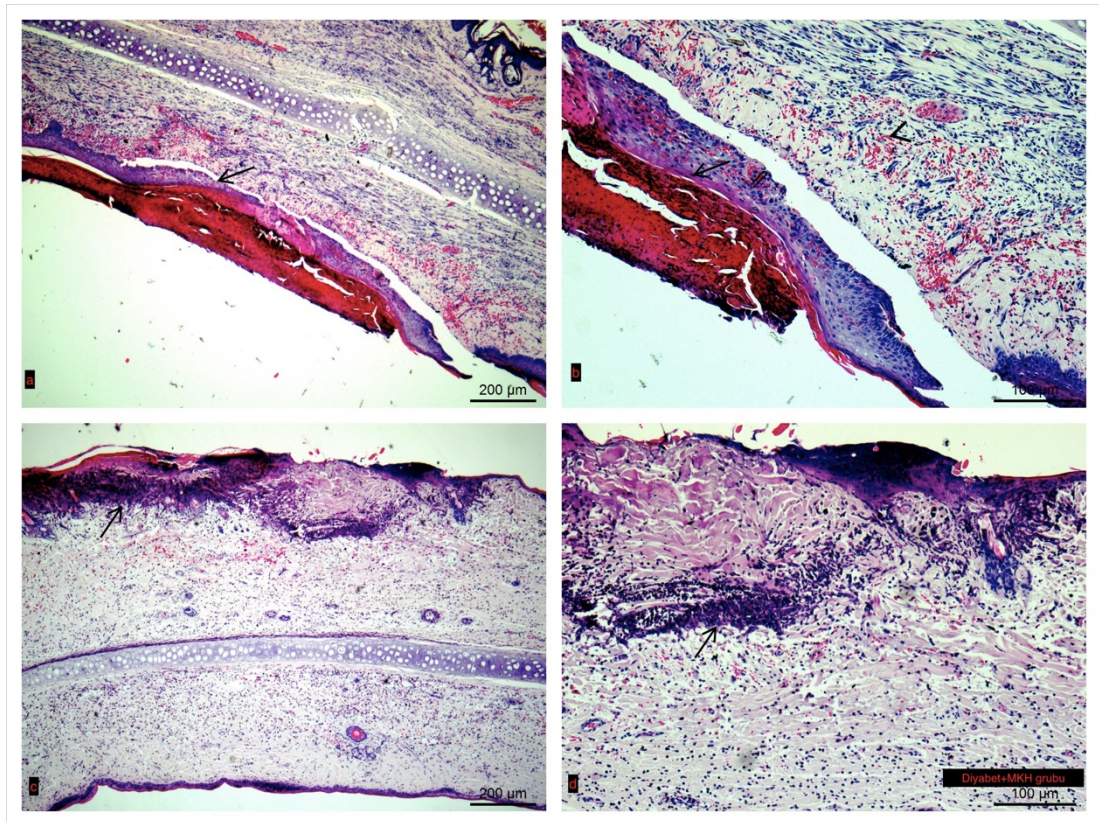
Tablo 4.4. Masson's Trichrome boyaması teşhis kriterleri.

1	%5-25 kollajen birikimi, yoğun infiltrasyonlu granülasyon dokusu, büyük miktarda ara madde.
2	%26-50 kollajen birikimi, MNL infiltrasyonu, ara maddede azalma.
3	%51-75 kollajen birikimi, ince ve ondülasyon tarzında kollajen bantlar arasında az inflamatuvar hücre.
4	%75'ten fazla kollajen birikimi, yoğun ve paralel kollajen bantlar, inflamatuvar hücre yok.

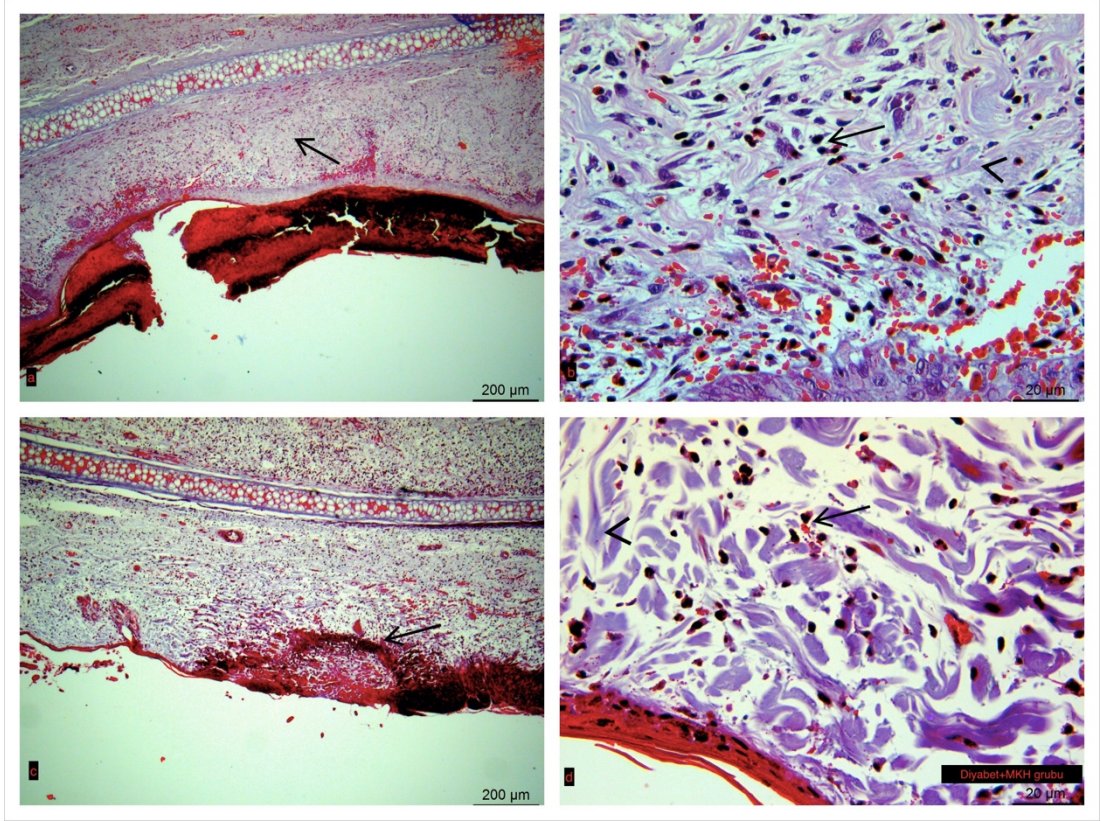
Bu kriterler ışığında; A grubu kesitleri incelendiğinde; iskemik olmayan taraf 7.gün biyopsilerinde Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde çok yoğun PMNL infiltrasyonu görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem yoğundu. Granülasyon dokusu orta kalınlıkta olup, anjiyogenez nadiren izlendi. Re-epitelizasyonda tama yakın kapanma izlendi (>%61-99). Epitel tabakasının beşinci katını oluşturan keratinositler nadir olarak görüldü. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %26-50 kollajen birikimi ve monosit makrofaj infiltrasyonu izlendi. Ara maddede ise azalma mevcuttu. Aynı taraf 14. gün Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde hafif PMNL yoğunluğu izlendi. Konjesyon, hemoraji ve ödemin 7. güne göre azaldığı görüldü. Artan yoğun anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusu da çok kalındı ve re-epitelizasyonda yara alanında tama yakın bir kapanma izlendi (%61-99). Epitel tabakasının beşinci katını oluşturan keratinositler nadir olarak görüldü. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %51-75 oranında kollajen birikimi gözlemlendi. İnce ve ondülasyon tarzındaki kollajen bantlar arasında az inflamatuvar hücre vardı.

A grubu iskemik taraf 7. gün biyopsi kesitlerinde ise Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde yoğun infiltrasyon görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem yoğundu. Bu yüzden granülasyon dokusu çok inceydi. Anjiyogenez nadirdi ve re-epitelizasyon hafifti (<%30). Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %26-50 kollajen birikimi

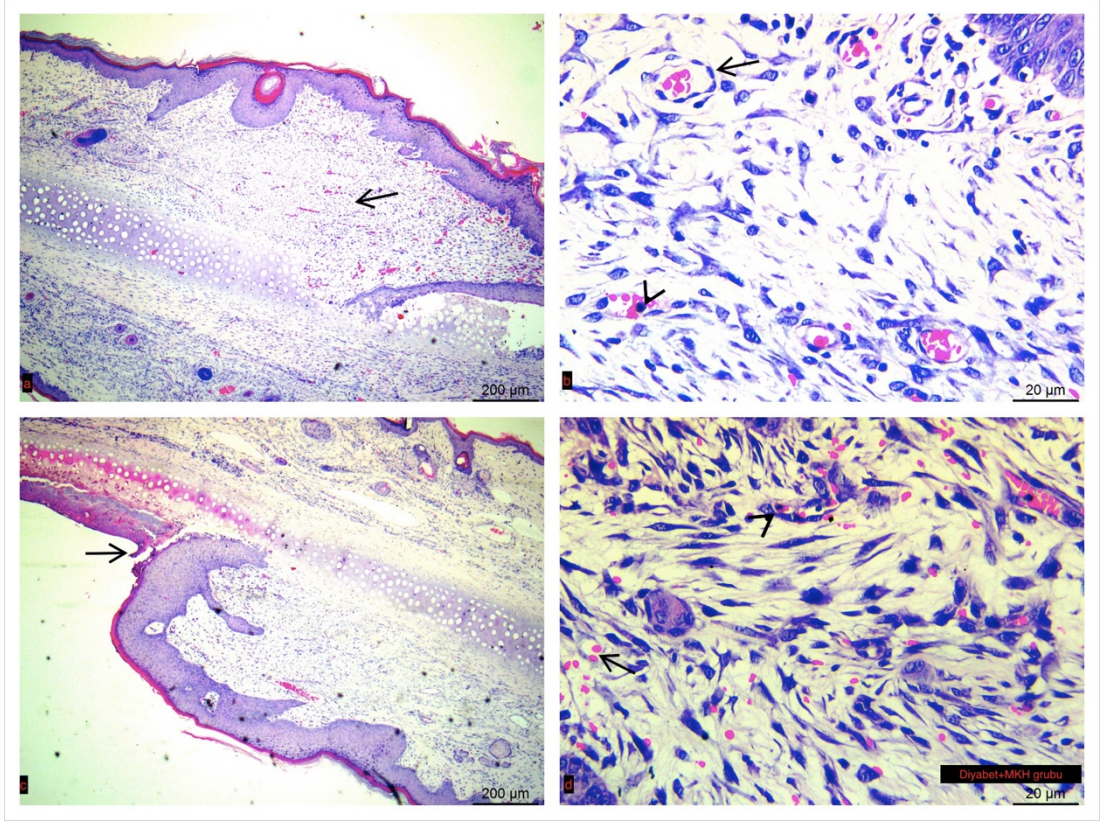
izlendi. Monosit makrofaj infiltrasyonu izlendi. Ara maddede azalma tespit edildi. Aynı tarafın 14. gün biyopsilerinde Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde inflamasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem hafifti. Granülasyon dokusunun arttığı ve orta kalınlığa ulaştığı görüldü, anjiyogenez nadiren izlendi ve re-epitelizasyon orta düzeydeydi (>%31-60). Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %51-75 oranında kollajen birikimi gözlemlendi. İnce ve ondülasyon tarzındaki kollajen bantlar arasında az inflamatuvar hücre vardı.



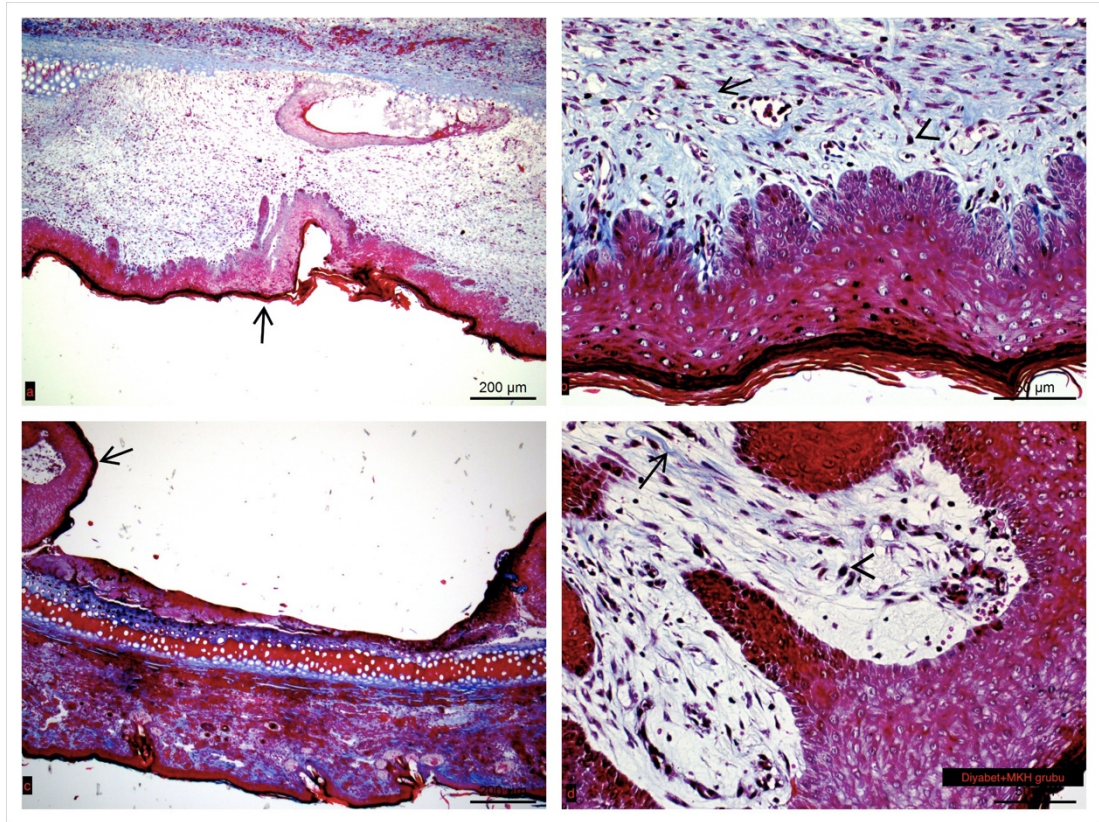
Şekil 4.12. A grubu 7.gün Hematoksilen Eozin boyama görüntüleri (a: A1sol kulakta re-epitelizasyonda tama yakın kapanma (ok).H&E,scale bar: 200 µm.b: A2 sol kulakta yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem (ok başı). Re-epitelizasyonda tama yakın kapanma ve nadir izlenen keratinositler. H&E,scale bar: 100 µm.c:A3 sağ kulakta yoğun infiltrasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem. H&E,scale bar: 200 µm.d:A4 sağ kulakta yoğun infiltrasyon,konjesyon,hemoraji ve ödem.H&E,scale bar: 100 µm).



Şekil 4.13. A grubu 7.gün Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a:A1 sol kulakta %26-50 kollajen birikimi (ok). Masson's Trichrome,scale bar:200 µm.b:A2 sol kulakta %26-50 kollajen birikimi (ok başı) ve inflamasyon. Masson's Trichrome,scale bar:20 µm.c:A3 sağ kulakta yoğun konjesyon,hemoraji ve ödem.Masson's Trichrome,scale bar:200 µm.d:A4 sağ kulakta %26-50 kollajen birikimi (ok başı) ve inflamasyon. Masson's Trichrome,scale bar:20 µm).



Şekil 4.14. A grubu 14.gün Hematoksilen Eozin boyama görüntüleri (a:A1 sol kulakta artan yoğun anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunda kalınlaşma (ok) H&E, scale bar: 200 µm.b:A2 sol kulakta hafif inflamasyon (ok başı) ve artan anjiyogenez. H&E,scale bar: 20 µm.c:A3 sağ kulakta orta düzeyde re-epitelizasyon. H&E,scale bar: 200 µm.d:A4 sağ kulakta hafif inflamasyon (ok başı) ve anjiyogenez. H&E,scale bar: 20 µm).



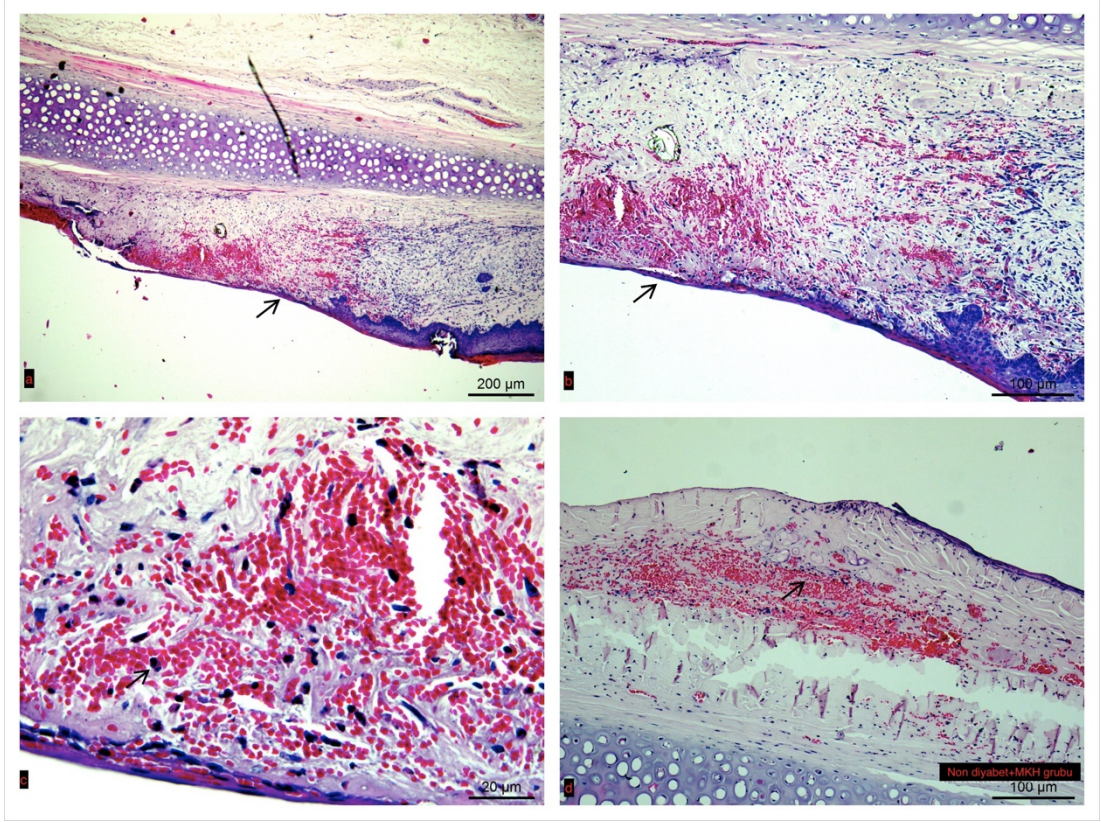
Şekil 4.15. A grubu 14.gün Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a:A1 sol kulakta re-epitelizasyonda tama yakın kapanma (ok). Masson's Trichrome,scale bar:200 µm.b:A2 sol kulakta %51-75 oranında kollajen birikimi.İnce ve ondülasyon tarzındaki kollajen bantlar arasında az miktardaki inflamatuvar hücre (ok başı). Masson's Trichrome,scale bar:50 µm.c:A3 sağ kulakta hafif re-epitelizasyon. Masson's Trichrome,scale bar:200 µm.d:A4 sağ kulakta %51-75 oranında kollajen birikimi. İnce ve ondülasyon tarzındaki kollajen bantlar arasında az miktarda inflamatuvar hücre (ok başı). Masson's Trichrome,scale bar:50 µm).

B grubuna ait kesitler incelendiğinde ise; iskemik olmayan yani sol kulaktaki 7.gün biyopsilerine bakıldığında Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde yoğun PMNL infiltrasyonu görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem çok yoğundu. Granülasyon dokusu incedi, anjiyogenez nadiren izlendi. Re-epitelizasyon hafifti (<30). Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %26-50 kollajen birikimi izlendi. Monosit makrofaj infiltrasyonu izlendi. Ara maddede azalma tespit edildi. Aynı tarafın 14. gün kesitlerine bakıldığında ise Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde hafif monosit

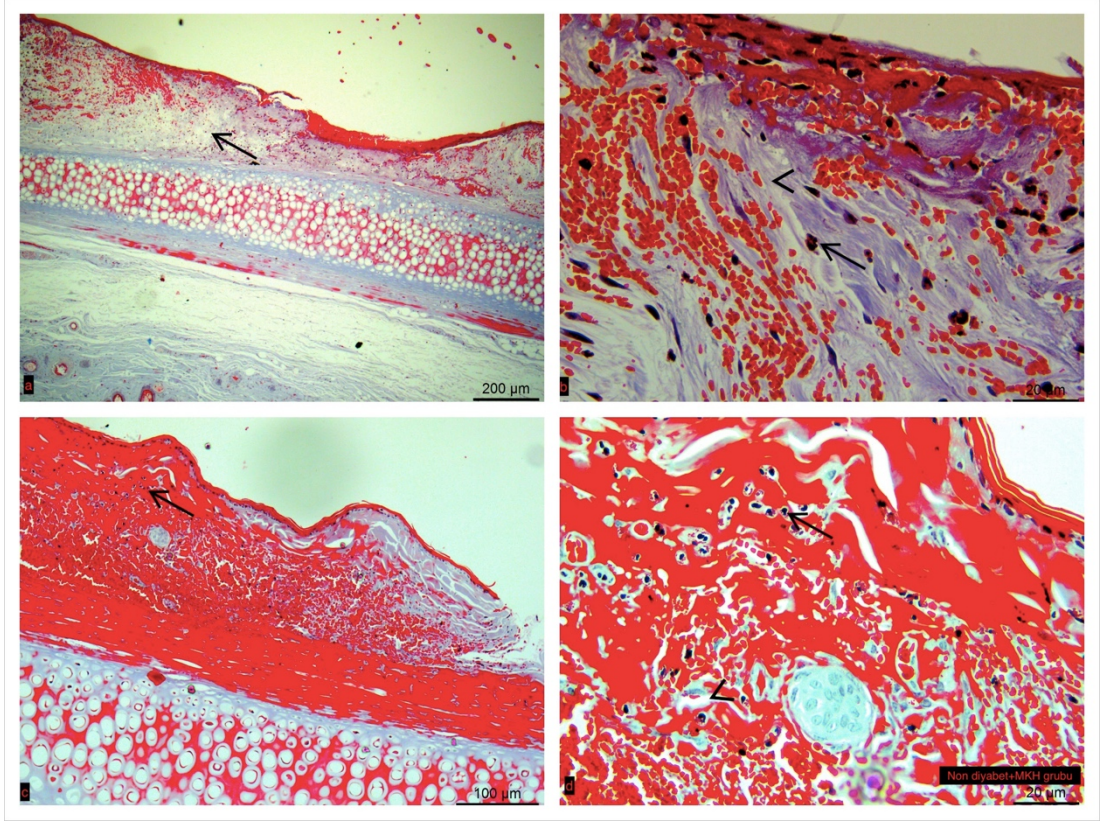
makrofaj yoğunluğu izlendi. Konjesyon, hemoraji ve ödem 7. güne göre azalarak, oldukça hafiflediği görüldü. Artan yoğun anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunda kalınlaşma ve re-epitelizasyonda tama yakın bir yara kapanması görüldü (%61-99). Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %51-75 oranında kollajen birikimi gözlemlendi. İnce ve ondülasyon tarzındaki kollajen bantlar arasında az inflamatuvar hücre vardı.

B grubunun iskemik yani sağ kulaktaki 7.gün biyopsilerine bakıldığında Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde çok yoğun infiltrasyon görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem çok yoğundu. Bu yüzden granülasyon dokusu çok inceydi. Anjiyogenez nadirdi ve re-epitelizasyon yoktu. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %5-25 kollajen birikimi izlendi. Yoğun infiltrasyon ve büyük miktarda ara madde birikimi vardı. İnce granülasyon dokusu izlendi. Aynı tarafın 14.gün kesitlerinde ise Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde inflamasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem hafifti. Granülasyon dokusunda kalınlaşma mevcutken, anjiyogenez nadiren izlendi. Re-epitelizasyon orta düzeydeydi (%31-60). Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %26-50 oranında kollajen birikimi izlendi. PMNL infiltrasyonu ve ara maddede azalma vardı.

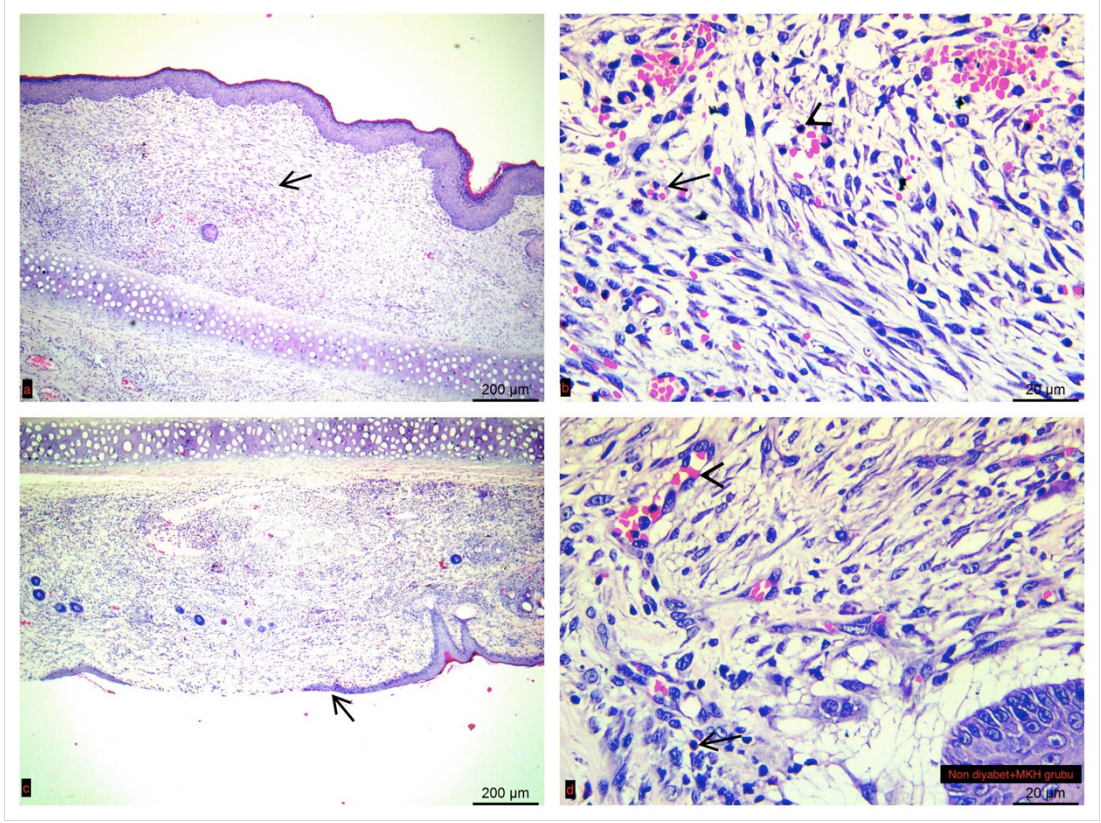




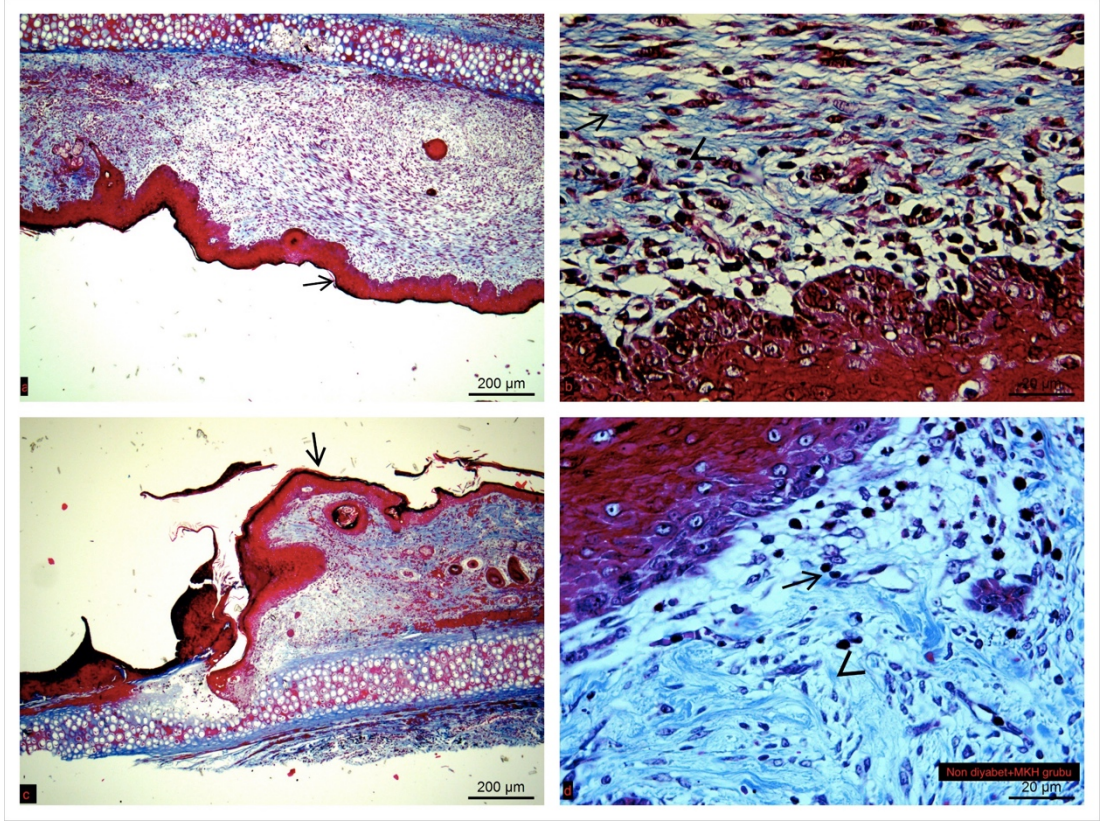
Şekil 4.16. B grubu 7.gün Hematoksilen Eozin boyama görüntüleri (a: B1 sol kulakta hafif re-epitelizasyon (ok).H&E,scale bar:200μm.b: B2 sol kulakta hafif re-epitelizasyon. H&E,scale bar: 100 μm.c: B3 sol kulakta yoğun infiltrasyon. Yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem. H&E,scale bar: 20 μm.d:B4 sağ kulakta yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem.H&E,scale bar:100 μm).



Şekil 4.17. B grubu 7.gün Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a:B1 sol kulakta %26-50 kollajen birikimi (ok). Masson's Trichrome,scale bar:200 µm.b:B2 sol kulakta %26-50 kollajen birikimi (ok başı) ve inflamasyon. Masson's Trichrome,scale bar: 20 µm.c:B3 sağ kulakta yoğun inflamasyon. Masson's Trichrome,scale bar:100 µm.d:B4 sağ kulakta %5-25 kollajen ve büyük miktarda ara madde birikimi (ok başı) birikimi ve yoğun inflamasyon. Masson's Trichrome,scale bar: 20 µm).



Şekil 4.18. B grubu 14.gün Hematoksilen Eozin boyama görüntüleri (a:B1 sol kulakta 14.günde artan yoğun anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunda kalınlaşma (ok) ve re-epitelizasyonda tama yakın bir kapanma (%61-99). H&E, scale bar: 200 $\mu$ m.b:B2 sol kulakta hafif infiltrasyon (ok başı) ve anjiyogenez. H&E,scale bar: 20 $\mu$ m.c:B3 sağ kulakta orta düzeyde re-epitelizasyon. H&E,scale bar: 200 $\mu$ m.d:B4 sağ kulakta hafif inflamasyon ve nadir anjiyogenez (ok başı).H&E,scale bar: 20 $\mu$ m).

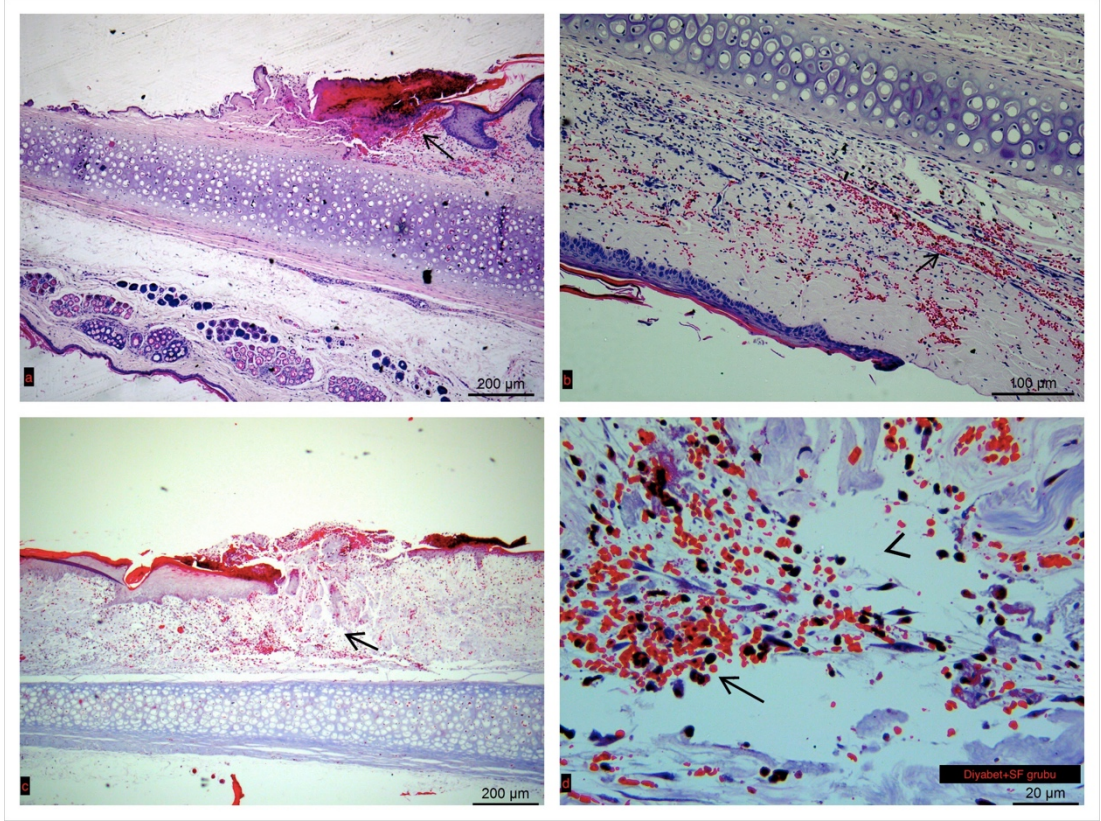


Şekil 4.19. B grubu 14.gün Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a:B1 sol kulakta re-epitelizasyonda tama yakın bir kapanma (ok). Masson's Trichrome,scale bar: 200 µm.b:B2 sol kulakta %51-75 oranında kollajen birikimi.İnce ve ondülasyon tarzındaki kollajen bantlar arasında az miktarda inflamatuvar hücre (ok başı). Masson's Trichrome,scale bar: 20 µm.c:B3 sağ kulakta orta derecede re-epitelizasyon. Masson's Trichrome,scale bar:200 µm. d: B4 sağ kulakta %26-50 oranında kollajen birikimi (ok başı) ve inflamasyon. Masson's Trichrome,scale bar: 20 µm).

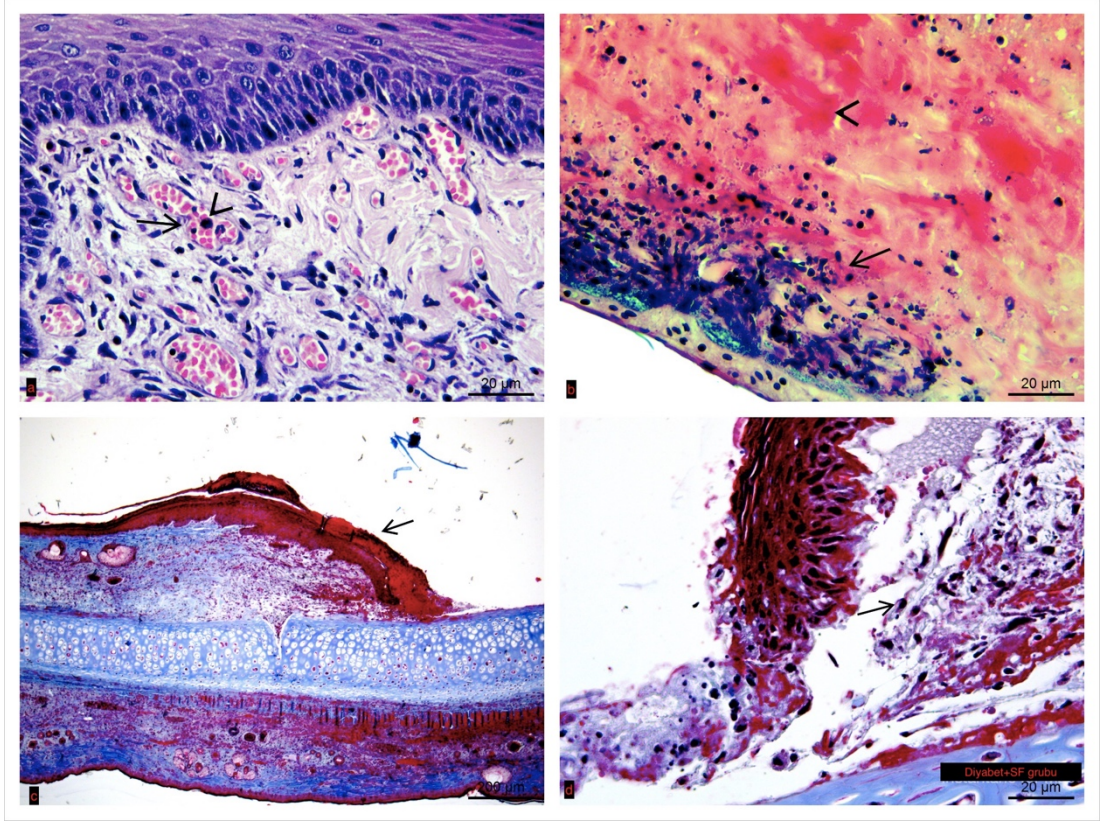
C grubuna ait kesitler incelendiğinde ise; iskemik olmayan yani sol kulaktaki 7.gün biyopsilerine bakıldığında Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde çok yoğun PMNL infiltrasyonu görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem oldukça yoğundu. Bu yüzden nadiren anjiyogenez gözlemlendi. Granülasyon dokusu izlenemedi ve re-epitelizasyon yoktu. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %5-25 kollajen birikimi izlendi. Yoğun infiltrasyon ve büyük miktarda ara madde birikimi vardı. 14. gün iskemik olmayan kulak kesitlerine bakıldığında Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde hafif monosit makrofaj yoğunluğu izlendi. Konjesyon, hemoraji ve ödem 7. güne göre

azalmıştı. Artan anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunun da kalınlaştığı, re-epitelizasyonun kısmen tamamlandığı görüldü (%31-60). Masson's Trichrome boyalı kesitlerde kollajen birikiminin arttığı (%26-50) ve monosit-makrofaj infiltrasyonunun mevcut olup, ara maddenin ise azaldığı tespit edildi.

C grubunda iskemik olan taraf yani sağ kulaktaki 7. gün biyopsilerine bakıldığında ise Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde yoğun infiltrasyon görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem çok yoğundu. Bu yüzden granülasyon dokusu çok inceydi, anjiyogenez ve re-epitelizasyon yoktu. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %5-25 kollajen birikimi izlendi. Yoğun infiltrasyon ve büyük miktarda ara madde birikimi vardı, ince bir granülasyon dokusu da bu tabloya eşlik ediyordu. Sağ tarafın 14.gün kesitlerinde ise Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde çok yoğun monosit makrofaj infiltrasyonu izlendi. Konjesyon, hemoraji ve ödem çok yoğundu. Anjiyogenez izlenmedi. Granülasyon dokusu inceydi ve re-epitelizasyon yoktu. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %5-25 oranında kollajen birikimi izlendi. Yoğun infiltrasyon ve büyük miktarda ara madde birikimi vardı. İnce granülasyon dokusu izlendi.



Şekil 4.20. C grubu 7.gün Hematoksilen Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a:C1 sol kulakta yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem (ok).H&E,scale bar: 200 µm.b:C3 sağ kulakta yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem ve infiltrasyon. H&E,scale bar: 100 µm. c: C1 sol kulakta büyük miktarda ara madde ve %5-25 kollajen birikimi. Masson's Trichrome,scale bar:200 µm. d:C2 sol kulakta büyük miktarda ara madde (ok başı) ve %5-25 kollajen birikimi,yoğun infiltrasyon. Masson's Trichrome,scale bar:20 µm).



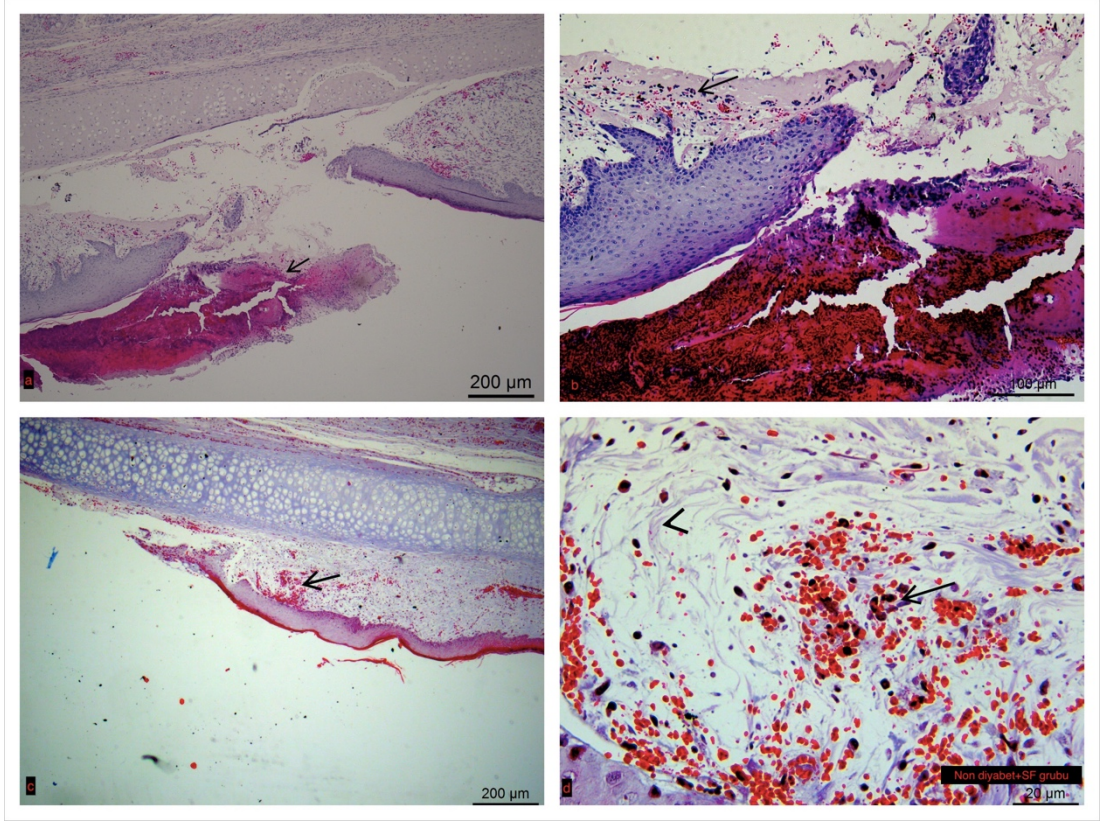
Şekil 4.21. C grubu 14.gün Hematoksilen Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a: C2 sol kulak H&E boyalı kesitlerde hafif infiltrasyon (ok başı) ve anjiyogenezde artış. H&E,scale bar: 20µm.b :C4 sağ kulakta çok yoğun infiltrasyon ve konjesyon, hemoraji ve ödem (ok başı). H&E,scale bar: 20 µm. c: C1 sol kulakta konjesyon, hemoraji. Masson's Trichrome,scale bar: 200 µm.d:C2 sol kulakta inflamasyon. Masson's Trichrome,scale bar:20 µm).

D grubunda iskemik olmayan yani sol kulaktaki 7. gün biyopsilerine bakıldığında Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde çok yoğun monosit makrofaj infiltrasyonu görüldü. Anjiyogenez nadirdi; konjesyon, hemoraji ve ödem oldukça yoğundu. Granülasyon dokusu izlenmedi, re-epitelizasyon yoktu. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %5-25 kollajen birikimi izlendi. Yoğun infiltrasyon ve büyük miktarda ara madde birikimi vardı. Aynı grubun 14. gün iskemik olmayan kulak kesitlerine bakıldığında Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde inflamasyon, konjesyon, hemoraji ve ödemin 7. güne göre azaldığı görüldü. Artan anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusu da kalınlaştığı görüldü. Re-epitelizasyon ile yara alanında tama yakın bir

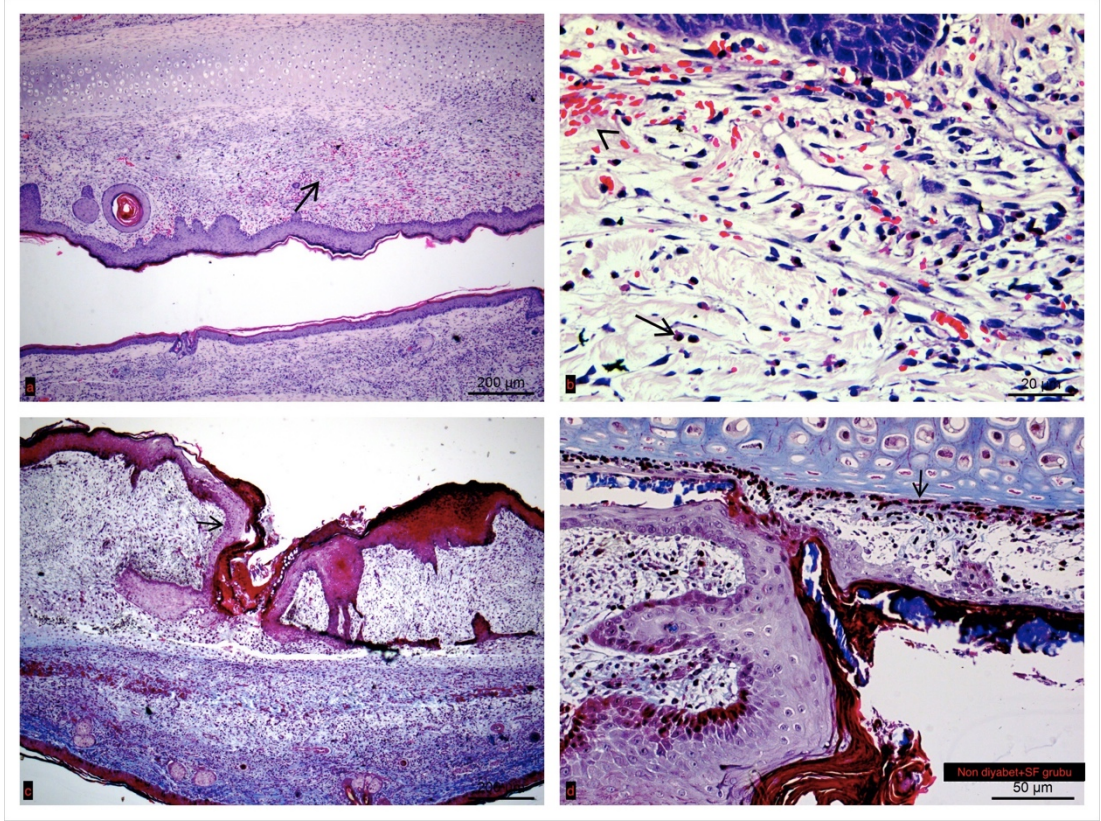
kapanma izlendi (%61-99). Masson's Trichrome boyalı kesitlerde kollajen birikiminin arttığı tespit edildi (%51-75). İnce, ondüasyon tarzındaki kollajen bantlar arasında az inflamatuvar hücre vardı.

D grubunda iskemik olan taraf yani sağ kulaktaki 7. gün biyopsilerine bakıldığında ise Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde çok yoğun monosit makrofaj infiltrasyonu görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem oldukça yoğundu. Bu yüzden granülasyon dokusu çok inceydi, anjiyogenez ve re-epitelizasyon yoktu. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %5-25 kollajen birikimi izlendi. Yoğun infiltrasyon ve büyük miktarda ara madde birikimi vardı ve ince bir granülasyon dokusu izlendi. Aynı şekilde 14. gün kesitlerinde ise Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde çok yoğun monosit makrofaj infiltrasyonu devam ettiği görüldü. Konjesyon, hemoraji ve ödem hafifti. Eritrosit içeren olgun damarlar sayıldığında nadiren anjiyogenez izlendi. Granülasyon dokusu inceydi ve re-epitelizasyon yoktu. Masson's Trichrome boyalı kesitlerde %26-50 oranında kollajen birikimi izlendi. Monosit makrofaj infiltrasyonu ve ara maddede azalma mevcuttu.





Şekil 4.22. D grubu 7.gün Hematoksilen Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a: D1 sol kulakta yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem (ok). H&E, scale bar: 200 µm.b:D2 sol kulakta yoğun infiltrasyon. H&E,scale bar: 100 µm. c: D1 sol kulakta %5-25 kollajen birikimi izlendi. Yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem. Masson's Trichrome,scale bar: 200 µm. d:D2 sol kulakta %5-25 kollajen birikimi (ok başı) ve yoğun infiltrasyon ve büyük miktarda ara madde birikimi.Masson's Trichrome,scale bar: 20 µm).



Şekil 4.23. D grubu 14.gün Hematoksilen Eozin ve Masson's Trichrome boyama görüntüleri (a:D1sol kulakta 14.günde konjesyon, hemoraji ve ödemde azalma (ok).Artan anjiogenez ile birlikte granülasyon dokusunda kalınlaşma ve re-epitelizasyonda tama yakın bir kapanma.H&E,scale bar:20 µm.b:D4 sağ kulakta 14.günde yoğun infiltrasyon. Hafif konjesyon, hemoraji ve ödem (ok başı). H&E, scale bar:20µm. c:D1sol kulakta 14.günde re-epitelizasyonda tama yakın bir kapanma. Masson's Trichrome, scale bar: 200 µm.d:D4 sağ kulakta 14.günde yoğun inflamasyon. Masson's Trichrome, scale bar:50 µm).

-Gruplar arası karşılaştırmalı sonuçlara baktığımızda;

Diyabetik tavşanlara SF uygulanan C grubu ile diyabetik tavşanlara MKH uygulanan A grubunun non iskemik kulak yaralarının 7. gün biyopsilerinden hazırlanan kesitler kıyaslandığında MKH uygulamasının olumlu etkileri izlendi. Her iki grupta da infiltrasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem yoğun olarak izlense de, MKH uygulanan A grubunda granülasyonun daha fazla artmaya başladığı, ve epitelizasyonun yara alanında tama yakın kapanmayı sağladığı belirlendi, epitel

tabakasının beşinci katını oluşturan keratinositler nadiren mevcuttu. İstatistiksel olarak ise A grubu lehine granülasyon ve re-epitelizasyonda anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ ). Aynı gruplar aynı taraf yaraların bu kez 14. gün biyopsi kesitleri karşılaştırıldığında ise her iki grupta da infiltrasyon, konjesyon, hemoraji ve ödemde 7. güne göre azalma izlendi. Anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumu 7. güne göre her iki grupta da artsa da A grubunda daha belirgin bir artış izlendi. Re-epitelizasyon açısından MKH uygulanan grup yani A grubunda tama yakın bir yara kapanması gözlemlendi, alanda epitel tabakasının beşinci katını oluşturan keratinositlere nadiren rastlandı. Bu bulgularda da istatistiksel açıdan A grubu lehine granülasyon ve re-epitelizasyon açısından anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ ). Yine Masson's Trichrome boyamada elde edilen skorlarda da A grubu lehine istatistiksel anlamlı fark mevcuttu ( $p<0,05$ ).

A ve C gruplarının bu kez de iskemik olan sağ kulak yaralarından alınan biyopsilerin kesitleri kıyaslandığında; 7. günde her iki grupta yoğun infiltrasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem görüldü. Granülasyon dokusu her iki grupta da ince olmasına karşın MKH uygulanan A grubunda diğer grubun aksine anjiyogenez izlendi. A grubunda re-epitelizasyonun da başladığı görüldü. İstatistiksel açıdan A grubu lehine anjiyogenez ve re-epitelizasyon açısından anlamlı fark olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). 14. gün karşılaştırması yapıldığında, MKH uygulanan grupta farkların daha net şekilde ortaya çıktığı görüldü. A grubunda inflamasyonun azaldığı, konjesyon, hemoraji ve ödem bulgularının daha fazla gerilediği tespit edildi. MKH uygulanan grupta artmaya başlayan anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunda kalınlaşma ve epitelizasyon da artış görüldü. A grubunda kollajen birikimi de daha yüksek miktardaydı. Burada da istatistiksel açıdan bakıldığında A grubu lehine granülasyon, anjiyogenez, re-epitelizasyon ve konjesyon, hemoraji, ödem parametrelerinde anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ ).

Non diyabetik tavşanlara SF uygulanan grup olan D grubu ve non diyabetik tavşanlara MKH uygulanan B grubunun non iskemik kulak yaralarının 7. gün biyopsilerinden hazırlanan kesitler kıyaslandığında 7. günde MKH uygulamasının infiltrasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem açısından belirgin bir farklılık yarattığı gözlenmese de, granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenezin ve epitelizasyonun başlaması açısından MKH'lerin olumlu bir katkı yaptığı düşünülmektedir. İstatistiksel açıdan bakıldığında diğer parametrelerin anlamlı fark yaratmamasına karşın erken

dönemde re-epitelizasyon B grubu yani MKH uygulanan grupta istatistiğe de yansiyacak şekilde daha fazlaydı ( $p<0,05$ ). Masson's Trichrome boyaması sonucu elde edilen skorlarda da B grubunda daha fazla kollajen birikimi görüldü. Bu da B grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya koydu ( $p<0,05$ ). Aynı gruplar aynı taraf yaraların bu kez 14.gün biyopsi kesitleri karşılaştırıldığında ise grup bulgularında farklılık gözlenmedi. Her iki grupta da 7. güne göre inflamasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem azaldığı anjiyogenezin ise arttığı görüldü. Granülasyon dokusunda kalınlaşma ve re-epitelizasyonda tama yakın bir kapanma görüldü. Bu durum istatistiksel açıdan anlamlı fark yaratmadı ( $p>0,05$ ).

B ve D gruplarının bu kez de iskemik olan sağ kulak yaralarından alınan biyoplerin kesitleri kıyaslandığında; 7. günde, iskemik dokuya ait görüntüler vardı ve gruplar arasında bir farklılık gözlenmedi. Bu doğrultuda her iki grupta da yoğun infiltrasyona, yoğun konjesyon, hemoraji ve ödem eşlik ediyordu. Bu nedenle granülasyon dokusu oldukça inceydi ve anjiyogenez ve re-epitelizasyon izlenmedi. Ancak B grubunda anjiyogenezin daha fazla olduğu görüldü. İstatistiksel açıdan bakıldığında da anlamlı fark B grubu lehine sadece angiogenezde saptandı ( $p<0,05$ ). 14. gün karşılaştırması yapıldığında her iki grupta da konjesyon, hemoraji ve ödem hafiflediği görüldü. Her iki grupta da anjiyogenez nadiren de olsa izlendi, ancak granülasyon dokusu gelişiminin MKH grubunda daha iyi olduğu görüldü. Re-epitelizasyon açısından MKH grubunda yarı yarıya kapanmanın başladığı görüldü. Yani MKH uygulanan B grubunda inflamasyonun hafiflediği, granülasyon dokusu kalınlığının daha fazla arttığı ve re-epitelizasyon ile daha fazla yara kapanması görüldüğü tespit edildi. İstatistiksel olarak da bu parametrelerde B grubu lehine anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Diyabetik ayak yaralarının % 60-80'i iyileşirken, % 10-15'i aktif kalarak kronik sürece ilerlemekte, % 5-24'ü ise ilk değerlendirmeden sonra 6-18 ay içinde uzuv amputasyonuna sebep olmaktadır [54]. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre ülkemizde yapılan amputasyon sayısı yılda 12.000 civarındadır, bunların da çok önemli bir kısmını diyabetik ayak yarasına bağlı ampütasyonlar oluşturmaktadır. Amputasyon hastayı major bir yara morbiditesinden kurtaran akılcı bir alternatif gibi gözükmele beraber hastanın ambulasyondaki enerji maliyetini artırmaktadır. Uzuv amputasyonu sonrası komorbid durumlar da düşünüldüğünde mortalite birinci yılda %13-40, üçüncü yılda %35-65, beşinci yılda %39-80'e çıkmaktadır. Bu sayılara bakıldığında prognoz birçok maligniteden daha kötüdür [132]. Bu anlamda diyabetik ayak yaralarının iyileşmesi/iyileştirilmesi sağ kalım için daha anlamlı bir çözümdür. Diyabetik ayak yarası olan hastalarda iyileşmeyi hızlandıracak, hastanede kalış süresini kısaltacak, ampütasyona gidişi engelleyecek, düşük maliyetli bir tedavi alternatifi bulunması oldukça önemli bir konudur. Bu nedenle diyabetik yara iyileşmesini destekleyecek yeni yaklaşımlara ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Literatürde diyabetik ayak yarası olan hastalarda yara iyileşmesinin farklı süreçleri farklı ilaçlar, yara bakım ürünleri veya büyüme faktörleri gibi pek çok yöntemle uyarılmaya çalışılmıştır. Mezenkimal kök hücre çalışmaları da bunlardan bir tanesidir.

Kume ve arkadaşları tarafından yapılan in vitro çalışmada; ileri glikolizasyon ürünlerinin, MKH'lerin proliferasyon ve diferansiyasyon yeteneklerini azalttığı, apoptotik etki ile MKH miktarında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. DM'ta oldukça yoğun ortaya çıkan bu ürünler nedeniyle diyabetik hastalarda yara iyileşmesinde endojen MKH'lerin etkisi zayıflamaktadır [133]. Cianfarani ve arkadaşlarına ait çalışmada, diyabetik farelerde YDKKH'lerin yara iyileşmesi konusunda etkinliği araştırılmış, diyabetik farelerde YDKKH'lerin proliferatif ve migratuar potansiyallerinde düşüş saptanmıştır. İnbred diyabetik fare kaynaklı adipojenik kök hücrelerde hepatosit büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü ve insüline benzer büyüme faktörü-1 gibi yara iyileşmesinde etkin bazı büyüme faktörlerinin salınımında inbred diyabetik olmayan fare kaynaklı gruba göre anlamlı düşüş görülmüştür. Ek olarak inbred diyabetik fare kaynaklı kök hücrelerin, keratinosit proliferasyonu ve migre edici özelliklerinin inbred diyabetik olmayan gruba göre daha

düşük olduğu dikkat çekmiştir [134]. Buradan yola çıkarak tedavide eksik olanı ya da fonksiyonu azalmış olanı kullanmak oldukça anlamlıdır. Kök hücre temelli tedaviler oldukça umut vaat etmekte ve pek çok alanda başarılı sonuçlar vermektedir.

Kemik iliğinden kök hücre elde etmenin zor, ağrılı ve daha invaziv bir işlem olması; periferik kanda yeterli sayıda kök hücre bulunmaması, yeterli sayıyı elde etmek için in vitro çoğaltma işlemi gerektirmesi; kordon kanında ise kaynağa ulaşmada kısıtlılıklar ve elde edilen hücrelerin diferansiasyonunda bazı yönlerde eksiklikler olması sebebiyle çalışmamızda kullandığımız mezenkimal kök hücre kaynağı yağ dokudur. Zuk ve arkadaşlarının [96] yaptığı çalışmada; yağ dokunun mezenkimal hücrelerden oldukça zengin olduğu, bir dizi moleküler ve biyokimyasal tanımlama yapılması sonucu işlenmiş lipoaspirat hücrelerinin KİKKH'lerle aynı yüzey antijenik özellikleri gösterdikleri, uygun kimyasal uyanlarla adipojenik, osteojenik, kondrojenik, myojenik ve nörojenik hücreler gibi birçok hücreye farklılaşma kapasitesine sahip oldukları ortaya konulmuştur. Bu hücreler 'yağ doku kaynaklı kök hücre' olarak adlandırılmıştır.

Yağ dokudan lipoaspirasyon yöntemi ile hem daha kolay hem de kemik iliğine göre daha fazla miktarda kök hücre elde edilebilmesi nedeniyle yağ dokunun plastik cerrahide son yıllarda kök hücre kaynağı olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Ayrıca adipoz dokunun santimetre küp başına kemik iliğine göre 100 ila 1000 kat daha fazla pluripotent kök hücre içerdiği saptanmıştır [97, 98]. YDKKH'lerin telomer uzunluğu ve beta-galaktosidaz aktivitelere bağlı olarak, KİKKH'lere benzer yaşlanma göstermelerine rağmen; proliferasyon yetenekleri KİKKH'lerden daha fazladır [135]. Pelizzo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; sağlıklı tavşan deney modelinde sırtta oluşturulan cilt yaralarında YDKKH ile tedavi edilen yaralar, kemik iliği kaynaklı kök hücrelere göre daha iyi epitel rejenerasyonu ve kollajen birikimi sağlamıştır [130].

Kern ve arkadaşları tarafından yapılan; kemik iliği, umbilikal kord ve yağ doku kaynaklı kök hücrelerin karşılaştırıldıkları çalışmada; her üç kaynaktan elde edilen kök hücrelerin aynı fibroblastoid morfolojiye sahip olduğu, aynı kolonileri oluşturdukları, ve benzer yüzey proteinlerine sahip oldukları gösterilmiştir. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitesinin yağ doku kaynaklı kök hücrelerde diğer iki gruba göre daha yüksek oranlarda olduğu tespit edilmiş, ayrıca umbilikal kord kanı

kaynaklı kök hücrelerin adipojenik farklılaşma gösteremediği bildirilmiştir [136]. Umbilikal kord kanı kaynaklı kök hücre elde edilmesi konusunda kaynağa ulaşmak noktasında da kısıtlılıklar mevcuttur. Bu bilgiler ışığında biz diğer kaynaklar yerine çalışmamızda YDKKH'lerin kullanılması tercih ettik. YDKKH'leri her bir tavşandan ayrı ayrı almak yerine, 2 adet inbred sağlıklı tavşandan elde ettik.

Seçilen deney modeline bakacak olursak; yaptığımız literatür taramalarında klinikte karşımıza çıkan diyabetik ayak yaralarına en yakın deney modelininin çalışmada kullanılması hedeflendi. Klinikteki diyabetik ayak yaralarında olduğu gibi; iskeminin ve nöropatinin bir arada olduğu, yara zemininde enfekte, kontamine kemik, kırık veya eklem olan yaraları temsil edecek bir model arandı. Literatürde karşımıza çıkan deney modellerinde yaraların; rat, fare veya tavşanların sırt kısımlarında oluşturulduğu görüldü. Bu yaraların zeminlerinde ekspozite kırık veya kemik yapı yoktu, aksine zeminde yumuşak doku olması sebebiyle yara iyileşmesine kontraksiyon da katkı sağlamaktaydı. Bu eksiklikler göz önünde bulundurularak, literatür taramamızda Chien ve Wilhelmi'nin tarif ettiği tavşan kulağında oluşturulan iskemik, nöropatik yara modelininin çalışmamıza en uygun model olduğu düşünüldü [11]. Bu modelde diyabetik ve diyabetik olmayan tavşanlarda yara iyileşmesi karşılaştırılabilirken, aynı tavşanda iskemik-nöropatik / iskemik ve nöropatik olmayan yaraların karşılaştırmasının yapılabilmesi de çalışmanın kapsamını desteklemektedir. Hem bu model hem de MKH kaynağı açısından çalışmamızda diğer literatür çalışmalarından farklı olan ve çalışmamızı bu açılarından özgün kılan bazı noktalara değinecek olursak;

- Daha önceleri MKH kaynağı olarak yaygın şekilde kemik iliği kullanılmakta iken; çalışmamızda inbred sağlıklı deney tavşanlarından elde edilen yağ dokudan üretilen kök hücreler kullanıldı.

-Diyabetik yara çalışmaları genellikle rat, fare ve tavşanların sırt bölgesinde yapılmıştır. Bu tip yaralarda zeminde yumuşak doku yapıları bulunmaktadır. Klinikte rastladığımız diyabetik yaraların pek çoğunda zeminde ekspozite kemik, tendon ve kırık gibi avasküler yapılar mevcuttur. Çalışmamızdaki deney modelinde oluşturulan yaralarda zeminde perikondriyum olmayan kırık dokusu bulunmaktadır. Bu durumun klinikte karşımıza çıkan kontamine/biyofilm içeren iskemik diyabetik yaraları en iyi şekilde yansıttığını düşünmekteyiz.

-Rat, fare veya tavşan sırtında yapılan zeminde yumuşak dokuların bulunduğu açık yaralarda kontraksiyon eğilimi fazla olduğundan, bunu engellemek için çeşitli materyaller ile yara dudakları sabit tutulmaya çalışılmaktadır [137]. Ancak kemirgenlerde bu tip materyallerin kullanımı, yerinde tutulması hayli zor olmaktadır. Ayrıca materyalin kendisi bası, kontaminasyon, eksuda birikimi ve enfeksiyona eğilim gibi durumlara yol açabilmektedir. Çalışmamızda kullanılan modelde iyileşmede, kontraksiyonun etkisi yok denecek kadar az düzeyde olup, iyileşme re-epitelizasyon ile sağlanmaktadır.

-Klinikte karşı karşıya kaldığımız diyabetik yaraların etiolojisinde nöropati, mikro ya da makrovasküler değişikliklere bağlı anjiyopati de bulunmaktadır. Oysa ki diyabetik rat, fare veya tavşan sırtında oluşturulan yaralarda nöropatiden söz etmek mümkün değildir. Ayrıca belli süre içinde oluşturulan deneysel diyabet modelinin mikro ya da makrovasküler anjiyopati yaptığına dair kanıt da yoktur. Çalışmalarda bununla ilgili ön değerlendirme de yapılmamıştır. Yara modelimizde vasküler hasar ve nöropatiyi ayrı ayrı ya da birlikte yapabilme olanağı mevcuttur. Dolayısı ile bu deneysel modelde kullanılacak herhangi bir ürünü kliniğe en yakın haliyle test etmek mümkün olacaktır. Bu özgün değerler doğrultusunda çalışmamız MKH'lerin yara iyileşmesi üzerine etkisi ve diyabetik-iskemik yara modeli konusunda literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Deneysel diyabet oluşturma yöntemimiz yine literatür incelemeleri sonucu seçildi. Diyabet ve komplikasyonlarının deneysel modellerde araştırılması, hastalığın mekanizmasının daha iyi anlaşılmasının yanı sıra geliştirilecek tedavi yöntemleri için de bir temel sağlamaktadır. Diyabet araştırmalarında genetik, cerrahi veya kimyasal yöntemlerle diyabetik hale getirilmiş deney hayvanları kullanılmaktadır. Genetik ve cerrahi yöntemler pahalılıkları, teknik deneyim gerektirmeleri (cerrahi pankreatektomi gibi) nedeni ile daha az tercih edilmektedir. Deney hayvanlarında diyabet oluşturmada en çok tercih edilen yöntem kimyasal yöntemler olan streptozotosin ve alloksan monohidrat enjeksiyonlarıdır. Etuk 2010 yılında yayınladığı derlemesinde 1996-2006 yılları arasında yapılmış hayvan deneylerinde kimyasal diyabet oluşturmada % 69 oranında streptozotosin, %31 oranında alloksan monohidrat kullanıldığını ifade etmektedir [138]. Uygulama açısından benzer olan bu iki kimyasal maddenin ikisi de farklı mekanizmalarla pankreas beta hücrelerini harap etmekte ve DM oluşumuna



sebeptir. Alloxanın beta hücre selektivitesi, streptozotose göre daha az, toksisitesi daha fazladır ancak insüliniz daha uzun süre sağ kalım sağlanması ve daha kolay ulaşılabilir olması sebebiyle deney tavşanlarında diyabet oluşturmak amacıyla alloxan monohidrat kullanımını tercih edildi [139, 140].

Yine modelimizde mezenkimal kök hücrelerin uygulama şekline değinecek olursak; Kallmeyer'in yapmış olduğu ratların ayak dorsalinde oluşturulan yaralarda lokal ve sistemik YDKKH uygulamasının karşılaştırıldığı çalışmada belirtildiği üzere; lokal uygulanan YDKKH'lerin hedef dokuda yani yara yatağında dağılımları, toplam miktarları ve burada kalma süreleri daha fazla olmaktadır. Sistemik uygulamada ise YDKKH'lerin akciğerlere ulaştıktan sonra buradan yara yatağına ulaşamadıkları görülmüştür [141]. Ayrıca lokal enjeksiyon yoluyla MKH'lerin sistemik yan etkilerinden de (anjiogenik hastalıklardan kanser, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi hastalıkların ortaya çıkmasını kolaylaştırıcı etkilerinden) korunabilmek mümkündür. Biz de çalışmamızda bu nedenlerden dolayı lokal enjeksiyon yöntemini kullandık.

Çalışmamızın makroskopik bulguları yani yara alan ölçümlerine bakıldığında tüm gruplarda hem iskemik hem de iskemik olmayan kulaklarda 7. ve 14. güne kadar olan yara kapanma miktarları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ).

A ve B grubu iskemik olmayan kulaklar arası yara alan ölçümleri karşılaştırıldığında 7. günde yara iyileşme oranı A grubunda yüksek iken 14. günde B grubunda iyileşme hızı ve yara kapanma oranının arttığı bunun hem ortalama alan ölçümlerine yansıdığı hem de istatistiksel olarak anlam ifade ettiği görüldü. Bu sonuçlardan yola çıkarak tek değişkenin diyabet olduğu durumda ilk 7 günde DM'un yara iyileşmesini olumsuz etkilemediği, hatta diyabetik tavşanlarda daha yüksek oranda iyileşme olduğu dikkat çekti. Ancak 14. günde, 7. güne kıyasla diyabetik olmayan tavşanların iyileşmelerinin hızlanarak daha yüksek iyileşme oranına ulaştığı ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı fark yarattığı görüldü ( $p < 0,05$ ). Bunun sebebi diyabetik tavşanlardan oluşan A grubunun, erken dönemde inflamasyonun diyabete bağlı daha şiddetli olması nedeniyle yara iyileşmesine bu safhada katkıda bulunan medyatörlere daha yoğun maruz kalması olabilir. Bahsedilen medyatörler arasında yara iyileşmesini hızlandıran faktörlerin de olması yara iyileşmesindeki hızlanmayı açıklamaktadır.

C ve D gruplarının kıyaslanması sonucu ise iskemik olmayan kulaklar arasında 7. günde istatistiksel anlamlı fark olmamasına karşın ( $p>0,05$ ), ortalama yara iyileşme miktarlarının C grubunda daha fazla olduğu karşımıza çıktı. 14. günde ise burada da A ve B grubunda olduğu gibi; D grubunun iyileşme hızı artarak C grubuna göre daha fazla oranda yara iyileşmesine ulaştı. Bu durum da benzer şekilde; C grubunun, erken dönemde inflamasyonun diyabete bağlı daha şiddetli olması nedeniyle yara iyileşmesine bu safhada katkıda bulunan medyatörlere daha yoğun maruz kalmasıyla açıklanabilir. Bahsedilen medyatörler arasında yara iyileşmesini hızlandıran faktörlerin de olması yara iyileşmesindeki hızlanmayı açıklamaktadır.

D grubunda ortaya çıkan alan ölçümlerinden yola çıkarak iyileşme oranlarına bakıldığında; non iskemik kulak yaralarında iyileşme oranlarının iskemik kulak yaralarına göre yüksek olduğu sonucuna varıldı. Bu sonucu diğer grupların iskemik ve iskemik olmayan kulak yaralarının iyileşme oranlarına baktığımızda da gördük. Yani tüm yara alan ölçümlerinde iskemik kulak yaralarında non iskemik kulak yaralarına göre beklenildiği şekilde iyileşme yavaş ve 14 günlük sürede tama yakın kapanma daha az sayıda denekte gerçekleşti.

A ve C gruplarının sonuçları kıyaslandığında ise hem iskemik hem de iskemik olmayan kulakların ayrı ayrı 7 ve 14. gün yara alan ölçümü ortalama değerlerine ve istatistiksel olarak farklarına bakıldığında; tüm kıyaslamalarda A grubunda daha yüksek oranda yara iyileşmesi ortaya çıktı. Burada A grubu lehine yani MKH uygulamasının olumlu etkisi üzerine anlamlı fark ortaya çıktı ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde B ve D gruplarının; non iskemik kulak yaralarının ayrı ayrı 7 ve 14. gün yara alan ölçümü ortalama değerlerine ve istatistiksel olarak farklarına bakıldığında tüm kıyaslamalarda B grubunda daha yüksek oranda yara iyileşmesi tespit edildi. B grubu lehine yani MKH uygulamasının olumlu etkisi üzerine anlamlı fark ortaya çıktı ( $p<0,001$ ). İskemik kulaklarda ise 7. günde ortalama alan ölçümlerine bakıldığında yara iyileşme oranı yine B grubu lehine yüksekti. Ancak bu fark istatistiğe yansımada ( $p>0,05$ ). 14. günde ise durum hem yara alan ölçümü ortalama değerleri hem de istatistiksel anlam olarak B grubu yani MKH uygulanan grup lehineydi ( $p<0,001$ ).

Yara alan ölçümlerine bakıldığında; en fazla yara alanı azalması yani yara iyileşmesi; MKH uygulanan ve diyabetik olmayan tavşanlardan oluşan B grubunda ardından yine MKH uygulanan ve diyabetik tavşanlardan oluşan A grubunda

karşımıza çıktı. Yani başka bir deyişle MKH uygulanan A ve B gruplarında yara boyutlarında azalmanın diğer gruplara göre daha fazla olduğu, yara kapanmasının epitelizasyonla sağlandığı deney modelimizden yola çıkarak da epitelizasyonun bu gruplarda daha yüksek miktarda olduğu görüldü. MKH uygulanan iskemik komponentin de olduğu yaralarda, yara kapanma oranlarının daha yüksek olduğu görüldü. B grubunun temsil ettiği Buerger hastalığı gibi diyabetin olmadığı ancak iskemi ve nöropatinin mevcut olduğu tablolarda; MKH uygulamasının etkin bir seçenek olduğu ortaya konmuş oldu.

B ve D grupları arasındaki iyileşme miktarları kıyaslandığında, özellikle iskemik kulak yaralarında her ne kadar hem 7 hem de 14. günlerde B grubunda daha fazla iyileşme görülse de yara kapanma miktarlarının 7-14. günler arasında ilk 7 güne göre daha fazla olduğu; ikinci 7 günlük periyotta yara iyileşmesinin ivme kazandığı tespit edildi. MKH uygulanmayan D grubunda bu ivmelenme tespit edilmedi. Bu nedenle B grubunda ortaya çıkan yara iyileşme hızındaki ivmelenmenin MKH'lerin etkisi nedeniyle ortaya çıktığı düşünüldü. Buradan yola çıkarak B grubunun temsil ettiği; diyabetik olmayan ancak iskemi ve nöropatinin yer aldığı Buerger hastalığı gibi tablolarda, daha uzun süreli MKH uygulaması elde edilecek olumlu etkiyi daha da artırabilir.

Alan ölçümleri açısından diyabetik tavşanlardan oluşan ve yaralara MKH uygulanan A grubu ve sham grubu olan diyabetik olmayan tavşanların kulak yaralarına SF uygulanan D grubu karşılaştırıldığında; A grubunun iskemik ve non-iskemik kulaklardaki iyileşme miktarları ayrı ayrı hem 7 hem de 14. günde sham grubuna göre daha yüksekti. Bu durumda MKH uygulanan diyabetik deneklerde, diyabetik olmayan plasebo uygulanan deneklere yakın bir yara iyileşmesi görüldü.

Shi ve arkadaşlarının ratlarda, diyabetik ayak yara modeli kullanılan çalışmasında, 7.günde YDKKH uygulanan grupta yara boyutlarının önemli ölçüde azaldığı, 15.günde YDKKH uygulanan ratlarda diyabetik ayak yaralarının daha da küçülerek neredeyse tamamen iyileşme eğilimi gösterdiği görülmüştür [142]. Bu bulgular, YDKKH'lerin epitelizasyonu önemli ölçüde artırdığı ve dolayısıyla ratlarda diyabetik ayak yarası modelinde yara iyileşmesini teşvik ettiğini göstermektedir. Benzer şekilde An ve arkadaşlarının çalışmasında elde edilen veriler, YDKKH uygulanan diyabetik farelerin, yara oluşumundan hem 7 hem de 14. günde kontrol gruplarına kıyasla daha

yüksek oranda yara kapanma miktarına sahip olduğunu göstermektedir [143]. Bu bağlamda çalışmamızdaki alan ölçümleri sonrası ulaşılan sonuçların literatüre katkı sağladığı ve literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Modelimizin özgün yönlerinden dolayı bu çalışmalara oranla çalışmamızın sonuçlarının kliniğe daha yakın olması sebebiyle literatüre katkısının daha kıymetli olacağını düşünmekteyiz.

Histopatolojik inceleme sonuçlarına bakıldığında ise diyabetik tavşanlara SF uygulanan C grubu ile diyabetik tavşanlara MKH uygulanan A grubunun non iskemik kulak yaralarının 7. gün biyopsilerinden hazırlanan kesitler kıyaslandığında; A grubunda MKH uygulamasının olumlu etkileri izlendi. MKH uygulanan A grubunda granülasyonun artmaya başladığı ve epitelizasyonun yarada tama yakın kapanmaya sebep olduğu görüldü. Aynı grupların aynı taraf yaralarının bu kez 14.gün biyopsi kesitleri karşılaştırıldığında anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumunun 7. güne göre her iki grupta da artmış olmasına rağmen MKH grubunda daha belirgin bir artış olduğu izlendi. Re-epitelizasyon açısından; MKH uygulanan grupta yarada tama yakın bir kapanma gözlemlendi ve matur epitel temsil eden keratinositlere rastlandı. Ayrıca A grubunda daha fazla kollajen birikimi mevcuttu.

A ve C gruplarının bu kez de iskemik olan sağ kulak yaralarından alınan biyopsilerin kesitleri kıyaslandığında; MKH uygulanan grupta anjiyogenezin nadiren de olsa görüldüğü ve re-epitelizasyonun başladığı izlendi. 14. gün karşılaştırması yapıldığında, MKH uygulanan grupta inflamasyonda azalmanın, konjesyon, hemoraji ve ödem bulgularında gerilemenin daha fazla olduğu görüldü. MKH uygulanan grupta artmaya başlayan anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunda kalınlaşma ve epitelizasyonun başladığı tespit edildi. Buradan yola çıkarak SF uygulamasına göre MKH'lerin diyabetik tavşanların hem iskemik hem de iskemik olmayan yaralarında iyileşme açısından önemli katkıda bulunduğu sonucuna ulaşıldı.

Non diyabetik tavşanlara SF uygulanan grup olan D grubu ve non diyabetik tavşanlara MKH uygulanan B grubunun non iskemik kulak yaralarının 7. gün biyopsilerinden hazırlanan kesitler kıyaslandığında; 7. günde MKH uygulamasının granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez ve epitelizasyonun başlamasına olumlu bir katkı yaptığı düşünüldü. Yine MKH uygulanan B grubunda daha fazla kollajen birikimi saptandı. Aynı gruplar aynı taraf yaraların bu kez 14. gün biyopsi kesitleri karşılaştırıldığında ise grup bulgularında farklılık gözlenmedi. Non diyabetik

tavşanların non iskemik taraf yaraları üzerinde 14. günde MKH'lerin fark yaratmadığı görüldü.

B ve D gruplarının bu kez de iskemik olan sağ kulak yaralarından alınan biyopsilerin kesitleri kıyaslandığında 7. günde gruplar arasında bakılan parametrelerde B grubunda daha fazla miktarda anjiyogenez saptandı. 14. gün karşılaştırması yapıldığında her iki grupta da konjesyon, hemoraji ve ödemin hafiflediği, bunlara ek olarak MKH uygulanan grupta inflamasyonun da hafiflediği görüldü. Her iki grupta da anjiyogenezin nadiren de olsa izlendiği, ancak granülasyon dokusu gelişiminin MKH grubunda daha fazla olduğu görüldü. Re-epitelizasyon açısından da MKH grubunda yarı yarıya kapanmanın başladığı izlendi. Buradan yola çıkarak SF uygulamasına göre MKH'lerin non diyabetik tavşanların hem iskemik hem de iskemik olmayan yaralarında iyileşme açısından önemli katkıda bulunduğu sonucuna ulaşıldı.

Non diyabetik tavşanlara SF uygulanan grup olan D grubu ve diyabetik tavşanlara MKH uygulanan A grubunu karşılaştırdığımızda ise non iskemik kulak yaralarından alınan biyopsi kesitlerinde; A grubunda 7. günde granülasyon dokusu oluşumunun, re-epitelizasyonun ve kollajen birikiminin daha fazla olduğu, konjesyon, hemoraji ve ödemin daha fazla azaldığı tespit edildi. Anjiyogenezin ise sham grubu olan D grubu ile aynı düzeyde olduğu saptandı. 14. günde yine A grubunda granülasyon dokusu gelişiminin, anjiyogenezin, re-epitelizasyonun daha fazla olduğu, konjesyon, hemoraji ve ödemin daha fazla azaldığı tespit edildi. İnflamasyon yoğunluğu ve kollajen birikiminin ise sham grubu olan D grubu ile aynı olduğu görüldü.

Non diyabetik tavşanlara SF uygulanan grup olan D grubu ve diyabetik tavşanlara MKH uygulanan A grubunu; iskemik kulak yaralarından alınan biyopsi kesitlerini karşılaştırdığımızda; 7. ve 14. günlerde bakılan tüm parametreler A grubu lehineydi. Yani tüm skorlarda granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez, re-epitelizasyon ve kollajen miktar artışı, inflamasyon azalması, konjesyon, hemoraji ve ödem azalması A grubunda sham grubu olan D grubuna göre daha fazlaydı.

Ayrıca A grubu iskemik kulak yaralarının incelemelerde elde edilen skorları ile sham grubu olan D grubunun non iskemik kulak yaralarının skorları karşılaştırıldığında; 7. günde A grubunda daha az inflamasyon, konjesyon, hemoraji ve ödem görülürken; granülasyon oluşumu, re-epitelizasyon ve kollajen miktarı D

grubuna göre daha fazlaydı. 14. günde ise A grubunda; inflamasyon daha az, konjesyon, hemoraji, ödem ve kollajen birikimi ise sham grubuyla aynıydı.

Bu sonuçlar doğrultusunda MKH uygulanan A ve B gruplarının hem iskemik hem non iskemik kulak yaralarında; granülasyon dokusu oluşumu, yeni damar oluşumu ve re-epitelizasyon üzerinde MKH uygulamasının olumlu etkileri göze çarpmaktadır. İskemik yaralarda inflamasyon üzerine de azaltıcı etki noktasında MKH uygulanan yaralar dikkat çekmektedir. Literatürde de kök hücre temelli tedavilerin anjiogenezi indüklediği ve bu etkiye bağlı olarak da zemininde iskemi yatan patolojilerin tedavisinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [144]. Planat-Benard; YDKKH'lerin vasküler yapıların oluşumuna katıldığı, aynı zamanda iskemik dokunun neovaskülarizasyonunu da artırdığını ortaya koymuş, buradan yola çıkarak da YDKKH'lerin iskemik zemin olan hastalıklarda anjiyogenez için bir hücre kaynağı olabileceğini öne sürmüştür [145]. Benzer şekilde, Cao da in vivo ve in vitro çalışmalarda YDKKH'lerin endotelial hücelere farklılaşabildiğini ve iskemik alt ekstremitelere kan perfüzyonunu ve anjiyogenezi iyileştirebildiğini bulmuştur [146]. Nie ve arkadaşları, yeşil floresan protein ile transfekte edilen YDKKH'lerin yalnızca vasküler endotelial ve epitelyal hücelere farklılaşarak yaraların vaskülaritesini ve epitel oluşumunu artırmakla kalmayıp, yara alanında farklı anjiyogenik faktörler aracılığı ile de anjiyogenezi teşvik ettiğini ifade etmiştir [147]. Yine Shi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, YDKKH'lerin epitelizasyonu artırmasının yanı sıra, granülasyon dokusu oluşumunu ve kollajen birikimini önemli ölçüde hızlandırdığını ve dolayısıyla yara iyileşmesini teşvik ettiğini göstermiştir [142]. Pelizzo ve arkadaşlarının çalışmasında, sağlıklı tavşan sırt kısmında tam kat cilt defekti şeklindeki yaralarda; otolog YDKKH'ler, allojenik YDKKH'ler, KİKKH'lerin yara iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir [130]. Çalışmada YDKKH uygulanan gruplarda, alınan yara iyileşmesi sonuçları, epitelyal rejenerasyonu ve kollajen depolanmasının, KİKKH uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark yaratacak şekilde daha iyi olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmanın bulguları da çalışmamızla paralellik göstermektedir; ancak çalışmamızda kullanılan tavşanların diyabetik olduğu, bahsi geçen çalışmada ayrıca deney modelinde yaraların sırtta oluşturulması sebebi ile yara iyileşme hızına kontraksiyonun da katkısının olduğu akılda tutulmalıdır. Hong ve arkadaşlarının çalışmasında ise tavşan kulaklarında oluşturulan tam kat yaralarda

YDKKH, KİKKH ve dermal fibroblastlar karşılaştırılmış; YDKKH lehine granülasyon dokusu oluşumunda artış gözlemlenmiştir. Ancak deney modelinde yara oluşturulurken zeminde perikondrium sağlam bırakılmıştır. Burada iyileşmeyi gösteren parametrelere sağlam perikondriumun katkısı göz ardı edilemez bir gerçektir [131].

Çalışmamızın detayları ve literatür bilgilerinden yola çıkıldığında çalışmamızın güçlü yönleri arasında; çalışmanın klinikte karşılaştığımız diyabetik ayak yaralarına oldukça yakın bir deney modeli üzerinde yapılması, sonuçlarımızın kliniğe en yakın modelde test edilerek elde edilmesi; ayrıca kullanılan MKH kaynağının son dönemlerde ön plana çıkan, diğer kaynaklara göre çok sayıda avantaj içeren yağ doku olması ve YDKKH'lerin inbred deneklerden elde edilmesi sayılabilir.

Çalışmamızın zayıf olduğu bazı noktalara değinecek olursak; klinikte karşımıza çıkan diyabetik ayak yaralı hastaların DM'a maruziyet süresi değişkenlik göstermektedir. Bu da DM'a bağlı metabolik patolojilerin, yara iyileşme bozukluklarının klinikte daha geniş bir spektrumda karşımıza çıkmasına sebep olmaktadır. Yine modelimiz her ne kadar klinikteki diyabetik ayak yaralarına oldukça yakın bir model olsa da; modelimizde klinikte sıklıkla karşımıza çıkan dış etkenlere bağlı bası ve enfeksiyon faktörü yer almamaktadır. Basıya neden olan faktörler klinikte sıklıkla karşımıza çıkmakta ve yara iyileşmesini sekteye uğratmaktadır. Zaman zaman tekrarlayan yara oluşumlarına sebep olabilmektedir. Bu yaralar klinikte karşımıza çıktıklarında neredeyse her zaman tabloya enfeksiyon da eklenmiş olmaktadır. Enfeksiyöz süreç yara iyileşmesini geciktirmesinin yanı sıra ek tedavi ve cerrahi girişimler gerektirmektedir.

Çalışmamızda kullanılan MKH'ler sağlıklı inbred deney tavşanlarından elde edildi. İnbred hücre kullanımı otojen hücre kullanımını taklit etse de; sağlıklı denekten alınıp çoğaltılan MKH'ler diyabetin yıkıcı metabolik yan etkilerine maruz kalmamış hücrelerdir. Klinik uygulamalarda diyabetik ayak yarası olan hastadan elde edilecek MKH'lerin vasfı ile farklılık gösterebilir. Ayrıca diyabetik ayak yarası olan hastalarda etik sorunlar da düşünüldüğünde allojenik MKH uygulaması henüz mümkün gözükmemektedir. Klinik uygulamada diyabetik ayak yarası olan hastadan elde edilecek MKH'lerin otolog olarak uygulanması söz konusudur. Bu noktada DM'un

MKH'lere vermiş olduğu hasar da göz önüne alınarak kök hücre iyileştirme çalışmaları dikkate alınmalıdır.

Tüm bu literatür bilgilerine bakıldığında çalışmamızın yara alan ölçümleri ve histopatolojik sonuçlarındaki; diyabetik/diyabetik olmayan ve MKH uygulanan deney gruplarındaki yara kapanma oranlarının yüksek olması, granülasyon dokusu oluşumu ve angiogenezde artış görülmesi, re-epitelizasyonun hızlanması literatüre katkı sağlayan ve gelecekteki yapılacak çalışmalar açısından umut vaat eden bulgulardır. MKH uygulanan yaralardaki inflamasyonda azalma, ödem ve konjesyondaki gerileme hızının fazlalığı da dikkat çekmektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar ve deney modelimizin kliniği oldukça iyi taklit eden yapısı ile çalışmamızın DM'a bağlı gelişen yaralar ve kronik iskemi, nöropatinin mevcut olduğu Buerger hastalığı gibi tabloların tedavisinde literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

DM tüm dünyada önemli sayıda insan üzerinde mortalitesi ve morbiditesi yüksek bir tablodur. Önemli morbiditelerinden olan diyabetik ayak yaraları, bazen nöropati ve iskemi zemininde gelişen basit bir yara şeklinde karşımıza çıkabilirken bazen de kişinin ölümüne dahi sebep olabilen ağır komplikasyonlara neden olabilecek kompleks bir yara şeklinde karşımıza çıkabilmektedir. Bu yaraların tedavi masrafları da ülke ve dünya ekonomisine büyük bir yük getirmektedir.

Bu bağlamda diyabetik ayak yarası tedavisinde iyileşmeyi hızlandıracak, hastanede kalış süresini kısaltacak, amputasyona gidişi engelleyecek, düşük maliyetli bir tedavi alternatifi bulunması oldukça önemli bir konudur. Bu nedenle diyabetik yara iyileşmesini destekleyecek yeni yaklaşımlara ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan deney modelini klinikte karşılaştığımız diyabetik ayak yaralarına en yakın model olacak şekilde seçtik. Bu modelde son dönemde literatür çalışmalarında pek çok alanda uygulama alanı bulan YDKKH'leri kullanarak yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırdık. Oldukça geniş kullanım alanları olan ve yeni gelişmelere fazlasıyla açık olan bu konu, diyabetik ayak yaralarının tedavisi konusunda da heyecan yaratan ve mutlaka yeni çalışmalar yapılması gereken bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızın sonucunda makroskopik ve histopatolojik olarak MKH'lerin deney modeline uygun oluşturulan diyabetik ve diyabetik olmayan tavşanlardaki iskemik, nöropatik ve iskemik, nöropatik olmayan yaraların iyileşmesine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde katkı sağladığı sonucuna ulaştık. MKH'lerin söz konusu yaralarda; granülasyon, anjiyogenez ve re-epitelizasyonu artırdığı, inflamasyon, konjesyon, hemoraji ve ödemi azalttığı tespit edildi.

Çalışmamızda YDKKH'ler diyabetik ve diyabetik olmayan tavşanlardaki iskemik, nöropatik ve iskemik, nöropatik olmayan yaraların iyileşmesi üzerine etkileri açısından kliniğe en yakın deneysel modelde test edildi. Bu sebeple bulgularımızın en kısa zamanda klinik kullanıma girebileceği ve literatüre önemli katkılarda bulunacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızda kullanılan model ve yöntemlerin daha geniş deney gruplarında uygulanmasını öneriyor; çalışmamızın diyabetik iskemik, nöropatik veya diyabetin eşlik etmediği iskemik, nöropatik yara tedavileri konusundaki yeni araştırmalara yol gösterici bir çalışma olacağını düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Gurtner, G.C. and V. Wong, Wound healing: normal and abnormal, in Grabb and Smith's plastic surgery. 2007. p. 15-22.
2. Witte, M.B. and A. Barbul, General principles of wound healing, in Surgical Clinics of North America. 1997. p. 509-528.
3. George Broughton, I., J.E. Janis, and C.E. Attinger, Wound healing: an overview. Plastic and reconstructive surgery, 2006. 117(7S): p. 1e-S-32e-S.
4. George Broughton, I., J.E. Janis, and C.E. Attinger, The basic science of wound healing. Plastic and reconstructive surgery, 2006. 117(7S): p. 12S-34S.
5. Lee, C.K. and S.L. Hansen, Management of acute wounds. Surg Clin North Am, 2009. 89(3): p. 659-76.
6. Hunt, T.K., The physiology of wound healing. Annals of emergency medicine, 1988. 17(12): p. 1265-1273.
7. Prabhakar, P.K. and M. Doble, Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2011. 17(8): p. 563.
8. Boyle, J.P., et al., Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the US. Diabetes care, 2001. 24(11): p. 1936-1940.
9. Akhavani, M.A., et al., Angiogenesis and plastic surgery. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery, 2008. 61(12): p. 1425-1437.
10. Huang, Yadi. IDF Diabetes Atlas 8th Edition.2017.
11. Chien, S. and B.J. Wilhelmi, A simplified technique for producing an ischemic wound model. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2012(63): p. e3341.
12. Kurt, N., Akut ve kronik yara bakımı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. S. 2003. 34-35.
13. KÖŞLÜ, A., Yara İyileşmesinde Tarihsel Gelişmeler. Ankara: Dermatopatoloji Derneği Yayınları.

14. Sipos, P., et al., Special wound healing methods used in ancient Egypt and the mythological background. *World journal of surgery*, 2004. 28(2): p. 211.
15. Louis Kuo Tai, F., The origins of surgery: 1. From prehistory to Renaissance. *Annals of the College of Surgeons of Hong Kong*, 1999. 3(4): p. 127-136.
16. Forrest, R.D., Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1982. 75(3): p. 198.
17. Cooper, R., A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care. *World wide wounds*, 2004. 1: p. 1-8.
18. Wollina, U., et al., Biosurgery in wound healing—the renaissance of maggot therapy. *Journal of the European academy of dermatology and venereology*, 2000. 14(4): p. 285-289.
19. Monaco, J.L. and W.T. Lawrence, Acute wound healing an overview. *Clinics in plastic surgery*, 2003. 30(1): p. 1-12.
20. Leahy, P.J. and W.T. Lawrence, Biologic enhancement of wound healing. *Clinics in plastic surgery*, 2007. 34(4): p. 659-671.
21. Rook, J.M., W. Hasan, and K.E. McC Carson, Temporal effects of topical morphine application on cutaneous wound healing. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 2008. 109(1): p. 130-136.
22. Browder, W., et al., Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*, 1988. 104(2): p. 224-230.
23. Park, J.E. and A. Barbul, Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, 2004. 187(5): p. S11-S16.
24. Champe, P.C. and R.A. Harvey, *Biochemistry (Lippincott's illustrated reviews)*. 1994: Lippincott.
25. Gantwerker, E.A. and D.B. Hom, Skin: histology and physiology of wound healing. *Clinics in plastic surgery*, 2012. 39(1): p. 85-97.
26. Witte, M.B. and A. Barbul, Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*, 2002. 183(4): p. 406-412.

27. Gurtner, G.C., et al., Wound repair and regeneration. *Nature*, 2008. 453(7193): p. 314-321.
28. Digelmann, R. and M. Evans, An over view of acute fibrotic and delayed. *J. of Front Bio. Sci*, 2004. 9: p. 283-289.
29. Gillitzer, R. and M. Goebeler, Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of leukocyte biology*, 2001. 69(4): p. 513-521.
30. Shah, J.M.Y., et al., Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 2012. 45(2): p. 220.
31. Lorenz, H., Wound healing: repair biology and wound and scar treatment. *Plastic surgery*, 2005. 1: p. 209-234.
32. Brem, H. and M. Tomic-Canic, Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 2007. 117(5): p. 1219-1222.
33. Tsourdi, E., et al., Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *BioMed research international*, 2013. 2013.
34. Lerman, O.Z., et al., Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *The American journal of pathology*, 2003. 162(1): p. 303-312.
35. Türk Diabet Cemiyeti. TURDEP-2 sonuçlarının özeti. 2010. <http://www.diabetcemiyeti.org>.
36. Altan, N., A. Sepici Dinçel, and C. Koca, Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2006. 31(2): p. 51-6.
37. Januszewski, A., et al., Role of lipids in chemical modification of proteins and development of complications in diabetes. 2003, Portland Press Ltd.
38. Maritim, A., a. Sanders, and J. Watkins Iii, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2003. 17(1): p. 24-38.

39. Komesu, M.C., et al., Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*, 2004. 11(2): p. 63-67.
40. Ahmed, N., Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*, 2005. 67(1): p. 3-21.
41. Spanheimer, R.G., Direct inhibition of collagen production in vitro by diabetic rat serum. *Metabolism*, 1988. 37(5): p. 479-485.
42. Grotendorst, G.R., et al., Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. *The Journal of clinical investigation*, 1985. 76(6): p. 2323-2329.
43. Oishi, Y., et al., 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. *British Journal of Dermatology*, 2002. 147(5): p. 859-868.
44. İrer, S.V. and G. Alper, Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2004. 2(3): p. 127-136.
45. Reiber, G.E., E.J. Boyko, and D.G. Smith, Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. *Diabetes in America*, 1995. 2: p. 409-27.
46. Lazarus, G.S., et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound repair and regeneration*, 1994. 2(3): p. 165-170.
47. Abbott, C., et al., The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabetic medicine*, 2002. 19(5): p. 377-384.
48. Control, C.f.D. and Prevention, Lower extremity disease among persons aged > or= 40 years with and without diabetes--United States, 1999-2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 2005. 54(45): p. 1158.
49. Lauterbach, S., K. Kostev, and T. Kohlmann, Prevalence of diabetic foot syndrome and its risk factors in the UK. *Journal of wound care*, 2010. 19(8): p. 333-337.

50. Lavery, L.A., et al., Practical criteria for screening patients at high risk for diabetic foot ulceration. *Archives of internal medicine*, 1998. 158(2): p. 157-162.
51. Prompers, L., et al., High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study. *Diabetologia*, 2007. 50(1): p. 18-25.
52. Boulton, A.J., The diabetic foot—an update. *Foot and ankle surgery*, 2008. 14(3): p. 120-124.
53. Benotmane, A., et al., Diabetic foot lesions: etiologic and prognostic factors. *Diabetes & metabolism*, 2000. 26(2): p. 113-117.
54. Dounis, E., et al., *Atlas of the diabetic foot*. 2010: John Wiley & Sons.
55. Greenhalgh, D.G., Wound healing and diabetes mellitus. *Clinics in plastic surgery*, 2003. 30(1): p. 37-45.
56. Saltoğlu, N., et al., *Diyabetik ayak yarası ve infeksiyonunun tanısı, tedavisi ve önlenmesi: ulusal uzlaşısı raporu*. 2015.
57. Malgrange, D., et al., Screening diabetic patients at risk for foot ulceration. A multi-centre hospital-based study in France. *Diabetes & metabolism*, 2003. 29(3): p. 261-268.
58. Kumar, S., et al., The prevalence of foot ulceration and its correlates in type 2 diabetic patients: a population-based study. *Diabetic medicine*, 1994. 11(5): p. 480-484.
59. Tesfaye, S., et al., Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia*, 1996. 39(11): p. 1377-1384.
60. Brem, H., P. Sheehan, and A.J. Boulton, Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. *The American journal of surgery*, 2004. 187(5): p. S1-S10.
61. Bowering, C.K., Diabetic foot ulcers. Pathophysiology, assessment, and therapy. *Canadian Family Physician*, 2001. 47(5): p. 1007-1016.

62. Bansal, V., J. Kalita, and U. Misra, Diabetic neuropathy. *Postgraduate medical journal*, 2006. 82(964): p. 95-100.
63. Slovenkai, M.P., Foot problems in diabetes. *Medical Clinics of North America*, 1998. 82(4): p. 949-971.
64. Young, M., et al., The effect of callus removal on dynamic plantar foot pressures in diabetic patients. *Diabetic Medicine*, 1992. 9(1): p. 55-57.
65. Demir, Y., S. Demir, and Ç. Gökçe, Diabetik ayak: Fizyopatolojisi, tanısı ve rekonstrüksiyon öncesi tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2004. 5(3).
66. Rebolledo, F.A., J.T. Soto, and J.E. de la Peña, The pathogenesis of the diabetic foot ulcer: prevention and management. *Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations*, 2011: p. 155-178.
67. Borssen, B., T. Bergenheim, and F. Lithner, The epidemiology of foot lesions in diabetic patients aged 15–50 years. *Diabetic Medicine*, 1990. 7(5): p. 438-444.
68. Jeffcoate, W., J. Lima, and L. Nobrega, The charcot foot. *Diabetic Medicine*, 2000. 17(4): p. 253-258.
69. Dormandy, J. and R. Rutherford, TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Management of peripheral arterial disease (PAD). *J Vasc Surg*, 2000. 31(1 Pt 2): p. S1-S296.
70. Clayton, W. and T.A. Elasy, A review of the pathophysiology, classification, and treatment of foot ulcers in diabetic patients. *Clinical diabetes*, 2009. 27(2): p. 52-58.
71. Peters, E.J., L.A. Lavery, and D.G. Armstrong, Diabetic lower extremity infection: influence of physical, psychological, and social factors. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2005. 19(2): p. 107-112.
72. Grunfeld, C., Diabetic foot ulcers: etiology, treatment, and prevention. *Advances in internal medicine*, 1992. 37: p. 103-132.



73. Pozzilli, P. and R. Leslie, Infections and diabetes: mechanisms and prospects for prevention. *Diabetic Medicine*, 1994. 11(10): p. 935-941.
74. Caballero, E. and R.G. Frykberg, Diabetic foot infections. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 1998. 37(3): p. 248-255.
75. Lipsky, B., R. Pecoraro, and L. Wheat, The diabetic foot. Soft tissue and bone infection. *Infectious disease clinics of North America*, 1990. 4(3): p. 409-432.
76. Armstrong, D.G. and B.A. Lipsky, Diabetic foot infections: stepwise medical and surgical management. *International wound journal*, 2004. 1(2): p. 123-132.
77. Mendes, J. and J. Neves, Diabetic foot infections: current diagnosis and treatment. *Journal of Diabetic Foot Complications*, 2012: p. 26-45.
78. Abdulrazak, A., et al., Bacteriological study of diabetic foot infections. *Journal of diabetes and its complications*, 2005. 19(3): p. 138-141.
79. Brodsky, J.W., *The diabetic foot. Surgery of the Foot and Ankle*, 2007: p. 1281-1368.
80. Laughlin, R.T., J.H. Calhoun, and J.T. Mader, The diabetic foot. *JAAOS- Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 1995. 3(4): p. 218-225.
81. Bevilacqua, N.J., L.C. Rogers, and D.G. Armstrong, Diabetic foot surgery: classifying patients to predict complications. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2008. 24(S1): p. S81-S83.
82. Sohn, M.-W., et al., Mortality risk of Charcot arthropathy compared with that of diabetic foot ulcer and diabetes alone. *Diabetes care*, 2009. 32(5): p. 816-821.
83. Rogers, L.C., et al., The Charcot foot in diabetes. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 2011. 101(5): p. 437-446.
84. Jeffcoate, W., Vascular calcification and osteolysis in diabetic neuropathy—is RANK-L the missing link? *Diabetologia*, 2004. 47(9): p. 1488-1492.

85. Lavery, L.A., et al., Reevaluating the way we classify the diabetic foot: restructuring the diabetic foot risk classification system of the International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes care*, 2008. 31(1): p. 154-156.
86. E.Hosmer, F., *Semmes-Weinstein Test*. 2005.
87. Karaöz, E. and O. Ercüment, *Kök Hücreler, Derya Kitabevi*. 2004, Trabzon.
88. Jacobson, L., The effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med.*, 1949. 34: p. 1538.
89. Lorenz, E., et al., Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Journal of the National Cancer Institute*, 1951. 12(1): p. 197-201.
90. Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 2006. 126(4): p. 663-676.
91. Tachibana, M., et al., Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013. 153(6): p. 1228-1238.
92. Pluripotent kök hücre.05/12/2018.<https://www.hucreler.gen.tr/pluripotent-kok-hucre.html>.15/01/2021.
93. Fortier, L.A., Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 2005. 34(5): p. 415-423.
94. Trucco, M., Regeneration of the pancreatic  $\beta$  cell. *The Journal of clinical investigation*, 2005. 115(1): p. 5-12.
95. Can, A. and M.K. Hücreler, *Kök Hücre: biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları*. Akademisyen Tıp Kitabevleri, Ankara, 2014.
96. Zuk, P.A., et al., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 2001. 7(2): p. 211-228.
97. Strem, B.M., et al., Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine*, 2005. 54(3): p. 132-141.
98. Aust, L., et al., Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytherapy*, 2004. 6(1): p. 7-14.

99. Preston, S., et al., The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular Pathology*, 2003. 56(2): p. 86.
100. Bianco, P., et al., Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells*, 2001. 19(3): p. 180-192.
101. Hawley, R.G. and D.A. Sobieski, Stem Cell Bouillabaisse-Potpourri. *Stem Cells*, 2002. 20(5): p. 360-363.
102. Fridenshtein, A., Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkhiv patologii*, 1982. 44(10): p. 3.
103. Karaoz, E., et al., Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology*, 2009. 132(5): p. 533.
104. Brown, S.A., et al., Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plastic and reconstructive surgery*, 2010. 126(6): p. 1936-1946.
105. Karaoz, E., et al., Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy*, 2010. 12(3): p. 288-302.
106. Semenza, G.L., Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *Journal of cellular biochemistry*, 2007. 102(4): p. 840-847.
107. Jurgens, W.J., et al., Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell and tissue research*, 2008. 332(3): p. 415-426.
108. Dubois, S.G., et al., Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens, in *Mesenchymal Stem Cells*. 2008, Springer. p. 69-79.
109. Ullmann, Y., et al., Searching for the favorable donor site for fat injection: in vivo study using the nude mice model. *Dermatologic surgery*, 2005. 31(10): p. 1304-1307.

110. Schipper, B.M., et al., Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Annals of plastic surgery*, 2008. 60(5): p. 538.
111. Girolamo, L.d., et al., Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. 2009, Taylor & Francis.
112. Asahara, T., et al., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997. 275(5302): p. 964-966.
113. Lu, F., et al., Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*, 2008. 121(1): p. 50-58.
114. Donofrio, L.M., Techniques in facial fat grafting. *Aesthetic surgery journal*, 2008. 28(6): p. 681-687.
115. Kaufman, M.R., et al., Autologous fat transfer for facial recontouring: is there science behind the art? *Plastic and reconstructive surgery*, 2007. 119(7): p. 2287-2296.
116. Yoshimura, K., et al., Adipose stem cells: from liposuction to adipose tissue engineering, in *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*. 2011, Springer. p. 67-81.
117. Yoshimura, K., et al., In vivo manipulation of stem cells for adipose tissue repair/reconstruction. *Regenerative medicine*, 2011. 6(6s): p. 33-41.
118. Yoshimura, K., et al., Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *The breast journal*, 2010. 16(2): p. 169-175.
119. Yoshimura, K., et al., Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatologic Surgery*, 2008. 34(9): p. 1178-1185.

120. Tiryaki, T., N. Findikli, and D. Tiryaki, Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2011. 35(6): p. 965-971.
121. Kim, M., et al., Clinical trial of autologous differentiated adipocytes from stem cells derived from human adipose tissue. *Dermatologic Surgery*, 2011. 37(6): p. 750-759.
122. Rigotti, G., et al., Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*, 2007. 119(5): p. 1409-1422.
123. Lendeckel, S., et al., Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2004. 32(6): p. 370-373.
124. Mesimäki, K., et al., Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2009. 38(3): p. 201-209.
125. Kim, W.-S., B.-S. Park, and J.-H. Sung, Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Archives of dermatological research*, 2009. 301(5): p. 329-336.
126. PARK, B.S., et al., Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatologic Surgery*, 2008. 34(10): p. 1323-1326.
127. Bunnell, B.A., et al., Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 2008. 45(2): p. 115-120.
128. Rubina, K., et al., Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Engineering Part A*, 2009. 15(8): p. 2039-2050.
129. Ebrahimian, T.G., et al., Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2009. 29(4): p. 503-510.

130. Pelizzo, G., et al., Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *Journal of translational medicine*, 2015. 13(1): p. 219.
131. Hong, S.J., et al., Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *PloS one*, 2013. 8(1): p. e55640.
132. Singh N, A.D., Lipsky BA. and Preventing foot ulcers in patients with diabetes. . *JAMA*, 2005. 293(2): p. 217–28.
133. Kume, S., et al., Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2005. 20(9): p. 1647-1658.
134. Cianfarani, F., et al., Diabetes impairs adipose tissue–derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound repair and regeneration*, 2013. 21(4): p. 545-553.
135. Mizuno, H., et al., Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine, in *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Volume 12. 2014, Springer. p. 165-174.
136. Kern, S., et al., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, 2006. 24(5): p. 1294-1301.
137. Moradi, A., et al., photobiomodulation plus Adipose-derived Stem cells improve Healing of ischemic infected Wounds in Type 2 Diabetic Rats. *Scientific Reports*, 2020. 10(1): p. 1-15.
138. Etuk, E., Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol JN Am*, 2010. 1(2): p. 130-134.
139. Macdonald Ighodaro, O., A. Mohammed Adeosun, and O. Adeboye Akinloye, Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*, 2017. 53(6): p. 365-374.

140. Sun, W.-T., et al., Effect of alloxan time administerDrug on establishing diabetic rabbit model. *International Journal of Ophthalmology*, 2010. 3(3): p. 200.
141. Kallmeyer, K., et al., Fate of systemically and locally administered adipose-derived mesenchymal stromal cells and their effect on wound healing. *Stem Cells Translational Medicine*, 2020. 9(1): p. 131-144.
142. Shi, R., et al., Localization of human adipose-derived stem cells and their effect in repair of diabetic foot ulcers in rats. *Stem cell research & therapy*, 2016. 7(1): p. 1-13.
143. An, R., et al., Adipose stem cells isolated from diabetic mice improve cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020. 11(1): p. 1-11.
144. Borlongan, C.V., Age of PISCES: stem-cell clinical trials in stroke. *The Lancet*, 2016. 388(10046): p. 736-738.
145. Planat-Benard, V., et al., Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 2004. 109(5): p. 656-663.
146. Cao, Y., et al., Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005. 332(2): p. 370-379.
147. Nie, C., et al., Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell transplantation*, 2011. 20(2): p. 205-216.

