



## Diyabetik Yaraların İyileşmesinde Bazı Glikozaminoglikan Maddelerin (Kitosan ve Hyaluronan) Etkilerinin Karşılaştırılması\*

Fulya TUYGUN<sup>1</sup>, Nazmi ATASOY<sup>2</sup>✉

1. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, TÜRKİYE.
2. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
27.05.2016	03.07.2016	31.10.2016

**Öz:** Bu çalışma, diyabetik yaralarda kitosan ve hyaluronanın etkilerinin karşılaştırılmasını amaçladı. Çalışma toplam kırk Yeni Zelanda tavşanı üzerinde yürütüldü. Tavşanlarda diyabet iki gün arayla iki defa 60 mg/kg dozda alloxan monohidrat uygulaması ile oluşturuldu. Anestezi altında tüm hayvanların bel bölgesinde iki adet 2 cm çapında dairesel tam kat deri yarası oluşturuldu. Çalışma grubundaki hayvanların yaralarından bir tanesine hyaluronan diğerine ise kitosan uygulandı. Post operatif 3., 6., 9., 11. ve 15. günlerde yara iyileşmesi makroskopik ve histopatolojik olarak incelendi ve yara kontraksiyon oranları ölçüldü. Sonuç olarak, ilk on günde kitosanın daha sonraki günlerde ise hyaluronanın diyabetli yara iyileşmesine olumlu katkı sağladıkları saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik yara iyileşmesi, Hyaluronan, Kitosan.

## Comparison on the Effects of Some Glicosaminoglycan Derives (Chitosan and Hyaluronan) in Diabetic Wound Healing

**Abstract:** This study aimed to compare the effects of chitosan and hyaluronan on diabetic wounds. The study was conducted on forty New Zealand rabbits. Diabetes was created in rabbits by injection of 60mg/kg alloxan monohydrate intraperitoneally twice two days apart. Under anaesthesia, 2 cm of diameter two full thickness circular skin wounds were created on the lumbar region of all rabbits. Chitosan was applied to one of the wounds and hyaluronan was applied to the other wound on animals in experimental group. Wound healing were examined macroscopically and histopathologically and wound contraction rates were measured at postoperative 3<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days. As a conclusion, it is determined that using chitosan in the first ten days and in the subsequent days using hyaluronan contribute positive effects on diabetic wound healing.

**Keywords:** Chitosan, Diabetic wound healing, Hyaluronan.

✉ Nazmi ATASOY  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.  
e-posta: nzmatsy@gmail.com

\* Aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

## GİRİŞ

**Y**ara, yumuşak doku bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara iyileşmesi birbirini takip eden ve birbirleriyle sıkı ilişki içerisinde olan hemostazis, inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon (remodelling) olarak adlandırılan dört evrede gerçekleşmektedir. Yukarıda kısaca özetlenen süreç ile iyileşen yaralar akut yara, bu evreleri takip etmeyen diyabet dahil iyileşmesi geciken veya eksik kalan yaralar da kronik yara olarak tanımlanmaktadır (1, 2).

Yara iyileşmesinde birçok yöntem ve madde kullanılmıştır. Bu maddelerden ekstrasellüler matriks (ECM)'in yapısında büyük oranda yer alan glikozaminoglikan türevi maddeler son 40 yıldan beri bilim adamlarının potansiyel biomedikal aplikatörler olarak dikkatini çekmektedir (3).

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen  $\beta$ -(1-4)-D glikozamino-N asetil-D-glikozamindir. Biyolojik parçalanma sonrası çok düşük toksisiteye sahiptir. Kitosan yanık ve travmatik yaraların sağaltımında yaygın biçimde kullanılır (4,5). Kitosan ve kitin yara iyileşmesinin erken döneminde nötrofiller için şemootraktan özellik göstererek yara iyileşmesini hızlandırır (4). Yine Ueno ve ark. (6) ile Ishihara ve ark. (7) çalışmalarında kitosanın polimorf nükleer nötrofil (PMNs) ve makrofajların fonksiyonlarını arttırdığını bildirmişlerdir. Bu özelliklerine ilave olarak fibroblastlarla birlikte vasküler endotelial hücrelerin çoğalmasını ve göçünü sağlar, ayrıca fibroblastlardan interlökin-8 (IL-8)'in salgılanmasını provoke eder (4). Fibroblast growth faktör-2 (FGF-2) ihtiva eden çapraz bağlı kitosanın diyabetik farelerde yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (8).

Epitelial growth faktör (EGF) ihtiva eden kitosan jel ile 2. derecedeki yanık yaralarında yapılan araştırmada kontrol grubuna göre daha hızlı bir epitelizasyon sağlandığı vurgulanmıştır (9). Kitosan fibroblast proliferasyonunu, ihtiyaç duyulan kollojeni ve yara kenarından natürel hyaluronik asit sentezini uyarmaktadır (10). Kitin ve kitosanın in vitro olarak

köpek PMN lerini leucotrine (LTB<sub>4</sub>) salmak için stimüle ettiği, in vivo olarak direkt ya da kompleman aktivasyonu yoluyla, köpek PMN'lerini araziidonik asit veya sitokin üretimi vasıtasıyla etkilediği gösterilmiştir (11).

Glukuronik asit N-asetilglikozamin disakkarit yapıya sahip olan hyaluronan doğadaki en higroskopik moleküllerden birisidir. Hyaluronanın bu higroskopik özelliği ECM ile hücreler arasındaki bağın zayıflamasına ve böylece hücrelerin göçü ile bölünmelerine yardımcı olur (12). Yüksek viskoz özelliği dolayısıyla hyaluronandan zengin perisellüler bölge oluşturarak viral ve bakteriyel pasajın hücrelere temasını engellemektedir (13,14). Hyaluronan aynı zamanda serbest radikalleri temizleyici olarak antioksidan etkiyede sahiptir (15,16).

Hyaluronan ve deriveleri yara iyileşmesinde kullanılmış, hem kendisinin hemde derivelerinin bakteriyostatik etki göstererek yara bölgesini mikroorganizmalara karşı koruduğu bildirilmiştir (2,17,18).

Bu çalışma, tavşanlarda, glikozaminoglikan türevleri olan; kitosan ve hyaluronan'ın diyabetik yara iyileşmesi üzerine olan etkilerini makroskopik ve histopatolojik karşılaştırmayı amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 8-12 aylık ve 2.5-3 kg ağırlığında erkek Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanılarak, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu kararı ve denetimi altında Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı küçük hayvan kliniğinde, Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAPB'nin destekleri ile yapıldı.

Çalışma her bir grupta 6 adet olmak üzere 5 deney grubu ve 2 şer adeten oluşan 5 kontrol grubu olmak üzere toplam 10 grup olarak, 40 adet Yeni Zelanda tavşanı üzerinde yapıldı. Çalışmanın yürütüldüğü tüm gruptaki hayvanlara adaptasyon

dönemi sonrasında 60 mg/kg dozda alloxan monohidrate 2'şer gün arayla intraperitoneal (i.p) olarak verildi. Alloxan uygulamasını takiben 5. günde kan glikoz düzeyi ölçülerek 250 mg/dl üzerinde olan hayvanlar diyabetli olarak kabul edildi. Çalışma öncesi hayvanlar 12 saat aç bırakıldı. Gruplardaki tüm hayvanlara 3mg/kg dozda xylazine 30mg/kg dozda ketamin i.m. enjeksiyon ile genel anestezi uygulandı. Operasyon bölgesi hazırlandıktan sonra tüm hayvanlarda bel bölgesinde median hattın 2.5 cm mesafede 2 cm çapında (3.14 cm<sup>2</sup>) dairesel tam kat 2 adet deri yarası oluşturuldu. Yaraların oluşturulmasından sonra yaraların çapları ölçülerek ilk gündeki alanları hesaplandı. Çalışma grubundaki her hayvanda oluşturulan dairesel yaralardan birisine hyaluronan diğereine de kitosan eşit miktarda (0.5 ml) jel olarak günde iki kez olmak üzere (sabah-akşam) günün aynı saatlerinde uygulandı. Kontrol grubundaki toplam 10 hayvana ise yara bölgesine serum fizyolojik günde iki kez 0.5 ml damla olarak uygulandı. Üçüncü günde, 6. günde, 9. günde, 11. günde ve 15. günde, günün aynı saatlerinde olmak üzere yara alanları (sentrifugal olay nedeniyle dairesel şekil bozulduğundan) milimetrik ölçülü şeffaf şablonun, stereolojide yüzey alanı hesaplamada kullanılan noktalı alan ölçüm cetveli (19) gibi, kullanılması suretiyle ölçüldü. Altıncı günde, 11. ve 15. günde her bir çalışma grubundaki 6 ve her bir kontrol grubundaki 6 hayvan önce genel anesteziye alındı, ardından oluşturulan ve medikal sağaltım uygulanan çalışma grubu ve kontrol grubu yaralardan çevre dokulardan da 0.7 cm kadar içerecek şekilde alınan doku örnekleri, %10'luk tamponlu formalin'de tespit edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan 4µm'lik kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ve Van-Giesson boyaları ile boyanarak araştırma mikroskopunda incelendi. İrreverzibil diyabet sonucu oluşacak kötü yaşam koşulları nedeniyle tüm hayvanlar anestezi altında biyopsi işlemi

tamamlandıktan sonra yüksek doz anestezi uygulaması ile ötenazi edildi. Çalışmanın sonuçları makroskopik, histopatolojik ve istatistiki olarak değerlendirildi. Yara kontraksiyon oranları (ilk günkü yara alanı (Ao) - kontrol günlerinde ölçülen yara alanı (At)) / At X 100 formülü ile hesaplandı (20).

### İstatistiksel Analiz

Gruplara ait istatistik hesaplamalar ve grupların ortalama değerleri arasındaki farklılıkların önemliliği için Varyans analiz metodu; gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için de Duncan testi uygulandı (21). İstatistiki analizler SAS (22) bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı.

### BULGULAR

#### Makroskopik Bulgular

Altıncı günde kontrol grubunda düzensiz bir kabuklanma ve küçük çapta yangı odakları gözlenirken (Şekil 1), kitosan ve hyaluronan gruplarında kabuklanma daha düzenliydi ve herhangi bir enfeksiyon odağı gözlenmedi. Hyaluronan grubuyla karşılaştırıldığında, kitosan grubunda kabuklanma daha düzenli ve hemen hemen tamamlanmıştı (Şekil 2).

#### 6. gün



Şekil 1. 6. gün kontrol grubu.

Figure 1. 6<sup>th</sup> day, control group.



**Şekil 2.** 6. Gün, sağ hyaluronan, sol kitosan.  
**Figure 2.** 6<sup>th</sup> day, right hyaluronan, left chitosan.

**11. gün**



**Şekil 3.** 11. Gün, sağ hyaluronan, sol kitosan.  
**Figure 3.** 11<sup>th</sup> day, right hyaluronan, left chitosan.



**Şekil 4.** 11. gün Kontrol grubu  
**Figure 4.** 11<sup>th</sup> day control group.

Onbirinci günde kitosan grubundaki iyileşmenin hyaluronan grubuna göre yavaşlamaya başladığı ve hyaluronan grubunda kabuklanmanın daha hızlı olarak ve muntazam bir şekilde ilerlediği gözlemlendi. Her iki grupta da enfeksiyon odaklarına rastlanmadı. Kitosan grubunda oluşan kabukta çatlaklar meydana geldi ve bu çatlaklar arasında seröz bir eksudat görüldü (Şekil 3). Kontrol grubunda irin odaklarının azaldığı ancak, dökülen kabuk altındaki yara bölgesinde iyileşmeyen kısımlar olduğu gözlemlendi (Şekil 4).

**15. gün**



**Şekil 5.** 15. gün, sağ hyaluronan, sol kitosan.  
**Figure 5.** 15<sup>th</sup> day, right hyaluronan, left chitosan.



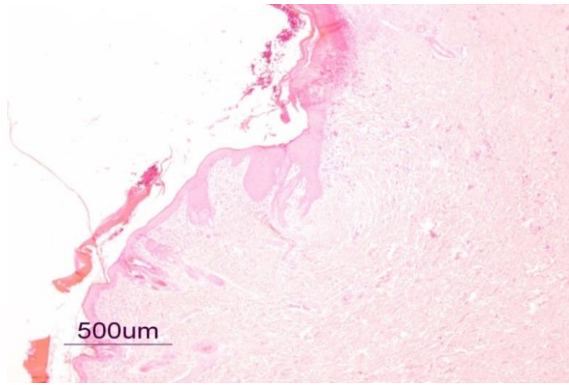
**Şekil 6.** 15. Gün, kontrol grubu.  
**Figure 6.** 15<sup>th</sup> day, control group.



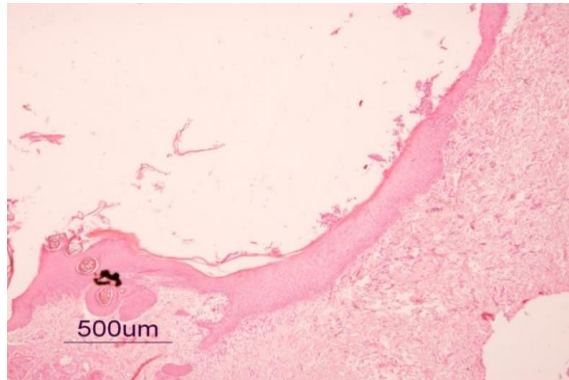
Onbeşinci günde hyaluronan grubunda yaranın küçüldüğü ve iyileşmenin büyük oranda sağlandığı gözlenirken, kitosan grubunda hyaluronan grubuna göre iyileşmenin biraz daha az olduğu saptandı (Şekil 5). Kontrol grubunda ise kabuklanmanın bile yetersiz olduğu, kabuklanmanın olmadığı yerlerde iyileşmeyen bölgelerin varlığı gözlemlendi (Şekil 6). Her üç grupta da enfeksiyona rastlanmadı.

### Histopatolojik Bulgular

#### 6. gün



**Şekil 7.** 6. Gün, hyaluronan. H.E, Bar = 500µm.  
**Figure 7.** 6<sup>th</sup> day, hyaluronan HE, Bar = 500µm.



**Şekil 8.** 6. gün, kitosan H.E, Bar = 500µm.  
**Figure 8.** 6<sup>th</sup> day, chitosan H.E, Bar = 500µm.

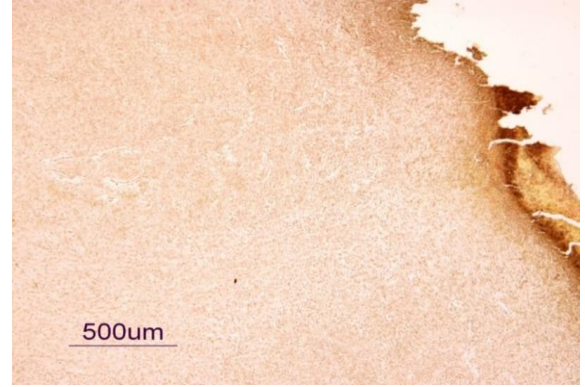
Kontrol grubu: Yara bölgesinde epitel rejenerasyonu hiç gelişmemiş, angiogenesis yetersiz, yangısal hücrelerden zengin bir bağdoku proliferasyonu görüldü.

Hyaluronan grubu: Epitel rejenerasyonu yara kenarlarından yeni başlamıştı. Rejenerasyonun

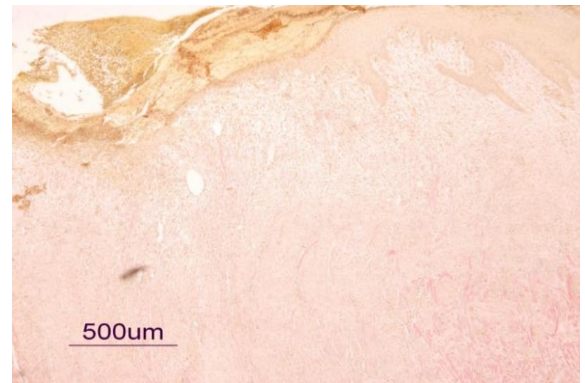
henüz gerçekleşmediği bölgelerde kapillar hiperemi ve çok az sayıda epitel hücre aktivasyonu görüldü. Dermiste belirgin angiogenesis ve bazı kapillar damarlarda hiperemiyle birlikte az sayıda lenfoplazmasiter ve nötrofil lökositlerden oluşan hücre infiltrasyonu içeren gevşek bağdoku proliferasyonu belirlendi (Şekil 7).

Kitosan grubu: Epitel rejenerasyonunun yara kenarlarından başladığı, bölgenin hiperemik olduğu ve yüzeyin, içinde nötrofil lökositler ile makrofajlar bulunan nekrotik bir eksudatla örtülü olduğu izlendi. Dermis bölgesinde angiogenesis, kapillar hiperemi, az sayıda lökositlerden oluşan hücre infiltrasyonu ile birlikte gevşek bağdoku proliferasyonu saptandı (Şekil 8).

#### 11. gün



**Şekil 9.** 11. gün, hyaluronan Van-Giesson, Bar = 500µm.  
**Figure 9.** 11<sup>th</sup> day, hyaluronan Van-Giesson, Bar = 500µm.



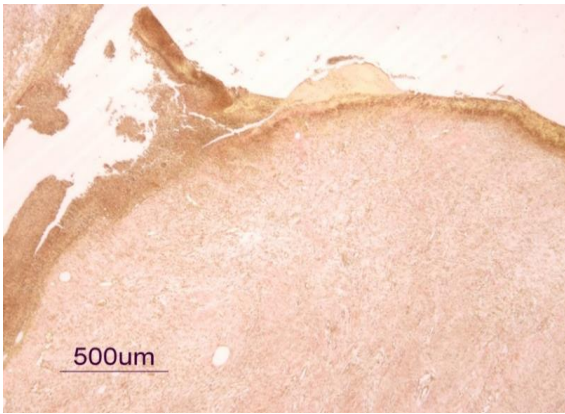
**Şekil 10.** 11. gün, kitosan Van-Giesson, Bar = 500µm.  
**Figure 10.** 11<sup>th</sup> day, chitosan Van-Giesson, Bar = 500µm.

Kontrol grubu: Yara bölgesindeki kenarlarından başlayan bir epitel rejenerasyonu gözlemlendi, ancak henüz epitel rejenerasyonu tamamlanmamış ve yaranın orta kısmı eksudatla örtülüydü. Dermisde belirgin bir angiogenezisle birlikte az sayıda mononükleer hücre içeren gevşek bir bağdoku gözlemlendi.

Hyaluronan grubu: Yara bölgesinde epitel rejenerasyonu tamamlanmamıştı. Dermis bölgesinde angiogenezisle birlikte az sayıda mononükleer hücre içeren tam olgunlaşmış bağdoku proliferasyonu gözlemlendi. Bu gruptaki bağdoku olgunlaşması kontrol ve kitosan gruplarına göre daha belirgin olarak gerçekleşti (Şekil 9).

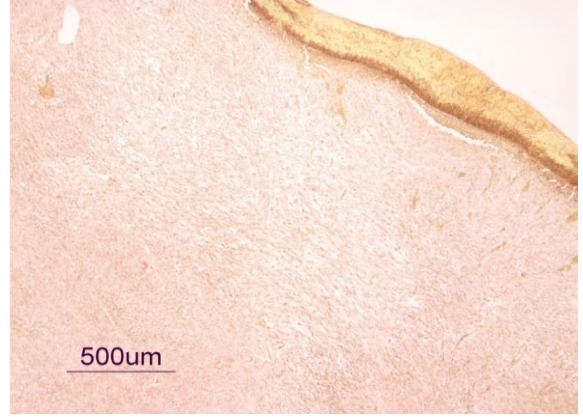
Kitosan grubu: Yara bölgesinde epitel rejenerasyonu tamamlanmamıştı. Dermis bölgesinde angiogenezisle birlikte az sayıda mononükleer hücre içeren henüz tam olgunlaşmamış bağdoku proliferasyonu gözlemlendi. Bu gruptaki epitel rejenerasyonu ve bağdoku olgunlaşması kontrol grubuna göre daha belirgin olarak gerçekleşti (Şekil 10).

### 15. gün



**Şekil 11.** 15. gün, hyaluronan Van-Giesson, Bar = 500µm.

**Figure 11.** 15<sup>th</sup> day, hyaluronan Van-Giesson, Bar = 500µm.



**Şekil 12.** 15. gün, kitosan Van-Giesson, Bar = 500µm.  
**Figure 12.** 15<sup>th</sup> day, chitosan Van-Giesson, Bar = 500µm.

Kontrol grubu: Yara bölgesindeki epidermiste ensizyon uçlarından başlayan bir rejenerasyon gözlemlendi, ancak henüz epitel rejenerasyonu tamamlanmamış ve yaranın orta kısmı eksudatla örtülüydü. Dermiste belirgin angiogenezis ve bazı kapillar damarlarda hiperemiyle birlikte az sayıda lenfoplazmasiter hücre infiltrasyonu içeren gevşek bağdoku proliferasyonu belirlendi.

Hyaluronan grubu: Yara bölgesindeki epidermiste epitel rejenerasyonu büyük çoğunlukla ilerlemiş fakat tam olarak tamamlanmamıştı. Dermis bölgesinde angiogenezisle birlikte az sayıda mononükleer hücre içeren tam olgunlaşmış bağdoku proliferasyonu gözlemlendi. Bu gruptaki epitel rejenerasyonu ve bağdoku olgunlaşması kontrol ve kitosan gruplarına göre daha belirgin olarak gerçekleşti (Şekil 11).

Kitosan grubu: Ensizyon bölgesindeki epidermiste epitel rejenerasyonu büyük çoğunlukla ilerlemiş fakat tam olarak tamamlanmadı. Dermis bölgesinde angiogenezisle birlikte az sayıda mononükleer hücre içeren henüz tam olgunlaşmamış bağdoku proliferasyonu gözlemlendi. Bu gruptaki epitel rejenerasyonu ve bağdoku olgunlaşması kontrol grubuna göre daha belirgin olarak gerçekleşti (Şekil 12).

**Tablo 1.** Yara kontraksiyon oranları.  
**Table 1.** Rates of wound contraction.

Günler	Gruplar				Contrast, P<	
	Kontrol	Hyaluronan	Kitosan	SEM	Linear	Quadratic
3	9.15±1.50 <sup>b</sup>	10.77±1.27 <sup>b</sup>	48.82±7.13 <sup>a</sup>	5.49	0.000	0.008
6	13.13±2.29 <sup>b</sup>	26.85±3.00 <sup>b</sup>	50.15±7.96 <sup>a</sup>	4.91	0.001	0.495
9	29.25±3.28 <sup>b</sup>	43.65±3.48 <sup>a</sup>	53.60±3.53 <sup>a</sup>	3.09	0.000	0.610
10	32.70±2.17 <sup>b</sup>	65.78±3.54 <sup>a</sup>	62.32±3.42 <sup>a</sup>	4.01	0.000	0.001
15	36.65±1.02 <sup>c</sup>	93.15±2.39 <sup>a</sup>	75.48±2.76 <sup>b</sup>	5.38	0.000	0.000

<sup>abc</sup> aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (P<0.05).

<sup>abc</sup> Means in each variable are differ significantly (P<0.05)

Yara kontraksiyon oranları incelendiğinde, kitosanın kontrol gurubuna göre tüm günlerde; hyaluronana göre ise 10. güne kadar (P<0.05), hyaluronan grubunda yara kontraksiyon oranlarının kontrol gurubuna göre tüm günlerde, 10. günden itibaren kitosandan daha fazla olduğu saptandı (P<0.05), (Tablo 1).

#### TARTIŞMA ve SONUÇ

Normal yara iyileşme zincirini takip etmeyen kronik yaralarda, yeteri miktarda büyüme faktörü ve aktivatör üretiminin azlığı veya yetersizliğini (2, 23) anjiyogenetik yanıtı (24), makrofajların fonksiyonlarını, miktarını ve fenotiplerini (25), kollojen miktarını ve oluşan granülasyon doku karakterini (26), fibroblast, keratinosit göçü ve gelişmelerini (27), matriks metalloproteinazlar tarafından kontrol edilen ekstraselüler matriksin bileşimleri ve yeniden şekillenmesini de ihtiva eden 100'ün üzerinde neden bulunmaktadır (28).

Deney hayvanlarında Tip-1 diyabetin oluşturulması için kullanılan kimyasal maddelerin en önemlilerinden birisi alloxandır (29,30). Pradhan ve ark. (31) nın tavşanlarda yaptıkları deneysel çalışmada alloxanı 48 saat arayla 50 mg/kg dozda damar içi vererek 10 gün sonra 250mg/dl kan glikoz seviyesine ulaşarak diyabet oluşturdukları belirtilmiştir. Ayrıca Wang ve ark. (32), tek doz %5'lik alloxanı 100 mg/kg olarak uygulayarak bir hafta sonra başarılı bir şekilde diyabet oluşturduklarını bildirmişler, kan glukoz düzeyinin 350 mg/dl'nin üzerinde olan tavşanlarada insülin uygulamışlardır. Bu çalışmada tavşanlara 60 mg/kg dozda 48 saat arayla iki kür halinde alloxan i.p olarak verildi ve 7 gün

sonra 250 mg/dl kan glikoz seviyesine ulaşıldı. Yapılan bu çalışmada tavşanların yaklaşık %30'unda hipoglisemi şekillendi. Bu durumun düzeltilmesi için hipoglisemik tavşanlara %20 lik dextrozdan 30 ml, gerektiği kadar 2 veya 3 doz intra peritoneal olarak uygulandı. Wang ve ark. (32)'da, alloxan uygulamasını takiben şekillenen hipoglisemiyi tedavi için %5 lik 10 ml glikozu 4. , 8. ve 12. saatlerde deri altı, daha sonraki 1. ve 2. günde % 5'lik glikozu oral olarak vermişlerdir.

Yapılan çalışmada tavşanların bel bölgesinde iki adet 2 cm çapında (3.14 cm<sup>2</sup>) dairesel tam kat deri yarası cerrahi makasla oluşturuldu. Oluşturulan bu yara, ebadı itibarı ile çalışma süresince herhangi bir komplikasyona neden olmamıştır. Ancak sentrifugal olay nedeni ile yara alanında artış doğal olarak gözlenmiştir. Her ne kadar sentrifugal olaya bağlı olan bu genişlemenin ilk 3 gün sonrasında normale döndüğü bildirilmişse de (33), aksine bu çalışmada yara kontraksiyon oranları ilk on günde düşük oranda kalmıştır. Uygulanan sağaltıma bağlı olarak mevcut genişlemenin on gün sonra ortadan kalkması, bu durumun diyabetten kaynaklandığını ortaya koymuştur.

Kitin ve kitosanın güçlü hemostatik etkisinin olduğu bildirilmektedir (34). Fibrin oluşumu kan kaybını önlemekle kalmaz, aynı zamanda geçici ekstraselüler matriksi oluşturur (35). Bu çalışmada kitosan ve hyaluronan kullanılan yaralarda çalışma süresince kanama görülmemiştir. Trombositler aktive edildiğinde platelet derived grovt faktör (PDGF), FGF, IL-1, IL-8 gibi birçok büyüme faktörü salgılanır. Bu faktörler fibroblastları aktive ederek kollojen, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanların üretimini

artırır ve böylece yara iyileşmesi sürecini uyarır (36, 37). Çalışmanın makroskobik ve histopatolojik incelemelerinde ilk on günde kitosan uygulanan yaraların daha hızlı iyileştiği görülmüştür. Bu sonuç kitosanın, trombositleri normal koagülasyon mekanizmasından farklı bir şekilde (38, 39) daha fazla aktive etmesinden ve yarada artan oranda doğal hyaluronik asit sentezini stimüle etmesine (10) bağlanmıştır.

Hyaluronanın (18) da, kitosan (40) gibi antimikrobiyal özelliği vardır. Yapılan çalışmada hem kitosan grubunda hem de hyaluronan grubunda aynı zamanda da kontrol grubunda da enfeksiyona rastlanmamıştır. Dolayısıyla çalışmadan elde edilen bu bulgulara göre kitosanın hem de hyaluronanın antimikrobiyal özellikleri hakkında kesin bir kanaate varılamamıştır.

Kitosanın makrofajlardan transforming growth faktör (TGF) ile PDGF faktör üretimini (41) ve interleukin 1-  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) (42) salgılanmasını artırdığı bildirilmektedir. Hyaluronanın ise makrofajlarda bulunan CD44 reseptörlerine bağlanarak tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1  $\beta$  ve insülin benzeri growth faktör-1 (ILGF-1) salgıladığı vurgulanmaktadır (43). Diğer taraftan Kobayashi ve ark. (44) da hyaluronan konsantrasyonuna bağlı olarak insan uterin fibroblastlarında TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-8 salgılandığını bildirmişlerdir. Gerek kitosanın ve gerekse hyaluronanın salgılanmasını sağladıkları yukarıda bahsi geçen kimyasal maddelerin yara iyileşmesi üzerine olumlu katkıları olan ve yara iyileşmesinde kullanılan materyaller olduğu da bilinmektedir (36, 37). Çalışmada, her iki maddeninde yukarıda sayılan özellikleri ile etkin oldukları tahmin edilmektedir.

Hyaluronan sentezinin artması hücrelerin ekstrasellüler matrikse olan bağlantılarını zayıflatarak, geçici olarak serbest göçlerine ve bölünmelerine ortam sağlar (45). Çalışmanın histopatolojik incelemelerinde yara iyileşmesinin hyaluronan grubunda düzgün şekillenmesinde, hyaluronanın bu özelliğinin katkıda bulunduğu sanılmaktadır. Diyabette serbest radikallerin artması

ve kronik yaralarda doku hasarının serbest oksijen radikalleri ve matriks parçalayıcı enzimlerinin neden olduğu uzun süren yangı sonucu olduğu kabul edilmektedir (46). Çalışmada serbest radikaller üzerinde bir araştırma yapılmadı, ancak her diyabet hastasında olduğu gibi bu çalışmada da serbest radikallerin olumsuz etkisi olabileceği muhakkaktır. Hyaluronanın serbest radikallerin sebep olduğu şiddetli olumsuz etkilerini (16), antioksidan etkisi sayesinde (47) engelleyerek diyabetik yara iyileşmesine bu özelliği ile katkıda bulunduğu çalışmada hyaluronanın ilk 10 günden sonra daha etkin olmasından anlaşılmaktadır.

Mekanizması henüz bilinmemekle birlikte hyaluronan oligosakkaridlerinin birçok modelde anjiogenesisi stimüle ettiği bildirilmektedir (2, 48). Hyaluronanın bu özelliği akut ve kronik yaraların iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır (46). Bu çalışmada da gerek kitosan grubunda gereksede hyaluronan grubunda anjiogenesisin 6. günden itibaren kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir.

Ciddi deri yaralanması şekillenen kedilerde kitosana yapılan sağaltımlarda skar dokusunun oluşmadığı bildirilmiştir (49). Diyabetli olmalarına rağmen hem kitosana hem de hyaluronanla sağaltılan tavşanlarda skar dokusu gözlenmemiştir. Genel olarak açık yaralarda tip 1 kollojen ve tip 3 kollojen arasındaki dengesizliğe bağlı olarak (6), Okamoto ve ark. (50) ise yaralı hayvanlarda sürekli kitosan kullanımına bağlı olarak taşkın granülasyon dokusu oluştuğunu bildirmişlerdir. Hyaluronanın fetal yaralarda olgun yaralardan farklı olarak daha uzun süre kalmasının kollejen depolanmasını ve dolayısıyla skatriks dokusunun azalmasını sağladığı bildirilmektedir (51). Benzer bulgu Laurent ve ark. (52) tarafından timpanik membran yara iyileşmesinde de elde edilmiştir. Balasz ve Denlinger (45), hyaluronandan zengin ortamın fibröz skar oluşumundan sorumlu matriks hücrelerini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. West ve ark. (53) ise, erişkin ve son gebelik dönemindeki fetal yara iyileşmelerinde hyaluronanın azlığı sonucunda fibrotik skar oluşumunun gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Yapılan



bu çalışmada kitosan ve hyaluronanın 15 gün süreyle günde iki defa topikal olarak verilmesi sonucunda; Van-Giesson boyamada kollojen sentezinin yetersizliğine veya fazlalığına ve kollojen parçalanmasına rastlanılmamıştır (Şekil 11-12). Ayrıca uygulanan kitosan ve hyaluronan tavşanlarda yabancı cisim reaksiyonuna neden olmadığında görülmüştür.

Aynı zamanda bu çalışmada histopatolojik olarak 11. (Şekil 9-10) ve 15. günlerde epitel rejenerasyonunun tamamen bitmediği, hyaluronan grubunda hem kontrol grubuna hem de kitosan grubuna göre daha iyi şekillendiği saptanmıştır. Bu sonucun hyaluronan tarafından epidermin bazal katmanından daha fazla keratinositlerin proliferasyonunu sağlamasından (54) kaynaklandığı sanılmaktadır.

Sitosidal, yangısel ve onarıcı olmak üzere 3 tip makrofaj vardır (55). Sitosidal makrofajlar fagositik etki gösterirler. Yangısel makrofajlar PDGF, TGF- $\beta$  ve Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) salgılayarak yara kenarlarındaki fibroblast ve endotel hücrelerini çoğaltırlar. Onarıcı makrofajlar ise ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesini ve ILGF ile PDGF salgılayarak (56,57). Başarılı bir yara iyileşmesinde yangısel ve onarıcı makrofajlar arasındaki denge hayati önem taşımaktadır. Monositlerin onarıcı makrofajlara dönüşebilmesi için hyaluronanın varlığı şarttır. Diyabetik yaralarda olduğu gibi makrofajlar arasında denge bozulduğunda, fibroblastlardan salgılanan hyaluronan miktarı azalacaktır. Dolayısı ile onarıcı makrofaj popülasyonu yara iyileşmesinin tamamlanması için gerekli olandan çok daha az olacaktır (58). Bu çalışma sonucunda makroskobik ve histopatolojik olarak ilk 10 gün kitosan grubunun daha hızlı, 10 günden sonra da hyaluronan grubunun daha hızlı iyileştiği gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan diyabetli tavşanlarda topikal olarak hyaluronan verilmesiyle onuncu günden sonraki olası makrofaj dengesizliğinin giderilmesinin sağlandığı kanaatine varılmıştır. Yara kontraksiyonu iyileşmenin önemli bir bölümünü oluşturarak, yara hacminin yaklaşık %40 oranında küçülmesinde etkilidir (59). Nitekim yara

kontraksiyon oranlarını gösteren tabloda da (Tablo 1) görüleceği üzere uygulamaların istatistiksel etkileri quadratik olarak da yansımıştır. Bu veriler, ilk 10 gün kitosan grubunun daha hızlı, 10 günden sonra da hyaluronan grubunun daha hızlı iyileştiğinin istatistiki göstergesi olmuştur.

Atların extremitelerinde ki yaralarda haricen esterifiye hyaluronanın kullanılmasında yara alanının ilk iki hafta içerisinde küçüldüğü, sonraki dönemlerde ise granülasyon dokusu içerisindeki mononükleer hücre sayısının arttığı bildirilmiştir (60). Benzer sonuç çalışmada hem kitosan hemde hyaluronan grubunda alınmıştır.

Diğer taraftan HA'ın domuzlara (61) ve diyabetli insanlarda (62) harici olarak uygulanmasıyla yara kontraksiyonu hızlandırdığı ve böylece yara iyileşme sürecini kısalttığı belirtilmiştir, Bu çalışmadan elde edilen makroskobik, histopatolojik ve istatistiki bulgular yukarıdaki verilerle paralellik göstermiştir.

Sonuç olarak, diyabetli yaralarda ilk 10 gün kitosan daha sonraki günlerde ise hyaluronan kullanılmasının yara iyileşmesine olumlu katkı sağladığı görülmüştür.

## TEŞEKKÜR

Çalışmaya maddi destek sağlayan YYÜ BAPB'na, çalışmanın histopatolojik incelemelerini yapan sayın Yard. Doç. Dr. Serkan Yıldırım'a ve istatistiki analizleri yapan sayın Prof. Dr. Taylan Aksu ya teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Menke NB., Ward KR., Witten TM., Bonchev DG., Diegelmann RF., 2007. Impaired wound healing. Clinics in Dermatology, 25,19-25.
2. Galkowska H., Wojewodzka U., Olszewski WL., 2006. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. Wound Repair and Regeneration, 14, 558-565.
3. Tan W., Krishnaraj R., Desai TA., 2001. Evaluation of nanosized composite collagen-chitosan matrices for tissue engineering. Tissue Engineering, 7, 203-210.

4. Ueno H., Mori T., Fujinaga T., 2001. Topical formulatin and wound healing applications of chitosan. *Advanced of Drug Delivery Reviews*, 52, 105-115.
5. Şenel S., Mc Clure SJ., 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced of Drug Delivery Reviews*, 56, 1467-1480.
6. Ueno Y., Tanaka K., Mitsunobu M., Kadosawa F., 1999. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 20, 1407-1414.
7. Ishihara M., Ono K., Sato M., Nakanishi K., Saito Y., Yura H., Matsui T., 2001. Acceleration of wound contraction and healing with a photocross linkable chitosan hydrogel. *Wound Repair and Regeneration*, 9, 513-521.
8. Ishihara M., Fujita M., Obara K., Hattori H., Nakamura S., Nambu M., Kiosawa Y., 2006. Controlled releases of FGF-2 and paclitaxel from chitosan hydrogels and their subsequent effects on wound repair, angiogenesis, and tumor growth. *Current Drug Delivery*, 3, 351-358.
9. Alemdaroğlu C., Degin Z., Çelebi N., Zor F., Öztürk S., Erdogan D., 2006. An investigation burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, 32, 319-327.
10. Husseiny IN., Ahmed AK., 2012. Application of chitosan for wound repair in dogs. *Life Science Journal*, 9, 196-203.
11. Kim MS., Sung MJ., Se SB., Yoo SJ., Lim WK., Kim, HM., 2002. Water-soluble chitosan inhibits the production of proinflammatory cytokine in human astrocytoma cells activated by amyloid- $\beta$  peptide and interleukin-1 $\beta$ . *Neuroscience Letters*, 321, 105-109.
12. Tole BP., 1997. Hyaluronan in morphogenesis. *Journal of Internal Medicine*, 242, 35-40.
13. Clarris BJ., Fraser JRE., 1968. On the pericellular zone of some mammalian cells invitro. *Experimental Cell Research*, 49, 181-193.
14. Clarris BJ., Fraser JRE., Rodda SJ., 1974. Effect of cell-bound hyaluronic acide in infectivity of Newcastle virüs for human synovial cells in vitro. *Annals of Rheumatic Diseases*, 33, 240-242.
15. Kvam BJ., Fragonas E., Degrassi A., Kvam C., Matulova V., 1995. Oxygen derived free radical action on hyaluronan, on two HA ester derivatives, and on the metabolism of chondrocytes. *Experimental Cell Research*, 218, 79-86.
16. Presti D., Scott JE., 1994. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH) radicals is depented on hyaluronan molecular mass. *Cell Biochemical Functions*, 12, 281-288.
17. Davidson JM., Nanney LB., Broadley KN., Whitset JS., Aquino AM., Beccaro M., 1991. Hyaluronate derivates and their application to wound healing: a preliminary observations. *Clinical Maternals*, 8, 171-177.
18. Miller RS., Steward DL., Tami TA., Sillars MJ., Seiden AM., Shete M., Paskowski C., Welge J., 2003. The clinical effects of hyaluronic acid ester nasal dressing on intranasal wound healing after functional endoscopic sinus surgery. *Otolaringology-Head and Neck Surgery*, 128, 862-869.
19. Akalan MA., Demirkan AÇ., 2013. Stereoloji ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24, 95-100.
20. Jawad HAA., Diab JM., İbraheem KM., 2007. Effect of chitosan sheets on wound healing. *The Journal of Veterinary Research*, 6, 81-96.
21. Steel RG., Torrie JH., 1980. Principle and procedures of statistics ,2nd Ed., McDonald Book Co, Inc. New York.
22. SAS, 1994. SAS/STAT User's Guide. Statistics., Sas Institute, Cary.
23. Goren I., Muller E., Pfeilschifter J., Frank S., 2006. Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-alpha. *American Journal of Pathology*, 168, 765-777.
24. Galiano RD., 2004. Topical vascular endothelial

- growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *American Journal of Pathology*, 164, 1935-1947.
25. Maruyama K., 2007. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *American Journal of Pathology*, 170, 1178-1191.
26. Falanga V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 366, 1736-1743.
27. Gibran NS., Jang YC., Isik FF., Greenhalgh DG., Muffley LA., Underwood RA., Usui ML., Larsen J., Smith DG., Bunnett N., Ansel JC., Olerud JE., 2002. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *The Journal of Surgery Research*, 108, 122-128.
28. Brem H., Canic MT., 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 1219-1222.
29. Etuk EU., 2010. Animal models for studying diabetes mellitus. *Agricultural Biological Journal of North American*, 1, 130-134.
30. Viana GS., Medeiros AC., Lacerda AM., Leal LK., Vale TG., Matos FJ., 2004. Hypoglycemic and antilipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology*, 8, 4-9.
31. Pradhan L., Cai X., Wu S., Andersen N., Martin M., Malek J., Gudhrie P., Veves A., LoGerfo WF., 2011. Gene expression of pro-inflammatory cytokines and neuropeptides in diabetic wound healing. *Journal of Surgical Research*, 167, 336-342.
32. Wang J., Wan R., Mo Y., Li M., Zhang Q., Chien S., 2010. Intracellular delivery of adenosine triphosphate enhanced healing process in full-thickness skin wounds in diabetic rabbits. *The American Journal of Surgery*, 199, 823-832.
33. Grinnel F., 1994. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of Cell Biology*, 124, 401-404.
34. Okamoto Y., Yano R., Miyatake K., Tomohiro I., Shigemasa Y., Minami S., 2003. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*, 53, 337-342.
35. Baum CL., Arpey CJ., 2005. Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatological Surgery*, 31, 674-686.
36. Bauer EA., Couper TW., Huang JS., Altman J., Deuel TF., 1985. Stimulation of invitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proceedings of National Academic Science*, 82, 4132-4136.
37. Brisett AE., Hom DB., 2003. The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Current Opinion Otolaryngology, Head and Neck Surgery*, 11, 245-250.
38. Kim IY., Seo SJ., Moon HS., Yoo MK., Park IY., Kim BC., Cho CS., 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnological Advances*, 26, 1-21.
39. Mi FL., Shyu SS., Wu YB., Lee ST., Shyong JY., 2001. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, 22, 165-173.
40. Jarmila V., Vavrikova E., 2013. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumor and anti oxidant activities-a review. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 3596-3607.
41. Ueno H., Nakamura F., Murakami M., Okumura M., Kadosawa T., Fujinaga T., 2001. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials*, 22, 2125-2130.
42. Nishimura K., Ishihara C., Ukei S., Tokura S., Azuma I., 1986. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine*, 4, 151-156.
43. Noble P., Lake F., Henson P., Riches D., 1993. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor- $\alpha$  dependent mechanism in murine macrophages. *The Journal of Clinical*

- Investigation, 91, 2368-2377.
44. Kobayashi H., Terao T., 1997. Hyaluronic acid – specific regulation of cytokines by human uterine fibroblasts. *American Journal of Physiology*, 276, 1151-1159.
  45. Balasz EA., Denlinger JL., 1989. Clinical uses of hyaluronan. In “The Biology of Hyaluronan” Ed., D Evered., WJ Chichester, 3th ed., 265-280, Willey and Sons Company, Newyork.
  46. Chen WYC., Abatangelo G., 1999. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*, 7, 79-89.
  47. Foschi D., Castoldi L., Radaelli E., Albelli P., Calderini G., Rastrelli A., Mariscotti C., Marazzi M., Trabucchi E., 1990. Hyaluronic acid prevents oxigen free-radical damage to granulation tissue: A study in rats. *International Journal of Tissue Reaction*, 12, 333-339.
  48. Rooney P., Wang M., Kumar P., Kumar S., 1993. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *The Journal of Cell Science*, 105, 213-218.
  49. Minami S., Okamoto Y., Tanioka S., Sashiwa H., Saimoto H., Matsushashi A., Shigemasa Y., 1993. Effects of chitosan on wound healing. In “Carbohydrates and Carbonhydrate Polymers” Ed., M Yalpani., 2nd ed., 141-152 ATL Press.
  50. Okamoto Y., Minami S., Matsushashi A., Sashiwa H., Saimoto H., Shigemasa Y., Tanigwa T., Tanaka Y., 1992. Application of chitin and chitosan in small animals. In “Advances in Chitin and Chitosan”. Ed., JJ Brine, PA Standfort., JP Zikakis, 70-78 Elsevier Science, Newyork.
  51. Longaker MT., Chiu ES., Adzick NS., Stern M., Harrison MR., Stern R., 1991. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Annals of Surgery*, 213, 292-296.
  52. Laurent C., 2009. Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: An experimental study. *American Journal of Otolaryngology*, 7, 181-186.
  53. West DC., Shaw DM., Lorenz P., Adzick NS., Longaker MT., 1997. Fibrotic healing of adult and late gestation fetal wounds correlates with increased hyaluronidase activity and removal of hyaluronan. *International Journal Biochemical Cell Biology*, 29, 201-210.
  54. Tammi R., Ripellino JA., Margolis RU., Maibach HI., Tammi M., 1989. Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ cultures. *The Journal of Investigations in Dermatology*, 92, 326-332.
  55. Riches DWH., 1996. Macrophage involvement in wound repair, modelling and fibrosis. In “The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair” Ed., RAF Clark, 2.nd ed., 95-142. W.B Saunders Company, Newyork.
  56. Robson MC., Steed DL., Franz MG., 2001. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Currents Problems in Surgery*, 38, 65-140.
  57. Singer AJ., Clarck RA., 1999. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 341, 738-746.
  58. Zykova SN., 2000. Altered cytokine and nitricoxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type-2-like db/db mice. *Diabetes*, 49, 1451-1458.
  59. Li J., Juan J., Kirsner R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25, 9-18.
  60. Witte SH., Olaiifa AK., Lewis AJ., Eggleston RB., Halper J., Kietzmann M., 2009. Application of exogenous esterified hyaluronan to equine distal limb wounds. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29, 197-205.
  61. West., DC., Hampson N., Arnold F., Kumar S., 1985. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 228, 1324-1326.
  62. Sudarsa I., Semadi N., Riasa NP., 2012. Hyaluronic acid caused of wider epithelialization compare to normal saline in severe diabetic ulcer. *Bali Medical Journal*, 1, 32-35.