

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**HEMOSTATİK AJAN
ANKAFERD'İN
YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Sevgi SEZGİN
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa ŞENOL**

MALATYA - 2010

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**HEMOSTATİK AJAN
ANKAFERD'İN
YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Sevgi SEZGİN
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa ŞENOL**

Bu tez, İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2010/80 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	V
GRAFİKLER DİZİNİ.....	VI
RESİMLER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Derinin yapısı.....	3
2.1.1. Epidermis.....	4
2.1.2. Epidermo-dermal bileşke.....	6
2.1.3. Dermis.....	6
2.2. Derinin görevleri.....	7
2.3. Yara iyileşmesi.....	7
2.3.1. Yara iyileşmesinin fazları.....	8
2.3.1.1. İnflamatuvar faz (Faz 1).....	8
2.3.1.2. Proliferasyon ve doku formasyonu (Faz 2).....	10
2.3.1.3. Matriks formasyonu ve yeniden yapılanma (Faz 3).....	12
2.3.2. Yara iyileşmesinde etkili sitokinler	17
2.3.2.1. Çalışmamızda kullanılan büyüme faktörleri ve hidroksiprolin.....	18
2.3.2.1.1. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF).....	18
2.3.2.1.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF).....	18
2.3.2.1.3. Epidermal büyüme faktörü (EGF).....	19
2.3.2.1.4.Çalışmamızda incelenen kollajen indikatörü: Hidroksiprolin19	
2.3.3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.....	19
2.4. Ankaferd (Ankaferd Blood Stopper, ABS).....	22
2.4.1. Ankaferd isminin geleneksel kökeni.....	22
2.4.2. Ankaferd'in birleşimi.....	22
2.4.3. Farmakokinetik, farmakodinamik.....	23
2.4.4. Ankaferd'in etki mekanizması.....	23
2.3.5. Ankaferd'in etkileri.....	24

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Deney hayvanları ve deney planı.....	26
3.2. Histopatolojik inceleme.....	28
3.3. Biyokimyasal inceleme.....	29
3.3.1. Kullanılan aletler.....	29
3.3.2. Hidroksiprolin (OH-P) düzeylerinin tesbiti.....	29
3.4. Moleküler genetik analizler.....	31
3.4.1. Dokuların hazırlanması.....	31
3.4.2. Kullanılan araç ve gereçler.....	31
3.4.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	31
3.4.5. Kullanılan çözelti ve tamponlar.....	32
3.4.6. Total RNA saflaştırması (Qiagen kit protokolü).....	33
3.4.7. cDNA sentez protokolü.....	34
3.4.8. Gerçek zamanlı PZR protokolü.....	34
3.5. İstatistiksel analizler	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Makroskopik bulgular.....	36
4.2. Histopatolojik bulgular.....	38
4.3. Biyokimyasal bulgular.....	41
4.4. PZR sonuçları.....	42
4.5. İstatistiksel analiz.....	46
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR.....	55
7. ÖZET.....	56
8. SUMMARY.....	58
9. KAYNAKLAR.....	60

KISALTMALAR DİZİNİ

ABS	: Ankaferd Blood Stopper
ADP	: Adenozin difosfat
CTGF	: Konnektif doku büyüme faktörü (Connective tissue growth factor)
ddsu	: Distile su
ECM	: Ekstraselüler matriks (Extracellular matrix)
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
H-E	: Hemotoksilen-eozin
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte growth factor)
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor)
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IP	: İmmün protein
KGF	: Keratinosit büyüme faktörü (Keratinocyte growth factor)
MPO	: Matriks metalloproteinaz
NO	: Nitrik oksit
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor)
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
TNF	: Tümör nekroz faktör
tPA	: Doku tipi plazminojen aktivatörü
uPA	: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Derinin yapısı.....	4
Şekil 2. Epidermisin yapısı.....	5
Şekil 4. Yara iyileşmesinin aşamaları.....	16
Şekil 5. . Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörlerinin etkileşimi.....	17
Şekil 6. ABS'in etki mekanizması.....	24
Şekil 7. QIAGEN RNAeasy saflaştırma kiti ile deri örneklerinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri.	42
Şekil 8. GAPDH, PDGF, VEGF ve EGF'lerin cDNA'larının gerçek zamanlı PZR deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi.....	43

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Yara iyileşmesinde, çeşitli hücre ve ekstraselüler elemanların rolleri.....	14
Tablo 2. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılandıkları hücreler ve bu mediatörlerin yara iyileşmesindeki görevleri.....	15
Tablo 3. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin doku onarımındaki işlevleri.....	16
Tablo 4. Hidroksiprolin ölçümü deney işlemleri.....	30
Tablo 5. Primer dizilimleri.....	34
Tablo 6. Ülser açısından gruplara ait değerler.....	39
Tablo 7. Reepitelizasyon açısından gruplara ait değerler.....	39
Tablo 8. Dermal inflamasyon açısından gruplara ait değerler.....	40
Tablo 9. Hidroksiprolin düzeyleri (mg/g).....	41
Tablo 10. Gruplara ait EGF mRNA/GAPDH mRNA düzeyleri.....	43
Tablo 11. Gruplara ait VEGF mRNA/GAPDH mRNA düzeyleri.....	44
Tablo 12. Gruplara ait PDGF mRNA/GAPDH mRNA düzeyleri.....	45
Tablo 13. Gruplar arasındaki hidroksiprolin düzeylerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 14. Gruplar arasındaki EGF düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 15. Gruplar arasındaki VEGF düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 16. Gruplar arasındaki PDGF düzeylerinin karşılaştırılması.....	47

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Ülser açısından gruplar arasındaki farklar.....	39
Grafik 2. Gruplar arasındaki reepitelizasyon farkları.....	40
Grafik 3. Gruplar arasındaki dermal inflamasyon oranları.....	41
Grafik 4. Graplardan elde edilen hidroksiprolin sonuçları.....	42
Grafik 5. Graplardan elde edilen EGF sonuçları.....	44
Grafik 6. Graplardan elde edilen VEGF sonuçları.....	45
Grafik 7. Graplardan elde edilen PDGF sonuçları.....	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Deney hayvanı.....	26
Resim 2. Deney hayvanının sırt derisi tıraşlanmış hali.....	26
Resim 3. Punch ile yara oluşturulması.....	27
Resim 4. Dokunun pensetle kaldırılması.....	27
Resim 5. Oluşturulan yara.....	27
Resim 6. Gruplara ait yara iyileşmesi makroskopik görüntüleri.....	37
Resim 7. İyileşme aşamalarında, gruplara ait histopatolojik görüntüler.....	38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri vücudun en büyük organ sistemidir. Toplam vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturur. Derinin ana fonksiyonlarından birisi, iç ve dış ortam arasında bir geçirgenlik engeli oluşturmaktır (1). Derinin bu fonksiyonunu yerine getirebilmesi için, bütünlüğünün korunması gerekir.

Dokuda, yaralanma sonucu, yara iyileşmesi ile sonlanan organize ve karmaşık bir takım hücresel ve biyokimyasal olaylar gelişir. Yara iyileşmesi, ayrı, ancak birbirleriyle içi içe geçen 3 farklı aşamadan oluşur. Bu aşamalar sırası ile; inflamasyon, epitelizasyon ve granülasyon dokusu ile matriks oluşumudur (2,3). Kutanöz doku onarımında amaç, derinin bariyer fonksiyonunun korunmasıdır. Bunun sağlanabilmesi için, defektin, yeni bağ dokusunu oluşturmak üzere, granülasyon dokusu ile dolması, fiziksel bariyerin sağlanabilmesi için de, epitel tarafından yaranın kapatılması gerekir (4).

Son yıllarda, yara iyileşmesi mekanizması daha iyi anlaşılmış ve yara iyileşmesini etkileyen birçok lokal ve sistemik faktör belirlenmiştir. Hayvan modellerinde, yara iyileşmesini hızlandıran çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin rapor edilmiştir. Yara iyileşmesinde; parankimal büyüme faktörleri, çeşitli mediyatörler, kan elemanları, ekstraselüler matriks ve parankimal hücreler rol almaktadır (2).

Ankaferd, folklorik olarak geleneksel Türk hekimliğinde hemostatik ajan olarak kullanılmış bir bitkisel ekstrattır. Bu bitkisel karışım; endotel, kan hücreleri, damar

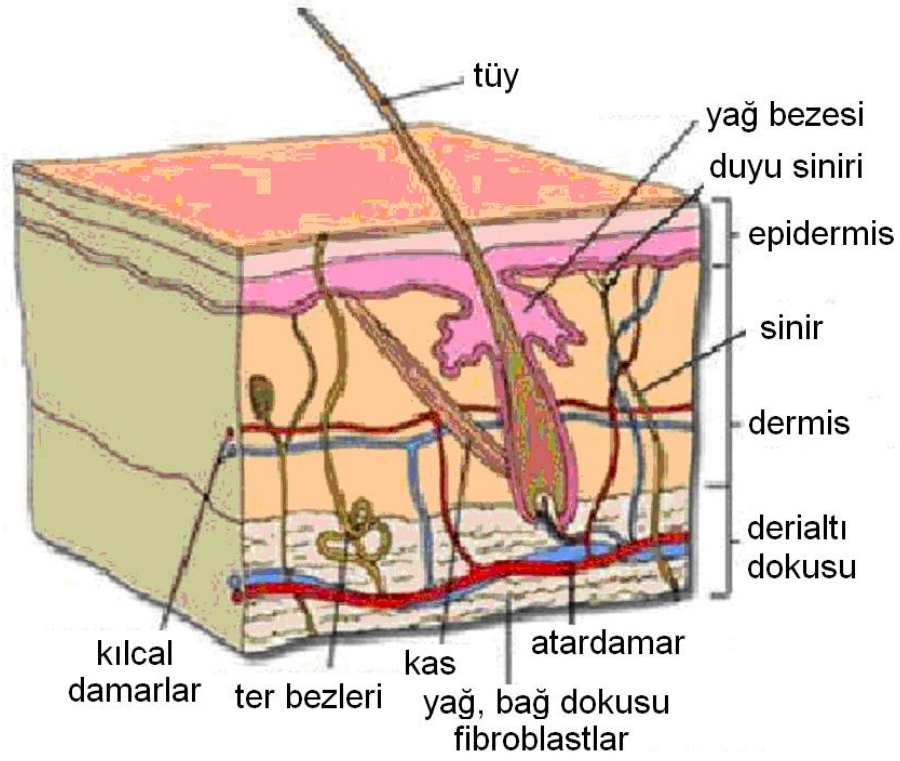
oluşumu (anjiogenezis), hücrel çoğalma, vasküler dinamikler ve değişik mediyatörler üzerinde etkilidir. Etkili kan durdurucu özellikleri olan Ankaferd'in, aynı zamanda güçlü antibakteriyel özellikleri olduğu gösterilmiştir. Diş hekimlerinin kanamayı kontrol amacı ile kullanımları sırasında, yaraların da hızla iyileştiği gözlenmiştir (5). Buradan hareketle, bu bitkisel ekstrenin deneysel olarak oluşturulmuş yaralar üzerindeki etkilerini, plasebo ve yara iyileştirici etkisi iyi bilinen gümüş sülfadiazin ile karşılaştırmayı planladık. Bu çalışmanın planlandığı tarihe kadar, literatürde ABS'in yara iyileşmesi üzerine etkilerini, karşılaştırmalı olarak araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Eğer yara iyileştirici etkisi kanıtlanabilirse, deri ve mukozalarda, kronik ülser ve yara ile seyreden pek çok hastalığın tedavisinde yeni bir alternatif olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin yapısı

Deri, epidermis ve dermis olmak üzere iki tabakadan oluşur. Epidermis; keratinize, adneksiyal yapıları (pilosebase ünite, ekrin ve apokrin bezler, tırnaklar) oluşturan, sürekli kendisini yenileyen, çok katlı skuamöz bir epitelyumdur (6). Epidermis; stratum bazale (tek kat), stratum spinozum (5-15 kat), stratum granülozum (1-3 kat), stratum korneum (5-10 kat) ve vücudun, el ayası ve ayak tabanı gibi bazı bölgelerinde, stratum korneum ile granülozum arasında bulunan ve stratum lusidumdan ibaret 5 katmana ayrılarak incelenir. Epidermisin kalınlığı yaklaşık olarak 100 mikron (μ)'dur, fakat vücut alanına göre kalınlığı değişir. Örneğin, göz kapağında 50 μ , el ayası ve ayak tabanında ise 1 mm'dir (7).

Dermis, papiller ve retiküler olmak üzere iki farklı kısımdan oluşur. Başlıca fibröz konnektif doku (kollajen, elastik ve retiküler fibriller) ve ara madde (matriks)'den meydana gelir. Fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar, dermiste düzenli bulunan hücrelerdir. Dermiste ayrıca sinirler, kan ve lenf damarları, kaslar ve adnekslerin epitelyal yapıları da bulunur. Deri, yüzey ve ağırlık açısından olduğu gibi, immünolojik aktivite yönünden de, en büyük organıdır. Birey ve dış çevre arasında koruyucu bir bariyerdir, mikroorganizmaların veya destrüktif kimyasal maddelerin penetrasyonunu engeller, ultraviyole radyasyonu absorbe eder ve sıvı kaybını önler. Vücut ısısının düzenlenmesinde de önemli rol oynar (6).



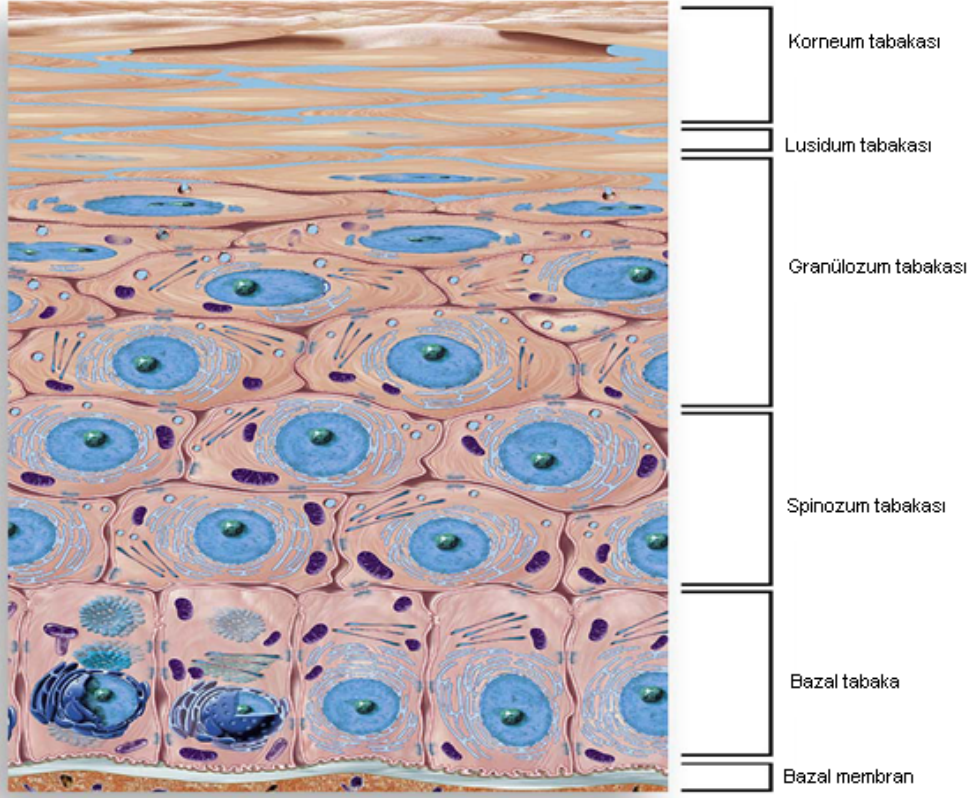
Şekil 1. Derinin yapısı (8).

2.1.1. Epidermis

Epidermal hücrelerin %90-95'ini keratinositler oluşturur. Epidermiste bulunan diğer hücreler ise; Langerhans hücreleri, melanositler ve Merkel hücreleridir (7).

Epidermis, keratinositlerin pozisyonlarına, yapısal özelliklerine, mitotik aktivitelerine ve farklılaşma durumlarına göre, içten dışa; bazal tabaka, spinozum tabakası, granüler tabaka, lüsid tabaka ve korneum tabakası olmak üzere 5 katmandan oluşur. Bazal tabaka ve spinal tabakaya birlikte Malpighi tabakası adı da verilir (7). Bu yapı, Şekil 2'de şematik olarak gösterilmiştir.

Yara iyileşmesinde, özellikle epitelizasyonda önemli roller oynayan deri ekleri epidermisin aşağıya doğru büyümesiyle oluşurlar (7).



Şekil 2. Epiderminin yapısı (9).

Bazal tabaka, mitotik aktivitesi olan keratinositlerin lokalize olduğu bölgedir. Bu tabakadaki keratinositler 3 farklı yapıda hücre içermektedir. Holoklon hücreler, yüksek derecede (%95) proliferatif özellik taşıyan hücrelerdir. Meroklon hücreler, orta derecede proliferatif özellik taşırlar. Paraklon hücreler ise, yalnızca diferansiye hücreleri içerir, proliferasyon göstermezler. İn vitro olarak holoklon yapısı kanıtlanan hücreler, epidermal kök hücre olarak kabul edilmektedir (6,10). Epidermal yaralanmaya cevap olarak, bu kök hücreler aktif hale geçerler (11). Prolifere olan bir keratinositin, bazal tabakadan ayrıldıktan sonra üst katlara ilerlemesi ve deri yüzeyinden atılmasına kadar geçen zamana, yenilenme zamanı (turn-over) adı verilir. Bu süre ortalama 28 gündür. Keratinositlerin bazal tabakadan korneuma ulaşması yaklaşık 14 gün, korneumu oluşturup dökülmesi ise bir 14 gün daha sürer. Bazal tabakadaki hücreler, birbirleriyle ve üstteki skuamöz hücrelerle dezmozomlar, alttaki bazal membranla ise, hemidezmozomlar arıcılığı ile bağlanırlar. Bazal tabaka hücrelerinin yaklaşık %3-5'ini melanositler, %1'ini ise Merkel hücreleri oluşturmaktadır (6,12).

Beş-on sıra skuamöz hücreden oluşan spinoz tabakadaki hücreler, geniş keratin filamentleri (K5/14, K1/10) içerir. Dezmozomlar, en belirgin şekilde bu tabakada gözlenir. Keratohiyalin (filagrin) ve Odland (lameller lipid) granülleri aracılığı ile, epidermal sağlamlık ve bariyer fonksiyonunda önemli rol oynayan bir tabakadır. Bu tabakada immünolojik fonksiyona ve antijen sunma yeteneğine sahip Langerhans hücreleri de yer alır (6,12,13).

Granüler tabaka, nükleus ve diğer hücre organellerinin çözülmeye hazırlandığı bölge olup, yüksek molekül ağırlıklı keratinlerin (K1/K2, K10/11) olduğu tabakadır (6,12).

Nükleus ve sitoplazmik organeller içermeyen, yassı, ölü, boynuzumsu hücrelerden oluşan korneositlerin, kolesterol sülfatın hidrolizi sonucunda deskuame oldukları kabul edilmektedir (6).

Yukarıda bahsedilen yapı ve hücreler, çok kompleks bir süreç olan yara iyileşmesinde, değişik şekillerde ve kademelerde rol oynamaktadır.

2.1.2. Epidermo-dermal bileşke

Epidermisi dermise bağlayan, her iki tabaka arasında sıvı ve hücre alışverişini yöneten epidermo-dermal bileşke, bir bazal membran zonundan oluşur. Bazal membran komponentleri, derinin bütünlüğünü sağlayan, ileri derecede kompleks bir adezyon yapısı oluşturmaktadırlar. Bu bileşkenin değişik moleküllerinde oluşan düzensizlikler, subepidermal bül oluşumu ile seyreden bazı dermatolojik hastalıklarda kilit rol oynamaktadır (3,13-15).

2.1.3. Dermis

Amorf ara madde, kollajen, elastik ve retiküler fibriller, fibroblast, mast hücresi ve makrofaj gibi hücrelerden oluşan dermis, papiller ve retiküler dermis olmak üzere iki bölümden oluşur. Temel madde, zemin maddesi, matriks gibi adlar alan ara dolgu maddesi; fibronektin, glikozaminoglikanlar, hiyaluronik asit, kondroitin sülfat ve dermatan sülfattan oluşur. Fibroblast, mast hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından

salgılanır ve derinin hidrasyonunu sağlar (16,17). Fibroblastlar dermiste en fazla bulunan hücrelerdir. Bu hücreler kollajen, elastin ve mukopolisakkaritleri üretirler. Dermiste en çok bulunan kollajenler tip 1 (%80-90), tip 3 (%8-12) ve tip 5 kollajen (%5'den az)'dir. Kollajenin yapısında; glisin, hidroksilizin, hidroksiprolin ve çok büyük oranda prolin aminoasitleri bulunur. Kollajen, bir taraftan kollajenazlar ile parçalanırken, diğer taraftan yeni sentez edilen fibrillerle yer değiştirir (1,6,18,19).

2.2. Derinin görevleri

Deri, vücut ile dış çevre arasında koruyucu bir bariyer olarak rol oynar. Mikroorganizmaların ve toksinlerin girişini engeller, sıvı kaybını önler. Hasar gördüğünde kendisini yenileyebilme kapasitesine sahiptir. Keratinositler, kollajen ve elastik fibriller, derinin dayanıklılığını ve elastikiyetini sağlar.

2.3. Yara iyileşmesi

Derinin görevlerini yerine getirebilmesi için bütünlüğünü koruması gerekir (1). Doku bütünlüğünün bozulduğu durumlar; erozyon, ülser ve yara olarak tanımlanır. Epidermisi etkileyen yüzeysel doku kaybı erozyon, dermis ve daha derin dokuları etkileyen doku kaybı ülser olarak adlandırılır. Yara ise, kaza veya operasyona bağlı oluşan travmatik hasarı tanımlamak için kullanılır. Ülser ve yara birçok nedenle oluşabilir, skar ve fibrozis ile iyileşir. Skar dokusu mekanik olarak yetersizdir ve deri ekleri yoktur. Aşırı bağ dokusu oluşması hipertrofik skar ve keloide yol açar (19,20).

Kutanöz yara iyileşmesi; temel olarak primer, sekonder ve tersiyer iyileşme olmak üzere üç kategoride incelenir (19,21). Yara kenarlarının karşılıklı getirildiği, iltihapsız ve minimum doku kaybıyla oluşan iyileşme, primer yara iyileşmesi olarak adlandırılır. Yara kenarlarının karşılıklı gelmediği, geniş doku kaybına yol açan, iltihaplı yaralar sekonder yara iyileşmesi ile iyileşir (22,23). Bu tür yaralarda, çok miktarda nekrotik artık, eksuda ve fibrin bulunur. Yara iyileşme süreci daha uzun sürer (24,25). Tersiyer yara iyileşmesi (gecikmiş primer iyileşme), enfekte yaralarda görülen iyileşme tipidir. Bu tür yaralar, başlangıçta açık bırakılır, enfeksiyon geçtikten sonra yara kenarları eksize edilir ve karşılıklı getirilerek birleşme sağlanır (21).

Yara iyileşme süreci, temelde tüm canlılarda benzerdir. Sadece zaman açısından önemli farklılıklar gösterir. Mesela; insanlarda yara iyileşmesi aylar hatta yıllar içinde tamamlanabilirken, bu süre ratlarda 8 hafta kadardır (26).

2.3.1. Yara iyileşmesinin fazları

Yara iyileşmesi, hücrel ve biyokimyasal olayların karşılıklı etkileşimini içeren patofizyolojik ve multifaktöriyel bir süreçtir (27,28). Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda; keratinosit, fibroblast, endotel, makrofaj ve trombositleri içeren birçok hücrenin rol aldığı bir süreç başlar. Bu hücrelerin migrasyon, infiltrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyonu ile yeni doku formasyonu oluşur ve sonuçta yara kapanır. Bu süreçte birçok büyüme hormonları, sitokinler ve kemokinler rol alır. Bunlardan en önemlileri; epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), konnektif doku büyüme faktörü (CTGF), interlökin ailesi (IL), keratinosit büyüme faktörü (KGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve tümör nekroz faktör (TNF)'dür (29).

Yara iyileşmesi 3 fazda incelenir:

- (A) İnflamasyon (Faz 1)
- (B) Proliferasyon ve doku formasyonu (Faz 2)
- (C) Matriks formasyonu ve yeniden yapılandırma (Faz 3)

2.3.1.1. İnflamatuar faz (Faz 1)

İlk faz olan inflammatuar faz, akut hasarı takiben ortaya çıkar. Yaralanmadan hemen sonra başlayıp, 4-6 gün kadar sürer (30). İnflamasyonun baskın olduğu bu fazda; trombosit göçü ve agregasyonu, lökosit toplanması, epitelizasyon ve granülasyon aşamaları yer almaktadır (4,31).

Trombositler yara oluştuğunda ilk aktive olan hücrelerdir (32). Yaralanmadan sonra bölgede gerçekleşen ilk olay, kanama kontrolüdür. Yara bölgesinde trombositler,

aktivasyon, adezyon ve agregasyonlarını tetikleyen trombin ve kollajen ile karşılaşır. Aktive trombositlerden; adenosin difosfat (ADP), fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve faktör VIII (vonWillebrand) gibi adeziv faktörler salınır. Fibrinojen, fibronektin ve trombospondin, trombosit agregasyonunu kolaylaştırırken, faktör VIII, trombositlerin kollajene yapışmasını hızlandırır. Sonuçta trombosit pıhtısı oluşur. Fibrinojenin trombinle polimerizasyonu, fibrin oluşumuna neden olur, fibrin de pıhtıyı genişleterek, yaraya hücre göçü için gerekli olan geçici ekstraselüler matriksin bir kısmını oluşturur. Trombositlerin hakim olduğu bu fazda, bir yandan da endotel hücreleri trombosit agregasyonunu ve pıhtı oluşumunu sınırlayıcı bir işlev görürler. Bu işlev; prostasiklinle trombosit agregasyonunun inhibisyonu, antitrombin 3 ile trombin aktivitesinin inhibisyonu, protein C ile koagülasyon faktörleri V ve VIII'in degradasyonu ve plazminojenin plazmine dönüşümü sonucunda pıhtı yıkımının başlatılmasını sağlar. Pıhtılaşma sırasında, hasarlanmış kan damarlarından plazma ve diğer kan elemanları damar dışına çıkar ve trombüs oluşumuna katkıda bulunurlar. Pıhtılaşma süreci, koagülasyon kaskadını aktive eden uyarıların kalkması ile sonlanır (3,4,20).

Hemostazı takiben damarlar, koagülasyon ve kompleman sistemi ürünlerinin etkisiyle dilate olur ve permabiliteleri artar. Ayrıca trombosit kaynaklı kemotaktik faktörlerin etkisi ile inflamatuvar hücreler yaraya geçer. Trombositler ayrıca TGF- α , TGF- β ve PDGF salgılayarak doku rejenerasyonunu ilerletirler. TGF- α , keratinosit migrasyon ve reepitelizasyonda, TGF- β , fibroblast ve endotel hücre migrasyonu ile granülasyon oluşumunda rol oynar (3).

Lökositler, yaralanmadan birkaç dakika sonra yara alanını istila ederler. Erken evrede nötrofiller ve monositler dominanttır (3). Endotel hücrelerinden salınan selektin ve β -2 integrinlerin etkisi ile dolaşımdaki lökositler, yavaşlar, yuvarlanır ve endotel hücrelerinin arasından geçerek yara bölgesine gelirler. Nötrofiller, hücresel yıkım maddelerini, yabancı cisimleri ve bakterileri fagositoz, enzimatik yol ve oksijen radikalleri aracılığıyla ortadan kaldırır (33). Bu hücreler, hedefe göre değişen çeşitli proteazlar [örneğin miyeloperoksidaz (MPO)] içerirler. İnflamatuvar yanıtın büyüklüğü ile orantılı olarak oluşan proteaz miktarına göre, matriks hasarının şiddeti değişebilir. Yaralanmamış doku matriksi, proteaz inhibitörleri ile korunur. Bugün için bilinmeyen bir mekanizma ile, fonksiyonu biten nötrofillerin çoğu apoptoza uğrar (34).

Kollajen, elastin, fibronektin yıkım ürünleri, aktif trombin ve TGF- β etkisi ile, hasardan sonraki 24-48 saat içinde, ortama monositler gelmeye başlar (35). Bunlar, fenotipik değişiklik geçirerek doku makrofajlarında dönüşür. Aktive makrofajlar, yara iyileşmesinde, proliferatif faza geçiş için önemlidir. Yara onarımında en temel ve kritik hücrelerdir. Bakterileri fagosite ederek öldürür ve doku debrisini ortadan kaldırır. Ayrıca aktive makrofajlar; VEGF, FGF, TNF, PDGF, IL-1 ve nitrik oksit (NO) sentezleyerek anjiyogeneze arabuluculuk eder (36). Doku yaralanmasından birkaç gün sonra, apoptoza uğramayan nötrofiller makrofajlar tarafından fagosite edilir ve yara iyileşmesinin ikinci fazı olan proliferasyon ve doku formasyonu başlar (4).

2.3.1.2. Proliferasyon ve doku formasyonu (Faz 2)

Yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra başlar ve yaklaşık 14. güne kadar devam eder. Geçici ekstraselüler matriks, granülasyon dokusuyla yer değiştirmeye başlar. Kapillerlerin invazyonuyla ilişkilendirilen bu morfolojik değişim, aynı zamanda hücresele seviyede, dermisen kalıcı elemanlarının bölgede oluşmasıyla kendini gösterir. Bunlar, fibroblastlar, kollajen ve kan damarlarıdır (37). İkinci fazda keratinosit migrasyonu, hipoksi, fibroplazi, anjiogenez, ekstraselüler matriks proliferasyonu görülür ve integrinlerin rolü vardır. Bu fazda hücresele aktivite baskındır (3).

Reepitelizasyon, yaralanma sonrası epidermisen tamiridir. Erken dönem reepitelizasyonda keratinosit migrasyonu görülür. Epidermal büyüme faktörü, KGF ve TGF- α keratinosit migrasyonunu, proliferasyonunu ve reepitelizasyonu uyarır. Keratinositler yaranın serbest kenarından hasarlı bölgeye göç ederler. Deri ekleri zarar görmediyse, kıl folikülü gibi yapılardan da keratinosit göçü olur. Keratinosit göçü deride fonksiyonel bariyer oluşuncaya kadar devam eder (3,38). Göç sırasında, keratinositlerde belirgin morfolojik değişiklikler olur. Bazal keratinositler normal küboid şekillerini kaybederek düzleşirler ve yara yatağına lamelli podlar uzatırlar. Hemidezmozomlar plazma membranından çekilirler ve bağlantı kanalı (gap junction) sayısı artar. Göç eden keratinositler, doku tipi (tPA) ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünün (uPA) düzeyini artırır. Bu enzimler, keratinositlerin fibrin pıhtısı içinde hareket edebilmeleri için gereklidir (4).

Yara yerinde hipoksi, fibroblast ve endotel hücrelerinin aktivasyonunda etkili bir faktördür. Endotelin-1, TGF- β 1, PDGF-B zinciri ve VEGF gibi birçok büyüme faktörünün sentezi de, hipoksi ile artar (4).

Fibroplazi, fibrin pıhtı içine fibroblast proliferasyonu, migrasyonu ve kollajen ile diğer matriks proteinlerinin üretimi olarak tanımlanır. Kollajen üretimi, yara iyileşmesinde, matriksin yeniden şekillenmesi ve ekstraselüler matriks depozisyonu evrelerinde görülür (39,40). Kollajen sentezinin başlaması ve proliferasyon için, fibroblastlar yaralı dokunun etrafındaki sağlam dokudan gelip aktive olurlar. Trombosit ve makrofajlar tarafından üretilen PDGF, FGF ve TGF- β , fibroblastlar için ana sinyali oluşturur. Platelet kaynaklı büyüme faktörü'ne yanıt olarak, fibroblastlar tip III kollajen, glikozaminoglikan ve fibronektinden oluşan geçici matriks sentezine başlarlar (41,42). Transforme edici büyüme faktörü- β , fibroblastların tip I ve tip III kollajen sentezlemesini uyarır, MMP aktivitesini azaltır, doku inhibitörlerinin ve adezyon moleküllerinin üretimini artırır (3,34). Bu fazı durduran sinyalin, bir fibroblast inhibitörü olan, interferonla indüklenen protein 10 (IP-10)'dan geldiği düşünülmektedir (24). Sekonder iyileşmede, yara kontraksiyonu ve epitelizasyonu, TGF tarafından yönetilir (43). Fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşerek yara kontraksiyonuna katkıda bulunur (3,4).

Anjiogenez, yeni kan damarları oluşumu olup, bu süreçte en etkili hücre, endotel hücreleridir. Ekstraselüler matriks ve komşu hücrelerden gelen kemotaktik sinyaller endotel hücrelerinin yaraya göçünde etkilidirler (4,20). Vasküler endotelial büyüme faktörü, FGF-2 ve anjiopoetinler, anjiogenezi uyaran çeşitli faktörlerden en önemlileridir, bazal membrandaki proteoglikanlara bağlanır ve bu yapılar hasarlanınca serbestleşirler. Direkt veya indirekt olarak endotel hücrelerini uyarırlar, bu uyarı sonucu, bazal membranı parçalayan proteinazlar salgılanır, endotel hücre göçü ve proliferasyonu başlar. Laminin ile etkileşmeleri sonucu, endotel hücre proliferasyonu artar ve yeni damarlar oluşur (44). Endotel hücreleri NO sentez ederler. Nitrik oksit, vazodilatasyonu artırıp dokuyu hipoksi, iskemik ve reperfüzyon hasarından korur. Yapılan çalışmalarda NO'nun yara iyileşmesinde çok önemli rol oynadığı gösterilmiştir (17). Erken dönemde sitostatik, kemotaktik, vazodilatatör olarak görev yapar, değişik hücrelerin diferansiyasyonunu ve çoğalmasını düzenler. Geç dönemde anjiogenezis ve kollajen depozisyonunu modüle eder (45).

Matriks metalloproteinaz'lar; yara iyileşmesinde, inflamasyon, proliferasyon, matürasyon ve yeniden yapılanmada rolü olan, Ca^{+2} ve çinko bağımlı endopeptidazlardır. Kollajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler, matrilisinler ve membranöz tip MMP'lar olarak, 5 sınıfta incelenir (46). Matriks metalloproteinaz-1, MMP-2, MMP-9, MMP-19 ve membranöz tip MMP (MT-MMP), angiogenezde rol alan en önemli MMP'lardır (47). Matriks metalloproteinaz-1, tip I kollajen matriks içine endotelial hücre migrasyonu için gereklidir (48). Matriks metalloproteinaz-2, endotelial hücre yüzeyindeki integrinler sayesinde, endotelial hücrelere yapışır, önlerine çıkan geçici ekstraselüler matriks (ECM)'i parçalayarak ilerlemelerini sağlar (47).

2.3.1.3. Matriks formasyonu ve yeniden yapılanma (Faz 3)

Yarannın granülasyon dokusuyla dolup, keratinosit migrasyonu ile reepitelizasyonun sağlanmasını takiben başlar. Yaralanmanın 8. günü başlayıp 1 yıla kadar devam eden bu fazda, fibroblast kökenli TNF- α , IL-1, PDGF ve TGF- β ile endotel hücrelerinden salgılanan EGF ve TGF- β rol alır (49, 50).

Hücrelerdeki ve ekstraselüler matriksteki abartılı artışın ortadan kaldırılması ve yaralanmadan önceki duruma dönebilmesi için, dokunun yeniden yapılandırılması gerekir. Apoptotik mekanizmalar ve MMP'ların enzimatik aktivitesi bu dönemde devreye girer. Apoptozisin gerçekleşmediği durumlarda, aşırı skatrizasyon, fibrozis ve keloid oluşumu gibi patolojik iyileşmeler görülebilir (4,51).

Yeniden yapılanma safhasında, özellikle MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 ve 12'nin rolü vardır. Kollajenazlar (MMP-1, MMP-8, MMP-13); tip I, II ve III kollajeni, jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9); tip I, V, VII, X kollajeni, elastin ve diğer bazal membran proteinlerini, stromelizinler (MMP-3, MMP-10 ve MMP-11); kollajen IV, V, X ve elastini, matrilisinler (MMP-7); fibronektin, jelatin ve elastini parçalar. Membranöz tip MMP'lar (MMP-14 ve MMP-17), hücre membranı üzerinde bulunur, diğer MMP'ların aktivasyonuna ve hücre yüzeyine bağlanmalarına yardım ederler (46).

Dokunun yeniden yapılandırılması, yara kontraksiyonu ve kollajenin yeniden şekillendirilmesi süreçleri ile karakterizedir (46). Bu süreçte, fibronektin komponentleri, hiyalüronik asit ve proteoglikanlar, kollajen ve miyofibroblastlar devreye girer (4). Yaranın kontraksiyonu işlemi, miyofibroblastlar tarafından yapılır. Bunlar; bölünme ve matriks kontraksiyonunu gerçekleştirme potansiyeli olan, intraselüler aktin mikrofilamentlerine sahip fibroblastlardır. Miyofibroblast diferansiyasyonu, fibroblastlar ve diğer hücreler tarafından salgılanan TGF- β tarafından indüklenir. Fibroblastlar, yara bölgesine geldikten sonra fibronektin üretirler. Fibronektin üretimi, başta TGF- β olmak üzere birçok büyüme faktörü tarafından tetiklenir (4,43,52).

Matriksin önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit, hücre hareketlerinde belirgin bir kolaylaşmaya neden olur. Granülasyon dokusundaki fibroblastlar, bol miktarda hiyalüronik asit üretirler. Yeniden yapılandırma gerçekleşirken, hiyaluronik asit, hiyalüronidazlar tarafından yıkılır ve yerini daha güçlü bir yapıya sahip olan, ancak hücre hareketlerini yavaşlatan, sülfatlı proteoglikanlar alır. İki temel proteoglikan olan kondroitin-4-sülfat ve dermatan sülfat, olgun skar fibroblastları tarafından üretilirler. Bunlar onarımın 2. haftasında yara alanına gelir ve matriksin esnekliğini sağlar (4,20).

Kollajen, yeniden şekillendirme aşamasının en karakteristik proteiniştir. Proliferatif aşama boyunca, başlangıçta tip III kollajenler, fibroblastlar tarafından yaraya döşenirler, sonraki birkaç ay içinde bunlar, tip I kollajen ile yer değiştirirler. Tip III kollajenin yavaş degradasyonu, makrofajlar, fibroblastlar ve endotelial hücrelerin salgıladığı MMP'lar tarafından sağlanır. Sağlam dokudaki kollajen oranı, %80-90 tip I ve %10-20 tip III şeklindedir. Granülasyon dokusunda, kollajen tip III %30'lara ve olgun skar dokusunda ise %10'lara düşer, ayrıca granülasyon dokusunda tip V kollajen de görülür. Skar dokusundaki proteinin %50'den fazlasını kollajen oluşturur. İyileşen yaranın direnci, bu süreç boyunca yavaş yavaş artar. Üçüncü haftada, yara direnci, sağlam dokudakinin %20'si civarındadır. İyileşmenin optimal şekilde tamamlanması durumunda bile, orijinal direncin ancak %70 kadarına ulaşılabilecektir (19,20,30,53).

Yukarıda özet olarak aktarılmaya çalışılan ve oldukça kompleks bir süreç olan yara iyileşmesinde rol alan hücre ve sitokin etkileşimleri Tablo 1, 2 ve 3 ile Şekil 4 ve 5'te özetlenmiştir.

Tablo 1. Yara iyileşmesinde, çeşitli hücre ve ekstraselüler elemanların rolleri (54).

Yara elemanları	Yaralanmadan sonra görülme zamanları	Yara iyileşmesinde major etkileri
Trombositler	Hemen	Hemostaz, büyüme faktörleri (PDGF, TGF- β , EGF, TGF- α) ve proteolitik enzimlerin salınımı
Nötrofiller	6. saat, 24-48. saatte pik	Yara debridmanı, bakteri ve yabancı cisimlerin fagositozu
Makrofajlar	3-5. günde pik	Yara debridmanı, büyüme faktörlerinin (PDGF, TGF- β , TGF- α , FGF, IL-1, EGF, TNF- α) salınımı
Fibroblastlar	48-72. saat arası	Kollajen, proteoglikan ve elastin sentezi, büyüme faktörlerinin (TGF- β , PDGF, KGF, FGF, IGF-1 ve IFN) salınımı, yara kontraksiyonu, yeniden yapılanma
Keratinositler	Epidermal migrasyon başlayınca	Mitoz, migrasyon, epitelizasyon, fibronektin sentezi, büyüme faktörleri (TGF- β , TGF- α , EGF) üretimi
Endotel hücreleri	48-72. saat arası	Fibronektin sentezi, büyüme faktörleri (PDGF, TGF- β , IGF-1) üretimi
Fibronektin	Erken	Hücre migrasyonu için yapısal destek; kollajenin organizasyonu
Kollajen	Tip III: 2 gün sonra Tip I: birkaç hafta sonra	Yapısal destek ve güç, hücreler arası etkileşimi düzenleme
Proteoglikanlar	2. haftada maksimum sentez	Kollajen sentezinin regülasyonu, hücreler arası etkileşimler, matriks komponenti
Hiyalüronik asit	4. günde maksimum	Hücre motilitesinin artırılması

(EGF: Epidermal büyüme faktörü, FGF: fibroblast büyüme faktörü, IFN: İnterferon, IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü, IL-1: İnterlökin 1, KGF: Keratinosit büyüme faktörü, PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü, TGF: Transforme edici büyüme faktörü, TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa)

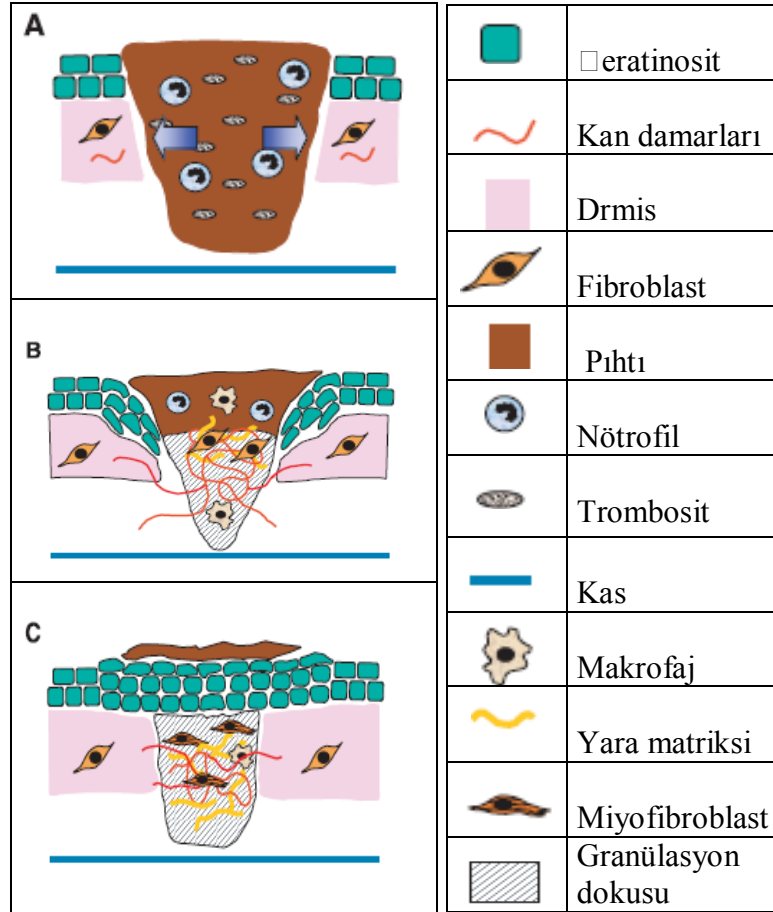
Tablo 2. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılandıkları hücreler ve bu mediatörlerin yara iyileşmesindeki görevleri (29).

Büyüme faktörleri	Hücreler	Fonksiyon
EGF	Trombositler Makrofajlar Fibroblastlar	Reepitelizasyon
FGF-2	Keratinositler Mast hücreleri Fibroblastlar Endotel hücreleri Düz kas hücreleri Kondrositler	Granülasyon dokusu formasyonu Reepitelizasyon Matriks formasyonu ve yeniden yapılandırma
TGF-β	Trombositler Keratinositler Makrofajlar Lenfositler Fibroblastlar	İnflamasyon Granülasyon dokusu formasyonu Reepitelizasyon Matriks formasyonu ve yeniden yapılandırma
PDGF	Trombositler Keratinositler Makrofajlar Endotel hücreleri Fibroblastlar	İnflamasyon Granülasyon dokusu formasyonu Reepitelizasyon Matriks formasyonu ve yeniden yapılandırma
VEGF	Trombositler Nötrofiller Makrofajlar Endotel hücreleri Düz kas hücreleri Fibroblastlar	Granülasyon dokusu formasyonu
IL-1	Nötrofiller Monositler Makrofajlar Keratinositler	İnflamasyon Reepitelizasyon
IL-6	Nötrofiller Makrofajlar	İnflamasyon Reepitelizasyon
TNF-α	Nötrofiller Makrofajlar	İnflamasyon Reepitelizasyon

Tablo 3. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin doku onarımındaki işlevleri (55).

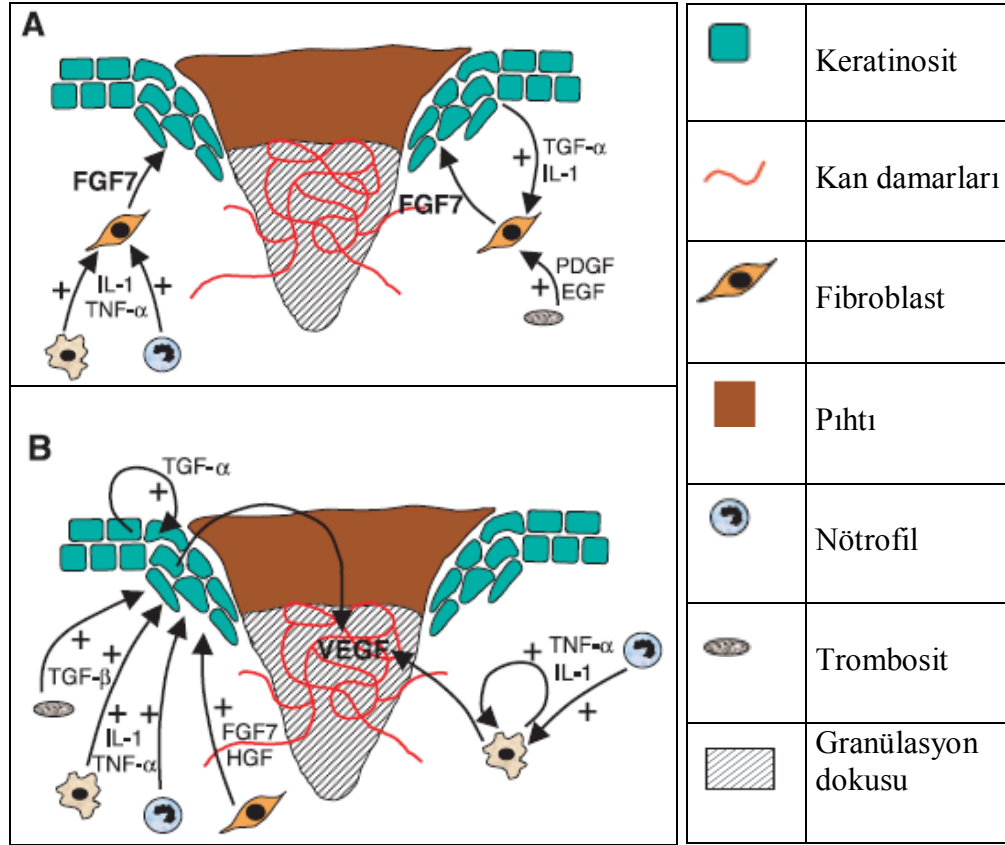
İşlevler	Büyüme faktörleri ve sitokinler
Nötrofil infiltrasyonu	TGF- β , IL-8, IL-6, IL-10 (-)
Makrofaj infiltrasyonu	TGF- β , IL-10 (-)
Anjiogenezis	VEGF-A, FGF-2, HGF, GM-CSF
Fibroplazi	PDGF, TGF- β , GM-CSF, IGF
Matriks depozisyonu	FGF-2, IGF-1, TGF- β
Skar oluşumu	IGF-1, TGF- β , IL-6, IL-10 (-)
Reepitelizasyon	FGF-2, FGF-7, FGF-10, EGF, TGF- α , IGF, IL-6, GM-CSF, TGF- β (-), IP-10 (immun protein-10)(-)

Not: (-) işaretle gösterilenler negatif regülasyon yaparlar.



Şekil 4. Yara iyileşmesinin aşamaları (55).

(A. Yaralanmadan 12-24 saat sonra yara alanı kan pıhtısı ile dolar. Nötrofiller pıhtı içinde hakim olur. B. Yaralanmadan 3-4 gün sonra nötrofillerin çoğu apoptoza uğrar. İyileşmenin bu evresinde yara dokusuna makrofajlar hakim olur. Pıhtı içine endotel hücreleri göç eder, proliferer olur ve yeni kan damarları oluşur. Yara dokusuna fibroblastlar göç eder ve ekstraselüler matrikste çoğalırlar. Oluşan yeni doku granülasyon dokusu olarak adlandırılır. Keratinositler yara kenarlarında proliferer olur, aşağıya doğru dermise göç eder ve geçici matriks içinde dağılırlar. C. Yaralanmadan 1-2 hafta sonra yara alanı komple granülasyon dokusu ile dolar. Fibroblastlar myofibroblastlar ile yer değiştirir, kollajen birikimine ve yara kontraksiyonuna yol açar).



Şekil 5. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörlerinin etkileşimi (55).

(A. Yara alanında FGF-7 regülasyonu. Lokal hemoraji trombositlerin damar dışına çıkmasına neden olur ve trombositler PDGF ve EGF salgılar. Bunlar fibroblastlardan mitojenik olan FGF-7 üretimini uyarır. Ek olarak nötrofil ve makrofajlar proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 ve TNF-α salgılar. Bunlar da fibroblastlardan FGF-7 üretimini artırır ve FGF-7 uyarısı ile keratinositlerden IL-1 ve TGF-β salgınır. B. Yara alanında VEGF regülasyonu. Lokal hemoraji, trombositlerin damar dışına çıkışına neden olur ve bunlar da TGF-β salgılar. Makrofajlar da büyüme faktörleri ile birlikte IL-1 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılar. Bu faktörler keratinosit ve makrofajlardan VEGF salınımını uyarır. Ek olarak, fibroblastlardan üretilen FGF-7, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve keratinositlerden üretilen TGF-α, epidermisten VEGF salınımını uyarır).

2.3.2. Yara iyileşmesinde etkili sitokinler

Sitokinler, inflamasyon, yara iyileşmesi, skar ve kan damarı oluşumunda rol oynayan, küçük protein veya glikoproteinlerdir. İnflamatuvar ve travmatik olaylara cevaben, duyarlı hücreler aktive olur ve sitokinler salgınır. Sitokinler, otokrin, parakrin ve endokrin yolla hedef hücreleri aktive eder. Bu sitokinler, IL'ler, koloni stimüle edici faktörler, büyüme faktörleri ve TNF'dir. Yara iyileşmesinde 9 önemli büyüme faktörü vardır: CTGF, EGF, FGF, IGF-I, KGF, PDGF, TGF-α, TGF-β ve VEGF'dir (20). Transforme edici büyüme faktörü, FGF ve PDGF, hücre aktivasyon ve

diferansiyasyonunda, VEGF ise vasküler permeabilite değişikliğinde, akut olarak mikrosirkülasyona geçer ve anjiogenezi artırır (56).

2.3.2.1. Çalışmamızda incelenen büyüme faktörleri ve hidroksprolin

2.3.2.1.1. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, trombositlerin α granüllerinde bulunan bir polipeptiddir. Özellikle erken dönem inflamatuvar fazda önemli rol oynar (57). Trombositlerden ve ayrıca makrofajlar, aktive fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ile epitelyal hücrelerden, travmanın başlatıcı etkisi ile yara yatağına salınırlar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü A ve B zinciri olmak üzere iki genin ürünüdür ve üç formu vardır; AA, AB, BB (55). Monosit, makrofaj ve nötrofiller için kemotaktik, fibroblast ve düz kas hücreleri için mitojendir (3). Fibronektin reseptörlerini uyararak, fibroblast migrasyonunu artırır. İndirekt olarak anjiogenezi, granülasyon oluşumunda ve fibroblast proliferasyonu ile ECM üretiminde de rol oynar. Hipertrofik skar ve keloid dokusunda yüksek düzeyde bulunur, fibroblastların aktivitesini artırır (56).

2.3.2.1.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, heparin bağlı bir glikoproteindir (56). Altı izoformu tanımlanmıştır. Dominant olarak makrofajlar tarafından üretilir, fibroblast, endotelyal ve epidermal hücreler tarafından da sentezlenir. Spesifik reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Bu sitokin ve onun reseptör sistemi, anjiogenezi yöneten hücre sinyalleri için düzenleyici fonksiyon görür. İyi bilinen bir vasküler geçirgenlik faktörüdür. Endotelyal hücrelerde, mikrovasküler tüp formasyonunu, hücre migrasyon ve proliferasyonunu uyararak, güçlü anjiogenetik etki gösterir. Vasküler endotelyal büyüme faktörünün temel fonksiyonu anjiogenezi sağlamaktır. Bu işlevi, direkt olarak görebileceği gibi, PDGF, EGF, TNF- α , IL-1 β ve TGF- β gibi anjiogenezi indirekt olarak aktive eden faktörleri uyararak ta yapabilir (20).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, FGF-2 ile birlikte, heparan sülfata güçlü afinitesi olan, kapiller endotelyal hücreler için güçlü bir mitojendir. Endotel

hücrelerinden NO sentezini uyararak vazodilatasyonu sağlar. Preoperatif subkutan VEGF enjeksiyonu, yara iyileşmesi sürecini kısaltır (56).

2.3.2.1.3. Epidermal büyüme faktörü (EGF)

Epidermal büyüme faktörü ve TGF- α , aynı hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak benzer biyolojik aktivite gösterirler. Epidermal büyüme faktörü, yara iyileşmesinin erken dönemlerinde başlıca trombositlerden salgılanır ve hemostazı sağlar. Epitel migrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyonunu artırarak epitelizasyonu hızlandırır. Ayrıca, fibroblastlar için kemotaktik ve mitojenik bir ajandır, bu hücrelerden metalloproteinaz ve glikoprotein sentezini artırarak, yara iyileşmesinin geç döneminde (yeniden yapılandırma) de rol oynar (20).

2.3.2.1.4. Çalışmamızda incelenen kollajen indikatörü: Hidroksiprolin

Kollajenin yapısında; başta prolin olmak üzere, hidroksiprolin, glisin ve hidroksilizin aminoasitleri bulunur. Hidroksiprolin; enzimatik hidroksilasyonla prolinden, az miktarda da arjinaz ve ornitin aminotransferaz aracılığı ile L-arjininden sentez edilir (18). Kollajenin yaklaşık %13'ünü oluşturan hidroksiprolin, kollajeni tanımlamak için iyi bir belirteç olup, düzeyi, kollajen miktarı ile paralellik gösterir. Doku kollajen ve kollajen turn-over indeksini ölçmek için hidroksiprolin kullanılır (40,58).

2.3.3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Bazı faktörler yara iyileşmesini kötü yönde etkiler, geciktirir veya engeller. Bunlar, lokal ve sistemik faktörler olarak incelenebilir. Lokal faktörler; kanlanma, enfeksiyon, nekrotik doku veya yabancı cisim varlığı, oksijenizasyon, sistemik faktörler ise; diyabet, kronik böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı gibi kronik hastalıklar, kanser, steroid kullanımı, ileri yaş, sigara içimi, kemoterapötik ajanlar, radyoterapi, beslenme yetersizliği ve herediter faktörlerdir (59,60).

Yaralanma şekli, yara iyileşmesini etkileyen önemli bir faktördür. En hızlı iyileşme, nekrotik yıkıntı olmayan yaralardadır. Kriyocerrahi, elektrocerrahi, lazer veya

asitlerle oluşan yaralar geç iyileşir. Bazı kostik, antiseptik veya hemostatik ajanlar da iyileşmeyi geciktirir (61).

Kanlanma: Yeterince kan akımı olmayan bir yarada, iyi beslenemediğinden dolayı enfeksiyon ve nekroz riski vardır. Yaşlı insanlarda lokal kan akımı azaldığından, yara iyileşmesi gecikir. Cerrahi uygulama esnasında damarlara fazla zarar verilmemesi, iyileşmeyi hızlandırır (62).

Enfeksiyon: Yaraya bakteriler dışardan ya da kan yoluyla gelirler. Ameliyathane şartlarında bile, her yara bir dereceye kadar kontamine dir. Her kontamine yara, enfekte olmaz. Bir gram dokuda 100.000'den fazla bakteri varsa, yarada enfeksiyon ihtimali %50'dir. Kolonizasyon ise mikroorganizmaların zararsız artışıdır ve yara iyileşmesini geciktirmez. Enfeksiyon olup olmadığına, esas olarak; eritem, ödem, ağrı, ısı artışı, pürülan akıntı ve sistemik semptomlar gibi klinik bulgulara bakılarak karar verilir. Enfeksiyon, inflamatif süreci uzatır ve yara iyileşmesini geciktirir. Bakteriler, kollajenaz üreterek doku gerilme direncini azaltır. Enfekte yaralarda fibroblastik aktivite azalır (61-63).

Yabancı cisim: Yabancı cisimler, yaradan uzaklaştırılmazsa inflamatif cevap uzar, enfeksiyona ve iyileşmede gecikmeye neden olur (64).

Oksijenizasyon: Fibroblast replikasyonu için uygun oksijen basıncı, 30-40 mmHg'dır. Hipoksi düzeyi arttıkça, kollajen sentezi ve yara gerilme gücü olumsuz etkilenir (64).

Kronik hastalıklar: Diyabet, dolaşım hastalıkları, karaciğer ve böbrek yetmezliği ve anemi gibi sistemik hastalıklar, yara iyileşmesini geciktirir. Diyabet, yara gerilim kuvvetini ve hidroksiprolin düzeyini azaltarak, yara iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. Bu sorun, insülin tedavisi ile tamamen düzelir (62,65,66).

İlaçlar: İlaçlar arasında kortikosteroidler, yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen en önemli ajanlardır. Epitelizasyonu bozar, kollajen sentezini inhibe eder, gerilme gücü oluşumunu geciktirir ve enfeksiyon riskini de artırırlar. Yaralanmadan

önceki 72 ve sonraki 48 saat içinde verilmeleri, yara iyileşmesini inhibe etmektedir. Bu etkiler, sistemik vitamin A verilmesi ile tersine çevrilebilir.

İmmünsüpresifler ve antineoplastikler, inflammatif hücre fonksiyonlarını inhibe ederek yara iyileşmesini bozar ve oluşturduğu lökopeni sebebiyle enfeksiyona eğilimi artırır. Kemoterapötikler, trombositleri ve büyüme faktörlerini azaltır. Özellikle preoperatif dönemde alınır, bu etkileri daha güçlüdür. Ayrıca, bu ajanlar kollajen sentezini de azaltmaktadır.

Aspirin ve fenilbutazon gibi steroid dışı antiinflamatuvarların, hayvanlarda yara gerilme gücünü azalttığı gösterilmiştir. Kanama riskinde artışa da neden olmaktadır (61).

Radyoterapi: Radyoterapi, direkt olarak fibroblastlar üzerine etki yoluyla yara iyileşmesini inhibe eder. Ayrıca, epitelizasyonda önemli olan keratinositler, vasküler sistem ve deri ekleri üzerinde olumsuz etkileri vardır. Hipoksiye neden olur ve pek çok hipoksik yaranın aksine, burada anjiogenez başlatılamaz. Radyoterapi ile hasar gören deri, ülser gelişimine elverişlidir ve iskemi nedeniyle de, bu ülserlerin iyileşmesi geç olur. Yaralanmadan 1 hafta önce yapılan radyoterapi, yara gerilim gücünü %50 civarında azaltır. Yaralanmadan 2 hafta sonra yapılan radyoterapi yara gücünü bu şekilde etkilemez (61).

Sigara: Sigara deride vazokonstrüksiyona neden olur, karboksihemoglobin oranını artırarak kanın oksijen taşıma kapasitesini sınırlar. Dokuda hipoksiye neden olur. Nikotin eritrosit, makrofaj ve fibroblast çoğalmasını engelleyici etkileri vardır. Kollajen sentezini azalttığı da gösterilmiştir. Kronik içicilerde, kutanöz arterioskleroz oranı da artar (61).

Beslenme: Yara iyileşmesi için; metionin, sistin, sistein ve arjinin gibi aminoasitler hayati önem taşırlar. Bu proteinlerin eksikliğinde, inflamasyon fazı uzar ve fibroplazi bozulur. Fibroplazi; fibroblastların yara kenarından göç edip prolifer olmaları, kollajen üretilmesi ve birikimi süreci olarak tanımlanır (65,67). Karbonhidratlar ve yağlar hücrenin enerji kaynağıdır. Hücre sentezinde, özellikle hücre membran sentezinde, yağların rolü büyüktür. Eksiklikleri, yara iyileşmesini olumsuz

etkiler. Sodyum, potasyum, kalsiyum, klor, fosfor, çinko ve mağnezyumun eksikliği, kollajen sentezinde bozukluklara sebep olur ve iyileşmeyi olumsuz etkiler. Çinko yetersizliğinde, epitel hücreleri ve fibroblastlar göç edebilirler fakat çoğalamazlar. Sonuçta, epitelizasyon oluşmaz ve kollajen üretimi, yara kenarlarını bir arada tutacak yeterli düzeye ulaşamaz. Yüksek çinko konsantrasyonu, yara iyileşmesi için zararlı olabilir. A, B, C, D ve E gibi vitaminler de, yara iyileşmesi için gereklidirler. Ancak; yüksek dozda vitamin E, yara iyileşmesi ve kollajen üretimini belirgin olarak yavaşlatır. Yüksek doz A vitamini, inflamatuvar reaksiyonları artırır. Vitamin C, kollajen sentezi için gereklidir. Vitamin C yokluğunda, kollajen sentezi tamamlanamaz veya sentezlenen kollajen salgılanamaz (62,63,65).

2.4. Ankaferd (Ankaferd Blood Stopper, ABS)

2.4.1. Ankaferd isminin geleneksel kökeni

Ankaferd ismi anka ve ferd kelimelerinden oluşur. Anka kelimesi İbranice anak kelimesinden türemiştir. Anak, isim olarak gerdanlık ve uzun boyunlu dev anlamlarına, fiil olarak ise gerdanlık takmak, boğmak, boğazı sıkmak anlamlarına gelmektedir. Anka kuşu; Simurg, Zümrüd-ü anka, Devlet kuşu ve Phoenix adlarıyla da bilinir. Yüzü insan yüzüne benzer, boynu uzun ve tüyleri renk renktir. Divan şiirinde, doğu mitolojileri ve efsanelerinde sıkça kullanılan Anka, çeşitli rivayetlere göre insan gibi düşünür, konuşur, çok geniş bilgi ve hünere sahiptir. Kendisine başvuran hükümdar ve kahramanlara akıl hocalığı yapar. Tüleriyle yaraları sıvazlayıp yaraları iyi eder (68). Ferd ise; Osmanlıca'da, tek, bir, yekta, eşi benzeri olmayan anlamına gelmektedir.

2.4.2. Ankaferd'in bileşimi

Ankaferd, geleneksel olarak Türk tıbbında kullanılan beş bitkisel içeriğin çeşitli oranlarda karıştırılması suretiyle hazırlanan hemostatik bir ajandır. Aynı zamanda, damar endoteli, kan hücreleri, anjiogenez ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri olan bir karışımdır. İçeriğinde, *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Vitis vinifera* (koruk) ve *Alphina officinarum* (havlıcan)'un kurutulmuş yaprak ekstreleri, *Urtica dioica* (ısırgan)'nın kurutulmuş kök ekstresi ve *Thymus vulgaris* (kekik)'in kurutulmuş ot ekstresi bulunmaktadır. Standardize edilmiş karışımın 100 ml'si; 5 mg *Thymus vulgaris*, 9 mg

Glycyrrhiza glabra, 8 mg *Vitis vinifera*, 7 mg *Alphina officinarum* ve 6 mg *Urtica dioica* içermektedir (69,70).

2.4.3. Farmakokinetik, farmakodinamik

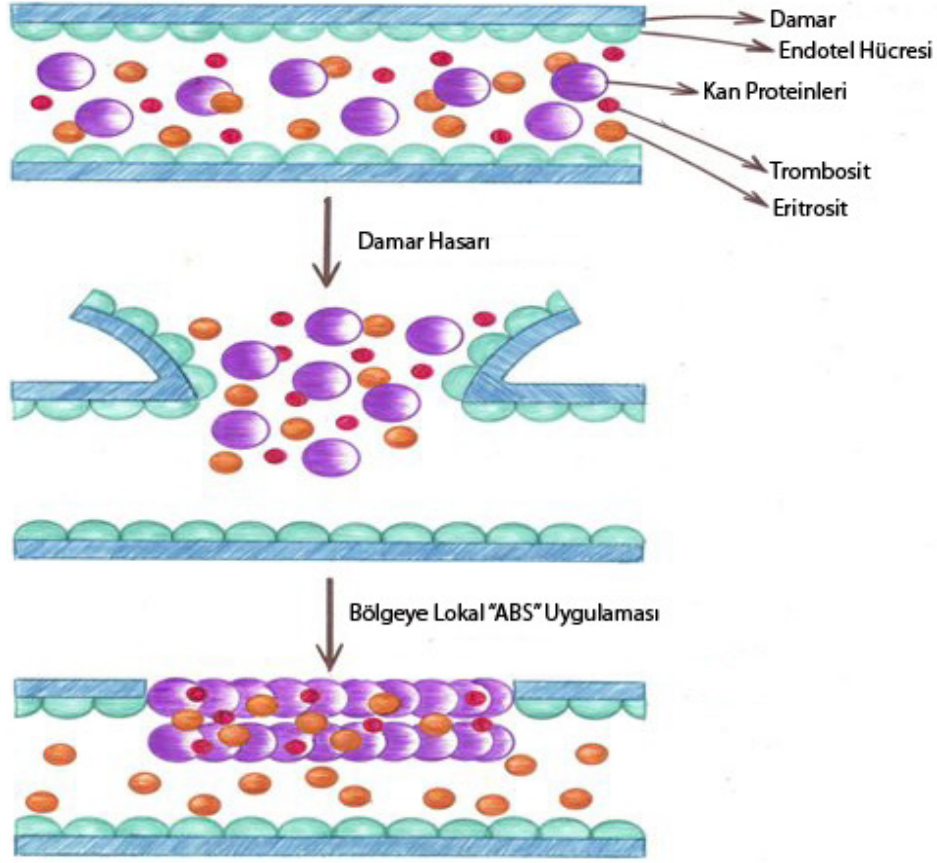
Bu bitkilerin tümü, tek başlarına endotel, kan hücreleri, damar oluşumu, hücre çoğalması, vasküler dinamikler ve çeşitli mediyatörler üzerinde etkilidir. Ankaferd, ampul, tampon ve sprey olmak üzere 3 farklı farmasötik formda hazırlanmıştır (71).

Glycyrrhiza glabra; anjiogenezisi önler, VEGF'ü düşürür ve neovaskülarizasyonu azaltır. Aynı zamanda anti-inflamatuar, anti-trombin, anti-trombosit, anti-oksidan, anti-arteriosklerotik ve anti-tümör etkileri bulunmaktadır (72). *Timus vulgaris*'in anti-oksidan etkisi vardır. Bu da, in vivo oksidatif hasarı, lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı arterioskleroz oluşumunu önler (73). *Vitis vinifera*'nın anti-arteriosklerotik ve anti-tümör etkileri vardır (74-77). *Alpinia officinarum* NO oluşumunu azaltır (78). *Urtica dioica*'nın, sıçanda endotel kaynaklı hipotansif yanıt oluşturduğu, bunun endotelden NO salıverilmesi ve potasyum kanallarının açılması sonucu oluşan vazodilatasyona ve negatif inotropik etkiye bağlı olabileceği bildirilmiştir (79). Ankaferd'in doku iyileşmesi, mezenkimal kök hücre gelişimi ve kanser hücreleri üzerine etkileri araştırılmaktadır (71).

2.4.4. Ankaferd'in etki mekanizması

Ankaferd'in etkisini, fibrinojen başta olmak üzere kan proteinleri ve eritrositlerin plazma ve serumda "Protein ağı" meydana getirmesi suretiyle gösterdiği bildirilmektedir. Ankaferd'in etkisi çok hızlı başlamakta, eritrosit ve kan proteinlerinin birleşmesiyle meydana gelen enkapsüle protein ağı formasyonu, saniyeden daha kısa bir sürede meydana gelmektedir.

Yapılan biyokimyasal ölçümlerde, pıhtılaşma faktörleri üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir. Ankaferd kullanımını takiben plazma fibrinojen aktivitesinde ve fibrinojen miktarında azalma, buna bağlı olarak trombin zamanının uzadığı bildirilmektedir (71). Ankaferd'in etki mekanizması Şekil 6'da şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 6. ABS'in etki mekanizması (71).

2.3.5. Ankaferd'in etkileri

Ankaferd blood stopper ile yapılan ilk in vivo çalışmada, deney hayvanı olarak kedi ve köpek kullanılmış ve Ankaferd'in kedi ve köpeklerin insizyonel yaralarında, kanamanın kontrolü ve durdurulmasında etkili olduğu, allerjik reaksiyon, renk değişikliği ve kimyasal reaksiyon gözlenmediği, güvenle kullanılacak bir madde olduğu bildirilmiştir (71). Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda, topikal Ankaferd kullanımının, warfarin, aspirin ve enoksaparin kullanılarak antikoagülan tedavi uygulanan ratlarda, kanama süresini ve miktarını anlamlı derecede azalttığı, böylelikle in vivo ortamda da etkili olduğu ortaya konmuştur (80,81). Ankaferd klinikte ilk olarak, hemofili A tanısıyla takip edilen ve sünnet sonrası sızıntı tarzında kanaması olan 16 yaşındaki bir erkek hastada denenmiştir. Yüksek dozda faktör VIII tedavisine yanıt vermeyen, ilave olarak siklofosfamid ile prednizolon verilen ve bu önlemlere rağmen kanaması devam eden olguda, Ankaferd'in kanayan yere yüzeysel olarak sürülmesini takiben, birkaç dakika içinde kanamanın tamamen durduğu bildirilmiştir (82).

Ülkemizde dental uygulamalarda Sağlık Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmakla birlikte, üst gastrointestinal sistem kanamalarında endoskopik olarak biyopsi alınan bir olguda, biyopsi bölgesine topikal Ankaferd uygulamasıyla da ani kanama kontrolü sağlandığı bildirilmiştir (70).

Ankaferd'in, aralarında insan patojeni ve gıda bozulma etkeni bakterilerin de bulunduğu, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı yüksek inhibitör aktivite gösterdiği, antifungal etkinliğinin olduğu, antimikrobiyal aktivitesinden, enfeksiyon hastalıkları ile hastane enfeksiyonlarının tedavisinde ve gıdaların korunmasında faydalanılabileceği bildirilmiştir (83-86).

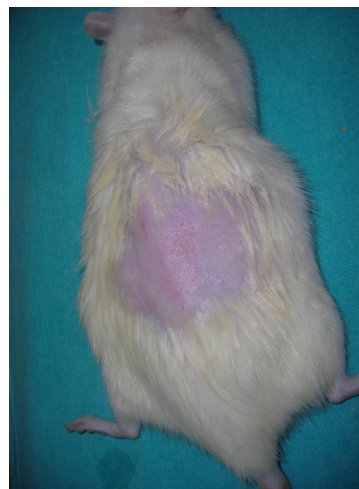
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları ve deney planı

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı tarafından planlandı. Çalışma öncesi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 12.10.2009 tarih ve 2009/26 sayılı karar ile onay alındı. Deney hayvanı olarak; 36 adet Wistar türü, 32-36 haftalık, 200-250 gr ağırlığında dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar, tekli kafeslerde ve oda sıcaklığında tutuldu. Deney hayvanlarına, su ve uygun diyet verilerek, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusları altında yaşamaları sağlandı. İntraperitoneal olarak uygulanan 60 mg/kg ketamin anestezisini takiben, tüm hayvanların sırt bölgesi tıraşlanıp, 8 mm'lik punch biyopsi iğneleri yardımıyla, her hayvanın sırt orta kesiminde birer adet yara oluşturuldu (Resim 1-5)



Resim 1. Deney hayvanı



Resim 2. Deney hayvanının sırt derisi tıraşlanmış hali



Resim 3. Punch ile yara oluşturulması

Resim 4. Dokunun pensetle kaldırılması



Resim 5. Oluşturulan yara

Her grupta 9'ar adet denek kullanıldı ve gruplar;

Grup A: Ankaferd grubu (n=9)

Grup B: Gümüş sülfadiazin (Silverdin) grubu (n=9)

Grup C: Baz krem (Basis krem) grubu (n=9)

Grup D: Tedavisiz kontrol grubu (n=9) olarak randomize edildi.

Grup A'daki hayvanlara günde iki defa Ankaferd solüsyon;

Grup B'deki hayvanlara günde iki defa gümüş sülfadiazin krem,

Grup C'teki hayvanlara günde iki defa aktif madde içermeyen baz krem uygulandı.

Grup D'deki kontrol grubuna ise herhangi bir tedavi uygulanmadı, yaralar kendi halinde iyileşmeye bırakıldı.

Bu uygulamaya 15 gün boyunca devam edildi.

Biyokimya (hidroksiprolin), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) [(EGF, PDGF ve VEGF)] ve histopatolojik inceleme için 0., 3., 7. ve 15. günlerde, her bir inceleme için, her deney grubundan 3 hayvandan biyopsi alındı. Üçüncü ve sonraki günlerdeki biyopsiler, yaranın tamamını, bir miktar çevre dokuyu ve subkutan yağ tabakasını da içerecek şekilde, 8 mm'lik punchlar olarak alındı. Biyopsi alınan hayvanlar, işlemi takiben yüksek doz fenobarbital verilerek sakrifiye edildi.

Oluşturulan yaralar makroskopik olarak değerlendirilip, 0., 3., 7. ve 15. günlerde fotoğraflandı.

Alınan biyopsiler; hidroksiprolin düzeyi çalışılmak üzere biyokimya laboratuvarına, EGF, PDGF ve VEGF düzeyleri incelenmek üzere moleküler biyoloji laboratuvarına, yara iyileşmesinin histopatolojik belirteçleri yönünden incelenmek üzere ise, patoloji laboratuvarına gönderildi. Örnekler, biyopsiler tamamlanıp deneyler yapılanaya kadar, uygun ısı ve ortam şartlarında (biyokimyasal örnekler -70 °C'de, PZR örnekleri -70 °C'de ve özel koruma solüsyonları içerisinde, histopatolojik örnekler ise, oda ısısında ve %10'luk formaldehit içinde) saklandı.

3.2. Histopatolojik inceleme

%10'luk formaldehit içerisinde tespit edilmiş deri punch örnekleri, rutin doku takip işlemleri sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikrometre (µm) kalınlığında elde edilen kesitler, Hemotoksilen Eozin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Biyopsi örneklerinde epidermis ve dermisdeki histomorfolojik değişiklikler ve gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Histomorfolojik kriterler olarak; epidermal ülser ve reepitelizasyon ile dermal inflamasyon kullanıldı. Skorumla aşağıda gösterildiği şekilde yapıldı:

Ülser ve reepitelizasyon için: 0: Yok

1: Yara yerinin 1/3'ünde

2: Yara yerinin 2/3'ünde

3: Yara yerinin tamamında

İnflamasyon şiddeti için: 0: Yok
1: Hafif
2: Orta
3: Şiddetli

3.3. Biyokimyasal inceleme

3.3.1. Kullanılan aletler

NEL pH 890 marka pH-metre, Labinco BV L 46 marka vorteks (Hollanda), Kötterman Labortechnik marka Ben Mary (Almanya), Libror AEG-320 marka hassas terazi (Japonya), Rotina 46R marka soğutmalı maksimum 5000 rpm kapasiteli santrifüj (Almanya) ve LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 uv/visible marka Spektrofotometre (İngiltere) kullanıldı.

3.3.2. Hidroksiprolin (OH-P) düzeylerinin tesbiti

-70 °C’de dondurularak deney gününe kadar saklanan dokular, oda ısısında çözüldükten sonra, izotonik NaCl ile yıkandı. Kurutma kağıdına serilerek kendi halinde kurumaya bırakılan örnekler tartıldı. Ağzı açık cam tüplere konularak, 100 °C’ye ayarlanmış etüvde 72 saat kurutuldu. Bu şekilde kontamine olması engellenen dokular, küçük bir havan içinde toz haline getirildi. Toz haline gelmiş dokuların herbirinin ağırlıkları, hassas terazide ölçülerek kaydedildi. Toz halindeki dokular, 15 ml’lik vida kapaklı cam tüpler içerisine konularak, üzerine 2 ml 12 N HCl ilave edildi. Daha sonra, etüvde 130 °C’de 3 saat kaynatılarak hidrolize edildi. Buharlaştırma nedeniyle miktarı 1 ml’nin altına düşenler ölçülerek, 12 N HCl ile tekrar 1 ml’ye tamamlandıktan sonra, 3000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısmından 0.5 ml alınıp, üzerine 0.5 ml isoproterenol eklenerek, 2500 devirde 10 dakika daha santrifüj edildi. Sonra, üst fazdan 0.3 ml alınarak çalışıldı. Hidroksiprolin tesbiti, Woessner’in tarif ettiği yöntemle ve kısmen modifiye edilerek yapıldı.

Deney işlemleri esnasında; OH-P standardı, koramin T, p-dimetil amino benzaldehit, perklorik asit, isopropanol, Na-asetat.3 H₂O, Na-sitrat.5.5 H₂O, 12 N HCl ve 1 mM HCl kimyasalları kullanıldı (Merck&Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA).

Hidroksiprolin standardı; 1.231 mg OH-P, 5 ml =.001 M HCl'de çözülerek günlük stok standart çözelti olarak hazırlandı. Daha sonra bu stok standart çözeltisi, 1/2, 1/4, 1/6 ve 1/8 oranlarında dilüe edilerek daha düşük konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Sonra, OH-P deney işlemleri eldeki örneklere uygulanarak 558 nm'de standart körüne karşı okundu. Çıkan absorbans değerleri ile standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten eğim bulunarak hesap işlemlerinde kullanıldı.

Kloramin T çözeltisi; 70 mg kloramin T, 1 ml bidistile suda çözülüp, üzerine 4 ml asetat/sitrat tamponu ilave edilerek günlük hazırlandı.

Erlich reaktifi; 4 gr p-dimetil amino benzaldehit, 6 ml (% 60'lık) perklorik asitte çözülüp, üzerine 26 ml isopropanol ilave edilerek günlük hazırlandı.

Asetat/sitrat tamponu; 57 gr Na-asetat.3 H₂O ve 44.47 gr Na-sitrat.5.5 H₂O, 400 ml bidistile suda çözüldü. Üzerine 385 ml isopropanol ilave edilerek HCl ile pH 6'ya ayarlandıktan sonra, hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra deney işlemleri Tablo 4' e göre yapıldı.

Tablo 4. Hidroksiprolin ölçümü deney işlemleri.

	Kör	Numune
Bidistile su	0.3 ml	-
Numune	-	0.3 ml
İsopropanol	0.2 ml	0.2 ml
Kloramin-T	0.1 ml	0.1 ml
Erlich reaktifi	2.6 ml	2.6 ml

Numune ve kör tüpleri üzerine reaktifler yukarıdaki sıraya göre eklendikten sonra vorteksle karıştırıldı ve 60 °C'lık su banyosunda 25 dakika inkübe edildikten sonra, 558 nm'de köre karşı okundu. Sonuçlar mg/g kuru doku olarak verildi. Her örnek için deney 3 defa tekrarlandı.

3.4. Moleküler genetik analizler

3.4.1. Dokuların hazırlanması

Enzimlerin mRNA seviyelerinin tespiti için, gruplardan alınan deri parçaları, steril şartlarda ve buz üzerinde küçük parçalar halinde kesildi ve RNA saklama çözeltisi içinde -35 °C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Bu dokulardan Qiagen firmasının ürettiği RNeasy mini kit kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı.

3.4.2. Kullanılan araç ve gereçler

Roche marka, LC480 modeli gerçek zamanlı PZR makinası

Biorad-MyCycler marka PZR cihazı

Denver Instrument marka terazi

Biorad marka elektroforez güç kaynağı

Jenco marka, 6173 model pH-metre

Hettich-zentrifugen marka, micro 200 model, masaüstü santrifüj cihazı (14000 rpm)

Ultra turrax, T 25 model homojenizasyon cihazı.

Biohit marka hassas otomatik pipetler ve uçları

Labart marka vorteks

Yellow line marka manyetik karıştırıcı

3.4.3. Kullanılan kimyasal maddeler

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$; FW: 372.24; Sigma no: E5134)

Tris baz ($C_4H_{11}NO_3$; FW: 121.14 ; Sigma no: T6066-)

Borik asit (H_3BO_3 ; FW:61.83 ; Sigma no: B6768)

EtBr ($C_{21}H_{20}N_3.Br$; FW: 394.32; Sigma no: E8751)

Gliserol ($C_3H_8O_3$; FW: 92.09; Sigma no: G5516)

Bromofenol blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$; FW: 669.96 Sigma no: B0126)

Agaroz (Sigma No: 5093)

Sodyum sitrate tribazik dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$; FW:294.1; Sigma no: C8532)

Sodyum asetat (CH_3COONa ; FW: 82.03; Sigma no: S3272)

Guanidin tiyosiyanat ($CH_5N_3.CHNS$; FW:118.16; Sigma no: G9277)

Sodyum hidroksit (NaOH; FW:40.00; Sigma no: S8045)
Hidroklorik asit (HCl; FW:36.46; Sigma no: H1758-1 l)
Konsantre asetik asit (CH₃CO₂H; FW:60.05; Sigma no:A9967)
DEPC (COOC₂H₅)₂; FW: 162.14; Sigma no:D5758)
Beta-merkaptotanol (C₂H₆OS; FW: 78.13; Sigma no: M3148)
Sodyum klorit (NaCl; FW: 58.44; Sigma no: S3014)
Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄; FW132.14; Sigma no: A4915)
dNTP (Invitrogen)
Superscript (Invitrogen)
Primer (Operon veya Midland, Teksas, USA)
Taq polimeraz (Sigma)

3.4.5. Kullanılan çözelti ve tamponlar

RNA later saklama solüsyonu:

70 gr Amonyum sülfat, 10 mM EDTA ve 25 mM Sodyum Sitrat (pH=5,2), 100 ml DEPC ile işlenmiş ddsu içerisinde karıştırılarak hazırlandı ve son pH 5.2'ye ayarlandı.

RNA denature solüsyonu (RLT çözeltisi):

4M guanidin tiyosiyanat, 25 mM sodyum sitrat (pH=7), %0,5 sarkosil içeren çözelti hazırlandı ve kullanımdan hemen önce son konsantrasyon %1 olacak şekilde beta-merkaptotanol eklendi.

5X TBE çözeltisi:

- 0.4 M Tris baz
- 0.4 M Borik asit
- 20 mM EDTA

1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için

- 54 gr Tris baz
- 27,5 gr Borik asit
- 20 ml 0.5 M EDTA çözeltisi

900 mL ddsu (distile su) içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 8.0 oluncaya kadar HCl eklendi. Çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

3.4.6. Total RNA saflaştırması (Qiagen kit protokolü):

Bu işlem için Qiagen RNA mini saflaştırma kiti, aşağıda verilen şekliyle kullanıldı.

-Yaklaşık 100 mg doku parçası alındı ve %5 (w/v) doku olacak şekilde kit içerisindeki RLT çözeltisi içine kondu.

-13.500 rpm hızda, 5 mm'lik homojenizatörün ucuyla buz üzerinde 3 dakika homojenize edildi

-Homojenattan 600 µl alındı (30 mg dokuya karşılık geliyor)

-10 dakika 18.000 rpm'de (4 °C) de santrifüj edildi.

-Süpernatant kısmı yeni Eppendorf tüpüne alındı ve üzerine aynı hacimde %70 etanol (DEPC ddsu ile hazırlandı) eklendi.

-Çözeltinin 600 µl'si filtreye kondu ve altındaki tüple beraber 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.

-Alt tüpteki sıvı atıldı ve tüp tekrar filtreye takılarak geriye kalan çözelti de filtreye eklendi ve yukarıdaki gibi santrifüj edildi.

-Alttaki tüpteki sıvı atıldı ve filtreye RWI solüsyonundan 700 µl eklendi ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.

-Alttaki tüp atıldı ve filtrenin altına yeni bir tüp takıldı (2 ml) ve filtreye 500 µl RPE solüsyonu ilave edildi (kullanmadan önce RPE için 4 kat etanol eklendi) ve 15 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

-Alttaki sıvı atıldı ve filtreye 500 µl RPE eklendi ve 2 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

-Alttaki tüp atıldı ve filtre yeni bir Eppendorf içerisine takıldı ve filtreye 50 µl RNAaz içermeyen ddsu eklendi ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

-Filtreye tekrar 50 µl RNAaz içermeyen ddsu konularak tekrar 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi, alt tüpteki saf toplam RNA hemen -35 °C'de saklandı.

Araştırmada rat GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz), PDGF, VEGF ve EGF gen ifadelerinin analizi için Tablo 5'te listesi verilen primerler kullanıldı (86,87).

Tablo 5. Primer dizilimleri

Primer adı	Primer dizilimi	PZR ürünü büyüklüğü (baz sayısı)	Primerin alındığı kaynak
GAPDH-F GAPDH-R	CGTGGAGTCTACTGGCGTCT GGATGCAGGGATGATGTTCT	346	(86)
EGF-F EGF-R	ATGTCTGCCAATGCTCAGAAGG TAGGACCACAAACCAAGGTTGGG	617	(87)
VEGF-F VEGF-R	GCCCATGAAGTGGTGAAGTT TATGTGCTGGCTTTGGTGAG	243	(86)
PDGF-F PDGF-R	TCCCTCTACCCCAAGAACCT GATCTGGGTGCCATGAGAGT	215	(87)

3.4.7. cDNA sentez protokolü

cDNA sentezi için Invitrogen firmasının ürettiği Superscript III ters transkriptaz enzim kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır.

100 µl'lik PZR tüpüne 1,0 µg toplam RNA, 1 µl primer (4 pmol gen spesifik primer veya 100 pmol PoliT-18 primeri), 1 µl dNTP (10 mM) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde ddsu eklendi, karıştırıldı ve 65 °C'de 15 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışım üzerine 4 µl 5x First strand tamponu, 2 µl DTT, 1 µl ddsu, 1 µl Superscript II ters transkriptaz enzimi eklendi ve karıştırıldı ve PZR makinesinde 50 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 15 dakika ısıtıldı, daha sonra da -20 °C de analize kadar saklandı.

3.4.8. Gerçek zamanlı PZR protokolü

Gerçek zamanlı PZR makinası, Roche LC480 modeli olduğu için Roche gerçek zamanlı PZR kit karışımı kullanıldı. Reaksiyonlar 20 µl toplam hacimde yapıldı. Bunun için 10 µl kit karışımı (Enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 0.2 µl cDNA, 0.2 µl ileri ve geri primerler (10 pmol/µl) ve 9.4 µl ddsu olacak şekilde hazırlandı. 0.2 µl cDNA eklenmesinde, hatayı en aza indirmek için, 1 µl cDNA üzerine 24 µl ddsu eklendi, karıştırıldı ve bu karışımdan her bir PZR tüpüne 5 µl eklendi. Aynı örnek için GAPDH,

PDGF, VGEF ve EGF aynı zamanda aynı koşullarda yapıldı. 0.2 µl primer eklenmesinden gelecek hataları en aza indirebilmek için, kit karışımı, primerler ve suyun olduğu çoklu stoklar hazırlandı ve her bir örnek için 15 µl çekildi. İlk denaturasyon, 5 dakika 95 °C, ikinci denaturasyon 30 saniye 95 °C, bağlanma 60 °C 30 saniye ve polimerizasyon 72 °C, 40 saniye olarak ve döngü sayısı 60 olarak kullanıldı.

3.5. İstatistiksel analizler



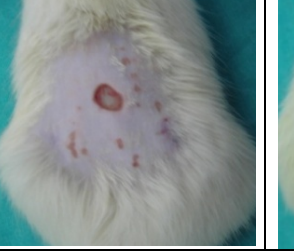






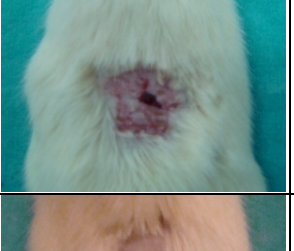
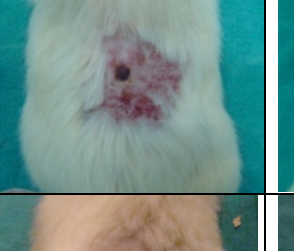
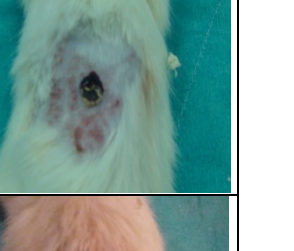

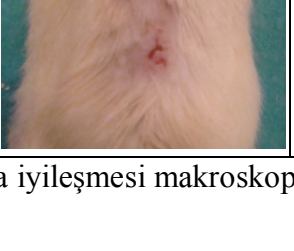
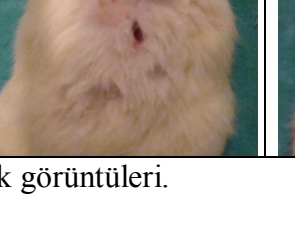

İstatistik incelemede, SPSS for Windows istatistik paket programının 15.0 versiyonu kullanıldı. Rakamsal değerler, ortalama (\bar{X}) ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İkili karşılaştırmalar, en küçük önemli fark (LSD) yöntemi ile incelendi.. $p < 0.05$ değerı istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik bulgular

Denekler her gün makroskopik incelemeye tabi tutuldu. 15 günlük dönem içerisinde herhangi bir grupta denek kaybı meydana gelmedi. A ve B gruplarındaki yaralar çok hızlı ve komplikasyonsuz iyileşme sergiledi. B grubundaki 1 deneğin biyopsi hattının dahi kaybolduğu fark edildi. Grup D, yara iyileşmesinin en kötü izlendiği grup oldu. Yara yüzeyinde yara kabuklarının kaldığı denekler görüldü.

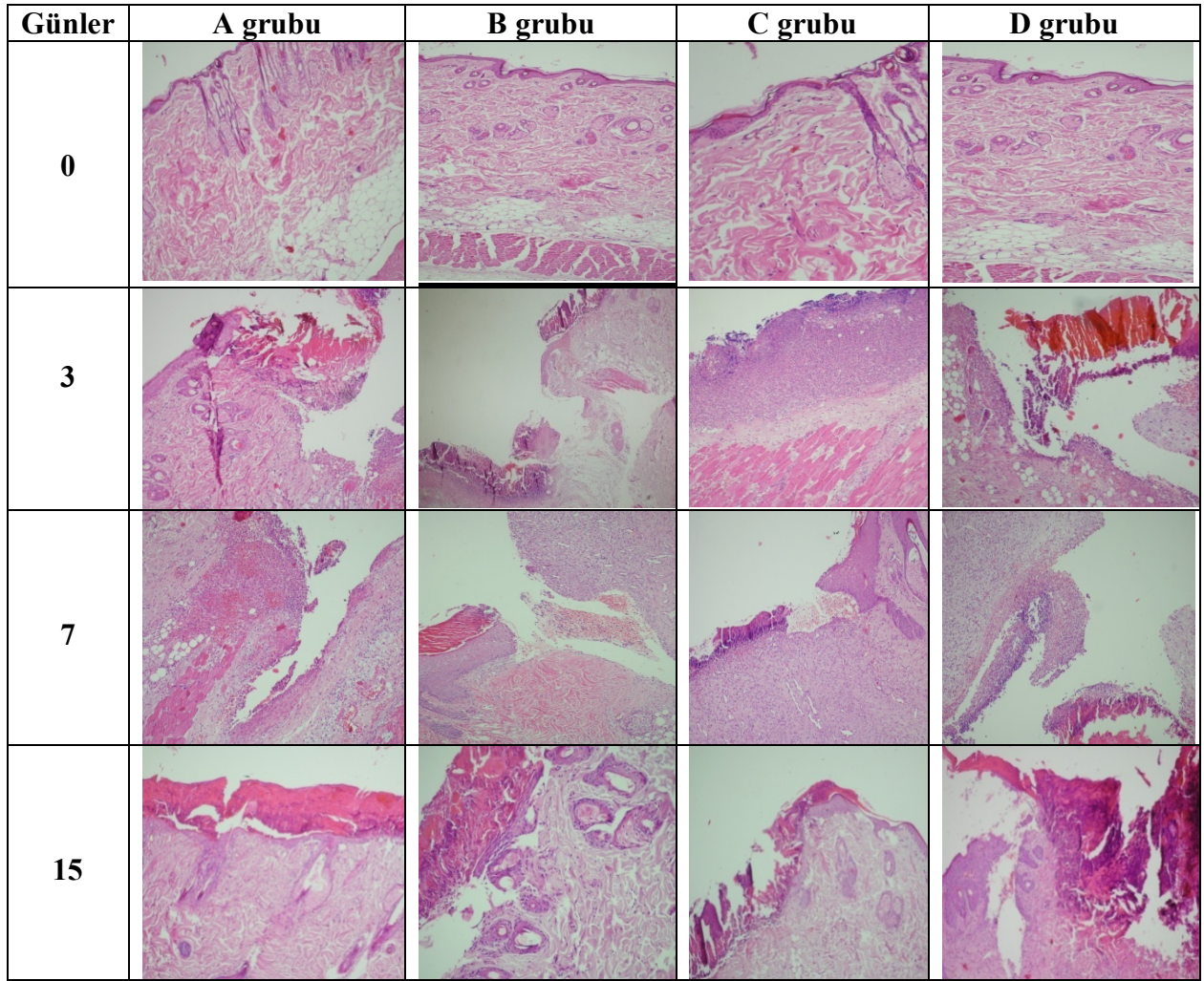
Grup C’de de komplikasyonsuz yara iyileşmeleri görüldü. Ancak iyileşmelerin grup A ve B kadar iyi olmadığı fark edildi. Biyopsi alınan bölgenin A ve B grubu kadar küçülmediği izlendi, fakat yaralar içerisinde enfeksiyon bulgularına rastlanmadı. Tüm gruplar içerisinde sıralama yapacak olursak, iyiden kötüye yara iyileşme kalitesi makroskopik olarak; ilk sırada grup B, ikinci sırada grup A, üçüncü sırada grup C ve son sırada grup D sıralanabilir. Resim 6’da, gruplara ait yara iyileşme görüntüleri yer almaktadır.

Günler	A grubu	B grubu	C grubu	D grubu
0				
3				
7				
15				

Resim 6. Gruplara ait yara iyileşmesi makroskopik görüntüleri.

4.2. Histopatolojik bulgular

Histolojik inceleme, daha önce bahsettiğimiz skorlama esasları içerisinde 0. gün, 3. gün, 7. gün ve 15. günlerdeki bulgular değerlendirilerek yapıldı. Belirtilen günlere ait histopatolojik fotoğraflar Resim 7’de gösterilmiştir.

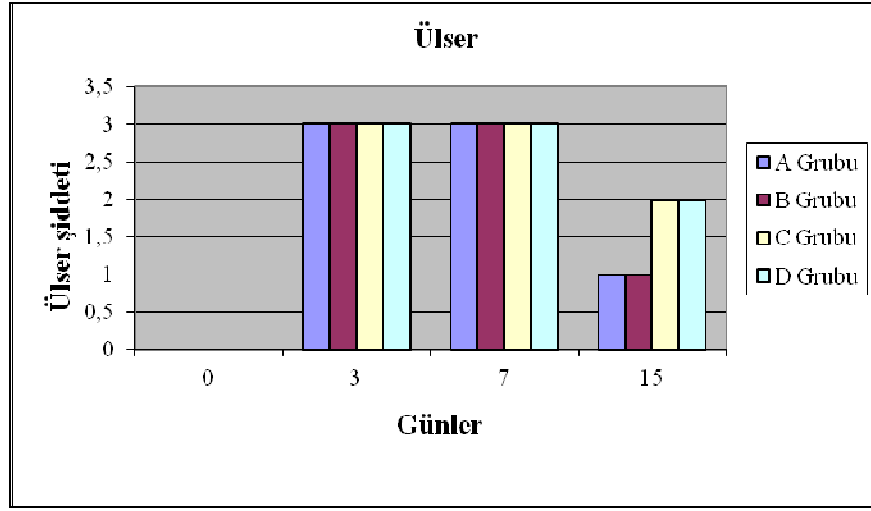


Resim 7. İyileşme aşamalarında, gruplara ait histopatolojik görüntüler.

Daha önce bahsedildiği şekilde, epidermiste ülser ve reepitelizasyon ile dermal inflamasyonun histomorfolojik özelliklerine göre skorlama yapıldı. Tespit edilen histopatolojik skorlar Tablo 6, 7 ve 8 ile ve Grafik 1, 2 ve 3’te görülmektedir.

Tablo 6. Ülser açısından gruplara ait skorlar.

Günler	A grubu	B grubu	C grubu	D grubu
0	0	0	0	0
3	3	3	3	3
7	3	3	3	3
15	1	1	2	2

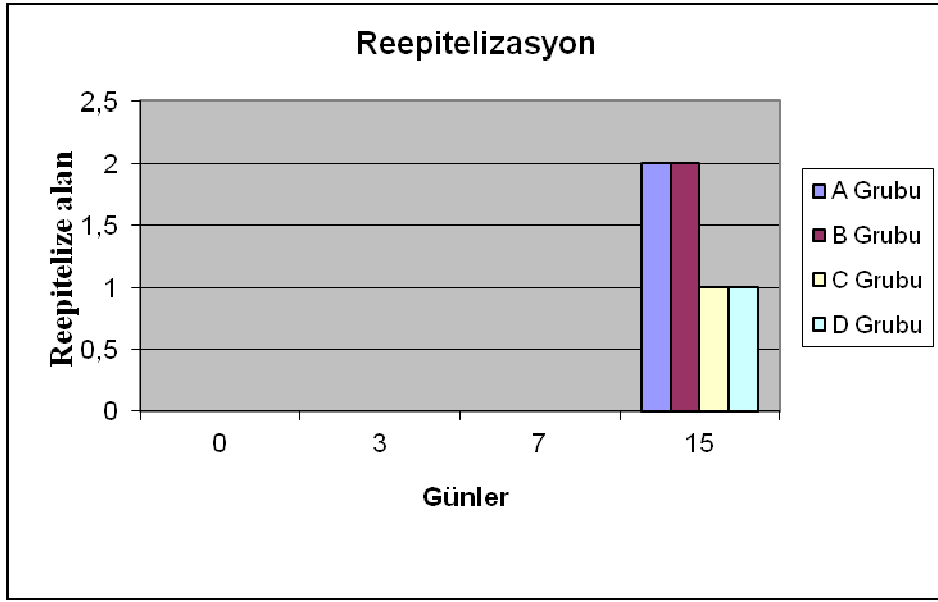


Grafik 1. Ülser açısından gruplar arasındaki farklar.

Grafikte de görüldüğü gibi 3. ve 7. günlerde ülser alan ve şiddeti, tüm gruplarda eşitti ve ülser alanında daralma görülmedi. Onbeşinci günde ise, tüm gruplarda ülser alanı daralmıştı. Ancak A ve B gruplarında, C ve D gruplarına oranla ülser alanında daha fazla küçülme olduğu görüldü. Onbeşinci gün sonunda, A ile B ve C ile D grupları arasında, ülser alanındaki küçülmeler eşit oranlardaydı.

Tablo 7. Reepitelizasyon açısından gruplara ait skorlar.

Günler	A grubu	B grubu	C grubu	D grubu
0	0	0	0	0
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0
15	2	2	1	1

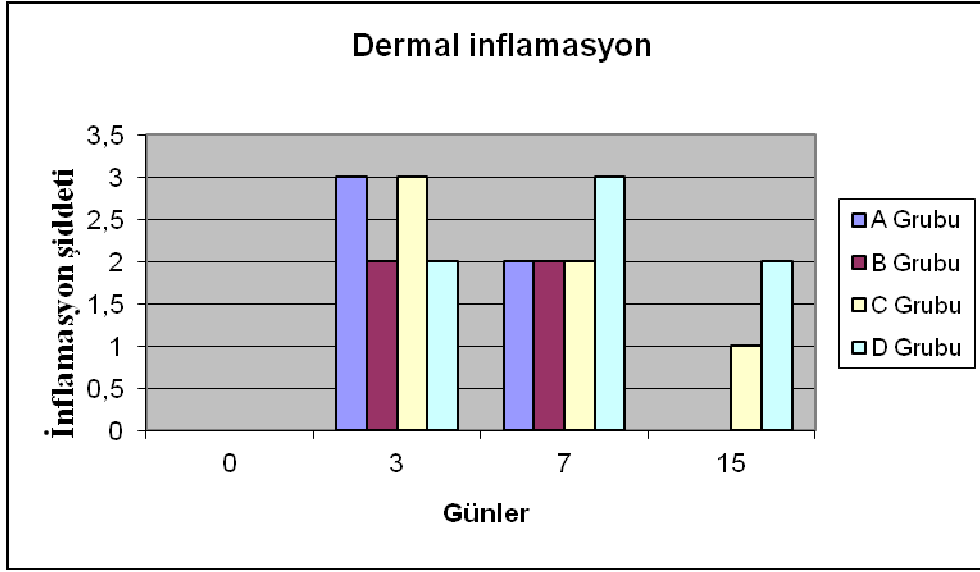


Grafik 2. Gruplar arasındaki reepitelizasyon farkları.

3. ve 7. gün alınan biyopsilerde, hiçbir grupta reepitelizasyon görülmedi. Onbeşinci gün sonunda, A ile B ve C ile D gruplarında eşit oranlarda reepitelizasyon izlendi. Fakat A ve B gruplarındaki reepitelizasyon, C ve D gruplarına oranla daha fazlaydı.

Tablo 8. Dermal inflamasyon açısından gruplara ait skorlar.

Günler	A grubu	B grubu	C grubu	D grubu
0	0	0	0	0
3	3	2	3	2
7	2	2	2	3
15	0	0	1	2



Grafik 3. Gruplar arasındaki dermal inflamasyon farkları.

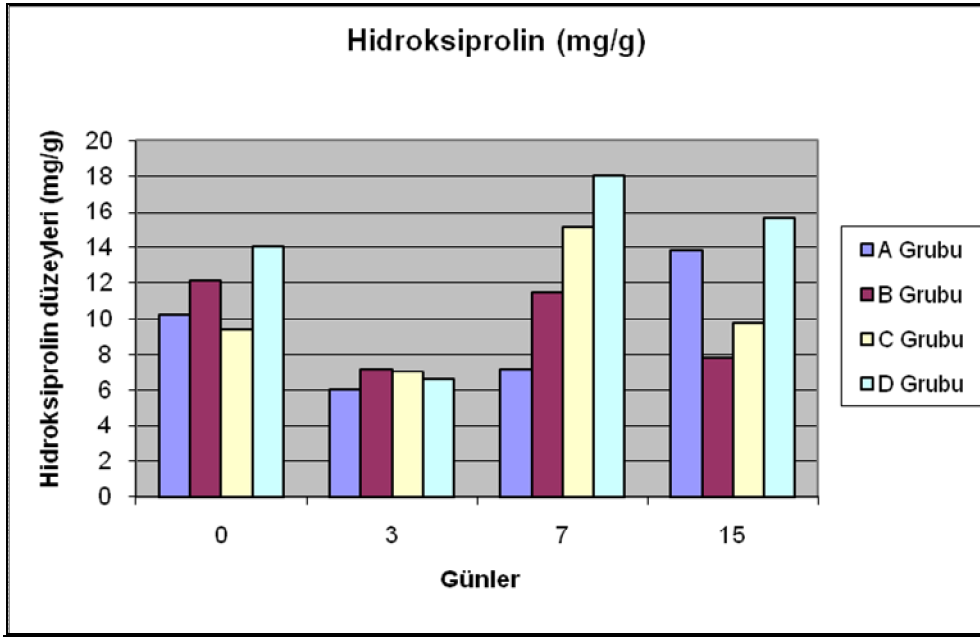
Dermal inflamasyon, 3. günde A ve C gruplarında birbirine eşit ve diğer gruplara oranla yüksekti. Yedinci günde, A ve C gruplarındaki inflamasyon azaldı, B grubunda değişmedi, D grubunda ise arttı. Diğer bir deyişle, A, B ve C gruplarındaki inflamasyon eşitti ve D grubuna oranla azdı. Onbeşinci günde ise, A ve B gruplarındaki inflamasyon tamamen kaybolmuştu, D grubunda daha şiddetli olmakla beraber C ve D gruplarındaki inflamasyon devam etmekteydi.

4.3. Biyokimyasal bulgular

Biyokimyasal inceleme sonucunda tespit edilen, 0., 3., 7. ve 15. günlerdeki hidrokspirolin düzeyleri Tablo 9 ve Grafik 4’de verilmiştir.

Tablo 9. Hidrokspirolin düzeyleri (mg/g kuru ağırlık).

Günler	A grubu (X±SD)	B grubu (X±SD)	C grubu (X±SD)	D grubu (X±SD)
0	10,256±1,506	12,140±0,814	9,370±1,120	14,103±1,249
3	5,996±0,595	7,156±0,750	7,050±0,926	6,630±0,860
7	7,150±0,637	11,490±1,260	15,153±1,405	18,023±1,397
15	13,846±0,901	7,830±0,856	9,763±1,166	15,650±1,273

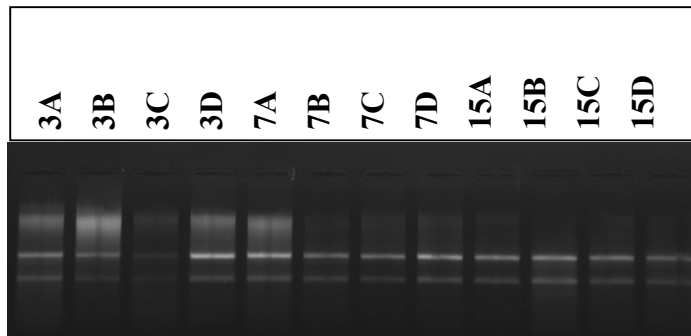


Grafik 4. Gruplardan elde edilen hidroksiprolin sonuçları.

Grafikte görüldüğü gibi, hidroksiprolin düzeyleri ile günler arasında orantılı bir değişim görülmemiştir. Makroskopik ve mikroskopik açıdan, yara iyileşme sürecinin hızlı olduğu A ve B gruplarında, hidroksiprolin düzeyleri, bu iyileşme oranları ile bir paralellik göstermiyordu.

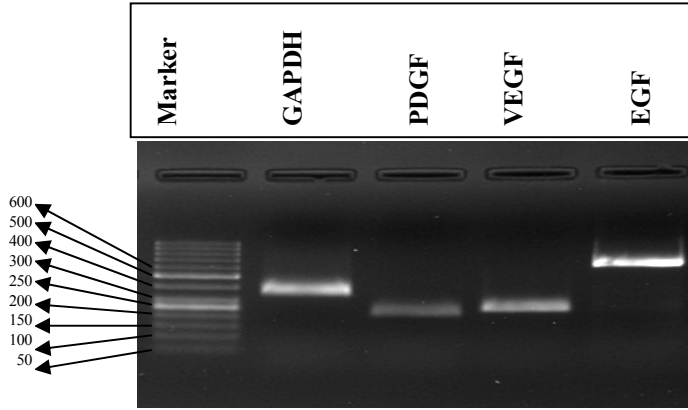
4.4. PZR sonuçları

RNA'lar saflaştırıldıktan sonra %1 lik agaroz jeline yüklenerek incelendiler. Şekil 7'deki gibi RNA degradasyonunun olmadığını gösteren iki ribozomal bant büyük saflıkta elde edildi.



Şekil 7. Qiagen RNAeasy saflaştırma kiti ile deri örneklerinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri (%1 agaroz jel)

Gerçek zamanlı PZR'da çoğaltılan DNA'ların %2 agaroz jeline yüklenmesiyle elde edilen GAPDH, PDGF, VEGF ve EGF cDNA'larına ait elektroforez sonuçları Şekil 8'de görülmektedir.

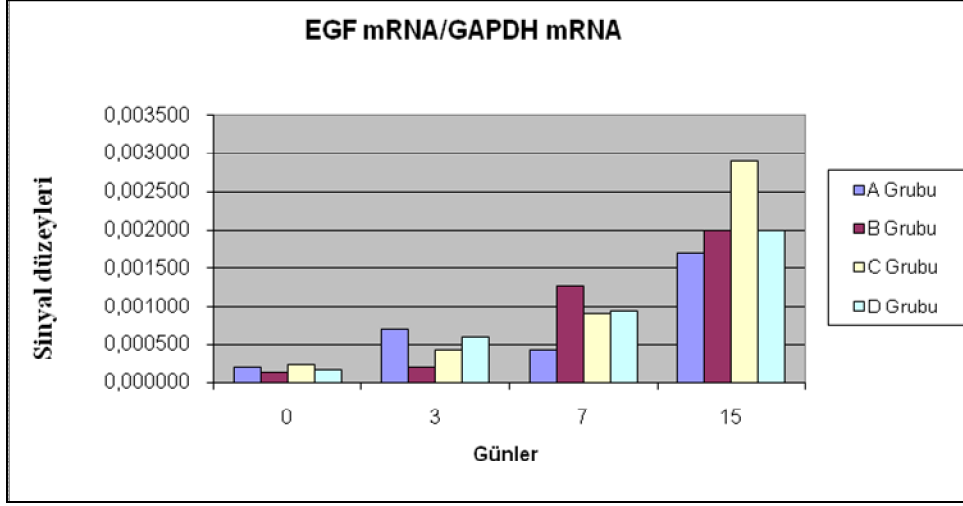


Şekil 8. GAPDH, PDGF, VEGF ve EGF'lerin cDNA'larının gerçek zamanlı PZR'da çoğaltımının agaroz jel elektroforezi.

PZR incelemede, 0., 3., 7. ve 15. günlerde alınan biyopsi örneklerindeki EGF, VEGF ve PDGF düzeyleri, Tablo 10, 11 ve 12 ile Grafik 5, 6 ve 7'de gösterilmiştir.

Tablo 10. Gruplara ait EGF mRNA/GAPDH mRNA düzeyleri.

Günler	A grubu X±SD	B grubu X±SD	C grubu X±SD	D grubu X±SD
0	0,000200±0,000100	0,000133±0,000058	0,000233±0,000058	0,000167±0,000058
3	0,000700±0,000100	0,000200±0,000100	0,000433±0,000058	0,000600±0,000100
7	0,000433±0,000058	0,001267±0,000153	0,000900±0,000100	0,000933±0,000158
15	0,001700±0,000200	0,002000±0,000200	0,002900±0,000400	0,002000±0,000300

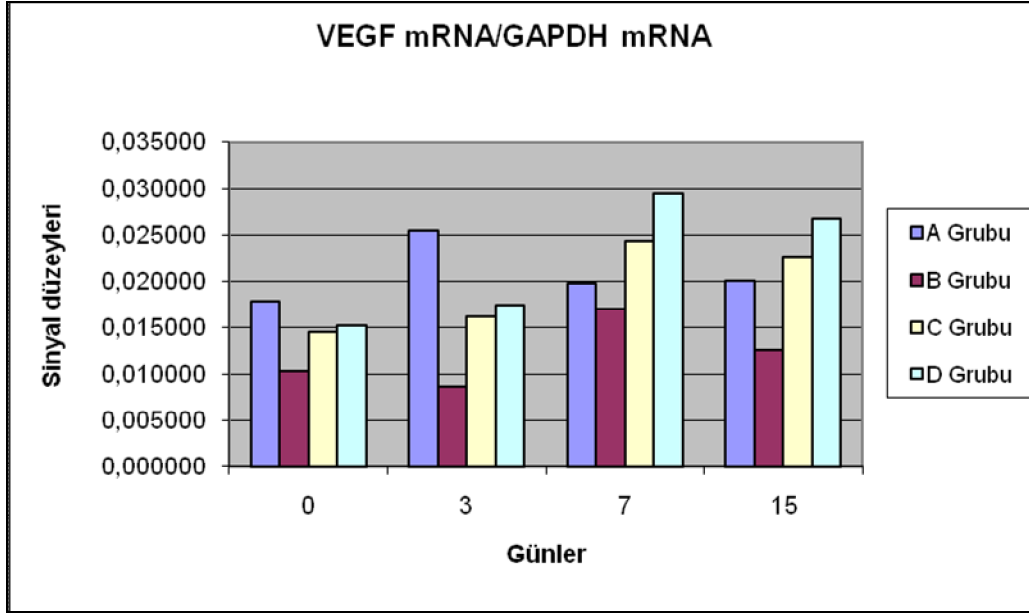


Grafik 5. Gruplardan elde edilen EGF sonuçları

Grafikte de görüldüğü gibi, tüm gruplara ait EGF düzeylerinde bir artış izlenmiştir. Ancak bu artış oranı, yara iyileşme sürecinin makroskopik ve histolojik olarak nispeten hızlı seyrettiği A ve B gruplarında daha düşüktür. Buna dayanarak, A ve B gruplarındaki yara iyileşme hızı ile EGF düzeyleri arasında bir paralellik olmadığı söylenebilir.

Tablo 11. Gruplara ait VEGF mRNA/GAPDH mRNA düzeyleri

Günler	A grubu X±SD	B grubu X±SD	C grubu X±SD	D grubu X±SD
0	0,017833±0,001150	0,010333±0,000751	0,014633±0,001102	0,015267±0,001150
3	0,025500±0,001000	0,008600±0,000400	0,016300±0,000500	0,017467±0,000808
7	0,019800±0,000700	0,017133±0,000451	0,024300±0,000500	0,029467±0,001002
15	0,020133±0,000850	0,012633±0,000321	0,022733±0,001041	0,026700±0,001200

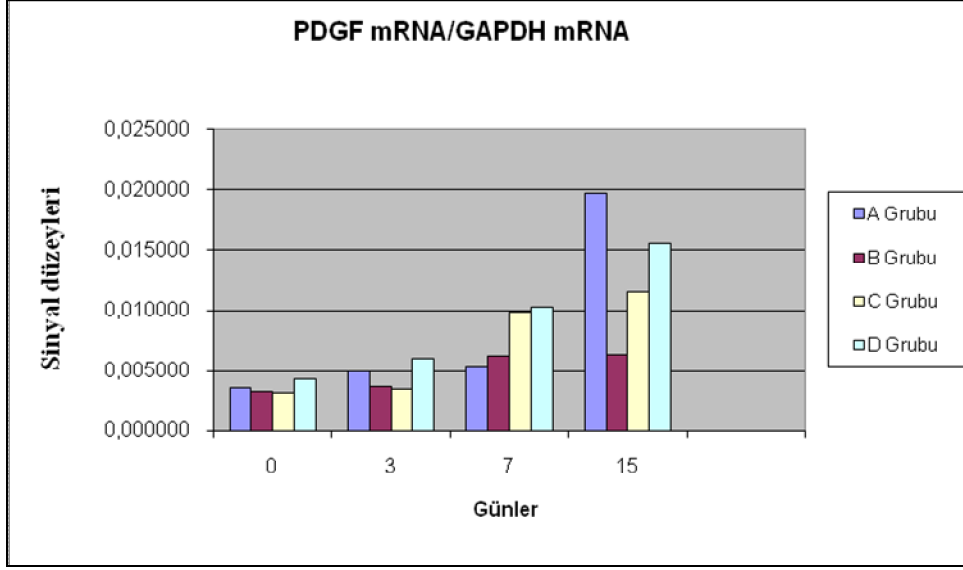


Grafik 6. Gruplardan elde edilen VEGF sonuçları.

Grafikte, Ankaferd uygulanan grupta, VEGF düzeyinin 3. gün pik yaptığı, 7. günde düzeyin düştüğü ve 15. günde çok hafif yükseldiği görülmektedir. Gümüş sülfadiazin uygulanan B grubunda, 3. gün VEGF düzeyinde düşüş, 7. gün yükseliş ve 15. gün tekrar düşüş, C ve D gruplarında ise VEGF düzeylerinin düzenli olarak yükseldiği izlenmektedir.

Tablo 12. Gruplara ait PDGF mRNA/GAPDH mRNA düzeyleri

Günler	A grubu X±SD	B grubu X±SD	C grubu X±SD	D grubu X±SD
0	0,003633±0,000751	0,003300±0,000500	0,003200±0,000656	0,004333±0,000971
3	0,005000±0,000500	0,003700±0,000300	0,003500±0,000500	0,006000±0,000400
7	0,005400±0,000400	0,006300±0,000500	0,009800±0,000700	0,010267±0,000702
15	0,019733±0,000751	0,006400±0,000500	0,011500±0,000600	0,015533±0,000451



Grafik 7. Gruplardan elde edilen PDGF sonuçları

Grafikte görüldüğü gibi, yara iyileşme süreci boyunca tüm gruplarda PDGF düzeyinde bir artış gözlenmektedir. İyileşme sürecinin 15. gününde, A grubunda yaklaşık 5 kat artış olduğu gözlenmektedir. Kontrol grubu olarak kullandığımız ve yara iyileşme sürecinin diğer gruplara oranla daha yavaş seyrettiği D grubunda ise, yaklaşık 4 kat bir artış izlendiği görülmektedir.

4.5. İstatistiksel analiz

Deney gruplarına ait, hidrokspirolin, EGF, VEGF ve PDGF düzeyleri, total olarak istatistiksel açıdan analize alınmış ve çıkan sonuçlar Tablo 13, 14, 15 ve 16'da gösterilmiştir.

Tablo 13. Gruplar arasındaki hidrokspirolin düzeylerinin karşılaştırılması.

Grup	n	X±SD	p
A	12	9,3125±3,28982	0.01
B	12	9,6542±2,42032	
C	12	10,3342±3,25702	
D	12	13,6017±4,56824	

Hidrokspirolin sonuçları, D grubunda, diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır (p:0.01)

Tablo 14. Gruplar arasındaki EGF düzeylerinin karşılaştırılması.

Grup	N	X±SD	p
A	12	0,000758±0,0006067	0.75
B	12	0,000900±0,0008213	
C	12	0,001117±0,0011191	
D	12	0,000925±0,0007238	

EGF sonuçları açısından, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir ($p>0.05$).

Tablo 15. Gruplar arasındaki VEGF düzeylerinin karşılaştırılması.

Grup	N	X±SD	p
A	12	0,020817±0,0030760	<0.0001
B	12	0,012175±0,0033705	
C	12	0,019492±0,0043469	
D	12	0,022225±0,0063204	

VEGF düzeylerinin, B grubunda anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0.0001$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir.

Tablo 16. Gruplar arasındaki PDGF düzeylerinin karşılaştırılması.

Grup	n	X±SD	p
A	12	0,008442±0,0068638	0.15
B	12	0,004925±0,0015463	
C	12	0,007000±0,0039010	
D	12	0,009033±0,0045606	

PDGF sonuçları, gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı çıkmamıştır ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Deri, vücudun immünolojik açıdan aktif olan en geniş organıdır. Koruyucu bir bariyerdir, mikroorganizmaların, kimyasal maddelerin penetrasyonunu engeller, ultraviyole radyasyonu absorbe ve bloke eder. Vücut ısı-sıvı dengesinin sağlanmasına yardımcı olur (6). Derinin görevlerini yerini getirebilmesi için, bütünlüğünün korunması gerekir. Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda; keratinosit, fibroblast, endotel hücreleri, makrofaj ve trombositleri içeren birçok hücrenin rol aldığı, kompleks bir iyileşme süreci başlar. Bu hücrelerin migrasyon, infiltrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyonu ile, yeni doku formasyonu başlar ve sonuçta yara kapanır. Bu süreçte birçok büyüme hormonları, sitokinler ve kemokinler rol alır. Bunlardan en önemlileri; EGF, TGF- β , FGF, VEGF, GM-CSF, PDGF, CTGF, KGF, IGF, IL'ler ve TNF- α 'dır (2-3,20,29).

Yaralanma, bir travma sonucu meydana gelebileceği gibi, tedavi amacıyla yapılan cerrahi bir işlem sonrasında da gerçekleşebilir. Herhangi bir cerrahi işlemin başarısı, oluşturduğu yaranın iyileşme durumuna bağlıdır. Ne kadar hızlı ve kaliteli bir yara iyileşmesi gerçekleşecek olursa, o denli başarılı bir tedavi sağlanmış demektir.

Yara iyileşmesini iyi yönde hızlandırmak amacıyla kullanılan tedavi yöntemlerindeki ana hedef; yara iyileşmesinde rol alan faktörleri (inflamatuvar hücreler, trombositler, mediyatörler, hücre dışı matriks v.b.) etkileyerek, bu faktörlere ait süreleri kısaltmak ve ideal bir skar oluşumunu sağlamaktır. Bunun için, pek çok topikal ve

sistemik ajan kullanılmış ve yara iyileşmesindeki gecikme ve düzensizliklerin önüne geçilmeye çalışılmıştır (88).

Ankaferd, folklorik olarak Türk hekimlik geleneğinde hemostatik ajan olarak kullanılan 5 bitkinin, kurutulmuş kök ve yapraklarından elde edilmiş bir ekstraktır. Bu karışım; diş operasyonları, değişik sebeplerle oluşan yaralanmalar, travmatik kesikler ve spontan ya da cerrahi girişimler sonrası oluşan minör ve major kanamaların kontrolünde kullanılmaktadır (80,88).

Kanama kontrolündeki etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmış olan Ankaferd'in, az sayıda hayvan çalışması ve olgu sunumları ile, antimikrobiyal, antifungal (82-85), yara iyileşmesini hızlandırıcı etki ve antiseptik özelliklerinin olduğu da bildirilmiştir (88).

Akkoç ve ark., Ankaferd'in in vitro antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları bir çalışmada; karışımın, test edilen tüm bakterilere karşı (26 indikatör şuş) etkinlik gösterdiğini tespit etmişler ve yara iyileşmesinde, hemostatik etkisine ek olarak anti-mikrobiyal özelliğinin de yararlı olabileceğine dikkat çekmişlerdir (83).

Yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda deney hayvanı olarak çoğunlukla rat ve tavşanlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, deney hayvanı olarak ratları kullandık. Ratları seçmemizin sebebi; bu tür deneylerde sık kullanılmaları, karşılaştırma imkanı sağlamaları, temin edilme ve çalışma kolaylığı yanında, maliyetlerinin de az olmasıdır.

Deney gruplarımızın ilki olan A grubunu oluşturmaktaki amaç; Ankaferd'in yara iyileşmesine olan etkisini tespit etmek ve diğer gruplarla karşılaştırmaktır. B grubunda, yara iyileşmesinde antibakteriyel ve epitelizan etkileri iyi bilinen gümüş sülfadiazin, C grubunda aktif madde içermeyen baz krem kullanıldı. D grubu olarak adlandırdığımız kontrol grubuna ise, hiçbir ajan uygulanmayıp, sekonder iyileşmeye bırakıldı. Böylelikle, bu 4 grubun, birbirleriyle etkinlik açısından karşılaştırılmaları ve aralarındaki farkların irdelenmesi amaçlanmıştır.

Makroskobik incelemede; yara çapındaki küçülme, kabukların durumu ve enfeksiyon gelişip gelişmediği göz önünde bulundurulmuştur. Gros değerlendirmede, A ve B gruplarında, diğer gruplara oranla, daha hızlı ve düzgün bir iyileşme oluştuğu dikkati çekmektedir. Bu iki grupta enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı ve yaralar kabuklanmadan iyileşti. İki grubun karşılaştırılmasında, B grubundaki iyileşmenin A grubuna göre daha iyi olduğu söylenebilir. D grubunda kabuk oluşumu izlendi ve yara iyileşmesi en kötüydü. Yara iyileşmesi, makroskopik olarak en iyiden kötüye doğru; B, A, C, D şeklinde sıralanabilir.

Rivanol, gümüş sülfadiazin ve çinko oksit kullanılarak yapılan bir çalışmada; en hızlı ve düzgün yara iyileşmesinin gümüş slfadiazinle sağlandığı bildirilmiştir (89).

Erçetin ve ark., diş tedavisi sırasında kanama kontrolü sağlamak amacıyla uygulanan ABS'in, bu etkisi yanında, enfeksiyonu engellediğini ve yara iyileşmesini de olumlu yönde etkilediğini rapor etmişlerdir (90).

Arslan ve ark., yaşlı bir hastada, travma sonrası oluşmuş yarada, Ankaferd uygulanması ile hızlı bir iyileşme süreci rapor etmişlerdir. Ekstrenin uygulanmasından 24 saat sonra yara ağzının kapanmaya başladığı bu olgu ile, Ankaferd'in yaşlılarda yara iyileşmesinde yardımcı bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği ileri srlmştir (88).

Yeşilada ve ark.'ları, henüz yayınlanmamış deneysel bir sıçan çalışmasında, Ankaferd'in McFarlane flebi oluşturulan 32 sıçanda nekroz oranını azalttığını ve flep sağkalımını artırdığını gözlemlemişlerdir (91). Diğer bir çalışmalarında ise, sırt ciltlerinde yara oluşturulan 20 sıçanda, Ankaferd'in sekonder yara iyileşme süresini kısalttığını tespit etmişlerdir (92).

Akgl ve ark., Ankaferd'in, penil kavernozaal cerrahilerde kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada; tam iyileşme açısından, Ankaferd uygulanan grubun kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu ve kavernozaal cerrahilerde hemostatik ve antiinflamatuvar olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (93).

Çalışmamızda; Ankaferd uygulanan grupta, bu çalışmalara benzer şekilde, enfeksiyon bulgusu görülmedi ve kontrol grubuna göre yara iyileşmesi daha iyiydi. Fakat aynı sonuçları gümüş sülfadiazin uygulanan grupta da görüldü. Gros değerlendirme açısından, Ankaferd'in sekonder yara iyileşmesini hızlandırdığını, fakat bu etkisinin, gümüş sülfadiazinden daha üstün olmadığını söyleyebilir.

Histopatolojik incelemede, makroskopik incelemeye paralel sonuçlar elde edildi. Çalışmamızda Ankaferd ve gümüş sülfadiazin uygulanan gruplarda, histopatolojik iyileşme, kontrol grubuna göre daha iyiydi. Histopatolojik kriter olarak; ülser şiddeti, reepitelizasyon ve dermal inflamasyon değerlendirildi. Yara iyileşmesi açısından, A ve B grupları ile diğer iki grup arasında belirgin farklar izlendi. Dermal inflamasyon 3. günde, A ve C gruplarında birbirine eşit ve diğer gruplara oranla daha fazlaydı. Yedinci günde, A ve C gruplarındaki inflamasyon azaldı, B grubundaki değişmedi, D grubundaki ise arttı. Özetle, takip ettiğimiz iyileşme süresinin ortasında, A, B ve C gruplarındaki inflamasyon eşit ve D grubuna oranla daha azdı. Onbeşinci günde ise; A ve B gruplarındaki inflamasyon tamamen kaybolmuştu, D grubunda daha şiddetli olmakla beraber C ve D gruplarındaki inflamasyon devam etmekteydi. Onbeşinci günde, A ve B gruplarında ülser alanının küçüldüğü ve reepitelizasyonun olduğu tespit edildi. C ve D gruplarında ise, ülser alanı daha geniş ve reepitelizasyon daha azdı.

Akgül ve ark., yukarıda bahsedilen çalışmalarında; Ankaferd'in histopatolojik olarak, kaverno dokuda eritrosit agregasyonu oluşturduğunu, hemostatik ve antienflamatuar etki gösterdiğini, fakat inflamasyonu etkilemediğini ve fibrozisi artırmadığını gözlemlemişlerdir (93). Çalışmamızda farklı olarak, Ankaferd uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla inflamasyonun 3. günde arttığı 15. günde ise, tamamen kaybolduğu görüldü.

Kalaycı ve ark., deneysel olarak oluşturdukları karaciğer yaralanmasında, Ankaferd'in; hemoraji, nekroz, fibrovasküler yapı, inflamatuvar eksuda ve rejenerasyon gibi histopatolojik olaylar üzerine etkilerini incelemişler ve bu olayları değerlendiren histopatolojik skorların, Ankaferd grubunda daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (94).

Huri ve ark., sıçanlarda yaptıkları parsiyel nefrektomilerde, Ankaferd'in etkisini, histopatolojik olarak; glomerüler nekroz, akut inflamasyon, kalsifikasyon, fibrozis,

fibroblast aktivasyonu ve mikrovasküler proliferasyonu değerlendirerek incelemişlerdir. Deneklerde inflamasyon, fibrozis, fibroblast aktivasyonu ve mikrovasküler proliferasyonun anlamlı derecede etkilenmediğini bildirmişlerdir. Deneklerde nekroz ve kalsifikasyon görülmemesini, renal dokuya pozitif etki olarak değerlendirmişlerdir (95).

Demircan ve ark.nın, Ankaferd'in erken dönem kemik iyileşmesine etkilerini araştırdıkları çalışmada; ekstrenin kullanıldığı grupta, anlamlı derecede düşük enfeksiyon ve nekroz oranları izlenmiş, yeni kemik yapımı ise, anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur. Fibrozis açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (96).

Çalışmamızda, gram kuru doku ağırlığı içinde miligram olarak incelenen hidroksiprolin düzeyleri, kontrol olarak kullanılan D grubunda, diğer gruplara oranla anlamlı şekilde yüksek olarak gözlemlendi.

Kalaycı ve ark., yukarıda adı geçen çalışmalarında, Ankaferd'in hidroksiprolin seviyesi üzerine etkilerine bakmışlar ve Ankaferd uygulanan grupta hidroksiprolin seviyesinin 15. gün daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (94).

Karasu ve ark., tavşanlarda oluşturulan insizyonel deri yaralarının kapatılmasında oktil-siyanoakrilat doku yapıştırıcısının yara onarımına katkılarını araştırdıkları çalışmada, hidroksiprolin miktarının çalışma grubunda, postoperatif 3. ve 7. günlerde kontrol grubundan fazla olduğunu, 14. ve 21. günlerde ise anlamlı fark olmadığını saptamışlardır (97).

Tang ve ark., bir bitkisel ekstre olan Emodin (Rheum officinale Baill bitkisinin köklerinden üretilmiş 1, 3, 8-trihidroksi-6-metil-antraquinon)'in yara iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada; Emodin ve rekombinant EGF'yi karşılaştırmışlar. Her 2 grupta, yara iyileşmesinin çok iyi ve Emodin grubunda daha bariz olmak üzere, hidroksiprolin düzeylerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (98).

Kollajen sentezi inhibitörlerinden 5-flurourasil ve Halofuginon'un yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada; yara iyileşmesinin 28. gününde, kontrol ve Halofuginon grubunda yara iyileşmesinin iyi olduğu, 5-FU grubunda ise, kötü olduğu tespit edilmiştir. 5-flurourasil ve kontrol grupları arasında

anlamli fark gözlenmemesine karşın, Halofuginon grubunda, hidroksiprolin düzeyi anlamli olarak düşük bulunmuştur ($p<0,017$). Halofuginon'un keloid oluşumunu engelleyebileceği yorumu yapılmıştır (99).

Çalışmamızda da, yara iyileşmesinin düzgün olduğu A ve B gruplarında hidroksiprolin düzeyleri düşük, kontrol grubu olan D grubunda ise, yüksek olarak bulunmuştur. Yukardaki bulgulardan, hidroksiprolin düzeyi ile iyileşme hızı ve kalitesinin her zaman paralel seyretmediği, fakat yüksekliğinin, aşırı fibrozis ve keloid oluşumuna sebep olabileceği sonucu çıkarılabilir.

Büyüme faktörlerinden VEGF düzeyi, B grubunda belirgin derecede düşük bulundu, diğer gruplarda önemli bir farklılık yoktu. EGF ve PDGF seviyeleri açısından, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark görülmedi.

Numata ve ark., histamin sentezinin engellendiği yaralarda, yara iyileşmesinin kötü yönde etkilendiğini ve VEGF düzeylerinin anlamli şekilde düşük olduğunu bildirmişlerdir (100). Başka bir çalışmada; NO sentezinin inhibe edilip iyileşme süreci bozulan yaralarda, benzer şekilde VEGF miktarının azaldığı gözlenmiştir (101).

Luo ve ark., polisakkarit hidrojelini, yara iyileşmesine olumlu katkı sağladığını, EGF düzeyini anlamli derecede artırdığını, VEGF düzeyini ise etkilemediğini bildirmişlerdir (102).

Gerçek ve ark., deksametazonun yol açtığı gecikmeyi, balık yağının düzeltip düzeltemeyeceğini araştırdıkları çalışmada; deksametazon ile deksametazon artı balık yağı verilen gruplar arasında, histopatolojik iyileşme kriterleri açısından önemli bir fark görmemişler, fakat PDGF düzeyinin, deksametazon verilen grupta anlamli olarak yüksek çıktığını belirlemişlerdir (103). Konya ve ark., spinal kord hasarı sebebiyle yara iyileşmesi bozuk olan ratlardaki PDGF miktarını, düzgün iyileşen yaralardakine benzer düzeyde bulmuşlardır (104).

Bu çalışmalar da gösteriyor ki, tek başlarına EGF, VEGF ve PDGF düzeyleri, yara iyileşme hız ve kalitesi için bir gösterge olarak düşünülemez.

Sonuç olarak; makroskopik ve histopatolojik incelemelerde, Ankaferd'in daha önceki çalışmaları destekler şekilde, tedavisiz kontrol grubuna kıyasla yara iyileşme sürecini hızlandırdığı gözlemlendi. Fakat, Ankaferd'in gümüş sülfadiazine göre yara iyileşmesi üzerine belirgin bir üstünlüğü olmadığı da tespit edildi. Ankaferd'in, ancak ekonomik açıdan daha uygun bir alternatif olarak sunulabilmesi durumunda gümüş sülfadiazin'e tercih edilebileceği kanaatine varıldı.

Çalışmamızda, literatür bilgilerine benzer bir şekilde, hidroksprolin, EGF, VEGF ve PDGF değerleri açısından çelişkili sonuçlar elde edildi. Bu çelişkiler, denek sayımızın azlığından ve deneysel farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Ankaferd'in, kontrol grubuna oranla yara iyileşmesini hangi mekanizma ile hızlandırdığını tam olarak açıklayamadık. Daha geniş popülasyonlar üzerinde ve daha değişik etken maddeler kullanılarak yapılacak kontrollü çalışmalar ile elde edilecek verilerin, konunun daha da aydınlanmasına yardımcı olacağını düşünüyoruz.

6. SONUÇLAR

1. Makroskopik inceleme sonucunda; Ankaferd (A) ve gümüş sülfadiazin (B) uygulanan gruplarda yara iyileşmesinin, diğer iki gruba [baz krem (C) uygulanan ve tedavisiz iyileşmeye bırakılan (D)] oranla daha hızlı olduğu görülmüştür.
2. Histopatolojik incelemede; 15. gün sonunda, ülserasyon ile inflamasyonun, A ve B gruplarında C ve D gruplarına göre daha az ve reepitelizasyonun daha fazla olduğu tespit edilmiştir.
3. Hidroksiprolin değerlerinin, D grubunda, diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.01$).
4. EGF sonuçları açısından, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).
5. VEGF düzeylerinin, B grubunda bariz şekilde düşük olduğu ($p<0.0001$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.
6. PDGF seviyelerinde gruplar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

7. ÖZET

Yara iyileşmesinde, iyileşmede rol alan faktörleri (inflamatuvar hücreler, trombositler, mediyatörler, hücre dışı matriks v.b.) etkileyerek, bu fazlara ait süreleri kısaltmak ve ideal skar oluşumunu sağlamak amacıyla pek çok topikal ve sistemik ajan kullanılmaktadır.

Ankaferd, geleneksel olarak Türk tıbbında kullanılan beş bitkisel içeriğin çeşitli oranlarda karıştırılarak hazırlanan ve hemostatik ajan olarak kullanılan bir ekstraktır. Fibrinojen başta olmak üzere kan proteinleri ile eritrositlerin plazma ve serumda “protein ağı” meydana getirerek, saniyeden daha kısa sürede pıhtılaşmayı sağlamaktadır.

Çalışmamızda Ankaferd’in yara iyileşmesi üzerine olan etkileri incelendi. Bu amaçla, her biri 9 denekten oluşan 4 gruba ayrılmış 32 ratın sırt bölgesinde 8 mm’lik punch biyopsi iğneleri ile yaralar açıldı. Kontrol grubu olan D grubunda tedavi uygulanmazken, A grubuna topikal olarak günde iki defa Ankaferd, B grubuna günde iki defa gümüş sülfadiazin ve C grubuna günde iki defa aktif madde içermeyen baz krem uygulandı. Denekler makroskopik olarak 15 gün boyunca takip edildi ve 0., 3., 7. ve 15. günlerde yine punch biyopsi iğneleri ile biyopsiler alınarak histopatolojik olarak incelendi, hidroksiprolin, EGF, VEGF ve PDGF düzeylerine bakıldı.

Çalışmamızın sonunda, Ankaferd’in kontrol ve baz krem kullanılan gruba kıyasla, makroskopik ve histopatolojik bulgulara bakılarak, iyileşme sürecini hızlandırdığı tespit edildi. Ancak gümüş sülfadiazin uygulanan grupta da benzer şekilde

makroskopik ve histopatolojik olarak iyileşmenin, kontrol grubu ve baz krem kullanılan gruba kıyasla hızlı olduğu görüldü. Yara iyileşme sürecinin hızlı olduğu A ve B gruplarında hidrokspirolin düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu, kontrol grubunda ise hidrokspirolin düzeyi anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Büyüme faktörlerinden sadece VEGF düzeylerinde gümüş sülfadiazin uygulanan grupta anlamlı şekilde bir düşüklük tespit edildi. Gruplar arasında, EGF ve PDGF düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktu.

Bu bilgiler ışığında, Ankaferd'in sekonder yara iyileşme sürecini hızlandırdığı, fakat gümüş sülfadiazinle karşılaştırıldığında üstün bir özelliği olmadığı tespit edilmiştir. Ankaferd'in, ekonomik açıdan daha uygun bir alternatif olarak sunulması halinde, sekonder yara iyileşmesini hızlandırıcı bir ajan olarak kullanılabilmesi kanatine varılmıştır. Etkinliğinin tam olarak ortaya konulabilmesi için, daha geniş popülasyonlar üzerinde yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. SUMMARY

THE EFFECTS OF ANKAFERD, A HEMOSTATIC AGENT, ON WOUND HEALING

There have been a lot of topical and systemic agents to provide an ideal scar formation and decrease the periods of wound healing process by affecting the factors of healing (inflammatory cells, thrombocytes, extracellular matrix etc.).

Ankaferd is an extract used as a hemostatic agent which is prepared in certain ratios of five herbal contents which are used in traditional Turkish medicine. It provides clotting less than a second by making a protein network with eritrocytes and blood proteins (esp. fibrinogen) in plasma and serum.

In our study, we observed the effects of Ankaferd on wound healing. So that, wounds were created with 8 mm punch biopsy knots on the back of 32 rats which were separated into 4 groups of 9 rats. No treatment was done in Group D which is the control group while Group A took topical Ankaferd treatment twice a day, Group B treated with silver sulfadiazine twice a day, and Group C put on base cream which did not include any active agent, twice a day. The rats were followed for 15 days macroscopically and examined histopathologically on 0., 3., 7. ve 15th days by taking biopsies and the levels of hydroxyproline, EGF, VEGF, and PDGF were analysed from the tissue.

At the end of our study, it was detected that Ankaferd accelerated the healing process in comparison to control and base cream groups according to the macroscopic

and histopathologic results. Also, similar to this situation, it was observed that the healing process in silver sulfadiazine group was faster than control and base cream groups. There was no a significant difference in hydroxyproline levels between Groups A and B where the wound healing process were faster, but the hydroxyproline levels were significantly higher in Group D. The only significantly lower growth factor was VEGF in the silver sulfadiazine group. There were no significant differences by means of EGF and PDGF levels between all groups.

In the light of these observations, it was concluded that Ankaferd accelerated the secondary wound healing process, but in comparison to sulfadiazine, it did not have a superior property. It can be said that Ankaferd can be used for secondary wound healing when presented as a more suitable and economical alternative. More experimental and clinical studies in wider populations are needed to prove and confirm its efficacy.

9. KAYNAKLAR

1. Tüzün Y. Derinin yapısı ve gelişmesi. Tüzün Y, Gürer MA, Serveroğlu S, Oğuz O, Aksungur LA (eds). Dermatoloji. 3. baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008;17-32.
2. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70.
3. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:9-18.
4. İkizoğlu G. Ekstraselüler matriks, kan damarları ve sinirlerin biyolojisi. Tüzün Y, Gürer MA, Serveroğlu S, Oğuz O, Aksungur LA (eds). Dermatoloji. 3. baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008;33-99.
5. http://www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf
6. Öztürk G. Derinin yapısı ve görevleri. *T Klin J Cosmetol* 1999;2:1-8.
7. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002;12(4):390-401.
8. <http://www.tekplatform.com/basarinin-anahtari/248499-anatomi-2.html>
9. <http://www.fmtr.com/biyoloji/3351749-epidermis-ve-katmanlari.html>
10. Köse O. Epidermal kök hücreler. *Dermatose* 2005;4(4):176-81.
11. Jimenez PA, Jimenez SE. Tissue and cellular approaches to wound repair. *Am J Surg* 2004;187:56-64.
12. <http://web.inonu.edu.tr/~msenol/dosyalar/deriyapi.doc>
13. James WD, Berger TG, Elston DM. Aydemir EH (çeviri ed). *Deri: Temel yapı ve işlevleri*. Andrews Deri Hastalıkları Klinik Dermatoloji. 1. baskı, İstanbul, Medikal yayıncılık, 2008;1-15.
14. Akay BN, Erdem C. Bazal membran zonunun biyolojisi. *Dermatose* 2006;5(4):244-7.
15. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007;127:2525-32.
16. Önerci M. *Temel Cerrahi Teknikler*. 1. Baskı. Ankara, Selim Ofset, 2001;5-15.
17. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly-discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:259-64.
18. Shukla A, Rasik AM, Shankar R. Nitric oxide inhibits wound collagen

- synthesis. *Mol Cell Biochem* 1999;200:27-33.
19. Strodbeck F. Physiology of wound healing. *Newborn Infant Nurs Rev* 2001;1:43-52.
 20. Theoret CL. Update on wound repair. *Clin Tech Equine Pract* 2004;3:110-22.
 21. Mercandetti M, Johen AD. Wound healing, healing and repair. 2008; (<http://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview>).
 22. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. In: *Pathologic Basis of Diseases*. 7th edition. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005;87-118.
 23. www.baskent.edu.tr/~bmeweb/20393329.htm.
 24. Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am* 2003;83(3):483-507.
 25. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997;77(3):509-28.
 26. Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF, Berard CW, Rosen H. The healing of rat skin wounds. *Ann Surg* 1965;161:293-308.
 27. Serarşlan G, Altuğ ME, Konaş T. Kafeik asid fenetil ester'in insizyonel yara modelinde plazma lipid peroksidasyonu, antioksidan durum ve nitrik oksit seviyesi üzerine etkisi. *Türkderm* 2007;41:11-4.
 28. Kapoor M, Appleton L. Wound healing: Abnormalities and future therapeutic targets. *Curr Anaesth Crit Care* 2005;16:88-93.
 29. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Canic MT. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601.
 30. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(Suppl):12-34.
 31. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007;127:998-1008.
 32. Emekçi P, Bostancı S. Yara iyileşmesi. *T Klin J Dermatol* 2002;12:114-20.
 33. Tonnesen MG, Worthen GS, Johnston RB. Neutrophil emigration, activation, and tissue damage. In: *Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Clark RAF, Henson PM (eds). New York, Plenum, 1998;149-83.
 34. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future. *Adv Skin Wound Care* 2004;17:24-35.

35. Clark RAF. Wound repair. Overview and general considerations. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Clark RAF (ed). 2nd ed. New York, Plenum, 1996;3-50.
36. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg* 2002;183:406-12.
37. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
38. Serdaroğlu S, Arzuhal N. Proteolitik enzimler ve yara iyileşmesi. *Dermatose* 2002;2:20-4.
39. Souza BR, Nascimento AP, Costa AMA. Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009;611:77-84.
40. Achuth HS, Moochhala SM, Mahendran R, Tan WTL. Nitrosoglutathione triggers collagen deposition in cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen* 2005;13:383-9.
41. Broughton G, Janis J, Attinger C. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(Suppl):12-34.
42. Louis W. The study of cytokine dynamics at the operation site after mastectomy. *Wound Repair Regen* 2003;11:326-30.
43. Yang CC, Lin SD, Yu HS. Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar. *J Dermatol Sci* 1997;14:162-9.
44. Özorun Y. Onarım: Hücre rejenerasyonu, fibrozis ve yara iyileşmesi. *Temel Patoloji*. Çevikbaş U (ed). 6. baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2000;47-60.
45. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* 2002;7:1-10.
46. Utz ER, Elster EA, Tadaki DK, et al. Metalloproteinase expression is associated with traumatic wound failure. *J Surg Res* 2009;15:1-7.
47. Baum C, Arpey C. Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005;31(6):674-86.
48. Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, et al. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 1994;162:499-510.
49. Gurtner G. Wound healing: Normal and abnormal. In: *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 6th ed. Philadelphia, Lippincott-RavenPublishers, 2007;15-22.

50. Mendonca RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspect of wound healing. *Ann Bras Dermatol* 2009;84(3):257-62.
51. Green HDG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Biol* 1998; 30:1019-30.
52. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;15(3):334-7.
53. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing: an overview. *Clin Plast Surg* 2003;30;1-12.
54. Karukonda SRK, Flynn TC, Boh EE, Mcburney EI, Russo GG, Millikan LE. The effects of drugs on wound healing. *Int J Dermatol* 2000;39:250-7.
55. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70.
56. Lineaweaver CW, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Dongmei C, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay and skin flap survival. *Ann Surg* 2004;239:866-75.
57. Zhang F, Hu EC, Gerzenshtein J, Lei MP, Lineaweaver WC. The expression of proinflammatory cytokines in the rat muscle flap with ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg* 2005;54:313-7.
58. Datta HS, Mitra SK, Patwardhan B. Wound healing activity of topical application forms. Based on Ayurveda. *eCAM* 2009;27:1-10.
59. Ramasastry SS. Acute wounds. *Clin Plast Surg* 2005;32;195-208.
60. Izadi K, Ganchi P. Chronic wounds. *Clin Plast Surg* 2005;32;209-22.
61. Fetil E. Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesini etkileyen faktörler: *T Klin J Int Med Sci* 2007;3(48):13-7.
62. <http://www.mumcu.com/html/article.php?sid=332>.
63. <http://forum.veterinerhekimiz.com/archive/index.php/thread-20559.html>.
64. Guo S, Dipietro LA, Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010;99(3):219-29.
65. Şenol M. Yara iyileşmesi. *T Klin Dermatol* 1995;5:49-53.
66. Yalçın H, Özkalp B. Vücut hijyeninin önemi ve yara bakımında yeni gelişmeler. 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 2005;287-308.
67. Karasu A, Bakır B. Yara ve yara iyileşmesi. *Vet Cerr Derg* 2008;14(1);36-43.

68. Batislam HD. Divan şiirinin mitolojik kuşları: Hüma, Anka ve Simurg. Türk Kültürü İncelemeleri Dergisi 2002;185-208.
69. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. J Int Med Res 2008;36:163-70.
70. Kurt M, Disibeyaz S, Akdogan M, Sasmaz N, Aksu S, Haznedaroglu C. Endoscopic application of Ankaferd Blood Stopper as a novel experimental treatment modality for upper gastrointestinal bleeding: A case report. Am J Gastroenterol 2008;103:2156-8.
71. http://www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf
72. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra. Int Immunopharmacol, 2006;6:494-8.
73. Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chem 2007;91:131-7.
74. Barka EA, Belarbi A, Hachet C, et al. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol Lett 2000;186:91-5.
75. Barka E, Gognies S, Nowak J, et al. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biol Control 2002;24:135-42.
76. Zhao J, Wang J, Chen Y, et al. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. Carcinogenesis 1999;20:1737-45.
77. Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, et al. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 1999;142:139-49.
78. Matsuda H, Ando S, Morikawa T, et al. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. Bioorg Med Chem 2006;14:138-42.
79. Testai L, Chericoni S, Calderone V, et al. Cardiovascular effect of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. J Ethnopharmacol 2002;81:105-9.
80. Cipil HS, Kosar A, Kaya A, et al. In vivo hemostatic effect of the medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper in rats pretreated with warfarin. Clin Appl Thromb Hem 2009;15:270-6.

81. Kosar A, Cipil HS, Kaya A, et al. The efficacy of Ankaferd Blood Stopper in antitrombotic drug induced primary and secondary hemostatic abnormalities of a rat bleeding model. *Blood Coagul Fibrin* 2009;20:185-90.
82. Canatan D, Savaş Ç, Kubulu AE, ve ark. İnhibitörlü hemofili A hastasında RFVIIA ve Ankaferd kullanımı. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, İzmir, 2008;B056.
83. Akkoc N, Akcelik M, Haznedaroglu IC, et al. In vitro anti-bacterial activities of Ankaferd Medicinal Plant Extract. *Int J Lab Hematol* 2008;30:95.
84. Berktaş M, Yaman G, Ayhan H, ve ark. Ankaferd Blood Stopper: aynı zamanda ideal bir antibiyotik öncülü mü? 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, İzmir, 2008;P0146.
85. Sarıbaş Z, Şener B, Haznedaroğlu C, Haşçelik G, Kirazlı S, Göker H. Hemostatik bir ajan olan Ankaferd'in antibakteriyel etkinliğinin araştırılması. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Antalya, 2008;P220.
86. Wang XT, Liu PY, Tang JB. PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-kappaB gene in signal pathways in ischemic flaps. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(1):129-39.
87. Kwon DS, Gao X, Liu YB, et al. Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Int Wound J* 2008;5:453-63.
88. Arslan S, Yeşil Y, Ülger Z, ve ark. Yaşlı bir hastada yumuşak doku travmasına bağlı gelişen yara iyileşmesinde Ankaferd. *Akad Geriatri Derg*, 2010;2:58-60.
89. Şenol M, Şahin M, Aktaş A, Kaya M. Rivanol, gümüş sülfadiazin ve çinko oksit'in yara iyileşmesi üzerine etkileri. *Yeni Tıp Derg* 1993;10(3):12-7.
90. Erçetin S, Haznedaroğlu IC, Kurt M, ve ark, Ağız, diş ve çene cerrahisinde Ankaferd Blood Stopper'in etkinliği ve güvenilirliği. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, İzmir, 2008;P0143.
91. Yeşilada AK, Tatlıdede S, Sümer O, ve ark. Ankaferd Blood Stopper hemostatik ajanın flep sağkalımına etkisinin sıçanlarda değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma, Ankaferd Bilimsel perspektif ve temel klinik veriler kitabı.
92. Yeşilada AK, Tatlıdede S, Sümer O, ve ark. Ankaferd Blood Stopper hemostatik ajanın sekonder yara iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma, Ankaferd Bilimsel perspektif ve temel klinik veriler kitabı.
93. Akgul T, Huri E, Ayyıldız A, Ustun H, Germiyanoglu C. Haemostatic and histopathological effect of Ankaferd Blood Stopper on penile cavernosal tissue in rats. *Int J Hem Oncol* 2009;3(19):159-65.

94. Kalaycı MU, Eroglu HE, Soylu A, et al. Effect of Ankaferd Blood Stopper on hemostasis and histopathological score in experimental liver injury. *Bratisl Lek Listy* 2010;111(4):183-8.
95. Huri E, Akgul T, Ayyıldız A, Ustun H, Germiyanoglu C. Hemostatik role of a folkloric medicinal plant extract in a rat partial nephrectomy model: controlled experimental trial. *J Urol* 2009;181(5):2349-54.
96. Demircan S, İşler C, Çakar S, ve ark. Ankaferd Blood Stopper'in erken dönem kemik dokusu iyileşmesi üzerine etkileri. Sıçanlar üzerinde deneysel bir çalışma. Oral Cerrahi Derneği VIII. Uluslararası Kongre, Sözel sunum. Antalya, 2000;14.
97. Karasu A, Bakır B. Tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan deri ensizyonlarının kapatılmasında Oktil-siyanoakrilatın yara iyileşmesi üzerine etkisi. 11. Ulusal Veteriner Cerrahi Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı. Aydın, 2008;36-7.
98. Tang T, Yin L, Yang J, Shan G. Emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, enhances cutaneous wound healing in rats. *Eur J Pharmacol* 2007;567:177-85.
99. Beyhan ŞG. Kollajen sentezi inhibitörlerinden 5-flurourasil ve Halofuginon'un yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2008.
100. Numata Y, Terui T, Okuyama R, et al. The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. *J Invest Dermatol* 2006;126:1403-9.
101. Frank S, Stallmeyer B, Kampf H, Pfeilschifter J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J* 1999;13:2002-14.
102. Luo Y, Diao H, Xia S, Dong L, Chen J, Zhang J. A physiologically active polysaccharide hydrogel promotes wound healing. *J Biomed Material Res Part A* 2010;193-204.
103. Gercek A, Yildirim O, Konya K, et al. Effects of parenteral fish-oil emulsion (Omegaven) on cutaneous wound healing in rats treated with dexamethasone. *J Parenter Enteral Nutr* 2007;31(3):161-6.
104. Konya D, Gercek A, Akakın A, et al. The effects of inflammatory response associated with traumatic spinal cord injury in cutaneous wound healing and on expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-*b*1) and platelet-derived growth factor (PDGF)-A at the wound site in rats. *Growth Factors* 2008;26(2):74-9.