



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2022, 9(1): 151-158

Diyabetik Sıçan Deri Yara İyileşmesinde Probiyotik Etkisi

Effect of Probiotics on Diabetic Rat Skin Wound Healing

Müge Karakayalı¹, Tuna Önal², Mustafa Öztatlıcı², Rabia Duruşma², Tuğba Çavuşoğlu³, Erdoğan Kocamaz², İbrahim Tuğlu²

¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp, İzmir, Türkiye.

²Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye.

³Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye.

e-mail: muge.karakayali@idu.edu.tr, tuna.onal@cbu.edu.tr, mustafa.oztatlici@cbu.edu.tr, durusma.rabia35@gmail.com, tugbagurpinar@gmail.com, erdogan.kocamaz@gmail.com

ORCID: 0000-0001-5779-4102

ORCID: 0000-0002-3650-4046

ORCID: 0000-0001-9914-7122

ORCID:0000-0002-5521-9267

ORCID:0000-0002-4787-8561

ORCID:0000-0002-5508-0461

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Müge Karakayalı

Gönderim Tarihi / Received:25.02.2022

Kabul Tarihi / Accepted: 07.03.2022

DOI: 10.34087/cbusbed.1078611

Öz

Giriş ve Amaç: Diyabetik deri yarası kronik, tedavisi zor ve maliyetli bir patolojidir Probiyotikler (PB) yeni ürünler olup barsak mikrobiyotasını düzenleyerek cilt yaralarının iyileşme sürecini olumlu yönde etkilerler. Ancak mekanizmaları bilinmemektedir. Bu çalışmada diyabetik sıçan deri yarasına PB katkısı morfolojik parametreler, oksidatif stres, apoptoz, damarlanma, inflamasyon ve bağ doku açısından mekanizmalar araştırıldı.

Gereç ve Yöntemler: Sıçanlar 50 mg/kg intraperitoneal Streptozotosin kullanılarak diyabetik hale getirildi. Sırt bölgesinde 1x1cm tam kat deri defekti yapıldı ve NBL Probiotic Gold preparatı PB olarak oral gavaj ile uygulandı. Yara iyileşmesinin 7. gününde örnekler alındı. Histokimyasal olarak HE boyamaları ile morfolojik inceleme ve skorlama yapıldı. Örnekler, immünohistokimyasal yöntem ile eNOS, Kaspas 3, IL-10, VEGF ve Kollagen1 ile boyandı ve H-skor ile değerlendirildi.

Bulgular: Tam kat deri defekti ile oluşan yaranın iyileşmesinde PB kullanımı morfometrik skorlamada anlamlı bir hızlanma ve olgunlaşma sağladı. Yara yerinde hasara bağlı oluşan eNOS, Kaspas 3 ve IL-10 artışı ile VEGF ve Kollagen1 azalışının PB ile anlamlı bir şekilde geri döndürüldüğü izlendi.

Sonuç: PB için deride kronik, zor ve maliyetli yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisinin klinikte hasta yaşam kalitesini arttıracığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel Diyabet, Probiyotik, Deri, Yara İyileşmesi, Oksidatif Stres, Apoptoz, Damarlanma.

Abstract

Objective: Treatment of diabetic skin wound is a chronic, difficult and expensive pathology. Probiotics (PB) are new products which affects the skin wound healing process positively by regulating the intestinal microbiota. However, the mechanisms are unknown. In this study, the mechanisms of PB contribution to diabetic rat skin wound in terms of morphological parameters, oxidative stress, apoptosis, vascularization, inflammation and connective tissue were investigated.

Materials and Methods: Rats were made diabetic using 50 mg/kg intraperitoneal Streptozotocin. A 1x1cm full-thickness skin defect was made in the back area and NBL Probiotic Gold preparation was applied as PB by oral gavage. Samples were obtained on the 7th day of wound healing. Morphological examination and scoring were performed by histochemical HE and MT staining. The samples were stained with eNOS, Caspas 3, IL-10, VEGF and Collagen1 by immunohistochemistry and evaluated with H-score.

Results: The effect of PB in the healing of the wound formed by a full-thickness skin defect provided a significant acceleration and maturation in morphometric scoring. It was observed that the increase in eNOS, Kaspas 3 and IL-10, and the decrease in VEGF and Collagen1 due to damage at the wound site were significantly reversed by PB.

Conclusion: It was thought that the positive effect of PB on chronic, difficult and costly wound healing in the skin would increase the quality of life of the patients in the clinic.

Keywords: Apoptosis, Experimental Diabetes, Oxidative Stress, Probiotic, Skin, Wound Healing, Vascularization.

1. Giriş

Diyabetik deri hasarının onarım süreci, geçici olarak örtüşen pıhtılaşma, inflamasyon, migrasyon-proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamalarını içerir. Oluşan hiperglisemik durumun iyileşme ve kronikleşmeye doğrudan etkisi bulunmaktadır. Diyabetik durum keratinosit ve fibroblast aktivitesini ile çoğalma ve göçü etkileyerek antimikrobiyal savunmayı azaltır ve oksidatif stresi artırır. Oksidatif stresdeki artış Nitrik Oksit Sentaz (NOS) üzerinden olup hızlı iyileşmeyi engelleyen kritik bir durumdur. Diyabetik deride normale göre daha fazla inflamatuvar hücre, ödem ve granülasyon dokusu oluşumu izlenmektedir. Tüm bu olumsuz etkiler diyabetik yara iyileşmesini kötü yönde etkileyerek iyileşmeyi geciktirir [1].

Mikrobiyota ile oluşan biyolojik süreçlerin değişimleri özellikle probiyotik (PB) uygulamalarına bağlı farklı etkiler son zamanlarda önemli araştırma konusu olmuştur. PB kullanımı barsak florasını değiştirerek diğer organ ve dokularda etki göstermektedir. Deride bulunan mikrobiyota hem barsakta olan değişikliklerden hem de ilaca bağlı etkileşimlerden dolayı patolojik durumlarda önemli olabilmektedir [2].

DeneySEL diyabetik yara iyileşmesinde araştırmalarda kullanılan parametreler morfolojik ve protein ekspresyonları şeklinde olmaktadır. Morfolojik parametreler içerisinde makroskobik iyileşme, reepitelizasyon, kapiller, enflamatuvar hücre ve fibroblast sayısı ile kollajen fibriller ve yağ bezleri bulunmaktadır. Bu parametreler HE ve Mason trikrom boyama üzerinden morфометrik ölçüm ve skorlama ile saptanmaktadır. Protein ekspresyonu parametreleri olarak oksidatif stres, apoptoz, inflamasyon, vaskülarizasyon ve matriks belirteçleri; immünohistokimyasal, blot ve PCR teknikleri ile gösterilmektedir [3,4,5].

PB ile regüle edilen barsak bakterilerinin yara iyileşmesine olumlu katkılar sağladığı gösterilmiştir. PB deride hem inflamasyonu hem de immün cevabı modüle ederek etkili olabilmektedir. İyileştirmeyi hızlandırması, olgunlaştırması, enfeksiyonları önlemesi ve immün hücreleri uyarması ile özellikle iyileşmeyen kronik yaralarda umut verici olabilmektedir. En çok kullanılan PB suşları *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* olup sıçan, fare ve tavşan gibi birçok hayvan modelinde [2,6] ve insan klinik çalışmalarında [7] etkisi gösterilmiştir [8].

PB uygulaması için deride yara iyileşmesine etkileri bilinmesine rağmen iyileşmeyen diyabetik yaralar için etkisi ve mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir [9,10]. Bu çalışmada, PB kullanımının diyabetik sıçan

deri yara iyileşmesi üzerine etkileri histolojik ve immunohistokimyasal olarak incelendi.

2. Materyal ve Metot

2.1 DeneySEL Model

Tüm deney boyunca MCBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 250±50 gram ağırlığında toplam 20 adet yetişkin erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Denekler özel kafelerde optimal koşullarda beslendi. 22°C'lik sabit sıcaklıkta, nem kontrollü ve otomatik olarak kontrol edilen günde 12 saat ışık parlaklığına maruz bırakılan klimalı bir odada tutuldu. Diyabet oluşturmak için erişkin erkek sıçanlarda 50 mg/kg tek doz intraperitoneal Streptozotosin (STZ) uygulandı. İki hafta sonrası açlık kan şekeri 250mg/dL üzeri olan denekler diyabetik kabul edildi. Her bir denekte sırt bölgesinde 1 adet 1x1 cm tam kat deri defekti yapıldı [11].

Denekler diyabetik olan (D) ve olmayan (ND) olarak iki gruba ayrıldı. Her grup içinde SF (Kontrol) ile PB (Deney) uygulanan iki grup oluşturuldu. Her grupta (ND-K, ND-PB, D-K ve D-PB) 5 denek olmak üzere toplam 20 denek kullanıldı [12]. PB uygulama için Nobel-Farma'dan temin edilen enfektif olmayan ve içinde 2,5x10⁹ *Enterococcus faecium*, 2,5x10⁹ *Lactobacillus acidophilus*, 2,5x10⁹ *Lactobacillus rhamnosus*, 2,5x10⁹ *Bifidobacterium longum*, 2,5x10⁹ *Bifidobacterium bifidum* probiyotik bakterileri içeren NBL Probiotic Gold Preparatı ile oral gavaj yoluyla beslendi. *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM®, yaklaşık 200.000 ila 210.000 koloni oluşturan birim (CFU) doza karşılık gelen 200 mg/gün dozunda, deneyden beş gün önce başlayıp ötenaziye kadar günde bir kez oral olarak uygulandı [13].

2.2 Histopatolojik Analiz

Yara iyileşmesinin 7. gününde makroskobik iyileşme için fotoğraflar alınıp ImageJ ile değerlendirildi. Mikroskobik iyileşme için yara yerinden örnekler alındı. Parafin bloklardan mikrotom ile yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitlere aktarıldı. Kesitler 56°C derecede etüv içinde deparafinize edildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirildi ve sonra akarsu altında yıkandı. Histopatolojik inceleme için Hematoksilin Eozin (HE) boyamaları yapıldı. Morfolojik parametreler olarak reepitelizasyon, kapiller, enflamatuvar hücre ve fibroblast sayıları ile kollajen fibriller ve yağ bezleri kullanıldı. Morфометrik ölçüm ve skorlama ile değerlendirildi. Kör olarak +1 ile +5 arasında değerlendirilen görüntülerin ortalaması alındı [14-16].

2.3 İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal incelemeler için ise alınan kesitler deparafinize edildikten sonra %3'lük hidrojen peroksit ile endojen peroksit inaktivasyonu yapıldı. Antijen

retrieval için 37°C'de 10 dk tripsin ile inkübasyon yapıldıktan sonra kesitler PBS ile yıkandı. Daha sonra nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloklanması için kesitler üzerine bloklama solüsyonu damlatıldı. Bu basamaktan sonra PBS ile yıkama yapılmadan primer antikorlar anti-endothelial NOS (sc-7271, Santa Cruz), anti-kaspaz3 (Santu Cruz, sc-56053), IL-10 (Santu Cruz), VEGF (Santu Cruz) ve Kollajen 1 (Santu Cruz) ile +4°C'de 1 gece inkübasyon yapıldı. Ertesi gün kesitler PBS ile yıkandıktan sonra immun reaksiyonun gözlenmesi için DAB ile inkübe edildi. Mayer's hematoksilin ile de çekirdek boyaması yapıldı ve kesitler entellan ile kapatıldı [17-19].

2.4 İstatistik Analiz

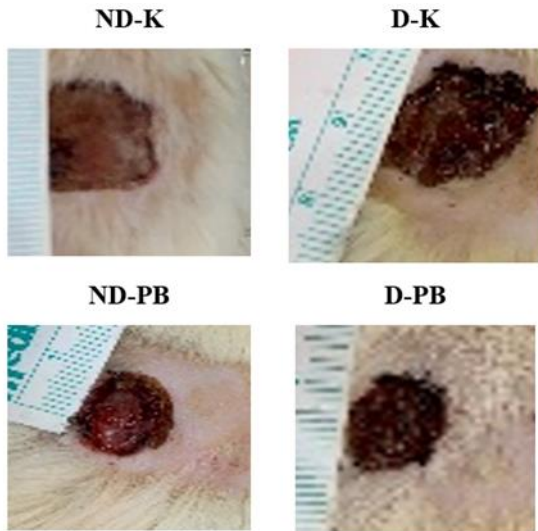
İmmünohistokimyasal boyamaların skorlanması için h-skor analizi yapıldı. Her örnekte 10 kesit, 30 alanda X40'luk objektif de boyanma yoğunluğu dikkate alınarak dokular değerlendirildi; 0: hiç boyanma yok, 1: zayıf boyanma, 2: orta boyanma, 3: kuvvetli/şiddetli boyanma kabul edilerek değerlendirildi. Elde edilen verilerin GraphPad Prism 3.1 programı ile istatistiksel analizi yapıldı. Tek yönlü varyans analizi testi kullanılarak gruplar arası farklar kıyaslandı. Çoklu grup karşılaştırmaları için Post hoc testlerinden Tukey's testi kullanıldı. Karşılaştırmalarda p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi [20].

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Histopatolojik Bulgular

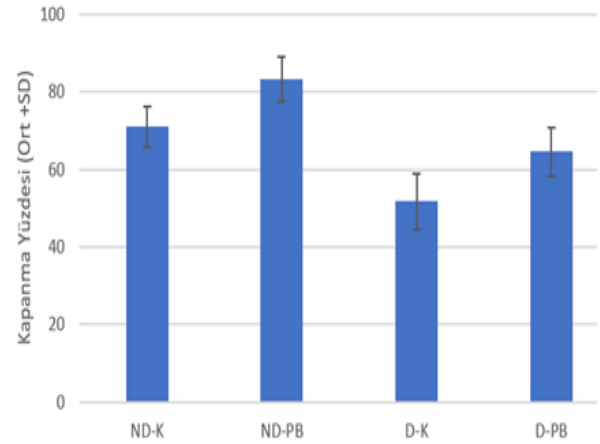
3.1.1 Makroskobik Bulgular

Makroskobik değerlendirme amacı ile ND örneklerle karşılaştırıldığında D örneklerinde yaranın daha geç iyileştiği izlendi. PB uygulaması ile D örneklerde ND örneklere göre daha etkili olduğu gözlemlendi (Resim 1).



Resim 1. Deneysel Gruplarında 7. gün yara makroskobik iyileşmesine PB uygulamasının hızlandırıcı ve olgunlaştırıcı etkisi. Örneklerin ImageJ ile yapılan alan ölçümlerinde PB uygulamasının ND örneklerde anlamlı ve D örneklerde oldukça anlamlı hızlı ve daha iyi tedavi yaptığı bulundu (Şekil 1).

İyileşmenin Makroskobik Ölçümü

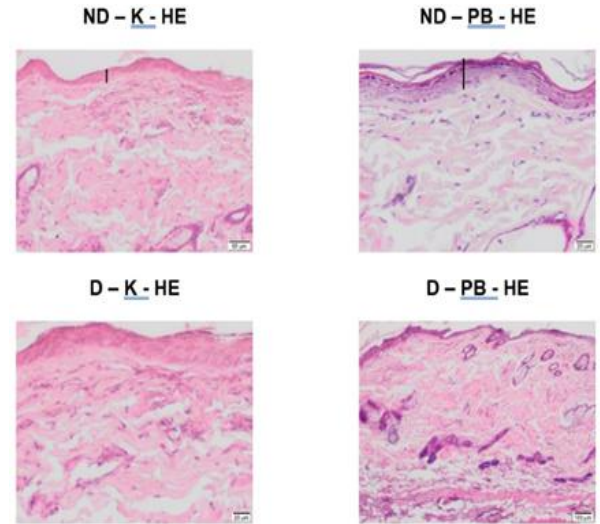


Şekil 1. Deneysel Gruplarında 7. gün yara makroskobik iyileşmesine PB etkisi. PB uygulaması ile yaranın daha hızlı kapandığı görüldü.

3.1.2 Mikroskobik Bulgular

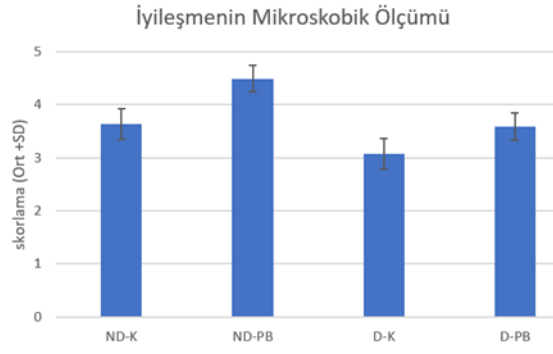
3.1.2.1 Histolojik Bulgular

Mikroskobik değerlendirmede amacı ile yapılan inceleme sonrasında alınan 7. gün deri örneklerinde yapılan HE boyamaları reepitelizasyon, kapiller sayısı, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı, kollajen fibriller ve yağ bezleri açısından incelendi. Yara mikroskobik iyileşmesine parametreleri için incelendiğinde PB uygulaması ile re-epitelizasyon, bez, hücre sayısı ve yeni kan damarları oluşumunun arttığı gözlemlendi (Resim 2).



Resim 2. Deneysel Gruplarında yara mikroskobik iyileşmesinin karşılaştırılması. PB uygulaması ile örneklerde reepitelizasyon, kapiller, enflamatuar hücre ve fibroblast sayıları ile kollajen fibriller ve yağ bezlerinin görünümü. Siyah çizgi epitel göstermektedir.

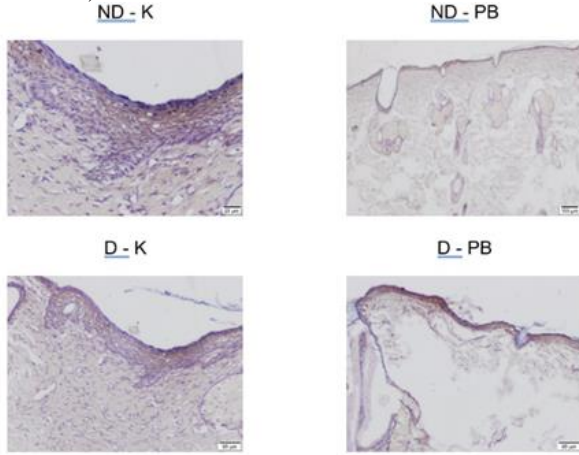
Morfometrik analizde ND örneklerde PB etkisi anlamlı bulundu. D örneklerinde PB etkisinin daha anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 2).



Şekil 2. İyileşmeye PB etkisi için histolojik parametrelerin skorlaması. Her parametre için +1 ile +5 arasında değerlendirilen deney gruplarında tüm parametrelerin ortalaması.

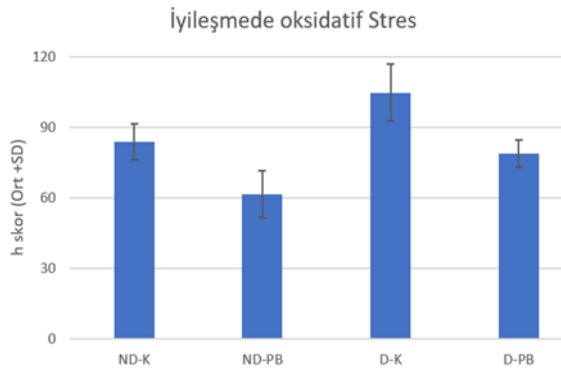
3.1.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Yapılan uygulamaların oksidatif stres ile ilişkisini göstermek için yapılan e-NOS İHK örneklerinde hasara neden olan serbest radikallerin uygulamalar ile azaltılarak yara iyileşmesini hızlandırdığı görüldü (Resim 3).



Resim 3 Yara iyileşmesinde eNOS İHK boyanma görüntüleri.

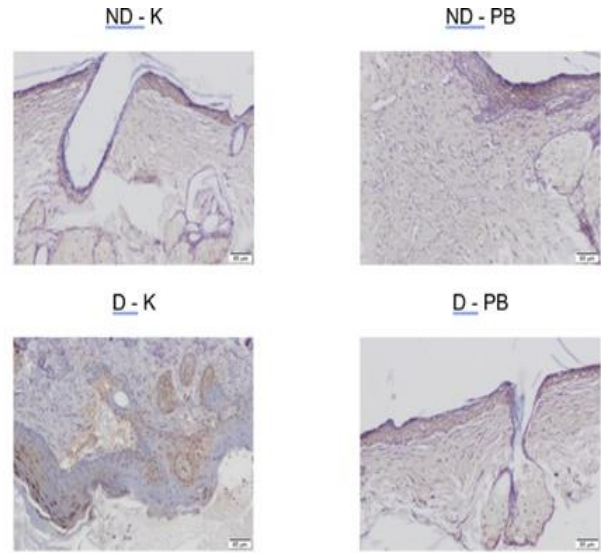
Yara iyileşmesinde eNOS boyanmaların H-skor ile değerlendirilmesi ile ND grubunda PB uygulamasının anlamlı, D örneklerinde ise etkisinin daha anlamlı bir şekilde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 3).



Şekil 3. Yara iyileşmesinde eNOS İHK boyanma görüntülerinin h-skor ile değerlendirilmesi.

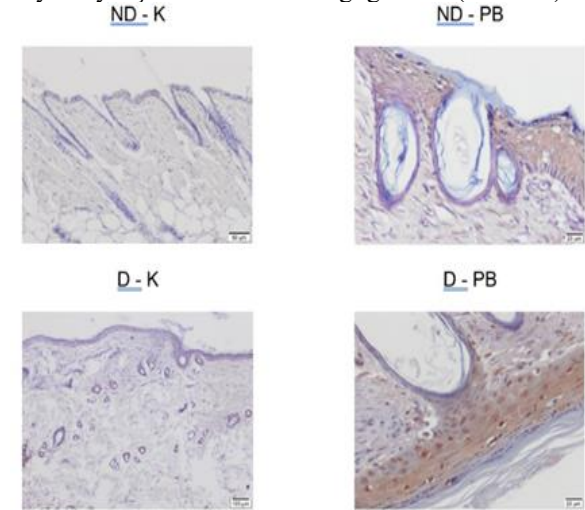
Yapılan uygulamaların apoptoz ile ilişkisini göstermek için yapılan Kaspaz 3 İHK örneklerinde hasar sonrası gerçekleşen apoptozun PB uygulaması ile azaltılarak yara iyileşmesini hızlandırdığı görüldü (Resim 4).

Yara iyileşmesinde Kaspaz 3 boyanmaların h-skor ile değerlendirilmesinde PB uygulamalarının ND grupta PB tedavi edici etkisi anlamlı olup, D örneklerinde bu etkinin daha anlamlı olduğu bulundu (Şekil 4).



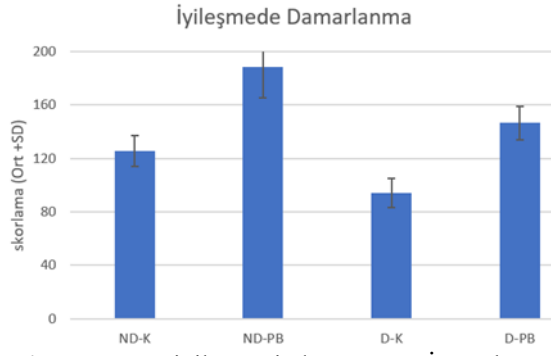
Resim 4. Yara iyileşmesinde Kaspaz 3 İHK boyanma görüntüleri.

Damarlanma için yapılan VEGF İHK örneklerinde hasar sonrası damarlanmanın artarak kanlanmanın sağlandığı ve yara iyileşmesini hızlandırdığı görüldü (Resim 5).



Resim 5. Yara iyileşmesinde VEGF İHK boyanma görüntüleri.

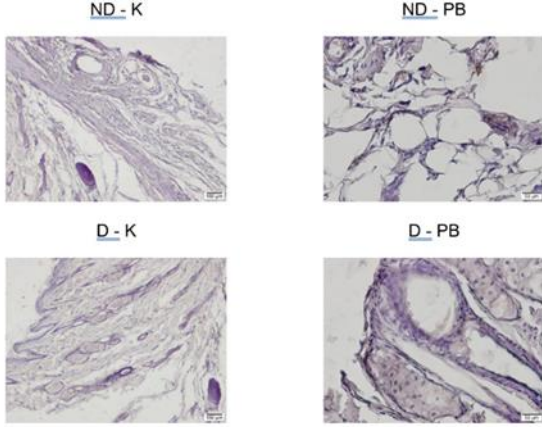
Yara iyileşmesinde VEGF boyanmaların h-skor ile değerlendirilmesinde PB uygulamalarının ND ve D örneklerde oldukça anlamlı bir şekilde damarlanmayı arttırdığı bulundu (Şekil 5).



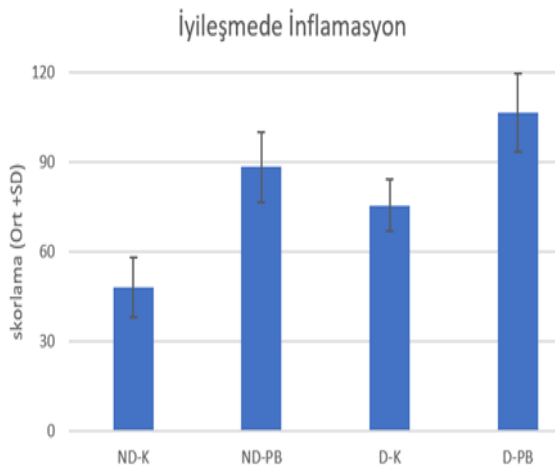
Şekil 5. Yara iyileşmesinde VEGF İHK boyanma görüntülerinin H-skor ile değerlendirilmesi.

PB uygulamasının inflamasyon ile ilişkisini göstermek için yapılan IL-10 İHK örneklerinde hasarın tamir ve tedavisinde önemli bir sorun olan inflamasyonun PB uygulamalar ile azaltılarak yara iyileşmesini hızlandırdığı görüldü (Resim 6).

Resim 6. Yara iyileşmesinde IL-10 İHK boyanma görüntüleri.

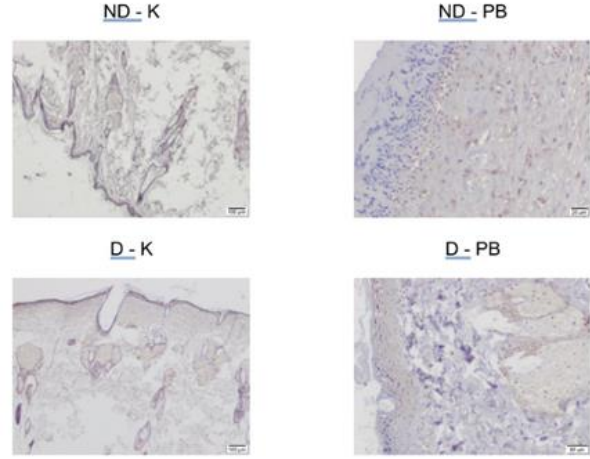


Yara iyileşmesinde IL-10 boyanmaların H-skor ile değerlendirilmesinde PB uygulamalarının özellikle D örneklerde ise oldukça anlamlı bir şekilde inflamasyonu azalttığı saptandı (Şekil 6).



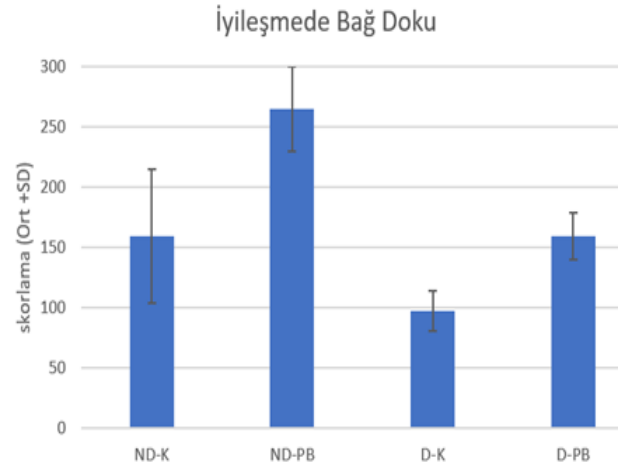
Şekil 6. Yara iyileşmesinde IL-10 İHK boyanma görüntülerinin H-skor ile değerlendirilmesi.

PB uygulamasının bağ dokusu ile ilişkisini göstermek için yapılan kollajen 1 İHK örneklerinde hasarın tedavisinde önemli bir faktör olan bağ doku ve matris yapımının kollajen lif sayısını artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı izlendi (Resim 7).



Resim 7 Yara iyileşmesinde kollajen 1 İHK boyanma görüntüleri.

Yara iyileşmesinde kollajen 1 boyanmaların h-skor ile değerlendirilmesinde PB uygulamalarının ND için anlamlı D örneklerinde PB etkisinin oldukça anlamlı bir şekilde bağ dokuyu güçlendirdiği saptandı (Şekil 7).



Şekil 7. Yara iyileşmesinde Kollajen 1 İHK görüntülerinin h-skor ile değerlendirilmesi.

3.2 Tartışma

Bu çalışmada PB uygulamasının oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyonu azalttığı ve artan damarlanma ve bağ dokusu yapımı üzerinden iyileşmeyi hızlandırarak daha etkin bir tedavinin sağlandığı anlaşıldı. PB desteğinin deride kronik, zor ve maliyetli yara iyileşmesi için kaliteli iyileşmeyi sağlayacağı düşünüldü.

PB barsak mikrobiyotasının manüple edilmesi deri yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkilemektedir [10,21]. Yara iyileşmesi çalışmaları, esas olarak yara ortamının çok yönlü doğası nedeniyle inflamasyon, çoğalma, yeniden epitelizasyon ve yeniden şekillenme dahil olmak

üzere çeşitli hücrel ve onarım aşamalarını bütünleştiren karmaşık bir süreçtir. Farelerde, tavşanlarda ve domuzlarda diyabetik ve beslenmeyle ilgili akut veya kronik yaraları taklit etmek için kullanılabilir çeşitli olası klinik öncesi modeller bulunmaktadır. Bir çalışma için uygun bir model belirlendikten sonra, araştırmacıların yara ilerlemesinin zaman içinde izlenmesini sağlayacak uygun ve tekrarlanabilir yöntemleri seçmesi gerekir. İyileşme için değerlendirmede yara takibi, makroskobik görüntü analizi ve yara biyopsisi üzerinden yapılacak mikroskobik incelemeler ile kullanılabilir [22-24]. Çalışmamızda kullandığımız diyabet, tam kat deri defekti ve uygulama modeli önceki çalışmalar ile uyumlu bulundu.

Bağırsak mikrobiyotasını PB ile destekleme deride de indirek yolla olumlu tepkilere neden olmaktadır. İyileşme sürecinin tüm aşamalarını ve ayrıca bağırsak-deri iyileşme mekanizmalarını anlamak, tedavi edilemeyen kronik diyabetik yaralarda önemli olmaktadır [25]. Sıçanlarda perioperatif oral PB uygulamasının deri yaralarının iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, yetişkin sıçanlara 15 gün boyunca ağızdan kontrol olarak günde 250 mg oral maltodekstrin ve PB olarak *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus acidophilus* HN001 preparatı NCFM® 250 mg/gün dozunda verilmiştir. Deneklerin 3, 7 ve 10. günlerde yapılan incelemelerinde yara kontraksiyonu PB grupta kontrollere göre daha hızlı iyileşme olmuş ve yara alanı küçük bulunmuştur. PB grupta 3. günden 7. güne kadar artan fibrozis gözlenmiştir. Deneklerde 10. günde tip I kollajen ve 7. günde ise tip III kollajen üretimi artmıştır. PB uygulaması için inflamatuvar fazı azaltarak, fibrozis sürecini geriletirerek ve kollajen birikimini artırarak yara alanının daha olgun tedavisi sağlanmıştır [26,27]. Bu bulgular ile bizim sonuçlarımız uyumlu ve paraleldir. Çalışmamızda diyabetik deneklerde daha anlamlı bir tedavinin sağlanmış olması farkını ve önemini ortaya koymaktadır.

PB kullanımının tip 2 diyabetik hastalarda ayak ülserlerinde oluşan yaraların tedavisi amaçlı bir çalışmada genomik analiz yapılmıştır. Hastaların 10 hafta boyunca iki haftada bir alınan sürüntü ve debrütman örneklerinde yapılan 16 sRNA PCR örneklerinde diyabetik grupta oldukça azalan bir mikrobiyom saptanmıştır. Bunun içerisinde çok düşük yoğunlukta bir grubun anlamlı bir şekilde farklı olduğu bulunmuştur. Bu tür yaralarda tüm hastalarda büyük çoğunlukla deri stafilkokları saptanırken diğer bakteriyel grupların hastalarına göre değişiklik göstermiştir. Ancak bu değişiklikler anlamlı bulunmamıştır [28,29]. Bizim çalışmamızda benzer değişikliklerin olduğu düşünüldü. Bu anlamda yapılacak analizde diyabetin getirdiği farklılıkların ve PB tedavisinin etkisinin önemli olacağı düşünüldü.

Deve sütünün antidiyabetik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada sütte bulunan 14 tür bakteri içeren PB kullanılmış, deneklerde şeker ve lipid düzeylerinin düştüğü, pankreas, karaciğer ve böbrek morfolojisinin

düzeldeği, klaudin-1 ve müsin 2 üzerinden epitel bütünlüğünün korunduğu saptanmıştır [12]. Ayrıca PB kullanımı PI3K/AKT yolağı üzerinden etkilediği gösterilmiştir [30]. Deri yara iyileşmesinde PB etkisinin bakıldığı bir çalışmada 2x2cm tam kat tek yara modelinde kontrole karşılaştırıldığında PB kullanılan örneklerde 3.günde yara alanında diyabetik grupta %15, PB grubunda %10 iyileşme görülmüştür. 7.günde kontrolde %20 iken, PB grubunda %30 anlamlı iyileşme saptanmıştır. 10.gün örneklerinde her iki grupta %80 benzer iyileşme gösterilmiştir [12,23]. Çalışmamızda elde edilen benzer iyileşme süreçlerinde oluşan olumlu etkide PB için sistemik antidiyabetik katkısının da olabileceği düşünüldü.

Deri yara iyileşmesinde oksidatif stres etkisinin reaktif oksijen türlerini artırarak yaranın etrafındaki M2 fenotip makrofajlarını yukarı doğru düzenlenmesi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, yara kapanmasını iyileştirmek için granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör salınımının da katkısı anlaşılmıştır. Benzer şekilde deferoksamin için oksidatif stresin azalmasını ve kronik diyabetik yaralarda yeni damar yapımı ve rejenerasyonu sağladığı bulunmuştur. Bu etkinin hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu şekilde yara vaskülaritesi, deri kalınlığı, kollajen birikimi ve gerilme mukavemeti belirgin şekilde artarak yara iyileşmesini hızlandırmıştır. Ayrıca A, C ve E vitaminleri antioksidanlar ve propolis gibi faktörler yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Bu etki için glutatyon (GSH) ve GSH/glutatyon disülfid oranını arttırdığı, TNF düzeyini azaltıp IL-10 artırabileceği düşünülmüştür. N-asetil sisteinli antioksidanın endotel hücre fonksiyonunu ve anjiyogenezi iyileştirmiştir. Bu tedavilerin diyabetik yara iyileşmesi ve anjiyogenesis için önemi ortaya konmuş ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür [30,31]. Anjiyogenez, yara pıhtısını ve granülasyon dokusunu organize ederek yeni kan damarları yapar ve yara iyileşmesinde çok önemli bir rol oynar. Bu dinamik süreçte, hücre dışı matris (HDM) ortamından gelen sinyallerin etkisi altındadır. VEGF, anjiyopietin, fibroblast büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü beta yara anjiyogenezinde güçlü anjiyojenik sitokinler olarak bilinmektedir. Spesifik endotelial HDM reseptörleri, yara onarımı sırasında kan damarlarındaki değişiklikler için kritik öneme sahiptir [32]. Deri defektlerinde oksidatif stres oluşumu ve NOS artışının patoloji ve iyileşme ile ilişkisi gösterilmiştir. Antioksidan tedavinin iyileşmede hızlanmayı ve yaranın daha iyi tamir edildiği bilinmektedir. Bu etkinin endotelial NOS baskılanması ile sağlandığı saptanmıştır [33, 34]. Çalışmamızda oksidatif stres ve damarlanma parametreleri olarak kullanılan VEGF ve eNOS için PB uygulamasının önceki çalışmalardan farklı olarak diyabetik deri yara iyileşmesine katkı sağladığı saptandı. Bitki ekstraktları gibi birçok tedavi yöntemi ile Mikrobiyom çeşitliliğinin kaybı genellikle uzun süreli inflamasyona ve yara iyileşme sürecinin gecikmesine neden olur. Son araştırmalar, yerel mikrobiyota ile etkileşime ek olarak, bağırsak mikrobiyotasındaki

değişikliklerin, antimikrobiyal moleküller üreterek, bağışıklık ve inflamatuvar yanıtı düzenleyip yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir [35]. Önceki çalışmalarda bağırsak ve deri mikrobiyotasının etkileştiği öne sürülmüştür. Bu teoriye göre, bağırsak bakterileri, inflamatuvar sitokin ekspresyonunun salınımını modüle ederek uzaktan deri iyileşmesine müdahale edebilir. Bu nedenle, barsak mikroflorasını modüle etmek, iyileşme sürecini iyileştirmek için önemli bir strateji olabilir. Barsak mikrobiyotasının modülasyonu için kullanılan yöntemler, diyet değişikliklerine ek olarak prebiyotikler, probiyotikler, simbiyotikler ve dışkı naklidir. Ticari PB ürünler bilinen ve miktarı belirlenmiş bakterileri içerir. Klinik durumlarda en uygun suşlar Laktobasiller (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*) ve *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium lactis*) olmaktadır. PB kullanımı ve iyileşme arasındaki ana bağlantı, doku onarımı üzerinde olumlu etkileri olabilen inflamasyonun modülasyonudur [36-39]. Literatürdeki tüm bulgular ile sonuçlarımızın uyumlu olmasının yanı sıra diyabetik olgularda etkinin daha belirgin olması önemli bir fark olarak düşünüldü.

4. Sonuç

Diyabete bağlı deri yara iyileşmesi zor ve maliyetli aynı zamanda istenilen etkin tedaviyi sağlayamayan bir durumdur. PB için oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyonu azaltması, damarlanma ve kollagen oluşumunu artırması ile özellikle diyabetik yara iyileşmesini hızlandırdığı anlaşıldı. PB uygulaması ile deride kronik, zor ve maliyetli yara iyileşmesi açısından klinikte yararlı olacağı ve hasta yaşam kalitesini arttıracığı düşünüldü.

5. Teşekkür ve Bilgilendirme

2020-058 proje numarası ile Manisa Celal Bayar üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Referanslar

1. Tsiouris, C.G, Kelesi, M, Vasilopoulos, G, Kalemikerakis, I, Papageorgiou, E.G, The efficacy of probiotics as pharmacological treatment of cutaneous wounds: Meta-analysis of animal studies, *European Journal of Pharmacological Sciences*, 2017, 104,230–239.
2. Johnson, T.R, Gómez, B.I, McIntyre, M.K, et al., The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing, *International Journal of Molecular Science*, 2018, 19, 2699.
3. Ponugoti, B, Xu, F, Zhang, C, Tian, C, Pacios, S, Graves, D.T, FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress, *Journal of Cell Biology*, 2013, 28;203,327-43.
4. Satish Patel, Shikha Srivastava, Manju Rawat Singh, Deependra Singh, Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 112, 108615.
5. Tan, J.L, Lash, B, Karami, R, et al., Restoration of the healing microenvironment in diabetic wounds with matrix-binding IL-1 receptor antagonist. *Commun Biology*, 2021, 4, 422.
6. Fijan S, Frauwallner A, Langerholc T, et al. Efficacy of Using Probiotics with Antagonistic Activity against Pathogens of Wound Infections: An Integrative Review of Literature, *Biomed Res Int*, 2019, 2019,7585486.

7. Yu Y, Dunaway S, Champer J, Kim J, Alikhan A. Changing our microbiome: probiotics in dermatology, *British Journal of Dermatology*, 2020,182,39–46.
8. Campos LF, Tagliari E, Casagrande TAC, Noronha L, Campos ACL, Matias JEF. Effects Of Probiotics Supplementation On Skin Wound Healing In Diabetic Rats. *Arq Bras Cir Dig*, 2020, 8,33(1), e1498.
9. Drago F, Gariazzo L, Cioni M, Trave I, Parodi A. The microbiome and its relevance in complex wounds. *Eur J Dermatol*, 2019, 1,29,6-13.
10. He Zhou, Xue Zhao, Lin Sun, Yujia Liu, You Lv, Xiaokun Gang, Guixia Wang, "Gut Microbiota Profile in Patients with Type 1 Diabetes Based on 16S rRNA Gene Sequencing: A Systematic Review,Disease Markers, vol. 2020,11.
11. Gürpınar, T., Ekerbiçer, N., Uysal, N., Barut, T., Tarakçı, F., & Tuğlu, M.I. The effects of the melatonin treatment on the oxidative stress and apoptosis in diabetic eye and brain. *The Scientific World J*, 2012, <https://doi.org/10.1100/2012/498489>
12. Ebaid, H., Abdel-salam, B., Hassan, I. et al. Camel milk peptide improves wound healing in diabetic rats by orchestrating the redox status and immune response. *Lipids Health Dis*, 2015,14, 132.
13. Akhoundzadeh K, Vakili A, Shadnough M, Sadeghzadeh J. Effects of the Oral Ingestion of Probiotics on Brain Damage in a Transient Model of Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Iran J Med Sci*, 2018, 43,32-40.
14. Beyhan G, Yücel B. Koca, Mahmud Ö., MI Tuğlu, Matrix changes due to the toxic effects of metronidazole in intestinal tissue of fish (*Onchorhynchus mykiss*), *Chemosphere*, 2016,44,1605-1610.
15. I Aydemir, MM Özkut, F Fırat, A Gümürüdü, DH Sal, K Erdoğan, A Göker, Effects of stem cells applications on oxidative stress and apoptosis during implantation. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2019,7, 229.
16. Birinci H., Halıcıoğlu BŞ., Öztatlıcı M., Yüncü M. Sisplatinin Neden Olduğu Nefrotoksisite ve Ultrastrüktürel Hasar Üzerine Kurkuminin Koruyucu Etkisi. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2021, 8, 598- 605.
17. 17.-BA Altan, O Sokucu, MM Ozkut, S Inan and histological investigation of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement *Lasers in medical science*, 2012,27 (1), 131-140.
18. Öztürk Ş., Ceyda L.,Öztürk Ş.,(2021)Deneyisel Karaciğer Rezeksiyonu Oluşturulmuş Ratlarda Rejenerasyon ve Apoptozun Değerlendirilmesi. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2021,4, 621 – 626.
19. Busra SEN , Mehmet İbrahim TUĞLU , (2020),Farklı İki Yöntemle Oluşturulan Deneyisel Prematür Over Yetmezlik Modelinde Ovarlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Cilt 7, Sayı 3, 2020,7, 257- 265.
20. Sen Halicioğlu B, Saadat KASM, Tuğlu MI. The relationship of 4-vinylcyclohexene diepoxide toxicity with cell death, oxidative stress, and gap junctions in female rat ovaries. *Reprod Med Bio*, 2021,20,543-553.
21. Ibrahim, K. S., Bourwis, N., Dolan, S., Lang, S., Spencer, J., & Craft, J. A. Characterisation of gut microbiota of obesity and type 2 diabetes in a rodent model. *Bioscience of microbiota, food and health*, 2021, 40, 65–74.
22. Liling Deng, Chenzhen Du, Peiyang Song, Tianyi Chen, Shunli Rui, David G. Armstrong, and Wuquan Deng Published The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 4,8852759
23. Asghari M, Kanonisabet A, Safakhah M, Azimzadeh Z, Mostafavinia A, Taheri S, Amini A, Ghorishi SK, JalaliFiroozkahi R, Bayat S, Bayat M. The effect of combined photobiomodulation and metformin on open skin wound healing in a non-genetic model of type II diabetes. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 169,63-69.
24. Blair MJ, Jones JD, Woessner AE, Quinn KP. Skin Structure-Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2020, 9,127-143.
25. Campos LF, Tagliari E, Casagrande TAC, Noronha L, Campos ACL, Matias JEF. Effects Of Probiotics Supplementation On Skin Wound Healing In Diabetic Rats. *Arq Bras Cir Dig*, 2020, 8,33: e1498.
26. Tagliari E, Campos LF, Casagrande TAC, Fuchs T, de Noronha L, Campos ACL. Effects of oral probiotics administration on the expression of transforming growth factor β and the proinflammatory cytokines interleukin 6, interleukin 17, and tumor necrosis factor α in skin wounds in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nut.*, 2021, 26.

27. Tagliari E, Campos LF, Campos AC, Costa-Casagrande TA, Noronha L. Effect Of Probiotic Oral Administration On Skin Wound Healing In Rats. *Arq Bras Cir Dig*, 2019,9,32(3), e1457.
28. Gardiner, M, Vicaretti, M, Sparks, J, Bansal, S, Bush, S, Liu, M, Darling, A, Harry, E, Burke, C.M, A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome, *Peer Journal*, 2017, 20,5: e3543.
29. Drago F, Gariazzo L, Cioni M, Trave I, Parodi A. The microbiome and its relevance in complex wounds, *European Journal of Dermatology*, 2019, 1,29,6-13.
30. Mohseni, A.H, Casolaro, V, Bermúdez-Humarán, L.G, Keyvani, H, Taghinezhad-S, S, Modulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by probiotics as a fruitful target for orchestrating the immune response, *Gut Microbes*, 2021 ,13,1-17.
31. Liling, Deng, Chenzhen, Du, Peiyang, Song, Tianyi, Chen, Shunli, Rui, David, G., Armstrong, and Wuquan Deng Published The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 4, 8852759.
32. Honnegowda, T.M, Kumar, P, Udupa, E.G.P, Kumar, S, Kumar, U, Rao, P, Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing, *Plast Aesthet Res*, 2015, 2,243-9.
33. Cano Sanchez, M, Lancel, S, Boulanger, E, Neviere, R, Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)*, 2018,7(8), 98.
34. Dubey AK, Podia M, Priyanka, Raut S, Singh S, Pinnaka AK, Khatri N. Insight Into the Beneficial Role of Lactiplantibacillus plantarum Supernatant Against Bacterial Infections, Oxidative Stress, and Wound Healing in A549 Cells and BALB/c Mice, *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 4, 12,728614.
35. Fijan, S, Frauwallner, A, Langerholc, T, et al., Efficacy of Using Probiotics with Antagonistic Activity against Pathogens of Wound Infections: An Integrative Review of Literature, *Biomed Res In*, 2019, 7585486, 12.
36. He, Zhou, Xue, Zhao, Lin, Sun, Yujia Liu, You, Lv, Xiaokun, Gang, Guixia Wang, "Gut Microbiota Profile in Patients with Type 1 Diabetes Based on 16S rRNA Gene Sequencing: A Systematic Review", *Disease Markers*, 2020, 3936247, p11.
37. Ibrahim, K. S., Bourwis, N., Dolan, S., Lang, S., Spencer, J., & Craft, J. A. Characterisation of gut microbiota of obesity and type 2 diabetes in a rodent model, *Bioscience of microbiota, food and health*, 2021, 40, 65–74.
38. Jere, S.W, Houreld, N.N, Abrahamse, H, Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine Growth Factor Review*, 2019, 50, 52-59.
39. Johnson, T.R, Gómez, B.I, McIntyre, M.K, et al., The Cutaneous Microbiome and Wounds, New Molecular Targets to Promote Wound Healing, *International Journal of Molecular Science*, 2018, 19, 2699.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

