TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BOTULİNUM TOKSİN A'NIN YARA İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİLERİNİN DİYABETİK HAYVAN MODELİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Dr. Barış HAZIR

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan UNCU

Ankara

2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BOTULİNUM TOKSİN A'NIN YARA İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİLERİNİN DİYABETİK HAYVAN MODELİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Dr. Barış HAZIR

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan UNCU

Ankara

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Botulinum Toksin A'nin Yara Iyileşmesine Olan Etkilerinin Diyabetik Hayvan Modeli Üzerinde Incelenmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 28.04.2021 tarihinde, 2021-9-63 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Barış HAZIR

Tarih: 06.12.2021

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU



KABUL VE ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Dr.Barış HAZIR	**Sınav tarihi:** 03 /12 / 2021
Anabilim/Bilim Dalı: Genel Cerrahi	
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan UNCU	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER
Tezin Başlığı: BOTULİNUM TOKSİN A'NIN YARA İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİLERİNİN DİYABETİK HAYVAN MODELİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ
Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine ☐ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Ahmet Nezih ERVERDİ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Hakan UNCU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Kamil GÜLPINAR
Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Beş yıllık uzmanlık eğitimim sürecinde kendisiyle çalışmaktan büyük bir keyif ve mutluluk duyduğum, akademik gelişimim üzerindeki etkisi sebebiyle her zaman kendisine minnettar olacağım ve bu araştırmanın gerçekleşmesi için gerekli şartların hazırlanmasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, araştırmanın oluşum aşamasında ve sonrasında değerli katkılarını ve desteğini sunan tez danışmanım Prof. Dr. Hakan Uncu'ya,

Tezimin yapım ve yazım aşamalarında sonuna kadar desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı Ankara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. Oya Evirgen'e,

Deney yapım aşamasında ve sonrasında koşullar her ne olursa olsun hiçbir toplantıyı kaçırmayan ve tezi bir bina gibi inşa etmemi sağlayan kardeşim Op. Dr. Berk Hazır ve Dr. Volkan Tümer'e,

Mesleki kimliğimin oluşumunda ve gelişmesinde büyük katkıları olan, genel cerrahi konusundaki bilgi ve becerilerini, temel prensipleri ve cerrahi disiplini bana aktaran başta anabilim dalı başkanlarımız Prof. Dr. Ahmet Nezih Erverdi ve Prof. Dr. Ayhan Bülent Erkek olmak üzere tüm saygıdeğer hocalarıma,

İhtisas sürem boyunca çok şey paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma,

İş hayatında birlikte çalıştığımız servis, poliklinik ve ameliyathane hemşireleri, teknisyen ve personellerine,

"Türkiye'de tıbbın amiral gemisi Ankara Tıp Fakültesi Genel Cerrahi'dir." sözü ile beni cerrahi disiplinde yetiştirip büyüten ve bu kliniğe girmem için her türlü desteği sağlayan canım babam Zekayi Hazır'a,

Koşullar her ne olursa olsun beni büyüten , her sevinç ve üzüntümde yanımda olduğunu bildiğim canım annem Serpil Hazır ve kardeşim Bulut Hazır'a,

Asistanlık eğitimimin başında tanıştığım, bu süre boyunca bana karşı olan sevgisi ve sabrı ile yanımda olduğunu bildiğim sevgili eşim Pelin Uğuz Hazır'a,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan i

Özgünlük Raporu ii

Kabul ve Onay Sayfası iii

Önsöz iv

İçindekiler v

Simgeler ve Kısaltmalar vii

Şekiller Dizini viii

Tablolar Dizini ix

Resimler Dizini x

1. TÜRKÇE ÖZET 1

2. ABSTRACT 3

3. GİRİŞ VE AMAÇ 5

4. GENEL BİLGİLER 7

4.1. Yara İyileşmesi 7

4.2. Yara İyileşmesi Tipleri 8

4.3 Yara İyileşmesi Evreleri 8

4.3.1. İnflamatuvar Evre (Eksudatif Faz) 9

4.3.1.1. Artmış damarsal geçirgenlik 10

4.3.1.2. İnflamatuar fazda yer alan yara elemanları 11

4.3.2. Proliferatif Faz (Fibroblastik Faz) 11

4.3.2.1. Anjiyogenez 12

4.3.2.2. Fibroplazi 12

4.3.2.3. Epitelizasyon 13

4.3.2.4. Proliferatif fazda yer alan yara elemanları 13

4.3.3. Olgunlaşma (Maturasyon) ve Remodeling fazı 15

4.4. Botulinum Toksini 15
4.4.1. Botulinum toksininin tarihteki yeri 16
4.4.2. Botulinum toksininin yapısı 16
4.4.3. Botulinum toksini tip A (BTX-A)'nın etki mekanizması 17
4.4.4. Botulinum toksininin klinik kullanım prensipleri 18
4.4.5. Botulinum toksininin yan etkileri 18
5. GEREÇ VE YÖNTEM 19
5.1. Deney Hayvanları 19
5.2. Çalışma Modeli 19
5.2.1. Sıçanlarda Deneysel Tip 1 Diyabet Modeli 19
5.2.2. Yara Modeli Oluşturma ve Tedavi 20
5.2.3. Doku Takibi ve Histolojik İnceleme 22
5.3. İstatistik İnceleme 23
6. BULGULAR 24
6.1. Diyabet ve Kontrol Gruplarındaki Sıçanların Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması (Morfometrik Analiz) 24
6.3. Histomorfolojik- Histomorfometrik Analiz 29
7. TARTIŞMA 41
7.1. Çalışmamızın Güçlü Yanları ve Kısıtlılıkları 45
8. SONUÇ ve ÖNERİLER 46
9. KAYNAKLAR 48

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACH:	Asetilkolin
ADP:	Adenozin difosfat
ATP:	Adenozin trifosfat
BTX:	Botulinum Toksini
cm2:	Santimetre kare
DMF:	Dimetil fumarat
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
FDA:	Federal Drug Agency (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FGF:	Fibroblast Growth Factor
IGF – 1:	insülin benzeri büyüme faktörü – 1
IL:	İnterlökin
Kg:	kilogram
MMP:	Matriks metalloproteinaz
ml:	mililitre
mg:	miligram
NAD:	Nikotinamid adenin dinükleotid
PDGF:	platelet derive edici büyüme faktörü
SNAP -25:	Sinaptozomomal ilişkili protein – 25
STZ:	Streptozosin
TGF - β1:	Transforming Growth Factor – beta
TNF:	Tümör nekroze edici faktör
VEGF:	Damarsal endotelyal büyüme faktörü
vWF:	von Willebrand faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Yara iyileşmesi dönemleri ve bu dönemlerde etkili hücre tipleri(11)..... 9

Şekil 6.1. Hayvan örnekleminin oluşturulma basamakları 24

Şekil 6.2. Diyabetli grup ile kontrol grubundaki hayvanların günlere göre kilolarındaki değişim25

Şekil 6.3. Her farklı grupta yara alanı ortalamalarının günlere göre değişimi. 26

Şekil 6.4. Yara açıldıktan 5 gün sonra yapılan ölçümde değerlendirilen kapanma miktarı (*p<0,001)..... 27

Şekil 6.5. Yara açıldıktan 7 gün sonra yapılan ölçümde değerlendirilen kapanma miktarı (*p<0,001)..... 28

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler[27] 15

Tablo 4.2. Botulinum toksin tipleri, etki mekanizmaları 17

Tablo 4.3. Botulinum toksin kullanım alanları 18

Tablo 4.4. Botulinum Toksin yan etkileri 18

Tablo 6.1. Diyabetli grup ile kontrol grubundaki hayvanların günlere göre kilo ortalamaları 24

Tablo 6.2. Her grubun farklı ölçüm günlerindeki yara alanları 25

Tablo 6.3. Tüm grubun ve her alt grubun yara alanlarındaki 5. gün ve 7. gün değişim ortamaları 27

Tablo 6.4. Her alt grubun 5. güne kadar yara alanlarındaki ortalama değişiminin birbiriyle karşılaştırılması 28

Tablo 6.5. Her alt grubun 7. güne kadar yara alanlarındaki ortalama değişiminin birbiriyle karşılaştırılması 29

Tablo 6.6. Deri Yara iyileşme Skorunun belirlenmesinde kullanılan histolojik parametreler 30

Tablo 6.7. Kontrol ve deney gruplarında toplam yara iyileşme skoru..... 30

Tablo 6.8. Kontrol ve deney gruplarında Dermis granülasyon dokusu uzunluğu 40

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. İyileşme Yanıtları 7

Resim 5.1. Deney hayvanlarına intraperitoneal enjeksiyon uygulaması 20

Resim 5.2. Sıçanların ense bölgelerinin tıraş edilmesi, yara boyutlarının ölçümü ve %1'lik povidon-iyodür ile antisepsi uygulanması 21

Resim 5.3. Cilt ve cilt altını içerecek şekilde oluşturulan yara modeli 21

Resim 5.4. Yara çevresine BTX-A uygulaması 22

Resim 6.1. A) Kontrol, B) DM grupları. 31

Resim 6.1. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü D) DM+BTX-A grubu 32

Resim 6.2. A) Kontrol grubu, B) DM grubu 33

Resim 6.2. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu. D) DM+BTX-A grubu. 34

Resim 6.3. A) Kontrol, B) DM grupları 35

Resim 6.3. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu grubu. D) DM+BTX-A grubu. 35

Resim 6.4. A) Kontrol grubu, B) DM grubu. 36

Resim 6.5. A) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu. B) DM + BTX-A 37

Resim 6.6. A) Kontrol grubu, B) DM grubu. 38

Resim 6.6. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu. D) DM+BTX-A grubu. 39

Resim 6.7. DM+BTX-A grubu. 39

Resim 6.8. Yara uçları arasında granülasyon dokusu uzunluğu ölçümü 40

1. TÜRKÇE ÖZET

Botulinum Toksin A'nın Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin Diyabetik Hayvan Modeli Üzerinde İncelenmesi

Giriş: Farklı sebeplerle doku bütünlüğünün bozulması yara olarak tanımlanmaktadır. Yara oluşumuna pek çok etken yol açabileceği gibi, cerrahi işlemler de sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yara üzerindeki tekrarlayan basınç artışlarının yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür. Takiben yara bölgesindeki kas dokularının kasılmasını engelleyecek ve cilt gerginliğini azaltacak çeşitli uygulamalar üzerine çalışmalara yoğunlaşılmış, çeşitli yöntemlerle yara basıncı düşürülmüş ve yara iyileşmesi üzerine bu yöntemlerin olumlu etkileri gösterilmiştir.

Yara iyileşmesi sırasında yara dokusunun altında yer alan kas tabakasının kasılmasını önlemenin yara üzerindeki basıncı düşürerek ve inflamasyon ile proliferasyon fazlarını olumlu yönde etkileyerek yara iyileşme sürecini düzelteceği düşüncesi ile yola çıkılarak, Botulinum Toksini (BTX) enjeksiyonunun faydalı olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda, diyabetik hayvan modelinde, yara bakımında kullanılan salin ve yara bakım ürünlerine karşılık; BTX-A'nın yara iyileşmesindeki etkinliği araştırılmıştır. İlk defa ülkemizde planlanan bu çalışmanın sonuçlarının olumlu çıkması durumunda, özellikle zor iyileşen diyabetik yaralarda BTX-A'nın kullanımı konusunda çalışmamızın önemli klinik çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Yöntem: Çalışmamıza 72 hayvan dahil edildi. 55 hayvan diyabet modeli grubuna 17 hayvan ise kontrol grubu larak ayrıldı. Diyabet modeli oluşturulurken 24 hayvan çeşitli komplikasyonlar sonucu exitus oldu ve çalışmaya 48 hayvanla devam edildi. Yara modeli aşamasında diyabetik hayvanların ense bölgesine 1 cm^2 genişliğinde yara açılarak ve hayvanlar 4 farklı gruba ayrıldı. Yara modelinde yaralara; kontrol grubuna salin uygulandı. , diyabet olan birinci gruba salin uygulaması , ikinci gruba salin sonrası klorheksidinli yara bakım örütüsü uygulanması , üçüncü gruba ise salin sonrası yara çevresine BTX-A uygulanmıştır. Yaralar 5. ve 7. günlerde çapları ölçülmüş ve ardından 7. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek yara bölgeleri genişçe eksize edilmiştir. Ardından deri yara iyileşme skoruna göre histomorfometrik analiz yapılmıştır. Sonuçlar spss ile analiz edilmiştir.

Bulgular: 7. gün sonunda yara çapındaki değişim ortalama 0,77 cm iken alt gruplar tek tek analiz edildiğinde kontrol grubunda 0,76 cm, DM+ salin uygulanan grupta 0,72 cm, DM+ klorhekzidinli yara bakım örtüsü uygulanan grupta 0,67 cm ve DM+ BTX-A uygulanan grupta ise 0,90 cm olarak bulundu.

Toplam yara iyileşmesi skoru her bir hayvana ait incelenen parametrelerin skor değerlerinin toplamı ile elde edildi. Buna göre (9-13) arası gecikmiş yara iyileşmesi, (14-20) orta düzey yara iyileşmesi, (21-27) ileri düzey yara iyileşmesi olarak belirlendi. Yara iyileşme skoru hesaplanan gruplar ; Kontrol grubu 15,875, DM+Salin grubu 12,625, DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu 17,250, DM+Botoks grubu 23,875 olarak bulundu.

Sonuç: Çalışmamızda, diyabetik hayvan modelinde, yara bakımında kullanılan salin ve yara bakım ürünlerine karşılık; BTX-A'nın yara iyileşmesindeki etkinliği araştırılmıştır. Sonuç olarak 7. günün sonunda insizyon çapının en fazla değiştiği grup BTX-A uygulanan grup olduğu görülmüş ve ardından yapılan histolojik analizde ileri düzey yara iyileşmesi olduğu kanıtlanmıştır. Yara üzerinde BTX- A 'nın kullanıldığı çalışma sayısı az olmakla birlikte çalışmamızın diyabetik yaralarda BTX- A kullanımı konusunda diğer çalışmalara ışık tutucağını öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Yara, Botulinum Toxin A, Diyabet

2. ABSTRACT

Investıgatıon Of The Effects Of Botulınum Toxın A On Wound Healıng On A Dıabetıc Anımal Model

Entry: Disruption of tissue integrity due to different reasons is defined as wound. Wound formation can be caused by many factors, as well as surgical procedures. Studies have suggested that repetitive pressure increases on the wound are an important factor that negatively affects wound healing. Subsequently, studies were focused on various applications that would prevent the contraction of muscle tissues in the wound area and reduce skin tension, the wound pressure was reduced by various methods and the positive effects of these methods on wound healing were demonstrated.

It has been reported that Botulinum Toxin (BTX) injection may be beneficial, based on the idea that preventing the contraction of the muscle layer under the scar tissue during wound healing will improve the wound healing process by reducing the pressure on the wound and positively affecting the inflammation and proliferation phases. In our study, in the diabetic animal model, in response to saline and wound care products used in wound care; The effectiveness of BTX-A in wound healing has been investigated. If the results of this study, which is planned for the first time in our country, turn out to be positive, we think that our study on the use of BTX-A, especially in difficult-to-heal diabetic wounds, will shed light on important clinical studies.

Method: 72 animals were included in our study. 55 animals were assigned to the diabetes model group and 17 animals were assigned to the control group. While establishing the diabetes model, 24 animals died as a result of various complications and the study was continued with 48 animals. In the wound model stage, a 1 cm^2 wound was opened on the nape of the diabetic animals and the animals were divided into 4 different groups. Wounds in the wound model; Saline was administered to the control group. In the first group with diabetes, saline was applied to the second group, chlorhexidine wound care dressing was applied to the second group, and BTX-A was applied to the wound area after saline to the third group. The diameters of the wounds were measured on the 5th and 7th days, and then at the end of the 7th day, the animals were sacrificed and the wound sites were extensively excised. Then, histomorphometric analysis was performed according to the skin wound healing score. The results were analyzed with spss.

Result: While the mean change in wound diameter was 0.77 cm at the end of the 7th day, when the subgroups were analyzed individually, it was 0.76 cm in the control group, 0.72 cm in the DM+ saline group, 0.67 cm in the DM+ chlorhexidine wound care dressing group, and DM+ BTX- In group A, it was found to be 0.90 cm.

The total wound healing score was obtained by summing the score values of the parameters examined for each animal. Accordingly, (9-13) delayed wound healing, (14-20) moderate wound healing, (21-27) advanced wound healing were determined. Groups with calculated wound healing score; The control group was 15,875, the DM+Saline group was 12,625, the DM+ Chlorhexidine dressing group was 17,250, and the DM+Botox group was 23,875.

Conclusion: In our study, in the diabetic animal model, in response to saline and wound care products used in wound care; The effectiveness of BTX-A in wound healing has been investigated. As a result, at the end of the 7th day, it was observed that the group in which the incision diameter changed the most was the group in which BTX-A was applied, and advanced wound healing was proven in the histological analysis performed afterwards. Although the number of studies using BTX-A on wounds is few, we predict that our study will shed light on other studies on the use of BTX-A in diabetic wounds.

Key words: Wound, Botulinum Toxin A, Diabetes

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Doku bütünlüğünün çeşitli sebeplerle bozulması yara olarak tanımlanmaktadır. Yara oluşumuna pek çok etken yol açabileceği gibi, cerrahi işlemler de sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yara üzerindeki tekrarlayan basınç artışlarının yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür(1). Takiben yara bölgesindeki kas dokularının kasılmasını engelleyecek ve cilt gerginliğini azaltacak çeşitli uygulamalar üzerine çalışmalara yoğunlaşılmış, çeşitli yöntemlerle yara basıncı düşürülmüş ve yara iyileşmesi üzerine bu yöntemlerin olumlu etkileri gösterilmiştir(2, 3). Yara iyileşmesinin patogenezinde genetik yatkınlık ile birlikte topografik, metabolik, dolaşımsal, immünolojik ve beslenme ile ilişkili pek çok değişkenin rol aldığı bilinmektedir(4).

Yara iyileşmesi sırasında yara dokusunun altında yer alan kas tabakasının kasılmasını önlemenin yara üzerindeki basıncı düşürerek ve inflamasyon ile proliferasyon fazlarını olumlu yönde etkileyerek yara iyileşme sürecini düzelteceği düşüncesi ile yola çıkılarak, Botulinum Toksin (BTX) enjeksiyonunun faydalı olabileceği bildirilmiştir(5).

Bilindiği üzere bir bakteri tarafından üretilen BTX, 2002 yılında tedavi onayı almış olup, günümüzde terapotik ve kozmetik endikasyonlarla pek çok alanda kullanılmaktadır. BTX'in çizgili kaslar üzerindeki paralitik etkisi, toksinin sinir uçlarına endositoz ile girmesiyle başlar ve asetilkolin salıverilmesinin engellenmesiyle sonuçlanır. Oluşan flask paralizi geri dönüşümlüdür ve bu etki ile yara çevresindeki patolojik gerilim azaltılmaktadır(6). Bu etki sayesinde daha iyi bir yara iyileşmesi ve daha az skar oluşumunun sağlanabileceği bildirilmiştir (7). Ayrıca BTX, kollajen sentezini de arttırarak yara iyileşmesini hızlandırabilir(8, 9).

Diyabetik hastaların yaralarında uzamış inflamasyon süreci, bozulmuş kollajen sentezi mevcut olup, nöropatiye bağlı his kaybı ve azalan elastikiyet sebebi ile lokal basınç artışı olduğu bilinmektedir. Bozulmuş neovaskülarizasyon (anjiogenezis) da yara iyileşme sürecini olumsuz yönde etkilemektedir(10). Bizim çalışmamızda BTX-A'nın lokal uygulamasının, hasarlı cilt dokusunun bitişiğindeki kaslarda paraliziye sebep olarak yara kenarlarındaki gerilme kuvvetini ve basıncı en aza indireceğini, yarada inflamasyonu azaltarak matürasyon sürecinde granülasyon dokusunu arttırır, anjiogenezi ve fibroblast proliferasyonuyla ekstrasellüler matriks ve kollajen sentezini arttırıp özellikle diyabetik canlılarda daha hızlı ve daha iyi bir yara sağlayacağını öngörmekteyiz.

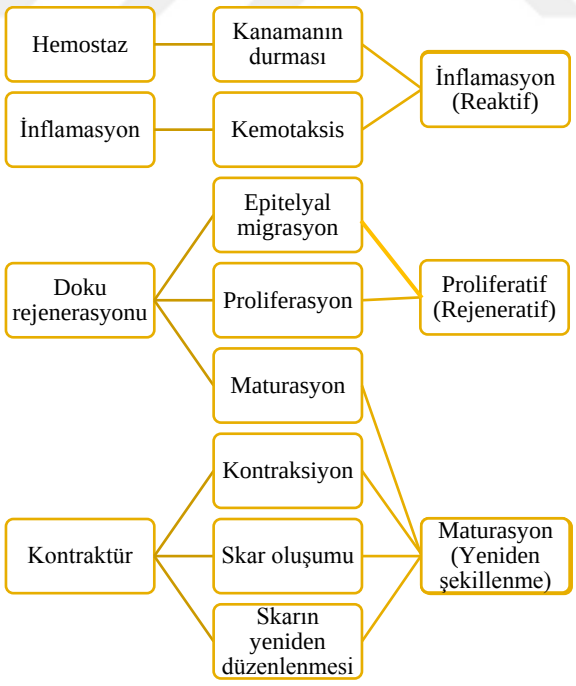
Çalışmamızda, diyabetik hayvan modelinde, yara bakımında kullanılan salin ve yara bakım ürünlerine karşılık; BTX-A'nın primer yara iyileşmesindeki etkinliği araştırılmıştır. Botulinum Toksin A'nın yara üzerine etkisi ile ilgili güncel çalışma sayısı oldukça azdır. Ülkemizde ilk defa gerçekleştirilen bu çalışmanın sonuçlarının olumlu çıkması durumunda, özellikle zor iyileşen diyabetik yaralarda BTX-A'nın kullanımı konusunda önemli klinik çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Yara İyileşmesi

Yara; farklı sebeplerle doku bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır. Cerrahi işlemler de bu sebeplerden biridir(1). Yara oluşumunu takiben iyileşme fazları başlar ve bu birçok hücre tipinin ve ürününün işbirliğinden oluşan önemli bir fizyolojik süreçtir(11).

Hasar gören dokular normal fonksiyonlarını ve yapısal bütünlüğünü hasar oluşur oluşmaz yeniden sağlamaya çalışır. Bu aşamada sıvı kaybının ve enfeksiyonlara geçirgenliğin azaltılması amacıyla bir bariyer oluşturulması, yara gelişimindeki en önemli faktörlerden olan kan akımının yara çevresinde arttırılması ve bunun yanında lenfatik drenajın sağlanması daha sağlıklı bir yara iyileşmesi için hayatidir. Bu olaylar sonucunda yaralanmış olan sistemin mekanik onarımına başlanır(11).



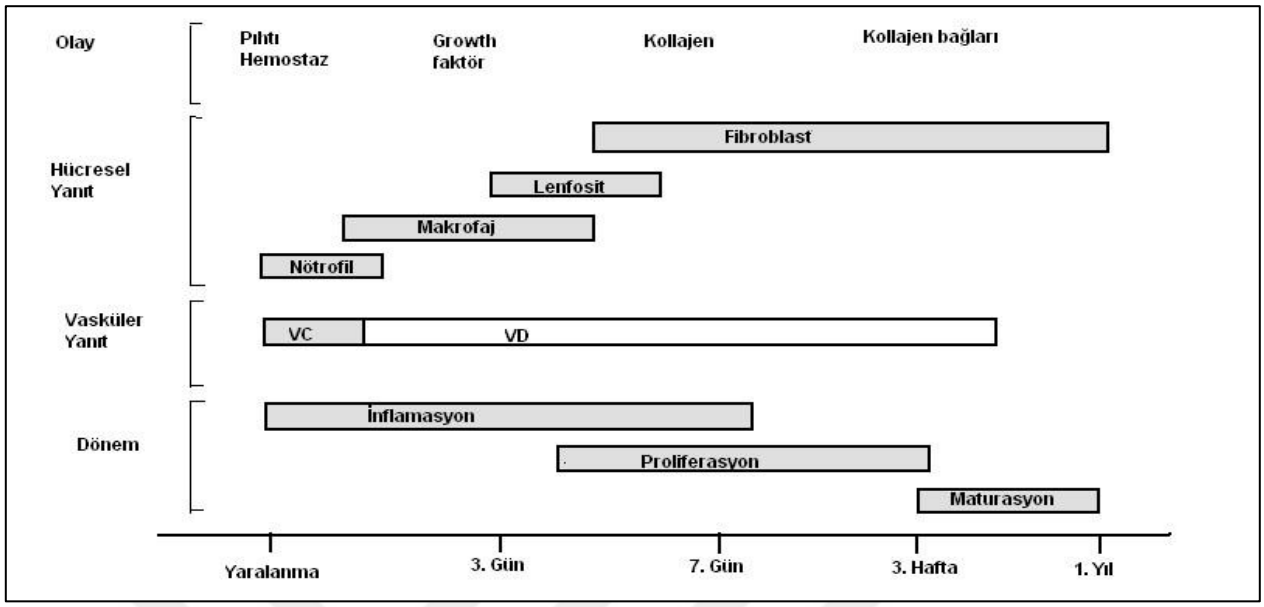
Resim 4.1. İyileşme Yanıtları

4.2. Yara İyileşmesi Tipleri

Yara iyileşmesi üç farklı şekilde olmaktadır. Bunlar; primer iyileşme, sekonder iyileşme ve tersiyer iyileşme (gecikmiş primer iyileşme) olarak adlandırılmaktadır(12). Primer iyileşme, yara kenarlarının steril bir şekilde doku kaybı olmadan birbirine yaklaştırılması ile oluşturulan yara iyileşmesidir(13). Sekonder iyileşme, açık kalan yara bölgesinin granülasyon dokusu geliştirilerek onarımı ve reepitelize olması sonucu kendiliğinden gelişmesi olayıdır. Bu iyileşme esnasında verilen yara bakım hizmeti çok önemlidir(14). Tersiyer iyileşme ise sekonder iyileşme sonrası temiz yaranın süture edilip kapatılması ile oluşur(14).

4.3 Yara İyileşmesi Evreleri

Yaralanmada ilk yanıt hemostaz ve inflamatuvar faz (eksudatif faz) ile başlar. Defans mekanizmaları ile hasar minimumda tutulmaya çalışılır. Proliferatif (rejeneratif) faz; reepitelizasyonun, ekstraselüler matriks sentezinin ve yeni damar oluşumunun görüldüğü dönemdir. Son dönemde görülen maturasyon (olgunlaşma) fazında ise daha önceki fazlarda oluşan ödemin ortadan kaldırılması ve kollajen üretilmesi sayesinde yarada kontraksiyon oluşturulmaktadır. Tüm fazlar birbirinden bağımsız gibi görülse de, iç içe geçmiştirler ve yara iyileşmesinde hepsinin bir bütün olarak işlediği unutulmamalıdır (Şekil 4.1.) (11).



Şekil 4.1. Yara iyileşmesi dönemleri ve bu dönemlerde etkili hücre tipleri(11).

4.3.1. İnflamatuvar Evre (Eksudatif Faz)

Yaralanmaya karşı ilk yanıt inflamatuvar evrede olmaktadır. Erken dönemde oluşan vazodilatasyon, lenfatik drenajın bozulması ve inflamasyonun belirtilerinin (ısı artışı, kızarıklık, şişme) görüldüğü ortalama 24-48 saati kapsayan dönemdir. Yara iyileşmesinde ilk cevap hemostaz yani kanama kontrolüdür. Hemostazi takiben, erken dönemde doku hasarı oluşan bölgede meydana gelen nekrozu ortadan kaldırmak ve enfeksiyon gelişimini önlemek için inflamasyon ortaya çıkar. Yani öncelikle vasküler cevap, vasküler cevabı takiben hücresel cevap ortaya çıkar.

Yaralanmanın olduğu bölgedeki kan damarlarında vasküler cevap olarak önce şiddetli vazokonstrüksiyon oluşur, takiben şiddetli vazodilatasyon ile artmış vasküler geçirgenlik meydana gelir. Eritrositler ve trombositler hasarlı alana yapışıp kılcal kan damarlarını tıkayıp kanamayı durdururlar. Ardından hasarlı endotel bölgesine yapışan trombositler kollajen reseptörlerini harekete geçirir. Tip IV ve Tip V kollajenin salıverilmesi ile pıhtılaşma kaskadı başlar ve trombosit agregasyonu görülür. Endotelyal hücrelerden salınan von Willebrand faktör (vWF) de trombositlerin kollajene tutunmasını sağlar(11, 15).

4.3.1.1. Artmış damarsal geçirgenlik

Subendotelyal kollajenin trombositlere maruz kalmasıyla trombosit göçü, trombosit degranülasyonu ve koagülasyon kaskadının aktivasyonu meydana gelmektedir. Trombosit – alfa granüllerden salınan platelet derive edici büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), dönüştürücü büyüme faktörü – beta (TGF-β), fibrinojen, fibronektin, von Willebrand faktörü (vWF) ve trombospondin bu kaskadda rol oynar. Ek olarak kollajenler hemostazisi sağlamak için polimorfonükleer lökositler ve monositlerden oluşan inflamatuvar hücrelerin yaraya göçü için iskele görevini üstlenir. Hücre göçü sonrası ortamda bulunan mast ve histamin hücrelerinden salınan histamin ile damarsal geçirgenlik artar. Sonuç olarak pıhtılaşma kaskadı aktive olur(11, 16).

Hücre zarlarının yıkımına bağlı olarak salgılanan maddelere ek olarak ortaya çıkan tromboksan A_2 ve prostaglandin F_2-alfa, trombosit agregasyonuna yardımcı olur ve sonucunda vasokonstriksiyona sebep olur(11, 16).

Tüm bu süreç, hasarlanan dokuda hasarı sınırlamayı sağlasa da dokuda bölgesel iskemiye ve nekroza yol açabilir(11).

Polimorfonükleer hücrelerin ve seratoninin etkisi ile damarsal geçirgenlikte artış görülmekte ve takiben dokuya nötrofil göçü olmaktadır. Bu göçte rol alan en önemli kemotaktikler ise, nötrofil adezyonunu ve kemoatraksiyonunu düzenleyen iki faktör olan kompleman-5a ve lökotrien-B4 tür. Monositler ve endotel hücrelerin her ikisi de inflamatuar mediyatörler olan interlökin(IL)-1 ve tümör nekroze edici faktör (TNF)-alfa üretir. Bu mediyatörler de nötrofillerin inflamasyon alanına göçünün hızlandırır. Tüm bu olayların sonunda inflamasyonun klinik bulguları olan kızarıklık, şişlik, ısı artışı ve ağrı görülür(17).

Nötrofillerin etkinliğindeki kompleman kaskadı ile bakterilere tutunulmakta ve bu bakteriler etkisiz hale getirilmektedir. Nötrofillerin asıl görevi fagositozdur. Bununla birlikte nekrotik materyalin ortamdan uzaklaştırılması da nötrofillerin diğer bir önemli görevidir. Ayrıca doku oksijenizasyonunun iyi olması nötrofillerin bakterisidal fonksiyonunu güçlendirmektedir(2).

Yaradaki inflamasyon kontrol altına alındığında nötrofil göçü durma noktasına gelmektedir. Ortalama ömrü 24 saattir. Ardından dokuya mononükleer hücre baskını olmaya başlar ki, bu da takriben 48. saatte denk gelir(11).

4.3.1.2. İnflamatuar fazda yer alan yara elemanları

a) <u>Makrofajlar</u>

Yara iyileşmesinde önemli payı olan ve sitokin salıverilmesinden birinci sırada sorumlu olan hücrelerdir. Polimorfonükleer hücreler (nötrofil v.b.) yara yerinden uzaklaştıktan sonra onların yerine makrofajlar geçmektedir. Yara oluşumundan 24-48 saat sonra ortaya çıkar ve 48-96 saat süreyle yarada yüksek oranda bulunurlar. Yara iyileşmesi tamamlana kadar da yara bölgesinde bulunmaya devam etmektedirler(11, 15, 16).

Makrofajlar, nötrofiller gibi fagositoz yaparak yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. İnflamasyon sürecinde makrofajlar yönetici konumdadır. Oksijen radikalleri ve nitrik oksit sentezi ile hücre düzeyinde debridman yapar. Ayrıca yara yerinde bulunan makrofajlar, matriks metalloproteinaz salıverilmesine yol açarak mevcut hücredeki yabancı maddelerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Diğer bir görevi ise büyüme faktörlerinin yardımı ile matriks sentezine katkıda bulunmaktır. Özetleyecek olursak makrofajların yara iyileşmesindeki görevi, fibroblast proliferasyonunu, fibroblastların şekil değiştirmesini, anjiogenezi ve kollajen sentezini uyarmasıdır(11, 15, 16).

b) <u>Lenfositler</u>

Yaralanmanın 5. gününde yarada anlamlı miktarda T-lenfosit ortaya çıkmakta ve 7. günde yarada en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Lenfositler yarada inflamatuvar evreden proliferatif evreye geçişte köprü görevi görürler. Fibroblastları stimüle eder ve yara inflamasyonunu azaltma yönünde rol oynar(2,9,10).

4.3.2. Proliferatif Faz (Fibroblastik Faz)

Proliferatif evre yara iyileşmesinin ikinci evresidir . Yaklaşık 4. ve 12. günler arasına denk gelmektedir. Proliferatif evre, hemostaz ve inflamasyonun akut sonuçları bittikten sonra anjiyogenez, fibroplazi ve epitelizasyon aşamaları ile ön plana çıkmaktadır. Granülasyon dokusu bu evre için karakteristik bir oluşumdur. Bu doku hyaluranik asit, fibronektinin ve kollajenin

oluşturduğu gevşek bir yapıdan meydana gelmektedir. Ayrıca fibroblastlar ve makrofajlar da granülasyon dokusu oluşumunda yardımcı yapılardandır(11).

4.3.2.1. Anjiyogenez

Yeni damar oluşumu ve yara iyileşmesine uygun koşulların sağlandığı dönemdir. Travma sonrası aktif olan endotel hücreleri, bazal membranların geçirgenliğini arttırarak yara bölgesine göç ederler. Göç ettiği yerde bölünerek ve çoğalarak tübülleri oluştururlar. Sonuçta bazal membranı tekrar oluştururlar ve kapiller maturasyonu meydana getirirler.

Anjiyogenez özellikle makrofaj ve trombositler tarafından üretilen sitokinler ile yönlendirilir. Makrofajlardan üretilen TNF-alfa da inflamasyon fazında anjiyogenez yapabilir. Bununla birlikte endotel hücrelerinden salınan damarsal endotelyal büyüme faktörü (VEGF), hücre hasarı ve hipoksinin kendisi de hasarlı bölgede anjiyogenik etkiye sahip faktörlerdir(11).

4.3.2.2. Fibroplazi

Fibroblastlar, bağ dokusundan köken alan ve iskemik mezenkimal hücrelerden farklılaşan özel hücrelerdir. Yara bölgesine göç etmezler. Doku hasarı sonrası sessiz şekilde bekleyen fibroblastlar hasarlı bölgeye çekilirler ve ekstrasellüler matriks bileşenlerini üretirler. Makrofaj ve trombosit kaynaklı sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından uyarıldıktan sonra, hücre döngüsünün G0 fazı yani dinlenme fazında bekleyen fibroblastlar uyarılır ve proliferasyona uğrarlar. Trombosit kökenli bir madde olan TGF-beta, PDGF'yi uyararak fibroblast proliferasyonunu uyarır. Fibroblastlar prolifere olabilmek için büyüme faktörlerine gereksinim duymaktadır. Fibroblastların birincil görevi inflamasyonun hücresel fazında kollajen sentezidir.

Fibroblastlardan ilk üretilen kollajenler yara iyileşmesinin 3. ve 5. günleri arasına denk gelmektedir. Kollajen üretimi 4. haftadan sonra azalmaya başlar. Bunun nedeni ise bir kollajenaz olan matriks metalloproteinaz (MMP)-1'in harekete geçmesidir. Bu aşamadan sonra yara olgunlaşma aşamasına geçer ve bu aşama aylar, hatta yıllar sürebilir(11, 17).

4.3.2.3. Epitelizasyon

Doku kuvveti ve sağlamlılığı tekrar sağlanmaya çalışılırken eksternal bariyer tekrar inşa edilmelidir. Bu bağlamda epidermis inşa edilmeye başlanır. Epidermis, sıvı kaybını ve bakteriyel translokasyonu önleyen bir bariyerdir. Epidermis içindeki sıkı bağlantılar, geçirgenliği olabildiğince azaltan yapılardır. Aynı zamanda bu hücreler, hücreler arası bağlantıyı kurar ve bir çatı görevi görerek oluşan yapıya sağlamlık katarlar(11, 18).

Bu süreç yaralanmanın 1. günü başlar. Başlangıçta yara pıhtı ile kapatılır ve sonra travma alanına epitelyal hücre göçü olur. Epitelyal hücreler kollejen dermis ile fibrin eskar arasına girerse, ekstraselüler matriks yıkımı için gerekli olan MMP-1 ve plazminojen aktivatörü enzimleri devreye girerek kollojenaz ve plazmini aktif hale getirir. Trasloke olan bu hücreler yolları üzerindeki hücreleri fagosite etme özelliğindedir.

İlk tamir edilecek yapı bazal membrandır. Bazal membran genel olarak üç kattan oluşmaktadır; Lamina lusida, lamina densa, lamina densayı dermise bağlayan tip 4 kollojen lifler. Bazal membranın görevlerini özetlersek madde alışverişini gerçekleştirmek, hücreye hareket kazandırmak, hücrelerin birbirlerine bağlanmalarını sağlamaktır(11, 18).

4.3.2.4. Proliferatif fazda yer alan yara elemanları

a) Ekstrasellüler matriks

Ekstrasellüler matriks dokuların fiziksel bütünlüğünü sağlayan ve fibroblastlarla dinamik bir şekilde çalışan bir iskelet yapısı gibidir. Ayrıca bağlantılı olduğu dokuların davranışlarını düzenler ve hücreler arası iletişim kurar. Glikozaminoglikanlar ve kollajen gibi proteinler ekstrasellüler matrikste bulunan ana yapılardır. Glikozaminoglikanlar akışkan bir yapıdadır ve besin, hormon, kan ve metabolitleri dokular arasında taşımayı sağlar. Kollajen lifleri ise dokuya sağlamlık katar. Elastin lifleri de ekstrasellüler matriks proteinlerinin aksine doku elastikiyetisini arttırır(11, 19).

b) Kollajen yapısı ve sentezi

Kollajen çok hücreli hayvanların tümünde bulunan yapısal bir proteindir. Memelilerdeki protein kütlesinin %25-30'unu oluşturmaktadır. Ekstrasellüler matriksin temel protein yapısıdır. İnsanda en az 20 tip kollajen tipi vardır. Bağ dokusunun ana yapısıdır. Anjiyogenezin ve dokunun yeniden şekillenmesini sağlar.

Kollajen üretimi fibroblastların endoplazmik retikulumundan başlar. İn vivo sentezlenip prolin ve lizinle hidroksile edilir, ardından prokollajen olarak hücreden salgılanır. Hidroksilasyon için oksijen, C vitamini, demir ve ketogluterat gereklidir. Prokollajen polimerizasyonu ile tropokollajeni oluşturur. Tropokollajenlere peptit dizileri eklenerek kollajen lifleri oluşturulur.

Kollajen üretim hızını pek çok faktör etkiler. Bunların en önemlileri yeterli miktarda kan akımı ve dokudaki oksijen miktarıdır. Kollajenin üretimi yara oluştuktan sonraki 14. günde en yüksek seviyeye ulaşır. 21. günden sonra kollajenin yıkımı ve sentezi bir denge halindedir. 1. aydan sonra yıkımı artmaya başlar. Kollajenin birçok tipi bulunmaktadır. Deride %80 oranında tip I kollajen, %20 oranında tip III kollajen bulunur. Yara iyileşmesinde kollajen tipleri zamana göre değişmektedir. Yaralanmadan sonraki ilk saatlerde tip IV-V kollajen, 24. saatte tip III kollajen , 5. günde Tip I kollajen baskındır(20-24).

c) Elastik lifler

Cilt, kan damarları ve akciğer gibi dokular kendi işlevlerini yerine getirebilmek için direnç ve elastikiyete ihtiyaç duyarlar. Bunu sağlayanlar ise ekstrasellüler matrikste olan elastik liflerdir. Bu liflerin ana bileşeni elastindir. Elastin, alanin ve lizinden oluşan bir polipeptittir. Elastinin en önemli özelliği hidrofilik olmasıdır ve bu özelliği dokuya elastikiyet sağlar. Elastin üretimi fetal dönemde başlar ve erken yaşlara kadar üretilebilir. İlerleyen yaşlarda üretimi durur ve yıkılmaz. IGF -1 ve TGF- beta, elastin üretimini uyarır(11).

4.3.3. Olgunlaşma (Maturasyon) ve Remodeling fazı

Travma sonrası 7. ve 21. Gün aralığında başlar ve yaklaşık 12. aya kadar devam eder. İyileşmenin ilk günlerinde oluşan düzensiz kollajen lifleri zamanla düzenli hale gelerek daha organize olurlar. Travma sonrası oluşan kollajen maturasyon dönemine gelindiğinde bu sayede sağlamlaşır ve lifler arasında direnç daha da artar.

Maturasyon evresinde kollajen miktarı değişmez, yapım ve yıkım süreci denge halindedir. Yara direncindeki artış kollajen miktarından ziyade oluşan kollajenlerin düzenli yapımı ve yıkımıyla birlikte diziliminin daha düzgün hale gelmesi ve üretilen yeni kollajenler arasındaki kalıcı kollajen liflerinin miktarının artmasıyla olmaktadır. Ekstrasellüler matriks elemanları bu evrede normal deride olan seviyelere geriler. Doku ödemi azalır. Anjiyogenez, fibroblast aktivitesi ve inflamatuvar hücre sayısı azalır(13, 25, 26).

Tablo 4.1. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler[27]

Lokal Faktörler	**Sistemik Faktörler**
Mekanik travma	Yaş
Enfeksiyon	Beslenme
Ödem	Diyabetes Mellitus
İskemi / nekrotik doku	Metabolik hastalık
Topikal ajanlar	İmmünsüpresyon
Radyasyon	Bağ doku hastalıkları
Düşük oksijen basıncı (hipoksi)	Sigara
Yabancı cisim	

4.4. Botulinum Toksini

Botulizm yaklaşık 200 yıldır bilinen bir besin zehirlenmesi tablosudur. Clostridium botulinum adlı bir bakteri tarafından üretilen toksinin oral yolla alınması ile meydana gelir. Ancak bu toksin, son yıllarda terapotik amaçla kullanılmaktadır.

Clostridium botulinum anaerob gram pozitif çomak şeklinde bir bakteridir. Dışkıda ve toprakta yaygın olarak bulunmaktadır. Konserveleme teknikleri gelişene kadar evde yapılma konservelerde çok miktarda üremiş ve salgınlara neden olmuştur.

Botulizm ise bir hastalık olup, bakterinin ısıya duyarlı toksini ile meydana gelen nöroparalitik bir hastalıktır. Toksin oral yolla alındıktan sonra bulgular tipik olarak 2-3 gün içinde meydana gelir. Semptomlar arasında disfaji, disfoni, kaslarda güçsüzlük, diplopi yer almaktadır.

4.4.1. Botulinum toksininin tarihteki yeri

İlk olarak 19. yy başlarında Dr. Kerner tütsülenmiş yiyeceklerin yenmesi sebebiyle oluşan salgın sonucu botulismusu tanımlamıştır. 19. yy sonlarına doğru botulinum nörotoksini tanımlanmış, I. ve II. Dünya Savaşları'nda oluşan salgınlardan sonra Dr. Lamanna ve arkadaşları nörotoksinin aktivitesi ile ilgili araştırmalar yapmış ve bunun sonucunda Botulinum Toksin tip – A üretimini başarmıştır(21).

1960 sonlarına doğru yapılan hayvan deneyleri ile Botulinum Toksin Tip-A 'nın nöromuskuler bileşkede asetilkolin (ACH) salıverilmesini inhibe ettiği gözler önüne serilmiştir(21). 1970 yıllarında ise oftalmoloji alanında kullanılmaya başlanan Botulinum Toksin Tip – A strabismus hastarında cerrahiye alternatif olarak geliştirilmiştir(21). Şaşılığın düzeltilmesi için oküler kaslara direkt enjekte edilmiş ve sistemik etkiden kaçınılmıştır(21). Bu başarıdan sonra 1989 yılında botulinum toksin tip-A Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından insanlarda kullanımı için "Oculinum" adıyla onay almış ve BOTOX® adıyla piyasaya sürülmüştür. 1980 'li yılların sonunda fokal distoninin primer tedavisi için de kullanılmaya başlanmıştır(21).Yaklaşık on yıl içinde ise erişkin spastisitesi ve jüvenil serabral palsi hastalıklarında tedavinin temelini oluşturmuştur(28).

BOTOX®, 2002 yılında 18-65 yaş arası hastalarda glabeller çizgilenmenin geçici düzeltilmesi için corrugator ve procerus kaslarında uygulanması için FDA onayı almıştır.

4.4.2. Botulinum toksininin yapısı

BTX – A, 100kDa ağır ve 50 kDa hafif olmak üzere birbirine disülfit bağı ile bağlı iki polipeptit zincirden oluşur. Hafif zincir bir proteaz enzimidir ve nöromusküler kavşakta ACH veziküllerinin presinaptik membrana etki eden füzyon proteinlerine (Sinaptozomomal ilişkili protein – 25 (SNAP-25), sintaksin, sinaptobrevin) etki eder. Enjekte edildiği bölgedeki kaslarda

füzyon proteinlerine etki ederek ACH salıverilmesini inhibe eder ve bu kimyasal denervasyon olayı kasta paraliziye neden olur. Etkisi iki haftada maksimium seviyeye ulaşır, ortalama üç ay sürer ve altıncı ayda tamamen kaybolur(29-31).

Botulinum toksinin 8 ayrı serotipi bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla A, B, C, D, E, F, G olarak isimlendirilmiştir. Hepsi nöromusküler kavşakta aynı etkiye sahip olsa da molekül ağırlığı, biyosentezi ve etki bölgesine göre farklılık gösterir(32). Çalışmamız klinik rutinde en sık kullanılan BTX-A ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.2. Botulinum toksin tipleri, etki mekanizmaları

Nörotoksin	Hedef Protein	Lokalizasyon
BTX-A, E	SNAP-25	Presinaptik plazma membranı
BTX-B, D, F, G	Sinaptobrevin	Sinaptik vezikül membranı
BTX-C	Sintaksin	Presinaptik plazma membranı

4.4.3. Botulinum toksini tip A (BTX-A)'nın etki mekanizması

BTX – A, uyarılan nöronların kimyasal olarak denervasyonunu sağlar. Periferik kolinerjik nöronlardan ACH salıverilmesini bloke ederek bu sinir yolaklarını selektif olarak inaktive eder. Parasempatik ve sempatik ganglion hücrelerini, postganglionik parasempatik ve kolinerjik sempatik nöronları da inaktive ederek otonom foksiyonları durdurur. BTX – A nöronları öldürmez, reverzibl blokaj sağlar(25).

BTX – A'nın kas gevşetici etkisinden bağımsız olarak ayrıca kronik enflamasyonda ve ağrı durumlarında da analjezik etkisi vardır.

4.4.4. Botulinum toksininin klinik kullanım prensipleri

BTX – A, klinik kullanımda dikkatle seçilmiş kaslara ve bezlere enjekte edilir. Sistemik olarak verilmemeye özen gösterilmelidir. Etkisi günler içinde başlar ve 2-4 ay sonra fark edilen kas güçsüzlüğü ve atrofisi yapar, maksimum etki molekülün verildiği bölgede görülür. Bu kas güçsüzlüğünün derecesi ve süresi doza bağlıdır. Tekrarlayan uygulamalarda tolerans gelişebilir(33).

Tablo 4.3. Botulinum toksin kullanım alanları

Fokal distoniler(34)	Servikal distoni, Blefarospazm, Laringeal distoni, Ektremite distonileri
Distonik olmayan istemsiz hareket bozuklukları(35)	Hemifasiyal spazm, Tremor, Tikler, Myoklonus
Spastisite(28)	İnme, Travmatik beyin hasarı, Serebral palsi, Multipl skleroz, Omurilik hasarı
Strabismus(36)	Okuler strabismus
Kozmetik(37)	Hiperkinetik fasyal çizgiler (Kaz ayağı, alın çizgileri), Hipertrofik platisma
Otonom sinir sistemi bozuklukları(38)	Aksiller ve palmar hiperhidroz, Frey sendromu, Siyalore, Hiperlakrimasyon
Lokalize kas spazmı ve ağrı ile seyreden tablolar(39, 40)	Kronik bel ağrısı, Herediter kas spazmı, Miyofasyal ağrı sendromu, Migren, Gerilim tipi baş ağrısı
Düz kas hiperaktivitesi ile seyreden bozukluklar(41-43)	Kardiya akalazyası, Hirschsprung hastalığı, Kronik anal fissürler, Aşırı aktif mesane hastalığı

4.4.5. Botulinum toksininin yan etkileri

BTX – A ‘nın en önemli yan etkileri jeneralize güçsüzlük, çabuk yorulma, disfaji ve solunum sıkıntısıyla seyreden botulizm tablosu olup nadir görülmektedir(33, 44).

Tablo 4.4. Botulinum Toksin yan etkileri

Yerel Yan Etkiler(45)	Enjeksiyon yapılan ya da komşu kaslarda geçici zaaf
	Enjeksiyon bölgesinde ağrı, kaşıntı, kızarıklık, ekimoz (periorbital)
	Disfaji
	Ağız ve göz kuruluğu
	Göz kapağında veya kaşta düşüklük
Sistemik Yan Etkiler(46)	Allerjik reaksiyona bağlı cilt döküntüsü, anjioödem
	Grip benzeri tablo
	Jeneralize botulizm bulguları (yorgunluk, solunum sıkıntısı, disfaji)

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda vücut ağırlıkları (250±50) g arasında olan 72 adet dişi Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Denekler deneyden 1 hafta önceden bakım yerlerine alındı, 12 saatlik gece-gündüz döngüsünde ad-libitum beslendi. Deneklerin bakım, beslenme ve operasyon aşamaları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Hayvanlara yapılan cerrahi, anestezi ve hayvan bakım yöntemleri Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesine uygun olarak yapıldı(47). Çalışmamız etik kurul tarafından onaylanmış olup, onay numarası 2021-9-63'dır.

5.2. Çalışma Modeli

Çalışmanın iki aşamada yapılması planlandı. İlk aşama sıçanların kontrol ve vaka grupları olarak ayrılması ve vaka grubu içindeki hayvanlarda diyabet oluşturulduktan sonra 1 hafta süreyle takip edilmesidir. İkinci aşama ise diyabetik oldukları tespit edilen sıçanların ense bölgesine primer yara oluşturulması ve her bir gruba yalnızca bir uygulama olmak üzere oluşturulan yaraya salin, klorheksidinli yara bakım örtüsü ve BTX- A uygulanması planlandı.

5.2.1. Sıçanlarda Deneysel Tip 1 Diyabet Modeli

Deney gruplarındaki sıçanlar (n=72) ilaç uygulamasından bir gece önce aç bırakıldı. Deneye katılacak tüm sıçanların vücut ağırlıkları ve açlık kan şekeri ölçümleri yapıldı. Sıçanlar diyabet (n=55) ve kontrol (n=17) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Sıçanlar deney grupları gözetilerek kafes başına 5-6 hayvan olacak şekilde barındırıldı. Diyabet grubuna 0,1M sitrat bufferda (pH 4,5) çözdürülen Streptozosin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA, S0130-1 G) tek doz (intraperitoneal, 60mg/kg) olarak uygulandı (Resim 5.1). Streptozosin çözücüsü olarak kullanılan ve diyabet grubuna ilaçla birlikte verilen sitrat buffer (pH 4.5), yalnızca ilacın yarattığı etkiyi gözlemlemek için kontrol grubuna 0.1M 1 ml intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Diyabet ve kontrol grubuna

streptozosin veya sitrat buffer uygulamasını takiben 1. gün ve 3. günde kuyruk venlerinden alınan örneklerden kan şekeri değerleri (Roche Diagnostic, Accu-check hasta başı şeker ölçüm cihazı); 1. ve 6. günde de vücut ağırlıkları (VA) ölçüldü. Üçüncü günün sonunda kan şekerleri 200 mg/dL ve üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edilip çalışmaya dahil edildi.



Resim 5.1. Deney hayvanlarına intraperitoneal enjeksiyon uygulaması

5.2.2. Yara Modeli Oluşturma ve Tedavi

Streptozosin uygulanarak diyabet oluşturulan 55 sıçan 1 hafta boyunca takip edildi. Bir haftalık takip sonrasında hayatta kalan sıçanlar (n=31) yara modeli oluşturmak üzere 3 gruba ayrıldı. Çalışmada yer alan gruplar:

1. Grup: Kontrol Grubu + Salin Uygulaması (n=17)

2. Grup: DM + Salin Uygulaması (n=9)

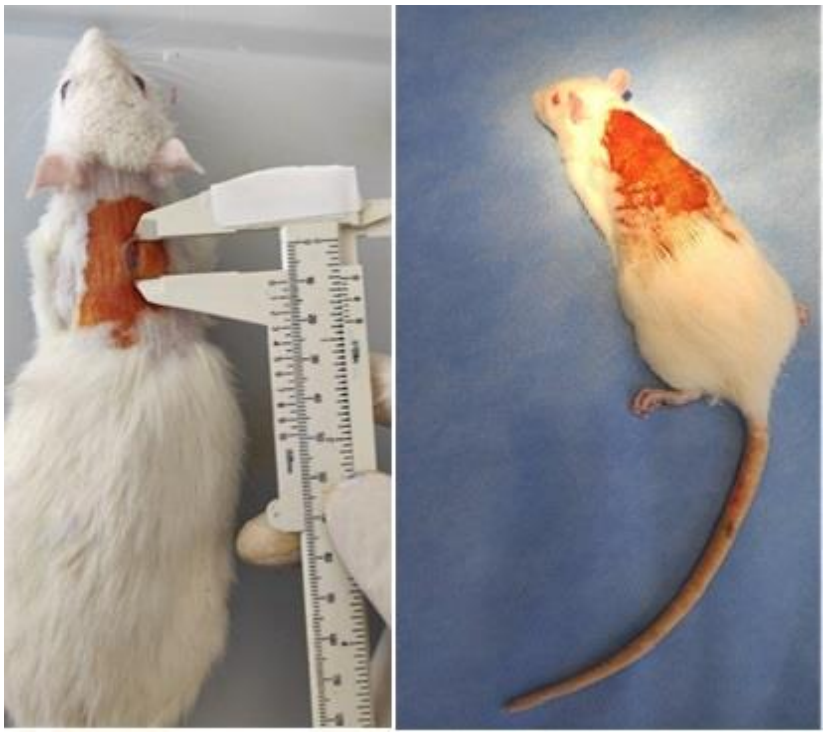
3. Grup: DM + Salin Uygulaması + Klorheksidinli Yara Bakım Örtüsü Uygulaması (n=10)

4. Grup: DM + Salin Uygulaması + BTX-A Uygulaması (n=12)

Her bir sıçan primer yara oluşturulması için hazırlandı. İşlem öncesi sıçanlara 30 mg/kg ketamin ve 20 mg/kg tiyopental intraperitoneal uygulanarak anestezi sağlandı. Sıçanların ense bölgeleri tıraş edildi ve %1'lik povidon-iyodür ile antisepsi uygulandı (Resim 5.2.). Ense bölgesine bistüri, penset, makas yardımıyla 1 cm^2 lik kesiler yapıldı ve kesim sonrası her bir yara çapı ölçülerek 1 cm^2 olduğu teyit edildi. Kesi, cilt ve cilt altını içerecek şekilde yapıldı (Resim 5.3.).

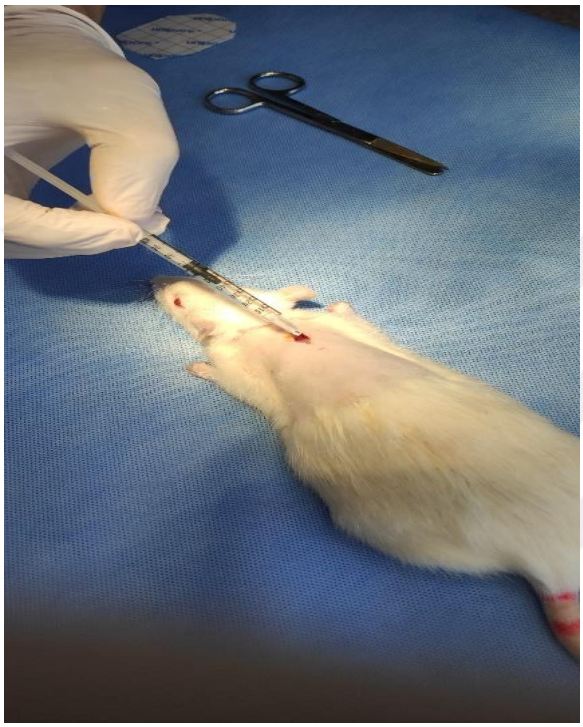


Resim 5.2. Sıçanların ense bölgelerinin tıraş edilmesi, yara boyutlarının ölçümü ve %1'lik povidon-iyodür ile antisepsi uygulanması



Resim 5.3. Cilt ve cilt altını içerecek şekilde oluşturulan yara modeli

Yara oluşturulduktan sonra birinci ve ikinci gruptaki sıçanlarda yara bölgesi salinle yıkandı ve yara gazlı bez ile kapatıldı. Üçüncü gruptaki sıçanlarda salinle yıkama sonrasında yaranın üzerine 3 cm2 boyutunda yara örtüsü (%0.5 klorheksidin içeren) yerleştirildi ve gazlı bez ile kapatıldı. Dördüncü grupta ise salinle yıkama sonrası yara çevresine tek doz BTX-A (20 IU) uygulandı (Resim 5.4.) ve yara gazlı bez ile kapatıldı.



Resim 5.4. Yara çevresine BTX-A uygulaması

İşlemler tamamlandıktan sonra sıçanlar kafeslerine alındı. İkinci günden sonra pansumansız takip edildi ve günlük olarak salinle yıkandı, 5. Ve 7. Günlerde yara çaplarının ölçümü gerçekleştirildi.

Yedinci günde yara alanlarının hesaplanmasından sonra sıçanlar CO2 ile sakrifiye edildi. Bu sıçanların ense bölgelerindeki yaralar cilt, cilt altı ve bir miktar kas dokusunu da içerecek şekilde yaklaşık 3 cm2 olarak eksize edildi ve %10 tamponlu formalin solüsyonunda muhafaza edildi.

5.2.3. Doku Takibi ve Histolojik İnceleme

Eksize edilen dokular histolojik incelemeler için %10 tamponlu formalin solüsyonuna (pH:7,3-7,4) alınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na

aktarıldı. Dokular, belli aralıklarla tazelenen formalin solüsyonunda 10 gün boyunca fikse edildi. Fikse olan doku örnekleri, dereceli alkol serilerinden (%75-%96-%100) geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyon işleminden sonra dokular arka arkaya 3 değişim ksilenden geçirilerek şeffaflanmaları sağlandı. Şeffaflaştırılan doku örnekleri 3 kez değiştirilen sıvı parafinle 2 saat 60°C'de inkübe edildi ve parafin bloklara gömüldü.

Parafin bloklar oda sıcaklığında sertleştikten sonra buzdolabında +4 °C'de bekletildi. Kesit işlemine başlamadan birkaç saat önce -18°C'ye alınan bloklardan Leica RM 2125RT model mikrotom kullanılarak cilt yüzeyine dik olacak şekilde 5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler yara iyileşmesinin temel parametrelerini incelemek üzere Hematoksilen-eozin ve kollajen lifleri gözlemlemek için Masson Trikrom(anilin mavisi) ve MalloryAzan ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda (Leica DM 500) değerlendirilerek mikroskoba bağlı dijital kamera (Leica ICC50 HD) ile fotoğraflandı.

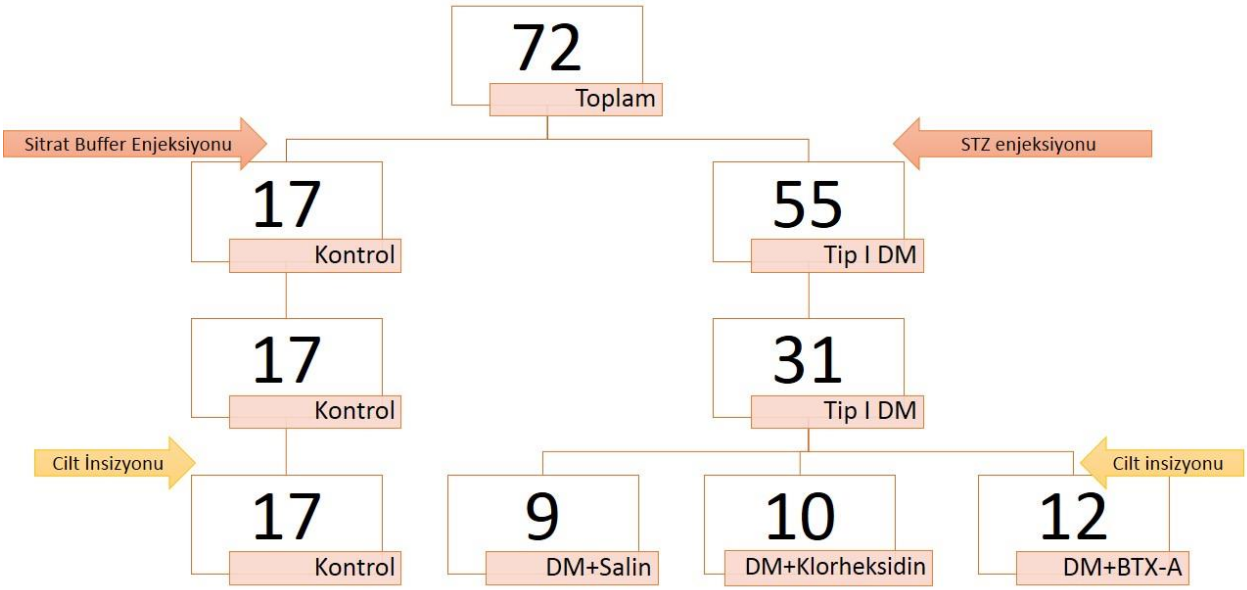
Deney ve kontrol gruplarında Hematoksilin-eozin ile boyanan kesitlerden ışık mikroskobuna bağlı Leica ICC50 HD dijital kamera ile x4 büyütmede dijital 8-bit RGB fotoğraflar alındı. Dermiste yara sınırları arası granülasyon dokusu uzunluğu ImageJ programı kullanılarak ölçüldü.

5.3. İstatistik İnceleme

Verilerin analizinde; SPSS İstatistik Analiz Yazılımı versiyon 24.0 kullanıldı. Tek değişkenli analizde nominal veriler için ki-kare testi, parametrik değişkenler için t-testi, nonparametrik değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametrik veriler için ortalama ± standart sapma, nonparametrik veriler için ise ortanca ± dağılım genişliği kullanıldı. İkiden çok grupta ortalamaların karşılaştırılmasında, karşılaştırılacak değişken ölçümle elde edildiği ve tüm gruplarda veriler normal dağıldığı için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Farklılığa hangi grup yada grupların neden olduğunu bulmak amacıyla Post hoc testi kullanıldı. Post hoc analizi seçiminde varyansların homojen dağılıp dağılmadığına bakılarak, homojen olduğu durumda LSD (ANOVA with Fisher's Least Significant Difference), homojen olmadığı durumda ise Tamhane testi kullanıldı. $p<0,05$'in altındaki değer istatistiksel anlamlı kabul edildi. İstatistiksel verilerde güven aralığı %95 olarak alındı.

6. BULGULAR

6.1. Diyabet ve Kontrol Gruplarındaki Sıçanların Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması (Morfometrik Analiz)

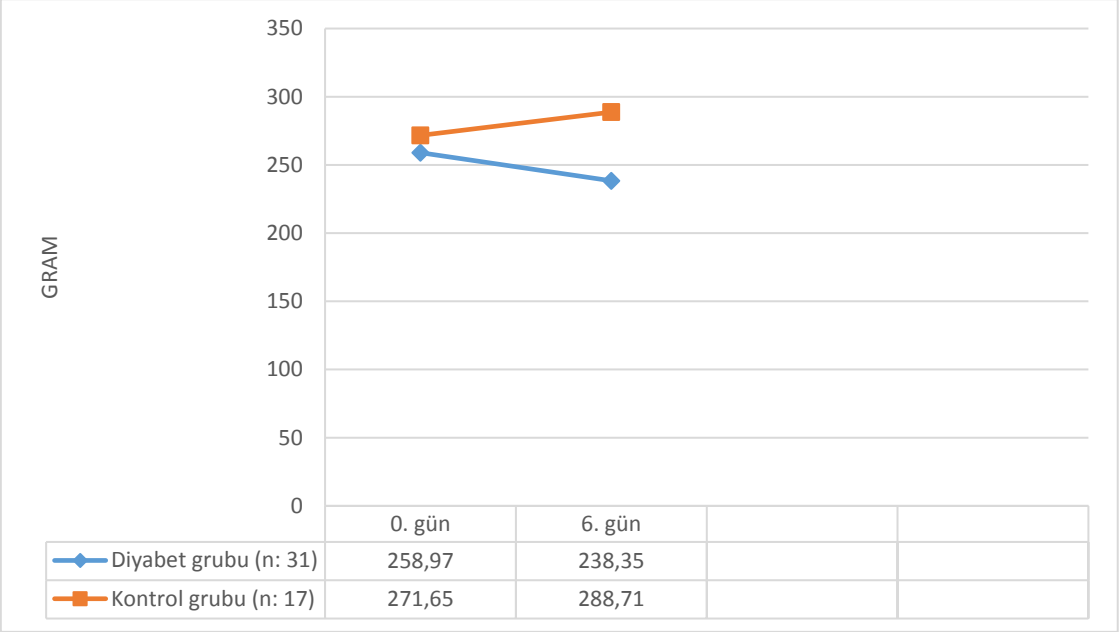


Şekil 6.1. Hayvan örnekleminin oluşturulma basamakları

Tablo 6.1. Diyabetli grup ile kontrol grubundaki hayvanların günlere göre kilo ortalamaları

	Diyabet grubu (n:31)	Kontrol grubu (n:17)	p
0. gün	258,97±21,99 gr	271,65±25,42 gr	0,077
6. gün	238,35±24,52 gr *	288,71±20,31 gr	**<0,001**

Independent sample t test. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 6.2. Diyabetli grup ile kontrol grubundaki hayvanların günlere göre kilolarındaki değişim

Diyabet grubunun ve kontrol grubunun diyabet modeli oluşturulduğu 0. gündeki ağırlıklarının ortalaması sırasıyla 258,97±21,99 g ve 271,65±25,42 g olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır (p:0,077) (Tablo 6.1.)

Diyabet grubunun ve kontrol grubunun diyabet modeli oluşturulmasını takiben 6. gündeki ağırlıklarının ortalaması sırasıyla 238,35±24,52 g ve 288,71±20,31 g olarak bulunmuştur. Diyabet grubundaki sıçanların, kontrol grubundakilere göre vücut ağırlıklarının istatiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu bulunmuştur (p:0,001) (Tablo 6.1.).

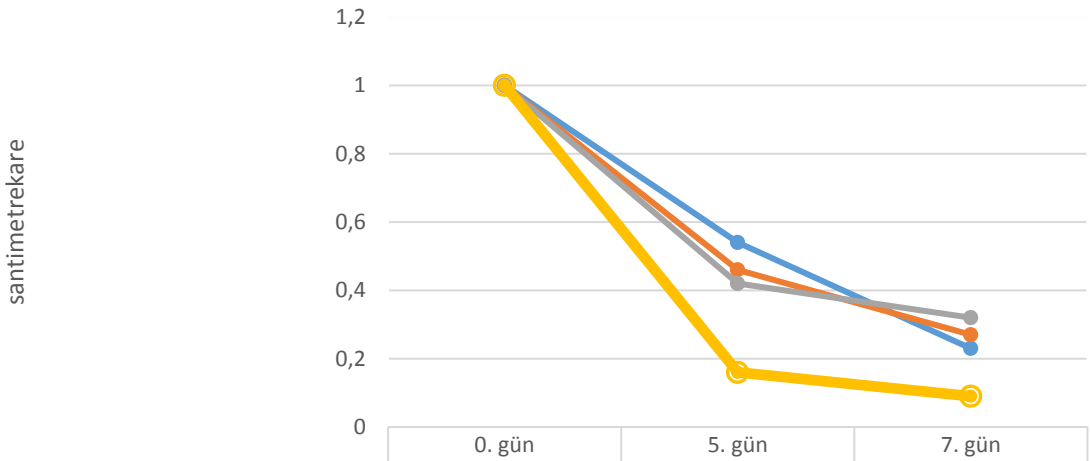
4.1.2.Deney Gruplarında Yara Çaplarının Gruplara Ve Günlere Göre Karşılaştırılması

Dört farklı gruba ayrılan sıçanların hepsinde 1 cm çapında insizyon açıldıktan sonra her grubun yarası 5. gün ve 7. gün incelendi ve yaraların iyileşmesi ile birlikte yaralardaki açıklığın çapı tekrar ölçüldü (Tablo 6.2.).

Tablo 6.2. Her grubun farklı ölçüm günlerindeki yara alanları

	0. gün	5. gün	7. gün
Kontrol grubu (n=17)	1 cm^2	0,54±0,17 cm^2	0,23±0,11 cm^2
DM + Salin grubu (n=9)	1 cm^2	0,46±0,15 cm^2	0,27±0,07 cm^2
DM + Klorheksidinli yara örtüsü grubu (n=10)	1 cm^2	0,42±0,17 cm^2	0,32±0,10 cm^2
DM + BTX-A grubu (n=12)	1 cm^2	0,16±0,08 cm^2	0,09±0,05 cm^2

BTX-A: Botulinum toksin tip A



	0. gün	5. gün	7. gün
Kontrol grubu (n=17)	1	0,54	0,23
DM + Salin grubu (n=9)	1	0,46	0,27
DM + Klorheksidinli yara örtüsü grubu (n=10)	1	0,42	0,32
DM + BTX-A grubu (n=12)	1	0,16	0,09

Yalnızca sarı ok ile belirtilen grup, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde iyi yara iyileşmesine sahiptir.

Şekil 6.3. Her farklı grupta yara alanı ortalamalarının günlere göre değişimi.

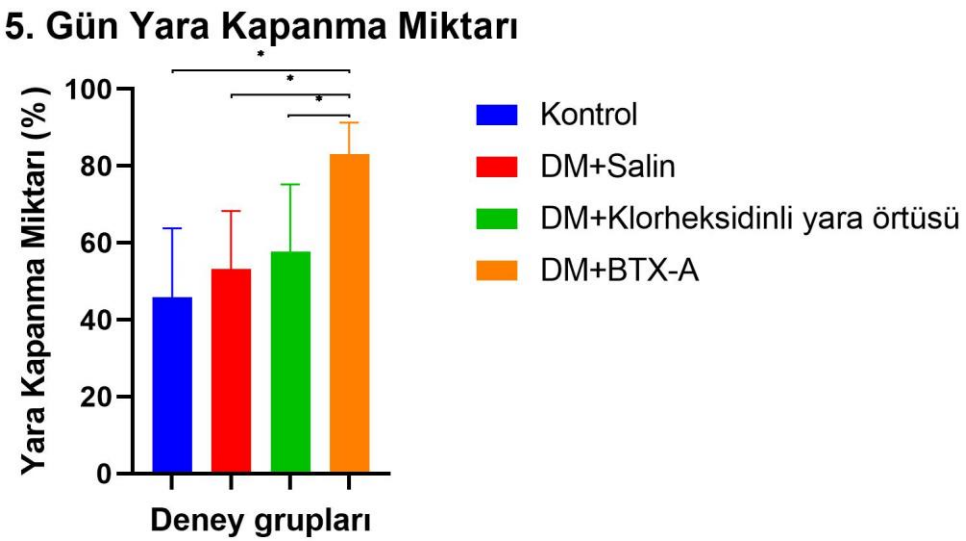
5. gün yara çapındaki değişim ortalama 0,59±0,20 cm^2 iken alt gruplar analiz edildiğinde kontrol grubu, DM+ Salin grubu, DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+ BTX-A grubundaki değişimin ortalaması sırasıyla 0,45±0,17 cm^2, 0,53±0,15 cm^2, 0,57±0,17 cm^2 ve 0,83±0,08 cm^2'dir. 7. gün yara çapındaki değişim ortalama 0,77±0,12 cm^2 iken alt gruplar analiz edildiğinde kontrol grubu, DM+ Salin grubu, DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+BTX-A grubundaki değişimin ortalaması sırasıyla 0,76±0,11 cm^2, 0,72±0,07 cm^2, 0,67±0,10 cm^2 ve 0,90±0,05 cm^2'dir (Tablo 6.3.).

En az 1 grupta 5. gün ((F:3,44)=14,231, p<0,001) ve 7. gün ((F:3,41)=10,759, p<0,001) yaradaki iyileşme miktarı istatiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur.

Tablo 6.3. Tüm grubun ve her alt grubun yara alanlarındaki 5. gün ve 7. gün değişim ortamaları

		Denek sayısı (n)	Ortalama + Standart sapma
5. gün yara alanındaki toplam değişim (cm^2)	Kontrol grubu	17	0,459±0,179
	DM+ Salin grubu	9	0,533±0,150
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	10	0,578±0,174
	DM+ BTX-A grubu	12	0,830±0,083
7. gün yara alanındaki toplam değişim (cm^2)	Kontrol grubu	17	0,768±0,113
	DM+ Salin grubu	9	0,723±0,070
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	9	0,678±0,102
	DM+ BTX-A grubu	10	0,906±0,0502

BTX-A: Botulinium toksin A. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir



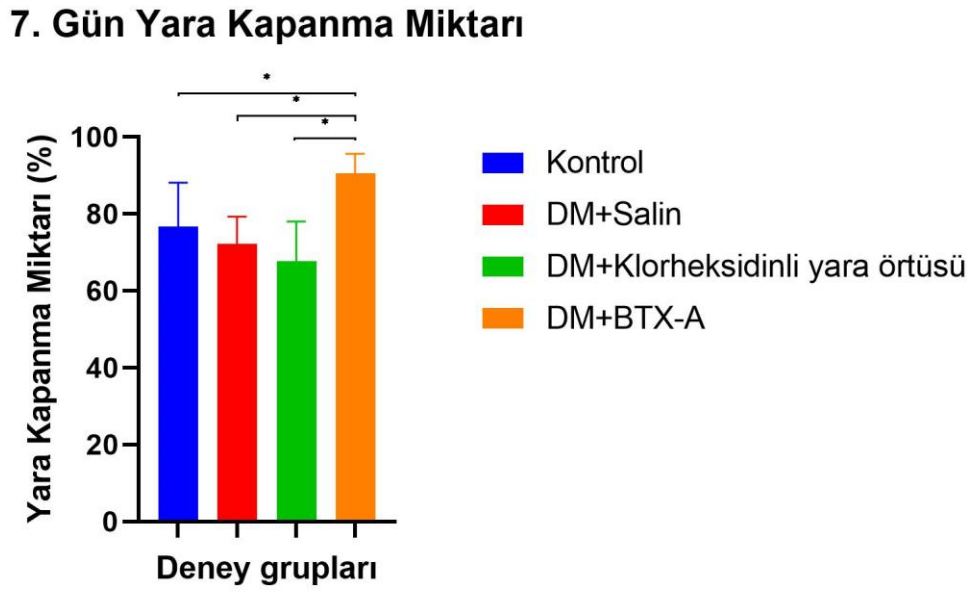
Şekil 6.4. Yara açıldıktan 5 gün sonra yapılan ölçümde değerlendirilen kapanma miktarı (*p<0,001)

Beşinci gündeki iyileşme açısından DM+ Salin grubunun (p:0,251) ve DM+ klorheksidinli yara örtüsü grubunun (p:0,060) kontrol grubundan farkı olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte DM+ klorheksidinli yara örtüsü grubundaki iyileşmenin DM+ Salin grubuyla (p:0,532) benzer olduğu gözlenmiştir. **DM+BTX-A grubundaki yara iyileşmesinin ise kontol grubundan (p<0,001), DM+ Salin grubundan (p<0,001) ve DM+ klorheksidinli yara örtüsü grubundan (p<0,001) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha belirgin olduğu bulunmuştur** (Şekil 6.4).

Tablo 6.4. Her alt grubun 5. güne kadar yara alanlarındaki ortalama değişiminin birbiriyle karşılaştırılması

		Ortalama fark (cm^2)	Standart hata	p
Kontrol grubu	DM+ Salin grubu	-0,073	0,063	0,251
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	-0,118	0,061	0,060
	DM+ BTX-A grubu	-0,371*	0,058	**<0,001***
DM+ Salin grubu	Kontrol grubu	0,073	0,063	0,251
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	-0,044	0,070	0,532
	DM+ BTX-A grubu	-0,297*	0,068	**<0,001***
DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	Kontrol grubu	0,118	0,061	0,060
	DM+ Salin grubu	0,044	0,070	0,532
	DM+ BTX-A grubu	-0,252*	0,066	**<0,001***
DM+ botoks grubu	Kontrol grubu	0,371*	0,058	**<0,001***
	DM+ Salin grubu	0,297*	0,068	**<0,001***
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	0,252*	0,066	**<0,001***

ANOVA with Fisher's Least Significant Difference, *p<0,05, BTX-A: Botulinium toksin A



Şekil 6.5. Yara açıldıktan 7 gün sonra yapılan ölçümde değerlendirilen kapanma miktarı (*p<0,001)

Yedinci gündeki iyileşme açısından DM+Salin grubunun kontrol grubuyla benzer olduğu (p:0,787), DM+ klorheksidinli yara örtüsü grubunun da DM+Salin grubu (p:0,884) ve kontrol grubu (p:0,298) ile benzer olduğu görülmüştür. DM+Botoks grubundaki yara iyileşmesinin ise kontol grubundan (p:0,001), DM+ Salin grubundan (p<0,001) ve DM+ klorheksidinli yara örtüsü grubundan (p<0,001) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha iyi olduğu bulunmuştur (Şekil 6.5).

Tablo 6.5. Her alt grubun 7. güne kadar yara alanlarındaki ortalama değişiminin birbiriyle karşılaştırılması

		Ortalama fark	Standart hata	p
Kontrol grubu	DM+ Salin grubu	0,044	0,036	0,787
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	0,089	0,044	0,298
	DM+ BTX-A grubu	-0,137*	0,031	**0,001***
DM+ Salin grubu	Kontrol grubu	-0,044	0,036	0,787
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	0,044	0,041	0,884
	DM+ BTX-A grubu	-0,182*	0,028	**<0,001***
DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	Kontrol grubu	-0,089	0,044	0,298
	DM+ Salin grubu	-0,044	0,041	0,884
	DM+ BTX-A grubu	-0,227*	0,037	**<0,001***
DM+ botoks grubu	Kontrol grubu	0,137*	0,031	**0,001***
	DM+ Salin grubu	0,182*	0,028	**<0,001***
	DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu	0,227*	0,037	**<0,001***

ANOVA with Tamhane test, *p<0,05, BTX-A: Botulinium toksin A

6.3. Histomorfolojik- Histomorfometrik Analiz

Elde edilen kesitlerde cilt dokusuna ait epidermis, dermis tabakaları yara iyileşmesi histolojik parametreleri açısından değerlendirildi (Tablo 6.6). Kontrol ve deney grupları arasında yara iyileşmesinin histolojik değerlendirilmesi aşağıdaki modifiye skorlama parametreleri kullanılarak yapıldı(48, 49).

Tablo 6.6. Deri Yara iyileşme Skorunun belirlenmesinde kullanılan histolojik parametreler

Skor	**1**	**2**	**3**
Epidermis			
Reepitelizasyon	Kısmen kapanmış	Tam kapanmış immatür	Tam kapanmış matür
Dermis			
İnflamatuar Hücre infiltrasyonu (Monosit, Nötrofil, Plazma Hücresi, Histiyosit)	yoğun	hafif	az
Granülasyon Dokusu	Yara Boşluğunu doldurmuş Gevşek	Yara Boşluğunu doldurmuş Erken matür	Yara Boşluğunu Doldurmuş Matür
Neovaskülarizasyon	>7	5-7	<5
Fibroblast Matürasyonu	İmmatür (Yıldız Biçimli)	Orta Matür	Matür (İğ Biçimli, Epidermise paralel yerleşimli)
Kollajen Birikimi *	Hafif soluk boyanma	Orta şiddete boyanma	Yoğun şiddetli boyanma
Kollajen Organizasyonu*	Vertikal	Karışık	Horizontal
Kollajen Paterni*	Retiküler	Karışık	Fasiküler
Granülasyon Dokusu İçinde Kıl Folikülü varlığı	Yok		Var

*Masson's Anilin blue trichrome ile boyanan preparatlarda değerlendirilmiştir

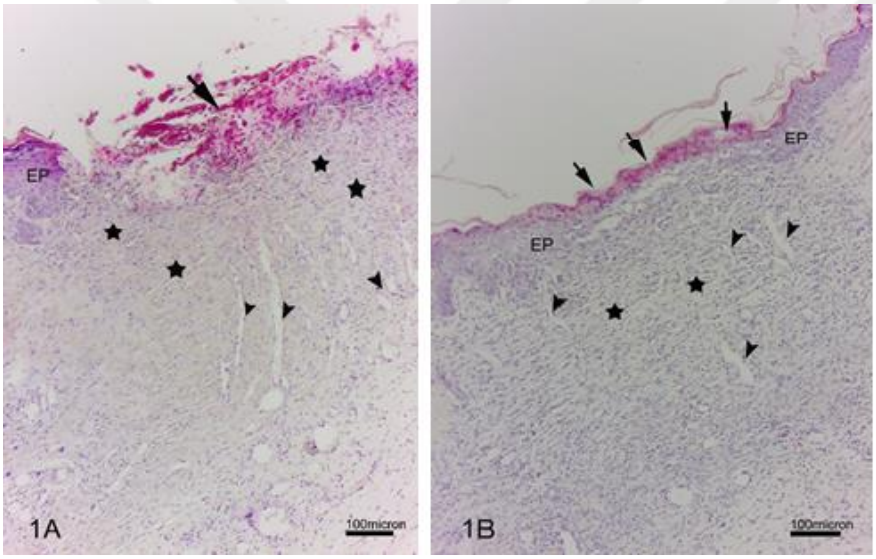
Toplam yara iyileşmesi skoru her bir hayvana ait incelenen parametrelerin skor değerlerinin toplamı ile elde edildi. Buna göre (9-13) arası gecikmiş yara iyileşmesi, (14-20) orta düzey yara iyileşmesi, (21-27) ileri düzey yara iyileşmesi olarak belirlendi.

Yara iyileşme skoru hesaplanan gruplar; Kontrol grubu 16, DM+Salin grubu 13, DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu 17, DM+ BTX-A grubu 24 olarak bulundu (Tablo 6.7). Bu skorlamaya göre yara çevresine DM+BTX-A uygulanan grupta ileri düzey yara iyileşmesi görülmüştür.

Tablo 6.7. Kontrol ve deney gruplarında toplam yara iyileşme skoru

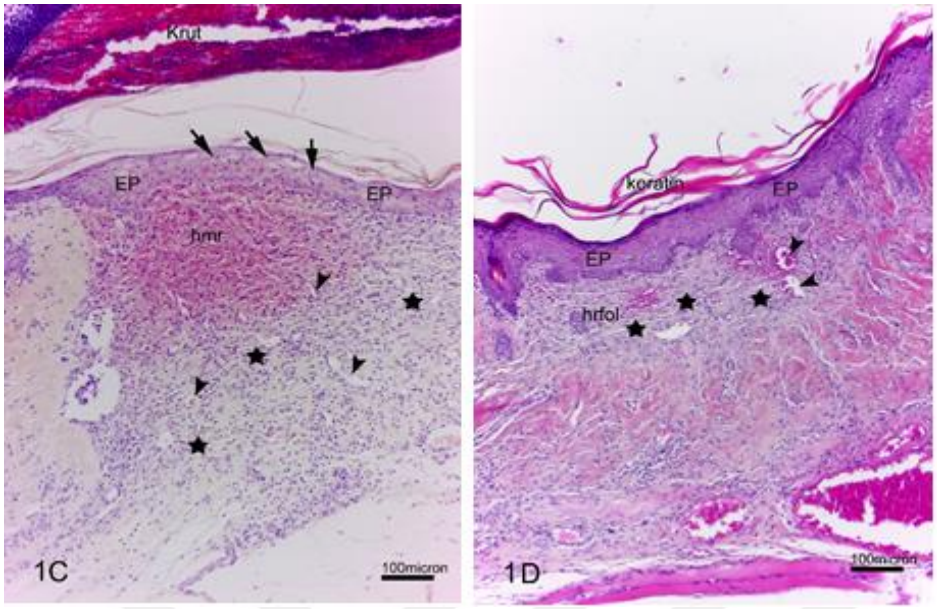
Toplam skor	Toplam yara iyileşmesi skoru	Toplam skora göre hesaplanmış yara iyileşme düzeyi
Kontrol	16	Orta
DM+ Salin	13	Gecikmiş
DM+Klorheksidinli yara örtüsü grubu	17	Orta
DM+ BTX-A	**24**	**İleri düzey**

DM+Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+ BTX-A gruplarında yara bölgesinde çoğunlukla epidermisin rejenere olarak yara yüzeyini kapattığı gözlendi. Yara yüzeyinin sadece salinle yıkandığı kontrol ve DM gruplarında ise bazı hayvanlarda epitelin yara yüzeyini tam olarak kapatamadığı (Resim 6.1 A,B) bazılarında ise yara yüzeyinin ince ve immatür bir epitelle örtüldüğü görüldü (Resim 6.2 B). DM+ BTX-A grubunda epidermisin çok yassı katlı keratinize epitelinin stratum bazale, stratum spinozum, stratum granülozum ve stratum korneum tabakalarını içerecek şekilde yara yüzeyini tamamen kapatttığı ve epidermis maturasyonunun ifadesi olarak granüler tabaka hücrelerinde sitoplazma içerisinde keratohiyalin granüllerinin varlığı görüldü. Epitel yüzeyinde keratin tabaka oluşumu ve epitel kalınlaşması izlendi. Bu bulgular epidermisin DM+Botox grubunda rejenerasyonunu tamamladığını göstermekte idi (Resim 6.1 C,D).



Resim 6.1. A) Kontrol, B) DM grupları.

EP: Epitel, Ok: Rejenere olmamış epidermis yara yüzeyi, Yıldızlar: Granülasyon dokusu ok başları: Granülasyon dokusu içinde damar kesitleri , X10 obj., bar:100µm, Hematoksilin-Eozin

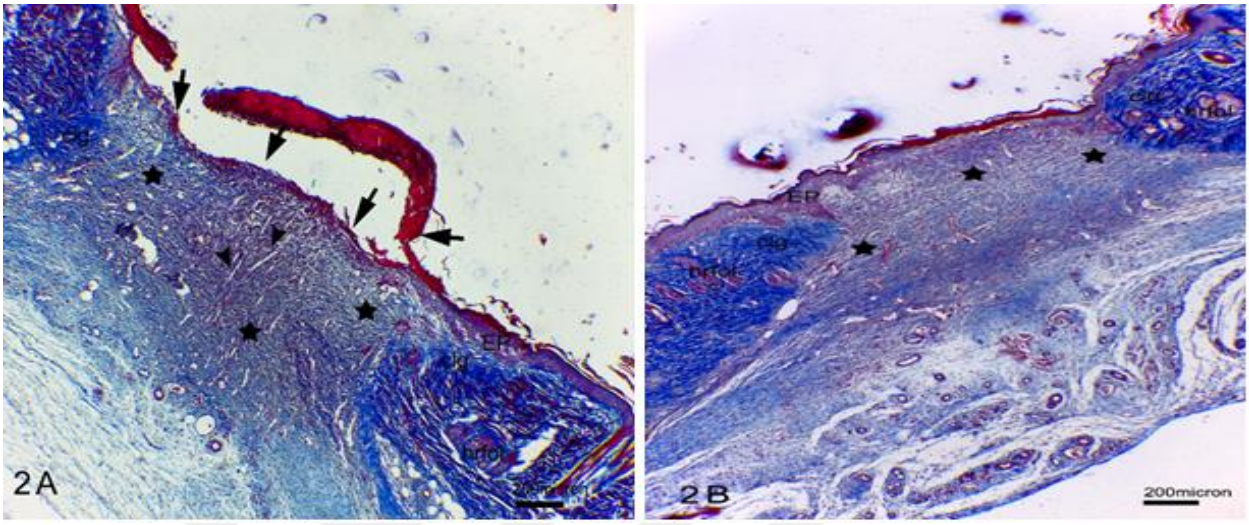


Resim 6.1. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü D) DM+BTX-A grubu

EP: epitel. Oklar: yara yüzeyini kapatmış rejenere epidermis. Ok başları: damar kesitleri. Yıldızlar: granülasyon dokusu. Hmr: eritrosit ve infiltratif hücre içeren hemoraji. Krut: yara yüzeyiniörten eritrosit ve hücre artıkları içeren kabuk

EP: Tüm katlarıyla rejenere epidermis yüzeyde keratin. Ok başları: damar kesitleri. Yıldızlar: granülasyon dokusu. Hrfol: kıl follikülü kesitleri X10 obj., bar: 100µm, Hematoksilin-Eozin

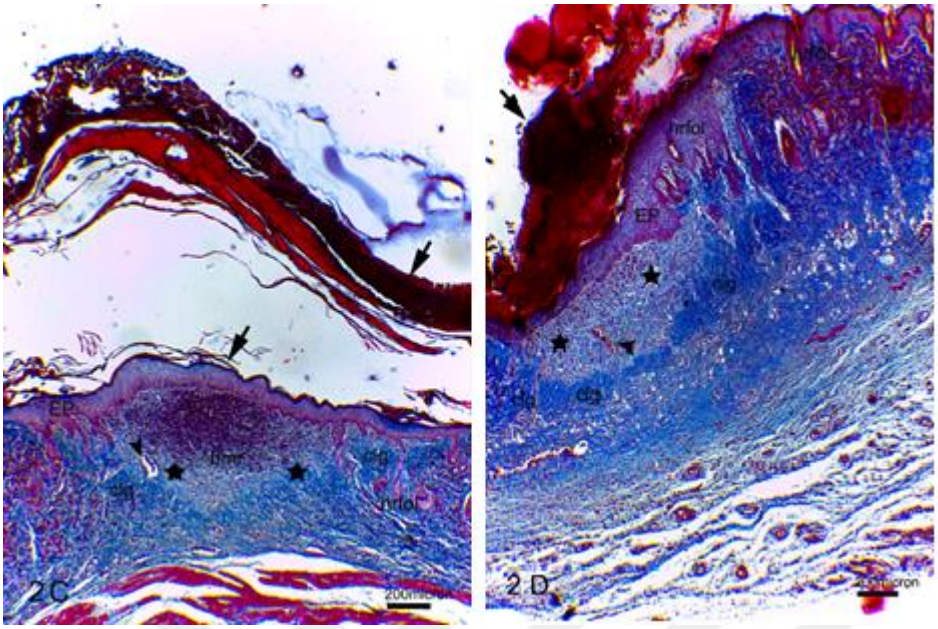
Tüm gruplarda granülasyon dokusu 4.haftada yara bölgesini doldurmuş olarak izlendi.(Resim 6.2 A,B,C,D)



Resim 6.2. A) Kontrol grubu. B) DM grubu

Yıldızlar: granülasyon dokusu. Ok başları: damar kesitleri. Oklar: yüzeyde kabuk oluşumu altında epitelize olmamış yara bölgesi. EP: yara uçlarında normal epidermis epiteli altında dermiste clg: kollajen lif demetleri ve hrfol: kıl follikülleri

EP: yara uçlarında normal epidermis epiteli. Clg: kollajen lif demetleri ve Hrfol: kıl follikülleri. Oklar: yara yüzeyini kapatmış ince immatür epidermis epiteli X 4 obj., bar: 200µm, Masson(anilin mavisi) Trikrom

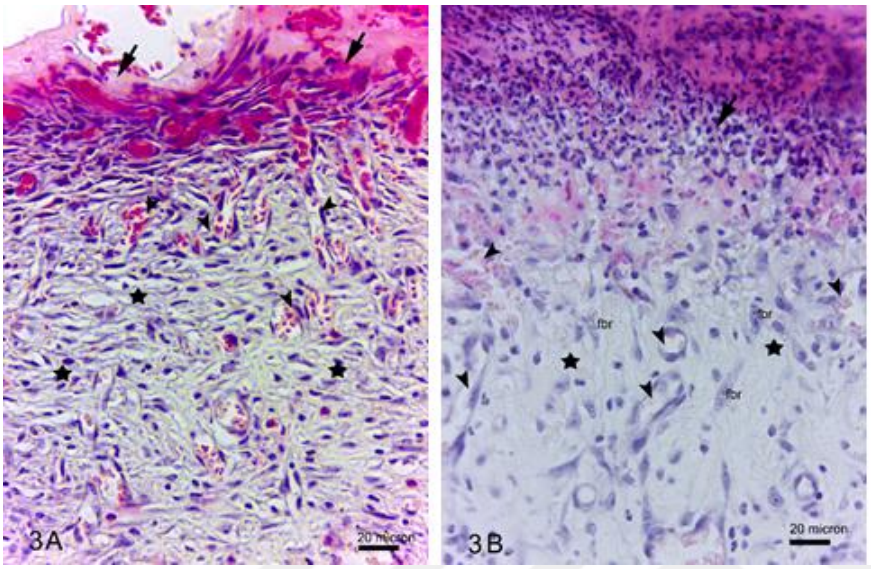


Resim 6.2. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu. D) DM+BTX-A grubu.

Yıldızlar: granülasyon dokusu. Ok başları: damar kesitleri. Oklar: yüzeyde kabuk oluşumu altında rejenere epidermis epiteli. EP: yara uçlarında normal epidermis epiteli altında dermiste. hmr: hemoraji. clg: kollajen lif demetleri ve hrfol: kıl folliküller

Ok: yüzeyel yara kabuğu EP: rejenere epidermis epiteli. Yıldızlar: granülasyon dokusu. Ok başı: damar kesiti. clg: dermiste kollajen lif demetleri ve hrfol: kıl folliküller, X 4 obj., bar: 200µm, Masson(anilin mavisi)Trikrom

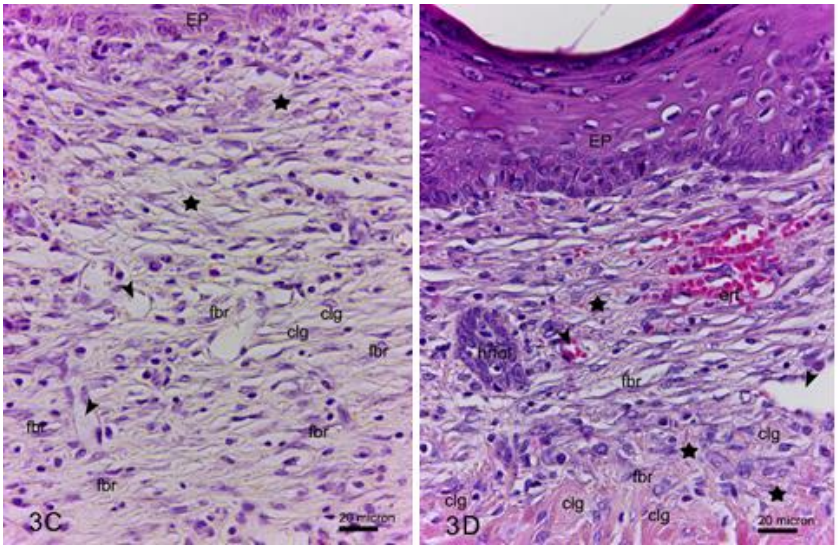
Dermiste granülasyon dokusunda kontrol grubu ve DM grubunda daha fazla sayıda vertikal yönde uzanan yeni damar oluşumu izlendi (Resim 6.3 A,B). DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+BTX-A grubunda ise yeni damar oluşumu daha azdı (Resim: 6.3 C,D).



Resim 6.3. A) Kontrol, B) DM grupları

oklar: yara yüzeyinde eritrositler ve hücre döküntüsü, yıldızlar: granülasyon dokusu

ok başları: damar kesitleri, fbr:fibroblastlar X40 obj., bar:20µm, Hematoksilin-Eozin

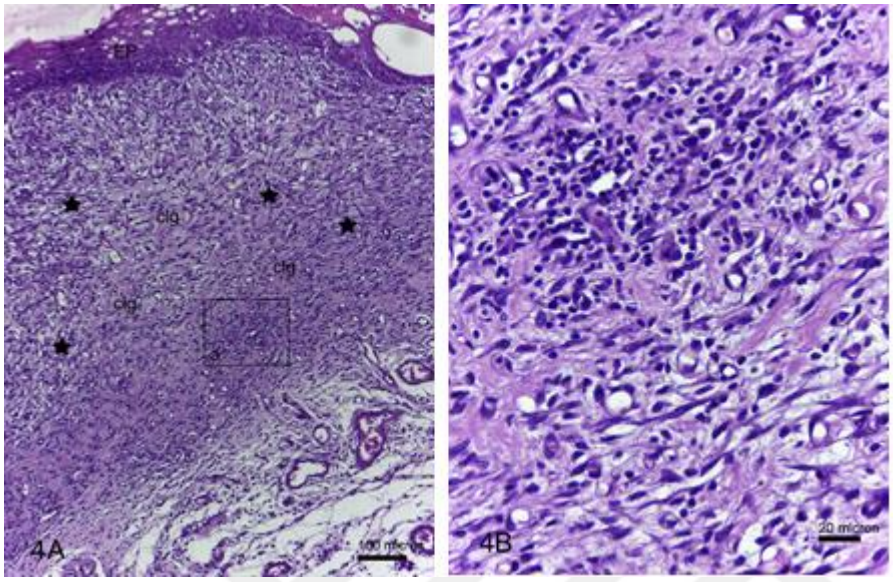


Resim 6.3. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu grubu. D) DM+BTX-A grubu.

ert:eritrosit. EP: rejenere epitel. Ok başları: damar kesitleri. Yıldızlar: granülasyon dokusu

EP: Tüm katlarıyla rejenere epidermis. Yıldızlar: granülasyon dokusu. hrfol: kıl follikülü kesitleri. fbr: fibroblastlar. clg: kollajen lifler X40 obj., bar: 20µm, Hematoksilin-Eozin

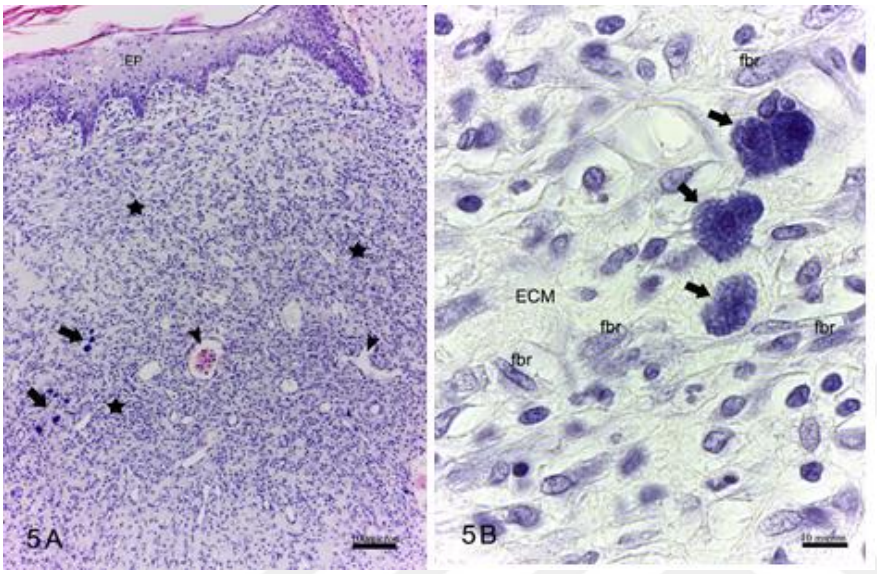
Tüm gruplarda dermiste granülasyon dokusu içinde inflamatuar hücre infiltrasyonu vardı. Kontrol grubu ile DM grubunda Fokal hücre infiltrasyonuda izlendi (Resim 6.4 A,B).



Resim 6.4. A) Kontrol grubu B) DM grubu.

EP: yara yüzeyi vakuolize alanlar içeren rejenere epidermis epiteli. Yıldızlar: granülasyon dokusu. clg: kollajen lif. Dikdörtgen alan a: fokal hücre infiltrasyonu X10 obj., bar: 100µm, büyük büyütmede dikdörtgen alan a: hücre infiltrasyonu X40 obj.bar: 20 µm , Hematoksilin-Eozin

DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu (2 hayvanda) ve DM+BTX-A (2 hayvanda) gruplarında bazı hayvanlarda dermiste granülasyon dokusu içinde hücre infiltrasyonu alanlarında damara yakın mast hücreleri izlendi (Resim 6.5A ve 6.5B)



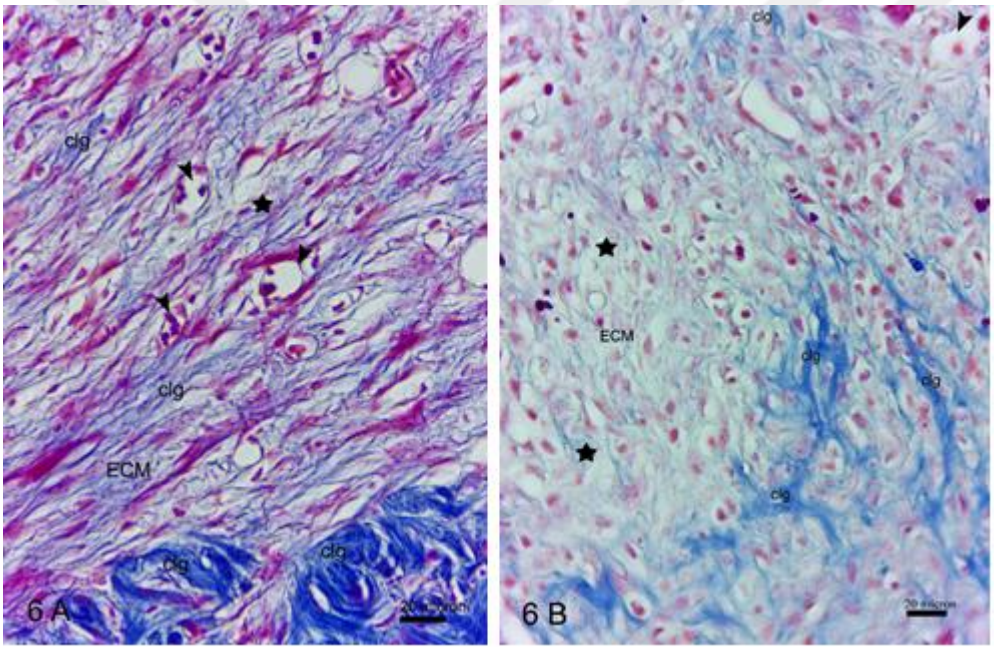
Resim 6.5. A) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu. B) DM + BTX-A

EP: rejenere epidermis epiteli. Ok başları: damar kesitleri. Yıldızlar: granülasyon dokusu. Oklar: mast hücreleri X10 obj., bar: 100µm,

Büyük büyütmede oklar: sitoplazmik granülleriyle mast hücreleri. ECM: ekstraselüler matriks. fbr: fibroblast hücreleri X100 immersiyon obj., bar: 10µm, Hematoksilin-Eozin

Kontrol grubu ve DM+ Klorheksidinli yara örtüsü uygulanan grupta granülasyon dokusu daha fazla miktarda ekstraselüler matriks içermekteydi. Ayrıca karışık yönde düzenlenmiş orta şiddette boyanan kollajen lifler içeren erken matür granülasyon dokusu gözlendi (Resim 6.6 A, C)

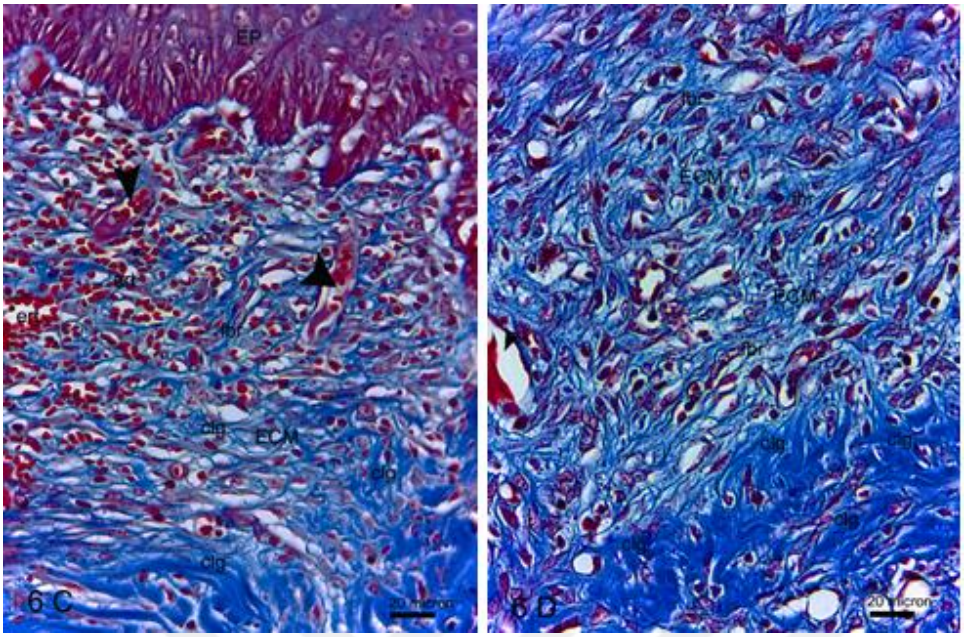
DM grubunda granülasyon dokusu daha gevşek retiküler düzenlenmişti. Az miktarda ekstraselüler matriks ve vertikal düzenlenmiş soluk boyanan ince kollajen lifler içeren immatür granülasyon dokusu izlendi (Resim 6.6 B). DM+ BTX-A uygulanan grupta ise yoğun ve koyu boyanan ekstraselüler matriks içinde horizontal yönde uzanan kollajen liflerin demetler oluşturduğu epidermise paralel düzenlenmiş iğ biçimli fibroblastları içeren granülasyon dokusunun matür granülasyon dokusu özelliklerini içerdiği izlendi (Resim 6.6 D).



Resim 6.6. A) Kontrol grubu. B) DM grubu.

Yıldızlar: granülasyon dokusu. ECM: daha yoğun ekstrasellüler matriks. Ok başları: damar kesitleri. clg: dermiste karışık yönde düzenlenmiş kollajen lifler ve lif demetleri

Yıldızlar: granülasyon dokusu. ECM: gevşek retiküler düzenlenmiş az ekstrasellüler matriks. Vlg: vertikal uzanan soluk boyanmış ince kollajen lifler. Ok başları: damar kesitleri X 40 obj., bar: 20µm, Masson(anilin mavisi) Trikrom

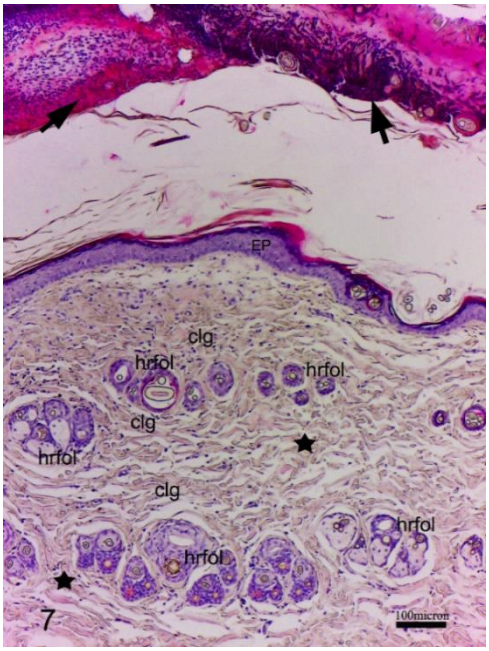


Resim 6.6. C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu. D) DM+BTX-A grubu.

EP: rejenere epidermis epiteli. ECM: yoğun ekstrasellüler matriks. Ok başları: damar kesitleri. ert: doku içinde serbest eritrositler. clg: dermiste koyu boyanan kollajen lifler ve lif demetleri

ECM: yoğun ekstrasellüler matriks. clg: paralel yönde düzenlenmiş koyu boyanmış kollajen lifler ve lif demetleri. fbr: fibroblastlar X 40 obj., bar: 20µm, Masson(anilin mavisi)Trikrom

DM+BTX-A uygulanan grupta matürasyonunun göstergesi olarak granülasyon dokusu içinde deri ekleri ve kıl foliküllerinin varlığı ve hiperplazisi izlendi (Resim 6.7.).



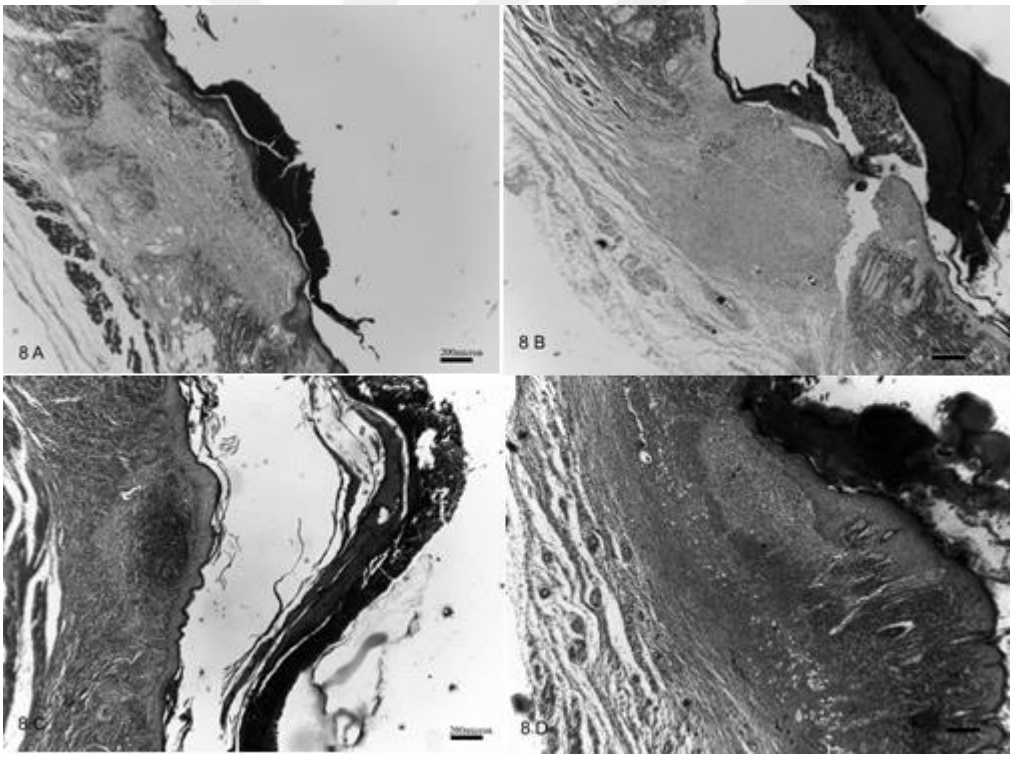
Oklar: yara yüzeyinde hücre döküntüsü ve eritrositleri içeren kabuk. EP: rejenere epidermis epiteli. Yıldızlar: granülasyon dokusu. clg: paralel düzenlenmiş kollajen lifler. hrfol: granülasyon dokusuna kıl folikülü migrasyonu ve hiperplazisi X10 obj., bar: 100µm, Hematoksilin-Eozin

Resim 6.7. DM+BTX-A grubu.

Kontrol grubu DM, DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+BTX-A gruplarında dermiste yara sınırları arası granülasyon dokusunun uzunluğu histomorfometrik olarak ölçüldüğünde DM+BTX-A grubunda kontrol ve diğer gruplara göre en az olduğu görüldü (Tablo 6.8, Resim 6.8.)

Tablo 6.8. Kontrol ve deney gruplarında Dermis granülasyon dokusu uzunluğu

	Dermis yara sınırları arası granülasyon dokusu uzunluğu (μm)
Kontrol (mean±SD)	1855±362
DM (mean±SD)	1780±586
DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu (mean±SD)	1544±993
DM+ BTX-A (mean±SD)	1018±812



Resim 6.8. Yara uçları arasında granülasyon dokusu uzunluğu ölçümü

A) Kontrol B) DM C) DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu D) DM+BTX-A

7. TARTIŞMA

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarında 72 adet Wistar Albino cinsi rat üzerinde gerçekleştirilmiştir. Yara modeli oluşturulan hayvanlarda BTX-A'nın yara iyileşmesi üzerine etkisine bakılmıştır.

Gerek cerrahi sonrası gerekse diyabet ve basınç ülseri gibi farklı etyolojilerle ortaya çıkan yaraların iyileşmesi günümüzde sıklıkla incelenen konular arasındadır. Çünkü yaranın iyileşmemesi ve kronik hale gelmesi hasta için yüksek derecede morbidite, mortalite ve hasta ve sağlık sistemi için ciddi ekonomik yük oluşturmaktadır(50). Bu sebeple yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışma sayısı gittikçe artmaktadır. Özellikle diyabetin sebep olduğu periferik nöropati ve dokunma duyusunun kaybı sebebiyle, insanlarda diyabete bağlı alt ekstremite yaraları görülmektedir(51-54). Diyabetin bir global epidemi ve toplum sağlığını etkileyen en önemli hastalıklardan biri olduğu ve 2040'a kadar dünyada 642 milyon insanın diyabet tanısı alacağı (55) ve bu hastaların yaklaşık %50'sinde periferal nöropati gelişeceği tahmin edilmektedir(51). Bu tip hastalarda gelişen en yaygın komplikasyon olan diyabetik ayak, genellikle hareket başlatma, yürüme ve ayakta durma dönemindeki tekrarlayan basınç artışına bağlı veya travma sonrası görülmektedir(56). Bizim çalışmamızın temelini ise bu tarz hasta gruplarına bir çözüm arayışı oluşturmaktadır.

Günümüze kadar yapılmış çeşitli hayvan deneylerinde, diyabetik hastaların yarasında iyileşmeyi hızlandıracak ve klinik olarak anlamlı şekilde iyileştirecek moleküller araştırılmıştır. Li ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada multipl skleroz tedavisinde kullanılan dimetil fumarat (DMF) molekülünün yara iyileşmesindeki etkisine bakılmıştır. Bizim çalışmamızda da kullanılan STZ molekülü ile oluşturulan diyabet modelinde, oksidatif stres hasarı ve inflamasyonu hafiflettiği ve yara kapanmasını hızlandırdığı bulunmuştur(57). STZ ile oluşturulan diyabet modelinde, tıbbı bir mantar olan ve özellikle diyabet ve kanser tedavisinde kullanılan Sparrassis crispa (58) adlı molekülün yara kapanmasını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde hızlandırdığı ve yaraya makrofaj ve fibroblast göçü, kollajen rejenerasyonu ve epitelizasyonunu arttırdığı bulunmuştur(59). Bizim çalışmamızda da BTX-A'nın diyabete sahip sıçanlarda yara iyileşmesine olan etkileri incelendi.

Bu çalışmada diyabet modeli oluşturulurken STZ kullanılmıştır. Günümüze kadar çeşitli diyabetli hayvan modeli yaratılmıştır(60). Diyabetin hayvan modeli için önemli olan, hastalığın

doğasını, patogenezini ve hastalığa bağlı komplikasyonlarını yansıtmasıdır(60). Diyabet modeli oluşturulan hayvan modellerinde en öne çıkan ajanlar Alloksan ile STZ'dir(61). Her ikisi de sitotoksik bir glukoz analoğudur. Her iki diyabetojenik ajanın sitotoksik etkisi reaktif oksijen radikalleri aracılığı ile olmaktadır, ancak her iki ajana bağlı oluşan bu radikallerin kaynakları farklıdır. Alloksan ve onun redüksiyonu ile oluşan dialurik asit, süperoksit radikallerinin oluşumu ile bir redoks dizisi oluşturur. Bu radikaller dismutasyon ile hidrojen peroksite ilerlemektedir. Daha sonra Fenton reaksiyonu ile oldukça reaktif hidroksil radikalleri oluşur(62). Reaktif oksijen türleri ile birlikte hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki büyük artış, pankreasta insülin oluşturan Beta hücrelerinin hızlı yıkımına neden olmaktadır(63). Streptozosin ise Streptomyces achromogenes adlı bir gram pozitif bakteri tarafından üretilir. Beta hücrelerine bir glukoz taşıyıcısı olan GLUT 2 aracılığıyla girer ve DNA alkilizasyonuna sebep olur(64). DNA hasarı, STZ'nin diyabetojenitesi için DNA hasarının kendisinden daha önemli olan bir süreç olan poli ADP-ribozilasyonunun aktivasyonunu indükler(65). Poli ADP-ribozilasyon, hücresel NAD+ ve ATP'nin tükenmesine yol açar(66). Streptozotosin tedavisinden sonra geliştirilmiş ATP fosforilasyonu, ksantin oksidaz için bir substrat sağlar ve bu da süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olur. Sonuç olarak, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri de üretilir(67). Ayrıca STZ, akonitaz aktivitesini inhibe eden ve DNA hasarına katılan toksik miktarlarda nitrik oksit açığa çıkarır(68). Streptozotosinin bu etkilerinin bir sonucu olarak, B hücreleri nekroz ile yıkıma uğrar ve sonuç olarak ilaca bağlı diyabet tablosu görülür. Alloksan'ın doz aralığı, STZ'ye göre oldukça dardır. Aksine STZ, hayvan modellerinde güvenli bir doz aralığında rahatlıkla verilebilmektedir(68). STZ'nin uygulanma kolaylığı ve güvenliliği sebebiyle bizim çalışmamızda STZ tercih edilerek diyabetik hayvan modeli oluşturulmuştur. STZ, intravenöz veya intraperitoneal olarak hayvan modellerinde uygulanabilmektedir. Intravenöz olarak 40-60 mg/kg olarak verilebilmekte ancak yüksek dozlarda da uygulanabilmektedir(69). Bununla birlikte, STZ aynı doz ve aynı etkinlik oranıyla intraperitoneal olarak da verilebilmektedir(70). Bizim çalışmamızda, intravenöz enjeksiyona göre intraperitoneal enjeksiyonun uygulama kolaylığı ve aynı doz ile aynı etkinlik oranına sahip olması sebebiyle bu uygulama yolu kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda bir kemirgen olan sıçan kullanılmıştır. Kemirgenlerin derileri panniculus carnosus tabakası (sadece insanların boyunlarındaki platismada bulunan ince kas tabakası)'na sahip olması sebebiyle eşsizdir. Bunun sebebi, hasarı takiben hızlı yara kasılmasını sağlamasıdır(71). Dişilerin daha kalın bir epidermis ve subkutan tabakaya sahip olması sebebiyle çalışmamızdaki yer alan tüm hayvanlar dişi cinsiyete sahiptir(72).

Literatürde yara iyileşmesi ile ilgili rodent çalışmalarında insizyonel ve eksizyonel olarak iki ana yara modeli bulunmaktadır; insizyonel ve eksizyonel. İnsizyonel model genellikle cerrahi insizyon materyallerinin araştırılmasında ve farklı dikiş materyallerinin gerilme gücündeki farklılıkları sebebiyle bu materyallerin incelenmesinde faydalı olabilmektedir(73). Eksizyonel yara modeli, en sık kullanılan yara modellerinden biridir(74). Yara kenarlarına dikişin atılmadığı sekonder iyileşmeyle giden akut klinik yaralara benzediği kabul edilmektedir(71). Bu yara modelinde tüm deri tabakaları (epidermis, dermis, ve subkutan yağ tabakası) deney hayvanından cerrahi olarak eksize edilmektedir. Bu yara modeli hemoraji, inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu, reepitelizasyon, anjiyogenez ve remodelling aşamalarınının incelenmesine izin verir. Yara alanları çalışma süresince düzenli çekilen fotoğraflar ile kayıt edilir ve yara alanındaki iyileşmeye bakılır. Histolojik analiz için de çalışma sonunda hayvana ötenazi uygulanır ve gerekli biyopsiler alınır. Bizim çalışmamızın doğası gereği en uygun yara modeli olan eksizyonel yara modeli tercih edildi ve uygulandı. Yukarıda anlatılan aşamalar bir bir uygulandı ve en sonunda Ankara Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı tarafından yara yatağının granülasyonu (toplanmış hücre grupları, vaskülarite ve matrikste değişim) ve kollajen organizasyonu incelenmiştir.

Çalışmamızda diyabetik yara modeli oluşturulan hayvanların, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde kilo kaybettiği tespit edilmiştir. Saydah ve ark.'nın yaptığı çalışmada diyabetin kilo kaybına sebep olduğu bildirilmiştir(75). Literatürde yer alan farklı çalışmalar da bu bulguyu doğrular niteliktedir(76, 77). Öte yandan kemirgenlerde oluşturulmuş diyabet yara modellerinde de kilo kaybı gösterilmiştir. Bu sebeple bulgumuzun literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir(78-80).

Literatüre bakıldığında klorheksidinli yara örtüsünün yara iyileşmesine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Halbuki pratikte birçok merkezde sıklıkla kullanılmaktadır. Öte yandan, Acar ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada Candida Albicans ile enfekte edilerek oluşturulan yanık yara modeli oluşturulmuş ve klorheksidinli yara örtüsünün buna etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada klorheksidinli yara örtüsünün uygulandığı grubun kontrol grubundan bir farkı bulunamamıştır(81). Ulkür ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise Pseudomonas aeruginosa ile enfekte edilerek oluşturulan yanık yara modeline klorheksidinli yara örtüsünün etkisi incelenmiştir. Burada klorheksidinli yara örtüsü grubunun yaralarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrol grubundan daha iyi iyileştiği tespit edilmiştir(82). Çalışmamızda ise klorheksidinli yara örtüsünü uygulanan diyabetli sıçanların kontrol grubundan ve diyabetik olup yaraya salin

uygulanan grupla arasında yara iyileşmesi açısından bir fark görülmemiştir. Bu çalışma modelinin literatürde bir ilk olduğunu vurgulamak isteriz.

Klorheksidinli yara örtüsünün deride alerjik semptomlara sebep olduğu bilinmektedir. 1314 hasta üzerinde yapılmış bir çalışmada 1,5% hastada klorheksidine bağlı kutanöz ve respiratuvar alerjik semptomların geliştiği tespit edilmiştir(83). Garvey ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise klorheksidine bağlı alerjinin immünoglobulin-E aracılığı ve histamin salınımı ile gerçekleştiği bulunmuştur(84). Bizim çalışmamızda ise sınırlı sayıda da olsa klorheksidinli yara örtüsü uygulanan bazı hayvanlarda dermiste granülasyon dokusu içinde mast hücrelerin görüldüğü ve hipersensivite geliştiği tespit edilmiştir. Bu sebeple alerjik öyküsü olan hastalarda klorheksidinli yara örtüsü uygulamasının dikkatli bir şekilde yapılması ve alerjik reaksiyonlara hazırlıklı olunması gerekmektedir.

İyileşen cilt yarasının altındaki kas dokusundaki tekrarlayan mikro travma döngülerinin inflamatuar süreci ve kollajen dokusu ve glikozaminoglikan birikimini arttırmada temel rol oynadığı ve bunun sonucunda skar hipertrofisi ve hiperpigmentasyon meydana geldiği bilinmektedir(85, 86). Skar oluşumunun azaltılması için çeşitli cerrahi teknikler (cilt altı derin sütürizasyon, insizyonun cilt gerginliğinin az olduğu yönde gerçekleştirmek gibi) denenmiş ancak bu teknikler yara gerginliğini azaltsa tam olarak sorunu çözememiştir (87). Cilt altına BTX – A uygulanması sonucu paralitik etki ile yara iyileşmesinin erken fazındaki tekrarlayan mikro travma döngülerini azalttığı ve skar oluşumuna çözüm olabileceği bildirilmiştir(5, 88-90).

Gassner ve ark. tarafından BTX – A'nın primatlar üzerindeki etkisinin incelendiği yara modelinde yara kenarlarının bir tarafına %0,9 oranında normal salin diğer tarafına %0,9 salin ile 7 ünite botoks enjeksiyonu ile oluşturulmuş çözelti uygulanmış. Toksin grubunda BTX – A'nın kemodenervasyon etkisi sonucu skar oluşumunun anlamlı şekilde daha az olduğu sonrasında yapılan histolojik analiz sonucunda inflamasyonun bu grupta daha az olduğu izlenmiştir(88). Gassner ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada ise prospektif randomize kontrollü bir şekilde yüz yarasında BTX – A'nın etkisine bakılmıştır. Fotoğraflar ve 10 cm'lik bir görsel analog skala (sıfır – en kötü; on – ideal) yardımıyla incelenen yaralarda BTX – A grubunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha iyi yara iyileşmesine sahip olduğu bulunmuştur(85).

Lee ve ark.'nın yaptığı çalışmada 15 adet farede cerrahi yara modeli oluşturulmuş ve 2 adet fareye BTX-A enjeksiyonu yapılmıştır. Kontrol grubuna oranla BTX-A grubunda inflamatuar hücre infiltrasyonunun ve fibrozisin daha düşük izlendiği ancak yara iyileşmesinin daha yavaş

olduğu gözlenmiştir(5). Bununla birlikte, Wang ve ark.'nın yaptığı bir hayvan deneyinde botoks grubunda yara iyileşmesinin kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür(91). Bizim çalışmamızın bu çalışmalardan farkı, kemirgenleri dört farklı grup altında incelenmesi ve diyabetli yara modelinde botoksun etkisinin incelenmesidir. BTX-A'nın diyabetli yara modelinde belirgin olumlu iyileşme sağlamasının ileride yapılacak klinik çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda görüldüğü üzere botulinum toksin uygulanan sıçanların granülasyon dokusunda kollajen liflerin demetler oluşturduğu, yoğun boyandığı ve epidermis tabakasına paralel yerleşmiş iğ biçimli fibroblastları içerdiği görülmüştür. Ayrıca bu hayvan grubunun granülasyon dokusu içinde kıl foliküllerinin varlığı ve hiperplazisi izlenmiştir. Jamadagni ve ark.'nın yaptığı hayvan çalışmasında uzamış fibroblast görünümünün granülasyon dokusunun olgunlaştığının bir göstergesi olduğu bildirilmiştir(92). Bununla birlikte Gupta ve ark. yaptığı çalışmada ise granülasyon dokusunun matür olmasının, yara bölgesindeki kollajenlerin yoğun boyanması, horizontal şekilde yerleşimi, ve yarada kıl folikünün varlığı ile paralel olduğu tespit edilmiştir(48). Çalışmamızdaki bulgular bize BTX – A'nın yara iyileşmesine olan bariz etkisini göstermektedir. İleride yapılacak klinik çalışmaların da bu bulgulara paralel şekilde sonuçlanacağını öngörmekteyiz.

7.1. Çalışmamızın Güçlü Yanları ve Kısıtlılıkları

Çalışmamızın güçlü yanları, BTX-A'nın diyabetli hayvan modelinde ülkemizde ilk kez kullanıldığı çalışma olması, histoloji ve tıbbi farmakoloji anabilim dalları ile birlikte gerçekleştirilmiş multidisipliner bir çalışma ile sonuçların klinik ölçümler yanında histolojik olarak da ayrıntılı olarak analiz edilmesidir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları, sıçanlardaki mortalite oranının yüksek olması, neticesinde gruplar arasında sayıların kısmen orantısız olarak sonuçlanmasıdır. Ayrıca histolojik incelemelerin elektron mikroskobisi ile yapılmaması, immünohistokimyasal yöntemin kullanılmaması ve literatüre kıyasla BTX – A'nın daha kısa süreli etkisinin incelenmiş olması çalışmamızın diğer kısıtlılıkları arasında sayılabilir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda BTX-A'nın diyabetli yara modelinde iyileşmeye olan etkisi incelenmiştir. Sonuçlar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

- Çalışmanın başında diyabet grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlığı, kontrol grubu ile istatistiksel olarak benzer bulunurken, çalışma sonunda diyabet grubunun vücut ağırlığı istatistiksel olarak düşük bulunmuştur.
- Diyabet modeli oluşturulmasını takiben yara modeli oluşturulan kontrol ve diyabet grubunda, 5. gündeki DM+ BTX – A grubunun yara alanının tüm diğer alt gruplara göre belirgin düşük olduğu saptanmıştır.
- Diyabet modeli oluşturulmasını takiben yara modeli oluşturulan kontrol ve diyabet grubunda, 7. gündeki DM+ BTX – A grubunun yara alanının tüm diğer alt gruplara göre belirgin düşük olduğu tespit edilmiştir.
- Yara iyileşmesindeki kullanılan histolojik modifiye skorlama parametleri sonucunda DM+ BTX – A grubunda toplam skora göre hesaplanmış yara iyileşme düzeyi "ileri düzey" olarak bulunurken, DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve kontrol grubunda bu düzey "orta düzey" olarak bulunmuştur. DM+ Salin grubunun yara iyileşme düzeyi ise "gecikmiş düzey" olarak tespit edilmiştir.
- Yara iyileşmesinin histolojik analizinde, DM+Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+ BTX – A grubunda yeni damar oluşumu daha az izlendi.
- Yara iyileşmesinin histolojik analizinde, DM+Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+ BTX – A grubundanki bazı hayvanlarda dermiste granülasyon dokusu içinde hücre infiltrasyonu alanlarında damara yakın mast hücreleri izlendi
- Yara iyileşmesinin histolojik analizinde, diyabet grubundaki granülasyon dokusunun daha gevşek retiküler düzenlendiği izlendi.
- Yara iyileşmesinin histolojik analizinde, DM+ BTX – A grubunda matür granülasyon dokusu özelliklerinin olduğu (kıl folikülleri) ancak kontrol grubu ve DM+ Klorheksidinli yara örtüsü grubunda erken matür granülasyon dokusu özelliklerinin olduğu gözlendi.

- Yara iyileşmesinin histolojik analizinde; kontrol grubu, DM+ Salin grubu, DM+Klorheksidinli yara örtüsü grubu ve DM+BTX - A grubunda dermiste yara sınırları arası granülasyon dokusunun uzunluğu histomorfometrik olarak ölçüldü. DM+Botoks grubunda bu uzunluğun, kontrol ve diğer gruplara göre daha az olduğu görüldü.
- Çalışmamız Tip 1 diyabet modelinde yara iyileşmesine BTX-A'nın etkisini değerlendirilmiş olup bunda sonra yapılacak çalışmalarda Tip 1 ve Tip 2 diyabet modelinde yara iyileşmesi üzerine BTX-A'nın etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirilebilir.

9. KAYNAKLAR

1. On the anatomy and physiology of the skin. I. The cleavability of the cutis. (Translated from Langer, K. (1861). Zur Anatomie und Physiologie der Haut. I. Uber die Spaltbarkeit der Cutis. Sitzungsbericht der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Classe der Kaiserlichen Academie der Wissenschaften, 44, 19.). Br J Plast Surg. 1978;31(1):3-8.
2. Larrabee WF, Sherris DA. Principles of facial reconstruction: Lippincott Williams & Wilkins; 1995.
3. McCarthy J. Plastic surgery, vol 1, Philadelphia, 1990. WB Saunders; 1990.
4. Huang C, Murphy GF, Akaishi S, Ogawa R. Keloids and hypertrophic scars: update and future directions. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2013;1(4):e25.
5. Lee BJ, Jeong JH, Wang SG, Lee JC, Goh EK, Kim HW. Effect of botulinum toxin type a on a rat surgical wound model. Clin Exp Otorhinolaryngol. 2009;2(1):20-7.
6. Aoki KR. Pharmacology and immunology of botulinum toxin type A. Clin Dermatol. 2003;21(6):476-80.
7. Fonfria E, Maignel J, Lezmi S, Martin V, Splevins A, Shubber S, et al. The Expanding Therapeutic Utility of Botulinum Neurotoxins. Toxins. 2018;10(5):208.
8. Al-Qattan MM, Al-Shanawani BN, Alshomer F. Botulinum toxin type A: implications in wound healing, facial cutaneous scarring, and cleft lip repair. Ann Saudi Med. 2013;33(5):482-8.
9. Kim YS, Hong ES, Kim HS. Botulinum Toxin in the Field of Dermatology: Novel Indications. Toxins. 2017;9(12):403.
10. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. J Clin Invest. 2007;117(5):1219-22.
11. Leong M, Phillips LG, Murphy DK. Wound Healing, Sabiston Textbook of Surgery, 20th Edition. Townsend MC, editor. USA: Elsevier; 2018. 130-62 p.
12. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları2002. 51-9 p.

13. Brunicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE. Schwartz"s Principles of Surgery. 8 ed2005. 223-48 p.

14. Sayek İ. Temel Cerrahi. Engin A, editor. Ankara2004. 322-3 p.

15. Lawrence WT. Physiology of the acute wound1998. 321-40 p.

16. Desai H, Dyson M, Hart J. The effect of pretreatment with platelet-derived growth factor-AB (PDGF)-AB on acute wound repair1997.

17. Smith PD, Kuhn MA, Franz MG, Wachtel TL, Wright TE, Robson MC. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. J Surg Res. 2000;92(1):11-7.

18. Brunicardi JF. Schwartz's Principles of Surgery. 10 ed. USA: The McGraw-Hill Companies; 2016. 241-7 p.

19. Transforming Growth Factor-beta mRNA and Protein in Hypertrophic Scar Tissues and Fibroblasts: Antagonism by IFN-alpha and IFN-gamma In Vitro and In Vivo. Journal of Interferon & Cytokine Research. 2000;20(2):143-52.

20. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. Annu Rev Biochem. 2009;78:929-58.

21. P Bornstein a, Sage H. Structurally Distinct Collagen Types. Annual Review of Biochemistry. 1980;49(1):957-1003.

22. Collagen: Structure and mechanics. New York: Springer International Publishing; 2008.

23. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem. 1995;64:403-34.

24. Sato K, Yomogida K, Wada T, Yorihuzi T, Nishimune Y, Hosokawa N, et al. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. J Biol Chem. 2002;277(40):37678-84.

25. Robbins SL, Kumar B, Cotran R. Tissue repair: Cellular growth, fibrosis and wound healing. Saunders WB, editor. Philadelphia2000. 46-59 p.

26. Akça T, Öcal K. Yara İyileşmesi ve Yara Bakımı. Genel Cerrahi Ders Notları2010.

27. Heybeli T, Kulaçoğlu H. İnsizyonel hernilerin FGF-beta yüklenmiş prostetik materyal ile onarımı. Ankara2007.

28. Moeini-Naghani I, Hashemi-Zonouz T, Jabbari B. Botulinum Toxin Treatment of Spasticity in Adults and Children. Semin Neurol. 2016;36(1):64-72.

29. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends Biochem Sci. 2002;27(11):552-8.

30. Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. Pharmacol Rev. 1981;33(3):155-88.

31. Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. Toxicon. 2001;39(1):27-41.

32. Bansal C, Omlin KJ, Hayes CM, Rohrer TE. Novel cutaneous uses for botulinum toxin type A. J Cosmet Dermatol. 2006;5(3):268-72.

33. Shaari CM, Sanders I. Quantifying how location and dose of botulinum toxin injections affect muscle paralysis. Muscle & Nerve. 1993;16(9):964-9.

34. Balint B, Mencacci NE, Valente EM, Pisani A, Rothwell J, Jankovic J, et al. Dystonia. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):25.

35. Karp BI, Alter K. Botulinum Toxin Treatment of Blepharospasm, Orofacial/Oromandibular Dystonia, and Hemifacial Spasm. Semin Neurol. 2016;36(1):84-91.

36. Rowe FJ, Noonan CP. Botulinum toxin for the treatment of strabismus. Cochrane Database Syst Rev. 2017;3(3):Cd006499.

37. Sundaram H, Signorini M, Liew S, Trindade de Almeida AR, Wu Y, Vieira Braz A, et al. Global Aesthetics Consensus: Botulinum Toxin Type A--Evidence-Based Review, Emerging Concepts, and Consensus Recommendations for Aesthetic Use, Including Updates on Complications. Plast Reconstr Surg. 2016;137(3):518e-29e.

38. McConaghy JR, Fosselman D. Hyperhidrosis: Management Options. Am Fam Physician. 2018;97(11):729-34.

39. Sheean G. Botulinum toxin for the treatment of musculoskeletal pain and spasm. Curr Pain Headache Rep. 2002;6(6):460-9.

40. Becker WJ. Botulinum Toxin in the Treatment of Headache. Toxins (Basel). 2020;12(12).

41. Khashab MA, Vela MF, Thosani N, Agrawal D, Buxbaum JL, Abbas Fehmi SM, et al. ASGE guideline on the management of achalasia. Gastrointest Endosc. 2020;91(2):213-27.e6.

42. Halleran DR, Lu PL, Ahmad H, Paradiso MM, Lehmkuhl H, Akers A, et al. Anal sphincter botulinum toxin injection in children with functional anorectal and colonic disorders: A large institutional study and review of the literature focusing on complications. J Pediatr Surg. 2019;54(11):2305-10.

43. Chen JL, Kuo HC. Clinical application of intravesical botulinum toxin type A for overactive bladder and interstitial cystitis. Investig Clin Urol. 2020;61(Suppl 1):S33-s42.

44. Yiannakopoulou E. Serious and long-term adverse events associated with the therapeutic and cosmetic use of botulinum toxin. Pharmacology. 2015;95(1-2):65-9.

45. Sorensen EP, Urman C. Cosmetic complications: rare and serious events following botulinum toxin and soft tissue filler administration. J Drugs Dermatol. 2015;14(5):486-91.

46. Partikian A, Mitchell WG. Iatrogenic botulism in a child with spastic quadriparesis. J Child Neurol. 2007;22(10):1235-7.

47. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi [Available from: http://hadyek.ankara.edu.tr/?mod=3.

48. Gupta A, Kumar P. Assessment of the histological state of the healing wound. Plastic and Aesthetic Research. 2015;2:239-42.

49. Sultana J, Molla MR, Kamal M, Shahidullah M, Begum F, Bashar MA. Histological differences in wound healing in maxillofacial region in patients with or without risk factors. Bangladesh Journal of Pathology. 2009;24(1):3-8.

50. Gillette B, Criscitelli T, Howell R, Woods J, Acerra M, Gorenstein S. Regenerative Wound Surgery: Practical Application of Regenerative Medicine in the OR. Aorn j. 2019;109(3):298-317.

51. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. Jama. 2005;293(2):217-28.

52. Apelqvist J, Armstrong DG, Lavery LA, Boulton AJ. Resource utilization and economic costs of care based on a randomized trial of vacuum-assisted closure therapy in the treatment of diabetic foot wounds. Am J Surg. 2008;195(6):782-8.

53. Barshes NR, Sigireddi M, Wrobel JS, Mahankali A, Robbins JM, Kougias P, et al. The system of care for the diabetic foot: objectives, outcomes, and opportunities. Diabet Foot Ankle. 2013;4.

54. Bus SA, van Netten JJ. A shift in priority in diabetic foot care and research: 75% of foot ulcers are preventable. Diabetes Metab Res Rev. 2016;32 Suppl 1:195-200.

55. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas 2015 [7th:[Available from: http://www.diabetesatlas.org/.

56. Najafi B, Crews RT, Wrobel JS. Importance of time spent standing for those at risk of diabetic foot ulceration. Diabetes Care. 2010;33(11):2448-50.

57. Li Y, Ma F, Li H, Song Y, Zhang H, Jiang Z, et al. Dimethyl fumarate accelerates wound healing under diabetic condition. J Mol Endocrinol. 2018;61(4):163-72.

58. Thi Nhu Ngoc L, Oh Y-K, Lee Y-J, Lee Y-C. Effects of Sparassis crispa in Medical Therapeutics: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Int J Mol Sci. 2018;19(5):1487.

59. Kwon AH, Qiu Z, Hashimoto M, Yamamoto K, Kimura T. Effects of medicinal mushroom (Sparassis crispa) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. Am J Surg. 2009;197(4):503-9.

60. Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. J Pharmacol Toxicol Methods. 2016;78:13-31.

61. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51(2):216-26.

62. Munday R. Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of "active oxygen" species. Biochem Pharmacol. 1988;37(3):409-13.

63. Kim HR, Rho HW, Park BH, Park JW, Kim JS, Kim UH, et al. Role of Ca2+ in alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. Biochim Biophys Acta. 1994;1227(1-2):87-91.

64. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. Diabetologia. 2000;43(12):1528-33.

65. Sandler S, Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. Diabetologia. 1983;25(5):444-7.

66. Heller B, Bürkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Müller M, et al. Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. Biol Chem Hoppe Seyler. 1994;375(9):597-602.

67. Nukatsuka M, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Enhancement by streptozotocin of O2- radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. FEBS Lett. 1988;239(2):295-8.

68. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res. 2001;50(6):537-46.

69. Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. Diabetes. 1976;25(7):595-603.

70. Katsumata K, Katsumata K, Jr., Katsumata Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. Horm Metab Res. 1992;24(11):508-10.

71. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. Int J Exp Pathol. 2020;101(1-2):21-37.

72. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. Cell Mol Life Sci. 2014;71(17):3241-55.

73. Shao K, Han B, Gao J, Jiang Z, Liu W, Liu W, et al. Fabrication and feasibility study of an absorbable diacetyl chitin surgical suture for wound healing. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2016;104(1):116-25.

74. Nauta AC, Gurtner GC, Longaker MT. Adult stem cells in small animal wound healing models. Methods Mol Biol. 2013;1037:81-98.

75. Saydah SH, Imperatore G, Henkin L, D'Agostino R, Divers J, Mayer-Davis EJ, et al. Trends and characteristics of self-reported case presentation of diabetes diagnosis among youth from 2002 to 2010: findings from the SEARCH for Diabetes in Youth study. Diabetes care. 2015;38(6):e84-e5.

76. Pinhas-Hamiel O, Hamiel U, Greenfield Y, Boyko V, Graph-Barel C, Rachmiel M, et al. Detecting intentional insulin omission for weight loss in girls with type 1 diabetes mellitus. Int J Eat Disord. 2013;46(8):819-25.

77. Roche EF, Menon A, Gill D, Hoey H. Clinical presentation of type 1 diabetes. Pediatric Diabetes. 2005;6(2):75-8.

78. Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. Diabetologia. 1990;33(8):462-4.

79. Okon U, Owo D, Udokang N, Udobang J, Ekpenyong C. Oral administration of aqueous leaf extract of Ocimum gratissimum ameliorates polyphagia, polydipsia and weight loss in streptozotocin-induced diabetic rats. American Journal of Medicine and Medical Sciences. 2012;2(3):45-9.

80. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Verdi AA, et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2007;22(2):60-4.

81. Acar A, Uygur F, Diktaş H, Evinç R, Ulkür E, Oncül O, et al. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat®), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass®) and nystatin for topical antifungal effect in Candida albicans-contaminated, full-skin-thickness rat burn wounds. Burns. 2011;37(5):882-5.

82. Ulkür E, Oncül O, Karagöz H, Celiköz B, Cavuşlu S. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass), and silver sulfadiazine 1% (Silverdin) for topical antibacterial effect in Pseudomonas aeruginosa-contaminated, full-skin thickness burn wounds in rats. J Burn Care Rehabil. 2005;26(5):430-3.

83. Aalto-Korte K, Mäkinen-Kiljunen S. Symptoms of immediate chlorhexidine hypersensitivity in patients with a positive prick test. Contact Dermatitis. 2006;55(3):173-7.

84. Garvey LH, Krøigaard M, Poulsen LK, Skov PS, Mosbech H, Venemalm L, et al. IgE-mediated allergy to chlorhexidine. J Allergy Clin Immunol. 2007;120(2):409-15.

85. Gassner HG, Brissett AE, Otley CC, Boahene DK, Boggust AJ, Weaver AL, et al. Botulinum toxin to improve facial wound healing: A prospective, blinded, placebo-controlled study. Mayo Clin Proc. 2006;81(8):1023-8.

86. Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. Neurological Research. 2004;26(8):884-92.

87. Sherris DA, Larrabee WF, Jr., Murakami CS. Management of scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. Otolaryngol Clin North Am. 1995;28(5):1057-68.

88. Gassner HG, Sherris DA, Otley CC. Treatment of facial wounds with botulinum toxin A improves cosmetic outcome in primates. Plast Reconstr Surg. 2000;105(6):1948-53; discussion 54-5.

89. Sherris DA, Gassner HG. Botulinum toxin to minimize facial scarring. Facial Plast Surg. 2002;18(1):35-9.

90. Mahboub T, Sobhi A, Habashi H. Optomization of presurgical treatment with botulinum toxin in facial scar management. Egypt J Plast Reconstr Surg. 2006;30:81-6.

91. Wang L, Tai NZ, Fan ZH. [Effect of botulinum toxin type A on the expression of substance P, calcitonin gene-related peptide, transforming growth factor beta-1 and alpha smooth muscle actin A in wound healing in rats]. Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi. 2009;25(1):50-3.

92. Jamadagni PS, Jamadagni S, Mukherjee K, Upadhyay S, Gaidhani S, Hazra J. Experimental and histopathological observation scoring methods for evaluation of wound healing properties of Jatyadi Ghrita. Ayu. 2016;37(3-4):222.