

T.C  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRİMER YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE EMBRİYONİK KÖK  
HÜCRE VE OVARYUM FOLİKÜL SIVISININ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Selda AYHAN**

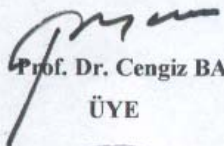
Tez DanıŐmanı: Prof. Dr. Erinç ARAL

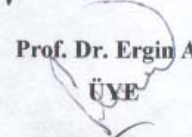
AĞustos 2007

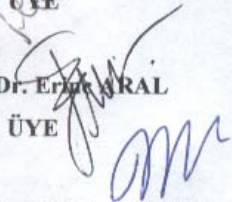
## KABUL VE ONAY YAZISI


Selda Ayhan'nın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Primer Yara İyileşmesi Üzerine Embriyonik Kök Hücre ve Ovaryum Folikül Sıvısının Etkisi**" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

16.08.2007

  
Prof. Dr. Cengiz BAYÇU  
ÜYE

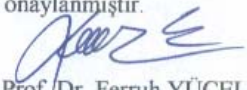
  
Prof. Dr. Ergin AÇIKALIN  
ÜYE

  
Prof. Dr. Erhan AYRAL  
ÜYE

  
Prof. Dr. Mehtap KUTLU  
ÜYE

  
Doç. Dr. Nurhan SARACOĞLU  
ÜYE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 24.08.2007 Tarih ve 709/12293.....Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Ferruh YÜCEL  
Sağ. Bil. Enst. Müdürü

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>iii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. DERİ.....	4
2.1.1. DERİNİN HİSTOLOJİK ÖZELLİKLERİ .....	4
2.1.1.1. Epidermis.....	5
2.1.1.2. Dermis.....	6
2.1.1.2.1. Dermal Bağ Doku.....	7
2.2. YARA İYİLEŞMESİ.....	9
2.2.1. YARA İYİLEŞMESİNİN TİPLERİ.....	10
2.2.1.1. Primer Yara İyileşmesi.....	10
2.2.1.2. Sekonder Yara İyileşmesi.....	10
2.2.1.3. Tersiyer Yara İyileşmesi.....	11
2.2.2. YARA İYİLEŞMESİNDEKİ HÜCRESEL AKTİVİTELER.....	11
2.2.3. YARA İYİLEŞMESİNİN FAZLARI.....	12
2.2.3.1. HEMOSTAZİS FAZI.....	12
2.2.3.2. İNFLAMATUAR FAZ.....	14
2.2.3.2.1. İnflamatuar Faz Olayları.....	15
2.2.3.2.1.1. Vazokonstriksiyon.....	15
2.2.3.2.1.2. Vazodilatasyon.....	15
2.2.3.2.1.3. Damar Duvarı Geçirgenliğinde Artma (Permeabilite Artışı).....	16
2.2.3.2.1.4. Sıvı ve Hücre Eksüdasyonu.....	17
2.2.3.2.1.5. Kan Akımında Değişiklik.....	19
2.2.3.2.1.6. Kemotaksiz.....	19
2.2.3.2.1.7. Fagositoz.....	20
2.2.3.2.2. İnflamatuar Hücreler.....	20

2.2.3.2.2.1. Polimorf Nükleer Lökositler (PMNL).....	21
2.2.3.2.2.2. Mononükleer Lökositler (MNL).....	23
2.2.3.3. MİGRASYON/PROLİFERASYON FAZI.....	26
2.2.3.3.1. Epitelizasyon .....	26
2.2.3.3.2. Anjiyogenezis .....	28
2.2.3.3.3. Fibrozis (Fibroplazi) Fazı.....	31
2.2.3.4. MATURASYON FAZI.....	32
2.2.3.4.1. Kontraksiyon.....	32
2.3. SİTOKİNLER.....	33
2.3.1. YARA İYİLEŞMESİNDE TANIMLANMIŞ SİTOKİNLER.....	33
2.3.1.1. BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	35
2.3.1.1.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF).....	35
2.3.1.1.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF).....	36
2.3.1.1.3. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF).....	37
2.3.1.1.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF).....	38
2.3.1.1.5. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF-1,2,3).....	40
2.3.1.2. Transforme Edici Faktör (TGF).....	41
2.3.1.2.1. Transforme Edici Faktör – Alfa (TGF- $\alpha$ ).....	41
2.3.1.2.2. Transforme Edici Faktör-Beta (TGF- $\beta$ ).....	41
2.3.1.3. Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF).....	42
2.3.1.4. Proinflamatuvar Sitokinler.....	43
2.3.1.5. Anti-İnflamatuvar Sitokinler.....	43
2.4. OVARYUM FOLİKÜL SIVISI.....	44
2.4.1. OVARYUM FOLİKÜL SIVISINDA BULUNAN SİTOKİNLER.....	46
2.5. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE.....	47
2.5.1. KÖK HÜCRELER.....	47
2.5.1.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	50
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>52</b>
3.1. Hayvanlar.....	52
3.2. Deney Protokolü.....	52
3.2.1. Biyolojik Gereçler.....	52

3.2.1.1. Embriyonik Kök Hücre (EKH).....	53
3.2.1.2. Ovaryum Folikül Sıvısı.....	55
3.2.2. Primer İnsizyonel Yara Oluşturulması.....	55
3.2.3. Gruplar.....	56
3.3. Dokuların Alınması ve Değerlendirilmesi.....	56
3.3.1. Deri İçin Uyguladığımız Doku Takip Metodu.....	57
3.3.2. Deri İçin Uyguladığımız Hematoksilin-Eozin (H&E) Boyama Yöntemi.....	57
3.3.3. Deri İçin Uyguladığımız Periyodik Asit Schiff-Hematoksilin (PAS-HE) Boyama Yöntemi.....	58
3.3.4. Deri İçin Uyguladığımız Weigert'in Rezorsin Fuksin Boyama Yöntemi.....	59
3.3.5. Deri İçin Uyguladığımız Masson Trikrom Boyama Yöntemi.....	60
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>61</b>
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	61
4.1.1. Grup 1 (Kontrol grubu) Bulguları.....	61
4.1.2. Grup 2 (Sham grubu) Bulguları.....	62
4.1.3. Grup 3 (EKH grubu) Bulguları .....	64
4.1.4. Grup 4 (Ovaryum Folikül Sıvısı grubu) Bulguları.....	66
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>92</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>121</b>
<b>7. SİMGE VE KISALTMALAR .....</b>	<b>123</b>
<b>8. RESİMLER DİZİNİ.....</b>	<b>126</b>
<b>9. KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>132</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>149</b>

## ÖZET

Yara iyileşmesi, birbiriyle iç içe olan ve oldukça kompleks fazlardan oluşan bir süreçtir. Bu fazlar, deride bulunan hemen hemen her tip hücreden salgılanan sitokinler tarafından kontrol edilir. Yara alanında bulunan sitokinlerin miktarları, iyileşme için yeterli seviyelerde olmalıdır. Eğer sitokin seviyesi gerekli miktarın altında ise, yaranın geç iyileştiği yada iyileşemediği gözlenir. Bundan dolayı yaraların tedavisinde bazı büyüme faktörleri, farmakolojik uygulamalarla arttırılır.

Embriyonik kök hücreler, son yıllarda, insanlardaki pek çok hastalık için hücre esaslı bir tedavi stratejisi olarak ortaya çıkmıştır. Ovaryum folikül sıvısı ise yara iyileşmesinde görev alan sitokinlerin hemen hemen hepsini içeren biyolojik bir sıvıdır. Bu nedenle araştırmamızda; primer insizyonel dermal yara oluşturulan sıçanlarda ovaryum folikül sıvısının ve farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin yara iyileşmesi üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladık.

Araştırmamızda, 200±30 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi, albino, dişi sıçanlardan (n=50), Kontrol (Grup I, n=5), Sham (Grup II, n=15), Farklılaşmamış embriyonik kök hücre (Grup III, n=15), Ovaryum folikül sıvısı (Grup IV, n=15) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Kontrol grubu hariç tüm deney gruplarındaki sıçanların dorsal sol taraflarında 3cm'lik primer insizyonlar oluşturuldu ve kendi aralarında 3 gruba ayrıldı. Primer insizyon oluşturulduktan hemen sonra farklılaşmamış embriyonik kök hücre 200µl olarak yara alanı dikiş altına enjekte edildi, ovaryum folikül sıvısı grubunda ise follikül sıvısı hem 80 IU olarak dikiş altı enjekte edildi hem de her gün pulverizasyon yoluyla uygulandı. Deri örnekleri insizyon hattı oluşturulduktan sonraki 1., 2., ve 3. hafta sonunda alındı. Doku örnekleri alınırken eter anestezi uygulandı ve insizyon hattını içeren 4x1cm'lik bölge eter anestezi altında tamamen kesilip çıkartıldı ve rutin histolojik takip uygulandı. Kesitler Hematoksilin- Eozin (H&E), Periyodik Asit Shciff-Hematoksilin (PAS-HE), Weigert'in Rezoksin Fuksin Boyası, Masson'un Trikrom Boyası ile boyandı. Yapılan histolojik incelemelerde sham grubuyla karşılaştırıldığında kök hücre ve folikül sıvısı grubunda yara iyileşmesinin oldukça hızlı olduğu gözlemlendi. Kök hücre grubunda yara tamiri, 3. hafta sonunda skarsız

**bir şekilde tamamlanırken, ovaryum folikül sıvısı grubunda ise 2. hafta sonunda tamamlandığı gözlemlendi.**

**Araştırmamızda ovaryum folikül sıvısı uygulanan grupta sham ve pluripotent özellikteki etkisi kanıtlanmış embriyonik kök hücre gruplarına oranla yara iyileşme sürecinin oldukça hızlandığı gözlemlenmiştir. İlk kez bizim uyguladığımız ovaryum folikül sıvısının gelecekte yara iyileşmesi tedavi protokollerinde kullanılacağını düşünmekteyiz.**

**Anahtar Kelimeler: Yara iyileşmesi, Embriyonik kök hücre, Ovaryum folikül sıvısı.**

## SUMMARY

Wound healing is a complex process and at least four phases can be determined in skin. The phases are controlled with cytokines which are secreted by almost every type of cells in skin. The amount of cytokines in wound bed have to be in sufficient levels for skin healing. If not, either delayed or incomplete wound healing will be observed. In such cases, it was observed that pharmacologic application of some growth factors treatment have beneficial effects in wound healing.

In recent years, embryonic stem cells appear to be a cell base therapy for many diseases in humans. Ovarium follicular fluid is a biologic fluid which contains all of the cytokines that plays role in wound healing. Therefore, the aim of our study is, to examine the effect of embryonic stem cells and ovarium follicular fluid on primary incisional dermal wound healing in rats.

In this study Spraque-Dawley female, albino rats (n=50) weighing about 200±30g were assigned to four groups; as control (group I, n=5), sham (group II, n=15), embryonic stem cell (group III, n=15) and ovarium follicular fluid (group IV, n=15). In dorsal left skin 3 cm length of primary incision was performed in all groups except control group. In addition, in group II, III and IV were divided into 3 groups as 5 rats in each group to better observed the healing phases. Embriyonic stem cell group was intradermally received a single dose of (200 µl) undifferentated embryonic stem cell after primary incision. In addition, ovarium follicular fluid group was received ovarium follicular fluid a single dose of 80 IU with intradermal injection and by pulverization everyday. Skin samples were taken at the end of the 1, 2 and 3 weeks postsurgery. 4x1 cm of incision line region were removed under ether anaesthesia and processed for routine histology. Sections were stained with Hematoxylin-eosine (H&E), Periodic Acid Schiff – Hematoxylin (PAS-HE), Weigert's Resorcin Fucsin and Masson's Trichrom techniques. When sections were examined, it was observed that the embryonic



**stem cell and ovarium follicular fluid groups were significantly accelerate wound healing in comparison to sham group. Wound healing in the ovarium follicular fluid group was completed at the end of the 2nd week, while in the embryonic stem cell group was completed at the end of the 3rd week as in the scar-less phase.**

**Our results showed that, wound healing process was significantly accelerated in ovarium follicular fluid group than in sham and embryonic stem cell groups. Ovarium follicular fluid which was used first time in our study may use as an alternative protocol for wound healing therapy in the future.**

**Key Words: Wound healing, Embryonic stem cell, Ovarium follicular fluid.**

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yara herhangi bir ajanın fiziksel bir hasar yaratmasıyla vücuttaki normal yapılarının bütünlüğünün bozulması şeklinde oluşan doku kayıplarıdır (31, 67). Yara iyileşmesinde genellikle primer, sekonder ve tersiyer yara iyileşmesi olarak farklı sınıflandırmalar olmasına karşın tüm yaralarda hücrel etkileşimler ve ekstrasellüler bileşenler benzerdir (31,). İyileşmeyi olumsuz yönde etkileyecek bir durum olmadıkça yara hemostazis, infiltrasyon, proliferasyon ve maturasyon fazlarını izleyerek iyileşir (1, 5, 24, 25, 52, 68, 69, 71, 76, 96, 97, 115).

Tüm bu fazların düzenlenmesinde asıl rol oynayan mediatörler sitokinlerdir (5, 18, 42, 60, 78, 112). Yara alanında hücre ve sitokinlerin kompleks etkileşimleri sonucunda iyileşme gerçekleşir. Bugüne kadar yapılan tüm çalışmaların temelinde de sitokinlerin oluşturduğu kaskat mekanizması yatmaktadır. Bu nedenden dolayı son zamanlardaki çalışmalar sitokinler üzerinedir. Araştırmacılar yara alanındaki sitokin seviyelerini ve etki mekanizmalarını belirlemek için yara sıvısı analizlerine yoğunlaşmışlardır (2, 19, 39, 115). Yapılan analizler sonucunda; bir çok sitokinin yara iyileşmesinin tüm fazlarında görev aldığı, tamiri başlatarak zaman-bağımlı tamir süreçleri için gerekli olan tüm aracı yolları indükleyerek iyileşmeyi kontrol ettikleri ortaya çıkarılmıştır (18, 112).

Ayrıca diyabetli ya da glikokortikoid tedavisi gören hastaların, yaşlıların ve yanık yarası, yatak yarası gibi kronik yaraları olan hastaların yara sıvısı analizlerinde sitokin konsantrasyonlarının veya sitokinlerin dokularda bulunan reseptörlerinin azaldığı tespit edilmiş ve yara iyileşmesinde bozulma veya iyileşememe gibi kliniksel problemlerin de bunun bir sonucu olduğu belirtilmiştir (6, 11, 12, 19, 85, 112). Bu sorunların arkasında hücrel ve moleküler mekanizmaların iyileşme için yetersiz kalması yatmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yara iyileşmesini hızlandırmak için topikal sitokinlerden yararlanılmış ve sitokinlerin, birçok hayvan modelinde yara iyileşmesini hızlandırdığı açıkça gösterilmiştir. Ayrıca araştırmacılar

yaptıkları deneysel modellerde, faktörlerin kombine şekilde kullanılmasının, tek tek kullanımından daha fazla etkili olduğunu da göstermişlerdir (31).

Ovaryum folikül sıvısı, tüp bebek merkezlerinde infertilite tedavisine alınan kadınların hiperstimüle edilmiş preovulatuvar foliküllerinden oosit aspirasyonu sırasında rutin olarak elde edilir. Ovaryum folikül sıvısı analizleri son birkaç yıldır oosit mikroçevresinin belirlenmesi için yapılmaktadır. Yaptığımız incelemeler sonucunda, ovaryum folikül sıvısının yara iyileşmesinde rol oynayan tüm sitokinleri içerdiği belirlenmiştir.

Embriyonik kök hücreler preimplante embriyoların iç hücre kitlesinden (ICM) (embriyoblastdan) elde edilen pluripotent özellikteki hücrelerdir. Her bir embriyoblast, farklı hücre tiplerine dönüşebilme (pluripotansiyel) ve uzun telomerleri, çok aktif telomeraz enzim yapıları, laboratuarda iki yıla varan yenilenebilme yeteneği nedenleriyle “embriyonik kök hücre (EKH)” kaynağıdır. EKH’lerin pluripotensiyelliği, kültür medyumuna farklılaşmayı önleyen lösemi inhibitör faktör (LIF) eklenerek veya kök hücrelerin mitotik olarak inaktive edilmiş fotal fare fibroblast hücreleri ile birlikte kültüre edilmesiyle saklı tutulur. Farklılaşmamış embriyonik kök hücreler in vivo ortama transfer edildiklerinde, o ortama özgü hormonların etkisiyle farklılaşır, normal gelişimlerini sürdürür ve biyolojik işlevini yerine getirir (50, 59, 70, 105, ).

Hücre esaslı tedavi, insanlardaki pek çok hastalık için bir tedavi stratejisi olarak ortaya çıkmıştır. Hücre esaslı tedavinin amacı, hasar gören bir hücre-doku veya organın biyolojik işlevini yerine koymak ve tamir etmektir. Bir hedef organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. İşte kök hücreler son yıllarda bu amaca hizmet edebilecek yani hücre esaslı tedavide kullanılacak başlıca unsur olarak görünmektedir (59).

Bu bilgiler ışığında araştırmamızda farklılaşmamış embriyonik kök hücreleri ve yara iyileşmesi üzerine etkili sitokinleri kombine bir şekilde içeren

ovaryum folikül sıvısı ile yara iyileşme mekanizmalarını uyararak, makul yara iyileşme süresini kısaltmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DERİ

#### 2.1.1. DERİNİN HİSTOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Deri vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını kapsayan büyük bir organdır. Yetişkinde yaklaşık 10 kg ağırlığındadır. Yüzey alanı ise 1,5-2 m<sup>2</sup>'dir. Dış ortam ile vücut arasında su alışverişini sınırlaması, solunum, vücut ısısının düzenlenmesi, çeşitli duyu fonksiyonlarında görev alması ve organizmayı dış etkenlere karşı koruması en önemli görevleri arasında sayılmaktadır (29, 57, 89).

Vücudun dış yüzeyini tümüyle kaplayan deri epidermis ve dermis olmak üzere, yapı ve gelişim yönünden farklı iki tabakadan oluşur (29, 30, 37, 57, 62, 89).

■**Epidermis:** Çok katlı yassı epitelin keratinleşen tipidir. Ektodermden köken alır. Bu epitelin en dikkati çeken özelliği; yüzeyel hücrelerin sürekli dökülmesi ve bazaldan mitozla çoğalan hücrelerin bunların yerini almasıdır.

■**Dermis(corium):** Epidermisin altındaki mezodermden köken alan, damardan zengin gevşek ve sıkı düzensiz bağ dokusudur.

Dermis ve epidermis birbirine kalınlığı 0,5-4 mm arasında değişen bazal membran aracılığı ile sıkıca yapışırlar.

Dermisin altında yer alan hipodermis (tela subcutenea, fascia superficialis), gevşek bağ dokusu ve yağ dokusundan oldukça zengin olup, deriyi daha derindeki fascia, periosteum yada perikondrium gibi yapılara bağlar. Hipodermis çoğu yerde deri altı yağ dokusunu oluşturur (pannikulus adipozus). Hipodermis deriye yakın komşulukta olmasına rağmen derinin bir tabakası olarak tanımlanmamıştır. Dermis hipodermise bağ dokusu lifleriyle bağlanır ve derinin hareketliliği hipodermis liflerinin

sayısına bağlıdır. Bu bağlantının gevşek olduğu yerlerde deri hipodermis üzerinde kolayca hareket eder. Ayak tabanı, el ayası gibi bağlantının sıkı olduğu yerlerde ise derinin hareketliliği sınırlı ölçüdedir (89).

### **2.1.1.1.Epidermis**

Çok katlı yassı keratinize epiteldir. Vücudun değişik bölgelerinde epidermis kalınlığı ve tabakalaşma düzeni farklıdır. 50  $\mu$ 'dan birkaç mm kalınlığa kadar ulaşabilir. Bu durum histolojik olarak seviye ve düzende açıkça bellidir. Çok katlı epitellerin altındaki dokulara tutunması ve beslenmesini kolaylaştırmaya yönelik yapı özellikleri epidermiste en belirgin durumdur

Epiderminin pek çok özelliklerinin yanı sıra rejenerasyon yeteneği de vardır. Bazı araştırmacılara göre tüm epiderminin yenilenme süresi 59-75 gündür. Bazılarına göre ise epidermis mitotik aktivitesini 15-30 günde tamamlamaktadır.

Epidermisi keratinositler ve uzantılı hücreler olmak üzere iki tip hücre oluşturur. Epiderminin %15'ini kapsayan uzantılı hücreler melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleridir. Epidermis hücrelerinin yaklaşık %85 kadarını ise keratinositler oluşturur. Bu hücreler boynuzsu hücrelere dönüşürken bazalden apikale doğru beş tabaka halinde sıralanırlar (89).

- |                                       |                            |
|---------------------------------------|----------------------------|
| ■Stratum Germinativum (bazal tabaka)  | stratum malpighi yada rete |
| ■Stratum Spinosum (dikensi tabaka)    | malpighi zonu              |
| ■Stratum Granülozum (granüllü tabaka) | malpighi zonu              |
| ■Stratum Lusidum (parlak tabaka)      | keratinizasyon zonu        |
| ■Stratum Korneum (boynuzsu tabaka)    |                            |

Nükleus içeren hücrelerin oluşturduğu stratum bazale, stratum spinosum ve stratum granülozumun üçüne birden stratum malpighi denir. Stratum lusidum ise

keratinizasyon zonudur. Bu beş tabakalı tabakalaşma düzeni en iyi el ayası ve ayak tabanı gibi kalınlığı yaklaşık 1,5mm'yi bulan derilerde görülür.

### **2.1.1.2. Dermis**

Epidermin altında damardan ve elastik liflerden zengin gevşek bağ dokusudur. Kalınlığı yerel değişiklikler gösterir; avuç içi ve ayak tabanında en fazla (3mm) iken, skrotum, penis ve göz kapağı derisinde en incedir. Vücudun dorsal bölümü ventrale göre, ekstremitelerin lateral bölümü de mediale göre daha kalındır. Ortalama dermis kalınlığı 1-3 mm arasındadır (29, 30, 37, 89).

Dermis vücudun her tarafında aynı yapıdadır. Epidermis ve dermis sınırı belirgin olarak seçilir. Kan damarları, lenf damarları, sinirler, kollajen lifler, elastik lifler ve bağ dokusu hücrelerinin dağılımına göre sınırları belirgin olmayan, stratum papillare ve stratum retikulare olmak üzere iki tabakaya ayrılır (89).

### **1.Stratum Papillare**

Subepitelyal tabaka (yüzeyel, ince ve epidermise komşu olan bölüm) gevşek bağ dokusu yapısındadır. Epidermin hemen altında olup, dermis içine doğru papilla denen cep tarzında konik biçimli girintiler yapar. Papillaların sayısı ve yüksekliği avuç içi ve ayak tabanında çok fazladır (ter bezi duktusları papillaların tepe bölümünden epidermis içine girer). Bazı papillalarda özel sinir sonlanmaları bulunur (*sinirsel papilla*), bazılarında ise kapillerler yer alır (*vasküler papilla*).

Stratum papillare hücreden zengin gevşek bağ dokusudur. Fibroblastlar çoğunlukta olmak üzere, mast hücresi ve makrofajlar gibi çok sayıda hücre içerir. İnce kollajen lifler ve bol miktardaki elastik lifler bu tabakada gevşek bir ağ oluştururlar (29, 30, 37, 89).

## 2. Stratum Retikulare (Derin ve Kalın Bölüm)

Sıkı düzensiz bağ dokusu yapısında olup, kalın kollajen demetler içerir. Ayrıca az sayıda retikulum ve çok sayıda elastik lif bulunur. Bağ dokusu hücreleri oldukça azdır. Lifler çoğunlukla yüzeye paralel seyrederek. Liflerin yönlerine göre deride gerilme çizgileri oluşur. Bu çizgiler cerrahide önemlidir, deri insizyonları bu çizgilere paralel yapılırsa gelişecek skarlar minimal olur (29, 30, 37, 57, 89).

### 2.1.1.2.1. Dermal Bağ Doku

Yapısal bileşeni bakımından bağ dokusu üç alt bileşene ayrılır. Hücreler, lifler ve temel madde. Temel madde, bağ dokusunun hücre ve liflerin arasındaki boşlukları dolduran, hücreleri bağ doku liflerine bağlamada rol alan, lubrikasyon yapan sulu jeller ve matriks elemanları (proteoglikanlar ve GAGs) ile hücreleri birbirine bağlayan adheziv glikoproteinlerin kompleks bir karışımı olup renksiz saydam, homojen ve visköz yapıdadır (57, 89). Direnci oluşturan fibröz yapısal proteinler (kollajen ve elastik lifler ve temel madde ekstrasellüler matriks (ECM) olarak isimlendirilir. ECM içinde gömülü olarak bağ doku hücreleri bulunur. Bağ dokusu hücreleri metabolitlerin birikiminde, immün ve inflamatuvar cevaplarda ve hasardan sonra doku tamirinde önemli rollere sahiptir (66).

ECM lokal olarak yapılan, dinamik, kalıcı taslak yapan makro moleküler bir komplekstir. ECM, kemik rijiditesi ve yumuşak doku turgoru sağlanmasının yanı sıra, hücre adhezyonu için substrat sağlar ve hücrelerin büyümesi, hareketi ve diferansiyasyonunu düzenler. ECM iki temel şekilde oluşur; interstisyel matriks ve bazal membran (BM) (66).

**İnterstisyel matriks:** bağ dokusu ve epitel ile destekleyici damar ve düz kas yapıları arasında bulunur. Mezenkimal hücreler (örneğin, fibroblast) tarafından yapılır ve üç boyutlu amorf jel oluşturmaya eğilimlidir. Ana yapısı proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler ile liflerdir (43, 66).



**Bazal membran:** ECM, bağ dokusu interstisyel matriksinde rasgele düzenlenmiştir ancak epitel hücreleri, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri çevrelerinde ileri derecede organize olarak bazal membranı oluşturur. BM kendisini sentezleyen üzerindeki epitel ve altındaki mezenkimal hücrelerin arasında *kümes teli* biçiminde plaka benzeri bir yapıdır. Bu bölge 150-500Å<sup>0</sup> kalınlığındadır. Ana elemanları amorf fibrilsiz tip IV kollajen, heparan sülfat içeren proteoglikan ve glikoproteinlerden laminin ve fibronektindir (43, 66).

Ayrıca epitel ve epitel olmayan hücreler ECM bileşenleri için reseptörlere sahiptir. Bu reseptörler laminin ve fibronektin için bağlanma afinitesi içeren integrin ailesidir (66).

### **Ekstrasellüler Matriksin Rolü**

ECM'in hücreler etrafında dolgu maddesi olmanın ötesinde çeşitli rolleri vardır (66).

- Hücrelere mekanik destek sağlar. Adhezyon yokluğunda çoğu hücre tipleri ölür.
- Hücre oryantasyonunun sağlar (polarite). Çoğu hücrede fonksiyon için önemli yönler bazolateral ve apikaldir (örn: sindirim kanalında besin absorpsiyonu veya pankreastan sindirim enzimlerinin salgılanması) .
- Hücre büyümesini kontrol eder. Büyüme ve diferansiyasyon hücre adhezyonu ve biçimi ile kontrollüdür. Adheziv hücreler daha proliferatiftir.
- Hücre diferansiyasyonunun sürdürülmesini sağlar. ECM protein tipi diferansiyasyon derecesini etkiler. İlginç olarak aynı ECM mekanik etkene göre farklı etkidedir.
- Doku yenilenmesinde görev alır. Tüm dokular dinamik olarak yenilenir ve yapılarını koruyabilmek için sağlam BM'ye gereksinim duyarlar. Labil ve stabil hücreler rejenerasyon gücünde olmalarına rağmen bu dokuların hasarı normal yapının kazanılması ile sonuçlanamaz. Parankima hücreleri altındaki stromanın ve özellikle bazal membranın devamlılığı, rejenere dokunun organizasyonunda çok önemlidir. Eğer

bazal membran parçalanmışsa hücreler düzensiz proliferasyon olarak disorganize ve nonfonksiyonel dokular oluşur. Labil veya stabil dokuların aşırı hasarı fibroblast (mezenkimal) popülasyonunun ekspansiyonuyla hakim olarak skar oluşumunu sonuçlar.

- Mikro çevre sağlar. BM epitel ve alttaki bağ doku arasında sınır oluşturur. ECM infeksiyon etkenlerini arayan iltihap hücrelerini de tutar.
- Regülatör moleküllerin depolanması ve prezentasyonunda görevlidir. Örneğin fibroblast büyüme faktörü ( FGF) normal dokularda BM tarafından ekstremite edilir ve depolanır, bu lokal zedelenmede hücrelerin hızlı büyümesini olanaklı kılar.
- Savunmada görev alır. Dışarıdan gelen saldırganlara karşı engel görevi görür.

## 2.2.YARA İYİLEŞMESİ

Herhangi bir ajanın fiziksel bir hasar yaratmasıyla vücuttaki normal yapılarının bütünlüğünün bozulması şeklinde oluşan doku kayıplarına yara denir (31). Yara kelimesinin karşılığı olarak erozyon, ülser ve fissür terimleri de kullanılır. Erozyon, dermise ulaşmayan fokal epidermis kayıplarını tanımlayan bir terimdir, iz bırakmaz ve kronik değildir. Fissür, çatlak şeklindeki dikey yaraları tanımlayan doku kayıplarıdır. Epidermis ve/veya dermisi etkileyebilir. Ülser ise dermis ve epidermisi tümüyle etkileyen fokal doku kayıplarıdır. Ülserler bazen kronikleşerek, klinisyenler açısından zaman zaman tedavisi zor durumlar yaratabilirler. Yaraların iyileşmesi için kesin süreler verilemez ancak makul sürede iyileşemeyen yaralar, yavaş veya az iyileşme gösteren yaralar için kronik deyimini kullanılır, iyileşme hastanın genel durumundan, tedavi protokolü gibi değişen birçok faktöre bağlıdır (67).

Bir insizyonla oluşturulan doku hasarlarında ilk yanıt genellikle kanamadır. Koagülasyon ve vasokontraksiyon kaskadı hemen yaraya implante olan ve hemostazise neden olan kanın pıhtılaşmasıyla başlar ve dehidratasyonla birlikte yara kabuğu oluşur. Hücresel maddelerin ve mediatörlerin salgılanması ve inflamatuvar hücrelerin istilasıyla devam eder. Yeni sellüler ve ekstrasellüler komponentlerin salgılanmasının ardından angiogenezis ve re-epitelizasyon meydana gelir (8, 58).

## **2.2.1.YARA İYİLEŞMESİNİN TIPLERİ**

Yara iyileşmesi genellikle primer, sekonder ve tersiyer yara iyileşmesi olarak sınıflandırılır. Farklı sınıflandırmalar olmasına karşın tüm yaralarda hücrel etkileşimler ve ekstrasellüler bileşenler benzerdir ve hedef hasarlı bir dokunun iyileşmesidir (1, 5, 24, 25, 52, 68, 69, 71, 76, 96, 97, 115).

### **2.2.1.1.Primer Yara İyileşmesi**

Primer iyileşme, oluştuğu saatler içerisinde bir yaranın kapanmasını içerir. Temiz bir insizyon olduğunda ve yara kanarları dikişle yan yana getirildiğinde görülen iyileşme yara iyileşmesinin en az komplike örneğidir ve primer iyileşme yada birleşme olarak adlandırılır. Bu cerrahi işlemde hücrel bileşenler minimal sayıda hasarlanır. İnsizyon, sınırlı sayıda epitel ve bağ dokusu hücresi yıkımına sebep olur, insizyon alanı dardır, hemen fibrin ve kan hücreleri içeren pıhtı ile dolar. Yüzeydeki pıhtının dehidratasyonu ile krut meydana gelir. Krut yarayı örter ve dış çevreden izole eder (31).

### **2.2.1.2.Sekonder Yara İyileşmesi**

Sekonder iyileşme yaranın büzülme ve re-epitelizasyonla kendiliğinden kapanmasını içerir. İnfarktüs, inflamatuvar ülserasyon, apse oluşumu ve geniş doku defektleri olan yüzey yaralanmalarında olduğu gibi aşırı miktarda hücre ve doku kaybı olur ve iyileşme süreci daha komplikedir. Parankima hücrelerinin rejenerasyonu tam anlamıyla orijinal yapıyı oluşturmaz. Onarımı tamamlamak üzere fazla miktarda granülasyon dokusu oluşur. Bu tip yara iyileşmesine sekonder iyileşme yada birleşme denir. Yine de temel olaylar "primer iyileşme" ile benzerdir. Aradaki farklar, inflamatuvar reaksiyonun daha şiddetli, granülasyon dokusunun daha fazla miktarda oluşu ve yara kontraksiyonudur. Akut inflamasyon

ve debrisin temizlenmesine epiderminin yara kenarı boyunca aşağı doğru ilerlemesi eşlik eder. Epitel canlı dermisi nekrotik dokudan ayırır (31).

### **2.2.1.3. Tersiyer Yara İyileşmesi**

Tersiyer yara iyileşmesi ayrıca primer iyileşmesinin gecikmesi olarak ta bilinir. Yara uzun bir dönemde iyileşir. Bu tip iyileşmelerde yara kontamine olmuş olabilir. 4. güne kadar kontamine dokunun fagositozu, epitelizasyonu, kollajen sentezi ve maturasyonu meydana gelir. Fagositoz sırasında yabancı materyaller makrofajlar tarafından kuşatılır. Eğer yara temizlenmezse kronik inflamasyon ortaya çıkar ve belirgin yara iziyle sonuçlanır (31).

### **2.2.2. YARA İYİLEŞMESİNDEKİ HÜCRESEL AKTİVİTELER**

Normal yara iyileşmesi, birçok hücrenin düzenli ve ard arda çalışması ile gerçekleşir. Bu aktiviteler (18);

**1. Fagositoz;** Fagositoz; iltihapta en önemli olaydır. Fagositler zararlı etkenleri içlerine alarak onları parçalar, zararsız hale getirir veya eritirler. Polimorf nüveli lökositler ve makrofajlar, primer fagositik hücrelerdir.

**2. Kemotaksis;** Kemotaksis hücrelerin bir engelle karşı göçüdür. Yara iyileşmesinin çeşitli fazlarında rol oynayan hücreleri etkileyen kemotaktik ajanlar, iyileşme olayına çok önemli katkılarda bulunurlar.

**3. Mitogenez;** Mitogenezi uyaran ajanlar yara iyileşmesi için gerekli hücre bölünmesini sağlar.

**4. Kollajen sentezi;** Esas olarak fibroblastlarca sentezlenen protein ve glikoproteinler, kollajen ve ara maddeyi oluşturarak yara iyileşmesinde kritik bir noktanın tamamlanmasını sağlar.

**5. Diğer matriks komponentlerinin sentezi;** Yara kontraksiyonu ve skarın yeniden ęekillenmesi yara iyileşmesinin son basamaklarını oluşturur.

Bu hücreselel aktiviteler gelişigüzel değil düzenli ve uyumlu bir şekilde sürer.

### **2.2.3. YARA İYİLEŞMESİNİN FAZLARI**

Yara iyileşmesi sürecindeki aşamalar;

- 1) Hemostazis,
- 2) İnflamatuar
- 3) Migrasyon/proliferasyon
  - Epitelizasyon
  - Fibroplazi
  - Angiogenesis
  - Kontraksiyon
- 4) Skar maturasyonu (1, 5, 24, 25, 52, 68, 69, 71, 76, 96, 97, 115)

#### **2.2.3.1. HEMOSTAZİS FAZI**

Zedelenmiş kan damarlarından kan akımının önlenmesi hemostazis olarak tanımlanır. Hemostazis; bir enzim (aktif pıhtılaşma faktörü), bir substrat (pıhtılaşma faktörünün proenzim hali) ve bir kofaktörden (reaksiyon hızlandırıcı) oluşan reaksiyon topluluğudur. Bu komponentler bir fosfolipit yüzeyinde toplanır ve kalsiyum iyonları tarafından birleştirilir. Bu yüzden hemostazis aktive olmuş trombositlerin yüzeyi gibi, böyle bir topluluğun bir arada olabildiği yerlerde sınırlı kalma eğilimindedir (84).

Kan damarları yaralanınca, önce trombositlerin adhezonu ve agregasyonu gözlenir. Bu olayda ilk olarak trombositler subendotel tabakadaki kollajen, kapiller bazal membranı, fibroblastlar ve düz kas hücreleri gibi damar duvarının bir çok elemanı ile temas eder. Bunların hepsi trombosit adhezyonuna yol açabilmekle birlikte, en

kuvvetli uyarın kollajendir. Kollajenle temas eden trombositler adhezyon, sekresyon, agregasyon gibi bir dizi değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerin tümüne *trombosit aktivasyonu* adı verilir. Trombositin zedelenme sonucu açığa çıkan kollajenle teması büyük ölçüde pıhtılaşma faktörlerinden olan von Willabrand Faktörü (vWF)'nün trombositin yüzey reseptörleri ile kollajen arasında köprü vazifesi görmesiyle gerçekleşir. Bu birleşme sonucunda, trombositin hemen yoğun granüller salınır (ADP, serotonin vb. içerir). ADP özellikle önemlidir, çünkü trombosit agregasyonunda ve diğer trombositlerden ADP salgılanmasının artırılmasında görev alacaktır. Serotonin ise güçlü bir vazokonstriktördür (68, 84).

Daha sonra karaciğerde sentezlenip kana verilen protrombin, trombine dönüşür. Bu dönüşüm ya ekstrinsik sistemle (yaralanmış dokudan) pıhtılaşma faktörlerinden doku faktörü (doku tromboplastini) aracılığıyla ya da intrinsik sistem (kanda mevcut maddelerden) aracılığıyla olur. Trombin trombositleri yapışkan yapar ve kollajen, ADP ve trombin etkisiyle trombosit agregasyonu meydana gelir. Giderek büyüyen ve kendi kendini yenileyen bu mekanizma küçük damarlarda tek başına bir tıkaç olarak kanamanın kontrol altına alınması için yeterli olabilir. Ayrıca trombin ve kollajen trombositleri uyarınca; trombosit membranında bulunan araziidonik asitten siklookligenaz enzimi aracılığı ile siklik endoperoksitler (prostaglandin G<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>) meydana gelir. Siklik endoperoksitler de trombositlerde bulunan tromboksan sentetaz aracılığı ile tromboksan A<sub>2</sub> 'yi meydana getirir. Tromboksan A<sub>2</sub> hem güçlü bir vazokonstriktör hem de çok kuvvetli bir trombosit agregasyonunu arttırıcı bir maddedir. Trombin, tromboksan A<sub>2</sub> ve artan ADP etkisi altında trombositler sıkışır ve başlangıçtaki geçici trombosit tıkaçının yerini kalıcı trombosit kitlesi alır (8, 68, 84).

Trombinin diğer bir önemli görevi; kan pıhtılaşmasının esas reaksiyonu, primer kaynağı karaciğer olan, ayrıca akciğer epitelinden de az miktarda üretilebilen, eriyebilen bir plazma proteini olan fibrinojenin erimeyen lifsel bir protein olan fibrine dönüştürülmesidir. Bu sırada açığa çıkan fibrinopeptidler damar permeabilitesini artırırlar ve lökositlere kemotaktiklerdir. Fibrin ince iplikler halinde bir ağ teşkil ederek koagülasyon sürecinin oluşması için iskelet oluşturur. Bu iplikler çok yapışkandır;

birbirine, kan hücrelerine ve dokuya yapışarak hemostazisi sağlar. Fibrin iplikleri ve aralarına tutunmuş olan kan hücreleri pıhtıyı meydana getirirler (68).

Trombin oluşumuna kadar tüm aşamalar pozitif feedback mekanizmasıyla kontrol edilirken, trombin, fibrin şekillenmesi ve fibrinin stabilizasyonu negatif feedback mekanizmasıyla kontrol edilir. Böylece pıhtılaşmanın tüm damar sistemine yayılmayıp damar zedelenmesinin olduğu yerle sınırlı kalması sağlanır (68).

Fibrinolizis ile fibrin ve pıhtılaşma faktörleri parçalanırken, fibrin parçalanma ürünleri (FPÜ) meydana gelir. Bu ürünler antitrombiktirler, fibrinin stabilize olmasını ve trombosit agregasyonunu önlerler. Diğer bir anti-koagülan plazminojen-plazmin sistemidir. Plazminojen aktivatör (endotel, lökosit kaynaklı) plazminojeni aktif hali olan plazmine parçalar. Plazmin ise fibrini parçalar ve fibrin polimerizasyonunu kontrol eder. Fibrinin yan ürünleri de permeabiliteyi artırır. Plazmin, ayrıca inflamasyonda önemli rol oynayan ve plazmada inaktif formlar halinde bulunan kompleman komponentleri (C1-C9) aktive eder. C3'ü vasodilasyon ve permeabiliteyi artıran C3a ya dönüştürür .

Böylece yavaş yavaş pıhtı kontraksiyon yapmaya başlar ve başlangıçtaki volümünün %40'ı kadar küçülür (84).

### **2.2.3.2.İNFLAMATUAR FAZ**

Yaklaşık 0-4 gün süren bu dönem bedenin zedelenmeye tepkisi olarak ortaya çıkar. İnflamasyon, hemostazis ve fagositoz ile karakterizedir. Yara oluşumu boyunca üretilen kollajen, pıhtılaşma kaskadının hem esas hem harici yolaklarını aktive eder ve inflamatuvar fazı başlatır (102).

### **2.2.3.2.1. İnflamatuvar Faz Olayları**

Hasarlı dokudan çıkan kimyasal maddelerin etkisi ile bir dizi damarsal reaksiyon ortaya çıkar. Bu reaksiyonların bazıları aynı anda oluşur. Bu ardışık olaylar şunlardır (52, 61, 66, 78, 85):

- Vazokonstriksiyon
- Vazodilatasyon
- Damar duvarı geçirgenliğinde artma (permeabilite artışı)
- Sıvı ve hücre eksüdasyonu
- Kan akımında değişiklik
- Kemotaksi
- Fagositoz

#### **2.2.3.2.1.1. Vazokonstriksiyon**

Hemostatik cevapta lokal doku faktörleri (serotonin, tromboksan A<sub>2</sub> gibi) vazokonstriksiyonu başlatırlar. inflamasyon etkeni ne olursa olsun, genellikle ilk görülen etki; kısa süreli arteriol daralmasıdır ve birkaç dakika sürer. Bu sırada dokunun zedelenen bölgesinde kısa süren bir solukluk olur (66).

#### **2.2.3.2.1.2. Vazodilatasyon**

Vazokonstriksiyonu takiben sırasıyla arteriol ve venüllerde genişleme olur. Yara alanında yeni mikrovasküler yataklar açılır. Artan kan akışı sonucunda yara bölgesinde kırmızılık belirir, ısı artar. Vazodilatasyonda, zedelenen dokudan çıkan kimyasal maddeler yanında vazomotor sinirlerin de rolü vardır ve bu uyarıcılar vazodilatasyonun ne kadar süreceğini belirler (66, 71).



### 2.2.3.2.1.3. Damar Duvarı Geçirgenliğinde Artma ( permeabilite artışı)

Normal koşullarda kılcal damarlar yarı geçirgendir. Su ve elektrolitler, arteriol ucundan dokulara geçer, venül ucundan ise damarlara geri alınırlar. Büyük molekülü proteinler ve hücreler damarlardan çıkamazlar. Sıvının damar dışına çıkması ve geri alınması damar içindeki hidrostatik ve osmotik basıncın etkisi ile olur. Normalde kılcal damarların arteriyol tarafındaki hidrostatik basınç 25-30 mm. Hg'dır (66, 84).

İnflamasyonun en erken fazında, vazodilasyon ve artan kan akışı intravasküler hidrostatik basıncı arttırır ve 60 mm. Hg.'ya yükselir. Kapillerin venül tarafındaki normal hidrostatik basınç 12 mm. Hg iken inflamasyonda 30 mm. Hg.'ya kadar çıkar. Kanın ozmotik basıncı ise değişmeyip 25 mm. Hg basıncına uyar. Hidrostatik ve ozmotik basınç arasındaki fark nedeni ile sıvı kapillerden damar dışına çıkar. *Transuda* olarak adlandırılan, az protein içeren bu sıvı kan plazmasının ultrafiltratıdır. Transudasyon kısa sürede damar duvarının permeabilitesini arttıracığından bu çıkış hızlanır. Su ve elektrolitlerin yanı sıra büyük molekülü proteinler de damardan interstisyel dokuya çıkarlar. Proteinden zengin bu sıvıya ise *eksuda* adı verilir (66, 84).

Damarlarda geçirgenliğin artmasına, zedelenen hücrelerden serbestleşen aracı maddeler neden olur. Bunların en önemlileri: aminler (histamin, serotonin), kininler ve kinin yapımını sağlayan enzimler (kininler, bradikinin, kallidin, enzimler, kallikrein, globulin permeabilite faktörü, plazmin), kanın kompleman sistemi, polimorf nüveli lökositlerden çıkan biyolojik olarak aktif maddeler, prostaglandinler ve diğer maddeler (lenfokinler, sinir uçlarından salınan asetil kolin, nükleik asit yıkım ürünleri vb.) (66).

Normal sıvı değişimi ve mikrovasküler permeabilite normal bir endotele bağımlıdır. Endotel hücrelerinin inflamasyonda nasıl geçirgen hale geldiği ile ilgili en az dört mekanizma vardır (66).

1. Yukarıda belirtilen maddelerin etkisi ile damar duvarındaki endotel hücreleri kontraksiyon yapar, birbirinden ayrılarak genişlemiş intersellüler bağlantıların veya

intersellüler deliklerin oluşmasına neden olur. Bu vasküler permeabiliteyi meydana getiren en olağan mekanizmadır. Kan ile doku arasında sadece bazal membran kalır.

2. Endotel hücre nekrozu ve ayrılmasıyla sonuçlanan direkt endotel incinmesi; bu mekanizma genellikle şiddetli incinmelerde meydana gelir (şiddetli yanık, litik bakteriyel enfeksiyonlar gibi). Çoğu durumda sızıntı incinmeden hemen sonra başlar ve hasar gören damar tromboze oluncaya veya tamir edilinceye kadar birkaç saat veya gün yüksek seviyelerde tutulur.

3. Lökosit bağımlı endotelyal incinmesi; lökositler, inflamasyonda nispeten erken dönemde bir araya toplanır ve endotele yapışır, toksik oksijen türleri ve proteolitik enzimler çıkararak aktive olurlar ve endotel incinmesi veya ayrılmasına neden olurlar.

4. Rejenere kapillerlerin sızıntı mekanizması; tamir esnasında, endotel hücreleri çoğalarak yeni kan damarları oluşturur. Bu kapiller tomurcuklar, endotel hücreleri diferansiye oluncaya kadar ve intersellüler birleşmeleri oluşturuluncaya kadar sızıntılı kalır. Bu mekanizma yara iyileşmesinde inflamasyonunun karakteristik ödemi meydana getirir.

Hücreler arasında meydana gelen aralıklardan su, büyük moleküllü proteinler ve polimorf nüveli lökositler damar dışına çıkar.

Yara iyileşmesinin çeşitli evrelerinde ayrı ayrı işlev gören bu mekanizmaların hepsi birden işlev görecektir (66).

#### **2.2.3.2.1.4. Sıvı ve Hücre Eksüdayonu**

Normalde kan elemanları damardaki plazma içinde akarlar. Bu akış bir düzene göre olur. En büyük hücreler olan lökositler ortada, eritrositler bunun dışında,

trombositler ise kenara yakın bölgede akarlar. Damar duvarına yakın bölgede serbest plazma akar. Bu düzene *zonal akım* denir. İnflamasyon başlarken meydana gelen yüzeyel elektrik yükü değişimleri eritrositlerin birbirlerini itmesini engeller. Birbirlerine yapışarak büyük kümeler yaparlar. Bu kümeler lökositlerden büyük olduğu için orta kısma geçerler. Lökositler radyal bir hareketle duvara (endotele) doğru itilir. Bu itilme olayına *marjinasyon* adı verilir. Bu sırada artan hidrostatik basınç ve permeabilite nedeni ile plazma da damar dışına çıkar ve lökositler endotele yapışır. Bu olaya *adezyon* denir. Lökositler endotel hücresi üzerinde kayarak iki endotel hücresi arasına psödopod uzatır sonra da kemotaktik bir uyarıya doğru aktif amöboid hareketle damar dışına çıkar. Bu olaya *emigrasyon* adı verilir. Damar dışına çıkan lökositler dakikada 20 µ yol alırlar. Kemotaktik maddelerin de etkisi ile zedelenen bölgede toplanırlar. Bu alana sıvı daha önce gelmeye başlamıştır. Damarlardan sıvı çıkmasına *sıvı eksüdasyonu*, hücre çıkmasına *hücre eksüdasyonu* denir. Zedelenme bölgesinde toplanan sıvı ve hücrenin tamamı ise *iltihabi eksüda* adı ile anılır. Zararlı etken dokuda kaldığı sürece sıvı ve hücre eksüdasyonu devam eder. İltihap kronikleştikçe eozinofil lökositler ve monositler de emigrasyon ile iltihap bölgesine gelirler (58, 71, 76, 1002).

Eritrositler diğer hücrelerin peşinden sürüklenerek pasif olarak damar dışına çıkarlar. Bu olaya *diapedez* denir. İltihap kronikleştikçe doku monositleri de bu alana göç ederler. Akut iltihabi eksüda içinde bol polimorf nüveli lökosit ve ölen lökositlerden kalan nüve kırıntıları bulunur. Bu tür eksüdaya *pürülan (cerahatli) eksüda* adı verilir. İltihap kronikleştikçe, ömürleri kısa olan polimorf nüveli lökositler azalır ve mononükleer hücre sayısı artar. Monositler eksüdanın asit ortamına dayanıklıdırlar, uzun yaşarlar ve bölünerek çoğalabilirler (66, 76).

Eksüda içinde hücrelerden başka, önemli kısmı plazma olan sıvı içinde nekrotik hücre artıkları, fibrinojen, fibrin, opsonin, kompleman ve immün globulinler ile hastaya verilen ilaçlar bulunur. Bağ dokusunun ara maddesi hyaluronik asitten yapılmıştır. Normalde jel olan bu madde, zararlı etkenlerin çıkardıkları hyaluronidaz fermenti etkisi ile sıvılaşır. Sıvılaşma sonucu o bölgede toplanan zararlı maddeler sulandırılmış olur. Ayrıca kandan gelen maddeler (eksüda) daha geniş bir alana yayılabilir ve hidrostatik

basınç artışı engellenir. Bazen de hastalık etkenleri doku aralıklarına ve daha geniş sahalara bu sıvılaşma nedeni ile yayılabilir (66).

#### **2.2.3.2.1.5. Kan Akımında Değişiklik**

İnflamasyonun başlangıcında, kapiller, arteriyol ve venülde genişleme olur. Bu geniş alana aniden kan dolar ve kan akımı kısa süre için hızlanır. Buna *aktif hiperemi* denir. Bir süre sonra genişlemiş damar yatağı kanla dolar ve kan akımı yavaşlar. Bu olaya *pasif hiperemi* denir. Bu sırada ortamda H<sup>+</sup> iyonları artar ve asitleşir. Asit ortam damar genişlemesinin sürekli olmasını sağlar. Kan plazmasının damar dışına çıkması ile damar içindeki hücreler kolay akamazlar başka bir deyişle "kanın viskozitesi" artar. Bu olay da kan akımının daha fazla yavaşlamasına neden olur. Hatta, kan akımı bir süre durabilir. Kan akımının durmasına *staz* adı verilir. Staz, bazen trombüs oluşumu ile beraberdir. Bu durumda, damarların beslediği doku bölgesine az O<sub>2</sub> gider ve doku nekroz olur. Kanın viskozitesi (yapışkanlığı) artınca lökositler kenara yaklaşır. Kümelenen eritrositler ortaya geçer. Dolayısı ile laminar akım bozulur (58, 66, 84).

#### **2.2.3.2.1.6 Kemotaksis**

Kemotaksi bitki ve hayvanların yabancı maddeleri tanımlarına ve beslenmelerine yardım eden güçtür. İnflamasyonda kemotaksis hücrelerin bir engelle karşı göçü olup inflamatuvar hücreleri, fibroplazi ve anjiogeneze rol oynayan hücreleri etkileyen kemotaktik ajanlar, yara iyileşmesi olayına katkıda bulunur (18, 66, 84).

İnflamasyonda lökositlerin göçü kemotaksi ile başlar. inflamasyon sırasında bulunan veya ortaya çıkan bazı maddeler lökositlerin sitoplazmalarında bulunan hareket sistemini etkiler. Hücreler bu maddelerin etkisi ile belli bir yöne hareket eder ve belli bir odakta toplanırlar. Kemotaktik maddeler endojen veya eksojen olabilirler. Endojen kemotaktik maddelere örnek; Antijen + Antikor + Kompleman kompleksleri, özellikle C5a, arakidonik asit metabolizmasının lipoksigenaz yolla olan ürünleri, özellikle leukotrien B<sub>4</sub>, eksüdanın ve kompleman sisteminin ayrışma ürünleri, nükleik asit yıkım

ürünleridir. Eksojen kemotaktik maddelere örnek olarak da bakterileri, bakteri filtratlarını, bakteri endotoksinlerini sayabiliriz (66)

### **2.2.3.2.1.7 Fagositoz**

Fagositoz; iltihapta en önemli olaydır. Fagositler zararlı etkenleri içlerine alarak onları parçalar, zararsız hale getirir veya eritirler. Ölen hücrelerin artıklarını fagosite ederek ortamı temizlerler. Eksüdata bulunan opsonin bakterileri sararak onları fagositoza hazırlar. Fagositler yabancı cisim ya da bakteriye yaklaştıkları ve değdikleri zaman zarlarında bir çöküntü olur ve bu cismi sarar. Cisim zardan kopan bir vakuol içinde taşınır. Buna fagozom denir. Hücre içindeki bu vakuole yaklaşan bir lizozom onunla birleşir ve içindeki enzimleri boşaltır. Bu şekilde cisim eritmeye çalışılır. Fagosit bazen yabancı cismi yok edemez, bazen de yabancı organizma fagosit içinde çoğalabilir ve fagositi parçalayarak tekrar ortama döner (18, 66).

Polimorf nükleuslu lökositler ve makrofajlar, primer fagositik hücrelerdir. Monositler kandan dokuya çıktıktan sonra orada çoğalır, büyür ve fagositlere dönüşürler. Bunların bir kısmı ise doku histiyositlerinden meydana gelmiştir. Polimorf nüveli lökositler de fagositoz yaparlar. Monositlerden oluşan fagositlere makrofaj; polimorf nüveli lökositlere ise mikrofaj denir ( 18)

### **2.2.3.2.2. İnflamatuvar Hücreler**

İltihap odağı mikroskopik olarak incelendiği zaman görülebilecek hücreler şunlardır (76):

#### **■ Polimorf Nükleer Lökositler (PMNL)**

- Nötrofil Lökositler
- Eozinofil Lökositler
- Bazofil Lökositler

- Mononükleer Lökositler (MNL)
  - Monositler (Dev hücreler)
  - Lenfositler
  - Plazmasitler

#### 2.2.3.2.2.1 Polimorf Nükleer Lökositler

Polimorf nükleuslu lökositler sitoplazmalarındaki granüllerin boyanma özelliğine göre üçe ayrılırlar (66).

#### Nötrofil Lökositler

Kemik iliğinde yapıp periferik kana verilirler. Kan yaymalarında 100 hücreden 50-70'i nötrofil lökositlerdir. Çapları 10-15 mikron kadardır. Sitoplazmalarında asit ve bazik boyalar ile boyanmayan granüller bulunur. Bu granüller proteaz, lipaz, nükleotidaz, peroksidaz, asit fosfataz ve karbonhidraz gibi enzimler taşırlar (57, 66).

Yara alanına plateletlerden sonra göç eden ikinci hücredir. Nötrofiller çoğalmazlar. İltihap odağındaki asit ortama fazla dayanıklı değildirler. Üç dört günde ölürlür. Öldükleri zaman ortamda serbest kalan granüllerindeki enzimler, hücre dışı sindirim yaparak ölü dokuları eritir ve su haline getirirler. Yara iyileşmesinde nötrofiller; debrisin uzaklaştırılmasından, bakterilerin opsonizasyonundan, oksidatif reaksiyonlar sonucu (superoksit ve hidrojen peroksit oluşumu) bakteri yıkımından sorumludur (66, 76).

İltihabi dokuda postkapiller venül endoteli, inflamasyonun sebebine bağlı olarak endotoksin, aktif makrofajların salgıladığı IL-1, TNF  $\alpha$ , sitokinler, C3a, C5a, histamin, LTC4 ve trombin ile aktive olmuştur. Aktif hale gelen endotel üzerinde E ve P selektinler belirir. Nötrofiller; yüzeylerinde bulunan glikoprotein yapısındaki karbonhidrat parçalarıyla (L-selektin gibi) inflamasyon nedeniyle yavaşlamış olan damar içi kan akımının tesirinden kurtularak, aktif endotel üzerindeki sülfatlı fukozile,

sialize ve glikoprotein yapılara tutunur (bu yapılar muhtemelen E ve P selektin'dir). Bu safhaya *gevşek tutunma* denir. Gevşek tutunma, daha sonra oluşacak olan kuvvetli bağlanma için gereklidir. Bu safha olmazsa daha sonraki nötrofil integrinleri ile endotel ICAM-1 arasındaki bağlantı sağlanamaz (8, 76).

Damar dışı dokuya geçiş (transmigirasyon) ancak kuvvetli bağlanmayı takiben oluşur. Endotele gevşek olarak bağlanmış olan nötrofillerin IL-8, C5a ve trombosit aktive edici faktör (PAF) etkisiyle uyarılması yüzeylerindeki LFA-1 ve Mac-1 moleküllerinin hem sayısını artırır, hemde yapılarında değişikliklere yol açar ki, bu olaya *sinyal oluşturma (signaling)* denir. IL-8 ve PAF aktif endotelden salınmakta ve haptotipik bir aktivite göstermektedir. Böylece nötrofiller çok daha sıkı bir şekilde yine sitokin ve endotoksin uyarımıyla artırılmış olan endotel ICAM-1 molekülüne bağlanır. Bu olaya *sıkı bağlanma* denir. Sıkı bağlanma safhasında nötrofiller L-selektinlerini kana dökerler. Kana dökülen bu moleküllerin kaderi ve hücreye bağlı olan L-selektin ile yarışıp yarışmadığı henüz kesin olarak anlaşılamamıştır (8).

Diapedezis için nötrofillerin üzerinde devamlı olarak Mac-1 ekspresyonu gerektirir. Diğer taraftan migirasyonun oluşabilmesi için nötrofillerin ve endotel hücrelerinin yüzeyinde integral bir membran glikoproteini olan CD47'nin eksprese olması gerekir. Eğer bu molekül hücre yüzeyinde eksprese olmazsa hücreler migirasyonda başarısız olurlar. Bu molekülün epitel hücreleri üzerindeki ekspresyonları IFN  $\gamma$  etkisiyle artırılır. Subendotelyal bazal membrandan nötrofillerin migirasyonunun, bu hücrelerin granüllerinden salınan proteinazlar vasıtasıyla membran elemanlarının yıkımına bağlı olduğu görülür. Örneğin;

-Tip IV kollajeni yıkma yeteneğinde olan ve nötrofillerde bulunan bir metalloproteinaz olan gelatinaz B'nin inhibisyonu nötrofillerin bazal membrandan migirasyonunu etkilerken, kemotaksis ve degradasyonu etkilemez (8).

-Jelatinaz B'yi aktive eden nötrofil elastazının inhibisyonu bazal membrandan geçişi bloke eder (8).

-Nötrofillerin bazal membrandan göçü subendotelial kollajenin tipine bağlı olarak değişir. Tip I kollajen nötrofilleri aktive ederken, tip IV kollajenin alfa 3 bölgesi bu fonksiyonları azaltır (8).

Bu şekilde bazal membran ile temas ederek endotel altına ve sonra dokuya geçen nötrofiller çeşitli enzimler salgılayarak ve kemotaktik ve gradient uyarınca ilerleyerek efektör fonksiyonlarını gösterebilirler (8, 66, 76).

### **Eozinofil Lökositler**

Kemik iliğinde yapılırlar. Sitoplazmalarında eozin ile koyu pembe-kırmızı boyanan iri granülleri vardır. Periferik kan yaymalarında lökositlerin %1-2'sini oluştururlar. Allerjik ve paraziter hastalıklarda kanda ve iltihabi eksüdata oranları artar. Kronik iltihaplarda damarlardan göç ederek eksüda içine gelirler (57, 76).

### **Bazofil Lökositler**

Bu hücrelerin granülleri büyük ve bazofiliktir. Periferik kandaki lökositlerin %0.5'ini oluştururlar. Bu lökositler hipersensibilite (aşırı duyarlılık) iltihaplarında bulunurlar (57, 66).

### **2.2.3.2.2. Mononükleer Lökositler (MNL)**

#### **Monositler**

Kemik iliğinde yapılırlar. Kandaki oranları %8-10 kadardır. Lökositlerin en büyüğüdür. Sitoplazmalarında granül görülmez. Nükleusları parçalı değildir. Bu nedenle mononükleer hücre grubuna girerler (57).



İnflamasyonda polimorf nüveli lökositlerden sonra damarlardan monositler çıkarlar. Uzun ömürlü olduklarından ve dokuda çoğalabildiklerinden, iltihap kronikleştikçe sayıları polimorflar aleyhine artar. İltihap odağında çoğalma hızları fazladır. Bunun, iltihap eksüdasındaki bir faktörle ilgili olduğu ve bu faktörün monositin DNA'sını etkilediği sanılmaktadır. İltihap odağına gelen monositler, buradaki bakterilerin, endotoksinleri ve antijen ile karşılaşarak aktive olmuş T lenfositlerinin salgıladığı lenfokin denilen maddenin etkisi ile değişerek aktif makrofaj halini alırlar. Aktif makrofajların sitoplazmaları daha geniş olup, mitokondrileri, lizozomları ve hidrolitik enzimleri artmıştır. Metabolizmaları artmış olduğundan fagositoz yetenekleri yüksektir. Makrofajlar düzenleyici (orkestratör) gibi davranırlar ve yara iyileşmesi için gereklidirler. Tüm hücrel artıkları ve matriksin yaralarını temizleyen obur fagositler gibi davranır. Hücre içine aldıkları bakteri veya malign hücreleri hemen öldürebilirler. Ortama, iltihapta aktif rol oynayan pekçok madde salgırlar. İltihap odağında iyileşme başlayınca makrofajlar (yine dış etkenler yardımı ile) eski hallerine dönerler (8, 58, 76, 102).

İltihap alanındaki monositlerin çoğu kandan gelmekle beraber, bir kısmı dokudan gelmektedir (zira monositler ve makrofajlar "mononükleer fagositik sistem" in parçalarıdır) (66).

Bu hücreler herhangi bir zedelenme halinde derhal aktive olarak makrofaj halini alırlar. Makrofajlar ölen lökositleri de fagosit ederler. Bazı durumlarda sitoplazmaları füzyon gösterir (kaynaşır) ve çok nükleuslu dev hücreleri oluştururlar (66, 76).

Yaralanmanın üçüncü gününde monositler damarlardan sızarak yaraya göç eder ve doku makrofajları olarak yerleşirler. Bunlar primer doku iyileşmesi için şart olan hücrelerdir. Makrofajlar temizleme işlemine devam eder ve 3-4 gün boyunca yara iyileşmesini etkileyen bir çok faktör salgırlar (8, 60).

Salgıladıkları bu faktörler aracılığı ile de;

1. Fibroblastlar tarafından oluşturulmuş alanların yaratılmasını
2. Düz kas hücrelerinin dublikasyonunu
3. Yeni kan damarlarının filizlenmesiyle endotel hücrelerinin çoğalmasını yönetir.

Bu basamaklar dokunun yeniden yapılanmasını ve proliferasyon fazına geçişini temsil eder.

### **Lenfositler**

Kemik iliğindeki ana hücrelerden geliştikten sonra timus ve lenfoid organlarda olgunlaşarak dokulara dağılırlar. Kan yaymalarında bulunma oranları %15-30 arasında değişir. Lenfositlerin çapları lökositlerin hepsinden küçüktür. Nükleusları yuvarlak olup koyu mavi-mor boyanırlar. Sitoplazmaları dar olup mikroskopta görülmesi zordur. Lenfositler bağışıklıkta görevli hücrelerdir. Bu nedenle immünite ile ilgili iltihaplarda yoğun olarak bulunurlar. Ayrıca kronik iltihaplarda görülürler. Fagositoz yetenekleri yoktur. inflamasyonda ve immün cevaplarda rolü olan maddeler salgırlar (8, 57, 58).

Lenfositler hem inflamasyonda endotele sıkıca yapışır ve dokuya geçerler, hem de normal koşullar altında endotelle yakın etkileşim içindedir. Lökositlerin aktivasyonu ile bakteriler fagosite edilir. Diğer yandan serbest O<sub>2</sub> radikalleri, lizozomal enzimler, proteaz, elastaz, kollejenaz salgılanır (8, 58, 66).

### **Plazmositler**

Plazmositler (plazma hücreleri) periferik kanda bulunmazlar. Çapları polimorf nükleer lökositlerden büyüktür. Nükleus sitoplazmanın bir tarafına çekilmiştir (eksantriktir). Nükleusların kromatini araba tekerleği gibi, nükleus zarına doğru kümeleşmeler gösterir. Lenfositlerden oluşurlar. Antikor yaparlar. Kronik iltihaplarda görülürler (57, 58).

### **2.2.3.3. MİGRASYON / PROLİFERASYON FAZI**

Yara iyileşmesinin bu anabolik fazının en önemli temel basamakları epitelizasyon, anjiogenezis ve fibroplazidir. Bu alt fazlar bir öncelik sırası olmaksızın iç içe gelişir ve her biri bir diğerinin indikatörüdür (2, 61, 69, 78, 85, 96, 97, 115).

Hasarlanma sonucu fokal epidermis ve dermis kayıpları meydana gelir. Epidermis kayıpları reepitelizasyon yani epitel tabakanın yeniden şekillenmesiyle yerine konulur. Kayıp dermisin yeniden şekillenmesi ise proliferasyon fazının final bölümünü oluşturur. Oluşan yeni dermise *granülasyon dokusu* adı verilir. Granülasyon dokusu; yumuşak, pembe ve granüllü görünümündedir. Fibroblastlar ve yeni kapiller ağın yatakladığı ekstrasellüler matriks (ECM) ile karakterizedir ve bazalden itibaren koagulumun yerini alır. Granülasyon dokusunun üç komponenti bulunur. Fibrozis; fibroplazi, yeni kan damarlarının oluşumu; anjiogenezis, skarın matürasyonu ve organizasyonu (96, 97).

#### **2.2.3.3.1. Epitelizasyon**

Hasarlanma fokal epidermis kayıplarıyla sonuçlanır ve yaralı bölgede hemostazis sonucu oluşan fibröz pıhtı yara kenarlarını birbirinden ayırır. Bundan dolayı epitel tabaka arasındaki bağlantı kesilir. Yara düzeyinde yeniden oluşan epitelyal süreç, sonunda iyileşmenin olabilmesi için çok önemlidir (55, 96, 97).

Reepitelizasyon yara alanına epitel hücrelerinin göç etmesiyle meydana gelir. Bu süreç ilk 24 saat içinde epitelyal hücrelerin yayılmasıyla başlar, periferik epitel hücrelerinin bölünmesi meydana gelir ve zayıf bir epitelyal hücre tabakası yara kenarları arasında köprü kurar. Proliferasyon yaralanmadan sonraki 48-72. saatler içinde

maksimumdur ve yara kenarı epitelyal hiperplazi ve mitozisle 17 kat artar (8, 55). Yara iyileşmesinin bu aşamasında büyüme faktörleri ve sitokinler önemli rol oynar.

Keratinositler üretilen fibronektin, kollajenazlar, plazminojen aktivatörler, nötral proteazlar ve tip V kollajen ile reepitelizasyon sürecine yardım eder. Fibronektin, keratinosit adezyonunu destekleyen ve yara merkezine doğru keratinositlere kılavuzluk eden önemli bir matriks komponentidir (52, 66, ).

Yara iyileşmesinde fibronektinin rolü;

- Hücre adezyonu ve göçü için gerekli matriksin oluşması için fibrine çapraz bağlanır.
- ECM'in erkenci bir bileşeni olarak fonksiyon gösterir.
- Kollajene bağlanır ve matriks glikozaminoglikanları ile interaksiyona girer.
- Makrofajlar, fibroblastlar, endotelial ve epidermal hücreler için kemotaktik özelliklere sahiptir.
- Oponizasyon ve fagositozu destekler (gelişimine yardımcı olur).
- Fibroneksuzun bir bileşenini oluşturur.
- Kollajen oluşumu için iskelet oluşturur.

Kollajenaz ve diğer proteazlar yenilenmiş dokunun debridmanından sorumludur. Plazminojen aktivatör pıhtının eritilmesine yardımcı olan fibrinolitik mekanizmaları başlatır. Tip V kollajen epidermal hücreler tarafından sentezlenir ve epitelizasyon işlemi sırasında gereklidir. Epidermal hücrelerin hareket düzeyleri yara yatağının su içeriği tarafından belirlenir ve epitelin kritik bir nem seviyesi ile migrasyonunu arttırır (8)

Yara alanında eğer bazal membran bütünlüğü bozulmamışsa (1. derece yanığa eş değerdir) keratinositlerin göçü normal olarak yukarı doğrudur. Epitelyal projenitör hücreler yara altında bozulmamış olarak kalır ve epidermin normal tabakaları 2-3 günde restore edilir. Bazal membran yıkıldığında ise (2. veya 3. derece yanıklara eş değer) yara periferindeki normal hücrelerden ve bütünlüğü bozulmamış deri eklerinden tekrar epitellenir (reepitelizasyon). Epidermis, yaraların kesilen kenarlarından ve

hasarlanmış yapıların kesip çıkarılmasından geriye kalan ter bezleri yada kıl folliküllerinin yüzeyine yakın kenarından ayrılan keratinositlerin göçü ile tamir edilmeye başlanır. Keratinositler fibrin pıhtı ve yaralı dermis arasındaki ara tabakaya doğru ilerler. Lamellipodlar uzatırlar ve epidermisten aşağıya doğru ilerleyerek kendilerini yaranın üzerine sürüklerler (66).

#### **2.2.3.3.2. Anjiyogenezis**

Anjiyogenezis, mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesidir. Vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir. Anjiyogenezis, kadın üreme sistemi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlar dışında organizmada oldukça sınırlıdır (65).

Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenezis süreci içinde yer alan temel hücrelerdir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarını oluştururlar ve ana damarları, dalları ve kapiller ağı oluşturuucu genetik bilgileri içerirler (6, 65, 71).

Yara yatağı içine kapillerlerin göçü, kusursuz yara iyileşmesi için esastır. Hasarlı doku kapillerlere muhtaçtır. Çünkü yeni kapillerler yaraya besinleri ve oksijeni götürerek granülasyon dokunun sürdürülmesine yardımcı olur. Bundan dolayı kronik olarak iyileşmeyen yaralarda meydana gelen angiogenezis büyük ihtimalle başarısızdır (41, 65, 96, 97).

Anjiyogenezis oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezisde temel rol oynar. Henüz tüm anjiyogenik etkileşimlerin niteliği açıklığa kavuşmamıştır. En büyük olasılık anjiyogenik uyarıcılar ve anjiyogenezis inhibitörleri arasındaki dengenin, normalde damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlıyor olmasıdır. Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenezis inhibitörlerinin azalışı anjiyogenezi başlatmaktadır (65).

Yeni damar oluşumu aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

1. Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması,
2. Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü,
3. Tübül oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi (65).

### **1. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması**

Anjiyogenez süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar. Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler (65)

Normal, hastalıklı yada hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiogenik büyüme faktörleri, yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olur. ECM'nin enzimatik yıkılmasını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler (65).

Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metaloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir. ECM bileşenlerinin yıkılması ve MMP-1, MMP-3, MMP-9, elastaz gibi matriks metaloproteinazlarının aktivasyonu da plazminin işlevleri arasındadır (65).

## **2. Endotel Hücrelerinin Göçü ve Çoğalma**

Anjiogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive eder. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse göç eder ve çoğalır. Bu süreçte etkili anjiogenik faktör vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'dir. Endotel hücreleri daha sonra sağlam bölgedeki kapillerler ile birleşerek yara bölgesinde kapiller ağ oluştururlar (121, 65).

## **3. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması**

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve filiz oluşumuna izin verir. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta, sonunda kendilerinden damarların olduğu lümenler gelişir. Böylece, ekstraselüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunma gereksinimi vardır. İntegrinler gibi membran proteinleri de bu süreç içinde yer alır ve endotel hücrelerinin birbirine ve ECM'ye tutunmalarına yardımcı olurlar, böylece yeni kapillerler oluşur (65).

Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece ECM'nin proteolitik yıkımı inhibe olur ve yeni oluşmuş kapillerler etrafında matriks bileşenleri sentez edilir, endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (65).

### 2.2.3.3.3. Fibrozis (Fibroplazi) Fazı

Fibrozis yara odağında doku makrofajları ve fibroblastların artması, makrofajlar aracılığıyla inflamatuvar mediatörler ve lökositlerin dokudan uzaklaştırılması ile karakterizedir. Böylelikle fonksiyonel olmayan, aşırı birikmiş skar dokusu ile dokunun normal yapısal bileşenleri yer değiştirir. Bu faz 5.günde başlar ve iki hafta sürer. İki aşamada gerçekleşir (25, 54, 93, );

- Fibroblastların göçü ve proliferasyonu
- ECM'nin depolanması

Bu fazın en önemli hücresi, granülasyon dokusu oluşumunun kritik hücresi olan fibroblastlardır. İnflamatuvar faz sırasında aktive olan mediatörlerin uyarılması ile fibroblastlar yara odağına göç ederler. Fibroblastlar yalnızca kollajen üretmekle kalmayıp aynı zamanda hyaluronan, elastin, fibronektin, proteoglikan, sülfatlı ve sülfatsız GAG'lar ve kollejenaz gibi proteazları üretirler (96, 97). Bu nedenle reorganizasyonda önemlidirler.

Yara alanı, fibroblastlardan üretilen bir glikoprotein olan fibronektin ve GAG'larla dolar. GAG'lar heparan sülfat, hyaluronik asit, kondroitin sülfat ve keratan sülfat içerir. Hyaluronan ve fibronektin fibroblast migrasyonunu aktive eder. Granülasyon doku oluşumunun erken fazında (ilk 4-5 gün) hyaluronik asit matriksin önemli bir komponentidir, sonraki fazlarda ise hyaluronik asitin yerini proteoglikanlar alır (kondroitin-4-sülfat, dermatan sülfat, heparin sülfat gibi). Proteoglikanlar intersellüler matriksi oluştururlar, doku esnekliğinde önemlidirler ve kollajen sentezinde rol alırlar (43, 66, 97).

Normal bir deride yada matür bir skarda mevcut kollajenin önemli çoğunluğunu tip I ve III kollajen oluşturur. 5-7. günlerde yeni tip I-III kollajenleri sentezleyecek fibroblastlar yara içine göç eder. Normal yara iyileşmesinde öncelikle tip III kollajen



predominanttır ancak daha sonra tip I kollajen artar. 5. gün sonunda bu lifler fibronektin iskeleti üzerine yerleşmeye başlar (25, 54, 71, 93).

Kollajenler depolandığında, yara tamirinin son fazına girilmiş demektir. Fibriler kollajen demetlerinin agregasyonu ve moleküller arası çapraz bağlanmaları, iyileşmekte olan dokunun giderek sertleşmesine, gerilme direnci kazanmasına öncülük eder. Elastin yapımı ise kollajene oranla daha az oluşur (25).

#### **2.2.3.4. MATURASYON FAZI**

##### **2.2.3.4.1. Kontraksiyon**

Yara alanındaki defektin kapanmasını kolaylaştırmak için yara kenarlarının merkeze doğru hareketi olarak tanımlanan kontraksiyon, yaralanmadan sonraki 5-15. günlerde maksimumdur. Kontraksiyondan sorumlu hücreler, yara alanında bulunan fibroblastlar ve perivasküler mezenkimal hücrelerden farklılaşan, ultrastrüktürel ve fonksiyonel birçok nitelikleri bakımından düz kas hücresine benzeyen miyofibroblastlardır. Miyofibroblastlar 10-21. günlerde yara bölgesinde maksimum sayıdadır ve çevre ECM ile kontraksiyonu sağlarlar (24, 66, 71).

Bu fazın altında yatan teori kontraktıl miyofibroblastlarla granülasyon dokunun diğer elementleri arasındaki uzmanlaşmış bağlantılardır. Bu bağlantılar açık yaralar boyunca kontraksiyon kuvvetlerine arabuluculuk eder. Bu mekanizma fibroneksuz olarak da tanımlanır (Singer).

Progresif kontraksiyon yara boyutunu küçültür, ilerleyen epidermis sonuçta granülasyon dokusunu tümüyle örter. İyileşme ilerledikçe fibroblast ve yeni damarların sayısı azalır, ECM depolanması artar. Kollajen yapımı iyileşen yaranın gücünü sağlar. Kollajen birikimi, kollajen sentezinin artışı yanında yıkımının azalmasına da bağlıdır (24).

Sonuçta granülasyon dokusu inaktif işi fibroblastlar, yoğun kollagen ve elastik liflerden oluşur. Gelişen skar dokusu başlangıçta pembedir, damarsal yapıların azalmasıyla ileri aylarda giderek solar ve beyazlaşır (52, 69, 78, 85, 96, 97, 115).

## **2.3 SİTOKİNLER**

Sitokinler, hücrel düzenleyici proteinlerdir. Vücudun farklı dokularında çeşitli hücreler tarafından belli uyarıcılara karşı salgılanıp, hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar; belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücrel sıvılara salgılanarak hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanırlar. Diğer bazı sitokinler ise parakrin etki gösterirler (42, 43, 66).

Sitokinlerin bir çok biyolojik olayda (örneğin; hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, hematopoez ve bağışıklık sisteminin regülasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücrel metabolizmanın değiştirilmesi gibi) çok önemli rolleri vardır. Sitokinlerin en önemli etkileri hücre bölünmesi ve farklılaşması üzerinedir. Normal hücreler belli faktörlerin (örn: sitokinler) uyarısı ile bölünür. Hücrenin yüzeyinde mevcut olan reseptörler, bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirlerler. Büyüme faktörleri, hücre bölünmesi üzerinde pozitif etki gösterirken, bazı sitokinlerin hücre bölünmesini engelleyici etkileri vardır. Sitokinlerin hücre bölünmesi üzerindeki pozitif ve negatif etkileri hücre tipine bağlı olarak değişir ve bu etki mekanizmaları yoğun bir şekilde halen araştırılmaktadır (42, 43, 66).

### **2.3.1.YARA İYİLEŞMESİNDE TANIMLANMIŞ SİTOKİNLER**

Sitokinler normal yara iyileşmesi için son derece önemlidir (66, 69, 78, 97,112). Yara tamir sürecinin tüm aşamaları farklı sitokinlerle kontrol edilir. Bu sitokinlerin bir

çoğunun yararlı etkileri yara iyileşmesinin farklı tiplerinden hastalarla ve hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İyileşmeye yanıt veren endojen büyüme faktörlerinin rolleri kısmen açıklanmış ve çoğu durumda bu moleküllerin fonksiyonları derlemelerde ve/veya fonksiyonel hücre kültürü verileriyle tanımlanmıştır (112).

Yara iyileşmesinde etkili olan tanımlanmış sitokinler;

1) Büyüme faktörleri

- Trombositlerce Salınan Büyüme Faktörü (PDGF)
- Epidermal Büyüme Faktörü (EGF),
- Asidik ve bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (FGFs)
- Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF)
- İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF-1, IGF-2)

2) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ )

3) Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör (GM-CSF)

4) Proinflamatuvar Sitokinler

- İnterlökin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ),
- İnterlökin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),
- İnterlökin 6 (IL-6)
- Tümör nekroz faktörleri (TNF- $\alpha$ )

5) Anti-inflamatuvar Sitokinler

- İnterlökin-10 (IL-10)

### **2.3.1.1.Büyüme Faktörleri**

#### **2.3.1.1.1.Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF);**

Trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. 32000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan PDGF, 2 disülfid bağıyla bağlanmış bölümden oluşur. A ve B adını alan bu üniteler %56 oranında benzerlik gösterirler (18, 66, 78, 97). PDGF'ler PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD içeren homodimerik yada heterodimerik büyüme faktörleri ailesidir (78, 112). AA, AB ve BB şekillerinde ifade edilen faktörün her üç formunun biyolojik aktiviteleri temelde benzer olup B ünitesi mitogenezi biraz daha güçlü uyarabilir. Fonksiyonlarını üç farklı transmembran tirozin kinaz reseptöre bağlanarak gerçekleştirirler ( $\alpha$  ve  $\beta$  zincilerin homo yada heterodimerleri) (69, 112).

Endotel hücreleri, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF salgırlar. PDGF'ler nötrofiller, monositler ve fibroblastlar gibi iyileşen dermal yaraya göç eden hücreler için kemotaktik olan büyüme faktörlerinin ilkidir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün bir alandaki konsantrasyonu, hangi hücrelerin ona daha çok yanıt verme yeteneğinde olduğunu gösterir, çünkü farklı hücreler, farklı PDGF konsantrasyonları ile o ortama çekilirler. Fibroblast ve düz kas hücrelerinde kemotaksizin yanında mitogenezi de uyarırlar (78, 97, 112).

Yara iyileşmesinde PDGF'nin iki önemli rolü daha vardır. İlki; fibroblast proliferasyonunu stimüle etmek için erkenci bir fonksiyon, ikincisi ise; miyofibroblast fenotipini uyarmaktır. Bu hipotez bir çalışmayla desteklenmiş ve insan yara sıvısına nötr hale getirilmiş PDGF antikorlarının eklenmesiyle kültüre edilmiş fibroblastlar için yara sıvısının mitojenik etkisi %45 oranında azalmıştır. PDGF'ler fibroblast proliferasyonu ve bu hücrelerden kollajen, hyalüran ve fibronektin sentezini uyararak ekstrasellüler matriks üretimini artırırlar. Ayrıca kollajenaz aktivitesini arttırarak ve

miyofibroblast kontraksiyonu için fibroblastları stimüle ederek matürasyon fazında rol oynarlar. Ayrıca timidin fosforilaz etkisi gösterir ve timidini timine defosforilleyerek serbest radikal oluşumunu artırmak suretiyle anjiyogenez genlerini aktive ederler. Tüm bu fonksiyonlarından dolayı PDGF yara iyileşmesinin majör mediatörleri kabul edilir (112).

### **2.3.1.1.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)**

EGF ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından tanımlanmıştır. Cohen erkek fare submandibular tükürük bezinde Sinir Büyüme Faktörünü (NGF) izole etmeye çalışırken bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken diş sürmesi ve erken gözkapağı açılışına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve bu maddeye epidermisin gelişimini hızlandırıcı etkisinden dolayı Epidermal Growth Factor (EGF) adını vermiştir (107, 120, 95).

Bir çok üyeden oluşan mitojen EGF ailesi EGF, TGF- $\alpha$ , heparin bağlayıcı EGF, amphiregulin, epiregulin, betasellulin, neureglins ve son zamanlarda keşfedilen epigen içerir (112). Ürogastron ile identik olup 53 amino asitlik bir polipeptittir. Birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salınır. Hücrelerin çoğunda EGF'ye ait reseptörler bulunmasına rağmen epitel hücrelerinde en çok sayıda reseptör bulunur; ancak endotel hücreler, fibroblast ve düz kas hücrelerinde de reseptörler vardır (18, 78). Tüm bu büyüme faktörleri dört farklı reseptöre (EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB5) yüksek afinite ile bağlanarak fonksiyon gösterir. Ligand bağlayan bu reseptörler homo yada heterodimer formdadır (69, 112).

EGF'nin epitel hücreleri, endotel ve fibroblastlar için kemotaktik özelliği vardır. Anjiogenezi ve kollagenaz aktivitesini uyarır(18).

Yara iyileşmesindeki EGF'lerin rollerinin anlaşılması için ilk kanıtlar yara sıvısının analizinden sonra elde edilmiştir. Bir çok yayın yara sıvısında HB-EGF'nin hazır bulunduğunu rapor etmiştir. HB-EGF, domuzlarda kısmi kalınlaşmış eksizyonal

yaraların yara sıvısındaki majör heparin bağlayıcı büyüme faktörüdür. Çünkü HB-EGF granülasyon doku oluşumu ve re-epitelizasyonda önemli rol oynayan keratinositler ve fibroblastlar için mitojeniktir (78, 112)

### **2.3.1.1.3. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)**

FGF'ler yapısal olarak polipeptit büyüme faktörlerine ait olan, halen 22 üyeden oluşan ve büyüyen bir ailedir. Belirlenmiş 10 formu vardır. Mezenkimal hücreler için mitojen olarak ilk kez bulunan FGF ailesinin pek çok üyesi geniş bir mitojenik spektruma sahiptir. Onlar mezodermal, ektodermal ve ayrıca endodermal orjinli çeşitli hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederler. Yalnızca tek istisna FGF-7'dir (keratinosit büyüme faktörü (KGF)). FGF-7 yetişkin organizmada epiteliyal hücreler için spesifiktir. Mitojenik etkilerine ek olarak FGF'ler; hem hedef hücrelerinin farklılaşması ve çoğalmasını düzenlerler hem de bazı FGF'lerin sitoprotektif oldukları gözlenmiştir, stres durumları altında hücre canlılığını desteklerler (18, 78, 112).

Belirlenmiş 10 form içinde en önemli FGF formları asidik (aFGF) ve bazik (bFGF) FGF'dir. Her iki FGF izoformu da doku hasarından sonra epiteliyal hücreler ve makrofajlardan salgılanır, endotelial hücreler ise FGF'yi hem sentezler hem de ona yanıt verirler. a ve bFGF benzer özelliklere sahiptirler ve aynı reseptör yoluyla etkilerini gösterirler. Her iki tip FGF de endotel proliferasyonu ve motiliteyi arttırarak neovaskülarizasyonu hızlandırır, heparinin etkilerini güçlendirir. Fakat bFGF, aFGF'den yaklaşık 10 kat daha güçlüdür. Bazik FGF'nin damarlanmayı uyarıcı özelliği yaklaşık 10 kat fazladır. Bazik FGF ayrıca kollajen, fibronektin ve proteoglikan sentezlerini, yara kontraksiyonunu uyarır (18, 81, 87, 112).

Fonksiyonlarını, dört yüksek afiniteli transmembran protein tirozin kinaza bağlanarak gösterirler (FGFR1-4). Reseptörlerin her biri farklı afiniteyle farklı FGF'lere bağlanır. FGF'lerin karakteristik bir özelliği de; FGF'leri termal denatürasyon ve proteolizise karşı dengede tutan heparin yada heparan sülfat proteoglikanlarla

interaksiyonlarıdır. Bu onların diffüzyonunu güçlü bir şekilde sınırlar. Çok önemli olan bu interaksiyon, reseptörlerin aktivasyonu için gereklidir (112).

FGF, yaralarda re-epitelizasyon ve anjiyogenez için önemli uyarıcılardır, fibroblast ve keratinosit proliferasyonunda ve göçünde rol oynarlar. Yapılan çalışmalarda FGF1, FGF2, FGF4, FG7 ve FGF10'un lokal uygulanmasıyla yara tamiri stimüle edilir (112).

#### **2.3.1.1.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)**

VEGF homodimerik, heparin-bağlayıcı glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF ailesi halen VEGF A, B, C, D, E (ya da aminoasit sayılarına göre VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> ve VEGF<sub>145</sub>) ve plasenta growth faktör (PLGF)'ü içerir. Üç farklı transmembran tirozin kinaz reseptörüne (VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 ) bağlanarak biyolojik fonksiyonlarını gösterirler. Bunlardan VEGFR-1 ve -2 endotel hücreleri üzerinde, VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (6, 19, 28, 112, ). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve *ras* GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlar. VEGF-A ve onun reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin biyolojik fonksiyonları detaylı olarak araştırılmıştır. İn vivo ve invitro çalışmalarda VEGF-A, yara iyileşmesi süresince anjiyogenezis ve vaskülogenezisin majör regülatörü olarak tanınır (112).

Diğer büyüme faktörleriyle karşılaştırıldığında, VEGF çok etkili ve uzun vadeli olarak angiogenezi başlatan sinyal olarak düşünülmektedir. Dermal hasardan sonra keratinositler ve makrofajlar VEGF gen ekspresyonunu çok artırır ve VEGF reseptörler yara granülasyon dokusu içindeki kan damarlarında bulunur. VEGF temel anjiyojenik faktör olma özelliği yanında (VEGF' ye maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transsellüler gap oluşumuna olanak sağlanarak) vasküler permeabilite artırılır (18, 78). Endotel hücreleri için migratuar

özelliğinin yanı sıra, hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku- tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır (78,112).

Yara iyileşmesinde VEGF-A ekspresyonu, dermal hasar sonrasında, majör üreticileri olan keratinositler ve makrofajlarda güçlüdür. Reseptörleri ise granülasyon dokunun kan damarlarında ortaya çıkar. Bu VEGF-A'nın parakrin tarzdaki yara anjiyogenezisini stimüle ettiğini gösterir. VEGF-A ekspresyonunun azaltılması yada yara iyileşmesi ile ilişkili olduğu bulunan degranülasyonunun hızlanmasıyla ilgili yapılan birkaç çalışma, iyileşme sürecinde VEGF-A'nın önemli rolünü desteklemiştir (28, 112).

### **PLGF (plasenta büyüme faktörü)**

VEGF-A'ya ek olarak PLGF son zamanlarda yara anjiyogenezisinin bir regülatörü olarak tanınır. Yaraya komşu kapillerlerin endotel hücreleri tarafından sentezlenir. PLGF'nin akut insan derisi yaralarındaki keratinosit migrasyonunu güçlü bir şekilde düzenlediği belirtilmiştir. PLGF knock-out farelerde, anjiyogenezisteki defektle birlikte yara iyileşmesinin bozulması karakterizedir. VEGF-A ve PLGF arasındaki sinerji oldukça ilginçtir. İyileşme mekanizmasında her iki büyüme faktörünün de bulunmasının normal yara anjiyogenezisi için önemli olduğu çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (86, 112).

### **Angiopoietinler**

VEGF'lere ek olarak angiopoietinler vasküler endotelial büyüme faktörlerinin ikinci ailesidir. Şimdiye kadar transmembran tirozin kinaz reseptörlere bağlanan 4 farklı angiopoietin keşfedilmiştir. Angiopoietin-1 ve 4 bu reseptörlerin aktivatörleri olarak bilinirken, angiopoietin 2 ve 3 bir çok durum altında bu reseptörlerin aktivitesini bloke eder (86, 112).



VEGF'lerden farklı olarak angiopoietinler endotel hücre proliferasyonunu düzenlemezler daha çok angiopoietin 1 kan damarlarının stabilizasyonundan sorumludur; kapiller damarları güçlendirir, perisitleri stabilize ederek endotel hücre yaşam süresini arttırır ve yeni oluşan vasküler yapıyı kuvvetlendirir. VEGF gibi endotel hücreleri için mitojenik etki göstermeden, endotel hücrelerinin kendi arasındaki ve çevredeki düz kaslarla ve perivasküler alan yada ekstraselüler matriks ile olan ilişkisini güçlendirir. Angiopoietin 2 ise angiopoietin 1'e ters etki olarak damarların destabilizasyonuna ve yeniden yapılanmasına neden olur, neovaskülarizasyon bölgelerinde yoğun olarak bulunur (112, 121).

#### **2.3.1.1.5. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (Somatomedinler; IGF)**

IGF-I ve IGF-II bir çok farklı hücre tipinin canlılığının ve mitogenezisinin güçlü stimülatörleridir ve otokrin, parakrin ve endokrin fonksiyon gösterirler. IGF-I'e insülin reseptöre benzeyen bir tirozin kinaz olan Tip I IGF reseptör yolu aracılık ederken, IGF-II, IGF Tip II/ mannoz-6-fosfat reseptöre bağlanır. Ekzojen IGF-I'in özellikle diğer büyüme faktörleriyle birlikte yara iyileşmesi üzerine yararlı etkilerinin olduğu birçok çalışmayla ortaya çıkarılmıştır ve bu bulgular yara iyileşmesinde IGF'nin önemli aktivitesini desteklemiştir (18, 112).

Esas olarak hepatosit ve fibroblastlarca sentezlenir ve fibroblast proliferasyonunu uyarmada PDGF ile birlikte çalışır. PDGF ve FGF gibi maddeler, hücrelerin, hücre siklusuna erken girmelerini sağlar (G0 ve G1); kompetans faktörü olarak davranırlar. IGF de progresyon faktörü olarak davranır ve hücre siklusunun diğer basamaklarının ilerlemesini sağlar (S1, G2, M) (18, 66).

### **2.3.1.2. Transforme Edici Faktör (TGF)**

#### **2.3.1.2.1. Transforme Edici Faktör - Alfa (TGF- $\alpha$ )**

TGF- $\alpha$  hem EGF hem de vaccinia büyüme faktörüne (VGF) benzer. EGF ile %30 yapısal benzerlik gösterir; EGF'nin daha otokrin çalışabilen bir varyantı olarak kabul edilir (18). Uyarılmış makrofajlar, trombositler, keratinositler ve eozinofiller gibi vücuttaki diğer bazı hücrelerce sentezlenir (18, 66, 112).

TGF- $\alpha$ 'lar biyolojik etkilerini EGF reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Mezenşimal, epitelyal, endotelyal hücre büyümesini ve endotel hücre kemotaksisini uyarırlar. Endotelial hücre proliferasyonunu sağlaması açısından EGF ile aynı güçte, ancak anjiyogenezi stimüle etmesi açısından 10 kat daha güçlüdür. Ayrıca fibroblast stimülasyonu sağlarken, TGF- $\beta$ 'nın mutlaka olması gereken bir kofaktördür (18, 66, 78, 112).

#### **2.3.1.2.2. Transforme Edici Büyüme Faktörü - $\beta$ (TGF - $\beta$ )**

TGF- $\beta$  süper ailesinin çoğu gelişim, hemostazis, hastalık ve tamirde önemli rol oynayan proteinlerin etrafını farklı şiddette çevirerek etki gösterirler. TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2 ve TGF-  $\beta$ 3 olmak üzere en az 3 izoformu vardır (18, 78, 112). Yaralanmadan hemen sonra TGF- $\beta$ 1 plateletlerden geniş miktarda salgılanır. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur ve hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. Plateletlerden aktif TGF- $\beta$ 1'in salgılanmaya başlanması ilk olarak nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar için kemoatraktan olarak görev yapar ve bu hücreler çeşitli hücre tiplerindeki TGF- $\beta$ 1 seviyesini daha da artırır. Makrofajlar kendi ürettikleri TGF- $\beta$ 'yı otokrin yolla düzenlerler. TGF- $\beta$  ayrıca monositleri uyararak FGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Aktif formları kadar latent TGF- $\beta$ 'lar ayrıca yara matriksi içine yerleşir ve üretilir. Farklı hücre kaynakları ve

geçici stokların bu kombinasyonu tamir süreci boyunca TGF- $\beta$ 'nin aralıksız tamirini sağlarlar (78, 92, 93, 100, 112).

Tüm üç izoformun ekspresyonu tamir boyunca birçok farklı hücre tipinde tanımlanmıştır ve her üç izoformun yara dokusunda karakteristik bir dağılımı vardır. Birçok çalışmada tamirin sonraki fazlarında TGF- $\beta$ 3 ifadesinde bir artma gözlenirken, TGF- $\beta$ 1 ve TGF- $\beta$ 2'nin hızlı indüksiyonu gözlenmiştir. TGF-  $\beta$ 'nin 3 izomeri, kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinir ve ekstrasellüler matrikste depolanır. Özellikle TGF-  $\beta$ 1 ve TGF-  $\beta$ 2 ekstrasellüler matrix depolanmasında ve dermal skar oluşumuna yardımcı olur. Fakat TGF-  $\beta$ 3 skar oluşumunun engellenmesine neden olur. Ayrıca kollajenazı aktive eden diğer faktörlerin uyarıcı etkisini azaltır. Transforme edici faktör -  $\beta$  tek başına, endotel hücre proliferasyonunu inhibe ederken, başka bir kofaktörle birlikte anjiyogenezi stimüle eder. TGF-  $\beta$  fibroblastlarca fibronektin ve proteoglikan sentezini; keratinositlerce de fibronektin sentezini uyarır. İntegrinler ve ekstrasellüler matriks proteinleri için çok güçlü stimülatörlerdir. Yara kontraksiyonunda rol oynar, ECM'yi organize edebilme özelliği nedeni ile yeniden yapılanma olayında görev yapar. Sonuç olarak TGF- $\beta$ 'lar yara iyileşmesinde çok çalışılan moleküller arasındadır (18, 78, 112).

### **2.3.1.3. Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF)**

Polietik bir sitokin olan GM-CSF, keratinositler için mitojeniktir ve endotel hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu stimüle eder. Ayrıca hematopoitik hücreler üzerindeki güçlü etkisinin yanında dermal yara tamirinde de önemli bir rol oynar. Bir seri hayvan deneyleri ve kliniksel çalışmalarla normal yaraların ve kronik ülserlerin tedavisinde GM-CSF'nin yararlı etkisi vardır. Yakın zamandaki çalışmalarında Mann ve ark. eksizyonel fare yaralarında hücresel kaynağı belli olmamasına rağmen derideki GM-CFS seviyesinde güçlü bir artış olduğu göstermiştir. Transjenik farelerin epidermisindeki GM-CFS'nin overekspresyonu, yara re-pitelizasyonunu hızlandırmıştır, ayrıca neovaskülarizasyon ve granülasyon doku oluşumunda da güçlü bir artışa neden olmuştur (112).

GM-CFS yara tamirini direkt stimüle ederken indirekt olarak sekonder sitokin indüksiyonuna aracılık eder, örneğin; TGF- $\beta$ 1 gibi yara iyileşmesinde önemli rol oynadığı bilinen bir çok sitokin seviyesi bu hayvanların yaralarında yükselir (112).

#### **2.3.1.4. Proinflamatuvar Sitokinler**

Proinflamatuvar sitokinler olan interlökin 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ , yara tamirinde önemli rol oynar. Keratinosit ve fibroblast proliferasyonunun stimülasyonundan, ECM proteinlerinin yıkımı ve yeniden sentezlenmesinden, fibroblast kemotaksisinden ve immün yanıtın düzenlenmesinden sorumludurlar (112).

Dermal yaralarda proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu iyileşmenin inflamatuvar fazı boyunca güçlüdür. Polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar bu sitokinlerin majör kaynağıdır fakat ekspresyonları diğer hücre tiplerinde de gözlenmiştir. Diyabetli ve glikokortikoid tedavi gören farelerin bozulmuş yara iyileşmelerinde bu genlerin ekspresyonlarının şiddetle azaldığı tespit edildiğinden beri normal tamir mekanizmalarında ki önemleri artmıştır (112).

#### **2.3.1.5. Anti-inflamatuvar Sitokinler**

Anti-inflamatuvar sitokinler, proinflamatuvar sitokinler ve birçok kemokinezin ekspresyonunu ve yara alanına doğru makrofaj ve nötrofillerin infiltrasyonunu engellerler. Bu sitokinlerin ekspresyonu inflamasyon fazından fibroplazi fazına geçişi temsil eder. Böylece hipertrofik scar oluşumu engellenir (112).

#### **İnterlökin-10**

Preinflamatuvar sitokinlere ek olarak, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler ayrıca yara tamirinin önemli regülatörleri olarak gösterilir. Keratinositleri ve infiltratif mononükleer hücreler IL-10'un majör üreticileridir. Bu sitokinin, inflamatuvar yanıtın

kısıtlanmasında ve sona erdirilmesinde majör bir rol oynadığı düşünülmektedir. Buna ek olarak, çeşitli immün hücrelerin, keratinositlerin ve endotelial hücrelerin büyüme ve/veya farklılaşmasını düzenlerler (112).

İnsizyonal yara oluşturulan farelerde yaralanma sonrası 60.dakikada IL-10 seviyesi pik yapar. Aynı yara modelini kullanan Sato ve arkadaşları hasarlanma sonrası IL'10 ekspresyonunda iki pik bulmuştur; ilki yaralanma sonrası maksimum 3. saatte erken bir pik ve yaralanma sonrası 3. günde ikinci bir pik (112).

#### **2.4. OVARYUM FOLİKÜL SIVISI**

Ovaryal siklus evrelerinden olan folliküler evrede, sırasıyla primordial, primer, sekonder, tersiyer ve olgun follikül yada Graaf folikülü gelişir. Sekonder folikül gelişimi sırasında foliküler hücreler arasında küçük hücreler arası boşluklar oluşur. Bu boşluklar folikül (granuloza) hücreleri ve oosit tarafından sentezlenen folikül sıvısı içerir. Daha sonra bu küçük boşluklar birleşerek, daha büyük bir boşluk olan antrumu yapar. Antrumun oluşması, foliküler hücrelerin primer oosite göre yeniden düzenlenmesine neden olur. Ovulasyondan hemen önce, primer oosit folikül sıvısı içinde eksentrik bir konum alır (23, 62).

Oositlerin büyüme-gelişim ve maturasyonları, folikül ve oosite bir seri gelişimsel olay gerektirir. Oositler tüm bu olayları foliküller içinde sürdürürler (22, 51). Bu anlamda oosit ve kumulus hücrelerinin ve daha sonrada oosit ile foliküler sıvının karşılıklı etkileşim içinde olması gerekir. Oosit ile kumulus hücrelerinin ilişkileri karşılıklı uyarı-inhibisyon mekanizmalarının dengede tutulmasıyla süreklilik kazanır. Oosit gelişimi ve maturasyonunda folikül sıvısının etkili olabileceği düşüncesi bu konudaki çalışmaları arttırmıştır. Burada follikül sıvısının içeriğini bilmek, oosit maturasyonunda etkili olabilecek yapıların ve etki mekanizmalarının ortaya çıkarılmasını sağlayacaktır (22).

Özellikle klasik IVF’de oosit maturasyonu sadece kumulus korona kompleksine bakılarak değerlendirildiği için oositin yeterliliği konusunda daha sağlıklı bilgi verebileceği düşüncesiyle folikül sıvısının içeriği yoğun olarak araştırılmış ve yapılan analizler sonunda çok çeşitli sayı ve miktarlarda hormon içerdiği tespit edilmiştir (3, 4, 15, 16, 20, 26, 35, 36, 45, 46, 47, 48, 51, 53, 79, 83, 88, 90, 91, 95, 98, 110, 116).

Folikül fonksiyonuyla ilgili olarak, follikül sıvısı biyokimyasında değişiklikler meydana gelir ve bununda hem hücresel hem de kromozomal düzeyde insan oositlerinin gelişim potansiyelini etkilediği bilinmektedir. Folikül sıvısı, granüloza ve teka hücreleri tarafından salınan pek çok büyüme faktörleri ve sitokinleri içermektedir. Fizyolojik şartlar altında LH ve HCG, bu faktörlerin salınımını stimüle eder. Bunun sonucunda da oosit maturasyonunu dolayısıyla fertilizasyon oranı etkilenir (3, 22).

Çeşitli çalışmalarla bazı sitokinlerin, ovaryal siklusun evreleri olan folikülogenezis, ovulasyon ve luteinizasyonda ve bu evrelerin modülasyonunda rol oynadıkları gösterilmiştir (3, 4, 10, 14, 94,103, 117, 119, )

Oosit mikroçevresi olan folikül sıvısının temel görevlerini maddeler halinde sıralayacak olursak;

- oositi korumak.
- oositi uygun zamanda olgunlaştırmak.
- uterinal siklus sürecinde, proliferatif özellikli endometriyum oluşturmak için uygun hormonal ortamını sağlamak.
- olgunlaşan oositi uygun zamanda dışarı atmak.
- implantasyon için uygun şartları oluşturmak ve gebeliğin sürmesini sağlamak üzere korpus luteum gelişimini temin etmek.
- fetoplasental ilişki gerçekleşinceye kadar gerekli metabolik elemanları içeren substansları ve hormonal ortamı oluşturmak.

### 2.4.1. OVARYUM FOLİKÜL SIVISINDA BULUNAN SİTOKİNLER

Folikül sıvısı (FF) oosit ve oositin büyüme gelişiminin düzenlenmesi için gerekli immünolojik faktörleri içeren mikro çevredir. Ovaryum fonksiyonlarını etkileyebilen immün ve endokrin sistemler arasındaki iletişim bu mikro çevre aracılığıyla gerçekleşir. FF'deki düzenleyici faktörlerin organizasyonu fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimle doğrudan bağlantılıdır. FF ve doku çevresinde birçok sitokini sentezleyebilen çeşitli lenfatik yapılar bulunur. Lenfatiklere ek olarak, sitokinler ayrıca luteal, stromal, tekal ve granüloza hücrelerinin oluşturduğu ovaryum somatik hücreleri tarafından üretilir (110).

Karmaşık bir işleyiş ve geniş alt gruplara sahip büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerine etkileri, daha önceki yıllarda ve günümüzde pek çok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmalar hem oosit ve embriyo gelişiminin anlaşılması hem de büyüme faktörlerinin fonksiyon ve işleyişinin açıklanması bakımından yol gösterici olmuştur. Oosit ve erken embriyo gelişimiyle ilgili olarak üzerinde durulan sitokinler (3, 4, 15, 16, 20, 26, 35, 36, 45, 46, 47, 48, 51, 53, 79, 83, 88, 90, 91, 95, 98, 110, 116);

#### 1) Büyüme faktörleri

- Trombositlerce Salınan Büyüme Faktörü (PDGF)
- Epidermal Büyüme Faktörü (EGF),
- Asidik ve bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (FGFs)
- Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF)
- İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF-1, IGF-2)

#### 2) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ )

#### 3) Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör (GM-CSF)

#### 4) Proinflamatuvar Sitokinler

- İnterlökin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ),

- İnterlökin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),
- İnterlökin 6 (IL-6)
- Tümör nekroz faktörleri (TNF- $\alpha$ )

#### 5) Anti-inflamatuar Sitokinler

- İnterlökin-10 (IL-10)' dur.

## 2.5. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE

### 2.5.1. KÖK HÜCRELER

Bilim adamları vücuttaki diğer hücrelerden farklı olan kök hücreleri tanımlamak için beş ölçüt kullanmışlardır (59).

- Kök hücreler, normalde kendileri çoğalamayan kan, kas ve sinir hücrelerinden farklı olarak, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler.

Hücrelerin bölünme kapasitesini, yani bir bakıma ömrünü belirleyen faktörlerden biri doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve 'telomer' denilen DNA zincirleridir. Telomerler doğrusal kromozomların uçlarıdır ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA dizileri (insanda TTAGGG) içerirler. Normal bir hücrenin her bölünüşünde, telomer boyu yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır. Telomer kısalması hücre bölünmesini sayan bir saat gibidir ve telomerler normal insan somatik hücrelerinin bölünme sayılarını düzenleyen önemli unsurlar olarak ortaya çıkmışlardır. Somatik hücrelerde her hücre bölünmesi sonucu kromozomların telomerleri kısalır. Birçok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar olur ve hücre daha fazla bölünme kapasitesini yitirir. Diğer yandan, insan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği bulunmuştur ve telomeraz etkinliğinin bu hücre tiplerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, telomeraz etkinliği kök hücrelerinin bir belirtecidir denilebilir (59).



- Kök hücreler özelleşmemişlerdir.

Bir kök hücrenin temel özelliklerinden biri de, bu hücrelerin özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip olmayışıdır. Bir kök hücre kalp kasının, kan hücresinin yada bir sinir hücresinin fonksiyonunu yapamaz fakat özelleşmemiş kök hücreler, kalp kası hücreleri , kan hücreleri yada sinir hücreleri gibi özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.

Son yıllarda kök hücrelerin özelleşmemiş olarak kalmalarını sağlayan unsurlar ve şartlar ile ilgili araştırmalarda önemli proteinler tanımlanmıştır. Örneğin hematopoietik kök hücrelerin farklılaşmadan çoğalabilmesinde Wnt isimli bir proteinin rol oynamaktadır. Wnt proteini, kök hücrelerin yüzeyinde reseptöre bağlanır ve hücrelerin içinde bir kaskad başlatır. Bu kaskad sonucunda bazı önemli genler aktive olarak kök hücrelerin farklılaşmadan kendilerini yenilemelerini sağlar (Tannishtha Reya 2003).

- Kök hücreler özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir. Buna farklılaşma denir. Kök hücreler birden fazla hücre tipine farklılaşabilir. Buna en iyi örnek insanı oluşturan ilk hücre olan zigottur.

- Kök hücreler hasar gören alıcıya nakilden sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilir. Örneğin; kemik iliği stromal hücreleri, hasarlı kalp dokusuna enjekte edildikten sonra kardiyomyositlere dönüşmüştür.

- Kök hücreler in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlar. Farklı kaynaklardan elde edilmiş kök hücrelerin blastosiste enjekte edildikleri zaman farklı hücre tiplerine kaynaklık etmeleri gibi (kimerizim) (59).

## KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ ve KAYNAKLARI

Kök hücreler esas itibariyle iki farklı kaynaktan elde edilir (59).

1. Embriyonik kök hücreler (EKH)
2. Embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler.
  - a. Erişkin kök hücreleri (dokuya özgün kök hücre, postnatal kök hücre)
    - i. Hematopoietik kök hücreleri
      1. kemik iliği kök hücreleri
      2. periferik kan kök hücreleri
      3. kordon kanı kök hücreleri
    - ii. Stromal kök hücreler (mezenkimal kök hücreleri)
    - iii. Organlara yerleşik diğer erişkin kök hücreleri
  - b. Fetüs kök hücreleri
  - c. Kadavradan elde edilen kök hücreler
  - d. Partenot hücreleri (partenogenez)
  - e. Göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri

Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar ki tüm blastomerler totipotenttirler (yani tam bir vücudu oluşturabilecek potansiyele sahiptirler, sınırsız farklılaşabilir ve farklı yönlere gidebilirler). Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde, bu hücreler 'blastosisti' oluştururlar. Blastosist üç yapıyı içine alır; *Trofoblast* denilen ve blastosisti çevreleyen hücre tabakası, blastosistin içindeki *blastosöl boşluğu* ve blastosölün sonunda yer alan *iç hücre kitlesi* (embriyoblastlar). Blastosistin içindeki bu iç hücre kitlesindeki hücreler vücudun endoderm, ektoderm ve mezoderm denilen üç embriyonik tabakasından köken alan pek çok farklı hücre çeşidine (yaklaşık 220 çeşit hücre) kaynaklık edebilirler (50). Bu güçteki iç hücre kitlesinden elde edilen kök hücrelere embriyonik kök hücreler denir ve bu özelliğe sahip kök hücreler pluripotent hücrelerdir (70, 105). Pluripotent hücreler, vücuttaki bütün dokuların yanı sıra gebeliği destekleyen hücrelere de kaynaklık edebilirler ancak kendilerinden yeni bir birey meydana gelmez. Fetal dönemde ise hücreler biraz daha özel görevlere sahip olurlar ve

erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Bu hücreler, yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere de “multipotent” hücreler denir (59).

Son birkaç yılda yapılan bazı araştırmalar, bir dokudan elde edilen kök hücrenin tamamen farklı bir başka dokunun hücre tiplerine de kaynaklık ettiği olasılığını gündeme getirmiştir. Bu tarz çoklu hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine plastisite veya transdifferensiyasyon denir. Yapılan çoğu çalışma embriyonik kök hücrelerin ve hematopoietik kök hücreleri ve mezenkimal kök hücreleri gibi embriyonik olmayan kök hücrelerin plastisite özelliklerini göstermiştir. Plastisite özelliği gösteren erişkin kök hücrelere örnek olarak; epiderminin bazal tabakasında ve kıl foliküllerinin diplerinde bulunan deri kök hücreleri verilebilir (59).

### **2.5.1.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRELER**

Embriyonik kök hücrelerin izolasyonu ve bu hücrelerin laboratuvar koşullarında nasıl farklılaşmadan çoğalabileceğine ilişkin bilgilerimiz bundan yaklaşık 20 yıl öncesine dayanmaktadır. İlk olarak 1981 yılında Dr. Martin Evans ve Dr. Kaufman tarafından, 3,5 günlük blastosistlerin iç hücre kitlesinden sürekli olarak çoğalan fare embriyonik kök hücreleri elde edilmiştir (32, 59). Daha sonra Thomson ve arkadaşları (1988) insan embriyonik kök hücrelerini elde etmiştir.

Fare embriyonik kök hücrelerden elde edilen tecrübeler, insan embriyonik kök hücrelerinin kültüre edilmesinde ve bunların farklılaşmasında kullanılacak yöntemlere ilişkin ip uçları vermiş ve nihayet, Thomson ve arkadaşları 1988 yılında başladıkları çalışmalar sonucunda embriyoların iç hücre kitlesinden (ICM=embriyoblast) insan embriyonik kök hücrelerini elde etmişlerdir (109).

Embriyonik kök hücreleri, pluripotent hücre popülasyonundan (embriyoblastdan) köken alırlar, normal karyotipte, yüksek telomeraz aktiviteli, primat embriyonik kök hücreleri için karakteristik hücre yüzey markırları eksprese eden

hücrelerdir. Ölümsüzdürler; bir ribonükleoprotein olan telomerazın insan EKH tarafından yüksek seviyede eksprese edilmesi, bu hücrelerin uzun ömürlü olmalarını ve somatik hücelere dönüşebilmelerini sağlar. Farklılaşmaları önlenerek proliferasyonlarından sonra, trofoblastlara ve üç embriyonik germ tabakasına (endoderm; mesoderm; ectoderm) dönüşme yetisindedirler (59).

Fare embriyonik kök hücrelerinin bu pluripotensiyelliği, kültür medyumuna farklılaşmadan çoğalabilmeyi sağlayan lösemi inhibitör faktör (LIF) katılarak veya mitotik olarak inaktive edilmiş fetal fare fibroblast hücreleri ile birlikte kültüre edilerek saklı tutulur. Yoksa spontan olarak in vitroda üç germ tabakası orjinli doku ve hücelere dönüşürler (59). LIF, gp130 yolu ile etki gösteren bir pleitrofik sitokindir. Bu yol siliar nörotrofik faktör, onkostatin M ve interlökin 6 gibi sitokinlerle ilişkilidir. Bu sitokinlerin her biri embriyonik kök hücrelerinin pluripotansiyelliğinin korunmasını sağlar. LIF’de bu sitokinler üzerine etkilidir. Rhesus maymunu ve insan embriyonik kök hücreleri üzerinde böyle bir etkisi olmayan LIF’in fare embriyosundaki fizyolojik rolü, embriyonik gelişimin yavaşlaması sırasında ICM’nin yaşayabilirliğini sürdürmektir. Bu yavaşlama esnasında LIF’i eksik olan fare embriyolarının ICM’leri bozulmakta ve ölmektedir (101).

Embriyonik kök hücreler in vivo ortama transfer edildiklerinde normal gelişimlerini sürdürür ve tüm dokuların oluşumuna katılırlar.

Günümüzde, blastosistteki iç hücre kitlesini (ICM) oluşturan embriyoblastların, pluripotansiyel hücreler olmasından; yani gerekli sinyal ve ortamlar sağlandığında kas hücresinden, deri, kan, pankreas, sinir, karaciğer hücresi gibi neredeyse 220 çeşit farklı hücreye dönüşebilme yeteneğinde olmalarından yararlanılarak embriyonik kök hücrelerin hastalıkların tedavisinde kullanılması gündeme gelmiştir (50, 59).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. HAYVANLAR

Araştırmamızda 50 adet, 3-4 aylık, sağlıklı, 200±30 gram ağırlığında, Sprague-Dawley cinsi, albino, dişi sıçanlar kullanıldı.

Hayvanlar araştırma süresince 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısısı 21±1 °C ve nemi %45-65 olarak ayarlanmış ortamda yaşatıldı. Hayvanlara insizyonel yara oluşturulacağı için her biri ayrı polikarbon şeffaf kafeslere konularak, deneye başlamadan iki hafta önce ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Standart sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

Araştırmamızda her grupta 15 hayvan olacak şekilde 3 ayrı deney grubu oluşturuldu.

#### Gruplar

<b>Grup 1:</b> Kontrol grubu	n=5
<b>Grup 2:</b> Sham grubu	n=15
<b>Grup 3:</b> Embriyonik kök hücre grubu	n=15
<b>Grup 4:</b> Ovaryum folikül sıvısı grubu	n=15

#### 3.2. DENEY PROTOKOLÜ

##### 3.2.1. Biyolojik Gereçler

### **3.2.1.1. Embriyonik Kök Hücre (EKH)**

Araştırmamızda kullandığımız EKH'ler ESOGU, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı embriyoloji laboratuvarlarında elde edilmiştir.

#### **Blastosist Elde Edilme Yöntemi:**

Seksüel olarak matür dişi sıçan ile yine seksüel olarak matür sağlıklı erkek sıçan çiftleşme için bir gece bir arada tutuldu. Ertesi sabah vaginal smear kontrolü ile gebeliğin birinci günü tespit edildi. Beşinci günde gebe sıçana yüksek doz anestezi madde verilmesinin ardından (Ketamine+Xylazine 90 + 10 mg/kg i.p.) derhal servikal dislokasyon ile öldürülerek hayvanın uterus boynuzları çıkarıldı ve uterus boynuzları kültür medyumuna içinde yıkanarak blastosistler elde edildi. Elde edilen blastosistler spontan hatching için kültür mediumuna alındı (111).

#### **Spontan Siklusla Elde Edilen Blastosistlerin Kültürü:**

Kültür mediumu olarak Complete Blastosist (Complete Blastosist, Irvine Scientific, Cat#9930, Lot#993060358 ) kullanıldı. Toplanan blastosistler orta petri içinde Complete Blastosist mediumu ile hazırlanmış temiz mikrodamlara yerleştirildi. Elde edilen blastosistlerin kültür değişimi yapılarak spontan hatchingleri kontrol edildi. Spontan hatching yapmayanların zona pellusidaları kimyasal (Asid Thyrode, Irvine Scientific, Cat#99252 Lot#9925210712) olarak uzaklaştırıldı. Spontan ya da kimyasal hatching yapan blastosistler embriyonik kök hücre medyumuna alındı.

#### **Primer Embriyonik Kök Hücre Elde Etme Yöntemleri:**

Bunun için önce %0.1'lik jelatin kaplı dört gözlü kültür kapları hazırlandı.

### **%0.1'lik jelatin solüsyonu hazırlığı;**

2gr. toz jelatin 100ml ultrafiltre distile suya eklenerek karıştırıldı. Cam serum şişesinde 30 dakika otoklavlanarak (hem jelatinin erimesi hem de sterilitenin sağlanması için) %2'lik jelli stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyondan 50 ml alınarak 950 ml steril su ile karıştırılıp %0.1'lik jelatin solüsyonu elde edildi. Sterilizasyondan daha emin olmak için ayrıca 0.22µm filtrasyon uygulandı.

### **Jelatin kaplı kültür kaplarının hazırlanması:**

4 gözlü petriyer alınarak her göze 0.5 ml %0.1'lik jelatin solüsyonu konulmak suretiyle oda sıcaklığında steril kabin içinde 30 dakika bekletildi. Hemen kullanılmayacak olanlar streçlenip buzdolabına kaldırıldı. Petriyer kullanılacağı zaman jelatin aspire edildi, steril kabin havasında kurutulduktan sonra yerine embriyonik kök hücre mediumu kondu.

### **Embriyonik kök hücre mediumunun hazırlanması:**

Embriyonik kök hücre mediumu %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Cambrex Bio Science, Cat#DE 14-801E, Lot#5SB0003) ve LIF içeren 250 ml Basal Medium A'ya (Basal Medium, ES-Cult™ Stem Cell Technologies, Cat#05801, Lot#35269597) (Medium DMEM/ F12, D-Glukoz, L-Glutamin, Sodyum Bikarbonat içeriyor) 0.5 ml stok basic-fibroblast growth faktör (β-FGF) eklenerek hazırlandı (74, 108, 113).

### **Stok β-FGF hazırlanışı:**

5 ml %0.1 FBS'li PBS'ye 10µg β-FGF (Human FGF-b, rh Basic Fibroblast Growth Factor, Stem Cell Technologies, Lot# 3J229594) eklendi. Bu amaçla -20°C'de muhafaza edilen β-FGF +4°C'de çözdürüldü. 25µg/100µl çözülmüş solüsyondan 5ml %0.1 FBS'li PBS'ye 40 µl β-FGF eklenerek stok β-FGF solüsyonu elde edildi.

Elde edilen primer embriyonik kök hücrelerin alt pasajlanması yapılarak kök hücre deney grubunda ki hayvanların sırt bölgesindeki primer insizyon hattına dikiş altı yolla 9. gün, 3. pasaj farklılaşmamış embriyonik kök hücreler transfer edildi.

### **3.2.1.2 Ovaryum Folikül Sıvısı**

Araştırmamızda kullandığımız ovaryum folikül sıvıları ESOGÜ Üreme Sağlığı Merkezinde IVF/ET protokolü uygulanan infertil kadınların preovulatar foliküllerinden elde edildi ve toplandıktan hemen sonra Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalımız embriyoloji laboratuvarında hazırlandı.

#### **Folikül sıvısı hazırlanışı;**

Folikül sıvısı örnekleri konik tüplere paylaştırıldı ve 1000g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde, pelet hareket ettirilmeden, pipet yardımıyla ayrı bir tüpe aktarıldı. 0.22µm'lik filtrelerden geçirilerek 3ml'lik aliquotlar oluşturulup -20°C 'de stoklandı (3, 4, 15, 16, 20, 26, 35, 36, 45, 46, 47, 48, 51, 53, 79, 83, 88, 90, 91, 95, 98, 110, 116).

### **3.2.2. Primer İnsizyonel Yara Oluşturulması**

Hayvanlar insizyon oluşturmadan 1 gün önce anestezi uygulanacağı için aç bırakıldı. Anestezik madde olarak 0.008 ml/gr ketalar, kasılmayı önlemek için 0.005ml/gr rompun intramüsküler olarak uygulandı (111). Tüm hayvanların dorsal sol tarafları tıraş edilip önce suyla sonra batikonla temizlendi. Makas yardımıyla 3cm uzunluğunda ve derinliği kasa kadar olan insizyonlar oluşturuldu. Dikişler steril, atraumatik, metrik 3.5, nonkapiller örgülü siyah sütür materyaliyle atıldı.

Primer yara oluşturulduktan sonra hayvanlar ayrı kafeslerine yerleştirildi ve anestezi sırasında vücut ısıları düştüğü için üzerleri talaşla örtüldü.



### **3.2.3. Gruplar**

#### **Grup 1: Kontrol Grubu**

Bu gruptaki hayvanların deri örnekleri, hiçbir işlem uygulanmamış hayvanlarının dorsal sol tarafından elde edildi.

#### **Grup 2: Sham Grubu**

Bu gruptaki hayvanların dorsal sol tarafında 3cm'lik insizyon oluşturulup, sütür atıldı.

#### **Grup 3: Kök Hücre Grubu**

Bu gruptaki hayvanların dorsal sol tarafında 3cm'lik insizyon oluşturulup, sütür atıldıktan sonra 200µl farklılaşmamış embriyonik kök hücre dikiş altına enjekte edildi.

#### **Grup 4: Follikül Sıvısı Grubu**

Bu gruptaki hayvanların dorsal sol tarafında 3cm'lik insizyon oluşturulup, sütür atıldıktan sonra follikül sıvısı hem 80 IU dikiş altı enjekte edildi hem de her gün pulverizasyon yoluyla uygulandı.

### **3.3. DOKULARIN ALINMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yara bölgesi deri örnekleri insizyon hattı oluşturulduktan sonraki 1., 2., ve 3. hafta sonunda alındı. Doku örnekleri alınırken eter anestezi uygulandı ve insizyon hattını içeren 4x1cm'lik bölge tamamen kesilip çıkartıldı. Alınan dokular, nötral formalin fiksatifte 24-48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokuların rutin

histolojik takipleri yapıldı. Doku takip metodu, gereç ve yöntemlerin sonunda belirtilmiştir.

Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden mikrotom (Leica RM 2145) yardımıyla 5µm kalınlığında seri kesitler şeklinde lamlara alındı ve 4 değişik histolojik boyama yöntemi uygulandı. Boyanan kesitler entellan ile kapatılıp DP 70 dijital kamera ekli Olympus BX-61 mikroskop ile incelenip görüntülendi.

### 3.3.1. Deri İçin Uyguladığımız Doku Takip Metodu

- Nötral Formalin solüsyonda fiksasyon : 24-48 saat
- Yıkama : 3 saat
- 70°'lik alkol : 30 dk
- 80°'lik alkol : 30 dk
- 90°'lık alkol : 30 dk
- 96°'lık alkol I : 30 dk
- 96°'lık alkol II : 30 dk
- 100°'lük alkol I : 30 dk
- 100°'lük alkol II : 30 dk
- 1/1 Absolü + Ksilol : 5 dk
- Ksilol I : 5-10 dk
- Ksilol II : 5-10 dk
- 1/1 Ksilol + Parafin : 30 dk
- Parafin I : 1 saat
- Parafin II : 1 saat
- Parafin III : 1 saat

### 3.3.2. Deri İçin Uyguladığımız Hematoksilin-Eozin (H&E) Boyama Yöntemi

- Ksilol I : 20 dk
- Ksilol II : 20 dk

■ 96°'lık alkol II	: 5 dk
■ 96°'lık alkol I	: 5 dk
■ 90°'lık alkol	: 5 dk
■ 80°'lik alkol	: 5 dk
■ 70°'lik alkol	: 5 dk
■ Distile su	: 5 dk
■ Hematoksilin	: 2 dk
■ Yıkama (akar suda)	: 5dk
■ Eozin	: 5 dk
■ 70°'lik alkol	: 3 dk
■ 80°'lik alkol	: 3 dk
■ 90°'lık alkol	: 3 dk
■ 96°'lık alkol I	: 3 dk
■ 96°'lık alkol II	: 3 dk
■ Ksilol I	: 20 dk
■ Ksilol II	: 20 dk

### 3.3.3. Deri İçin Uyguladığımız Periyodik Asit Schiff-Hematoksilin (PAS-HE) Boyama Yöntemi

■ Ksilol I	: 3 dk
■ Ksilol II	: 5 dk
■ Ksilol III	: 5 dk
■ 96°'lık alkol	: 2 dk
■ 90°'lık alkol	: 2 dk
■ 80°'lik alkol	: 2 dk
■ Distile su	: 1 dk
■ PAS	: 5 dk
■ Distile su	: 2 dk
■ Schiff	: 15 dk
■ Yıkama (akar suda)	: 2 dk
■ Hematoksilin	: 1,5 dk

■ Yıkama (akar suda)	: 1 dk
■ Asit alkol	: 1 sn
■ Yıkama (akar suda)	: 1 dk
■ 100°'lük alkol	: 1 dk
■ Ksilol I	: 1 dk
■ Ksilol II	: 1 dk

### 3.3.4. Deri İçin Uyguladığımız Weigert'in Rezorsin Fuksin Boyama Yöntemi

■ Ksilol I	: 20 dk
■ Ksilol II	: 20 dk
■ 96°'lık alkol II	: 3 dk
■ 96°'lık alkol I	: 3 dk
■ 90°'lık alkol	: 3 dk
■ 80°'lik alkol	: 3 dk
■ 70°'lik alkol	: 3 dk
■ Çalışma solüsyonu	: 30 dk (56 <sup>0</sup> C etüv içinde)
■ %1'lik Asit alkol	: Çalkala
■ Yıkama (akar suda)	: 5dk
■ Van Gienson	: 1 dk
■ Distile su	: Çalkala
■ %1'lik Asit alkol	: Çalkala
■ Distile su	: Çalkala
■ 70°'lik alkol	: 3 dk
■ 80°'lik alkol	: 3 dk
■ 90°'lık alkol	: 3 dk
■ 96°'lık alkol I	: 3 dk
■ 96°'lık alkol II	: 3 dk
■ Ksilol I	: 20 dk
■ Ksilol II	: 20 dk

**Çalışma solüsyonu:** 100 cm<sup>3</sup> Distile su, 1 gr Bazik Fuksin, 2 gr Resorcin karıştırılıp kaynatılır. 12.5 cm<sup>3</sup> taze hazırlanmış %30'luk ferrik klorid solüsyonu eklenir ve 5dk daha kaynatılır. Karışım soğutulup filtre edilir. 100 cm<sup>3</sup> 95°'lik alkol ve 2 cm<sup>3</sup> hidroklorik asit eklenir.

### 3.3.5. Deri İçin Uyguladığımız Masson Trikrom Boyama Yöntemi

■ Ksilol I	: 20 dk
■ Ksilol II	: 20 dk
■ 96°'lık alkol II	: 5 dk
■ 96°'lık alkol I	: 5 dk
■ 90°'lık alkol	: 5 dk
■ 80°'lik alkol	: 5 dk
■ 70°'lik alkol	: 5 dk
■ Distile su	: 5 dk
■ Hematoksilin	: 1 dk
■ % 1'lik Glasiyal asetik asit	: 1 dk
■ Yıkama (akar suda)	: 5 dk
■ Asit fuksin	: 5 dk
■ Distile su	: 1 dk
■ Fosfomolibdik asit	: 5 dk
■ Distile su	: 1 dk
■ % 1'lik Glasiyal asetik asit	: 2 dk
■ 70°'lik alkol	: 2 dk
■ 80°'lik alkol	: 2 dk
■ 90°'lık alkol	: 2 dk
■ 96°'lık alkol I	: 2 dk
■ 96°'lık alkol II	: 2 dk
■ Ksilol I	: 20 dk
■ Ksilol II	: 20 dk

## 4. BULGULAR

Cerrahi operasyonlar sonucunda oluşan primer insizyonal yaraların iyileşmesi, hastanın maddi ve manevi açıdan konforunun sağlanması için son derece önemlidir ve bu süre ne kadar kısa olursa o kadar iyidir.

Primer insizyonal yara iyileşmesinin deri kesitlerinde genel özelliklerin ortaya konmasına yönelik Hematoksilin-Eozin (H&E), bazal membran bütünlüğünü ve ECM sentezini ortaya koymak için Periyodik Asit Schiff - Hematoksilin (PAS-HE), elastik liflerin yapılanmasını belirlemek için Weigert'in Rezorsin Fuksin boyası ve bağ doku elemanlarını özellikle kollojen lif sentezi ve reorganizasyonunu göstermek için Masson'un Trikrom boyası uygulandı.

### 4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

#### 4.1.1. Grup 1 (Kontrol grubu) Bulguları

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait deri kesitlerini incelediğimizde; epidermisin stratum bazale, stratum spinozum, stratum granülozum, stratum lusidum ve stratum korneum içeren beş hücre tabakasından oluştuğu gözlemlendi. Dermis ise stratum papillare ve stratum retikularis olmak üzere iki tabaka halinde gözlemlendi. Stratum papillare gevşek bağ dokusu yapısında olup hücreden zengindi. Stratum retikularis ise sıkı düzensiz bağ dokusu yapısında olup daha az sayıda hücre içeriyordu. Hipodermis tabakasında ise bol miktarda yağ hücresi belirlendi (Resim 1).

PAS+HE tekniği uyguladığımız deri kesitlerinde, epidermis altında çok ince bir hat şeklinde seyreden bazal membran koyu pembe olarak belirgin gözlenirken, dermiste bulunan kollajen lif demetleri açık pembe olarak boyandı (Resim 3).

Weigert'in Rezorsin Fuksin boyama yöntemi uygulanan deri kesitlerinde dermiste koyu mor-siyah renkte gözlenen elastik lifler, pembe boyanan kollajen lif

demetleri arasında demet oluşturmada, dallanma göstererek dağınık olarak yerleşmişti. Elastik liflerin stratum retikulare ile karşılaştırıldığında papillare tabakasında daha çok sayıda oldukları gözlemlendi (Resim 4).

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız deri kesitlerinde ise dermisteki kollajen lif demetleri mavi-yeşil renkte gözlemlendi. Kollajen lif demetlerinin stratum papillare tabakasında aralarında geniş boşluklar bırakarak düzenlendiği, stratum retikularede ise daha sıkı demetler oluşturduğu gözlemlendi (Resim 2).

#### **4.1.2. Grup 2 (Sham grubu) Bulguları**

Primer insizyonel yara oluşturulan gruba ait doku örnekleri yara iyileşmesinin fazlarını takip etmek için 1., 2., ve 3. haftalar sonunda alınmıştır. Her hafta ayrı bir grup olarak kabul edilmiş ve içinde bulunduğu yara iyileşmesi fazı kriterlerine göre bulgular çıkartılmıştır.

##### **1. Hafta Bulguları**

Birinci hafta sonunda hematoksilin-eozin ile boyanmış primer insizyonel deri kesitleri incelendiğinde; inflamatuvar faz hücrelerinin fagositozu sayesinde hemostastazis sonucunda yara alanını dolduran fibröz pıhtının iyice gerilediği, epitelizasyonun başladığı fakat epidermis bütünlüğü tam olarak sağlanmadığı için yara alanıyla temas halinde olan krut varlığı dikkati çekti. Ayrıca infiltratif hücrelerin bilinen kemoatraktan özelliklerinden etkilenen fibroblastların yara alanına göçü gözlemlendi. Dermiste ise ekstrasellüler proteolizler sonucu oluşan çok sayıda hücre içi ve hücreler arası boşluklar (anjyogeneziste endotelin yol alması ve uzaması sırasında oluşurlar ve sonunda bu alanlarda damarlar oluşur) gözlemlendi (Resim 5, 6, 7).

PAS-HE boyama yöntemiyle ECM sentezinin sadece fibroblastlar etrafında sınırlı kaldığı tam olarak şekillenmediği, BM bütünlüğünün ise sağlanmadığı gözlemlendi (Resim 8).

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız deri kesitlerinde ise, ECM sentezi ve birikiminin yeni başladığı ve sentezlenen kollajen liflerin henüz demet oluşturmadığı, bu nedele normal yapıdaki çevre bağ doku mavi-yeşil renkte boyanırken insizyon alanının bu tür bir boyanma özelliği göstermediği gözlendi (Resim 9).

Weigert'in Rezorsin boyama tekniğiyle boyanmış deri kesitlerinde , elastin sentezi kollajen lif sentezinden daha geç sürede ve daha az sayıda meydana geldiği için insizyon hattı boyunca elastik lifler gözlenmedi.

## **2. Hafta Bulguları**

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde; re-epitelizasyonun 2. haftada tamamlandığı gözlendi. Bu haftada gözlenen faz fibrozis fazıdır ve bu fazın bilindiği gibi önemli iki hücresi makrofajlar ve fibroblastlardır. Bulgularımızda, I. haftaya göre makrofajlar ve fibroblastlar daha çok sayıda, inflamatuvar hücreler (PMNL) ise daha az sayıda belirlendi. Artan fibroblastlar sayesinde kollajen ve diğer ECM komponentlerinin sentezinin ve depolanmasının arttığı dikkati çekti. Neovaskülarizasyonda artmış olan ekstrasellüler boşlukların ise 1. haftaya oranla azaldığı gözlendi (Resim 10, 11).

PAS-HE boyama yöntemiyle boyanmış primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde; dermiste ECM sentezinin ve birikiminin arttığı, BM bütünlüğünün ise sağlandığı gözlendi.

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde ise, kollajen liflerin demet oluşturmaya başladıkları için açık yeşil-mavi renkte boyanma özelliği gösterdikleri gözlendi.



### **3. Hafta Bulguları**

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde; I. ve II. haftayla karşılaştırıldığında yara alanındaki fibroblast sayısında ve bunun sonucu olarak ta ECM ve kollajen sentezinde artma olduğu ancak dermal bütünlüğün sağlanamadığı gözlemlendi (Resim 12, 13).

PAS-HE boyama yöntemi ile boyanmış deri kesitlerinde, insizyon alanında ECM ve kollajen sentezinin arttığı, çevre bağ dokuya oranla daha koyu-pembe renkte boyanma özelliğiyle tespit edildi (Resim 14).

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız deri kesitlerinde de, insizyon alanında fibroblast sayısının ve bunun sonucu olarak da ECM sentezi ve birikiminin arttığı, hücre yoğun alanların açık-yeşil renk boyanma özelliğiyle tespit edilmiştir.

#### **4.1.3. Grup 3 (EKH grubu) Bulguları**

##### **1. Hafta Bulguları**

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde sham grubunun 1.haftasındaki iyileşme bulguları ile EKH grubu 1. haftasıyla karşılaştırıldığında; re-epitelizasyonun tamamlandığı ve krutun uzaklaştığı ilk olarak dikkat çekmektedir. İnsizyon alanına transfer edilen farklılaşmamış EKH'lerin fibroblastlara farklanması sonucunda fibroblastlar inflamatuvar hücrelerden sayıca çok fazla bulundu ve hakim fazın fibroplazinin erken aşaması olduğu gözlemlendi. Fibroblastların sentezi sayesinde, yıkılan hasarlı matriksin hızla tamir edilmeye başlandığı saptandı (Resim 15, 16, 17).

1. haftada ayrıca fibroblastların anjiyogenezi stimüle etmesi sonucunda, anjiyogenezin ilk safhalarında ekstrasellüler proteolizler sonucu oluşan dermisteki

hücre içi ve hücreler arası boşluklar sham grubunun I. haftasına oranla çok daha az olarak gözlemlendi.

PAS-HE boyası uygulanan deri kesitlerinde; yara alanında artan fibroblast sayısı ile paralel olarak ECM sentezinin arttığı ve bazal membran bütünlüğünün sağlandığı gözlemlendi. Ayrıca yine artan fibroblast sayısındaki artmadan dolayı yeni oluşan kapillerler etrafında matriks bileşenlerinin sentez edilmesi ve damar kan akımının başlaması anjiyogenezin son aşaması olan damar olgunlaşmasına girildiğini gösterdi (Resim 18).

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde ise, sentezlenen kollajen liflerin demet oluşturmaya başladığı, açık mavi-yeşil renkte boyanma özelliğiyle tespit edildi (Resim 19).

## **2. Hafta Bulguları**

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış primer insizyonel yara içeren deri kesitlerindeki bulguları; maturasyon fazına girilmiş olduğu şeklinde yorumladık. Çünkü sham grubu II. hatta III. hafta yara iyileşmesi bulgularıyla karşılaştırıldığında EKH grubunun bu haftasında insizyon alanı oldukça daralmış olduğu gözlemlendi. Bu bulgumuz da, maturasyon fazında kontraksiyon aşamasına girildiği ve yara alanı fibroblastlarının kontraktil miyofibroblastlara dönüştüğü bilgileriyle örtüştü. Ayrıca fibroblast ve yeni damar sayısının azalması ise maturasyon fazının diğer bir göstergesi olarak tespit edildi.

PAS-HE boyama yöntemi uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde, yara boyutunun küçüldüğü gözlemlendi ve bu küçülmenin progresif kontraksiyona bağlı olduğu düşünüldü. Dermis retiküler tabakanın ortasından epidermise kadar uzanan dar bir insizyon hattının varlığı, sentezlenen matriks bileşenlerinin koyu pembe renkte yoğun boyanma özelliğiyle tespit edildi (Resim 20, 21, 22).

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde ise bu dar insizyon hattında az sayıda bağ doku hücreleri ile hızla reorganizasyonlarını tamamlamaya çalışan kollajen demetler dikkat çekti (Resim 23, 24).

### **3. Hafta Bulguları**

Hematoksilin-Eozin boyama tekniği uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde ; 3. haftada tüm epidermis- dermis kısımlarının histolojik yapısı bakımından kontrol grubuyla benzer olduğu gözlendi.

PAS-HE boyama tekniği uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde, Tüm kesit yüzeyinin aynı renklerde boyanması, insizyon hattının belli olmamasını ECM-kollajen sentezi ve birikiminin sona erdiği, buna paralel olarak kollajen reorganizasyonunun tamamlandığı şeklinde yorumladık. Bu bulgumuz EKH 3. haftasının kontrol grubuyla aynı histolojik yapıda olduğu dşuncemizi destekledi (Resim 25, 26).

Ayrıca Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız deri kesitleri bulgularımız da Hematoksilin-Eozin ve PAS-HE 3. hafta bulgularımızı destekledi. Tüm dermis kollajen lif demetlerinin aynı mavi-yeşil renkte boyandığı gözlendi (Resim 27).

Weigert'in Rezoksin boyama tekniği uyguladığımız primer insizyonel deri kesitlerinde elastik lifler kontrol grubuyla aynı histolojik yapıda tespit edildi.

#### **4.1.4. Grup 4 (Ovaryum Folikül Sıvısı Grubu) Bulguları**

##### **1. Hafta Bulguları**

Ovaryum folikül sıvısı ile tedavi edilmiş 4. gruba ait 1. hafta deri kesitlerinde, hem sham grubu hem de EKH grubuyla karılaştırıldığında ovaryum folikül sıvısı

uygulanan grupta oldukça dikkat çekici bir iyileşme gözlemlendi. Bu iyileşme EKH grubunun II. hatta III. haftasına karşılık gelebilecek nitelikteydi.

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış kesitlerde; maturasyon fazının özellikleri gözlemlendi. İnsizyon hattı neredeyse üst üste tek sıra bağ doku hücrelerinden oluşacak kadar daralmıştı. Bu hat çevresinde ise tamamen kontrol grubuyla aynı histolojik yapı özelliği gösteren bağ doku tipi tespit edildi. Ayrıca epitelizasyon tamamlandığı ve epidermin tüm tabakalarının eksiksiz bir şekilde oluştuğu gözlemlendi. Anjiyogenik özelliklere ise hiç rastlanmadı. Bu bulgu da maturasyonun bir özelliği olan anjiyogenezin gerilemesini doğrular nitelikteydi (Resim 28, 29).

PAS-HE boyama yöntemi uyguladığımız primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde, oldukça dar insizyon hattı üzerinde bulunan az sayıdaki hücrenin ECM sentezinin yok denilecek kadar az olması ilk olarak dikkati çekti. Bu bulgu, burada bulunan hücrelerin fibroblastan çok miyofibroblastlara farklılaşmış hücreler olduğunu fikrini destekler nitelikteydi. Epidermis altındaki BM bütünlüğünün oluşmasına bağlı olarak koyu pembe-morrenkte, düzgün bir hat şeklinde gözlemlendi (Resim 30, 31).

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde mavi-yeşil renkte boyanan kollajen lif demetlerinin kontrol grubuyla benzer histolojik organizasyonda olduğu gözlemlendi (Resim 32, 33).

Weigert'in Rezoksin boyama tekniği uyguladığımız primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde; normalde kollajene oranla daha geç ve az oluşmasına karşın ovaryum folikül sıvısı grubunun I.haftasında, dermiste elastin yapımına bağlı olarak elastik lifler hem insizyon hattı çevresindeki bağ dokusunda hem de subepidermal tabakada kontrol grubuyla benzer histolojik yapıda gözlemlendi (Resim 34).

## **2. Hafta Bulguları**

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış kesitlerde insizyon hattının subepidermal tabakaya kadar gerilediği ancak 1. haftayla karşılaştırıldığında fibroblast sayısının ve buna paralel olarak ECM ve kollajen sentezinin kısmen daha fazla olduğu dikkati çekti. Diğer dermis kısımları ise kontrol grubuyla benzer histolojik yapıda gözlemlendi (Resim 35).

PAS-HE boyama yöntemi uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde de, subepidermal insizyon hattındaki ECM sentezinin sadece subepidermal tabakayla sınırlı ancak 1. haftaya oranla daha fazla olduğu tespit edildi. Epidermis altındaki BM, bütünlüğünün oluşmasına bağlı olarak oldukça belirgin, koyu pembe-mor hat şeklinde gözlemlendi.

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde, subepidermal tabakada fibroblast sayısının ve kollajen lif sentezinin arttığı ve demetlerin yeniden oluşmaya başladığı gözlemlendi (Resim 36, 37).

Weigert'in Rezoksin boyama tekniği uyguladığımız primer insizyonel yara içeren deri kesitlerinde elastik lifler yara alanında değil sadece çevre bağ doku içinde ve subepidermal alanda gözlemlendi (Resim 38).

## **3. Hafta Bulguları**

Hematoksilin-Eozin ile boyanmış primer yara kesitlerinde 4.grubun I. ve II haftasıyla karşılaştırıldığında insizyon hattının epidermis- hipodermis boyunca genişlediği, fibroblast proliferasyonunun ve ECM sentezinin yeniden arttığı gözlemlendi. Epidermis bütünlüğü ve kalınlığı ise diğer haftalarla ve kontrol grubuyla benzerdi (Resim 39, 40).

PAS-HE boyama yöntemi uyguladığımız primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde de, ECM sentezinin fibroblast sayısı ile orantılı olarak yeniden arttığı tespit edildi. Epidermis altındaki BM bütünlüğü de belirgin hat şeklide gözlemlendi (Resim 41, 42).

Masson'un Trikrom tekniği uyguladığımız primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde, yara çevresi ile karşılaştırıldığında, lokal olarak, insizyon hattında yeni sentezlenmiş kollajen liflerin düzgün demetler oluşturduğu dikkati çekti (Resim 43, 44).

Weigert'in Rezoksin Fuksin boyama tekniği uyguladığımız primer insizyonal yara içeren deri kesitlerinde elastik lifler yara alanında gözlenmezken normal çevre bağ dokuda ve epidermis altındaki tabakada bulundu.

## 5. TARTIŞMA

Yaralarda, özellikle cerrahi uygulamalar sonucunda oluşan primer insizyonel yaralarda, iyileşmeyi olumsuz yönde etkileyecek bir durum olmadıkça yara inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon dönemlerini izleyerek iyileşir. Çünkü; canlı organizmanın en iyi ve temel savunma mekanizmalarından biri yarayı iyileştirme gücüdür.

Yalnızca Birleşmiş Milletler'de her yıl 40 milyondan daha fazla cerrahi operasyon yapıldığı dikkate alındığında tüm dünya genelinde bu oran oldukça fazladır (102). Sadece akut yara iyileşmesi sürecinde hastaların postoperatif ağrıdan toparlanmaya kadar olan sürede, maddi-manevi bir çok aşamadan geçtiği göz önünde bulundurulduğunda, minimal invaziv cerrahi klinik araştırmalarda altı çizilen en önemli nokta olmuştur. Çok hızlı postoperatif geri kazanım sağlanabilmesi için çok küçük insizyonlar faydalıdır. Tüm bu nedenlerden dolayı son zamanlarda laparoskopik uygulamalarda yoğunlaşmıştır. Laparoskopi yalnızca abdominal bir prosedür olmaktan çıkmış, insizyonu en aza indirerek hastanın en kısa zamanda normal aktivitesine geri dönmesine izin veren bir teknik halini almıştır (102). Bu teknik sayesinde ayrıca enfeksiyon riski, aşırı skar gelişimi ve şiddetli kontraksiyon gibi komplikasyonlarda önlenmiş olur. Zaten yara alanındaki hızlı tamirin en temel ilkesi; kontaminasyonu en aza indirip, immün mekanizmaları maksimuma çıkarmak ve bu durumu muhafaza etmektir. Bu nedenle yara bakımı, cerrahi hemşireliği uygulamaları içinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu alanda da çeşitli pansuman malzemeleri ve solüsyonlarıyla ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Ancak laparoskopik cerrahi operasyonda kullanılmaktadır.

Cerrahi operasyonların çoğunda oldukça uzun insizyonlar olur. Bu uygulamalar sonucunda primer yaraların yanı sıra çok sayıda sekonder yaralarda oluşur. Sekonder yaralar ayrıca cerrahi müdahale olmaksızın uzun süreli vücudun hareketsiz kalması yada yatağa bağımlı yaşam sonucunda spontan gelişebilir. Cerrahi sırasında yapılan uygulamalar ya da kullanılan malzemeler, hastanın yara oluşmadan önce muzdarip

olduğu bazı hastalıklar (diyabet , kemoterapi uygulamaları gibi) iyileşme mekanizmasını bozabilir veya iyileşme sürecini geciktirebilir. Venöz ülser, basınç yaraları, yanık yarası ve travmatik yaralar da iyileşmenin geciktiği kliniksel problemlerdir. Yine yaşla yara iyileşme hızı ters orantılıdır; yaş ilerledikçe yara iyileşmesi gecikir (87 115).

Bu nedenlerden dolayı yara iyileşmesi günümüzde çok incelenen bir konu olmuştur. Yara tedavisinin başlıca hedefi yaranın hızlı, fonksiyonel ve estetik bir skar dokusu ile kapanmasıdır. Tedavilerde, iyileşmenin bozulduğu durumlarda eksik olanın yerine konmasında yada normal iyileşmenin hızlandırılmasında pek çok teknik kullanılmaktadır.

Yakın zamana kadar yara iyileşmesi araştırmalarında sıcaklık uygulamaları iyileşmeyi hızlandırıcı tekniklerin başında gelmekteydi. Yüzeyel ısıtıcılar (Hot-pack, infraruj gibi), derin ısıtıcılar (ultrason, diatermi gibi) ve ultraviyole ışınının, yara iyileşmesinde genel ve periferik donanımı arttırmak suretiyle etkili oldukları konusunda araştırmalara rastlanmaktadır.

Ancak son zamanlarda sitokinler ve büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar yara sıvısı analizlerine yoğunlaşmışlardır (2, 19, 39, 115).

Yara sıvısının immünokimyasal analizlerinde; flourescent-synthetic peptid metodu, dot-blot, western-blot, bradford protein yöntemi, RİA (radioimmuno assay) gibi pek çok teknik kullanılmasına rağmen en çok kullanılan teknik ELİSA (enzyme-linked immunoabsorbent assay)'dır. Doku kesitlerindeki sitokin konsantrasyonlarının belirlenmesinde ise immünohistokimya kullanılmaktadır (2, 19, 39, 115).

Yapılan analizler sonucunda; sitokinlerin yara iyileşmesinin tüm fazlarında görev aldıkları, yara tamirini başlatarak zaman-bağımlı tamir süreçleri için gerekli olan tüm aracı yolakları indükleyerek, iyileşmeyi kontrol ettikleri ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca



yapılan analizler sonucunda diyabetli hastalarda ya da glikokortikoid tedavisi gören hastalarda, yaşlılarda ve yanık yarası gibi kronik yaraların yara sıvısı analizlerinde sitokin konsantrasyonlarının veya onların dokuda bulunan reseptörlerinin azaldığı tespit edilmiş ve yara iyileşmesinde bozulma veya iyileşememe gibi klinik problemlerinde bunun bir sonucu olduğu rapor edilmiştir. Bu gecikmelerin arkasında hücresel ve moleküler mekanizmaların iyileşme için yetersiz kalması yatmaktadır (5, 12, 18, 19, 33, 60, 81, 85, 115, ).

Yaşlılarda yara iyileşmelerindeki bu gecikme ilk olarak, I. Dünya Savaşı sırasında Carrell ve Du Nouy'sun dikkatini çekmiş, genç ve yaşlı hastalar arasındaki iyileşme oranlarını kliniksel olarak karşılaştırdıklarında anlamlı bir fark bulmuşlardır. 1932 yılında Howes ve Harvey ratlarda mide yarası çalışmışlar ve fibroblast büyüme hızının ve yara direncinin yaşlı ratlarda azaldığını rapor etmişlerdir. Hem Swift ve arkadaşları hem de Bucher ve Klingsberg yaşlı sıçan ve insanlarda yaptıkları çalışmalarında reepitelizasyondaki gecikmeyi, kollajen sentezi ve reorganizasyonundaki azalmayı tespit etmişlerdir (115).

Son zamanlardaki klinikle ilgili çalışmaların çoğu kronik yaralar üzerinedir. Kronik yaralarda sitokin seviyelerinin oldukça az olduğu bilinmektedir ancak akut yaralardaki sitokin seviyelerinin ölçümü için bir çok teknik olmasına rağmen kronik yaralarda çok az miktarda bulunan sitokinlerin seviyesini belirleyecek güvenilir bir teknik yoktur. Cooper ve arkadaşları 1994 yılında bir teknik geliştirmişler, miktarları bilinen oldukça düşük konsantrasyondaki sitokinlerle tekniklerini test etmiş ve sonuçta %88-98 benzerlik elde etmişlerdir (19).

Yara sıvısının analizlerinden güvenilir sonuçlar alındıkça araştırmalar bu sıvılarda eksik yada az olan faktörün belirlenmesi, eksiklik sonucunda iyileşmede meydana gelen bozukluklar ve eksik olan faktörün yerine konması hipotezine yoğunlaşmıştır. Bu alanda yapılan araştırmalar sonucunda; yara iyileşmesine katılan tüm sitokinler, bu sitokinlerin iyileşme mekanizmasındaki rolleri, eksikliklerinde görülebilecek anormallikler tespit edilmiş ve çeşitli tedavi prokolleri denenmiştir. Son

olarak ta bu genel bilgiler teknolojiyle birleştirilip rekombinant sitokinler üretilmiştir (78). Rekombinant sitokinler kullanılarak, yara iyileşmesine katılan sitokinlerin aktivitelerinin detaylı mekanizmaları açıklanmış, optimal yara iyileşmesinin sağlanamayacağı hastalık ya da medikal terapi durumlarında tedavi amaçlı olarak uygulanmıştır (87, 102). Yapılan araştırmalar sonucunda; bu ajanların iyileşme sürecini modifiye ederek hızlandırdığı, sadece enfeksiyonu kontrol altına almakla kalmayıp fibroblast migrasyonu ve proliferasyonu yada kollajen sentezi ve degradasyonu için gerekli sinyalleri sağlayarak skar kalitesini arttırdığı, bunun sonucunda da yara gerilim direncinin daha da arttırdığı onaylanmıştır (87).

Araştırmalar sonucunda; sitokinler yara gerilim direnci arttırmakta, skarsız iyileşme sağlayıp normal dermal dokuyu yeniden oluşturmaktadır. Yara iyileşmesinde sitokin kullanımının klinik açıdan oldukça uygun olduğu ve “yakın gelecekte yara tedavisi protokollerinin bu yönde değişeceği düşünülmektedir”(2, 5, 19, 39, 55, 87, 102, 115, 121)

Yara iyileşmesindeki EGF reseptör ligandların rollerinin anlaşılmasında ilk kanıtlar yara sıvısının analizinden sonra elde edilmiştir. Grotendorst ve ark. sıçanlardan toplanan yara sıvısında EGF-like faktörler ortaya çıkarmışlardır. Yara sıvısının çıkarılan asit, anti-EGF antisera ile nötr hale getirilen endotel hücreleri için kemotaktik aktivite göstermiştir. Ayrıca, EGF ve TGF- $\alpha$ 'nın önemli seviyeleri yanık yarası olan hastaların yara alanında graft derilerindeki yara sıvısında bulunmuştur (sonuçlar diğer çalışmalardaki TGF- $\alpha$  için de doğrulanmıştır). Bu grup yara sıvısının bazı tiplerinde ise EGF'nin yalnızca çok düşük seviyeleri ortaya çıkmıştır. Yaradaki EGFR ligandların hücrel kaynağı için yapılan bir araştırmada, Rappolee ve ark. izole yara makrofajındaki TGF- $\alpha$  mRNA'yı ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca genç farelerle karşılaştırıldığında yaşlı farelerin insizyonel yaralarındaki EGF ve EGF reseptörlerinin ekspresyonu gecikme göstermiştir (112).

Çok yakın geçmişte Hong Kong'lu bir grup tarafından Actovegin olarak bilinen bir terapi ile EGF kombinasyon tedavisi uygulanmış ve onların rastgele, çift-kör,

kontrollü denemeleriyle, diyabetik bacak ülserlerindeki iyileşmede %0.04 konsantrasyonda hEGF bulunan bir krem uygulamasında önemli pozitif etkiler gösterilmiştir. Bu doza duyarlılık yara yatağındaki EGF ve diğer growth faktörlerin hazır bulunması için gerekli olan sinyallere bağlı olabileceği düşünülmüştür. Dozlar yara yatağında bulunan proteazların negatifliğini yenmek için yüksek dozda olmalıdır. EGF yara tamirinde potansiyel terapötik bir ajan gibi görünür fakat ilk çalışmalar küçük örnek alanları ve diğer artan değişkenler tarafından sınırlanmıştır. EGF'nin epitelizasyon üzerine güçlü etkileri ışığında; yara tamir terapötikleri umut verici olmuştur. Muhtemelen EGF ilk olarak daha derin yaralardan çok reepitelizasyona ihtiyaç duyan yüzeysel venöz ülserlerde klinik olarak kullanımı daha faydalı olmaktadır. Daha önceki klinik çalışmalarda da insan epidermal büyüme faktörüyle muamele edilen yaralarda epitelizasyon oranının %20 oranında arttığı gösterilmiştir (78).

EGF, TGF- $\alpha$  ve HB-EGF'nin yara tamirindeki pozitif etkileri, farklı yara modellerinde, deneysel ve klinik bir seri çalışmayla gösterilmiştir. EGF, her gün topikal uygulandığında tavşan kulağı yara modeli, split-thickness epidermal yaralar ve parsiyel kalınlıktaki yanıkların epitelizasyonunu arttırmıştır. Kobaylarda, EGF ile desteklenen yaralarda, desteklenmeyenlere oranla, daha fazla kollajen ve glikozaminoglikan toplandığı gösterilmiştir. Diabetik kobaylarda EGF desteği, yara alanında kollajen birikimini hızlandırmıştır. Ayrıca EGF, sistemik uygulanan metilprednizolon'un yara iyileşmesi üzerindeki geciktirici etkisini geri döndürebilmiştir (18, 112).

FGF'lerin yara iyileşmesine olan katkıları da yapılan çalışmalarla açıkça gösterilmiş ve FGF1, FGF2, FGF4, FG7 ve FGF10'un lokal uygulanmasının yara tamirini stimüle ettiği belirlenmiştir. Antoniades ve arkadaşları in-sitü hibridizasyon yöntemi kullanarak domuzlardaki epidermal yaralarda keratinositlerdeki FGF1 ve FGF2 ekspresyonunun upregülasyonunu bulmuşlardır. Werner ve arkadaşları RNaz üretimi yöntemiyle insizyonel fare yaralarında farklı FGF'lerin mRNA seviyelerini belirlemişlerdir. FGF1, FGF2, FGF5 ve FGF7 ekspresyonu normal ve hasarlanmış deride bulunmuş ve tüm bu FGF'lerin ekspresyonu deri hasarlarından sonra artmıştır.

Ayrıca tamir süresince yaşlı farelerde görülen bozulmuş yara iyileşmesinde, bu bozulmanın sebebini FGF2 seviyesinin azalmasıyla anjiogenetik yanıtın azalmasının bir sonucu olarak açıklamışlardır. FGF2 ekspresyonu normal deride hasar sonrası yüksek seviyelerde olup diyabetik sıçanlarda yoktur. Sonuçta FGF ailesinin bir üyesi, büyük ihtimalle FGF2, yara düzenleyici proteinler için bir kaynaktır (112).

FGF2'nin yara tamirindeki rolünün fonksiyonel kanıtlarını temin etmek için Broadley ve ark. insan FGF2'ye karşı, nötr hale getirilmiş poliklonal antikolar kullanmışlardır. Bu yöntemde polivinil alkol sünger diskin merkezine yerleşmiş peletler içindeki IgG, arındırılmıştır. Diskler daha sonra sıçan ventral pannikulus carnosus altına implante edilmiştir. Sürekli antikor salgılanması, kontrol IgG süngerlerindeki granülasyon doku oluşumuyla karşılaştırıldığında, vaskülarizasyon ve sellülaritede dikkat çekici bir azalmaya neden olmuştur. Ayrıca DNA, protein ve kollajen seviyeleri anti-FGF2 süngerlerde, implantasyondan sonraki 7. günde %25-35 oranında azalmıştır. Bu çalışma yara tamirinde endojen FGF2'nin önemli rolü olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir (112).

FGF2'nin yara iyileşmesindeki rolü, son olarak, FGF2 içermeyen null farelerin yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılmasıyla aydınlatılmıştır. Bu fareler üstün körü bir incelemeyle yabani tipten ayırt edilemez fakat eksizyonel yaralarda epidermis/dermis kalınlaşması değişmiştir ve FGF2 eksik null farelerde iyileşmenin geciktiği gözlenmiştir. Re-epitelizasyondaki gecikmeye ek olarak FGF2 null farelerde yara alanındaki kollajen sentezi azalmıştır ve kalın yara kabuğuna oluşmuştur (112).

Yapılan araştırmalar sonucunda rekombinant bFGF üretilmiş ve hem insan hem hayvan modellerinde, hem normal hem de hasarlı yara iyileşmelerinde klinik denemelerle test edilmiştir. Domuzdaki yaralara topikal olarak uygulanan bFGF, epitelizasyonu %20 hızlandırmıştır. Ayrıca rekombinant bFGF iskemi yada bakteriyel kontaminasyonla oluşturulan yaralardaki iyileşmeyi hızlandırmıştır. Klinik denemeleri yapılmasına rağmen bu ilaç U.S'nin FDA onayını alamamıştır. Yakın zamanda Kaken, Japonya'daki deri ülserlerinin topikal tedavisi için Torafermin (Fibroblast Spray; KCB-

1) adını verdiği bir (rh)bFGF geliştirmiştir. Bu maddenin diğer ũlkelerde yapılan klinik denemeleri de yine potansiyel diyabetik bacak ũlseri ũzerine olmuştur (78). FGF de çeşitli hayvan modellerinde incelenmiş; kobay kulağındaki yaraya topikal uygulanması sonrasında, bazik FGF'nin epitelizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Kobaylara subkutan FGF enjeksiyonu ile hũcre sayısı ve kollajen içeriği artmıştır. Topikal bazik FGF, farelerde enfeksiyon ve diyabetin neden olabileceği yara iyileşmesi sorunlarını olumlu etkilemiştir (18).

Geniş FGF ailesinin (FGF -7,-10) başka bir ũyesi olan, Keratinosit bũyũme faktörleri (KGF-1 ve -23) keratinosit proliferasyonu için gũlũ bir uyarıcıdır ve hayvan modellerinde granũlasyon dokusu oluşumu ũzerine pozitif bir etkiye sahiptir. Repifermin (human Genome Sciences; Gaithers- bung MD-USA) KGF-2'nin topikal olarak uygulanan rekombinant bir formudur ve ilk klinik denemeler onun tedavi amaçlı kullanılabileceğini vaat etmiştir. Kronik venöz ũlserli hastalarda yapılan bir araştırmada kontrol grubu ve tedavi grubundaki iyileşme yũzdeleri hesaplanmış ve reepitelizasyonu yũkseltebildiđi gösterilmiştir. Ayrıca KGF, kollajen depolanmasını ve yara kopma direncini de attırmıştır (78).

Amgen firması tarafından ũretilen bir başka rekombinant KGF, Palifermin (arh KGF), gastrointestinal sistem boyunca mukositis için geliştirilmiş bir bileşiktir. Palifermin epitelyal hũcre proliferasyonunu, farklılaşmasını, sitoprotektif mekanizmaların dũzenlenmesini stimũle etmektedir (78).

İyileşme mekanizmasına ilk katılan bũyũme faktrũ olan PDGF'nin klinikte yara iyileşmesinde kullanılması için 1997 de FDA onayı alınmıştır. PDGF (beca plermin), Regranex (ethicon, Inc; west somenville, NJ,USA) ticari adı ile piyasada bulunur. Canlı organizmada PDGF plateletler, makrofajlar, fibroblastlar, dũz kas hũcreleri ve endotelial hũcrelerden salgılanır ve kemotaksisi, proliferasyonu ve yeni gen ekspresyonunu uyarır. PDGF seviyeleri kronik yaralarda azdır ve bu yetersizliğin iyileşmenin gecikmesine katkıda bulunduğu dũřũnũlmektedir (78).

Yara iyileşmesinde PDGF'nin yararlı etkileri, bir çok deneysel ve klinik çalışmayla gösterilmiştir. Ayrıca PDGF insan ülserlerinin tedavisi için onaylanmış ilk büyüme faktörüdür. PDGF'nin çeşitli gen ürünlerinin hetero yada homodimerizasyonundan sonuçlanan beş izoformundan biri olan PDGF-AB, insan plateletlerinden salgılanan predominant formdur. Ayrıca rekombinant human (rh) PDGF-BB formunun da klinik yararı ispatlanmıştır. PDGF-BB'nin Faz III denemeleri 7 yıldan fazla ayak ülseri olan 1000'den fazla hastada denenmiş ve kombine sonuçlarda beklenen tam iyileşme oranında %10'luk bir artış gözlenmiştir. Bu mütevazı bir gelişme gibi görünmesine rağmen diyabetik ülserler için başarısız tedaviler düşünüldüğünde oldukça önem taşır (78, 112).

Dauel ve arkadaşları (1982) tarafından yapılan bir araştırmada, PDGF-AB ile yara alanını tetiklendiğinde, postoperatif 3. günde proliferatif hücre sayısının önemli derecede arttığını göstermişlerdir. Bu bulgu hücresel mesaj seli başlatan tek bir sitokin azaldığı zaman, hasarlı doku üzerindeki yanıtlardaki gecikmeyi açıklamaktadır. Pierce ve arkadaşları (1991) ise; PDGF-BB'nin insizyonel yara iyileşmesinin 3. haftasında yara kopma direncini %50-70 arttırdığını göstermişlerdir (102).

Ayrıca yapılan diğer çalışmalar sonucunda; (rh)PDGF-BB, cerrahi ayrılmalar ve diğer açık yaraların iyileşmesinde olumlu sonuçlar elde edilmiş ve Switzerland's Kuros şirketi kliniksel denemeleri sonucunda fibrin salgılayan PDGF jeli geliştirmişlerdir (78).

PDGF, hayvan modellerinde de, etkili bir yara iyileşmesi destekleyicisi olarak gösterilmiştir. Tavşan kulağı modelinde PDGF'nin epitelizasyon hızını arttırdığı saptanmıştır. Farelere yerleştirilen subkutan sponçlara hergün PDGF beta enjekte edilmiş ve enjeksiyon yapılmayanlara oranla, yapılanlarda, tedavinin 7. gününde hücre miktarında ve kollajen içeriğinde artma saptanmıştır. Farelerdeki insizyonel yaralanmalara PDGF-BB uygulandığında, 7 hafta sonunda, kontrollere oranla, yara iyileşmesi daha belirgin olarak saptanmıştır. Radyasyon uygulanmış kobaylardaki insizyonel yaralar PDGF-BB ile desteklendiğinde, 7 ve 12. günlerde, yaranın sağlamlığında belirgin artma olduğu gösterilmiştir. Diyabetik farelerde

eksizyonel yaralar, PDGF'ün topikal uygulanımı ile desteklendiğinde daha hızlı kapanmıştır (18).

Farklı özellikteki yaralarda IGF-I ve IGF-II ekspresyonu bir çok çalışmayla gösterilmiştir. IGF-I, domuz ve sıçan yara sıvısında bulunmuş ve bu proteinlerin minimal derecelendirilmeleri belirlenmiştir. Dondurularak hasar oluşturulmuş sıçan kulağı kullanılan bir çalışmada, yara alanında lokalize IGF ve reseptörleri immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Normal deride yalnızca epidermis ve dermisteki birkaç hücrede sentezlenirken, yara alanında makrofajlar ve bazı diğer inflamatuvar hücreler ve tüm epidermal hücreler yaralanmadan sonraki 1.-3. günler içinde IGF pozitif olarak gözlenmiştir (112).

Subkutan sponge implant model ve insizyonel yara modellerinin kullanıldığı bir başka araştırmada da, yara alanında IGF-I ve IGF-II ekspresyonu gözlenmiştir. İlginç olarak her iki IGF mRNA seviyeleri her iki modelde hasar sonrası önemli derecede artmıştır. Çelik tel ağdan oluşan silindirlerin deri altı dokuya yerleştirilmesiyle oluşturulan sıçan yara modelinde ise yara alanındaki IGF-I reseptör ekspresyonu değişmemekle birlikte artan IGF-I mRNA seviyeleri gözlenmiştir. Bu çalışmalarla ayrıca yaralı ve normal deri arasındaki majör farklılıklarda ortaya konmuştur (112).

Glikokortikoid tedavisinde ve diyabette yara iyileşmesi anormalliklerinde IGF'nin rolü birçok çalışmayla desteklenmiştir. Örneğin yapılan bir çalışmada; streptozotosinle oluşturulan diyabet, sıçanların yara sıvısında IGF-I seviyesinin %42 oranında azalmasına neden olmuştur. Bir başka araştırmada ise normal ve diyabetik farelerde yara iyileşmesi süresince IGF-I ve IGF-II seviyeleri analiz edilmiş, normal IGF-I mRNA ekspresyonunun diyabetik farelerde azaldığı bulunmuş ve bununda yara iyileşmesinin gecikmesine neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca IGF-II mRNA konsantrasyon piki, kontrol farelerle karşılaştırıldığında diyabetik farelerde yüksek olmasına karşın, geciken indüksiyon, IGF-II içinde gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada ise deri altına implante edilmiş polivinil süngerler ve paslanmaz çelik ağ çember modellerinde iyileşen ve iyileşmesi gerilemiş diyabetik ve glukokortikoidal tedavi gören

sıçanların yara alanlarında IGF-I, IGF-I reseptörleri ve IGFBP3 mRNA seviyeleri analiz edilmiştir. İlginç olarak bu genlerin tümünün ekspresyonu, iyileşmesi bozulmuş hayvanlarda oldukça azalmıştır. Diyabetik hastaların fibroblastlarındaki ve epidermis bazal tabakasındaki IGF-I proteinlerinin yetersiz oluşunun anlaşılmasından beri, kronik insan yaralarının patogenezi için bu bulgular önemlidir. Bundan başka; IGF-I insan diyabetik ayak ülserlerinin bazal keratinosit tabakasında da yetersizdir. Fonksiyonel çalışmalarla bu hipotez henüz doğrulanmamasına rağmen bazı çalışmalar IGF ve reseptörlerinin ekspresyonlarının azalmasının yara iyileşmesinin gecikmesine neden olduğu desteklenmektedir (112).

Diğer taraftan IGF-I ekspresyonunun fazla artması, normal deriyle karşılaştırıldığında oldukça fazla skar dokusu oluşumuyla sonuçlanabilir. Çünkü IGF-I'in kültüre edilmiş dermal fibroblastlardaki Tip I prokollojenin pro-alfa I zincirinin ve Tip III Prokollojenin pro-alfa III zincirinin ifadesini arttırdığı gözlenmiş ve bu bulgular hipertrofik skarın patogenezisindeki artan IGF-I seviyelerinin ettiren rolünü desteklemiştir (112).

Sıçanlarda oluşturulan insizyonel yara modelinde ise IGF-I ve IGFBP-I ile tedavi, hidroksiprolin içeriğini ve yara kopma direncini arttırmıştır (55).

Ekzojen IGF-I'in özellikle diğer büyüme faktörleriyle birlikte kombine kullanıldığında yara iyileşmesi üzerine yararlı etkilerinin olduğu birçok çalışmayla ortaya çıkarılmıştır (112).

VEGF'nin yara iyileşmesindeki rolü yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. VEGF'nin proteolizisinin artmasının yada ekspresyonunun azalmasının yara iyileşmesinin gecikmesi ya da eksilmesi ile paralel olduğu bulunmuştur. Tavşan iskemi yara modeli oluşturulan araştırmada yaralar VEGF ile tedavi edilmiş, sonuçta yara tamirinin hızlandığı ve granülasyon dokusunun iki kat arttığı tespit edilmiştir (78).



Zhang ve arkadaşları (2003) iskemik dermal yaralarda VEGF'nin etkisini araştırmışlar ve deney protokollerinde, 1. basamak VEGF'nin elde edilmesi, 2. basamak elde edilen VEGF'nin tedavi amaçlı kullanımı olmak üzere iki basamak izlemişlerdir. İlk basamakta 24 erişkin erkek Sprague Dawley cinsi sıçanlarda 3cm'lik insizyonlar oluşturmuşlar, steril spançlarla direkt basınç uygulayarak hemostazisi elde etmişler ve yara kenarlarını sütürle birleştirmişlerdir. Postoperatif 12. ve 24. saatlerde punch biyopsi ile yara merkezinden doku örnekleri almışlar, doku örneklerini homojenize edip belli bir prosedürde hazırlayarak VEGF<sub>165</sub>'i ELISA tekniğiyle tespit etmişlerdir. İkinci basamakta ise 48 sıçanda primer insizyonal yara oluşturmuşlar ve 1ml VEGF<sub>165</sub> (1µg/ml)'yi insizyon hattı kenarından subkutan yolla enjekte etmişlerdir. 1. ve 2. haftalar sonunda aldıkları doku örneklerinin histolojik incelemeleri sonucunda ekzojen VEGF<sub>165</sub>'nin anjiyogenezi oldukça hızlandırdığı, ECM sentezini ve kollajen liflerin çapraz bağlanmasını arttırdığı bunun sonucunda da yara kopa direncinin önemli oranda arttığı tespit etmişlerdir (121).

Angiyogenetik özelliklerin ışığında; diğer yara iyileşmesi uygulamalarının bir çeşidi olan gen terapisi ile VEGF'nin rolünü geliştiren patentler Genentech firmasına aittir. Firma diyabetli hastalardaki ülserin iyileşmesinde bir (rh)VEGF ürünü olan Telbermin'in FazIII denemelerine devam etmek için onay almıştır. VEGF, epitelizasyonu, ekstrasellüler matriks oluşumunu yada yara büzülmesini etkileyemez, ancak bir anahtar faktör gibi iskemili yaralarda sınırlayıcı rol oynamaktadır (78).

TGF-β'da, yara iyileşmesinde kullanılmaktadır. Tavşan kulağı modelinde epitelizasyonu hızlandırdığı kanıtlanmamıştır, ancak kollajen sentezini uyardığı belirlenmiştir. TGF-β'nın, yenidoğan farelerde subkutan enjeksiyon ile kollajen sentezi ve anjiogenezi uyardığı saptanmıştır. Gine domuzlarında yapılan bir başka araştırmada yaralar açık bırakılmış ve TGF-β içeren sponçlarla muamele edilmiş, sonuçta, 8. günde, bu tedavi uygulanmayanlara oranla, yaraların daha fazla granülasyon dokusu içerdikleri saptanmıştır. Farelerdeki insizyonel yaralara kollajen vehikül içinde TGF-β uygulandığında da, 3. ve 14. günler arasında, yaranın sağlamlığında, kontrollere oranla artma saptanmıştır. TGF-β desteği, adriamycine

bağlı yara iyileşmesindeki zayıflamanın üstesinden de gelebilmektedir. Ayrıca glukokortikoide bağlı yara iyileşmesi gecikmesini, kollajen vehikül içinde TGF -  $\beta$  desteği, 7. günden itibaren ortadan kaldırmaktadır (18).

TGF-  $\beta$ 1 ve TGF-  $\beta$ 2 izoformların ekspresyonu, hipertrofik skarlarda ve keloidde çok hızlı bulunmuştur. Bu izoformların nötralizasyonu ise ekstrasellüler matriks depolanmasında önemli kesintilere neden olur. TGF-  $\beta$ 1 ve TGF-  $\beta$ 2 izoformların varlığı antikorları nötr hale getirirken, ortama TGF-  $\beta$ 3'ün ilavesi skar oluşumunun önlenmesinde kullanılır (112).

Yara yatağına TGF-  $\beta$ 'nın ilavesinin, diyabet ve artan basınçtan dolayı oluşan ülserdeki hızlandırılmış yara tamirinde, potansiyel terapötik ajan gibi davrandığı tespit edilmiştir. Hayvan deneyleri, TGF-  $\beta$ 'nın ekstrasellüler matriks üretimini ve yara kontraksiyonunu arttırabilme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. İnsanlardaki yapılan çalışmalar, TGF-  $\beta$ 'nın yara iyileşmesini hızlandığı göstermiştir. Basınç ülserlerinin tedavisiyle ilgili küçük bir çalışma da TGF-  $\beta$ 3'ün potansiyelini desteklemiştir (112).

Sitokinlerin yara iyileşmesi üzerine etkileri gözden geçirildiğinde; PDGF'nin PMNL'ler için kemoatraktan olduğu, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde mitogenezi uyardığı, fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü stimüle ettiği ve tüm bunların sonucunda anjiyogenezi, re-epitelizasyonu hızlandığı ve yara kopma direncini arttırdığı gözlenmiştir. EGF'ler epitelial ve endotelial hücreler, fibroblastlar için kemoatraktandır. Özellikle re-epitelizasyonu hızlandırırlar, kollojenaz aktivitesini uyararak neovaskülarizasyonu arttırırlar ve ECM sentezinde görev alarak granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırırlar. FGF, endotelial hücre proliferasyonunu uyararak neovaskülarizasyonu hızlandırır. Re-epitelizasyonu uyarır, ECM sentezini stimüle ederek ve kollojen reorganizasyonunu uyararak yara kontraksiyonunda rol oynar. VEGF endotelial hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu, diferansiyasyonunu sağlayarak ve ECM yıkımında görev alarak anjiyogenezi hızlandırır. IGF'ler fibroblast proliferasyonunda ve hücre siklusunun ilerlemesinde rol oynar. TGF- $\alpha$  mezenseyal, epitelial ve endotelial hücre büyümesini uyarır. Fibroblastları stimüle eder,

anjyogenezi hızlandırır. TGF- $\beta$  nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar ve keratinositler için kemoatraktandırlar. ECM depolanması, kollojen sentezi ve reorganizasyonunu uyarırlar. Skar oluşumunda ve yara kontraksiyonunda rol oynarlar. GM-CSF keratinositler için mitojeniktirler ve re-epitelizasyonu hızlandırır, endotelial hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle ederek neovaskularizasyonda ve granülasyon doku oluşumunda rol oynarlar. Proinflamatuvar sitokinler (IL-1 $\alpha$ , $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) fibroblastlar için kemoatraktandırlar, keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu stimüle ederler. ECM yıkımından ve immün yanıtın düzenlenmesinden sorumludurlar. Anti-inflamatuvar sitokinler ise proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve PMNL infiltrasyonunu engellerler. İnflamatuvar fazdan fibroplazi fazına geçişi sağlarlar (112).

Bizde araştırmamızda, sıçanlarda oluşturduğumuz primer insizyonal yaraların tedavisinde, yara iyileşmesinde tanımlanmış tüm proinflamatuvar ve proliferatif sitokinleri içeren ovaryum folikül sıvısını kullandık. Ovaryum folikül sıvısı kullandığımız deney grubuna ait postoperatif 1.hafta sonu bulgularımıza göre yara iyileşmesinin inflamasyon, proliferasyon, reepitelizasyon, anjyogenezis ve maturasyon fazlarının normalden daha erken sürelerde tamamlandığı çok açık bir şekilde gözlenmiştir.

Bir çok çalışma ile ülserler üzerine sitokinlerin etkili olduğunu kanıtlandıktan sonra araştırmalar en uygun doz belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak sitokin gibi maddelerin kliniksel uygulamalar için en uygun konsantrasyonlarının tespiti henüz araştırmalara açık bir konu olarak kalmıştır.

Ichiro ve arkadaşları (2002), tavşanlarda oluşturdukları primer insizyonal yaraların tedavisinde bFGF kullanmışlar ve en etkili bFGF dozunu belirlemek için 2 farklı doz uygulamışlardır, ayrıca deney sürelerini diğer benzer çalışmalara göre daha uzun tutarak bFGF uygulamasının gerilim direnci ve skarsız iyileşme üzerine etkisini araştırmışlardır. Tavşanlarda 3cm'lik insizyonlar oluşturduktan sonra 1. gruba (kontrol) intradermal yolla yalnızca su, 2. gruba insizyonun her 1cm'sine 0,1 $\mu$ g bFGF gelecek şekilde toplam 0,3 $\mu$ g bFGF, 3. gruba ise insizyonun her 1cm'sine 1 $\mu$ g bFGF olacak

şekilde toplam 3µg bFGF enjekte etmişler ve doku örneklerini postoperatif 1., 3. 5. ve 7. hafta sonunda almışlardır. Sonuçta kontrol grubuna göre bFGF uygulanan gruplarda oldukça erkenci inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yeni kan damarlarının gelişiminin çok açık bir şekilde gözlenmiş, fibroblast sayısı ve kollajen sentezi artmıştır. Ayrıca tüm gruplarda göre sadece 1µg bFGF grubunda 7. hafta sonunda kollajen liflerin demet oluşturduklarını, skar oluşumunun ise diğer guruplardan daha az olduğunu tespit etmişlerdir (87).

1988 yılında McGee ve arkadaşları da bFGF'nin akut insizyonel yaralara uygulamışlar ve sadece 3. ve 7. günlerdeki kısa süreli etkilerine bakmalarına rağmen pozitif etkisini rapor etmişlerdir.

Jimenez ve arkadaşları (1999) 1µg, 4µg ve 10µg olmak üzere 3 farklı dozlarda KGF-2'yi Sprague Dawley sıçanlarda oluşturdukları 3cm'lik dorsal primer insizyonel yaralara topikal olarak uygulamışlar ve postoperatif 5. günde aldıkları doku örneklerinde Sircol kollajen yöntemiyle yara alanı kollajen içeriğini, Instron tensiyometre yöntemi ile yara kopma direncini ölçmüşler, insizyon hattına sadece tampon uyguladıkları kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında oldukça yüksek sonuçlar elde etmişlerdir. 4µg'lık KGF-2 ile tedavi edilen grupta yara kopma direnci en fazla bulunmuştur. Gerilim gücündeki artma ECM miktarındaki artmayı işaret eder. ECM'deki artma ise kollajen maturasyonu ve çapraz bağlanması ile ilişkili olarak yara iyileşmesinin maturasyon fazını gösterir. Çalışmada ayrıca epidermal kalınlık deney gruplarında artmıştır yine 4µg'lık KGF-2 ile tedavi edilen grupta en fazla bulunmuştur. Dermal kalınlıkta ise tüm gruplar arasında fark bulunamamıştır. Kontrolle karşılaştırıldığında deney gruplarında dermis ve epidermis hücre tiplerinde ve infiltrasyonunda farklılık gözlenmemiştir. Sonuç olarak araştırmalar KGF-2'nin insizyonel yara iyileşmesi hızlandırdığını belirtmişlerdir (55).

Tek bir sitokin bile iyileşme mekanizmasını oldukça hızlandırdığı göz önünde bulundurulduğunda, doz belirleme çalışmaları yerini, birkaç sitokinlenin kombine kullanıldığı yara tedavilerine bırakmıştır. Geçmişte optimum yara iyileşmesi minimum

kontaminasyon, hatasız doku tamiri ve bunun korunması üzerine kurulmuşken, bugün yara iyileşmesinin optimum mikroçevresinin yaratılması olmuştur. Yara iyileşmesi sitokinlerin sıralı yanıtlarına bağlı olduğundan tek bir faktör yara iyileşmesi için optimum ortamı sağlayamamaktadır. Daha doğrusu “en iyi uygulama sitokinlerin kombinasyonudur” (T9).

Smith ve arkadaşları (2000), Sprague Dawley cinsi sıçanlarda primer insizyonal yara modelinde proinflamatuvar sitokinlerin (GM-CSF, IL-1B), proliferatif sitokinlerle kombine uygulandığında iyileşmenin nasıl etkileneceğini araştırmışlardır. Oluşturulan insizyonal yaraların tedavisinde GM-CSF, TGF-B, IL-1B ve PDGF-BB kombine olarak kullanılmıştır. Postoperatif 1. hafta sonunda doku örnekleri alınmış, histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda kontrol grubunda sıvılaşma nekrozu gözlenirken, kombine sitokin tedavi grubunda inflamatuvar hücre ve fibroblast popülasyonunun arttığı buna paralel olarak da yara kopma direncinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada sitokinler diğer çalışmalardan farklı bir yöntemle uygulanmıştır. Deneyle 1. aşama sitokinlerin preoperatif uygulanması ve 2. aşama insizyonların oluşturulması olmak üzere iki aşamadan oluşmuştur. 1. aşamada öncelikle normal derinin daha sonra insizyon oluşturulacak bölgesine sitokinler lineer bir hat doğrultusunda tek doz olarak enjekte edilmiş ve oluşturulacak yara için mikroçevre yaratılması amaçlanmıştır. Kontrol amacıyla da aynı hayvan üzerinde, sitokin enjekte edilen hatta paralel ikici bir hat belirlenmiş ve bu alana boş enjektör iğnesi sokulup çıkartılmıştır. Enjeksiyon sonrası 7. günde doku örnekleri alınıp incelendiğinde sitokin enjekte edilen normal yapıdaki dokuda sadece enjeksiyon hattı üzerinde fibroblast ve makrofaj proliferasyonunun arttığı buna bağlı olarak ECM ve kollajen sentezinin yeniden başladığı gözlenmiştir. Kontrol hattı ise hala normal yapıdadır. 2. aşamada ise 1. aşamayla oluşturulan enjeksiyon hatlarıyla üst üste çakışan primer insizyonlar oluşturulmuştur. Ancak bu teknik sadece cerrahi müdahaleler öncesinde oldukça kullanışlı olabilir. Kronik yaralarda bu teknik kullanılamaz hatta kaza sonucu oluşan insizyonal yaralarda da bu tekniğin 1. aşamasından söz etmek mümkün bile değildir (102).

Smith ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bu çalışma , bir çok araştırmada eksik olan ve merak edilen “acaba sitokinlerin yara iyileşmesinde sistemik bir etkisi mi gösterir yoksa lokal mi?” sorusuna da cevap teşkil etmiştir. Yani enjeksiyon hattında proliferasyon tetiklenirken, bu hatta çok yakın olan kontrol hattının normal olması ve sitokinlerin sadece uygulandıkları hat üzerinde etkili olmaları, sitokinlerin lokal etkisini doğrulamıştır (102).

Grdisa ve arkadaşları (2004) araştırmalarında, farelerde insizyonel yara oluşturup G-90 (sinyal transdüksiyon yolağını aktive eden glikoprotein yapısındaki doku homojenatı) ile tedavi ederek, yara alanındaki EGF ve FGF konsantrasyonlarını arttırmayı amaçlamışlardır. Deneylerinde sağlıklı farelerden oluşan kontrol grubu, insizyon oluşturulup hiçbir tedavi uygulanmamış sham grubu ve insizyondan sonra 25 µl G-90 (10µg/ml) enjekte edilmiş deney grubundan oluşan 3 grup oluşturmuşlar. Sham ve G-90 uygulanan deney gruplarından ilk 24 saat içinde her 6 saatte bir yara sıvısı toplamışlar ve büyüme faktörlerinin konsantrasyonlarını dot blot ve ELISA tekniği kullanarak ölçmüşlerdir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sham grubu EGF konsantrasyonunda ilk 24 saat içinde %14-45 oranında, G-90 deney grubunda ise ilk 6. saate %28’lik, 24. saatte ise %110’luk bir artma meydana gelmiştir (kontrol: 5.1±0,23ng/ml, sham grubu: 6. saat 5.9±0,27ng/ml, 24. saat 9.2±0,28ng/ml, G-90: 6. saat 7.0±0,3ng/ml, 24.saat 55.2±0,28ng/ml). FGF konsantrasyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sham grubunda ilk 24 saat içinde %17-33 oranında, G-90 deney grubunda ise ilk 6. saate %17, 24. saatte ise %60 oranında bir artma meydana gelmiştir (kontrol: 4.7ng/ml, sham grubu: 6. saat 4.9±0,28ng/ml, 24. saat 7.2±0,36ng/ml, G-90: 6. saat 5.6±0,36ng/ml, 24.saat 11.6±0,27 ng/ml). Sonuçta, kombine EGF ve FGF konsantrasyonlarındaki bu artma farklı hücre tiplerinin proliferasyonunu stimüle etmiş, mitogenezi indüklemiştir, FGF’deki bu artma ayrıca anjiyogenezde de rol oynamış ve yara iyileşmesi, sham grubuna göre oldukça hızlanmıştır (39).

Son yıllarda folikül sıvısında bulunan büyüme faktörlerinin in vivo etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi, konsantrasyonlarının infertilite etiyojisine bağlı olup olmadığını ve fertilizasyon/gebelik oranları üzerine etkisini tespit etmek için çok

sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda sitokinlerin konsantrasyon seviyelerini belirlemede ELISA tekniği kullanılmıştır (4, 44, 47, 48, 53).

Hammadeh ve arkadaşları (2002) ICSI hastalarında yaptıkları çalışmada, tedaviye düşük yanıt veren hastalarla karşılaştırıldığında yüksek yanıt veren hastalarda FF'deki PDGF konsantrasyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca FF PDGF seviyesiyle fertilizasyon oranı arasında negatif bir ilişki olduğunu da göstermişlerdir (düşük  $249.8 \pm 150.1$  pg/ml yüksek  $387.6 \pm 36.0$  pg/ml) ve bu sitokin oosit fertilizasyonu ve implantasyon için bir marker olarak önerilmiştir (46).

Yine Hammadeh ve arkadaşları yaptıkları bir başka çalışmada (2002), ICSI uygulanan 49 hastanın FF'lerindeki EGF'lerin benzer konsantrasyonlarda olduğunu göstermişler (düşük  $9.12 \pm 5.5$  pg/ml yüksek  $8.9 \pm 5.4$  pg/ml) (1), Ozornek ve arkadaşları (1999) gebe kalamayanlarla karşılaştırıldığında gebe kalanların EGF seviyesinin önemli oranda düşük olduğunu göstermişlerdir (88).

Mendoza ve arkadaşları (2002) yaptıkları araştırmalarında, gebelik elde edilen ve edilmeyen kadınların FF'lerindeki TGF- $\alpha$  konsantrasyonları karşılaştırmış ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulmamışlardır (79). Gebelik + FF:  $7.6 \pm 2.3$  pg/ml, Gebelik – FF:  $7.4 \pm 2.4$  pg/ml.

Hammadeh ve arkadaşları (2003) yapmış oldukları diğer bir araştırmalarında, FGF'nin, hem serum-FF konsantrasyonlarını karşılaştırmış hem de infertilite etiolojisine göre (PCO: polikistik over sendromu, endometriyozis, tubal faktör, erkek faktör) FF konsantrasyonlarında değişiklik olup olmadığını araştırmışlar; serumdaki FGF konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunduğunu fakat FF'deki FGF seviyelerinde önemli bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca infertilite etiolojisi FF FGF seviyesi üzerine etkili olmadığını belirtmişlerdir. Yani FF'deki FGF seviyesi oosit kalite ve derecesi, fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi ve gebelikle ilişkili değildir (48).

PCO (n=20)	serum: 4.8±2.3	FF: 104.0±39pg/ml
Endometriyozis(n=17)	serum: 5.9±3.1	FF: 125.4±74pg/ml
Tubal faktör (n=19)	serum: 10.2±11.3	FF: 128.7±75.9pg/ml
Erkek faktör (n=19)	serum: 7.4±4.5	FF: 102.35±47pg/ml

Yine Hammadeh ve arkadaşları 2004 yılında yapmış oldukları araştırmalarında ICSI uygulanmış 75 kadının FF'lerinde ve serumunda FGF varlığını göstermişler ve gebelik elde edilen kadınlar ile gebe olmayanların FF'sindeki FGF konsantrasyonu arasında önemli bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Gebelik (+) serumdaki konsantrasyon: 8.5±1.5 ve FF' deki konsantrasyon: 127.6±66.5pg/ml. Gebelik (-)serum: 6.4±3.6 ve FF: 108.3±57.3pg/ml (47).

Moncayo ve arkadaşları yaptıkları araştırmalarında; serumda bulunan konsantrasyonla karşılaştırıldığında FF'de VEGF'nin önemli derecede arttığını göstermişlerdir. FF: 1648.5 pg/ml, Serum: 430.7 pg/ml (110).

Sanja Vujisic ve Snjezana Zidovec (2005) ise oositin mikroçevresi üzerine yaptıkları araştırmalarında serum ve FF'de VEGF'nin benzer konsantrasyonlarını rapor etmişlerdir. FF: 3057±217.88, Serum: 220±15.59 pg/ml. Granüloza hücreleri tarafından VEGF üretimi, kontrollü over stimülasyonu (COS) süresince arttığı için infertil kadınların FF'lerinde, VEGF'nin artmış konsantrasyonları (4-20 kat artmıştır) bulunmuştur ((110). Ayrıca Pellicer ve arkadaşları ile Garrido ve arkadaşları normal ovulasyonlu kadınlarla endometriyozisli kadınların FF'lerinde bulunan VEGF konsantrasyonlarını karşılaştırıldığında endometriyozisli kadınların folikül sıvısında VEGF konsantrasyonunun azaldığını rapor etmişlerdir (34, 36, 90, 91).

Mendoza ve arkadaşları tarafından 15 çift üzerinde yapılan bir başka çalışmada gebelik elde edilmeyenlerle klinik gebelik elde edilmiş kadınlar karşılaştırıldığında klinik gebelik elde edilmiş kadınların FF'lerindeki IGF-I konsantrasyonunda artma gözlemlemişlerdir IGF-I için, Gebelik (-) 73.8±12.6 ng/ml, Gebelik (+) 103.6±15.2 ng/ml IGF-II için, Gebelik (-) 2.4±0.8 ng/ml, Gebelik (+) 2.8±0.9 ng/ml (79).



Dorn ve arkadaşları tarafından 84 hasta üzerinde yapılan çalışmada, IVF sonuçlarıyla FF IGF-I seviyesi arasında bir ilişki bulunamamıştır (7) fakat Hammadeh ve arkadaşları çalışmalarında ICSI'ye verilen yanıtları dikkate alarak FF'deki IGF-I konsantrasyonlarını çok düşük olarak yorumlamışlardır. Düşük yanıtı gösteren hastaların FF IGF-I konsantrasyonu:  $0.416 \pm 0.089$  ng/ml, yüksek yanıt gösteren hastaların FF IGF-I konsantrasyonu:  $0.431 \pm 0.094$  ng/ml (46).

Bilindiği gibi Polikistik over (PCO) sendromlu kadınların granüloza hücrelerindeki insülin faaliyetlerinde defekt vardır, bu durum ovaryum insülin direncini destekler ve bu metabolik fenotip, artmış IGF-I'in mitojenik potansiyeli ile ilişkilendirilmektedir. Cunha-Filho ve arkadaşları tarafından ise orta /şiddetli endometriyozisli infertil kadınların FF'lerindeki düşük IGFBP-1 seviyesinin ovulasyon fonksiyonunun bozulması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (20).

TNF- $\alpha$  ise folikül gelişiminin parakrin bir modülatörü olarak fonksiyon gösterir ve patolojik oluşumlar sırasında ovaryum fonksiyonlarının değişmesinde rol oynayan multifonksiyonel bir sitokindir. TNF- $\alpha$ 'nın ovaryumdaki sentezi gonodotropinler tarafından desteklenmektedir. Sanja Vujisic ve Snjezana Zidovec (2005) araştırmalarında, stimüle edilmemiş ovaryum FF'sindeki TNF- $\alpha$  konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında stimüle edilmiş ovaryum FF'sindeki TNF- $\alpha$  konsantrasyonunda artma gözlemlenmiştir. Nonstimüle:  $13.2 \pm 2.6$  pg/ml Stimüle:  $32.5 \pm 4.9$ . Sonuçta FF'deki TNF- $\alpha$  konsantrasyonu ile infertilite sebebi ya da IVF/ET gebelikleri arasında bir ilişki bulunamamışlardır (110).

Calogero ve arkadaşları ise yaptıkları araştırmalarında FF GM-CSF seviyesinin infertilite etiolojisi ile ilişkisini incelemiş ve sadece immünolojik faktörlerden dolayı infertil olan kadınlarda GM-CSF konsantrasyonunun azaldığını göstermişlerdir (15).

Hammadeh ve arkadaşları (2002) tarafından 160 hasta üzerinde yapılan iki çalışmada ise FF'deki GM-CSF konsantrasyonları ile ICSI yada IVF/ET sonuçları ve

infertilite etioloji arasında bir ilişki gözlemlenmemiştir (düşük yanıt veren hastalarda  $1.45 \pm 2.1$  pg/ml, yüksek yanıt veren hastalarda  $1.8 \pm 3.3$  pg/ml) (46).

Salmassi ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları araştırmalarında IVF/ICSI programı uygulanmış 81 hastanın serumuyla karşılaştırıldığında, FF'de GM-CSF konsantrasyonunun arttığını bulmuşlardır. Serum: 64.5pg/ml, FF: 117.98pg/ml (98).

Karagouni ve arkadaşları yaptıkları araştırmalarında, IVF/ET protokolüne alınmış kadınlarda, gonadotropinlerin, IL-1 $\alpha$ 'nın lokal ve sistemik sentezine neden olduğunu göstermişler ve implantasyon elde edilmiş ve edilememiş toplam 33 kadının postovulatar folikül sıvılarındaki IL-1 $\alpha$  konsantrasyonlarını karşılaştırmışlar, her iki grupta da istatistiksel olarak benzer seviyeler rapor etmişlerdir; implantasyon (+):  $11.6 \pm 5.1$  pg/ml, implantasyon (-):  $7.3 \pm 1.9$  pg/ml .

Mendoza ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada gebelik elde edilmeyenlerle karşılaştırıldığında, klinik gebelik elde edilmiş kadınların FF'lerindeki IL-1 $\alpha$  konsantrasyonunda önemli bir fark bulunmadığını göstermişlerdir (Gebe (+) kadınlarda IL-1 $\alpha$   $21.9 \pm 9.2$  pg/ml iken, Gebe (-) kadınlarda  $37.3 \pm 10.0$  pg/ml'dir) (79).

Yine benzer şekilde Bili ve arkadaşları, infertil 22 kadının FF'sindeki IL-1 $\alpha$ 'yı tanımlamışlar ve oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik başarısı arasında bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (110).

IL-1 $\beta$  sekresyonu da IL-1 $\alpha$  gibi gonadotropinler tarafından stimüle edilir. Spontan ovarian siklusla karşılaştırıldığında, stimüle edilmiş siklus FF'sindeki IL-1 $\beta$  konsantrasyonunda artma gözlenmiştir. Stimüle siklusta IL-1 $\beta$  seviyesi:  $6.6 \pm 0.32$  pg/ml iken, spontan siklusta IL-1 $\beta$ :  $0.52 \pm 0.1$  pg/ml' dir (16).

Fujii ve arkadaşları 16 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada folikül sıvısındaki IL-1 $\beta$  varlığını doğrulamışlar ve intrafolliküler oosit gelişiminin düzenlenmesinde rol

oynadıklarını rapor etmişlerdir. 15 infertil kadın üzerinde yapılan bir başka çalışmada IL-1 $\beta$ 'nin oosit matürasyonu üzerindeki rolünü desteklemiştir. Mendoza ve arkadaşları, normal fertilizasyon gösteren oositleri topladıkları folikül sıvısındaki IL-1 $\beta$  konsantrasyonları ile fertilizasyon elde edilememiş oositlerin folikül sıvısındaki IL-1 $\beta$  konsantrasyonlarını karşılaştırmışlar ve fertilizasyon gösteren oositleri topladıkları folikül sıvısındaki IL-1 $\beta$  konsantrasyonlarını daha yüksek bulmuşlardır. Fertilizasyon(+): 20.6  $\pm$ 10.2 pg/ml, fertilizasyon(-): 14.2 $\pm$ 4.3 pg/ml (16).

Bir çok araştırma IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'yi IVF/ET protokollerinin başarısında bir marker olarak göstermiştir. Ancak FF IL-1 $\beta$  konsantrasyonu ile infertil etiolojisi arasında bir ilişki bulunmadığını belirtmiştir. Bir başka çalışmada infertil 13 kadının FF'sinde IL-2 varlığı tespit edilmesine rağmen, bu sitokin oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik başarısı ile ilişkisi olmadığı bulunmuştur (16).

Granüloza hücrelerinden IL-6 sentezi de yine gonadotropin stimülasyonu ile düzenlenmektedir ve yapılan bir çalışmada stimüle ovaryan siklus ile spontan siklus karşılaştırıldığında stimüle siklus FF'sindeki IL-6 konsantrasyonunda artma gözlenmiştir. Stimüle siklus: 18.7  $\pm$ 2.1 pg/ml spontan siklus: 8.9 $\pm$ 1.2 pg/ml (15).

Pellice ve arkadaşları ile Kawasaki ve arkadaşları ; FF ve serum IL-6 konsantrasyonlarını karşılaştırmış ve FF'de 4-20 kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Özellikle de içinde immatür oositlerin bulunduğu FF örneklerinden, matür oositleri içeren FF örneklerindeki IL-6 konsantrasyonu daha yüksektir. Bu bulgu IL-6'nın folikül maturasyonundaki indikatör rolünü desteklemektedir (91).

FF'deki IL-6 konsantrasyonu yaşla da ilgilidir. Pellice ve arkadaşları 37 yaş üzerindeki 41 kadının FF IL-6 konsantrasyonunun yüksek olduğunu belirlemiştir. Ayrıca n=79 ve n=81 IVF/ET protokolüne alınmış kadınlar üzerinde yapılan iki kapsamlı çalışmayla da FF IL-6 konsantrasyonu ile infertilite etiolojisi arasında bir ilişki bulunmadığı desteklenmiştir (90).

Geva ve arkadaşları, IVF/ET protokolü uygulanmış 20 kadının preovulatuvar FF'sinde IL-10 varlığını göstermişlerdir (78.7±104.7 pg/ml). Ancak IL-10 seviyesinin oosit maturasyonu, fertilizasyon, embriyo kalitesi ve gebelik başarısı ile ilişkisi yoktur. Bu bilgi IL-10'un folikülogenezde belli bir rol oynadığını destekler (90).

Tüm bu araştırmalar sonucunda folikül sıvısında bulunan sitokinlerin büyük çoğunluğunun konsantrasyonlarının infertilite etiyolojisiyle ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Az seviyelerde bulunan sitokin konsantrasyonları ise gonodotropin tedavisi sırasında zaten artmaktadır. Bu nedenle folikül sıvısı örnekleri hasta etiyolojisine bakılmaksızın tüm hastalardan alınabilir. Bizde çalışmamızda ESOGÜ tüp bebek merkezinden hasta etiyolojine bakmadan FF örneklerini temin ettik.

Ovaryum folikül sıvısı kullandığımız deney grubuna ait postoperatif 1.hafta sonu bulgularımıza göre yara iyileşmesinin inflamasyon, proliferasyon, re-epitelizasyon, anjiyogenezis ve maturasyon fazlarının normalden daha erken sürelerde tamamlandığı çok açık bir şekilde gözlenmiştir. Araştırmamızda bir çok sitokini kombine olarak içeren folikül sıvısı uygulamamıza rağmen, sitokinlerin etkileri çok dar insizyon hattıyla sınırlı kalmıştır. Bu bulgumuz sitokinlerin lokal etkili olduğunu belirten araştırmalarla uyumludur.

Bulgularımızda ayrıca ovaryum folikül sıvısı uygulanan deri kesitlerinde, dermis ve epidermis kalınlıkları normal deri yapısıyla benzer bulunmuştur, bu da eksiksiz yara iyileşmesinin olduğunu göstermektedir.

Dikiş altına enjeksiyondan sonra 2 hafta boyunca pulverizasyon yöntemiyle ovaryum folikül sıvısı uyguladığımız deney grubuna ait bulgularımızda ise yara alanında çok küçük bir insizyon hattının sadece subepidermal tabaka ile sınırlı olduğu gözlenmiştir. Diğer dermis ve epidermis kısımları kontrol grubuyla aynı histolojik yapıda bulunmuştur. Bu bulgularımızda sitokinlerle uzun-sürelili tedavinin iyileşme üzerinde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 2. hafta sonu grubunda da sitokinlerin etkilerinin lokal olduğu bir kez daha gözlenmiştir.

Ovaryum folikül sıvısı uyguladığımız deney grubuna ait 3. hafta sonu bulgularımızda ise 1. ve 2. haftanın aksine fibroblast proliferasyonunda tekrar bir artma gözlenmiştir. İlk bakışta olumsuz gibi görülen bu bulgu, daha önce bahsettiğimiz Smith ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışmaya dayandırılarak, normal deriye preoperatif sitokin uygulayarak insizyon için önceden uygun mikroçevrenin yaratılması çalışmaları ile açığa kavuşturmuştur. Bizim düşüncemize göre de 2. hafta sonunda yara iyileşmesi tamamlanıp deri tamamen normal yapıya kavuşmuş, ancak 3. haftada da ovaryum folikül sıvısı uygulanmaya devam edildiği için, sitokinlerin etkisi preoperatif mikroçevre yaratmıştır. Bulgularımızda 3. hafta sonu lokal hat üzerinde sadece fibroblastların gözlenmesi düşüncemizi doğrulamaktadır.

Araştırmalarımızın sonuçlarına göre; kronik yaralarda, diyabetli hastalarda, ve yaşlılarda görülen sitokin eksikliğinden dolayı yara iyileşmenin bozulduğu veya geciktiği durumlarda doğal olarak elde edilen ovaryum folikül sıvısıyla tedavi ile patolojik reaksiyon gözlenmeksizin başarılı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca bu yöntem, folikül sıvısının elde edilmesindeki kolaylıktan dolayı diğer tedavi yöntemlerine göre maddi-manevi açıdan daha avantajlıdır. Ovaryum folikül sıvısıyla ilgili çalışmaların artırılması sonucunda yara iyileşmesinin geleceği tamamen değişebilir.

Araştırmamızda tercih ettiğimiz embriyonik kök hücreler ise bilindiği gibi transfer edildikleri dokuya özgü hücrelere farklılaşabilme ve çeşitli sitokinleri sentezleyebilme yeteneklerinden dolayı günümüzde yara iyileşmesinde kullanılmaktadır ve cerrahi iyileşmeyi arttırıcı potansiyelde oldukları birçok araştırma ile saptanmıştır. Son zamanlardaki çalışmalarda ise diyabetli hastalardaki yaralar ve kronik ülserler gibi zor yaraların iyileşmesini arttırdığı rapor edilmiştir.

Embriyonik kök hücreler, pluripotansiyel özelliklerinden dolayı yetişkin kök hücrelere nazaran daha fazla hücre ve dokuya dönüşebilir fakat kandan veya kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerde bu özellik sınırlıdır. Ancak bazı çalışmalarda laboratuvar ortamında EKH'lerin oluşturabileceği farklı hücre tipleri gözlenirse de

vücuda nakledilmeleri sonrasında bunların ne tip hücelere dönüşebildiği henüz bilinmemektedir. Bu nedenle de etik açıdan uygun değildir. Fakat yetişkin kök hücrelerinin bu konuda çok büyük bir kullanım avantajı vardır. Kişinin kendi kanından veya kemik iliğinden elde edildikleri için yine aynı kişiye tedavi amacıyla nakledilmeleri etik ve immün açıdan bir problem oluşturmamaktadır. Böylece uygulamanın gerçekleştirileceği kişiden alacağınız yazılı bir onay ile bu hücreleri aynı kişide kullanabilirsiniz. Bu nedenle de her geçen gün yetişkin kök hücreleri ile gerçekleştirilen araştırmalar artmaktadır ve olumlu etkilerin gözlemlendiği vakalar basında yer almaktadır (59, 80).

Yara iyileşmesi çalışmalarında genellikle embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücrelerden olan kemik iliğinden elde edilen hematopoietik kök hücreler veya stromal kök hücreler (mezenkimal kök hücreler) kullanılmaktadır (59, 82, 99).

Kemik iliği kök hücreleri son 30-40 yılın konusunu oluşturmuştur ve lösemi başta olmak üzere çeşitli hastalık durumlarında kan sistemini tekrar elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Krause ve arkadaşları (2001) radyasyona maruz bırakılmış fareye nakledilen bir tek hematopoietik kök hücrelerinin, sadece mezoderm kökenli kan hücrelerine kaynaklık etmekte kalmayıp, ektoderm kökenli deri epitel hücreleri gibi diğer doku ve hücelere de kaynaklık ettiğini göstermişlerdir (59).

Grant ve arkadaşları ise ölümcül derecede radyasyona maruz kalan kemiricilere nakledilen tek bir hematopoietik kök hücrenin sadece hematopoietik hücelere değil, aynı zamanda daha önceden hasarlanan kan damarlarının endotel hücrelerine de kaynaklık ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca hasarlanan kan damarında kan akımının tekrar sağlandığını da ortaya koymuşlardır (59).

Bu araştırmalardan yola çıkarak yaralarda kök hücre tedavisindeki son zamanlardaki çalışmalarda hematopoietik kök hücreler kullanılmasıyla, hematopoietik

hücrelerle inflamatuvar fazın daha çabuk tamamlanması ve neovaskülerizasyon için şart olan endotel hücre proliferasyonu artırılarak iyileşmenin hızlandırılması hedeflenmiştir.

Bluff ve arkadaşları (2007) kemik iliğinden elde edilmiş endotelial progenitör hücrelerin (BM-EPC) primer insizyonal yara iyileşmesi üzerine etkisini araştırmışlar ve iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Kullandıkları X-gal boyama yöntemiyle BM-EPC'ler postoperatif 1. ve 3. günde insizyon hattının üst epidermis kısmında gözlenmiştir. Ayrıca yağ dokusu içinde ve subdermal pannicus cornasusda az sayıda hücreye rastlanmıştır. 5. gün ve sonraki günlerde ise EPC'lerin granülasyon dokusu içine lokalize oldukları ve çok az hücrenin damar yapılarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. 5. ve 14. günlerde EPC hücre sayısı yavaş yavaş artmış ve 14. günde pik yapmıştır. 14. ve 18. günler arasında ise BM-EPC sayısında hızlı düşüş tespit etmişlerdir (13, 106).

Yara iyileşmesinde en çok kullanılan kök hücre kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonucunda fibroblastlara benzeyen adheziv kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlanmıştır (59). Sonraki çalışmalar mezenkimal kök hücreleri her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent kök hücre kaynağı olarak belirlemişlerdir. Bu hücrelerin kültür ortamına yayılmasının ardından hücreler üç farklı morfolojik alt tipteki heterojen hücre kolonilerine ayrılırlar. Bunlardan birisi de kollajen tip I ve IV, laminin ve fibronektin gibi matriks proteinlerine sentezleyebilme yeteneğinde olan, büyük, poligonal şekilli ve fibroblast benzeri hücrelerdir. Fibroblastlar, mezenkimal öncül hücrelerin birincil ex-vivo kaynağı olarak kabul edilirler. Mezenkimal kök hücreler ex-vivo ortamdaki yüksek çoğalım kapasitelerine rağmen, normal karyotiplerini ve telomeraz etkinliklerini kaybetmezler. Yalnız, uygulanan alt kültürleme hücre işlevlerini zayıflatabilir (59, 99).

Hematopoyetik ve mezenkimal kök hücreler birçok adhezyon molekülünü ortak olarak bulundurlar. Bunların başlıcaları fibronektin, laminin ve kollajene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi, ICAM, VCAM ve L-selektindir (59).

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) ayrıca bir çok sitokin, kemokin ve hücre dışı matriks proteinlerini sentezleme yeteneği vardır. Ayrıca hematopoietik kaynaklı olan ve olmayan birtakım büyüme unsurlarını, interlökinleri ve kemokinleri üretmektedirler. Kemik iliğindeki mezenkimal öncülerin sadece mezenkimal öncül hücreler için değil, aynı zamanda kemik iliğinde bulunan hematopoietik öncüllerin ve mezenkimal kökenli olmayan diğer stromal hücrelerin gelişimi için de uyarıcı/düzenleyici sinyaller üreten stromal bir mikroçevrenin oluşumuna ve işlev görmesine katkı sağladığına ilişkin bulgular bulunmaktadır (59).

Koc ve arkadaşları (2001), allojenik ve otolog hematopoietik kök hücre nakillerinde MKH infüzyonunun trombosit ve nötrofil engrafmanını hızlandığını göstermişlerdir. Bu veriler başka çalışmalarla da desteklenmiş ve hematopoietik kök hücrelerin yerleşim, çoğalma ve farklılaşmasını hızlandıran bazı sitokinleri sentez ve salgılamasına bağlı olduğunu düşünmüşlerdir. Bu sitokinlerden başlıcaları GM-CSF, SCF, IL-6'dır. Bu bulgular mezenkimal öncül hücrelerin aralarında fibronektinin, laminin, kollajen ve proteoglikanların da olduğu çok geniş yelpazedeki matriks moleküllerini ürettiklerini ve matriksle veya hücreden hücreye adhezyon etkileşimleriyle ilgili bazı karşı almaçları eksprese ettiklerini gösteren verilerle kuvvetlenmiştir (59).

Orisis Therapeutics firmasından moleküler biyolog Mark Pittenger ve ekibi 1998 yılından bu yana yaptıkları bir dizi çalışmada erişkin insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin uygun şartlar altında uyarıldıkları zaman birçok bağ doku hücresine farklılaşabilme yeteneğinde multipotent hücreler olduklarını gösterdiler. 1998 yılında yayınladıkları ilk çalışmalarında, 60 vericiden topladıkları insan mezenkimal kök hücrelerini uygun kültür ortamlarında kültüre ettiklerinde 14. gün içinde ekstrasellüler matriks komponentleri olan tip II kollajen, aggregan, ve anyonik proteoglikanları salgılamışlardır (59).



Tüm bu özelliklerinden dolayı yara iyileşmesinde MKH'ler koruyucu, rejeneratif, anjiyojenik, anti-inflamatuar, özelliklere sahiptir. Böylece hasarlı dokulardaki kaynak hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını düzenleyebilir, bu hücrelerin ömrünü uzatabilir, anjiyojenik faktörlerle doku kanlanmasını arttırabilir, anti-inflamatuar sitokinler ve ECM sentez yeteneklerinden dolayı yara iyileşmesini hızlandırarak skar oluşunu engelleyebilirler (59, 82).

Mc Farlin ve arkadaşları (2006); BM-MKH'ler fibroblastlara farklılaşabildikleri, büyüme faktörleri ve sitokinlerin geniş bir çeşidini salgılayabildikleri ve BM-MKH'ler tarafından salgılanan doku tamir faktörlerinin olağanüstü plastisite ve sinerjenik/allojenik yetenekleri olduğu için çalışmalarında sıçanlardaki dermal insizyonel yaralarda BM-MKH'lerin terapötik etkisini araştırmışlardır. Sprague Dawley cinsi sıçanlarda abdominal orta hatta 5cm'lik primer insizyonel yaralar oluşturmuşlar, sütür atıldıktan hemen sonra insizyon alanına BM-MKH enjekte etmişler, doku örneklerini 7. ve 14. günlerde almışlardır. Sircol Collogen Assay kit kullanarak yara alanındaki total kollajen (I-V) miktarını kalorimetrik olarak ölçmüşler ve kollajen üretimindeki artma tespit etmişlerdir. Tüm doku organizasyonu, hücrel infiltrasyon, neovaskülarizasyon ve kollajen ile matriks sentezindeki artmaya paralel olarak da yara gerilim direncinde 2-7 kat artma gözlenmiştir. Yaraların histolojik maturasyonları çok hızlıdır. Hem BM-MKH tedavisi uygulanmamış yaralarla karşılaştırıldığında hemde tedavi grubunun 7. günle 14. günü arasında histolojik olarak oldukça açık farklar bulunmuştur. 14. günde tedavi edilmemiş yara dokusunda ödemli dokuya paralel olarak vaskülaritede ve fibroblast sayısında artma gözlenirken tedavi edilmiş doku inflamatuvar infiltrasyondan yoksun bağ dokunun oluşturduğu matür skar gözlenmiştir. Bu histomorfolojik bulgular BM-MKH'lerle tedavi edilmiş yara iyileşmesinde inflamasyon ve granülasyon doku oluşumunun oldukça hızlı olduğunu yansıtmaktadır (7, 82).

Ayrıca McFarlin ve arkadaşları araştırmalarında BM-MKH'lerin intravenöz yolla sistemik yada intradermal enjeksiyon yada topikal uygulanmasının yara iyileşmesini eşit etkilediğini tespit etmişlerdir (7, 82).

Badiaves ve arkadaşları (2003), kronik bacak ülseri olan hastalarda ve sıçanlarda dermal yara iyileşmesinde kemik iliğinde türetilmiş kök hücreler (BMSC) kullanmışlar ve Mcfarlin ve arkadaşlarıyla benzer sonuçlar elde etmişlerdir (82).

Yamaguchi ve arkadaşları (2003), benzer şekilde BMSC'leri dermal yaralara kapatıcı pansumanla kombine olarak topikal uygulamışlar ve yara iyileşmesinin hızlandığını rapor etmişlerdir (7).

Sonuç olarak kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin (BMSC) yara iyileşmesini geliştirmede iki önemli rolü vardır. İlki doku tamiri ve rejenerasyonu stimüle eden sitokinleri sentezleme yetenekleri vardır. Yara içine göç ettikten sonra yaranın oldukça yüksek olan proinflamatuvar çevresiyle karşılaşarak faaliyete geçerler ve aktive olurlar. Aktive olan BMSC'ler salgılanan sitokin ve büyüme faktörleri tarafından oluşturulan yara mikroçevresinde mini biyoreaktörler gibi davranırlar (7, 17, 59, 99).

İkinci rolleri ise, güçlü plastisite sağlamaları ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşarak doku içine integre olabilme yetenekleridir. BMSC'ler dermal yara içine göç ettikten sonra keratinositler ve miyoblastlara farklılaşarak yara iyileşmesini kolaylaştırırlar.

Bizde araştırmamızda, tüm BMCS'lerin öncüleri oldukları ve BMCS'lere oranla daha fazla hücreye farklılaşabildikleri için farklılaşmamış embriyonik kök hücreleri kullandık ve diğer araştırmalarla benzer sonuçlar elde ettik. EKH'leri insiyon alanına tek doz enjekte ederek postoperatif I. hafta sonunda yara alanında infiltratif hücre sayısında azalmaya paralel olarak fibroblast sayısında artma gözlemledik. 2. hafta sonunda ECM/kollajen sentezindeki artma ve kontraksiyondaki progresif ilerlemeden dolayı maturasyonun oldukça hızlı olduğunu gözlemledik. 3. hafta sonunda ise iyileşmenin eksiksiz tamamlandığını, skarsız iyileşme sonunda kontrol grubuyla aynı histolojik yapı tespit ettik.

Araştırmamızda kullandığımız ovaryum folikül sıvısı grubu ve farklılaşmamış embriyonik kök hücre grubu bulgularımızı kendi aralarında karşılaştırdığımızda, ikisi de yara tedavisinde oldukça etkili terapötik ajanlardır. Ancak ovaryum folikül sıvısı hem etik açıdan hem de elde edilmesindeki kolaylık açısından embriyonik kök hücreden daha avantajlıdır. Bununla birlikte ovaryum folikül sıvısı 1. hafta bulgularımızda kök hücre grubuna göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Embriyonik kök hücre grubunda 1. hafta sonunda inflamatuvar faz gözlenirken, ovaryum folikül sıvısı grubunda ilk haftadan itibaren maturasyon fazının bulguları gözlenmiştir.

## 6. SONUÇ

Araştırmamızda; Primer insizyonel yara oluşturulan sıçanlar farklılaşmamış embriyonik kök hücre (EKH) ve ovaryum folikül sıvısıyla tedavi edilmiştir. Sıçan blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilen farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin benzer araştırmalarla uygun olarak yara iyileşmesini hızlandırdığı, ancak ilk kez bizim araştırmamızda kullandığımız ovaryum folikül sıvısının yara iyileşme sürecini embriyonik kök hücreden daha fazla kısalttığı gözlenmiştir.

Farklılaşmamış embriyonik kök hücre uygulanan grupta, sham grubuyla karşılaştırıldığında 1. hafta sonundan itibaren yara iyileşmesi hızlanmıştır. Yara alanına postoperatif transfer ettiğimiz kök hücreler 0.günden itibaren fibroblast sayısını ve buna paralel olarak fibroblastlardan salgılan ECM ve kollajen miktarını arttırmıştır. 3. hafta sonunda sham grubunda dermis kaybı, belirgin bir insizyon hattı ve hala devam eden ECM/kollajen sentezi gözlenirken, EKH grubunda kontrol grubuyla aynı histolojik yapıya sahip skarsız bir iyileşmenin meydana geldiği tespit edilmiştir.

Ovaryum folikül sıvısı grubunda ise hem sham grubuna hem de EKH grubuna göre yara iyileşmesinde 1. haftadan itibaren önemli bir hızlanma gözlenmiştir. 1. haftada insizyon alanı oldukça daralmış ve ECM/kollojen sentezi ve reorganizasyonu neredeyse tamamlanmıştır. 2. hafta sonunda ise insizyon alanı subepidermal tabakada çok küçük bir alanla sınırlı kalmış, diğer dermis kısımları ise kontrol grubuyla benzer yapıda gözlenmiştir. Ancak 3. hafta sonu bulgularımızda ise 1. ve 2. haftanın aksine fibroblast proliferasyonunda tekrar bir artma gözlenmiştir. İlk bakışta olumsuz gibi görülen bu bulgu, daha önce bahsettiğimiz, normal dermal dokuya preoperatif sitokin uygulayarak insizyon için önceden uygun mikroçevrenin yaratılması çalışmaları ile açığa kavuşturmuştur. Bizim düşüncemize göre 2. hafta sonunda yara iyileşmesi tamamlanıp deri tamamen normal yapıya kavuşmuş, ancak 3. haftada da ovaryum folikül sıvısı uygulanmaya devam edildiği için, sitokin etkisiyle yeniden preoperatif mikroçevre yaratılmıştır.

Sonuç olarak, farklılaşmamış embriyonik kök hücreler bütün hücrelerin öncüleri olduğundan tamir olaylarında önemli rol oynarlar. Ancak hem elde edilmeleri hem de uzun vadede donördeki akıbetlerinin ne olacağı konusuna bir açıklık getirilmemesi gibi nedenlerle etik açıdan uygun olmadığı belirtilmektedir. Ovaryum folikül sıvısı analizi ile ilgili yaptığımız literatür taramalarımız sonucunda, folikül sıvısının yara iyileşmesinde kritik öneme sahip sitokinlerin hepsinin var olduğunu tespit ettik. Ayrıca yapılan analizler sonucunda yara sıvısında bulunan her bir sitokin mevcut seviyesi ile folikül sıvısında bulunan seviyelerini karşılaştırıldığımızda folikül sıvısında sitokin seviyelerinin daha yüksek olduğunu belirledik. Bu güne kadar yapılan yara iyileşmesi çalışmaları sonucunda varılan ortak düşünce; kombine ve yüksek seviyelerde sitokinlerle yara tedavisinde daha başarılı sonuçlar elde edileceği şeklindedir. Zaten yapılan analizler sonucunda diyabetlilerde ya da glikokortikoid tedavisi gören hastalarda, yaşlılarda ve yanık yarası gibi kronik yaralara sahip hastaların yara sıvısı analizlerinde sitokin konsantrasyonlarının veya onların dokuda bulunan reseptörlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ovaryum folikül sıvısı bu beklentilerin hepsini karşılamaktadır. Ayrıca EKH gibi elde edilmesinde etik açıdan hiçbir sakınca yoktur, zaten sadece Türkiye'deki tüp bebek merkezlerinde her gün yüzlerce kadından elde edilen oldukça fazla miktarlarda folikül sıvısı çöpe atılmaktadır. Bununla ilgili araştırmaların artırılması sonucunda belki de ovaryum folikül sıvısı yara iyileşmesinin geleceğini değiştirecektir.

## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

Aa	: Amino asit
ADP	: Adenozin Di Fosfat
aFGF	: Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü
bFGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BM	: Bazal Membran
BM-EPC	: Kemik İliği Endoteliyal Projenitör Hücreler
BM-MKH	: Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
BMSC	: kemik iliği kök hücreleri
C 1, 3, 5,9	: Kompleman Komponentleri
C 1a, 3a, 5a, 9a	: Aktif Kompleman Komponentleri
kD	: Kilodalton
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR/ErbB	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
ELİSA	: Enzim-Linked İmmünosorbent Assay
EPC	: Endoteliyal Projenitör Hücre
ET	: Embriyo Transferi
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	: Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü
FF	: Folikül Sıvısı
FPÜ	: Fibrin Parçalanma Ürünleri
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
G1	: Hücre döngüsü presentetik büyüme evresi 1
G2	: Hücre döngüsü premitotik büyüme evresi 2
G-90	:Glikoprotein yapısında bir doku homojenatı
GAG	: Glikozaminoglikan
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum

GH	: Growth Hormon
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
GTPaz	: Guanozin Tri Fosfataz
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin
H&E	: Hematoksilin-Eozin
HER/ErbB	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
Hg	: Civa
HB-EGF	: Heparin-Bağlı Epidermal Büyüme Faktörü
ICAM	: Intracellular Adhesion Molecule
ICM	: İç Hücre Kitlesi
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF	: İnsülin Enzeri Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin
IFN	: İnterferon
IVF	: In-Vitro Fertilizasyon
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
LH	: Luteinizan Hormon
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
MAGPs	: Microfibril-Associated Glicoproteins
MIP-1 $\beta$	: Makrofaj İnflamatuar Protein-1 $\beta$
MKH	: Mezenkimal kök hücrelerin
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MNL	: Mononükleer Lökositler
ng	: Nanogram
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
PA	: Plazminojen Aktivatör
PAF	: Trombosit (platelet) Aktive Edici Faktör
PAS-HE	: Periyodik Asit Schiff-Hematoksilin
PCO	: Polikistik Over Sendromu
pg	: Pikogram
PLGF	: Plasental Büyüme Faktörü

PMNL	: Polimorf Nükleer Lökositler
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RGD	: Arginin-Glisin-Aspartik Asit
rh	: Rekombinant
RIA	: Radioimmuno Assay
S	: Hücre döngüsü DNA-sentez evresi
SCF	: Stem Cell Faktör
TİMPs	: Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
TGF	: Transforme Edici Faktör
TGF- $\alpha$	: Transforme Edici Faktör – Alfa
TGF- $\beta$	: Transforme Edici Faktör-Beta
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü
vWF	: von Willabrand Faktör



## 8. RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1:** Kontrol grubuna ait deri kesiti. Epidermis ve dermis tabakaları gözlenmektedir. H&E.....70
- Resim 2:** Kontrol grubuna ait deri kesiti. Kollajen lifler mavi-yeşil renkte gözlenmektedir. Masson trikrom.....70
- Resim 3:** Kontrol grubuna ait deri kesiti. PAS-HE. (→) Bazal Membran (BM).....71
- Resim 4:** Kontrol grubuna ait deri kesiti. (→) Elastik lif. Weigert Rezorsin Fuksin....71
- Resim 5:** Sham grubu 1. haftaya ait deri kesiti. Oldukça geniş olan insizyon hattında inflamatuvar fazın hakim olduğu, re-epitelizasyonun sağlanamadığı gözlenmektedir. (\*) krut, (↔) dermis kaybı, (▶) sütür izi, (→) dev hücreler. H&E.....72
- Resim 6:** Sham grubu 1. haftaya ait büyük büyütme ile deri kesiti. (↑) hasarlı matriks yıkımı sonucunda oluşan anjiyojenik boşluklar.(▶) normal yapıda dermis. H&E.....72
- Resim 7:** Sham grubu 1. haftaya ait deri kesitinde gözlenen (→) infiltratif hücreler ve (↔) kan akımının az da olsa başladığı anjiyojenik boşluklar. H&E.....73
- Resim 8:** Sham grubu 1. haftaya ait deri kesitinde, baskın infiltratif hücre tipi PMNL'ler olduğu için, az sayıdaki fibroblast çevresinde sınırlı kalmış (→) ECM sentezi koyu-pembe renkte gözlenmektedir. PAS-HE.....73
- Resim 9:** Sham grubu 1. haftaya ait deri kesitinde, kollajen sentezi ve depolanmasının henüz başlamadığı gözlenmektedir. (\*) insizyon alanı, (▶) normal yapıdaki çevre bağ doku. Masson trikrom.....74

- Resim 10:** Sham grubu 2. haftaya ait deri kesitinde, 1. haftaya oranla insizyon alanında fibroblast migrasyon ve proliferasyonunun arttığı ve PMNL'lerin daha az sayıda olduğu gözlenmektedir. H&E.....74
- Resim 11:** Sham grubu 2. haftaya ait deri kesitinde, hasarlı matriks yıkımının tamamlandığı, anjiyojenik boşlukların birleşerek, endotele sahip, matür, kan damarlarını oluşturduğu ve kan akımının başladığı gözlenmektedir. H&E.....75
- Resim 12:** Sham grubu 3. haftaya ait deri kesitinde, insizyon alanının daraldığı, hakim fazın fibroplazi olduğu ve (→) dermal bütünlüğün sağlanamadığı gözlenmektedir. H&E.....75
- Resim 13:** Sham grubu 3. haftaya ait deri kesitinde, re-epitelizasyonun tamamlandığı gözlenmektedir. H&E.....76
- Resim 14:** Sham grubu 3. haftaya ait deri kesitinde, ECM sentezi ve birikiminin hala devam ettiği insizyon hattının çevre bağ dokuya oranla daha koyu-pembe boyanma özelliğiyle tespit edildi. (→) dermal bütünlüğün sağlanamadığı gözlenmektedir. PAS-HE.....76
- Resim 15:** EKH grubu 1. haftaya ait deri kesitinde; kurutun uzaklaştığı, reepitelizasyonun tamamlandığı ve fibroblastların PMNL'lerden sayıca çok fazla olduğu gözlenmektedir. H&E.....77
- Resim 16:** EKH grubu 1. haftaya ait deri kesitinde; (→) insizyon alanındaki fibroblastlar. H&E.....77
- Resim 17:** EKH grubu 1. haftaya ait deri kesitinde; anjiyojenik boşlukların birleşerek, endotele sahip, matür kan damarlarını oluşturduğu ve kan akımının başladığı gözlenmektedir. H&E .....78

- Resim 18:** EKH grubu 1. haftaya ait deri kesitinde, (→)yara alanında artan fibroblast sayısı ile paralel olarak artan ECM sentezi ve birikimi koyu-pembe boyanma özelliğiyle tespit edildi. PAS-HE.....78
- Resim 19:** EKH grubu 1. haftaya ait deri kesitinde, fibroblast proliferasyonu arttığı, kollajen sentezi ve birikiminin başladığı gözlenmektedir. Masson trikrom.....79
- Resim 20:** EKH grubu 2. haftaya ait deri kesitinde maturasyon fazının kontraksiyon aşamasına girildiği oldukça daralmış olan insizyon alanı ile dikkati çekmektedir. PAS-HE.....79
- Resim 21:** EKH grubu 2. haftaya ait deri kesitinde; (→) BM bütünlüğünün sağlandığı gözlenmektedir. PAS-HE.....80
- Resim 22:** EKH grubu 2. haftaya ait deri kesitinde daralmış insizyon hattında (\*) ECM sentez ve birikiminin devam ettiği gözlenmektedir. PAS-HE.....80
- Resim 23:** EKH grubu 2. haftaya ait deri kesitinde daralmış insizyon hattında (\*) kollajen lif sentezinin, birikiminin ve reorganizasyonunun devam ettiği gözlenmektedir. Masson trikrom.....81
- Resim 24:** EKH grubu 2. haftaya ait deri kesitinde daha büyük büyütmede, daralmış insizyon hattında (\*) kollajen lif reorganizasyonu. Masson trikrom.....81
- Resim 25:** EKH grubu 3. haftaya ait deri kesitlerinde tüm kesit alanının aynı renkte boyandığı ve dermal bütünlüğün sağlandığı gözlenmektedir. PAS-HE.....82
- Resim 26:** EKH grubu 3. haftaya ait deri kesitinin büyük büyütmesi. ECM sentezi/birikiminin ve kollajen reorganizasyonunun tamamlandığı, BM bütünlüğünün sağlandığı gözlenmektedir. PAS-HE.....82

- Resim 27:** EKH grubu 3. haftaya ait deri kesitinin büyük büyütmesinde kollajen reorganizasyonunun tamamladığı gözlenmektedir. Masson trikrom.....83
- Resim 28:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 1. haftaya ait deri kesitinde krutun uzaklaştığı, reepitelizasyonun tamamlandığı ve insizyon hattının oldukça daralmış olduğu gözlenmektedir. H&E.....83
- Resim 29:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 1. haftaya ait deri kesitinin büyük büyütmesinde, oldukça daralmış insizyon hattında maturasyon fazının özellikleri gözlenmektedir. H&E.....84
- Resim 30:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 1. haftaya ait deri kesitinde re-epitelizasyonun ve (→) BM bütünlüğünün sağlandığı gözlenmektedir. PAS-HE.....84
- Resim 31:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 1. haftaya ait deri kesitinde, maturasyon fazının bir göstergesi olarak; (→)ECM sentezinin insizyon hattında bulunan az sayıdaki hücreyle sınırlı kaldığı gözlenmektedir. PAS-HE.....85
- Resim 32:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 1. haftaya ait deri kesitinde, maturasyon fazının bir göstergesi olarak insizyon hattında kollojen reorganizasyonunun tamamlandığı tüm dermisin aynı renkte boyanma özelliğiyle tespit edilmiştir. MTC...85
- Resim 33:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 1. haftaya ait deri kesitinin büyük büyütmesinde fibroblastlarca sentezlenen kollajen liflerin demet oluşturduğu gözlenmektedir. Masson trikrom.....86
- Resim 34:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 1. haftaya ait deri kesitinde, (→) insizyon hattındaki sentezlenmiş elastik lifler. Weigert Rezorsin Fuksin.....86
- Resim 35:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 2. haftaya ait deri kesitinde insizyon hattının subepidermal tabakaya kadar gerilediği gözlenmektedir. H&E.....87

- Resim 36:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 2. haftaya ait deri kesitinde (→) insizyon hattının subepidermal tabakaya kadar gerilediği gözlenmektedir. Masson trikrom.....87
- Resim 37:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 2. haftaya ait deri kesitinde (→) subepidermal insizyon hattında yeni sentezlenen kollajen liflerin demet oluşturmaya başladıkları gözlenmektedir. Masson trikrom.....88
- Resim 38:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 2. haftaya ait deri kesitinde (→) subepidermal insizyon hattındaki elastik lifler. Weigert Rezorsin Fuksin.....88
- Resim 39:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 3. haftaya ait deri kesitinde insizyon hattının yeniden epidermis-hipodermis boyunca genişlediği gözlenmektedir. H&E.....89
- Resim 40:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 3. haftaya ait deri kesiti büyük büyütmesinde genişleyen insizyon hattında fibroblast sayısının arttığı ve buna paralel olarak kollajen lif sentezinin/birikiminin yeniden başladığı gözlenmektedir. H&E.....89
- Resim 41:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 3. haftaya ait deri kesitinde genişleyen insizyon hattındaki ECM sentezi ve birikimi çevre bağ dokuya oranla daha koyu pembe renkte boyanma özelliğiyle tespit edildi. PAS-HE.....90
- Resim 42:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 3. haftaya ait deri kesitinin büyük büyütmesi. ECM sentezinin devam ettiği, BM bütünlüğünün korunduğu gözlenmektedir. PAS-HE.....90
- Resim 43:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 3. haftaya ait deri kesitinde genişleyen insizyon hattında kollajen lif sentezinin/birikiminin yeniden başladığı açık yeşil renkte boyanma özelliğiyle tespit edildi. Masson trikrom. ....91

**Resim 44:** Ovaryum folikül sıvısı grubu 3. haftaya ait deri kesitinin büyük büyütmesi. Genişleyen insizyon hattında kollajen lif sentezinin/birikiminin yeniden başladığı açık yeşil renkte boyanma özelliğiyle tespit edildi. Masson trikrom.....91

## 9. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. AKASAKA Y., ONO I., YAMASHITA, T., JIMBOW K., ISHII T.: Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Apoptosis and Suppresses Granulation Tissue Formation in Acute Incisional Wounds, *Journal of Pathology*, 203: 710–720, (2004).
2. ANDREE C., PAGE C.P., SLAMA J., STARK G.B., ERİKSSON E.: Naturally Occurring Growth Factors in Porcine Wounds Treated with Autologous Keratinocytes in a Liquid Environment, *Eur J Plast Surg.*, 22:322–325, (1999).
3. ARTINI P.G., BATTAGLIA C., D’AMBROGIA G., BARRECA A., DROGHIN F., VOLPE A., GENAZZANI A.R.: Relationship Between Human Oocyte Maturity, Fertilization and Follicular Fluid Growth Factors, *Human Reproduction*, 9(5): 902-6, (1994).
4. ARTINI P.G., MONTI M., MATTEUCCI C., VALENTINO V., CRISTELLO F., GENAZZANI, A.R.: Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor in Polycystic Ovary Syndrome During Controlled Ovarian Hyperstimulation, *Gynecological Endocrinology*, 22(8), 465–470, (2006).
5. ASHCROFT G.S., HORAN M.A., FERGUSON M.W.J.: The Effects of Ageing on Wound Healing: Immunolocalisation of Growth Factors and Their Receptors in a Murine Incisional Model, *J. Anat. (Ageing and wound healing)*, 190, 351-365, (1997).
6. BAUER S.M., BAUER R.J., VELAZQUEZ O.C.: Angiogenesis, Vasculogenesis and Induction of Healing in Chronic Wounds, *Vascular and*

Endovascular Surgery, 39(4), (2005).

7. BAUER S.M., GOLDSTEIN L.J., BAUER R.J., CHEN H., PUTT M., VELAZQUEZ O.C.: The Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cell Response is Impaired in Delayed Wound Healing From Ischemia, *Journal of Vascular Surgery*, 43(1), 134-141, (2006).
8. BAYKAL Y.: Travmaya Cevap (yara iyileşmesi ve inflamasyon), *Seminer, GATA*, (2005).
9. BEVERS M.M., DIELEMAN S.J., HURK R., IZADYAR F. Regulation and Modulation of Oocyte Maturation in the Bovine. *Theriogenology*, 13-22, (1996).
10. BISHONGA C., TAKAHASHI Y., KATAGIRI S., NAGANO M. Immunocalization of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in the Ovarian Follicular Compartments of the Adult Mouse at Diestrus, Proestrus and after Treatment with Human Chorionic Gonadotropin. *J. Reprod. Dev.*,47:91-96, (2001).
11. BITAR M.S., LABBAD Z.N.: Transforming Growth Factor- $\beta$  and Insulin-like Growth Factor-I in Relation to Diabetes-Induced Impairment of Wound Healing. Available online, (2002).
12. BLAKYTNY R., JUDE E.: The Molecular Biology of Chronic Wounds and Delayed Healing in Diabetes, *Diabetic Medicine*, 23, 594–608, (2006).
13. BLUFFA J.E., FERGUSONA M.W.J., O’KANE S., IRELANDA G.: Bone Marrow–Derived Endothelial Progenitor Cells do not Contribute significantly to New Vessels during Incisional Wound Healing, *Experimental Hematology*, 35, 500–506, (2007).



14. BULGURCUOĞLU S., ÖZSAIT B., ATTAR E.: Büyüme Faktörlerinin Oosit ve Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkisi, *Artemis*, 4(1), 18-26, (2003).
15. CALOGERO A.E., NICOLETTI F., PALUMBO M.A.: Macrophage-Derived Cytokines in the Follicular Fluids of Women with Infertility due to Immunological Causes. Elevated Levels of Interleukin 6 and Low Levels of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, *Cytokine*, 10(10), 814-8, (1998).
16. CHAE H., HONG S.H., HONG S.H., KIM S.H., KIM C.H., KANG B.M., LEE J.Y.: Influence of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  on Estradiol, Progesterone, Insulin-Like Growth Factor-II, and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1, 2, and 3 in Cultured Human Luteinized Granulosa Cells, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, (2006).
17. CARRIE F., C., WILSON, L., HUTTER, J., KAPOOR, V., SMITH, A., HOCKING, A., ISIK, F.: Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Skin: Collagen Deposition and Wound Repair, *Stem Cells*, 22, 812-822, (2004).
18. CİĞER S.: Yara İyileşmesi ve Büyüme Faktörleri, *Alsancak Devlet Hastanesi Dermatoloji Kliniği Uzmanı*.
19. COOPER D.M., YU E.Z., HENNESSEY P., KO F., ROBSON M.C.: Determination of Endogenous Cytokines in Chronic Wounds, *Annals of Surgery*, 219(6), 688-692, (1994).
20. CUNHA-FILHO J.S., LEMOS N.A., FREITAS F.M., KIEFER K., FALLER M., PASSOS E.P.: Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 and IGF Binding Protein-1 and -3 in the Follicular Fluid of Infertile Patients with Endometriosis, *Hum Reprod*, 18(2): 423-8, (2003).

21. DEKEL N., SHERIZLY I.: Epidermal Growth Factor Induces Maturation of Rat Follicle-Enclosed Oocytes, *Endocrinology*, 116: 406-409, (1985).
22. DELİLBAŞI L., BALABAN B., AYAŞ B. Gametler (sperm/oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim, Serono Yayınları,1.Baskı, (2000-02).
23. DEMİR R.: İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi, 1. Baskı, Palme Yayıncılık,Antalya, (1995).
24. DESMOULIE'RE A., CHAPONNIER C., GABBIANI G.: Tissue Repair, Contraction, and Myofibroblast. *Wound Rep. Reg.*, 13: 7-12, (2005).
25. DIEGELMANN R.F., EVANS M.C.: Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing, *Frontiers in Bioscience*, 9, 283-289, (2004).
26. DORN C., REINSBERG J., KUPKA M., VAN DER VEN H., SCHILD R.L.: Leptin, VEGF, IGF-1, and IGFBP-3 Concentrations in Serum and Follicular Fluid of Women Undergoing *In Vitro* Fertilization, *Arch Gynecol Obstet*, 268(3): 187-93, (2003).
27. DRUMMOND A.E., DYSON M., LE M.T., ETHIER J.F., FINDLAY I.K.: Ovarian Follicle Populations of the Rat Express TGF- $\beta$  Signalling Pathways, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202, 53-57, (2003).
28. EMING S.A., LAUER G., COLE M., JURK S., CHRIST H., HORNIG C., KRIEG T., WEICH H.A.: Increased Levels of the Soluble Variant of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor VEGFR-1 are Associated with a Poor Prognosis in Wound Healing, *The Journal Of Investigative Dermatology*, 123, (2004).

29. ERBENGİ T. Özel Histoloji. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 1.Baskı, İstanbul (1985).
30. ERKOÇAK A. Özel Histoloji, A.Ü. Tıp Fakültesi Basımevi-1982-Ankara
31. ERTOY D.: Yara İyileşmesinin Histopatolojisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi.
32. EVANS M.J., KAUFMAN M.H.: Establishmend in Culture of Pluripotential Cells From Mouse Embryos. Nature, 292 (5819): 154-6, (1981).
33. FALANGAV., SAAP L.J., OZONOFF A.: Wound Bed Score and its Correlation with Healing of Chronic Wounds, Dermatologic Therapy, 19, 383–390, (2006)
34. FERRARI B., PEZZUTO A., BARUSI L., COPPOLA F. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are increased during GnRH antagonist/FSH ovarian stimulation cycles. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 124, 70–76, (2006)
35. FRIED G., WRAMSBY H.: Increase In Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Ovarian Follicular fluid following ovarian stimulation and In-Vitro Fertilization Correlates to Pregnancy, Human Reproduction, 13(3), 656–659, (1998).
36. GARRIDO N., NAVARRO J., REMOHI J., SIMON C., PELLICER A.: Follicular Hormonal Environment and Embryo Quality in Women with Endometriosis, Hum Reprod, 6(1), 67-74, (2000).

37. GARTNER L.P., HIATT J.L.: Color Textbook of Histology, First Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, (1997).
38. GIANNOUDIS P.V., POUNTOS I.: Tissue Regeneration: The past, The Present and The Future. *Injury, Int. J. Care Injured*, 36S, 2-5, (2005).
39. GRDISA M., POPOVIC M., HRZENJAK T.: Stimulation of Growth Factor Synthesis in Skin Wounds Using Tissue Extract (G-90) from the Earthworm *Eissenia Foetida*, *Cell Biochemistry and Function (Cell Biochem Funct)*, 22,3–378, (2004).
40. GRUEMMER R., MOTEJLEK K., BERGHAUS D., WEICH H.A., NEULEN J. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR-1) expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 57, (2005).
41. GÜLLÜ İ.H.: Anjiyenez ve Antianjiyenez Tedavileri, ders notları
42. GÜNEŞ H.: Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri, *TR. J. of Biology*, 23, 283-292, (1999).
43. GÜNEŞ H.V.: Moleküler Hücre Biyolojisi, 1. Baskı, 4, Kaan Kitapevi, Eskişehir, (2003).
44. HAMMADEH M.E., BRAEMERT B., BALTES S., GEORG T., ROSENBAUM P., SCHMIDT W.: Relationship Between Ovarian Stimulation Regimen and Cytokine Concentration in Follicular Fluid and Their Effect on Fertilization and Pregnancy Outcome of Patients Undergoing ICSI Program, *Am J Reprod Immunol.*, 43(1):12-20, (2000).

45. HAMMADEH M.E., ERTAN A.K., GEORG M.T., ROSENBAUM P., SCHMIDT W.: Relationship between Ovarian Stimulation Regimen and Interleukin level in Pre-ovulatory Follicular Fluid and Their Effect on ICSI Outcome, *Am J Reprod Immunol (AJRI)*, 48, 255–261, (2002).
46. HAMMADEH M.E., ERTAN A.K., ZEPPEZAUER M.: Immunoglobulins and Cytokines Level in Follicular Fluid in Relation to Etiology of Infertility and Their Relevance to IVF Outcome, *Am J Reprod Immunol*, 47(2): 82-90 (2002).
47. HAMMADEH M.E., FISCHER-HAMMADEH C., HOFFMEISTER H., HERRMANN W., ROSENBAUM P., SCHMIDT W.: Relationship between Cytokine Concentrations (FGF, sICAM-1 and SCF) in Serum, Follicular Fluid and ICSI Outcome, *Am J Reprod Immunol (AJRI)*, 51(1), 81-85, (2004).
48. HAMMADEH M.E., FISCHER-HAMMADEH C., HOFFMEISTER H., HUEBNER U., GEORG T., ROSENBAUM P., SCHMIDT W.: Fibroblast Growth Factor (FGF), Intracellular Adhesion Molecule (sICAM-1) Level in Serum and Follicular Fluid of Infertile Women with Polycystic Ovarian Syndrome, Endometriosis and Tubal Damage, and their Effect on ICSI Outcome, *AJRI*, 50:124–130 (2003).
49. HASSA H.: İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları, 1.Baskı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, (2003).
50. HATOYA S., TORII R., KONDO Y., OKUNO T., KOBAYASHI K., WIJewardana V., KAWAE N., TAMADA H., SAWADA T., KUMAGAI D., SUGIURA K., INABA T.: Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol reprod dev.*, 73(3): 298-305, (2006).

51. HULL K.L., HARVEY S.: Growth Hormone: Roles in Female Reproduction, *Journal of Endocrinology*, 168, 1–23, (2001).
52. ISIK F.F.: Wound Healing, Research in the Department of Surgery, (2002).
53. J. BURATINI J., TEIXEIRA A.B., COSTA I.B., GLAPINSKI V.F., PINTO M.G.L., GIOMETTI I.C., BARROS C.M., CAO M., NICOLA E.S., PRICE C.A.: Expression of Fibroblast Growth Factor-8 and Regulation of Cognate Receptors, Fibroblast Growth Factor Receptor-3c and -4, in Bovine Antral Follicles, *Society for Reproduction and Fertility*, 1470–1626, (2005).
54. JESCHKE M.G., SCHUBERT T., KRICKHAHN M., POLYKANDRIOTIS E., KLEIN D., PEREZ-POLO J.R., PRZKORA R., HERNDON D.N.: Interaction of Exogenous Liposomal Insulin-Like Growth Factor-I cDNA Gene Transfer with Growth Factors on Collagen Expression in Acute Wounds, *Wound Repair and Regeneration*, 13, 269–277, (2005).
55. JIMENEZ P.A., RAMPY M.A.: Keratinocyte Growth Factor-2 Accelerates Wound Healing in Incisional Wounds, *Journal of Surgical Research*, 81, 238–242 (1999).
56. JOHSON A.L.: Intracellular Mechanisms Regulating Cell Survival in Ovarian Follicles, *Animal Reproduction Science*, 78, 185-201, (2003).
57. JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J., KELLEY R.O.: *Temel Histoloji*, 8. Baskı, Barış Kitapçılık, (1998).
58. KARADURMUŞ N.: *Inflamasyonda Nöroendokrin Sistem Aktivasyonu*, GATA seminer.

59. KARAÖZ E., OVALI E.: Kök Hücreler, Derya Kitapevi Celepler Matbaacılık, (2004).
60. KHAN M.N., DAVIES C.G.: Advances in the Management of Leg Ulcers- the Potential Role of Growth Factors, International Wound Journal, 3, 113-120, (2006).
61. KHANNA S., VENOJARVI M., ROY S., SHARMA N., TRIKHA P., BAGCHI D., BAGCHI M., SEN C.K. Dermal Wound Healing Properties of Redox-Active Grape Seed Proanthocyanidins, Free Radical Biology & Medicine, 33(8), 1089-1096, (2002).
62. KIERSZENBAUM A.L.: Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş, (2006).
63. KNIGHT P.G., GLISTER C.: Local Roles of TGF- $\beta$  Superfamily Members in the Control of Ovarian Follicle Development, Animal Reproduction Science, 78, 165-183, (2003).
64. KOHLMAN-TRİGOBOFF D., LAWSON J.H., MURPHY M.P.: Stem Cell use in a Patient with an Ischemic Foot Ulcer: A Case Study, Journal of Vascular Nursing (J Vasc Nurs), 24,56-61, (2006).
65. KONUKOĞLU D., TURHAN M.S.: Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezini, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 36 (1), (2005)
66. KUMAR V., COTRAN R., ROBBIN S.: Basic Pathology, Sixty Edition, Saunders Company, 47-70, (2000).

67. KUNDAKÇI N.: Doku Harabiyetinin Nedenleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
68. LAURENS N., KOOLWIJK P., MAAT M.P.M.: Fibrin Structure and Wound Healing, *Journal of Thrombosis and Haemostasis (J Thromb Haemost)*, 4: 932–9, (2006).
69. LAURENCE R.: Wound Healing, Growth Factors, Department of Surgery, University of Alabama at Birmingham Hospital, February 17, (2006).
70. LI M.: Embryonic Stem Cells, Review Article, *ACNR*, 5 (1), March/ April, (2005).
71. LOKMIC Z., DARBY L.A., THOMPSON E.W., MITCHELL G.M., Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 14, 277–288, (2006).
72. LORENZA P.L., REBOLLAR P.G., ILLERA M.J., ILLERA M., ALVARNO J.M.R. Stimulatory Effect of Insulin-Like Growth Factor I and Epidermal Growth Factor on the Maturation of Rabbit Oocytes in Vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107: 109-117, (1996).
73. LORENZO P.L., ILLERA M.J., ILLERA J.C., ILLERA M. Enhancement of Cumulus Expansion and Nuclear Maturation During Bovine Oocyte Maturation In Vitro by the Addition of Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor I. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 697-701, (1994).
74. LUDWIG T.E., LEVENSTEIN M.E., JONES J.M., BERGGREN W.T., MITCHEN E.R., FRANE J.L., CRANDALL L.J., DAIGH C.A., CONARD



- K.R., PIEKARCZYK M.S., LLANAS R.A., THOMSON J.A.: Derivation of Human Embryonic Stem Cells in Defined Conditions. *Nature biotechnology*, 24: 185-187 (2006).
75. MANNIAUX M.M., MANGET P., BESNARD N., HUET C., PISSELET C. Growth Factors and Antral Follicular Development in Domestic Ruminants. *Theriogenology*, 3-12, (1996).
76. MARTÍN P., LEIBOVICH S.J. Inflammatory Cells During Wound Repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 15(11), (2005).
77. MCGEE E.A., CHUN S.Y., LAI S., HE Y. HSUEH A.J.W. Keratinocyte Growth Factor Promotes the Survival, Growth and Differentiation of Preantral Ovarian Follicles. *Fertility and Sterility*, 71(4): 732-738, (1999).
78. MEIER K., NANNEY L.B. Emerging New Drugs for Wound Repair. *Expert Opinion Emerging Drugs* 11(1):23-37(2006).
79. MENDOZA C., RUIZ-REQUENA E., ORTEGA E., CREMADES N., MARTINEZ F., BERNABEU R., GRECO E., TESARIK J.: Follicular Fluid Markers of Oocyte Developmental Potential, *Human Reproduction (Hum Reprod)*, 17(4), 1017-1022, (2002).
80. MOON S.Y., PARK Y.B., KIM D.S., OH S.K., KIM D.W.: Generation, Culture, and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells for Therapeutic Applications, *Molecular Therapy*, 13(1), (2006).
81. NAGATO H., UMEBAYASHI Y., WAKO M., TABATA Y., MANABE M.: Collagen–poly Glycolic Acid Hybrid Matrix with Basic Fibroblast Growth Factor Accelerated Angiogenesis and Granulation Tissue Formation in

Diabetic Mice, *Journal of Dermatology*, 33, 670-675, (2006).

82. NAKAGAWA H., AKITA S., FUKUI A., FUJII T., AKINO K.: Human Mesenchymal Stem Cells Successfully Improve Skin-substitute Wound Healing, *Cutaneous Biology, British Journal of Dermatology*, 153, 29–36, (2005).
83. NARDO L.G., BELLANCA S.A., BURRELLO N.: Concentrations of Insulin-like Growth Factor (IGF)-I and IGF Binding Protein-3 in the Follicular Fluid of Women Undergoing Ovarian Hyperstimulation with Different Gonadotropin Preparations, *Gynecol Endocrinol*, 15(6), 413-20, (2001).
84. NOYAN A.: Fizioloji, 13.Baskı, Meteksan A.Ş., (2003).
85. NURSAL T.Z., BAYKAL A., HAMALOĞLU E. Wound Healing in the Elderly: Is there a difference? *Turkish Journal of Geriatrics Geriatri*, 2(1): 29-32, (1999).
86. ODORISIO T., CIANFARANI F., FAILLA C.M., ZAMBRUNO G.: The Placenta Growth Factor in Skin Angiogenesis. *Journal of Dermatological Science* 41, 11-19, (2006).
87. ONO I.: The Effects of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) on the Breaking Strength of Acute Incisional Wounds, *Journal of Dermatological Science*, 29, 104–113 (2002).
88. OZORNEK M.H., BIELFELD P., KRUSSEL J.S., HIRCHENHAIN J., JEYENDRAN R.S., KOLDOVSKY U.: Epidermal Growth Factor and Leukemia Inhibitory Factor Levels in Follicular Fluid. Association with In Vitro Fertilization Outcome, *J Reprod Med.*, 44(4): 367-9 (1999).

89. PAKER Ş. Histoloji, 1. Baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 1990.
90. PELLICER A., ALBERT C., MERCADER A., BONILLA-MUSOLES F., REMOHÍ J., SÍMON C.: The Pathogenesis of Ovarian Hyperstimulation Syndrome: *In Vivo* Studies Investigating the Role of Interleukin-1beta, Interleukin-6, and Vascular Endothelial Growth Factor, *Fertil Steril*, 71(3), 482-9 (1999).
91. PELLICER A., ALBERT C., MERCADER A., BONILLA-MUSOLES F., REMOHÍ J., SÍMON C.: The Follicular and Endocrine Environment in Women with Endometriosis: Local and Systemic Cytokine Production, *Fertil Steril*, 70(3): 425-31 (1998).
92. PENG P., CATT K.J., KNECTH M.: Transforming Growth Factor-  $\beta$  Stimulates Meiotic Maturation of the Rat Oocyte, *Endocrinology*, 122: 181-186, (1988).
93. PHILIPS N., KELLER T., GONZALEZ S.: TGF  $\beta$ -Like Regulation of Matrix Metalloproteinases by Anti-Transforming Growth Factor- $\beta$ , and Anti-Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Antibodies in Dermal Fibroblasts: Implications for Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration*, 12, 53–59, (2004).
94. QU J., GODIN P.A., NISOLLE M. DONNEZ J. Expression of Receptors for Insulin-Like Growth Factor I and Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Follicles. *Molecular Human Reproduction*, 6(2): 137-145, (2000).
95. REEKA N., BERG F.D., BRUCKER C.: Presence of Transforming Growth Factor Alpha and Epidermal Growth Factor in Human Ovarian Tissue and Follicular Fluid, *Human Reproduction*, 13(8), 2199-2205, (1998).

96. ROH C., LYLE T. Cutaneous Stem Cells and Wound Healing 0031-998/06/5904-0100R Pediatric Research Vol. 59, No. 4, Pt 2, 2006 Copyright © 2006 International Pediatric Research Foundation, Inc.
97. ROSENBERG L.: Wound Healing, Growth Factors, , (2006).
98. SALMASSI A., SCHMUTZLER A.G., HUANG L., HEDDERICH J., JONAT W., METTLER L.: Detection of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and its Receptor in Human Follicular Luteinized Granulosa Cells, Fertil Steril, 81(1), 786-91, (2004).
99. SATOH H., KISH K., TANAKA T., KUBOTA Y., NAKAJIMA T., AKASAKA Y., ISHII T. Transplanted Mesenchymal Stem Cells Are Effective for Skin Regeneration in Acute Cutaneous Wounds. Cell Transplantation, 13(4), 405-412, (2004).
100. SCHUSTER N., KRIEGLSTEIN K. Mechanisms of TGF- $\beta$ -Mediated Apoptosis. Cell Tissue Res., 307: 1-14, (2002).
101. SEKKAI D., GRUEL G., HERRY M., MOUCADEL V., CONSTANTINESCU S.N., ALBAGLI O., TRONIK-LE ROUX D., VAINCHENKER W., BENNACEUR-GRISCELLI A.: Microarray Analysis of LIF/Stat 3 Transcriptional Targets in Embryonic Stem Cells, 23 (10), 1634-1642, (2005).
102. SMIT P.D., KUHN M.A., FRANZ M.G., WACHTEL T.L., WRIGHT T.E., ROBSON M.C.: Initiating the Inflammatory Phase of Incisional Healing prior to Tissue Injury, Journal of Surgical Research 92, 11–17 (2000).
103. SPICER L.J., SANTIAGO C.A., DAVIDSON T.R., BRIDGES T.S., CHAMBERLAIN C.S.: Follicular Fluid Concentrations of Free Insulin-Like

Growth Factor (IGF)-I during Follicular Development in Mares, Domestic Animal Endocrinology, 29, 573–581 (2005).

- 104.** STAMM J., COONEY R.N., MAISH G.O., SHUMATE M.L., LANG C.H., EHRLICH P., VARY T.C. Growth hormone dose not attenuate the inhibitory effects of sepsis on wound healing. Wound Repair and Regeneration 8, 103-109: (2000).
- 105.** STOJKOVIC M., LAKO M., STRACHAN T., MURDOCH A.: Derivation Growth and Applications of Human Embryonic Stem Cells. 128: 259-27, (2004).
- 106.** SUH W., KIM K.L, KIM J.M., SHIN I.S., LEE Y.S., LEE J.Y., JANG H.S., LEE J.S., BYUN J., CHOI J.H., JEON E.S., KIM D.K. Transplantation of Endothelial Progenitor Cells Accelerates Dermal Wound Healing with Increased Recruitment of Monocytes/Macrophages and Neovascularization. Stem Cells ,23(10), 1571-1578, (2005).
- 107.** ŞİMŞEK B. Epidermal Büyüme Faktörü Ve Çene Cerrahisindeki Yeri. G.Ü. Diş Hek. Fak. Ağız. Diş, Çene Hast. ve Cer. ABD
- 108.** Technical Manuel. In Vitro Differentiation of Murine ES Cells into Pancreatic Islet- Like Clusters in Stemcell Technologies. Version 1.0.1. www. Stemcell.com., pp1-17, (2003).
- 109.** THOMSON J.A., ITSKOVITZ-ELDOR J., SHAPIRO S.S., WAKNITZ M.A., SWIERGEL J.J., MARSHALL V.S., JONES J.M.: Embryonic Stem Lines Derived from Human Blastocysts. Science, 282: 1145-7, (1998).
- 110.** VUJIŠIC S., ZIDOVEC S.: Follicular Immunology Environment and the Influence on In Vitro Fertilization Outcome, Current Women’s Health

Reviews, 1, 49-60 , (2005).

111. WANDA A., DORSETT-MARTIN DVM.: Rat Models of Skin Wound Healing: A review, *Wound Repair and Regeneration*, 12, 591–599, (2004).
112. WERNER S., GROSE R.: Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines, *Physiol Rev.* 83, 835–870, (2003).
113. Wicell Research Institute. Class Manuel. Intraduction to Human Embryonic Stem Cell Culture Methods. Madison, USA, 1-81, (2003).
114. YAMAGUCHI Y., HEARING V.J., ITAMI S., YOSHIKAWA K., KATAYAMA I.: Mesenchymal-Epithelial Interactions in the Skin: Aiming for Site-Specific Tissue Regeneration, *Journal of Dermatological Science* 40, 1-9 (2005).
115. YAO F., VISOVATTI S., JOHNSON C.S., CHEN M., SLAMA J., WENGER A.: Age and Growth Factors in Porcine Full-Thickness Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration (Wound Rep. Reg.)*, 9(5), 371-377, (2001).
116. YANAGI K., MAKINODA S., FUJII R.: Cyclic Changes of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) mRNA in the Human Follicle During the Normal Menstrual Cycle and Immunolocalization of G-CSF Protein, *Human Reproduction (Hum Reprod)*, 17(12), 3046-52, (2002).
117. YASHIMURA Y., IWASHITA M., KARUBE M., ODA T., AKIBA M., SHIOKAWA S., ANDO M., YASHINAGA A., NAKAMURA Y. Growth Hormone Stimulates Follicular Development by Stimulating Ovarian Production of Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocrinology*, 135, 887-894, (1994).

- 118.** YASHIMURA Y., NAKAMURA Y., KAYAMA N., IWASHITA M., ADACHI T., TAKEDA Y. Effects of Growth Hormone on Follicle Growth, Oocyte Maturation And Ovarian Steroidogenesis. *Fertil Steril*, 59: 917-23, (1993).
- 119.** YUAN W., GIUDICE L.C. Insulin-Like Growth Factor-II Mediates the Sterodogenic and Growth Promoding Actions of Follicle Stimulating Hormone on Human Ovarian Preantral Follicles Cultured In Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, 84: 1479-1482, (1999).
- 120.** YELER H., YÜCETAŞ Ş., YILMAZ D., ÖZTÜRK M., ARICI S. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nün Diş Çekim Yarası İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi Cilt 2, Sayı 1*, (1999).
- 121.** ZHANGA F., LEIA M.P., OSWALDA T.M., PANGB Y., BLAINA B., CAIB Z.W., LINEAWEAVERA W.C.: The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on the Healing of Ischaemic Skin Wounds, *The British Association of Plastic Surgeons*, 56, 334–341(2003).

## ÖZGEÇMİŞ

**Doğum tarihi ve yeri:** 08.07.1982/ Eskişehir

**Eğitim** : Embriyoji Sertifikası (GATA Tüp Bebek Merkezi).....2006

Yüksek Lisans Eğitimi (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı).....2005-

Lisans Eğitimi (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü).....2000-2004

Staj (GATA Tüp Bebek Merkezi).....2003

Lise Öğrenimi (Eskişehir Atatürk Lisesi).....1996-1999

İlk ve orta öğrenimi (Eskişehir Dr. Halil Akkurt İlköğretim Okulu).....1988-1996