

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ ve
MİKROAKIM STİMÜLASYONU İLE DOKU
REJENERASYONUNUN GÖSTERİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Müge SEVİNDİK

İZMİR-2016

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRUKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ ve
MİKROAKIM STİMÜLASYONU İLE DOKU
REJENERASYONUNUN GÖSTERİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Müge SEVİNDİK

Danışman Öğretim Üyesi: **Prof. Dr. Adnan MENDERES**

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	
ŞEKİL LİSTESİ	
RESİM LİSTESİ	
KISALTMALAR	
TEŞEKKÜR	
1- ÖZET	1
2- İNGİLİZCE ÖZET	3
3- GİRİŞ ve AMAÇ	4
4- GENEL BİLGİLER	6
4.1 Yara İyileşmesi ve Rejenerasyon	6
4.1.1 Yara İyileşmesi	8
4.1.2 Doku Rejenerasyonu	19
4.2 Nörotrofik Faktörler ve Sinir Büyüme Faktörü	22
4.2.1 Nörotrofik Faktörler	22
4.2.2 Sinir Büyüme Faktörü (NGF).....	23
4.3 Elektrik Stimülasyonu	27
4.3.1 Elektrik Stimülasyonu Tipleri	28
4.3.2 Elektrik Stimülasyonu Etkileri	29
4.3.3 Kablosuz Mikroakım Stimülasyonu Tekniği.....	31
5- GEREÇ ve YÖNTEMLER	32
5.1 Cerrahi Yöntem.....	34
5.2 Elektrik Stimülasyonunun Uygulanması	36
5.3 HCFG-NGF Hazırlanışı.....	38
5.3.1 NGF Hazırlanışı.....	38
5.3.2 HCFG Hazırlanışı	39

5.4 Değerlendirme	41
5.4.1 Histopatolojik Değerlendirme	41
5.4.2 Radyolojik Değerlendirme	44
5.4.3 İstatiksel Değerlendirme	44
6- BULGULAR	45
6.1 Histopatolojik Değerlendirme Bulguları.....	45
6.1.1 Makroskopik Bulguların Değerlendirme Bulguları	45
6.1.2 Işıık Mikroskopik Bulguların Değerlendirme Bulguları	46
6.2 Radyolojik Değerlendirme Bulguları.....	58
7- TARTIŞMA	61
8- SONUÇ ve ÖNERİLER	68
9- KAYNAKLAR.....	69

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Yara iyileşmesinden sorumlu büyüme faktörü ve sitokinler.....	12
Tablo 2: Kollajen tipleri ve dağılımı.....	17
Tablo 3: Nörotrofinler ve reseptör afiniteleri.....	23
Tablo 4: Deney Grupları ve Yapılan İşlemler.....	33
Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	42
Tablo 6: Masson Trikrom boyama protokolü.....	43
Tablo 7: Histolojik skorlama tekniği.....	44
Tablo 8: Yeni oluşan epitel kalınlıklarının istatistiksel analizi.....	54
Tablo 9: Yeni oluşan kemik skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi.....	55
Tablo 10: Yeni oluşan kıl folikülü skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi.....	55
Tablo 11: Yeni oluşan yağ-ter bezleri skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi.....	55
Tablo 12: Histolojik Skorlama Sonuçları.....	56

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Rejenerasyon tipleri.....	4
Şekil 2: Epimorfik- Morfolaktik Rejenerasyon.....	5
Şekil 3: Yara iyileşmesi	9
Şekil 4: Koagülasyon kaskadı.....	10
Şekil 5: Rejenerasyon Süreci.....	20
Şekil 6: Rejenerasyon Basamakları.....	21
Şekil 7: Deri ve yaralanma elektriksel alanı.....	29
Şekil 8: Makroçevre.....	33
Şekil 9: Kablosuz mikroakım stimülasyon cihazı.....	37
Şekil 10: Ortalama epitel kalınlığının gruplara göre dağılımı.....	57
Şekil 11: Histopatolojik inceleme sonuçlarının gruplara göre dağılımı.....	57
Şekil 12: Rejenerasyon basamaklarında NGF ve Elektrik stimülasyonun yeri.....	67

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Otomutilasyon önlemleri.....	32
Resim 2: Kuyruk ampütasyon seviyesi.....	34
Resim 3: Hayvanların postoperatif izlem süreci.....	35
Resim 4: Elektrik stimülasyonunun uygulanışı.....	38
Resim 5: Liyofilize fibrinojen konsantresinin hazırlanışı.....	39
Resim 6: Duploject sistemi ile fibrin jel hazırlanışı.....	40
Resim 7: Makroçevrelere yerleştirilen HCFG.....	41
Resim 8: Makroskobik değerlendirme.....	45
Resim 9: Grup-4 makroskobik değerlendirme.....	46
Resim 10: Gruplarda H-E boyama ile ışık mikroskobik bulgular.....	47
Resim 11: Gruplarda Masson-Trikrom boyama ile ışık mikroskobik bulgular.....	48
Resim 12: Grup-1 Işık mikroskobik bulgular.....	49
Resim 13: Grup-2 Işık mikroskobik bulgular.....	50
Resim 14: Grup-3 Işık mikroskobik bulgular.....	51
Resim 15: Grup-4 Işık mikroskobik bulgular.....	52
Resim 16: Grup-4 Histolojik bulguların radyoloji ile korelasyonu.....	53
Resim 17: Grup-4 Histolojik bulguların radyoloji ile korelasyonu.....	54
Resim 18: Grup-1 Radyolojik değerlendirme bulguları.....	60
Resim 19: Grup-2 Radyolojik değerlendirme bulguları.....	60
Resim 20: Grup-3 Radyolojik değerlendirme bulguları.....	61
Resim 21: Grup-4 Radyolojik değerlendirme bulguları.....	61

KISALTMALAR

NGF: Nerve Growth Factor (Sinir büyüme faktörü)

HCFG: Heparin-Conjugated Fibrin Gel (Heparin ile konjuge fibrin jel)

EGF: Epidermal Growth Factor (Epidermal büyüme faktörü)

HB-EGF: Heparin-binded Epidermal Growth Factor (Heparine bağlı epidermal büyüme faktörü)

TGF- α : Transforming Growth Factor α (Transforme edici büyüme faktörü α)

TGF- β : Transforming Growth Factor β (Transforme edici büyüme faktörü β)

TXA2: Tromboksan A2

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (Platelet kaynaklı büyüme faktörü)

ILGF-1: Insulin Like Growth Factor-1 (Insulin benzeri büyüme faktörü -1)

OKT-1: All T cell marker (Periferik T hücre işareti)

PAF: Platelet Activating Factor

TNF- α : Tumor Necrosing Factor- α (Tümör nekroz faktör- α)

FGF: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast büyüme faktörü)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler endotelial büyüme faktörü)

IL-1: Interlökin-1

IL-2: Interlökin-2

CGF: Ceratinocyte Growth Factor (Keratinosit Büyüme Faktörü)

HGH: Human Growth Hormone (İnsan büyüme hormonu)

IFN: İnterferon

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

Da: Dalton

kDa: Kilodalton

MMP: Matriks mettalloproteinaz

mRNA: Messenger RiboNucleic Acide (Mesajcı Ribonükleik Asit)

DNA: Deoxyribonucleic Acide (Deoksiribonükleik asit)

UDP: Uridin difosfat

Zn: Çinko

Na: Sodyum

NaCl: Sodyumklorür

nAg Protein : Newt Anterior Gradient Protein
BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor (Beyin kaynaklı nörotrofik faktör)
NT-3: Neurotrophin-3 (Nörotrofin-3)
NT-4/5: Neurotrophin-4/5 (Nörotrofin 4/5)
NT-6: Neurotrophin-6(Nörotrofin 6)
NT-7: Neurotrophin-7 (Nörotrofin 7)
Trk: Tirozinkinaz
CNTF: Cilier Neurotrophic Factor (Siliyer nörotrofik faktör)
LIF: Leukemia Inhibitory Factor (Lökemi inhibitör faktör)
GDNF: Glia Derived Neurotrophic Factor (Gliyal hücre kaynaklı nörotrofik faktör)
DC: Direct Current (Direk akım)
AC: Alternative Current (Alternatif akım)
HVPC: High Voltage Pulsed Current (Yüksek voltaj darbeleri akım)
LIDC: Low Intensity Direct Current (Düşük şiddetli direk akım)
PEMF: Pulsed Electromagnetic Field (Darbeli elektromanyetik alan)
TENS: Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (Transkutanöz elektrik ile sinir stimülasyonu)
WMCS: Wireless Microcurrent Stimulation (Kablosuz mikroakım stimülasyonu)
TEPs: Transepitelyal potansiyel
mV: Milivolt
W: Watt
A: Amper
Hz:Hertz
µA: Mikroamper
C: Coulomb
µC: Mikrocoulomb
LED:Light Emitting Diot
cm: Centimeter (Santimetre)
mm: Milimeter (Milimetre)
nm: Nanometer (Nanometre)
ng: Nanogram
ml: milliliter (Mililitre)

mM: Milimolar

ph:Power of Hydrogen

MW:Molecular Weight (Molekül ağırlığı)

µgr : Mikrogram

KIU: Kallikrein İnhibitör Ünite

mmol: Milimolar

CaCl₂: Kalsiyumklorür

IU:International Unit (İnternasyonel unite)

MAP: Mitogen Activated Protein (Mitojen active edici protein)

CGRP: Calsitonin Gen Related Peptid (Kalsitonin gen ilişkili peptid)

NaH₂PO₄.2H₂PO₄.2H₂O : Di-Sodyum hidrojen fosfatdodekahidrat

ES: Elektrik Stimülasyonu

HE: Hematoksilen-Eozin

mmhg: Milimetre civa

kVp: Kilovolts peak (Kilovolt pik)

mAs: miliamper saniye

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

TEŞEKKÜR

Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi eğitimimde, hekim olarak bilgi ve becerime olan büyük katkıları ve insan olarak bana kazandırdıkları değerler için tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Dr. Müge SEVİNDİK

1.ÖZET

Sıçanlarda Sinir Büyüme Faktörü ve Mikroakım Stimülasyonu ile Doku Rejenerasyonunun Gösterilmesi

Müge Sevindik, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı İnciraltı-İzmir , muge.sevindik@deu.edu.tr

Rejenerasyon; organizmaların doku ve hücrelerinin yenilenmesi ya da kayıplarının eksiksiz olarak aynı doku ile yerine konulması, yenilenmesi sürecidir.

Memeliler ve üst düzey omurgalılarda kapasitesinin azlığı ile bilinen epimorfik rejenerasyonun gerçekleşebilirliğinin gösterilmesi ekstremite amputasyonları, spinal kord yaralanmaları, retina, lens ve optik sinir hasarları gibi tıp bilimi için önemli olan sorunlara çözüm olanağı yaratacaktır. Bu çalışmada, sinir büyüme faktörü (Nerve Growth Factor-NGF) ve mikroakım stimülasyonunun doku rejenerasyonunda ki etkileri araştırıldı.

Çalışmada 24 adet 300 gr ve üzeri erkek Sprague Dawley sıçan üzerinde kuyruk bölgesinde kaudal vertebrayı açıkta bırakacak şekilde amputasyon modeli oluşturuldu. Rejenerasyon gözlemek üzere her bir grupta altı adet sıçan yer alacak şekilde toplam dört çalışma grubu oluşturuldu. Kontrol grubunda ampute edilen kuyruk; içinde serum fizyolojik olan makroçevreye yerleştirilip deney süresince izlendi.İkinci grupta ampute edilen kuyruk makroçevre içinde mikroakım stimülasyonu ile izlendi. Üçüncü grupta kuyruk heparinle konjuge fibrin jel (HCFG) ile sinir büyüme faktörü (NGF) içeren makroçevre içinde takip edildi.Dördüncü grupta ampute edilen kuyruk HCFG ile NGF içeren makroçevre içinde mikroakım stimülasyonu ile izlendi. Sıçanlar uygun koşullarda 42 gün süre ile gözlemlendi. Bu süre içinde mikroakım stimülasyonu uygulanan çalışma gruplarına 0,3 , 6 ,12,18 , 24, 35 ve 42. günlerde 15 dk süren seanslar ile 1 µA elektrik akımı uygulandı. Sıçanların 0. ve 42. günlerde ön-arka grafi ile radyolojik görüntüleri kaydedildi.

Çalışma süreci sonunda sıçanlar sakrifiye edilip histolojik ve radyolojik olarak değerlendirildi.Yapılan değerlendirmelerin sonuçları her bir grup için epitel kalınlığı, yeni kollajen oluşumu, kemik, kıl folikülü ve yağ-ter bezi oluşumu açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Sonuçta; yeni kemik oluşumu ,yeni kollajen oluşumu ve artmış epitel kalınlığı bulguları doğrultusunda mikroakım elektrik stimülasyonu ve NGF uygulamasının doku rejenerasyonunu desteklediği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Doku rejenerasyonu, Sinir büyüme faktörü (NGF), Elektrik stimülasyonu

2.ABSTRACT

The effect of Nerve Growth Factor and Microwave Electrical Stimulation on Tissue Regeneration: An Experimental Study in Rats

Müge Sevindik, Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, muge.sevindik@deu.edu.tr

Tissue regeneration involves replacement of damaged structures or cells with replications of the originals.

While mammals and most higher vertebrates typically express very limited regenerative capacities. It is hoped that epimorphic regeneration on mammalian systems will be the answer of extremity amputations, spinal cord injuries and damaged lens, optic nerve and retina. In this study, the effects of nerve growth factor and microwave electrical stimulation on tissue regeneration were evaluated in rats.

Twenty-four 300 gr and over , male, Sprague Dawley rats were included in this study with amputated tail model .In this study, four experimental group is designated , each containing six rats, in order to observe tissue regeneration. In Group-1, amputated tail followed up with saline filled macro-environment tubes. In Group-2, the rats are followed up with amputated tail in macro-environment tubes with electrical stimulation. In Group-3, we used nerve growth factor with heparin- conjugated fibrin gel at macro-environment tubes. In Group-4, the rats are followed up with microwave electrical stimulation at nerve growth factor with heparin - conjugated fibrin gel filled macro-environment tubes. The rats are followed- up forty-two days in standard conditions. Electrical stimulation performed in rats of group two and four on days 0,3,6,12,18,24, 35 and 42 with 1 μ A for 15 minutes. X-rays are taken on first and 42th days. At the end of this period, they are sacrificed and evaluated histopathologically and radiologically. At the end of analysis, findings are compared statistically for each group. Depending on these results, it can be concluded that NGF and microwave electrical stimulation have positive effects on tissue regeneration.

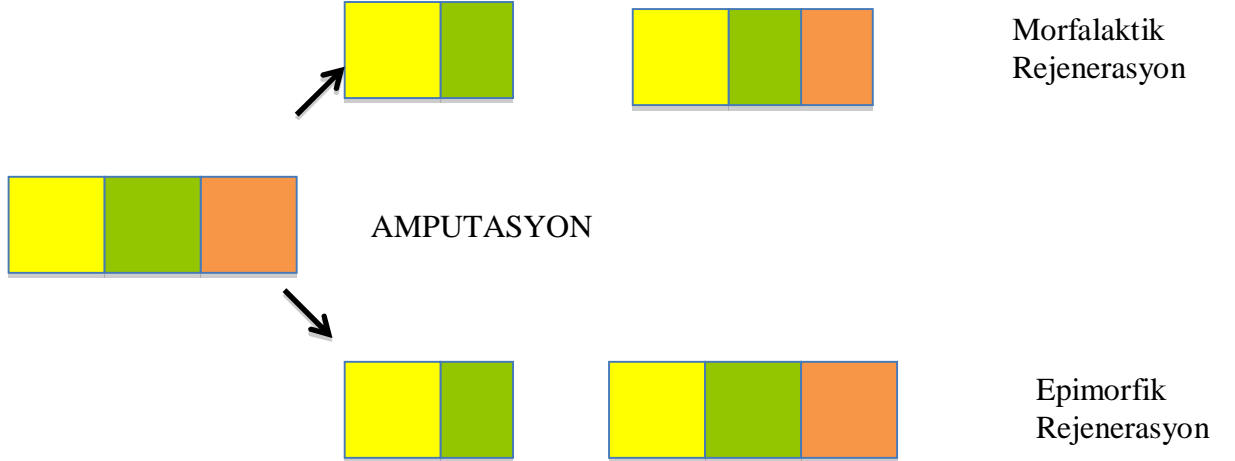
Key words: Tissue regeneration, Nerve growth factor (NGF), Electrical stimulation

3. GİRİŞ ve AMAC

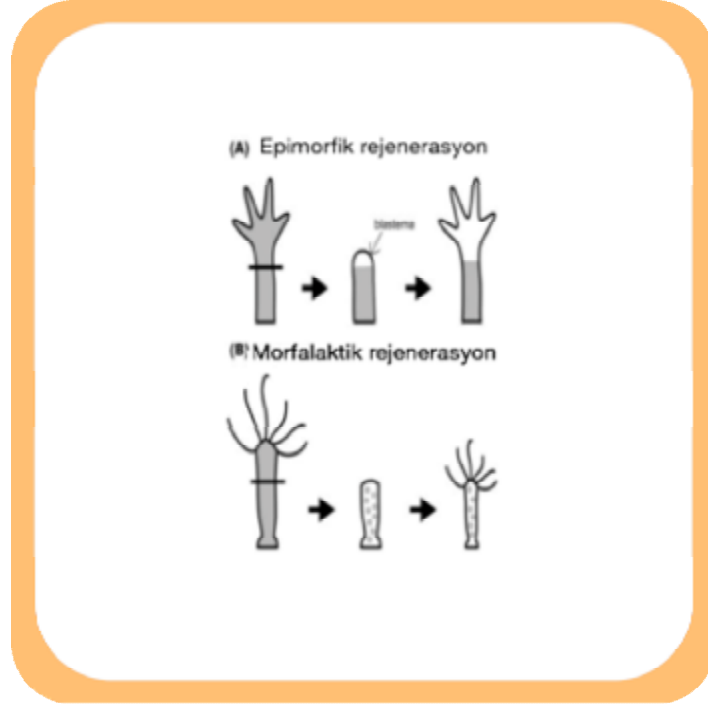
Rejenerasyon; organizmaların doku ve hücrelerinin yenilenmesi ya da kayıplarının eksiksiz olarak aynı doku ile yerine konulması sürecidir. Yaşamsal döngüde epitelde ya da hematopoetik sistemde görüldüğü gibi hücrelerin doğal dalgalanmalar halinde yaptığı yenilenme fizyolojik rejenerasyon iken doku kayıpları sonrası yara iyileşmesi benzeri başlayan sürecin bazı genler ve sinyal yollarının aktivasyonu ile aynı cins ve değerde hücrelerle olan kompleks doku ya da organ restorasyonu ise onarımsal rejenerasyondur.¹

Bir diğer rejenerasyon şekli ise “Ototomi” dir. Ototomi; deniz yıldızı, yengeç ve kertenkele gibi hayvanların tehlike anında otonomik olarak uzuvlarını kaybetmesini takiben gerçekleşen rejenerasyon sürecidir.²

Rejenerasyon 2 temel hücresel mekanizma ile gerçekleşir. Gerçekleşen doku kaybı sonrası proliferasyonun gözlenmediği, kalan mevcut dokuların yeniden düzenlenmesi ve şekillendirilmesi ile gerçekleşen “Morfalaktik rejenerasyon” ve epidermis altına kümelenen progenitor hücrelerin reoryantasyonuna değil rediferansiyasyonuna ve proliferasyonuna dayanan “Epimorfik rejenerasyon” şeklindedir.³ (Şekil 1-2)



Şekil 1: Rejenerasyon tipleri; Morfolaktik Rejenerasyon- Epimorfik Rejenerasyon



Şekil 2: Epimorfik- Morfolaktik Rejenerasyon³

Memeliler ve üst düzey vertebralılarda zamana spesifik ve limitli rejenerasyon kapasitesi vardır. Bundan yola çıkılarak epimorfik rejenerasyon için üç temel gereklilik vardır.⁴

1. Organizmanın mitotik olarak aktif hücreler içermesi gerekir.
2. Mitotik aktif olan hücrelere sinyaller gönderilerek proliferasyonun indüklenmesi gerekir.
3. Rejenerasyon cevabını inhibe eden faktörlerin olmaması gerekir.

Filogenetik olarak bakıldığında ; bazı eklem bacaklıların ve amfibilerin yüksek rejenerasyon kapasitesi olduğu görülmektedir. Deniz yıldızı, kertenkele, semenderler rejenerasyonun doğada bilinen en iyi örnekleridir. Bu canlılarda yapılan çalışmalarda rejenerasyon süreci ve sürecin basamakları incelendiğinde sinir uyarımı ve nörotransmitterlerin rejenerasyon için gerekli olan gen ve sinyal yollarında önemli rol oynadığı görülmüştür.⁵ Çalışmalar doğrultusunda nöronların ve sentezledikleri proteinlerin rejenerasyon için gerekliliği esas alınıp memelilerde de rejenerasyon kapasitesini artırma amaçlı kullanılabileceği çalışmamızın temelini oluşturmaktadır.

Sinir rejenerasyonu; doku rejenerasyonunda temel nokta olarak kabul edildiğinde nörotrofin ailesinin en etkili üyesi olan sinir büyüme faktörü (NGF) ön plana çıkmaktadır. Her üç germ yaprağına da etki etme potansiyeli taşıyan bu büyüme faktörünün hem periferik hem santral sinir sistemine ait nöronların proliferasyonu ve diferansiyasyonundan sorumlu olmakla birlikte sinir sistemi dışındaki dokuların iyileşme süreçlerinde de etkili olduğu bilinmektedir. ⁶

“Sinir doku , rejenerasyon için hedef basamak mıdır” sorusuna yanıt aramak için NGF temelli yürüttüğümüz çalışmamızda rejenerasyon kaskadını amplifiye edip devam ettirecek bir diğer seçenek olarak elektrik stimülasyonu gündeme gelmiştir. Elektrik stimülasyonu tarih boyunca kırık onarımında, ağrı tedavisinde , yara iyileşmesinde kullanılmış olup son dönemde de doku rejenerasyonunda kullanılmaktadır.⁷ Elektrik stimülasyonunun doku perfüzyonunu arttırması, hücre proliferasyonunu arttırıp hızlandırması göz önüne alındığında rejenerasyon üzerine olası etkilerinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir.

Üst düzey vertebralılarda rejenerasyon elde edilmesi halinde ekstremité amputasyonları, spinal kord yaralanmaları, retina ve optik sinir hasarları gibi tıp dünyasının uğraşı olan konulara yeni çözümler sunma hedefi ile NGF ve mikroakım elektrik stimülasyonu kullanılarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Yara İyileşmesi ve Rejenerasyon

Yara iyileşmesi, bir organizmanın, bir doku ya da organın fiziksel bütünlüğünün bozulması karşısında organizmanın defektin sınırları ötesinde tüm organizmanın fizyolojisini stabilize etmek üzere verdiği yanıtın tümüdür. Bu aşamada karşımıza iki süreç çıkar; skar oluşumu ve rejenerasyon süreci. Yaralanmış organ ya da dokunun fizyolojik devamlılığını sağlamak amaçlı başka bir hücresel matriksin yaralı dokunun yerini alması skar oluşum sürecidir. Gelişimsel yolların reaktivasyonu aracılığı ile orijinal mimarinin yeniden oluşturulması ise rejenerasyon sürecidir.⁸

Yara iyileşmesi cevabı ve rejenerasyon cevabı arasında açık bir fark vardır. Bu iki olay aynı basamaklar ile ilerleyip tamamen farklı son ürünler oluştururlar. Yara iyileşmesi sürecinde; yağ-ter bezleri, bu bezlerin kanalları , kıl folikülleri , kıkırdak ve kemik doku gibi kompleks biyolojik yapılar oluşmaz. Rejenerasyonda ise tüm bu orijinal yapıların yenilendiğini görmekteyiz.⁸ Epimorfik rejenerasyon için üç temel gereklilik vardır.⁴

1. Organizmanın mitotik olarak aktif hücreler içermesi gerekir.
2. Mitotik aktif olan hücrelere sinyaller gönderilerek proliferasyonun indüklenmesi gerekir.
3. Rejenerasyon cevabını inhibe eden faktörlerin olmaması gerekir.

Memelilerde epidermal yara oluşumunu takip eden ilk dakikalarda defekt alanında fibrin tıkaç oluşur. Fibrin tıkaç; çapraz bağlı fibrin ve platelet yanında sitokin, epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor-EGF), heparine bağlı epidermal büyüme faktörü (Heparin binded epidermal growth factor-HB-EGF), transforme edici büyüme faktörü β (Transforming growth factor β -TGF- β) açısından oldukça zengindir.⁹ Kuru çevreye sahip yara modelinde; granülasyon doku formasyonu fibrin tıkaç altında yerleşen komşu epidermal hücrelerin göçü ile gerçekleşir. Epidermal hücreler bu göç sırasında fibrin tıkaçı yıkıma uğratarak, tıkaç altında mevcut büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri aracılığıyla yeni epiteli oluşturur. Nemli yara modelinde ise granülasyon dokusu oluşumu olmadan direk olarak yara yüzeyinde

reepitelizasyon gerçekleşir.¹⁰ Tüm bu yara iyileşmesi süreci sonunda orijinal yapı ve fonksiyondan uzak kollajen ağları ile örülü skar doku oluşur. Yara iyileşme sürecinde oluşan bu yara epiteli rejenerasyon için gerekli bir basamaktır. Görüldüğü üzere yara iyileşmesi ve rejenerasyon süreci erken dönemlerinde benzer basamaklara sahiptir. Fakat epimorfik rejenerasyon yaraya karşı verilen biyokimyasal cevabın yanında biyofiziksel cevabı da barındırır. Rejeneratif sürecin içerdiği bu biyofiziksel süreç fiziksel mekanikleri, biyoelektriksel olayları ve yara çevresinde oluşan elektriksel alanı kapsamaktadır.¹¹

4.1.1 Yara İyileşmesi

Patolojik bir olay sonucu doku ya da organın anatomik bütünlüğünün ve fonksiyonunun bozulması yarayı tanımlar. Yara iyileşmesi ise yaralanmadan sonra birçok hücre ve onların ürettikleri mediatörlerin yer aldığı, ekstrasellüler matriks üretimi ile sonuçlanan fizyolojik ve biyokimyasal olayların bütünüdür.¹²

Yara iyileşmesi Tipleri:

1. Primer yara iyileşmesi
2. Sekonder yara iyileşmesi
3. Tersiyer yara iyileşmesi

1. Primer yara iyileşmesi

Yara kenarlarının cerrahi yöntemler ile kapatılabildiği, epitelyal ve stromal yapıların en az hasar gördüğü, bakteriyel kontaminasyonun az olduğu yara iyileşme şeklidir.

Primer yara iyileşmesinde başlıca rolü yara dudaklarına paralel yer alan keratinositler oynar. Epidermis hızla proliferer olur ve insizyon hattına doğru hücre göçü görülür. Kırksekiz saat sonunda fibrin tabaka oluşumu ile dış ortam teması kesilir ve dehidratasyon önlenir. Fibrin tabaka aynı zamanda bakteriyel penetrasyonu önlemede de bariyer oluşturur. Üç ile beşinci günde kollajen sentezi artar, 30. günün sonunda inflamatuvar hücre içermeyen skar doku oluşur.^{13,14}

2. Sekonder yara iyileşmesi

Hasar gören dokuda inflamatuvar reaksiyonun fazla olması, doku hasarının fazla görüldüğü durumlarda granülasyon dokusu artışı olması beklenir. Ortamda debris, bakteriyel kontaminasyon ve eksuda fazla olduğu için inflamatuvar yanıt daha şiddetlidir. Epidermal rejenerasyon oranı yeterli olmadığı için granülasyon dokusu miktarı ve kontraksiyon miktarında artış vardır.

3. Tersiyer yara iyileşmesi

Gecikmiş primer yara iyileşmesinde ise hasar gören doku bakteriyel yük, yabancı cisim varlığı gibi sebeplerle pansuman ile izlenir. Yara debridman ve pansumanlarla uygun hale geldikten sonra primer yara iyileşmesi yöntemleri uygulanır .

Memelilerin doku bütünlüğünü bozan bir sürece verilen sistemik cevap hemostaz,inflamasyon, proliferasyon ve remodelling aşamalarından oluşur.(Şekil 3)



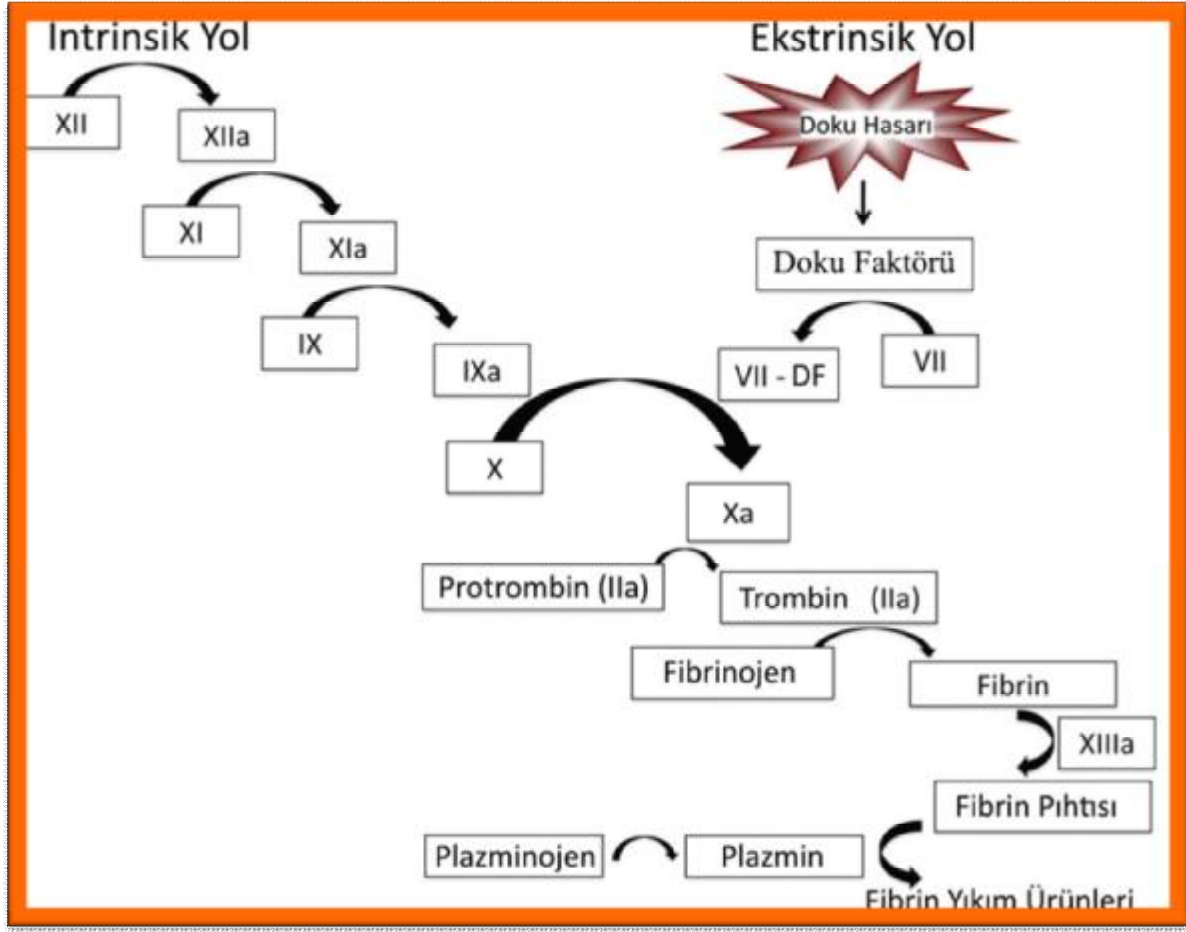
Şekil 3: Yara iyileşmesi

1. Hemostaz

Endotel hasarı ile oluşan kanamaya verilen ilk cevaptır. Doku hasarı sonrasında beş ile on dakika içinde katekolamin salınımı sonucu oluşan vazokonstriksiyon ile bölgesel kan akımı azalır. Endotel hasarı sonucu ortaya çıkan subendotelyal kollajen, dolaşımdaki trombositlerle temas eder ve faktör 12 (Hageman Faktör) aktive olarak, koagülasyon kaskadını aktifler. Faktör 12' nin aktive olması aynı anda kompleman sistemini, kinin sistemini ve plazmin sentezini uyarır.

Tromboksan A₂ (TXA₂)' nin açığa çıkması ile vazokonstriksiyon ve trombosit aktivasyonu yolu ile hemostatik plak oluşur. İntrensek ve ekstrinsek koagülasyon yollarının ortak aktivasyonu ile protrombinden trombin oluşur, trombin ise fibrinojeni fibrine dönüştürerek hemostatik tıkaç oluşumunu sağlar.(Şekil 4) Fibrin oluşumu ile sonuçlanan kısa süreli vazokonstriksiyon hasarlı bölgede hemostaz sağlar ve inflamatuvar hücre göçü için zemin hazırlar. Trombositlerin alfa granüllerinden Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insulin benzeri büyüme faktörü-1 (ILGF-1), transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibrinojen, fibronektin, platelet faktör-4, prostoglandinler, biyojenik aminler gibi birçok sitokin ve mediatör salgılanarak makrofaj ve nötrofiller için hücre göçü başlatılır. Hasarlı bölgeye ulaşan nötrofil ve makrofajlar nekrotik doku, debris ve bakteriyel elemanları fagosite ederek uzaklaştırılmalarını sağlar. Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) aynı zamanda fibroblast göçünü de başlatarak aktive eder, fibroblastlarda sentezlenen glikozaminoglikanlar ve kollajen ekstrasellüler matriks onarımı için gereklidir.

13,14,15,16



Şekil 4: Koagülasyon kaskadı

2. İnflamasyon

Endotel hasarından 24 saat sonra başlayan, hasara verilen hücresel ve vasküler yanıtı içeren ikinci evre inflamasyon evresidir. Bu evrede amaç; hemostazın sağlanması, devital dokuların uzaklaştırılması ve bakteriyel kolonizasyon ile invaziv enfeksiyonların önlenmesidir.

Vasküler yanıt; geçici hemostaz sonrasında aktive olan kompleman sisteminden C3a - C5a, endotel hücrelerinden histamin, prostoglandin E₂, prostosiklin ve mast hücrelerinden bradikinin açığa çıkarak vazodilatasyon gerçekleşir. Trombositler hasarlı endotel üzerinde bazal membrana yapışarak fosfolipaz A₂'yi aktive eder ve araşidonik asit serbestleşmesine yol açar. Permeabilite artışı ve trombositlerden salınan PDGF ve TGF- β salınımına bağlı olarak nötrofil ve monositler hasar alanına ulaşırlar. Bu süreçte damar duvarından interstisyel alana geçen sıvı klinik bulgularda şişlik olarak görülür. Şişlik nedeni ile lokal doku basıncı

artışı ise ağrıya sebep olur. Vazoaktif aminlerin ve histamin salınımının artışı ile hasar bölgesinde kızarıklık ve sıcaklık artışı görülür. Vazodilatasyon dönemi yaklaşık olarak 72 saat sürer.^{15,17}

Vasküler permeabilite artışından sonra PDGF ve TGF- β etkisi ile hasar bölgesinde görülen ilk hücreler nötrofillerdir. Nötrofiller 6 saat içinde yara yerinde görülürler ve 48 saate kadar baskın olan hücre tipidirler. Nötrofiller diapedez yolu ile damar duvarı dışına çıkarlar, endotel hücreleri arasından geçiş için elastaz ve kollejenaz salgırlarlar.

Nötrofiller yara yerinde yabancı cisimleri ve bakterileri fagosite ederek, proteaz salınımı ile hasar görmüş hücre kalıntılarını ortadan kaldırarak fonksiyon görürler. Nötrofil yüzeyindeki integrinler ile matriks bileşenleri arasında oksijen varlığında etkileşim oluşur ve sonucunda reaktif oksijen metabolitleri ortaya çıkar. Yara yerinde bakteriyel kontaminasyon ve yabancı cisim yoksa nötrofil sayısı apoptoz ile hızla azalır, tersi durumda ise inflamatuvar süreç devam eder ve yara yerinde eksüdasyona yol açarak yara iyileşmesini yavaşlatır.

Makrofajlar yara yerinde üç ile beşinci günde hakim olan hücre tipidir. Makrofajlar lenfositleri de aktive ederek yara yerine migrasyonlarını uyarırlar. Lenfosit sayısı 6. günde maksimuma ulaşır. Lenfositlerden lenfokin salınımı ile fibroblast proliferasyonu ve migrasyonu artar, endotel hücrelerden mediatör salınımını uyarılır, hücre kemotaksisi hızlanır. İnflamasyon alanında all-T-cell marker (OKT-1) taşıyan lenfositler ile sitotoksik ve supresör T lenfosit grubu birlikte görülür, birbirleri ile etkileşerek çalışmalarını sonucunda ise başarılı yara iyileşmesi gerçekleşir. Makrofajlar ise dolaşımdan dokuya geçen monositler olarak bilinir. Makrofajların hasarlı alanda hakim hale gelmesi inflamatuvar sürecin sonlanıp, proliferatif evreye geçileceğinin göstergesidir. Makrofajlar da nötrofiller gibi debris ve bakteriyel komponentleri fagositoz ile ortadan kaldırmanın yanında çeşitli mediatör ve sitokinlerin salınımı ile granülasyon dokusu oluşumunu, fibroblast göçü ve proliferasyonunu, anjiyogenez ve kollajen sentezini düzenlemede önemli rol oynarlar.¹⁷ Makrofajlardan salınan başlıca sitokin ve büyüme faktörleri; PDGF, TGF- α , TGF- β , ILGF-1, Platelet aktive edici factor (PAF), Tümör nekroz faktör- α (TNF- α), Fibroblast büyüme faktörü (FGF) , EGF, Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), IL-1 ve IL- 6 olarak sayılabilir. (*Tablo 1*)

Tablo 1: Yara iyileşmesinden sorumlu büyüme faktörü ve sitokinler

<i>Büyüme Faktörü, Sitokinler</i>	<i>Kaynağı</i>	<i>Görevleri</i>
Trombosit-kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor, PDGF)	Trombositler, makrofajlar endotel hücreleri	Fibroblast proliferasyonu nötrofil ve makrofaj kemotaksisi ve proliferasyonu, anjiogenez
Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor β , TGF- β)	Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofaj, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, kemotaksis, indirekt anjiogenez, diğer büyüme faktörlerinin etkilerine yardım
Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF)	Platelet ve makrofaj	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunun uyarılması
Transforme edici büyüme faktörü alfa (Transforming growth factor α , TGF- α)	Aktive makrofajlar, trombosit, keratinosit	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunun uyarılması
İnterlökinler (Interleukins 1-2, IL-1,2)	Makrofaj, lenfosit, birçok doku ve hücre, osteoblast	Fibroblast proliferasyonu, kollajenaz, nötrofil kemotaksisi
Tümör nekroz faktörü (Tümör necrosis factor, TNF)	Makrofaj, mast hücresi, T lenfositler	Fibroblast proliferasyonu
Lökosit kaynaklı büyüme faktörü (Leucocyte derived growth factor, LDG)	Makrofaj, mast hücresi T lenfositleri	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
Fibroblast büyüme faktörleri (Fibroblast growth factors, FGF)	Beyin, pitüiter bez, makrofaj diğer doku ve hücreler	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, matriks depolanmasını uyarır, anjiogenezanjiogenez, yara kontraksiyonu
Keratinosit büyüme faktörleri (Ceratinocyte growth factors, CGF)	Fibroblastlar	Epitel hücre proliferasyonu

<i>Büyüme Faktörü, Sitokinler</i>	<i>Kaynağı</i>	<i>Görevleri</i>
İnsan büyüme hormonu (Human growth hormone, HGH)	Pitüiter bez, plazma	Anabolizma, IGF-1 'i uyarır
İnterferonlar (Interferons, IFN)	Lenfositler, fibroblastlar	Fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezinin inhibisyonu
Sinir büyüme faktörü (Nerve Growth Factor- NGF)	Makrofaj, fibroblast, sinir hücreleri	Sinir iyileşmesi, üç germ yaprağına ait hücre proliferasyonu
Granülosit Koloni Stimülan Faktör (G-CSF)	Stromal hücreler, fibroblastlar, endotelial hücreler, lenfositler	Granülosit proliferasyonu, matürasyonu ve aktivasyonunu uyarır.
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	Endotel hücreleri	Anjiogenezi artırır.

3. Proliferasyon

Doku hasarının üç ile dördüncü gününde başlayıp, yaklaşık üç hafta süren fibroblast hücre tipinin hakim olduğu evredir. Makrofajlardan 72. saatte salınan PDGF ve TGF- β etkisi ile fibroblastlarda kemotaksis başlar ve aktive olan fibroblastlarda proliferasyon görülür. Fibroblastlar hasarlı alana gelir, glikozaminoglikan ve kollajen üretimi başlar.¹⁶

TGF - β : Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofaj ile birlikte birçok doku ve hücrede sentezlenen TGF- β 'nın hedef hücreler üzerinde proliferasyon, diferansiyasyon, adhezyon, morfogenetik etkileşim, ekstrasellüler matriks oluşumu gibi etkilerinin olmasının yanında tüm bunlara zıt olarak programlı hücre ölümü ve antiinflamatuvar etkileri de vardır. Tümoral dokularda ise onkojenik özellikler göstererek anormal proliferasyon, metaplazi ve aplaziye de neden olduğu bilinmektedir.¹⁸

Transforme Edici Büyüme Faktörü β (TGF- β) ; 25 kDa büyüklüğünde olup iki eş protein dimerin sülfid köprüsü ile bağlandığı moleküldür. Hücrede pre-pro-peptid şeklinde sentezlenir ve bu şekilde inaktif olarak hücre dışına salınır. Serin proteazlar etkisi ile N-Terminal dalının uzaklaştırılması ile aktif hale dönüşür.^{19,20}

Transforme Edici Büyüme Faktörü β (TGF- β); epitelyal ve hematopoetik hücrelerde hücre siklusunun G_0 fazında durmasını sağlayarak antiproliferatif etki gösterir. Prolifreasyonu baskılaması ve diferansiyasyonu hızlandırıcı etkisini siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini aktifleyerek gerçekleştirir. Yara iyileşmesi üzerinde ise; endotel hücreleri ile makrofajlar üzerinde kemotaksisi ve proliferasyonu arttırıcı etki gösterirken, Th-1 ve Th-2, sitotoksik T lenfositleri baskılayarak immunsupresif ve antinflamatuar etki gösterir. Kollajen sentezinin bilinen en güçlü uyarıcısı olan TGF- β , yara iyileşmesinin matürasyon fazında en önemli mediatördür, antinflamatuar ve preapoptotik etki ile hücre çoğalmasını azaltarak, ekstrasellüler matriks üretimini arttırarak skar formasyonu oluşumuna yol açar.^{19,21}

Proliferasyon evresinde epidermiste olan değişiklikler

Yaralanma sonrasında epidermiste reepitelizasyon ile tam kat dermis oluşturulmaya çalışılmaktadır. Bazal tabakada bulunan keratinositler ilk 24 saatte yara kenarında hızla proliferere olurken küboid şekillerini kaybedip, düzleşirler. Keratinositlerin hücre içi tonofilamanları kısalır, psödopot benzeri uzantılar oluştururlar. Sitoplazmalarında aktin filaman oluşumu ve hücreler arası desmozomal bağlantılarında azalma görülür. Migrasyonu sırasında keratinositlerin üzerinde bulunan integrin reseptörleri matriks proteinleri ile etkileşerek migrasyonun yönünü belirlerler. Yeni oluşan kollajen ve keratinositler arasındaki etkileşimi matriks metalloproteinazlar (MMP) belirler. MMP-1 fibriller kollajenden oluşmuş bağları bozarak keratinosit migrasyonunun devamını sağlarken MMP-9 bazal membran üzerinde laminin düzeyini azaltarak keratinositlerin bazal membrandan ayrılmasını kolaylaştırır. Tüm bu aşamalarda en etkili büyüme faktörleri EGF ile TGF- β 'dir. Yara iyileşmesinin dokuzuncu gününden sonra bazal membran zonu oluşmaya başlar. Bazal membranda kollajen ve laminin başta olmak üzere birçok ekstrasellüler matriks proteini bulunmaktadır. Bu aşamada oluşan granülasyon dokusunun içeriğinde fibroblastlar, makrofajlar, endotel hücre migrasyonu ile oluşan kapiller ağ, yeni sentezlenen kollajen fibrilleri bulunmaktadır. Granülasyon dokusu matür skar dokusu oluşana kadar hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna kılavuzluk eder.²²

Proliferasyon evresinde dermiste olan değişiklikler

Dermis; fibroblastlarca düzenlenen fibroplazi ve anjiogenez safhalarından oluşur. Bu safhada oluşan granülasyon dokusu kollajen, hyalüronik asit, fibronektin, makrofajlar ve fibroblastları içerir. Geçici ekstrasellüler matriksi oluşturan fibrin pıhtı hyalüronik asit ve fibronektinden zengindir ve granülasyon dokusu için geçici iskelet dokuyu oluşturarak migrasyon ve anjiogenezde yol gösterici rol oynar. Fibronektin fibroblastların ekstrasellüler matrikse bağlanmalarını sağlar, hücre migrasyonunu indükler ve yara kontraksiyonunda belirleyici rol oynar. Fibroblastlar migrasyon ve proliferasyon sürecinde eş zamanlı olarak kollajen ve elastin gibi proteinlerin sentezini de arttırarak myofibroblastlara dönüşürler. Erken dönemde yara kontraksiyonundan myofibroblastlar sorumludur. Erken dönemde oluşan kontraksiyon ile çevresel olarak yara alanının azaltılması amaçlanır.²³ Yedinci günden sonra matriks metalloproteinazların etkisi ile granülasyon dokusu rezolüsyonu başlar ve myofibroblastlar apoptoz ile ortamdaki uzaklaştırılır. TGF- β , ILGF, PDGF, FGF etkisi ile fibroblastlar tarafından yara iyileşmesi için gerekli olan glikozaminoglikanlar ve kollajen üretilir.

Proteoglikanlar

Hyalüronik aside nonkovalent olarak protein bağlanması ve her proteine de kondroitin sülfat, heparan sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat gibi daha kısa glikozaminoglikan bağlanması ile oluşan ekstrasellüler matriks elemanlarıdır. Kollajen ve elastin gibi fibröz proteinler ile bağlanarak dayanıklılık ve elastikiyeti sağlarlar. Fibroblast ve diğer mezenkimal hücreler kollajen, glikozaminoglikan ve proteoglikan sentezinde rol alarak devamlılığı sağlarlar.²⁴

Kollajen sentezi

18 adet gen ürünü ile sentezi düzenlenen, üç adet polipeptit zincirin oluşturduğu helikal yapıda, bağ dokunun en önemli makromolekülüdür. Amino asit dizisi tripeptit şeklindedir, yapısındaki amino asitlerden %35'i glisin, %15'i prolin ve hidroksiprolin, %11'i alaninden oluşur. Yapısında bulunan prolin ve hidroksiprolin polipeptit omurganın dönüşünü sınırladığı için kollajenin stabilitesinden sorumludur. Fibroblastlar üzerine etkili büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından sentezi düzenlenir. Uygun sinyalle birlikte gen

transkripsiyonu sonucu endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlarda preprokollajen sentezlenir. mRNA ile endoplazmik retikuluma taşınan preprokollajenin N-terminal dalı veziküller arasında ayrılır ve prokollajen oluşur. Endoplazmik retikulum vezikülleri içinde posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve prolin ve lizin kalıntılarının üzerine hidroksil grupları eklenerek hidroksiprolin ve hidroksilizin haline dönüştürülür. Bu reaksiyonda görevli lizin hidroksilaz ve prolin hidroksilaz enzimlerinin çalışması için ortamda α -ketoglutarat, oksijen, demir ve askorbik asit gereklidir. Hidroksilizin ve hidroksiprolin yapılarına galaktozil transferaz ve glikozil transferaz enzimleri etkisi ile UDP –galaktozil ve UDP-glikozilden alınan glikoz veya galaktoz eklenir. Hidroksillenmesi ve glikozillenmesi tamamlanmış olan prokollajen molekülü golgi kompleksi aracılığıyla hücre dışına salınır. Prokollajenin N-terminal peptidi prokollajen aminopeptidaz enzimi ile, C- terminal ucundaki aminopeptidi prokollajen karboksipeptidaz enzimi ile ayrılır ve tropokollajen oluşur. Tropokollajende çapraz bağ oluşumu ise bakır içeren lizil oksidaz enzimi ile olur. Tropokollajenin amino ve karboksi terminallerine peptit dizileri bağlanarak kollajen filamentlerini daha sonra kollajen fibrillerini oluştururlar.²⁵ Yara iyileşmesinde ikinci haftada kollajen sentezi hızlanır, ikinci ve üçüncü haftalarda en yüksek düzeydedir, üçüncü haftadan sonra kollajen sentez ve yıkımı dengede iken dördüncü haftadan sonra kollajen sentezi azalır. Yaralanmadan sonraki ilk saatlerde tip 4 ve tip 5 kollajen miktarı fazladır, 24 saatte tip 3 kollajen hakim hale geçer, 60. saatten sonra tip 1 kollajen miktarı fazla iken tip 3 ve tip 4 kollajen de depolanmaya devam eder.²⁶

Tip 1 Kollajen

Organizmada en fazla miktarda bulunan kollajen tipi, tip 1 kollajendir. Yara iyileşmesi matürasyon fazı ile birlikte tip 3 / tip 1 kollajen oranı giderek azalır. Ekstrasellüler matriksin en önemli bileşenidir. Matür yara dokusunda tip 1 kollajen miktarının artışı; yara iyileşmesi morfogenezi ve fibrozisi için gereklidir. Tip 1 kollajen sentezinde TGF- β , IL-1, TNF- α gibi mediatörler ile kofaktör olarak C vitamini ve demir gereklidir.²⁷

Tablo 2:Kollajen tipleri ve dağılımı²⁸

KOLLAJEN TİPİ	BULUNDUĞU DOKU
Tip-1	Deri, tendon, fasya, ligament , arter, uterus
Tip-2	Hiyalin kıkırdak, kornea
Tip-3	Deri, arter, uterus
Tip-4	Bazal membran
Tip-5	Bazal membran, plasenta
Tip-6	Kas, fasya, tendon
Tip-7	Bazal membran
Tip-8	Endotel
Tip-9	Kıkırdak doku
Tip-10	Mineralize kıkırdak
Tip-11	Mineralize kıkırdak
Tip-12	Ligamentler ve perikard

Anjiogenez

Yara iyileşmesinin dördüncü gününde başlar. Endotel hücrelerinin Vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor-VEGF), TNF- α ve FGF etkisi ile proliferasyonu sonrasında kapiller tomurcuklanma ile anjiogenez başlar. Endotel hücrelerinden salınan kollejenaz ve elastaz gibi proteolitik enzimler bazal membranın parçalanmasına yol açar. Endotel hücrelerinin fenotipik değişiklikleri ile perivasküler alana çıkan hücrelerde migrasyon başlar. Yeni oluşan kapillerler granülasyon dokusu boyunca ilerleyerek birbirleri ile birleşme eğilimindedirler. Endotel migrasyonu sırasında proliferasyon baskılanır. Hücre proliferasyonunun tamamlanması ile anjiogenezi indükleyen faktörler azalır ve anjiogenez tamamlanır. Yaranın metabolik aktivitesi de neovaskülarizasyonda etkilidir; oksijen miktarında azalma, pH düşüklüğü ve laktat yüksekliği gibi faktörler anjiogenezi uyarıcı rol oynar.^{29,30}

4. Remodelling

Remodelling fazı; yara iyileşmesinin sekizinci gününde başlar ve bir yıl ya da yaralanma tipine göre daha fazla sürer. Proliferasyon fazında sentezlenmeye başlanan kollajen fibrilleri arasında kovalen bağlar artarak kollajen daha stabil bir form kazanır. Fibroblastlardan salınan lizil oksidaz enzimi kollajen fibrilleri arasında kovalen bağlar oluşturmadan sorumludur. Kollajen lifleri başlangıçta rastgele dizilim gösterirken mekanik kuvvetlerin etkisi ile organize olurlar. Maturasyon evresinde kollajen sentezi ve yıkımı denge halinde olduğu için doku kollajen miktarında artış olmaz. Matriks metalloproteinaz enzimlerinden biri olan ve yapısında çinko (Zn) bulunduran 'Kollejenaz' enzimi kollajenin α -heliks zincirleri arasına girerek kollajen yıkımına sebep olur. Tip 3 kollajen yıkımı sonucu dokuda tip 1 kollajen oranı artmaya başlar. Matriks metalloproteinazların etkisi metalloproteinaz inhibitörleri tarafından inhibe edilir. Bu iki enzim grubu arasındaki denge TGF $-\beta$, PDGF, IL-1 ve IL-6 tarafından düzenlenir.

Yarada bulunan kollajen miktarı, çapraz bağ oluşturma oranı, sentez ve yıkım arasındaki denge yaranın gerim kuvvetini belirler. Yara gerim kuvveti 14-21. günlerde artar ve maturasyon döneminde stabil hale geçer ancak hiçbir zaman normal doku gerim kuvvetinin %80'ini geçmez.^{17,26}

Yoğun hücrel aktivitesi olan ve vaskülaritesi fazla olan yara iyileşme dokusu ilk günlerde pembe kırmızı renkte izlenirken , maturasyon dönemi boyunca daha az hücrel eleman ve vaskülarite içeren skar dokusu ile yer değiştirir ve soluk pembe ya da beyaz renk alır. Skar dokuda inaktif şekildeki fibroblastlar iğsi hücre şeklini alır, yeni oluşan kapiller damarlarda tromboz ile birlikte apoptoz ve dejenerasyon gelişir. Hücrel metabolik aktivite azalır. Hyaluronik asit, dermatan sülfat, keratan sülfat gibi ekstrasellüler matriks elemanlarının düzeyi normale iner. Dokuların su miktarı da aşamalı olarak azalarak normal seviyesine iner.^{17,26,31}

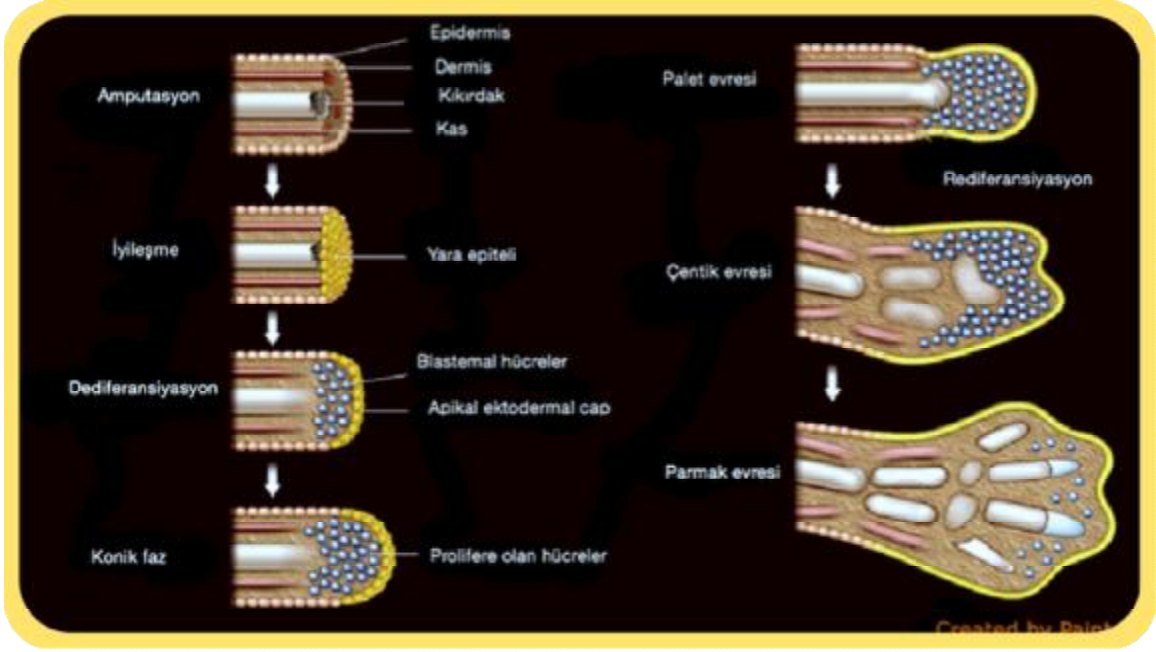
4.1.2 Doku Rejenerasyonu

Kertenkele, semender,deniz yıldızı, planarya,hidra, solucan gibi doğadaki canlılarda ekstremite, kuyruk, çene, spinal kord, retina, lens, optik sinir, ince bağırsak rejenerasyonu görülebilmektedir.³²

Rejenerasyonu inceleyen kertenkele temelli çalışmalarda rejenerasyonun sadece kopan sinirlerin rejenerasyonu ile mümkün olduğu görülmüştür. Aynı çalışmalar sonucunda; sinirlerin sadece sinir hücreleri ve hedef organ arasında iletim sağlayıcı değil aynı zamanda rejenerasyon için de gerekli olduğu anlaşılmıştır.³²

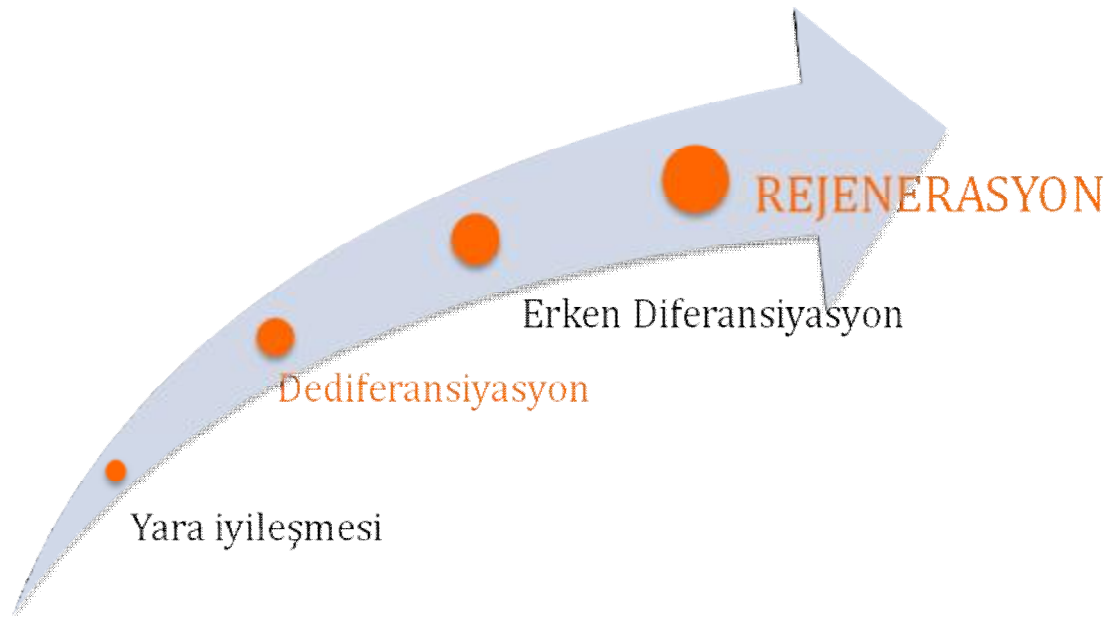
Sinir öncülüğünde ekstremite rejenerasyonu ilk olarak 1823 yılında Tweedy John Todd tarafından keşfedilmiş, 1940-1950 yılları arasında ise Marcus Singer tarafından analiz edilmiştir. Marcus Singer'a göre duyu veya motor sinirler herhangi bir uyarı ya da nörotransmitter salınımı olmadan rejenerasyona öncülük edebilir.³² Sinir ve rejenere olacak doku arasında ilişki sağlayan mediatörler ve büyüme hormonları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Kertenkelelerde ekstremite amputasyonu sonrası güdük hattında gelişen blastema formasyonu ile rejenerasyon başlar. Sinirin rejenere olması ile blastemal hücreler proliferasyonla artabilir ve rejenerasyon gerçekleşebilir.(Şekil 5)



Şekil 5: Rejenerasyon Süreci

Rejenerasyon aşamalarında amputasyonu takip eden yara iyileşmesi ardından gelen dediferansiyasyon basamağı; memeliler ve rejenerasyon kapasitesi yüksek canlıları ayıran en önemli basamaktır. Dediferansiyasyon; yaralanan bölge komşuluğundaki hücrelerin proliferen kök hücrelere geri dönüşümüdür. Bu basamak sonrasında kök hücrelere dönüşen hücreler diferansiye olup orjinale uygun dokulara farklı olarak rejenerasyonu tamamlamış olmaktadır. Bu nedenle dediferansiyasyon süreci rejenerasyonun temel ve en önemli noktasıdır.³² (Şekil 6)



Şekil 6: Rejenerasyon Basamakları

Dediferansiyasyonu takip eden rejenerasyon basamaklarından erken diferansiyasyona kadar olan sürecin sinir rehberliğinde ilerlediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Sinir uyarımı ve nörotransmitterler rejenerasyon için gerekli olan gen ve sinyal yollarında önemli rol oynamaktadır. Schwann hücrelerinden salgılanan “newt anterior gradient” (nAg) proteini rejenerasyon için şarttır. Rejenerasyon sonrası epitelde ve yağ-ter bezlerinde de aynı proteinin izole edilmiş olması; sinir kaynaklı olan bu proteinin rejenerasyonda etkin olduğunu göstermiştir. 2007 yılında Kumar ve arkadaşları tarafından kertenkeleler üzerinde yapılan çalışmada ampute edilen ekstremitede rejenerasyon süreci izlenmiştir. Rejenerasyon sürecinde; yara iyileşmesini takiben ilk olarak kök hücreden zengin; dediferansiyasyona öncülük eden “blastema” oluşumu gözlenmiştir. Blastema oluşumu sonrası ampute edilen ekstremitede denerve edilip, sinir ve nAg protein sentezi durdurularak yapılan kontrollü sürecin sonunda; denerve amputatta rejenerasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Plazmid ile nAg protein taşıyan denerve amputatta ise rejenerasyonun tamamlandığı gösterilmiştir. Sonuçta akson boyunca schwann hücrelerinden salınan nAg protein; blastema üzerinde olan Prod 1 yüzey proteinine bağlanarak rejenerasyonun başlamasını ve sürdürülebilirliğini sağlar⁵

4.2 Nörotrofik Faktörler ve Sinir Büyüme Faktörü

4.2.1 Nörotrofik Faktörler

Nörotrofik faktörler, nöronların büyümesini, yaşamlarını devam ettirmesini, morfolojik plastisite ve fonksiyonel olarak protein sentezlerini düzenleyen, endojen çözünebilir proteinlerdir. “Nörotrofik” terimi, Yunanca’daki “besleyen” anlamına gelen “trophimos” sözcüğünden köken almaktadır.³³

Nörotrofik faktörler, nöronların yaşamını devam ettirmesi için ihtiyaç duyduğu bir polipeptid ailesidir^{34,35} Embriyonik yaşam boyunca nöronların gelişim ve olgunlaşmalarına katkıda bulunurlar.

Nörotrofik faktörler 3 ana gruba ayrılır.

1. Nörotrofin ailesi:

Memelilerde nörotrofin ailesinin 4 üyesi vardır:

- a. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)
- b. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)
- c. Nörotrofin- 3 (NT-3)
- d. Nörotrofin- 4/5 (NT-4/5)

Bunlar Tirozinkinaz (Trk) ailesinin (Trk A,B,C) tirozin kinaz reseptörlerine etki eden küçük temel polipeptidlerdir.

2. Nörokin ailesi:

- a. Silier Nörotrofik Faktör (CNTF)
- b. Lökemi İnhibitör Faktör (LIF)

3. TGF- β ailesi:

- a. TGF- β 1
- b. TGF- β 2
- c. TGF- β 3
- d. Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF)

Bunlara ek olarak teleost balıklarında Nörotrofin-6 (NT-6) ve Nörotrofin-7 (NT-7) adı verilen 2 nörotrofin daha bulunmuştur.³⁶

Nörotrofinlerin üç tane yüksek ve bir tane de düşük afiniteli reseptörleri vardır. Yüksek afiniteli reseptörler, tropomyozin reseptör kinaza bağlı proto-onkojenlerin ürünleri olup TrkA, TrkB ve TrkC olarak isimlendirilir. Tek düşük afiniteli reseptör ise 75 kDa ağırlığındaki p75^{NTK} adlı reseptördür. TrkA reseptörü, NGF, NT-6 ve NT-7'ye; TrkB reseptörü, BDNF, NT-4/5'e; TrkC ise sadece NT-3'e bağlanır. Bu arada, NT-3, TrkA ve TrkB için de sekonder ligand görevi görmektedir.³⁶ (Tablo 3)

Tablo 3: Nörotrofinler ve reseptör afiniteleri

Nörotrofin	Reseptör
NGF	TrkA > p75 ^{NRT}
BDNF	TrkB > p75 ^{NRT}
NT3	TrkC > TrkB > TrkA > p75 ^{NRT}
NT4/5	TrkB > p75 ^{NRT}

Stabil biyolojik aktif formlarında kovalent olmayan homodimerler şeklinde bulunsalar da nörotrofik faktörlerin çoğu doğada monomerler şeklindedir. Bir çoğunun izoelektrik noktası yediden büyük olduğu için bazik proteinler olarak kabul edilirler.

4.2.2 Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Ramon Y Cajal 1928'de, kesilmiş bir sinirin aksonlarının proksimalden distale trofik faktörlerin öncülüğünde rejenere olduğunu ileri sürmüştür. 1951 yılında Rita Levi-Montalcini ve Viktor Hamburger Sinir Büyüme Faktörünü (Nerve Growth Factor, NGF) bulmuşlardır. İlk olarak erkek fare tükürük bezinden izole edilen NGF ile sinir rejenerasyonu alanında büyük gelişmelerin başlangıcına öncülük edilmiştir.³⁷ Ancak yapılan sonraki çalışmalarda NGF'nin sadece sinir iyileşmesinde etkili olmadığı her üç germ yaprağından da gelişen dokuların iyileşmesinde de etkili olabileceği gösterilmiştir.⁶

Sinir hasarı sonrası makrofaj, schwann hücreleri ve fibroblastlardan sentezlenen NGF ortama salınmaktadır. Yapılan deneylerde, NGF kullanımı ile doğal ya da deneysel olarak indüklenmiş hücre ölümünün sempatik ve duyuşal nöronlarda geri döndüğü ve ek olarak anti-NGF antikörlerinin, *in vivo* olarak sempatik sinir gelişimini bloke ettiği gösterilmiştir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, NGF ile aksonal tomurcukların büyüme yönünün de etkilendiği saptanmıştır. Sempatik ve duyuşal nöronlar, normal gelişimleri için de NGF'e ihtiyaç duyarlar, ancak parasempatik ve motor nöronlara etkisi yoktur.³⁸ Zhuk ve arkadaşları NGF uygulaması ile aksotomilerden sonra görülen santral kromatoliz ve hasarlı nöron ölümünde azalma, protein sentezi, fosforilasyonu ve kollateral lif tomurcuklanmasında artış

saptamışlardır.³⁹ Kesilmiş siyatik sinir distal segmentinde, NGF de keskin bir artış oluşarak sinir rejenerasyonunu hızlandırmaktadır. Lee ve arkadaşlarının sıçan siyatik sinirinde yaptıkları çalışmada, kontrollü NGF salınımının aksonal rejenerasyonu doz bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür. Duyusal arka kök ganglionlarının yaşayabilirliği üzerindeki etkisi kanıtlanmış olan NGF, fibronektin ile beraber kullanıldığında motor nöronlar üzerinde de etkili olabildiği gösterilmiştir.^{40,41}

Sinir büyüme faktörü; 26.500 Da ağırlığında olup 118 aminoasitlik iki zincirden oluşur. İzoelektrik noktası 9,5 ile 9,8 arasında değiştiği için bazik bir protein olarak davranır. Plazmada en çok $\alpha 2$ makroglobulin ve albumine bağlanır. Bu proteinlerin ve spesifik reseptörlerinin yanı sıra mikrotübül proteini olan tübüline ve ekstrasellüler matriksin proteoglikanlarına da bağlanır. NGF' nin plazmada bağlı bulunma oranı %50'den fazladır. NGF'nin $\alpha 2$ makroglobulin ve albumine çok miktarda bağlanması, kan-beyin bariyerini geçişini azaltmaktadır.⁴¹

Sinir büyüme faktörü; ortama verilmesi zor olan, kolay yıkılan bir büyüme faktörü olması nedeniyle uygulaması ve optimal dozu yakalaması zordur. Bu nedenle bir taşıyıcıya ihtiyaç duyar.⁴²

Heparin ile konjuge edilen fibrin jel içine verilen NGF ile; NGF salınımı sağlanırken aynı zamanda heparini kofaktör olarak kullanan epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) için de katalizör sağlanmış, hücre büyüme ve farklılaşması desteklenmiş olur.⁴³

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

İlk kez 1982 yılında bulunmasına karşın moleküler tekniklerle karakterize edilmesi uzun yıllar almıştır. Sinir büyüme faktörü (NGF) ile benzer bir moleküler yapıya sahip, 120 aminoasitten oluşan bir polipeptittir. Daha çok TrkB olmak üzere, hem TrkB hem de TrkC reseptörlerine bağlanabilir. Sinir hasarı sonrası, schwann hücrelerinde ve hedef organ olan kasta miktarı artar, retrograd olarak sinir hücre gövdesine taşınır.^{44,45} Yapılan çalışmalarda, aksotomi sonrası omurilik ön boynuzda yerleşik motor sinir hücre ölümünü azalttığı, periferik sinir rejenerasyonunu ve remyelinizasyonunu arttırdığı, ek olarak hücre kültürü çalışmalarında da, motor nöronların yaşayabilirliğini arttırdığı saptanmıştır.^{46,47}

Zhang ve arkadaşlarının sıçanlarda periferik sinir hasarı oluşturdukları deneysel çalışmalarında, BDNF ile periferik sinir rejenerasyonu ve remyelinizasyonunda oluşan düzelmeyen, anti-BDNF antikoru verildiğinde bloke olduğu görülmüş ve sinir rejenerasyonu için endojen BDNF'ün gerekli olduğu ortaya konulmuştur.⁴⁸

Boyd ve arkadaşlarının BDNF'ün periferik sinir rejenerasyonu üzerine etkisinin doza bağımlı bifazik olduğunu öne sürmüşlerdir. Düşük dozlarda (0,5–2 µg/gün) uygulandığında motor akson rejenerasyonunu hızlandırmasına karşın, yüksek dozlarda (12–20 µg/gün) rejenerasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Ancak bu doz bağımlı mekanizma henüz net olarak çözülememiştir.⁴⁹

Nörotrofin-3 (NT-3)

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve NGF ile yapısal benzerlik gösteren 119 aminoasitli dimerik yapıya sahip bir polipeptit olup, hem santral sinir sisteminde, hem de periferik sinir sisteminde bulunur. Tercihen TrkC reseptörlerine bağlanır. Duyusal ve parasempatik nöronlarda yaşayabilirliği ve diferansiyasyonu destekler. İn vitro motor nöron yaşayabilirliği üzerine güçlü etkileri vardır. Nöromusküler eşik fonksiyonlarını düzenler. Motor nöronları doğal hücre ölümünden korur. Ayrıca periferik sinir rejenerasyonunda da etkileri vardır. Spinal kord yaralanmalarında, NT-3 enjeksiyonu ile kortikospinal yollarda rejeneratif tomurcuklanmada artış olduğu gösterilmiştir.^{38,45}

Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)

Sinir büyüme faktörü ile yapısal benzerlik gösteren, 130 aminoasitli dimerik bir polipeptittir. Tercihen TrkB reseptörlerine bağlanır. Hasarlanmış retinal ganglion hücrelerinin yaşayabilirliğini desteklediği, motor nöron yaşayabilirliği için güçlü destekleyici etkilerinin olduğu, motor nöronların iskelet kası innervasyon kapasitelerini arttırdığı saptanmıştır.⁴⁵

Yin ve arkadaşlarının yürüttüğü fibrin yapıştırıcının NT-4/5 için taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı sıçan siyatik sinir kesi modelinde, aksotomi sonrası periferik sinir rejenerasyonunda NT-4/5'in etkili olduğu gösterilmiştir.⁵⁰

Siliyer Nörotrofik Faktör (CNTF)

Sağlıklı periferik sinirlerde Schwann hücrelerinde ve santral sinir sisteminde astrositlerde bol miktarda bulunan ve yapısal olarak NGF'den farklı yapıda bir nöroaktif sitokindir. Siliyer nörotrofik faktör (CNTF) motor ve duysal nöronlarda artmış metabolik aktivite ile beraber, her iki tip sinirde de aksonal tomurcuklanmayı artırır. Aksotomilerden sonra, distal güdükte CNTF mRNA seviyeleri hızla düşer ve akson tekrar rejenere olana kadar bir artış görülmez. Sinir rejenerasyonuna CNTF de artış eşlik eder ve CNTF seviyelerinin devamlılığı için, aksonların glial hücrelerle temas etmesinin kritik önemi olduğuna işaret eder. Siliyer nörotrofik faktör ile *in vitro* olarak, aksotomilerden sonra motor nöronların yaşayabilirliğinin de artış saptanmış olmasına karşın, trofik desteği henüz açıklığa kavuşmamıştır. Hasara yanıt olarak glial hücrelerden salındığı düşünülmektedir. Siliyer nörotrofik faktör aynı zamanda, nöron kaynaklı bir myojenik faktör olarak da düşünülmektedir. Tedavi amacıyla uygulandığında, kaslarda denervasyona bağlı gelişen atrofiyi azaltmakta ve kas gücünün yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır.^{38,44} Siliyer nörotrofik faktörün , bazik FGF, BDNF ve NGF ile sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur.

McCallister ve arkadaşlarının, sıçan periferik sinirinde yaptıkları çalışmada aksotomi sonrası CNTF ve NGF beraber uygulandığında, aksonal rejenerasyonda artış olduğu görülmüştür.⁵¹

Lökemi İnhibitör Faktör (LIF)

Yamamori ve arkadaşları tarafından 1989 yılında bulunan, periferik sinirlerin yaşayabilirliğini destekleyen bir diğer büyüme faktörüdür. *In vitro* çalışmalarda, sempatik nöronlardaki aktivitesinin CNTF ile oldukça benzer olduğu ve CNTF ile benzer sinyal yollarını kullandığı saptanmıştır. Diğer nörotrofik faktörler gibi retrograd taşınarak, arka kök ganglionlarındaki nöronları etkiler. Sinir hasarı sonrasında retrograd bu taşınma işlemi, CNTF ile beraber artar. Schwann hücreleri tarafından üretildiği düşünülmektedir. Aksotomize sinirlere LIF uygulandığında, sinir rejenerasyonunun ve miyelinizasyonunun artmasının yanı sıra, kas kitlesinde ve kasılma gücünde de artış olduğu saptanmıştır.³⁸

Kurek ve arkadaşları tarafından LIF üretimi baskılanmış farelerle yapılan deneyde, kas rejenerasyonunun belirgin şekilde azaldığı, ancak bu durumun LIF infüzyonu ile düzeldiği gözlenmiştir.⁵² Sıçanlarda, omurilik hasarı sonrasında kullanımı ile akson rejenerasyonunda artış ve lökomotor fonksiyonlarda düzelme olduğu saptanmıştır.⁵³

Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF)

İlk kez 1993 yılında bulunduğunda dopaminerjik nöronlarda etkili olduğu düşünülmüş, ancak sonradan yapılan çalışmalarda pek çok nöron popülasyonunda potent bir nörotrofik faktör olduğu saptanmıştır. Embriyonik sıçan omurilik motor nöronlarından elde edilebilir. Bunların kolinerjik maturasyonunu desteklerken, hem duyuşal hem de motor nöronların, doğal ya da travmaya bağlı hücre ölümünü azaltır. Schwann hücreleri tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerine güçlü trofik etkisi ile periferik sinir iyileşmesinde de rol alır. Deneysel olarak, sıçan siyatik sinir hasarında kullanılmış ve rejenerasyonun arttığı saptanmıştır.⁴⁴ Periferik sinir hasarı sonrası iskelet kasında da düzeyleri artar ve retrograd olarak motor nöronlara taşınır; hem in vivo hem de in vitro olarak motor nöronların yaşayabilirliği üzerindeki etkisi gösterilmiştir.³⁸

4.3 Elektrik Stimülasyonu

Elektrik stimülasyonu tarih boyunca tıp doktorları ve alternatif tıp savunucuları tarafından kullanılmıştır.

Eski Yunan ve Roma da kan akımını hızlandırmak amaçlı yılan balıkları ile ayak banyoları yapılmıştır.⁵⁴ 17. y.y da su çiçeğinin yol açtığı skarların tedavisi amaçlı altın folyolar kullanılmıştır.⁵⁵ Takip eden yıllarda altın folyoları yaralara sararak yara iyileşmesini sağlamışlardır.^{56,57} 18. y.y da John Wesley elektrik stimülasyonu ile baş ağrısı, anjina ve ayak ağrılarınin tedavi edilebileceği ile gündeme gelmiştir.⁵⁸ İlk olarak 1950 yılında Lente elektrik stimülasyonu ile kemik iyileşmesini göstermiştir.⁵⁹ Bundan sonra ki süreçte de fraktürler sonrası gelişen malunion-nonunion tablolarının tedavisinde elektromanyetik araçlar kullanılmıştır.^{60,61,62}

4.3.1 Elektrik Stimülasyonu Tipleri

Elektrik stimülasyonu kırık onarımında, ağrı tedavisinde , yara iyileşmesinde ve son dönemde doku rejenerasyonunda kullanılmaktadır.

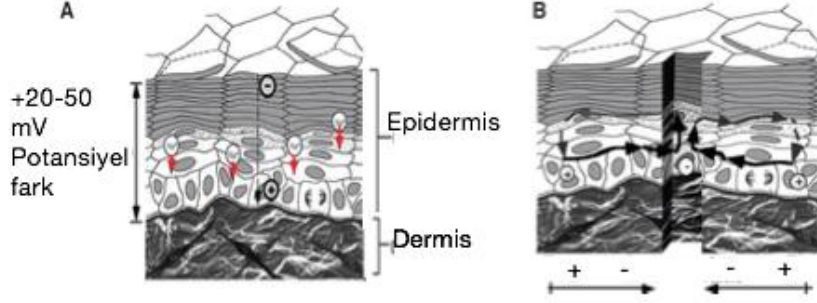
- Direk akım (DC)
- Alternatif akım (AC)
- Yüksek voltaj darbeleri akım (HVPC)
- Düşük şiddetli direk akım (LIDC)
- Darbeleri elektromanyetik akım (PEMF)
- Transkutanöz elektrik stimülasyonu (TENS)^{63,64}
- Kablosuz mikroakım stimülasyonu (WMCS)

Kutanöz Biyoelektrik

Amfibilerde, memelilerde ve insanlarda intakt ve yaralı ciltte ölçülebilir bir elektrik akımı mevcuttur. Epidermisten elektronegatif akım ölçülürken dermisten elektropozitif akım ölçülmektedir.^{65,66,67} Amfibilerde bu ölçülebilir akımın ; transeptilyal potansiyelin (TEPs) epidermis apikal membranında yerleşen sodyum (Na) kanalları nedeni olduğu düşünülmüştür. Bu akım Foulds ve Baker tarafından 10 mV-60 mV olarak ölçülmüştür. Epidermisin stratum corneum tabakasından ölçülen sınır değer ise 23,4 mV negatif potansiyele ulaştığı bulunmuştur.⁶⁸

İnsan hücrelerinde olan aynı elektrokimyasal fizyoloji mevcut olan transeptilyal potansiyel epidermisten dermise olan Na göçü ile sağlanmaktadır. Epidermis elektronegatif, dermis elektropozitif olmak üzere bir elektrik alanı oluşturmaktadır.⁶⁵ (Şekil 7)

1830 yılında yara dokusunda normal biyoelektrik alanda iyonik akımlar oluştuğu görülmüştür.⁴³ Dubois ve Reymond tarafından çocuklarda ampute parmakta $35 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ akım oluştuğu, Gine domuzlarında gelişen yaralanmada ise $10-30 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ şiddetinde elektrik akımı oluştuğu görülmüştür.⁶⁶



Şekil 7- A) Normal deri elektriksel alanı
B) Yaralanma sonrası elektriksel alan

4.3.2 Elektrik Stimülasyonu Etkileri

Elektrik ve Hücre Proliferasyonu

Elektrik stimülasyonunun medikal literatürde belirtilmiş olan birçok etkisinden biri de hücre proliferasyonunu arttırmasıdır. Normalde organizmada olan elektriksel alan yaralanma ile bozulur ve yeni bir elektrik alanı meydana gelir. Bu alan epitelyal hücre göçünde kemoatraktan maddeler ve sinyal yolları yardımıyla klavuzluk görevi üstlenir.⁶⁶ Yapılan çalışmalarda direk akım altında hücre hareket ve yönelim kapasitesinde artma ve hücre oriyantasyonunda hızlanma gözlenmiştir. Bu etki normalde olan elektriksel alan taklit edilerek sağlanmıştır. Ayrıca elektrik stimülasyonu yaralanmış dokuya olan nötrofil, makrofaj ve uyarılmış fibroblast göçünü arttırır.

Darbeli elektromanyetik akım (PEMF) ise endotelyal hücre ve fibroblastların “doubling-time” kısaltır ve” p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinaz” aktivasyonu ile hücre proliferasyonunu arttırır.⁶⁸

Elektrik ve Enfeksiyon

Gecikmiş yara iyileşmesinde en önemli noktalardan biri bakteriyel enfeksiyondur. Elektrik stimülasyonu bakteriyel çoğalmayı ve klinik enfeksiyon riskini azaltır. Yapılan çalışmalarda elektrik akımının her türünün bakteriyel çoğalmayı inhibe ettiği gözlenmiştir.⁶⁹

Elektrik ve Perfüzyon

Elektrik stimülasyonunun perfüzyonu arttırması; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) artışı ile ilişkilendirilmiştir. VEGF; ekspresyonu hipoksi ve sitokinler ile regüle edilen primer anjiojenik faktördür. Kanno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda; elektrik stimülasyonun iki saat uygulanması ardından VEGF mRNA ekspresyonunun arttığı ve uygulamadan 46 saat sonra bazal seviyesine döndüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak elektrik stimülasyonu ile mevcut VEGF salınımı artar ve devam eden uygulamalar sonucunda VEGF ekspresyonu da artar. Tüm bunlar sonucunda da elektrik stimülasyonu ile doku perfüzyonunun arttığı sonucuna ulaşılmıştır.⁶⁷

Elektrik ve Rejenerasyon

Elektrik stimülasyonu; akut ve kronik akson yaralanmaları sonrası motor ve duyu sinirlerin rejenerasyonunda etkilidir. Elektrik stimülasyonu hücre içi cAMP düzeyini arttırarak akson uzamasını sağlar. Nörotrofik faktörler ve nörotrofik faktörlerin reseptörlerinin regülasyonundan sorumlu genlerin upregülasyonu ile sinir rejenerasyonunu gerçekleştirir.⁷⁰

Elektrik stimülasyonu aynı zamanda Androjen reseptörlerinde yaptığı aktivasyon ile başta BDNF, NT-4/5 olmak üzere nörotrofik faktör salınımını da arttırır.⁷¹

Elektrik stimülasyonu schwann hücrelerinin rejenerasyonunda ve remyelinizasyonun gerçekleşmesinde etkilidir.^{72,74} Bir nöropeptid ve vazodilatatör olan Kasionin gen ilişkili peptid (Calsitonin gen related peptid-CGRP) arttırarak BDNF artışı sağlar ve bu şekilde sinir rejenerasyonu sağlar.^{73,75} Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), NGF, Trk B, Trk C artışı ile sinir rejenerasyonuna katkıda bulunur.⁷⁶ Elektrik stimülasyonu makrofajları aktive ederek degradasyonu sağlar ve wallerian dejenerasyonu indükleyerek rejenerasyonu hızlandırır.⁷⁶

4.3.3 Kablosuz Mikroakım Stimülasyonu Tekniği

Elektrik stimülasyonu; elektrik akımı ile yaraya enerji transferi prensibine dayanır. Elektrik stimülasyonu uygulaması için yaraya ve çevre sağlam deriye temas eden iki elektrot ile devrenin tamamlanması başta olmak üzere birçok farklı teknik tanımlanmıştır. Fakat bugüne dek enerji transferi için optimal teknik belirtilmemiştir.

Kablosuz mikroakım stimülasyonu elektrik akımının yara yüzeyine enfeksiyon riski taşıyan ve hastada ağrıya, rahatsızlığa sebep olan elektrotlar olmadan transferini sağlayan noninvaziv bir teknolojidir. Kablosuz mikroakım stimülatörü atmosferik gazları iyonla dönüştürerek yara yüzeyine transfer eder.^{77,78}

Kablosuz mikroakım stimülasyonu akselatör yardımı ile havadaki gazları yüklü iyon formlarına dönüştürerek atomların elektron alışverişi sırasında açığa çıkan enerji esasına dayanmaktadır. Stimülasyon sırasında yaraya veya çevre dokuya temas olmadan havada olan Oksijen ve Nitrojenin elektron alıp verme kapasitesi kullanılarak elektrik enerjisi transferi sağlanmaktadır.⁷⁸

Atmosferik hava; %80 elektropozitif Nitrojen, % 20 elektronegatif Oksijen içermektedir. Atmosferde bulunan zıt kutuplar iyonizasyon enerjisi yaratmaktadır. İyonizasyon enerjisinin kullanıldığı bu methodta; kullanılan akselatör yardımı ile havada mevcut olan nitrojen ve oksijen ekipmanın yarattığı voltaja göre farklı kutuplara hareketlendirilip akım yaratılır. Yara yüzeyinin pozitif yüke sahip olması nedenli ekipman negatif voltaja ayarlanır. Ortamda pozitif yüke sahip olan nitrojen ekipmana, negatif olan oksijen de yara alanına hareket edecek ve bu şekilde elektrik akım alanı oluşturulmuş olacaktır. O_2^- elektriksel alanda formunu kısa süreli koruyabilen ve cilt veya yara yüzeyine ulaştığında nötralize olan oldukça anstabil bir moleküldür. Yaraya veya cilde temasında O_2^- 'nin yüklü olmayan O_2 dönüşümü gerçekleşir ve ortama yüklü elektronların salınımı ile $-1.6021765 \times 10^{-19}$ C enerji salınır. Bu şekilde yüklü partiküller ile 1-3 μA elektrik akımı sağlanır. Saniyede 2 μA ile 60 dakika süren stimülasyon sonucu $-7200 \mu C$. enerji transferi sağlanmış olmaktadır.⁶⁶

5. GEREC ve YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanı araştırmaları etik Kurulu'na verilen tez projesinin onayının ardından alışma Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ında yürütüldü.

Deneysel Hayvanı

Hayvan Deneysel Etik Kurulu tarafından önerilen laboratuvar hayvanı kullanım - kılavuzunda belirtilen şartlarda bakımı yapılan ve Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarından temin edilen 24 adet, 280-300 gr ağırlığında, erkek, Sprague Dawley suşu rat kullanıldı.

Deneysel Hayvanlarının Bakımı

Çalışmada kullanılan deneysel hayvanlarının bakımı Dokuz Eylül Üniversitesi Deneysel Hayvanı Araştırmaları Laboratuvarı'nda yapıldı. Denekler standart sıçan yemi ve suyu ile beslenip, kafeslerde tekli olarak izlendi. Cerrahi sonrası günlük pansumanlar ile izlenen deneklere otomutilasyonu engellemek için yakalık tarzında ateller uygulandı.(Resim 1)



Resim 1: Otomutilasyon nlemleri

Anestezi

Deneklerin anestezi Ketamin (Alfamine) 65 mg/kg ve Ksilazin klorür (Alfazyne) 6,5 mg/kg intraperitoneal uygulama ile sağlandı.

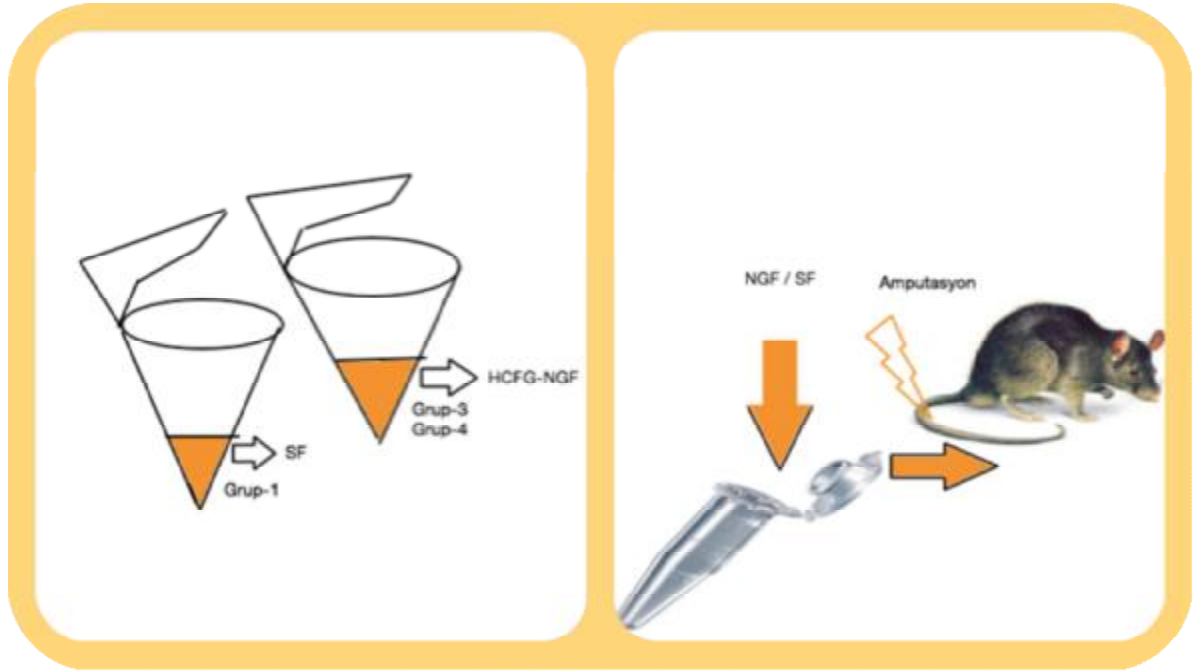
Deney Grupları ve Özellikleri

Denekler rastgele her grupta 6 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. (Tablo 4)

Tablo 4: Deney Grupları ve Yapılan İşlemler

Gruplar	İşlem
Grup-1	Kontrol , makroçevre + %0.9 NaCl ile izlem
Grup-2	Makroçevre + Elektrik Stimülasyonu
Grup-3	Makroçevre + HCFG-NGF
Grup-4	Makroçevre + Elektrik Stimülasyonu + HCFG-NGF

Her dört grubun kuyruğu yaklaşık 10 cm distalden ampute edildi. Ampute edilen kuyruklar eppendorf tüplerinden oluşturulan makroçevre içine yerleştirildi. Kuyruk güdük hattı makroçevreye Kirschner teli ile tespit edilip yapılan uygun pansuman ardından otomutilasyonu önlemek amaçlı ratların sırt bölgesine 2.0 ipek sütür ile tespit edildi.



Şekil 8: Makroçevre

5.1 Cerrahi Yöntem

Ketamin (Alfamine) 65 mg/kg ve Ksilazin klorür (Alfazyne) 6,5 mg/kg intraperitoneal verilerek genel anestezi sağlanan denekler prone pozisyonda operasyon masasına yatırıldı. Steril örtülerin örtülmesini takiben kuyruklar povidon iodin solüsyonla temizlendi.

Kuyruk yaklaşık 10 cm distalden 15 no' lu bistüri yardımı ile kaudal vertebra açıkta bırakılacak şekilde ampute edildi. (Resim 2) Amputasyon sonrası güdük hattı makroçevre içine yerleştirilip Kirschner teli ile tespit edildi. Steril drape ile pansuman yapılarak deneklerin sırt derisine 2.0 ipek ile tespit edildi. (Resim 3)



Resim 2: Kuyruk ampütasyon seviyesi



Resim 3: Hayvanların postoperatif izlem süreci

Grup-1

Kontrol grubu denekleri genel anestezi altında kuyruk yaklaşık 10 cm distalden yapılan amputasyon sonrası standardize edilen makroçevreye yerleştirildi. Makroçevre içinde sadece %0.9 NaCl ile izlendi.

Grup-2

Denekler genel anestezi altında kuyruk yaklaşık 10 cm distalden yapılan amputasyon sonrası makroçevreye yerleştirildi. Makroçevre olarak belirlenen eppendorf tüplerine elektrik stimülasyonu için gerekli olan hava ile temasa olanak sağlayan pencereler açıldı. Deneklere 0,3,6,12,18,24,30 ve 35. günlerde 1 μ A şiddetinde, 630 nm dalga boyunda kablosuz mikroakım stimülasyonu 15 dakika süre ile uygulandı. Elektrik stimülasyonunu takiben makroçevre üzerinde olan pencereler steril drape ile kapatıldı.

Grup-3

Denekler genel anestezi altında kuyruk yaklaşık 10 cm distalden yapılan amputasyon sonrası içine Heparin ile konjuge fibrin jel (HCFG) ve sinir Büyüme Faktörü (NGF) eklenen makroçevrede izlendi. Makroçevre bir haftalık periodlar ile değiştirilerek HCFG-NGF nin ortamda optimal doz aralığında tutulması sağlandı.

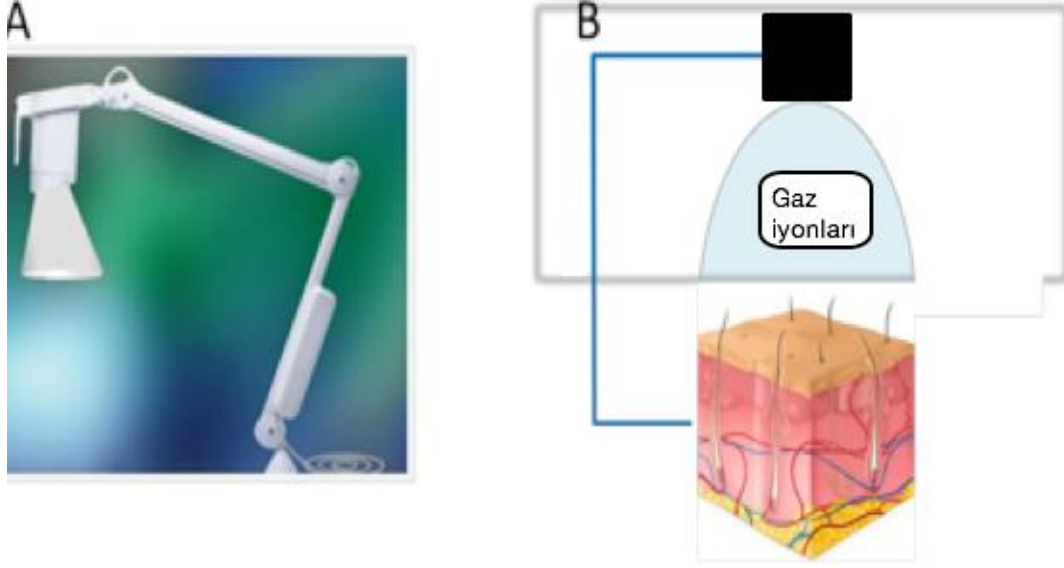
Grup-4

Denekler genel anestezi altında kuyruk yaklaşık 10 cm distalden yapılan amputasyon sonrası içine Heparin ile konjuge fibrin jel (HCFG) ve sinir Büyüme Faktörü (NGF) eklenen makroçevrede izlendi . Makroçevre olarak belirlenen eppendorf tüplerine elektrik stimülasyonu için gerekli olan hava ile temasa olanak sağlayan jel tabakanın üst seviyesinden pencereler açıldı. Deneklere 0,3,6,12,18,24,30 ve 35. günlerde 1 μ A. şiddetinde, 630 nm. dalga boyunda kablosuz mikroakım stimülasyonu 15 dakika süre ile uygulandı. Elektrik stimülasyonunu takiben makroçevre üzerinde olan pencereler steril drape ile kapatıldı. Makroçevre bir haftalık periodlar ile değiştirilerek HCFG-NGF nin ortamda optimal doz aralığında tutulması sağlandı.

Tüm denekler 42 gün süre ile normal yaşam şartlarında standart besin ile izlendi. Tüm deneklerin 0. ve 42. Günde kuyruk ön-arka grafileri çekilerek radyolojik olarak değerlendirildi. Denekler 42. Gün sonunda yüksek doz eter anestezisi altında sakrifiye edildi.

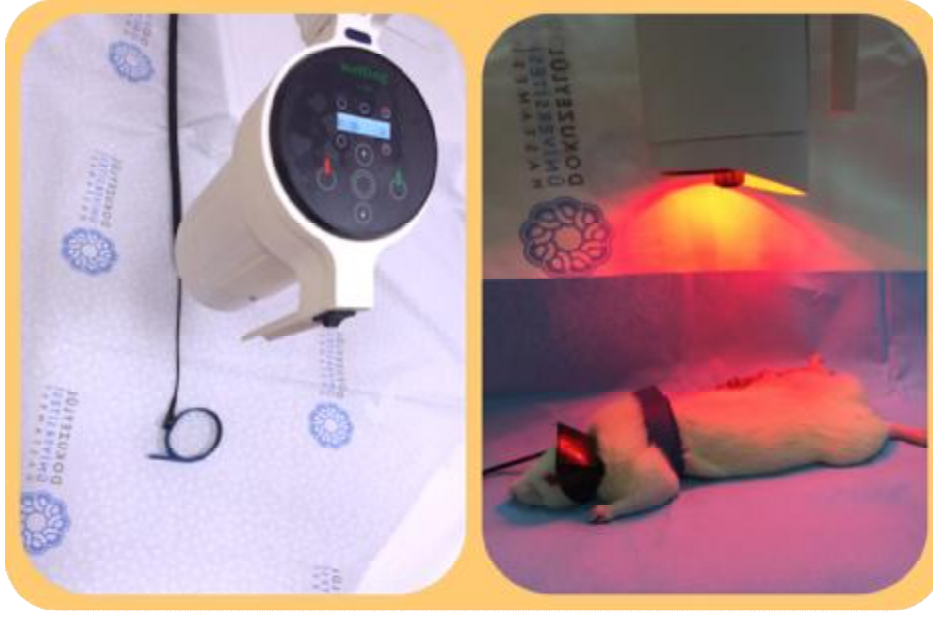
5.2 Elektrik Stimülasyonunun Uygulanması

Kablosuz mikro akım stimülatörü olarak oksijen iyonları üretip yara yüzeyine transfer eden WMCS W200 cihazı (Wetling health, Fredensborg, Denmark) kullanıldı. (*Şekil-9*) Kablosuz mikroakım stimülasyon cihazı; 15 W güç tüketimi, 0.25 A besleme akımı, 50-60 Hz besleme gerilimi özelliklerinde olup tedavi başlığı, hareket kolu, güç kaynağı ve bileklikten oluşmaktadır. Tedavi başlığı üzerinde olan kontrol paneli ile süre, transfer edilecek akım miktarı, “light emitting diode” (LED) ışık dalga boyu ve yoğunluğu ayarlanabilmektedir. Elektrik stimülasyonu için LED ışık kapalı modu da tercih edilebilmektedir. Bileklik ise yaradan uzakta bir bölgeye bağlanarak yara yüzeyine ulaşan O₂ elektronlarının güç kaynağına geri dönüşünü sağlamaktadır.



Şekil 9 A) Wetling kablosuz mikroakım stimülasyonu
B) Elektrik stimülasyon şematik diyagramı

Sıçanlar elektrikten izole bir masaya fleksibil nötral elektrot sıçanın gövdesine sarılarak yerleştirildi. Akselatörün kontrol kutusu üzerinde elektrik stimülasyonunu uygulamak istediğimiz süre (1-99 dakika), akım ($0.5-4 \mu A$.; $0.5 \mu A$. artan aralıklar) ve dalga boyu (465-630 nm) 15 dakika süre ile $1 \mu A$ akım ve 630 nm dalga boyu olarak belirlendi. Akselatör kuyruk amputasyon hattından 10-15 cm vertikal mesafede olacak şekilde yerleştirilerek stimülasyona uygulandı.(Resim 4) Elektrik stimülasyonu uyguladığımız gruplar olan Grup-2 ve Grup-4 de 15 dakika süre ile $1 \mu A$ akım sekiz seans halinde uygulandı. Seanslar çalışmanın 0,3,6,12,18,24,30 ve 35. günlerinde uygulandı.



Resim 4: Elektrik stimülasyonunun uygulanışı

5.3 HCFG-NGF Hazırlanışı

5.3.1 NGF Hazırlanışı

Bu çalışmada Sigma firmasına ait N-0513 katalog numaralı NGF kullanıldı. Kullanılan NGF; erkek fare submaksiller bezinden izole edildikten sonra nörotropik etkiye sahip olduğu belirlenmiş olan β -alt ünitesi saflaştırılmıştır. Doku kültür ortamında biyoaktivitesi test edilen NGF-7S 2-200 ng/ml konsantrasyonlar arasında etkin bulunmuştur. Liyofilize toz halinde bulunan preperatın tamponlu salin ya da doku kültür mediumu ile sulandırılması önerilmiştir.

Çalışmada steril şartlarda hazırlanan 2.5 mM sodyum fosfat ph:7.0 tamponu solvent olarak kullanıldı. 89 mg Di-Sodyum hidrojen fosfatdodekalhidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) MW: 358.14 gr 100 ml steril bidistile suda çözülerek 2.5 mM solüsyon hazırlandı. 39 mg Natriumdihidrojenfosfat-2hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) MW:156 gr 100 ml steril bidistile suda çözülerek 2.5 mM lik solüsyon hazırlandı. Her iki çözülden uygun miktarlarda karıştırılarak ph:7.0 olan sodyum fosfat tamponu elde edildi.

Liyofilize NGF-7S 50 ml sodyum fosfat tamponu içinde çözülerek 2 μg /ml NGF-7S solüsyonu hazırlanıp çalışmanın sonuna kadar 0 derecede saklandı.

5.3.2 HCFG Hazırlanışı

İnvitro ortama kontrollü NGF salınımını sağlamak amaçlı fibrin jel *Tisseel Lyo* (Baxter – Eczacıbaşı) kullanılarak üretildi. *Tisseel Lyo* 2 ml Trombin ve 2 ml Fibrinojen içeren iki bileşenli bir doku yapıştırıcısıdır. *Tisseel Lyo*; ajirojen liyofilize fibrinojen konsantresi, 3000 KIU/ml (Kallikrein İnhibitör Ünite) steril, ajirojen sığır kaynaklı aprotinin solüsyonu, steril ajirojen liyofilize trombin, 40 mmol/ml sterik CaCl₂ den oluşan dört flakon içeren set halinde sunulmaktadır.



Resim 5: Liyofilize fibrinojen konsantresinin hazırlanışı

Liyofilize Fibrinojen Konsantresinin Hazırlanışı

Fibrinojen konsantresinin hazırlanması flakonları hem ısıtarak hem de karıştırarak hazırlama işlemini kolaylaştıran *Fibrinothem* cihazı ile yapıldı. *Fibrinothem* cihazı 37 C sabit ısı sağlarken fibrinojen konsantresi flakonu içinde bulunan manyetik karıştırıcı da ısınırken flakonun homojen olarak karışmasını sağlamaktadır. Fibrinojen konsantresi ve 3000 KIU/ml steril, ajirojen sığır kaynaklı aprotinin solüsyonu karıştırılması ardından cihaza yerleştirilip yaklaşık 15 dakika ısıtıldı. Fibrinojen konsantresinin bu şekilde plazmin gibi proteazların inhibitörü olan Aprotinin ile çözülmesi ardından 75-115 mg/ml fibrinojen içeren 2 ml solüsyon oluşturuldu. (Resim 5)

Trombin Solüsyonun Hazırlanışı

Steril, apirojen , insan plazma havuzundan elde edilmiş olan Trombin, fibrinojen konsantresi hazırlamada kullanılan enjektörlerin kullanılmamasına özen gösterilerek 40 mmol/ml CaCl₂ solüsyonu ile sulandırılır.*Fibrinotherm* cihazı ile 37 C de ısıtılan flakon sonunda 400-600 IU/ml trombin ve 36-44 mmol/ml CaCl₂ içeren solüsyon oluşturuldu. (Resim 5)

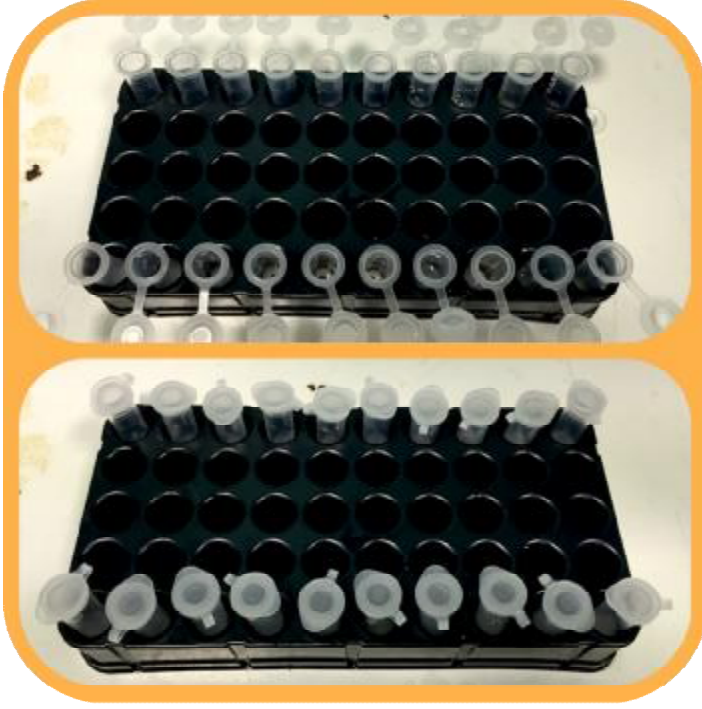
Fibrin jel oluşumu *Duploject* Sistemi ile 2 ml Fibrinojen ve 2 ml Trombin içeren solüsyonların eşit şekilde karıştırılması ile oluşturuldu.Fibrin jele ilave edilen 1 ml Heparin ile HCFG elde edildi.(Resim 6)



Resim 6: Duploject sistemi ile fibrin jel hazırlanışı

HCFG-NGF Hazırlanışı

Heparin ile konjuge ettiğimiz fibrin jel taşıyıcı makroçevre olarak tasarladığımız eppendorf tüplerine eşit olacak şekilde 0,5 ml ilave edildi.Jel taşıyıcı içine her tüpe eşit olacak şekilde 50 mikrolitre sodyum-fosfat tamponu ile çözülmüş NGF ilave edildi. Homojen bir yapı sağlanarak NGF ve NGF ve elektrik stimülasyonu gruplarında kullanılmak üzere 0 derecede saklandı.(Resim 7)



Resim 7: Makroçevrelere yerleştirilen HCFG

5.4 Değerlendirme

Çalışma sonuçları cerrahiden altı hafta sonra hayvanların sakrifiye edilmesi ardından histopatolojik, radyolojik ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.4.1 Histopatolojik Değerlendirme

Denekler radyolojik incelemelerin sonrasında altıncı haftada yüksek doz eter anestezisi ile sakrifiye edildi. Ampute edilip rejenerasyon gözlenen kuyruk distal uçlar kaudal vertebra dahil edilerek örneklendi. Alınan örnekler dekalsifiye edilinceye kadar formalinde (%10'luk) saklanmıştır. Dekalsifikasyon işlemi %10'luk EDTA (ph: 7.4) gerçekleştirilmiştir. Dekalsifiye olan kesitler, 24 saat süreyle akan suyun altında bekletilerek EDTA'dan arındırılmış ve gerekli doku takibi işlemleri sonucunda, seri olarak transvers yönde 5-6µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler Hematoksilin- eozinle (HE) ve masson-trikrom boya ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70,%80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo 5)

Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	% 100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirdi. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 4 damla weigert hematoksilen boyası ile 4 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi 4 dakika sonra uzaklaştırıldı. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı 4 dakika bekletilen kesitler distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 10 dakika muamele edildikten sonra uzaklaştırıldı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.(Tablo 6)

Tablo 6: Masson Trikrom boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda Isısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda Isısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:1 + No:2 solüsyonu	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:3	4 dakika
Boyama	No:4	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:5	10 dakika
Boyama	No:6	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

Histolojik Skorlama

Histolojik değerlendirme sonunda yeni oluşan kollajen depozisyonu, yeni kemik laküna oluşumu, kıl folikülü oluşumu ve yağ-ter bezi oluşumu skorlanarak kaydedildi. Skorlama yöntemi olarak Heiple ve arkadaşlarının sunduğu, Lane ve Sandhu'nun modifiye ettiği histopatolojik skorlama sistemi kullanıldı.⁷⁹(Tablo 7)

Tablo 7: Histolojik skorlama tekniği

Yeni Oluşum	Skor
Yok	0
Hafif değişiklik	1
Orta değişiklik	2
Yaygın değişiklik	3

5.4.2 Radyolojik Değerlendirme

Deneklere yapılan kuyruk distal-uç amputasyon bitiminde ve rejenerasyon için beklenen 6 haftalık sürenin bitiminde uzamay göstermek amacıyla ön-arka düzlemde direkt grafi çekildi. Grafler *Selenia Hologic* Kvp 20-40, Mas 4-450 aralık değerlere sahip mamografi cihazında çekildi. Radyolojik inceleme sırasında deneklere Ketamin –Xylazin ile anestezi verildi. Her denek numaralandırıldı. Denekler supin pozisyona yatırılarak kuyruk ön-arka uygun pozisyona getirilerek görüntülendi.

5.4.3 İstatiksel Değerlendirme

Histomorfolojik değerlendirmede; oluşan yeni epitelin kalınlığı, yeni oluşan kollajen depozisyonu, yeni kemik lakünaları, kıl folikülü oluşumu, yağ-ter bezi oluşumu incelenmiştir. Bu parametreler skorlanarak istatistiksel olarak anlamlılığı SPSS 15.0 programında incelenmiştir. Dört çalışma grubunun kendi arasında karşılaştırılması amaçlı ikili gruplar halinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

6. BULGULAR

6.1 Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

6.1.1 Makroskobik Bulguların Değerlendirme Bulguları

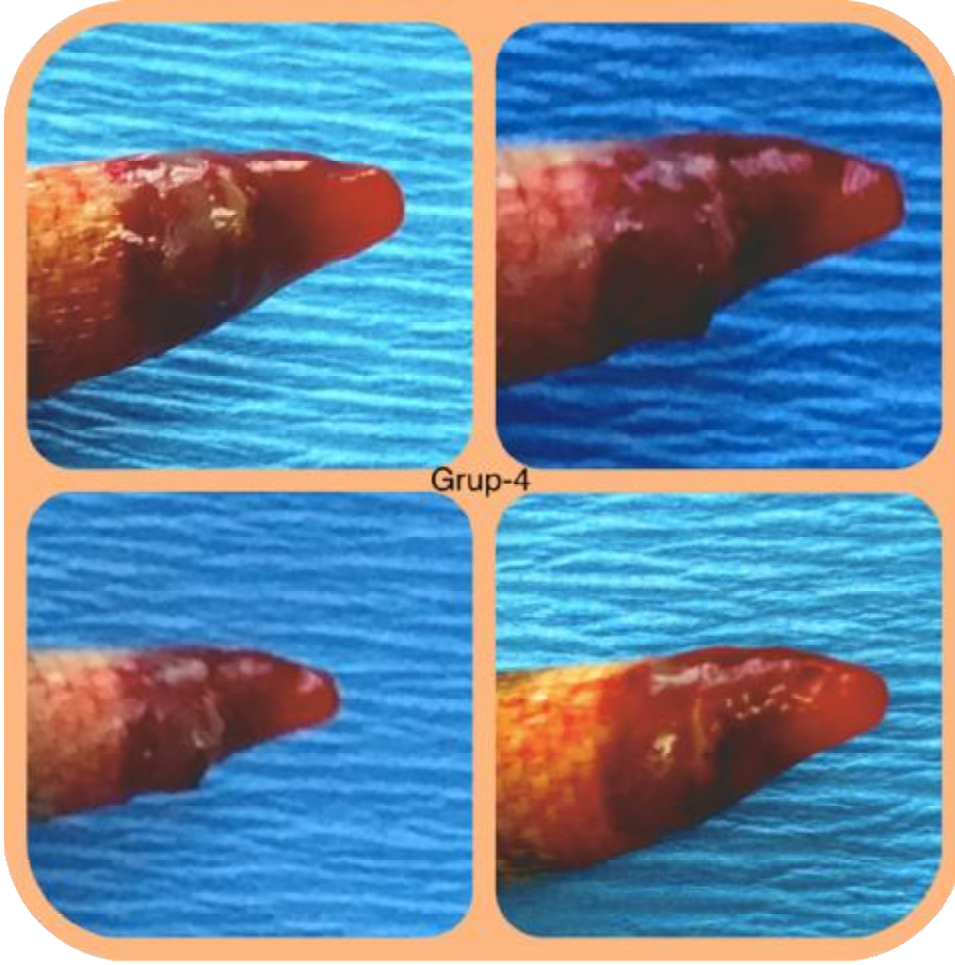
Kontrol grubunda amputasyon hattında kaudal vertebranın açıkta olduğu ve kemik yapının devital olduğu gözlemlendi. Tüm deneklerde çevre yumuşak dokuda fibrozis ve skar formasyonu izlendi.

Elektrik stimülasyonu grubunda amputasyon hattında totale yakın onarım dokusu görüldü. Ancak doku diğer gruplara göre daha immatür ve hipermik izlendi. Skar dokusu ve bazı odaklarda kıl folikülü formasyonu gözlemlendi.

Sinir büyüme faktörü ve NGF ile Elektrik stimülasyonu gruplarında kemik dokuyu total kaplayan onarım dokusu izlendi. Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında onarım dokusu ile amputasyon hattı sınırlarının kaybolduğu ve kıl formasyonunun oluştuğu görüldü. (*Resim 8-9*)



Resim 8: Makroskobik değerlendirme



Resim 9: Grup-4 makroskobik değerlendirme; Çalışmanın 30. Gününe ait makroskobik bulgular.

6.1.2 Işık Mikroskobik Bulguların Değerlendirme Bulguları

Histokimyasal olarak hematoksilin-eozin ve masson trikrom üçlü boyaları ile boyanan dekalsifiye edilmiş sıçan kuyruk kesitleri ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Hematoksilin–Eozin dokunun genel morfolojisini incelememizi sağlarken, Masson- Trikrom histokimyasal boyası osteoid doku ve kemik matriksini daha ayrıntılı incelememizi sağlar. Bağ dokusu fibrillerinin differensiyal boyama işlemleri, histolojik tekniklerin önemli bir kısmını oluşturur. Dekalsifiye edilmiş kemiğin parafin kesitlerinde genellikle osteoid doku parlak kırmızı ve kemik matriksi mavi boyanmaktadır.

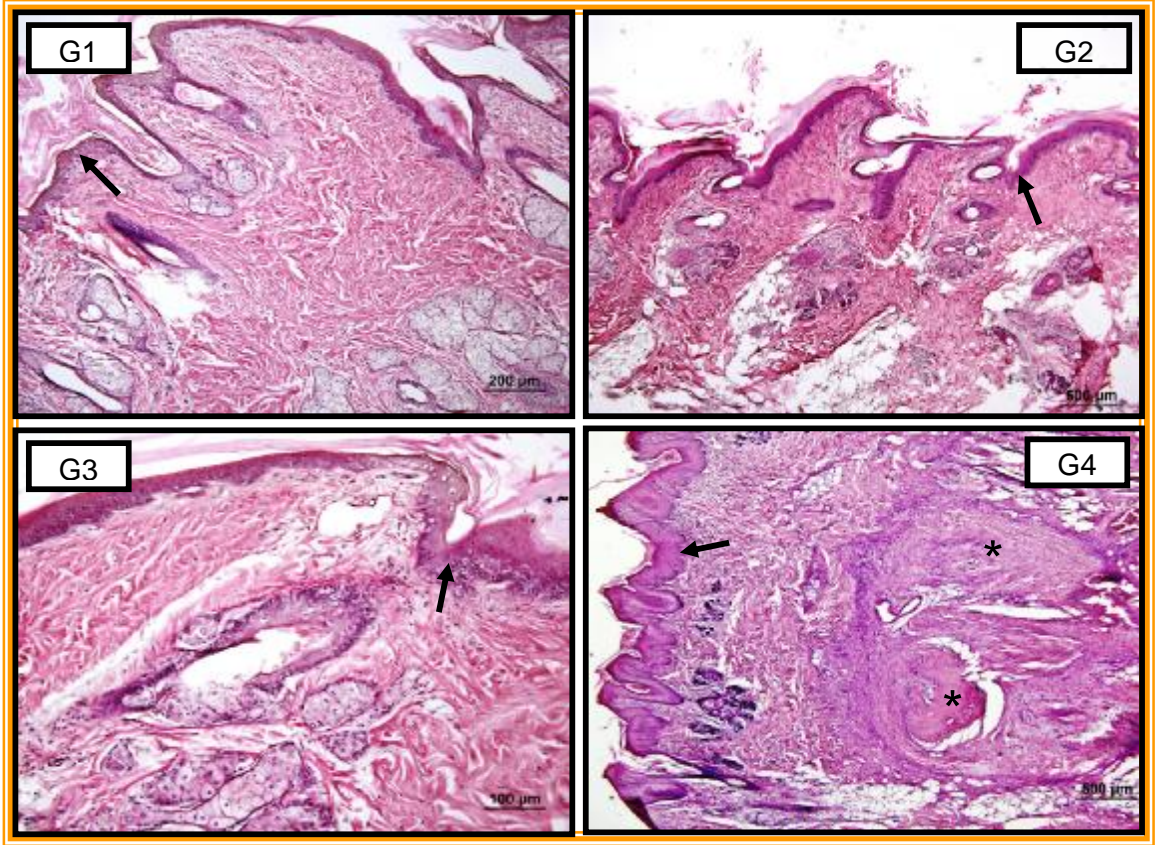
Çalışmada, Hematoksilin-Eozin ve Masson Trikrom ile boyanmış dekalsifiye edilmiş sıçan kuyruk kesitleri değerlendirildiğinde; kontrol grubunda epitel kalınlığının, yeni oluşan

kollajen, kıl folikülü, yağ ve ter bezi oluşum miktarının en az olduğu grup olarak gözlemlendi. Kontrol grubunda yeni kemik oluşumu gözlemlenmedi. (*Resim 10-11-12*)

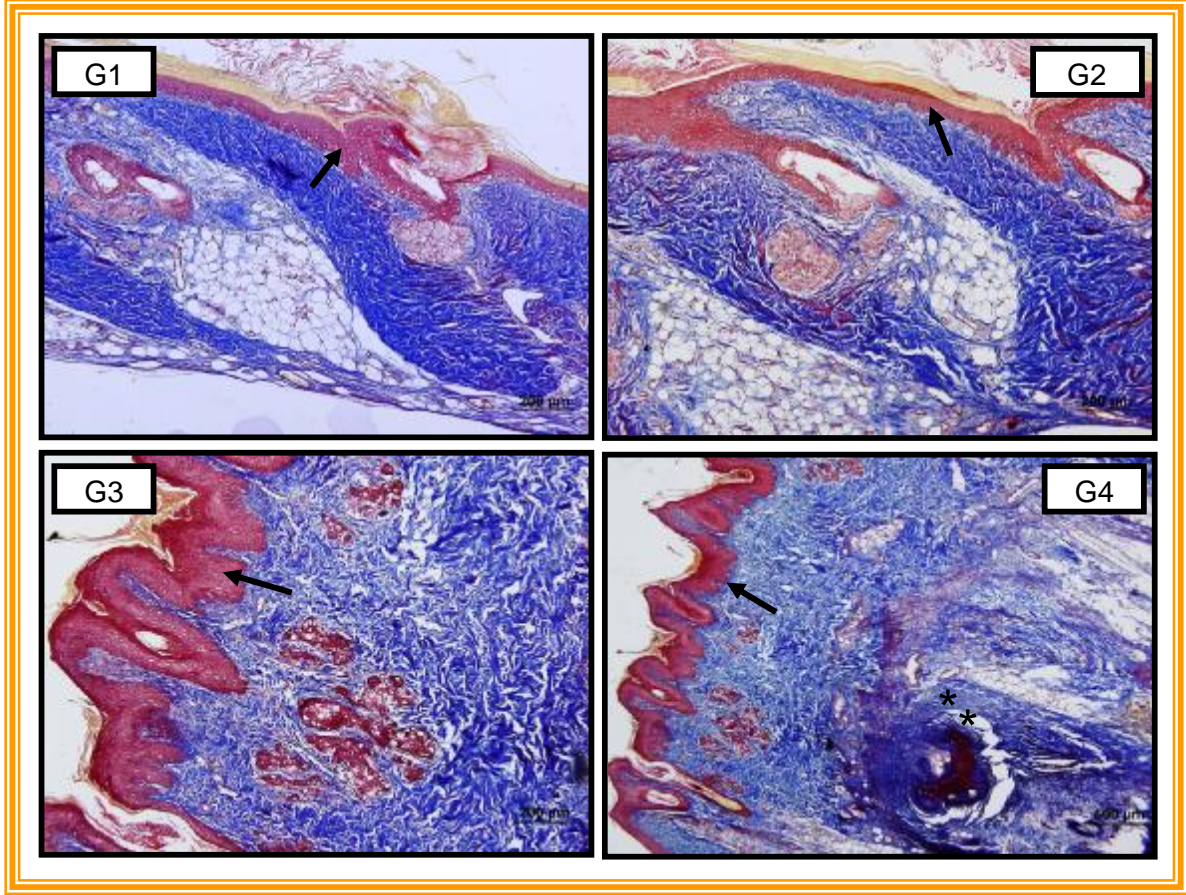
Elektrik stimülasyonu grubunda amputasyon hattında totale yakın iyileşme görüldü. Epitel kalınlığı artmış olarak izlendi. Fibroblast proliferasyonunun ve vaskülarizasyonun yüksek olduğu görüldü. Yeni kıl folikülü ve yağ-ter bezi oluşumu gözlemlendi. Elektrik stimülasyonu grubunda yeni kemik oluşumu gözlemlenmedi. (*Resim 10-11-13*)

Sinir büyüme faktörü grubunda amputasyon hattında kemik yapıyı örten, homojen, total onarım dokusu izlendi. Epitel kalınlığının artmış olduğu izlendi. Distal kaudal vertebrada dekalsifikasyon görüldü. Onarım dokusu periferinde yeni oluşan kıl folikülü ve yağ-ter bezi oluşumu gözlemlendi. (*Resim 10-11-14*)

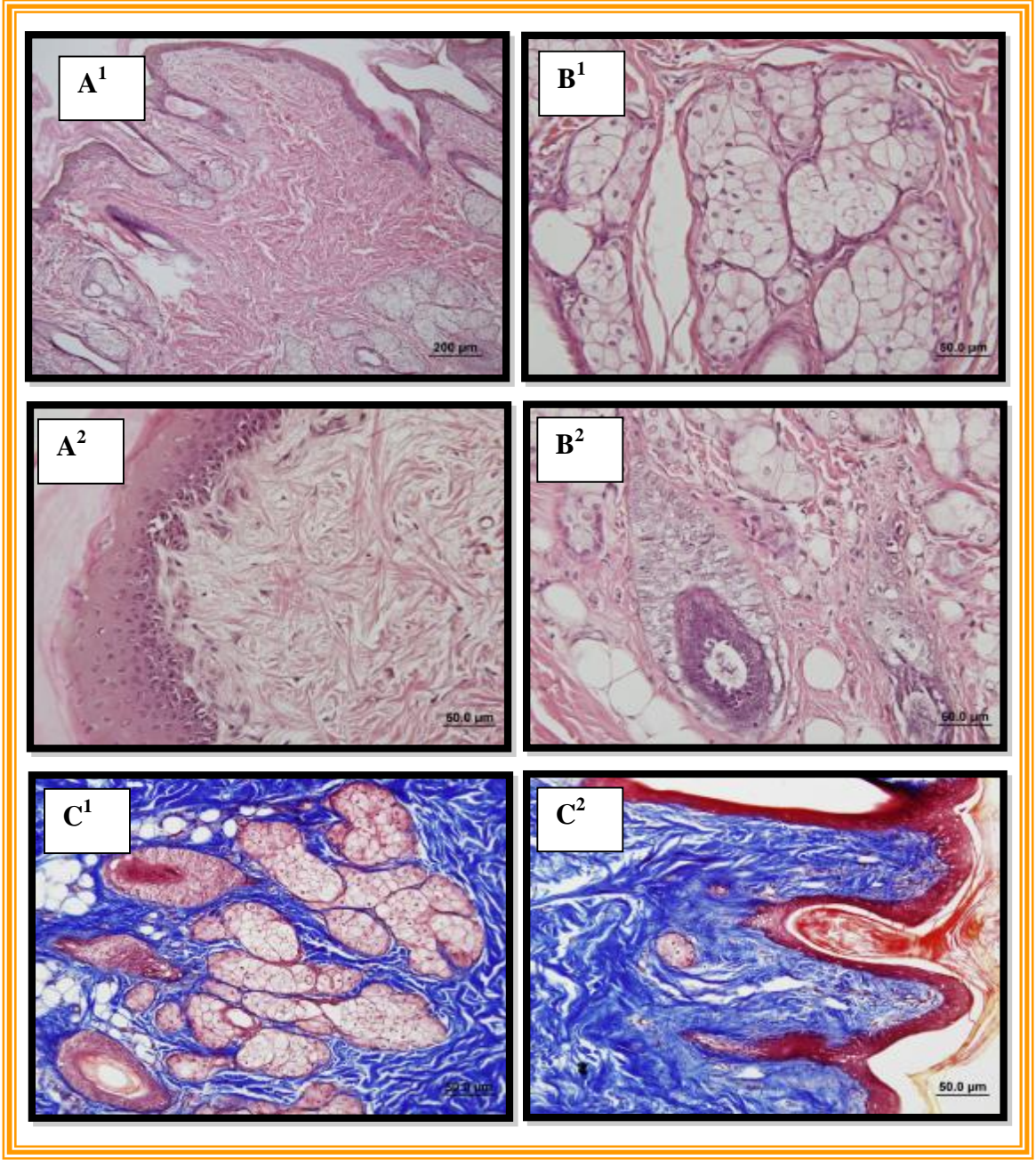
Sinir büyüme faktörü ve elektrik stimülasyonu grubunda amputasyon hattında kemik yapıyı örten, homojen, artmış kalınlıkta total onarım dokusu izlendi. Vaskülarizasyonun ve fibroblast proliferasyonunun arttığı görüldü. Yeni oluşan kollajenin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında artmış kalınlıkta olduğu ve düzenli yerleşim gösterdiği izlendi. Yeni oluşan kemik lakünaları içinde osteoblast formasyonu ve periferinde kondroblast hücre artışı gözlemlendi. Onarım dokusunda diffüz yerleşimli çoklu kıl folikülü içeren üniteler ve yağ-ter bezleri izlendi. (*Resim 10-11-15*)



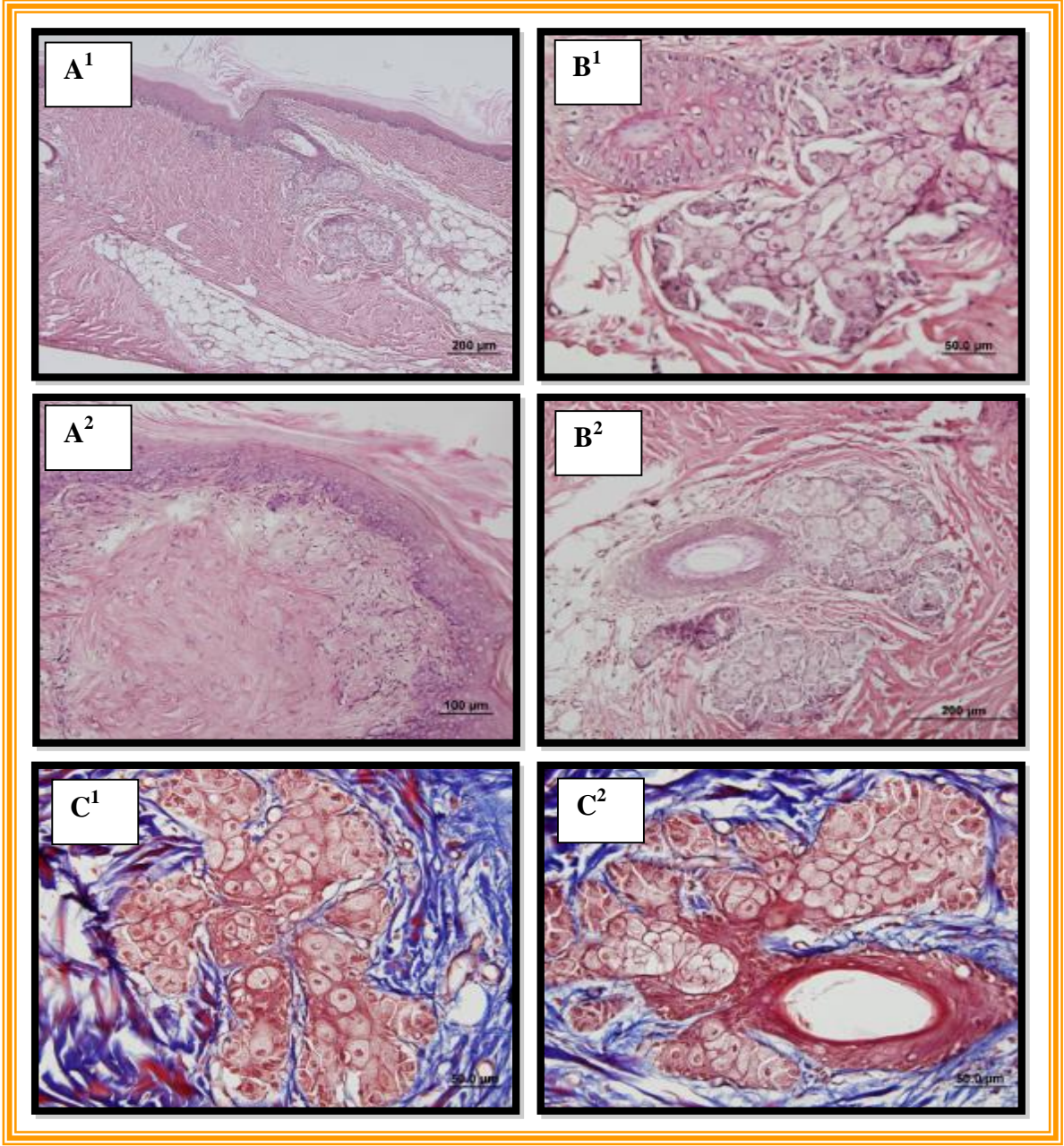
Resim 10: Gruplarda H-E boyama ile ışık mikroskopik bulgular; oklar ile epitel rejenerasyonu, yıldız ile kıl follikülleri ve bez yapılarına ait rejenere olan yapılar gösterilmiştir. Ayrıca yeni oluşan kemik doku (*) ile gösterilmiştir.



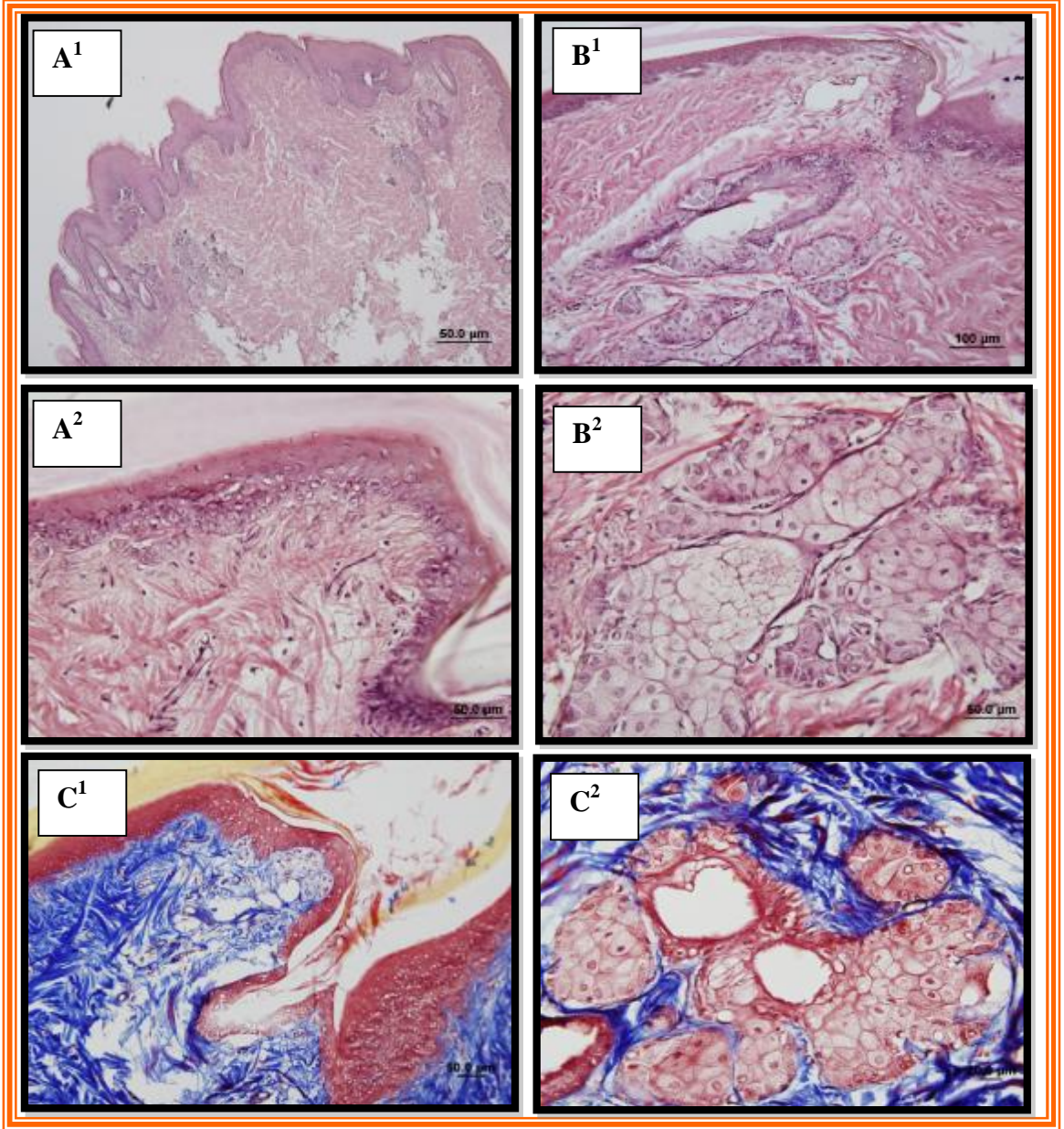
Resim 11: Gruplarda Masson-Trikrom boyama ile ışık mikroskopik bulgular; oklar ile epitel rejenerasyonu, yıldız ile kıl follikülleri ve bez yapılarına ait rejenere olan yapılar gösterilmiştir. Ayrıca yeni oluşan kemik doku (*) ile gösterilmiştir.



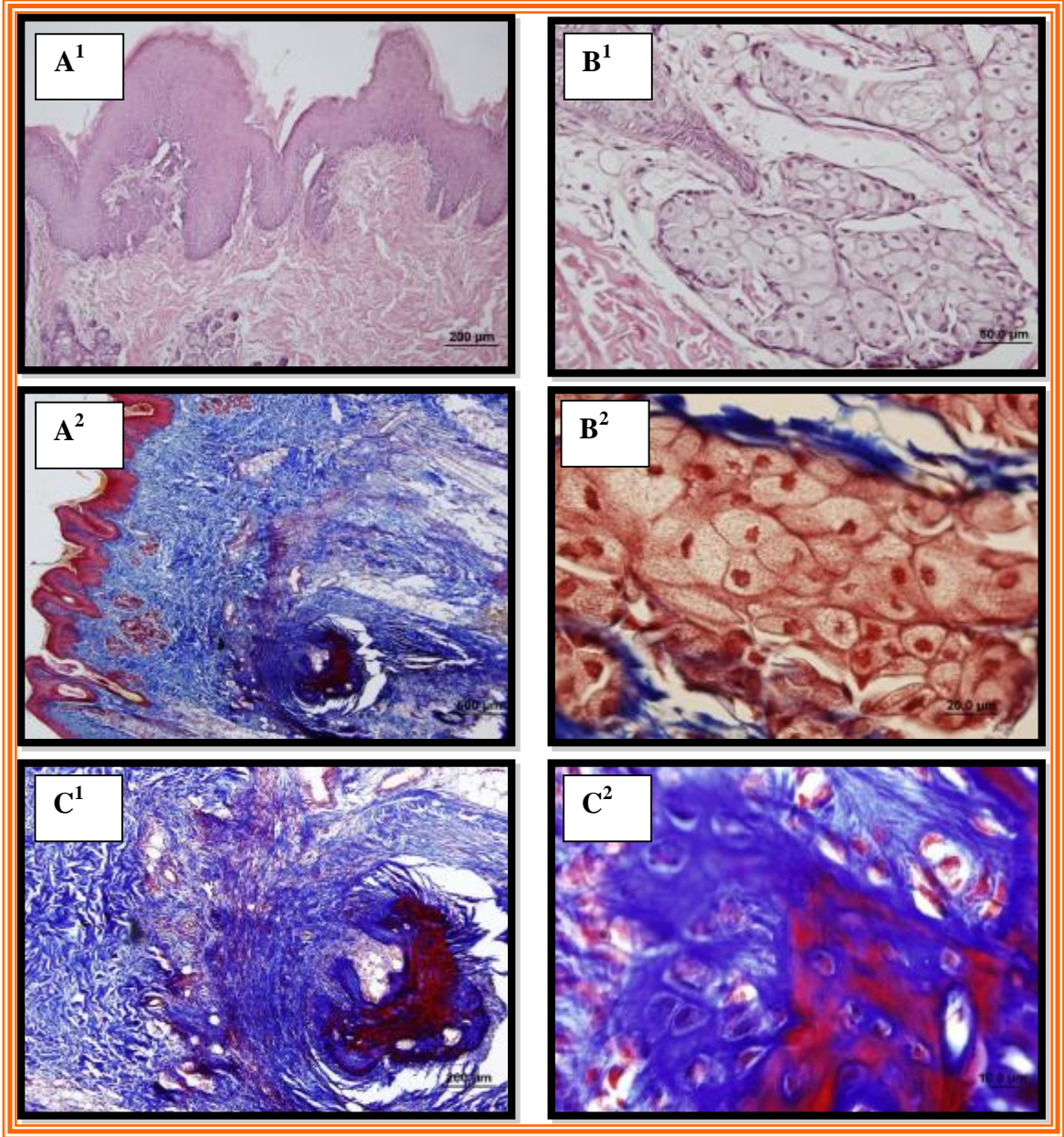
Resim 12: Grup-1 Işık mikroskobik bulgular; **A^{1,2}**:Yeni oluşan epitel yapı H-E boyamada gösterilmiştir **B^{1,2}**:Yeni oluşan yağ-ter bezi yapıları H-E boyamada gösterilmiştir **C^{1,2}**:Masson-Trikrom boyamada yeni oluşan yağ-ter bezi yapıları gösterilmiştir.



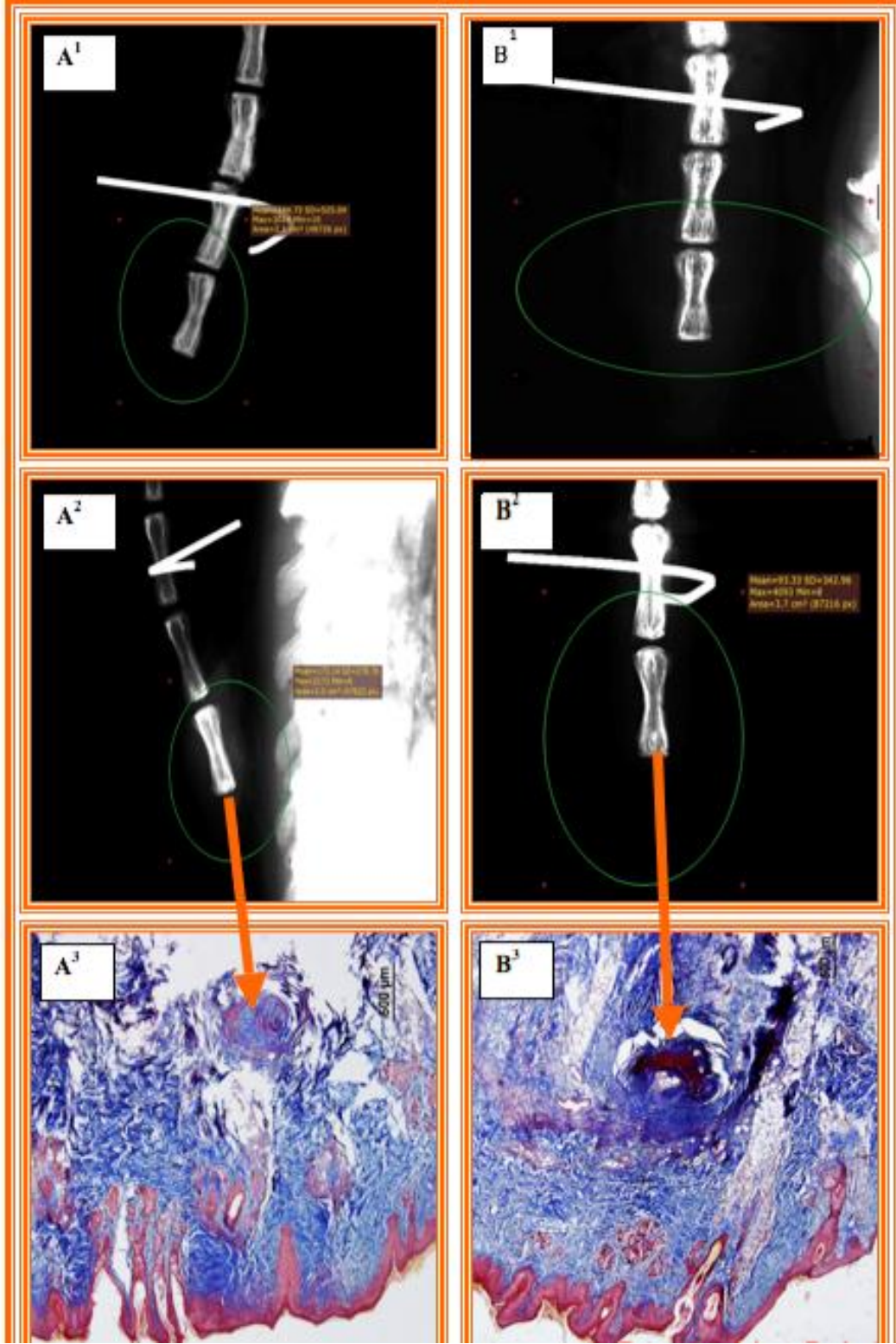
Resim 13: Grup-2 Işık mikroskobik bulgular; A^{1,2}:Yeni oluşan epitel yapı H-E boyamada gösterilmiştir B^{1,2}:Yeni oluşan yağ-ter bezi yapıları H-E boyamada gösterilmiştir C^{1,2}:Masson-Trikrom boyamada yeni oluşan yağ-ter bezi yapıları gösterilmiştir.



Resim 14: Grup-3 Işık mikroskopik bulgular; A^{1,2}:Yeni oluşan epitel yapı H-E boyamada gösterilmiştir B^{1,2}:Yeni oluşan yağ-ter bezi yapıları H-E boyamada gösterilmiştir C^{1,2}:Masson-Trikrom boyamada yeni oluşan yağ-ter bezi yapıları gösterilmiştir.



Resim 15: Grup-4 Işık mikroskopik bulgular; **A^{1,2}**:Yeni oluşan epitel yapı H-E boyamada gösterilmiştir **B^{1,2}**:Yeni oluşan yağ-ter bezi yapıları Masson- Trikrom boyamada gösterilmiştir **C^{1,2}**:Masson-Trikrom boyamada yeni oluşan kemik yapı gösterilmiştir.



Resim 16: Grup-4 Histolojik bulguların radyoloji ile korelasyonu; **A¹, B¹** ;İşlem öncesi radyolojik görüntülemelere aittir. **A²,B²** ; İşlem sonrası radyolojik görüntülemelere aittir. **A³,B³**; Radyolojik görüntülemede olan kemik oluşumları Masson-Trikrom boyamada gösterilmiştir.

Tablo 8: Yeni oluşan epitel kalınlıklarının istatistiksel analizi

Gruplar	Ortalama	Ortanca	Standart sapma
Grup-1	69,2321	64,1300	19,65801
Grup-2	80,7929	77,5100	12,93634
Grup-3	67,0608	68,3000	6,26663
Grup-4	84,4031	84,3300	9,58559

Tablo 9: Yeni oluşan kemik skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi

Gruplar	Ortalama	Ortanca	Standart sapma
Grup-1	0,0000	0,0000	0,00000
Grup-2	0,0000	0,0000	0,00000
Grup-3	0,3333	0,0000	0,51640
Grup-4	1,3333	1,0000	0,51640

Tablo 10: Yeni oluşan kıl folikülü skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi

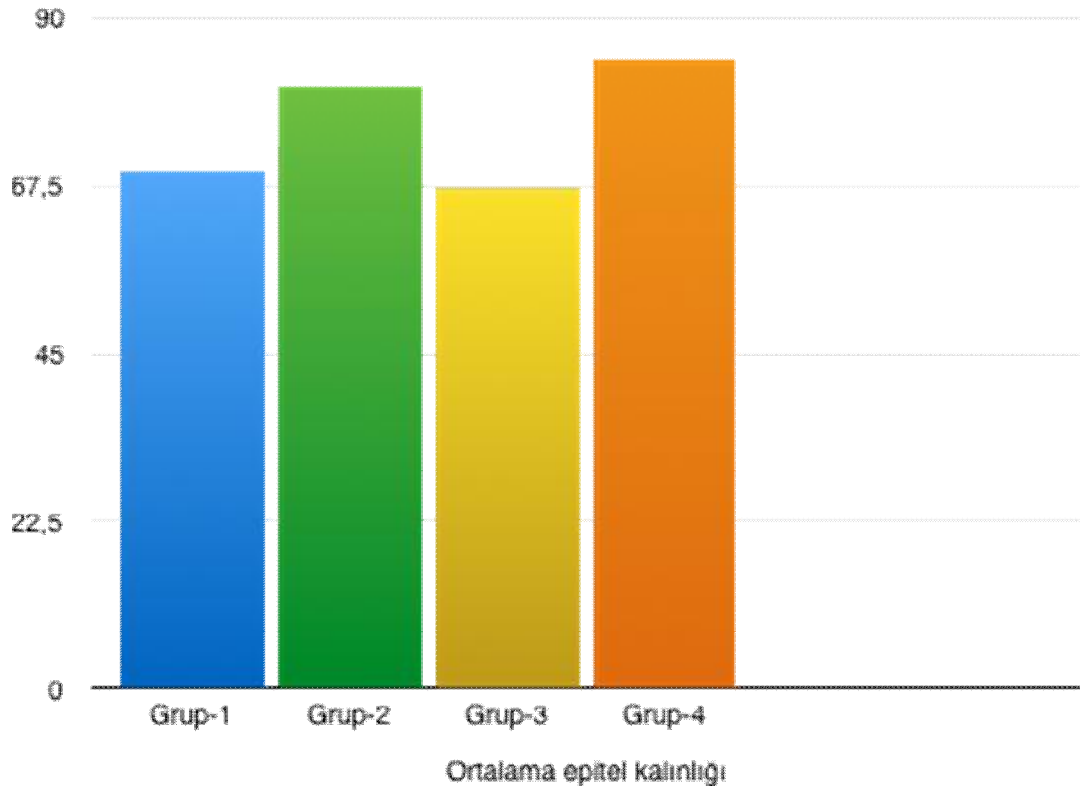
Gruplar	Ortalama	Ortanca	Standart sapma
Grup-1	2,5000	2,5000	0,54772
Grup-2	2,6667	3,0000	0,51640
Grup-3	2,6667	3,0000	0,51640
Grup-4	3,0000	3,0000	0,00000

Tablo 11: Yeni oluşan yağ-ter bezleri skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi

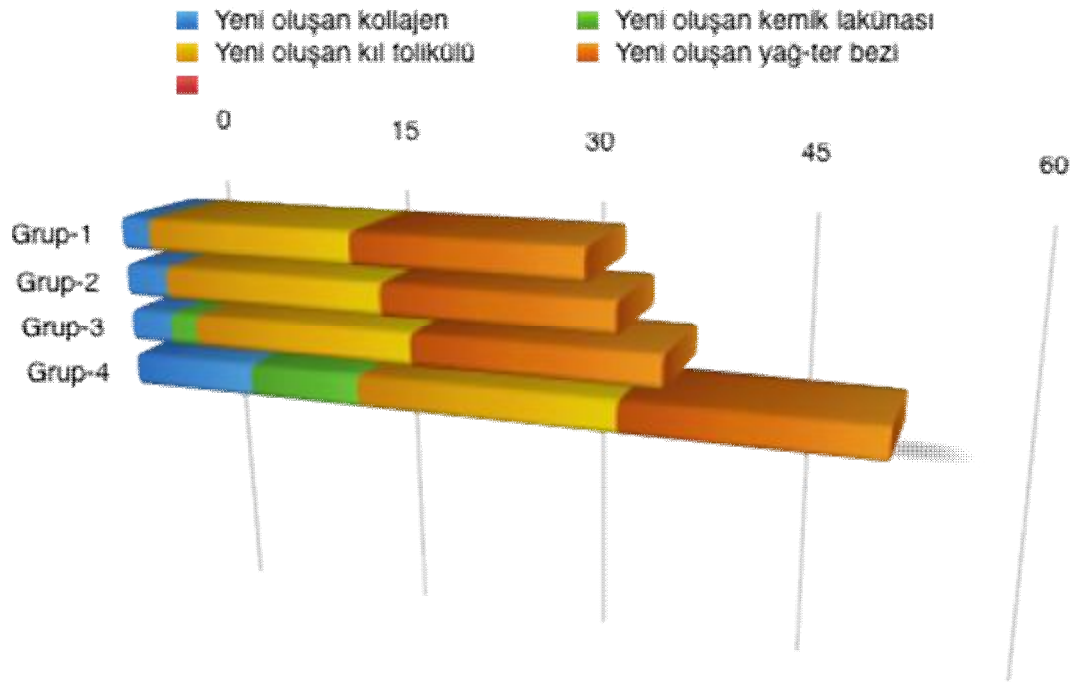
Gruplar	Ortalama	Ortanca	Standart sapma
Grup-1	2,6667	3,0000	0,51640
Grup-2	2,6667	3,0000	0,51640
Grup-3	2,8333	3,0000	0,40825
Grup-4	2,8333	3,0000	0,40825

Tablo 12: Histolojik Skorlama Sonuçları

Gruplar	Yeni oluşan kollajen	Yeni oluşan kemik lakünaları	Yeni oluşan kıl folikülü	Yeni oluşan yağ-ter bezi
GRUP 1 -1	1	0	2	2
GRUP 1 -2	0	0	3	3
GRUP 1 -3	0	0	3	3
GRUP 1 -4	0	0	2	3
GRUP 1 -5	1	0	3	3
GRUP 1 -6	0	0	2	2
GRUP2 -1	1	0	3	3
GRUP2 -2	0	0	2	2
GRUP2 -3	0	0	3	3
GRUP2 -4	1	0	3	3
GRUP2 -5	0	0	2	2
GRUP2 -6	1	0	3	3
GRUP 3-1	1	0	3	3
GRUP 3-2	0	0	2	2
GRUP 3-3	1	0	3	3
GRUP 3-4	0	0	3	3
GRUP 3-5	1	1	2	3
GRUP 3-6	0	0	3	3
GRUP 4-1	2	2	3	3
GRUP 4-2	1	1	3	2
GRUP 4-3	2	2	3	3
GRUP 4-4	2	1	3	3
GRUP 4-5	1	1	3	3
GRUP 4-6	1	1	3	3



Şekil 10: Ortalama epitel kalınlığının gruplara göre dağılımı



Şekil 11: Histopatolojik inceleme sonuçlarının gruplara göre dağılımı

Dört alt grup ışık mikroskopik değerlendirmede elde edilen epitel kalınlıkları açısından değerlendirildi. Mann Whitney U testi ile Grup 1 ve 2, Grup 1 ve 3 , Grup 1 ve 4, Grup 2 ve 3, Grup2 ve 4, Grup 3 ve 4 kendi arasında karşılaştırıldı.Yapılan karşılaştırma sonunda; en anlamlı fark elektrik stimülasyonu ve NGF uygulanan Grup-4 ile kontrol grubu olan Grup-1 arasında bulundu.($p < 0,05$ ($p = 0,000$)) Kontrol grubu olan Grup-1 ile elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunurken ($p = 0,000$), NGF verilen Grup-3 ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı.($p = 0,39$) Elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ile elektrik stimülasyonu ve NGF verilen Grup-4 karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu.($p = 0,046$) Elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ile elektrik stimülasyonu ve NGF verilen Grup-3 karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu.($p = 0,000$) Elektrik stimülasyonu ve NGF verilen Grup-4 ile NGF verilen Grup-3 karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu.($p = 0,000$)

Dört alt grup ışık mikroskopik değerlendirmede elde edilen yeni kollajen oluşumu, yeni kemik oluşumu, kıl folikülü ve yağ-ter bezi oluşumu skora sonuçları değerlendirildi. Mann Whitney U testi ile Grup 1 ve 2, Grup 1 ve 3 , Grup 1 ve 4, Grup 2 ve 3, Grup2 ve 4, Grup 3 ve 4 kendi arasında karşılaştırıldı.Yeni oluşan kıl folikülü ve yağ-ter bezi oluşumu açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi.Yeni oluşan kollajen depozisyonu skora sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldığında; en anlamlı fark elektrik stimülasyonu ve NGF uygulanan Grup-4 ile kontrol grubu olan Grup-1 arasında bulundu.($p < 0,05$ ($p = 0,011$)) Yeni kollajen oluşumu skora sonuçları kontrol grubu olan Grup-1 ile elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ($p = 0,575$) ve NGF verilen Grup-3 ($p = 0,575$) karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. Elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ile NGF verilen Grup-3 karşılaştırıldığında yeni kollajen oluşumu açısından anlamlı fark görülmedi.($p = 1,00$) Elektrik stimülasyonu ve NGF uygulanan Grup-4 ile elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ($p = 0,019$) ve NGF verilen Grup-3 ($p = 0,019$) karşılaştırıldığında anlamlı farklar görüldü. Yeni oluşan kemik formasyonu skora sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldığında; en anlamlı fark elektrik stimülasyonu ve NGF uygulanan Grup-4 ile kontrol grubu olan Grup-1 arasında bulundu.($p < 0,05$ ($p = 0,002$)) Yeni kemik oluşumu skora sonuçları kontrol grubu olan Grup-1 ile elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ($p = 1$) ve NGF verilen Grup-3 ($p = 0,138$) karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. Elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ile NGF verilen Grup-3 karşılaştırıldığında yeni kemik oluşumu açısından anlamlı fark görülmedi.($p = 0,138$) Elektrik

stimülasyonu ve NGF uygulanan Grup-4 ile elektrik stimülasyonu verilen Grup-2 ($p=0,002$) ve NGF verilen Grup-3 ($p=0,014$) karşılaştırıldığında anlamlı farklar görüldü.

6.2 Radyolojik Değerlendirme Bulguları

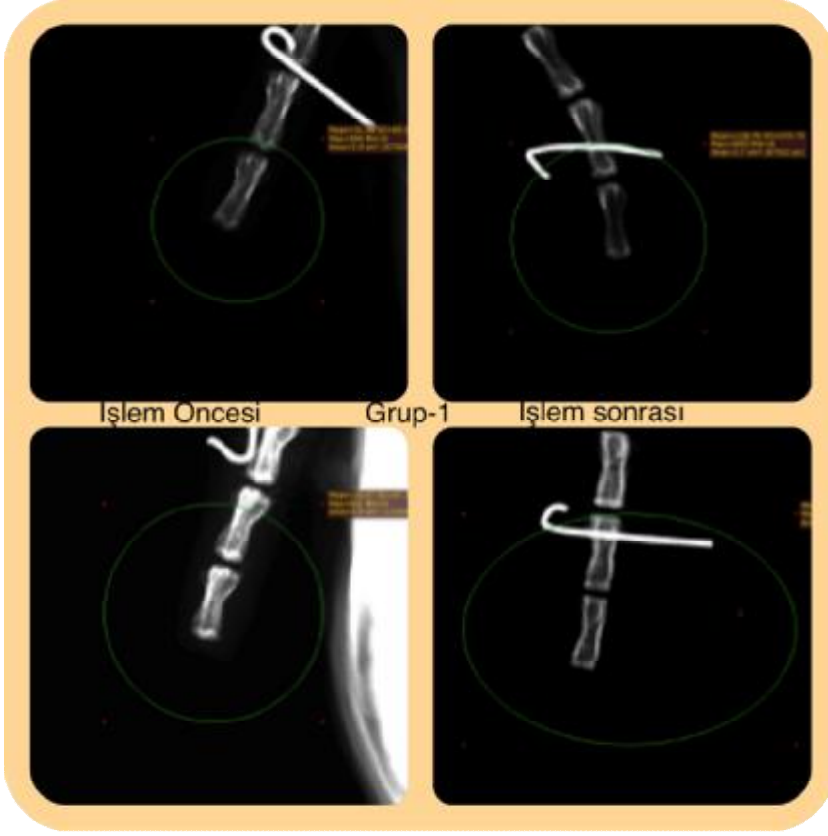
Denekler çalışmanın 0.ve 42. günlerde supin pozisyona yatırılarak kuyruk ön-arka uygun pozisyona getirilerek *Selenia Hologic* mamografi cihazı ile görüntüledi. Radyolojik değerlendirme sonuçları histopatolojik değerlendirme sonuçları ile korele edilerek yorumlandı.

Kontrol grubunda kemiklerde yaygın osteoporoz ve korteks netliğinde azalma gözlemlendi.(*Resim 17*)

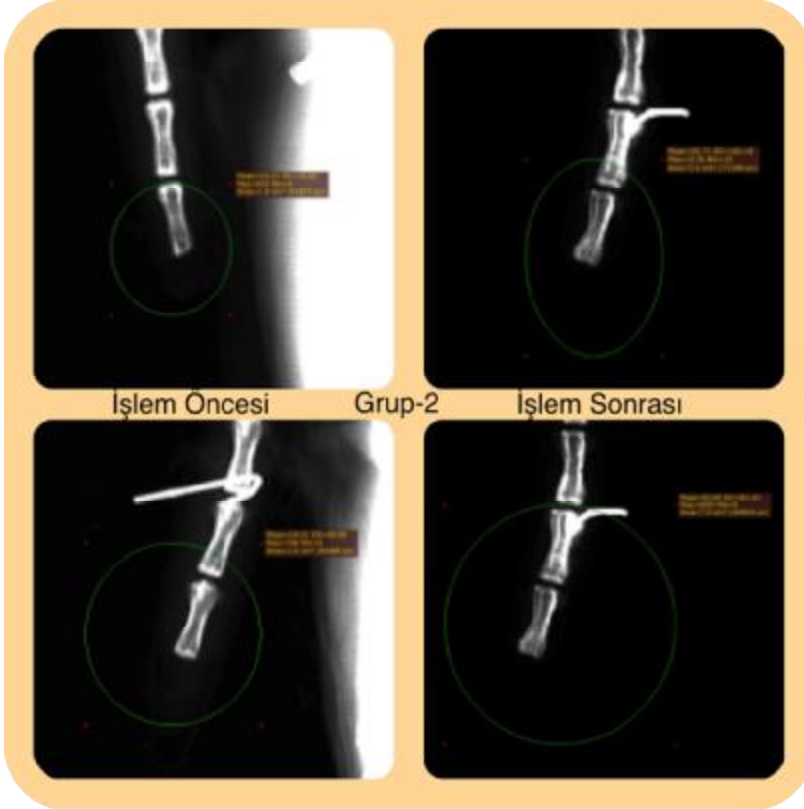
Elektrik stimülasyonu uygulanan grupta 0. ve 42. gün görüntüleri karşılaştırıldığında yaygın osteoporozla ilave olarak trabekülyasyonda artış gözlemlendi. Kemik distal uçta kallus formasyonu izlendi.(*Resim 18*)

Sinir büyüme faktörü uygulanan grupta 0. ve 42. gün görüntüleri karşılaştırıldığında yaygın osteoporozla ilave olarak kemik distal uçta kallus formasyonu izlendi.(*Resim 19*)

Sinir büyüme faktörü ve elektrik stimülasyonu uygulanan grupta 0. ve 42. gün görüntüleri karşılaştırıldığında kemik distal uçta kallus formasyonuna ilave olarak yeni kemik gelişim odakları, Ca çökme alanları izlendi.Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında kallus formasyonunda vertikal ve horizontal yönde asimetrik dağılım izlendi.(*Resim 20*) Histopatolojik değerlendirme sonuçları ile korele edildiğinde kemik rejenerasyonu lehine bulgulara ulaşıldı.(*Resim 16*)



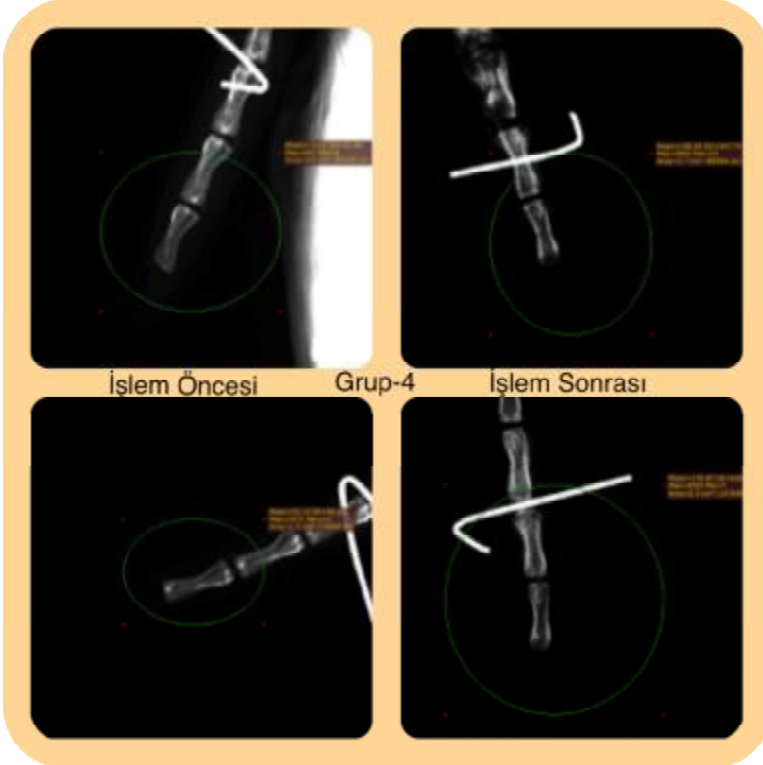
Resim 17: Grup-1 Radyolojik değerlendirme bulguları



Resim 18: Grup-2 Radyolojik değerlendirme bulguları



Resim 19: Grup-3 Radyolojik değerlendirme bulguları



Resim 20: Grup-4 Radyolojik değerlendirme bulguları

7.TARTIŞMA

İnsanlarda morbidite ve mortaliteye sebep olan hastalıkların büyük çoğunluğu, organ veya dokuların kaybına veya işlevselliklerinin yitirilmesine bağlıdır. Travma, cerrahi, malignensi, enfeksiyon veya enflamatuvar süreçler gibi edinsel nedenler ile ya da konjenital olarak gelişen doku kayıplarının tedavisinde otolog doku transplantasyonu günümüzde uygulanan tedavi seçeneğidir. Bazı durumlarda gerek donör alan morbiditesi, gerekse işlevsel kayıplar nedeni ile bu tedavi yetersiz kalır. Rekonstruktif cerrahide doku kayıplarını benzer dokular ile onarmak her ne kadar iyi bir tedavi seçeneği gibi görünse de bazı dokuların fonksiyonu tam olarak geri dönmez. Özellikle birden fazla dokudan oluşan kompozit kayıpların fonksiyonel rekonstrüksiyonu plastik cerrahinin zorlu ve gelişime açık uğraşı alanıdır.

Doku rejenerasyonu kertenkele, deniz yıldızı, planarya gibi canlılarda gerçekleşebilirken üst düzey omurgalılarda rejenerasyon kapasitesi kısıtlıdır.⁵ Rejenerasyon kapasitesinin memelilerde arttırılabilmesinin; kemik, kırık, sinir, kas ve özellikle kompozit dokuların kayıplarında yenilikçi çözümler getireceği düşünülmektedir. Bu nedenle kompozit doku rejenerasyonuna yönelik kertenkele , planarya ve semenderlerde yapılan çalışmalar, daha üst düzey vertebralı olan farelerde denenmiş olup memelilerde rejenerasyonu arttırma hedefi ile devam etmektedir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde kertenkele ve semenderlerin rejenerasyonun temel basamaklarını örneklemek için kullanıldığını görmekteyiz.⁵ Sinir rejenerasyonu, kas, kemik ve kırık dokunun rejenerasyonu üst düzey vertebralılarda da çalışılmasına rağmen kompozit doku rejenerasyonu ile ilgili sınırlı çalışma bulunmaktadır. Üst düzey vertebralılarda kompozit doku rejenerasyonunda ise ilk olarak fareler kullanılmıştır. Farelerde yaratılan ekstremitte distal amputasyon modeli üzerinde gerçekleştirilen rejenerasyon çalışmaları memelilerde kompozit doku rejenerasyonu özellikle ekstremitte amputasyonlarında yol gösterici olmuştur. Sıçanların filogenetik olarak daha gelişmiş olması, anesteziye dayanıklılığının yüksek olması, doku miktarının fazla olması nedeni ile bu çalışmada deney hayvanı olarak sıçan tercih edildi. Çalışmalar farelerin ön veya arka ayakları üzerinde parmağın orta falanks orta seviyesinden amputasyon modelinde yürütülmüştür.⁸⁰ Çalışmamızda ekstremitte amputasyon modelinin plastik cerrahi uygulamaları hedef alanında olması nedeni ile kliniğe uygulanabilir olduğu düşünüldü. Çalışmamızda doku miktarının

fazla olması, hayvanların mobilite ve besine ulaşımını daha az engellemesi ve aynı şekilde kemik, kıkırdak, sinir , yumuşak doku ve deri kompozisyonundan oluşması nedeni ile sıçan kuyruk amputasyon modeli üzerinde çalışıldı.

Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda yaşları 2-6 ay aralığında olan hayvanlar kullanılmıştır. Çalışmalar göz önünde bulundurularak 2-6 ay yaş aralığında (280-300 gr) sıçanlar kullanıldı.⁸⁰ Dişi sıçanlarda rejenerasyon kapasitesinin erkek sıçanlara oranla daha yüksek olması nedeni ile çalışma erkek sıçanlar üzerinde yürütüldü.⁸⁰ Kuyruk uzunluk ve kalınlığının yeterli doku içeriğini karşılaması nedeni ile Sprague Dawley suşu tercih edildi.

Vertebralılarda ekstremite rejenerasyonu kertenkelelerde, amfibilerde ve farelerde çalışılmış olup⁸¹ parmak distal uç amputasyon modelleri ise farelerde⁸² ve maymunlarda⁸³ çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar amfibilerde tam ampute ekstremitenin 30 gün içinde total rejenerasyonu farelerde ise kapasitenin sınırlı olduğunu ve rejenerasyonun distal uçlarda tamamlanabildiğini göstermiştir. Kertenkeleler ve amfibilerde gerçekleşen bu epimorfik rejenerasyon; farklı dokular içermesi, doğru oryantasyonda ve pozisyonda gerçekleşmesi nedeni ile rejenerasyonun temeli kabul edilip, örnek teşkil etmiştir.⁸⁴

Üst düzey vertebralılarda olan bu spesifik ve limitli rejenerasyonu sağlamak için mitotik aktivitesi yüksek hücrelere ve bu hücreleri proliferatif edip yönlendirecek sinyal yollarına ihtiyaç vardır.⁴ Rejenerasyon için gerekli mitotik aktif hücreler yara iyileşmesi sürecinde açığa çıkar ve yine rejenerasyon için gerekli olan sinyaller ile diferansiyasyon olur ve rejenerasyon tamamlanır. Eğer yara iyileşmesi sürecini başlatıp devamlılığını sağlayabilirsek ve diferansiyasyon olan mitotik aktif hücreleri sinyal yolları üzerinden yeniden diferansiyasyon edebilirsek rejenerasyon gerçekleşebilecektir. Bu nedenle çalışmamızda hedefimizi yara iyileşmesini devam ettirebilmek ve her üç germ yaprağını da etkileyebilecek sinyal molekülleri ile rejenerasyonu sağlamak olarak belirledik.

Çalışmamızda yara iyileşme sürecini desteklemek ve devam ettirmek amaçlı elektrik stimülasyonu kullanmayı seçtik. Elektrik stimülasyonu eski Yunan ve Roma döneminde kullanılmaya başlanan, hücre proliferasyonu ve vaskülarizasyonu artırması ve enfeksiyonu, inflamasyonu baskılaması nedeni ile yara iyileşmesi tedavisinde kullanılmakta olan bir yöntemdir. Dışarıdan verilen elektrik akımı ile yaralanma sonucu devamlılığı bozulan biyoelektrik sistemi taklit prensibine dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda direk akım altında hücre hareket ve yönelim kapasitesinde artma ve hücre oryantasyonunda hızlanma gözlenmiştir. Bu etki normalde olan elektriksel alan taklit edilerek sağlanmıştır.⁶⁶ Ayrıca

elektrik stimülasyonu yaralanmış dokuya olan nötrofil, makrofaj ve uyarılmış fibroblast göçünü arttırır. Endotelial hücre ve fibroblastların “doubling-time” kısaltır ve” p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinaz” aktivasyonu ile hücre proliferasyonunu arttırır.⁶⁸

Bassett ve Herrmann fibroblast kültürlerine uyguladıkları 1000 V/cm devamlı elektrik akımı ile 14. günde DNA ve kollajen sentezinde %20 artış elde etmişlerdir.⁸⁵ Bourignon ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada fibroblast hücre kültürlerinde uygulanan yüksek doz pulsed akım (HVPC) uygulaması ile fibroblastlarda DNA ve kollajen sentezinde %160 artış kaydetmişlerdir. Elektrik akımı 50-75 V saniyede 100 pulse olarak uygulanmıştır. Uygulamanın ikinci saniyesinde fibroblastlarda Ca alımının artmasına ilave olarak insülin reseptör sayısında da artış görülmüştür. Ortama insülin eklendiğinde ise Ca alımında artma ve DNA , protein sentezinde ikinci bir artış gözlenmiştir.⁸⁶ Falanga ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elektrik stimülasyonu ile insan dermal fibroblast kültürlerinde TGF- β reseptörlerinde artış elde edilmiştir. Transforme edici büyüme faktörü- β kollajen sentezinde oynadığı önemli rol nedeni ile artışı DNA ve protein sentezini arttırmıştır.⁸⁷ Cheng ve arkadaşları ise sıçan cildinde uyguladıkları mikroamper düzeyinde direk akım ile protein sentezi etkilerini gözlemlemişlerdir. 100-500 μ A direk akım uygulandığında aminoasit alımı %30-40 artmakta ve 50 μ A ile maksimum protein sentezi gerçekleşmektedir.^{88,89}

Sonuçta in-vitro elektrik akımı uygulama çalışmalarında görülmüştür ki; hücre yüzeyinde yerleşim gösteren Ca kanalları, insülin reseptörleri ve TGF β reseptörleri etkilenerek DNA sentezi, kollajen sentezi ve fibroblast proliferasyonu arttırılmaktadır.

Kloth ve arkadaşları 2005 yılda yaptıkları derlemede, bildirilen en dikkat çekici yanıtı direk akım (DC) ile tedaviyi takiben çekme direncinde bir artış olduğudur. Diğer çalışmalar kollajen depolanması ile birlikte yara fibroblast proliferasyonunun artış gösterdiğidir. Araştırmacılar anotda katotdan daha hızlı epitelizasyonun geliştiğini bildirmişlerdir. Diğer çalışmalar da katodal elektrik stimülasyonunun mikrodamarlardan gelen makromoleküler kaçağı engelleyerek ödem oluşumunu sınırladığını göstermişlerdir.⁹⁰

Elektrik stimülasyonu kolonize ya da enfekte yaralarda bakteriyostatik ya da bakterisidal etki göstermektedir. Miliamper şiddetinde alternatif akım ya da mikroamper şiddetinde direk akım ile antibakteriyel etkiyi sağlamak mümkündür.

Rowley ve arkadaşları tavşanlarda olan kutanöz yaralarda yaptıkları çalışmada 1 mA şiddetinde 72 saat uygulanan direk akım ile *Pseudomonas Aeruginosa* enfeksiyonunda bakteriyostatik etki sağlamışlardır.⁹¹ Barranco ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 0.4, 4, 40 ve 400 µA şiddetinde direk akım ile *Staphylococcus Aureus* çoğalmasının inhibe edilebildiği gösterilmiştir.⁹² Kincaid ve Lavoie bakterisidal etkinin; akımın organizmalar üzerinde yaptığı direk etki, antimikrobiyal faktörlerin elektroforetik hareketi, lokal ısınma ve pH değişiklikleri ile olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca antibiyotik etki elektrik alanın biyofilm tabakasını uzaklaştırması ile de ilişkilidir.^{93,94}

Kloth ve arkadaşları yaptığı derlemede, direk akım uygulanarak yapılan çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada yaygın yara patojenlerinin çoğalmasının inhibe olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda bakteri yükünün azaltılması amacıyla yaralara gümüş emdirilmiş pansumanlar kullanılması, anodal direk akım ile tedavi edilen yaraların içine aktif olarak gümüş iyonların geçişini kolaylaştırarak bu tür sargıların etkinliğini artırabileceğini düşünmüşlerdir.⁹⁰

Elektrik stimülasyonu perfüzyonu artırır ve bunu vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınım artışını takiben VEGF ekspresyon artışı ile sağlar.

Klinikte Junger ve arkadaşları tarafında kronik venöz ülseri olan hastalarda yapılan çalışmada; monofazik darbeleri akım 630 µA ve 315 µA şiddetlerinde uygulanmıştır. Çalışma sonunda kapiller dansite, doku oksijenizasyonu ve cilt perfüzyonu değerlendirilmiştir. Bazı 8,05 kapiller /mm² dansite olan stimülasyon sonunda 11,55 kapiller /mm² ulaşmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Doku oksijenizasyonunun 13,5 mmhg dan 24,7 mmhg' a yükseldiği, lazer doppler flowmetri ile ölçülen doku perfüzyonun da arttığı gösterilmiştir.⁹⁵ Greenberg ve arkadaşlarının domuzlarda yanık modelinde yaptığı çalışmada ise darbeleri direk akım uygulaması sonucu epitelizasyona ilave olarak neovaskülarizasyon görülmüştür.⁹⁶

Doku onarımında, yara iyileşmesinde hücrelerin normal ve yeterli aktivite gösterebilmeleri için oksijene ihtiyaçları vardır. Yeterli oksijen aynı zamanda nötrofil bağımlı oksidatif hücre ölümü ile de ilişkili olup hipoksik ortamlarda gelişen enfeksiyon tablosu bu süreç ile ilişkilidir.

Gagnier ve arkadaşları 30 spinal kord yaralanması olan hastada uyguladıkları elektrik stimülasyonu ile ortaya çıkan perkütan oksijen basınç artışlarını anlamlı olarak değerlendirmişlerdir.⁹⁷ Mawson ve arkadaşları sakral bası yarası olan spinal kord yaralanmalı hastalarda yaptıkları elektrik stimülasyonu çalışmalarında transkutanöz oksijen basıncında

artma ve dolayısıyla perfüzyonda artma kaydetmişlerdir.⁹⁸

Hücreler yüzey polariteleri ile ilişkili olarak yara iyileşmesi sürecinde elektrik alanında zıt kutuba doğru hareket ederler ki buna galvonataksis denir. Eberhardt ve arkadaşları cilt yüzeyinden uygulanan elektrik stimülasyonu ile 6 saatte 500 nötrofilin %69'unun galvonotaktik hareket yaptığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % 24 lük farkın anlamlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.⁹⁹ Mertz ve arkadaşları yedi günde iki seanslık 30 dakika monofazik elektrik stimülasyonunun epidermal hücre migrasyonunu arttırdığını gözlemlemişlerdir.¹⁰⁰

Sonuçta tüm bu çalışmalar doğrultusunda; yaratılan ve biyoelektriği taklit eden bu zayıf elektrik alanları ile galvonotaksise sebep olmak ve yara iyileşmesi için hücre migrasyonu sağlamak mümkündür.

Elektrik stimülasyonu sinir doku üzerinden rejenerasyonu destekler. Nörotrofik faktörlerin salınımını arttırıp, reseptörlerinin up-regülasyonunu sağlayarak sinir rejenerasyonu sağlar.¹⁰¹

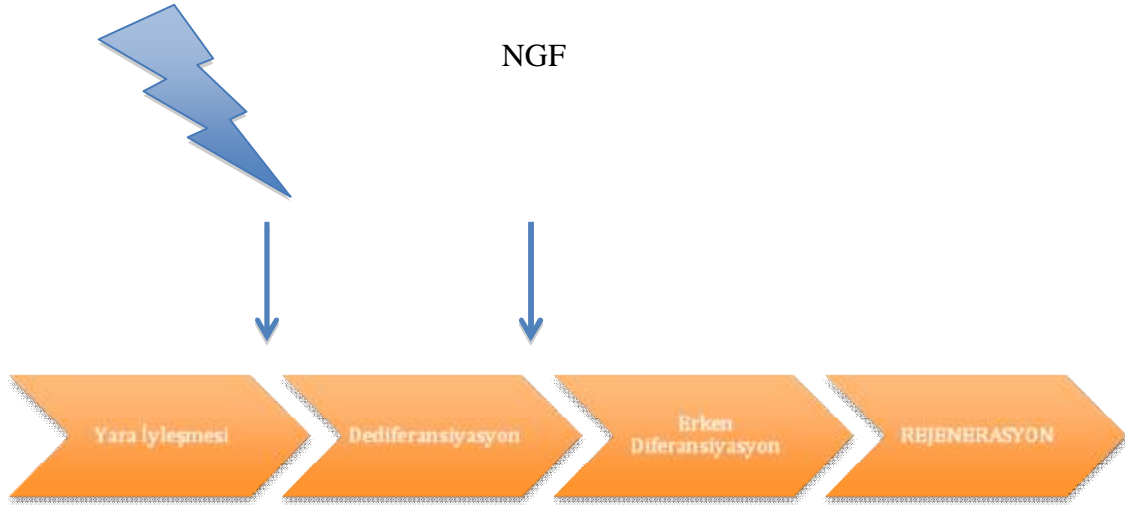
Tüm bu çalışmalar doğrultusunda rejenerasyon için hedef basamaklarımızdan biri olan yara iyileşmesini devam ettirip, indükleyebilmek için gerekli gördüğümüz; DNA-protein sentezini arttırmak, nötrofil, makrofaj, fibroblast proliferasyonunu arttırmak, perfüzyonu, vaskülarizasyonu arttırmak, hücre yüzey reseptörlerini ve büyüme faktörlerini arttırarak yönlendirilmiş hücre migrasyonunu gerçekleştirebilmek ve tüm bunları gerçekleştirirken antibakteriyel etkisinden de yararlanabilmek adına mikroakım stimülasyon tekniği tercih edildi.

Elektrik stimülasyonu dalga formu, akım süresi, frekansı, amplitüdü, modülasyonu, uyarı ve dinlenme süreleri değişkenleri ile elektrotlar yardımı ile uygulanır. Elektrotların klinikte enfeksiyon riskini arttırması, hastaya uygulanımının yaratacağı rahatsızlık ve ağrı hissi nedeni ile uygulanmasını kısıtlı gördük. Bu nedenle çalışmamızda elektrik stimülasyonunu kablosuz direk akım olarak uygulamayı tercih ettik.

Kablosuz mikroakım stimülasyonu; yapılmış olan çalışmalar doğrultusunda; şiddeti 1 μ A, uygulama süresi 15 dakika olarak toplamda sekiz seans uygulanmak üzere belirlendi.⁸⁰

Rejenerasyon hedefimizde yara iyileşmesi sürecini modüle edip dediferansiyasyon basamağına taşımayı takiben diferansiyasyonu sağlamak amaçlı sinyal molekülü olarak Sinir büyüme faktörünü (NGF) tercih ettik.(*Şekil 12*)

Elektrik Stimülasyonu



Şekil 12: Rejenerasyon basamaklarında NGF ve Elektrik stimülasyonun yeri

Rejenerasyon kertenkelelerde yapılan ekstremite rejenerasyon çalışmalarında; rejenerasyonun temelini oluşturan bir protein bulunmuştur. "Newt Anterior Gradient Protein" (nAG protein) rejenera olan aksonlarda schwann hücrelerinden sentezlenir. Amputasyonun proksimalinde ilk 3-5 günde pik yaparak rejenerasyonu destekler. Schwann hücrelerinin yanısıra yara epitelinin altında yer alan dermis ve bez yapılardan da salgılanarak rejenerasyona katkıda bulunur.¹⁰² Rejenerasyonun sinir hücreleri ve bu hücrelerden sentezlenen proteinler temelli yürütüldüğünü destekleyen birçok çalışma yapılmıştır. El bilek seviyesinden gerçekleştirilen amputasyon sonrası brakiyal plexus seviyesinden denerve edilen ekstremitede rejenerasyon gözlenmemiştir.⁸¹ Meksika kertenkelelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise ekstremiteye giden majör sinirin sırta yapılan implantasyonu sonrası sırta aksesuar ekstremite gelişimi gözlenmiştir.¹⁰³ Kertenkele ekstremite amputasyon modelinde yapılan başka bir çalışmada denerve edilen ampute ekstremitenin rejenera olmadığı gözlenmiştir. Plazmid aracılığı ile nAG protein denerve amputate verilerek rejenerasyon tamamlanmıştır. Erken rejenerasyon döneminde nAG protein blastemal hücrelerin proliferasyonu için büyüme faktörü görevi görmekte ve rejenerasyonun devamlılığını sağlamaktadır. Bu çalışmalar doğrultusunda görülmüştür ki kertenkelelerde gerçekleşen rejenerasyon sinir bağımlıdır ve ancak sinir rejenerasyonu ile mümkündür.

Bu çalışmalar doğrultusunda çalışmamızda sinir hücrelerinin büyümesini, yaşamlarını devam ettirmesini sağlayan nörotrofik faktörlerden sadece sinir iyileşmesinde değil her üç germ yaprağından gelişen dokuların rejenerasyonunda etkili olduğu gösterilmiş olan NGF tercih edilmiştir.

Yaralanma sonrasında schwann hücreleri ve muhtemel fibroblastlar tarafından sentezlenip salınan NGF sinir uçları tarafından içeri alınıp sinir terminaline retrograd taşınır. Duyu ve sempatik nöronların NGF' nin esas hedefi olduğu düşünülse de motor nöronların da etkilendiğine dair çalışmalar mevcuttur.^{104,105} Duyu, motor ve otonom sinirlerin iyileşmesi ve rejenerasyonu çalışmalarında NGF 'nin etkili olduğu ve değişkenlik göstermediği görülmüştür.^{104,105} Tüm sinir rejenerasyon çalışmalarında NGF en çok yer alan faktör olmuştur. Yokluğunda hücrelerde kromotolitik reaksiyonlar ve sinir hücresi ölümü görülebilmektedir.¹⁰⁶ Perez - Polo yaptığı çalışmada; NGF' nin oksidan- antioksidan dengesi üzerinde ki etkilerinin akson tomurcuklanması, büyümesi ve sinaps oluşumu üzerine büyüme ve gelişmenin tüm evrelerinde hatta yaralanma sonrası ve yaşlanmada da rol aldığını öne sürmüştür.¹⁰⁶

Nörotrofin ailesinden olan birçok nörotrofik faktör de sinir rejenerasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Siliyer nörotrofik faktör (CNTF) ile NGF ile yapılan çalışmalardan daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.¹⁰⁷ Ancak CNTF sıçan iskelet kasında ve diğer hedef dokularda bulunmaması nedeni ile nörotrofik etkileri tartışmalı bulunup çalışmamızda tercih edilmemiştir.

Çalışmamızda doku kültür ortamında biyoaktivitesi test edilen NGF-7S'in 2-200 ng/ml konsantrasyonlar arasında etkin bulunması nedeni ile liyofilize NGF-7S 50 ml sodyum fosfat tamponu içinde çözülerek 2 µgr /ml NGF-7S elde edilip in vitro olarak kullanılmıştır.¹⁰⁸

Sinir büyüme faktörü; ortama verilmesi zor olan, kolay yıkılan bir büyüme faktörü olması nedeni ile uygulamak ve optimal dozu yakalamak zordur. Bu nedenle bir taşıyıcıya ihtiyaç duyar.⁶

Daha önce periferik ve santral sinir kesileri sonrası rejenerasyon çalışmaları üzerine NGF etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda in-vivo ortamda lokal uygulama yöntemleri olarak kapalı tüp ya da infüzyon pompaları kullanılmıştır.¹⁰⁵

NGF nin klinik aplikasyonu hızlı in-vivo degradasyonu ve nonnöral dokularda olan nonspesifik multifonksiyonel yapısı nedeni ile oldukça zordur.¹⁰⁹ NGF dozunu ayarlayabilmek, istenen aralıkta sabit tutabilmek için taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır.

Kontrollü NGF salınımı için kollajen¹¹⁰, polimer¹¹¹ ve fibrin¹¹² taşıyıcılar kullanılabilir.

Heparinle konjuge fibrin jel (HCFG) NGF kontrollü salınımı sağlar. Heparinle konjuge fibrin jelin klinik kullanımda birçok avantajı vardır. Öncelikle enjekte edilebilir ve dış ortamda manipüle edilebilir, şekil verilebilir olması klinik kullanım kolaylığı sağlar.¹¹³ Sinir büyüme faktörünün uygun doz aralığında salınımı sağlar. Aynı zamanda FGF¹¹⁴ ve VEGF¹¹⁵ gibi heparine bağlanan yan zinciri olan büyüme faktörlerini indükleyerek, aktivitelerini artırır.

İn-vitro ortamda uygulamayı planladığımız çalışmamızda bu sorunun taşıyıcı bir katalizör ile aşılması tasarlandı. Heparin ile konjuge edilen fibrin jel içine verilen NGF ile; NGF salınımı sağlanırken aynı zamanda heparini kofaktör olarak kullanan epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) için de katalizör sağlanması, hücre büyüme ve farklılaşmasının desteklenmesi düşünüldü.⁴³

Çalışma sonuçları histopatolojik ve radyolojik olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonunda rejenerasyonu göstermek ve yara iyileşmesi ile rejenerasyonu ayırt edebilmek amaçlandı. Rejenerasyon sonunda yeni kemik, yağ-ter bezi, kıl folikülü oluşumu ve artmış epitel kalınlığı beklenmektedir.⁸⁰ Rejenerasyonun yara iyileşmesinden farklı son ürünleri olarak yağ-ter bezi, kıl folikülü ve yeni kemik oluşumu gösterilmiş⁸⁰ olmakla beraber yağ-ter bezi ve kıl folikülü oluşumunun yara iyileşmesinde de gösterilmiş örnekleri bulunmaktadır. Nemli ortamda yara epiteli kontraksiyonuna izin verildiğinde granülasyon dokusundan yağ-ter bezi ve kıl folikülü oluşumu gösterilmiştir.¹¹⁶ Roney ve arkadaşlarının tavşanlar üzerinde yaptığı kıl folikülü rejenerasyon çalışmalarında kıl folikülü siklus süreleri ve siklusun hangi evresinde çalışıldığı ile ilgili değişkenlerin sonuçları etkilediği görülmüştür.¹¹⁷ Bu çalışmalar doğrultusunda rejenerasyonun yeni kemik oluşumu ve artmış epitel kalınlığı ile gösterilebileceği, yağ-ter bezi ve kıl folikülü oluşumunun rejenerasyon ölçütü olarak kabul edilmesinde elimizde yeterli bilgi olmadığı ve histolojik değerlendirme parametrelerinin geliştirilebileceği sonucuna ulaşıldı.

Histopatolojik değerlendirmeyi desteklemek amacı ile radyolojik görüntüleme kullanıldı. Histopatolojik olarak yeni kemik oluşumu izlenen deney grubunda radyolojik olarak da eş bölgede kemik oluşumu gösterilerek bulgular korele edildi.

8. SONUCLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada rejenerasyonun temel basamaklarının gerekliliği olan ve yara iyileşmesini takiben gerçekleşen dediferansiyasyon ve rediferansiyasyon göz önüne alınarak sıçanlarda kuyruk amputasyon modeli üzerinde mikroakım elektrik stimülasyonu ve NGF uyguladık. Elektrik stimülasyonu ile hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu, doku oksijenizasyonunu ve vaskülarizasyonunu artırarak yara iyileşmesi sürecini takiben blastemayı taklit eden mitotik aktif hücre popülasyonu yarattık. Üç germ yaprağını da etkilediği bilinen NGF ile bu mitotik olarak aktif hücre popülasyonunu rediferansiye olma yönünde yönlendirdik. Rejenerasyonun temel gereksinimi olan sinir hücreleri ve mediatörlerini de aynı zamanda NGF ile destekleyerek rejenerasyon sürecinin ilerlemesi sağladık.

Sıçanlarda kuyruk amputasyon modeli ile yapılan rejenerasyon amaçlı çalışmamızda; yeni kemik oluşumu ve yeni kollajen oluşumu ile artmış epitel kalınlığı bulgularının rejenerasyon sürecinin yara iyileşmesinden farklı son ürünleri olduğu bilgisi doğrultusunda sonuçlar histopatolojik ve radyolojik olarak değerlendirildi.⁸⁰ Sonuçlar istatistiksel olarak incelendi.

Elektrik stimülasyonu ve NGF uygulanan deney grubunda laküna tipi orjinal kemik benzeri yeni kemik oluşumunun görülmesi, artmış kalınlıkta yara epitelinin görülmüş olması ve tüm bu sonuçların diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı ve farklı bulunması nedeni ile sonuçlar rejenerasyon ile uyumlu bulundu. Kontrol grubu ve NGF uygulanan Grup-3 de yeni kemik oluşumunun görülmemiş olması, epitel kalınlığının yetersiz olması nedeni ile sonuçlar yara iyileşmesinden ayırt edilemedi ve rejenerasyon olarak değerlendirilmedi. Elektrik stimülasyonu uygulanan Grup-2 de epitel kalınlığının yara iyileşmesinde görülenden farklı olarak artmış olduğu ancak yeni kemik oluşumunun görülmemesi nedeni ile sonuçlar rejenerasyon yönünde değerlendirilmemiştir.

Yetersiz epitel rejenerasyonu sonucu gerçekleşen yara epitelinin kontraksiyonu ile de görülebilen , rejenerasyon sonunda da oluşması beklenen yağ-ter bezi ve kıl folikülü formasyonları rejenerasyon ve yara iyileşmesi sürecinin ayırt edilmesinde yetersiz kalmıştır. Bu nedenle kontrol grubu, elektrik stimülasyonu uygulanan Grup-2 ve NGF uygulanan Grup-3 de yağ-ter bezi ve kıl folikülü formasyonunun oluşmuş olması tek başına rejenerasyon sonucuna ulaşmakta yetersiz olarak değerlendirildi. Yeni oluşan kollajen depozisyonu, oluşan

epitelin kalınlığı ve yeni kemik oluşumu göz önüne alındığında NGF ve elektrik stimülasyonu uygulanan Grup-4 sonuçlarının yara iyileşmesinden farklı, rejenerasyon ile uyumlu ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Sonuçlar doğrultusunda; in-vitro NGF uygulaması ve kablosuz mikroakım stimülasyon uygulaması ile rejenerasyonun gösterilebilmiş olması klinik uygulamalarda yenilikçi ve güvenli yaklaşımlar getirebileceği düşüncesindeyiz. Fonksiyonel rekonstrüksiyon güçlüğü yaşadığımız; sinir yaralanmalarında, ekstremitte distal uç amputasyonlarında ve kompozit doku kayıplarında başarılı sonuçlar alınabileceği, klinik uygulamasının kolay ve güvenli olduğu gözlemlenmiş olup geliştirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

8.KAYNAKLAR

- 1- Gurtner GC et al: Wound repair and regeneration. Nature 453:314, 2008.
- 2- Bellairs d'A, Bryant SV. 1985. Autotomy and regeneration in reptiles. In: Gans C, Billet F, editors. Biology of the reptilia, Vol. 15. New York: John Wiley and Sons. p 301–410.
- 3- Suzuki, M., Yakushiji, N., Nakada, Y., Satoh, A., Ide, H. & Tamura, K. 2006. Limb regeneration in *Xenopus laevis* froglet. *Sci. World J.* **12**, 26–37.
- 4- Stocum DM. Regenerative biology and medicine. New York: Elsevier Inc.; 2006.
- 5- B. M. Carlson, Principles of Regenerative Biology (Elsevier, London, 2007).
- 6- Chang, Y. J., C. M. Hsu, C. H. Lin, M. S. Lu, and L. Chen. Electrical stimulation promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 4130–6:2013, 1830.
- 7- Carley PJ, Wainapel SF. Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil* 1985; 66: 443_6.
- 8- Woolley K., Martin P. Conserved mechanisms of repair, from damaged single cells to wounds in multicellular tissues. *Bioessays*. 2000;22(10):911-919
- 9- Martin P. Wound healing—aiming of perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75–81.
- 10- Carlson BM. Principles of regenerative biology. New York: Elsevier Inc.; 2007.
- 11- Levin M. Bioelectric mechanisms in regeneration: unique aspects and future perspectives. *Seminars in Cell & Development Biology* 2009;20: 543–6.
- 12- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738- 46.
- 13- Complex wounds and their management. 2010 90(6):1181-94
- 14- Broughton G, Janis JE, Attiger CE, the basic science of wound healing, *Plast reconsurg* 2006;117:12-34
- 15- Goldberg SR, Diegelmann RF, Wound healing primer. *Surg Clin North Am.* 2010;90(6):113-46 146
- 16- Broughton G, Janis JE, Attinger CE The basic science of wound healing. *Plast Reconsurg* 2006;117:12-34
- 17- Kirsner R. Wound Healing. In: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, eds. *Dermatology*. 2nd ed.: Mosby Elsevier, 2008 (vol 2):2147-58

- 18- Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-21.
- 19- Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 expression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003; 11:915-26.
- 20- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425: 577-84.
- 21- Miyazone K, Oloffson A, Colosetti P, Helding CH. A role of the latent TGF- β 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1. *EMBO J.* 1991;10: 1091–1110.
- 22- O'Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:525-30. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70.
- 23- Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AM. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2003;2:60-8.
- 24- Johnstone CC, Farley A. The physiological basics of wound healing. *Nurs Stand* 2005;19:59-65
- 25- Gelse K, Pöschl E, Aigner T, Collages-structure,function and biosynthesis *Adv Drug Deliv Rev* 2003;28:55(12):1531-46
- 26- Joan L, Monaco W, Thomas L. Acute wound healing *Clinics in Plast Surg* 2003: 30(1):1-12
- 27- Lischka DJ, Reed MJ, Sage EH, Cell specific expression of α -1 collagen Hgh minigenes in transgenic mice. *J Cell Biol* 1994;125(3):695-704
- 28- Yara iyileşmesi ve yara bakımı, Doç. Dr. Koray ÖCAL Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Ders Notları
- 29- Rosenzweig A. Endothelial progenitor cells. *N Engl J Med* 2003;348:581-2.,
- 30- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-21.
- 31- Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:9-18.
- 32- J. P. Brockes, A. Kumar, *Science* 310, 1919 (2005).

- 33- Thorne, RG. Frey, WH. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic consideration. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40 (12): 907-946
- 34- Funakoshi H, Risling M, Carlstedt T, Lendahl U, Timmusk T, Metsis M, Yamamoto Y and Ibanez CF. Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. *Proc Natl Acad Sci*, 1998; 95: 5269-5274.
- 35- Bervar M. Video analysis of standing-an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neuroscience Methods*, 2000; 102:109-116.
- 36- Glass, DJ. Yancopoulos, GD. The Neurotrophins and their receptors. *Trends Cell Biol* 1993; 3: 262-267
- 37- Gravannis, AI. Lykoudis, EG. Tagaris, GA. et. Microsurgical repair of nerve lesions with nerve grafts: the effect of nerve growth factor 7s. *Euro.J.Plast.Surg.* 2001; 25: 187-192
- 38- Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999; 194(Pt 1):1-14.
- 39- Zhuk ON, Kalyunov VN. Effect of nerve growth factor on the regeneration of fibers in the rat sciatic nerve. *Neurosci Behav Physiol.* 1997; 27(5):541-4
- 40- Whitworth IH, Brown RA, Dore CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G. Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *J Hand Surg [Br]*. 1996; 21(4):514-22.
- 41- Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurons and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg [Br]*. 1998; 23(4):433-7.
- 42- Chang, Y. J., C. M. Hsu, C. H. Lin, M. S. Lu, and L. Chen. Electrical stimulation promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 4130-6:2013, 1830.
- 43- Jeon O, Ryu SH, Chung JH, Kim BS. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. *J Control Release* 2005; 105:249-59
- 44- Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral

- nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397-405.
- 45-** Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurons and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg [Br]*. 1998;23(4):433-7.
- 46-** Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol*. 1992;119(1):45-54
- 47-** Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience*. 1997;79(3):765-74.
- 48-** Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci*. 2000;12(12):4171-80.
- 49-** Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci*. 2002;15(4):613-26.
- 50-** Yin Q, Kemp GJ, Yu LG, Wagstaff SC, Frostick SP. Neurotrophin-4 delivered by fibrin glue promotes peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 2001;24(3):345-51.
- 51-** McCallister WV, Tang P, Smith J, Trumble T. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. *J Hand Surg [Am]*. 2001;26(3):478-88.
- 52-** Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):815-22
- 53-** Zang DW, Cheema SS. Leukemia inhibitory factor promotes recovery of locomotor function following spinal cord injury in the mouse. *J Neurotrauma* 2003;20(11):1215-22
- 54-** Werner S, Grose R: Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83:835, 2003.
- 55-** Garrison FH. An introduction to the history of medicine. Philadelphia: W.B. Saunders 1921.
- 56-** Robinson K. Digby's receipts. *Ann Med Hist* 1925; 7: 216_9.

- 57-** Kanof NM. Gold leaf in the treatment of cutaneous ulcers. *J Invest Dermatol* 1964; 43: 441_2.
- 58-** Wolf M, Wheeler PC, Wolcott LE. Gold-leaf treatment of ischemic skin ulcers. *JAMA* 1966; 196: 693_6.
- 59-** Lente F. Cases of united fractures treated by electricity. *N Y State J Med* 1850;5:5117-8.
- 60-** Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect in bone. *Nippon Seirigaku Zasshi* 1957;12:1158-62.
- 61-** Becker R, Spadero J, Marino A. Clinical experiences with low intensity direct current stimulation of bone growth. *Clin Orthop* 1975;124:75-83.
- 62-** Bassett C. The development and application of pulsed electro- magnetic fields (PEMFS) for un-united fractures and arthrodeses. *Orthop Clin North Am* 1984;15(1):61-87.
- 63-** Stillings D. A survey of the history of electrical stimulation for pain to 1900. *Med Instrum* 1975; 9: 255_9.
- 64-** Kloth LC, Feedar JA. Acceleration of wound healing with high voltage, monophasic, pulsed current. *Phys Ther* 1988; 68: 503_8.
- 65-** Carley PJ, Wainapel SF. Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil* 1985; 66: 443_6.
- 66-** Ojingwa JC and Isseroff RR: Electrical stimulation of wound healing. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1.
- 67-** Kincaid CB, Lavoie KH. Inhibition of bacterial growth in vitro following stimulation with high voltage, monophasic, pulsed current. *Phys Ther* 1989; 69: 651_5.
- 68-** Jaffe LF, Vanable JW Jr. Electric fields and wound healing. *Clin Dermatol* 1984; 2: 34_44.
- 69-** Gilbert TL, Griffin N, Moffett J, Ritz MC, George FR. The Provant Wound Closure System induces activation of p44/42 MAP kinase in normal cultured human fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961: 168_71.
- 70-** Udina,E., Furey, M., Busch, S., Gordon, T., Fouad, K.,2008.Electrical stimulation of intact peripheral sensory axons in rats promotes outgrowth of their central projections.*Exp.Neurol.* 2010,238-247

- 71-** English, A.W., Schwartz, G., Meador, W., Sabatier, M.J., Mulligan, A., 2007. Electrical stimulation promotes axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. *Dev. Neurobiol.* 67, 158-172.
- 72-** Vivó M, Puigdemasa A, Casals L, Asensio E, Udina E, et al. (2008) Immediate electrical stimulation enhances regeneration and reinnervation and modulates spinal plastic changes after sciatic nerve injury and repair. *Exp Neurol* 211:180–193. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.01.020 PMID: 18316076
- 73-** Alrashdan MS, Park JC, Sung MA, Yoo SB (2010) Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in a rat model. *Acta Neurol Belg* 110:168–179. PMID: 20873447
- 74-** Teodori RM, Silva AM, Silva MT, Oliveira LS, Polacow MLO, et al. (2011) High-voltage electrical stimulation improves nerve regeneration after sciatic crush injury. *Rev Bras Fisioter* 15:325–331. doi: 10.1590/S1413-35552011005000008 PMID: 21975682
- 75-** Xu C, Kou Y, Zhang P, Han N, Yin X, et al. (2014) Electrical stimulation promotes regeneration of defective peripheral nerves after delayed repair intervals lasting under one month. *PLoS One* 9:e105045. doi: 10.1371/journal.pone.0105045 PMID: 25181499
- 76-** Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T (2000) Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur J Neurosci* 12:4381–4390. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.01341.x PMID: 11122348
- 77-** PG. Wirsing, AD. Habrom, TM. Zehnder, S. Friedli, and M. Blatti, “Wireless micro current stimulation - an innovative electrical stimulation method for the treatment of patients with leg and diabetic foot ulcers”, *Int. Wound J.*, Dec. 30, 2013, doi: 10.1111/iwj.12204.
- 78-** ARamadhinara, and K.Poulas, “Use of wireless microcurrent stimulation for the treatment of diabetes-related wounds: 2 case reports”, *Adv. Skin Wound Care*, vol 26, pp. 1-4, 2013.
- 79-** Khan, S. N., Cammisa F. P. J., Sandhu H. S., Diwan A. D., F. P. Girardi F. P., Lane J. M. “The biology of bone grafting.” *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2005 13, 77-86.
- 80-** Hechavarria, D., Dewilde, A., Braunhut, S., Levin, M., Kaplan, D., “BioDome

- regenerative sleeve for biochemical and biophysical stimulation of tissue regeneration” , *Medical Engineering & Physics* 32 (2010) 1065–1073
- 81-** Kumar A, Godwin JW, Gates PB, Garza Garcia AA, Brockes JP. Molecular basis for nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science*. 2007b, 318: 772–7.
- 82-** Said S, Parke W, Neufeld DA. Vascular supplies differ in regenerating and non-regenerating amputated rodent digits. *Anat Rec A Discov Mol Cell Eval Biol*. 2004, 278: 443–9.
- 83-** Singer M, Weckesser EC, Geraudie J, Maier CE, Singer J. Open fingertip healing and replacement after distal amputation in rhesus monkey with comparison to limb regeneration in lower vertebrates. *Anat Embryol (Berl)*. 1987, 177: 29–36.
- 84-** Kumar A, Gates PB, Brockes JP. Positional identity of adult stem cells in salamander regeneration. *CR Biol*. 2007a, 330: 485–90.
- 85-** Bassett C, Herrmann I. The effect of electrostatic fields on macromolecular synthesis by fibroblasts in vitro [Abstract]. *J Cell Biol* 1968;39:9.
- 86-** Bourguignon G, Wenche J, Bourguignon L. Electric stimulation of human fibroblasts causes an increase in Ca²⁺ influx and the exposure of additional insulin receptors. *J Cell Physiol* 1989;140(2):397- 85.
- 87-** Falanga V, Bourguignon G, Bourguignon L. Electrical stimulation increases the expression of fibroblast receptors for transforming growth factor-beta. *J Invest Dermatol* 1987;88:488-92.
- 88-** Cheng N, Van Hoof H, Bockx E, et al. The effects of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport in rat skin. *Clin Orthop* 1982;171:264-72.
- 89-** Cheng K, Goldman R. Electric fields and proliferation in a dermal wound model: cell cycle kinetics. *Bioelectromagnetics* 1998;19:68-74.
- 90-** Kloth LC. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005;4:23-44.
- 91-** Rowley B, McKenna J, Chase G, et al. The influence of electrical current on an infecting microorganism in wounds. *Ann N Y Acad Sci* 1974;238:543-51.
- 92-** Barranco S, Spadero J, Berger T, et al. In vitro effect of weak direct current on

- Staphylococcus aureus*. Clin Orthop 1974;100:250-5.
- 93-** Costerton B, Dirckx P. Antibiotic effectiveness is increased in the presence of even a weak, intermittent electrical field. The Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman. Available from: URL: <http://www.erc.montana.edu>. Accessed January 13, 2005.
- 94-** McLeod B, Dirckx P. The combination of electricity plus antibiotic is more effective against biofilm cells than either is alone. The Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman. Available from: URL: <http://www.erc.montana.edu>. Accessed January 13, 2005.
- 95-** Junger M, Zuder D, Steins A, et al. Treatment of venous ulcers with low frequency pulsed current (Dermapulse): effects on cutaneous microcirculation. Der Hautartz 1997;18:879-903.
- 96-** Greenberg J, Hanly A, Davis S, et al. The effect of electrical stimulation (RPES) on wound healing and angiogenesis in second degree burns. Proceedings of the 13th Annual Symposium on Advanced Wound Care; 2000 Apr 1-4; Dallas, TX.
- 97-** Peters E, Armstrong D, Wunderlich R, et al. The benefit of electrical stimulation to enhance perfusion in persons with diabetes mellitus. J Foot Ankle Surg 1998;37(5):396-400.
- 98-** Mawson A, Siddiqui F, Connolly B, et al. Effect of high voltage pulsed galvanic stimulation on sacral transcutaneous oxygen tension levels in the spinal cord injured. Paraplegia 1993;31:311-9.
- 99-** Eberhardt A, Szczypiorski P, Korytowski G. Effect of transcutaneous electrostimulation on the cell composition of skin exudate. ACTA Physiol Pol 1986;37(1):41-6
- 100-** Mertz P, Davis S, Cazzaniga A, et al. Electrical stimulation: acceleration of soft tissue repair by varying the polarity. Wounds 1993;5(3):153-9.
- 101-** Elzinga, K., Tyreman, N, Savaryn, A. L. "Brief electrical stimulation improves nerve regeneration after delayed repair in Sprague Dawley rats" Experimental Neurology 269 (2015) 142–153
- 102-** Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. Science. 2005, 310: 1919–23.

- 103-** Endo T, Bryant SV, Gardina DM. A stepwise model system for limb regeneration. *Dev Biol.* 2004, 270: 135–45.
- 104-** Chen YS, Wang-Bennett LT, Coker NJ “Facial nerve regeneration in the silicon chamber: the influence of nerve growth factor” *Exp Neurol* 1989 Jan; 103(1):52-60
- 105-** Eppley BL., Snyders RV., Winkelmann TM., Roufa DG., “Efficacy of nerve growth factor in regeneration of the mandibular nerve: a preliminary report” *J. Oral Maxillofac Surg* 1991 Jan; 49(1):61-68
- 106-** Hiraizumi Y., Fujimaki E., Transfeldt EE., Kawahara N., Fiegel, VD., Knighton, D., sUNG, Jh. “The effect of the platelet derived wound healing formula and the nerve growth factor on the experimentally injured spinal cord” *Spinal Cord* Jul; 34(7):394-402
- 107-** Newman, JP., Verity AN., Hawatmeh S., Fee WE., Terris DJ. “Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996 Apr; 122(4):339-403
- 108-** Menderes A, Yılmaz M, Vayvada H, Özer E, Barutçu A. Effects of nerve growth factor on the neurotization of denervated muscles. *Ann Plast Surg* 2002;48:415– 422
- 109-** Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 1996;148:1807-18.
- 110-** Madduri S, Papaloizos M, Gander B. Trophically and topographically functionalized silk fibroin nerve conduits for guided peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2010;31:2323-34.
- 111-** Jhaveri SJ, Hynd MR, Dowell-Mesfin N, Turner JN, Shain W, Ober CK. Release of nerve growth factor from HEMA hydrogel-coated substrates and its effect on the differentiation of neural cells. *Biomacromolecules* 2009;10:174-83.
- 112-** Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS. Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A* 2007;80:998-1002.
- 113-** Jeon O, Ryu SH, Chung JH, Kim BS. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. *J Control Release* 2005;105:249- 59.
- 114-** Park MS, Kim SS, Cho SW, Choi CY, Kim BS. Enhancement of the osteogenic efficacy of osteoblast transplantation by the sustained delivery of basic fibroblast growth factor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;79:353-9.

- 115-** Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:1434-8.
- 116-** Hardy, M. H. "The Development of Pelage Hairs and Vibrissae from Skin in Tissue Culture." *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 63: 546-61, 1951
- 117-** Ronet, H. R.; Cohen, D. M.; and Schaffner, I. "Patterns of Hair Growth Cycles in the Colored Rabbit and Their Modification by Experimental Means." *J. Invest. Dermatol.*, 21:313-30, 1953