

171601

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ: FARELERDE DENEYSEL
ÇALIŞMA**

Dr. OSMAN ENVER AYDIN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALİ BARUTÇU

İZMİR-2006

İçindekiler

Şekiller Listesi	6
Tablolar Listesi	7
Grafikler Listesi	8
TEŞEKKÜR	9
ÖZET	10
ABSTRACT	11
GİRİŞ	13
GENEL BİLGİLER	15
TARİHÇE:	15
YARA İYİLEŞMESİ FİZYOLOJİSİ:	17
Hemostaz:	17
İnflamasyon:	18
Proliferasyon:	20
Kollajen sentezi:	20
Neovaskülarizasyon:	20
Yeniden modellenme:	23
YARA İYİLEŞMESİ BOZUKLUKLARI:	23
DİYABETES MELLITUS VE YARA İYİLEŞMESİ	24
Enzimatik olmayan glikozilasyon	24
Poliol yolu:	26
Protein kinaz C aktivasyonu:	26
Artmış Hekzosamin yolağı aktivitesi:	27
Mitokondrial elektron taşıma zincirinde süperoksit anyonu oluşumu:	27
Diyabetik Mikroanjyopati:	28
Diyabetik nöropati:	28
Reolojik Bozukluklar:	30
İmmünolojik Bozukluklar:	30
Mekanik Bozukluklar:	31
Diyabette Yara İyileşmesini Etkileyen Diğer Bozukluklar:	31
VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ:	32
Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ile Yapılan Deneysel ve Klinik Çalışmalar:	34
Diyabet ve Yara İyileşmesi Modelleri:	35
GEREÇ VE YÖNTEM	36
DENEKLER VE GRUPLARA DAĞILIMI:	36
DİYABET PROTOKOLÜ:	37
MİKROKÜRECİKLERİN HAZIRLANMASI:	37
YARA OLUŞTURULMASI:	38
YARA İYİLEŞMESİNİN İZLEMİ:	40
ÖRNEKLERİN TOPLANMASI:	40
HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME:	40
ÇIKARILMA ÖLÇÜTLERİ:	41
DENEY SONLANDIRMA:	41
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME:	41
BULGULAR	43
KAN ŞEKERİ DÜZEYLERİ:	43
KLİNİK TAKİP:	43
YARA İZLEM:	43
HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER	45
Akut inflamasyon:	45
Kronik inflamasyon:	46
Damar Yoğunluğu:	47
İmmünohistokimyasal inceleme:	47
TARTIŞMA	51
Diyabetik Mikroanjyopati:	52
Diyabetik yara modeli:	52
Diyabetik yaralarda büyüme faktörleri:	53
Diyabette VEGF kullanımı:	53

VEGF uygulama yöntemi:.....	54
Akut inflamasyon:	57
Kronik inflamasyon:.....	58
Damarlanma Artışı:	59
Yara Kapanma Hızı:.....	59
SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 (Solda) Ebers Papiruslarından bir sayfa (B. George, E.J. Jeffrey, E.A. Christopher “A Brief History of Wound Care”; Plast. Reconstr. Surg. 117, (Suppl.): 6S, 2006 den alınmıştır) (Sağda) Şerafeddin Sabuncuğlu yılan zehiri toplarken (Şerafeddin Sabuncuoğlu, “Mücerreb-name: İlk Türkçe deneysel tıp eseri-1468”, Güncelleştiren Uzel I Suveren, Ankara, Atatürk Kültür Merkezi Başkanlığı Yayınları, 1999 dan alınmıştır).....	15
Şekil 2 Yara iyileşmesinin evreleri kronolojik olarak gösterilmektedir. Evreler bazen eş zamanlı olarak devam etmektedir. (Rohrich R J., Robinson JB. “Wound Healing”, Selected Readings in Plastic Surgery, Vol 9, Number 3, 1999’dan alınmıştır).....	17
Şekil 3 Yeniden damarlanma süreçleri (Simons M., “Angiogenesis Where Do We Stand Now?”, Circulation 2005;111;1556-1566’dan adapte edilmiştir).....	21
Şekil 4 Redüktan karbonhidratların enzimatik olmayan glikozilasyonu. (V. JAKUŠ, N. RIETBROCK, “Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications” Physiol. Res. 53: 131-142, 2004’dan alınmıştır).....	25
Şekil 5 RAGE yapısı ve domainleri şematik olarak. (Yonekura H., Yamamoto Y., Sakurai S., Watanabe T., Yamamoto H., “Roles of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Diabetes-Induced Vascular Injury”, J Pharmacol Sci 97, 305 – 311 (2005)’dan alınmıştır.).....	25
Şekil 6 Poliol yolu. (Satish K. Srivastava, Kota V. Ramana, Aruni Bhatnagar, “Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options” Endocrine Reviews 26(3):380–392’dan uyarlanmıştır.).....	27
Şekil 7 VEGF reseptör sonrası ikincil habercileri ve ilgili yolakların sonuçları. (Hoeben A., Landuyt B. , Highley Ms., Wildiers H., et. al., “Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis” Pharmacol Rev 56:549–580, 2004 den alınmıştır.).....	33
Şekil 8- Kalsiyum Aljinat mikrokürecikler içinde VEGF hazırlanmasını özetleyen şema.....	38
Şekil 9 Kalsiyum Aljinat mikroküreciklerin tarayıcı elektron mikroskop görüntüleri. (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Laboratuvarında çekilmiştir.).....	38
Şekil 10 Yara çevresine yerleştirilen silikon simit şeklinde atel.....	39
Şekil 11 Yara çevresine dikilen ve yapılandırılan silikon atel ve yara üzerine pansuman olarak kapatılan şeffaf film tabaka.....	39
Şekil 13 VEGF immünohistokimyasal boyaması sonrası VEGF gruplarından bir kesit. VEGF ₁₆₅ HDM’ye bağlandığından hücreler arası alanda yoğun VEGF boyanması mevcut.....	48
Şekil 14 VEGF immünohistokimyasal boyaması sonrası VEGF gruplarından bir kesit. VEGF ₁₆₅ HDM’ye bağlandığından hücreler arası alanda yoğun VEGF boyanması mevcut.....	49
Şekil 15 VEGF verilmeyen gruplardan VEGF immünohistokimyasal boyaması sonrası bir kesit.....	49
Şekil 16 VEGF immünohistokimyasal boyama tekniği ile mikrovasküler yapılar.....	49
Şekil 17 H&E boyama kesitlerinde damarlanmanın artmış olduğunun izlendiği bir alan.....	49
Şekil 18 H&E boyama kesitlerinde kürecik çevresi yabancı cisim reaksiyonu ve artan damar sayısı.....	50
Şekil 19 DM grubuna ait H&E boyama kesitlerinde damar izlenmeyen bölge.....	50

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1 Anjiyogenezi uyaran ve önleyen faktörler (Konukoğlu D, Turhan S. M. "Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi". Cerrahpaşa J Med 2005; 36: 42-48'den alınmıştır.)	22
Tablo 2 Kronik yara nedenleri (Medina A., Scott PG., Ghahary A., Tredget EE., "Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds" Journal of Burn Care & Rehabilitation Volume 26, Number 4, pp:306-319 den uyarlanmıştır.)	23
Tablo 3 Diyabet fizyopatolojisinde hiperglisemi ve etkilerini gösteren şema. Deneysel ve klinik tedavi uygulamaları. * Deneysel uygulama, PKC: protein kinaz C, AR: aldoz redüktaz.....	29
Tablo 4 Grupların şematik olarak gösterilmesi ve planlanan işlemler. 30 diyabetik fareden 21'i histopatolojik izlem grubunda 3 eşit gruba ayrılmışlardır. Kalan 9 fare fotoğraflık izlem grubunda 3 eşit gruba ayrılmışlardır. Her farenin sırtında ikişer yara açılmıştır. Her yara ayrı bir örnek olarak alındığından örnek sayıları tabloda verildiği gibi değerlendirilmiştir.	36
Tablo 5 Histopatolojik kriterler	41



GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1 Kontrol ve STZ verilen farelerin 42. günde kuyruktan alınan örneklerinden kan glukoz düzeyleri grafikte gösterilmiştir.	43
Grafik 2 Yara alanının yüzde cinsinden zamana göre grafiği verilmiştir.	44
Grafik 3 15. günün sonunda tüm yaraların kapanma yüzdesi.	45
Grafik 4 Akut inflamasyon skorlarının zaman içinde değişimi. DM grubunun eğimi $R^2=0,8359$, VEGF grubunun eğimi $R^2=0,0871$ bulunmuştur.	46
Grafik 5 Kronik inflamasyon skorlarının zaman içinde değişimi. DM grubunun eğimi $R^2=0,8359$, VEGF grubunun eğimi $R^2=0,3183$ bulunmuştur.	46
Grafik 6 X400 büyütme alanında ortalama mikrodamar sayısı. VEGF ile diğer gruplar arasında ve normal ile DM grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur. ($p<0,05$)	47
Grafik 7 Grupların 5 gün aralar ile alınan örneklerinde mikrodamar ortalamalarının grafiği.	48



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında, bana her türlü desteği sağlayan başta Eşim ve Kızım olmak üzere tüm aileme; tezin fikir yapısı ve çalışma modelinin oturtulması konusundaki düşünceleri ile beni aydınlatan hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma; deney modelinin belirlenmesi konusunda yardımlarından dolayı Vet. Ensari Güneli'ne ve DEÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına, mikrokürecik hazırlama işlemleri sırasında yardımları ile hayatı kolaylaştıran Kim. Memduh Bülbül'e; Doç Dr. Halil Resmi şahsında tüm DEÜTF Multidisipliner Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) personeline; patolojik incelemelerinden dolayı Prof. Ali Küpeliöğlü, Doç. Dr. Banu LEBE ve Dr. Evren Yılmaz'a; tezin bilimsel yönetimine ve istatistik yöntemine olan katkılarından dolayı Doç. Dr. Murat Özgören ve Dr. Adile Öniz'e, her tür katkılarından dolayı Dr. Nil Hocaoğlu ve Dr.Tuncay Küme'ye teşekkür ederim.

Dr.Osman Enver Aydın

Vasküler Endotel Büyüme Faktörünün Diyabetik yara iyileşmesi üzerine etkileri

ÖZET

Diyabetes mellitus tüm dünyada giderek önemi artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Diyabetik hastalarda kronik, iyileşmeyen yara sıklıkla görülmektedir. Uzun süre iyileşmeyen yara ise sağlık sorunlarının ötesinde her psikolojik hem de sosyal yükler getirmektedir. Bu açıdan diyabetik hastalarda görülen kronik yaraların tedavisine yönelik girişimler giderek önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, fare diyabetik yara modelinde kalsiyum aljinat mikrokürecikler içinde kontrollü salınımı sağlanan vasküler endotel büyüme faktörünün yara damarlanmasına ve yara kapanmasına olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, fareler dört gruba ayrılmıştır. Gruplardan 3'ünde 200mg/kg streptozosin ile diyabet uyarılmıştır. Kan glukoz düzeyleri cerrahi öncesi kontrol edilmiştir. 300 mg/dl altında kan glukoz ölçülen fareler deneyden çıkarılmıştır. Sırt bölgesinde yara oluşturulmasını takiben, üç diyabetik gruptan DM+VEGF grubuna 1 µg VEGF kontrollü salınım sistemi ile verilmiştir. DM+Aljinat grubuna SF ile hazırlanan mikrokürecikler verilmiştir. Bir diyabetik gruba ve STZ verilmemiş normal gruba hiçbir ek girişimde bulunmadan sadece izlenmiştir. Gruplar histopatolojik inceleme ve fotoğrafik inceleme için ayrılmışlardır. Histopatolojik olarak H&E boyama ile akut ve kronik inflamasyon ve mikrovasküler yapıların yoğunluğu değerlendirilmiştir. VEGF₁₆₅ yönelik immünohistokimyasal teknik ile neovaskülarizasyon incelenmiştir. Yara alanı 3 günde bir ölçülmüştür. İlk yara alanı belirlenerek zamana bağlı değişimi cm² ve yüzde alan cinsinden belirlenmiştir. Sonuçlar ANOVA ile incelenmiştir.

En hızlı yara kapanması normal grupta izlenmiştir. 15. günde normal grupta tüm yaralar kapandığında, DM+VEGF grubunda orijinal yaranın % 82'si kapanırken, DM grubunda % 71'i kapanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Neovaskülarizasyon incelemesinde, DM+VEGF grubunun ortalama damar yoğunluğu 17,97 ± 2,14 hesaplanırken, sırasıyla DM+Aljinat grubunda 6,6 ± 0,83, DM grubunda 4,22 ± 1,03, normal grupta 7,21 ± 1,65 ortalamalara ulaşılmıştır. VEGF grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır (p<0,05).

Bu sonuçlar kalsiyum aljinat kontrollü salınım sisteminde taşınan VEGF'nin diyabetik yara iyileşmesi modelinde, yara kapanma zamanını kısalttığını ve diyabetik yaralarda damarlanmayı arttırdığını göstermektedir.

Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Diabetic Wound Healing

ABSTRACT

Diabetes mellitus has become an important issue in healthcare world wide. Diabetic patients often suffer from chronic wounds. Long lasting wound leads not only to health problems but also, to a burden in social and psychological settings. With this respect, research for treatment of chronic diabetic wounds is of great importance. The aim of the study is, to assess the effects of vascular endothelial growth factor, released from calcium alginate microspheres, in a controlled release system, on wound angiogenesis and epithelization in mice diabetic wound model.

Mice were grouped in four sets. 3 groups were given 200 mg/ kg streptozocin. Diabetic state was confirmed before the surgical intervention. Mice having blood glucose level lower than 300mg/dl was excluded from the study. Microvascular complications of diabetes were assumed to settle within 6 weeks after the injection. Excisional wounds were created in dorsal area of the mice. Following wounding procedure, DM+VEGF group was given 1 µg VEGF in calcium alginate controlled release system. DM+Alginate group was given sham microspheres prepared with % 0,9 NaCl. One diabetic and one normal groups were devoid of any intervention. Groups were divided into further subsets for histopathology and photographic examination. H&E sections were evaluated for acute and chronic inflammation and microvascular density. Immunohistochemistry staining for VEGF₁₆₅ was made for evaluation of neovascularisation. Wound area was measured in 3 days intervals. Percent and cm² wound area was assessed with respect to time. Results were examined using ANOVA analysis.

Fastest wound closure was seen in normal group. On 15th day, when all normal wounds were epithelized, DM+VEGF group had 81,77 %, DM group 70,78 % epithelization. The difference was statistically significant. Mean microvascular density of groups were, DM+VEGF group 17,97 ± 2,14, DM+Alginate group 6,6 ± 0,83, DM group 4,22 ± 1,03, normal group 7,21 ± 1,65. There was statistically significant difference between DM+VEGF group and all other groups. (p<0,05).

These results suggest that, VEGF released from calcium alginate microspheres, in a controlled release system, improves epithelization and wound angiogenesis in mice diabetic wound model.



GİRİŞ

Yara iyileşmesi, pek çok sistemin bir orkestra halinde uyumlu çalışması ile gerçekleşen bir olaydır. Sürece katılan sistemlerin fazla olması, süreç ile ilgili bozukluklar gelişmesi için zemin hazırlamaktadır. Bu açıdan diyabetes mellitus (DM) yara iyileşmesine etki eden en önemli sistemik hastalıklardan birisidir.

Diyabetik hastalar sıklıkla küçük yaralanmalardan sonra iyileşmeyen yaralarla plastik cerrahi polikliniklerine başvururlar. DM görülme sıklığı da DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) istatistiklerine göre artmakta ve bu hastaların hastalık yönetimlerindeki gelişmelerden dolayı yaşam süreleri giderek uzamaktadır.¹ Sorunun büyüklüğünü anlatmada belirtilmesi gereken bir istatistik de travmatik olmayan alt ekstremitte amputasyonlarının % 50'sinin DM' a bağlı olmasıdır.² Hasta sayısının ve beklenen yaşam süresinin artışı plastik cerrahi pratiğinde bu hastalara ait kronik veya akut yaralar ile karşılaşma ihtimalini artırmaktadır.

Diyabet, metnin geri kalan kısmında açıklanacak çeşitli mekanizmalarla yara iyileşme sürecinin pek çok basamağına darbeler vurmakta, bu yolla pek çok insanda yaşam kalitesini düşürmekte, sosyoekonomik yükler getirmektedir.

Diyabet hastalarında yara oluşumuna ve iyileşme bozukluğuna neden olan faktörler şöyle sıralanabilir: mikroanjyopati, nöropati, immün yetmezlik, dolaşım bozuklukları, mekanik bozukluklar ve büyüme faktörleri düzenlenmesi bozuklukları.³ Bu bilgiler ışığında DM'de yara oluşumunu engelleme ve oluşan yaranın tedavisine yönelik stratejiler geliştirilmiştir.⁴

Büyüme faktörleri çeşitli şekillerde diyabetik yaraların tedavisinde kullanılmıştır. Güncel araştırmalarda, taşıyıcı sistemlerle birlikte büyüme faktörü uygulamaları önde gelmektedir. Yapılan çalışmalarda, diyabetik yara iyileşmesi sırasında bazı büyüme faktörlerinde eksiklikler veya faktöre verilen cevapta yetersizlikler saptanmıştır. Bu eksikliği tamamlamaya yönelik olarak geliştirilen ilaçlardan ilki diyabetik ayak tedavisinde kullanım için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesinden (FDA) onay almış olan PDGF preparatıdır.^{5,6,7} Yine bu çaba ile yapılan araştırmalarda DM'larda VEGF salınım ve etkinliğinde bozukluklar saptanmış ve bu yönde çalışmalar başlamıştır.^{8,9,10} Tüm bu çalışmalarda VEGF ya viral vektörler kullanarak, ya da VEGF sıvı taşıyıcılarda damlatılarak uygulanmıştır.

Büyüme faktörleri, kontrollü salınım gerçekleştiren kapsüllü sistemlerde daha etkin olabilmektedir. Kalsiyum aljinat mikrokürecikler içinde hazırlanmış VEGF'nin kontrollü

salınımı ile ilgili çalışmalar aljinat-VEGF ikilisinin diğer taşıyıcı-faktör kombinasyonlarına göre daha uyumlu olduğunu göstermiştir.^{11,12}

Diğer yandan kronik yaraların tedavisinde pansuman alternatifi olarak ticari ürünleri de piyasaya sürülen aljinat ve türevlerinin de kullanımı artmıştır. Gümüş iyonları ile kombinasyonları kabul görmüştür.^{13,14}

Bahsedilen literatür ışığında, bu çalışmada; streptozosin ile diyabet uyarılmış fare modelinde, daha önce diyabetik yaraların tedavisinde denenmemiş bir kombinasyon olan vasküler endotel büyüme faktörü- kalsiyum aljinat mikrokürecik taşıyıcı sisteminin, yara damarlanması ve kapanma zamanı üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilecek verilerin diyabetik ayak başta olmak üzere, tüm diyabetik yaralarda klinik uygulamaya katkısı olacağı düşünülmektedir.

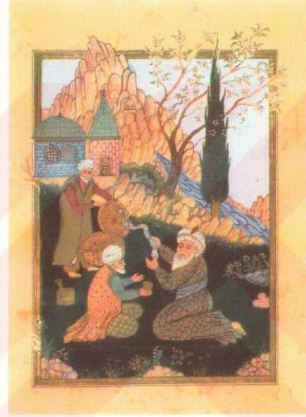


GENEL BİLGİLER

TARİHÇE:

Antik çağlarda hastalıkların fizyopatolojisinden daha çok tedavilerine yönelik deneysel teknikler daha öncelikli ilgi konusu olurken, Rönesans sonrası tıp daha çok fizyopatolojiyi anlamaya yönelmiş, fizyopatoloji çerçevesinde tedavi yöntemleri geliştirilmiştir.¹⁶

Yara iyileşmesi ile ilgili ilk kayıtlara M.Ö. 1700 yıllarına tarihlenen Ebers Papiruslarında rastlanmaktadır. (Şekil 1) Papirüslerde yüzlerce hastalık reçetesi tarif edilirken bunların bir kısmı yara tedavisine yöneliktir.¹⁵



Şekil 1 (Solda) Ebers Papiruslarından bir sayfa (B. George, E.J. Jeffrey, E.A. Christopher "A Brief History of Wound Care"; Plast. Reconstr. Surg. 117, (Suppl.): 6S, 2006 den alınmıştır) (Sağda) Şerafeddin Sabuncuğlu yılan zehiri toplarken (Şerafeddin Sabuncuoğlu, "Mücerreb-name: İlk Türkçe deneysel tıp eseri- 1468", Güncelleştiren Uzel I Suveren, Ankara, Atatürk Kültür Merkezi Başkanlığı Yayınları, 1999 dan alınmıştır)

Hipokrat, tıp tarihinde en önemli kilometre taşlarından biridir. Hipokrat, aforizmaları ile yüzyıllarca dogmatik tıbbın temelini oluşturmuştur. Kronik yaraların tedavisinde debridmanın önemini vurgulamış, yara tedavisinde katran ve bal, sirke, şarap gibi hayvansal veya bitkisel ürünlerden elde ettiği merhemler tanımlamıştır. "İlaçla tedavi olmayan yaralar bıçakla tedavi edilir. Bıçağın iyi gelmediği yaralar ateşle tedavi edilir. Ateşin de iyi etmediği hastalıklara iyileşmeyen marazlar gözüyle bakılmalıdır" diyerek debridman ve koterizasyona dikkat çekmektedir.^{16, 17, 18}

Erken Antik çağ doktorları yabancı cisimlerin yaradan uzaklaştırılması, suturasyon ve yaranın kapalı tutulmasının önemine işaret etmektedir. Galen, pansumanı benzer ilaçlarla yaparken, yara üzerinde gelişen cerahatin iyileşme adına iyi bir işaret olduğunu savunmuştur. Takipçileri de yüzyıllarca Galen'in etkisinde kalarak bu alanda büyük gecikmelere yol açmışlardır.^{16,19} Daha sonraları dağlama ve haşlama gibi yöntemler daha revaçta olsa da, 15. yüzyılda Fransız cerrah Ambroise Par'e saldırgan yöntemleri değil de daha eski ve dokuya daha saygılı teknikleri tekrar uygulamıştır.²⁰

Galen etkisinde yara iyileşmesinde yaşanan gerileme, Ebu Bekir El-Razi, İbn-i Sina gibi bilim adamlarının bu etkilerden uzak kalması ile İslam biliminde yaşanmamıştır. İbn-i Sina yaraları sınıflandırmış ve bu sınıflamalara göre farklı tür yaralar için farklı tedavi biçimleri önermiştir. El-Razi kronik yaraların tedavi edilemediği durumlarda amputasyon gerektiğini bildirmiş ve amputasyon cerrahisinin temellerini atmıştır. Bir diğer önemli Türk bilim adamı da Şerafettin Sabuncuoğlu'dur. Sabuncuoğlu, döneminde koterizasyon konusunda uzman olarak kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra nekrotik dokuların kimyasal debridman ile uzaklaştırılmasını sağlayan, yılan zehiri de içeren bir merhem kullanmıştır.^{18,21,22} (Şekil 1)

Cerrahi işlemlerin ve yara tedavisinin gelişmesinde önemli bir köşe taşı da Joseph Lister'in çalışmalarıdır. Lister, ilk olarak antiseptikleri cerrahi pratiğe sokmuştur. Karbolik asid (Fenol) emdirilmiş gazlı bezle pansumanı ilk olarak kullanmıştır. "Germ teorisi" ve antisepsi cerrahi yara enfeksiyonlarını azaltmıştır.²³

Zaman içinde "Yara"nın ne olduğunu ve nasıl iyileştiğini anlama çabası 19. yüzyıl sonlarında sonuçlarını vermiştir. 1908 Nobel Ödülü "Fagositoz" üzerine yaptığı çalışmalar nedeniyle İlya Metchnikoff'a verilmiş. Metchnikoff, yaralı bölgede ortaya çıkan inflamasyonun, kolonize olan bakterileri fagosite etmek için bağışıklık hücrelerini bölgeye davet eden bir çağrı olduğunu ileri sürmüştür. Bu çalışma, günümüz yara iyileşmesi biliminde ilk modern yaklaşım olmuştur.²³

Carl Reyher ise ilk olarak modern "debridman" kavramının temellerini atmıştır. "Geniş mekanik yara temizliği" uygulaması ile Osmanlı-Rus Savaşı sırasında enfeksiyon kaynaklı ölümleri önemli derecede azaltmıştır. Antoine Depage ise bugünkü bilinen anlamda nekrotik, ezilmiş ve yanmış dokuların, yabancı cisimlerin yara ortamından uzaklaştırılması gerektiğini bildirmiş ve anaerob yara enfeksiyonlarını büyük ölçüde engellemiştir.²³

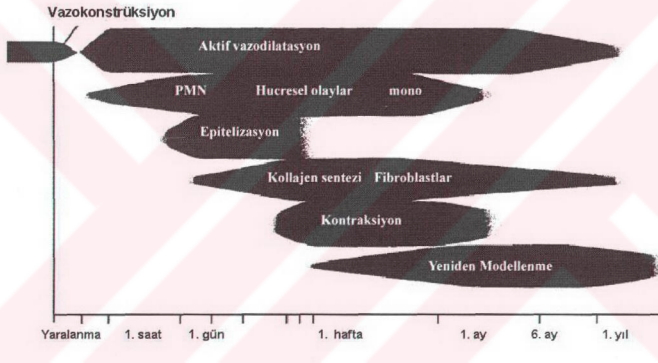
Diyabet ile ayak yaraları arasındaki ilişkiye ise ilk olarak Pyrc'e'nin 1887 yılında "Lancet" dergisinde yayımlanan makalesinde dikkat çekmiştir. Ancak patogenez ile ilgili

bilgiler son 20 yılda ortaya çıkmıştır. Tedavi yaklaşımları da bu bilgiler etrafında geliştirilmektedir.²⁴

YARA İYİLEŞMESİ FİZYOLOJİSİ:

Yara iyileşmesi esas olarak 4 ana olay çevresinde gerçekleşir. Olaylar ardışık bir düzen içinde değil, birbiri içerisinde sınırları tam olarak ayırt edilemeyecek özelliktedir. (Şekil 2) Bu evreler:

1. Hemostaz
2. İnflamasyon
3. Proliferasyon
4. Yeniden modellenme şeklinde sıralanabilmektedir.²⁵



Şekil 2 Yara iyileşmesinin evreleri kronolojik olarak gösterilmektedir. Evreler bazen eş zamanlı olarak devam etmektedir. (Rohrich R J., Robinson JB. "Wound Healing", Selected Readings in Plastic Surgery, Vol 9, Number 3, 1999'den alınmıştır)

Hemostaz:

Travmalar az veya çok, damar yaralanmasına yol açmaktadır. Damar bütünlüğünün bozulduğu bu durumlarda, kan kaybını durdurmaya yönelik mekanizmalar devreye girmektedir. Bu mekanizmalar:

- Vazokonstrüksiyon
- Platelet tıkaçı
- Pıhtılaşma
- Fibröz organizasyon şeklinde sıralanabilir.²⁶

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

Plateletlerin içindeki alfa granüllerden; albumin, fibrinojen, fibronektin, immunglobulin G, faktör V ve faktör VIII' in yanı sıra platelet kökenli büyüme faktörü (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), farklılaştırıcı büyüme faktörü alfa ve beta (Transforming Growth Factor α/β , TGF α/β), fibroblast büyüme faktörü-2 (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2) ve platelet kökenli epidermal büyüme faktörleri (Epidermal Growth Factors, EGFs) ve endotel hücresi büyüme faktörleri salınmaktadır.²⁷

Plateletlerin içindeki yoğun cisimler içerisinde ise serotonin, adenozin trifosfat (ATP), adenozin difosfat (ADP), kalsiyum gibi pıhtılaşma zincirinde önemli rolleri olan faktörler bulunmaktadır.²⁷

Doku hasarlanması sırasında bozulan damar bütünlüğü, pıhtılaşma mekanizmalarını aktive etmektedir. İntrensek ve ekstrinsek mekanizmalar pıhtılaşma sisteminin temelini oluşturmaktadır. İntrensek yolak, yara iyileşmesi için ekstrinsek yolak kadar etkin değildir.²⁸ Ekstrinsek yolak, doku faktörünün faktör VII veya faktör VIIa ile teması ile uyarılır ve sonuçta protrombin trombine dönüşerek aktive olur. Aktive olan trombin, fibrinojeni fibrine çevirerek fibrin tıkaç oluşumuna neden olur.²⁶ Fibrin tıkaç sabitleştirildikten sonra vitronektin ile kaplanır. Vitronektin aracılığıyla fibronektin erken matrikste kendine yer bulur. Fibronektin üzerinde pek çok hücre için yapışma noktaları mevcuttur. Ayrıca fibrin-fibronektin matriks sitokinler için toplayıcı görevi görmektedir.²⁷

İnflamasyon:

Yaralanmanın erken dönemlerinde gelişen vazokonstriksiyon 10–15 dakika içinde son bulur ve vazodilatasyon gelişir. Bu kendisini yara çevresinde kırmızı-kızıl bir hale şeklinde gösterir. Plateletlerden salınan faktörler, pıhtılaşma zincirinde açığa çıkan bradikinin gibi ürünler ve doku hasarı sonucu gelişen nekrozdan kaynaklanan faktörler yaralanma çevresinde endotel geçirgenliğini değiştirerek damar dışı alana plazma geçişine ve ödeme neden olmaktadır. Vazodilatasyon endotel veya mast hücresi kaynaklı lökotrienler, prostaglandinler

ve özellikle histamin kaynaklıdır. Trombin, kinin ve C3a/C5a da geçirgenliği artırıcı kuvvetli ajanlardır.^{25,27}

İnflamasyon evresinin ilk hücrel aktörü nötrofillerdir. Bunlar yaralanmadan hemen sonra ilk 24 saat içinde bölgede boy gösterir. Hücre ve matriks yıkım ürünleri, bakteriler ve yabancı cisimleri uzaklaştırmaya çalışır. Bu sırada ortama nötrofil granüllerinden jelatinaz, kollajenaz, elastaz gibi proteazlarla birlikte reaktif oksijen radikalleri de salınmakta ve bu da nekrozu debride etmektedir.²⁹

Kollajen, elastin yıkım ürünleri, kompleman, TGF- β , tümör nekroz faktörü alfa (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), interlökin-1 (Interleukin-1, IL-1), PDGF, lökotrien B4 (Leukotriene B4, LTB4) ve platelet faktörü IV (Platelet Factor IV, PF-IV) lökositler için kuvvetli kemoatraktandır. PF-IV CD11/CD8 ifadenmesini artırarak diapedezi kolaylaştırır.²⁷

Damar dışı alana çıkan monositler, T-lenfositlerinde salınan IL-2 ve interferon α (Interferon α , IFN- α) ile aktive olur ve ortama TGF- β salırlar. TGF- β da kuvvetli kemotaktik etki ile akut inflamasyonun tipik hücrelerinin toplanmasına katkıda bulunurlar.²⁷

Makrofajlar inflamasyonun en önemli hücrelerindedir. 48. saatten sonra yaralanma bölgesinde ortaya çıkmaya başlar ve çoğunlukla dolaşımdaki monositlerden kaynak alırlar. Nötrofillerin o zamana kadar gerçekleştirdiği görevleri daha kuvvetli şekilde devam ettiren eş zamanlı olarak da saldıkları veya salınmasını düzenledikleri pek çok büyüme faktörü ile yara iyileşmesinin düzenlenmesinde “Orkestra şefi” gibi görev yapar. Makrofaj kaynaklı sitokinler yeniden damarlanma, fibroblast göçü ve çoğalması, kollajen üretimi ve yara kontraksiyonu ile ilişkilidir. TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü- I (Insulin-like growth factor-I/IGF-I), FGF-2, PDGF, TNF- α , IL-1 makrofaj sitokin repertuarının önemli üyelerindedir.

Diyabetiklerde, fonksiyonel olarak ayrımlanan makrofaj alt tiplerinde farklılıklar saptanmıştır. İnflamatuar ve hücre öldürücü makrofaj oranları artarken, tamir makrofajlarının oranı azalmaktadır. Bu değişim sitokin repertuarını da değiştirerek, fibroplazi ve anjiyogenezi uyaran ve proliferatif faza geçişi uyaran faktörleri baskılamaktadır. Diyabetiklerde, makrofajlardan PDGF ve IGF-1 salınımının azaldığı gösterilmiştir. Bunun yerine inflamatuvar makrofaj fenotipinin saldıdığı inflamatuvar sitokinler artmaktadır.⁶⁶

Bağışıklık sisteminin önemli bir diğer hücresi olan T-lenfositleri de yara iyileşmesinin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. CD4 + T lenfositler daha baskın olmak üzere CD8 + lenfositler de yara bölgesinde yüksek oranda saptanır. CD 4+ T lenfositleri bağışıklık sisteminin ne tür bir cevap vereceğini planlayan ve düzenleyen hücre tipidir. IL-1, IL-2, TNF-

α , EGF ve TGF- β gibi pek çok sitokin ya kaynağı ya da salınımını kontrol eden en önemli üyedir.^{27,29}

Proliferasyon:

Yara iyileşmesinin erken dönemlerinde fibrince zengin bir matriks içerisinde inflamatuvar hücreler baskınken, temiz yaralarda 3–5. günden itibaren makrofajlar tarafından salınan PDGF, TGF- β gibi sitokinler tarafından fibroblastlar aktive edilir ve bölünerek çoğalmaya yönlendirilir. Bu dönemden itibaren, fibroblastlar yara ortamındaki baskın hücre haline gelmektedir.²⁷

Fibroblastların tek kaynağı çoğalma değildir. Bunun yanında çevre dokudaki fibroblastlar, PDGF, TGF- β , EGF ve fibronektin tarafından aktive edilerek erken yara matriksi içinde ilerlemesi sağlanır.^{25,27} Mezenşim kökenli kök hücreden ortam uyaranlarına bağlı olarak fibroblasta farklılaşma da diğer bir kaynaktır.²⁷

Kollajen sentezi:

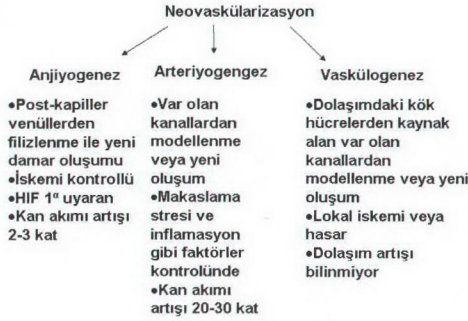
Kollajen, bağ dokunun temel yapı taşıdır. Vücut ağırlığının 1/3'ü kollajen proteindir. Glisin-Prolin-hidroksilizin/hidroksiprolin polimeri yapısındadır. Polipeptid zinciri sol el heliks yapısında kıvrılır. Ardından 3 polipeptid zinciri kendi etraflarında sağ el heliks şeklinde sarılır. Bu yapıya tropokollajen denir. Hücre dışına salınan tropokollajen molekülleri kollajen lifleri yapmak için biraraya gelir.³⁰

İnsan vücudunda dokudan dokuya farklı tip ve özellikteki kollajen sentezlenmektedir. . Kollajenin farklı tipleri değişik dokularda farklı oranlarda mevcuttur. Sağlam deride % 80- 90 oranında tip I kollajen, % 10–20 Tip III kollajen bulunurken, granülasyon dokusunda tip III kollajen % 30 oranındadır. Tip II kollajen kırıkta, tip IV kollajen bazal membranda yerleşir.²⁵ Şimdiye kadar 30 farklı kollajen polipeptid zinciri ve 20 farklı tip kollajen saptanmıştır. Normal ciltte Tip I/III kollajen oranı 4:1 dir. Yara iyileşmesinin erken evrelerinde bu oran 2:1'e kadar çıkar.^{20, 31}

Neovaskülarizasyon:

Yeni damarların oluşması ile ilgili üç süreç vardır. Bunlar anjiyogenez, arteriyogenez ve vaskülogenezdir.³² (Şekil 3) Embriyonik damar sisteminin gelişimi vaskülogenez olarak anımlanır ve endotel öncülü hücrelerin embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde farklılaşması sonrasında gelişir. Anjiyogenez ise mevcut kan damarlarından yeni kan damarları gelişmesidir. Embriyonik damar sisteminin gelişmesi ve embriyonun oksijen ve besin

ihtiyacı, aynen erişkinde anjiyogenez oluşumunda, özellikle de hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplara benzer özelliktedir.³³



Şekil 3 Yeniden damarlanma süreçleri (Simons M., "Angiogenesis Where Do We Stand Now?", *Circulation* 2005;111;1556-1566'den adapte edilmiştir)

Erişkinde ise yüksek laktat düzeyleri, asidik pH, TGF- β , EGF, TGF- α , TGF- β , KGF, IGF-I, FGF, PDGF, IL-1 α , IL-6, TSH ve ACTH gibi sitokin ve hormonlar da VEGF salınımını artırırlar.^{34, 35}

HDM ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri neovaskülarizasyonda temel rol oynar. Endotel hücresi neovaskülarizasyon süreci içinde yer alan temel hücredir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarında yerleşirler. Erişkin insanlardaki vasküler endotel hücreleri tipik olarak düşük çoğalma hızına sahip olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturacak çoğalma kapasitesine sahiptirler.

Neovaskülarizasyonun düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Neovaskülarizasyonu uyarıcı ve baskılayıcı faktörler arasındaki denge, fizyolojik koşullarda yeni damar oluşumunu kısıtlamaktadır. Uyarıcıların artışı ve/veya inhibitörlerinin azalması neovaskülarizasyonu başlatmaktadır. Yeni damar oluşumu çok basamaklı bir süreçtir. Bu süreç basamakları şeklinde verirse:

- Hipoksik ortamda salınan faktörlerin son reseptörde etki etmesi
- Endotel hücre ve perisit aktivasyonu
- Bazal membranın proteolitik enzimlerce delinmesi
- Endotel hücrelerinin ve bazal membrandaki boşluktan göçü ve proliferasyonu
- Damar tüpü oluşumu

- Bazal membranın yeniden oluşumu
- Damar stabilizasyonu ve HDM'nin yeniden şekillenmesi şeklinde sıralanabilir.^{33, 36, 37, 38}

Anjiyogenik Faktörler	Anjiyogenezi Önleyen Faktörler
VEGF (Vasküler endotel büyüme faktörü)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme faktör)	Anjiostatın
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör)	Endostatın
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör-3)	Vazostatın
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	Vasküler endotel büyüme faktörü inhibitörü
TGF- α (Transforme edici büyüme faktör- α)	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- β (Transforme edici büyüme faktör- β)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
Anjiogenin	İnterferon- α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiyopoeitin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenebilen protein- 10
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α) (Düşük doz)	TNF- α (Tümör nekroz faktör- α) (yüksek doz)
Proliferin	

Tablo 1 Anjiyogenezi uyaran ve önleyen faktörler (Konukoğlu D, Turhan S. M. "Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi". Cerrahpaşa J Med 2005; 36: 42-48'den alınmıştır.)

VEGF salınımının kontrolü eritropoetin (EPO) kontrolü ile benzer özelliktedir. Doku hipoksisi ile ortamda bulunan fibroblastlarda, keratinositlerde ve makrofajlarda hipoksi-indüklenebilir faktör-1 (Hypoxia-inducible factor-1/ HIF-1) denilen bir protein aktive olur ve bu protein VEGF promotör bölgesinin 5' ucundaki 28 baz çifti uzunluğundaki parçasına bağlanır. 28 baz çifti uzunluğundaki bu bölge EPO kontrolünü sağlayan promotör bölge ile büyük homoloji göstermektedir. Bu bağlanma sonucunda VEGF promotörü aktive olur ve VEGF salınır. Ortamda oksijen konsantrasyonu yükseldiğinde ise HIF-1 prolin rezidüsünden hidroksillenir ve aktivitesini kaybeder.³⁵ VEGF tarafından aktive olan endotel hücreleri bazal membranı parçalayan MMP'ler salgırlar ve enzimler tarafından delikler açılan bazal membranı geçen endotel hücreleri hızla kemoaktif uyarana doğru çoğalarak göç ederler. Bu snada yeni damar tüpünü de şekillendirirler. Karşı yönden gelen benzer damar filizi ile iliştiikten sonra endotel ilerlemesi durur ve yeni bazal membran sentezlenir.³⁶

Bu karmaşık süreç pek çok büyüme faktörü tarafından sıkı kontrol altında tutulur. Bilinen en kuvvetli anjiyogenik faktörler aFGF, bFGF, VEGF izotipleri, Anjiyopoetin (Ang1/2) ve plasental büyüme faktörü gibi faktörlerdir.^{36,33}

Yeniden modellenme:

Proliferasyon evresinde artan fibroblastlar kollajen sentezleyerek yara bölgesinde birikime neden olur. Yeniden modellenme evresinde, kollajen sentez ve yıkımı bir denge noktasına ulaşır. γ -interferon, TNF- α , ve kollajenin kendisi sentezini baskılar.²⁷

Kollajen yıkımından sorumlu olan ise MMP'lerdir. MMP'ler pek çok HDM elemanını parçalayabilen bir enzim grubudur. Farklı hücreler tarafından farklı tipleri salınır. Ortamda bulunan doku MMP baskılayıcıları (TIMPs) tarafından kontrol edilirler.²⁷

Erken dönemde düzensiz biçimde depolanan kollajen, yeniden modellenme evresinde MMP'ler tarafından yıkılır. Fibroblastlar tarafından yeniden sentezlenen kollajen, daha düzenli ve epitele paralel şekilde dizilir. Yara gerim gücü giderek artar.²⁰

YARA İYİLEŞMESİ BOZUKLUKLARI:

Pek çok nedenle açılan yaralar, normal fizyolojik süreçte gelişmesi gereken olaylar zincirine etki eden tıbbi durumlardan dolayı kapanma problemi ile ortaya çıkmaktadır. İyileşme sekteye uğradığında kronik yara haline gelmektedir. Zinciri bozan bu faktörler bölgesel, sistemik veya sistemik bir hastalığın bölgesel etkileri olabilmektedir. (Tablo 2) Beslenme bozukluğu, ilaç kullanımı, radyasyon teması, sigara kullanımı, yara hipoksisi, ileri yaş, sistemik metabolik hastalıklar bu faktörlerin önde gelenleridir. Bunlar arasında diyabetes mellitus (DM) en sık görülen nedendir.

Bölgesel faktörler	Sistemik Faktörler
Enfeksiyon	Metabolik hastalıklar
Yabancı Cisim	Beslenme bozukluğu
İskemi	Konjenital yara iyileşme bozuklukları
Malignite	Alkolizm
Sigara	Steroid kullanımı
Venöz Yetmezlik	Kanser kemoterapisi
Mekanik travma	İleri yaş
Toksinler	Uzak malignite
Radyasyon	

Tablo 2 Kronik yara nedenleri (Medina A., Scott PG., Ghahary A., Tredget EE., "Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds" Journal of Burn Care & Rehabilitation Volume 26, Number 4, pp:306-319 en uyarlanmıştır.)

DİYABETES MELLİTUS VE YARA İYİLEŞMESİ

Diyabet karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının tamamını etkileyen sistemik bir hastalıktır.³⁹ DSÖ verilerine göre ülkemizde 2000 yılında 2.920.000 olan DM prevalansı, 2030 yılında 6.422.000'a ulaşacaktır.¹ DM, sıklıkla idiyopatik tipte görülse de, cerrahi, tümör veya herhangi bir sistemik hastalık sonucunda da gelişebilmektedir. İdiyopatik tip DM 2 tanı grubuna ayrılmaktadır. Tip I DM, insülin kaynağı olan beta hücrelerin yıkımı ile karakterize bir hastalıktır. Tip II DM fizyopatolojisinin temelinde düzensiz insülin salınımı ve çevre dokuların insülin hormonunun etkilerine karşı dirençli veya duyuşuz olması yatmaktadır. Tipi ne olursa olsun sonuçta tüm DM' larda benzer sorunlar gelişmektedir.

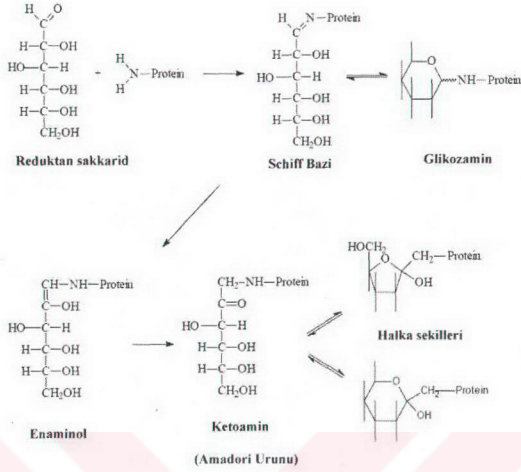
Deneyşel ve klinik gözlemler, diyabetin tüm komplikasyonlarının metabolik bozukluklarla, özellikle de hiperglisemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Fizyopatolojik süreçlerin temelinde birkaç biyokimyasal olay yatmaktadır:

- 1) Enzimatik olmayan glikozilasyon
- 2) Poliöl yolu
- 3) Protein kinaz C aktivasyonu
- 4) Hekzosamin yolu artmış aktivitesi
- 5) Mitokondrial elektron taşıma zincirinde süperoksid anyonu oluşumu.⁴⁰

Enzimatik olmayan glikozilasyon

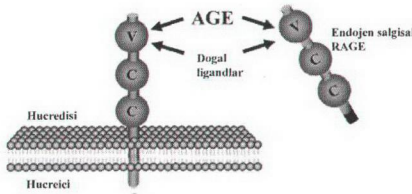
Kanda artan glikozun enzimlerin katalizör görevi yapmadığı reaksiyonlarla yapısal ve işlevşel proteinlere bağlanmasına enzimatik olmayan glikozilasyon denmektedir. Doğrudan can glukoz düzeyi ile ilişkilidir. Oluşan glikozile proteinlere "İleri glikozilasyon son ürünleri" (Advanced glycation Endproducts-AGE) denmektedir.

Redükten bir şeker olan glukoz enzimatik olmayan bir reaksiyonla Schiff bazına İönüşür. Bu aşama geri dönüleşilen bir basamaktır. Bundan sonra Amadori ürünü oluşur. Amadori ürünü erken AGE ürünlerindedir. Dehidrasyon, çapraz bağlar veya kondensasyon gibi reaksiyonlar ile geri dönüşüz AGE oluşur.^{40, 41} (Şekil 4) AGE dokularda, bazal membranlarda birikir ve mikroanjyopatiye yol açar. Lipoproteinler de aynı yoldan geçerek nodifiye olurlar ve intimaya yerleşir.



Şekil 4 Reduktan karbonhidratların enzimatik olmayan glikozilasyonu. (V. JAKUŠ, N. RIETBROCK, "Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications" *Physiol. Res.* 53: 131-142, 2004'dan alınmıştır)

AGE proteinleri vücutta kendilerine reseptörlük yapan başka proteinlerle bağlanabilirler, bunlara da "AGE reseptörü" (Receptor for AGE-RAGE) denmektedir. RAGE, immünglobulin süpergen ailesinin bir üyesidir. 2 sabit (Constant-C) ve 1 adet de değişken (Variable-V) domaini mevcuttur. (Şekil 5)



Şekil 5 RAGE yapısı ve domainleri şematik olarak. (Yonekura H., Yamamoto Y., Sakurai S., Watanabe T., Yamamoto H., "Roles of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Diabetes-Induced Vascular Injury", *J Pharmacol Sci* 97, 305 – 311 (2005)'dan alınmıştır.)

RAGE aktivasyonu, hücrede oksidan strese ve mitojen ile aktive olan protein kinaz aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. Sonuçta, ilgili hücre tipinde yapısal bozukluk ve

hücrel çoğalma meydana gelmektedir. Bu da kendini retinopati veya mezangial proliferasyon ile göstermektedir.⁴¹

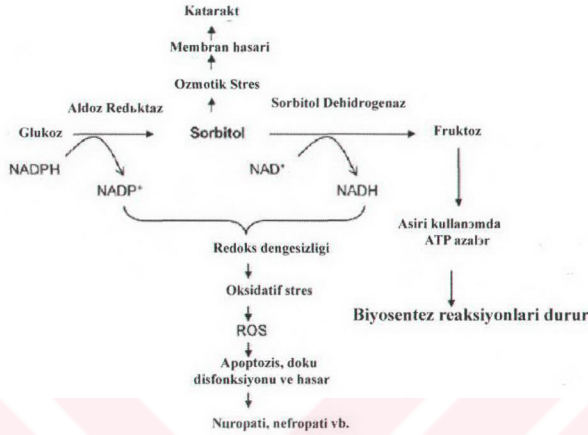
*Goova ve ark.*⁴² RAGE'leri baskılayarak yara iyileşmesinin düzeldiğini göstermişlerdir. Bu çalışmadan yola çıkarak RAGE'in fizyopatolojide önemli bir yer tuttuğu ileri sürülmüştür. *Goova ve ark.* çalışmalarında diyabetik yaralarda, inflamasyonun başlangıcının daha geç ve kronik fazın ise uzamış olduğunu söylemektedirler. RAGE daha önce belirtildiği gibi immünglobulin ailesi üyesi bir membran glikoproteinidir.⁴⁰ Pek çok hücrede varlığı gösterilmişse de yara iyileşmesi ile doğrudan ilgili olarak fibroblastlarda, endotel hücrelerinde ve makrofajlarda varlığı önemlidir. RAGE uyarımı, monositlerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırmaktadır. Bu sitokinler inflamasyonun devamlılığını sağlamaktadır. İlginç olan şey ise RAGE'i uyan proteinlerin yine monosit kaynaklı olmasıdır. Diyabetiklerde makrofajlar parakrin ve otokrin mekanizma ile inflamasyonun uzamasına neden olmaktadır.⁴³

Poliol yolu:

Diyabetiklerde hücre içinde artan serbest glukoz, kendi kinazı tarafından fosforlanmadığında alternatif yollara kaymaktadır. Bunlardan en önemlisi de polioli yoludur. Aldoz Redüktaz, glukozu indirgeyebilen aldo-keto redüktaz ailesine ait bir enzimdir. Glukoz aldoz redüktaz tarafından redükte edilir ve sorbitole dönüşür. Sorbitol dehidrogenaz ise sorbitolu fruktoza çevirir. Bu dönüşüm nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağımlıdır. Sorbitol hücre zarından serbest olarak geçemez ve fruktoza çevrilemez ise içeride birikerek ozmotik farkı artırır ve hücre içine su çeker. Bu sırada redoks reaksiyonlarının önemli kofaktörleri olan NAD ve NADP dengeleri de bozulur ve hücrede oksidan stres artar.^{44,45} (Şekil 6)

Protein kinaz C aktivasyonu:

Hücre içi hiperglisemide glikoliz ara ürünlerinden olan gliseraldehit 3-fosfat , gliserol 3-fosfata indirgenir ve açılır. Diaçilgliserol (DAG) protein kinaz C'nin aktivatörü olduğundan konsantrasyonunun artması enzimin aktivasyonuna yol açar. DAG öncelikle olarak PKC'nin beta ve alfa izoformlarını aktive eder. PKC aktivasyonu sonucunda damar geçirgenliği artar, vazoaaktif hormonlar, kan akımı değişiklikleri olur ve bazal membran entezi artar.^{46, 47, 48}



Şekil 6 Polioli yolu. (Satish K. Srivastava, Kota V. Ramana, Aruni Bhatnagar, "Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options" Endocrine Reviews 26(3):380–392'dan uyarlanmıştır.)

Artmış Hekzosamin yolağı aktivitesi:

Hücre içi hiperglisemide fruktoz-6-fosfat, glikoliz ile metabolize olmaz ve glukozamin 5- fosfata dönüşür. Bu dönüşüm glutamin:fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (GFAT) tarafından katalize edilir. Glukozamin 6-fosfattan oluşan N-asetil glikozamin, TGF-β1 ve benzeri faktörlerin sentezini aktive eden transkripsiyon faktörlerini kovalent olarak modifiye ederek aktifleştirir. Bu modifikasyon asetil CoA karboksilaz geni gibi diğer glukozu yanıt genlerinin düzenlenmelerine de aracı olabilir. Hiperglisemi ile hekzosamin yolu aktivasyonunun gen ekspresyonunda ve protein fonksiyonunda değişikliklere neden olarak diyabetik komplikasyonların patogeneziye katkıda bulunma olasılığından bahsedilmektedir.^{49, 50, 51}

Mitokondrial elektron taşıma zincirinde süperoksid anyonu oluşumu:

Son araştırmalar hücre içi hiperglisemi ile indüklenen bu metabolik olayların nitokondrilerde aşırı süperoksid oluşumu ile aktive olduğunu göstermektedir. Endotel hücrelerinde hiperglisemi ile indüklenen reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumunun ana kaynağının trikarboksilik asid döngüsü olduğu, NADH ve pürüvatın sitozolden mitokondriye aşınmaları inhibe edilerek gösterilmiştir. Kompleks V' e alternatif olarak proton geçişini sağlayarak proton gradientini azaltan kenetlenmeyi bozucu protein (UCP-1) ve Süperoksid dismutazın

(SOD) aşırı ekspresyonları hipergliseminin etkilerini engellemektedir. UCP-1 ve SOD' un endotel hücrelerinde hiperglisemiye bağlı olarak artan sorbitol birikimini, AGE oluşumunu ve PKC aktivasyonunu tamamen engelledikleri saptanmıştır. Hiperglisemi ile indüklenen NF-κB aktivasyonunun mitokondrideki aşırı süperoksid oluşumunun inhibisyonu ile engellendiği gösterilmiştir. Mitokondride aşırı miktarlarda süperoksid oluşumu gliseralehit 3- fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe eder. Bu inhibisyon glukoz ve glikoliz metabolitlerinin konsantrasyonlarının artmasına neden olur. Gliseralehit 3- fosfattan parçalanma ile oluşan metil glioksalin artışı AGE'lerin artmasına neden olmaktadır.^{48,52, 53,54}

Hiperglisemi ile indüklenen mikrovasküler değişiklikler daha sonraki normal glukoz homeostazi dönemlerinde de kalıcı olur veya ilerler. Mitokondride oluşan ROS'ların mitokondrial DNA'da hasara neden olduğu gösterilmiştir. Mitokondrial elektron transport sistem elemanlarından bazılarını kodlayan mitokondrial DNA'nın hasarlanması, bu elemanların yapılarının ve fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Hasarlı elemanlar nedeni ile normoglisemide bile süperoksid oluşumu artar. Hiperglisemik hafızanın mitokondrial DNA'daki oksidatif hasar ile açıklanabileceği önesürülmektedir.⁵⁵

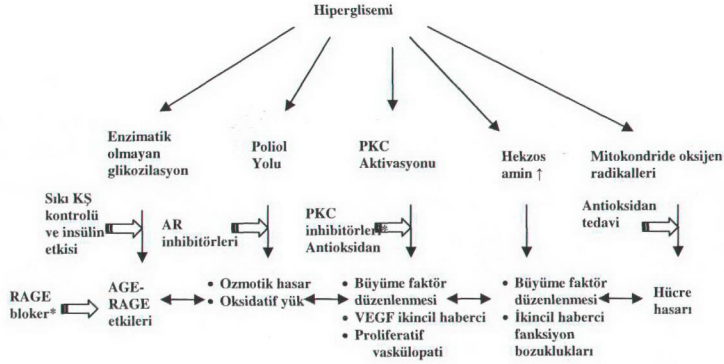
Diyabetik hastalarda yukarıda anlatılan mekanizmalar ile gelişen hasar sonunda sistemik komplikasyon gelişmektedir.^{3,56}

Diyabetik Mikroanjyopati:

Diyabette tipik olarak mikroanjyopati görülse de büyük damarlarda da ateroskleroz plaklarına bağlı klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Kapiller bazal membranında kalınlaşma ve endotel fonksiyon bozuklukları görülür.^{3,56,57,58}

Diyabetik nöropati:

Diyabetik periferik nöropati duyu, motor ve otonom sinir liflerinin tamamını etkiler. Nöropati gelişmesinde polioll yolu, otoimmünite ve mikroanjyopati gibi mekanizmalar değişen oranlarda etkili olabilmektedir. Sinir biyopsilerinde endonöral ödem, demyelinizasyon alanları mevcuttur.³



Tablo 3 Diyabet fizyopatolojisinde hiperglisemi ve etkilerini gösteren şema. Deneysel ve klinik tedavi uygulamaları. * Deneysel uygulama, PKC: protein kinaz C, AR: aldoz redüktaz

Duyusal nöropati, diyabetik hastalarda bası, travma ve yanığa bağlı yaralar açılmasına neden olmaktadır. Otonom nöropati sonucunda ise terleme kaybına bağlı deri kuruluğu ve çatlakları gelişir. Deri travmaya daha hassas hale gelir. Otonomik nöropatinin diğer bir etkisi de periferik arteriovenöz şantların kontrolününün kaybıdır. Şantların açılması sonrasında periferik nabızlar alınsa bile kapiller yatağa yeterli kan akımı olmamaktadır. Motor nöropati ise kas gruplarına dengesiz kasılmalara ve mekanik dengesizliklere neden olarak yara oluşumuna katkıda bulunur.^{3,56, 57,58}

Duyu sinirlerinin dermise kadar ulaşmasında sinir büyüme faktörünün (NGF) rolü olduğu düşünülmektedir. Burada NGF kaynağı bazal tabaka hücreleridir. NGF keratinositlerdeki purinerjik reseptörlerin çeşit ve düzeylerini düzenlemektedir. Denerve yaralarda purinerjik reseptör düzenlemeleri bozulmuştur. Diyabetik nöropatide epidermal NGF salınımı bozulmuştur. Bu durumda keratinosit çoğalmasından sorumlu olduğu düşünülen γ 2Y₂ reseptörünün sentezi azalmakta, keratinositlerin ileri farklılaşmasını sağladığı düşünülen γ 2Y₁ reseptörünün sentezinin arttığı izlenmiştir. NGF, dışarıdan verildiğinde ise reseptör düzeyleri normale gelmektedir.⁵⁹

Reolojik Bozukluklar:

Diyabet hastalarında platelet agregasyonu ve adezyonu artmakta ve eritrosit deformasyon yeteneği azalmaktadır. Ayrıca bazal membrandaki bozukluğa bağlı olarak hücreler arası alana sıvı kaçışı olmakta bu da viskoziteyi arttırmaktadır. Sonuçta yer yer dolaşım problemleri gelişmektedir.^{3,56}

Diyabet hastalarında, ankrin ve spektrin gibi eritrosit iskelet proteinleri de enzimatik olmayan glikozilasyon ve artmış oksidatif yükten etkilenmektedir. Bu etkilenim eritrosit duvar kırılabilirliğini arttırmakta ve reolojik bozukluklar gelişmektedir.⁶⁰ Yine endotelde gelişen diyabetik etkilenim sonucu platelet agregasyonu ve adezyonu artmaktadır.^{61,62}

İmmünolojik Bozukluklar:

Yara iyileşmesi sürecinde inflamasyon önemli yer tutmaktadır. Bu evrenin düzenlenmesinde bozukluklar ciddi iyileşme sorunlarına yol açmaktadır.⁶³ Yaralanmadan sonra erken dönemde yara bölgesinde akut inflamasyon özellikleri baskınken, 48. saatten sonra yavaş yavaş kronik inflamasyon hücreleri çoğunluğu ve kontrolü ele geçirir. Normal yara iyileşmesinde izlenen bu yapay akı şeması, diyabetiklerde değişiklikler göstermektedir.⁷³

Diyabetiklerde kemotaksis, diapedez fonksiyonlarında izlenen bozukluklar, tüm bağışıklık fonksiyonlarda genel baskılanmaya neden olmaktadır. Bu bozukluklar yara iyileşmesinde kendini göstererek, basamaklardan birisi olan inflamasyonda yetersizlikle sonuçlanmaktadır.^{10,64} Diyabetik yaralarda, inflamasyon geç başlamakta, düşük şiddetle uzun süre devam etmektedir.¹⁰ Makrofaj ve B lenfositlerinden zengin kronik hücresel infiltrasyon yara iyileşmesinde önemli rolü olan CD4+ T lenfositlerinin sitokin repertuarını iyileşmeye yardımcı şekilde yönlendirmesini engeller.⁶⁵ Fenotipik olarak farklı tiplerinden olan inflamatuvar, tamir ve hücre öldürücü tip makrofajların oranı değişerek inflamatuvar makrofajların sayısı artar.⁶⁶ Diyabetik yaralarda TNF- α ve IL-1 β düzeyleri artmıştır.⁶⁷ Bu artış MMP artışından sorumlu tutulmaktadır. Enzimatik olmayan glikozilasyon ürünlerine karşı gelişen reaksiyonlar nedeniyle otoimmün hastalıklar görülebilir.^{3,56}

*Gough ve ark.*⁶⁸ bağışıklık sistemindeki bu baskılanmayı göz önüne alarak immün istemi uyarmak amacıyla, enfekte diyabetik ayak yarası olan olgulara granulosit-koloni ıyıcı faktör (G-CSF) uygulamış ve enfeksiyon kontrolü ve hastanede kalış süresinde belirgin iyileşme olduğunu bildirmiştir. Öte yandan, *Yönem ve ark.*⁶⁹ ve *Kastenbauer ve ark.*⁷⁰ da G-CSF kullanımını pozitif etkilerini gösterememişlerdir.

Mekanik Bozukluklar:

Motor nöropati ve fasyaların enzimatik olmayan glikozilasyonu sonucunda kısılma ve esneklik kaybından dolayı özellikle ayakta dejeneratif ve ilerleyici bozukluklar gelişir. Ayakta bası gören ve vücut ağırlığını yere aktaran noktalarda basınç artar ve yaralar açılır. Nörotravmatik ayak olarak tanımlanan bu durumun en ağır haline “Charcot Ayağı” denir.^{3,56, 57,58}

Diyabette Yara İyileşmesini Etkileyen Diğer Bozukluklar:

Hiperglisemi ve onun yol açtığı biyokimyasal bozukluklar temelinde, şimdiye kadar bahsedilen sistemlerin yanı sıra pek çok hücre tipi ve bunların fonksiyonlarında bozukluklara yol açmaktadır. Yara iyileşmesi sürecinde, en önemli rollerden birine sahip olan fibroblastlar ve keratinositler de bu grup içindedir.

Diyabetik farelerde yapılan *in vitro* çalışmada, *Lerman ve ark.*,⁷¹ diyabetik fibroblastların hücresel göç yeteneklerinin normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında daha zayıf olduğunu göstermiştir. Ayrıca, diyabetik fibroblastların artmış MMP-9 sentezi ve azalmış VEGF salınımı da *in vitro* olarak gösterilmiştir. Fibroblast fonksiyonlarından bir diğer de MMP düzenlemesidir. Diyabetiklerde MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 sentezinde artış gösterilmiştir. Ayrıca MMP aktivitesini kontrol eden doku metalloproteaz inhibitörü-2 (TIMP-2) azalmıştır.^{67, 72, 73}

Fibroblastlar kadar önemli diğer bir hücre türü de keratinositlerdir. Yara iyileşmesinde VEGF'nin en önemli kaynaklarından birisi yine keratinositlerdir. Genetik olarak diyabetik farelerde keratinositlerde VEGF mRNA sentezinin belirgin derecede düştüğü gösterilmiştir.⁷⁴ *Terashi ve ark.* da hipergliseminin keratinositlerin çoğalmasına negatif etkileri *in vitro* olarak göstermişlerdir.⁷⁵ Ayrıca glikozile kollajenin keratinosit göçü için uygun bir ortam sağlamadığı gösterilmiştir.⁷⁶

Hiperglisemi ve yol açtığı biyokimyasal bozukluklar temelinde, şimdiye kadar bahsedilen sistemlerin yanı sıra pek çok hücre tipi ve bunların fonksiyonlarında bozukluklara yol açmaktadır. Yara iyileşmesi sürecinde en önemli rollerden birine sahip olan fibroblastlar ve keratinositler de bu grup içindedir.

Fibroblastlar kadar önemli diğer bir hücre türü de keratinositlerdir. Yara iyileşmesinde VEGF'nin en önemli kaynaklarından birisi yine keratinositlerdir. Genetik olarak diyabetik farelerde keratinositlerde VEGF mRNA sentezinin belirgin derecede düştüğü gösterilmiştir.⁷⁷ *Terashi ve ark.* da hipergliseminin keratinositlerin çoğalmasına negatif etkileri *in vitro* olarak

göstermişlerdir.⁷⁸ Ayrıca glikozile kollajenin keratinosit göçü için uygun bir ortam sağlamadığı gösterilmiştir.⁷⁹

Bütün bunların dışında yaş da yara iyileşmesinde önemli bir faktördür. İleri yaşta yara iyileşmesinin pek çok aşamasında bozukluklar oluşmaktadır. Bunlar tek başına yaşa bağlı olabile de, birçoğunda metabolik hastalıkların eş zamanlı bulunması ve periferik arter hastalığı bulunması tabloyu oldukça karıştırmaktadır. Yaşlanma ile erkek ve kadın cinsiyet hormonlarındaki düşüşün, pür yaşlılığa bağlı yara iyileşmesi bozukluğunda rolü olduğu düşüncesi mevcuttur. Bu görüşten yola çıkarak, *Ashcroft ve ark.*⁸⁰ topikal estrogen preparatlarının yara iyileşmesini iyileştirdiğini göstermiştir. *Margolis*⁸¹ de bası yarası ve venöz ülser gibi kronik yarası olan postmenopozal kadın olgularda estrogen replasman tedavisinin yara iyileşmesini belirgin şekilde iyileştirdiğini göstermiştir. Bahsedilen çalışmalarda altı çizilen asıl nokta, pür yaşa bağlı yara iyileşme bozukluğunda, cinsiyet steroidlerinin azalmasının yara iyileşmesinde negatif etkilerinin olduğudur.

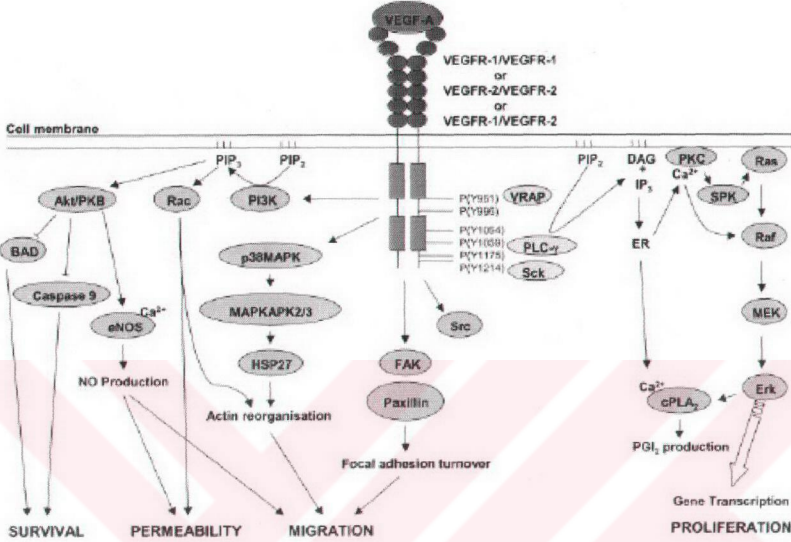
VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ:

1983 yılında Senger, tümör hücre hattından elde edilen damar geçirgenliğini artırıcı faktör (VPF) denilen bir protein saflaştırmıştır. 1989 yılında Ferrera ve Henzel ayrı bir çalışmada endotel hücrelerine özgün bir mitojen bulmuşlar ve adına “vasküler endotel büyüme faktörü” demişlerdir. Daha sonra yapılan dizilim çalışmalarında, Connolly VEGF ve VPF'nin aynı protein olduğunu göstermiştir.^{35,82}

VEGF gen ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, VEGF-E ve Plasental büyüme faktörü (PLGF) denilen glikoprotein yapıda üyelerden oluşur. Aile PDGF süpergen ailesinin bir üyesidir. 6. kromozomun kısa bacağına yerleşir.⁸³ VEGF-A daha çok anjiyogenez, VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiyogenezden sorumludur.⁸⁴ VEGF-A sıklıkla VEGF olarak bilinmekte ve kullanılmaktadır. Diğer izoformların anjiyogenez etkinliği VEGF-A adar fazla değildir.

VEGF-A transkripsiyon sonrası alternatif dilimlenmeler ile farklı ekson ombinasyonları oluşturur. 121, 145, 165, 189, 206 amino asitli tiplerine 148, 162, 183 amino asitli izoformlar ve son olarak da VEGF₁₆₅ türevi olan VEGF_{165b} saptanmıştır.⁸⁴ 145, 189, 206 izotipleri hücre zarına sıkıca bağlı kalırken, 121 aminoasitli tip yüksek derecede çözünürdür ve uzak etkilerden sorumludur. VEGF₁₆₅ heparin ve HDM'ye tutunur. VEGF_{165b} e farklı eksonların alternatif şekillenmesi ile oluşur. VEGF_{165b}'nin diğerlerinden farkı

mitojen uyarıyı başlatma özelliğinin bulunmamasıdır. Tüm bu tiplerden anjiyogenezde en etkin olanı VEGF₁₆₅'tir.³⁵



Şekil 7 VEGF reseptör sonrası ikincil habercileri ve ilgili yolların sonuçları. (Hoeben A., Landuyt B., Highley Ms., Wildiers H., et. al., "Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis" Pharmacol Rev 56:549-580, 2004 den alınmıştır.)

VEGFR-1 (Flt-1 (fms-like tyrosine kinase)) ve VEGFR-2 (Kinase insert Domain-DR) tirozin kinaz reseptörü (RTK) sınıfından olmasına rağmen, reseptör sonrası akış ile ilgili bilgiler oldukça tartışmalıdır. VEGFR farklı hücre ve gelişim basamaklarında farklı tkilere sahiptir. VEGFR-1'in VEGF'ye olan afinitesi oldukça yüksektir. Ancak RTK ktivitesi yine RTK özelliğinde olan VEGFR-2'den daha zayıftır. VEGFR-1 daha çok /EGFR-2 etkilerini azaltmaya neden olan "şaşırtma etkisi" yüksek afinitesi ve düşük RTK ktivitesi ile ilişkilidir. VEGFR-3 erişkinde lenfatik endotelde sınırlanmıştır. Endotel hücreleri yırca nöropilin-1 ve -2 reseptörü ile de etkileşirler. NRP-1 ilk olarak nöronlarda österilmiştir. Sinir yönlendirilmesinde ve büyümesinde rolü olduğu düşünülmektedir. NRP-1 ağede VEGF₁₆₅ ve VEGF¹²¹'e bağlanır, NRP-2 VEGF₁₆₅, ve VEGF₁₄₅ ve PLGF' ye ağlanmaktadır. NRP'lerin sitoplazmik sinyal uzantısı yoktur. Bunlar diğer VEGFR ile ompleks halinde etki göstermektedirler.^{35,84}

VEGF'nin reseptöre bağlandıktan sonra, RTK dimer haline gelerek kendisini fosforile ettiği gösterilmiştir. Ardından fosfolipaz C üzerinden protein kinaz C aktive olmakta ve bu da Ras proteini yolağı üzerinden hücre bölünmesini uyardığı gösterilmiştir. Aynı sırada protein kinaz B üzerinden apoptozisi baskıladığı saptanmıştır. Endotel NO sentaz (eNOS) enzimini aktive ederek NO üzerinden vazodilatasyona ve geçirgenlik artışına neden olmaktadır. Mitojen ile uyarılmış protein kinaz (MAPK) üzerinden çoğalmayı yine uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca endotel hücre göçünü yine MAPK ve paksilin üzerinden gerçekleştirmektedir.^{35,82,84}

VEGF'nin yara iyileşmesi ile ilgili diğer önemli hedef hücreleri hematopoetik kök hücre kaynaklı hücrelerdir. Özellikle monositler/makrofajlarda VEGFR-1 varlığı gösterilmiştir. VEGFR-1 üzerinden hematopoetik kök hücre ve monosit/makrofajlarda çoğalma ve kemotaksis uyarılmaktadır.⁸⁵

VEGF endotel hücreleri, hematopoetik kök hücre üzerine etkileri kadar, retina pigment epiteli, pankreatik duktus epiteli, Schwann hücreleri, üzerine etkileri gösterilmiştir. Alveol tip II hücrelerde surfaktan salınımını artırır. Son çalışmalarda nöroprotektif etkileri izlenmiştir. Ayrıca, embriyolojik gelişim, yara iyileşmesi, kadın üreme döngüsü ve tümör gelişimi ile ilişkilidir.³⁵

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ile Yapılan Deneysel ve Klinik Çalışmalar:

VEGF, anjiyogenezisi uyarıcı etkisinden dolayı pek çok iskemi modelinde kullanılmaktadır. Rekonstrüktif ve estetik cerrahide özellikle flep cerrahisi başta olmak üzere, pek çok deneysel çalışmada araştırılmıştır. Son yıllarda terapötik anjiyogenez mantığıyla kronik yara modellerinde özellikle de diyabetik yaralarda denenmektedir.^{8,9,10,35}

Takeshita ve ark, tavşanlarda yaptıkları çalışmalarında, VEGF'nin iskemik arka bacak modelinde, hem intramusküler hem de intravenöz enjeksiyonunda, iskemik ekstremiteye olan kan akımını arttırdığını bildirmişlerdir.⁸⁶

Sıçanlarda abdominal iskemi oluşturulup, 5 µg VEGF'nin femoral damar içine uygulaması ile deney grubunda flep yaşınının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir.⁸⁷ Zhang ve ark. sıçan venöz flep modelinde subdermal olarak verilen 1 µg/ml VEGF'nin flep yaşayabilirliği kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdığını göstermişlerdir.⁸⁸

Başarılı hayvan çalışmalarından sonra insanlarda da gen terapisi ile VEGF uygulamaları yapılmıştır. Ekstremitte iskemisi olan hastalarda, VEGF geni taşıyan plazmid ile

perkutanöz anjiyoplasti uygulanmış. 4 haftalık tedavi sonrasında diz, tibia ortası ve ayak bileğinde anjiyogeneze ait anlamlı anjiyografik ve histolojik bulgular ortaya çıkmıştır.⁸⁹

Diyabet ve Yara İyileşmesi Modelleri:

Diyabetik hayvan deneyi modellerinde, cerrahi, kimyasal veya genetik uygulamalar mevcuttur. STZ ile uyarılmış diyabet sık başvurulan modellerdendir.⁹⁰ Kimyasal uyarılmış diyabet modellerinin en çok eleştirilen noktalarından birisi; ilacın verilmesinden sonra hipotezin test edilmesi için beklenen sürenin, diyabeti ve komplikasyonlarını tam olarak yansıtması için beklenmesi gereken süreden uzak olmasıdır.

Yara deney modelleri *in vitro* ve *in vivo* modeller olarak ayrılmaktadır. *In vitro* modeller hücre kültürlerini temel almaktadır ve özel fiziksel şartlar ve tecrübe gerektirmektedir. Bununla beraber *in vivo* modeller hayvan çalışmalarından oluşmaktadır. Hamster, fare, sıçan, tavşan ve domuz modelleri mevcuttur. Hayvan modelleri arasında birbirlerine üstünlükler belirgin değildir. Kolay ulaşılabilmesi, bakım kolaylığı, test edilecek hipotezin özelliği modelin seçiminde önemlidir.⁹¹

Bu genel bilgiler ışığında, VEGF'nin taşıyıcı aljinat mikrokürecik sistemi kullanılarak diyabetik yara iyileşmesi üzerine etkisinin aydınlatılması bu teze konu olarak alınmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda ve Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) yapıldı. Çalışmada Bornova Veteriner Araştırmaları Enstitüsünden elde edilen, ağırlıkları 20-30 gr arası değişen, 50 İsvaç Albino cinsi fare üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deneklerin cinsiyeti çalışma planı açısından önemsizdi. Çalışma sırasında deneklere, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health-NIH) tarafından yayımlanmış olan ve Laboratuvar Hayvanları Kaynakları Enstitüsü (Institute of Laboratory Animal Resources) tarafından hazırlanan "Laboratuvar Hayvanları Kullanımı ve Bakım Klavuzu"* ve Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Tıp Araştırmaları Birliği (National Society for Medical Research) tarafından düzenlenen laboratuvar hayvanlarının bakım prensiplerine uygun şartlarda uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Tüm denekler standart laboratuvar yem ve suyu ile beslenmiştir.

DENEKLER VE GRUPLARA DAĞILIMI:

Elli adet İsvaç Albino cinsi fare DEÜTF Deneysel Hayvanları Laboratuvarına getirildi. Bir hafta adaptasyon için beklendi. On fare kontrol grubu için ayrıldı ve 40 fareye diyabet oluşturma protokolü uygulandı.

Tüm denekler, histopatoloji ve fotoğrafik inceleme amacıyla 2 gruba ayrıldı. Bu gruplar da aralarında DM+VEGF, DM+Aljinat, DM, ve normal grupları oluşturacak şekilde ayrıldılar.

Altıncı hafta sonunda kan glukoz düzeyi 300 mg/dl altında olan 3 fare ve ölen 7 fare çıkarıldıktan sonra kalan 30 fare gruplara tablo gösterildiği şekilde dağıtıldı.

Histopatolojik inceleme				Fotoğrafik inceleme				
DM (n=14)	DM+Aljinat (n=14)	DM+VEGF (n=14)	Normal (n=14)	DM (n=6)	DM+Aljinat (n=6)	DM+VEGF (n=6)	Normal (n=6)	
Yaraların Oluşturulması				Yaraların Oluşturulması				
İzlem	Boş Aljinat kürecik	CaAljinat- VEGF	İzlem	Normal grubun	İzlem	Boş Aljinat kürecik	CaAljinat- VEGF	İzlem
5 gün aralar ile histopatolojik örnek alınması				yara kapanma süresi	3 gün aralıkla fotoğraf çekimi			

Tablo 4 Grupların şematik olarak gösterilmesi ve planlanan işlemler. 30 diyabetik fareden 21'i histopatolojik izlem grubunda 3 eşit gruba ayrılmışlardır. Kalan 9 fare fotoğrafik izlem grubunda 3 eşit gruba ayrılmışlardır. Her farenin ründa ikişer yara açılmıştır. Her yara ayrı bir örnek olarak alındığından örnek sayıları tabloda verildiği gibi değerlendirilmiştir.

DIYABET PROTOKOLÜ:

Farelerin kuyruklarından alınan kan örneklerinden kan şekeri bazal düzeyleri saptanması amacıyla, glukometre (AccuCheck Go, Roche) ile ölçümler yapıldı. Streptozosin (STZ) (Sigma S0130) 0.5 M sitrat (Sigma S1804) tampon çözeltisinde çözülerek 40 adet fareye 200 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edildi. Üç gün sonra farelerin kuyruklarından alınan kan örneklerinden, kan şekeri düzeyleri yeniden saptandı ve enjeksiyon sonrası 1. haftadan itibaren haftalık örnekler alındı. Ölçümde kan şekeri düzeyi 300 mg/dl üzerinde saptanan fareler, diyabetik kabul edildi.⁹² Altıncı hafta sonunda diyabetin damarsal etkilerinin geliştiği kabul edilmiştir.^{93, 94, 95, 96}

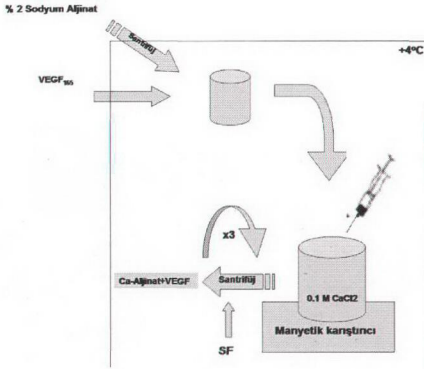
MİKROKÜRECİKLERİN HAZIRLANMASI:

ARLAB (Dokuz Eylül Üniversitesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı) imkanları kullanılarak kürecikler hazırlandı. Sodyum aljinat (SIGMA A0682, San Diego, CA, USA) kuru tozundan, 20 ml % 0.9 NaCl (Eczacıbaşı) içinde % 2'lik sodyum aljinat çözeltisi hazırlandı. Çözünmenin tamamen gerçekleşmesi için 24 saat raf üzerinde oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan visköz sıvı 15000 devir/dk hızda 3 saat santrifüje edildi. Süpernatant toplandı ve çökelti atıldı. Süpernatant, steril tüplerde küçük hacimlere bölündü ve 12 saat ARLAB hücre kültür odasında, raf üzerinde, ultraviyole ışıkta bekletilerek sterilizasyonları sağlandı.

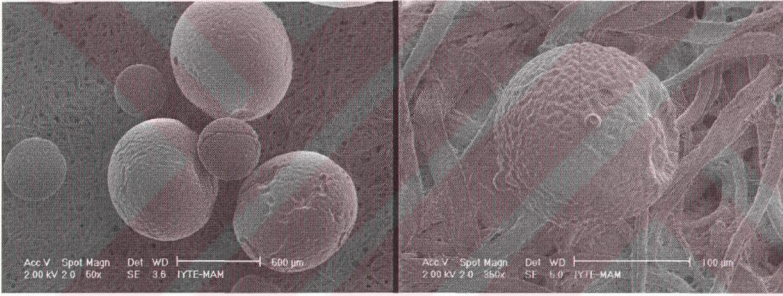
VEGF₁₆₅ (SIGMA V7259) 0.4 ml % 0.9 NaCl içinde 25 µg VEGF içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar, 4°C de, 3 ml sodyum aljinat içeren steril cam kaplarda karıştırıldı. El ile hafifçe karıştırıldıktan sonra karışım 23 gauge hipodermik iğne ile kaptan alındı.

Elli ml, 0.1 M kalsiyum klorür (Sigma-Aldrich C1016) oda sıcaklığında hazırlandı. Çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde kırılmış buz içeren cam kaba damlalar halinde katıldı. Karışım manyetik karıştırıcıda 4°C de bir gece karıştırıldı. Karışım düşük hızda santrifüje edilerek kürecikler elde edildi.¹¹ Mikroküreciklerden alınan örnek İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Laboratuvarında tarayıcı elektron mikroskopla incelendi. Kürecik çapları 150-200 µm arasında ölçüldü.

Kontrol grubunda kullanılacak kürecikler, % 0.9 NaCl ile hazırlandı.



Şekil 8- Kalsiyum Aljinat mikrokürecikler içinde VEGF hazırlanmasını özetleyen şema.

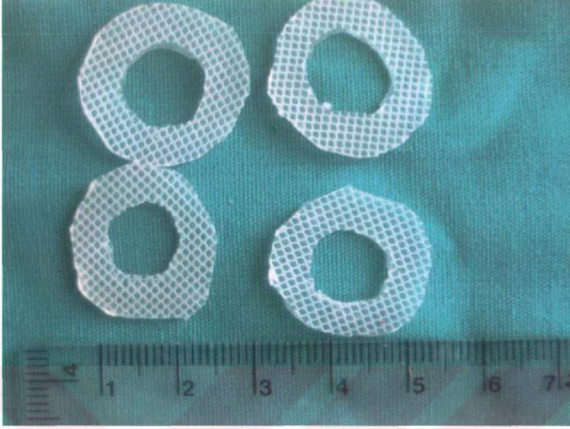


Şekil 9 Kalsiyum Aljinat mikroküreciklerin tarayıcı elektron mikroskop görüntüleri. (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Laboratuvarında çekilmiştir.)

YARA OLUŞTURULMASI:

Tüm cerrahi girişimler intraperitoneal Ketamin hidroklorür (Ketarlar – 50 mg/ml) 50 mg/kg ve Ksilazin hidroklorid (Alfazyne % 2, Alfasan- 20mg/ml) 5 mg/kg anestezisi ile, steril koşullar altında gerçekleştirildi. Antibiyotik profilaksisi uygulanmadı. Anestezi ardından, yara oluşturulacak bölge traş edildi. Serum ile yıkanarak kıllar uzaklaştırıldı. Povidon iyot ile saha temizliği sağlandı. Ardından fare sırt bölgesinin her iki tarafında, paraskapuler bölgede 10 mm çapında dairesel cilt defekti planı çizildi ve küçük doku makasıyla dermis altındaki seviyeden cilt eksize edilerek tam kat cilt defekti oluşturuldu. Ardından yara kontraksiyonunu önlemek için simit şeklinde önceden hazırlanmış silikon tabaka yara çevresine doku yapıştırıcısı ile

yapıştırıldı ve ayrıca tek tek emilemeyen 5/0 suturler (Prolene, Ethicon) ile suturlerle desteklendi.⁹⁷



Şekil 10 Yara çevresine yerleştirilen silikon simit şeklinde atel.



Şekil 11 Yara çevresine dikilen ve yapıştırılan silikon atel ve yara üzerine pansuman olarak kapatılan şeffaf film tabaka

DM+VEGF gruplarına, 1 μ g/ 0.1 ml VEGF içeren mikrokürecikler yara üzerine 0.1 ml uygulandı. Ardından şeffaf pansuman malzemesi (Tegaderm, 3M Healt Care) ile uygulanan

üreciklerin kurumaması ve kontaminasyonu engellemek amacıyla yara üzerine kapalı pansuman uygulandı.

DM+Aljnat gruplarına, 0.1 ml boş mikrokürecik uygulandı. Ardından şeffaf pansuman malzemesi ile yara üzerine kapalı pansuman yapıldı.

DM ve Normal gruplara ise yara sadece şeffaf pansuman malzemesi ile yara kapatılarak takip edildi.

Fareler postoperatif erken dönemde ayrı kafeslerde tutuldu.⁹⁷

YARA İYİLEŞMESİNİN İZLEMİ:

Fotoğrafik izlem grubundan 3'er fare ve her farede 2'şer yara seri olarak takip edildi. Yaralar, 3 gün ara ile dijital fotoğraf makinası (Canon Powershot A75) ile standart çözünürlükte, standart ışık şartlarında, standart mesafeden (17 cm yükseklik), üç ayak (Minette, Japonya) kullanılarak seri fotoğraflar çekildi. Fotoğraf çekimleri sırasında kısa süreli eter anestezisi uygulandı. Eter ile uyutulan fare ölçekli zemin üzerinde yerleştirilerek fotoğrafı çekildi. Yaraların kapanması defektin tam olarak epitelize olması kabul edildi. Defekt alanı ImageJ 1.34s (National Institutes of Health, USA) yazılımında, hassas fare kullanılarak yara sınırları çizildikten sonra, çizilen bölgenin piksel büyüklüğü ölçüldü. Program 1 cm'ye göre kalibre edilerek alanın cm² cinsinden alanı saptandı.¹⁰

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI:

Beşinci, onuncu ve onbeşinci günlerde histopatoloji gruplarından 2'şer fare gelişimi güzel olarak seçildi ve 100 mg/kg sodyum pentotal ile sakrifiye edilerek ve yara çevresindeki 5 mm doku ile, pannikulus altındaki seviyeden eksize edildi.

HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME:

Alınan örnekler % 10 formolde fikse edildi. Örnekler, rutin hematoksilin-eozin boyama ile akut ve kronik inflamasyon ve damarlanma açılarından değerlendirildi.

Akut ve kronik inflamasyon değerlendirmesi için, *Kirchner ve ark.*'nin yayımladığı skorlama sistemine uygun şekilde gerçekleştirildi.¹⁰ Değerlendirme, bir patolog tarafından tabloda belirtilen ölçütlere uygun şekilde gruplara kör olarak incelendi ve skorlandı.

Parametre	Tanım	Ölçü birimi
Akut İnflamasyon	Göreceli nötrofil varlığının derecesi	0= Yok 1= Hafif 2=Orta 3=Belirgin
Kronik İnflamasyon	Göreceli lenfosit ve eozinofil varlığının derecesi	0= Yok 1= Hafif 2=Orta 3=Belirgin

Tablo 5 Histopatolojik kriterler

Neovaskülarizasyonun değerlendirilmesi için ise, hematoksilen-eozin ile boyanmış örnekler, bir patolog tarafından gruplara kör şekilde, x400 büyütmede her örnek için 12 büyütme alanında yer alan kapiller damar sayımlarının ortalaması belirlenerek gerçekleştirildi.⁸

Damarlanma miktarını belirleme için endotel hücrelerini göstermek amacıyla VEGF'ye yönelik immünohistokimyasal teknik ile boyama yapıldı. Parafin bloklardan hazırlanan kesitler VEGF Ab-7 (Neomarker, LabVision Corp, Fremont CA) ile boyandı. Ardından damar yoğunluğu açısından değerlendirildi.⁹⁹

ÇIKARILMA ÖLÇÜTLERİ:

Streptozosin enjeksiyonu sonrası, 6. haftada kan glukoz düzeyi 300 mg/dl altında olması ve yara yerinde makroskopik enfeksiyon ve yara bölgesine deney süresince gelişen ravmalar, deneğin çıkarılma kriteri olarak kabul edilmiştir.

DENEY SONLANDIRMA:

Deneğin sonlandırılma zamanı, normal grupta tüm yaralar kapandığı gün olarak belirlendi. Normal grupta yara kapandığı sırada, diğer gruplardaki yara alanları ilk alan ile karşılaştırıldı.

STATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME:

Yara alanı verileri yüzde cinsinden incelendi ve gruplar arasında istatistiksel fark Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirildi. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

Mikrovasküler yoğunluğun incelemedinde mikroskop alanına giren ortalama mikrodamar sayısı, gruplar arasındaki fark açısından Tek yönlü ANOVA analizi ile incelendi. Post Hoc test Scheffe ve Bonferroni kullanıldı.

Akut ve kronik inflamasyon skorları varyans analizi ile değerlendirildi. Skorların çarekökü alınarak varyans stabilize edildi. Grup skorlar zaman bağımlı olarak tabloya köküldü. Eğim çizigisi hesaplanarak gruplar arasındaki fark değerlendirildi.

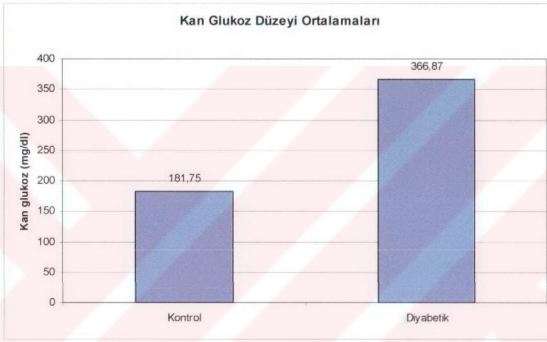
Tüm istatistiksel işlemler SPSS 11.0 versiyonunda gerçekleştirildi.

BULGULAR

KAN ŞEKERİ DÜZEYLERİ:

Deneklerin bazal kan glukoz değerleri ölçüm sonuçları $181,7 \pm 14,23$ mg/dl olarak saptandı. STZ verildikten sonra diyabet grubunda kan glukoz düzeyleri haftalık olarak takip edildi. 42. günde kuyruktan alınan kan örneklerinde ortalama kan glukoz düzeyleri $366,87 \pm 44,84$ mg/dl saptandı. (Grafik 1) 42. günde farelerden 3'ünün kan glukoz düzeylerinin önceden belirlenen 300 mg/dl limitinin altında kaldığı görüldü.

İzlem sırasında, 7 fare öldü. 42. günde kan glukoz düzeyi 300 mg/dl altında kalan 3 fare deney dışı bırakıldı.



Grafik 1 Kontrol ve STZ verilen farelerin 42. günde kuyruktan alınan örneklerinden kan glukoz düzeyleri grafikte gösterilmiştir.

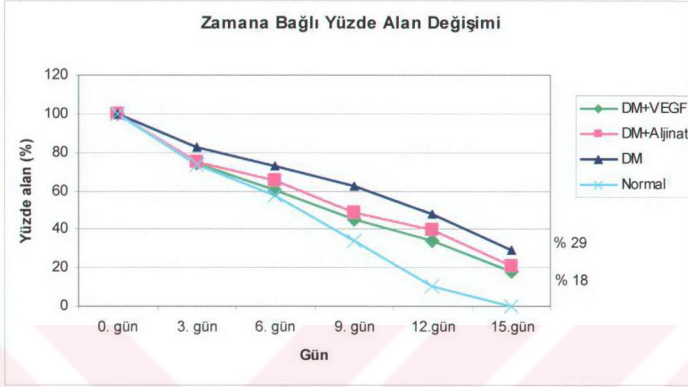
KLİNİK TAKİP:

Cerrahi prosedür öncesinde, sırasında ve sonrasında erken dönemde komplikasyon gelişmedi. Anestezi komplikasyonlarından denek ölümü olmadı. İzlem sırasında normal gruptan 1 denek kafesinde ölü bulundu. DM+VEGF grubunda 1 denek yara bölgesinden diğer farelerce ısırılma suretiyle yaralanması nedeniyle, DM+Aljimat ve DM grubundan birer denek de makroskopik yara yeri enfeksiyonu gelişmesi üzerine deneyden çıkarıldı.

YARA İZLEM:

Yara iyileşmesinin takibi fotoğraf izlem grubunda 3 günde bir fotoğraf çekilerek gerçekleştirildi. Normal grupta tüm yaraların kapanması 15. günde gerçekleşti. Onbeşinci günde sırasıyla gruplarda yara alanlarının ortalaması, DM+VEGF grubunda $0,14 \pm 0,02$ cm², DM+Aljimat grubunda $0,16 \pm 0,01$ cm², DM grubunda ise $0,23 \pm 0,03$ cm² ölçülmüştür. 15.

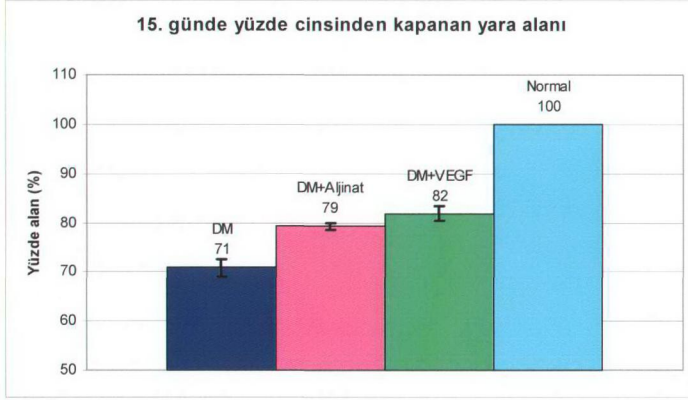
günde, DM+VEGF grubunda ilk yara alanına göre % 18'lik bir açıklık devam etmekteydi. DM grubunda ise açıklık % 29 düzeyindeydi. (Grafik 2)



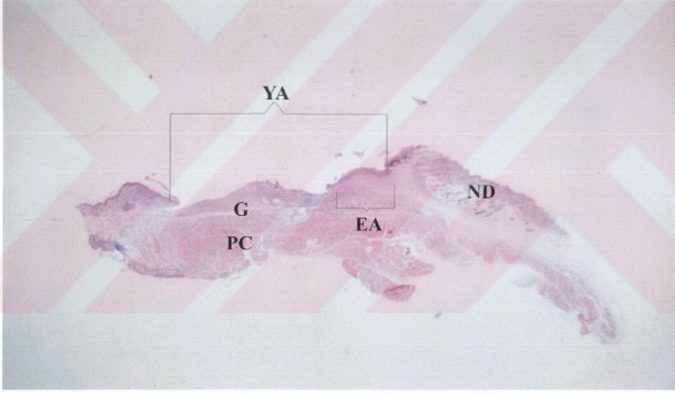
Grafik 2 Yara alanının yüzde cinsinden zamana göre grafiği verilmiştir.

Onbeşinci gün yara kapanma yüzdeleri karşılaştırıldığında, DM grubu ile DM+Aljinat grubu arasında ($p<0,05$, M-W $U=0,0$) ve DM grubu ile DM+VEGF grubu arasında ($p<0,05$, M-W $U=0,0$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. DM+VEGF grubu ile normal gruplar arasında ($p<0,05$, M-W $U=0,0$) ve DM+Aljinat grubu ile normal grup arasında ($p<0,05$, M-W $U=0,0$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

15. gün sonunda DM+VEGF grubunda yaraların % 81,77'si kapanırken, DM grubunda % 71'i kapanmıştır. (Grafik 3) Yara alanlarının yüzde cinsinden zamana bağlı değişimi grafikte gösterilmiştir.(Grafik 2)



Grafik 3 15. günün sonunda tüm yaraların kapanma yüzdesi.

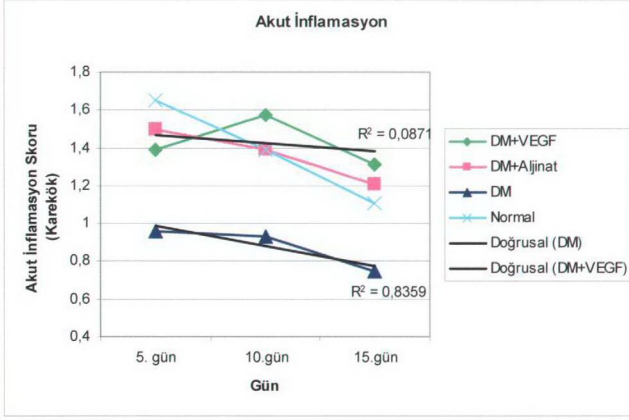


Şekil 12 Epitel defektinin H&E boyamada görünümü. YA: Yara alanı, EA: Epitelizasyon alanı, ND: Normal deri, G: Granulasyon, PC: Panniculus Carnosus

HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

Akut inflamasyon:

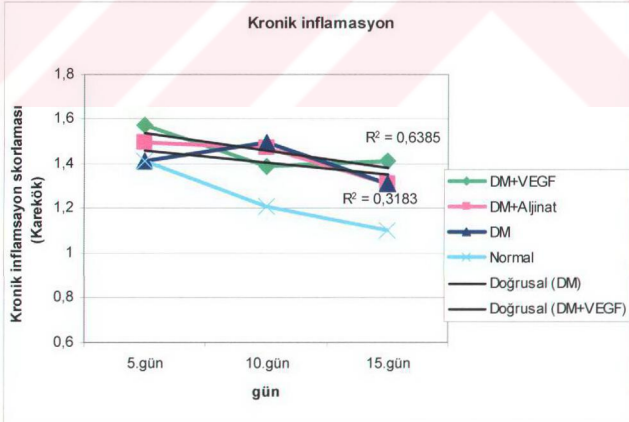
Akut inflamasyon skorlaması sonucunda tüm ölçüm zamanlarında en düşük skor DM grubunda saptanmıştır. En yüksek skor ise normal grupta izlenmiştir. DM grubunun eğimi $R^2=0,8359$, VEGF grubunun eğimi $R^2=0,0871$ bulunmuştur. Akut inflamasyon tüm gruplarda zaman içinde azalmıştır. Ancak en dramatik azalış normal grupta izlenmiştir.(Grafik 4)



Grafik 4 Akut inflamasyon skorlarının zaman içinde değişimi. DM grubunun eğimi $R^2=0,8359$, VEGF grubunun eğimi $R^2=0,0871$ bulunmuştur.

Kronik inflamasyon:

Kronik inflamasyon değerlendirmesinde 5. günde tüm gruplar arasında belirgin fark izlenmedi. Tüm gruplarda kronik inflamasyon skoru azalma eğiliminde bulundu. Tüm diyabetik gruplarda skor daha yüksek olma eğilimindeydi. DM grubunun eğimi $R^2=0,8359$, DM+VEGF grubunun eğimi $R^2=0,3183$ bulunmuştur.(Grafik 5)



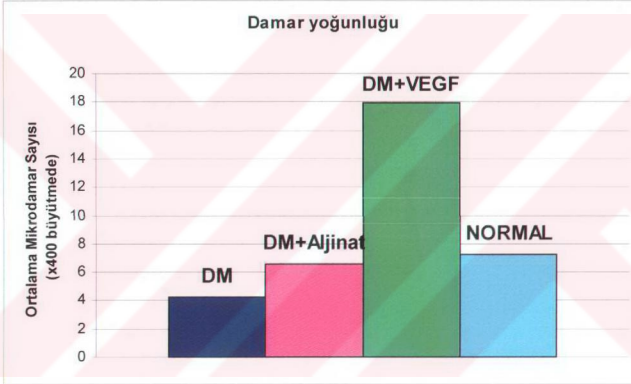
Grafik 5 Kronik inflamasyon skorlarının zaman içinde değişimi. DM grubunun eğimi $R^2=0,8359$, VEGF grubunun eğimi $R^2=0,3183$ bulunmuştur.

Damar Yoğunluğu:

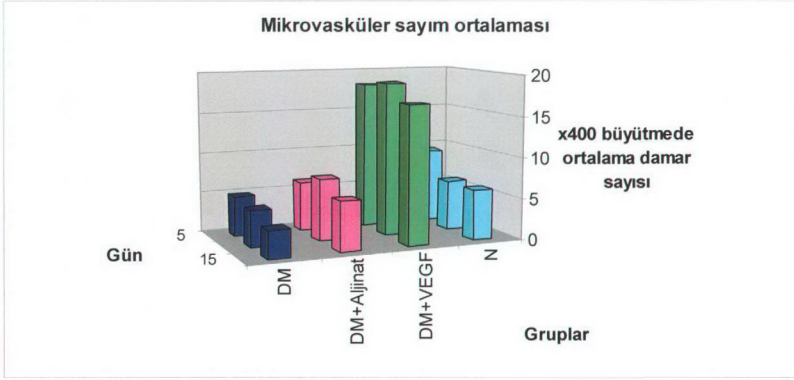
Tüm gruplar damar yoğunluğu açısından incelendiğinde, DM+VEGF grubunun ortalama damar yoğunluğu $17,97 \pm 2,14$ hesaplanırken, sırasıyla DM+Aljinat grubunda $6,6 \pm 0,83$, DM grubunda $4,22 \pm 1,03$, normal grupta $7,21 \pm 1,65$ ortalamalara ulaşılmıştır. DM+VEGF grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Normal grup ile DM grubu arasında fark saptanırken, DM+Aljinat grubu ile arasında anlamlı fark saptanamamıştır.(Grafik 6) (Şekil 16,Şekil 17,Şekil 18,Şekil 19)

İmmünohistokimyasal inceleme:

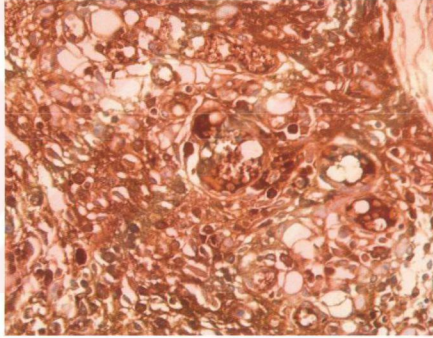
Patoloji kesitleri VEGF₁₆₅'e yönelik immünohistokimya yöntemi ile boyandığında DM+VEGF grubunda HDM'de yoğun VEGF₁₆₅ boyanması izlenmiştir. (Şekil 13, Şekil 14) Diğer gruplarda ise VEGF boyanması zayıf kalmıştır ve HDM'de tutulum izlenmemiştir.(Şekil 15)



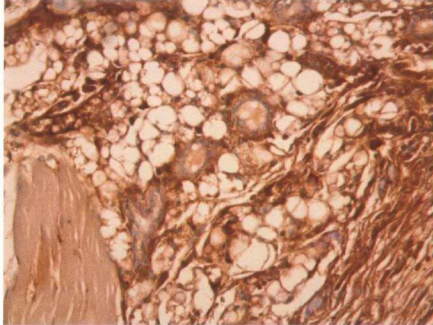
Grafik 6 X400 büyütme alanında ortalama mikrodamar sayısı. VEGF ile diğer gruplar arasında ve normal ile DM grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur. ($p<0,05$)



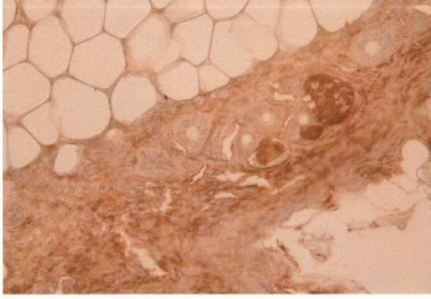
Grafik 7 Grupların 5 gün aralar ile alınan örneklerinde mikrodamar ortalamalarının grafiği.



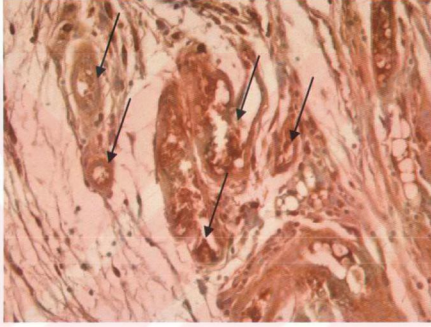
Şekil 13 VEGF immünohistokimyasal boyaması sonrası VEGF gruplarından bir kesit. VEGF₁₆₅HDM'ye bağlandığından hücreler arası alanda yoğun VEGF boyanması mevcut.



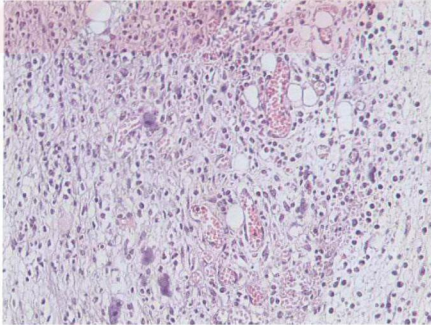
Şekil 14 VEGF immünohistokimyasal boyaması sonrası VEGF gruplarından bir kesit. VEGF₁₆₅HDM'ye bağlandığından hücreler arası alanda yoğun VEGF boyanması mevcut.



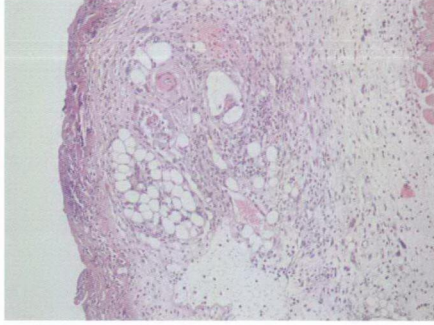
Şekil 15 VEGF verilmeyen gruplardan VEGF immünohistokimyasal boyaması sonrası bir kesit



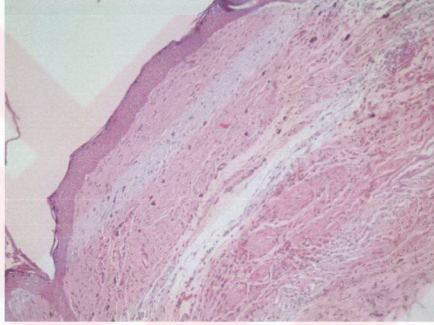
Şekil 16 VEGF immünohistokimyasal boyama tekniği ile mikrovasküler yapılar



Şekil 17 H&E boyama kesitlerinde damarlanmanın artmış olduğunu izlendiği bir alan.



Şekil 18 H&E boyama kesitlerinde kürecik çevresi yabancı cisim reaksiyonu ve artan damar sayısı.



Şekil 19 DM grubuna ait H&E boyama kesitlerinde damar izlenmeyen bölge.

TARTIŞMA

DM hastalarının %25'i ağır ayak yaralarına adaydır.^{4,56} Kronik ayak yaralarının yanı sıra, DM hastalarının elektif veya acil cerrahi girişimleri de yara iyileşme problemleri nedeniyle morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilmektedir.

Akut gelişen doku hasarlarının kronik hale gelmesine fizyolojik yara iyileşme mekanizmalarından biri veya birkaçında bozukluklar neden olmaktadır. (

Tablo 1) Bu faktörlerin bir kısmı diyabetik yaralarda yaranın kronikleşmesinde etkindir.⁷³

Diyabete bağlı gelişen metabolik bozuklukların fizyopatolojisi göz önüne alındığında, nefropati, retinopati gibi komplikasyonlar diyabette görülen yara iyileşmesi bozukluğu ile paralel özellik göstermektedir. Diyabette, metabolik durum ne kadar iyi ise DM'nin geç komplikasyonları ve yara iyileşme problemleri de o kadar geç olmakta, gelişen problemler ise daha kolaylıkla tedavi edilebilmektedir. Kan glukoz düzeyinin kontrol altında tutulmasına yönelik bütün tedaviler sonuçta yara iyileşmesinde görülen bozukluğunda düzelmesine katkıda bulunacaktır. *Girach*¹⁰⁰, hiperglisemi düzeyi ile diyabetin komplikasyonları arasındaki korelasyonu göstermiştir. Kan şekeri kontrol altına alındığında ise tekrar normal risk düzeyine dönüşmesi zaman almaktadır.

Diyabetik komplikasyonların temelinde yatan hiperglisemiye yönelik tedavilerin etkisiz kaldığı durumlarda ise, fizyopatolojinin diğer basamaklarına yönelik farmakolojik müdahaleler gerekli olmaktadır. (Tablo 3) Aldoz redüktaz inhibitörleri, antioksidan tedaviler klinik kullanımı olan ajanlardır. RAGE blokerleri, proteinkinaz C inhibitörleri de deneysel şamadır ve mikroanjyopati gelişimini erken dönemde durdurarak, diyabetik yaralar daha başlamadan önleme adına özel önem verilmesi gereklidir.^{42, 44, 58, 101, 110}

Mevcut yara modelinde, VEGF'nin endotel üzerine koruyucu etkileri, vazodilatatör etkilerinden dolayı kısmen de olsa reolojik parametreleri düzeltmesi mümkün görünmektedir. Periferik nöropatiye bağlı dolaşım düzenlemesi bozukluğu ve keratinosit farklılaşma düzenlemesi bozukluğu iyileşmeyi bozan faktör olarak mevcut olsa bile, periferik duysal nöropati, motor nöropati ve buna bağlı gelişen mekanik düzensizlikler etkin bir faktör olmamaktadır.

Diyabetik Mikroanjiyopati:

*Greenhalgh*⁵⁶, *Dinh*⁵⁷ ve *Jeffcoate*⁵⁸ diyabette mikroanjiyopatinin önemine dikkat etmektedir. Diyabetik ayak hastalarında yara açılmadan çok önce mikroanjiyopati aptanmıştır. Diyabette tipik olarak mikroanjiyopati görülse de, büyük damarlarda da aterosklerozun laklarına bağlı klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Kapiller bazal membranında kalınlaşma ve endotel fonksiyon bozuklukları görülür.^{3,56,57,58} Diyabetik ayak yarasında periferik vasküler hastalık mikroanjiyopatiye eklenerek hipoksemiye derinleştirilmektedir. Burada kullanılan modelde ise mikroanjiyopati bulunsun da makrovasküler hastalıktan etkilenim söz konusu değildir.¹⁰¹

İndüklenmiş diyabetli hayvan modellerinde, STZ verilmesinden sonra 3 gün içerisinde hiperlipidemi gelişirken, diyabetik komplikasyonlar daha geç dönemlerde gelişmektedir. Bu konu ile ilgili *Pfaffman*,⁹³ STZ-diyabetik sıçan modelinde 2-12 haftada vasküler değişiklikler gelişmiştir. *Emanuel*⁹⁵ ise STZ-diyabet modelinde 28. günde vasküler endotelde apoptozis aptandığını ve 60. günde belirgin mikroanjiyopati geliştiğini bildirmişlerdir. *Van Dam*⁹⁶ ise anjiyopati için 2-6 haftalık bir zaman dilimi önermişlerdir. 6 hafta süresince farelere diyet kısıtlaması yapılmamıştır. Bu şekilde, kontrolsüz diyabet benzeri bir süreç elde edilmeye çalışılmıştır.⁹⁶

Bu çalışmada da, sözü edilen literatürler ışığında 6 haftalık bekeme süresi modellenmiştir. Yine benzer çalışmalarda olduğu gibi diyet kısıtlamasına gidilmemiştir.

Diyabetik yara modeli:

*Galeano ve ark.*⁸, *Galiano ve ark.*⁹, *Kirchner ve ark.*¹⁰, *Komesu ve ark.*⁶⁴ çalışmalarında fare veya sıçan sırt bölgesini yara modelinde kullanmışlardır. *Vranckx*¹¹⁵ çalışmalarında *Breibart ve ark.*¹¹² ise tavşanlarda iskemik kulak modelinde yara iyileşmesi çalışmıştır. Ancak sıklıkla kabul gören *in vivo* çalışma modeli kemirgen sırt yara modeli olmuştur.

*Galiano ve ark.*⁹ fare ve diğer kemirgen modellerinde yara iyileşmesinin, insanlardan farklı olarak kontraksiyona dayandığını; insanlarda ise granülasyon ve epitelizasyonun daha yavaş olduğunu belirtmiş ve farelerde yeni bir yara modeli tanımlamıştır. *Galiano ve ark.*⁹ modelinde, ince bir silikon tabaka, ortası simit şeklinde kesilip hazırlanıp, yara çevresine yerleştirilerek sutur ve doku yapıştırıcısı ile yara kenarlarına tespit edilmektedir. Model, fare

ara iyileşmesini temeli olan kontraksiyon engellenerek, epitelizasyon ve granülasyonu icalemeye olanak vermektedir.⁹

Bu çalışmada, *Galiano ve ark'ın* modelinin farelerde tanımlı olması, kolay temin dilebilmesi, tek başına müdahalelerin daha kolay yapılabilmesi, bakım kolaylığı ve geçmişte ara çalışması tecrübesi nedeniyle fare modeli kullanılmıştır.⁹¹

Dişabetik yaralarda büyüme faktörleri:

Yukarıda adı geçenlerin yanı sıra yeni tedavi seçenekleri de sunulmaya çalışılmaktadır. 'ara iyileşmesindeki bozukluğa yönelik müdahaleler, büyüme faktörleri, matris tamamlayıcı müdahaleler, enzim düzenlemeleri, kök hücre tedavileri gibi başlıklar altında icelenebilmektedir.^{4,58}

Büyüme faktörlerinin yara tedavisi amacıyla kullanılması düşüncesi 1970'lerin onlarına dayanmaktadır.⁵ Bunca yıl geçmesine rağmen, insanlarda kronik yara tedavisinde kullanım için lisans alabilen tek ilaç rekombinant insan PDGF'si REGRANEX®'tir Becaplermin Gel 0.01%).

Son yıllarda büyüme faktörlerinin kronik yara tedavisinde kullanmaya yönelik araştırmalar yoğunlaşmıştır. PDGF'nin yanı sıra, FGF, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) da insanlarda randomize kontrollü çalışmalarda kullanılmıştır.^{102, 103,104,105,106,107,108,109}

Dişabette VEGF kullanımı:

VEGF anjiyogenezi uyaran, etkileri uzun yıllardır iyi bilinmesine karşın, tümör anjiyogenezindeki rolünden dolayı insanlarda randomize kontrollü çalışmalarda kullanılmayan bir ajandır. Bununla beraber, hayvanlarda terapötik anjiyogenez araştırmalarında en sık kullanılan ve umut vaat eden faktördür. Terapötik anjiyogenez araştırmalarının da başında dişabetik yara iyileşmesi ve dişabete bağlı geç komplikasyonların tedavisine yönelik denemeler gelmektedir.

Dişabetik yaralarda daha önce bahsedilen mekanizmalarla yara iyileşmesinde bozukluklar gelişmektedir. Bu bozukluklara VEGF açısından bakarsak, dişabetiklerde fibroblastlardan ve keratinositlerden VEGF salınımının belirgin düzeyde azaldığı gösterilmiştir.^{71,74} *Altavilla ve ark.* da dişabetiklerde oksidatif stresin VEGF salınım ve düzenlenmesinde bozukluklara yol açtığını göstermiştir. Lipid peroksidasyonu askılandığında anjiyogenezin daha belirgin hale geldiğini göstermişlerdir.¹¹⁰ Dişabetik yaralarda eksikliğini gösterilmesinden sonra eksikliği tamamlamak için çalışmalara başlanmıştır.^{8,111,112}

Tsou ve ark. diyabetik fare modelinde retrovirüs ile defektif VEGFR gen ansfeksiyonu ile anjiyogenezi ve yara iyileşmesini baskılanmıştır.¹¹³ *Nissen ve ark.* aptıkları çalışmalarda, cerrahi yara sıvı örneklerinin sıçan kornea anjiyogenez modelinde neovaskülarizasyonu artırıcı etkilerini göstermişler, VEGF'nin özgül antikor ile baskılandığı durumlarda ise neovaskülarizasyonu izlememişlerdir.¹¹⁴ Bu iki çalışma VEGF'nin yara iyileşmesi için vazgeçilmez derecede önemli olduğunu göstermiştir.

Yukarıdaki literatürler ışığında, *Di Peppe ve ark.*, *Galeano ve ark.* ve *Breitbart e ark.* VEGF genini farklı vektörler ile diyabetik farelere transfekte etmişler ve yara iyileşmesinin anjiyogenez, epitelizasyon ve HDM sentezi açısından daha iyi olduğunu göstermişlerdir.^{111,112} *Galiano ve ark.* ve *Kirchner ve ark.* da topikal olarak uygulanan VEGF'nin diyabetik yara iyileşmesini hızlandırdığını saptamışlardır.^{9,10} Öte yandan, *Vranckx ve ark.* adenovirüs ile ansfekte ettikleri VEGF₁₂₁'in domuzlarda yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerini gösterememiş aksine, aşırı VEGF sentezi saptanan gruplarda yara iyileşmesinin diğer gruplara göre daha kötü olduğunu göstermişlerdir.¹¹⁵ Model farklılıklarından dolayı çıkarımlar yapmak üçtür.

VEGF'nin etkisi hakkında çelişkili sonuçların nedeni kullanılan VEGF izotiplerinin ve deney modellerin farklılığı olabileceği düşünülmüştür. *Vranckx*¹¹⁵ model olarak yaşlı domuz ksizyonel yara modelini kullanırken, diğer çalışmalarda kemirgenler kullanılmıştır. Ayrıca *Vranckx*'in kullandığı izotip olan VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅'e göre daha kolaylıkla difüze olabilen, IDM elemanlarına bağlanmayan, dolayısıyla büyük ölçüde sistemik dolaşıma katılan formudur.⁹

VEGF₁₆₅ HDM'de tutularak dolaşıma daha kontrollü katılır ve lokal etkisi diğer tüm formlara göre uzun sürer.³⁵ Bununla beraber, *Galiano ve ark.* sıvı taşıyıcı ile diyabetik farelere topikal VEGF₁₆₅ uyguladıkları modelde, kemik iliği kaynaklı kök hücreleri yara bölgesinde göstermişler ve VEGF₁₆₅'in sistemik olarak da etkileri olduğunu saptamışlardır.⁹

Terapötik anjiyogenez çalışmalarında sıklıkla kullanılan VEGF'nin 165 aminoasitli formudur. Bu çalışmada, topikal uygulamaya daha uygun olması ve mevcut modellerde daha azla refere edilmesi nedeniyle VEGF₁₆₅ kullanmasına karar verilmiştir.^{8,9,10,11,12,111,112}

VEGF uygulama yöntemi:

Bahsedilen çalışmalarda, VEGF'nin viral transfeksiyonla uygulanmasının VEGF gibi tümör gelişiminde etkin⁸² rol oynayan bir faktörün vücutta kontrolü kısıtlı bir şekilde alınmasının yan etkileri arttıracığı düşünülmektedir. Diğer yandan, büyüme faktörlerinin kısa

arı ömürleri, protein yapıları ve diyabette ortaya çıkan MMP'lerdeki artışı göz önüne alındığında topikal uygulamalarında sıvı taşıyıcı sistemlerin kullanılmasının da VEGF etkinliğini azaltacağı düşünülmektedir.³² Sıvı taşıyıcı kullanan modellerde her gün veya 2 gün rayla her yaraya 20 µg gibi yüksek miktarlarda VEGF₁₆₅ verilmesi de uygulama zorluğu ve istemik dolaşıma geçiş nedeniyle maliyet ile birlikte yan etkileri de yükselteceği düşünülmektedir.^{9,10}

Bunlar göz önüne alındığında, kontrollü salınım sistemleri büyüme faktörlerinin *in vivo* uygulamalarında daha uygun taşıyıcılar gibi görünmektedir. Kontrollü salınım sistemleri zerdikleri ilacı çevre etkilerden koruyarak, etkili olması istenen bölgede yeterli derişimde atacak dozda yavaş salınım yaparak görev yaparlar. Böylece aynı etkiyi elde etmek için istemik olarak yüksek doz ilaç verilmesi gerekmez veya tekrarlayan defalarda düşük doz ilaç uygulaması yapılması gerekmez. Kontrollü sistemler özellikle kısa yarı ömürlü protein yapıları ve faktörlerin uygulamaları için idealdir. VEGF kısa yarı ömrü, yapısı, istenmeyen yan etkilerinin bulunması, tekrarlayan uygulamalarının zorluğu ile pek çok diğer büyüme faktörü gibi, kontrollü salınım sistemleri için verilen tanıma uyar.^{35,116} Bu çalışmada yukarıda çıkılan nedenlerden dolayı, sıvı taşıyıcı veya viral vektörlü VEGF₁₆₅ ya da VEGF₁₂₁ değil, VEGF₁₆₅ kontrollü salınım sistemi ile uygulanmıştır.

VEGF'nin kontrollü salınım sistemi olarak seçenekler, *Elçin* ve diğer bazı çalışmacılar tarafından bildirilen albümin-kitosan küre taşıyıcı, polilaktid- poliglikolid kürecikler dabilmektedir.^{11,117} Ancak aljinat kürecik sisteminin diğer yöntemlere göre hem teknik hem de VEGF ile ilişkili kullanım avantajları mevcuttur. *Gu ve ark'a*¹² göre teknik olarak proteinlerle daha uyumlu fiziksel şartlarda hazırlanabiliyor olması bir avantajdır.

*Ozawa ve ark'*¹¹⁸ VEGF gen transfekte edilmiş myoblastların, *in vitro* VEGF salınım düzeyini ölçmüşler; sonuçta en düşük dozda VEGF salınımı gösteren % 10 transfekte klonun yaklaşık 5 ng/gün/10⁶ hücre düzeyinde, ortama VEGF saldıklarını saptamışlardır. Yine aynı çalışmada, % 10'luk klondan, 5x10⁵ hücre transplante edilen fare kulaklarında, kontrol gruplarına göre mikrovasküler yatağın % 56 oranında arttığını göstermişlerdir. Yani 10 ng/günden daha düşük dozlarda bile VEGF lokal olarak anjiyogenetik etkilerini gösterebilmektedir. Çalışmada, 70 ng/gün/10⁶ düzeyine kadar normal yapıda damarlanma artışı izlenmiştir. Ancak 100 ng/gün/10⁶ ve üzeri dozlarda hemanjiyom yapısında damarlanma artışı izlenmiştir.

*Elçin*¹¹ çalışmasında, 2µg/ml ve 4µg/ml VEGF içeren kalsiyum aljinat küreciklerin *in vivo* ve *in vitro* VEGF salınımını ölçmüştür. *In vitro* test sonuçları, 2µg/ml VEGF içeren

mikroküre grubunda, ilk 3 günde VEGF salınımı olmadığını, 4-7 gün arasında 20-160 ng/gün VEGF salındığını, 7. günden itibaren yapılan ölçümlerde 80-90ng/gün VEGF salınımına ulaştığını göstermiştir. 4 µg/ml grubunda ise ilk 3 gün VEGF salınmamış, 4-7 gün arası 0-150 ng/gün, 7. gün sonrasında ise 60-100 ng/gün salınım düzeyine ulaştığını göstermiştir.

*Trentin ve ark.*¹¹⁹ diyabetik olmayan, normal fare yara iyileşmesi modelinde sırt bölgesinde yerleşen 0,5 cm çapındaki eksizyonel cilt defektlerine VEGF₁₆₅ ve HIF DNA izilimi uygulamışlardır. VEGF taşıyıcısı olarak fibrin matris kullandıkları çalışmada, 1,25 µg/ml VEGF'nin yara bölgesinde damarlanmayı belirgin derecede arttırdığını göstermiştir.

*Ferrara*¹²⁰, VEGF'nin *in vitro* etkilerini aktardığı çalışmasında, kapiller endotel hücrelerinin 1-1,2 ng/ml düzeyinde maksimum mitoz cevabı verdiğini göstermiştir. Yine bu alışmada 150 pg/ml düzeyinde maksimum cevabın yarısı düzeyinde mitoz cevabı izlendiği bildirilmiştir.

VEGF'nin doku düzeyleri dışında normal yara iyileşmesinde salınım dinamiği ile ilgili olarak yaptığı çalışmasında *Brown ve ark.*¹²¹; VEGF salınımının 3. günde pik yaptığını ve 3 haftadan sonra normal düzeylere döndüğünü göstermişlerdir.

Elçin'in¹¹ çalışmasından elde edilen, kalsiyum aljinat küreciklerden *in vitro* VEGF salınım verileri 3. güne kadar VEGF salınmadığını göstermektedir. *Brown ve ark.*'in¹²¹ çalışmasında ulaşılan fizyolojik VEGF salınım verileri ile örtüşmektedir.

Bu çalışmada, 1µg/ml VEGF-kalsiyum aljinat taşıyıcı kürecik sistemi ile uygulanan VEGF, adı geçen çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanarak kullanılmıştır.

Kalsiyum aljinat küreciklerle VEGF salınım sisteminin diğer bir özgün avantajı ise aljinatın yıkım ürünü olan oligosakkaridlerin VEGF'nin *in vitro* etkinliğinin artırıyor olmasıdır.^{122, 123, 124} *Peters ve ark.* ve *Kawada ve ark.* *in vitro* olarak aljinat yıkım ürünlerinin endotel hücrelerinde VEGF'nin uyarıcı etkisinin arttırdığını göstermişlerdir.^{122,123} Ayrıca sentetik oligosakkaridlerin de civciv koryoallantoik membranında VEGF etkilerinin arttırdığını ve damar stabilizasyonuna katkıda bulunduğu *Mousa ve ark.* tarafından bildirilmiştir.¹²⁴ Bu çalışmada aljinatların, VEGF ile etkileşimi test edilmesi amaçlanmamıştır. Ancak aljinat taşıyıcı sistemler, diğer büyüme faktörlerinin yanında VEGF uygulaması için daha uygundur.

Aljinatlar bilindiği gibi pansuman malzemesi olarak diyabet dahil kronik yara bakımında farklı ticari formlarda pratik kullanımda bulunmaktadır. Bunların bir kısmında ek olarak gümüşün geniş bir yelpazede antimikrobiyal etkilerinden yararlanılmaktadır.^{13,14} Aljinatın jel ve hidrokolloid şeklinde kullanımının hücresel düzeyde etkileri bazı

raştırmaçılarca incelenmiştir. Aljinat çözeltisinin fibroblastlar için bir bariyer etkisi östererek fibrozisi azalttığı gösterilmiştir.¹²⁵ *Ledinek ve ark.* da keratinosit kültürlerinde, alsiyum aljinat içerikli pansuman malzemelerinin toksik etkilerini test etmiş, sonuçta eratinositlerde düşük düzeyde çoğalma baskılanması ve şekilsel bozuklular saptamıştır. 'alışma sonucunda diğer pansuman malzemeleri ile karşılaştırma yapılmış ve aljinatların Bariz toksik risk taşımadığına" karar verilmiştir.¹⁴ *Suzuki ve ark.*¹²⁶ ise domuzlarda aptıkları bir çalışmada, dondurularak kurutulmuş kalsiyum aljinatın fibroblast çoğalması zerine olumsuz etkilerinin olmadığını saptamışlardır. Belirtilen literatür ışığında, VEGF ontrollü salınımı için diğer yöntemler yerine kalsiyum aljinat küreciklerin taşıyıcı olarak ullanılmasına karar verilmiştir.^{11,117}

kut inflamasyon:

VEGF'nin inflamasyonda aldığı rolü *Barleon ve ark.*¹²⁷ makrofaj kemotaksisini uyaran modelinde göstermişlerdir. *Reinders ve ark.*¹²⁸, VEGF ile uyarılmış doğal katil hücrelerin Natural Killer cells-NK) VEGF'nin inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonuna olan etkilerini östermişlerdir. Ayrıca Kim ve ark.¹²⁹ VEGF'nin inflamasyon şiddetinin kontrolü için hayati nem taşıyan ICAM-1 ve VCAM-1 yüzey moleküllerinin sentezini düzenleyen birbirine zıt iki ücre içi haberci sistemini de aktive ettiğini göstermişlerdir. Bu veri; yazarlar tarafından, rtamda mevcut olan inflamatuvar uyaran veya inflamasyonu baskılayan faktörlerin, belirlediği nflamasyon cevabının VEGF tarafından kuvvetlendirildiği şeklinde yorumlanmıştır. Yani 'EGF duruma göre inflamatuvar veya antinflamatuvar etkiler gösterebilmektedir.

*Kirchner ve ark.*¹⁰ yaptıkları çalışmada, VEGF'nin inflamasyonu düzenleyici etkilerine tıfta bulunarak, inflamasyon sonuçlarını değerlendirmiştir. Diyabetik gruplarda, 5. günde kut inflamasyon skorlarını düşük bulmuşlardır. VEGF verilen grupta, akut inflamasyon korunda, VEGF ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptamamışlardır.

*Komesu ve ark.*⁶⁴ da alloksana bağlı diyabet gelişen farelerde yaptıkları çalışmada, .,3. ve 7. günlerde aldıkları histopatolojik örneklerde, mikroskop alanında inflamatuvar hücre ayarak inflamasyon derecesini değerlendirmişler ve diyabetik farelerde inflamasyon fazının aha geç başladığını ve kronik inflamasyon özelliklerinin daha uzun sürme eğiliminde lduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada, *Kirchner ve ark.*¹⁰ ve *Komesu ve ark.*⁶⁴ elde ettiklerin verilerle kısmen yumlu olan akut inflamasyon skorları saptamıştır. Bu çalışmada, *Kirchner ve ark.*¹⁰ dan arklı olarak tüm diyabetik gruplarda değil, sadece DM grubunda inflamasyon skoru düşük

aptanmıştır. DM+VEGF ve DM+ Aljnat gruplarında normal gruba yakın skorlar elde edilmiştir. Buna neden olarak boş aljnat küreciklerin inflamasyonu uyarması görülmüştür. 'ueyo ve ark.,¹³⁰ Robitaille ve ark.¹³¹ ve Otterlei ve ark.¹³² tarafından gösterilen aljnat olisakkaridlerinin proinflamatuvar sitokilerin salınımını arttırmaları özelliğinden ayrılanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca histopatolojik incelemelerde kalsiyum aljnat üreciklere karşı reaksiyon geliştiğinin görülmesi literatürle uyumludur.¹³³

Bu görüşlere karşın, eldeki akut inflamasyon skorlama sonuçları istatistiksel değerlendirme yapılabilmesine olanak tanımamaktadır. Bu nedenle daha geniş serilerde, daha objektif ölçüm yöntemleri ile değerlendirme yapmadan, kesin yorumlar yapılamaz.

Kronik inflamasyon:

Normal yara iyileşmesinde, yaralanma sonrasında erken dönemde ortaya çıkan akut inflamatuvar hücrelerden baskın görünüm, kendiliğinden bir çözülmeye yönelerek yarayı proliferatif evreye yönlendirecek makrofajlara ve lenfositlere yerini bırakmalıdır. Ancak iyabette bu doğal akış bozulmuştur. İnflamatuvar süreçteki bu gecikme ile ilgili olarak yapılan alışmalarda, diyabetik fare modelinde makrofaj kemoatraktan protein-1 (MCP-1) sentezinin 5. günde yapması gereken pikin 5. güne sarktığını göstermişlerdir. Bu bulgu inflamatuvar ürecin gecikmesini açıklamaktadır.⁶⁵

Kirchner ve ark.,¹⁰ genetik olarak diyabetik farelerde VEGF₁₆₅'in kronik inflamasyon üzerine olan etkilerini 5 gün aralar ile alınan örneklerde histopatolojik olarak değerlendirmiştir. Değerlendirme sonucunda, diyabetik olmayan kontrol grubunda kronik inflamasyon skorunun zaman ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir. Diyabetik gruplarda ise 5. günde düşük skor saptadıkları kronik inflamasyonun, 5 gün aralıklarla dalgalanmalar gösterdiğini göstermişlerdir. Yirminci gün sonunda diyabetik gruplarda diyabetik gruplara göre daha düşük skor elde etmişlerdir.

Bu çalışmada, kronik inflamasyon verileri arasında kabaca gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlılık açısından değerlendirilemezse de, diyabetik olmayan grupta belirtilen alışmalar ile uyumlu olarak zamana bağlı bir azalma eğilimi görülmektedir (DM grubunun eğimi $R^2=0,8359$, DM+VEGF grubunun eğimi $R^2=0,3183$ bulunmuştur). Diyabetik gruplarda da, kronik inflamasyon skorlarında zamana bağlı bir azalma görülsede önceki çalışmalarda görülen dalgalı desen izlenmemektedir.^{10, 64} DM+VEGF grubu ile DM grupları arasında istatistiksel değerlendirme yapılamamakla beraber, grupların regresyonları birbirlerinden farklı saptanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen kronik inflamasyon sonuçları, *Kirchner ve ark.*¹⁰ çalışmalarında ulaştığı bulgular, klinik gözlemler ve yukarıda bahsedilen literatürler ile uyumlu görünmektedir. Ancak istatistiksel değerlendirme yapılamamaktadır.

Damarlanma Artışı:

VEGF bilinen en kuvvetli neovaskülarizasyon uyarıcı faktörlerdendir. Anjiyopati ile eşyreden durumlarda kullanımları ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar hızla devam etmektedir. Bu modelde tercih edilen taşıyıcı ile kullanıldığı çalışmalarda damarlanmayı arttırdığı daha önce gösterilmiştir.^{11, 134} *Padubidri*, random flep modelinde,⁸⁷ *Zhang ve ark.* içan venöz flep modelinde⁸⁸, *Takehita ve ark.* iskemik arka bacak modelinde⁸⁶, VEGF'nin damarlanma artışı ile flep yaşamına olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir.

VEGF'nin anjiyogenezi artırıcı etkisi terapötik anjiyogenez mantığıyla kronik yara modellerinde özellikle de diyabetik yaralarda kullanılmıştır. *Galeano ve ark.*⁸ adenovirüs taşıyıcı ile VEGF₁₆₅ gen transferi yaparak diyabetik yaralarda damarlanmanın arttığını göstermişlerdir. *Galiano ve ark.* da topikal sıvı taşıyıcı ile VEGF₁₆₅ uygulaması sonrasında damarlanmanın arttığını ve iyileşmenin hızlandığını göstermiştir. Ayrıca, VEGF'nin kemik büyüme faktörü kaynaklı kök hücrelerin yara bölgesine toplanmasına yol açtığını da göstermişlerdir.⁹ Kök hücrelerin VEGF etkisi ile dolaşıma katılması yeni damar gelişimi ile ilgili terimleri tartışmayı gerektirmektedir. (Şekil 3) VEGF'nin neovaskülarizasyona anjiyogenez mekanizması ile neden olduğu düşünülmekteydi. Ancak *Galiano ve ark.*'in bulguları anjiyogenez kadar askülogenezin de etkili olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, *Galeano ve ark.*⁸, *Galiano ve ark.*⁹, *Kirchner ve ark.*¹⁰, *Breibart ve ark.*¹¹², *Di Peppe ve ark.*¹¹¹, *Nissen ve ark.*¹¹⁴, bildirdikleri verilerle uyumlu olarak VEGF'nin diyabetik yara modelinde mikro damar sayısını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığını göstermektedir.

Epitelizasyon Hızı:

*Galeano ve ark.*⁸, *Galiano ve ark.*⁹, *Kirchner ve ark.*¹⁰, *Breibart ve ark.*¹¹², *Di Peppe ve ark.*¹¹¹, *Nissen ve ark.*¹¹⁴ diyabetik yara modellerinde farklı taşıyıcılarla VEGF kullanmış ve epitelizasyonun hızlandığını göstermişlerdir. VEGF'nin keratinositler üzerine direkt proliferatif etkisi gösterilememiştir.³⁵ Epitelizasyonu hızlandırma etkisi indirekt etki gibi görünmektedir.

Bu çalışmada izlenen epitelizasyon farkı, DM+VEGF grubu ile DM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koymuştur. Literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu

arak VEGF verilen grupta yara, diyabetik VEGF verilmeyen gruba göre daha hızlı kapanmıştır.^{8,9,10,111,112,114}

VEGF'nin epitelizasyonu artırıcı etkisinin mekanizması halen bilinmemektedir. Kök ücre üzerine olan etkileri, damarlanma artırıcı etkisi ve makrofajlar üzerine olan kemotaktik etkilerinin, tek başına veya kümülatif etki ile keratinosit çoğalma ve ilerlemesini hızlandırabileceği düşünülmüştür. Ancak bu çalışmadan elde edilen veriler ve literatür ışığında bu görüş spekülasyon düzeyinde kalmaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Diyabetik yara iyileşmesinde klinik çalışmalar çoğunlukla diyabetik ayak tedavisine odaklanmış olsa da, sistemik hastalık tüm yaraları ve vücudu etkilemektedir. Diyabetik ayak aralarının tedavisinde “Yara yatağının hazırlanması” kavramı aslında fizyolojik sürecinde evam etmesi gereken, fakat sistemik bir bozukluk ve buna bağlı komplikasyonlar nedeniyle olunda gitmeyen eylemlerin tekrar rayına oturtulması için gereken müdahalelerin yapılması anlamında kullanılan bir terimdir. Amaç yaranın zaten kendiliğinden gerçekleştireceği iyileşme” eylemi için en uygun şartları sağlamaktır. Bunun kapsamında, debridman, enfeksiyon kontrolü, kanlanmanın artırılması, yükün azaltılması ve alta yatan deformitelerin üzeltmesi yer almaktadır.⁵⁸

Diyabetik ayak yaralarının önlenmesinde, kesin metabolik kontrol dışında ayak akımının hasta ve yakınlarına öğretilmesi pek çok diğer önlemden daha değerlidir. Bu açıdan “Önleyici Sağlık Hizmetleri” öncelikli bir konudur. Ancak kontrol altında olmayan DM lularında er ya da geç bir cerrahiye bağlı veya travmatik bir yaralanma oluşacaktır. Bu urumda ise “Tedavi Edici Sağlık Hizmeti” de sunmakta olan bizlerin elinde yönetim çenelerimizi artırmaya yönelik deneysel ve klinik çalışmalar büyük bir hızla devam tmektedir.

Çalışmanın kısıtlılıkları arasında, diyabetik ayak ile ilgili tam olarak kabul görmüş bir ayvan modeli olmaması görülmektedir. Diyabetik ayak fizyopatolojisi saf bir “yara oluşumu” dan oldukça uzaktır. Bu çalışma ve diğer diyabetik yara çalışmalarında kullanılan yara ileşmesi modeli, diyabetik ayakla doğrudan doğruya ilişkili değildir. Diyabetik ayak arasında periferik vasküler hastalık mikroanjyopatiye eklenerek hipoksemiye erinleştirmektedir. Burada kullanılan modelde ise mikroanjyopati bulunsa da makrovasküler astalıktan etkenim söz konusu değildir. Yine bu modelde nöropati yara açılması ile ilişkili eğişse de otonom nöropati, bilinen mekanizmalar ile yara iyileşmesini baltalamaktadır. Oysa iyabetik ayakta periferik duysal, motor ve otonom nöropati hem yara açılmasına, hem de ileşmenin gecikmesine neden olmaktadır. Tüm dünyada hayvan modelleri diyabetik ayağa yarlanmaktadır.⁹¹

Ayrıca, diyabetik hayvan modellerinde kullanılan hayvanların yaşları genellikle genç-rişkin yaş ile uyumlu iken, klinikte görülen hastalar ileri yaşıdadır.¹⁰¹ Bu açıdan bu çalışma da ahil olmak üzere, tüm diyabetik yara iyileşmesi modellerinde kliniğe tam olarak ansıtılabilecek kesin bir çıkarım yapmak pek mümkün görünmemektedir.

Deney modeli ile ilgili bu kısıtlılıkların yanısıra, tüm diğer büyüme faktörleri gibi EGF'nin pahalı ve kullanımının soğuk zincire bağımlı olması da kliniğe yansıtılabilecek bir uygulamada dezavantaj olacaktır.

Bu çalışmada, streptozosin ile diyabet uyarılan farelerde, sırt yara modelinde, kalsiyum jinat mikrokürecikler içinde kontrollü salınımı yapılan VEGF'nin, diyabetik yaraların amaranmasını arttırdığı ve yara kapanma süresini kısalttığı gösterilmiştir. Bu çalışma, daha önce diyabetik yara modellerinde kullanılan VEGF'nin uygulama yöntemleri arasında denenmemiş, yara modelinde ilk olarak kullanılan kalsiyum aljinat taşıyıcı ile kontrollü salınım sisteminin etkinliğinin gösterilmesi açısından önemli etkilere sahip olacağı düşünülmüştür. Ayrıca mevcut modelden yeniden düzenlenen bu modelde, VEGF'nin etki mekanizmaları, diğer büyüme faktörlerinin kullanımları da gerçekleştirilebilecektir.

AYNAKLAR

WHO Diabetes Programme, prevalence data, http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index4.html,
rih: 22.10.2006

Cunha BA, "Antibiotic selection for diabetic foot infections: A review", *J Foot Ankle Surg* 2000;39:253-7

Colen LB., "Diabetes and Lower Extremity Reconstruction", editörler Bruce M. Achauer, Elof Eriksson, Craig
ander Kolk, Robert C. Russell, "Plastic Surgery: Indications, Operations, Outcomes", Vol. 1, chapter 33, pp37-
2, Mosby, St Louis, 2000

Brem H., Sheehan P., Rosenberg HJ., "Evidence-Based Protocol for Diabetic Foot Ulcers" *Plast.
econstr.Surg.* 117 (Suppl.): 193S, 2006

S. P. Bennett1, Griffiths, A. M. Schor, "Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers" *British Journal
Surgery* 2003; 90: 133-146

Chan R K., Liu PH., Pietramaggiore G, "Effect of Recombinant Platelet-Derived Growth Factor (Regranex®)
on Wound Closure in Genetically Diabetic Mice" *J Burn Care Res* 2006;27:202-205

Fu X.; Li X., Cheng B, Chen W, Sheng Z, "Engineered growth factors and cutaneous wound healing: Success
and possible questions in the past 10 years" *Wound Rep Reg* 2005;13:122-130

M. Galeano, B. Deodato1, D. Altavilla, et. al., "Adeno-associated viral vector-mediated human vascular
endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic
mouse" *Diabetologia* (2003) 46:546-555

Robert D. Galiano, Oren M. Tepper, Catherine R. Pelo, et.al., "Topical Vascular Endothelial Growth Factor
accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone
Marrow-Derived Cells" *Am J Pathol* 2004, 164:1935-1947

John Loren M. Kirchner, MD, Sharon O Meerbaum, MS, Brian S. Gruber, MD, Andrew K. Knoll, BS, Jeffery
Wulgrin, BS, R.A.J. Taylor, PhD, Steven P. Schmidt, PhD, "Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on
wound closure rates in the genetically diabetic mouse model", *Wound Rep. Reg.* 2003;11:127-131

John Elcin YM., Dixit V., Gitnick G., "Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of vascular
endothelial growth factor: implications for tissue engineering and wound healing", *Artificial Organs*, 2001 25(7):
58-565

John Gu F., Amsden B., Neufeld R., "Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads"
Journal of Controlled Release 96 (2004) 463- 472

John Qin Y. "Silver-containing alginate fibres and dressings". *Int Wound J* 2005;2:172-176

John Paddle-Ledinek JE., Nasa Z., Cleland HJ., "Effect of Different Wound Dressings on Cell Viability and
proliferation" *Plast. Reconstr. Surg.* 117 (Suppl.): 110S, 2006

John Köşlü A. Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi Kitabı/Online, Yara İyileşmesinde Tarihsel Gelişmeler, ,
dermaneturk-Woundcare, http://www.dermaneturk.com/yara_online/tarihsel.doc , tarih: 23.10.2006

John Ronan, Colin A. "Bilim Tarihi: Dünya Kültürlerinde Bilimin Tarihi ve Gelişmesi" TUBİTAK Kitapları, 2003,
Ankara; Orjinalinden çeviri "Science: Its History and Development Among World Cultures" New York, Facts on
file, 1982

- 1 Hippocrates Works, Aphorisms, Translated by Francis Adams, The University of Adelaide Library Electronic Collection, <http://etext.library.adelaide.edu.au/h/hippocrates/h7w/aphorism.html>, tarih 7-11-2004
- 2 Barutcu A., Aydın OE., "Wound Care in Anatolia", EWMA Journal Vol:6, No: 1, Spring 2006, pp 16-17
- 3 SY Tan, "Medicine in Stamps Galen (130-201 AD): History of Most Enduring Medicine", Singapore Med J 2002 Vol 43(3): 116-117
- 4 Rohrich R J., Robinson JB. "Wound Healing", Selected Readings in Plastic Surgery, Vol 9, Number 3, 1999
- 5 İbn-i Sina, "El-Kanun Fit-Tıbb" Çeviren Esin Kahya, Ankara, Atatürk Kültür Merkezi Başkanlığı Yayınları, 1995
- 6 Şerafeddin Sabuncuoğlu, "Mücerreb-name: İlk Türkçe deneysel tıp eseri- 1468", Güncelleştiren Uzel İyveren, Ankara, Atatürk Kültür Merkezi Başkanlığı Yayınları, 1999
- 7 B. George, E.J. Jeffrey, E.A. Christopher "A Brief History of Wound Care"; Plast. Reconstr. Surg. 117, (suppl.): 6S, 2006
- 8 Boulton A. J. M. ,The diabetic foot: from art to science.The 18th Camillo Golgi lecture, Diabetologia (2004) 17:1343–1353
- 9 Mast BA., Cohen IK., "Normal wound healing" editörler Bruce M. Achauer, Elof Eriksson, Craig Vanderpolk, Robert C. Russell, "Plastic Surgery: Indications, Operations, Outcomes", Vol. 1 Capter 5,pp37-52, Mosby, St Louis, 2000
- 10 "Textbook of Medical Physiology" Guyton AC.& Hall JE. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000 (çinâlininden çeviri, Çeviri editörü: Çavuşoğlu H., "Tıbbi Fizyoloji" sayfa 419-422, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001
- 11 Monaco JL, Lawrence WT, Acute wound healing: An overview, Clinics in Plastic Surgery January 2003 (Vol. 3), Issue 1, Pages 1-12) Clinics in plastic surgery 2003 jan
- 12 Dahlback B. "Blood coagulation" Lancet 2000;355:1627-32
- 13 Parslow TG., Bainton DF., "Innate immunity" editörler, Stites DB., Terr AI., Parslow TG., "Medical Immunology"Chap.2: p 25-42, Appelton&Lange, 9. baskı, Stanford
- 14 Inkinen K., "Connective Tissue Formation in Wound Healing An experimental study", presented in the symposium "Richard Faltin" of the Fourth Department of Surgery, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, on September 11th, 2003, at 12 o'clock noon.
- 15 Mitchell RN., Cotran RS., Bölüm 3 "Onarım: hücre rejenerasyonu, fibrosis ve yara iyileşmesi" sayfa 47-60, çeviri editörü: Çevikbaş U., Kumar V., Cotran RS., Robbins SL., "Basic Pathology" 6th edition, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2000
- 16 Simons M., "Angiogenesis Where Do We Stand Now?", Circulation 2005;111:1556-1566
- 17 Konukoğlu D, Turhan S. M. "Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezini". errahpaşa J Med 2005; 36: 42-48.
- 18 Witte MB, Barbul A. "Wound Healing: General principles of wound healing", Surg Clin N Am 1997;77:509-518
- 19 Ferrara N, "Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress", Endocrine Reviews 2004; 25: 581–611, 2004
- 20 D.C. Felmeden, A.D. Blann, G.Y.H. Lip, "Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease", European Heart Journal (2003) 24, 586–603

- 7 Folkman J, D'Amore PA. "Blood vessel formation: what is its molecular basis?" *Cell* 1996;87:1153–5.
- 8 Hanahan D. "Signalling vascular morphogenesis and maintenance." *Science* 1997;48–50.
- 9 Crawford JM. "Pancreas" sayfa 557-575, Çeviri editörü: Çevikbaş U., Kumar V., Cotran RS., Robbins SL., *Basic Pathology* 6th edition, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2000
- 10 Yonekura H., Yamamoto Y., Sakurai S., Watanabe T., Yamamoto H., "Roles of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Diabetes-Induced Vascular Injury", *J Pharmacol Sci* 97, 305 – 311 (2005)
- 11 V. Jakuš, N. Rietbrock, "Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications" *Physiol. Res.* 53: 131-142, 2004
- 12 Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrad S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern M, Schmidt AM., Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 2001, 159:513–525
- 13 Pierce GF., Inflammation in Nonhealing Diabetic Wounds, The Space-Time Continuum Does Matter, *Am J Pathol.* August 2001, Vol. 159, No. 2
- 14 Satish K. Srivastava, Kota V. Ramana, Aruni Bhatnagar, "Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options" *Endocrine Reviews* 26(3):380–392
- 15 Nilgün Altan, Aylin Sepici Dinçel, Cemile Koca, "Diabetes Mellitus and Oxidative Stress", *Turk J Biochem* 2006; 31 (2); 51–56.
- 16 Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int* 2000;58(suppl 77):S26-S30.
- 17 Bursel SE, King GL. Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:169-182.
- 18 Koya D, King GL. "Protein kinase C activation and the development of diabetic complications." *Diabetes* 1998;47:859-866.
- 19 Sayeski PP, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- α gene transcription. *J Biol Chem* 1996;271:15237-43.
- 20 Hawkins M, Bazilai N, Liu R, et al. Role of glucosamine pathway in fat induced insulin resistance. *J Clin Invest* 1997;99:2173-2182.
- 21 Hart GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* 1997;66:315-335
- 22 Brownlee M, Aiello LP, Friedman E, Vinik AI, Nesto RW, Boulton AJM. "Complications of diabetes mellitus. IN: PR Larsen, HM Kronenberg, S Melmed, KS Polonsky (Eds), *Williams Textbook of Endocrinology*, J. B. Saunders, Philadelphia, 2003:1510-1522
- 23 Knight RJ, Koefoed KF, Schelbert HR, Buxton DB., Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in post-ischaemic myocardium.. *Cardiovasc Res* 1996;32(6):1016-1023
- 24 Korshunov SS., Skulachev VP., Starkov AA., High protonic potential actuates a mechanism of production of active oxygen species in mitochondria.. *FEBS Lett* 1997 Oct 13;416(1):15-8.
- 25 Manna SK, Zhang HJ, Yan T, et al. Overexpression manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor- κ B and activated protein-1. *J Biol Chem* 1998;273:13245-13254

-
- 5 Greenhalgh DG, "Wound healing and diabetes mellitus", *Clin Plas Surg* 30 (2003) 37-45
7. Dinh TL, Veves A, "A Review of the Mechanisms Implicated in the Pathogenesis of the Diabetic Foot" *Lower Extremity Wounds* 4(3);2005 pp. 154-159
- 3 Jeffcoate WJ., Price P., Harding KG., "Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers", *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20(Suppl 1): S78-S89.
- 9 Aina VH Greig, Stuart E James, Angus D McGrouther, Giorgio Terenghi and Geoffrey Burnstock. "β-adrenergic receptor expression in the regenerating epidermis in a rat model of normal and delayed wound healing." *Exp Dermatol* 2003; 12: 860-871
- 10 H. Resmi, Ç. Pekçetin, G. Güner, Erythrocyte membrane and cytoskeletal protein glycation and oxidation in short-term diabetic rabbits, *Clin Exp Med* (2001) 1:187-193
- 11 Vinik AI, Erbas T, Park TS, Stansberry KB, Scanelli JA, Pittenger G., Dermal neurovascular dysfunction in type 2 diabetes., *Diabetes Care* 24:1468-1475, 2001
- 12 Holmberg A, Sandhagen B, Bergqvist D, Hemorrhologic variables in critical limb ischemia before and after infringuinal reconstruction., *J Vasc Surg.* 2000 Apr;31(4):691-5.
- 13 Park JE., Barbul A., Understanding the role of immune regulation in wound healing *The American Journal of Surgery* 187 (Suppl to May 2004) 11S-16S
- 14 Komesu MC., Tanga MB., Buttros KR., Nakao C., Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing, *Pathophysiology* 11 (2004) 63-67
- 15 Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. "Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair." *J Invest Dermatol* 2000;115:245-53.
- 16 Helen V. Waugh, Jonathan A. Sherratt, "Macrophage Dynamics in Diabetic Wound Healing", *Bulletin of Mathematical Biology* (2006) 68: 197-207
- 17 Wall SJ, Sampson MJ, Levell N, Murphy G. "Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts". *Br J Dermatol* 2003;149:13-6.
- 18 Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster AVM, Philpott-Howard J, Edmonds E (1997) Randomised placebo- controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet* 350: 855-859
- 19 Yonem A, Cakir B, Guler S, Azal O, Corakci A (2001) Effect of granulocyte-colony stimulating factor in the treatment of diabetic foot infection. *Diabetes Obes Metab* 3: 332-337
- 20 T. Kastenbauer, B. Hornlein, G. Sokol, K. Irsigler, Evaluation of granulocyte-colony stimulating factor (filgrastim) in infected diabetic foot ulcers, *Diabetologia* (2003) 46:27-30
- 21 Lerman OZ., Galiano RD., Armour M. et. al., "Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast Impairment in Migration, Vascular Endothelial Growth Factor, Production, and Response to Hypoxia", *Am J Pathol* 2003, 162:303-312
- 22 Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. "Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and nondiabetic patients." *Diabetologia* 2002;45:1011-6.
- 23 Medina A., Scott PG., Ghahary A., Tredget EE., "Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds" *Journal of Burn Care & Rehabilitation* Volume 26, Number 4, pp:306-319

- 1 Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing." *J Biol Chem* 1995, 270:12607-12613
- 2 Terashi H., Izumi K., Devenci M. et al., "High glucose inhibits human epidermal keratinocyte proliferation for cellular studies on diabetes mellitus" *Int Wound J* 2005;2:298-304.
- 3 Morita K., Urabe K., Moroi Y. et al., "Migration of keratinocytes is impaired on glycosylated collagen I" *Wound Rep Reg* 2005;13:93-101
- 4 Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing." *J Biol Chem* 1995, 270:12607-12613
- 5 Terashi H., Izumi K., Devenci M. et al., "High glucose inhibits human epidermal keratinocyte proliferation for cellular studies on diabetes mellitus" *Int Wound J* 2005;2:298-304.
- 6 Morita K., Urabe K., Moroi Y. et al., "Migration of keratinocytes is impaired on glycosylated collagen I" *Wound Rep Reg* 2005;13:93-101
- 7 G.S. Ashcroft, T. Greenwell-Wild, M.A. Horan, S.M. Wahl, M.W. Ferguson, Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response, *Am J Pathol* **155** (1999), pp. 1137-1146
- 8 D.J. Margolis, J. Knauss and W. Bilker, Hormone replacement therapy and prevention of pressure ulcers and venous leg ulcers, *Lancet* 23 (2002), pp. 675-677
- 9 Hoeben A., Landuyt B., Hightley Ms., Wildiers H., et al., "Vascular Endothelial Growth Factor and angiogenesis" *Pharmacol Rev* 56:549-580, 2004
- 10 Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. "Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3." *Circulation* 93: 1493, 1996.
- 11 Byrne AM., D.J. Bouchier-Hayes, J.H. Harmey, "Angiogenic And Cell Survival Functions Of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)", *J. Cell. Mol. Med.* Vol 9, No 4, 2005 pp. 777-794
- 12 Ramanathan M, Giladi A, Leibovich S.J. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Murine Macrophages by Nitric Oxide and Hypoxia *Exp Biol Med* 228:697-705, 2003
- 13 Takeshita S, Zheng LP, Brogi E et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularisation in a rabbit ischemic hindlimb model, *J. Clin Invest* 103(2):662-70.1994
- 14 Padubidri A, Brown E Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random tension of axial pattern skin flaps in rats, *Ann Plast Surg* 37(6):604-11.1996
- 15 Zhang F., Brooks, D., Chen, W., et al., Improvement of Venous Flap Survival by Application of Vascular Endothelial Growth Factor in a Rat Model, *Ann Plast Surg* 2006;56: 670-673
- 16 Isner JM., Walsh K., Symes JF., et al., Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease, *Hum Gene Ther* 20;7(8):959-99.1996
- 17 Dresner LS., Wang SP., West MW., Ponomarenko IN., Mueller CM., Wait RB., "Nitric Oxide Inhibition Inhibits the Enhancement of $\alpha 1$ Agonist-Induced Vasoconstriction in Diabetes" *Journal Of Surgical Research: Vol. 70, NO. 2, July 1, 1997*

- Gottrup F., Agren MS., Karlsmark T., Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue, *Wound Rep Reg* 2000, 8:83-96
- 2 S. Mutalik, M. Chetana, B. Sulochana, P. Uma Devi And N. Udupa, "Effect Of Dianex, A Herbal Formulation n Experimentally Induced Diabetes Mellitus" *Phytother. Res.* 19, 409–415 (2005)
- 3 Pfaffman MA, Ball CR, Darby A And Hilman R. "Insulin Reversal Of Diabetes- Induced Inhibition Of ascular Contractility In The Rat." *Am. J. Physiol.* 242: H490- H495, 1982.
- 4 Hayashi K., Kojima R., Ito M., "Strain Differences in the Diabetogenic Activity of Streptozotocin in Mice" *iol. Pharm. Bull.* 29(6) 1110—1119 (2006)
- 5 Emanuelli C., Salis MB., Pinna A, Stacca T, Milia AF., Spano A., Chao J, Chao L., Sciola L., Madeddu P., "Prevention of Diabetes-Induced microangiopathy by Human Tissue Kallikrein Gene Transfer" *Circulation.* 102;106:993-999.)
- 5 Van Dam B., Demirci Cihan, Reitsma HJ., et al. "Arteriolar changes in nitric oxide activity and sensitivity during the course of streptozotocin-induced diabetes" *Eur. J. Pharmacol.* 455 (2002) 43–51
- 7 Robert D. Galiano, MD; Joseph Michaels, V, MD; Michael Dobryansky, MD; Jamie P. Levine, MD; Geoffrey Gurtner, MD, "Quantitative And Reproducible Murine Model Of Excisional Wound Healing", *Wound Rep. Reg.* 2004;12:485–492
- 8 Riley CM, Fuegy PW, Firpo MA, Shu XZ, Prestwich GD, Peattie RA., Stimulation of in vivo angiogenesis using dual growth factor-loaded crosslinked glycosaminoglycan hydrogels, 2006 Dec;27(35):5935-43. *Epub* 2006 Sep 6
- 9 Turley H., Scott P. A. E., Watts V M., Expression Of VEGF In Routinely Fixed Material Using A New Monoclonal Antibody VG1J. *Pathol.* 186: 313–318 (1998)
- 10 A. Girach, D. Manner, M. Porta "Diabetic microvascular complications: can patients at risk be identified? A review", *Int J Clin Pract*, November 2006, 60, 11, 1471–1483
- 11 Goldberg JJ., Dansky HM. Diabetic Vascular Disease An Experimental Objective, *Arterioscler Thromb Vasciol.* 2006;26:1693-1701.
- 12 Steed DL. "Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers." *J Vasc Surg* 1995; 21: 71–81.
- 13 Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (Beclapernin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomised placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care* 1998; 21: 822–827.
- 14 Wieman TJ. Clinical efficacy of beclapernin (rhPDGF-BB) gel. *Am J Surg* 1998; 176(Suppl 2A): 74S–79S.
- 15 Richard JL, Parer-Richard C, Daures JP, Clouet S, Vannereau D, Bringer J et al. Effect of topical basic fibroblast growth factor on the healing of chronic diabetic neuropathic ulcer of the foot. *Diabetes Care* 1995; 18: 4–69.
- 16 Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster AV, Philpott-Howard J, Edmonds ME. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet* 1997; 350: 855–859.
- 17 De Lalla F, Pellizzer G, Strazzabosco M, Martini Z, Du, Jardin G, Lora L et al. "Randomised prospective controlled trial of recombinant granulocyte colony-stimulating factor as adjunctive therapy for limb-threatening diabetic foot infection." *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1094–1098

- 08 Holloway GA, Steed DL, DeMarco MJ. A randomised controlled dose response trial of activated platelet pernanatant topical CT-102 (APST) in chronic non-healing wounds in patients with diabetes mellitus. *Wounds* 1993; 5:198–206.
- 09 Steed DL, Goslen JB, Holloway GA, Malone JM, Bunt TJ, Webster MW. CT-102 activated platelet pernanatant, topical versus placebo: a randomised prospective double blind trial in healing of chronic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 1992; 15: 1598–1604.
- ³ Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D et al. (2001) Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis. *Diabetes* 50:667–674
- 11 Romano Di Peppe S, Mangoni A, Zambruno G, Spinetti G, Melillo G, Napolitano M, and Capogrossi MC. Adenovirus-mediated VEGF(165) gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice.” *Gene Ther* 9: 1271–1277, 2002
- 12 Breitbart AS, Grande DA, Laser J, Barcia M, Porti D, Malhotra S, Kogon A, Grant RT, AND Mason JM. Treatment of ischemic wounds using cultured dermal fibroblasts transduced retrovirally with PDGF-B and EGF121 genes.” *Ann Plast Surg* 46: 555–561, 2001
- 13 Tsou R, Fathe C, Wilson L, Wallace K, Gibran N, And Isik F. “Retroviral delivery of dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor type 2 to murine wounds inhibits wound angiogenesis.” *Wound Repair Regen* 10: 222–229, 2002.
- 14 Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, Dipietro LA. “Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing.” *Am J Pathol* 152: 1445–1452, 1998.
- 15 Franckx JJ., Yao F., Petrie N., et al., “In vivo gene delivery of Ad-VEGF121 to full-thickness wounds in aged pigs results in high levels of VEGF expression but not in accelerated healing” *Wound Rep Reg* 2005;13:51–59
- 16 Patel ZS., Mikos AG., “Angiogenesis with biomaterial-based drug- and cell-delivery systems” *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 15, No. 6, pp. 701–726 (2004)
- 17 Elçin YM., Dixirt V., Gitnick G.” Controlled release of endothelial cell growth factor from chitosan-albumin microspheres for localized angiogenesis: In vitro and In vivo studies”, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1996; 24:257-71
- 18 Ozawa C.R., Banfi A., Glazer N.L., et.al., Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis, *J. Clin. Invest.* 113:516–527 (2004)
- 19 Trentin D., Hall H., Wechsler S., Hubbell J.A., Peptide-matrix-mediated gene transfer of an oxygen-sensitive hypoxia-inducible factor-1_v variant for local induction of angiogenesis *PNAS* 2006;103:2506-2511;
- 20 N. Ferrara, W.J. Henzel, Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161 (1989) 851– 858.
- 21 Brown LF, Yeo KT, Berse B, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992;176(5):1375-9.
- 22 Peters MC, Isenberg BC, Rowley JA, Mooney DJ (1998) Release from alginate enhances the biological activity of vascular endothelial growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* 9 :1267–1278

-
- 23 A. Kawada · N. Hiura · S. Tajima · H. Takahara, "Alginate oligosaccharides stimulate VEGF-mediated growth and migration of human endothelial cells", *Arch Dermatol Res* (1999) 291 :542–547
- 24 S. A. Mousa, X. Feng, J. Xie, Y. Du, Y. Hua, H. He, L. O'Connor, R. J. Linhardt, "Synthetic oligosaccharide Stimulates and Stabilizes Angiogenesis: Structure–Function Relationships and Potential Mechanisms", *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:6–13
- 25 Nagakura T., Hirata H., Tsujii M., et al. "Effect of Viscous Injectable Pure Alginate Sol on Cultured Fibroblasts" *Plast. Reconstr. Surg.* 116: 831, 2005
- 26 Suzuki Y., Nishimura Y., Tanihara M., Evaluation of a novel alginate gel dressing: Cytotoxicity to fibroblasts in vitro and foreign-body reaction in pig skin in vivo, *J Biomed Mater Res*, 39, 317–322, 1998.
- 27 Barleon B, Sozzani S., Zhou D, A. Weich Herbert., Alberto Mantovani, and Dieter Marme, Migration of human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is Mediated via the VEGF receptor flt-1, *Blood*, Vol 87, No 8 (April 15), 1996: pp 3336-334
- 28 Reinders M. E.J., Sho M., Izawa A, et al., Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in autoimmunity, *J. Clin. Invest.* 112:1655–1665 (2003)
- 29 Kim I., Moon S., Kim S.H., et.al., Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear factor- κ B Activation in Endothelial Cells, *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;276(10):7614-20.
- 30 Pueyo ME, Darquy S, Capron F, Reach G. In vitro activation of human macrophages by alginate-polylysine microcapsules, *J Biomater Sci Polym Ed.* 1993;5(3):197-203.
- 31 Otterlei M, Ostgaard K, Skjak-Braek G, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Espevik T., Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J Immunother.* 1991 Aug;10(4):286-9
- 32 Robitaille R., Dusseault J., Henley N., Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate–poly-L-lysine microcapsules, *Biomaterials* 26 (2005) 4119–412
- 33 Suzuki Y, Nishimura Y, Tanihara M, Evaluation of a novel alginate gel dressing: Cytotoxicity to fibroblasts in vitro and foreign-body reaction in pig skin in vivo, *J Biomed Mater Res*, 39, 317–322, 1998.
- 34 Richardson TP., Peters MC., Ennett AB., Mooney DJ., Polymeric system for dual growth factor delivery, *Nature Biotechnology* • Vol 19, 1029-34, • November 2001