

HİPERGLİSEMİK VASATIN KERATİNOSİT PROLİFERASYONU VE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ

Mustafa ŞENGEZER, Mustafa DEVECİ, Yalçın BAYRAM

GATA Plastik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET

Diabetik hastalarda karşılaşılan en önemli sorunlardan biri yara iyileşmesinin gecikmesidir. Bunun en önemli nedenlerinden birinin artan oksidatif stres olduğu düşünülmektedir. Yüksek glukoz seviyelerinin oksidatif stres mekanizmaları yoluyla keratinositlerdeki programlanmış hücre ölümünü (apoptosis) indüklediği ve böylece yara iyileşmesinin başarılmasında keratinositlerin üstlenmiş olduğu düzenleyici rolü bozarak yara iyileşmesini geciktirdiği hipotezi bu konudaki çalışmaların odak noktası haline gelmiştir. Bu amaçla sağlıklı yetişkin kadınlarda uygulanan meme küçültme ameliyatlarından elde edilen deri temel epidermal hücre olan keratinosit kültürünün elde edilmesinde kullanıldı. Bir gecelik tripsinizasyon işleminden sonra elde edilen hücre süspansiyonu ilaveleri eklenen MCDB 153 kültür vasatı içine ekildi. Kültür vasatlarındaki glukoz seviyeleri 5,5mM (normal), 20 mM, 35 mM ve 50 mM olacak şekilde 4 gurup halinde hazırlanarak ekimler yapıldı. Kültür vasatları her iki günde bir değiştirildi. Üç farklı zaman noktasında apoptotik hücrelerin yüzdesi FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA) kit ile, proliferasyon olan hücrelerin yüzdesi BrdU kullanılarak belirlendi. Boyanan ve hazırlanan kültür kapları inverted mikroskop altında rasgele seçilen 3 alan taranarak incelendi. Boyanan hücrelerin yüzdesi olarak ifade edilen veriler ANOVA kullanılarak analiz edildi. Sonuç olarak vasatlardaki glukoz düzeyinin artması artan oranda keratinosit apoptosisi ile ve azalan sayıda proliferasyon ile korelasyon göstermekteydi. Bu bulgular diyabetik hastalardaki gecikmiş yara iyileşmesinin fizyopatolojisinin açıklanmasına ve kronik yaralardaki tedavi yaklaşımlarının yeniden gözden geçirilmesine katkıda bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, yara iyileşmesi, keratinosit, apoptosiz

GİRİŞ

Kronik yara sorunu bulunan hastalar genellikle yaşlı ve negatif katabolik durumda olan hastalardır. Bu hastalarda yara iyileşmesindeki başlıca sorunlar; yara kontraksiyonunda gecikme, neovaskülarizasyonda azalma, epitelizasyonda yavaşlama ve yara iyileşmesine katkıda bulunan hücrelerde proliferasyon ve fonksiyonlarında bozulma olarak özetlenebilir.

SUMMARY

The Effect of Hyperglycemia Medium on Keratinocyte Proliferation and Apoptosis

Delayed wound healing is one of the most significant and challenging problems in diabetic patients. Recently, the studies about wound healing have been focused onto hypothesis that high glucose levels induces keratinocyte apoptosis (programmed cell death) via oxidative stress mechanisms thereafter regulatory role of the keratinocytes during wound healing impairs and finally results in delayed wound healing. In this study, primary epidermal cell cultures (Keratinocytes) were cultured from the breast reduction skin of healthy adult females. After overnight trypsinization of the split thickness skin, the resulting cell suspension was plated in supplemented MCDB 153 culture medium. Glucose levels in the cultures prepared as 5,5mM (normal), 20 mM, 35 mM and 50 mM. The medium was changed every other day. Apoptosis was quantified using the FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA) kit. Proliferation was also evaluated by using BrdU. Stained and prepared culture dishes were examined by scanning 3 random selected field of view under inverted phase microscope. Data were expressed as percent stained cells were analyzed using analysis of variance (ANOVA).

In conclusion, increased glucose levels in cultures were in correlate with increasing percentages of the keratinocyte apoptosis and decreasing percentages of proliferation. The data contributes that understanding of the physiopathology of wound healing problem in diabetics and review of management to chronic wounds.

Key Words: Diabetes, wound healing, keratinocyte, apoptosis

Yatak yaraları, diabetik yaralar ve venöz ülserler kronik yara için en önemli örnekleri oluşturmaktadır. Bu tip yaralar yoğun cerrahi ve medikal tedaviye rağmen oldukça kötü bir yara iyileşmesi profili sergilemektedir. Normal yara iyileşmesi için fibroblastlar, endotelial hücreler ve epitelyal hücrelerin migrasyon ve proliferasyonu birlikte fibroplazi, anjiogenesis ve reepitelizasyonun gerçekleşmesi gerektiği bilinmektedir.

¹⁻³. Düz kas hücrelerinden farklı bir mekanizma ile gerçekleşen yara kontraksiyonu iyileşmenin önemli bir bileşenidir. Her ne kadar fibroblastlar tarafından sağlanan yara kontraksiyonunun mekanizması tam olarak açıklanmamış olsa bile özelleşmiş fibroblastlardan (myofibroblast) kaynaklandığı düşünülmektedir ³⁻⁵. Bununla birlikte yara iyileşmesinde en önemli görevi yara iyileşmesinde görevli hücreler için bir modulator gibi davranan keratinositlerin yaptığı ileri sürmek akılcı bir yaklaşım gibi görünmektedir.

Kronik ve iyileşmesi gecikmiş dermal ülserler diabetik hastaların en önemli sorunlarından biridir². Gecikmiş yara iyileşmesi, yetersiz granülasyon dokusu formasyonu ve epitelizasyon ile yara kontraksiyonunun olmaması fibroblast ve keratinositlerdeki hücre fonksiyon bozukluğuna bağlı gibi görünmektedir⁶. Oksidatif stres diabetik yara komplikasyonlarında en önemli patojenik faktörlerden biri olarak kabul edilmekte ve hücrelerin yaşam süresi ve replikasyonunu engellediği düşünülmektedir. Yüksek glukoz seviyelerinin oksidatif stres mekanizmaları yoluyla keratinositlerdeki programlanmış hücre ölümünü (apoptosis) indüklediği ve böylece yara iyileşmesinin başarılmasında keratinositlerin üstlenmiş olduğu düzenleyici rolü bozarak yara iyileşmesini geciktirdiği hipotezi bu konudaki çalışmaların odak noktası haline gelmiştir⁶⁻⁸.

Diabetik yaralarda keratinositlerin sadece apoptosise artan bir eğilime değil; aynı zamanda iyileşme prosesini başlatan ve devam ettiren sinyalleri üretmek ile karakterize bazı fonksiyonel defektlere de sahip olduğu düşünülmektedir. Programlanmış hücre ölümünün morfolojik özellikleri birçok hücrede benzer şekilde ortaya çıkmaktadır⁹ ve apoptotik hücreler parçalanmış DNA fragmanlarının işaretlendiği özel tanusal tetkiklerle gösterilebilmektedir (TUNEL)¹⁰.

Bu çalışmada diabetik koşulların yarattığı oksidatif stresin keratinositlerin proliferasyonu ve keratinosit apoptosisine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kültüre keratinositler elde edilerek normal ve hiperglisemik vasatlara pasajlar yapıldı. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında diabetik koşulların keratinosit apoptosisine neden olduğu görülmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kültür Vasatlarının ve Solüsyonların Hazırlanması:

Keratinositler için spesifik olarak üretilen ve toz halinde hazırlanan MCDB 153 kültür vasatı 10 lt distile su içinde çözünerek 0.218µg/ml hidrokortizon, 5 İg/ml epidermal growth factor (EGF), 5 İg/ml insulin, 60 İg/ml bovine pituitary extract (BPE, frozen pituitaries from Pel-Freeze, Rogers, AR, USA) ve 0.15 mM CaCl₂ eklendi. Ph 7.4 olacak şekilde hazırlandı ve phenol red ile rengi ayarlandı. Elde edilen solüsyon 0.22 mikronluk filtrelerden süzülerek steril hale getirildi ve +4°C sıcaklıkta depolandı.

Hücre kültür kaplarını yıkamak için kullanılan solüsyon A 1000 ml yüksek saflıkta distile su içinde 7.149 gr HEPES, 1.802gr glukoz, 0.224 gr KCl, 7.697 gr NaCl, 0.268 gr Na₂HPO₄ ve 0.125 gr fenol red karıştırılarak elde edildi. Solüsyonun pH sı 4.0 NNaOH kullanılarak 7.4 olacak şekilde ayarlandı. Aynı şekilde steril edilerek gentamycin ve streptomycin ilaveleri yapıldı.

Tripsinizasyonu için gerekli olan solüsyonlar %0.03 ve %0.01 EDTA olacak şekilde solüsyon A içinde hazırlandı ve -20 °C derecede saklandı. Dokunun tripsinizasyonu için kullanılacak %0.9 luk tripsin solüsyonu ise solüsyon A içinde (90 mg tripsin + 100 ml solution A) taze olarak hazırlandı ve aynı şekilde steril edildi.

Antitripsin solüsyonu solüsyon A içinde %0.03 konsantrasyonda hazırlanarak -20°C derecede saklandı.

Chelexed serum (Ca içermeyen serum) +4 °C derecede 48 saat süre ile karıştırılarak elde edildi ve -20°C de depolandı.

Büyüme faktörleri, antibiyotikler, enzimler ve ayıraçlar Sigma, St.Luis, MO, USA ve plastik sarf malzemeleri Laboratory Science Co. Corning, NY, USA den elde edildi.

Dokunun Hazırlanması:

1.Gün Derinin elde edilmesi

Deri örnekleri meme küçültme ameliyatlarından elde edildi. Alınmadan önce ameliyat sahası cerrahi sabun ve fırça ile dezenfekte edildi. Epidermis ve dermisi içeren tam kalınlıkta deri alındıktan sonra steril şartlarda ince şeritler halinde kesildi ve RPMI kültür vasatı içinde kültür yapılacak ortama taşındı. %0.09 luk tripsin solüsyonu içine aktarılan bu deri parçaları oda ısısında bir gece bu solüsyonda tutuldu.

2.Gün Epiderminin Ayrılması

Şeritler yeni bir petri kabına alınarak tripsinin etkisini inhibe etmek amacıyla %10 luk fetal bovine serum (FBS) ilave edildi (45 ml MCDB153 + 5 ml FBS). Epidermis bistüri ile bazal tabakadan ayrılarak keratinositler kazındı. Pedri kabındaki dermis ve epidermis parçacıkları uzaklaştırılarak solüsyon 50 ml lik santrifüj tüpü içinde 1.000 rpm de 10 dakika santrifüj işleminden sonra hücre süspansiyonu elde edildi.

Hücre ekimi

Hücrelerin sayımından sonra 50 ml santrifüj tüpünün üzerinde kalan süpernatant aspire edildi ve kültür vasatı ile resüspande edildi. Hücrelerin kültür kabının tabanına yapışmasını kolaylaştırmak amacıyla %2 lik chelexed FBS (100 ml vasat + 2 ml chelexed FBS) vasata eklendi. Her bir kültür kabı içinde (T-75 flask) 20 milyon hücre ve 15 ml kültür vasatı olacak şekilde ekimler yapıldı. Kültür kapları 37°C de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. 3 gün sonra kültür kapları solüsyon A ile yıkanarak vasatlar değiştirildi.

Pasajların yapılması:

Primer hücreler genellikle melanositler ve ayrılmamış ölü hücre kümelerinden oluşmaktadır. Bu gereksiz hücrelerden kurtulmak için iki aşamada onları tripsinize etmek gerekmektedir.

Birinci aşama tripsinizasyonda vasat aspire edildikten sonra 10 ml solüsyon A ile kültür kapları yıkandı. Her bir kültür kabına 2 ml tripsin /EDTA ilave edildi ve oda ısısında 1 dakika bekletildi. Bu süre zarfında mikroskop altında gözenerek ölü hücrelerin %90 ı yüzmeye başladığında ve melanositler yuvarlak bir hal aldığımda tripsin aspire edildi. İkinci aşama tripsinizasyonda ise her kültür kabına 1 ml yeni tripsin/ EDTA ilavesi yapılarak 5 dakika inkübe edildi. Sonra 2 ml inhibitör ilave edilerek yapışan hücreler tamamen ayrıldı. Her bir kültür kabı içindeki tripsin+inhibitör karışımı steril bir 50 ml santrifüj tüpüne transfer edilerek 1.000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi. Pellet 15 ml vasat ile resüspande edildi ve pasaj gerçekleştirildi. Takip eden pasajlarda sadece ikinci aşama tripsinizasyon işlemi yapılarak aynı şekilde gerçekleştirildi.

Deney Gurupları

Bu çalışmada hiperglisemik vasatın keratinositler üzerine etkisini araştırmak amacıyla normal (5.5mM), 20mM, 35mM ve 50mM olmak üzere 4 farklı glukoz konsantrasyonuna sahip vasatlarda pasajlar yapıldı(Tablo 1). Apoptosis yüzdeleri her bir konsantrasyon gurubu için 6 farklı kültür kabında (35mm çaplı petri kabı içinde kollajen kaplı olan) 3, 7 ve 10 günler olmak üzere üç farklı ekspozur zamanında değerlendirildi.

Tablo 1:

	Normal	20mM	35mM	50mM	Normal	20mM	35mM	50mM	Normal	20mM	35mM	50mM
DEĞERLER	12,75	13,07	9,11	9,28	9,3	13,88	15,11	17,11	9,88	19,89	15,91	20,65
	18,43	12,41	12,82	11,02	8,33	12,31	15,64	22,45	9,5	12,86	14,71	17,56
	12,8	7,3	9,87	9,10	12,9	18,34	20,48	33,42	9,51	10,82	16,12	19,35
	7,03	8,33	4,25	7,86	4,48	10,81	31,23	35,53	10,82	13,35	14,99	20,78
	9,53	8,39	18,11	12,13	3,05	22,19	33,58	23,78	10,65	14,05	16,51	21,95
	7,3	9,45	11,57	12,10	4,51	17,56	25,81	27,68	9,72	12,62	14,62	17,52
ORTALAMA	9,97	9,32	10,62	10,25	7,095	15,84	23,612	26,662	9,6433	12,432	15,477	19,635
ST.SAPMA	2,30	1,63	4,316	1,61	3,415	5,897	7,204	6,359	0,820	1,201	0,733	1,6613
	3.GÜN				7.GÜN				10.GÜN			

Apoptosisin İncelenmesi:

Apoptosis Frag E1 (Oncogene, Cambridge, MA) kit kullanılarak değerlendirildi. Hücreler beşer dakika olmak üzere üç kez TBS de yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit ile fikse edildi. Örneğin geçirgenliğini sağlamak için lamaların yüzeyi 10mM Tris pH 8 içindeki 20 µg/ml proteinaz K'nın 100 il si ile 20 dakika örtüldü. İki kez TBS ile durulandıktan sonra endojen peroksidazın inaktivasyonu %3 H₂O₂ ve metanol karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Lamalar takiben TBS ile

durulandı ve TdT dengeleyici tamponun içine daldırıldı (30mM Tris pH7.2, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM cobalt chloride). Sonra lamaları örtmek için TdT tampon içindeki TdT (0.3 e.u/ml) ve biotinylate dUTP kullanıldı ve nemli atmosferde 37°C de 90 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, durdurma tamponu ile sonlandırıldı (300mM sodium chloride, 30mM sodium citrate). TBS ile durulandıktan sonra lamalar bloke edici tampon ile (PBS içinde %4 bovine serum albumin) 10 dakika örtüldü. Lamalar bloke edici tampon içinde nemli ortamda peroxidase steptavidin conjugate ile 30 dakika örtüldü. TBS ile tekrar durulandı ve dUTP nin reaktivitesi %3 hidrojen peroxide ile 3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kullanılarak belirlendi. DAB çözeltisi hücrelere oda ısısında 10 dakika uygulandı. Karşı boyama lamaların 10 dakika methyl green ile immersiyonu ile elde edildi. Boyanmış ve hazırlanmış kültür kapları Nikon TMS inverted faz mikroskobu altında rastgele seçilen 3 alanın taranması ile incelendi.

Proliferasyonun incelenmesi:

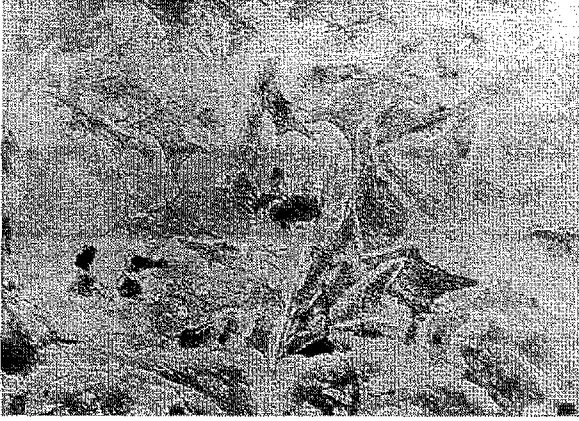
Prolifere olan keratinositlerin yüzdesini değerlendirmek için bromodeoksiüridin (BrdU; Sigma, St. Luis, MO) kullanıldı. 3 mg/ml BrdU solüsyonu kültür vasatına eklenerek 3 saat bekledi ve hücreler %4 paraformaldehit ile bir gece inkübe edilerek fikse edildi. Nonspesifik immün reaksiyon normal serum ile 30 dakika inkübe edilerek bloke edildi. Daha sonra hücreler BrdU ya karşı monoklonal antikorlarla (Vector Lab, Burlingame, CA) oda sıcaklığında 12 saat inkübe edildi. Hücreler anti-maus antikorlara (IgG) bağlı olan peroksidaz ile 45 dakika inkübe edildikten sonra 0.01 M fosfat tamponlu salin ile iki kez yıkandı. BrdU nun immünreaktivitesi 3.3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (Sigma, St Louis; MO) ve %3 lük hidrojen peroksid içeren solüsyon kullanılarak belirlendi. 3.3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid solüsyonu hücrelere oda ısısında 1-5 dakika uygulandı. Boyanan ve hazırlanan hücre kapları Nikon TMS inverted faz mikroskop altında rasgele seçilen üç farklı alan taranarak gözden geçirildi.

Değerlendirme:

Boyanan hücrelerin yüzdesi olarak ifade edilen veriler ANOVA (analysis of variance) kullanılarak analiz edildi. Guruplar arasındaki farklılıklar doğrulandıktan sonra karşılaştırmalar için çiftli t testleri kullanıldı.

BULGULAR

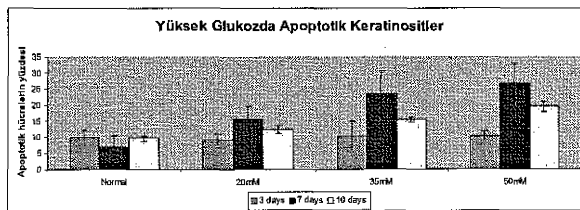
Apoptosisin varlığı, hücrelerin ebatlarında küçülme, membranda kabarcıklanma ve kromatinde yoğunlaşmanın gözlenmesi ile belirlendi (Resim 1). Apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması, 3, 7 ve 10 günler olmak üzere üç farklı ekspozur zamanı için yapıldı. 3.günde normal vasatta üreyen keratinositlerde saptanan apoptoz ortalaması 10.0 iken, bu ortalama 20mM için 9.3; 35mM için 10.6; 50mM için 10.2 olarak



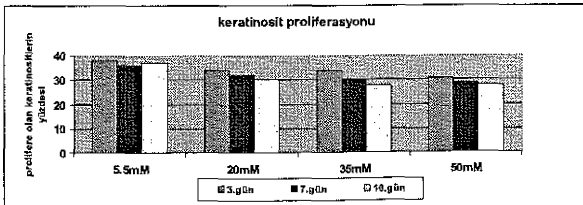
Resim 1: İverted mikroskopta keratinositlerin apoptoza uğramış nükleusları görülmektedir (200X).

saptandı 3. gündeki apoptotik hücre yüzdeleri arasındaki farklılık normal (5.5mM), 20mM, 35mM ve 50mM konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlar için istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.1$). 7. günde normal konsantrasyonda üreyen hücrelerde görülen apoptoz yüzdesi ortalama 7.1; 20mM için 15.8; 35mM için 23.6 ve 50mM için 26.7 olarak saptandı. 10. günde ise normal konsantrasyondaki apoptoz oranı 9.6; 20mM için 12.4; 35mM için 15.5 ve 50mM için 19.4 idi. 7 ve 10. günlerdeki apoptosis yüzdelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0.001$). Bu anlamlılık 5.5 mM ile kıyaslandığında her üç doz için de (20, 35, 50 mM) geçerli idi (Şekil 1).

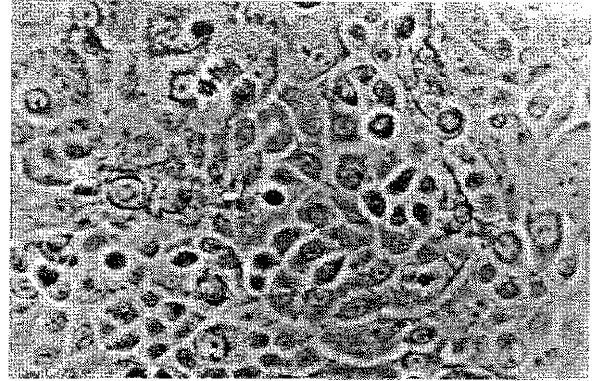
Şekil 1: Kültür vasatlarındaki glukoz konsantrasyonu arttıkça apoptotik hücrelerin yüzdesi de artmaktadır. Bu artış hücrelerin artan glukoz konsantrasyonları için maruz kalma süresinin artması ile birlikte daha da belirginleşmektedir.



Şekil 2: Hücrelerin proliferasyon yüzdesi farklı glukoz konsantrasyonları için anlamlı farklılıklar göstermemektedir.



BrdU ile boyanan hücreler proliferere olan hücrelere olarak alındı (Resim 2). Keratinosit proliferasyonu yine aynı zaman aralıklarında her bir deney grubu için değerlendirildi. 5.5mM glukoz içeren grupta 3. günde



Resim 2: BrdU ile boyanmış hücreler daha koyu renkte görülmektedir. İverted mikroskopta 200x büyütme altında proliferere olan hücrelerin görünüşü.

prolifere olan keratinositlerin oranı 38 ± 2.4 idi. Glukoz konsantrasyonu ve maruz kalma süresi arttıkça keratinosit proliferasyonunun azaldığı tespit edildi (Şekil 2). Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.1$)

TARTIŞMA

Kronik yaranın en önemli ve yaygın örneği diabetik yaralardır. Diyabetli hastaların yaklaşık % 25 inde yara komplikasyonu ile karşılaşmakta ve bunların % 10-15 i cerrahi tedavi gerektirmektedir. Diabetik ayak, diyabete bağlı diğer komplikasyonlardan daha fazla oranda hospitalizasyonun uzamasına neden olmaktadır. Kaynağına bağlı olarak diabetik yaralar aterosklerotik, periferik nöropati ve mikroanjiopati olmak üzere sınıflanabilir. Diabetik aterosklerozda lezyon karakteristik olarak ayak tabanı ve topuk ya da ayak lateralinde yerleşimli lokal iskemiyeye bağlı nekrotik lezyon olarak ortaya çıkar. Diyabette ortaya çıkan polinöropati duysal ve motor kayıplara yol açmakta ve parezi ve paralizisi ile sonuçlanmaktadır. Ağrı uyarınının kaybı ile pozisyon değişiminde aksama sonucunda baskı yaraları ortaya çıkabilmekte ve küçük damarların invazyonundaki bozukluk lokal iskemiyeye katkıda bulunmaktadır. Mikroanjiopati endotelial hücrelerde yüksek glikoz düzeyi ile ortaya çıkan damar duvarı hasarı sonucu gelişmektedir. Diyabetik hastalarda gelişen tüm yaralar enfeksiyona oldukça eğilimlidir çünkü hastalarda immün yanıt zaten bozuktur. Bu tip yaraların tedavisinde yüksek glikemisinin kontrol altına alınması dışında mekanik yara bakımı ve gerektiğinde debrütman önerilmektedir.

Son yıllarda antioksidan maddelerin ve a-FGF, KGF, TGF β 1, PDGF, PDGF-BB gibi büyüme faktörlerinin dışardan yaraya uygulanmasının hem normal hem de gecikmiş yara iyileşmesi koşullarını iyileştirdiği rapor edilmiştir^{1,2,11-17}. Bu çalışmalar bazı büyüme faktörleri ile olan tedavi yaklaşımlarının önemini gösterebilir de

topikal ajanların etkinliği hala tartışmalıdır.

Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan iki farklı predominant deri hücresi mevcuttur. Fibroblastlar temel olarak yara iyileşmesinin önemli bir bileşeni olan ve düz kas hücrelerinden farklı bir mekanizma ile gerçekleşen yara kontraksiyonundan sorumludur. Yara kontraksiyonunun mekanizması tam olarak açıklanmamış olsa bile myofibroblast adı verilen özelleşmiş fibroblastlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Fibroblastların fonksiyonlarındaki bozulma yarada kontraksiyon yetmezliğine neden olarak iyileşmeyi geciktirir. Bununla birlikte yara iyileşmesinde en önemli görevi yara iyileşmesinde görevli hücreler için bir modulator gibi davranan keratinositlerin yaptıkları işleri sürmek akılcı bir yaklaşımdır.

Bu çalışmada hiperglisemik şartların yara iyileşmesinde düzenleyici rol oynadığı düşünülen epidermal bazal hücreler (keratinosit) üzerindeki etkisini araştırıldı. Elde edilen sonuçlar 3 günden daha uzun bir süre için hiperglisemik şartları taklit eden kültür vasatlarında üreyen keratinositlerin apoptosise daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Hiperglisemik keratinositlerin iyileşmekte olan bir yarada hücreler arasındaki sellüler ilişkiyi düzenleyen moleküler sinyalleri üretmek ile ilgili görevlerinde yetmezlik olması da muhtemeldir.

Dr. Mustafa ŞENGEZER
GATA Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi
Anabilim Dalı,
ANKARA

KAYNAKLAR

1. Werner, S., Breeden, M., Hubner, G., Greenhalgh, D.G., Longaker, M.T. 1994. Induction of Keratinocyte Growth Factor Expression is Reduced and Delayed During Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *J. Invest. Dermatol.* 104(5):469 – 473.
2. Mellin, T.N., Cashen, D.E., Ronan, J.J., Murphy, B.S., DiSalvo, J., et al. 1995. Acidic Fibroblast Growth Factor Accelerates Dermal Wound Healing in Diabetic Mice. *J. Invest. Dermatol.* 103(4):850–855.
3. Tomasek, J.J., Haaksma, C.J., Eddy, R.J., Vaughan. M.B. 1992. Fibroblast Contraction Occurs on Released of Tension in Attached Collagen Lattices: Dependency on an Organized Actin Cytoskeleton and Serum. *The Anatomical Record.* 232:359–368.
4. Germain, L., Jean, A., Auger, F.A., Garrel, D.R. 1994. Human Wound Healing Fibroblasts Have Greater Contractile Properties Than Dermal Fibroblasts. *J. Surg. Res.* 57:268–273.
5. Obara, K., Nikcevic, G., Pestic, L., Nowak, G., Lorimer, D.D., et al. 1995. Fibroblast Contractility without an Increase in Basal Myosin Light Chain Phosphorylation in Wild Type Cells and Cells Expressing the Catalytic Domain of Myosin Light Chain Kinase. *J. Biol. Chem.* 270(32):18734–18737
6. Hehenberger, K., Heilborn, J.D., Brismar, K., Hansson, A. 1998. Inhibited Proliferation of Fibroblasts Derived from Chronic Diabetic Wounds and Normal Dermal Fibroblasts Treated with High Glucose Associated with Increased Formation of L – Lactate. *Wound Repair Regeneration* 6(2):135–141.
7. Cheng, H., Feldman, E.L. 1998. Bidirectional Regulation of p38 Kinase and c – Jun N – Terminal Protein Kinase by Insulin – like Growth Factor – I. *J. Biol. Chem.* 273(23):14560–14565.
8. Baumgartner – Parzer, S.M., Wagner, L., Petterman, M., Grillari, J., Gessl, A., et al. 1995. High – Glucose – Triggered Apoptosis in Cultured Endothelial Cells. *Diabetes.* 44(11):1323–1327.
9. Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., Arrigo, A. 1996. Small Stress Proteins as Novel Regulators of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271(28):16510–16514
10. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of Programmed Cell Death In situ via Specific Labeling of Nuclear DNA
11. Kuzuya, M., Satake, S., Ai, S., Asai, T., Kanda, S., et al. 1998. Inhibition of Angiogenesis on Glycated Collagen Lattices. *Diabetologia.* 41:491–499
12. Puolakkainen, P.A., Twardzik, D.R., Ranchalis, J.E., Pankey, S.C., Reed, M.J., et al. 1995. The Enhancement in Wound Healing by Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1) Depends on the Topical Delivery System.
13. Heggors, J.P., Elzaim, H., Goodheart, R., Listengarten, D. 1997. Effect of the Combination of Aloe vera, Nitroglycerin, and L-NAME on Wound Healing in the Rat Excisional Model. *J. Alternative & Complementary Med.* 3(2):149–153
14. Shukla, A., Rasik, A.M., Patnaik, G.K. 1997. Depletion of Reduced Glutathione, Ascorbic Acid, Vitamin E and Antioxidant Defense Enzymes in a Healing Cutaneous Wound. *Free. Rad. Res.* 26:93–101
15. Pierce, G.F., Vande Berg, J., Rudolph, R., Tarpley, J., Mustoe, T.A. 1991. Platelet-derived Growth Factor-BB and Transforming Growth Factor Beta 1 selectively Modulate Glycosaminoglycans, Collagen, and Myofibroblasts in Excisional Wounds. *Am. J. Pathol.* 138:629–646
16. Robson, M.C., Phillips, L.G., Thomason, L.E., Robson, L.E., Pierce, G.F. 1992. Platelet-derived Growth Factor-BB for the treatment of Chronic Pressure Ulcers. *Lancet.* 339:23–25
17. Liechty, K.W., Nespit, M., Herlyn, M., Radu, A., Adzick, N.S., et al. 1999. Adenoviral-Mediated Overexpression of Platelet-Derived Growth Factor-B Corrects Ischemic Impaired Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* 113(3):375–383