



**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DİYABETİK RATLARIN DOKU KAYIPLI YARALARINDA
FARKLI SÜRELERDE SOĞUK ATMOSFERİK PLAZMA/NO
GAZI UYGULAMASININ İYİLEŞMEYE OLAN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Görkem TATLİCİOĞLU

Lefkoşa

Haziran, 2023

**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DİYABETİK RATLARIN DOKU KAYIPLI YARALARINDA FARKLI
SÜRELERDE SOĞUK ATMOSFERİK PLAZMA/NO GAZI
UYGULAMASININ İYİLEŞMEYE OLAN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Görkem TATLICIOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Fatma Eser ÖZGENCİL

Eş Danışman

Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA

Lefkoşa

Haziran, 2023

Onay

Görkem Tatlıcıoğlu tarafından hazırlanan ‘Diyabetik Ratların Doku Kayıplı Yaralarında Farklı Sürelerde Soğuk Atmosferik Plazma/NO Gazı Uygulamasının İyileşmeye Olan Etkisi’ Başlıklı Tez, Kapsam Ve Nitelik Açısından Kalite Standartlarına Uygunluğu İle İlgili Cerrahi Anabilim Doktora Tezi olarak 23/06/2023 tarihinde kabul edilmiştir. Tez savunması yüz yüze ve online (çevrim içi) yapılmıştır. Jüri üyeleri onaylarını sözlü olarak vermişlerdir. Tüm süreç kaydedilmiştir.

Jüri Üyeleri	Adı – Soyadı	İmza
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Zülfikar SARITAŞ
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA
Jüri Üyesi:	Yard. Doç. Dr. Mehmet Ege İNCE
Danışman:	Prof. Dr. Farma Eser ÖZGENCİL

Anabilim/ ~~Anasanat~~ Dalı Başkanı Onayı

23/06/2023

Ünvan, Ad-Soyad

Anabilim/~~Anasanat~~ Dalı Başkanı

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

...../04/2023

Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer

Enstitü Müdürü



Etik İlkelere Uygunluk Beyanı

Bu tezin içinde sunduğum verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi; tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu; çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallar gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Görkem TATLICIOĞLU

23/06/2023

Teşekkür

Tez çalışmamın ilk gününden son gününe kadar kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, ben ve tüm asistan arkadaşlarımın tabiri caizse, arkasında dağ gibi duran değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Fatma Eser Özgencil'e, eş danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Alper Çetinkaya'ya ve sonsuz destekleri için ailem Alev Tatlıcıoğlu ve Gölgeın Tatlıcıoğlu'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamı kaybettiğim babam Birol Tatlıcıoğlu'na armağan ederim.

Saygılarımı sunarım.

Görkem Tatlıcıoğlu

Özet

Diyabetik ratların doku kayıplı yaralarında farklı sürelerde soğuk atmosferik plazma/NO gazı uygulamasının iyileşmeye olan etkisi

Tatlıcıoğlu, Görkem

Doktora, Cerrahi Anabilim Dalı

Haziran 2023, 84 Sayfa

Son dönemlerde, iyileşmenin durduğu diyabetik yara tedavisinde öne çıkan uygulama soğuk atmosferik plazma/nitrik oksit (CAP/NO) gazı uygulamalarıdır. Bu çalışmada diyabetik ratlarda NO gazının 60 ve 120 sn uygulamasının yara iyileşmesine olan etkileri eşit standartlar altında değerlendirildi. Çalışmada toplam 15 adet diyabetik rat, sırt bölgesinde 3 cm çapında eksizyonel yara oluşturularak 3 gruba ayrıldı. Diyabetli kontrol grubuna uygulama yapılmadı. İkinci gruba 60, 3. gruba ise 120 sn günde 1 kez, 200 ppm dozda NO gazı uygulandı. Yaraların 0. 3. 7. 11. ve 14. Günlerde yara alanı küçülmesi ile 0. ve 14. Günler arasında yara kontraksiyon hızı hesaplandı. 14. Gün sonunda alınan dokulardan; inflamasyon, epitel rejenerasyonu, anjiyogenezis-konjesyon ve kollajen lif organizasyonuna göre histolojik değerlendirme yapıldı. Grupların normal dağılıp dağılmadığının belirlenmesinde; Shapiro-Wilk Testi, tüm grupların kendi arasında karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Test (NPar Test) ile Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA) testi kullanıldı. NO uygulanan her iki grupta da tedavinin 7. Gününden 14. Gününe kadar kontrol grubuna göre yara bölgesindeki küçülme anlamlı bulundu ($p<0.05$). Yara kontraksiyon hızı açısından kontrol grubuna göre NO 60 ve NO 120 sn grupları sırasıyla anlamlı bulundu ($p=0.033$, $p=0.049$). Kontrol grubu ile karşılaştırmada NO gruplarının inflamatuvar hücre ($p<0.05$), kollajen organizasyonu sırası ile NO 60 ve NO 120 gruplarında ($p<0.05$, $p<0.01$) anlamlı

bulundu. Kollajen organizasyonu değerlendirilmesinde; sırası ile kontrol grubu ile NO 60 grubu arasında ve kontrol grubu ve NO 120 grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$, $p<0.01$). Epitelizasyon değerlendirmesinde ise kontrol grubu ile NO uygulanan gruplar arasında önemli fark bulundu ($p<0.01$). Diyabetik yaralarda hem 60 sn hem de 120 sn süre ile günde bir kez NO uygulamaları iyileşmeye eşit ve önemli katkı sağladı.

Anahtar kelimeler: Soğuk atmosferik plazma; diyabetik yara iyileşmesi, nitrik oksit; rat

Abstract

Effect of Cold Atmospheric Plasma/NO Gas Application with Different Exposure Times on Healing in Wounds with Tissue Loss in Diabetic Rats

Tatlıcioğlu, Görkem

PhD, Department of Surgery

June 2023, 84 Pages

Applications of Cold Atmospheric Plasma/Nitric Oxide (CAP/NO) gas have recently garnered popularity when treating impaired wound healing in patients with diabetes. Herein, we aimed to investigate the effects of NO gas application for 60 and 120 s on wound healing in diabetic rats. A dorsal excision—3 cm in diameter—was performed in the 15 diabetic rats; these rats were categorized into the following 3 groups: DC (untreated diabetic control); DNO/60 (exposure to 200 ppm NO gas for 60 s/day); and DNO/120 (exposure to 200 ppm NO gas for 120 s/day).

Wound area shrinkage on days 0, 3, 7, 11 and 14, and wound contraction rate between days 0 and 14 were calculated. On day 14, tissue samples were collected for histopathologic assessment based on inflammation, epithelial regeneration, angiogenesis congestion, and collagen fiber organization. Normality of distribution was assessed using the Shapiro–Wilk Test, and intergroup comparisons were performed using the Mann–Whitney U Test (NPar Test) and Kruskal–Wallis (non-parametric ANOVA). Wound contraction during treatment days 7–14 was significantly greater in the NO-treatment groups than in the DC group ($p < 0.05$). The NO60 s and NO120 s groups showed a significantly higher wound contraction rate than the DC group ($p = 0.033$, $p = 0.049$, respectively). Significant differences were noted between the control and NO groups in terms of inflammation ($p < 0.05$) and between the control group and DNO/60 and DNO/120 groups in terms of collagen

organization ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively). Evaluation of epithelialization revealed significant intergroup differences between the control and NO treatment groups ($p < 0.01$). The contribution of NO application for 60 s and 120 s per day was equal and significant toward healing in diabetic wounds.

Key words: CAP; diabetic wound healing; nitric oxide; rat

İÇİNDEKİLER

Onay	i
Etik İlkeler Uyumluk Beyanı	ii
Teşekkür	iii
Özet	iv
Abstract	vi
Tablolar	xi
Şekiller	xi
Kısaltmalar	xii
BÖLÜM I	1
Giriş	1
BÖLÜM II	4
Kavramsal Temeller/Kuramsal Temeller ve İlgili Araştırmalar	4
1. Derinin Anatomik Yapısı	4
2. Yaranın Tanımı ve Yara İyileşmesi	7
2.1 Hemostaz ve İnflamatuar Faz	8
2.2. Proliferatif Faz.....	9
2.2.1 Fiprolazi ve Kollajen Birikimi	9
2.2.2 Anjiyogenezis	10
2.2.3 Epitelizasyon	10
2.2.4 Ekstrasellüler Matriks Sentezi.....	11
2.3. Olgunlaşma ve Yeniden Yapılanma Fazı.....	11
3. Yara İyileşme Tipleri	13
3.1. Primer İyileşme	13
3.2 Sekonder İyileşme.....	13
3.3 Tersiyer İyileşme	13
4. Deri Yaralarının Sınıflandırılması	15
4.1. Kapalı Yaralar	15
4.2. Açık Yaralar	15
4.3. Akut Yaralar	15

4.4 Kronik Yaralar.....	16
4.4.1 Kronik Yara Tipleri.....	17
5. Diyabet, Diyabet Modeli ve Diyabette Bozulmuş Yara İyileşmesi.....	19
5.1. Diyabetik Yara İyileşmesinde Güncel Yaklaşımlar	23
5.1.1. Topikal Jel Bazlı Biyomateryaller.....	24
5.1.2. Mezenkimal Kök Hücre ve Eksozom Uygulamaları	26
5.1.3. Büyüme Faktörlerinin Kullanımı	27
5.1.4. Topikal İnsülin Tedavisi	28
5.1.5. Trombositten Zengin Plazma (PRP) ve Trombositten Zengin Jel Uygulamaları	29
5.1.6. Hiperbarik Oksijen Tedavisi	29
5.1.7. Elektrik Stimulasyonu	29
5.1.8. Düşük Frekanslı Ultrason	30
5.1.9. Ekstrakorporeal Şok Dalga Tedavisi (ESWT).....	30
5.1.10. Topikal Ozon Tedavisi	30
6. Nitrik Oksit (NO), Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi ve NO Kaynakları	33
6.1. Yara İyileşmesinde Soğuk Atmosferik Plazma /NO Uygulamaları.....	34
<i>BÖLÜM III</i>	<i>39</i>
<i>Gereç ve Yöntem.....</i>	<i>39</i>
1. Hayvan Materyali ve Etik Kurul Beyanı.....	39
2. Diyabet Modeli	39
3. Anestezi ve Yara Modeli	39
4. Soğuk Atmosferik Plazma (SAP/NO) Uygulamaları.....	40
5. Yara Alanı Küçülmesi ve Yara Kontraksiyon Hızı Hesaplama.....	41
6. Histolojik İncelemeler.....	41
7. İstatistiksel Analizler	43
<i>BÖLÜM IV.....</i>	<i>44</i>
<i>Bulgular.....</i>	<i>44</i>
1. Klinik Makroskopik Bulgular	44
2. Histolojik Bulgular	46

BÖLÜM V	49
<i>Tartışma</i>	49
BÖLÜM VI	53
<i>Sonuç ve Öneriler</i>	53
KAYNAKÇA	55
EKLER	64
Ek 1. Etik Kurul Onayı	64
Ek 2. İntihal Raporu	65
ÖZGEÇMİŞ	68

Tablolar

Tablo 1. Akut ve Kronik/Diyabetik Yara İyileşmesi Farklılıkları.

Tablo 2. İnflamasyon, Anjiyogenezis, Fibroblast Aktivasyonu ve Epitel Rejenerasyonu Kriterleri.

Tablo 3. G1, G2 ve G3'ün İnflamatuvar Hücre, Anjiyogenezis, Kollajen Organizasyonu ve Epitelizasyon Yönünden İstatistiksel Değerlendirilmesi.

Şekiller

Şekil 1: Derinin Anatomik Yapısı.

Şekil 2: Kedi, Köpek ve İnsanda Kutanöz Dolaşım.

Şekil 3: Yara İyileşme Sürecinin 4 Farklı Aşaması.

Şekil 4: Primer iyileşme (A). Sekonder iyileşme.(B). Tersiyer iyileşme (C).

Şekil 5: Akut ve Kronik Yara Arasındaki Farklar.

Şekil 6: Akut ve Diyabetik Yara İyileşmesi Arasında Farklılıklar.

Şekil 7: Üç cm Çapında Eksizyonel Yara Oluşumu.

Şekil 8: CAP/NO Cihazı (A) ve NO Gazı Uygulaması (B).

Şekil 9: Klinik Gözlemlere Göre Gruplar Arasında Yara Alanı Küçülme Oranları.

Şekil 10: Çalışma Grubundaki Yara Yüzey Alanı Küçülmesi (A) ve Kontraksiyon Hızı (B) Farklılıkları.

Şekil 11: Kontrol ve NO Uygulanan Deneklerde İnflamasyon, Kollajen Organizasyonu ve Epitelizasyonun Değerlendirilmesi.

Kısaltmalar

ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
AGE	İleri glikasyon son ürünleri
AT1R	Anjiyotensin tip I reseptörü
AT2R	Anjiyotensin tip II reseptörü
AVA	Arteriyovenöz anastomoz
CAP	Cold Atmospheric Plasma
DAÜ	Diyabetik Ayak Ülseri
Dİ	Diyabetik İnsulin Grup
DM	Diyabetes Mellitus
DNO	Diyabetik Nitrik Oksit Grup
DPN	Diyabetik Periferik Nöropati
ECM	Ekstra Sellüler Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EDHF	Endotelyal Kökenli Hiperpolarize Edici Faktör
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
HBOT	Hiperbarik Oksijen Tedavisi
G	Grup
İL	İnterlökin
İL-1	İnterlökin-1
İL-1β	İnterlökin-1 β
İL-6	İnterlökin-6
İL-8	İnterlökin-8
ip	İntraperitoneal
İP-10	İndüklenebilir Protein
iv	İntravenöz
MDP	Multidomain Peptit Hidrojel
MMP	Matriks Metalloproteinaz
ml	Mililitre

NO	Nitirik Oksit
NOS	Nitirik Oksit Sentaz
NOS1	Nöronal NOS (nNOS)
NOS2	İndüklenebilen NOS (iNOS)
NOS3	Endoteliyal NOS (eNOS)
NPH	Nötral Protamine Hagedorn
O⁻²	Oksit iyonu
PAD	Periferik Arter Hastalığı
PC	Panniculus Carnosus
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen Glikol
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktid-ko-glikolit
PRP	Trombositten Zengin Plazma
PU	Poliüretan
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SAP	Soğuk Atmosferik Plazma
STZ	Streptozosin
T2DM	Tip II Diyabetes Mellitus
TGF	Transforming Büyüme Faktörü
TGF-β1	Transforming Büyüme Faktörü -β1
TGF-β2	Transforming Büyüme Faktörü -β2
TGF-β3	Transforming Büyüme Faktörü -β3
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü- α
VEGF	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü

BÖLÜM I

Giriş

Diyabetik yaralar, normal yara iyileşme aşamalarının her döneminin sekteye uğradığı kronik yaralardır ve önemli bir klinik sorun olarak karşımıza çıkar. Hayvan ve insan odaklı çalışmalarından ortaya çıkan kanıtlar, insan ve laboratuvar hayvanlarında diyabetik yaraların diyabetik olmayan yaralara kıyasla daha düzensiz bir inflamatuvar yanıtta ve azalmış neovaskülarizasyona sahip olduğunu göstermiştir. Yara iyileşmesinin her aşamasının bozulduğu bu yaralarda hiperglisemik ortam biyofilim oluşumunu da teşvik eder.

Son dönemlerde nitrik oksit (NO)'in bu tip yaraların onarımında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. NO'nun yara onarımı üzerindeki yararlı etkileri; anjiyogenez, kronik inflamasyonun inhibisyonu, hücre proliferasyonu, matriks birikimi ve yeniden şekillenme üzerindeki fonksiyonel etkilerine bağlanmıştır. Diyabetik yaralarda da genellikle patolojik bir enflamasyon söz konusu olup enfeksiyon ve hipoksi ile beraber iyileşme gecikir. NO bu anlamda da inflamatuvar yanıt, hücre proliferasyonu, kollajen oluşumu, antimikrobiyal etki ve anjiyogenezis dahil olmak üzere diyabet yaralarının iyileşme süreçlerinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar.

NO'nun yara iyileşmesindeki önemi, NO bazlı yara iyileştirme terapilerine odaklanılmasına neden olmuştur. Bu anlamda hem diyabetik yaralarda eksojen NO gazı uygulaması hem de uzun süreli NO sağlayan kitosan hidrojellerin ve polimerik nanopartiküllerin yara yatağına yerleştirilmesi ile ilgili çalışmalar yara iyileşmesini hızlandırmak için güncel uygulamalar arasında yer almış ve farmasötik bir ajan olarak yara iyileşmesinde son yıllarda önem kazanmıştır.

NO gazının 160 ppm üzerindeki konsantrasyonlarında güçlü antimikrobiyal etki gözlenmiş, daha düşük konsantrasyonlarda ise doza bağımlı olarak kısmi

bakterisidal ve bakteriostatik aktivite izlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak, bakterisidal etki için minimum NO dozu 200 ppm olarak bildirilmiş ve 200 ppm NO gazına yaralı ortamın uzun süre maruziyetinin antimikrobiyal olduğu belirtilmiştir.

Çalışmada kullanılan soğuk atmosferik plazma (SAP) cihazı (Inosante Medical Inc/Türkiye) NO (nitrojen monoksit) üretir ve NO hem bireysel hücreler hem de tüm vücudun fizyolojik ve metabolik süreçlerini regüle eder. Hücre membranından yüksek oranda geçebilme kabiliyetine sahip olduğundan dolayı NO, tüm organ ve dokularına etki ederek sinyal molekülü fonksiyonu görür. Hücre membranından diffüz bir şekilde geçip hücre içindeki hedefine ulaşabildiğinden dolayı da hücre reseptörlerine ihtiyaç duymaz. Bu cihaz tarafından üretilen gaz akımının bir parçası olan ekzojen NO, yara iyileşmesinde büyük etkinlik gösterir. Cihazın yara yüzeyine terapötik etkisi belirli bir mesafeden uygulama ile gerçekleşir. Cihazda, dış ortama verilen nitrojen monoksit konsantrasyonu (ppm) $-400 + - 100$ arasında ayarlanmıştır ve ortalama 200-300 ppm değerinde bir gaz akımı oluşturur. En uzun kullanım süresi tek seferlik <20 dk olmalıdır. Ekzojen NO cihazı ile NO'nun terapötik konsantrasyonu şekillenir ve $+10^{\circ}\text{C}$ ila -35°C arasında normal nem oranında kullanmak için dizayn edilmiştir.

NO gazı ile yara tedavisi uygulamaları ön plana çıkmakla beraber, son dönem araştırmalar NO gaz tedavisinin uygulama süreleri ile salma modunun zamansal kontrolü üzerine yoğunlaşmıştır. Literatür taramalarında NO gazının uygulama sürelerinde ve dozlarında değişkenlik göz önüne alındığında, çalışmamızda SAP/NO (Inosante Medical Inc/Türkiye) cihazı ile 200 ppm dozunda 60 ve 120 saniye sürelerde 2 mm mesafeden diyabetik rat yaralarında uygulanmasının araştırılması amaçlandı. Cihazdan optimum şartlarda en iyi verim sağlamak adına bu çalışma planlandı. Çalışmada, diyabetik yara iyileşmesinde, 60 ve 120 saniye sürelerde 2 mm

mesafeden NO uygulamasının yara alanı küçülmesine olan etkisi klinik ve histolojik analizler ile değerlendirildi.

BÖLÜM II

Kavramsal Temeller/Kuramsal Temeller ve İlgili Araştırmalar

1. Derinin Anatomik Yapısı

Deri; mikroorganizmaların içeriye girmesine engel olan ve termoregülasyondan sorumlu vücudun en büyük organıdır. Deri; epidermis, dermis ve hipodermisten oluşur. Epidermis 4 tabakadan ibaret olup; stratum corneum, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum basale'den oluşur. Stratum basale'de derinin üst keratinositlerini yaptığı için doğurgan anlamında stratum germinatum da denilmektedir (Şekil 1).

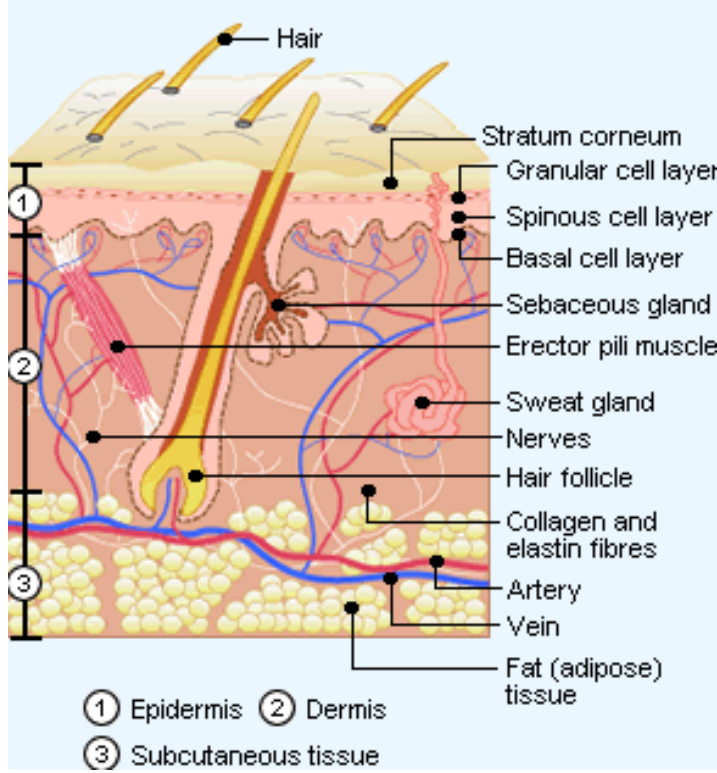
Epidermis; derinin en dış tabakası olup çoğunlukla keratinosit olarak adlandırılan hücrelerden oluşur ve damarsal yapılar içermez. Epidermiste keratinositler dışında melanosit, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri de bulunmaktadır. Keratinositler derinin %5'ini oluşturur ve hücre içinde protein yapısında keratin isimli proteini yapar. Dermis ile komşu katmanda keratinositler bölünerek üst katmanlara atılır. Alt katmanlarda yapılan canlı keratinositler en üst katmanlarda ölür ve deriden dökülerek ayrılır. Bu sürece keratinizasyon döngüsü adı verilir.

Dermis; derinin epidermis ile subkutis arasında bulunan, bağ dokudan oluşan ve vücudu darbelere karşı koruyan katmandır. Dermiste hücre arası destek dokusu ve fibroblast hücreleri ile bunların arasında sinir, damar, lenfatik yapılar, ter/yağ bezleri, tırnak ve kıl follikülleri yer almaktadır. Epidermis ile karşılaştırıldığında, çok daha az sayıda hücre ve çok daha fazla lif bulundurulur. Dermiste ana hücreler fibroblastlar olup dermisin hücre dışı destek matriks dokusunu oluştururlar. Bu matriks yapısı kollajen, elastin ve retiküler fiberlerden oluşur. Dermis vücut savunma sisteminin parçası olan makrofajlar ve mast hücreleri gibi diğer hücreleri de barındırır. Dermiste; dokunma duyusundan sorumlu olan Merkel ve Meissner cisimcikleri, basınç duyusundan sorumlu olan Pacinian cisimcikleri ve mekanik duyudan sorumlu olan Ruffini cisimcikleri bulunmaktadır. Basınç ve dokunma duyuları derin dermisdeki ter bezlerinde de bulunan Meissner ve Pacinian cisimcikleri tarafından algılanır (Crona vd., 2017). Dermisin fibril yapıdaki destek dokusu olan kollajen derinin gerginliğini, elastin ise derinin elastikiyetini sağlar. Fibriller dışında proteoglikanlar, glikoproteinler, glikozaminoglikanlar, su ve

hyalüronik asit diğer destek yapılar arasındadır. Bunlardan ön plana çıkan proteinlerin proteoglikanlara bağlanmış formları olan glikozaminoglikanlardır. Proteinler; kondrotin sülfat, dermatan sülfat, keratin sülfat, heparan sülfat ve heparinlerden oluşur. Glikoproteinler hücrelerin birbirlerine tutunmasını, hücrelerin yer değiştirmesini, hücreler arası ilişkiyi düzenler. Dermisde papiller tabaka gevşek bağ doku, sinir lifleri, kılcal damar ve fibroblastları içerir. Retiküler tabaka ise dermisin alt kısmında hipodermise geçiş alanını oluşturur. Daha yoğun ve kalın lif ağına sahip olup daha az sinir lifleri ve kılcal damar içerir. Bu alt katmanda kollajen lifler kalın demetler halinde toplanır ve çoğunlukla cilt yüzeyine paralel hizalanmıştır. Dermis ayrıca vücut savunma sisteminin parçası olan makrofajlar, mast hücreleri gibi başka hücrelere de konaklık etmektedir (Pavletic, 2010; Crona vd., 2017).

Subkutis (Panniculus, Hipodermis); dermin en alt tabakasıdır. Bu tabaka yağ tabakası olan stratum adiposum ve fascia süperfisialis olmak üzere iki kısımdan oluşur. Stratum adiposum yağ hücreleri; otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalar yoluyla çeşitli sitokin, kemokin, TNF- α , İL-6 ve akut faz proteinleri gibi faktöeleri de salgılar (Şekil 1) (Pavletic, 2010; Crona vd., 2017).

Şekil 1. Derinin Anatomik Yapısı.

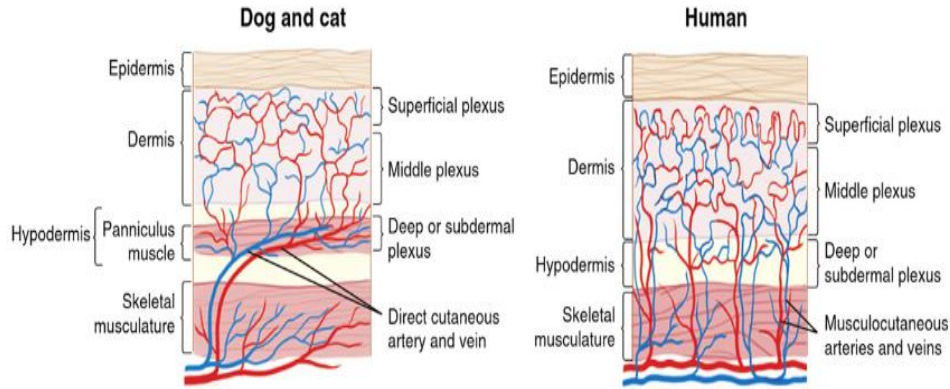


<https://www.safarivet.com/care-topics/dogs-and-cats/dermatology/>

Çoğu memeli hayvan türü, yara iyileşmesinin kontraksiyon fazında çok önemli bir role sahip olan M. Panniculus carnosus (PC) kasına sahiptir. Memelilerde derinin kasılma işlevinden sorumlu olan bu kas; insanlarda evrimin bir sonucu olarak fonksiyonunu kaybetmiştir. İnsan ve domuzlar hariç çoğu memelide deri yaraları bu kasın kontraksiyonu ile iyileşir. Bu oluşum reepitelizasyon ve granülasyon doku oluşumunun bir alternatifidir (Muguet-Chanoit vd., 2011, Pavletic, 2018; Naldaiz-Gastesi vd., 2018). Subdermal pleksusun vasküler yapısı kedi ve köpekde direkt olarak bu kasın seviyesinde deriye paralel seyrederken insanda muskulokutanöz damarlar deriye dikey seyreder (Şekil 2) (Naldaiz-Gastesi vd., 2018).

Şekil 2

Kedi, Köpek ve İnsanda Kutanöz Dolaşım .



Subdermal pleksusun köpek ve kedilerde PC seviyesinde direkt kutanöz damarların uç dalları tarafından oluşturulması ve muskulokutanöz damarların dikey oriyantasyonu ile köpek ve kedilerde yatay oriyantasyonu (Naldaiz-Gastesi vd., 2018).

2. Yarannın Tanımı ve Yara İyileşmesi

Yara; canlı dokunun hücresel, anatomik ve fonksiyonel devamlılığının ‘fiziksel, kimyasal, termal, mikrobiyal veya immünolojik nedenlerden ötürü’ bozulması olarak tanımlanır. Yara iyileşmesi aşamaları yara ortamının çok yönlü doğasından dolayı karmaşıktır (Masson-Meyers vd., 2020; Koivisto vd., 2014).

Yara onarımında primer iyileşme de dahil hiçbir yara önceden var olan doku mimarisine ulaşamaz. Türler ve doku tiplerine göre onarımda farklılıklar olsa da hemen hemen tüm yaralar benzer bir onarım sürecinden geçer. Yara iyileşmesinde ana hücresel bileşenler arasında; trombosit, nötrofil, makrofaj, endotelial hücre, fibroblast, miyofibroblast, keratinosit ve daha az olarak da lenfositler yer alır. Yara iyileşmesinde bu hücrelerin farklılaşması aktivasyonu, göçü ve çoğalması söz konusudur. Bu hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve metabolizmasını değiştiren, iyileşmeyi modüle eden ise biyolojik olarak aktif polipeptit gruplarıdır. Bunlar ise değişik mekanizmalarla hareket eden büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerdir.

Yara iyileşmesinde inflamasyon, proliferasyon (çoğalma) ve matürasyon (olgunlaşma) aşamaları söz konusudur. Yara iyileşirken bu fazların önemli ve değişken örtüşmesi gözlenir. İyileşmenin inflamatuvar fazında öncelikle yaralı doku

tarafından bir fibrin pıhtısı oluşumu ile hemostaz şekillenir. Trombosit tıkaçı inflamatuvar fazın hücrelerinin akışını desteklemek için geçici bir iskele görevi görür. İnflamatuvar fazın asıl önemi ise; bağışıklık bariyeri oluşturarak yaranın yabancı materyal ve kontaminantlardan uzaklaştırılması ile proliferasyon ile karakterize edilen bir sonraki fazı modüle edecek hücreleri ortama çekmesidir. Yara iyileşmesinin proliferatif fazında vasküler beslenmenin yeniden sağlanması, esnek güçlü bir ECM (Ekstrasellüler Matriks) oluşması ve yaranın epitelizasyonla kapanması gerçekleşir. Olgunlaşma evresi olarak da tanımlanan yara iyileşmesinin yeniden şekillenme fazında ise kollajenin yeniden düzenlenmesi ve yaranın öncesi doku gücüne erişimi modüle edilir (Zarei & Soleimanejad, 2018).

2.1 Hemostaz ve İnflamatuvar Faz

Yaralanmayı takiben 1-6 gün arasında süren hemostaz sonrası inflamasyon aşamasıdır. Hemostaz aşamasında; vazoaaktif bileşikler, hasarlı hücrelerden salınarak geçici bir vazokonstrüksiyona ve akabinde sıvı ve hücrelerin yara yatağına geçişine izin vermek için vazodilatasyona neden olur. Yaralanma damar endotelini uyarır ve trombositler fibrinojen, fibronektin gibi yapışkan proteinleri serbest bırakır. Lokal trombin ile birlikte daha fazla trombosit agregasyonu uyarılarak trombosit tıkaçı şekillenir. Fibrinojen trombin tarafından fibrine dönüştürülerek fibrin pıhtısı oluşturulur. Fibrin pıhtısı; bir matriks iskelesi sağlayarak büyüme faktörlerinin deposu olarak hizmet eder (Lux, 2022). İnflamasyon aşamasında istilacı mikroorganizmalara karşı bir immün bariyer oluşturulur ve vazodilatasyon ile artan endotelial hücre geçirgenliği, yara yatağına kan akışının artmasına, plazmanın ekstravazasyonuna neden olur. Dilate damarlardan yaraya ilk olarak nötrofiller göç eder. Nötrofiller aynı zamanda bakterileri uzaklaştırma görevi dışında ROT (reaktif oksijen türleri) ile proteolitik enzimlerin salınımına, bakteri / matriks artıklarının fagositoz ile uzaklaştırılmasında inflamatuvar fazı uzatan ek sitokinlerin salınımına da neden olur. Yara hipoksisi enfeksiyona karşı direnci bozar. TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü- α); nötrofil kemotaksisini güçlendirir, anjiyogenez ve kollajen sentezinde ihtiyaç duyulan büyüme faktörlerinin ekspresyonunu uyarır. Aktive olmuş inflamatuvar hücreler oksijeni yüksek oranda tükettiği için bu süreçte yaraya yetersiz kan temini olursa lokal hipoksi gelişir. Bu aşamadan sonra yara iyileşmesi için gerekli makrofajlar oluşturulur. Yaralanmadan yaklaşık 48 ila 72 saat sonra yaraya gelen kandaki monositler yara dokusunda

makrofajlara dönüşür. Makrofajların ömrü nötrofillerden daha uzun olup yaranın mikrodebridemanı için çalışır. Bununla beraber yara bölgesine sitokin (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) ve büyüme faktörleri (FGF, EGF, TGF- β)'nin erişimi sağlanır. Makrofajlar, bakteri ve kalıntıları fagosite ettiği gibi geçici hücre dışı matriksi bozan MMP (matriks metalloproteinaz) leri de üretirler. Doku içindeki nötrofiller, birkaç gün içinde programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) uğrar ve bu nötrofiller daha sonra doku makrofajları tarafından fagosite edilir. Yara makrofajları nötrofillerin aksine tüm bu yangısal evre boyunca yaradadır. Sağlıklı bir yarada hemostaz ve inflamatuvar faz 72 saatte tamamlanır ancak yaranın kontaminasyonu, nötrofillerin uzun dönem kalmasına ve yara iyileşmesinde gecikmeye neden olur (Lux, 2022).

2.2. Proliferatif Faz

Fibroplazi, neovaslularizasyon, anjiogenezis, epitelizasyon ve ECM sentezini içeren bu dönem 4-21 gün sürer. Bu fazın temel hücreleri; makrofaj, fibroblast, endotel hücreler ve epitel hücreleridir. Bu faza geçiş yaradaki yangı hücrelerinin azalması ile gerçekleşir (Ashcroft vd., 2003; Lux, 2022).

2.2.1 Fibroplazi ve Kollajen Birikimi

Fibroplazi evresinde; fibroblast göçü, çoğalması gerçekleşir ve aktive edilmiş makrofajlar yoluyla yaraya çekilir. Fibroblastlar yarada 48-72 saat sonra görülmeye başlar. Fibroblastlar yarada kollajen, elastin ve proteoglikan üretimi ile kollajeni çapraz bağlamak gibi önemli işlerde görev alırlar. Fibroblastlar ayrıca yaranın kontraksiyonundan sorumlu miyofibroblastlara dönüşürler. Fibroblastlar, proteaz üreterek hasarlı matriksi ortadan kaldırırlar. Tip III kollajen, fibroblastlar tarafından üretilen ve maksimum salgılanmanın 5-7 gün arasında gerçekleştiği baskın bir kollajen olup zamanla Tip I kollajen ile yer değiştirir ve ECM yi şekillendirir (Ashcroft vd., 2003; Lux, 2022).

Kollajen sentezi, üretimi ve modifikasyonu da oksijene bağlıdır. TGF- β , yaranın 7-14. günleri aralığında en yüksek seviyeye ulaşır, tip I kollajen sentezini arttırarak MMP üretimini azaltır. Birkaç hafta sonra, IP-10 (interferonla indüklenebilir protein), fibroblast alımını dolaylı olarak sınırlar ve bu olaylar fibroblastlar üzerinde olumsuz bir mitojenik etkiye sahiptir. Damarlaşma ve

fibroblast aktiviteleri ECM de gerçekleşir. Makrofaj, fibroblast, kollajen, hyalüronik asit ve diğer matriks bileşenlerini içeren yeni damarsal hücre dışı matriksin parlak kırmızı makroskopik görünümü yara iyileşmesinin proliferatif fazının karakteristiğidir ve granülasyon dokusu olarak adlandırılır. Yaralanmayı takip eden ilk haftanın sonunda ortaya çıkar ve sağlıklı iyileşen yaranın göstergesidir. Sağlıklı granülasyon dokusunda eksüdat hacmi azdır ve enfeksiyon riski düşüktür. Kollajen ECM içinde biriktikçe, vasküler yapı geriledikçe granülasyon dokusu daha soluklaşır (Stanley & Cornell, 2018).

2.2.2 Anjiyogenezis

Anjiyogenez, yeni kan damarlarının oluşumu olarak tanımlanır. Bu vaskularizasyon makrofajlar ve trombositler tarafından üretilen sitokinlerce uyarılıp modüle edilir. Fibroblast büyüme faktörleri de dahil olmak üzere artan büyüme faktörleri yeni kılcal damarın lümeni gibi bir tüp oluştururlar. VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü)'nin uyarılması arteriyal kısmi oksijen basıncına bağlıdır. Yeni damarlar yaraya oksijen ve besin sağlar ve bu mikrovasküler ağ 4-6 gün içinde ortaya çıkar. Bu fazın başında granülasyon dokusu parlak kırmızı renkte olmalı ancak soluk bir rengin anormal yara iyileşmesine işaret ettiği de bilinmelidir (Lux, 2022; Nakatsukasa vd., 1990; Ashcroft vd., 2003; Lux, 2022; Stanley & Cornell, 2018).

2.2.3 Epitelizasyon

Yaralanmayı takiben 12 saat sonra başlayan epitelizasyon 48 saatte üst seviyeye ulaşır. Epitelizasyon, bitişik keratinositlerin yaraya göçü ile başlar. Keratinosit göçü yaralanmadan 24 saat sonra başlar ancak epitelizasyonun görünmesi ise genellikle 4-5 gün sonradır. Kısmi kalınlıkta yaralarda, keratinositlerin göçü kıl folikülleri, tırnaklar ve sebace bezler gibi deri uzantılarından çok hızlı bir şekilde gerçekleşirken, sekonder iyileşmeye bırakılan tam kalınlıkta eksizyonel yaralarda tam bir granülasyon dokusu yatağı mevcut olana kadar epitelizasyon ilerlemez. Epitelizasyonun tek kat tamamlanması ile epidermis diğer deri katları hücrelerinin de gelişimini sağlar. Epitelizasyon yara oluşumundan itibaren başlar, sitokinler tarafından yönlendirilir ve epitel yüzeyi oluşmadan yara iyileşmesinin tamamlanamadığı bilinmelidir. Epitel hücreleri fenotipik değişikliğe

uğrar, doku yüzeyinde ilerler ancak yara yüzeyinde kabuklaşma var ise kabuğun altından göç ederek kollajenaz salgılar. Epitel göçünü yönlendiren kollajen liflerdir (Lux, 2022).

2.2.4 Ekstrasellüler Matriks Sentezi

Yaranın kontraksiyon fazının anlamı, doku kayıplı bir yaranın kenarlardan merkeze doğru küçülmesidir. Bu dönem yara iyileşmesinde proliferatif ve olgunlaşma evrelerini de içerir. Kollajen demetler önce granülasyon dokusuna sonra da deri kenarlarındaki dermal tabakaya bağlanır. Miyofibroblastların çekiş kuvveti ile hücre-hücre, hücre-matriks ve matriks-matriks ara bağlantılar sağlanır. Dikiş yaraları gibi minimal yara dudağı açıklığı olan yaralarda epitel hücreler boşluğu 48 saatte kapatabilir. Orta/büyük boşluğu olan yaralarda epitel göçü haftalar sürer veya açık yara hiçbir zaman tamamen kapanmayabilir (Pavletic, 2018; Lux, 2022). Miyofibroblastlar dermal fibroblastlardan oluşurlar ve dermal fibroblastlar, yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra TGF- β indüksiyonu ile miyofibroblastları eksprese eden bir düz kas aktinine farklılaşmak üzere uyarılır. Miyofibroblastlar kollajeni hücreye doğru çeker ve yara kasılmasına neden olur. Yaranın kasılma hızı, kollajen kafes konsantrasyonu ile ters orantılı olup hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Yara kontraksiyonu, tam kat eksizyonel yaraların iyileşmesinde oldukça önemlidir. Yara dudaklarının aşırı gerilimi kontraksiyonu engeller ve yara dudakları temas ettiğinde ise kontraksiyon durur. Nekrotik doku, kontraksiyon ve epitelizasyonu engeller (Lux, 2022).

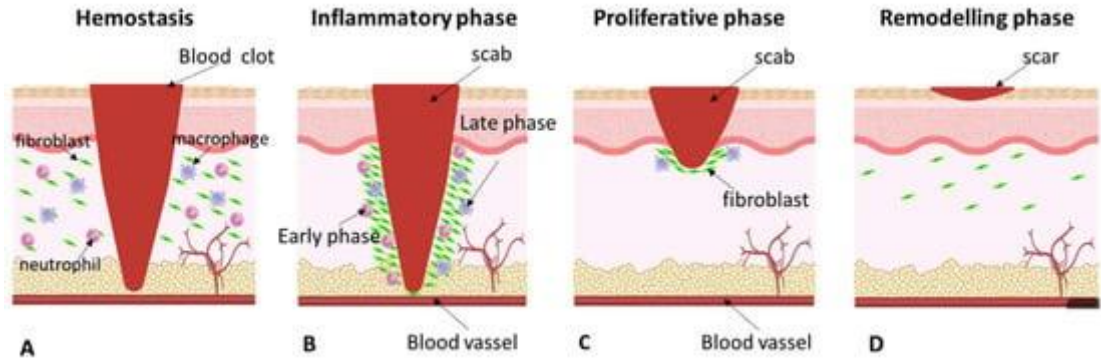
2.3. Olgunlaşma ve Yeniden Yapılanma Fazı

Kollajen demetlerin çapraz bağlanması ve epidermisin olgunlaşmasını içeren bu fazın amacı yarayı güçlendirmek ve fiziksel bir bariyer oluşturmaktır. Sağlıklı yarada bu faz; sentez ve bozulma arasındaki dengeyle ilerler. Yarada hyaluronik asit ve fibronektin azalırken kollajen içeriği artar. Erken granülasyon dokusunda bulunan tip III kollajen yerini birkaç hafta içinde tip I kollajene bırakır. En sonunda gelişen son skar dokuda ise %10 tip III kollajen vardır. Kollajen bileşiminin değişimi ile sertlik artar ancak yara dokusu doğal gerilme dayanıklılığını veya viskoelastik özelliklerini asla elde edemez. Skar dokunun son halinin direnci, yaralanma olmadan önceki halinin yaklaşık %70 ila %80'i kadardır. Yarada toplam

fibroblast sayısı ve kollajen sentezi keskin bir şekilde azalır ve bununla birlikte eklem yüzeylerini geçen yaralarda fibroblast ve miyofibroblastlar kalıcılığını koruyarak kollajen üretmeye devam ederler. Bu ise eklem bölgelerinde anormal iyileşmenin bir sonucu olan normal hareketi kısıtlayan kontraktürlerin gelişimine öncülük eder. Tip III kollajen, tip I kollajenin artmasıyla azalır ve kollajen liflerin yönü değişerek yarada bir güçlenme meydana gelir. Yara kuvvetinde artış en fazla 7 ile 14 gün arasında gelişir. Olgunlaşma ilerlerken granülasyon dokusunun yoğun damar ağı da azalır (Pavletic, 2010; Fossum, 2017). Bu fazın sonunda kollajen I'den oluşan hücresiz bir skar dokusu kalır. Yara iyileşmesinin bu aşamasındaki olumsuz faktörler hipertrofik veya hipoplazik yaranın gelişimine neden olabilir (Şekil 3) (Lux, 2022).

Şekil 3

Yara İyileşmesinin 4 Farklı Aşaması.



<https://doi.org/10.3390/molecules27113566>

- Sıvı kaybına ve patojen girişine geçici bir bariyer sağlayan biyoaktif faktörlerin ve antimikrobiallerin rezervuarı olan pıhtı oluşumu, bağışıklık hücresi infiltrasyonunu/göçünü destekleyen geçici ECM oluşumu ve doku onarım yollarının başladığı hemostaz aşaması.
- Bağışıklık hücrelerini işe almak için hasarla ilişkili moleküler modellerin aktivasyonu, reaktif türlerin üretimi, antimikrobiyal türlerin salınımı, immün hücre, keratinosit ve fibroblastların aktivasyonunun gerçekleştiği inflamatuvar aşama.
- Keratinosit, fibroblast, endotelial hücrelerin göçü, çoğalması, inflamasyonun çözülmesi, kollajen/hücre dışı matriks sentezi, azalmış damar geçirgenliği,

anjyogenezis, epitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşumunun oluştuğu proliferatif aşama.

- D.** ECM nin yeniden düzenlendiği, hizalandığı, kasıldığı, endotel hücre ve fibroblastların apoptozunun şekillendiği olgunlaşma aşaması.

3. Yara İyileşme Tipleri

3.1. Primer İyileşme

Yara dudaklarının karşılıklı geldiği, kontamine olmamış ensizyon yaralarının iyileşme şeklidir. Primer iyileşmede diğer iyileşme tiplerine göre daha az enfeksiyon riski, daha az skar şekillenmesi ve daha hızlı iyileşme söz konusudur (Şekil 4. A) (Pavletic, 2018; Fossum 2017).

3.2 Sekonder İyileşme

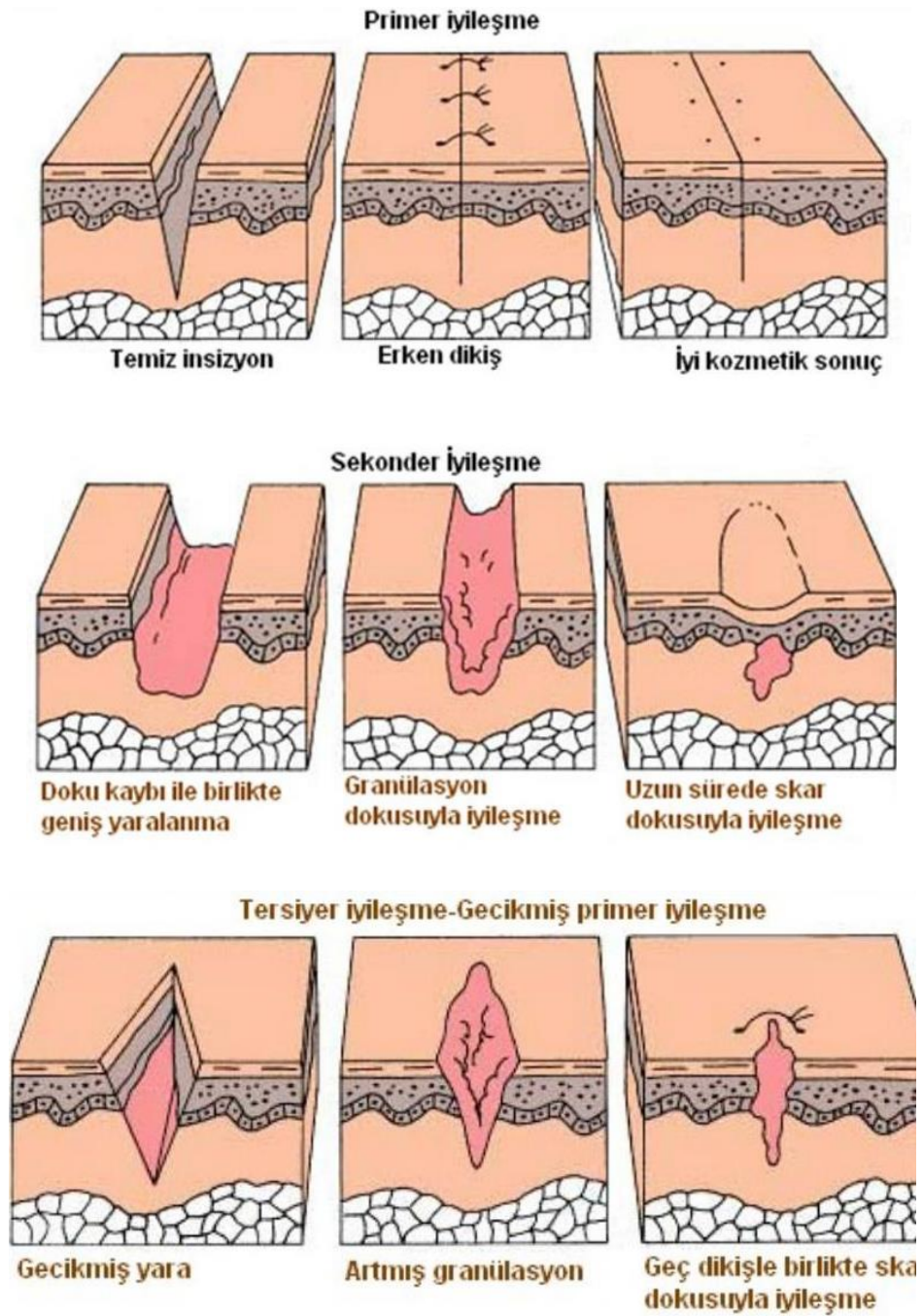
Doku kaybı olan ve yara dudaklarının karşılıklı getirilemediği yaraların kontraksiyon ve epitelizasyon fazı ile iyileşme şeklidir. Veteriner hekimlikte yaygın olarak uygulanır. Uygun yara yönetimi ile granülasyon dokusu oluşumu, epitelizasyon, miyofibroblastik yara kontraksiyonu süreçleri desteklenir (Pavletic, 2018; Fossum, 2017). İyileşmede primer iyileşmeye göre daha fazla skar oluşumu gözlenir (Şekil 4 B), (Pavletic, 2018).

3.3 Tersiyer İyileşme

Primer iyileşmeyi sağlayamayan yaralarda koşullar kazanılana kadar yaranın bakımının yapıldığı sonra da primer kapanmanın sağlandığı iyileşme şeklidir. Genellikle kontamine olan pansuman, drenaj ve debridement gerektiren yaralarda yara kapanması 3-5 gün ertelenir ve şartlar uygun hale geldiğinde primer kapanmanın sağlanması söz konusudur (Şekil 4 C) (Pavletic, 2018; Fossum 2017).

Şekil 4

Primer (A), Sekonder (B) ve Tersiyer İyileşme (C).



<https://akademiksunum.com/index.jsp?modul=document&folder=7aad7598dd47dd92f4c7cece4ab1ee8341b9f22c>

4. Deri Yaralarının Sınıflandırılması

Deri yaraları klinik görünüm ve özelliklerine göre kapalı ve açık yaralar; iyileşme süreçlerine göre de akut ve kronik yaralar olarak sınıflandırılır (Özaydın, 2023).

4.1. Kapalı Yaralar

Deri bütünlüğünün bozulmadığı, çarpma veya küt travmalar sonucu oluşan yaralardır. Kılcal damarların yıkımlanması ile doku aralıklarına sızan kanın pıhtılaşması ile sonuçlanan yaralar kapalı yaralardır (Lozier, 1993).

4.2. Açık Yaralar

Deri, deri altı doku ve kasları da içine alan deri bütünlüğünün bozulduğu yaralardır. Veteriner hekimlikte açık yara tipleri;

- Keskin bir cisim tarafından oluşturulan kenarları düz ve çevre dokularda hasarın minimum olduğu insizyon yaraları,
- Epidermis ve dermise teğet geçen travmanın neden olduğu epidermis katının soyulduğu, derinin genellikle sert bir yüzeye sürtünmesi sonucu oluşan sıyrık tarzında abrazyon yaraları,
- Bir doku segmentinin veya vücudun bir bölümünün tamamen yer değiştirecek şekilde yırtılma sonucu oluşan ve doku bağlantılarının ayrılması ile karakterize avulziyon yaraları,
- Yüzeyde ve altındaki dokularda farklı seviyelerde hasar oluşturabilen, düzensiz derinliklerde dokunun yırtılmasına bağlı oluşan laserasyon yaraları,
- Genellikle bakteriyel kontaminasyonun olduğu, sivri uçlu bir nesne ile oluşabilen batma, delinme, hayvan ısırması sonucu gelişen buzdağı adı verilen ve yüzeysel hasarın minimum derin doku hasarının ise maksimum düzeyde olduğu punktur yaraları ve
- Yanık yaraları olarak sınıflandırılır (Pavletic, 2018).

4.3. Akut Yaralar

İyileşmeyi engelleyen faktörlerin minimum düzeyde olduğu, aniden oluşan ve beklendiği gibi iyileşme aşamalarından geçerek iyileşebilen yaralara akut yaralar denir. Normal yara iyileşme sürecinin öngörülebilir ve beklenen hızında iyileşmeye sahiplerdir ve genellikle 2-4 hafta arasında iyileşen yaralardır. Akut yaralar yaraya

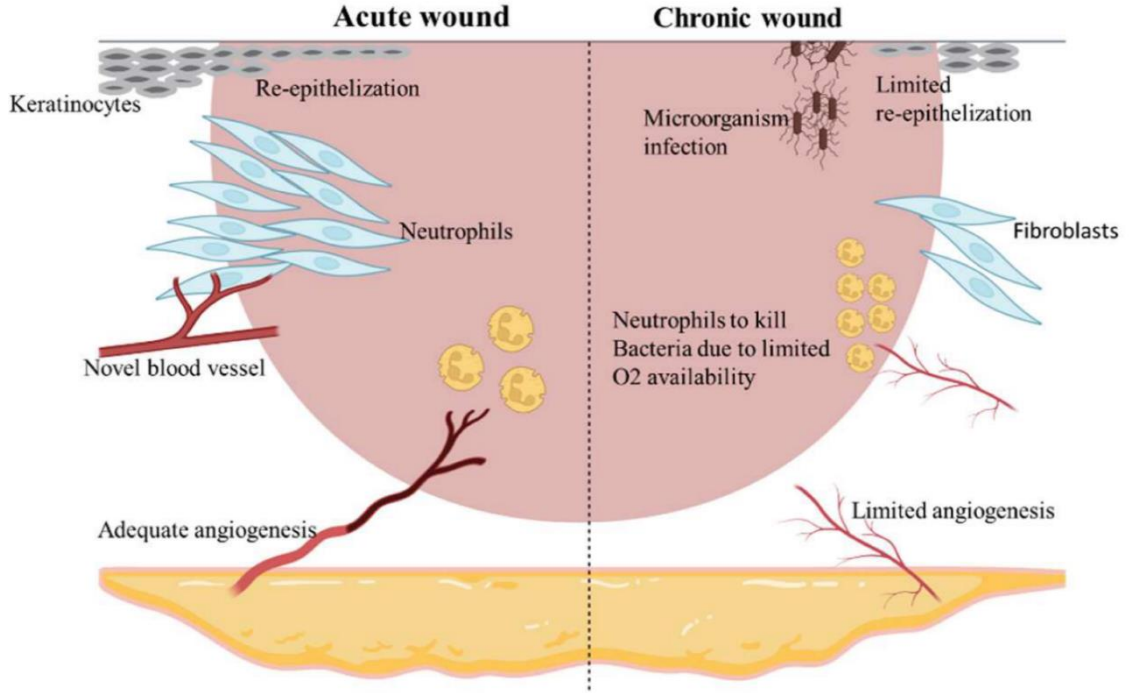
neden olan etkenin geçici olmasından dolayı beklenen sürede iyileşirler (Koyutürk & Soyaslan, 2016). Akut yaralar uygun mitojenik aktiviteye, düşük konsantrasyonlarda inflamatuvar sitokinlere ve MMP'lere, yüksek düzeyde büyüme faktörlerine, yeterli bakteri klirensine ve işleyen fibroblastları olan bir ortama sahiptir (Malone-Povolny vd., 2019).

4.4 Kronik Yaralar

Akut bir yaranın kendiliğinden iyileşemediği ve normal fizyolojik iyileşmeyi tamamlayamadığı yaralardır. Yaraların iyileşmesini engelleyen birçok faktör söz konusudur. İyileşmesi yavaş olan yaralar genellikle kronik yaralar olarak kabul edilir. Kronik yaralar bazen yara iyileşmesinin bir veya daha fazla aşamasında özellikle de inflamatuvar aşamasında takılı kalan yaralardır. Kronik yaralar, normal, düzenli ve zamanında bir onarım dizisiyle ilerlemeyen yaralar olmasının yanında genellikle yaygın ve yanlış tedaviye de meyillidir. Kronik yaraların morbiditesi ve ilişkili maliyetleri, yara önleme ve tedavi kılavuzlarının uygulanmasına duyulan ihtiyacı artırmıştır. İyileşmeye yönelik akut bir yaranın iyileşmeyen kronik bir yaraya geçişi ile sonuçlanan patofizyolojik mekanizmalar belirsizdir. Yarada gözlenen sürekli inflamasyon, anjiyogenezdeki değişiklikler, düzensiz matriks birikimi, nöropati ve bozulmuş nöropeptit sinyalizasyonu ve hücresel yaşlanma dahil birçok faktör kronik yara ile ilişkilendirilmiştir. Bununla beraber bakteriyel enfeksiyon, biyofilim oluşumu ve yara hipoksisi de kronik yaraların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Şekil 5). Biyofilim oluşumları kronik yaralarda iyi belgelenmiş olup bozulmuş yara iyileşmesinde yaralanmanın ilk aşamasından itibaren çok önemli bir role sahiptir. Biyofilimlerin; bakterileri sistemik antibiyotiklerden etkin bir şekilde koruması yanında polimikrobiyal yapıları gereği düzgün bir bakteri popülasyonunu ortadan kaldıracak antibiyotiklere karşı da yarayı daha az duyarlı hale getirdiği açıkça ortadadır (Narayan vd., 2003; Gosain & DiPietro, 2004).

Şekil 5

Akut ve Kronik Yara Arasındaki Farklar.



<https://doi.org/10.3390/molecules27113566>

A. Akut yaralarda gözlenen reepitelizasyon, fibroblast proliferasyonu ve nötrofillerin enfeksiyon önleyici aktiviteleri ile yeterli anjiyogenezis.

B. Kronik yaralarda gözlenen kalıcı lokal bakteriyel enfeksiyonlar, yeni kan damarlarının oluşumunda başarısızlık, zayıf anjiyogenez tarafından engellenen fibroblast proliferasyonu ve nötrofillerin antibakteriyel aktivitelerinin azalması.

4.4.1 Kronik Yara Tipleri

Beşeri hekimlikte hasta konforunun kaybı, yaşam kalitesinin bozulması ve ekonomik kayıplara neden olan kronik yaralar;

- Basınç sonucu gelişen basınç (dekübit) ülserleri,
- Periferik damar hastalığına bağlı arteriyel ülserler,
- Kronik venöz yetmezlik ve kalp yetmezliğine bağlı venöz ülserler ile

- Diyabetik periferik nöropati (DPN) ve diyabetik periferik arter hastalığına bağlı diyabetik ülserler olmak üzere sınıflandırılırlar (Narayan vd., 2003; Gosain & DiPietro, 2004).

DPN, yüksek seviyedeki kan şekerinin sinir hücrelerine zarar vermesi sonucu ortaya çıkan genellikle çoklu sinirlerin etkilendiği bir durumu ifade eder ve DPN, diyabeti olan kişilerde diğer nedenler elendikten sonra periferik sinir disfonksiyonu semptomlarını göstermesi olarak ayrılır. Duyusal, motor ve otonom sinirler üzerindeki etki söz konusu olup hastanın ağrı, sıcaklık, basınç ve dokunma gibi belirli uyaranları algılama yeteneği değişir, küçük kaslarını da etkileyerek atrofiye neden olabilir. DPN ile ilişkili olarak zamanında tespit edilemeyen yaralanmalar, DAÜ (Diyabetik Ayak Ülserleri) gelişimine yol açar (Perez-Favila vd., 2019). DM (Diyabetes mellitus)'de sinir hasarı sonucu doku metabolizmasının bozulması nedeniyle endotelyopati de gelişir. Uzun süreli DM li hastaların yaralarında damar duvarının bozulmuş reaktivitesi; uzak bölgelere akışın bozulmasına, dokuda AVAs (arteriyovenöz anastomozlar) oluşmasına neden olur. Küçük damarların endotelial disfonksiyonu; NO ve EDHF (endotelial kökenli hiperpolarize edici faktör) yollarının inhibisyonu ve endotelin-1 ve oksijen serbest radikallerinin artan üretimi nedeniyle gelişir. Diyabetle gelişebilen nöropati ve endotelyopati diyabet hasta yaralarını savunmasız yapar (Mieczkowski vd., 2022).

PAD (Periferik Arter Hastalığı); oksidatif stres ile birlikte hipergliseminin DM'li kişilerde mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişimine neden olan ileri glikasyon son ürünlerini üretmesi ile gelişen alt ekstremitelerin aterosklerotik tıkaçıcı hastalığı ile karakterize vasküler bir hastalıktır. PAD; arterin tıkanıdığı, daraldığı veya zayıfladığı ve mikrosirkülasyonda uzun süreli inflamasyona ek olarak kılcal damarın kalınlaşmasına yol açarak kılcal damarların esnekliğini sınırlayarak iskemiye yol açabilen kademeli bir süreci içerir. PAD tek başına bir DAÜ nedeni olmayıp ancak DPN, ayak deformiteleri, cilt kuruluğu, travma ve enfeksiyon gibi çeşitli risk faktörlerinin kombinasyonunun neden olduğu hasarı şiddetlendirerek DAÜ gelişimine katkı sağlar (Perez-Favila vd., 2019).

Bununla beraber genetik faktörler, radyasyon, immün sistem disfonksiyonu, beslenme yetersizlikleri, paraziter ve kronik mantar enfeksiyonlarında da kronik yaralar gözlenmektedir. Kronik yaraların epidemiyolojik tartışmaları, terminoloji, altta yatan hastalıklar (komorbiditler) ve jeo-demografik değişikliklerin yanı sıra tedavinin iyileşme eğilimi veya etkileri nedeni ile karmaşıktır (Falanga vd., 2022) .

İnsanlarda yaygın alt ekstremite yaraları; arteriyel, diyabetik, basınç ve venöz ülserleridir. İyileşmeyen alt ekstremite ülseri olan tüm hastalar; yara yeri, boyutu, derinliği, drenajı ve doku tipinin belgelenmesi dahil olmak üzere vasküler bir değerlendirmeye tabi tutulmalıdır.

Bununla beraber iyileşmeyen atipik yaralardan biyopsi alınmalı ve tedavinin temel dayanağı olan TIME ilkeleri benimsenmelidir. TIME ilkeleri; doku debridmanı, enfeksiyonun kontrolü, yaranın nem dengesi ve yara kenarlarının değerlendirilmesi kriterlerini içerir. Bu genel önlemler ele alındıktan sonra kronik yaralarda tedavi kronik yaranın tipine bağlı olarak özeldir. Arteriyel ülseri olan hastalar damar cerrahisi tarafından gözlemlenmeli, venöz ülseri olanlar alt ekstremitelerin kompresyon ve yükseltilmesi ile tolere edilebilir bir egzersiz programına dahil edilmeli, basınç ülserleri olanlara etkilenen bölgede basıncının azaltılması ile ilgili destek sağlanmalı, diyabetik yarası olan ve genellikle diyabetik ayak ülserine sahip hastalarda ekstremitenin yükünü boşaltarak ve gerekirse altta yatan periferik arter hastalığını tedavi ederek destek olunmalıdır (Bowers & Franco, 2020, Falanga vd., 2022).

5. Diyabet, Diyabet Modeli ve Diyabette Bozulmuş Yara İyileşmesi

Diyabet; pankreasın beta hücrelerinin yeterli miktarda insülin hormonu üretememesi veya insülin hormonunun etkili bir şekilde kullanılamaması durumunda gelişen hiperglisemi ile karakterize kronik progresif metabolik bir hastalıktır. Diyabet, tanı konulan en fazla sayıda kronik yara oluşumuna katkı sağlayan bir hastalıktır ve günümüzde özellikle insan ve evcil memelilerde hızla yayılan yüksek morbitide riski taşır. Tanıdaki kriter venöz kan glikozunun 200 mg/dl' nin üzerinde olmasıdır (Forouhi & Wareham, 2010; Riedl vd., 2011).

Tip I diyabet (diyabetes mellitus), immun kaynaklı pankreasın β -hücrelerinin yıkımı ile karakterize olup Tip II diyabette ise β -hücre disfonksiyonu ve insüline karşı direnç söz konusudur (Alberti & Zimmet, 1998).

Diyabet ve insülin direnci gelişen hastaların kardiyovasküler hastalık ve kutanöz ülser riskleri yüksektir. Oksidatif stres ve hiperglisemi; diyabete bağlı olarak retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonlara neden olur (Egan vd., 2001).

Son yıllarda beşeri hekimlikte; diyabetik yaraların özellikle de diyabetik ayak ülserlerinin artan prevalans ve morbiditesine ek olarak yüksek ekonomik maliyetten

dolayı yeni terapotik ajanların geliştirilmesi üzerine pek çok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. 2050 yılına kadar her 3 Amerikan vatandaşından birinin diyabete bağlı DAÜ geliştirebileceği bildirilmiştir. DAÜ ler için mevcut tedaviler arasında debridman, enfeksiyon kontrolü, nemli yara ortamının korunması ve basıncın uzaklaştırılması işlemleri yer alsa da çok sayıda DAÜ nün iyileşmediği ve yıllık 31 milyar doları aşan bir maliyetle ilişkilendirildiği belirtilmektedir. Diyabetik yaralarda etkili tedavilerin bulunamaması diyabetik yaraların karmaşık patofizyolojisine bağlı olup standart yara tedavilerinin bu tür kronik yaraları iyileştirmede sınırlı etkinliği söz konusudur (Bardill vd., 2022).

Diyabetik hayvan modellerine dayalı araştırmalar da dahil olmak üzere klinik araştırmaların ve klinik öncesi çalışmaların rolü, güvenli tıbbi ürünler yaratmak ve mümkün olan en hızlı iyileşmeyi sağlamaktır. Bu amaca ulaşmak için; klinik deneylerin yürütülmesiyle ilişkili geniş kapsamlı diyabetli hastalardaki yara koşullarını en yakın taklit edecek doğru bir hayvan modeline ihtiyaç vardır (Mieczkowski vd., 2022).

Deney hayvanlarında en sık kullanılan ve kimyasal olarak tip I diyabet oluşumunu indükleyen ajanlar; alloksan ve streptozotosindir. Alloksan ve streptozotosin öncelikle pankreas β -hücreleri üzerindeki doğrudan sitotoksik etkileri ile hiperglisemiye neden olur. Streptozotosin; insanların tip I diyabeti gibi duyarlı kemirgenlerde de bağışıklık sistemi yıkımının rol oynadığı nonproliferatif diyabetes mellitus yaratır (Mieczkowski vd., 2022).

Akut yaralar normal iyileşme zaman çizelgesine sadık kalırken diyabetik yaralarda bu söz konusu değildir. Normal iyileşen yaralarda; uygun mitojenik aktivite, düşük konsantrasyonlarda inflamatuvar sitokinler, MMP'ler, yüksek düzeyde büyüme faktörleri, yeterli bakteri klirensi ve işleyen fibroblastlar söz konusu iken diyabetik yaralarda; düşük mitojenik aktivite, yüksek düzeyde inflamatuvar sitokinler, MMP'ler, düşük büyüme faktörleri, biyofilim oluşumuna yatkınlık ve yaşlanan fibroblastlar söz konusudur (Tablo 1), (Bardil vd., 2022).

Tablo 1.

Akut ve Kronik/Diyabetik Yara İyileşmesi Farklılıkları (Bardil vd., 2022).

Yara iyileşme fazı	Akut yaralar	Kronik yaralar
Hemostaz	Trombosit tıkaç oluşumu, yara bölgesine hücreleri çekmek için salınan büyüme faktörleri	Hücre göçünde azalma, azalmış büyüme faktörü salınımı.
İnflamasyon	Monositlerin çekilmesi, nötrofillerin patojenleri ve yabancı cisimleri temizlemesi, Makrofajların M1 fenotipine dönüşümü, debridementin yapılması proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve MMP'lerin salgılanması Makrofajların nötrofilleri temizlemesi.	Yaraya gecikmiş monosit ve makrofajların çekilmesi, Nötrofillerin makrofajlar tarafından düzgün bir şekilde temizlenememesi, Nötrofillerin ECM proteinlerinin aşırı bozunmasına neden olan proteazlar salgılanması, Uzamış M1 makrofaj evresi, anormal inflamasyon ve hücresele artıklar ile apoptotik hücrelerin uzaklaştırılmaması, MMP'lerin artan ifadesi, ECM oluşumunun bozulması,
Proliferasyon	Granülasyon doku oluşumu, Miyofibroblastların kontraksiyonu, Makrofajların M2 fenotipine dönüşümü, Anjiyogenez ile fibroblastların çoğalması, Reepitelizasyonun gerçekleşmesi	Hipoksiye ve reaktif oksijen türlerine (ROT) neden olan zayıf damarlaşma, MMP'ler tarafından aşırı ECM bozulması, Fibroblast ve keratinosit fonksiyonlarının bozulmasına neden olan hipoksi koşulları.
Yeniden şekillenme	Epidermal rejenerasyon için keratinosit göçü, Kollajenin güçlendirilmesi, Makrofajların hücresele artıkları uzaklaştırması ve ECM'yi bozmak için proteaz salgılanması.	Aşırı MMP'ler nedeniyle bozulmuş kollajen oluşumu, azalmış epidermal gelişme.

Diabetes mellitus hastalarında fibrinolizde azalma ve sitokin dengesizliği ile yara kapanma süreçleri etkilenir. Hiperglisemi; anjiyogenezde azalmaya, keratinosit, fibroblastlar gibi hücrelerin göçünde azalmaya, yetersiz yeniden epitelizasyona neden olur ve aynı şekilde ECM fibroblastlar tarafından zayıf üretilir ve yetersiz yara kapanmasına katkı sağlar (Perez-Favila vd., 2019).

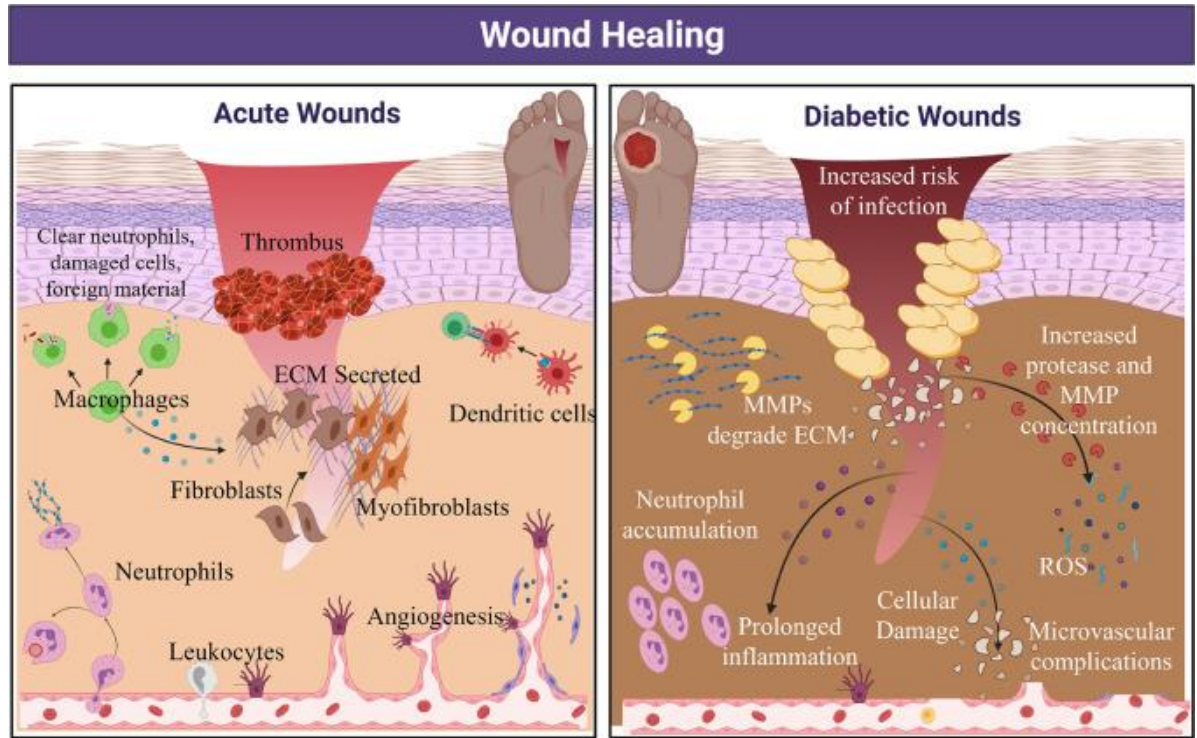
Diyabette gözlenen hiperglisemi, kanda AGEs (gelişmiş glikasyon son ürünleri) seviyelerinin artmasına neden olur. Glikasyon son ürünleri, yüksek

konsantrasyonlarda ROT (reaktif oksijen türleri) ve RNT (reaktif nitrojen türleri) nin oluşumuna doğrudan katkı sağlar. ROT/RNT seviyeleri belirli bir dokunun antioksidan kapasitesini aşarsa dokuda hasar gelişir. Yara iyileşmesinin inflamasyon aşamasında, ROT/RNTler ölü doku ve patojenlerin temizlenmesini hızlandırdıkları için iyileşmede gereklidir ancak aşırı konsantrasyonlarda ise inflamatuvar aşamadan proliferatif aşamaya geçişi engeller ve sağlıklı doku oluşumuna engel olur. Akut yaralarda bulunan bu koordinasyonun aksine kronik yaralardaki proinflamatuvar sitokinler, proteazlar ve büyüme faktörleri gibi sinyal moleküllerinin seviyeleri de genellikle dengesizdir. Diyabetik-kronik yaralarda yüksek sitokin konsantrasyonları, uzamış inflamatuvar evre ve MMP'lerin aşırı üretimi ECM bileşenlerinin sürekli olarak bozulmasına neden olur.

Azalmış büyüme faktörleri ve anjiyogenezde azalma, yetersiz doku perfüzyonuna neden olarak hipoksik ortamı indükler. Arızalı lökosit kemotaksisi ve fagositozis, bakteri yükünün daha az temizlenmesine ve inatçı biyofilimlerin oluşumuna neden olur ve diyabet hastalarında koenfeksiyonlara yatkınlık artar. Bakterilerden kaynaklanan endotoksinler doku hasarını artırarak yara iyileşmesini daha da bozar. Birçok kronik yarada olduğu gibi, DAÜ de sıklıkla tekrarlanan doku travmasının bir sonucu olarak gelişir. Diyabette genişlemiş damarlar, kanın alt ekstremitelerden yukarı akışını engelleyerek bacak ve ayaklarda basınç artışına ve dolaşımın bölgede azalmasına neden olur. TNF- α ve interlökin konsantrasyonlarının DAÜ lerde akut yaralara göre 100 kat kadar daha fazla olduğu bildirilmiştir. Uzamış bir inflamatuvar faz, sağlıklı bir yarada iyileşme kaskadının başlamasını işaret edecek büyüme faktörlerinin salınımını etkin bir şekilde atlar ve diyabetik hastalarda ayrıca istilacı patojenlere karşı bozulmuş bir bağışıklık tepkisinden kaynaklanan enfeksiyonla savaşıma yeteneği de bozulur (Şekil 6) (Bardil vd., 2022).

Şekil 6

Akut ve Diyabetik Yara İyileşmesi Arasında Farklılıklar (Bardil vd., 2022).



Enfeksiyon, DAÜ hastalarında polimorfonükleer hücrelerin değişmiş fagositoz ve bakterisidal aktivitesine, monosit/makrofajın bozulmuş kemotaksis ve fagositoz fonksiyonlarına, monositler tarafından anormal sitokin üretimine neden olur ve diyabetik hastaların özellikle dirençli patojenler tarafından enfeksiyonlara karşı duyarlılığında rol oynar (Perez-Favila vd., 2019).

5.1. Diyabetik Yara İyileşmesinde Güncel Yaklaşımlar

Son yıllarda diyabetik yara iyileşme mekanizmaları konusundaki bilgi inanılmaz bir şekilde artmış olsa da klinik diyabetik yara yönetiminde karşılanmamış ihtiyaçlar hala mevcuttur. Diyabetik yaranın patolojisinin daha iyi anlaşılması; tanının daha hızlı, tedavinin daha kolay ve ucuz yapılmasını sağlayabilir. Diyabetik hastaların popülasyonu artarken, kronik yara yönetimine artan bir ihtiyaç söz konusudur (Burgess vd., 2021).

Diyabetik yara iyileşmesinde son yıllarda sürekli gündeme gelen tedaviler arasında;

- ✓ Topikal jel bazlı biyomateryaller,
- ✓ Mezenkimal kök hücre ve ekzozom uygulamaları

- ✓ Topikal büyüme faktörleri kullanımı,
- ✓ Topikal mezenkimal kök hücre ve ekzozom kullanımı,
- ✓ Topikal insülin kullanımı,
- ✓ Topikal ozon kullanımı,
- ✓ PRP (Trombositten Zengin Plazma) ve trombosit zengin jel kullanımı,
- ✓ HBOT (Hiperbarik Oksijen Tedavisi),
- ✓ Elektrik stimülasyonu,
- ✓ Düşük frekanslı ultrason,
- ✓ Ekstrakorporeal şok dalga tedavisi ve
- ✓ NO (nitrik oksit) uygulamaları yer almaktadır. Bu çalışmaların hepsi de ileri ve kombine araştırmalara ihtiyaç duymaktadır (Burgess vd., 2021).

Mikrobiyal flora ve cansız dokunun uzaklaşmasını sağlayan *Lucilia cuprina* larva tedavisi, inflamatuvar fazın kısılmasını teşvik eden düşük seviyeli lazer tedavisi (LLLT) de bu yaklaşımlar arasında sayılabilir (Perez-Favila vd., 2019).

5.1.1. Topikal Jel Bazlı Biyomateryaller

Yara onarımı için matriks olarak kullanılan biyomateryaller hidrojel, bandaj, köpük ve film olarak kullanılır ve kökenlerine göre doğal veya sentetik olarak sınıflandırılır (Perez-Favila vd., 2019). Hem doğal hem de sentetik malzemeler, hücre iskelesi ve ilaç dağıtımı gibi özel uygulamalardan geçirilerek kimyasal olarak değiştirilebilir materyallerdir. Bu amaçla kullanılan biyomateryaller; yüksek su içeriği, ECM'yi taklit etme, yara yüzeylerini örtme yeteneği ve doku rejenerasyonunu destekleme özelliğine sahiptir.

Doğal biyomalzemeler arasında kollajen, jelatin, ipek, kitosan, selüloz, aljinat, hyaluronik asit, kitin, elastin ve hücresizleştirilmiş ECM bulunur. Doğal malzemelerin daha iyi hücre bağlamasına, sızmasına izin verdiği, doğal doku yapısını, işlevini taklit ettiği ve düşük inflamatuvar tepkilere neden olduğu bilinmesine rağmen doğal enzimler tarafından hızla bozunma, zayıf mekanik özellikleri nedeniyle klinik kullanımları sınırlıdır.

Bununla beraber yaygın olarak kullanılan sentetik malzemeler arasında; PEG (poli etilen glikol), PU (poliüretan), PLA (polilaktik asit), PLGA (polilaktid-ko-glikolit) ve PCL (polikaprolakton) sayılabilir (Perez-Favila vd., 2019).

Kitosan ve Aljinat düşük maliyeti, yüksek kullanılabilirliği ve biyoyumlu özellikleri nedeniyle doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan malzemelerdir.

Zwitteriyonik monomerlerin polimerizasyonuna dayalı hidrojel olan zwitteriyonik jeller, diyabetik yara iyileşmesinde inflamatuvar yanıtı azaltırlar. MDP (multidomain peptit hidrojel) ler gibi diğer peptit/protein bazlı yaklaşımlar, kronik yaraların iyileşmesini hızlandırmak için kullanılmıştır. MDP hidrojelleri şırıngalara yüklenebilir ve kolayca yaralara verilir. Diyabetik yara tedavisinde karboksimetilselüloz ve propilen glükolden oluşan bir antibakteriyel jel yara kapanmasını desteklemiştir. Kronik yaraların tedavisi için üretilmiş vulnamin jel; hyaluronik asit, amino asit, glisin, lizin, prolin ve lösinden kuruludur. İçerdiği amino asitler kollajen ve elastin sentezi için özellikle önemli olup, eNOS, TGF- β 1 belirteçlerini artırır ve inflamatuvar hücre sayılarını ve iNOS seviyelerini azaltır. Nöropatik bacak ülseri olan 30 diyabet hastasında uygulanmış ve yara kapanma oranlarını önemli ölçüde iyileştirdiği görülmüştür.

ROT'un yara iyileşme sürecinde kritik bir rol oynadığı nötrofil, monosit ve makrofajlar tarafından salgılandığı, anjiyogenezin yanı sıra bakteri ve diğer mikroorganizmalarla savaşan detoksifikasyon için önemli olduğu bilinmektedir. Kronik yaralar, ECM proteinlerinin bozulmasına neden olan artmış ve sürekli ROT seviyelerine sahiptir. Bu nedenle, ROT'u hedeflemek, kronik yaralar için umut verici bir yaklaşım sunar. Edaravone ile yüklenmiş aljinat bazlı bir nanokompozit hidrojelin serbest radikal yakalama özelliklerine sahip olduğu gözlenmiş ve kullanım sonunda diyabetik yaralarda iki kat iyileşmesini hızlandırdığı da belirtilmiştir.

RAS (Renin-anjiyotensin-sistemi); inflamasyonu, kollajen birikimini ve TGF- β sinyal yolunu düzenleyerek diyabetik yara iyileşmesinde rol oynadığı için anjiyotensin reseptör blokerlerinden Valsartanın yara iyileşmesinde kullanımı ilgi çekmiştir. Diyabette, artmış AT1R (anjiyotensin tip I reseptörü) ve azalmış AT2R (anjiyotensin tip II reseptörü) ekspresyonu gözlenir. Bu reseptörlerin oranlarındaki değişiklikler, kollajenin parçalanması ile diyabetik yara iyileşmesini riske sokar ve valsatran ile yapılan çalışmalar diyabetik domuz yaralarının plasebo grubuna göre %75 oranda artmış yara kapanma hızı olduğunu göstermiştir.

Desferrioksamin de anjiyogenezi destekleyen bir ilaç olarak DAÜ'ların tedavisinde iyileşmeyi desteklediği bildirilmiştir. Gümüş nanoparçacıkların yarada kullanımı kronik yaralarda hızlandırılmış iyileşme göstermiştir. Gümüş iyonları ve AgNP (gümüş nanopartikül) ler yarada bakteriyel direncin önlenmesinde önemli antibakteriyel ve antifungal etki sergilerler. Levofloksasin nanoemülsiyonu; bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir ilaç olup

DAÜ enfeksiyonlarıyla ilişkili bakteri seviyelerini azaltmak için hastalara oral olarak uygulanmıştır. Bu jel ile tedavi edilen *Staphylococcus aureus* ile enfekte diyabetik sıçan yaraları, 12 gün sonra neredeyse tam yara kapanması, artmış kollajen sentezi göstermiştir. Kronik yaralarda test edilen bu çok çeşitli nanopartikül yaklaşımları, topikal olarak uygulanan jel tedavilerine dahil edilmeleri için daha fazla araştırmaya izin vermelidir.

Kronik yaralarda test edilmiş bilinen antioksidan ve anti-apoptotik etkilere sahip olan C vitamini, olumlu yara iyileştirici özellikleri nedeniyle çeşitli bitkilerden ekstrakte edilmiştir.

Mangiferin, mango ağacı gibi bitki türlerinde bulunan doğal bir bileşik olup bu polifenol, ROT'un baskılanması yoluyla antioksidasyon ve antiinflamatuvar etkiler sergiler. Diyabetik sıçan yaraları mangiferin jeli ile tedavi edildikten sonra oksidatif stresin azaldığı, granülasyon dokusu oluşumunun arttığı gözlenmiştir.

Gözlendiği üzere hidrojeller, doku rejeneratif uygulamalarında kapsamlı bir şekilde çalışılmakta ve yüksek su içerikleri ve yaraları nemli tutma yetenekleri nedeniyle diyabetik yara iyileşmesinde çekici hale gelmeye devam etmektedir. Hidrojeller çoklu sentez mekanizmalarına, ayarlanabilir mekanik özelliklere, hücresel veya ilaç iletimi için kapsülleme yeteneğine sahiptir. Topikal jellerin diğer tedavi yaklaşımlarına göre avantajları; uygulama kolaylığı, daha az invaziv olmaları, terapötik maddenin yara ile daha fazla doğrudan teması ve terapötiklerin sistemik verilmesinden kaçınmayı içerir.

Bunun yanında sınırlı mekanik güç, artan bozunma oranı dahil olmak üzere topikal jellerin kullanımına ilişkin sınırlamalar vardır. Polimer sentezindeki diğer ilerlemeler, biyolojik tepkileri etkilemek adına doğal sinyallere yanıt verebilen yeni nesil "akıllı" hidrojellerin geliştirilmesine yol açacaktır. DAÜ için topikal jel tedavileri, araştırma ortamlarında kapsamlı bir şekilde incelenmiş ancak sadece tek bir topikal jel (Regranex) özellikle DAÜ tedavisi için FDA onayı ile kullanıma sunulmuştur (Bardill vd., 2022).

5.1.2. Mezenkimal Kök Hücre ve Eksozom Uygulamaları

Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordon kanı, sinir dokusu veya dermisten elde edilebilen mezenkimal kök hücreler, başka hücrelere farklılaşma, sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere çok sayıda mediatör salgılama yeteneklerinden dolayı yara iyileşmesinde bazı avantajlara sahiptirler.

Kronik yaraların tedavisinde kök hücre klinik uygulamalarında; klinik kanıtların çok sınırlı olması ve vaka bazlı olmaları nedeni ile kullanımı için kapsamlı kılavuzların eksikliği söz konusudur. Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin oto-transplantasyonu, kronik venöz ülserlerin tedavisinde güvenli ve alternatif bir yöntem olarak önerilmiştir (Hoang vd., 2022).

Bununla beraber kök hücrelerin uygulanmasına yönelik klinik araştırmalar; hyaluronik asit, kollajen veya diğer biyopolimerik materyallerden oluşan sentetik ECM lerin kullanımının da yolunu açmıştır. Bu geliştirilen matriksler sadece yara örtüsü sağlamakla kalmayıp aynı zamanda kök hücrelerin kontrollü salınımı da sağlar. ADSC (Adipoz dokudan türetilmiş kök hücreler), hücre proliferasyonunu ve epitelizasyonunu artıran parakrin ve otokrin etkilere bağlı olarak umut verici yara iyileştirme yetenekleri göstermiştir. BMSC (Kemik iliği kaynaklı kök hücreler), TGF- β 1 salgıladıkları için diyabetik yaralar için çekici bir tedavi seçeneği olmuştur.

HücreSEL işlev ve iletişim için önemli olan nükleik asitleri ve proteinleri içeren hücreSEL salgı ürünleri olan eksozomlar da azalmış immün rejeksiyon da dahil olmak üzere hücreSEL terapilere göre faydalar göstermiştir. Eksozomların terapötik etkisinin, yapı iskelesi özellikleri için kullanılan jel malzemeleriyle birleştirildiğinde yaralamadan 2 hafta sonra tam yara kapanmasının yanı sıra artmış epidermal büyüme faktör, artmış anjiyogenez ve kollajen üretimi gözlenmiştir. Bitkisel/anti-oksidan moleküllerle yüklü topikal jeller de yara iyileşmesinde çalışılmıştır (Bardill vd., 2022).

5.1.3. Büyüme Faktörlerinin Kullanımı

Büyüme faktörleri (VEGF, PDGF ve FGF) nin kronik yaralarda aşağı regüle edildiği bilindiği için büyüme faktörleri ve sitokinlerin topikal olarak uygulanmasının yara iyileşmesine katkı sağlayacağı fikri doğmuştur. Bunlar genel anlamda yara iyileşmesine *in vivo* olarak; inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların yara bölgesine alınmasını teşvik ederek, hücreSEL proliferasyonu uyarmak için mitojenler gibi davranarak, anjiyogenezi ve kan damarlarının yenilenmesini uyarak, ECM sentezini kolaylaştırarak, sitokinleri etkileyerek katkı sağlarlar. Bununla beraber ekzojen olarak kullanıma giren tek ticari preparat vardır. Bu ürünlerin kullanımındaki başarısızlıklar tasarım sınırlamaları, zayıf hasta uyumu, sistemik etki, immunojenite riski, proteolitik bozulma ve çevre doku tarafından

oluşan yanıtın ve iyileşme desteğinin değişkenliği olarak sıralanmaktadır ve bu proteinlerin açık yarada tedavi edici seviyeye ulaştırılamamasına neden olmaktadır. İyileşmeyi destekleyen fiziksel ortamda protein tutma ve iletme kabiliyeti olan doğal biyomateryaller, bu sınırların üstesinden gelmek için kutanöz yaralarda umut vadeder (Berry-Kilgour vd., 2021; Bardill vd., 2022).

Bağışıklık hücreleri tarafından üretilen kemokinler ve sitokinler; parakrin ve otokrin sinyalleme ile hücre fonksiyonları düzenleyen kemoatraktan özelliklere sahip olup kronik yaralarda düzensiz miktarlarda eksprese oldukları bilinmektedir. İL-8 sitokinleri, kolay uygulama için püskürtülebilir özelliklere sahip yaban turpu peroksidaz ile çapraz bağlı bir jelatin hidrojelinde kapsüllenmiş ve diyabetik sıçan yaralarında uygulanmış yara bölgesinde artmış yara epitelizasyonunu, anjiyogenez ve kollajen birikimini desteklemiştir.

P maddesi, diyabetik yaralarda kronik inflamasyonun azalmasında rol almaktadır. P maddesi; IL-10, VEGF, TFG- β 1 ve eNOS ekspresyonunu artırarak ve kollajen gelişimini artırarak diyabetik sıçanlarda yara kapanmasını önemli ölçüde hızlandırır.

Diyabetik yaralarda potansiyel yara iyileştirme özelliklerine sahip olan opioid büyüme faktörü reseptör yollarını bloke eden bir opioid reseptör antagonisti olan Naltrekson (NTX) da çalışılmıştır (Bardill vd., 2022).

5.1.4. Topikal İnsülin Tedavisi

1980 yılında Tip 1 diyabet hastalarının tedavisi için kullanıma sunulan bir peptid hormon ve büyüme faktörü olan insülinin ‘son yıllarda hasarlı bir yarada insülin sinyal yolunun yara onarımındaki’ potansiyel rolüne işaret edilmiş ve hasarlı yaralarda da topikal olarak kullanımını gündeme gelmiştir (Abdelkader vd., 2016; Özaydın vd., 2018)

İnsülinin yaralı dokularda epitelizasyonu ve inflamatuvar yanıtları düzenlemesinin yanında yaraların iyileşmesi için endotelial hücre göçünü ve endotelial tüp oluşumunu uyarmasıyla birlikte anjiyojenik etkisi de gösterilmiştir (Wang vd., 2019). Diyabetik olmayan hayvanlarda IGF-I ile tedavi edildikten sonra, IGF-I ile tedavi edilen diyabetik hayvanlara kıyasla miyofibroblastların ekspresyonunun daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum, diyabetik hayvanlarda

IGF reseptörü ekspresyonunda bir azalmaya işaret etmiş olup diyabetik yara iyileşmesinde sınırlı da olsa klinik kullanımda yerini almaktadır (Achar vd., 2014). İnsülin yüklü nanopartiküller, serbest insülin uygulamasına kıyasla yara bölgesinde daha uzun temas süresi sağlayarak hidrojel-insülin tedavisinin serbest insülin tedavisine kıyasla yara alanını %29.15 oranında azalttığı belirtilmiştir (Bardill vd., 2022).

5.1.5. Trombositten Zengin Plazma (PRP) ve Trombositten Zengin Jel Uygulamaları

PRP ve trombositten zengin jel ürünlerinin kronik yaraların iyileşmesini hızlandırdığı 30 yıldan fazla bir süredir rapor edilmektedir. Bu ürünler; PDGF, TGF- β 1 ve EGF gibi büyüme faktörünü uyarır, kemotaksiyi uyararak dokuları yeniler ve antimikrobiyal etkilere sahiptir. Allojenik PRP, otojenik PRP'den çok daha az araştırılmış ancak diyabetik kronik yaralar için etkili ve güvenli bir tedavi olarak belirtilmiştir. PRP, farklı aktivatörlerle birleştirilerek enjeksiyon veya jel formlarında kullanılmaktadır. Trombosit ürünlerinin, DAÜ hastalarında iyileşmeği uyardığı bildirilmiştir (Burgess vd., 2021).

5.1.6. Hiperbarik Oksijen Tedavisi

1960'ların ortalarında kronik yara tedavisine ek bir tedavi seçeneği olarak önerilmiş olup belirli bir basınç ortamında yaraların % 5 oksijene aralıklı olarak maruz kalmasını içeren bir yaklaşımdır. Oksihemoglobinin seviyelerinin artmasına yara bölgesinde gelişen hipoksik ortamın düzeltilmesine neden olur (Hoang vd., 2022).

5.1.7. Elektrik Stimülasyonu

Kronik yara iyileşmesi için geliştirilen ve sık çalışılan bir biyofizik tedavidir. Vazodilatasyonu teşvik ederek damar geçirgenliğini artırır böylece yara bölgesine hücre hareketi kolaylaştırır. Çalışmalar, elektrik stimülasyonundan sonra bakteriyel proliferasyonda bir inhibisyon olduğunu da göstermiştir. Proliferasyon fazında bu tedavi yöntemi; endotel hücre, keratinosit, miyofibroblast ve fibroblastların göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırır. Özellikle de

miyofibroblastların kontraktilesini artırarak tip III kollajeni tip I'e dönüştürür ve kollajen lifleri yeniden düzenler (Hoang vd., 2022).

5.1.8. Düşük Frekanslı Ultrason

Özellikle de kronik yaralar için yardımcı bir tedavi olarak önerilir. Nekrotik dokuyu uzaklaştırıcı etkisi ön planda olup ayrıca *in vitro* biyofilim bozulmasına neden olur. Kollajen sentezini uyarmada, anjiyogenezi artırmada, inflamatuvar fazı azaltmada ve hücrel proliferasyonu teşvik etmede etkili olduğu öne sürülmektedir (Hoang vd., 2022).

5.1.9. Ekstrakorporeal Şok Dalga Tedavisi (ESWT)

Akustik darbeli enerjii dokulara ileterek yara iyileşmesine yardımcı olur. Yöntemin anjiyogenezi artırdığı, dolaşımı uyardığı, anti-enflamatuvar yanıtı azalttığı ve sitokin ve büyüme faktör reaksiyonlarını yukarı regüle ettiği bildirilmiştir. Bununla beraber ESWT'nin diyabetik ayak ülseri olan hastalarda hiperbarik oksijen tedavisinden daha faydalı olduğu bildirilmiştir (Hoang vd., 2022).

5.1.10. Topikal Ozon Tedavisi

Ozon tedavisi; bakteri, virüs, mantar, maya ve protozoaların inaktivasyonunu ile oksijen metabolizmasının uyarılmasını içerir. Diyabetik yaralar genellikle vücuttaki oksidatif stresle ilişkilendirildiği için O₃'ün antioksidan sistemini aktive ederek glisemi seviyesini etkilediği ve süperoksit dismutaz (SOD)'i aktive ederek organik peroksit seviyelerini normalleştirerek oksidatif stresi engellediği gösterilmiştir (Elvis & Ekta, 2011). Ozonize pomat uygulamalarının diyabetik yaralarda bakteri kaynaklı biyofilim oluşumunu engellediği, yara iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir (Silva vd., 2021; Güngör vd., 2022).

5.1.11. Nitrik Oksit (NO) Tedavisi

Yara iyileşme süreçlerinde endojen NO nun rollerinin 1990 lı yıllarda tanımlanmasından sonra NO, kronik yaraların tedavisi için terapotik bir ajan olarak önerilmiştir. Diyabetik yaralarda yetersiz NO, yara iyileştirici hücre tiplerinin göçünü ve hareketini engellerken, enfekte yaralarla ilişkili aşırı NO da daha fazla doku hasarına neden olur. Bu nedenle NO'nun modülasyonu, bozulmuş yara iyileşmesinde bir çözüm olarak ön görülmektedir (Yang vd., 2015).

Diyabet sırasında pankreas β -hücreleri tarafından insülin salgılanması ve vücut hücrelerinin insüline tepkisinin önemli ölçüde azaldığı bilinmektedir. İnsülin salgılanması ve sinyalleşmenin özellikle NO seviyelerine bağlı olması NO oluşumundaki herhangi bir değişikliğin diyabet etiyojisini de etkileyebileceğini düşündürmüştür. Endojen olarak L-arginin sentezi azaldığında ve NO'nun O_2 ile etkileşimi arttığına yetersiz miktarda NO salınır ve diyabet sırasında, plazmada L-arginin seviyesi büyük ölçüde düştüğü için NO ile ilişkili yolların oluşumu ve işleyişi azalır. Hayvan diyetindeki arginin takviyesinin, artan kollajen birikimi ve yara direnci kırma gücü açısından değerlendirilmesinde yara iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir (Seifter vd., 1978).

NO'nun enerji düzenlenmesinde ve vasodilasyonda önemli bir role sahip olduğu, vasküler rahatsızlıkları azalttığı ve yüksek miktarlarda L-arginin pankreas β -hücrelerinin rejenerasyonuna katkı sağladığı ve insülin üretimini de artırdığı bilinmektedir (Lajoix vd., 2001). Diğer bir önemli faktörün de NO'nun azalmış biyoyararlanımının hiperglisemi ve hiperlipidemi ile bağlantılı olmasıdır (Batinic vd., 2010). Oksijen eksikliği ve NO salınımının azalması; mikrobiyal kolonizasyona, anjiyojenik aktivitenin azalmasına veya yokluğuna neden olan büyüme faktörlerinin eksikliğine veya yetersiz salgılanmasına katkıda bulunur (Martinengo vd., 2019).

Diyabetik hastalarda yaraların iyileşme sürecinin gecikmesinin bir diğer önemli nedeni ise; hipergliseminin endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini bozması ve dolayısı ile azalmış NO'nun NO'yu serbest bırakan azalmış anjiyogenez ile bağlantılı olmasıdır (Zahid vd., 2019). Uzun süreli inflamasyonun aynı zamanda yara dokusunda SDF-1 α (stromal hücre kaynaklı faktör-1 α) nın ekspresyonunu azaltarak yara iyileşmesini geciktirmesi söz konusudur. DM sırasında, makrofajlardaki fenotipik değişiklikler diyabetik yaraların inflamatuvar profilini artırır ve böylece anjiyogenez ile ilgili mRNA ekspresyonunda bir azalma anjiyogenezise katkı sunan VEGF başta olmak üzere büyüme faktörlerinin az salınımı gözlenir (Zahid vd., 2021).

NO'nun yara iyileşmesinde terapötik ajan olarak kullanımı, endojen rezervuarlardan NO üretmek ve ekzojen kaynaklardan NO ile dozlama olmak üzere iki şekilde katagörize edilir. Endojen kaynaklardan NO üretimi, NOS izo enzimi için bir substrat olarak L-arginin takviyesi ile veya NOS izoenzimlerinin özellikle

iNOS'un inhibisyonu ile gerçekleştirilebilir. Eksojen NO'nun yaraya dozlanması ise asitleştirilmiş koşullar (asitlendirilmiş nitrit kremlerle yapılan tedaviler) veya gaz halinde NO uygulamaları ile olmaktadır. Bununla beraber küçük moleküllü NO salan donörler (polimer, jel ve sargılar içinde kapsüllenme yoluyla) yaralara doğrudan uygulanabilir. NO donörleri ayrıca makromoleküler yapı iskelelerine kimyasal olarak bağlanabilir bu da kararsız NO donörlerine potansiyel olarak daha fazla stabilite sağlayarak NO'nun hedeflenen bölgeye, ayarlanabilir şekilde verilmesine yardımcı olur.

Hem endojen hem de ekzojen terapötik NO dozajının amacı, kronik yaralarda inflamasyonu ve dokunun yeniden şekillenmesini düzenlemektir. NO'nun yara iyileşmesiyle ilgili biyolojik aktivitesi hakkındaki bilgi gün geçtikçe artmaya devam etmektedir.

Herhangi bir NO bazlı yara tedavisinin iyileşmeye olan etkisi; NO yüküne ve konsantrasyonla ilgili olarak iletim süresine bağlıdır. Mikromolar NO konsantrasyonları, patojenin klirensi ve proinflamatuvar sinyaller ile ilişkiliyken, pikomolar NO konsantrasyonları doku rejenerasyonunu ve iyileşme sürecinin çözülmesini uyarır. NO salma özelliklerine sahip malzemeler için hem artmış hem de azalmış inflamatuvar hücre sayıları bildirilmiş ancak karşıt sonuçların NO salınım kinetiği veya diğer faktörlerin bir sonucu olup olmadığını anlamak için inflamatuvar hücre sayısı ve diğer yara iyileşme belirteçleri üzerindeki NO akışının daha kesin bir değerlendirilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. İlgili NO kinetik parametrelerinin doğru ölçümü ve raporlanması hem sonuçların hem de belirli NO bazlı terapötik uygulamanın en iyi şekilde nasıl gerçekleştirileceğinin anlaşılması için önemlidir. NO salınımının *in vivo* ortamlarda kullanılması için daha fazla çalışma yapmak gereklidir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak NO salınımının kinetik profilinin çıkarılmasını kolaylaştıran yöntemler; normalize edilmiş NO yükü, yarılanma ömrü ve toplam salınım süresi dahil olmak üzere önemli kinetik parametrelerin tanımlanmasını sağlayacaktır. Kinetik parametrelerin standart olarak raporlanması, farklı laboratuvarlarda geliştirilen NO donör sistem/malzemelerinin daha kolay karşılaştırılmasını kolaylaştıracak ve aynı zamanda yara iyileşmesi gibi belirli bir endikasyon için ideal NO salınım kinetik profili hakkında daha kesin sonuçlara varılmasını sağlayacaktır (Yang vd., 2015).

Yapılan araştırmalar sonucu; hiperglisemi sırasında eNOS aktivitesi etkilendiği için eksojen kaynaklardan topikal NO teminine ihtiyacın ortaya çıktığı sonucuna varılır. Bu ihtiyaç; nanopartiküller içinde kapsüllenen NO nun sentetik ECM ve polimerik hidrojellere yüklenmesi (Ahmed vd., 2022) veya Ekzojen NO üreten kaynaklardan (CAP /Soğuk Atmosferik Plazma) NO dozlama ile sağlanabilir (Rezakhanlou vd., 2011; Çürükoğlu vd., 2023).

6. Nitrik Oksit (NO), Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi ve NO Kaynakları

NO (nitrik oksit); nörotransmisyon, kan basıncı kontrolü, tümör hücrelerini öldürme yeteneği ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte biyolojik haberci olarak hizmet eden nispeten kararsız iki atomlu bir serbest radikal ve çok çeşitli fizyolojik süreçlerde biyolojik haberci olan inorganik endojen bir gazdır. NO, bir nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından L-argininin oksidasyonundan sonra üretilir ve NO izoenzimleri nNOS, iNOS ve eNOS olarak sıralanır.

Neuronal NOS (nNOS-Tip I NOS), iskelet kası, nöronlar, pankreas ve böbrekte tespit edilen ilk izo enzimdir.

İndüklenebilen NOS (iNOS-tip II NOS) izoenzimi normalde, dinlenme halinde hücrelerde bulunmaz ancak endotoksin, bazı sitokinler ve mikrobiyal ürünler tarafından indüklenir. Doku yaralanmasından sonra iNOS'un yukarı regülasyonu ve artan lokal NO üretimi normal yara iyileşmesini olumlu yönde destekler. iNOS tarafından üretilen NO önemli bir konak savunma mekanizmasıdır. Makrofaj, nötrofil, lenfosit, vasküler endotelial hücre ve düz kas hücreleri inflamatuvar sitokinlere veya endotoksine maruz kaldıklarında NO sentezler. Yara iyileşme süreci sırasında iNOS yolunun inhibe edilmesinin kollajen sentezinde, epitelizasyonda ve NO üretiminde kademeli bir azalmaya neden olduğu, iNOS yolunun yara iyileşme süreci için bir sinyal molekülü olarak görev yapan NO üretmek için argininin metabolizmasına yardımcı olduğu belirtilmiştir (Shi vd., 2000).

Endotelial NOS (eNOS-tip III NOS) izoenzimi faydalı vaskülojenik etkileriyle doğal olarak yara iyileşmesine yardımcı olur. Endotel, düz kas, epitel hücreleri, fibroblastlar, kardiyak miyositler, hepatositler ve makrofajlar dahil olmak üzere birçok farklı hücre NO üretir ve membran kanallarından veya reseptörlerden bağımsız olarak hücreler arasında hareket eder ve çok çeşitli moleküler hedeflerle reaksiyona girer (Ahmed vd., 2022).

NO donörleri yoluyla NO sağlanması yara iyileşmesini hızlandırırken, NOS inhibitörlerinin iyileşmesini geciktirdiği iNOS eksikliği olan farelerde iNOS gen transferi ile yara iyileşmesinin düzenlendiği, anjiyogenez ve kollajen sentezini teşvik ederek yara iyileşmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Ahmed vd., 2022).

Sürekli olarak endojen üretilen NO yara iyileşme sürecine doğal olarak katkı sağladığı gibi hidrofobik NO donörlerinin eksojen olarak uygulanması da yara kapanma sürecini büyük ölçüde hızlandırır. Yaralı bölge üzerinde NO kullanımı, inflamasyonu azaltır ve kronik yara iyileşme sürecini hızlandırır. Endotel hücrelerin proliferasyonunu teşvik ederek anjiyojenik aktiviteyi destekler. Antimikrobiyal bir ajan olarak hareket ederek yara iyileşme aktivitesini kuvvetli bir şekilde artırır ve hücrelerin yaralı bölgeye göçünü teşvik eder (Kumar vd., 2017). İnflamatuvar aşamadan yaranın yeniden yapılanmasına kadar NO, hem iNOS hem de eNOS tarafından üretilerek yara iyileşmesinde birçok önemli rol oynar. Erken yara onarımında sitostatik, kemotaktik ve vazodilatör etkiler gösterir, birkaç hücre tipinin proliferasyon ve diferansiyasyonunu düzenler, kollajen birikimini ve anjiyogenez modüle ederek yara kasılmasını etkiler (Schwentker & Billiar, 2003).

6.1. Yara İyileşmesinde Soğuk Atmosferik Plazma /NO Uygulamaları

Tüm dünyada insan hastalıklarının tedavisine farmasötik bir ajan olarak eksojen NO gazı uygulamasına önem verildiği gözlenmektedir (Bryan, 2015; Krausz & Friedman, 2015).

Bugüne kadar klinik pratikte gaz NO ilk olarak, persistent pulmoner hipertansiyonun tedavisinde (Clark vd., 2000), ikinci olarak da yara ve inflamasyonun tedavisinde (Shekhter vd., 1998; Shekhter vd., 2005) kullanılmıştır.

Soğuk atmosferik plazma adı verilen düşük akımlı bir DC arkında atmosferik havadan kimyasal bir yöntemle NO elde eden ilk cihaz (Plason) ile NO tedavisi 2000 li yıllardan bu yana akut ve kronik yaraların tedavisinde kullanılmaktadır. Klinik deneyler sonucu; gaz NO nun yara iyileşmesini belirgin bir şekilde hızlandırdığı, kronik yarada inatçı inflamasyonu geriletlediği ve bakteriyel kontaminasyonu azalttığı bildirilmiştir (Shekhter vd., 1998; Shekhter vd., 2005; Reshetov vd., 2000; Krotovsky vd., 2002; Lipatov vd., 2002; Chirikova vd., 2003; Shulutko vd., 2004; Vasilets vd., 2015; Marakhonich vd., 2016; Achkasov vd., 2018).

Cihaz tarafından üretilen NO içeren gaz akışıyla 318 diyabetik ayak ülserli hasta tedavi edilmiş ve çalışmanın 7. gününden sonra, konvansiyonel tedavi yöntemleriyle karşılaştırıldığında, yara iyileşmesinin hızlandığı ve bakteri yükünün azaldığı bildirilmiştir (Shekhter vd., 1998; Fridman vd., 2008; Suschek & Oplander, 2016).

Özellikle, terapötik miktarda NO'nun bir düğmeye dokunarak kullanılabilir hale getirilmesi kavramı oldukça umut vericidir, dengesiz ve pahalı NO donörlerine ve asitli nitrit gibi geleneksel NO salınımı yapan sistemlerine kıyasla birçok avantaj sağlar. Bununla beraber SAP kaynakları NO salınım sistemleri olarak kullanılırken, kritik bir dezavantaj da SAP ın aynı zamanda NO'yu doğrudan ve dolaylı olarak tutan yüksek seviyelerde ROT içermesidir. Bundan dolayı ROT seviyelerini minimize etmek ve teknik yollarla NO seviyelerini maksimize etmek önemlidir. Başka bir seçenek, antioksidanlarla SAP kaynaklı ROT seviyelerini sınırlamaktır. Böylece, olası ROT kaynaklı doku/hücre hasarları azaltılabilir ve antioksidanlar, pH-/UVA kaynaklı nitrit ayrışması ile NO salınımını artırabilir. SAP kaynaklarının hasar görmüş yara iyileşmesinde veya mikrosirkülasyon bozukluklarında NO salınım sistemleri olarak kullanımı umut vericidir. Bununla beraber NO verimliliğini ve tedavi başarısını maksimize etmek için plasma kaynaklarının kullanılmasında parametrelerin ve tedavi rejimlerinin daha fazla optimize edilmesi gereklidir (Suschek & Oplander, 2016).

SAP tarafından uygulanan NO gazı; *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan bir doz-yanıt çalışmasında NO gazının 160 ppm üzerindeki konsantrasyonlarında güçlü antimikrobiyal özellikler gösterdiği, 160 ppm de 24 saat sürekli uygulanması bakteri proliferasyonunu %90 oranında azalttığı ve daha düşük konsantrasyonlarda ise doza bağımlı olarak kısmi bakterisidal ve bakteriyostatik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, bakterisidal etki için minimum NO dozunun 200 ppm olduğu bildirilmiştir. 200 ppm NO gazında LD100 dozuna ulaşmak için gereken ortalama maruziyet süresi 4.1 x 1.1 saat olarak hesaplanmıştır (Ghaffari vd., 2006).

Ekzojen NO gazının deri yara veya enfeksiyonu tedavisinde kullanılması için deri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada

sitotoksisite belirteçlerinden biri olarak, NO gazı varlığında veya yokluğunda dermal fibroblastların, keratinositlerin proliferasyonu izlenmiştir. NO gazının sitotoksik etkilerini en aza indirmek için; hücreler her gün 8 saat hava (kontrol grubu) ve NO gazına maruz bırakılmış ve tüm hücreler tedaviler arasında 37.1 C derece ısıda inkübe edilmiştir. Tüm insan deri hücreleri, 200 ppm NO gazının sitotoksik ve sitostatik etkilerine karşı güçlü direnç göstermiş, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da keratinositlerin diğer deri hücreleri ile karşılaştırıldığında NO tedavisine daha duyarlı oldukları belirtilmiştir (Ghaffari vd., 2007).

Shekhter vd. (2005), toksisite endişelerini azaltmak için günde bir kez 6 gün boyunca yalnızca 60 sn süreyle daha yüksek NO konsantrasyonları (500 ppm'ye kadar) kullanmış ve aralıklı bir dozlama mekanizmasıyla hem enfekte hem de temiz yaraları olan sıçanlar, azalmış doku hipoksisi ve mikrobiyal enfeksiyon, artan anjiyogenez, önemli ölçüde azalmış iyileşme süresi ve gelişmiş doku morfolojisi ile karşılaşmıştır. Yazarlar ayrıca gaz NO'nun yara iyileşmesi üzerindeki etkisi için bir mekanizma önererek NO'ya maruz kalmanın yara dokusundaki peroksinitrit seviyelerini arttırdığını da belirtmişlerdir. Sitotoksik bir serbest radikal olan peroksinitrit, NO üretimi de dahil olmak üzere koruyucu mekanizmaların mobilizasyonunu başlatır. Gaz NO tedavisine, bozulmuş kronik yaraların iyileşme sürecini düzenleyen, dokuda artmış NO seviyelerinin eşlik ettiği tespit edilmiştir.

Bir fare lenfosit modeli kullanarak 5, 25, 75 ve 200 ppm basınçta 8 saat NO gazı uygulamasının güvenli olduğu bildirilmiştir. İncelenen NO gazı konsantrasyonlarının hiçbiri ECM ye zarar vermemekle beraber bazılarının lenfosit proliferasyonunu arttırdığı da gözlemlenmiştir. 200 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda ise hücre yaşamı ve bağışıklık hücrelerinin proliferasyonunda azalma gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde; NO gazının 5 - 200 ppm arasındaki basınç konsantrasyonlarında enfeksiyonlu yaraları tedavi edilebileceği gösterilmiştir (Malone-Povolny vd., 2019).

Pratik tıpta NO terapisi; postoperatif komplikasyon riskini azaltmakta ve doğası gereği trofik venöz ve diyabetik deri ülserlerinde, uzun süredir iyileşmeyen kontamine yaralarda, termal ve kimyasal yanıklarda, spor yaralanmaları, peritonit, kronik artrit ve artroz gibi hastalıklara karşı etkinlik göstermektedir (Reshetov vd., 2000; Krotovsky vd., 2002; Lipatov vd., 2002; Chirikova vd., 2003; Shulutko vd., 2004; Vasilets vd., 2015; Marakhonich vd., 2016; Achkasov vd., 2018).

Klinik etkinin temellerinde NO nun birçok fizyolojik ve patolojik sürecin düzenleyicisi olması yatar. Modern literatüre göre NO tedavisinin etkinliği, NO ile süperoksit anyon radikali O⁻² arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak yara dokularında oluşan nitrik oksit ve peroksinitritin bakterisidal etkisine dayanmaktadır. NO tedavisinin diğer etkileri; mikrodolaşımı düzenlenmesi, fagositozun indüklenmesi, anjiyogenez, fibroblastların proliferasyonu ve oksidatif stres yoluyla antioksidan aktivasyonunu sağlamasıdır (Vasilets vd., 2015).

Gaz halinde NO uygulamaları hem enfekte olmayan hem de enfekte kronik yaraların tedavisinde alternatif olarak görülür. Plason cihazındaki atmosferik havadan plazma-kimyasal nitrik oksit üretimi yanında NO-tedavisinin modifikasyonu ve iyileştirilmesi amacıyla modifiye cihazlar geliştirilmiş ve yapılan çalışmalarda fizikokimyasal parametrelerin yaralardaki inflamatuvar ve onarıcı süreçlerdeki etkileri incelenmiştir. Geliştirilen cihazla gaz NO uygulamaları ratların tam kat deri yaralarının tedavisinde kullanılmış ve morfolojik, immünohistokimyasal, morfometrik ve istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir. Çalışmanın sonunda Plasonun modifikasyonu olan NO-CGF cihazının da inflamasyonu önemli ölçüde azalttığı ve yaralardaki rejeneratif süreçleri geliştirdiği gösterilmiştir. NO terapisi için yeni bir cihazın geliştirilmesi ve cihazın kullanımını standartlarının belirlenmesi hem hekimler hem de hastalar açısından önemli bulunmaktadır. Bu cihaz biyolojik dokularda sıcaklığa bağlı hasar riskini ortadan kaldırmak için termal ayırıcı içerir ve değişik ortam ısılarında patolojik dokulara uygulama açısından uygun ve umut vericidir. Yaraya yüksek konsantrasyonda NO uygulaması, uygulama süresi ve probun yaraya olan mesafesinin irdelendiği çalışmalar ile gaz akışı hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamız NO tedavisinin tıbbi etkisini artıracak ve muhtemelen etkili sonuçlar; uzun NO gazı uygulama süresini kısaltacaktır. Soğuk NO-CGF cihazı; manipülatörü ile yara yüzeyi arasındaki mesafeyi gözlem ihtiyacını ortadan kaldırır ve biyolojik dokularda termal hasar riskini de ekarte eder. Bu durum NO terapi yönteminin klinik uygulamasını hem hekimler hem de hastalar için daha konforlu ve kolay hale getirir (Shekhter vd., 2019).

Çürükoğlu vd., (2023), diyabet oluşturulan ratların 3 cm² lik eksizyonel yaralarında günde bir kez, 2 mm mesafeden ve 1.5 dk süre ile SAP/NO uygulamalarının diyabetik yara iyileşmesinde güçlü bir antibakteriyel ajan olduğunu, yara alanında küçülmeye (P=0.034) katkı sağladığını, yara kontraksiyon hızında

($P=0.021$), epitelizasyonda ($P=0.02$) ve kollajen organizasyonunda ($P=0.006$) artışa neden olduğunu belirtmiştir. Bununla beraber inflamatuvar hücre sayısında azalmaya ($P=0.002$) anlamlı katkı sağlaması yanında NO grubunda İL-8 mRNA ifadesinde önemli bir artış olduğu ($P=0.026$) da belirtilmiştir.

Literatür taramaları doğrultusunda NO gazının yara tedavisinde uygulama süreleri ile salma modunun zamansal kontrolü üzerine yoğunlaşmış olduğu gözlemlendiği için çalışmada NO gazının uygulama süreleri değerlendirilmiştir.

Bu amaçla da SAP/NO gazının 200 ppm dozunda 60 ve 120 sn sürelerde 2 mm mesafeden diyabetik rat yaralarında uygulanmasının araştırılması amaçlanmıştır. Cihazdan optimum şartlarda en kısa sürede ve en iyi verimi almak adına; 60 ve 120 sn sürelerde 2 mm mesafeden NO uygulamasının diyabetik yara iyileşmesinde yara alanı küçülmesine olan etkisi klinik ve histolojik analizler ile değerlendirilmiştir.

BÖLÜM III

Gereç ve Yöntem

1. Hayvan Materyali ve Etik Kurul Beyanı

Çalışmada toplam 15 adet, 5-6 aylık Wistar albino dişi rat kullanıldı. Ratlar rastgele 3 eşit gruba ayrıldı. Diyabetli kontrol grubuna (G1-DK) hiçbir uygulama yapılmadı. İkinci gruba (G2-DNO/60) günde 60 sn, üçüncü gruba ise (G3-DNO/120) 120 sn NO gazı uygulaması 14. Gün boyunca günde bir kez yapıldı. Çalışma Yakın Doğu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No: 149).

2. Diyabet Modeli

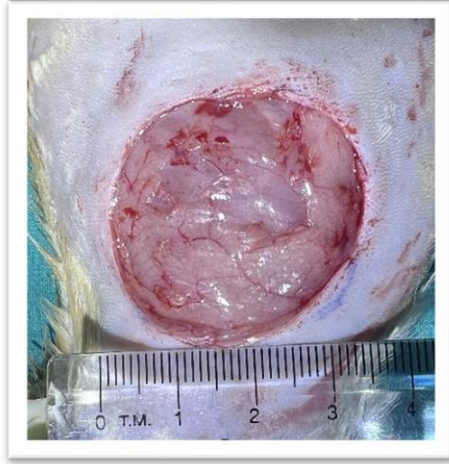
Diyabet, ratlarda pH 6 ve 0.07 M sitrat tamponu içinde çözülmüş ve intraperitoneal olarak uygulanan tek doz 50 mg / kg streptozotosin (STZ) ile uyarıldı (Sigma, St Louis, MO, ABD). Sıçanlar STZ uygulamasından 12 saat önce ve 4 saat sonra aç bırakılarak tüm hayvanların kan şekeri seviyeleri; 1.gün 2. gün ve 14. günde kuyruk venasından alınan kanlardan digital şeker ölçer ile ölçülerek bakıldı (HMD Gluco Leader). İlk iki gün tüm deneklerin içme suları %15'lik dekstrozdand oluşturuldu. STZ enjeksiyonundan sonra kan şekeri 200 mg/dL'nin üzerinde sabit seviyelere ulaştığında diyabet oldukları kabul edildi ve yara modeli oluşturuldu (Güngör vd., 2022).

3. Anestezi ve Yara Modeli

Hayvanlar 100 mg/kg ketamine HCl ve 10 mg/kg Xylazine HCl ile intraperitoneal olarak anestezi altına alındı. Cerrahi eksizyon öncesi 1 ml/kg Meloksicam (METACAM®) subkutan uygulandı. Ratların sağ sırt bölgesinde epidermis, dermis ve panniculus carnosus'u kaplayan 3 cm çapında eksizyonel sirküler yara oluşturuldu (Şekil 7).

Şekil 7

Üç cm Çapında Eksizyonel Yara Oluşumu.



4. Soğuk Atmosferik Plazma (SAP/NO) Uygulamaları

Çalışmada atmosferik havadan NO üreten Soğuk Atmosferik Plazma cihazı (Inosante Medical Inc/Türkiye) kullanıldı (Şekil 8A). Cihaz, veteriner hekimlikte biyolojik dokulara NO içeren gaz karışımı vermek için dizayn edilmiştir ve hücre membranından yüksek oranda geçebilme kabiliyetine sahip olup hücre reseptörlerine ihtiyaç duymadan tüm organ ve dokulara etki eden sinyal molekülü fonksiyonu gören ekzojen NO üretir. SAP/NO uygulanan gruptaki yaralara sırası ile günde bir kez 60 ve 120 sn olmak üzere 14 gün boyunca 200 ppm değerinde NO gazı uygulandı. Uygulama sirküler tarzda (periferden merkeze merkezden perifere hareketlerle) 2 mm mesafeden yapıldı (Şekil 8B).

Şekil 8

SAP/NO Cihazı (A) ve Uygulaması (B).



5. Yara Alanı Küçülmesi ve Yara Kontraksiyon Hızı Hesaplama

Aynı araştırmacı tarafından yaranın oluştuğu gün 3., 7., 11. ve 14. günlerde çekilen fotoğraflar ImageJ 1.53k freeware'e (National Institutes of Health, Rockville, MD) aktarıldı, ayrıca yara alanları cm^2 cinsinden kaydedildi. 0-3, 0-7 ve 0-14. günler arasındaki yara kontraksiyon oranları hesaplandı ve gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı ($[(\text{Created Wound Area} - \text{Measured Wound Area}) / \text{Created Wound Area}] \times 100$) (Bae vd., 2012; Anuk vd., 2016).

6. Histolojik İncelemeler

Deney süresinin bitiminde gruplara ait doku örnekleri alınarak %10 formaldehit ile tespit edildi. 24-48 saat tespit süresi sonunda dokular dereceli alkol serileri ve ksilolden geçirilerek parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Leica) ile 4-5 μm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler genel değerlendirme için hematoksilin eozin (MERCK HX69657153/Almanya), kollajen organizasyon değerlendirmesi için Masson trichrom (Bio Optica,04-010802/Italy) ile boyandı. Gruplara ait tüm kesitlerde histopatolojik değerlendirme inflamasyon, epitel rejenerasyonu, angiogenez-konjesyon ve kollajen lif organizasyonuna göre yapıldı (Tablo 2) (Güngör vd., 2022).

Tablo 2

İnflamasyon, Anjiyogenezis Fibroblast Aktivasyonu ve Epitel Rejenerasyonu Kriterleri.

	0	1	2	3
İnflamasyon Hücre sayısı	1-5 hücre/alan	5-8 hücre/alan	9-15 hücre/alan	≥ 15 hücre/alan
Anjiyogenezis Konjesyon Hemoraji	Konjesyon içerir ancak anjiyogenezis az	2-4 damar / alan Konjesyon içerir Anjiyogenezis s Hemoraji	5-6 damar/alan Hafif konjesyon	7-8 damar/alan Damarlar epitele doğru uzanmakta
Fibroblastik aktivasyon	Kollajen lifler dağınık ve parçalı	Hafif derecede fibroblast artışı İnce kollajen lifler	Orta derecede fibroblast artışı Kollajen lif organizasyonu tam değil	Belirgin/kalın fibroblast tabaka ≥%80 kollajen lifler organize
Epitelizasyon	Yok	≥%50 oranında epitelizasyon	≥%60 oranında epitelizasyon Orta derecede iyileşme	≥%80 oranında epitelizasyon Tam iyileşme

7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analiz SPSS yazılımı (Statistical Package for the Social Sciences 25.0, SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Nicel değişkenler ortalama \pm standart sapma (S.D.) olarak ifade edildi ve nitel değişkenler yüzde olarak ifade edildi. Grupların normal dağılıp dağılmadığının belirlenmesinde; Shapiro-Wilk Testi, uygulandı. Yara kapanma hızı, yara kontraksiyon hızı ve histolojik değerlendirme sonuçlarına ilişkin gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde, Conover post-hoc analizi ile Kruskal-Wallis testi (parametrik olmayan ANOVA) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak alındı.

BÖLÜM IV

Bulgular

1. Klinik Makroskopik Bulgular


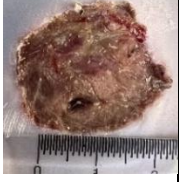
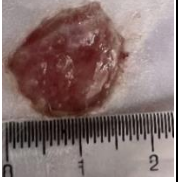
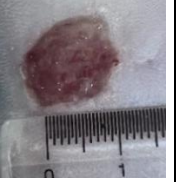
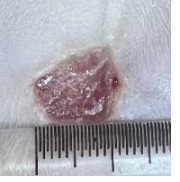


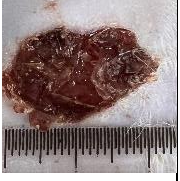
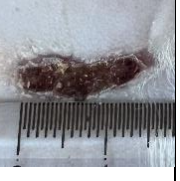



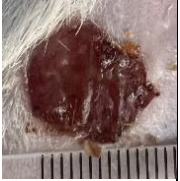


Tüm gruplarda makroskopik klinik gözlemlerimiz değerlendirildiğinde; 3. Günde NO uygulanan deneklerde belirgin bir kabuklaşma ve yarada kuruluk gözlenirken kontrol grubu deneklerde enfeksiyon belirtisi olan jelatinöz biyofilimler gözlemlendi. Yedinci günde kontrol grubu deneklerde düzgün olmayan yara yüzey alanı ve enfeksiyon belirtisi ve biyofilimlerin varlığı yanında NO uygulanan deneklerin yaralarında küçülmenin hızlandığı ve kabuklaşmanın kaybolduğu gözlemlendi. Onbirinci ve 14. Günlerde kontrol grubunda yara yüzey alanında küçülmenin yavaşladığı ancak NO uygulananlarda yara küçülmesinin hızlandığı izlendi (Şekil 9).

Çalışma grupları arasındaki yara alanı farklılıklarının analizi, NO uygulanan gruplarda tedavinin 7. gününden (11. gün ve 14. gün) itibaren kontrol grubuna göre yara bölgesinin küçüldüğünü ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi ($p < 0,05$) (Şekil 10 A).

Bununla beraber NO ile tedavi edilen gruplar arasında herhangi bir fark gözlemlenmedi. Yara kontraksiyon hızı açısından yapılan analizde 60 ve 120 sn NO uygulanan tedavi grubunda 0. gün ile 14. gün arasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($p=0,033$, $p=0,049$ sırası ile) anlamlı fark bulundu (Şekil 10 B).

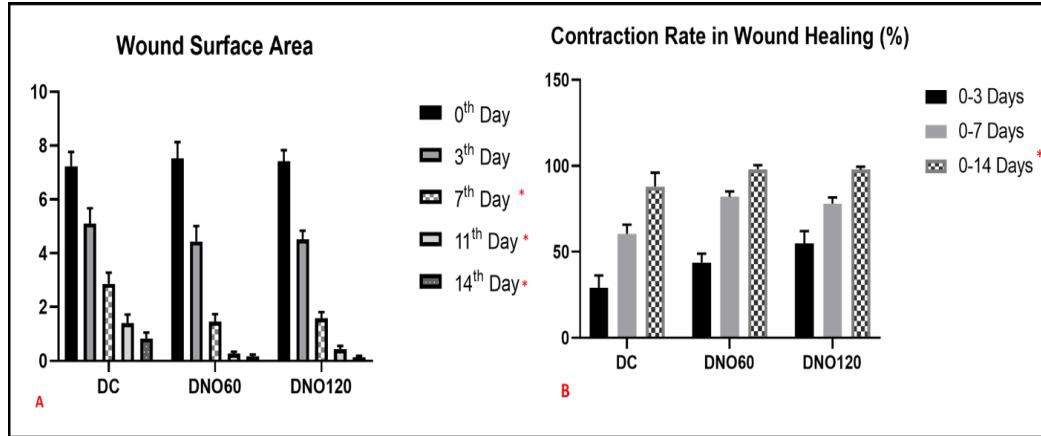
Şekil 9

Klinik Gözlemlere Göre Gruplar Arasında Yara Alanı Küçültme Oranları.

Gruplar	1.gün	3. gün	7. gün	11.gün	14. gün
DK- N5					
DNO- 60 - N1					
DNO- 120- N5					

Şekil 10

Çalışma Grubundaki Yara Yüzey Alanı Küçülmesi (A) ve Kontraksiyon Hızı (B) Farklılıkları.



A. Yara yüzey alanı açısından; tedavi edilen grup (DNO 60 ve DNO 120) ile kontrol grubu (DK) arasında 7. gün, 11. gün ve 14. gün arasında anlamlı farkın gözlenmesi (sırasıyla 7. gün için $p=0.028$, $p=0.040$, 11. gün için $p=0.16$, $p=0.032$ ve 14. gün için $p=0.006$, $p=0.024$).

B. Yara iyileşmesindeki kontraksiyon hızı oranının DNO 60 grubu ile DK grubu arasında ($p=0,033$) ve DNO120 grubu ile DK grubu arasında ($p=0,049$) anlamlı farkın gözlenmesi.

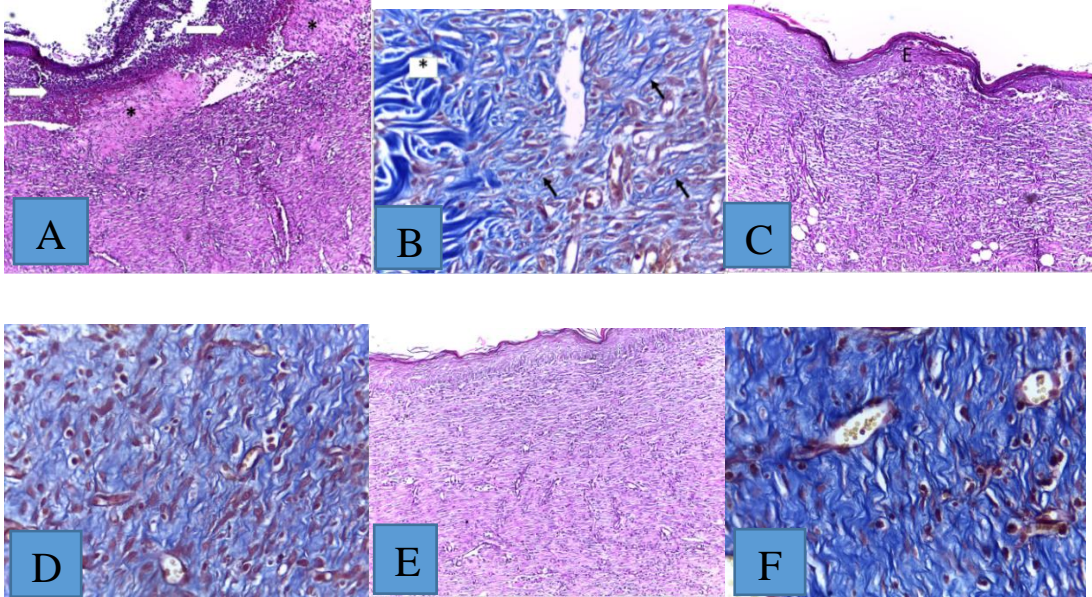
2. Histolojik Bulgular

Kontrol grubunda yara alanında epitelizasyonun hiç gelişmediği, nötrofil ağırlıklı artmış inflamatuvar hücreler ile nekrotik alanların varlığı (Şekil 11A), dermis tabakasında fibroblast aktivitesinin istenilen düzeyde olmadığı, kollajen liflerin ince ve dağınık olduğu, demetleşmenin hiç olmadığı Masson Trikrom boyaması ile belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 11 B). Altmış saniye NO gazı alan grupta epitelin rejenere olarak yara alanını kapattığı, yüzeye dik duruşlu konjesyonlu kapillerlerin varlığı ile inflamatuvar hücrelerin, kontrol grubuna göre azlığı (Şekil 11 C), epitel altı bölgede, kollajen liflerin kontrol grubuna göre artmış olduğu, yaygın olmasa da bazı alanlarda kollajen demetlerin bulunduğu (Şekil 11 D) gözlemlendi. Yüzyirmi saniye NO dozlanan grupta epitelizasyonun tamamlandığı (Şekil 11 E), kollajen organizasyonun

Grup 2 dekine benzer olarak demetleştigi (Şekil 11 F) gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NO uygulanan her iki grupta da diyabetik yara iyileşmesine aynı oranda katkı sağladığı gözlemlendi.

Şekil 11

Kontrol ve NO Uygulanan Deneklerde İnflamasyon, Kollajen Organizasyonu ve Epitelizasyonun Değerlendirilmesi.



A. Kontrol grubunda yara alanında epitelizasyonun olmadığı, nötrofil ağırlıklı artmış inflamatuvar hücreler (oklar), nekrotik alanlar (*) görülmektedir. D (dermiş). X10 hematoxilen eozin boyaması.

B. Kontrol grubunda kollajen liflerin ince ve dağınık olduğu, demetleşmenin olmadığı (oklar) görülmektedir. Sağlam alandaki kollajen lifler (*) X 40. Masson Trikrom boyaması

C. DNO/120 grubunda yara bölgesinde epitelin (E) rejenere olduğu ve yara alanını kapattığı, yüzeye dik duruşlu konjesyonlu kapillerlerin ve inflamatuvar hücrelerin, kontrol grubuna göre daha az olduğu görüldü. X10 Hematoxilen eozin boyaması.

D. DNO/60 grubuna yara alanında kollajen liflerin kontrol grubuna göre artmış olduğu, yaygın olmasa da bazı alanlarda kollajen demetlerin bulunduğu görüldü. X40 Masson trichrom boyama.

E. DNO/120 grubunda epitelizasyonun tamamlandığı görülmektedir. X10 Hematoxilen eozin boyaması.

F. DNO/120 grubunda kollajen organizasyonu Grup2 dekine benzer şekilde demetleşmelerin oluştuğunu göstermektedir. X40, Masson Trichrome boyaması.

İnflamatuar hücre değerlendirmesinde kontrol grupları ile NO uygulanan gruplar arasında farklılık gözlemlendi ($p<0.05$). Angiogenesis değerlendirmesinde; kontrol grubu ile NO 60 ve NO 120 grupları arasında farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Kollajen organizasyonu değerlendirilmesinde; sırası ile kontrol grubu ile NO60 grubu arasında ve kontrol grubu ve NO120 grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$, $p<0.01$). Epitelizasyon değerlendirmesinde ise kontrol grubu ile NO uygulanan gruplar arasında önemli fark bulundu ($p<0.01$) (Tablo 3).

Tablo 3.

G1, G2 ve G3'ün İnflamatuar Hücre, Anjiyogenesis, Kollajen Organizasyonu ve Epitelizasyon Yönünden İstatistiksel Değerlendirilmesi.

Gruplar	İnflamatuar hücre	Angiogenesis	Kollajen organizasyonu	Epitelizasyon
Kontrol	3.0±0.0 ^(a)	3.00±0.00	0.50±0.54 ^(a)	0.16±0.40 ^(a)
NO 60 sn	2.0±0.63 ^(b)	2.66±0.51	1.83±0.40 ^(b)	1.50±0.83 ^(b*)
NO 120 sn	1.83±0.75 ^(b)	2.83±0.40	1.83±0.75 ^(b*)	1.83±0.98 ^(b*)
	a:b $p<0.05$	$p>0.05$	a:b $p<0.05$ a:b* $p<0.01$	a:b* $p<0.01$

BÖLÜM V

Tartışma

Günümüzde topikal veya sistemik olarak uygulanan birçok terapötik ajan yara rejenerasyon sürecini ve nihayetinde yara kapanmasını hızlandırmak için araştırılır ve mümkün olan en kısa sürede iyileşmeyi sağlamak amaçlanır. Diyabet prevalansı ve ilişkili diyabetik yaralarındaki endişe verici artış göz önüne alındığında gelecekteki tedavi stratejilerinin, diyabetik yaraların bozulmuş iyileşmesini hedeflediğini gösterir (Burgess vd., 2021; Mieczkowski vd., 2022). Mikroanjyopati, nöropatinin geliştiği diyabetik yaralar hipergliseminin etkisi ile hücre proliferasyonunu ve kollajen organizasyonunu engeller ve bu durum fibroblastik ve anjiyojenik aktivite için büyüme faktörlerinin azalmasına yol açarak fagositotik aktiviteyi inhibe ederek yara iyileşmesini geciktiren bakteriyel enfeksiyona yatkınlığı artırır (Grada vd., 2018). Kronik yara iyileşmesinde inflamasyonun düzenleyicisi ekzojen NO gazı, dirençli olmayan bir antibakteriyel ajan olarak yara tedavisinde kullanılmaktadır ve rejeneratif süreçlerin tümüne etkinliğinin söz konusu olduğu belirtilmektedir (Forstermann & Sessa 2012; Malone-Povolny vd., 2019; Pekshev vd., 2018).

Atmosferik havadan kimyasal bir yöntemle üretilen ekzojen NO üreten cihazın keşfi; yara patolojilerinin, akut ve kronik inflamatuvar süreçlerinin tedavisinde yeni bir tedavi stratejisinin temelini atmıştır (Pekshev vd., 2018). Yapılan bir çalışmada atmosferik havadan NO üreten Plason cihazı ile NO gazı, ratların pürülant ve aseptik 3 cm² lik yaralarında günlük 60 sn 500 ppm dozunda uygulanmış ve cilt yaralarının iyileşmesine ve iyileşme süresinin yaklaşık üçte bir oranında kılmasına neden olmuştur. Aynı çalışmada, toksisite endişelerini azaltmak için 6 gün boyunca günde bir kez 500 ppm'e kadar konsantrasyonlarda NO gazı kullanılmış, enfekte veya temiz yaralarda doku hipoksisi ve mikrobiyal enfeksiyonda azalma olduğu bildirilmiştir (Shekter vd., 2005). Bu çalışmayı destekleyen başka bir çalışma da, NO gazının fare lenfosit modelinde 200 ppm dozlarında 8 saat süreyle kullanımının güvenli olduğunu bildirmektedir. 200 ppm konsantrasyonlarda NO kullanımının ekstrasellüler matrikse (ECM) zarar vermediği ve lenfosit proliferasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Rezakhanlou vd., 2011).

Çalışmada bildirilen cihaza benzer şekilde atmosferik havadan NO gazı üreten cihazla (Inosante Medical Inc/Türkiye) 200 ppm dozda 60 ve 120 sn/gün süre ile 2 mm mesafeden NO uygulamaları diyabetik ratlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde iyileşmeye katkı sağladı.

Klinik makroskopik gözlemlerimize göre 3. Günden itibaren kontrol grubu deneklerde enfeksiyon belirtisi olan biyofilimler gözlenirken NO uygulanan her iki grupta da enfeksiyon belirtisinin gözlenmediği ve 7. Günden itibaren 14. Güne kadar da NO gruplarında yara alanı küçülmesinin devam ederek arttığı gözlenmesi sübjektif olarak NO gazının antibakteriel etkinliğine yorumlandı. Bununla beraber kontrol grubu ile NO grupları arasında hem yara alanı küçülmesi açısından tedavinin 7. Gününden 14. Gününe kadar ($p<0.05$) hem de yara kontraksiyon hızı açısından NO60 ile NO120 gruplarının sırası ile 0. gün ile 14. gün arasında ($p=0.033$, $p=0.049$) anlamlı farklılığın bulunması; NO nun 60 ve 120 sn uygulamalarının diyabetik yara iyileşmesine katkı sağladığını gösterdi. NO molekülünün anti-inflamatuar etkisi bilinmekte olup, inflamasyonun devamlılığı, inflamasyon fazından yara iyileşmesinin diğer fazlarına ilerlemesini engellediği için diyabetik yaraların tedavisinde inflamasyonu kontrol etmek öncelikli olmalıdır.

Çalışmada inflamatuvar hücre sayısı yönünden kontrol grubu deneklerde NO uygulanan deneklere oranla anlamlı bir yükseliş olduğu gözlemlendi. NO nun hem 60 sn hem de 120 sn uygulamalarının olumlu sonuç verdiğini, inflamasyonu modüle ettiğini belirlememize neden oldu ($p<0.05$).

Kontrol grubunda yara alanında epitelizasyonun hiç gelişmediği, nötrofil ağırlıklı artmış inflamatuvar hücreler ile nekrotik alanların varlığı gözlemlendi. Epitelizasyon değerlendirilmesinde kontrol grubu ile NO uygulanan gruplar arasında önemli fark vardı ($p<0.01$) ve Her iki sürede NO uygulamasının epitelizasyona katkı sağladığı gözlemlendi. Düşük konsantrasyonlarda NO gazının; cildin kollajen sentezi üzerine uyarıcı etkisi bulunurken, yüksek konsantrasyonlarda bu etkinin ortadan kalktığı bildirilmiştir. NO gazının bifazik etkileri ile metabolitlerinin keratinosit proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılmış ve NO gazının düşük konsantrasyonlarda keratinosit proliferasyonunu arttırdığı ancak yüksek konsantrasyonlarda bu etkinin değiştiği gösterilmiştir. NO gazı uygulamaları ECM gen ekspresyonunda önemli mekanizmaları ortaya çıkardığı, hücre içi cGMP

seviyelerini ve kollajen ekspresyonunda yer alan cGMP sinyal yolağını arttırdığı gösterilmiştir (Miersch vd., 2008).

Çalışmada NO gazının 60 ve 120 sn sürelerde uygulamasının kollajen organizasyonuna olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiş, kontrol grubu ile sırası ile NO 60 ve NO 120 grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$, $p<0.01$).

Her iki NO grubunda 60 ve 120 sn 200 ppm NO dozlama anjiyogenezis değerinde anlamlı bir fark göstermemiş olması Ghaffari vd., (2007)' nin bulgularını destekledi ve NO uygulamasının angiogenezise bir etki yaratmadığı gözlemlendi.

Ekzojen NO gazının 200 ppm'lik bir konsantrasyonda 8-12 saatlik uygulamasının güçlü antimikrobiyal özellikler sergilediği bilinir ancak NO gazının 24 saat süresince 400 ppm dozda uygulaması insan dermal fibroblast proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. NO gazının deri enfeksiyonlarında kullanılması için dermal hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin en aza indirilmesi gereklidir. NO gazı sitotoksik etkilerini en aza indirmek için; hücreler her gün 8 saat atmosferik hava ve NO gazına maruz bırakılmış ve dermal hücreler 200 ppm NO gazının sitotoksik ve sitostatik etkilerine karşı güçlü direnç göstermiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da keratinositlerin diğer cilt hücreleri ile karşılaştırıldığında NO tedavisine daha duyarlı oldukları gözlenmiştir (Ghaffari vd., 2006; Ghaffari vd., 2007).

Çalışmada NO dozlama sürelerindeki riskler göz önüne alındığı ve mümkün olan en etkin ve kısa uygulama sürelerinin belirlenmesi amacı ile 60 ve 120 sn NO uygulamaları denenmiş ve diyabetik yara iyileşmesine eşit katkı sağladığı gözlenmiştir. Diyabetik yara iyileşmesinde NO gazı uygulamaları klinik pratikte 2 yıldan uzun süredir kronik diyabetik ayak ülserine sahip bir hastada denenmiş ve diyabetik yaraya 200 ppm NO, 14 gün boyunca uygulanmış, kötü kokulu olan enfekte yaranın hızlı bir şekilde iyileştiği ve 3. Günde sağlıklı granülasyon dokusunun oluştuğu, 14. günde ülser alanının %70 oranında azaldığı tedaviden 6 hafta sonra da yaranın %90 iyileştiği belirtilmiştir (Miller vd., 2004).

Bu umut verici ön vaka çalışması, gaz halindeki NO'nun etkinliğinin bir insan deneğinden hayvan modeline geçerek istatistiksel analizli çalışmalar ile desteklenmiştir. Gaz NO'nun bir fare lenfosit modeli kullanılarak 8 saat boyunca 5,

25, 75 ve 200 ppm'de güvenli bir şekilde dozlanabileceğini bildirmiş ve 200 ppm'e kadar güvenli kullanımını belirtmiştir (Rezakhanlou vd., 2011).

NO'nun antibakteriyel etkisine özel ilgi duyan Ghaffari vd., (2007), ağır *Staphylococcus aureus* ile enfekte yaralara sahip tavşanlarda 8 saatlik 200 ppm NO uygulamasının kollajenasyonu iyileştirdiğini ve gaz NO nun güçlü bir antibakteriyel ajan olduğunu belirtmiştir.

Bir başka çalışmada toksisite endişelerini azaltmak için günde bir kez 6 gün boyunca yalnızca 60 saniye süreyle 500 ppm'ye kadar NO konsantrasyonları hem enfekte hem de temiz yaraları olan sıçanlara uygulanmış ve azalmış doku hipoksisi ve mikrobiyal enfeksiyon, artan anjiyogenez, önemli ölçüde azalmış iyileşme süresi ve gelişmiş doku morfolojisi bildirilmiştir. Spesifik olarak yazarlar gaz halindeki NO'ya maruz kalmanın yara dokusundaki peroksinitrit seviyelerini arttırdığını, sitotoksik bir serbest radikal olan peroksinitritin NO üretimi de dahil olmak üzere koruyucu mekanizmaların mobilizasyonunu başlattığını bildirmişlerdir. Bununla beraber NO tedavisinde bozulmuş kronik yaraların iyileşme sürecini düzenleyen artmış doku NO seviyelerinin eşlik ettiğini tespit etmişlerdir (Shekhter vd., 2005). NO'nun enfekte yaralarda bakteri yükünü azalttığı gösterilmiş olsa da, gaz halindeki NO'nun enflamatuar süreç üzerinde doğrudan etkisini anlamak için daha çok araştırmaya ihtiyaç olduğu da belirtilmiştir (Yang vd., 2015).

Çürükoğlu, vd., (2023), deneysel diyabetik rat modeli oluşturmuş ve yara iyileşmesinde 200 ppm dozda 90 sn NO uygulamalarının yara alanı küçülmesi ve kontraksiyon hızına önemli katkı sağladığını, İL-8 ve TGF-beta'nın da değerlendirilmesi ile ortaya koymuştur.

Çalışmada 200 ppm dozlarda değişik sürelerde uygulanan NO nun bakteri yükünü önemli ölçüde azaltarak yara enfeksiyonunu engellediği subjektif olarak gözlenmiştir. Bununla beraber NO uygulamalarının inflamasyonu modüle ettiği, epitelizasyonu ve kollajenasyonu desteklediği, yara alanı küçülmesi ile kontraksiyon hızına olumlu etkisinin olduğu istatistiksel olarak gözlenmiştir. Bununla beraber yara iyileşmesinde 60 ve 120 sn NO uygulamalarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak yaklaşık 3 cm² lik defekti olan diyabetik rat yaralarında 60 sn NO gazının 200 ppm dozda sirküler olarak 2mm mesafeden uygulamanın yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

BÖLÜM VI

Sonuç ve Öneriler

Çalışma klinik, histolojik ve istatistiksel analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde; diyabetik ratlarda yara iyileşmesinde 2 mm mesafeden 60 sn ve 120 sn süreyle 200 ppm dozunda ekzojen NO gazı uygulamalarının, sübjektif olarak biyofilim oluşturmada yara iyileşmesine antibakteriyel katkı sağladığı gözlemlendi.

NO uygulamaları artmış yara alanı küçülmesi, yara kasılma hızı, epitelizasyon ve kollajen organizasyonunu ile iyileşmeye katkı sağladı. Özellikle diyabet yaralarında uzun süreli enflamasyonun iyileşmedeki olumsuz etkisi göz önüne alındığında hem 60 hem de 120 sn/gün NO dozlamasının inflamatuvar hücre sayısını azaltarak iyileşmesine eşit katkı sağladığı belirlendi.

SAP/NO cihazının anlamsız aşırı kullanımı gereksizliğinden yola çıkarak en azından 3 cm² lik defekti olan diyabetik rat yaralarında 60 sn NO gazının 200 ppm dozda sirküler olarak 2 mm mesafeden uygulamanın yeterli olduğu sonucuna varıldı.

Bu bulgular eşliğinde NO gazını 3 cm² lik yara alanında 60 sn uygulamanın yeterli olması sonucu bize daha ileride yapılması gerekli görülen yara alanı büyüklüğü, uygulama süresi ve uygulama mesafesi ile alakalı formülasyonların yolunu açacak ileri çalışmaları düşünmemize neden oldu.

Nitrojen monoksit (NO) hem hücreler hem de tüm vücudun metabolik süreçlerinin regülasyonu için evrensel bir regülatördür. Hücre membranından yüksek oranda geçebilme kabiliyetine sahip olduğundan dolayı NO, hayvanların neredeyse tüm organları ve dokularına etki eder ve sinyal molekülü fonksiyonu görür. Hücre membranından diffüz bir şekilde geçip hücre içindeki hedefine ulaşabildiğinden dolayı hücre reseptörlerine ihtiyaç duymaz.

Cihaz tarafından üretilen gaz akımının bir parçası olan ekzojen nitrojen monoksit, yara iyileşmesinde büyük etki gösteren bir faktördür. Eğer cihaz, yara yüzeyine terapötik etkisini yapabileceği bir mesafeye konulursa yüksek konsantrasyonda NO molekülüne (200-300 ppm) sahip olan bir gaz akımı oluşturur. Cihaz, veteriner sahasında biyolojik dokulara NO içeren gaz karışımı vermek için dizayn edilmiştir ve NO üreten bir ünite ve bu gazın yönlendirilmesini sağlayan ışıklandırılmış bir boruya sahiptir.

SAP/NO cihazı veteriner hekimlikte; tüm postoperatif yaralarda süpürasyonun şekillenmemesi ve iyileşmenin hızlanması, ineklerde mastitis tedavisi, büyük ve küçük baş hayvanlarda furunkulozis ve meme fissürlerinin tedavisi, atlarda üveitis'in tedavisi, büyük ve küçük baş hayvanlarda korneal hasarların ve panoftalmitisin tedavisi, at ve sığırlarda aseptik artritisin ve tırnak hastalıklarının tedavisinde umut vaad eder. Klinik pratiğe geçmesine yönelik daha fazla çalışmanın yapılması önem arz eder. Tek seferde maksimum uygulanabilecek tedavi süresinin 20 dk olması nedeni ile yara alanına göre cihazdan optimum sürede faydalanma gerekliliği ön planda olmalı ve bu bağlamda daha fazla hem deneysel hem de saha çalışmasının yapılması planlanmalıdır.

KAYNAKÇA

- Abdelkader, D. H., Osman, M. A., Elgizaway, S. A., Faheem, A., & McCarron, P. A. (2016). The role of insulin in wound healing process: mechanism of action and pharmaceutical applications. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 2(1).
- Achar, R. A. N., Silva, T. C., Achar, E., Martines, R. B., & Machado, J. L. M. (2014). Use of insulin-like growth factor in the healing of open wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta cirurgica brasileira*, 29, 125-131.
- Achkasov, E. E., Esipov, A. V., Pekshev, A. V., & Musailov, V. A. (2018). Use of an exogenous nitric oxide generator for treatment of peritonitis. *Biomedical Engineering*, 52(1), 64-68 pharmaceutical applications. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 2(1).
- Ahmed, R., Augustine, R., Chaudhry, M., Akhtar, U. A., Zahid, A. A., Tariq, M., ... & Hasan, A. (2022). Nitric oxide-releasing biomaterials for promoting wound healing in impaired diabetic wounds: State of the art and recent trends. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112707.
- Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, 15(7), 539-553.
- Anuk, T., Öztürk, S., Özaydın, İ. et al (2016). Comparison of Three Fixation Methods for the prevention of wound contractions in diabetic and non-diabetic mice with full-thickness skin excision. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*; 22:648-51.
- Ashcroft, G. S., Mills, S. J., Flanders, K. C., Lyakh, L. A., Anzano, M. A., Gilliver, S. C., & Roberts, A. B. (2003). Role of Smad3 in the hormonal modulation of in vivo wound healing responses. *Wound repair and regeneration*, 11(6), 468-473.

- Bae, S. H., Bae, Y. C., Nam, S. B., & Choi, S. J. (2012). A skin fixation method for decreasing the influence of wound contraction on wound healing in a rat model. *Archives of plastic surgery*, *39*(05), 457-462.
- Bardill, J. R., Laughter, M. R., Stager, M., Liechty, K. W., Krebs, M. D., & Zgheib, C. (2022). Topical gel-based biomaterials for the treatment of diabetic foot ulcers. *Acta biomaterialia*, *138*, 73-91.
- Batinić-Haberle, I., Rebouças, J. S., & Spasojević, I. (2010). Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Antioxidants & redox signaling*, *13*(6), 877-918.
- Berry-Kilgour, C., Cabral, J., & Wise, L. (2021). Advancements in the delivery of growth factors and cytokines for the treatment of cutaneous wound indications. *Advances in wound care*, *10*(11), 596-622.
- Bowers, S., & Franco, E. (2020). Chronic wounds: evaluation and management. *American family physician*, *101*(3), 159-166.
- Bryan, N. S. (2015). Nitric oxide enhancement strategies. *Future science OA*, *1*(1).
- Burgess, J. L., Wyant, W. A., Abdo Abujamra, B., Kirsner, R. S., & Jozic, I. (2021). Diabetic wound-healing science. *Medicina*, *57*(10), 1072.
- Chirikova, E. G., Shulutko, A. M., Shekhter, A. B., Pekshev, A. V., Mansurova, G. T., & Krylov, A. Y. (2003). The application of exogenous nitric oxide in the complex treatment of trophic ulcers of the venous etiology. *Ros. Med. Zh.(Rus.)*, *3*, 14-16.
- Crona, L., Ebert, E., & Cummings, F. (2017). Pathologic Basis of Veterinary Disease.
- Curukoglu, A., Gungor, G. C. A., Akan, G., Kukner, A., Ogutcu, G., Kalayci, M., ... & Ozgencil, F. E. (2023). The effect of cold atmospheric plasma (NO) alone and in combination with NPH insulin on the full-thickness excisional wound healing in a diabetic rat model. *Veterinárni medicína*, *68*(4), 152-163.

- Clark, R. H., Kueser, T. J., Walker, M. W., Southgate, W. M., Huckaby, J. L., Perez, J. A., ... & Kinsella, J. P. (2000). Low-dose nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *New England Journal of Medicine*, 342(7), 469-474.
- Egan, B. M., Greene, E. L., & Goodfriend, T. L. (2001). Insulin resistance and cardiovascular disease. *American journal of hypertension*, 14(S3), 116S-125S.
- Elvis, A. M., & Ekta, J. S. (2011). Ozone therapy: A clinical review. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 2(1), 66.
- Falanga, V., Isseroff, R. R., Soulika, A. M., Romanelli, M., Margolis, D., Kapp, S., ... & Harding, K. (2022). Chronic wounds (Primer). *Nature Reviews: Disease Primers*, 8(1).
- Fossum, T.W. (Ed) (2017). Small animal surgery, Mosby, Missouri, (China),707-717
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
- Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N., & Fridman, A. (2008). Applied plasma medicine. *Plasma processes and polymers*, 5(6), 503-533.
- Ghaffari, A., Jalili, R., Ghaffari, M., Miller, C., & Ghahary, A. (2007). Efficacy of gaseous nitric oxide in the treatment of skin and soft tissue infections. *Wound repair and regeneration*, 15(3), 368-377.
- Ghaffari, A., Miller, C. C., McMullin, B., & Ghahary, A. (2006). Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric oxide*, 14(1), 21-29.
- Gosain, A., & DiPietro, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World journal of surgery*, 28, 321-326.
- Grada, A., Mervis, J., & Falanga, V. (2018). Research techniques made simple: animal models of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(10), 2095-2105.

- Güngör G Ç A, Gültekin Ç, Kükner A, Etikan İ, Temizel M, Özgencil FE (2022). Effect of Topical Insulin and Ozonized Cream for the Treatment of Full-thickness Dermal Burn Injuries: A Clinical and Histopathological Study in Diabetic Rats. *Pakistan Veterinary Journal* 42 (2).
- Hoang, T. P. N., Ghori, M. U., Ousey, K., & Conway, B. (2022). Current and advanced therapies for chronic wound infection: An overview of chronic wounds, including their physiology, causes and management options. *Pharmaceutical Journal*, 309(7963).
- Koivisto, L., Heino, J., Häkkinen, L., & Larjava, H. (2014). Integrins in wound healing. *Advances in wound care*, 3(12), 762-783.
- Koyutürk, A., & Soyaslan, D. D. (2016). Yara ve Yanık Tedavisinde Kullanılan Örtüler. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(Özel (Special) 1), 58-65.
- Krausz, A., & Friedman, A. J. (2015). Nitric oxide as a surgical adjuvant. *Future science OA*, 1(1).
- Krotovsky, G., Pekshev, A., Zudin, A., Uchkin, I., Atkova, Y., & Mosesov, A. G. (2002). Exogenous nitric oxide therapy: a new method for stimulating the healing of trophic ulcers in patient with chronic venous insufficiency of the lower extremities. *Thorac. Cardiovasc. Surg.(Rus.)*, 1, 37-41.
- Kumar, S., Singh, R. K., & Bhardwaj, T. R. (2017). Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 182-201.
- Lajoix, A. D., Reggio, H., Chardes, T., Péraldi-Roux, S., Tribillac, F., Roye, M., ... & Gross, R. (2001). A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic β -cells controls insulin secretion. *Diabetes*, 50(6), 1311-1323.
- Lipatov, K. V., Emelyanov, A. Y., Farhat, F. A., Ondar, S. O., & Kupriyanov, Y. V. (2002). The role of laser Doppler flowmetry in a comprehensive assessment of microcirculatory disturbances in the wound area. In *Application of laser Doppler flowmetry in medical practice: Proceedings of the IV All-Russian Symposium.*—M (pp. 131-3).

- Lozier, S. M. (1993). Topical wound therapy. *Surgical complications and wound healing in small animal practice*, 63-88.
- Lux, C. N. (2022). Wound healing in animals: a review of physiology and clinical evaluation. *Veterinary dermatology*, 33(1), 91-e27.
- Malone-Povolny, M. J., Maloney, S. E., & Schoenfisch, M. H. (2019). Nitric oxide therapy for diabetic wound healing. *Advanced healthcare materials*, 8(12), 1801210.
- Martinengo, L., Olsson, M., Bajpai, R., Soljak, M., Upton, Z., Schmidtchen, A., ... & Järbrink, K. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of epidemiology*, 29, 8-15.
- Masson-Meyers, D. S., Andrade, T. A., Caetano, G. F., Guimaraes, F. R., Leite, M. N., Leite, S. N., & Frade, M. A. C. (2020). Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International journal of experimental pathology*, 101(1-2), 21-37.
- Marakhonich, L., Bordenyuk, V., Pekshev, A., & Vagapov, A. (2016). Effective clinical use of NO-containing gas flow generated by air-plasma in outpatient settings, *Ambulatoynaya Khirurgiya-Statsionarzameschayuschie Tekhnologii Ambul. Surg.-Inpatient-Care-Replacing Technol.(Rus.)*, 61, 97-100.
- Mieczkowski, M., Mrozikiewicz-Rakowska, B., Kowara, M., Kleibert, M., & Czupryniak, L. (2022). The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7930.
- Miersch, S., Espey, M. G., Chaube, R., Akarca, A., Tweten, R., Ananvoranich, S., & Mutus, B. (2008). Plasma membrane cholesterol content affects nitric oxide diffusion dynamics and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18513-18521.

- Miller, C. C., Miller, M. K., Ghaffari, A., & Kunimoto, B. (2004). Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: a case study. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 8(4), 233-238.
- Muguet-Chanoit, A. C., Olby, N. J., Babb, K. M., Lim, J. H., Gallagher, R., Niman, Z., ... & Campbell, J. (2011). The sensory field and repeatability of the cutaneous trunci muscle reflex of the dog. *Veterinary Surgery*, 40(7), 781-785.
- Nakatsukasa, H., Evarts, R. P., Hsia, C. C., & Thorgeirsson, S. S. (1990). Transforming growth factor-beta 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 63(2), 171-180.
- Naldaiz-Gastesi, N., Bahri, O. A., Lopez de Munain, A., McCullagh, K. J., & Izeta, A. (2018). The panniculus carnosus muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. *Journal of anatomy*, 233(3), 275-288.
- Narayan, K. V., Boyle, J. P., Thompson, T. J., Sorensen, S. W., & Williamson, D. F. (2003). Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *Jama*, 290(14), 1884-1890.
- Özaydın İ, Aksoy Ö, Yayla S, Kurt B, Kılıç E, Bingöl SA, Can İ, Deprem T: Clinical, histopatological and immunohistochemical evaluation of the effects of topical NPH-insulin on full-thickness open wounds: An *in-vivo* study in diabetic and non-diabetic mice. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 65, 219-228, 2018. DOI: 10.1501/Vetfak_0000002850
- Özaydın İ: Yara. In, Özaydın İ (Ed): *Veteriner Genel Cerrahi*. s. 729-752, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri. Ankara, 2023. ISBN: 978-625-7564-88-5
- Pavletic, M. M. (2010). Basic principles of wound healing. *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery*, 3.
- Pavletic, M. M. (Ed.). (2018). *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery*. John Wiley & Sons.

- Pekshev, A. V., Shekhter, A. B., Vagapov, A. B., Sharapov, N. A., & Vanin, A. F. (2018). Study of plasma-chemical NO-containing gas flow for treatment of wounds and inflammatory processes. *Nitric Oxide*, *73*, 74-80.
- Perez-Favila, A., Martinez-Fierro, M. L., Rodriguez-Lazalde, J. G., Cid-Baez, M. A., Zamudio-Osuna, M. D. J., Martinez-Blanco, M. D. R., ... & Garza-Veloz, I. (2019). Current therapeutic strategies in diabetic foot ulcers. *Medicina*, *55*(11), 714.
- Reshetov, I. V., Kabisov, R. K., Shekhter, A. B., Pekshev, A. V., & Maneilova, M. V. (2000). The use of a 'Plason' air-plasma apparatus for coagulation and NO-therapy in plastic reconstructive surgery for oncologic patients. *Ann. Plastic, Reconstr. Aesthetic Surg*, *4*, 24-38.
- Rezakhanlou, A. M., Miller, C., McMullin, B., Ghaffari, A., Garcia, R., & Ghahary, A. (2011). Gaseous nitric oxide exhibits minimal effect on skin fibroblast extracellular matrix gene expression and immune cell viability. *Cell Biology International*, *35*(4), 407-415.
- Riedl, E., Pfister, F., Braunagel, M., Brinkkötter, P., Sternik, P., Deinzer, M., ... & Koepfel, H. (2011). Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cellular physiology and biochemistry*, *28*(2), 279-288.
- Schwentker, A., & Billiar, T. R. (2003). Nitric oxide and wound repair. *Surgical Clinics*, *83*(3), 521-530.
- Seifter, E., Rettura, G., Barbul, A., & Levenson, S. M. (1978). Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery*, *84*(2), 224-230.
- Silva, V., Peirone, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Marques-Magallanes, J. A., Pires, I., ... & Poeta, P. (2021). Topical application of ozonated oils for the treatment of MRSA skin infection in an animal model of infected ulcer. *Biology*, *10*(5), 372.
- Shekhter, A. B., Kabisov, R. K., Pekshev, A. V., Kozlov, N. P., & Perov, Y. L. (1998). Experimental and clinical validation of plasmadynamic therapy of

wounds with nitric oxide. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 126, 829-834.

- Shekhter, A. B., Serezhenkov, V. A., Rudenko, T. G., Pekshev, A. V., & Vanin, A. F. (2005). Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. *Nitric oxide*, 12(4), 210-219.
- Shekhter, A. B., Pekshev, A. V., Vagapov, A. B., Telpukhov, V. I., Panyushkin, P. V., Rudenko, T. G., ... & Vanin, A. F. (2019). Physicochemical parameters of NO-containing gas flow affect wound healing therapy. An experimental study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 128, 193-201.
- Shi, H. P., Efron, D. T., Most, D., Tantry, U. S., & Barbul, A. (2000). Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery*, 128(2), 374-378.
- Shulutko, A. M., Antropova, N. V., & IuA, K. (2004). NO-therapy in the treatment of purulent and necrotic lesions of lower extremities in diabetic patients. *Khirurgiia*, (12), 43-46.
- Suschek, C. V., & Opländer, C. (2016). The application of cold atmospheric plasma in medicine: The potential role of nitric oxide in plasma-induced effects. *Clinical Plasma Medicine*, 4(1), 1-8.
- Stanley B.J. & Cornell K. (2018). Johnston S.A. & Tobias K.A.(Ed), *Veterinary Surgery Small Animal* (2.baskı, s. 132-148). Elsevier.
- Vasilets, V. N., Shekhter, A. B., Guller, A. E., & Pekshev, A. V. (2015). Air plasma-generated nitric oxide in treatment of skin scars and articular musculoskeletal disorders: Preliminary review of observations. *Clinical Plasma Medicine*, 3(1), 32-39.
- Wang, L., Yang, B., Jiang, H., Yu, G., Feng, M., Lu, X., ... & Liu, H. (2019). The molecular mechanism study of insulin in promoting wound healing under high-glucose conditions. *Journal of cellular biochemistry*, 120(9), 16244-16253.

- Yang, Y., Qi, P. K., Yang, Z. L., & Huang, N. (2015). Nitric oxide based strategies for applications of biomedical devices. *Biosurface and Biotribology*, *1*(3), 177-201.
- Zahid, A. A., Ahmed, R., ur Rehman, S. R., Augustine, R., Tariq, M., & Hasan, A. (2019). Nitric oxide releasing chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel promotes angiogenesis in chick embryo model. *International journal of biological macromolecules*, *136*, 901-910.
- Zahid, A. A., Augustine, R., Dalvi, Y. B., Reshma, K., Ahmed, R., ur Rehman, S. R., ... & Hasan, A. (2021). Development of nitric oxide releasing visible light crosslinked gelatin methacrylate hydrogel for rapid closure of diabetic wounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *140*, 111747.
- Zarei, F., & Soleimanejad, M. (2018). Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial cells, nanomedicine, and biot*

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 21/04/2022
 Toplantı No : 2022/149
 Proje Başvuru No : 149

Yakın Doğu Üniversitesi, Veteriner Hekimliği Fakültesi'nden, sorumlu araştırmacı Prof. Dr. Eser Özgencil tarafından hazırlanan 'Doku Kayıplı Diabetik Ratlarda Nitrik Oksit Gazı (gNO) nun yaraya uygulama süreçlerinin iyileşmeye olan katkısının klinik, histopatolojik ve immunhistokimyasal değerlendirilmesi.' başlıklı araştırma önerisi başlıklı kurumumuzca uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Emine KOÇ	(BAŞKAN)	
2. Prof. Dr. Tamer YILMAZ	(ÜYE)	
3. Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU	(ÜYE)	
4. Prof. Dr. Dilek ARSOY	(ÜYE)	
5. Prof. Dr. Aysel KÜKNER	(ÜYE)	
6. Prof. Dr. Vedat SAĞMANLIĞIL	(ÜYE)	
7. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ	(ÜYE)	
8. Vet. Hek. Ahmet SERHATOĞLU	(ÜYE)	
9. Vet. Hek. Meliha TEMİZEL	(ÜYE)	
10. Avukat Burak NOLAN	(ÜYE)	

Ek 2. İntihal Raporu

12%

SIMILARITY INDEX

11%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

docs.neu.edu.tr

Internet Source

7%

2

iksadyayinevi.com

Internet Source

1%

3

www.nuketeroglu.com

Internet Source

1%

4

www.hakanbuzoglu.com

Internet Source

<1%

5

acikbilim.yok.gov.tr

Internet Source

<1%

6

dspace.akdeniz.edu.tr:8080

Internet Source

<1%

7

A Curukoglu, G Ciray Akbas Gungor, G Akan, A Kukner, G Ogutcu, M Kalayc&#, M Temizel, FE Ozgencil. "The effect of cold atmospheric plasma (NO) alone and in combination with NPH insulin on the full-thickness excisional wound healing in diabetic rat model", Veterinární medicína, 2023

Publication

<1%

8

www.kadriyeakar.com

Internet Source

<1%

9

www.doczz.it

Internet Source

<1%

10	tr.wikipedia.org Internet Source	<1 %
11	aof.sorular.net Internet Source	<1 %
12	9lib.net Internet Source	<1 %
13	www.dergipark.ulakbim.gov.tr Internet Source	<1 %
14	Virginie Mariot, Romain Joubert, Anne-Charlotte Marsollier, Christophe Hourdé, Thomas Voit, Julie Dumonceaux. "A Deoxyribonucleic Acid Decoy Trapping DUX4 for the Treatment of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy", Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2020 Publication	<1 %
15	ERARSLAN, Elife, TÜRKAY, Cansel, UZ, Burak, KAYA, Arif, KOCA, Cemile, BAYRAK, Reyhan and ALICI, Özlem. "The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on acetic acid induced colitis in rats", Türkiye Sağlık ve Tedavi Vakfı, 2010.	<1 %
Publication		
16	medium.com Internet Source	<1 %
17	dspace.akdeniz.edu.tr Internet Source	<1 %
18	ZORLU, FERHAT, Pervin CINAR, Enis FIRINCIOGULLARI, Ahmet SAHIN, and Emrah Mat. "COMPARISON OF DIFFERENT SURGICAL	<1 %

19	docplayer.biz.tr Internet Source	<1 %
20	repozitorij.vef.unizg.hr Internet Source	<1 %
21	www.florence.com.tr Internet Source	<1 %
22	acikerisim.uludag.edu.tr Internet Source	<1 %
23	core.ac.uk Internet Source	<1 %
24	earsiv.odu.edu.tr:8080 Internet Source	<1 %
25	iyibesleiyihisset.com	

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı** : Görkem Tatlıcıoğlu
2. **Doğum Tarihi** : 26/01/1993
3. **Unvanı** : Veteriner Hekim
4. **Öğrenim Durumu** : Doktora
5. **Çalıştığı Kurum** : Yakın Doğu Üniversitesi Veteriner Hekimliği
Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Veteriner Fakültesi- Veteriner Hekimliği	İstanbul Üniversitesi	2011-2016
Doktora	Cerrahi Anabilim Dalı	Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi	2017



Michał Załęcki

Alic: ben ▾

Dear Author,

Your article has been accepted. Congratulations.

All future steps are depicted at our website.

Kind regards,

Michał Zalecki

--

dr hab. n. wet. Michał Załęcki, prof. UWM

Katedra Anatomii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Redaktor Naczelny

Polish Journal of Veterinary Sciences

<http://pjvsci.uwm.edu.pl/>

tel. +48 89 5234922

DVM, PhD, Associate Prof, Michał Zalecki

Department of Animal Anatomy

Faculty of Veterinary Medicine

University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland
