

MEHMET CAN ÇAKIN

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .

YÜKSEK LİSANS TEZİ

← YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2018

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**DENEYSEL SIÇAN YARA MODELİNDE TROMBOSİTTEN  
ZENGİN PLAZMADAN İZOLE EDİLEN LİPİD  
FRAKSİYONUNUN SKAR OLUŞUMU ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MEHMET CAN ÇAKIN**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. İLHAN ONARAN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında Yüksek Lisans öğrencisi Mehmet Can ÇAKIN tarafından Prof. Dr. İlhan ONARAN'ın danışmanlığında hazırlanan " DENEYSEL SIÇAN YARA MODELİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMADAN İZOLE EDİLEN LİPİD FRAKSİYONUNUN SKAR OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 07/08/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

  
**Jüri Başkanı**


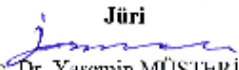
Prof. Dr. İlhan ONARAN  
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

  
**Jüri-Danışman**

Prof. Dr. İlhan ONARAN  
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN  
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

**Jüri**  
Doç. Dr. Yasemin MÜŞTERİ OLTULU  
Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmamın kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün sahalarda etik dışı davranışının olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını beyan ederim.

MEHMET CAN ÇAKIN



## İTHAF



Aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca hiçbir konuda desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. İlhan ONARAN'a,

Tez çalışmalarım esnasında bilgilerinden, tecrübelerinden ve önerilerinden son derece istifade ettiğim Sayın Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya,

Tez çalışmalarım süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Merve ANAPALI ve Hülya ARKAN'a,

Yüksek Lisans eğitimimin başlangıcından bugüne kadar her konuda aynı süreçlerden geçtiğimiz değerli arkadaşlarım Ayşe Seda AKDEMİR ve Gizem ERDOĞAN'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve özellikle manevi destekleriyle motive eden çok değerli aileme,

Teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-25982

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
.....	İİİ
İTHAF .....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİ
ÖZET .....	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1.1. Epidermis .....	3
2.1.2. Dermis:.....	4
2.1.3. Hipodermis (Subkutan):.....	5
2.2. Yara.....	6
2.2.1. Yara İyileşmesinin Aşamaları .....	7
2.2.2. Vasküler Tepki: Hemostaz and Koagülasyon.....	8
2.2.3. Hücresel Tepki : İnflamasyon .....	9
2.2.4. Proliferasyon (Çoğalma).....	10
2.2.4.1. Reepitelizasyon (Yeniden Epitelizasyon) .....	10
2.2.4.2. Anjyogenez (Vaskülerizasyon).....	12
2.2.4.3. Granülasyon Dokusu oluşumu .....	13
2.2.5. Remodeling (Yeniden şekillenme).....	13
2.3. PRP (Trombosit Zengin Plazma) .....	14
2.3.1. Trombosit (Platelet) .....	14
2.3.2. Plateletten Zengin Plazma (PRP).....	16
2.3.3. PRP içeriği ve avantajları.....	17
2.3.4. Trombosit lipidleri .....	17
2.3.4.1. Aminofosfolipidler .....	18
2.3.4.2. Fosfatidilinositol .....	19

2.3.4.3. Yağ asitleri, Eikozanoidler ve ilişkili türler .....	19
2.3.4.4. Lizofosfolipidler (LysoPL) ve Lizofosfatik asit (LPA): .....	20
2.3.4.5. Nötral lipidler; Gliseridler, Kolesterol Esterleri ve serbest kolesterol .....	20
2.3.4.6. Sfingolipidler ve Seramidler .....	20
2.4. Büyüme faktörleri ve Sitokinler.....	21
2.4.1. Kemokinler.....	23
2.5. Ekstraselüler Matriks (ECM).....	23
2.5.1. Ekstraselüler Matriks ve Yara İyileşmesi .....	25
2.5.1.1. Ekstraselüler Matriks ve Hemostaz.....	26
2.5.1.2. Ekstraselüler Matriks ve İnflamasyon.....	26
2.5.1.3. Ekstraselüler Matriks ve Proliferasyon .....	26
2.5.1.4. Ekstraselüler Matriks ve Remodeling .....	26
2.6. TGF- $\beta$ .....	27
2.6.1. TGF- $\beta$ ve Yara İyileşmesi.....	28
2.7. Kollajen.....	29
2.8. İmmünohistokimya Yöntemi .....	30
2.8.1. İmmünoenzim Yöntemi: .....	31
2.8.2. İmmünfluoresan Yöntemi: .....	31
2.8.3. İmmünaltın Yöntemi: .....	31
2.8.4. Streptavidin-Biotin Yöntemi.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Gereçler.....	33
3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	33
3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler .....	34
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar .....	34
3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler .....	35
3.2. YÖNTEM .....	36
3.2.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması:.....	36
3.2.2. PRP ve PRP' den İzole Edilen Lipid Fraksiyonunun Hazırlanması .....	37
3.2.2.1. PRP'nin Hazırlanması:.....	37
3.2.2.2. Lipid fraksiyonunun hazırlanması: .....	38
3.2.2.3. Lipid fraksiyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi: .....	38
3.2.2.4. PRP için trombosit sayımı yapılması: .....	39



3.3. Hayvan Deneyleri .....	39
3.3.1. Grupların oluşturulması: .....	39
3.3.2. Yara Modelleri: .....	39
3.3.3. Tedavilerin uygulanması ve biyopsi alımı: .....	41
3.3.4. Biyopsilerin muhafaza edilmesi:.....	41
3.4. Histopatolojik İnceleme Deneyleri .....	41
3.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
3.4.2. Masson Trikrom Boyama.....	42
3.4.3. Sirius Red Boyama.....	43
3.5. İmmünohistokimyasal Analiz Deneyleri .....	43
3.6. İstatiksel Analiz ve Skorlama .....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Bulguların Histolojik Değerlendirmesi.....	46
4.1.1. Granülasyon oluşumu: .....	47
4.1.2. Anjiyogenez: .....	48
4.1.3. Reepitelizasyon: .....	49
4.2. Bulguların İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi.....	50
4.2.1. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ile TGF- $\beta$ Ekspresyonlarının Histolojik Değerlendirilmesi (Şekil 4-7): .....	51
4.2.1.1. 3.gün TGF- $\beta$ ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	51
4.2.1.2. 7.gün TGF- $\beta$ ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	52
4.2.1.3. 14.gün TGF- $\beta$ ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	52
4.2.2. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ile Kollajen 1 Histolojik Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi (Şekil 4-8): .....	54
4.2.2.1. 3.gün Kollajen 1 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	55
4.2.2.2. 7.gün Kollajen 1 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	55
4.2.2.3. 14.gün Kollajen 1 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	55
4.2.3. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ile Kollajen 3 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi:.....	57
4.2.3.1. 3.gün Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	57
4.2.3.2. 7.gün Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	57
4.2.3.3. 14.gün Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi: .....	58
5. TARTIŞMA .....	59

KAYNAKLAR .....	66
FORMLAR .....	79
ETİK KURUL KARARI .....	80
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI... <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> .....	82
ÖZGEÇMİŞ .....	83



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Kollajenin yara iyileşmesindeki rolleri .....	30
Tablo 3-1 Kullanılan Cihazlar .....	33
Tablo 3-2 Kullanılan Ticari Kitler .....	34
Tablo 3-3 Kullanılan Kimyasallar .....	34
Tablo 3-4 Kullanılan Sarf Malzemeler .....	35
Tablo 3-5 Yara iyileşmesinde gözlemlenen aşamaların gösterdiği bulguların skorlanma yöntemi .....	45
Tablo 4-1 Tüm gruplara ait yara iyileşme skor değerlerinin Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi'ne karşılaştırılması.....	46
Tablo 4-2 Deney gruplarının günlere göre TGF- $\beta$ İmmünpozitifliğinin değerlendirilmesi .....	51
Tablo 4-3 Deney gruplarının günlere göre Kollajen 1 İmmünpozitifliğinin değerlendirilmesi .....	54
Tablo 4-4 Deney gruplarının günlere göre Kollajen-3 İmmünpozitifliğinin değerlendirilmesi .....	57

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Derinin yapısı .....	6
Şekil 2-2: Yara iyileşmesinde yer alan aşamaların sıralı gösterimi.....	7
Şekil 2-4 Yara iyileşmesinde İnflamasyon evresi.....	10
Şekil 2-5 Yara iyileşmesinde proliferasyon evresi .....	12
Şekil 2-6 Yara iyileşmesinde yeniden şekillenme evresi.....	14
Şekil 2-7 Trombositlerden salgılanan bazı büyüme faktörleri.....	15
Şekil 2-8 PRP'nin tam kandan elde edilişi .....	16
Şekil 2-9 Ekstraselüler Matriks yapısı ve bileşenleri.....	25
Şekil 3-1 Çalışmamızda uygulanan işlem sırası .....	36
Şekil 3-2 Deney hayvanlarında yara alanlarının oluşturulması .....	40
Şekil 4-1 Grupların Granülasyon dokusu oluşumu skorlarının karşılaştırılması.....	47
Şekil 4-2 Grupların Anjiyogenez skorlarının karşılaştırılması .....	48
Şekil 4-3 Grupların reepitelizasyon skorlarının karşılaştırılması .....	49
Şekil 4-6 Tüm grupların deri doku kesitlerine ait Sirius Red (3. 7. ve 14. günler) ve Masson Trikrome (14. gün) boyaması. (x50 büyütme) .....	50
Şekil 4-7 TGF- $\beta$ Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri (x50 büyütme) .....	53
Şekil 4-8 Kollajen 1 Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri (x50 büyütme) .....	56
Şekil 4-9 Kollajen 3 Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri (x50 büyütme) .....	58

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- PRP:** Trombositten zengin plazma
- LF:** Lipid Fraksiyonu
- DMSO:** Dimetilsülfoksit
- SHAM:** Kontrol grubu
- TGF- $\beta$ :** Transforme edici büyüme faktörü beta
- ECM:** Ekstraselüler matriks
- PDGF:** Platelet türevli büyüme faktörü
- EGF:** Epidermal büyüme faktörü
- MMP:** Matriks Metalloproteinaz
- MMPs:** Matriks Metalloproteinaz enzimleri
- PBS:** Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
- CaCl<sub>2</sub>:** Kalsiyum klorid
- LysoPL:** Lizofosfolipidler
- LPA:** Lizofosfatik asit
- TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktörü- $\alpha$
- VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü
- IFN- $\gamma$ :** İnterferon gama
- KGF:** Keratinosit büyüme faktörü
- IGF:** İnsülin benzeri büyüme faktörü
- NGF:** Sinir büyüme faktörü
- IL-1:** İnterlökin 1
- RhoGTPaz:** Ras homolog guanozin trifosfataz
- GTPaz:** Guanozin trifosfaz
- PDGF:** Trombosit türevli büyüme faktörü

- bFGF:** Temel fibroblast büyüme faktörü
- PDAF:** Trombosit Türevli Anjiyogenez Faktörü
- ECGF :** Epitelyal Hücre Büyüme Faktörü
- İns (1,4,5) P3:** Fosfatidilİnositol Trifosfat
- LOX:** Lipoksijenaz
- COX:** Siklooksijenaz
- PLA2:** Fosfolipaz A2
- TAG:** Triaçilgliserol
- DAG:** 1,2-diaçilgliserol
- BMP:** Kemik morfojenik proteinleri
- MIF:** Mulleran inhibe edici faktör
- GDF:** Büyüme ve farklılaşma faktörleri
- PAI-1:** Plazminojen aktive edici inhibitör-1
- TIMP-1:** Metalloproteaz-1 doku inhibitörü
- CTGF:** Bağ dokusu büyüme faktörü
- PUFA:** 20 Karbonlu doymamış yağ asidi
- kDa:** Kilodalton
- cm:** Santimetre
- mm:** Milimetre
- nm:** Nanometre
- kg:** Kilogram
- mg:** Miligram
- ng:** Nanogram
- ml:** Mikrolitre
- µm:** Mikrometre

## ÖZET

ÇAKIN, M.C.(2018). Deneysel sıçan yara modelinde trombositten zengin plazmadan izole edilen lipid fraksiyonunun skar oluşumu üzerine etkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

PRP'nin yara iyileştirici etkisi uzun yıllardan beri bilinmekte ve klinik olarak uygulanmaktadır. Son yıllardaki sınırlı *in vitro* çalışmalardan elde edilen bulgulardan yola çıkarak PRP'nin esas iyileştirici etkisinin trombositlerden kaynaklanan çok sayıdaki lipid içeriğinden olabileceği ileri sürülmüştür. Literatürde bu konuyu irdeleyen *in vivo* çalışmaya rastlanılmadığından, bu çalışmada PRP'den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileştirmesi üzerindeki etkisi deneysel sıçan yara modelinde değerlendirildi. Çalışmamızın hayvan deneyleri, 20 adet Wistar albino türü sıçanların sırt kısımlarında 1.2 cm çapında eksizyon yöntemiyle dairesel yaralar oluşturularak 4 farklı grup üzerinden gerçekleştirildi. PRP, lipid fraksiyonu, DMSO ve SHAM gruplarına ait yaralardan 3, 7, ve 14. günlerde biyopsi alındı. Histolojik değerlendirme amacıyla, yara iyileşmesinde etkin rol oynayan TGF- $\beta$ , Kollajen 1 ve Kollajen 3 proteinlerinin, süreçteki evrelere göre ekspresyon seviyeleri, bu 3 proteinin İmmünohistokimya boyama yöntemi ile biyopsilere uygulanarak İmmünopozitiflik skorlamaları yapıldı. Ayrıca yara iyileşmesinin proliferasyon evresini değerlendirilmesi amacıyla Masson Trikrom ve Sirius Red boyaları uygulanarak skorlamaları yapıldı. Tüm bulgular istatistiksel olarak One Way Anova ve Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma testleri ile analiz edildi. Çalışmamızın bulguları, PRP'den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileştirici etkisinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte bulgularımız, lipid fraksiyonunun iyileştirici etkiye sahip olmasına rağmen PRP'nin daha etkili olduğu sonucunu verdi. Farklı yara modelleri ve PRP ile lipid fraksiyonunun farklı bekleme süreleri ile yapılacak ileriki çalışmaların konuya daha aydınlatıcı bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : PRP, yara iyileşmesi, lipid fraksiyonu, deri, immünohistokimya

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-25982

## ABSTRACT

ÇAKIN, M.C. (2018). Investigation of the effect of lipid fraction isolated from platelet rich plasma on scar formation in an experimental rat wound model. İstanbul University, Institute of Health Science, Medical Biology Department. Master Tesis. İstanbul.

The wound healing effect of PRP has been known and clinically applied for many years. From the findings of limited *in vitro* studies in recent years, it has been suggested that the main therapeutic effect of PRP may be from a numerous of lipid contents originating from platelets. Since no *in vivo* studies have been found in the literature, the effect of the lipid fraction obtained from PRP on wound healing in this study was evaluated in the experimental rat wound model. In our study, animal experiments were carried out in 4 different groups by circular excision with 1.2 cm diameter excision in the back of 20 Wistar albino rats. Biopsies were taken at 3, 7, and 14.days from the injuries of PRP, lipid fraction, DMSO and SHAM groups. For histological evaluation, immunopositivity scoring was performed by biopsy of TGF- $\beta$ , Collagen 1 and Collagen 3 proteins which play an active role in wound healing, expression levels of these 3 proteins by immunohistochemical staining method. In addition, Masson Trichrome and Sirius Red stains were applied to evaluate the proliferation stage of wound healing. All findings were statistically analyzed with One Way Anova and Bonferroni's Multiple Comparison tests. Analyzes made in histological terms gave the result that lipid fraction treatment group had less closure rate than PRP and lipid fraction was more effective than PRP despite having content and curative effect. We think that different wound models and further studies with different waiting times of PRP and lipid fraction will give more illuminating information on the subject.

Key Words: PRP, Wound healing, Lipid fraction, Skin, Immunohistochemistry

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2017-25982



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri, vücudu dış etkenlerden koruyan en büyük organdır. Vücudu çepeçevre sararak vücut iç organlarının bir düzen içerisinde sabit kalmasını sağlar. Deri yaralanmasının sonrasında gerçekleşen yara iyileşmesi süreci, son derece karmaşık ancak bir o kadar da koordineli bir düzen içerisinde gerçekleşir. Bu düzende birçok hücre ve büyüme faktörü rol oynar. Bu süreçte rol oynayan en önemli büyüme faktörleri peptid büyüme faktörleridir (1). Trombositler, içerik olarak peptid büyüme faktörlerince zengin bir kaynaktır. Bu hücrelerde transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) gibi çok sayıda büyüme faktörü bulunmaktadır. Trombositlerin özellikle yara oluşumunun hemen ardından yara bölgesinde göstermiş olduğu aktivite, yara tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde özellikle bu hücre üzerine araştırmaların derinleşmesine sebep olmuştur.

Trombositten zengin plazma (PRP), kanın plazma kısmından elde edilen ve yüksek oranda trombosit konsantrasyonuna sahip bir plazma bölümüdür. PRP, günümüzde birçok cilt ve yumuşak doku yaralanmalarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca, birçok yayında PRP'nin çeşitli cerrahi ve yanık türü yaraların iyileşmesinde kullanıldığı gösterilmiştir.

PRP'nin büyüme faktörleri açısından zengin olması yara iyileştirme işlemi için avantajlı olduğu izlenimini vermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, PRP'nin faydalı etkileri sadece bu peptid büyüme faktörlerine atfedilmiştir (2,3,4). Son yıllarda bu hipotezin bir paradoks oluşturduğu görüşü de ortaya çıkmıştır. Zira yayınlanan bulgular, kronik yara ortamının yapısal olarak oldukça proteolitik olduğunu ve peptid büyüme faktörlerini hızla parçalayabildiğini göstermektedir. Bu nedenle, PRP'nin peptid bileşenlerinden ziyade daha dirençli olan ve trombositlerden salınan lipid bileşenlerinin iyileşmesi sürecinde önemli bir rol oynadığına dair yeni bir görüş ortaya konulmuştur. Bu görüşle ilgili olarak gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada bu görüşü destekler nitelikte bulgular bildirilmiştir (5). Ancak literatür bilgimiz bu görüşü destekler nitelikte *in vivo* model çalışmalar bulunmadığı yönündedir.

Yapısal özellikleri dışında, klasik bilgi olarak lipidlerin biyoaktif aracı moleküllerin öncü maddeleri olduğu, sinyal molekülleri olarak davrandıkları ve gen ekspresyonunun düzenleyicileri olduğu iyi bilinmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, yara iyileşmesi süresince sitokinlerle beraber biyoaktif lipidlerin, hasarlanan dokunun rejenerasyonu ve inflamasyonun çözülmesi için önemli rolleri olduğunu ortaya çıkarmıştır (6).

Etkili biyoaktif lipidler olan eikozanoidlerin, endocannabinoidlerin ve sfingolipidlerin deri inflamasyonu üzerinde etkileri olduğu ve inflamatuvar hücrelerin yara alanına toplanmasını etkilemek suretiyle derinin immün cevabını düzenleyebileceği gösterilmiştir. Söz konusu üç bileşik trombositlerde bulunmaktadır. Bir öncü molekül olarak PUFA'nın bu lipid aracılarının oluşmasında ve etkinliğinde önemli rolü vardır (7,8). Bazı çalışmalar PUFA'nın sistematik ve/veya topikal uygulamasının lipid mediatörlerinin oluşumunu ve bunların etkinliğini yara mikro çevresinde düzenlediği ileri sürülmüştür.

Yara iyileşmesi süresince iki önemli unsur göze çarpmaktadır. Bunlardan biri yaranın hızlı iyileşmesi diğeri de iz (skar) bırakmadan iyileşmesidir. PRP uygulamalarında hızlı bir iyileşmeden söz edilmekle birlikte bazı çalışmalar skar oluşumu üzerine etkileri olmadığı ya da negatif etkileri olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu bilgileri göz önünde bulundurarak bu araştırmada sıçan yara modelinde trombosit zengin plazmadan izole edilecek lipid fraksiyonun skar oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilecek bulgulardan, tartışılan bu konuya bazı ip uçları verebileceği gibi bu tedavi prokolüne yeni bir bakış açısı getirebileceği beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.DERİ

Deri, vücuttaki en büyük organ olup vücut ağırlığının yaklaşık olarak %15'ini oluşturur. Kimyasal bileşenleri açısından derinin yaklaşık olarak %70'i su, %25'i protein, %2'si lipidden oluşur.

Derinin işlevleri:

- Vücudu fiziksel yaralanmalara karşı korur.
- Vücudu sayısız patojenik mikrop ve kimyasal ajanlara karşı korur.
- Sıvı ve su kaybını kısıtlamaya yardımcı olur.
- Deriye su geçirmezlik kazandırarak su emilimini önlemeye yardımcı olur.
- Vücut sıcaklığının düzenlenmesine katılır.
- Vücudun sıcaklık, basınç, dokunma ve ağrı için temel duyu organıdır.
- Ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağlar.
- D vitamini eksikliği yumuşak kemikler ve birçok ilgili sorunlara yol açabilir.
- Bazı kimyasalların D vitamini sentezi ve biyotransformasyonu da dahil olmak üzere metabolizma konusunda kilit rol oynar.

Deri, Epidermis, Dermis ve Hipodermis (Subkutan) doku olmak üzere 3 temel katmana ayrılır.

#### 2.1.1. Epidermis

Derinin en üst tabakasıdır. Epidermiste kan damarları yoktur; ancak ihtiyacı olan bileşenleri dermis tabakasında bulunan kan damarlarından sağlarlar. Epidermisin kalınlığı genellikle 0.5-1 mm olmakla birlikte vücudun farklı bölgelerinde değişim gösterebilir. Epidermis; Keratinosit, Melanosit ve Langerhans hücreleri olmak üzere 3 tip hücreden oluşur.

Keratinositler, cildin su geçirmez ve dayanıklı olmasını sağlayan Keratin denilen proteinini oluştururlar. Epidermisin en alt kısmında olgunlaşmamış, hızla bölünen keratinositler bulunur. Olgunlaştıkça keratinositler su kaybeder, düzleşir ve yukarı doğru hareket eder.

Yaşam döngülerinin sonunda da Stratum Korneum denilen epidermisin en üst tabakasına ulaşırlar. Stratum Korneum tabakası; ölü keratinositler, sertleşmiş proteinler (keratinler) ve lipidlerden oluşur ve de koruyucu bir kabuk oluşturur. Stratum Korneum'daki ölü hücreleri sürekli dökülür ve yerini alttan gelen yeniler alır. Deri, 3-5 haftada bir kendini tamamen yeniler.

Epidermisteki bir diğer önemli hücre grubu Melanositlerdir. Melanositler, Melanin denilen deriye rengini ve renk tonunu sağlayan proteinleri oluştururlar. Melanin, proteini cilde koyu bir renk verir ve vücudu zararlı gün ışıklarından korur. Melanin miktarı ne kadar fazla ise derinin koyuluğu da o derece artar. Langerhans hücreleri ise epidermiste immün sistemin ilk bariyer kısmıdır. Yabancı cisimlerin deriye nüfuz etmesini önler.

### **2.1.2. Dermis:**

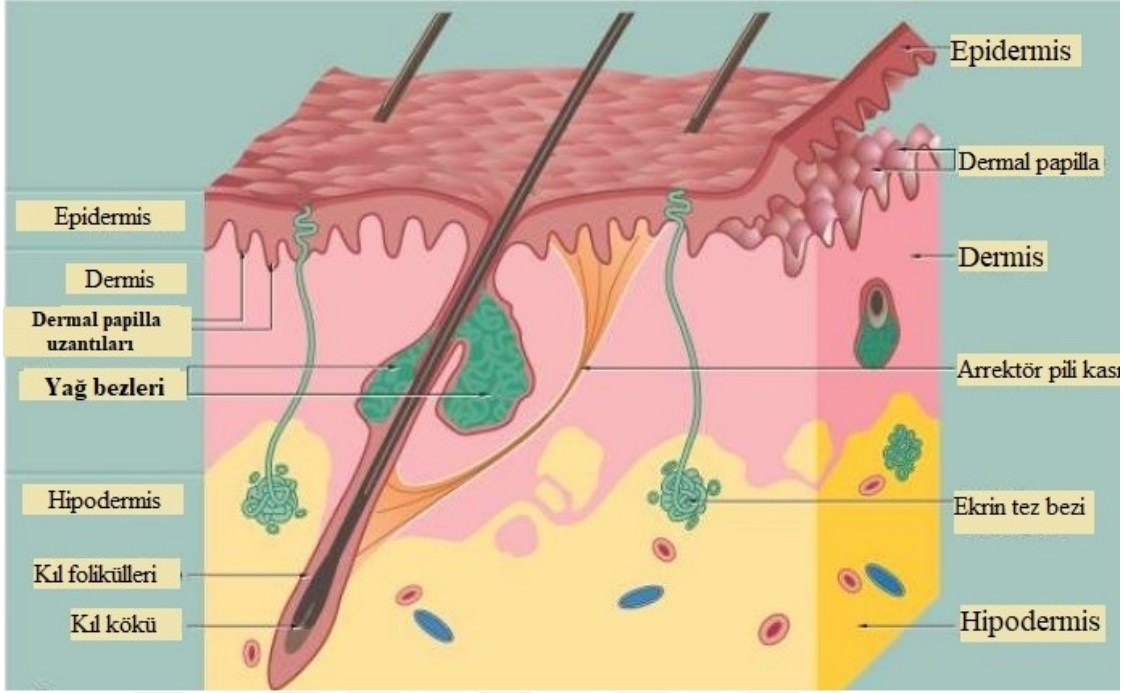
Dermis, derinin orta kısmını oluşturan tabakadır. Derinin en kalın ve en sağlam kısmıdır. Bunu sağlayan özelliği Kollajen ve Elastik liflerin sıkı bir şekilde ağ yapısı oluşturmasıdır. Kollajen proteini, deriye yapısal destek sağlarken; elastin proteini deriye esneklik sağlar. Bu iki önemli proteini ve diğer yapısal molekülleri üreten hücreler ise Dermis tabakasında bulunan Fibroblast hücreleridir. Fibroblastların işlevini doğru bir şekilde sürdürmesi, deri sağlığı için son derece önemlidir. Ayrıca kılcal damarlar ve lenf nodülleri gibi metabolik işlevleri yerine getiren yapılarda dermiste yer alır. Dermis, derinin esnekliği ve mekanik direncinden sorumludur ve ayrıca vücut sıcaklığının düzenlenmesinde yer alır. Dokunma, basınç, ağrı ve sıcaklık için duyu organları içerir. dermis ayrıca yağ bezleri, ter bezleri, kıl kökleri ve aynı zamanda sinir ve kas hücreleri içerir. Kıl foliküllerinin çevresinde bulunan yağ bezleri, sebum (yağ) ürettiği için deri sağlığı için oldukça önemlidir. Sebum yağ içerikli, cildi ve saçları yağlayıcı özelliği olan ve suya dayanıklı koruyucu bir maddedir. Sebum maddesi üretiminin az olduğu durumda deride kuruluk ve kırılgılıklarda artış görülür. Aksine aşırı üretiminde de sivilcelere sebep olur. Dermisteki diğer önemli bez ise ter bezleridir. Ter bezleri, uzun ve sarılı oyuk şeklinde hücrelerdir. Dermisteki sarılmış kısım terin üretildiği; uzun kısım ise ter bezini derinin dış yüzeyindeki gözeneklerine bağlayan bir kanaldır. Ekrin ve Apokrin bezleri olmak üzere iki farklı ter bezi vardır:

**Ekrin:** Özellikle alın, el avuç içi ve ayak tabanlarında olmak üzere vücudun her yerinde bulunur. Bezler, fiziksel egzersiz yoluyla veya çevre sıcaklığındaki artışın ve aynı zamanda duygusal stresin direkt bir sonucu olarak vücut sıcaklığındaki bir artışa yanıt olarak aktif hale gelir.

**Apokrin:** Ekrin bezlerinden daha büyüktür ve genelde koltuk altı, kasık ve meme uçlarının etrafında bulunur. Genellikle kıl follikülleri ile son bulurlar. Kıl, deride folikül (kök) ve dışarıdan gördüğümüz mil olmak üzere iki yapıdan oluşur. Mil, keratin yapısındadır. Saç milinin şekli saçın kıvrıkcık, dalgalı veya düz olup olmadığını belirler. Kıl folikülü (kök) ise deri yüzeyinin altında bulunur ve kıl kabına (bulb) doğru uzanır. Kıl kabının tabanında Papilla (küçük doku yığını) bulunur ve bu Papilla yapısı, büyüme için gerekli olan oksijen, enerji ve amino asitleri sağlayan kılcak kan damarı ağına sahiptir. Kıl, Papilla'daki keratinosit hücrelerinin hızlı bölünmeleri sonucu oluşur. Yeni hücreler oluştuğunda, eski hücreler tabandan yukarıya doğru itilir. Hücreler kendi beslenme kaynaklarından uzaklaşır ve hücreler sertleştikçe keratin haline dönüştürülür. Apokrin bezlerdeki terleme, protein ve yağ asitleri içerir; bu da daha kalın, süt veya sarımsı renkte bir sıvı açığa çıkmasına sebep olur.

### **2.1.3. Hipodermis (Subkutan):**

Dermisin altında, yağ dokusu ve yağ moleküllerinden oluşan derinin en iç kısmındaki tabakasıdır. Subkutan yağ, altta yatan dokuları soğuk ve mekanik travmadan koruyan bir amortisör ve ısı yalıtıcısı gibi işlev görür. Deri altı dokusunun kaybı, çoğunlukla yaşla birlikte karakterize şekilde yüz sarkması ve kırışıklıklara neden olur (1).



**Şekil 2-1 Derinin yapısı (1)** (Türkçeleştirilmiştir)

## 2.2. Yara

Yara, deri ya da vücudun diğer dokularının bütünlüğünün ve işlevselliğinin bozulmasıdır. Yara; kesik, çizik veya delinme sonucu oluşur. Yaranın büyüklüğü ve derinliği dokunun aldığı hasara göre değişkenlik gösterebilir. Yaranın tedavisi de aynı şekilde büyüklük ve derinliğe göre farklılık gösterebilir. Bu süreçte yara iyileşmesinin süresi de değişir. Yaralanmayı takiben doku bütünlüğü ve fonksiyonel kapasiteyi geri kazanmaya yönelik hücresel ve biyokimyasal, ince ve çok sıkı bir şekilde düzenlenmiş yanıtlar zincirine Yara iyileşmesi denir. Yara iyileşmesi, bugün cerrahi tıbbın en önemli hedefi ve temel meselesidir (9).

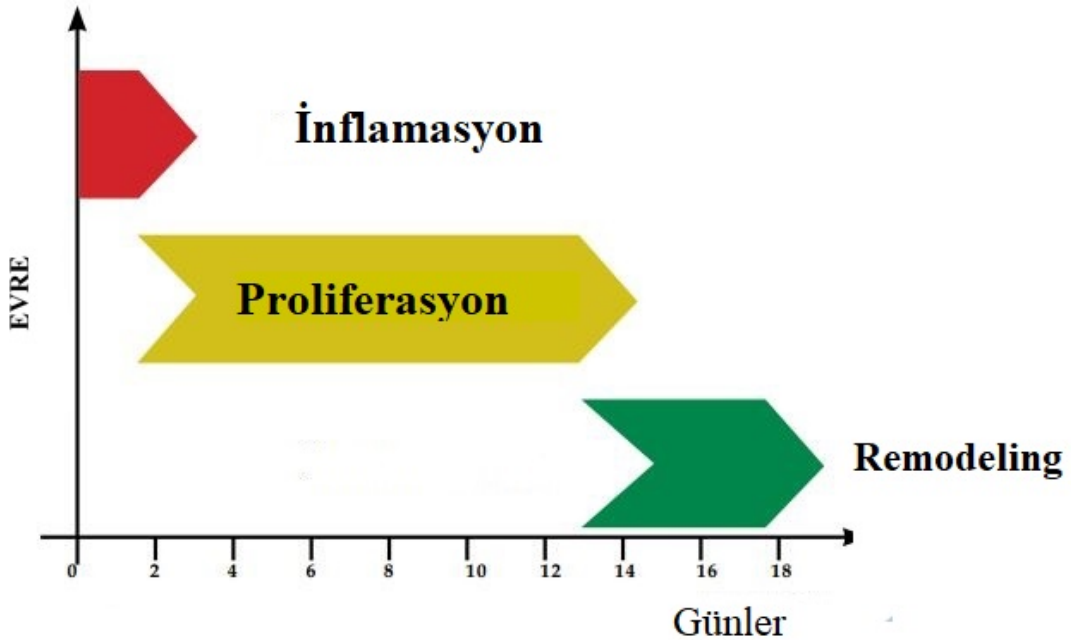
Yara iyileşmesinin tarihsel geçmişi, bir bakıma insanlığın tarihidir. En eski tıbbi el yazmalarından biri Milattan Önce 2200 yılına dayanan bir kil tabletidir. Bu tablet, yara tedavisi için yaraları yıkamak, pansuman yapmak (yarayı sıvamak) ve yarayı sarmak şeklinde belki de ilk protokolü içermektedir. Bu antik dönemlerde yarayı sıvamak terimi günümüzdeki pansuman ile eşdeğerdir ve o dönemde pansuman işlemi için çamur, kil veya bitki ve otlardan oluşan karışımlar kullanılmıştır. Farklı antik kültürlerde pansuman işlemi için farklı maddeler kullanılmıştır.

Sümerler, 19 farklı bira çeşidi; Mısırlılar, bal ve yağ; Yunanlılar ise kaynatılmış su, sirke ve şarap ile pansuman işlemini gerçekleştirmişlerdir. 18.Yüzyıla kadar yara iyileşmesinde farklı metodlar uygulansa da; asıl olarak 19.Yüzyılda antiseptik tekniklerin geliştirilmesi ile bu alanda yeni ve daha sağlıklı yöntemler kullanılmaya başlandı. 20. Yüzyılda modern yara iyileşmesinin ortaya çıkışı gerçekleşti. Günümüzde 5000'den fazla yara bakım ürünü bulunmaktadır (10).

### 2.2.1. Yara İyileşmesinin Aşamaları

Yara iyileşmesi, son derece dinamik bir süreçtir ve hücre dışı matriks moleküllerinin, çözünür mediator moleküllerin, çeşitli yerleşik hücrelerin ve sızan (infiltrating) lökosit alt tiplerinin kompleks etkileşimlerini içerir. Onarımın asıl amacı, doku bütünlüğü ve hemostazı sağlamaktır. Bu amaçla iyileşme süreci 3 aşamada gerçekleşir.

- 1) İnflamasyon (İltihaplanma)
- 2) Proliferasyon (Doku oluşumu)
- 3) Remodeling (Dokunun yeniden şekillenmesi)



Şekil 2-2: Yara iyileşmesinde yer alan aşamaların sıralı gösterimi (11) (Türkçeleştirilmiştir)

Derinin yara iyileşmesi süreci, yaralanmadan hemen sonra başlayıp yıllarca sürebilen, dinamik ve yüksek düzeyde düzenlenmiş hücresel ve moleküler mekanizmalardır. Dokunun herhangi bir etki sonucu normal anatomik yapısının bozularak normal fonksiyonunu kaybetmesi yara olarak tanımlanabilir (12).

### **2.2.2. Vasküler Tepki: Hemostaz and Koagülasyon**

Fizyolojik veya akut yara iyileşmesinin ilk aşaması hemostaz ve yaradan hemen sonra ortaya çıkan ve birkaç saat sonra tamamlanan geçici bir yara matrisi oluşumuna ayrılmıştır. Bu faz inflamatuvar süreci başlatır ve bazen geç faz olarak da adlandırılır. Bu fazda, organizmada meydana gelen yaranın iyileşme süreci için birçok hücre ve faktörlerin harekete geçirilmesi sağlanır (13). Epidermal katmana ulaşan bir deri yaralanmasında, mikroorganizmalar ve antijenleri uzaklaştırmak için kan ve lenfatik damarlar travmatize edilir (14). Bu olayın ardından pıhtılaşma basamakları başlar. Aynı anda yaralı damarlarda kan kaybını azaltmak ve oluşan doku boşluğunu sitokinler ve büyüme faktörlerinden oluşturulmuş bir kan pıhtısı ile doldurmak için trombositlerin tetiklediği 5-10 dakikalık vazokonstriksiyon olayı meydana gelir (15). Ayrıca kan pıhtısı; lökositlerin, keratinositlerin, fibroblastların ve endotel hücrelerinin migrasyonu için bir iskele yapısı olarak geçici matrisi oluşturan ve büyüme faktörlerinin bir rezervuarı olarak fibrin molekülleri olan fibronektin, vitronektin ve trombospondinler içerir (16). Vazokonstriksiyonu takiben trombositlerin önceden oluşan geçici matrisi doldurduğu vazodilasyon olayı gerçekleşir. Ardından trombositler, kemotaktik faktörlerin salınması yoluyla lökositlerin salınımını tetikler. Hem trombositler hem de lökositler inflamatuvar süreci aktive etmek için sitokinler ve büyüme faktörlerini serbest bırakır, Kollajen sentezini uyarır, fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü aktive eder, anjiyogenezi başlatır ve reepitelizasyon sürecine destekte bulunur (17).

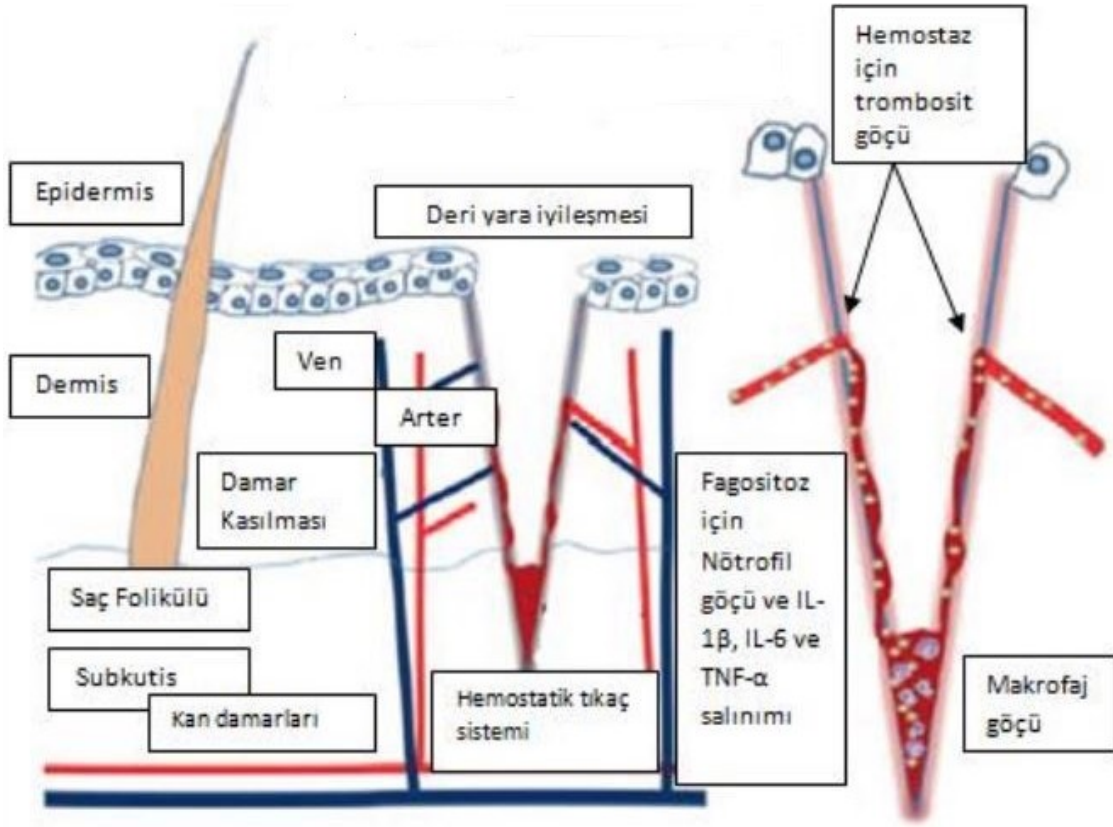


### 2.2.3. Hücresel Tepki : İnflamasyon

Yara iyileşme sürecinin inflamatuvar fazı, hemostaz ve pıhtılaşma fazı sırasında harekete geçirilir. İnflamatuvar faz, nötrofillerin yara bölgesine hareketi erken faz ve monositlerin ortaya çıkarak makrofaja dönüşümü ile geç faz olmak üzere ikiye ayrılır. Aktive olmuş İnflamatuvar yolağının, degranülasyona uğramış trombositler ve bakteriyel degradasyonun yan ürünlerine cevap amacıyla, nötrofiller yaralı bölgede konumlanır ve yaranın enfekte olmaması durumunda 2-5 gün süreyle burada bulunur.

Nötrofiller, fagositoz ve proteaz sekresyonundaki yeteneği ile yerel bakterileri yok eder ve nekrotik dokunun bozulmasına yardımcı olduğu için yaralanmanın ilk günlerinde hayati önem taşır. Ayrıca inflamatuvar fazda görev alacak diğer hücreler için kemoatraktan (kimyasal çekici) olarak işlev görürler. Nötrofiller; TNF- $\alpha$ , Interlökin-1, Interlökin-6 gibi inflamatuvar yanıtı çoğaltan mediatörleri serbest bırakır ve yeterli bir onarım yanıtı için gerekli VEGF ve Interlökin-8 mediatörlerini uyarır (18). Ayrıca *in vitro* çalışmalarda nötrofillerin, makrofajların fenotip ve sitokin profili ekspresyonunu değiştirebildiğini ve iyileşme sırasında doğal bir bağışıklık tepkisine neden olduğu gösterilmiştir (19).

Makrofajlar yaralanmadan yaklaşık 3 gün sonra yaralı bölgeye girer. Patojenlerin ve hücre parçacıklarının fagositozunu ve büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinlerin salgılanmasını sağlayarak süreci devam ettirirler (20). Makrofaj ve Nötrofiller iyileşme sürecinin sağlıklı sürmesi ve yara iyileşme sürecinin sonraki aşamasının harekete geçirilmesi için son derece önemlidir. Makrofajların konakçı savunması, inflamasyonun çözülmesi, apoptotik hücrelerin çıkarılması, hasardan sonra hücre çoğalması ve doku restorasyonunun desteklenmesi gibi birçok fonksiyonu vardır (21).



Şekil 2-3 Yara iyileşmesinde İnflamasyon evresi (23) (Türkçeleştirilmiştir)

#### 2.2.4. Proliferasyon (Çoğalma)

Proliferasyon evresi kendi içinde Reepitelizasyon, Anjiyogenez ve Granülasyon dokusu oluşumu olmak üzere 3 faza ayrılır.

##### 2.2.4.1. Reepitelizasyon (Yeniden Epitelizasyon)

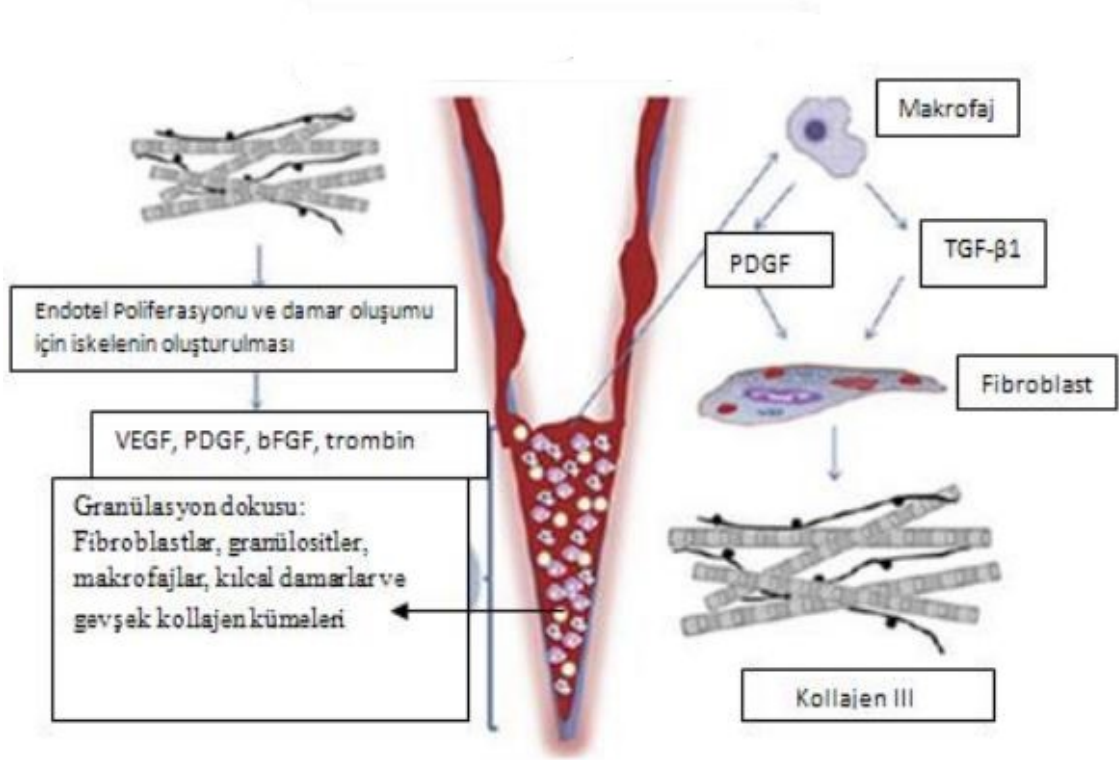
Proliferasyon evresinde, iyileşme sürecinin odak noktası yara yüzeyinin kaplanması, granülasyon dokusunun oluşması ve vasküler ağın eski haline getirilmesidir. Bu nedenle, fibrin ağı boyunca lokal fibroblastların göç etmesinin ve yara kenarlarında reepitelizasyonun başlangıcının yanında, neovaskülarizasyon ve anjiyogenez ile kılcal damarlanmanın başlaması ile aktif hale gelir (13, 14, 22, 24, 25).

IFN- $\gamma$  ve TGF- $\beta$  gibi düzenleyici sitokinlerin kontrolü altında, fibroblastlar tarafından yara iyileşmesi için gerekli olan kollajen, fibronektin ve diğer temel

maddelerin sentezi; doku boşluklarının kapatılması ve yaranın mekanik gücünün restorasyonu için yeni bir bağ doku matriksi oluşumunun temelini oluşturur. Ardından, kollajen sentezi yaranın her yerinde artarken, fibroblastların sayısı azalır ve ekstrasellüler matriksin sentezi ve bozunması arasındaki denge ayarlanır (26).

Reepitelizasyon süreci, yara kenarlarındaki lokal keratinositler ve kıl follikülleri veya ter bezlerinden alınan epitel kök hücreler tarafından sağlanır (15, 27, 28, 29). Bu süreç; EGF, KGF, IGF-1 ve NGF gibi çok sayıda farklı sitokinleri ve büyüme faktörlerini serbest bırakan yara kenarlarındaki epitel ve epitel olmayan hücrelerin sinyal yollarıyla aktive edilir. Ayrıca desmozom ve hemidesmozomlardaki kontakt inhibisyon ve fiziksel gerilimin ortadan kaldırılması, lipid araçları üretir ve membrana bağlı kinazları aktive ederek membranın kalsiyum ve iyon gibi moleküllere karşı geçirgenliğini artırır. Böylece hücrelerarası tonofilamentlerin göç yönünde geri çekilmesi ve yeniden düzenlenmesi ile yara kenarlarındaki hücrelere bir başlatıcı sinyal gönderilir.

Hücrelerarası desmozomların kollajenaz ve elastaz vasıtasıyla enzimatik olarak gevşetilmesi ile aktif keratinositler, granülasyon dokusunun üst tabakalarında önceden oluşturulmuş fibrin kan pıhtısı boyunca göç eder. Bu işleme keratinositlerin 'shuffling' (karıştırılma) denir (30). Bu işlemde yara merkezinde fibronektin zengin matriks üzerinde IL-1 gibi mediatörler aracılığı ile bir göç hareketi oluşturulur. Bu göç hareketi ekstrasellüler matrikste bulunan İntegrinler aracılığıyla yeni bir fokal adhezyon oluşumu ve sitoskeletal aktin fibrillerinin polimerizasyonu ile yara bölgesine yönlendirilir (31). Bu sitoskeletal mekanizma RhoGTPaz sinyal yolağıyla gerçekleşir. Küçük GTPazlar, fibrillerin hücre içi organizasyonu yönlendirir ve göçün sona ermesinin yanı sıra epitelizasyon sürecinin düzenlenmesi için de gereklidir. Bu süreç, göç eden hücreler birbirleri ile bağlantı kurana kadar devam eder. Ardından, GTPazlar kapatılarak hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi sağlanır. Epitelyumun karşılıklı füzyonu aktin fibrillerinin degradasyonu ile gerçekleşir ve bunun yerini hücreler arası adherens bağlantıları alır ve nihayetinde bir fermuar gibi yarayı kapatır (32).



Şekil 2-4 Yara iyileşmesinde proliferasyon evresi (23) (Türkçeleştirilmiştir)

#### 2.2.4.2. Anjiyogenez (Vaskülerizasyon)

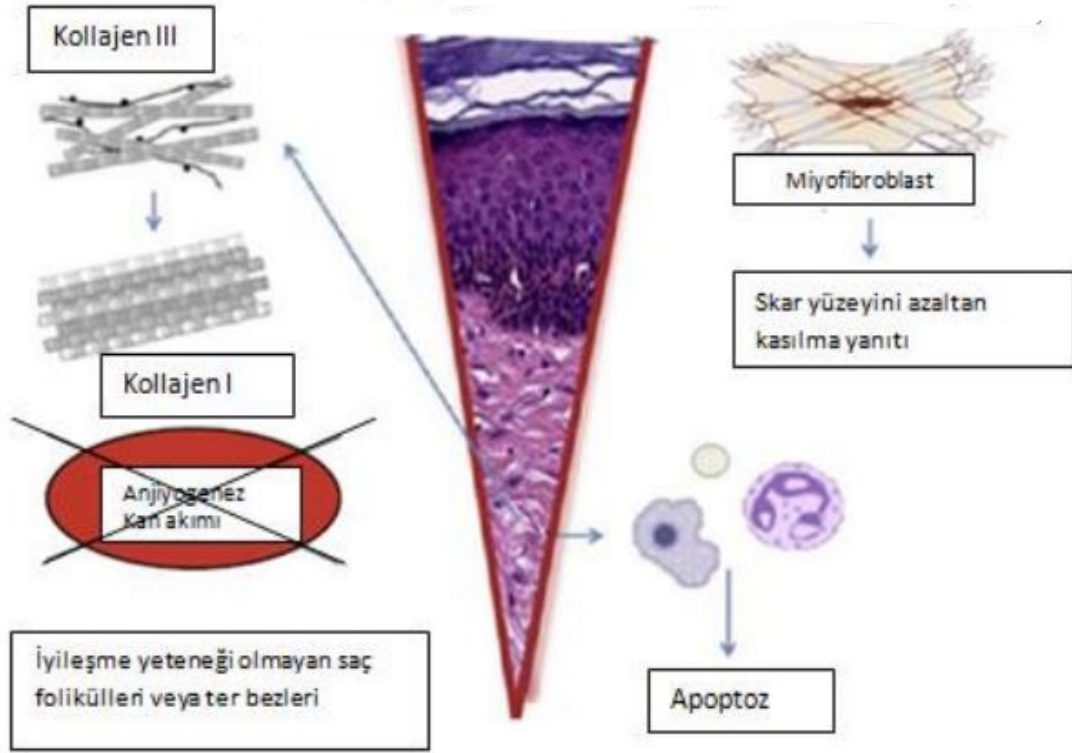
Derinin vasküler sisteminin restorasyon süreci daha karmaşıktır. Yara bölgesinde hücresel, moleküler ve humoral sistemin sentezi ile gerçekleşir. Başlatıcı elemanlar (örnek olarak VEGF, PDGF, bFGF ve serin proteaz trombini gibi) büyüme faktörleridir. Yeni damar oluşumundaki ilk adım, büyüme faktörlerinin mevcut damarların endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasıdır. Böylece hücre içi sinyalleşme basamakları harekete geçirilir. Aktive edilmiş endotel hücreleri, bazal laminayı eriten proteolitik enzimleri salgılar. Böylece endotel hücreleri çoğalıp; yaraya göç edebilir hale gelir. Endotel hücreleri, kendilerini İntegrin gibi yüzeysel adezyon moleküllerine yönlendirir. Ayrıca endotel hücrelerin çoğalması için matriks metalloproteinazlar serbest kalarak doku çevresini lizize uğratırlar. Endotel hücrelerinin yara bölgesinde çoğalması ile küçük kan damarları oluşur. Ardından bu yeni damarlar arter ve venüllere farklılaşarak; düz kas hücreleri ve perisitlerin damar duvarında birikip kararlı bir yapı oluşturmasıyla olgunlaşırlar. Yenilenen damarlarda kan akışının başlamasıyla anjiyogenik süreç tamamlanır (33).

### 2.2.4.3. Granülasyon Dokusu oluşumu

Proliferasyon evresindeki son adım akut granülasyon dokusunun gelişmesidir. Aynı zamanda remodeling aşaması için başlangıç sürecidir. Bir geçiş dokusu olarak fibrin/fibronektinden oluşan geçici yara matriksinin görevi tamamlanır ve olgunlaşmayla bir skar (yara izi) meydana gelir (34). Bu süreçte yara bölgesinde yüksek yoğunluklu fibroblastlar, granülositler, makrofajlar, kılcal damarlar ve gevşek şekilde düzenlenmiş kollajen demetleri görülür. Yüksek miktarda hücresel bileşenler içerdiği için bu bölgeye Granülasyon dokusu denir. Anjiyogenez süreci tamamen bitmediği için bu bölge son derece vaskülerdir ve herhangi olumsuz bir etkide yeniden travmatik bir durum söz konusu olabilir. Granülasyon evresindeki baskın olan hücre grubu, Kollajen ve Ekstrasellüler matriks maddeleri (Fibronektin, Glikozaminoglikanlar, Proteoglikanlar ve Hyalüronik asit) üretimi gibi farklı fonksiyonları yerine getiren fibroblastlardır (35, 36). Fibroblastlar aracılığıyla ekstrasellüler matriks oluşumu, hücre adezyonu için bir iskelet sağlar ve içindeki hücrelerin büyümesi, hareketi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (30). Fibroblastlar, geçici yara matriksi görevinin sonlandırılıp, bu bölgeye yerleşecek hücrelerin migrasyonu ve düzenlenmesinde öncüdür. Bu evrenin sonunda olgunlaşan fibroblastların sayısı, miyofibroblast farklılaşmasıyla azaltılır ve ardışık apoptoz ile sonlandırılır (37).

### 2.2.5. Remodeling (Yeniden şekillenme)

Remodeling (Yeniden şekillenme), yara iyileşmesinin son aşamasıdır ve yaralanmadan sonraki 21. günden 1 yıla kadar sürer. Yaranın olgunlaşması sırasında Ekstrasellüler matriks bileşenleri belirli değişiklikler geçirir. Yeniden şekillenme evresinde kollajen sentez ve yıkımı bir denge noktasına ulaşır. Proliferasyon evresinde artan fibroblastlar kollajen sentezleyerek yara bölgesinde birikime neden olur. Proliferasyon evresinde üretilen Kollajen 3' ün yerini daha kuvvetli olan Kollajen 1 alır.



**Şekil 2-5 Yara iyileşmesinde yeniden şekillenme evresi (23) (Türkçeleştirilmiştir)**

Kollajen yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinaz (MMP) enzimidir. MMP yarada fibroblast, makrofaj ve nötrofiller tarafından üretilir. Fibroblastlar tarafından yeniden sentezlenen kollajen daha düzenli ve epitele paralel şekilde dizilir. Yara iyileşirken, fibroblast ve makrofajların yoğunluğu azalır. Zamanla kılcal damar büyümesi durarak yara bölgesinde kan akışı ve metabolik aktivite azalır. Böylelikle kan damarları ve hücrelerin sayısı azalırken, direnci artmış bir skar dokusu oluşur. (38).

### 2.3. PRP (Trombositten Zengin Plazma)

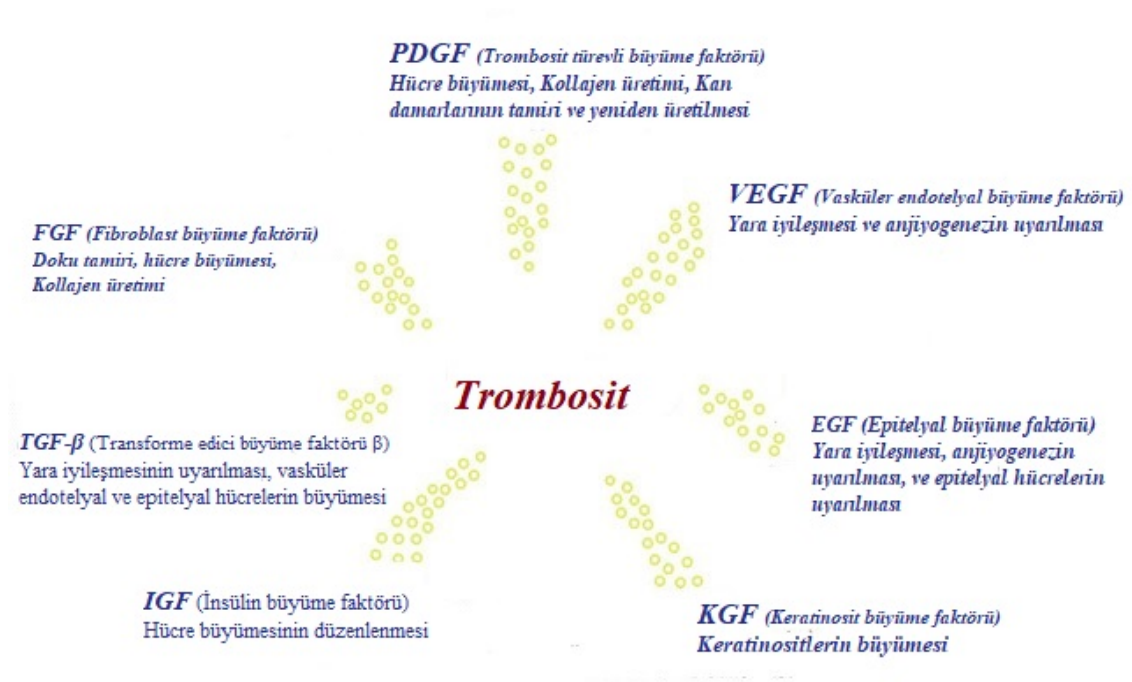
#### 2.3.1. Trombosit (Platelet)

Trombositler, beyaz kan hücrelerinin bir tipi olan megakaryositlerin sitoplazmik fragmanlarıdır. Yaklaşık olarak 2  $\mu\text{m}$  çapında, yuvarlak veya oval şekilli olup, kemik iliğinde üretilirler (39). Çekirdeksiz hücreler olup makrofajlar aracılığıyla 7 ila 10 gün içinde dolaşımdan uzaklaştırılır. Çekirdekleri olmamasına rağmen aktif hücrelerdir.



Yaşamları süresince büyüme faktörleri sentezleyerek, bunları pıhtılaşmaya yanıt olarak aktif bir şekilde harekete geçirirler (40). Plateletler, yara iyileşmesinin en başından itibaren işlev görmeye başlarlar. Hemostazda ve yara iyileşmesinde kritik rol üstlenirler. Yara yerinde istirahat halinde diskoid (disk şeklinde) şekilde bulunan plateletler, trombin ile aktive olmaları sonucunda şekil değiştirerek psötopod adı verilen uzanımlar gösterirler. Aktif plateletler  $\alpha$ -granüllerinde bulunan pıhtılaşma ve büyüme faktörlerini ortama salarlar. Büyüme faktörleri membran reseptörlerine bağlanan ve çeşitli biyolojik yolların başlatıcısı olan küçük peptidlerdir. İyileşme sürecinde büyüme faktörlerinin hücre regülasyonunda, farklılaşmasında, proliferasyonda, kemotaksiste, anjiogenezde ve matriks sentezinde önemli etkileri vardır (41).

Trombositlerden çok sayıda büyüme faktörü salgılanmaktadır. Bunlar Trombosit Türevli Büyüme Faktörü (PDGF), Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF), Trombosit Faktör 4, Trombosit Türevli Anjiyogenez Faktörü (PDAF), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Epitelyal Hücre Büyüme Faktörü (ECGF), İnsülin Büyüme Faktörü (IGF), Osteokalsin (Oc), Osteonektin (On), Fibrinojen (Ff), Vitronektin (Vn), Fibronektin (Fn), Trombospondin-1 (TSP-1) (42,43).



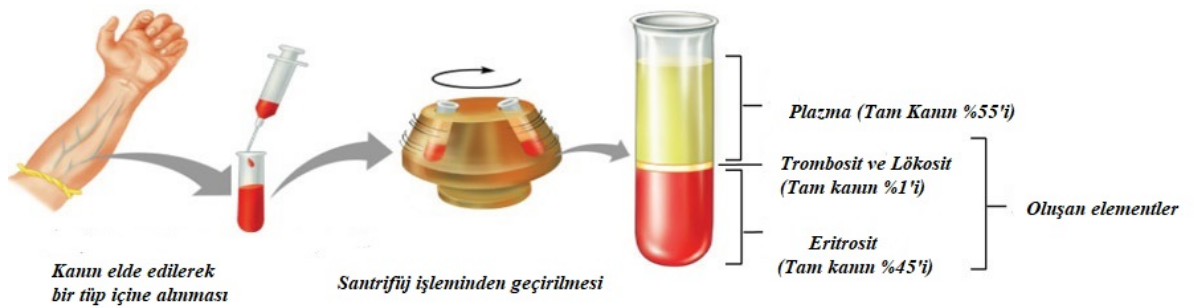
**Şekil 2-6 Trombositlerden salgılanan bazı büyüme faktörleri (44)** (Türkçeleştirilmiştir)

### 2.3.2. Plateletten Zengin Plazma (PRP)

Yara iyileşmesi, moleküler sinyaller tarafından kontrol edilen mediatörlerin ve hücresel olayların birbirleriyle etkileşim içinde olduğu kompleks bir olaydır. Sonuçta mezenkimal hücre proliferasyonu, ekstraselüler matriks ve skar oluşumu ile sonuçlanır. Yara iyileşmesindeki moleküler sinyaller, primer olarak sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından verilmektedir. Trombositlerin, özellikle içerdikleri büyüme faktörlerinin, hemostaz ve iyileşmede temel rol oynadıkları gösterilmiştir (45).

PRP, otolog insan trombositlerinin az miktarda bir plazma içinde konsantre edilmiş şeklidir. İlk kez Marx ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Normalde plazmanın hücresel komponenti; %93 eritrosit, %6 platelet ve %1 lökositten oluşur. PRP'de ise tam kana göre 3 ila 5 kat daha yüksek oranda platelet bulunur. PRP olarak tanımlanabilecek plazma için, genel olarak kabul edilmiş net bir platelet konsantrasyonu değeri yoktur. Ancak tam kanda 150 000/ $\mu$ l ile 350 000/ $\mu$ l kadar bulunan plateletlerin sayısının, 5 ml plazmada 1 000 000/ $\mu$ l üzerinde olduğu zaman iyileşmeyi artırıcı etkisinden bahseden çalışmalar bulunmaktadır. Yara iyileşmesini artırmak için daha düşük konsantrasyonlara güvenilmemekle birlikte daha büyük konsantrasyonların yara iyileşmesini daha da arttırdığı henüz gösterilmemiştir (46).

Periferik kanın antikoagulanlı tüplerde belirli hız ve sürede santrifüj edilmesiyle izole edilen trombositten zengin kısma plateletten zengin plazma (PRP-Platelet Rich Plasma) denir. Santrifüj sonrasında tüpte oluşan kan içeriğinin % 1 lik kısmı PRP'dir (47).



Şekil 2-7 PRP'nin tam kandan elde edilişi (48) (Türkçeleştirilmiştir)



### 2.3.3. PRP içeriği ve avantajları

Periferik kandan elde edilen PRP, içeriğindeki granüllerin degranülasyona uğraması sonucu aktif hale gelir ve büyüme faktörleri açığa çıkmaya başlar. PRP içerisinde depolanmış olan büyüme faktörlerinin % 70'i ilk 10 dakika içerisinde; kalan kısmı da ilk bir saat içerisinde salınır. 8 gün boyunca plateletler işlevini yerine getirip yok olana kadar ekstra salınım olur. Ancak PRP'nin pıhtılaştırılması yalnızca kullanım anında (hazırlanıldığı anda) yapılmalıdır. PRP, bir aşı şeklinde kemik içine enjekte edilerek, uygulanacak yara bölgesine tabaka şeklinde uyarlanarak nakledilerek, sprey şeklinde yumuşak doku yüzeyine püskürtülerek ya da direkt olarak deri üzerine aşı şeklinde uygulanabilir (46).

PRP, tedavi uygulanacak kişinin kendi kanından elde edilen bir yan ürünü olduğu için güvenlidir. Bu nedenle, hastanın tedavi olduğu tıbbi merkezin koşullarından kaynaklı olmadığı sürece enfeksiyon riski yoktur. Herhangi bir immün redde sebep olmaz. Yara, PRP'nin içeriğindeki yoğun büyüme faktörleri ve sitokinler ile rutin iyileşme sürecindekinden daha fazla faktörlere maruz kalacağından daha hızlı iyileşme sağlar. Böylece büyüme faktörleri doku sentezinde artışa ve dolayısıyla daha hızlı doku rejenerasyonu sağlar. PRP'nin elde ediliş, hazırlanışı ve uygulanışı kolaydır (49). PRP, sahip olduğu yüksek platelet konsantrasyonu nedeniyle hiperfizyolojik oranda büyüme faktörü içerir. Bu özelliği ile tendon, ligament, kıkırdak ve kas yaralanmalarında iyileşme sürecini hızlandırıcı etkisi hayvan deneylerinde gösterilmiştir (41).

### 2.3.4. Trombosit lipidleri

Lipidler düşük moleküler ağırlıklı, tipik olarak hidrofobik ve amfipatik moleküllerdir. Tüm hücre tiplerinde bulunur. Ya endojen olarak üretilirler ya da diyet kaynaklarından hücrelere dahil edilirler. Lipidlerin oluşum ve metabolizması, fosfolipazlar, lipid sentetazlar, ligazlar, oksidazlar / redüktazlar ve taşıyıcıları içeren hücresel proteinler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Lipidler, hücre yapısına katılma, enerji depolama ve sinyal verme gibi üç ana görevi yerine getirir.

Lipidler, trombositlerde önemli yapısal ve sinyal rolleri olan biyomoleküllerdir. Lipidlerin oluşumu ve metabolizması, enzimler ve sinyal yolları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve bunların düzensizliği durumunda; trombositlerin işlev görmesinde kusurlara yol açar. Trombositlerin aktivasyonu, membran lipidlerindeki değişiklikler ve hemostazda rol oynayan çeşitli biyoaktif lipidlerin oluşumu ile ilişkilidir. Son yıllarda, lipidlerin yeni nesil kütle spektrometresi ile analizi, bu moleküllerin önemli hücresel süreçlere nasıl katıldığı konusundaki anlayışı değiştirmeye başlamıştır. Daha önceki çalışmalarda, lipidlerin agregasyon, şekil değişimi, pıhtılaşma ve degranülasyon gibi trombosit biyolojisinin anahtar yönlerini nasıl düzenlediği ve plateletlerin oluşturduğu lipidlerin lökositler ve damar duvarı gibi diğer hücreleri etkileyerek hemostazı, vasküler bütünlüğü ve iltihaplanmayı nasıl düzenledikleri gösterilmeye çalışılmıştır.

Tüm memeli hücrelerinde olduğu gibi, trombositlerde de yapısal lipidler fosfolipidlerdir. Fosfolipidler, diğer hücre membranlarında olduğu gibi trombosit membranlarında da hidrofobik ve hidrofilik kısımlarını kendileri düzenleyerek membran yapısını oluştururlar. Lipidlerin temel olarak yeniden şekillenmesi, trombosit aktivasyonu sırasında ortaya çıkar ve şekil değişikliği, yayılma, mikro-vezikül oluşumu ve degranülasyon gibi biyoaktif pro-trombotik türlerinin üretilmesi gibi trombosit membranlarında önemli yapısal değişikliklerle birlikte görülür. Trombosit membranları, sfingomiyelinler (SM) ve lipid salları olarak adlandırılan özel sinyallerle işaretli serbest kolesterollerce zengindir (50).

Trombositlerde bulunan lipidler genel olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır:

#### **2.3.4.1. Aminofosfolipidler**

Tüm memeli hücrelerinde olduğu gibi trombositlerde de en bol miktarda bulunan fosfolipidlerdir. Trombosit total fosfolipidlerinin yaklaşık % 40'ını oluşturan Fosfatidilkolin (PC) ve % 28'ini oluşturan Fosfatidiletanolamin (PE)'dir. Kalan kısım ise %18 oranında Sfingomiyelin (SM), %10 oranında Fosfatidilserin (PS) ve yaklaşık % 3-5 oranında Fosfatidilinositol'den oluşur (51,52).

1970'lerin ortasında, kimyasal etiketleme veya eksojen fosfolipazlar kullanılarak yapılan çalışmalar, trombosit fosfolipidlerinin sitoplazmaya bakan Aminofosfolipidleri (aPL) olan Fosfatidiletanolamin (PE) ve Fosfatidilserin (PS) ile dışa bakan Fosfatidilkolin (PC) ve Sfingomiyelin (SM)'nin plazma membranının çift tabakaları arasında asimetrik olarak dağıldığını belirledi. Uyarılma esnasında Aminofosfolipidler (aPL), Prokoagülant veya trombojenik bir yüzey oluşturarak dışa vurulur (53). Ancak hücre içi sinyalleşme için gereken lipidler, iç yüzey lipidlerinden üretilir. Dolayısıyla fosfolipidler, trombosit sinyal mediatörleri üreten enzimler için substrat depolarıdır (54).

#### **2.3.4.2. Fosfatidilinositol**

Fosfatidilinositoller (PI), bir inositol başlık grubu içeren birbirleriyle ilişkili birkaç türden oluşur. Bu lipidler, enzimler tarafından sıkı şekilde kontrol edilen inositol başlık grubunun geri dönüşümlü fosforilasyonu yoluyla, sağlık ve hastalık durumunda hücre sinyalleşmesinde önemli roller oynar. Fosfoinositid PI (4,5) P<sub>2</sub>, (i) fosfodiester bağının tersinmez bölünmesi ve (ii) inositol başlık grubunun tersinir fosforilasyonu olmak üzere iki ayrı yolla reseptör aktivasyonuna yanıt olarak metabolize olur. Sonrasında, PI 3-kinaz yolağının, PI (3,4,5) P<sub>3</sub>'ün (veya PIP<sub>3</sub>'ün) ve önceki iki ikincil haberci DAG (1,2-diaçilgliserol) ve İns (1,4,5) P<sub>3</sub>'ün ana ürününü üretir. DAG protein kinaz C'yi aktive ederken; İns (1,4,5) P<sub>3</sub> ise hücre içi Ca<sup>2+</sup> + 'yı harekete geçirir (55,56).

#### **2.3.4.3. Yağ asitleri, Eikozanoidler ve ilişkili türler**

Trombositlerin aktivasyonda ilk önemli tepkisi, Gliserofosfolipidlerin (PL)'lerin sn<sub>2</sub> (2. Karbondaki ester bağı) bağından yağ asitlerini ayıran sitozolik fosfolipaz A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>a) izoformları da dahil olmak üzere birçok fosfolipazın devreye sokulmasıdır (57). Yapılan çalışmalar, açığa çıkan belirgin yağ asitlerinin Araşidonik asit, Lineloik asit, Palmitik asit ve Stearik asit olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, sinyalleşmede en önemli olanı Araşidonik asittir. Araşidonik asit, LOX ve COX enzimleri üzerinden, eikozanoide oksidatif dönüşümün öncüsüdür.

Trombositlerde, Ca<sup>2+</sup>'a duyarlı ve duyarsız formları içeren birkaç PLA<sub>2</sub> izoformları bulunur. Genelde Ca<sup>2+</sup> duyarlı cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , eikozanoid üretimi için Araşidonik asit kaynağıdır. Ayrıca PLA<sub>2</sub> izoformlarının genetik eksikliğinin, insanlardaki

trombosit disfonksiyonuyla birlikte önemli ölçüde bozulmuş trombosit eikozanoid oluşumuna yol açtığını göstermiştir (58).

#### **2.3.4.4. Lizofosfolipidler (LysoPL) ve Lizofosfatik asit (LPA):**

Lizofosfolipidler ve Lizofosfatik asit, fosfolipazlardan (ya PLA2, ya PLD) ya da 1,2-diaçilgliserol'ün fosforilasyonu yoluyla fosfolipidlerden üretilir. Nonenzimatik olarak da üretilebilirler, ancak şu anda bunun trombositlerde olduğunu gösteren bir kanıt bulunmamaktadır (59).

#### **2.3.4.5. Nötral lipidler; Gliseridler, Kolesterol Esterleri ve serbest kolesterol**

Bu tür lipidlerden trombositlerde çok az miktarda bulunur. Bunlar arasında en bol miktarda ise Kolesterol (% 90'dan fazla) bulunur. Gliseridler, TAG'ları ve DAG'ları içerir. TAG'lar nötral lipidlerin yaklaşık olarak % 2'sini temsil eder. Dinlenme halindeki hücrelerde az miktarlarda bulunmakla birlikte; DAG, PLC'nin etkisi ile trombosit aktivasyonu sırasında oluşur ve protein kinaz C'nin klasik ve yeni izoformlarını harekete geçirir. Dolayısıyla DAG, trombositlerin reseptöre bağlı aktivasyonu ile ilgili önemli bir ikincil habercidir (60).

#### **2.3.4.6. Sfingolipidler ve Seramidler**

Sfingolipid'ler (SP), en basitleri seramid olan; sfingozin ve bir yağ asitinden oluşan sfingoid baz omurgasını içeren bir lipid sınıfıdır. Trombositlerdeki rolleri belirsiz olsa da hem dinamik membran işlevlerine (örneğin, lipid salınma bağlı sinyal verme) hem de hücre içi sinyal iletilicileri olarak görev yapmaktadırlar (61). Sfingozin, kendisine özgü sfingozin kinaz 1 ve 2 tarafından fosforile edilerek Sfingozin-1-fosfat (S1P) oluşturulur. Bu da özgül G proteinine bağlı reseptörler aracı ile vasküler gelişim, karsinogenez, kemotaksis ve proliferasyonu etkileyebilir (62).

S1P, trombositlerde sfingozin kinazın etkisi ile üretilir ve depolanır. Daha sonra serumun kuvvetli anjiyojenik aktivitesine katkıda bulunan degranülasyonda salınır (63).

## 2.4. Büyüme faktörleri ve Sitokinler

Büyüme faktörleri, otokrin, parakrin veya endokrin yollarla hücre aktivitelerini kontrol eden moleküllerdir. Biyolojik fonksiyonlarını spesifik reseptörlere bağlanıp sinyal yollarını aktive ederek gerçekleştirirler. Bu şekilde çekirdekte gen transkripsiyonunu düzenler ve nihayetinde biyolojik bir cevap oluşturulmasını sağlarlar. Bir büyüme faktörü veya sitokin, farklı hücre tipleri üzerinde çeşitli fonksiyonlara sahip olabilirken, farklı büyüme faktörü veya sitokinler, bazı hücrelerde benzer veya örtüşen fonksiyonlar gerçekleştirebilir. Büyüme faktörleri ve sitokinler, hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz, immünolojik veya hematopoietik yanıt, morfogenez, anjiyogenez, metabolizma, yara iyileşmesi ve yetişkin organizmalarda doku homeostazisinin muhafaza edilmesi gibi çok çeşitli fizyolojik süreçleri etkiler. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin anormal üretimi veya regülasyonu, kanser, karaciğer fibrozu ve bronkopulmoner displazi gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir. Tarihsel olarak büyüme faktörlerinin, hücre büyümesi ve proliferasyon üzerinde pozitif bir etkiye sahip olan biyolojik parçalar olduğu düşünülürken, sitokinlerin tipik olarak bir immünolojik veya hematopoietik cevaba sahip olduğu düşünülmüştür. Ancak, farklı araştırmalar bir araya getirildiğinde, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin benzer işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (64, 65, 66).

Sitokinler, inflamasyon ve bağışıklık üzerinde karmaşık bir düzenleyici etkiye sahip; molekül ağırlığı 30 kDa'dan az olan küçük glikoproteinlerdir. Bağışıklık ve inflamatuvar yanıtın gelişmesinde hematopoietik hücreler, lenfoid hücre ve çeşitli pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar hücreler bulunur. Sitokinler, bu hücrelerin kompleks etkileşimlerine aracılık ederler.

Sitokinler, bağışıklık sistemindeki hücrelerarası habercilerdir ve farklı vücut bölmelerindeki birkaç hücre tipinin işlevini tutarlı bir bağışıklık yanıtına dönüştürür. Yıllar geçtikçe evrilmiştir ve şimdi interferonlar, interlökinler, kemokin ailesi, mezenkimal büyüme faktörleri, tümör nekroz faktörü ailesi ve adipokinler olarak kısımlara ayrılmıştır. Daha önce çözünür faktörler olarak bilinen sitokinler, eritrositler dışında her hücreden üretilir ve bu hücreler için bir yanıt oluşturur.

Hedef hücrelerin zarlarında, sinyal iletimi ve düzenleyici işlevleri için özel reseptörlere sahiptirler. Doğumsal ve adaptif bağışıklığın ötesinde sitokinler; hücre farklılaşması, inflamasyon, anjiyogenez, tümörgenez, nörobiyoloji, viral patogenez gibi birçok farklı fonksiyonda önemli bir role sahiptir (67).

Bugüne kadar yaklaşık 200 sitokin tanımlanmıştır. Sitokinler, yüksek dereceli  $\alpha$  sarmal yapısına sahiptirler ve bu moleküller, dört  $\alpha$  sarmal demeti ile benzer bir polipeptit kat içerir (68).

Sitokinler, salgılanma amaçlarına göre, Lenfokinler (T hücreleri tarafından salgılanan ve bağışıklık tepkisini düzenleyen sitokinler), proinflamatuvar sitokinler (iltihaplanma sürecini güçlendiren ve sürdüren sitokinler), büyüme faktörleri (hücre sağkalımını teşvik eden ve yapısal değişikliklerle sonuçlanan sitokinler) kemokinler (iltihaplı hücreler için kemotaktik olan sitokinler) ve anti-inflamatuvar sitokinler (iltihaplanma tepkisini negatif olarak modüle eden sitokinler) olarak sınıflandırılmışlardır (69).

Sitokinler, hedef hücrelerin membranlarında bulunan reseptörler aracılığıyla çeşitli biyolojik etkiler yaparlar. Bu reseptörlerin bir hücre dışı alanı, bir sitoplazmik alanı ve bir de tek bir zara yayılmış alanı bulunur. Hücre dışı alanda korunmuş amino asit dizi motifleri bulunur ve bu motifler dört korunmuş sistein kalıntısı içerir. İki polipeptit zinciri bulunur. Birincisi sitokine spesifik olan  $\alpha$  altbirimi ve diğeri de sinyal dönüştürücü  $\beta$  altbirimidir. Sitokinlerin bağlandığı hedef hücrenin doğası spesifik membran reseptörlerinin varlığı ile belirlenir. Sitokinler ve reseptörleri birbirleri için çok yüksek bir afinite gösterirler. Otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gösterir ve hücreler haberleşmeye aracılık ederler. İmmün yanıtın yoğunluğu veya süresi, çeşitli hücrelerin aktivasyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını uyararak veya inhibe ederek ve nitelikli antikörlerin veya diğer sitokinlerin salgılanmasının düzenlenmesiyle ayarlanır. Sitokinlerin reseptörlere bağlanma üzerindeki fizyolojik tepkileri, hücreler ve humoral bağışıklık tepkisinin gelişimi, inflamatuvar cevabın indüksiyonu, hematopoezin düzenlenmesi, hücreler proliferasyonunun kontrolü ve farklılaşma ve yara iyileşmesinin indüklenmesini içerir. Bunun dışında, sitokinler çoğu zaman diğer sitokinlerin sentezlenmesine yol açarak, bu sitokinleri salgılayan eski sitokinlerin aktivitesini etkilediği bir aktivite yolağı meydana getirir. Sitokinler, kandaki kısa ömürleri ve hücre dışı sıvılar nedeniyle çok sınırlı bir süre çalışırlar (70).

### 2.4.1. Kemokinler

Kemokinler, tüm immün hücrelerin göç düzenlerini ve konumlarını kontrol eden kemotaktik sitokinlerdir (71). Bilinen kemokinlerin çoğu primer yapılarında korunmuş olan iki sistein (C) (sistein) motifinin konfigürasyonuna göre iki büyük ailede sınıflandırılmışlardır:  $\alpha$ -kemokinlerde (C-x-C) iki sistein farklı bir aminoasitle (x) birbirinden ayrılırken;  $\beta$ -kemokinlerde (C-C) iki sistein yanyana yer alır (72).

$\alpha$ -kemokinlerin çoğu nötrofiller üzerinde aktivite gösterdikleri için akut inflamatuvar reaksiyonlarda önemli mediatörlerdir.  $\beta$ -kemokinler ise monositler, T-lenfositler, eozinofiller, bazofiller üzerinde etkilerini gösterir ve özellikle kronik inflamasyonda, parazit infeksiyonlarında ve allerjide rol alırlar. Kemokinlerin ekspresyonu, IL-1, IL-2, IFN-g ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu ile artar. Ekspresyonu artan kemokinler ise inflamasyon bölgesine bütün lökosit türlerini çekme yeteneğine sahiptirler. Bunu, kısmen lökositlerin yüzeyindeki integrinlerin ekspresyonunu arttırarak ve böylece lökositlerin damar endoteline bağlanmasını ve doku invazyonunu arttırarak sağlarlar. Kemokinler fonksiyonlarını, hücre membranındaki kemokin reseptörlerine bağlanarak ve onları aktive ederek gösterirler. Aktivasyon hücre sinyal iletim mekanizmalarından  $Ca^{2+}$  metabolik yolunu kullanır (73).

### 2.5. Ekstraselüler Matriks (ECM)

Ekstraselüler matriks, bağ dokularındaki hücreleri destekleyen ve çevreleyen bir protein ve karbonhidratlar ağıdır. Yapısal-mekanik fonksiyonlarının yanı sıra ECM molekülleri çeşitli hücre fonksiyonları düzenler ve embriyonik gelişim, inflamasyon, yara iyileşmesi, hemostaz, çeşitli organların fibrozisi, tümör büyümesi, metastaz ve anjiyogenez gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynarlar. ECM moleküllerinin hücrelerle etkileşimi, integrinler dahil olmak üzere hücre-matriks reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilir. ECM statik değildir: sürekli olarak yeniden düzenlenir.

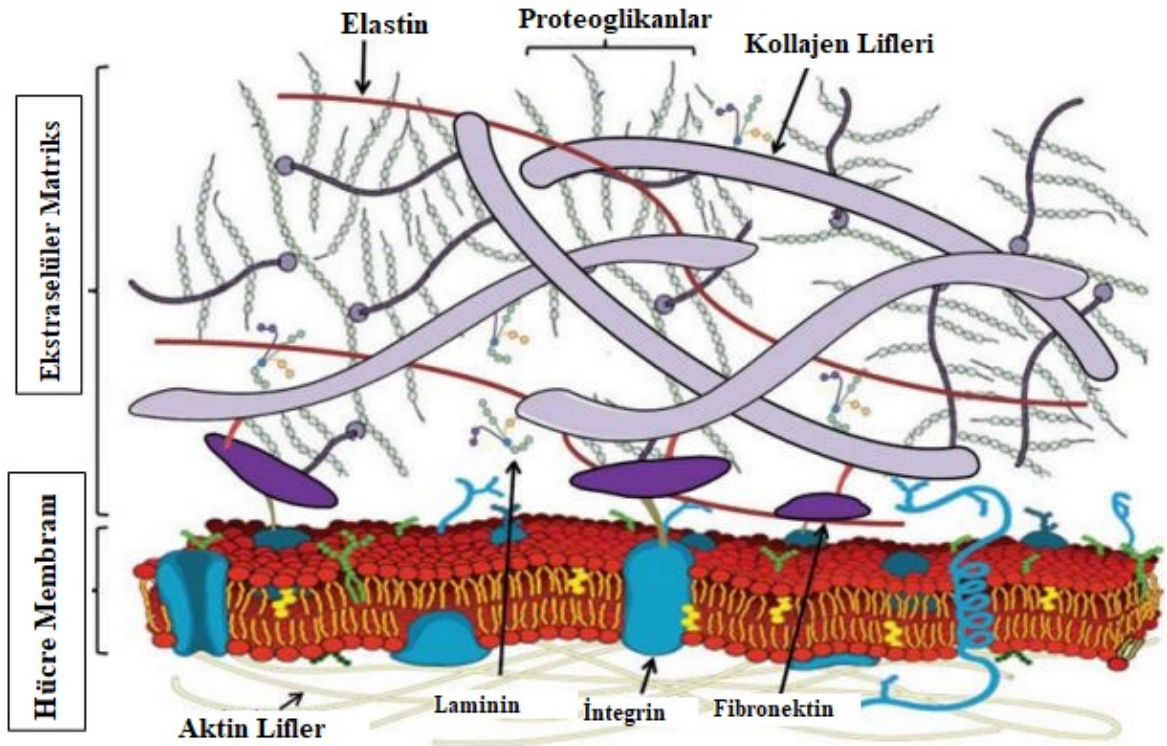
ECM bileşenleri, yara iyileşmesinin her fazında görev alırlar. Hücreler ve büyüme faktörleri ile etkileşerek, sonuçta yara kapanmasına neden olan dinamik bir alış veriş sürecinde rol oynarlar. Daha spesifik olarak, ECM bileşenleri hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmada, hücre göçünü yönlendirmede ve hücre tepkileri modüle etmede anahtar rol oynar. ECM işlevini kaybettiğinde (Örneğin; iyileşmesi zor veya kronik yaralarda) yara iyileşmesi yavaşlatılır veya durur (74, 75, 76).

ECM'nin protein yapısı Elastin ve Kollajen'den oluşur. Deride en bol bulunan kollajen tipleri Kollajen 1 ve 3 olup yapı, kuvvet ve bütünlük sağlar. ECM'de bulunan bir başka protein olan elastin ise deri ve dokulara esneklik sağlar (77). ECM, fibronektin, laminin ve vitronektin denilen hücre tutucu glikoproteinleri içerir. Bu hücre tutucu glikoproteinler, ECM'nin hücrelerine ve birçok bileşenine bağlanarak büyüme faktörü aktivitesi için modülatörler olarak işlev görür. Hücreler, integrin adı verilen hücre yüzeyi reseptörleri yoluyla tutucu glikoproteinlere bağlanır (78).

ECM'deki diğer bileşenler glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve matriselüler proteinlerdir. Glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar, düz polisakkarit zincirleri arasında hiyalüronik asit, dermatan sülfat, kondroitin sülfat, heparin, heparan sülfat ve keratan sülfat bulunur. Glikozaminoglikanlar yapılarına büyük miktarlarda su çekerler ve bu da ECM'nin sıkıştırma kuvvetlerine karşı direnç göstermesine olanak sağlar. Ayrıca Glikozaminoglikanlar, yüksek su içeriği sebebiyle hücre göçüne, besin ve diğer maddelerin alış verişine olanak sağlar. Çoğu glikozaminoglikan, proteoglikanları oluşturmak için bir protein çekirdeğine bağlanır. Glikozaminoglikanlar, ECM'deki proteinler (tutucu protein fibronektin gibi) ile etkileşirler. Bu etkileşim yoluyla glikozaminoglikanlar, proteinleri belirli yerlerde sabitler ve biyolojik aktivitelerini etkiler. Proteoglikanlar büyüme faktörleri için ortak reseptörler olarak görev yaparlar. Hücre sinyali katılırlar ve diğer birçok molekülün aktivitesini düzenlemeye yardımcı olurlar. Bu aktiviteler, glikozaminoglikan ve proteoglikanların hücre adezyonu ve göçünde önemli rol oynamalarını sağlar (79).



Matriselüler proteinler arasında hücre matris etkileşimlerini modüle ederek inflamasyon ve belirli büyüme faktörlerini yanıtı düzenlemeye yardımcı olan trombospondinler, osteopontin, tenaskinler bulunur. Ayrıca matriselüler proteinler, keratinosit göçünü ve matris oluşumu arttırmaya yardımcı olur (77).



Şekil 2-8 Ekstraselüler Matris yapısı ve bileşenleri (86) (Türkçeleştirilmiştir)

### 2.5.1. Ekstraselüler Matris ve Yara İyileşmesi

ECM, yara iyileşmesinde görülen hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma ile karakterize organize yanıtın yönlendirilmesinde işlev görür. Çeşitli ECM bileşenlerinin etkileri, yara aşamalarına göre farklılık gösterir. Dinamik ve sıralı olan bu düzen, hücre ve büyüme faktörlerinin etkileşimi sonucu gerçekleşir (70). Dermis yaralandığında, hasarlı kollajen fibrilleri ve diğer proteinler, yara bölgesinde pıhtı oluşturmak üzere trombositler için sinyal görevi görür. Ayrıca Kollajen, integrinlerle etkileşerek yara kontraksiyonunu etkilemek için miyofibroblastlar ve keratinositlerle etkileşir.

### **2.5.1.1. Ekstraselüler Matriks ve Hemostaz**

Hemostaz fazı sırasında, fibrin ve fibronektin bir geçici ECM oluştururlar. Bu geçici matriks, lökosit ve fibroblast bağlantısının yönlendirilmesi için bir iskele görevi görür. İntegrin proteini, endotelial hücrelerini fibronektin ve vitronektin gibi tutucu proteinlere bağlar. Bu olay yara iyileşmesinde anjiyogenez için gereklidir ve VEGF'i aktive eder (80, 81).

### **2.5.1.2. Ekstraselüler Matriks ve İnflamasyon**

İnflamatuvar faz sırasında lökositler, integrinler yoluyla ECM proteinlerine bağlanır. ECM proteinleri, monosit/makrofajların aktivitesini uyarır, yara bölgesinden nötrofilleri ve yara artıklarını temizlerler (82).

### **2.5.1.3. Ekstraselüler Matriks ve Proliferasyon**

Proliferatif fazda gelişen granülasyon dokusu oluşumu, fibroblastlar, büyüme faktörleri ve ECM arasında meydana gelen dinamik bir süreç ile gerçekleşir. Bu süreçte makrofajlar ECM'ye bağlandıktan sonra anjiyogenez, kollajen sentezi ve fibroblast proliferasyonunu uyaran büyüme faktörlerini serbest bırakır. Endotelial hücreler, integrinler aracılığıyla ECM proteinlerine bağlanarak anjiyogenez sürecinin ilerlemesine yardımcı olur (83).

### **2.5.1.4. Ekstraselüler Matriks ve Remodeling**

Remodeling aşamasında, ECM proteinleri ve büyüme faktörleri ile etkileşimleri aracılığıyla fibroblastlar, miyofibroblast haline geldikçe yara alanının daralması devam eder (74, 84). Miyofibroblastlar, daha sonra yarayı kapatmak için kollajen, vitronektin ve diğer proteinlerle etkileşir. Remodeling fazı ilerledikçe, fibronektin ve hiyaluronik asit, dokuya dayanıklılık veren kollajen demetleriyle yer değiştirir (85).

## 2.6. TGF- $\beta$

TGF- $\beta$ , topluca TGF- $\beta$  süper ailesi olarak adlandırılan ve üyeleri; epitel hücresi büyümesini, farklılaşmayı, hareketliliği, organizasyonu, apoptozu ve tümör genezi düzenleyen bir sitokin grubudur (87). Günümüzde TGF- $\beta$  süper ailesi, bilhassa C-sonlanma ucuna sahip ve hepsi en az bir benzer amino asit dizisi ortak olan (homoloji) 100 kadar farklı protein içerir (88). Bu aile üyelerinin çoğunun rolü yeterince karakterize edilmemekle birlikte, kemik morfojenik proteinleri (BMP), büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF), aktivinler, inhibitörler ve Mullerian inhibe edici faktör (MIF) gibi üyelerinin, özgül hücresel gelişimi düzenlendiği bilinmektedir (89). TGF- $\beta$ , baskın olarak bir T-hücresi alt kümesi tarafından üretilen ve tüm hücreler tarafından her yerde ifade edilen bir hücre dışı proteindir (90, 91). TGF- $\beta$ 'nın diğer önemli kaynakları trombositler, makrofajlar, nötrofiller, kemik, plasenta, böbrek endometriyumu ve hemotokrin hem de parakrin etkileri üreten malign hücreleridir (90, 92, 93).

Memelilerde, TGF- $\beta$ 'nın üç izoformu tanımlanmıştır. Bu proteinlerin her üçü de (TGF  $\beta$  1-2-3), amino asit dizilerinde büyük oranda benzer bölgeler taşır (94). Her izoform, farklı genlerden ve kromozomlardan kaynaklanır (95). TGF- $\beta$  proteini; (i) olgun TGF- $\beta$ -dimer, (ii) TGF- $\beta$  propeptit dimer veya latency- bağlı protein (LAP) ve (iii) Latent TGF- $\beta$  bağlama proteini (LTBP) olmak üzere birbirine bağlanan üçlü protein kompleksi şeklinde yüksek molekül ağırlıklı bir protein olarak hücrelerden salınır. TGF- $\beta$ , olgun TGF- $\beta$ 'dan LAP ayrılmasıyla aktif hale gelir (96).

TGF- $\beta$ , hücre türleri üzerinde oldukça geniş bir düzenleyici etkiye sahiptir. Hücrenin replikasyonu ve farklılaşması, kemik oluşumu, anjiyogenez, hematopoez, hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücresel göçü düzenler. Bütün bu işlemler doku gelişimi ve yara iyileşmesinde önemlidir (97, 98).

TGF- $\beta$  hücresel replikasyonun hem uyarıcısı hem de inhibitörüdür. TGF- $\beta$ , mezenkimal kökenli hücreleri uyarır ve epitelyal proliferasyonu (anti-mitojenik) büyük ölçüde inhibe eder. Ayrıca ekstraselüler matriks ile ilişkili komponentlerin üretimini ederek, apoptozu indükleyebilir ve ekstraselüler matriksin yeniden şekillendirilmesine aracılık ederek morfogenezi kontrol eder (99). TGF- $\beta$ ; kollajen, fibronektin, proteoglikanlar, tenaskinler, trombopondin, plazminojen aktive edici inhibitör-1 (PAI-1) ve metalloproteaz-1'in doku inhibitörü (TIMP-1) sentezini uyarır (100,101, 102, 103).

İnsan vücudundaki hemen hemen tüm hücreler TGF- $\beta$  reseptörlerine sahiptir. Dokuz tane zar protein reseptörü tanımlanmıştır. Farklı TGF- $\beta$ 'yı farklı afinitelerle bağlayan birkaç hücre yüzey reseptör sınıfı vardır. Bu reseptörlerin en yaygın dağılımı sırasıyla 53 ve 70 kDa moleküler ağırlıkları ile TGF- $\beta$  reseptörleri tip I ve II'dir. Tip I ve / veya Tip II reseptörünün kaybı, TGF- $\beta$ 'ye karşı hücreyel tepki kaybıyla ilişkilidir. Reseptör alt tiplerinde, hücre tipine göre spesifik farklılıklar vardır. EGF, PDGF ve FGF gibi büyüme faktörleri reseptörlerinin aksine, TGF- $\beta$  ailesi reseptörlerinin tamamı esas olarak serin / treonin kinaz aktivitesine sahiptir ve bu nedenle sinyal geçişinin farklı basamaklarını indükler (104, 105, 106).

### 2.6.1. TGF- $\beta$ ve Yara İyileşmesi

TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3 memelilerde bulunan ana formlardır. TGF- $\beta$ 1 derinin yara iyileşmesinde baskın olan üyedir. Makrofajlar, fibroblastlar, keratinositler ve trombositler tarafından üretilirler (107, 108, 109,). Yara alanının oluşumundan itibaren TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Yara iyileşmesinde TGF- $\beta$ 1, inflamasyon, anjiyogenez, reepitelizasyon ve bağ dokusu rejenerasyonunda önemlidir (110, 111).

TGF- $\beta$ 1, ek inflamatuvar hücrelerin alımını kolaylaştırır ve makrofaj aracılı doku debridmanını artırır. İn vitro çalışmalarda yara alanı sterilize edildikten sonra, TGF- $\beta$ 1'in makrofajlardan süperoksit üretimini aktive edebildiği belirtilmiştir. Bu şekilde yara alanını çevreleyen sağlıklı dokunun korunmasına yardımcı olur ve granülasyon dokusu oluşumu için yarayı hazırlar. İn vitro çalışmalarda, TGF- $\beta$ 1'in fibronektin, fibronektin reseptörü, kollajen ve proteaz inhibitörleri dahil olmak üzere ECM oluşumu ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak granülasyon dokusu oluşumunu başlatmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca VEGF'nin etkinliğini artırır.(112). Yapılan diğer çalışmalarda özellikle yara iyileşmesinin geç fazlarında TGF- $\beta$ 1'in aşırı ekspresyonunun keratinositlerin proliferatif fenotipini arttırdığı gösterilmiştir (113).

TGF- $\beta$ 1, yara iyileşmesinin matriks oluşumu ve yeniden biçimlenme evresinde kollajen üretimine (Kollajen 1 ve 3) dahil olur. Aynı zamanda, metalloproteinaz MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'un güçlü bir inhibitörü ve metalloproteinazı inhibe eden bir doku inhibitörü olan TIMP-1'in sentezinin bir uyarıcısıdır. Böylece kollajen yıkımı engellenir (114, 115).

TGF- $\beta$ 1'in aşırı ekspresyonu sonucunda, hipertrofik ve keloid skarlarının gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilen bağ dokusu büyüme faktörünü (CTGF) uyardığı gösterilmiştir (116). Yanık yaralanmalarında, TGF- $\beta$ 1'in salınımı ve aktivasyonundaki lokal artışın, re-epitelizasyonu engellediği ve fibroziyi artırdığı gösterilmiştir (117). Kronik yaralarda, özellikle nötrofil elastaz gibi proteolitik enzimlerin etkisiyle yara alanında TGF- $\beta$  seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. TGF- $\beta$ 'nın kronik yaraların tedavisi üzerine yapılan birçok klinik deneme başarısızlıkla sonuçlanmıştır (118).

## 2.7. Kollajen

Kollajen, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar, laminin, fibronektin, elastin ile birlikte ekstraselüler matriksin temel yapısını oluşturan ve üçlü heliks yapısında bulunan bir proteindir. Kollajen, hayvansal dokularda en bol bulunan proteindir. Dermisin kuru ağırlığının %70-80'ini oluşturur (119). Kollajenler esas olarak fibroblastlar tarafından üretilirler. Günümüzde en az 21 ayrı kollajen tipi tanımlanmıştır. Bunlardan altısı deride mevcuttur. Derinin Kollajen içeriğinin %70'i Kollajen 1'den, %10'u Kollajen 3'den ve kalan kısmı da Kollajen 4, 5, 6 ve 7'den oluşur (120).

Yara onarımındaki iki baskın kollajen tipi Kollajen 1 ve 3'tür (121). Kollajenin temel işlevi, çoğunlukla 1, 2 ve 3 formlarında, bağ dokusunda iskele görevi görmektir. Yara iyileşme sürecinin erken evrelerinde ilk önce Kollajen 3 üretimi gerçekleşir. Süreç ilerledikçe Kollajen 3 üretimi azalarak, Kollajen 1 üretimi artar.

Kollajen 1, skar oluşumunda ve yeniden şekillenme evresinde işlev görür (122). Kollajenin birikimi ve yeniden yapılanma, yara bölgesinde artan gerilme kuvvetine katkıda bulunur. Bu gerilme kuvveti yaralanmadan üç hafta sonra normalin yaklaşık %20'si kadardır ve yavaş yavaş normal cildin maksimum %70'ine ulaşır (123).

Epitelyal yapılar rejenerasyonla iyileşebilmesine rağmen, bağ dokular çoğunlukla onarım sürecine dayanamaz. Bu nedenle sağlıklı bir bağ dokusu oluşumu, doku sürekliliğini, kuvvetini ve işlevini yeniden sağlamaya hizmet eden, çoğunlukla da Kollajen 1 olan kollajenöz skar dokusunun oluşturulmasına bağlıdır (124).

**Tablo 2-1 Kollajenin yara iyileşmesindeki rolleri (125)**

<b>Kollajenin yaralanmanın ardından inflamutuar yanıtta etkisi</b>
Hücrel farklılaşma, anjiyogenez ve mitogenez
Protein sentezi ve ekstraselüler matriks oluşumu
Hücrel göç (keratinosit, epitelizasyon, fibroblast, monositler/makrofajlar, nötrofiller)
Kollajenaz indüksiyonu
Yara bölgesinin kapanması (daralması)
Trombositlerin yara alanında toplanması ve pıhtı oluşumu faktörlerinin uyarılması
Büyüme faktörleri ve sitokinlerin indüklenmesi
Hücre sinyalizasyonunda hücre yüzey reseptörleri (integrinler) ve diğer ECM molekülleri ve proteinlerinin uyarılması

## 2.8. İmmünohistokimya Yöntemi

İmmünohistokimya, belirli işaretleyiciler kullanılarak dokularda bulunan farklı protein türlerinin buldukları yerde, ışık mikroskopisi seviyesinde görülebilen hale getirilen boyama yöntemidir. Bu yöntemde materyal olarak çoğunlukla parafin kesitler, buna ek olarak dondurma ve rezin kesitler de kullanılmaktadır. Parafin kesitlerin kullanıldığı çalışmalarda, dokunun fikse edilmesi ve yüksek ısıya maruz kalmasına engel olunması son derece önemlidir. Böylece dokunun antijenik yapısının zarar görmesi engellenmiş olur. Bu yöntemin temeli, dokuda incelenecek proteine karşı geliştirilmiş poliklonal ve monoklonal antikörlerin kullanılmasına dayanır.

Dokuda incelenecek proteine karşı geliştirilmiş antikorlar, proteine bağlanarak bir antikor-antijen kompleks yapısı oluşturur. Oluşan bu kompleksin ışık mikroskobu altında görünür hale getirilmesi için birtakım işaretleyiciler uygulanmaktadır. Uygulanan işaretleyicilerin çeşitlerine göre bu yöntem üçe ayrılır:

### **2.8.1. İmmüenzim Yöntemi:**

Bu yöntemde işaretleyici olarak bir enzim kullanılır. Bu enzim antijen-antikor kompleksini görünür hale getirmek için gereklidir. Bu enzim antikorlara uygun şekilde bağlanabilen, molekül ağırlığı düşük, su, toluol ya da alkolde çözünmeyen maximum düzeyde ürünler vermelidir. En sık kullanılan enzimler; galaktozidaz, alkalın fosfataz, glukoz oksidaz ve bayır turpu (horseradish) peroksidazdır.

### **2.8.2. İmmünfluoresan Yöntemi:**

Bu yöntemde enzim- substrat ilişkisi yerine aynı işlevi gören floresan maddeler kullanılır. İdeal floresan madde yüksek oranda, kısa dalga ışınlarını arbsorblayabilmelidir. Bu yöntemde kullanılan floresan maddeler Floresan İzotiyosiyanat (FITC), Tetrametil Rodamin İzotiyosiyanat (TRITC), Fikoeritrin (PE), Akridin turuncusu (AO)' dir. Floresan mikroskopta, antikorlara bağlı bu maddeler için uygun filtreler kullanılarak işaret yeşil, kırmızı veya mavi renklere gözlenir.

### **2.8.3. İmmünaltın Yöntemi:**

İmmün altın yönteminde işaret maddesi olarak antikora koloidal altın partikülleri bağlanır. İmmün işaret, gümüş tuzlarıyla yapılan bir redüksiyon tepkimesiyle altın partiküllerinin gümüş metali ile kaplanması sonucu alınır. Işık mikroskobunda kullanılan immün işaretleme yöntemi çalışılacak doku ve kullanılacak antikora göre seçilir.

Araştırılan proteinin ışık mikroskopu altında görülebilir hale gelmesi için çeşitli yöntemler kullanılır:

1. Direkt Yöntem
2. İndirekt Yöntem
3. Protein A yöntemi
4. İşaretlenmemiş antikor yöntemleri (Enzim-Anti-Enzim Yöntemleri)
5. İmmünaltın yöntemi
6. Avidin-Biotin Yöntemi

#### **2.8.4. Streptavidin-Biotin Yöntemi**

Avidin (yumurta beyazı glikoproteini) ve biotin (suda çözünen vitamin) birbirlerine bağlanma özelliğinden yola çıkılarak uygulanır. Avidin, biotin için 4 bağlanma bölgesine sahiptir. En sık kullanılan yöntem, Avidin-Biotin Enzim Kompleks (ABC) ve Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB)'dir. Streptavidin bakterial bir proteindir ve daha az spesifik olmayan boyama yaptığından avidin yerine kullanır. Enzim kompleksi, biotinlenmiş enzim (horseradish Peroksidaz (HRP) veya Alkalın Fosfataz (AP)) ve avidindir.

Avidin-biotin-enzim kompleksi biotinlenmiş ikincil antikor ile bağlanır. İşaretlenmemiş birincil antikor ilavesi yapılır. Biotinlenmiş ikincil antikor, primer antikora bağlanır. Avidin-biotin-enzim kompleksi eklenerek biotinlenmiş ikincil antikora bağlanması sağlanır. Kromojen solüsyonu en sonda ilave edilir (126, 127).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmamızda kullanılan cihazlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 3-1 Kullanılan Cihazlar**

<b>Cihazlar</b>	<b>Markası</b>
Etüv	Elektro-Mag M420B
Mikrodalga fırın	Beko 1550
pH metre	Scheat pH-meter CG825
Vorteks	Elektro-Mag M16
Mikrotom	Reichert 390965
Hassas tartı	Ohaus Galaxy 4000
Saf su cihazı	Millipore Elix3
Buzdolabı	Profilo
Derin dondurucu (-20)	Bosch
Işık Mikroskobu	Olympus optical (CHL2-FM3)
Işık Mikroskobu-	Leica (DM 2500)
Işık mikroskobu kamerası	Leica (DFC 280)
Mikropipetler	Ependorf
Santrifüj	Hettich
Spektrofotometre	Thermo Scientific

### 3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler

Tez çalışmamızda kullanılan ticari kitler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 3-2 Kullanılan Ticari Kitler**

Kit Adı	Markası
Collagen 1 Mouse Monoclonal Antibody (4H10) 100 µl	Abbkine
Collagen 3A1 Polyclonal Antibody 100 µl	Abbkine
TGF-β1 Mouse Monoclonal Antibody (10E5) 100 µl	Abbkine
Sirius Red Picrate for collagen and bilirubin	Bio- Optica
Masson Trichrome Goldner with light green	Bio- Optica
ZytoChem Plus HRP Kit, Broad Spectrum	ZYTO
ZytomedSystems, G829-2 Antibody Dilüent	ZYTO

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmamızda kullanılan kimyasallar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 3-3 Kullanılan Kimyasallar**

Kimyasallar	Markası
Toluen Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck
PBS Tablet (1 tablet=100 ml) Bir kutu=100 adet	MPbio
Ethanol absolute Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck
Nötralin Formaldehit	Manuel hazırlandı.
Sitrat Tamponu (pH:6)	Manuel hazırlandı.
%3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Çözeltisi	Manuel hazırlandı.
DMSO	Santa Cruz
Trombin Multifibren U	Siemens Healthcare Diagnostics
CaCl <sub>2</sub>	Santa Cruz
Ksilazin	Rompun %2 Bayer
Steril Apirojen İzotonik NaCl çözeltisi	Medifleks Eczacıbaşı
Ketamin	Ketasol %10 Richer Parma

### 3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

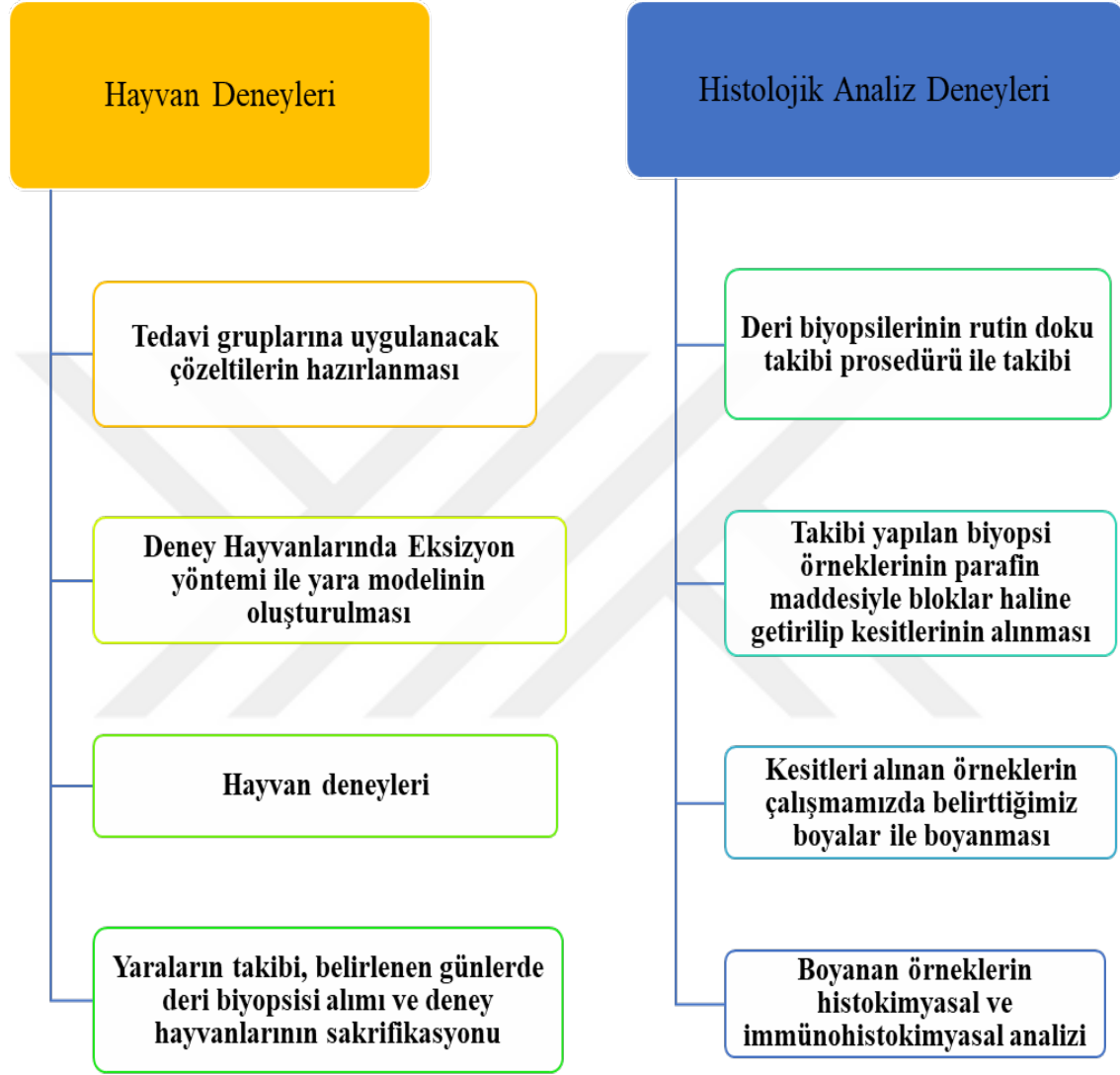
Tez çalışmamızda kullanılan sarf malzemeler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 3-4 Kullanılan Sarf Malzemeler**

Lam Pozitif Yüklü, 72'lik kutu
Lam Saklam Kutusu (100'lük)
Lamel 24x60 Bir kutu= 100 adet
Mikrotom bıçağı
Ependorf
Fırça
Boyama kabı
Şale

### 3.2. YÖNTEM

Çalışmamız için gerekli olan materyallerin temin edilmesinin ardından deneysel çalışmalarımız süresince uygulanan işlem sırası aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 3-1 Çalışmamızda uygulanan işlem sırası

#### 3.2.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması:

- $\text{CaCl}_2$  çözeltisi ve Trombin hazırlanması:

1,1 gram  $\text{CaCl}_2$ , 10 ml distile su sulandırılarak 10 milimolar  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi hazırlandı. 2 ml Multifibren U Trombin 2 ml distile su ile sulandırıldı. Her iki çözelti de PRP'nin trombosit içeriğinin aktifleştirilmesinde kullanıldı.

➤ **DMSO çözeltinin hazırlanması (%25'lik):**

1 ml DMSO, 3 ml PBS ile sulandırılarak hazırlanan seyreltik DMSO çözeltisi lipidlerin çözdürülmesi amacıyla kullanıldı.

➤ **PBS (Ph:7.2)**

Özellikle hücre kültürü çalışmalarında ortamın tuz dengesi ve asiditesini ayarlamak için kullanılan solüsyondur. İçeriği NaCl, potasyum fosfat monobazik ve sodyum fosfat dibazikten oluşur. PRP ve lipid fraksiyonunun tedavi amaçlı kullanımına hazırlanması için kullanıldı.

### 3.2.2. PRP ve PRP' den İzole Edilen Lipid Fraksiyonunun Hazırlanması

#### 3.2.2.1. PRP'nin Hazırlanması:

- Literatüre uygun olarak anesteziklerin enjekte edildiği deney hayvanlarımızdan herhangi bir ayırım gözetmeksizin seçilen birinin kalbinden 10 ml periferik kan alındı.
- Kan, hemolize uğramaması için 1.2 ml Sodyum sitrat (0.109 Molar) içerikli tüplere alındı.
- 16 dakika 8000 rpm hızla santrifüj uygulandı.

- Santrifüj sonrası oluşan şeffaf renkli plazma kısmı ayrı bir tüpe alındı. Elde edilen bu kısım PRP'dir (128).

### **3.2.2.2. Lipid fraksiyonunun hazırlanması:**

- Elde edilen PRP'den 0.5 ml alınarak trombositlerinin uyarılması amacıyla 5 ml  $\text{CaCl}_2$  ve 5 ml Trombin ile aynı ependorfta birleştirilip 30 dakika  $37^\circ\text{C}$  de inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından 4000 rpm hızla 14 dakika santrifüj uygulandı ve üst faz (supernatant) alınarak 200  $\mu\text{l}$  supernatant + 1000  $\mu\text{l}$  saf (%100) etanol eklendi.
- Karışıma 11 dakika sonikasyon ve 5 dakika vorteks uygulandıktan sonra  $-20^\circ\text{C}$ 'de overnight (15 saat) bırakıldı (5).
- Overnight inkübasyonun ardından 15.000 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifüj uygulandı. Elde edilen supernatant lipid fraksiyonu ve alkol karışımı içeren kısımdır.
- Lipid fraksiyonu ve alkol içerikli süpernatant kısmın alkol içeriği Azot gazı kullanılarak uzaklaştırıldı. Tüpün dip kısmında oluşan beyaz çökeltiler PRP'den izole edilen lipid fraksiyonudur.
- Lipid fraksiyonu, tedavi için kullanılması amacıyla DMSO (%25'lik) içerisinde çözdürüldü.

### **3.2.2.3. Lipid fraksiyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi:**

İzole edilen lipid fraksiyonunun konsantrasyonunu belirlemek için spektrometre cihazıyla ölçüm yapıldı. Spektrum taraması 200-240 nm dalga boyları arasında yapılarak lipid fraksiyonu konsantrasyonunun 206.9 nm dalga boyunda olduğu gözlemlendi.

#### **3.2.2.4. PRP için trombosit sayımı yapılması:**

- Elde edilen PRP, 4 kat dilüe edilerek Hemogram cihazıyla Trombosit sayımı yapıldı.  $220 \times 10^3$  trombosit sayıldı.
- Literatüre göre 1 yaraya uygulanacak total trombosit sayısı  $280 \times 10^7$  (28 milyon) olacak şekilde PRP ve lipid fraksiyonu içeriğinde bulunan trombosit miktarları hesaplandı ve her yara başına 50 µl uygulanacak şekilde (280 milyon trombosit içerecek şekilde) hazırlandı (129).

### **3.3. Hayvan Deneyleri**

#### **3.3.1. Grupların oluşturulması:**

Deney hayvanlarımız rastgele seçilerek, lipid fraksiyonu ve PRP uygulanmak üzere her bir grup için 6'şar adet; DMSO uygulanmak üzere ve SHAM (kontrol grubu) hiçbir etken maddesi uygulanmamak üzere her bir grup için 4'er adet olacak şekilde toplamda 20 hayvan 4 farklı gruba ayrılmıştır.

#### **3.3.2. Yara Modelleri:**

Grupların belirlenmesinin ardından, literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda anesteziğin etki süreleri dikkate alınarak yara oluşturulması sırasında ve deriden her biyopsi alımından 15 dakika önce deney hayvanlarımıza intraperitoneal yolla 10 mg/kg dozda Ksilazin HCl ve 50 mg/kg dozda ketamin HCl anestezisi uygulanmıştır (130). Literatüre dayalı olarak hayvanların yara bölgesine ulaşmaması için sırt bölgesi tıraş edilerek % 70'lik alkolle dezenfekte edilmiştir.



**Şekil 3-2** Deney hayvanlarında yara alanlarının oluşturulması

Oluşturulacak yaraların ilk alanlarının her hayvanda standart bir biçimde olması için kalıp bir levha oluşturularak yara şekilleri doku kalemi ile tüysüz deriye çizilmiştir. Ardından punch biyopsi tekniği kullanılarak 1.2 cm çapında dairesel 3 adet eksizyon yöntemi ile yara modeli oluşturulmuştur. Yaraların iki tanesi orta hattın sağ bölgesinde, bir tanesi de sol bölgesinde birbirlerine yaklaşık olarak eşit mesafelerde olacak biçimde açılmıştır. **Şekil 3-2**'de hayvanların sırt bölgelerinde oluşturulan yaraların konumu gösterilmektedir.



### 3.3.3. Tedavilerin uygulanması ve biyopsi alımı:

Yara modelinin Şekil 3-2'deki gibi oluşturulmasının ardından her gruptan cerrahi aletler yardımıyla alınan deri parçaları 0.gün biyopsisi olarak kabul edildi. 0.günde tüm gruplar için belirlenen tedaviler uygulanarak yaralar üzeri açık halde bırakıldı. Hayvanlar her biri ayrı bir kafese alınmak suretiyle yerleştirildi.

Yara oluşumundan 3 gün sonra her gruptan 3. gün deri biyopsileri alındı ve diğer 2 yaraya gruplarına uygun olarak tedavi uygulandı. Yaralanmanın 7 gün sonrasında tedavi uygulandığı saatlere yakın saatlerde 7. gün biyopsileri alındı ve kalan son yaraya da gruplarına göre tedavileri gerçekleştirildi. Yara oluşumundan 14 gün sonra yine aynı saatlerde gruplarımızdan 14. gün biyopsileri alınarak tüm deney hayvanlarımız, deney hayvanları etiğine uygun biçimde yüksek dozda anestezi uygulanarak sakrifiye edildi.

### 3.3.4. Biyopsilerin muhafaza edilmesi:

Gruplarımızdan alınan yara biyopsileri izotonik NaCl ile sterilize edilerek yara üzerindeki kan uzaklaştırıldı. Biyopsi örnekleri bistüri yardımı ile parçalanarak %10'luk tamponlanmış nötralformaline alınmıştır. Total biyopsi örneğimizin sayısı 61 adettir ve 60 tanesi 3, 7 ve 14. günlerde alınan biyopsiler olup 1 tanesi ise 0. günde alınan deri örneğidir.

## 3.4. Histopatolojik İnceleme Deneyleri

Yara alanından anestezi altında alınan deri dokusu biyopsi örnekleri %10'luk nötral formalin ile +4°C'de bir gece fikse edildi. Rutin doku takip protokolüne uygun şekilde yükselen (%70-%100) alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemine tabi tutuldu ve ardından parafine gömüldü.

Parafin bloklar haline getirilmiş olan doku örneklerinden mikrotom (Leica) ile 4 µm kalınlığında alınan kesitle, pozitif şarjlı lamlar üzerine alındı. Bir gece 37°C'deki etüvde bekletildikten sonra kesitlerin lamlara yapışması sağlandı. Toluolde deparafinize edilen kesitler inen alkol serisinden (%100-%70) geçirilerek distile suya indirildi. Kesitlere sırasıyla Masson Trikrom ve Sirius Red boyası uygulandı.

### 3.4.1. Masson Trikrom Boyama

Kesitlere Masson Trikrom Boyama (Bio-Optica, Katalog No: 04-011802) kiti içerisinde önerilen protokol uygulanı.

1. Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitlerin toluolde parafininin giderilmesinin ardından sırasıyla %100'lük, %96'lık ve %70'lik yükselen alkol serilerinden 2'şer dakika süreyle geçirildi.
2. Distile suya indirilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi.
3. Kesitlerden distile su uzaklaştırıldı ve lam üzerindeki fazla su alındı.
4. Ardından kesitler üzerine 6 damla A solüsyonu ve 6 damla da B solüsyonu eklendi ve 10 dakika beklendi.
5. Kesitler 3-4 saniye distile suda yıkandı ve fazla su kuru bir peçete ile giderildi. Sonrasında 10 damla D solüsyonu eklendi ve 4 dakika beklendi.
6. 4 dakika sonunda kesitler distile suda yıkandı ve fazla su uzaklaştırıldı. Sonrasında 10 damla E solüsyonu eklendi ve 10 dakika beklendi.
7. 10 dakika sonunda, kesitler yıkanmadan üzerindeki fazla solüsyon kuru bir peçete ile kurutuldu ve 10 damla F solüsyonu eklenerek 5 dakika beklendi.
8. Kesitler hızlı bir şekilde sırasıyla %70, %96 ve 1 dakika boyunca da %100'lük yükselen alkol (Etanol) serilerinden ve hemen ardından da toluolden geçirildi.
9. Tüm kesitler Entellan ile kapatıldı.

### 3.4.2. Sirius Red Boyama

Kesitlere Sirius Red Boyama kiti (Bio-Optica ve Katalog No:04-121873 ) içerisinde önerilen protokol uygulanıldı.

1. Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitlerin toluolde parafininin giderilmesinin ardından sırasıyla %100'lük, %96'lık ve %70'lik yükselen alkol serilerinden 2'şer dakika süreyle geçirildi.
2. Distile suya indirilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi.
3. Kesitlerden distile su uzaklaştırıldı.
4. Kit içinden çıkan A solüsyonundan kesitlerin üzerine 10'ar damla eklendi ve 50 dakika beklendi.
5. 50 dakika sonunda kesitler yine kit içerisinde bulunan B (tampon) solüsyonunda durulandı.
6. Kesitlerin üzerine 10 damla C solüsyonundan damlatıldı ve 3 dakika boyunca beklendi.
7. Kesitler 3 dakika boyunca akan çeşme suyu altında bekletildi.
8. Örnekler hızlı bir şekilde sırasıyla 3'er dakika boyunca %70, %96, %100'lük yükselen alkol (Etanol) serilerinden ve hemen ardından da 3 dakika toluolden geçirildi.
9. Boyanmış kesitler Entellan ile kapatıldı.

### 3.5. İmmünohistokimya Boyama

İmmünohistokimyasal boyama işlemi için streptavidin-peroksidaz immün boyama yöntemi uygulandı. Kollajen 1 Mouse Monoklonal Antibody (Abbkine, Katalog No: ABM40379) (1:50 dilüe), Kollajen 3A1 Poliklonal Antibody (Abbkine Katalog No: Abp53732) (1:100 dilüe) ve TGF- $\beta$ 1 Mouse Monoklonal Antibody (Abbkine Katalog No: Abm40281) (1:50 dilüe) primer antikorları kullanılarak ZytoChem Plus HRP (BroadSpectrum) (Katalog No: HRP-S-030) kiti ile immün boyama gerçekleştirildi. Kitin içinde tavsiye edilen boyama işlem sırası antikorlara göre düzenlenerek takip edildi. Tüm antikorlar Zytomed Systems, Antibody Dilüent ile dilüe edilerek uygulandı.

1. Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitlerin toluolde parafininin giderilmesinin ardından sırasıyla %100'lük, %96'lık ve %70'lik yükselen alkol serilerinden 2'şer dakika süreyle geçirildi.
2. Distile suya indirilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi.
3. Kesitler Sitrat tampon (pH:6.0) ile muamele edilerek 2'şer dakika olmak 3'er kez mikrodalga fırında kaynatılarak antijen iyileştirilmesi yapıldı.
4. Sitrat uzaklaştırılarak distile su eklendi.
5. Kesitler üzerindeki fazla su kuru bir peçete giderildi.
6. Endojen peroksitlerin maskelenmesi için %3'lük Hidrojen Peroksit ile 10 dakika muamele edildi.
7. Kesitler PBS ile 3 kez 6 dakika yıkandı.
8. İstenmeyen zemin boyanmasını engellemek için Bloking solüsyonu ile 5 dakika muamele edildi.
9. PBS ile 2 dakika yıkandı.
10. Kesitler üzerindeki fazla PBS kuru bir peçete ile örnek çevresinden giderildi.
11. Dilüe edilen Primer Antikor, örnekler üzerine damlatıldı. Negatif kontrol amaçlı kullandığımız örneğe ise PBS damlatıldı.
12. Primer Antikor uygulanmış örnekler Parafilm ile kapatıldı.
13. Örnekler 1 gece boyunca +4 C'de nemli ortamda bekletildi.
14. PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkandı.
15. Biotin ile işaretli 2. Antikor ile 13 dakika muamele edildi.
16. PBS ile 3 kez 6 dakika yıkandı ve örnek çevresindeki fazla PBS uzaklaştırıldı.
17. Örnekler Streptavidin-Peroksidaz ile 12 dakika muamele edildi.
18. PBS ile 3 kez 6 dakika yıkandı.
19. Substrat-Kromojen AEC solüsyonu ile renk reaksiyonu Işık mikroskobu altında görülene kadar muamele edildi.
20. Kesitler distile su içine alınarak reaksiyon durduruldu.
21. Kesitler Mayer's Hematoksilen ile 20 saniye zıt boyama yapıldı.
22. Çeşme suyunda boyanın fazlası giderildi ve PBS ile 30 saniye morartma işlemi gerçekleştirildi.
23. Kesitler distile suya alındı.
24. Kesitler Gliserin jel kapama medyumu ile kapatıldı.

### 3.6. İstatiksel Analiz ve Skorlama

Elde edilen histopatolojik ve immünohistokimyasal bulguların histopatolojik skorlaması Galeano ve ark. (2006) metodu ile yapıldı (134) (**Tablo 3-5**). Skorların istatiksel analizini değerlendirmek amacıyla Graphed Prism 5 istatistik programı kullanıldı. Ayrıca bulguların verilen skor değerlerine göre istatiksel analizleri, One Way Anova ve post test olarak da Bonferroni's Çoklu Karşılaştırmalı testleri ile yapıldı.

**Tablo 3-5 Yara iyileşmesinde gözlemlenen aşamaların gösterdiği bulguların skorlanma yöntemi**

Skor	Reepitelizasyon	Granülasyon	Anjiyogenez
0	Dokunun % 70'inde epitelyal proliferasyonun yokluğu	Dokunun % 70'inde olgunlaşmamış ve enflamatuvar doku	Anjiyogenezin yokluğu, tıkanıklık, hemoraj, ödem varlığı
1	Dokunun % 60'ında zayıf epidermal organizasyon	Dokuda % 60 oranında ince olgunlaşmamış ve enflamatuvar doku	Yara alanına düşen 1-2 damar, ödem, kanama, tıkanıklık
2	Dokunun % 40'ında eksik epidermal organizasyon	Dokunun % 40'ında orta yeniden modelleme	Yara alanına düşen 3-4 damar, orta ödem ve tıkanıklık
3	Dokunun % 60'ında orta epitel proliferasyonu	Dokunun % 60'ında kalın Granülasyon tabakası ve iyi oluşmuş kollajen matrisi	Yara alanına düşen 5-6 damar, hafif ödem ve tıkanıklık
4	Dokunun % 80'inde epidermal yeniden modellenme	Dokunun % 80'inin organizasyonunun tamamlanması	Epitel yüzeye doğru 7'den fazla damar oluşumu

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bulguların Histolojik Değerlendirmesi

Yara modelini oluşturulmuş gruplardan 3, 7 ve 14. günlerde alınan deri biyopsi dokularından elde edilen kesitlere Masson Trikrom ve Sirius Red boyaları ile histokimyasal boyamalar yapıldı. Histopatolojik Skorum Galeano ve ark. (2006) metodu ile yapıldı (**Tablo 3-5**). Bu metoda göre 14.günde her bir grup için normal bir yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında gözlemlenen granülasyon oluşumu, Anjiyogenez ve Reepitelizasyon fazlarının gösterdiği bulgulara göre skorlandırıldı. Bu kriterlere göre skorlandırılan SHAM, DMSO, PRP ve lipid fraksiyonu gruplarımız One Way Anova testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Anlamli fark görülenlerde post test olarak Bonferroni's Çoklu Karşılaştırmalı Testi kullanılarak gruplar arasındaki yara iyileşmesi aşamaları değerlendirildi (**Tablo 4-1**). Bonferroni's Çoklu Karşılaştırmalı Testine göre çalışmada yer alan tüm gruplar arasında çok ileri derecede anlamlı fark saptandı ( $p < 0,001$ ) (**Tablo 4-1**).

**Tablo 4-1 Tüm gruplara ait yara iyileşme skor değerlerinin Bonferroni's Çoklu Karşılaştırmalı Testi'ne karşılaştırılması**

	LF	PRP	DMSO	SHAM	P *
<b>Granülasyon</b>	3.48 ± 0.04 <sup>*b</sup>	3.65 ± 0.07 <sup>*a</sup>	2.46 ± 0.11 <sup>*c</sup>	1.53 ± 0.08	<0,0001
<b>Anjiyogenez</b>	3.53 ± 0.13 <sup>*b</sup>	3.76 ± 0.04 <sup>*a</sup>	2.54 ± 0.07 <sup>*c</sup>	2.05 ± 0.14	<0,0001
<b>Reepitelizasyon</b>	3.59 ± 0.05 <sup>*b</sup>	3.89 ± 0.08 <sup>*a</sup>	3.09 ± 0.15 <sup>*c</sup>	2.77 ± 0.11	<0,0001

Veriler, Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

\* **Grupların Bonferroni's çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılması.**

\*Bonferroni's çoklu karşılaştırma testinde DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

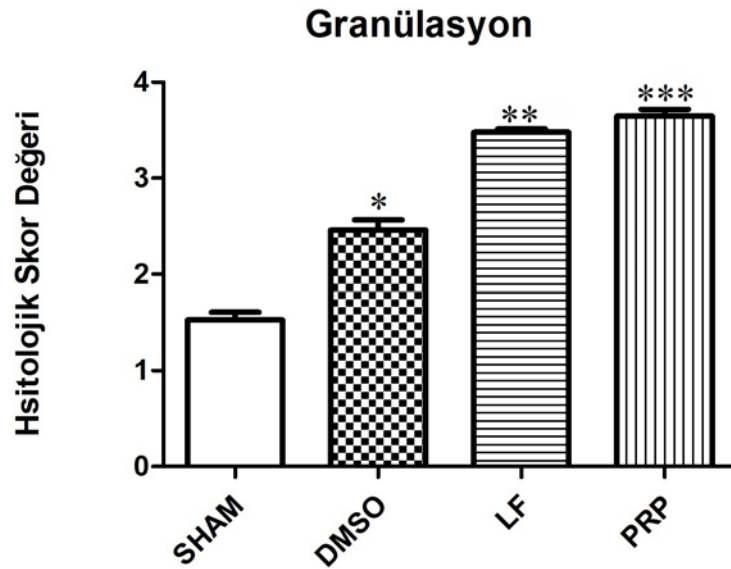
<sup>a</sup> SHAM, Lipid fraksiyonu ve DMSO gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> DMSO ve SHAM gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup> SHAM grubuna göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1. Granülasyon oluşumu:

Yara iyileşmesinde proliferasyon aşamasında gözlenen Granülasyon oluşumu, histokimyasal boyanma bulgularına göre değerlendirilerek skorlandı. Elde edilen tüm veriler One Way Anova testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca aralarındaki farkın anlamlı olup olmadığını görmek amacıyla Bonferroni's çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak değerlendirildi. Lipid fraksiyonu ve PRP uygulanan gruplarda Granülasyon dokusunun kalınlığının SHAM ve DMSO uygulanmış gruplarına göre ileri derecede anlamlı olduğu saptandı ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4-1). Lipid fraksiyonu ve PRP gruplarında kalın bir granülasyon dokusu gözlenirken SHAM grubunda ince granülasyon dokusu, DMSO grubunda ise orta kalınlıkta bir granülasyon dokusu olduğu saptandı. Granülasyon oluşumunda, skorlamalar gruplar arasında ikili kıyaslamalar yapılarak değerlendirildiğinde PRP grubunun lipid fraksiyonu grubuna göre, DMSO grubunun ise SHAM grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ( $p < 0,05$ ) saptandı (Şekil 4-1) (Şekil 4-6).



Şekil 4-1 Grupların Granülasyon dokusu oluşumu skorlarının karşılaştırılması

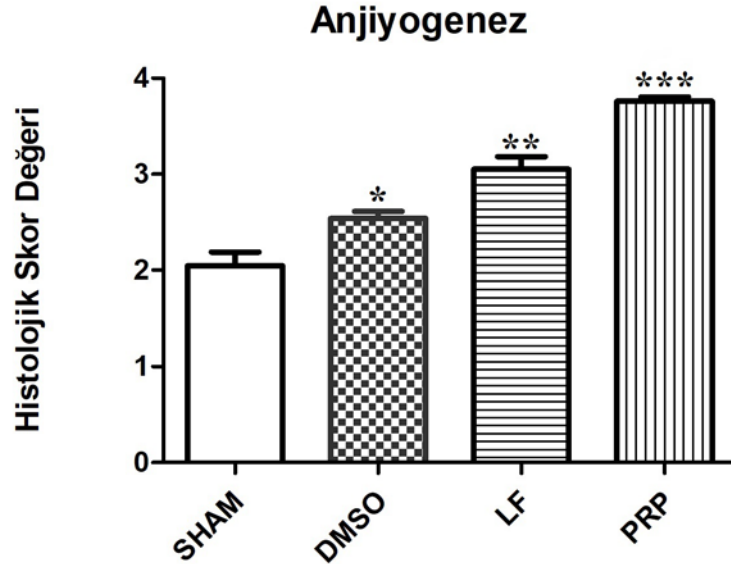
\*\*\* SHAM, Lipid fraksiyonu ve DMSO gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

\*\* DMSO ve SHAM gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

\* SHAM grubuna göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Anjiyogenez:

Proliferasyon aşamasında gözlenen 2.faz olan Anjiyogenez fazı, yukarıda belirtilen boyalar ile boyanmış ve yukarıda belirtilen istatistik testleri uygulanarak değerlendirilmiştir. SHAM ve DMSO gruplarında her alanda ortalama 3-4 damar gözlemlendi. Lipid fraksiyonu grubunda tüm alanlarda 5-6 damar yapı gözlenirken PRP uygulanan grupta bazı alanlarda 5-6 bazı alanlarda ise 7 ve üzeri damar yapısı gözlemlendi. İstatistik olarak değerlendirildiğinde SHAM ve DMSO grubuna göre lipid fraksiyonu ve PRP gruplarının Anjiyogenez fazı skorlarının anlamlı olarak yüksek olduğu ( $p < 0,05$ ) saptandı. Ayrıca ikili kıyaslamalarla değerlendirildiğinde PRP grubunun, lipid fraksiyonu grubuna ( $p < 0,05$ ), DMSO grubunda SHAM grubu göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4-2) (Şekil 4-6).



Şekil 4-2 Grupların Anjiyogenez skorlarının karşılaştırılması

\*\*\* SHAM, Lipid fraksiyonu ve DMSO gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

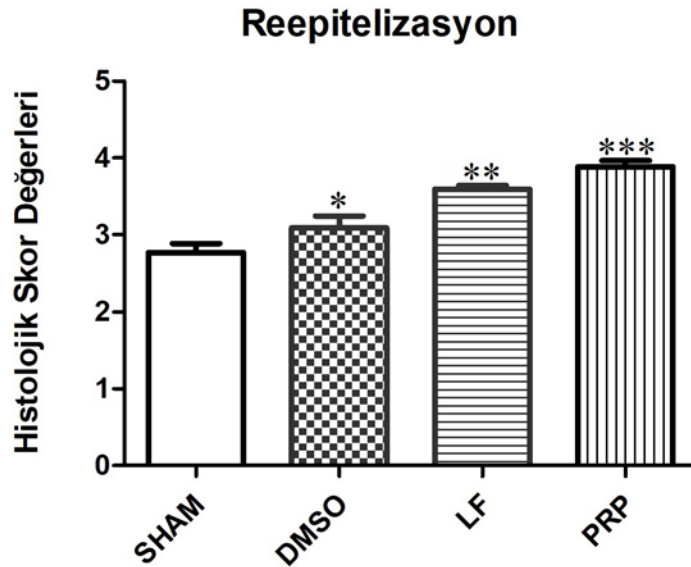
\*\* DMSO ve SHAM gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

\* SHAM grubuna göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).



#### 4.1.3. Reepitelizasyon:

Proliferasyon aşamasında gözlenen 3.faz olan Reepitelizasyon fazı boyama sonuçlarına göre skorlanıp istatistik olarak değerlendirildi. Yapılan skorlamada SHAM ve DMSO gruplarına göre lipid fraksiyonu ve PRP gruplarında reepitelizasyonun tamamlanmış olduğu görüldü. İkili kıyaslamalarda ise lipid fraksiyonu grubunun reepitelizasyon oranının PRP grubuna göre, DMSO grubunun ise SHAM grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ) (Şekil 4-3) (Şekil 4-6).

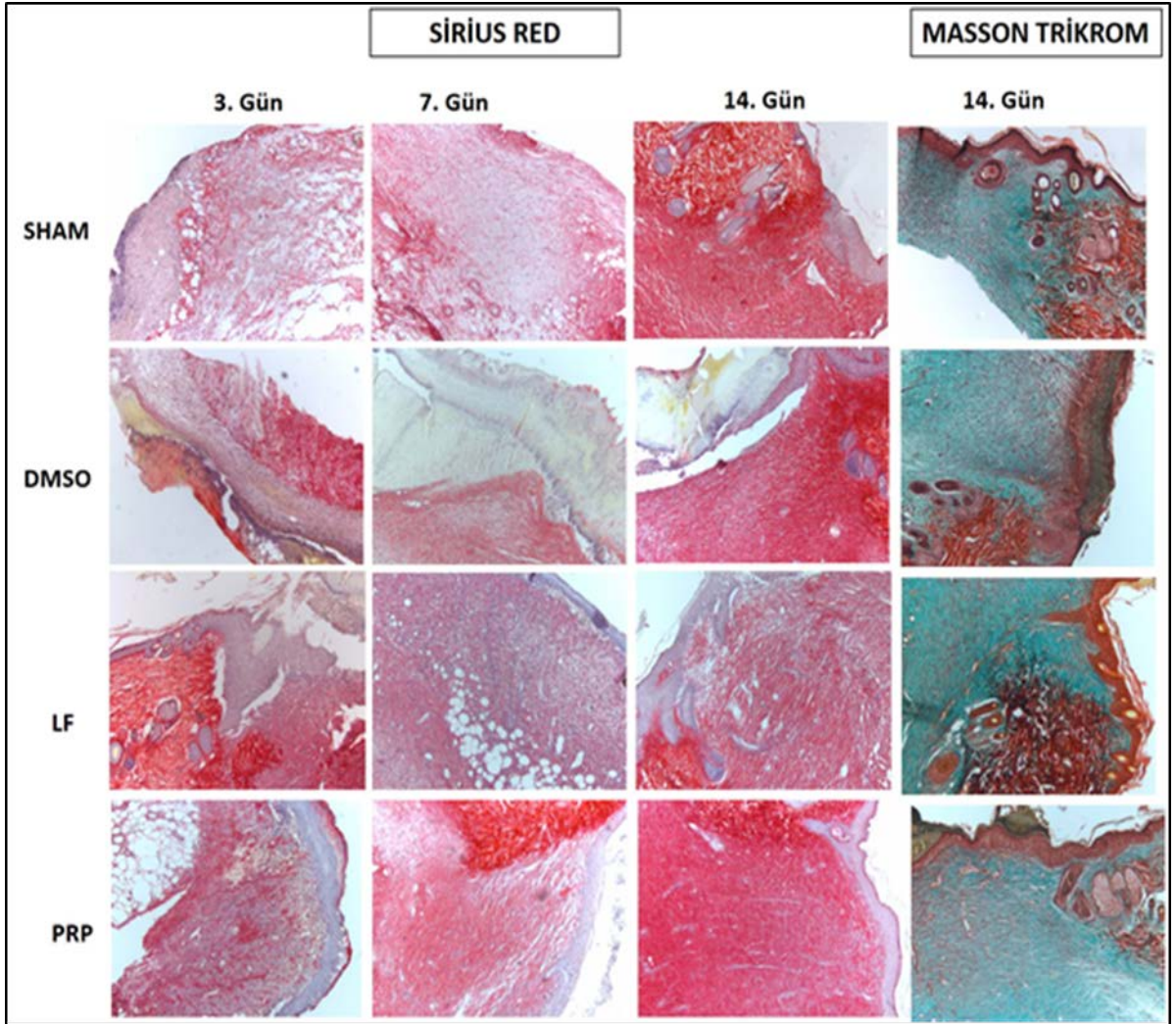


Şekil 4-3 Grupların reepitelizasyon skorlarının karşılaştırılması

\*\*\* SHAM, Lipid fraksiyonu ve DMSO gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

\*\* DMSO ve SHAM gruplarına göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).

\* SHAM grubuna göre anlamlı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4-4** Tüm grupların deri doku kesitlerine ait Sirius Red (3. 7. ve 14. günler) ve Masson Trikrome (14. gün) boyaması. (x50 büyütme)

#### 4.2. Bulguların İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Çalışmamızda deney hayvanları üzerinde yara modelleri oluşturularak; PRP, PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu ve DMSO uyguladığımız ve SHAM (hiçbir etken maddesi uygulamadığımız) gruplarında yara iyileşmesi süreçleri takip edildi. Yara iyileşmesinin 3, 7 ve 14. günlerde alınan deri biyopsi örneklerinde İmmünohistokimyasal analiz için kesitlere TGF- $\beta$ , Kollajen 1 ve Kollajen-3 immünohistokimya boyaması uygulandı. Her bir grup için elde edilen yara skorları One Way Anova testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Anlamli fark görülen gruplar arasında post test olarak Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak gruplar arasındaki ekspresyon anlamlılığı değerlendirildi.

#### 4.2.1. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ile TGF- $\beta$ Ekspresyonlarının Histolojik Değerlendirilmesi (Şekil 4-7):

TGF- $\beta$ , keratinositler, trombositler, makrofajlar, düz kas hücreleri, lenfositler, fibroblastlar ve epitelyal hücreleri tarafından salgılanan hem fibroblastların yara alanına göçünü ve proliferasyonunu hem de Kollajen sentezini uyaran önemli bir yara iyileşmesi faktörüdür. İmmünohistokimya boyama yöntemi uygulanan tüm deney gruplarımızda TGF- $\beta$  immunopozitifliği, yarıkantitatif olarak değerlendirildi.

**Tablo 4-2** Deney gruplarının günlere göre TGF- $\beta$  İmmünopozitifliğinin değerlendirilmesi

TGF- $\beta$	LF	PRP	DMSO	SHAM	P *
<b>3.Gün</b>	1.75 $\pm$ 0.06 <sup>*b</sup>	1.93 $\pm$ 0.07 <sup>*a</sup>	1.32 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.76 $\pm$ 0.07	<0,0001
<b>7.Gün</b>	2.40 $\pm$ 0.04 <sup>*b</sup>	2.54 $\pm$ 0.06 <sup>*a</sup>	1.63 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	1.25 $\pm$ 0.05	<0,0001
<b>14.Gün</b>	1.09 $\pm$ 0.01 <sup>*b</sup>	0.70 $\pm$ 0.07 <sup>*a</sup>	1.85 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	1.70 $\pm$ 0.06	<0,0001

Veriler, Ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

\* *Grupların Bonferroni's çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılması.*

\*Bonferroni's çoklu karşılaştırma testinde DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı (p <0,05).

<sup>a</sup> SHAM, Lipid fraksiyonu ve DMSO gruplarına göre anlamlı (p <0,05).

<sup>b</sup> DMSO ve SHAM gruplarına göre anlamlı (p <0,05).

<sup>c</sup> SHAM grubuna göre anlamlı (p <0,05).

##### 4.2.1.1. 3.gün TGF- $\beta$ ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:

Yara iyileşmesinin 3. gününde alınan örneklerin TGF- $\beta$  immünopozitiflik skorları Anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir (p<0,0001). Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve Lipid fraksiyonu uygulanan grupların TGF- $\beta$  ekspresyon seviyeleri, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (p<0,05). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak yüksektir (p<0,05) (**Tablo 4-2**).

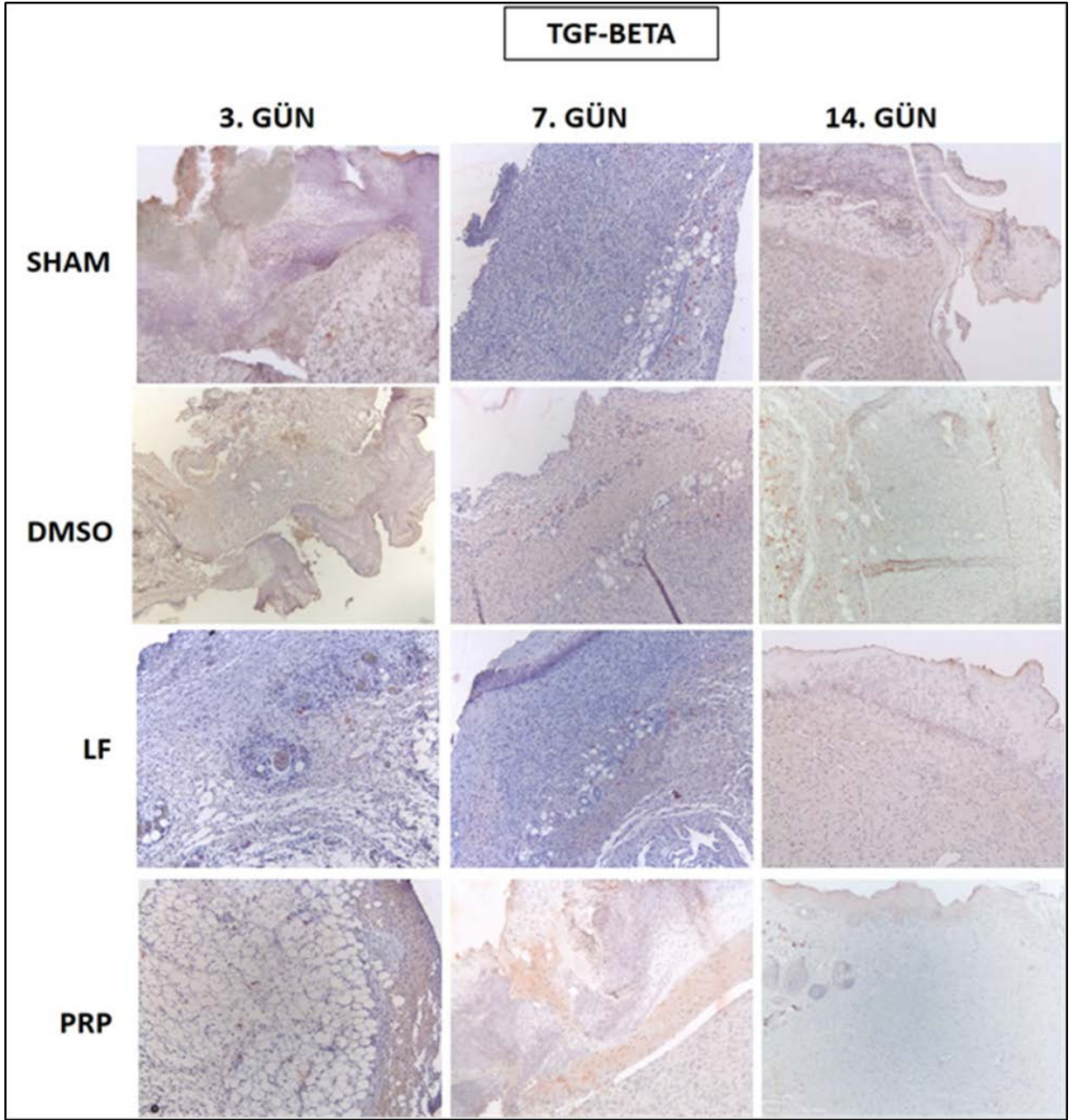
#### 4.2.1.2. 7.gün TGF- $\beta$ ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:

Yara iyileşmesinin 7. gününde alınan örneklerin TGF- $\beta$  immünpozitiflik skorları Anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir ( $p<0,0001$ ). Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve Lipid fraksiyonu uygulanan grupların TGF- $\beta$  ekspresyon seviyeleri, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ) (**Tablo 4-2**).

#### 4.2.1.3. 14.gün TGF- $\beta$ ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:

Yara iyileşmesinin 14. gününde alınan örneklerin TGF- $\beta$  immünpozitiflik skorları Anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir ( $p<0,0001$ ). Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve Lipid fraksiyonu uygulanan grupların TGF- $\beta$  ekspresyon seviyeleri, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak daha düşüktür ( $p<0,05$ ) (**Tablo 4-2**).





**Şekil 4-5 TGF- $\beta$  Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri (x50 büyütme)**

#### 4.2.2. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ile Kollajen 1 Ekspresyonlarının Histolojik Değerlendirilmesi (Şekil 4-8):

Kollajenler, ekstraselüler matriksin ana bileşenidir. Dermis tabakasının % 85'i kollajenden oluşur. Kollajen, kemotaktik rolü nedeniyle yara iyileşmesi aşamalarının her birinde önemli bir rol oynar. Yaralanmayı takiben fibroblastlar ve keratinositler gibi hücreleri yara alanına yönlendirir. Bu özelliğiyle anjiyogenez ve reepitelizasyon fazlarını uyarıcı etkisi vardır. Yara iyileşmesi sürecindeki iki baskın kollajen tipi kollajen 1 ve 3'tür. Kollajen 3 ekspresyon seviyesi, iyileşmenin erken aşamalarında Kollajen 1 ekspresyonuna göre yaklaşık olarak %20-%50 oranında daha fazladır. Skar olgunlaşması sırasında, iki kollajen tipi arasındaki ekspresyon oranı dengeye ulaşır. Bu nedenle Kollajen 1'e göre artan Kollajen 3 miktarı, olgunlaşmamış bir yarayı tanımlar. İmmünohistokimya boyama yöntemi uygulanan deney gruplarımızda Kollajen 1 ve Kollajen 3 immunopozitifliği, yarıkantitatif olarak değerlendirildi. İmmünohistokimya boyama yöntemi ile Kollajen 1 ve Kollajen 3 uyguladığımız deney gruplarımızın mikroskop görüntülerinin günlere göre dağılımı Kollajen 1 için Şekil 4-8'de, Kollajen 3 için Şekil 4-9'da gösterildi.

**Tablo 4-3** Deney gruplarının günlere göre Kollajen 1 İmmünopozitifliğinin değerlendirilmesi

Kollajen 1	LF	PRP	DMSO	SHAM	P*
<b>3.Gün</b>	1.29 ± 0.07 <sup>*b</sup>	1.35 ± 0.01 <sup>*a</sup>	0.88 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.59 ± 0.06	<0,0001
<b>7.Gün</b>	2.04 ± 0.12 <sup>*b</sup>	2.30 ± 0.04 <sup>*a</sup>	1.23 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.15 ± 0.13	<0,0001
<b>14.Gün</b>	2.34 ± 0.12 <sup>*b</sup>	2.59 ± 0.03 <sup>*a</sup>	1.66 ± 0.80 <sup>c</sup>	1.64 ± 0.06	<0,0001

Veriler, Ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

\* *Grupların Bonferroni's çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılması.*

\* Bonferroni's çoklu karşılaştırma testinde DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı (p <0,05).

<sup>a</sup> SHAM, lipid fraksiyonu ve DMSO gruplarına göre anlamlı (p <0,05).

<sup>b</sup> DMSO ve SHAM gruplarına göre anlamlı (p <0,05).

<sup>c</sup> SHAM grubuna göre anlamlı (p <0,05).

#### **4.2.2.1. 3.gün Kollajen 1 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:**

Yara iyileşmesinin 3. gününde alınan örneklerin Kollajen 1 immünpozitiflik skorları Anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir ( $p<0,0001$ ).

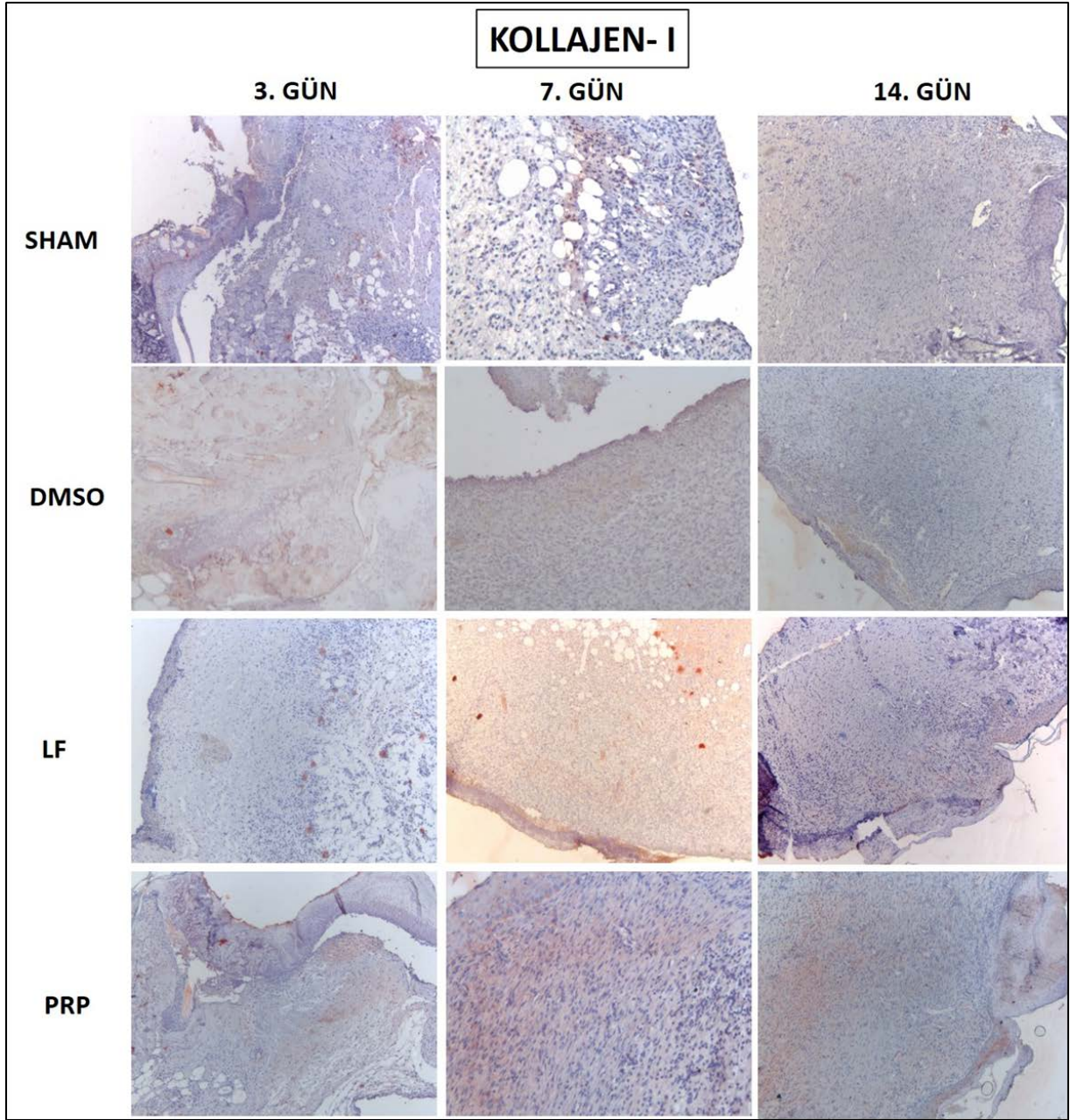
Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların Kollajen 1 ekspresyon seviyeleri, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ) ( **Tablo 4-3**).

#### **4.2.2.2. 7.gün Kollajen 1 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:**

Yara iyileşmesinin 7. gününde alınan örneklerin Kollajen 1 immünpozitiflik skorları anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir ( $p<0,0001$ ). Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların Kollajen 1 ekspresyon seviyeleri, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ) ( **Tablo 4-3**).

#### **4.2.2.3. 14.gün Kollajen 1 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:**

Yara iyileşmesinin 14. gününde alınan örneklerin Kollajen 1 immünpozitiflik skorları anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir ( $p<0,0001$ ). Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların Kollajen 1 ekspresyon seviyeleri, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak yüksektir ( $p<0,05$ ) ( **Tablo 4-3**).



**Şekil 4-6** Kollajen 1 Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri (x50 büyütme)



### 4.2.3. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ile Kollajen 3 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi:

**Tablo 4-4** Deney gruplarının günlere göre Kollajen-3 İmmünpozitifliğinin değerlendirilmesi

Kollajen 3	LF	PRP	DMSO	SHAM	P*
<b>3.Gün</b>	2.26 ± 0.03* <sup>b</sup>	2.55 ± 0.06* <sup>a</sup>	1.82 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.58 ± 0.04	<0,0001
<b>7.Gün</b>	1.83 ± 0.05 * <sup>b</sup>	1.68 ± 0.05 * <sup>a</sup>	2.13 ± 0.12 <sup>c</sup>	1.94 ± 0.04	<0,0001
<b>14.Gün</b>	0.76 ± 0.06 * <sup>b</sup>	0.63 ± 0.04 * <sup>a</sup>	1.33 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.18 ± 0.04	<0,0001

Veriler, Ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

\* *Grupların Bonferroni's çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılması.*

\* Bonferroni's çoklu karşılaştırma testinde DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı (p <0,05).

<sup>a</sup> SHAM, lipid fraksiyonu ve DMSO gruplarına göre anlamlı (p <0,05).

<sup>b</sup> DMSO ve SHAM gruplarına göre anlamlı (p <0,05).

<sup>c</sup> SHAM grubuna göre anlamlı (p <0,05).

#### 4.2.3.1. 3.gün Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:

Yara iyileşmesinin 3. gününde alınan örneklerin Kollajen 3 immünpozitiflik skorları anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir (p<0,0001). Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların, Kollajen 3 ekspresyon seviyeleri DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (p<0,05). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak yüksektir (p<0,05) (**Tablo 4-4**).

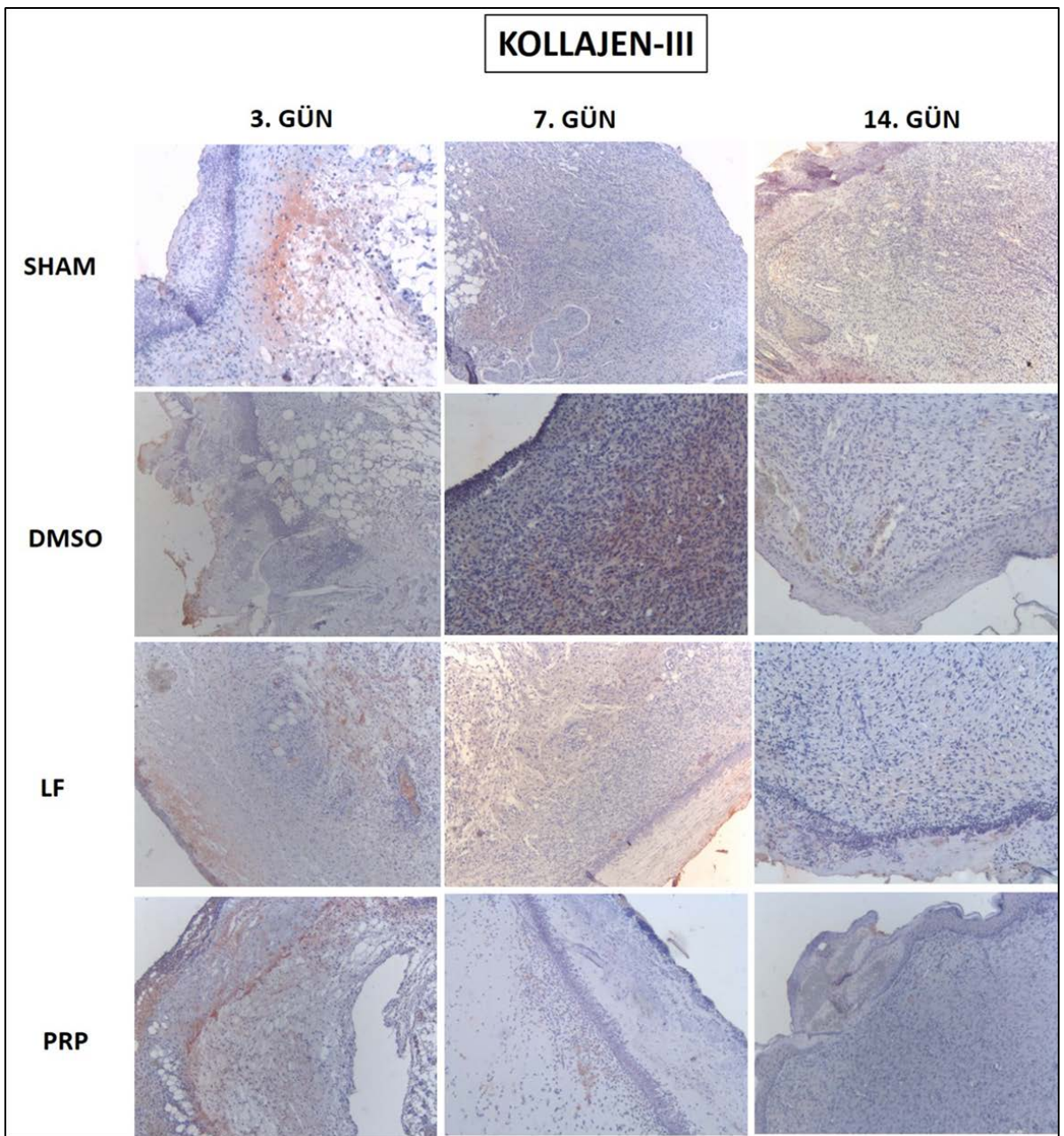
#### 4.2.3.2. 7.gün Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:

Yara iyileşmesinin 7. gününde alınan örneklerin Kollajen 3 immünpozitiflik skorları anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir (p<0,0001). Bonferroni's testi ile grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların Kollajen 3 ekspresyon seviyeleri, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak düşüktür (p<0,05). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak daha düşüktür (p<0,05) (**Tablo 4-4**).

#### 4.2.3.3. 14.gün Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi:

Yara iyileşmesinin 14. gününde alınan örneklerin Kollajen 3 immünopozitiflik skorları anova testi ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir ( $p < 0,0001$ ).

Bonferroni's testi grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile de PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların, Kollajen 3 ekspresyon seviyeleri DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ( $p < 0,05$ ). Aynı zamanda PRP grubunun değerleri, lipid fraksiyonuna göre anlamlı olarak daha düşüktür ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4-4).



Şekil 4-7 Kollajen 3 Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri (x50 büyütme)

## 5. TARTIŞMA

Yara iyileşmesi, uzun yıllar boyunca tıp alanında üzerine oldukça çok çalışma yapılan bir süreçtir. Yara iyileşmesi süreci, çok sayıda basamaktan oluşan bir seri moleküler olayların koordineli bir biçimde ard arda gelişmesi sonucu oluşur. Herhangi bir etki vasıtasıyla deri veya dokuda meydana gelen yaralanmalar sonucu oluşan hasarın kaliteli bir şekilde tamir edilmesi, yara alanında minimum düzeyde skar (yara izi) oluşumunu sağlamak, yaranın vermiş olduğu acı hissini azaltmak ve iyileşme sürecini daha da hızlandırmak gibi hedefler doğrultusunda yapılan çalışmalar; tıp dünyasını alternatif tedavi yöntemleri geliştirmeye itmiştir.

Dokuda yaralanmayı takiben başlayan yara iyileşmesi süreci; inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma evrelerinden oluşur. Bu evreler, moleküler anlamda karmaşık olsa da birbirleriyle bir düzen içerisinde çalışarak tamir sürecini gerçekleştirirler. Yara iyileşme sürecinde birçok faktör rol oynamakla birlikte bu süreçte büyüme faktörleri ve sitokinlerin rolleri ayrıntılı olarak birçok çalışmada incelenmiştir. Büyüme faktörleri, canlıların büyüme ve gelişim sürecinde yaşamlarını devam ettirmeleri için hayatları boyunca süren kemotaksis, hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalması gibi hücreyel olayları düzenler. Büyüme faktörleri polipeptit yapıda, olan vücut gereksinimlerine göre büyüme ile ilgili kimyasal ileti molekülleridir. Hücre bölünmesini aktif veya inaktif edebilen ve hücrelerin özelleşmiş hücrelere farklılaşmasını sağlayan, çok az miktarlarıyla bile etkili olabilen proteinlerdir (131).

Yara iyileşmesinin doğal seyrinde büyüme faktörlerinin aktif olarak işlev görmesi, yara alanına dışardan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacına ışık tutmuş ve araştırmacıları bu konu üzerine eğilmeye yönlendirmiştir. Özellikle yara iyileşmesi sürecinin proliferasyon evresinde gerçekleşen hücreyel ve biyokimyasal olayların koordinasyonu, büyüme faktörlerinin üretildiği hücre gruplarını uyarması sonucu gerçekleşir (132).

Günümüzde iyileşmesi zor ya da iyileşmeyen kronik yaraları tedavi etmek amacıyla büyüme faktörlerince zengin içerikli biyokomponentlerin tedavi yöntemlerinde kullanılması ön planda tutulmaya başlanmıştır.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda, Trombosit'ten elde edilen PRP'nin büyüme faktörlerince yüksek orandaki içeriği sebebiyle yara üzerindeki iyileştirici etkisi tespit edilmiştir (133). PRP tedavisi uygulanarak, plastik cerrahi, diş hekimliği, dermatoloji ve ortopedi gibi birçok alanda çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Deney hayvanları kullanılarak oluşturulan modeller üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar aracılığıyla yara iyileşmesinin makroskopik ve moleküler düzeydeki olayları araştırılmaktadır. PRP ve içeriğinin keşfedilmesiyle, büyüme faktörlerinin moleküler mekanizmalarının anlaşılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar, PRP tedavisinin klinik uygulamalardaki kullanımını için yeni fikirler vermektedir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda, yara iyileşmesi süresince sitokinlerle beraber biyoaktif lipidlerin ve aracılarının, hasarlanan deri dokusunun rejenerasyonu ve inflamasyonun çözülmesi için rolü olan mekanizmalarda önemli fonksiyonlara sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Trombositlerde de bulunan ve trombosit hücre zarından yağ aside türevlerinin enzimatik reaksiyonları sonucu oluşan eikozanoidlerin, endocannabinoidlerin ve sfingolipidlerin özellikle hemostaz ve deri inflamasyonu üzerinde etkilerinin olduğu ve inflamatuvar hücrelerin yara alanına toplanmasını etkileyerek derinin immün yanıtını düzenleyebileceği gösterilmiştir (6,7,8). Söz konusu lipid aracılarının öncü molekülü olan PUFA'ların sistematik ve/veya topikal uygulamasının lipid aracılarının oluşumunu ve bunların etkinliğini yara mikro çevresinde düzenlediği ileri sürülmüştür. Ancak tezin kurgulandığı ve yazıldığı dönemi de içine alan süreç içindeki literatür bilgimiz, lipidlerin yara iyileşmesi üzerine olan etkisini araştıran çalışma sayısının oldukça sınırlı olduğunu göstermektedir.

Bu konuda 2016 yılında Hoeflerlin ve ark. gerçekleştirmiş olduğu *in vitro* çalışmada, PRP bileşenlerinden protein yapıda olanların yara bölgesindeki proteaz aktivitesinden dolayı parçalandığı ancak lipid kısmının iyileştirici etkiyi devam ettirdiği ileri sürülmüştür (5). Bu fikirle yola çıkılarak PRP'den izole edilen lipid fraksiyonu içeriğinin kronik yara modeli üzerindeki iyileştirici etkisinin gösterilmesi amaçlanmış ve elde ettikleri bulgularla da lipid fraksiyonu tedavisinin *in vitro* kronik yaraların iyileşme sürecinde iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (5). Elde ettikleri bulgulara göre *in vitro* kronik yara iyileşme sürecinde; lipid fraksiyonu içeriğinde yer alan lipid aracılarının bir sınıfı olan Araşidonik asit türevli eikozonoidlerin özellikle iyileşme sürecinde eksprese oldukları ve sürece olumlu katkıda buldukları gösterilmiştir.

Hoferlin ve ark.nın yapmış oldukları bu çalışma *in vitro* kronik yara modelinde gerçekleştirilmiş ve konuyla ilgili bir *in vivo* çalışmanın olmaması literatürde bir boşluğa sebep olmuştur. Bu boşluğu doldurmak amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmamız, eksizyon yöntemiyle oluşturulan tam kat yara modeli üzerinde *in vivo* olarak gerçekleştirilmiş ve PRP'den elde edilen lipid fraksiyonunun derinin yara iyileşmesi süreci üzerinde iyileştirici bir etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmamızda aynı hipotez, *in vivo* olarak test edilip kaynağını bu noktadan almıştır.

Çalışmamızın neticesinde yapılan mikroskopik hesaplamalardan ve histolojik analizlerden elde edilen veriler değerlendirildi. Yaralanmayı takiben 3, 7 ve 14. günlerde alınan deri biyopsileri, rutin doku takip işlemlerinden geçirilip, parafin maddesine gömülerek katı parafin bloklar haline getirildi. Ardından her bloktaki doku örneklerinden 3-5 µm kalınlığında kesitler pozitif şarjlı lamalar üzerine alındı. Tüm doku kesitlerinin Masson Trikrom ve Sirius Red boyaları ile histokimyasal boyamaları yapıldı. Bu boyalar uygulanarak yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında görülen Granülasyon, Anjiyogenez ve Reepitelizasyon fazlarının gösterdiği bulgulara göre histopatolojik skorlama yapıldı. Histopatolojik skorlama, Galeano ve ark. (2006) skorlama metodu ile yapıldı.

SHAM, DMSO, PRP ve lipid fraksiyonu gruplarının histopatolojik skorları, One Way Anova testi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark görüldü. Aynı zamanda Bonferroni's çoklu karşılaştırmalı testi, çalışmamızda yer alan tüm grupların birbirleri ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucu verdi. Sonuçlarımız, PRP tedavisi uyguladığımız grupların skor ortalamalarının; lipid fraksiyonu tedavisi uyguladığımız, DMSO uyguladığımız ve SHAM (hiçbir etken maddesi uygulanmayan) grupların skor ortalamalarına göre anlamlı olarak yüksek olduğunu gösterdi.

PRP tedavisi uyguladığımız grupların skor ortalamaları, lipid fraksiyonu tedavisi uyguladığımız grupların skor ortalamalarından anlamlı olarak az bir farkla daha yüksek çıktı. Bu istatistik sonuçlarına göre PRP tedavisi uyguladığımız gruplar, lipid fraksiyonu uyguladığımız gruplara oranla yara iyileşmesinin proliferasyon evresinde az bir farkla olsa da daha hızlı bir sonuç verdi. DMSO ve SHAM gruplarının proliferasyon evresindeki gelişimini ise beklediğimiz üzere PRP ve lipid fraksiyonu gruplarına göre daha yavaş tamamladı.

Yara iyileşmesinde eksprese olduğu bilinen ve aktif rolü olan TGF- $\beta$ , Kollajen 1 ve Kollajen 3 proteinlerinin, çalışmamızda tedavi uyguladığımız gruplarımızdaki yara iyileşmesi sürecindeki ekspresyon seviyelerini incelemek amacıyla tüm doku kesitlerine TGF- $\beta$ , Kollajen 1 ve Kollajen 3 İmmünohistokimya boyaması uygulandı. Uygulanan TGF- $\beta$ , Kollajen 1 ve Kollajen 3 immünohistokimya boyalarının immünopozitifliğinin her bir grup için 3, 7 ve 14. günlere göre yarıkantitatif olarak skorlaması yapıldı. Verilen skorlar kullanılarak One Way Anova testi uygulanarak, gruplar arasındaki farkın anlamlılığı değerlendirildi.

Tüm gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu. Ayrıca post test olarak uyguladığımız Bonferroni's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gruplar arasındaki birebir anlamlılık değerlendirildi. Bonferroni's testi, çalışmamızda yer alan tüm grupların birbirleri ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucu verdi. Yara iyileşmesinin 3 ve 7. günlerinde PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların TGF- $\beta$  ekspresyon seviyelerinin, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu; 14. günde ise PRP ve lipid fraksiyonu uygulanan grupların TGF- $\beta$  ekspresyon seviyelerinin, DMSO ve SHAM grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu sonucunu verdi.

Yara iyileşmesinin 3 ve 7. günlerinde TGF- $\beta$  ekspresyonunun yoğun olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda TGF- $\beta$ 'nin yara iyileşmesinin 3 ve 7. günlerdeki ekspresyon seviyeleri gruplar arasında değerlendirildiğinde, PRP ve lipid fraksiyonu gruplarındaki ekspresyonun seviyelerinin DMSO ve SHAM gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. PRP gruplarımızın 3 ve 7. günlerdeki TGF- $\beta$  ekspresyon seviyesi lipid fraksiyonu gruplarındaki ekspresyonun seviyelerine göre daha yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı. DMSO gruplarındaki TGF- $\beta$  ekspresyon seviyelerinin de SHAM gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Yara iyileşmesinin 14. gününde TGF- $\beta$  ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir. Yara iyileşmesinin 14. gününde ise PRP ve lipid fraksiyonu gruplarındaki TGF- $\beta$  ekspresyonu seviyelerinin DMSO ve SHAM gruplarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. PRP gruplarımızın 14. günündeki TGF- $\beta$  ekspresyon seviyesinin lipid fraksiyonu gruplarındaki ekspresyon seviyelerine göre daha düşük olduğu sonucuna varıldı. DMSO gruplarındaki TGF- $\beta$  ekspresyon seviyelerinin de SHAM gruplarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

Yara iyileşmesinde TGF- $\beta$  tarafından sentezi uyarılan Kollajen 3'ün ekspresyonunun, iyileşmenin 3 ve 7. günlerinde yoğun olduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda Kollajen 3'ün yara iyileşmesinin 3 ve 7. günlerdeki ekspresyon seviyeleri gruplar arasında değerlendirildiğinde, PRP ve lipid fraksiyonu gruplarındaki ekspresyonun seviyelerinin DMSO ve SHAM gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. TGF- $\beta$  ekspresyon seviyeleri analizindeki gibi PRP gruplarımızın 3 ve 7. günlerdeki Kollajen 3 ekspresyon seviyesinin de lipid fraksiyonu gruplarındaki ekspresyon seviyelerine göre daha yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı. Yine TGF- $\beta$  ekspresyon seviyeleri analizine benzer bir sonuç olarak, DMSO gruplarındaki Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin de SHAM gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Yara iyileşmesinin 14. gününde ise Kollajen 3 ekspresyonunun TGF- $\beta$  ekspresyonu ile doğru orantılı olarak azaldığı bilinmektedir. Yara iyileşmesinin 14. gününde ise PRP ve lipid fraksiyonu gruplarındaki Kollajen 3 ekspresyonu seviyelerinin DMSO ve SHAM gruplarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. PRP gruplarımızın 14. günündeki Kollajen 3 ekspresyon seviyesinin lipid fraksiyonu gruplarındaki ekspresyon seviyelerine göre daha düşük olduğu ve DMSO gruplarındaki Kollajen 3 ekspresyon seviyelerinin de SHAM gruplarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

Yara iyileşmesinde Kollajen 3, proliferasyon evresinin granülasyon dokusu oluşumunda yüksek düzeyde eksprese edilir. Bu evre tamamlandıktan sonra Kollajen 3 yerini büyük ölçüde Kollajen 1'e bırakır. Yara iyileşmesinde Kollajen 1 ekspresyonunun, iyileşmenin 7 ve 14. günlerinde yoğun olduğu bilinmektedir. Bu yönde yaptığımız çalışmamızda yara iyileşmesinin 3, 7 ve 14. günlerdeki Kollajen 1 ekspresyonu düzeyleri gruplar arasında değerlendirildiğinde, PRP ve lipid fraksiyonu gruplarımızın ekspresyon düzeylerinin DMSO ve SHAM gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Yara iyileşmesinin tüm günlerinde Kollajen 1'in PRP gruplarındaki ekspresyonu düzeyleri lipid fraksiyonu gruplarımızın ekspresyon düzeylerine göre daha yüksek sonuç verdi. Yine tüm günlerde Kollajen 1'in DMSO gruplarındaki ekspresyonu düzeyleri, SHAM gruplarımızın ekspresyon düzeylerine göre daha yüksek sonuç verdi.

Çalışmamızda kullandığımız gruplarımıza, yara iyileşmesi sürecinde aktif olarak rol alan parametrelerden TGF- $\beta$ , Kollajen 1 ve Kollajen 3'ün immünohistokimyasal boyama metodu uygulanarak histolojik analiz gerçekleştirildi. Yaptığımız analiz sonucu bulgularımız göz önüne alındığında, çalışmamızın ana fikri olan PRP'den izole edilen lipid fraksiyonu tedavisinin yara iyileşmesi sürecindeki etkisinin PRP tedavisi ile karşılaştırılması yapıldı. Yapılan karşılaştırma sonucunda, PRP tedavisi uyguladığımız deney gruplarımızın; lipid fraksiyonu tedavisi uyguladığımız deney gruplarımıza göre daha hızlı yara iyileşme süreci gerçekleştirdiği tespit edildi. Ancak lipid fraksiyonu tedavisinin de yara iyileşmesi sürecinde iyileştirici bir etkiye sahip olması ve PRP tedavisine yakın bulgular vermesi önemlidir. Lipid fraksiyonunun dış etkenlere daha dirençli olmasını da göz önünde tutarsak ileride yapılacak çalışmalar PRP'den elde edilecek lipid fraksiyonunun tedavi edici potansiyelini ortaya koyabilir.

Çalışmamızın sonuçlarına etki eden bazı kısıtlayıcı yönleri de bulunmaktadır. İlk olarak kontrol grubu olarak kullandığımız SHAM grubunda oluşturduğumuz yaralar, diğer gruplarda oluşturduğumuz yaralar gibi herhangi bir biyolojik sıvı ile nemlendirilmemiştir ve kuru durumda bırakılmıştır. Literatüre göre yaranın nemli olması proliferasyon evresine geçişte rol oynayarak, yaraların kapanma hızına etki eder. Çalışmanın standart olması yönünden SHAM grubu yaraları saf su veya PBS ile nemlendirilmesi son derece önemliydi. Ek olarak literatürde yer alan PRP'den izole edilen lipid fraksiyonu tedavisinin yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışma kronik yaralar üzerinde yapılmışken, bizim çalışmamızda ise sağlıklı hayvanlarda oluşturulan eksizyon (kesip çıkarma) yara modelidir (10).



Yara iyileşmesi sürecinin son evresinde SHAM grubunda %80 oranında kapanma görülmüştür. PRP'den izole edilen lipid fraksiyonu tedavisinin yara iyileşmesine olan etkilerine ait daha kapsamlı ve net bulgular elde etmek amacıyla kronik yara veya daha farklı yara modelleri üzerinde çalışılmalıdır. Ayrıca hipertrofik ve keloid skar gibi anormal yara iyileşmesi sonucu oluşan skar tipleri üzerinde PRP'den izole edilen lipid fraksiyonu ve PRP tedavilerinin karşılaştırılarak değerlendirilmesi önerilir.

Özetle çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgular, PRP'den izole edilen lipid fraksiyonunun yara iyileştirici etkisinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte bulgularımız, lipid fraksiyonunun iyileştirici etkiye sahip olmasına rağmen PRP'nin iyileştirici etkisinin daha etkili olduğu sonucunu verdi. PRP'nin tedavi edici etkisinin içeriğindeki büyüme faktörleri olduğu birçok çalışmada ileri sürülmüştür. Ancak bu büyüme faktörlerinin protein yapıda olması, proteinlerin de doğal yapısının uzun bekleme sürelerinde bozulabilir olması ve yara mikro çevresinde proteinazlara karşı hassas olması daha kompleks bir yara durumunda PRP'nin iyileştirici etkisinin azalmasına sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple PRP'nin içeriğinde bulunan, doğal yapısı itibarıyla uzun bekleme sürelerinde kararlı ve bozunması zor olan lipid fraksiyonunun kompleks yaralarda tedavi amaçlı kullanılabileceği fikri literature yeni bir bakış açısı getirecektir. Farklı yara modelleri ve PRP ile lipid fraksiyonunun farklı bekleme süreleri ile yapılacak ileriki çalışmaların, konu ile ilgili olarak daha aydınlatıcı bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Zimmermann, K.A. (2016). Skin: Facts, Diseases & Conditions. Erişim 11.03.2016 <http://www.livescience.com/27115-skin-facts-diseases-conditions.html>. (Şekil Türkçeleştirilmiştir.)
2. Altuntaş Z. ve ark. Trombositten zengin plazma, Trombositten fakir plazma, Trombositten zengin fibrin kavramları, yara iyileşmesindeki biyolojik rolleri ve plastik cerrahide kullanım alanları. Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi, Konya 2014 Cilt **22** / Sayı 2
3. Marck, R.E., et al., The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: A randomized, double-blind, intra-patient controlled study. *Wound Repair Regen*, 2016. **24**(4): p. 712-20.
4. Masuki, H., et al., Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*, 2016. **2**(1): p. 19.
5. Hoferlin, L.A., et al., The Lipid Portion of Activated Platelet-Rich Plasma Significantly Contributes to Its Wound Healing Properties. *Advances in Wound Care*, 2015. **4**(2): p. 100-109.
6. Buckley, C.D., D.W. Gilroy, and C.N. Serhan, Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, 2014. **40**(3): p. 315-27.
7. Kendall, A.C. and A. Nicolaou, Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog Lipid Res*, 2013. **52**(1): p. 141-64.
8. Buckley, C.D., D.W. Gilroy, and C.N. Serhan, Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, 2014. **40**(3): p. 315-27.
9. KÖKLÜ, D.A.H.K. and D.A.U. ÇANKAL, Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler İçerisinde Beslenmenin Yeri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 2013. **23**.

10. Shah, J.B., The history of wound care. The Journal of the American College of Certified Wound Specialists, 2011. **3**(3): p. 65-66.

11. Gonzalez A., et al., Wound healing– a literature review. Anais Brasileiros de Dermat **91**: 614–620. 2016. (Şekil Türkçeleştirilmiştir.)

12. Lazarus, G.S., et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. Wound Repair and Regeneration, 1994. **2**(3): p. 165-170.

13. Robson, M.C., D.L. Steed, and M.G. Franz, Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Current problems in surgery, 2001. **38**(2): p. 72-140.

14. Strodbeck, F., Physiology of wound healing. Newborn and infant nursing reviews, 2001. **1**(1): p. 43-52.

15. Martin, P., Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.

16. Woo, Y.C., et al., Changes in tissue pH and temperature after incision indicate acidosis may contribute to postoperative pain. Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists, 2004. **101**(2): p. 468-475.

17. Werner, S. and R. Grose, Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological reviews, 2003. **83**(3): p. 835-870.

18. Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(3): p. 514-525.

19. Daley, J.M., et al., Modulation of macrophage phenotype by soluble product (s) released from neutrophils. The Journal of Immunology, 2005. **174**(4): p. 2265-2272.

20. Profyris, C., C. Tziotzios, and I. Do Vale, Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. Journal of the American Academy of Dermatology, 2012. **66**(1): p. 1-10.

21. Di Pietro, L. and P. Polverini, Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Institute Mitteilungen*, 1993(92): p. 238-247.
22. Bauer, S.M., R.J. Bauer, and O.C. Velazquez, Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vascular and endovascular surgery*, 2005. **39**(4): p. 293-306.
23. Sorg, H., et al., Effects of Erythropoietin in Skin Regeneration and Repair. *Frontiers in Drug Discovery: Erythropoietic Stimulating Agents*, 2013. **1**: p. 1160. (Şekil Türkçeleştirilmiştir.)
24. Arnold, F. and D.C. West, Angiogenesis in wound healing. *Pharmacology & therapeutics*, 1991. **52**(3): p. 407-422.
25. Endrich, B. and M. Menger, Regeneration of the microcirculation during wound healing? *Der Unfallchirurg*, 2000. **103**(11): p. 1006.
26. Madden, J.W. and E.E. Peacock Jr, *Studies on the biology of collagen during wound healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds*. *Annals of surgery*, 1971. **174**(3): p. 511.
27. Lau, K., et al., *Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing*. *Experimental dermatology*, 2009. **18**(11): p. 921-933.
28. Miller, S.J., et al., *Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1998. **110**(1): p. 13-19.
29. Roh, C. and S. Lyle, *Cutaneous stem cells and wound healing*. *Pediatric research*, 2006. **59**(S4): p. 100R.
30. Jacinto, A., A. Martinez-Arias, and P. Martin, Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature cell biology*, 2001. **3**(5): p. E117.
31. Clark, R.A., et al., Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *Journal of Investigative Dermatology*, 1982. **79**(5): p. 264-269.
32. Nobes, C.D. and A. Hall, Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of cell biology*, 1999. **144**(6): p. 1235-1244.

33. Sorg, H., C. Krueger, and B. Vollmar, Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *Journal of anatomy*, 2007. **211**(6): p. 810-818.

34. Nauta, A., G. Gurtner, and M. Longaker, Wound healing and regenerative strategies. *Oral diseases*, 2011. **17**(6): p. 541-549.

35. Eckes, B., R. Nischt, and T. Krieg, Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis & tissue repair*, 2010. **3**(1): p. 4.

36. Barker, T.H., The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. *Biomaterials*, 2011. **32**(18): p. 4211-4214.

37. Hinz, B., Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007. **127**(3): p. 526-537.

38. Greenhalgh, D.G., The role of apoptosis in wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 1998. **30**(9): p. 1019-1030.

39. Conley, C., Hemostasis. *Medical Physiology*. St. Louis: Mosby, 2004: p. 1137-1146.

40. Anitua, E., et al., Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*, 2004. **91**(01): p. 4-15.

41. Nguyen, R.T., J. Borg-Stein, and K. McInnis, Applications of platelet-rich plasma in musculoskeletal and sports medicine: an evidence-based approach. *PM&R*, 2011. **3**(3): p. 226-250.

42. Eppley, B.L., W.S. Pietrzak, and M. Blanton, Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006. **118**(6): p. 147e-159e.

43. Lacci, K.M. and A. Dardik, Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *The Yale journal of biology and medicine*, 2010. **83**(1): p. 1.

44. Available from: <http://www.prphairlossmd.com/blog/science-behind-prp/>  
(Şekil Türkçeleştirilmiştir.)

45. Cohen, I.K., et al., Wound healing: biochemical and clinical aspects. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1992. **90**(5): p. 926.

46. Marx, R.E., Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry*, 2001. **10**(4): p. 225-228.

47. Platelet-Rich Regenerative Therapy. 2017;

Available from: <http://www.melsmon.co.kr/front/product/device?langCd=en>.

48. Available from: <http://www.prphairlossmd.com/what-is-prp/>

(Şekil Türkçeleştirilmiştir.)

49. Sequeria, J.P. and S. Johri, Platelet rich plasma: clinical applications in dentistry. *Sch J Dent Sci*, 2015. **2**: p. 355-362.

50. O'donnell, V.B., R.C. Murphy, and S.P. Watson, Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circulation research*, 2014. **114**(7): p. 1185-1203.

51. Hamid, M.A., T.J. Kunicki, and R.H. Aster, Lipid composition of freshly prepared and stored platelet concentrates. *Blood*, 1980. **55**(1): p. 124-130.

52. Owen, J.S., et al., Platelet lipid composition and platelet aggregation in human liver disease. *Journal of lipid research*, 1981. **22**(3): p. 423-430.

53. Spangenberg, P., et al., Localization of phosphatidylethanolamine in the plasma membrane of diamide-treated human blood platelets. *Biomedica biochimica acta*, 1985. **44**(9): p. 1335-1341.

54. Zwaal, R., P. Comfurius, and L. Van Deenen, Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature*, 1977. **268**(5618): p. 358-360.

55. Schoenwaelder, S.M., et al., Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*, 2009. **114**(3): p. 663-666.

56. Banno, Y., et al., Purification and characterization of a cytosolic phosphoinositide-phospholipase C ( $\gamma$ 2-type) from human platelets. *Biochemical and biophysical research communications*, 1990. **167**(2): p. 396-401.

57. Derksen, A. and P. Cohen, Patterns of fatty acid release from endogenous substrates by human platelet homogenates and membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 1975. **250**(24): p. 9342-9347.

58. Bills, T., J. Smith, and M. Silver, Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin. *The Journal of clinical investigation*, 1977. **60**(1): p. 1-6.

59. Choi, J., et al., Lysophosphatidylcholine is generated by spontaneous deacylation of oxidized phospholipids. *Chemical research in toxicology*, 2010. **24**(1): p. 111-118.

60. Marcus, A.J., H.L. Ullman, and L.B. Safier, Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *Journal of lipid research*, 1969. **10**(1): p. 108-114.

61. Futerman, A.H. and Y.A. Hannun, The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*, 2004. **5**(8): p. 777-782

62. Dahm, F., et al., Distribution and dynamic changes of sphingolipids in blood in response to platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2006. **4**(12): p. 2704-2709.

63. Yatomi, Y., et al., Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood*, 1995. **86**(1): p. 193-202.

64. Sporn, M. and A.B. Roberts, Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 1986. **78**(2): p. 329-332.

65. Milani, S., et al., Transforming growth factors beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. *The American journal of pathology*, 1991. **139**(6): p. 1221.

66. Thébaud, B. and S.H. Abman, Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2007. **175**(10): p. 978-985.

67. Deverman, B.E. and P.H. Patterson, Cytokines and CNS development. *Neuron*, 2009. **64**(1): p. 61-78.

68. Zidek, Z., P. Anzenbacher, and E. Kmoníčková, Current status and challenges of cytokine pharmacology. *British journal of pharmacology*, 2009. **157**(3): p. 342-361.

69. Barnes, P.J., The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation*, 2008. **118**(11): p. 3546-3556.

70. Ono, I., et al., Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid. *Journal of dermatological science*, 1995. **10**(3): p. 241-245.

71. Griffith, J.W., C.L. Sokol, and A.D. Luster, Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 2014. **32**: p. 659-702.

72. Gallo, R.C. and P. Lusso, Chemokines and HIV infection. *Current opinion in infectious diseases*, 1997. **10**(1): p. 12-17.

73. Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage (VCH, 1995), and *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition (Garland, 2002), 1995.

74. Clark, R.A., Biology of dermal wound repair. *Dermatologic clinics*, 1993. **11**(4): p. 647-666.

75. Mac Neil, S., What role does the extracellular matrix serve in skin grafting and wound healing? *Burns*, 1994. **20**: p. S67-S70.

76. Midwood, K.S., L.V. Williams, and J.E. Schwarzbauer, Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2004. **36**(6): p. 1031-1037.

77. Smith, B., Expression and regulation of the collagen family in skin. *Wound Healing and the Skin*. London, UK: Martin Dunitz Limited, 2001: p. 57-60.

78. Li, J., Y.P. Zhang, and R.S. Kirsner, Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy research and technique*, 2003. **60**(1): p. 107-114.

79. Rapraeger, A.C., A. Krufka, and B.B. Olwin, Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 1991. **252**(5013): p. 1705-1708.



80. Tonnesen, M.G., X. Feng, and R.A. Clark. Angiogenesis in wound healing. in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2000. Elsevier.

81. Soldi, R., et al., Role of  $\alpha v\beta 3$  integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *The EMBO journal*, 1999. **18**(4): p. 882-892.

82. Brown, E.J. and J.L. Goodwin, Fibronectin receptors of phagocytes. Characterization of the Arg-Gly-Asp binding proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1988. **167**(3): p. 777-793.

83. Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh, Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 1994. **264**(5158): p. 569-571.

84. Arora, P.D., N. Narani, and C.A. McCulloch, The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor- $\beta$  induction of  $\alpha$ -smooth muscle actin in fibroblasts. *The American journal of pathology*, 1999. **154**(3): p. 871-882.

85. Falanga, V., Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 2005. **366**(9498): p. 1736-1743.

86. Xue, M. and C.J. Jackson, Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in wound care*, 2015. **4**(3): p. 119-136. (Şekil Türkçeleştirilmiştir.)

87. Massague, J., et al., Transforming growth factor-beta. *Cancer surveys*, 1992. **12**: p. 81-103.

88. Burt, D.W. and A.S. Law, Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Progress in growth factor research*, 1994. **5**(1): p. 99-118.

89. Saarma, M., GDNF—a stranger in the TGF- $\beta$  superfamily? *European journal of biochemistry*, 2000. **267**(24): p. 6968-6971.

90. Kehrl, J.H., et al., Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine*, 1986. **163**(5): p. 1037-1050.

91. Sporn, M.B., et al., Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science*, 1986. **233**(4763): p. 532-534.

92. Roberts, A.B., et al. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. in Federation proceedings. 1983.

93. Kothapalli, R., et al., Detection of eba1, a novel human gene of the transforming growth factor beta superfamily association of gene expression with endometrial bleeding. The Journal of clinical investigation, 1997. **99**(10): p. 2342-2350.

94. Roberts, A.B., Molecular and cell biology of TGF- $\beta$ . Mineral and electrolyte metabolism, 1998. **24**(2-3): p. 111-119.

95. Moses, H.L., et al., Transforming growth factor  $\beta$  regulation of cell proliferation. Journal of Cellular Physiology, 1987. **133**(S5): p. 1-7.

96. Taipale, J., J. Saharinen, and J. Keski-Oja, Extracellular matrix-associated transforming growth factor- $\beta$ : role in cancer cell growth and invasion, in Advances in cancer research. 1998, Elsevier. p. 87-134.

97. Kretzschmar, M., J. Doody, and J. Massagu, Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- $\beta$  family mediator Smad1. Nature, 1997. **389**(6651): p. 618.

98. Bikfalvi, A., Significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. European Journal of Cancer, 1995. **31**(7): p. 1101-1104.

99. Blottner, D., et al., TGF- $\beta$  rescues target-deprived preganglionic sympathetic neurons in the spinal cord. European Journal of Neuroscience, 1996. **8**(1): p. 202-210.

100. Streuli, C.H., et al., Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta 1 gene. The Journal of cell biology, 1993. **120**(1): p. 253-260.

101. Ignatz, R.A., T. Endo, and J. Massague, Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(14): p. 6443-6446.

102. Laiho, M., O. Saksela, and J. Keski-Oja, Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(36): p. 17467-17474.

103. Flanders, K., M. Sporn, and A. Roberts, Transforming Growth Factor-Beta: Possible Roles in Carcinogenesis, in *Cancer Metastasis*. 1989, Springer. p. 42-47.

104. Fanger, B.O., L.M. Wakefield, and M.B. Sporn, Structure and properties of the cellular receptor for transforming growth factor type beta. *Biochemistry*, 1986. **25**(11): p. 3083-91.

105. Wu, G., et al., Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*, 2000. **287**(5450): p. 92-7.

106. Wells, R.G., et al., Biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implications for complex formation. *J Biol Chem*, 1997. **272**(17): p. 11444-51.

107. Lee, H.S., et al., Modulation of TGF-beta 1 production from human keratinocytes by UVB. *Exp Dermatol*, 1997. **6**(2): p. 105-10.

108. Eppley, B.L., J.E. Woodell, and J. Higgins, Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **114**(6): p. 1502-8.

109. Mani, H., et al., Curcumin differentially regulates TGF-beta1, its receptors and nitric oxide synthase during impaired wound healing. *Biofactors*, 2002. **16**(1-2): p. 29-43.

110. Kopecki, Z., et al., Collagen loss and impaired wound healing is associated with c-Myb deficiency. *J Pathol*, 2007. **211**(3): p. 351-61.

111. Kane, C.J., et al., Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. *J Cell Physiol*, 1991. **148**(1): p. 157-73.

112. Greenwel, P., et al., Sp1 is required for the early response of alpha2(I) collagen to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem*, 1997. **272**(32): p. 19738-45.

113. Zambruno, G., et al., Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol*, 1995. **129**(3): p. 853-65.

114. Papakonstantinou, E., et al., Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts. *Cytokine*, 2003. **24**(1-2): p. 25-35.

115. Zeng, G., et al., Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. *Exp Cell Res*, 1996. **228**(2): p. 271-6.

116. Colwell, A.S., et al., Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plast Reconstr Surg*, 2005. **116**(5): p. 1387-90; discussion 1391-2.

117. Yang, L., et al., Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. *Am J Pathol*, 2001. **159**(6): p. 2147-57.

118. Yager, D.R., et al., Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair Regen*, 1997. **5**(1): p. 23-32.

119. Hopkinson, I., Growth factors and extracellular matrix biosynthesis. *J Wound Care*, 1992. **1**(2): p. 47-50.

120. Uitto, J., D.R. Olsen, and M.J. Fazio, Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol*, 1989. **92**(4 Suppl): p. 61S-77S.

121. Wolfram, D., et al., Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg*, 2009. **35**(2): p. 171-81.

122. Hayakawa, T., et al., Changes in type of collagen during the development of human post-burn hypertrophic scars. *Clin Chim Acta*, 1979. **93**(1): p. 119-25.

123. Desmouliere, A., et al., Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 1995. **146**(1): p. 56-66.

124. Berry, D.P., et al., Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg*, 1998. **102**(1): p. 124-31; discussion 132-4.

125. Doillon, C.J. and F.H. Silver, Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing. *Biomaterials*, 1986. **7**(1): p. 3-8.

126. Temizkan G. (Ed.). Arda N. (Ed.). (2018). *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Kitabı*. İstanbul, Yayınevi: Nobel Tıp Kitabevleri

127. Yılmaz S. Öztürk M. Dağıstanlı F. (1998) *Uygulamalı Ultrastrüktürel İmmünohistokimya Kursu Kitabı* İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

128. Guzel, Y., et al., The biomechanical and histological effects of platelet-rich plasma on fracture healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015. **23**(5): p. 1378-83.

129. Takikawa, M., et al., Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wounds in rats with PRP-containing fragmin/protamine microparticles (PRP&F/P MPs). *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 2015. **49**(5): p. 268-274.

130. Saydam İ, Y.S., Seven E., Topikal olarak uygulanan Nitrofurazon ve Rifamisin'in tam kalınlıkta yara iyileşmesi üzerine etkileri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005. **27**(3): p. 113

131. Kaltalıoğlu K. Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü'nün Yara Dokusu Oksidatif Olayları Üzerine Etkisi. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*. (2012). s. 18-35, Ankara.

132. Cross, K.J. and T.A. Mustoe, Growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am*, 2003. **83**(3): p. 531-45, vi.

133. Foster, T.E., et al., Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, 2009. **37**(11): p. 2259-72.

134. Galeano, M., et al., Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med*, 2006. **34**(4): p. 1139-46.



**FORMLAR**

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
KARAR METNİ

SAYI: 2017/110  
KONU: Sn. Prof. Dr. İlhan ONARAN

20.04.2017

Sayın, Prof. Dr. İlhan ONARAN

“Deneysel sıçan yara modelinde trombositten zengin plazmadan izole edilen lipid fraksiyonun skar oluşumu üzerine etkisinin araştırılması” başlıklı projenize ait başvurunuz 20.04.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ  
Etik Kurul Başkanı

*(Signature)*

Prof. Dr. Ahmet BELCE  
Üye

*(Signature)*

Prof. Dr. Erhan AYŞAN  
Üye

*(Signature)*

Prof. Dr. İsmail MERAL  
Üye

*(Signature)*

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADÖRİ  
Üye

*(Signature)*

Yrd. Doç. Dr. Ömer LYSAL  
Üye

*(Signature)*

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEKİN  
Üye

*(Signature)*

Harun SARIKAMIŞ  
Üye

*(Signature)*

Şerife GÖNCÜ  
Üye

*(Signature)*

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.





## DENEYSSEL SIÇAN YARA MODELİNDE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMADAN İZOLE EDİLEN LİPİD FRAKSİYONUNUN SKAR OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>6</b>	% <b>4</b>	% <b>3</b>	% <b>1</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://www.ftrdergisi.com">www.ftrdergisi.com</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>2</b>	<a href="http://neu.edu.tr">neu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	<a href="http://genesisturk.com">genesisturk.com</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	Simsek, Kemal, Mehmet Ozler, Muzaffer Durmus, Abdul Yapici, Hakan Ay, Bulent Uysal, and Sukru Oter. "EFFECTS OF WOUND DRESSING MATERIALS IN COMBINATION WITH HYPERBARIC OXYGEN ON CHRONIC WOUND HEALING", Gulhane Medical Journal, 2014. Yayın	% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://acikerisim.deu.edu.tr">acikerisim.deu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	TEPEBAŞI, Muhammet Yusuf and	

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Mehmet Can	<b>Soyadı</b>	ÇAKIN
<b>Doğ.Yeri</b>	Istanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	03.10.1990
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>TC Kim No</b>	15674149344
<b>Email</b>	mehmetcancakin28@gmail.com	<b>Tel</b>	0551 714 08 07

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	Kocaeli Üniversitesi	2015
<b>Lise</b>	Sadabad Lisesi	2009

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik	2017-
2.	Müdür Yardımcısı	B&A Akademi	2014-2015
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Zayıf	Orta		YökDil 57,5

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	66,92929	66,29731	61,43434
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi


**Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**

**Özel İlgil Alanları (Hobileri):**

