

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MAKROFAJ MİGRASYON İNHİBİTÖR FAKTÖR
DÜZEYİNİN HİPERTROFİK SKAR İLE İLİŞKİSİ

Dr.Sezi CEYLAN

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2014

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**MAKROFAJ MİGRASYON İNHİBİTÖR FAKTÖR
DÜZEYİNİN HİPERTROFİK SKAR İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Sezi CEYLAN

**Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŐMANI

Prof. Dr. Cengiz ÇETİN

**ESKİŞEHİR
2014**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI
T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Sezi CEYLAN'a ait "makrofaj migrasyon inhibitör faktör düzeylerinin hipertrofik skar ile ilişkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 11.02.2014

Jüri Başkanı Prof.Dr. Cengiz ÇETİN
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D.

Üye Prof.Dr. A.Aydan KÖSE
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D

Üye Doç Dr. Yakup KARABAĞLI
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.B.D

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun ---/---/---

Tarih ve --/-- Sayılı Kararı'yla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Bekir YAŞAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, eğitim süreci boyunca destek veren sayın hocalarım Prof.Dr. Cengiz ÇETİN'e, Prof.Dr. A. Aydan KÖSE'ye, Doç.Dr. Yakup KARABAĞLI'ya, Yrd.Doç.Dr. A. Emre KOÇMAN'a; tez çalışmama katkı sağlayan ESOGÜ Genetik A.B.D.'dan Prof. Dr. Sevilhan ARTAN'a ve Özden KUTLAY'a, Histoloji A.B.D.'dan Prof.Dr. Cengiz BAYÇU'ya teşekkür ederim.

ÖZET

Ceylan S. Makrofaj migrasyon inhibitör faktörün düzeylerinin hipertrofik skar ile ilişkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2014.

Çalışmamızda multipotent bir protein olan Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktörün hipertrofik skar gelişimi sürecindeki ekspresyon düzeylerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla toplam 30 adet balb-c/nu fare kullanılmıştır ve bu fareler 6 gruba ayrılmıştır. Her farenin sırtına 2x1 cm genişliğinde abdominoplasti ameliyatı olan hastalardan çıkan cilt fazlalığından alınan kısmi kalınlıklı deri grefti konulmuştur. Oluşturulan hipertrofik skarlardan 3., 21., 60., 120., 150. ve 210. günlerde biyopsiler alınmıştır. Alınan bu örneklerden MIF ekspresyon düzeylerine ve dermis kalınlığına bakılmıştır. Dermis kalınlığında tüm gruplarda kontrol grubuna göre artış gözlenirken özellikle 21, 60 ve 120 günlerdeki bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. 150 ve 210. günlerde ise hem klinik hem de histolojik olarak hipertrofik skar özelliklerinin gözlemlendi. MIF ekspresyon düzeylerinde ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre bifazik artış gözlemlendi. Ancak bu artış muhtemelen grupları oluşturan deneklerin azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sonuç olarak derin dermal travmalar sonrasında gelişen hipertrofik skar kaşıntı, ağrı, hareket kısıtlılığı gibi fonksiyon bozuklarının yanısıra görünümleri ile hastaların psikososyal yaşamını etkilemekte ve yaşam kalitelerini önemli ölçüde düşürmektedir. Hipertrofik skarın insana özgü olması ve patofizyolojinin hala tam olarak anlaşılammış olması nedeniyle etkin bir tedavisi de bulunamamıştır. Hipertrofik skar patofizyolojisinde yer alan birçok mekanizma ile direk veya indirek ilişkisi olan ve yara iyileşmesinde anahtar role sahip olduğu inanılan MIF ile hipertrofik skar arasındaki ilişkinin daha detaylı çalışılması ileride hipertrofik skar tedavisi veya önlemede alternatif bir seçenek olabilir.

Anahtar Kelimeler: hipertrofik skar, fibrozis, MIF, yara iyileşmesi

ABSTRACT

Ceylan S. Relation between macrophage migration inhibitory factor levels and hypertrophic scar. Eskişehir Osmangazi University Medical Faculty, Medical Speciality Thesis in Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Eskişehir, 2014. In this study our aim is to show a multipotent protein macrophage migration inhibitory factor expression levels at hypertrophic scar. For this purpose we use 30 balb-c/nu nude mice and separate at six groups. Full thickness skin of 2x1,5 cm was excised from the backs of the mice, and human split thickness skin grafts transplanted back of the mice which were taken from patients undergoing abdominoplasty surgery. At days 3, 21, 60, 120, 150 and 210 we took biopsies from the hypertrophic scars which developed from the transplanted xenografts. We analysed MIF expression levels and dermal thickness of the scars. In all groups dermal thickness was increased, especially at days 21, 60 and 120, it was significantly increased. At days 150 and 210 scars were depressed clinically and dermal thickness was reduced but it was still more than control group. We observed that MIF expression levels were increased in all groups at biphasic pattern but it was not a significant increasing statistically. Hypertrophic scar occurs after deep dermal traumas and causes functional impairment as pruritus, pain, limitation of joint mobility and cosmetic disfigurements which effects psychosocial life and decreases quality of lives. Hypertrophic scars unique to the human and pathophysiology is not well understood yet, so it is not have an exact therapy. There are a lot of mechanisms studied at hypertrophic scar and MIF is related with them direct or indirectly. It is also believed that MIF plays a major role at wound healing. In future may be more detail studies will reveal hypertrophic scar and MIF relation, and this relation may be an alternative therapy or prevent hypertrophic scarring.

Key Words: hypertrophic scar, fibrosis, MIF, wound healing

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Yara İyileşmesi	3
2.1.1. İnflamasyon Fazı	4
2.1.2. Proliferasyon Fazı	8
2.1.3.Remodeling Fazı	10
2.2. Hipertrofik Skar Tanımı	12
2.2.1. Hipertrofik Skar Patofizyolojisi	12
2.3. Makrofaj Migrasyon Faktör Tanımı	18
2.3.1. Mıf Etki Mekanizması	20
2.3.2. Mıf Ve Yara İyileşmesi	23
2.4. Hipertrofik Skarda Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri	24
2.4.1. Heterolog Hipertrofik Skar veya Keloid İmmunitesi Olmayan Hayvana İmplantı	25
2.4.2. Heterolog Hipertrofik Skar Veya Keloidin Bağışıklığı Olmayan Alana İmplantı	25
2.4.3. Kimyasal Aracılı Hasar İle Hipertrofik Skar veya Keloid İndüksiyonu	26
2.4.4. Özel Anatomik Bölgelerde Hipertrofik Skar veya Keloid İndüksiyonu	26
2.4.5. Domuz Modelinde Derin Dermal Yaralanma ile Hipertrofik Skarlaşma veya Keloid İndüksiyonu	26
3.GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Deney Hayvanları	30

	Sayfa
3.2. Anestezi ve Cerrahi Öncesi Bakım	30
3.3. Cilt Greftlerinin Hazırlanması	31
3.4. Eksizyonel Yara Modeli	31
3.5. Deney Grupları	32
3.6. Sakrifikasyon Yöntemi Ve Örneklerin Toplanması	33
3.7. Histolojik İnceleme	33
3.7.1. Kesitlerin Alınması ve Boyanması	33
3.7.2. Histolojik Değerlendirme	33
3.8. MIF Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	34
3.8.1. Genetik Doku Eldesi	34
3.8.2. Rna İzolasyonu	34
3.8.3. Total Rna Kalitesinin Mekanik Spektrofotometre Ve Biyoanalayzer Cihazı İle Ölçümü	34
3.8.4. c Dna Sentezi	35
3.8.5. Real-Time PCR	36
3.8.6. Verilerin Analizi	37
4. BULGULAR	38
4.1. Makroskobik Bulgular	38
4.2. Histolojik Bulgular	39
4.3. MIF mRNA Ekspresyon Düzeyleri	42
4.3.1. MIF Gen Amplifikasyon Sonuçları	43
4.4. İstatik Değerlendirme Sonuçları	44
4.4.1. MIF mRNA Ekspresyon Düzeyleri	44
4.4.2. Histolojik Dermal Kalınlık İstatistik Analizi	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

μL	Mikrolitre
ACTH	Adrenocorticotropin hormon
AP-1	Aktive protein 1
cDNA	complementary DNA
COL	Kollajen
COX-2	Siklooksijenaz
cPLA2	Phospholypase A2
CRH	Corticoid release hormon
CTGF(CCN2)	Connective tissue growth faktör
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Ekstracelluler signal-regulated kinase
FGF	Fibroblast growth factor
HTS	Hipertrofik skar
IFN-γ	İnterferon γ
IGF	İnsulin growth factor
IL	İnterlökin
JAB-1	c-Jun Activation Domain Binding Protein-1
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
LPS-1	Lökosit spesifik protein-1
MAPK	Mitogen- aktivited protein kinase
MIF	Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
MMP	Matriks metallopoteinaz
NO	Nitrit oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PCR	Polimerase chain reaction
PDGF	Platet derived growth factor
PG E	Prostoglandin E
RIN	RNA Integrity Number
SIP-1	Smad interacting protein -1
TGFβ	Tumor growth factor β

Th	T –helper
TIMP	Tissue inhibitor factor of matrix metalloproteinaz
TNF- α	Tümör necrose factor
VEGF	Vasküler endotelyal growth faktör

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Yara iyileşme evreleri	4
2.2. Yara iyileşmesi-inflamasyon fazı	5
2-3. Yara iyileşmesi-inflamatuvar faz 3. Gün	6
2.4. Yara iyileşmesi-proliferasyon fazı 5. Gün	9
2.5. Yara iyileşmesinin sonuçları	12
2.6. Makrofaj migrasyon inhibitör faktör; multifonksiyonel molekül	19
2.7. MIF ve glukortikoid ilişkisi	20
2.8. MIF sinyal iletim yolları	22
2.9 Dermal koninin vertikal şeması	27
2.10 Cilt grefi alınması sonrasında konilerin tanjansiyel yarada görünümü	28
3.1 IVC kafes sistemi	30
3.2 Cerrahi işelmin gerçekleştirildiği laminar hava akımlı kabin	31
3.3. İnsan deri greftinin xenograft olarak fare sırtına konulması	32
3.4 Agilent 2100 bioanalize' de total RNA elektroforegram görüntüsü	35
3.5. Real Time PCR koşulları	37
4.1. Oluşan skarların makroskobik görüntüsü	38
4.2 Hemotoksilen-eozin ve mallory azan ile boyanmış deri kesitleri	40
4.3. Hemotoksilen-eozin ve mallory azan ile boyanmış deri kesitleri	41
4.4. MIF ekspresyon güzeyleri	42
4.5. Real-time PCR'da yapılan gen amplifikasyonunun yazılım görüntüleri	43
4.6. MIF mRNA ekspresyonun başlangıç düzeyleri	44
4.7 MIF mRNA ekspresyonunun ortalama düzeyleri	45
4.8. 3. güne ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması	48
4.9. 21.güne ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması	48
4.10. 2. aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması	49
4.11. 4. aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması	49

	Sayfa
4.12. 5. aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması	50
4.13. 7. aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması	50
4.14 Oluşan hipertrofik skarların dermal kalınlık ölçümü	51
4.15 Oluşan hipertrofik skarın ortalama dermal kalınlık değişimi	52

TABLolar

	Sayfa
2.1. Yara alanında bulunan büyüme faktörlerinin bir kısmı	7
3.1. cDNA için kullanılan karışım içeriği	35
3.2. Real Time -PCR için kullanılan karışım içeriği	36
4.1. MIF mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplara göre ortalama ve standart sapma değerleri	44
4.2. MIF mRNA ekspresyon düzeylerinin tek yönlü varyans analiz sonuçları	46
4.3. MIF mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arası ikili karşılaştırma sonuçları	47
4.4. Histolojik dermal kalınlık ölçümlerinin gruplara göre ortalama ve standart sapma değerleri	51
4.5. Histolojik dermal kalınlık ölçümlerinin gruplara göre tek yönlü varyans analiz sonuçları	52
4.6. Histolojik dermal kalınlık ölçümlerinin gruplar arası ikili karşılaştırma sonuçları	53

1. GİRİŞ

Vücutun en büyük organı olan deri, organizmayı dış etkilere karşı koruma, su kaybının önlenmesi ve ısı düzenlenmesi gibi hayati fonksiyonlara sahiptir(1,2,3). Herhangi bir travma sonucu bütünlüğü bozulan bu yapının en kısa sürede yeniden bütünlüğünün sağlanması yara iyileşmesi olarak adlandırılır. Yara iyileşmesi doku hasarına karşı gelişen fizyolojik bir süreçtir. Bu süreç dinamik ve birbiri ile iç içe geçmiş birçok hücre çeşidi, sitokin, kemokin, büyüme faktörleri ve proteolitik enzimleri içeren karmaşık olaylar dizisinden oluşmaktadır(4). Aşırı skar oluşumu ise bu fizyolojik yara iyileşmesinin abartılı olmasına neden olan derin dermis hasarı sonucu meydana gelir(5).

Aşırı skarlaşmadan ilk kez M.Ö 1700 yıllarında Smith papirüslerinde bahsedilmiştir(5,6). Orta çağ döneminde ise Afrikalıların süsleme amaçlı keloid oluşumunu resimlerinde kullandıkları görülmüştür. 1802 de Alibert tarafından 'cheloides' terimi kullanılmıştır ve keloidlerin hem kendiliğinden hem de travma sonrası meydana geldiğini gözlemlemiştir(6). 1962'de Mancini, 1970'de Peacock aşırı skarlaşmayı günümüzde de hala geçerli olan hipertofik ve keloid skar olarak ikiye ayırmıştır(5). Fibroproliferatif bir bozukluk olarak kabul edilen hipertofik skar klinikte ciltten kabarmış, kırmızı renkli, kaşıntılı ve ağrılı lezyonlar ile karakterizedir(7,8). Eklem yerlerinde oluştuğunda ise kontraktürlere neden olmaktadır. Kötü estetik görünümü yanısıra hastaların hem fiziksel hem de psikolojik yönden yaşam kalitesini de olumsuz etkilemektedir(7). Patofizyolojik olarak ise fibroblastlar tarafından aşırı kollajen sentezi ve depolanması ile karakterize olan hipertofik skar hasara karşı gelişen inflamatuvar cevabın uzadığı durumlarda oluşmaktadır(8). Uzamış inflamatuvar cevap ise vaskülarizasyon artışı, hipersellülarite ve aşırı kollajen depolanması ile sonuçlanır.

Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör(MIF) ilk keşfedildiğinde T lenfosit kaynaklı immun aktiviteye sahip ve makrofajların rastgele migrasyonunu önleyen bir sitokin olarak tanımlanmıştır(9). Daha sonraları ise MIF'in basit bir sitokin olmadığı birçok hastalığın patogenezinde yer alan enzimatik ve endokrin aktiviteye sahip pleotropik bir protein olduğu bulunmuştur(10,11). MIF'in doku onarımı sırasında

yaygın salınımına rağmen yara iyileşmesindeki etkinliği konusundaki tartışmalar ise hala devam etmektedir(12). Yara iyileşmesinde önemli role sahip TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ gibi stokinlerin ekspresyonunu etkilemesi, NO salınımı, MMP-2 ekspresyonu ve COX-2 yolaklarını aktive etmesi nedeniyle direk proinflamatuvar faktör olarak kabul edilmektedir(11,13).

MIF'in skleroderma, glomerüloskleroz, ateroskleroz gibi fibrozis ile seyreden birçok hastalığın patogeneğinde yer alması fibroproliferatif hastalık olarak kabul edilen hipertrofik skar gelişiminde de rol alabileceği düşünülmüştür. Nitekim yapılan çalışmalarda MIF'in yara iyileşmesinde kritik bir öneme sahip olduğu ortak kanıdır. Ancak yara iyileşmesini hangi aşamada ve nasıl etkilediği yönündeki tartışmalar hala devam etmektedir.

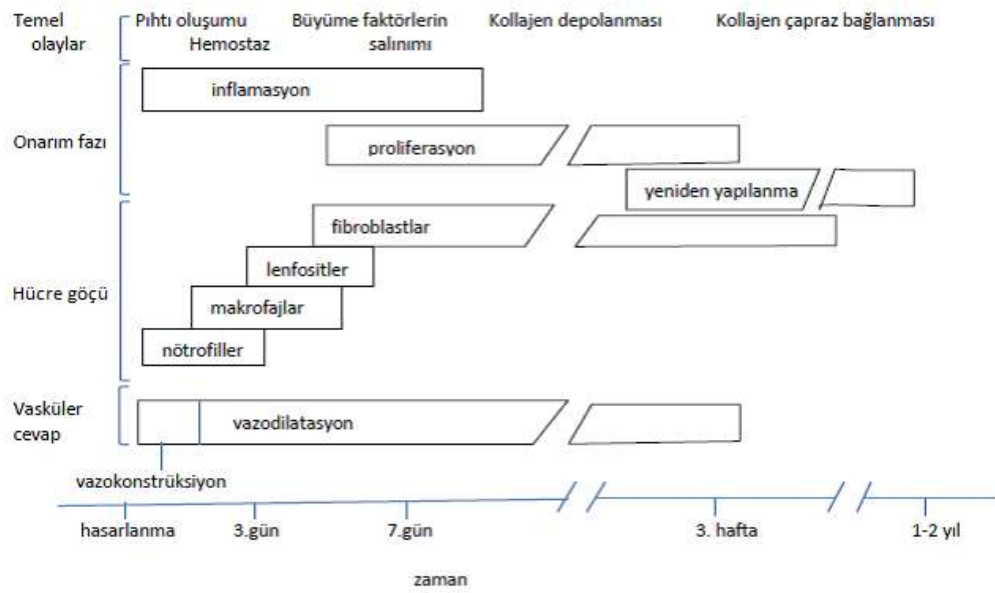
Bu çalışmanın amacı fibrozis ile seyreden birçok hastalığın patogeneğinde ve yara iyileşmesinde etkin rol alan MIF'in hipertrofik skar (HTS) gelişim sürecinde salınım düzeylerinin saptanmasıdır. HTS oluşumunda MIF'in rolünün belirlenmesi, hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkileyen hipertrofik skar tedavisine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Yara İyileşme Mekanizması

Yara, anatomik bir yapının hasarlanması veya bütünlüğünün bozulması şeklinde tanımlanmaktadır(14). Bu cildin epitel bütünlüğün basit bir şekilde bozulmasından daha derine cilt altı dokuya, tendonlara, kaslara, vasküler yapılara, sinirlere, parankimal organlara hatta kemiğe kadar uzanabilir(14). Herhangi bir şekilde doku bütünlüğünün bozulması, yara iyileşme sürecini başlatarak doku bütünlüğünün yeniden oluşmasını sağlar(15). Memelilerde bu onarım skar ile sonuçlanır, ancak kemik iyileşmesi ve bazı durumlarda karaciğer hasarının onarımı bu durumun dışındadır. Ayrıca fetal dönemde cilt, epidermal ve dermal eklerin rejenerasyonu ile skarsız olarak iyileşebilmektedir(18).

Normal yara iyileşmesi dinamik ve kompleks bir süreç olup 1)inflatuar mediatörler ve büyüme faktörleri, 2)hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasını sağlayan hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimleri, 3) epitelizasyon, fibroplazi ve anjiogenezis olayları, 4) yara kontraksiyonu ve 5)remodeling mekanizmalarını içerir(14). Birbiri ile içiçe geçmiş ve süreklilik arz eden bu olaylar dizisinin fizyolojik mekanizmasının anlaşılabilmesi için fazlara ayrılmıştır. İnflamasyon, proliferasyon ve remodelingten oluşan bu 3 faz kendilerine özgü sıra ile spesifik bir zamanda başlamalı ve optimal yoğunluğa ulaşana kadar belli bir süre devam etmelidir(17). Bu süreçte meydana gelen aksaklıklar iyileşmeyen yara, aşırı skarlaşma vb. şekilde sonuçlanmaktadır.

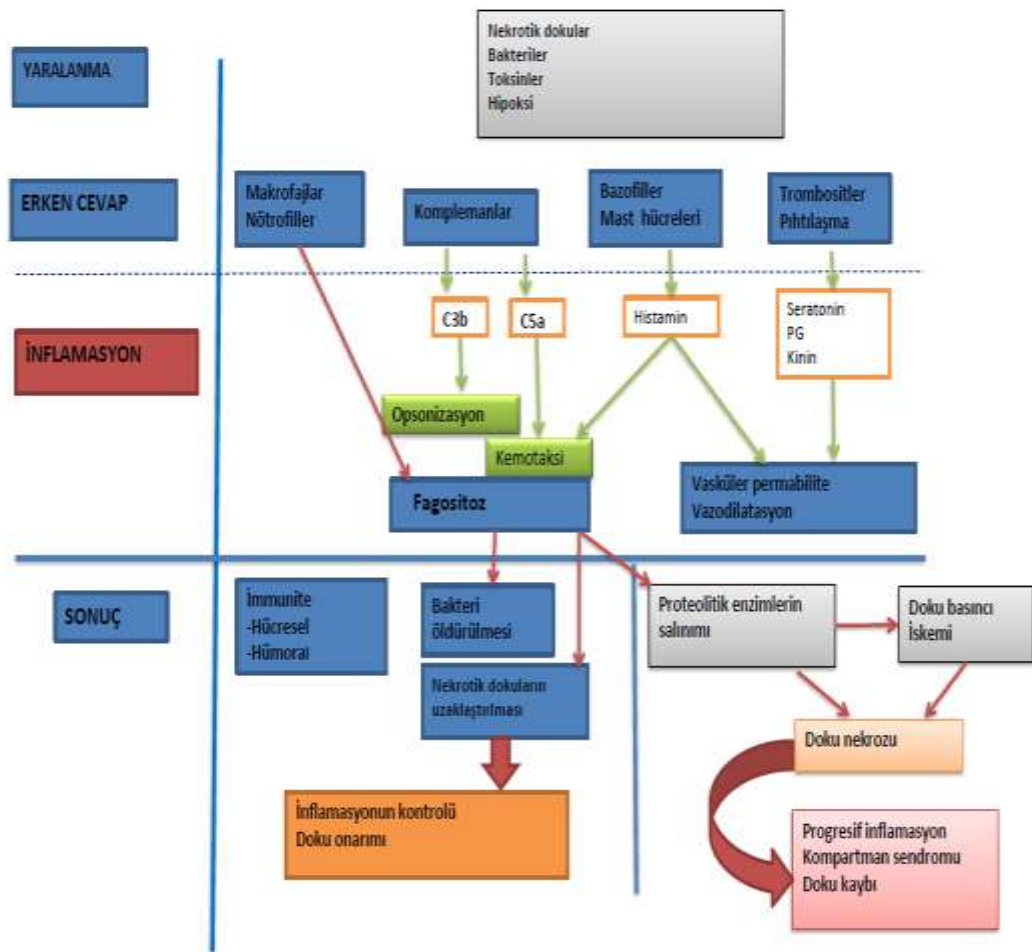


Şekil-2.1. Yara iyileşme evreleri

2.1.1. İnflamasyon Fazı (1-3 gün)

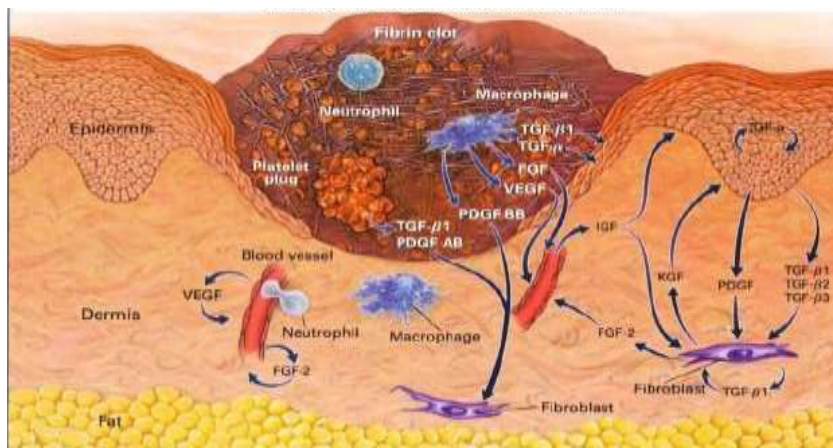
İnflamasyon yara iyileşmesinin ilk basamağı olup hemostaz ve koagülasyonu içermektedir(4,16). Bazı yazarlar hemostaz ve koagülasyon fazlarını ayrı olarak kabul eder yara ve iyileşmesini 4 faza ayırır(14,17). Yaralanma alanında lasere olmuş damarlar nöronal refleks mekanizmasının devreye girmesiyle hemen vazokonstrüksiyona uğrarlar. Bu refleks vazokonstrüksiyon kanamayı geçici olarak durdurur veya azaltır(14). Bu hemostatik olaylar ile birlikte özellikle subendotelden açığa çıkan tromboplastik doku ürünleri trombosit agregasyonu ve pıhtı oluşumu için ekstrinsik ve intrinsik koagülasyon yollarını aktive eder(14,16). Yaralanma alanına dökülen kan ürünleri ve trombositler, açığa çıkmış olan kollajen ve ekstrasellüler matriks elemanları ile birleşirler. Bu birleşme trombositlerden pıhtılaşma faktörlerinin salınımı tetikler ve fibronektin, fibrin, vitronektin ve trombospondinden oluşan pıhtıyı oluşturur(14,16). Bu pıhtı hemostaz sağlamasının yanı sıra bir sonraki fazda etkili olacak olan hücre göçünü sağlayan geçici matriks görevi görür(14,16). Aggrege olan trombositler degranüle olur ve inflamatuvar hücreler için güçlü kemoatraktanları, lokal fibroblast ve endotelial hücrelerin aktivasyonunu sağlayan faktörleri ve vazokonstrüktörleri salar(4,14,18). Hemostaz sonrasında lokal damarlar koagülasyon ve kompleman kaskadının aktivasyonuna sekonder olarak dilate olur. Bradikinin koagülasyon kaskadında yer alır ve Hageman faktörünün aktivasyonu ile

oluşan potent bir vazodilatatör olmakla birlikte vasküler permabilite faktörüdür(18). Kompleman kaskadında oluşan C3a ve C5a anafilatoksinleri direk olarak damar geçirgenliğini artırır ve nötrofil ve monositleri yara alanına çeker. Bu kompleman ürünleri aynı zamanda mast hücrelerinden histamin ve lökotrien C4 ve D4 salınımını uyarır. Lokal endotelial hücreler arasındaki hücre- hücre kontaklarının bozulması ve permabilitenin artışı inflamatuvar hücrelerin yara alanına migrasyonunu sağlar(18).



Şekil 2.2. Yara iyileşmesi- inflamasyon fazı

Nötrofillerin yüzey alanındaki adezyon moleküllerinde meydana gelen değişiklikler sonucunda nötrofiller yapışkan hale gelir ve yara etrafındaki post-kapiller venüllerdeki endotelial hücrelere yapışarak marjinasyonu başlatırlar(14). Nötrofiller endotelial yüzeyinde yuvarlanmaya başlarlar. Bu adezyon ve yuvarlama mekanizması selektin bağımlı olup zayıf bağlanmadır(14). Endotelial hücrelerden salınan kemokinler daha güçlü bir adezyon sistemi olan integrinleri aktive eder. Hücreler yuvarlanmayı bırakarak venüllerden diapedez ile göçe başlar ve yara alanına ulaşır(14). Yara yerine ilk gelen beyaz kan hücreleri olan nötrofiller hücre debriserini, yabancı cisimleri ve bakterileri temizler(15,16,18). Aktive olan kompleman fragmanları opsonizasyon ile bakteri öldürülmesine yardımcı olur. 2-3 gün içinde inflamatuvar hücre popülasyonu monositler lehine değişir(18). Nötrofiller bilinmeyen bir uyarı sonrasında apoptoza uğrar ve makrofajlar tarafından fagosite edilir(16). Dolaşımdaki monositler makrofajlara dönüşmek üzere yara alanına çekilir(4,16). Makrofajlar doku ve bakteri debriserininin fagositozunu gerçekleştirirken aynı zamanda birçok peptid büyüme faktörü salgılar. Bu büyüme faktörleri lokal endotelial hücreler, fibroblastlar ve keratinositleri yara alanına çeker ve aktive eder(18). Makrofajlar tarafından 20 den fazla sitokin ve büyüme faktörü salınmaktadır. Tablo-1 de inflamasyon fazında yara alanında bulunan bazı sitokin ve büyüme faktörleri, hücre kaynakları, hedef hücreleri ve biyolojik etkileri görülmektedir.



Şekil 2.3. İnflamatuvar faz 3. gün

Tablo-2.1: Yara alanında bulunan büyüme faktörlerinin bir kısmı

Büyüme faktör	Hücresel kaynak	Hedef hücre	Biyolojik aktivite
TGF- β 1& β 2	Makrofaj, trombosit Fibroblast, keratinosit	İnflamatuvar hücreler, keratinositler, fibroblastlar	Kemotaksi, proliferasyon, matriks üretimi(fibrozis)
TGF- β 3	makrofajlar	fibroblast	Anti-skar?
TGF- α	Makrofaj, trombosit keratinosit	Keratinosit, fibroblast, endotel hücreleri	proliferasyon
TNF- α	nötrofiller	Makrofaj, keratinosit, fibroblast	Büyüme faktörlerinin aktivasyonu
PDGF	Makrofaj, trombosit Fibroblast, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri	Nötrofil, makrofaj, fibroblast, endotel hücreler, vasküler düz kas hücreleri	Kemotaksi, proliferasyon, matriks üretimi
FGF-1, FGF-2 FGF-4	Makrofaj, fibroblast, endotel hücreleri	Keratinosit, fibroblast, endotel hücreleri, kondrosit	Anjiogenezis, proliferasyon kemotaksi
FGF-7(KGF-1) FGF-10(KGF-2)	Fibroblast	Keratinosit	Proliferasyon, kemotaksi
EGF	Trombosit, makrofaj, keratinosit	Keratinosit, fibroblast, endotel hücreler	Proliferasyon, kemotaksi
IGF-1/Sm-C	Fibroblast, makrofaj, serum	Fibroblast, endotel hücreler	Proliferasyon, kollajen sentezi
IL-1 α & 1 β	Makrofaj, nötrofil	Makrofaj, fibroblast, keratinosit	Proliferasyon, kollajenaz sentezi, kemotaksi
CTGF	Fibroblast, endotel hücreleri	Fibroblast	TGF- β 1 in salınımı
VEGF	Makrofaj, keratinosit, fibroblast	Endotel hücreler	anjiogenezis

Eikazonoidler ve araşidonik asidin diğer ürünleri hücre membranının hasarı sonucu salınır ve inflamasyonda güçlü biyolojik etkilere sahiptir(14). Lenfositler yara alanına gelen en son hücrelerdir ve yaralanmadan 72 saat sonra IL-1, kompleman komponentleri, IgG ürünleri tarafından çekilir(14). Hasarlanmış olan ekstrasellüler matriks, keratinositler, fibroblastlar, monositler ve makrofajlardan

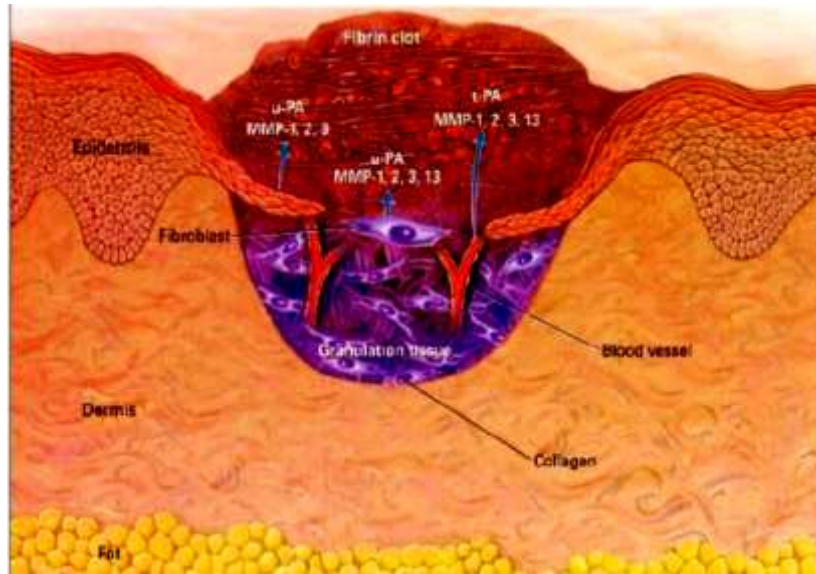
TNF- α uyarısı ile salınan matriks metalloproteinaz(MMP) lar tarafından temizlenir(16).

2.1.2.Proliferasyon Fazı(4-21 gün)

Fibroplazi:

Fibroplazi sürecinde fibroblastlar yara alanında yeni ekstrasellüler matriks(ECM) sentezler ve depolar. Proliferatif faz başlangıçtaki geçici fibrin-trombosit matriksin yıkımı ile başlar(18). Makrofajlar ve komşu ECM'den büyüme faktörleri salınarak fibroblastlar aktive edilir. Aktive olan lokal fibroblastlar hücre bölünmesi için protein sentezini artırır. Çoğalan fibroblastlar enfekte olmayan yarada 3-5. günlerde dominant hücre olur. Hücre bölünmesi ve çoğalması sonrasında fibroblastlar ECM ürünlerinin sentezine ve salgılanmasına başlar. Başlangıçtaki fibrin matriks yıkılarak yerini fibroblast migrasyonunu sağlayan fibronektin ve hyalurandan oluşan geçici matriks alır(14,18). ECM depozitlerinin fibroblastlar tarafından kontrolü kompleks olup kısmi olarak büyüme faktörleri ve ECM ile fibroblast hücre membran reseptörleri arasındaki etkileşim ile kontrol edilmektedir(18).

İntegrinler onarım sırasında hücre görevlerinin düzenleyicisidir ve bunlar transmembran reseptörleridir. Büyüme faktörleri, kollajen, elastin ve diğer ECM komponentleri integrin ligandlarıdır. Ligandlar bağlandıktan sonra integrin reseptörünün stoplazmik domaininde fosforilasyon başlar ve gen ekspresyonunu değiştiren sinyal iletim kaskadını tetikler(18).Fibronektin, glikozaminoglikan ve hyaluronik asid başlangıç matriksi oluşturur(14,18). Hyaluronik asid yüksek su hidrasyon kapasitesi nedeniyle matrikse hücre göçünü sağlar. Fibronektin, laminin ve tenaksin gibi adezyon glikoproteinleri erken matrikste yer alır ve hücre tutunmasını ve göçünü sağlar. Hücrelerin yüzeylerindeki integrinler matriksteki glikozaminoglikanlar ve glikoproteinleri bağlar. Yara yerine gelen ve çoğalan fibroblastların salgıladığı hyaluronidaz geçici olarak oluşturulan ve hyaluronik asitten zengin matriksi sindirir ve depolanan glikozaminoglikanları sülfatlar. Eş zamanlı olarak yeni kollajen fibroblastlar tarafından fibronektin ve glikozaminoglikandan oluşan iskelete dezorganize şekilde yerleştirilir(18).



Şekil 2.4. Proliferasyon faz 5. gün

Yara skarının major yapısal komponenti kollajendir. Fibroblastlar kollajeni kompleks bir intrasellüler ve ekstrasellüler işlem ile sentezlemekte ve salgılamaktadır(18). Birçok kollajen fibroblastlar tarafından sentezlenirken bazı tipler keratinositler tarafından sentezlenmektedir. Ancak aynı karakteristik özelliklere sahiptirler(18).

Cilt ve skar dokusunda ECM'i oluşturan major kollajen tipleri tip I ve tip III'tür(14). Tip I kollajenin tip III kollajene oranı hem deride hem de yara skarında 4:1 dir. Ancak yarada başlangıçta depolanan kollajen büyük miktarda tip III'tür.

Granülasyon:

Granülasyon dokusu gevşek olan fibronektin, hyaluronik asid ve kollajenden oluşan geçici matriksin içerdiği yoğun kan damarları, makrofajlar ve fibroblastlardan oluşmaktadır(14,18). Klinik olarak açık yaralarda taze et görünümündedir. Bu görünüm endotelial hücrelerin bölünmesi ve göçü ile yeni oluşan zengin kapiller ağın sonucudur(18).

Yara alanında kalan endotelial hücreler FGF, VEGF, PDGF, anjiojenin, TFG- α ve TGF- β gibi anjiojenik faktörlerin salınımından sorumludur. Bu faktörler ile anjiostatin ve steroid gibi inhibitör faktör arasında bir denge mevcuttur(14). İnhibitör ve stimulator ajanlar proliferen olan endotelial hücreler üzerinde direk veya

indirek olarak mitozu aktifleyerek hareketlerini sağlar ve etraftaki hücrelerden endotelial büyüme faktörlerin salınımını uyarır(14).

Yara merkezinin başlangıçta vasküler kaynağı yoktur ve hipoksik bir ortam mevcuttur. Hipoksik şartlarda etraf dokulardan salınan moleküller endotelial hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini sağlar. Yara iyileşmesi sırasında vasküler endotelial hücrelerin büyümesi direk olarak trombositler tarafından uyarılır, makrofaj ve fibroblast ürünleri tarafından aktive edilir. Birkaç gün içerisinde yara kenarından oluşan pıhtıya doğru kapiller tomurcuklanma başlar ve yeni oluşan kapilleri içeren mikrovasküler ağ oluşur(14).

Kontraksiyon:

Kontraksiyon yara etrafındaki yaranın dairesel olarak yaraya doğru çekilmesidir. Yara kontraksiyonu yeni doku formasyonu olmadan yara boyutunu dramatik olarak azaltmaktadır. Kontraksiyonun miktarı hem cildin esnekliğine hem de yaranın boyutuna göre değişmektedir. Kontraksiyonu sağlayan hücresel mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Kontraktil güçleri stoplazmalarında düz kas α -aktin ve mikrofilament içeren fibroblast benzeri hücreler olan myofibroblastlar tarafından yönetilmektedir(14,18). Bu hücreler matriks içerisinde hareketleri veya intrinsik hücresel güçler yardımı ile etraftaki cildi yaraya doğru çektığı düşünülmektedir(18).

Epitelizasyon:

Yaralanmadan saatler sonrasında yara kenarında varolan keratinositlerde morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir(14,18). Epidermal hücre tabakası kalınlaşır ve kenardaki bazal hücreler yara defektine doğru göç eder. Göç etmeye başlayan keratinositler epidermal devamlılık sağlanana kadar bölünmezler. Yaranın kapatılması için kullanılan epitelyal hücreler yara kenarında sabit olan bazal hücrelerden sağlanır. Bunların genç hücreleri yassılaştırmıştır ve yara matriksinin üzerine doğru tabaka şeklinde göç eder. Yara matrixi üzerine doğru göç eden keratinositlere tenaskin ve fibronektin gibi adezyon glikoproteinleri yol gösterir. Epitelyal tabakanın yeniden yapılması sonrasında keratinositler ve fibroblastlar bazal membrandan laminin ve tip IV kollajen salgılar. Keratinositler kolumnar hale gelir ve epitelyum tabakasını yapmak üzere bölünürler(18).

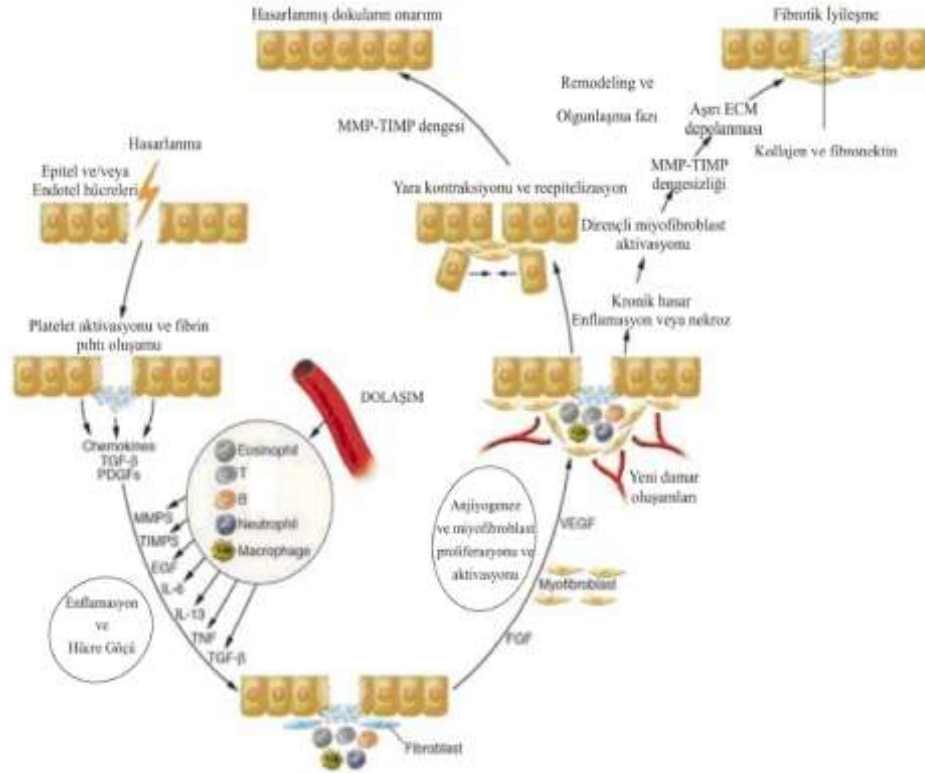
2.1.3. Remodeling fazı(21gün-1 yıl)

ECM yaralanmış veya yaralanmamış ciltte hücresele desteği sağlayan önemli iskelet yapı olması nedeniyle yaralanma sonrasında da mutlaka onarılmalıdır. ECM sentezi proliferasyon fazında granülasyon formasyonu ile başlar ve remodeling fazında devam eder(14,18). ECM dinamik bir yapı olup onarım sürecinde sentez, depolama ve yıkımdan oluşur ve sıkı bir kontrol mekanizması altında gelişir(18). Lizil oksidaz major intermoleküler kollajen çapraz bağ enzimidir. Kollajenin çapraz bağlanması yıkımını azaltmaktadır ve yaranın gerim kuvvetini artırır. Kollajenaz, jelatinaz ve stromelizin matriks metalloproteinazlardandır ve ECM komponentlerini yıkar. Kollajen depolanması ve yıkımı belli bir dengede olur ve matriks metalloproteinazların aktivitesi ile düzenlenir. Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri ise spesifik olarak matriks metalloproteinazları inaktive eder(14,18).

Skar formasyonu yara onarımının kaçınılmaz bir sonucudur. Skarların epidermal ekleri yoktur ve kollajen yapısı yaralanmamış ciltten tamamen farklıdır. Fibroblastlar tarafından salgılanan yeni kollajenler en erken yaralanmadan 3 gün sonra görülür. Kollajen matriks oluştuğunda yoğun şekilde bir araya gelen fibriller yara alanını doldurur. Skarın yeniden yapılanma fazı yıllarca devam edebilmektedir. Erken dönemde skar dokusu yoğun kapiller ağ nedeniyle kırmızı görünümündedir. Kapanma tamamen gerçekleştiğinde kapiller ağ regresyona uğrar. Tam maturasyon sonrasında skarlarda hipopigmentasyon görülür(18).

Yeniden yapılanma döneminde yaralar zaman içinde daha güçlü hale gelir. Yara gerim kuvveti kollajenin lizil oksidaz ile çapraz bağlanması ile 1-8 haftada hızlı bir şekilde artar. Ancak yara gerim kuvveti yaralanmamış cildin maksimum %80 ine ulaşır(18).

Yara iyileştikten sonra fibroblast ve makrofajlar apoptoz ile azaltılır. Zaman içinde kapiller büyüme durur, yara alanına kan akımı ve yaranın metabolik aktivitesi azalır. Sonuç olarak yüksek yara gerimine sahip tamamen olgun bir skar oluşur.



Şekil 2.5. Yara iyileşmesinin sonuçları(39): Doku rejenerasyonu veya fibrozis.

2.2. Hipertrofik Skar Tanımı

Hipertrofik skar(HTS) fibroproliferatif bozuklukların dermal formu olarak kabul edilir(7). Genellikle travma veya yanık nedeniyle oluşan derin dermis hasarında görülür(7). Klinik olarak kaşıntılı, kabarık, ağrılı ve sert skarlardır. Keloidlerin aksine yarananma alanı ile sınırlıdır. Yara iyileşmesinin istenmeyen sonuçlarından olup kötü estetik görünüm yanında etkilenen eklem ve uzuvlarda hareket kısıtlılığına neden olmaktadır. Bu hastaların fiziksel ve psikolojik durumlarını olumsuz etkilemekte ve yaşam kalitelerinin düşmesine neden olmaktadır(7).

Mekanizmasının hala anlaşılammış olması nedeniyle plastik cerrahinin major problemlerinden biri olmaya devam etmektedir. Malign bir tümör olmamasına rağmen fibroblastların aşırı proliferasyonu, apoptoza direçli olmaları ve atipik farklılaşması ile malign karaktere sahiptir(19).

2.2.1 Hipertrofik Skar Patofizyolojisi

Yara iyileşmesi yukarıda bahsedildiği üzere 3 evreden oluşmakta; hemostazis, inflamasyon, proliferasyon ve doku remodeling. Bu 3 evre büyüme faktörleri, proteolitik enzimler, hücre dışı matriks proteinleri gibi profibrotik ve antifibrotik moleküller ile iç içe geçmiş kompleksten oluşur(7). Her molekül yara iyileşmesinin farklı dönemlerinde kendi görevini yerine getirir. HTS, hasara karşı gelişen inflamatuvar cevabın uzadığı durumlarda oluşmaktadır. Uzamış inflamatuvar cevap vaskülarizasyon artışı, hipersellülarite ve aşırı kollajen depolanması ile sonuçlanır(7).

Fibroblastlarda meydana gelen değişiklikler:

Fibroblastlar bağ dokuda görülen en sık hücrelerdir ve yara iyileşmesinin anahtar elementleridir(21). Fibroblastların temel görevi bağ dokunun fiziksel bağlantılarının devamlılığını sağlamak ve yara kapatılmasında ekstrasellüler matriks(ECM)'in üretim ve yeniden yapılandırılmasında rol alır(7). Ancak HTS yer alan fibroblastlar farklı davranmaktadır. HTS' da izlenen fibroblastlarda normal fibroblastlardan daha yüksek TGF- β 1 salınımı görülmüştür(20). Artmış ve uzamış TGF- β 1 aktivitesi fibroblastlardan aşırı kollajen üretimi ve depolanmasına neden olur ve genellikle HTS oluşumu ile sonuçlanır(7,21)). HTS fibroblastlarında kollajenaz mRNA' sınının azaldığı gösterilmiş ve normal fibroblastlar ile karşılaştırıldığında çözünebilir kollajenin yıkımında da belirgin bir azalma mevcuttur. HTS fibroblastlarında yara iyileşmesini antiproliferatif ve antimikrobial etkileri ile kollajenaz aktivitesini düzenleyen büyüme faktör sinyalizasyonunda önemli bir mediatör olan nitrik oksit sentezinin de azaldığı bulunmuştur(7).

TGF- β 1 myofibroblastlarda α - düz kas aktin (α -SMA) salınımını uyararak myofibroblastların farklılaşması için güçlü bir uyarıcı olarak rol alır. HTS fibroblastlarının myofibroblastlara farklılaşması artmış ECM sentezi ve doku kontraksiyonunun nedeni olabilir(22). Myofibroblastlar (α -SMA) ekspresyonu ile fibroblastlardan farklı fenotipe sahiptir. HTS myofibroblastları apoptotik sinyallere daha az duyarlıdır, bununla birlikte fibroblastlardan daha fazla kollajen üretmeleri ve daha az kollajenaz üretmeleri HTS oluşumunda önemli rol oynaktadır(5,7,22).

Matriks Metalloproteinaz-1,2,9(MMP-1,2,9) ve Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri(TIMPs)nin HTS' daki Rolü

MMP'ler çinko bağımlı proteinazlardır ve dokunun remodeling fazındaki önemli görevleri ile bilinirler. En az 23 tipi mevcut olup en karakteristik görevleri kollajenin proteolitik yıkımı ve diğer ECM elementlerinin yıkımıdır(23). TIMP' ler ise MMP'lerin görevini düzenleyen spesifik proteinlerdir ve MMP' lerin aktivitesini bloklamak için 4 tane spesifik tipi mevcuttur(7,23). Normal hücrelerde MMP'lerin ekspresyon düzeyleri düşüktür ve sağlıklı bağ doku yapımını sağlar. Salınımlarındaki herhangi bir dengesizlik dermal fibrozis, tümör invazyonu ve metastaz gibi patolojik sonuçlara neden olur(5).

MMP' ler ve TIMP' lerin birçok tipinin HTS gelişmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda MMP-1 ekspresyonunun HTS' da azaldığı ve önemli bir transkripsiyonel değişime uğradığı gösterilmiştir(7). Atimik nude farelerde oluşturulan skarsız iyileşme modelinde ise MMP-9 up-regüle olduğu gösterilmiştir(24). Benzer şekilde skarsız fetal rat yara iyileşmesinde MMP-1 ve MMP-9 ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir. İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise MMP-9 skarsız iyileşmede rol alabileceği bulunmuştur(25).

HTS fibroblastlarına Smad interacting protein 1(SIP1) transfekte edilmesi sonucu MMP-1 ekspresyonunun artarken kollajen tip 1 α 2 (COL1A2) düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Aynı şekilde normal fibroblastlarda SIP1, knockout farelerde ise TGF- β 1 indüklemesi ile COL1A2 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar SIP1 in cilt fibrozisinin düzenleyicisi olabileceğini düşündürmektedir. HTS da SIP1 eksikliği COL1A2 nin artışına ve MMP-1 in azalmasına neden olarak aşırı ECM birikimine ve dolayısıyla HTS oluşumuna yol açmaktadır(7).

HTS' da MMP-2 düzeyleri artarken, MMP-9 ve MMP -1 düzeyleri azalmıştır(7,20). MMP-2'nin major etkisi matriks onarımının geç döneminde denature kollajenin yıkımı ile, MMP-9'unki ise erken dönemde tip IV-V kollajen, elastin ve fibronektinin yıkımı ile ortaya çıktığı düşünülmektedir(5,20).

Yaralanmanın Derinliği ve HTS

Yaralanmanın derinliği HTS formasyonu için önemlidir ve klinik öneme sahiptir(7). Yüzeysel yaralar genellikle 2 haftada HTS formasyonu oluşmadan

iyileşirken, derin yaralar HTS oluşturma eğilimindedir(7,21). Bu da derin dermal fibroblastların HTS oluşumundan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Derin ve yüzeysel dermal fibroblastlar papiller ve retiküler tabakalar ile ayrılmıştır. Derin dermal fibroblastlar yüzeysel olanlardan daha çok kollajen üretmektedir, yavaş çoğalmaktadır ve daha az kollajenaz üretmektedir(26). Ayrıca derin dermal fibroblastlar daha fazla α -SMA üretmektedirler. İlâveten derin dermal fibroblastlarda HTS fibroblastlarında görülen 2 anahtar profibrotik sitokin olan TGF- β ve Connective tissue growth factor(CTGF/CCN2)) düzeylerinde de artış izlenmiştir(21). Bu bulgular derin dermal fibroblastların HTS fibroblastlar ile benzer biyolojik özellikler gösterdiğini ve yüzeysel fibroblastlardan farklı olduğunu düşündürmektedir(7).

TGF- β İzofomları ve HTS

TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF - β 3 olmak üzere 3 izoformu vardır ve her üç tipi de ayrı ayrı yara iyileşmesinde özel görevlere sahiptir. TGF- β 1 ve TGF- β 2 degranüle olan trombositlerden, monosit ve makrofajlardan salınırken TGF - β 3 keratinositlerden salınmaktadır(7). Normal dokuda TFG - β izoformları latent formda bulunurlar ve latent TFG - β 1 bağlayıcı protein (LTBP)e bağlıdır(7). Yara iyileşmesi sırasında anjiogenez için uyarılar, fibroblastların çoğalması, myofibroblastların diferansasyonu ve kollajen gibi ECM depozitlerin sentezi TFG - β nın yara iyileşmesine katılmasını sağlar. Yapılan çalışmalar TFG - β nın pulmoner fibrozis, skleroderma ve HTS gibi fibrotik olaylarda önemli rol aldığını göstermiştir. HTS gelişen yanık hastalarında TFG - β 'nın serum düzeylerinin hem lokal hem de sistemik olarak arttığı görülmüştür(7).

Yapılan çalışmalar TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin HTS oluşumunu indüklediği, TGF- β 3'ün ise skarlaşmayı inhibe ettiği yönündedir. Bu nedenle TGF- β 3'ün diğer TGF- β izoformlarının antagonisti olabileceği düşünülmektedir(7). Yakın zamanlarda Leonard Lu ve arkadaşlarının her üç TGF- β isoformlarının antikorlarını tavşan kulağında oluşturulan yara yerinin tedavisinde kullanımı ile yapmış oldukları çalışmada bu üç izoformun yara iyileşmesi üzerinde farklı zamanlarda farklı etkilerinin olduğunu göstermiştir. Erken dönemde yara iyileşmesinin gecikmesine sebep olurken orta ve geç dönemlerde HTS oluşumunda belirgin azalma sağlamışlardır.

TGF- β 1 fibroblastlarda TIMP' leri uyararak MMP' lerin aktivitesini azaltır. Bu yolla MMP'ler tarafından ECM yıkımı engellenmiş olmaktadır. TGF- β 1' in fibroblastlar aracılığı ile ECM depolanması sonucu HTS oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir.

TFG $-\beta$ 1'in anormal intrasellüler sinyalizasyonunun fibroblastların aşırı ECM sentezini indükleyerek ve CCN2 regülasyonu ile HTS başlattığı düşünülmektedir. CCN2 bağ doku büyüme faktörü olarak bilinmektedir ve hücre çoğalması, adezyonu, göçü ve ECM üretimi gibi önemli hücrel olaylarda yer alır(29).

Th1, Th2 ve Th3 Sistemik Cevabı ve HTS

Hipertrofik skarın, yara iyileşme sürecinde inflamasyon ile immun cevap arasındaki komplike ilişkiden kaynaklandığı düşünülmektedir(7). Son zamanlarda yapılan çalışmalar da fibrozis miktarının inflamasyonun şiddeti ile ilişkili olmadığı görülmüştür(20). Yara yerine erken dönemde T lenfositlerin özellikle de CD4 T-lenfositlerin gelmesi dikkati bunların üzerine çekmiştir. HTS dokusunda CD4+ T lenfositler predominat olup CD8+ T lenfositler daha az izlenmektedir(27). Antijen sunan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından aktive edilen CD4+ T lenfositler Th1, Th2, Th3, Th17 ve T düzenleyici hücre olmak üzere 5 alt tipe diferansiye olur(7). Th1 hücreleri IL-2, IFN- γ ve IL -12 ekspresyonu yaparken Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5 ve IL-10 ekspresyonu yapar. Th1 sitokinleri, anti-fibrotik olan kollajenaz aktivitesinde artış ve matriks yapılanmasında rol alırken Th 2 sitokinleri, ise profibrotik olarak bilinir(20). IL-4 ün fibrozisi yönetmede, TGF- β 'dan 2 kat daha etkilidir. Ancak Th1 CD4 hücrelerden salınan IFN- γ ve IL-12 doku fibrozisini tamamen zayıflatacak etkiye sahiptir(20).

Th1 aracılı anti-fibrotik etkilerin akut faz reaksiyonu ve pro-apoptotik genlerin ekspresyonunun bu T hücrelerinden yapıldığını göstermiştir. İlaveten Th1 sitokinleri kollajenaz aktivitesini ve matriks remodelingi artıran nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonunu aktive etmektedir(20). Hipertrofik skar veya keloid fibroblastlarında kollajenaz aktivitesinde ve bununla birlikte NOS üretiminde de azalma görülmektedir. Buna karşılık Th2 bağımlı genler, prokollajen -1,3 ve 5, arjinaz-1, lizil oksidaz, matriks metalloproteinaz-2(MMP-2), MMP-9 ve matriks

metalloproteinaz doku inhibitörü-1(TIMP1) dir. Arjinaz-1 üretiminin hücre bölünmesi ve kollajen sentezi için gerekli olan poliamin ve prolin üretimini tetiklediğine inanılmaktadır(20).

Myofibroblastların Alternatif Prekürsörleri Fibrositler ve HTS

Fibrositler kemik iliğinden köken alır ve periferik kan hücrelerinin %0.1 - 0.5'ini oluştururlar. Periferik kanda bulunan fibrositler hızlıca yaralanma alanına gelir ve ECM yapımı, antijen sunumu, sitokin üretimi, anjiogenezis ve yara kapatılması gibi birçok alanda görev alır. Yara iyileşmesi sırasında TGF- β 1 fibrositlerin myofibroblastlara dönüşmesi için Smad2/3 ve JNK MAPK yollarını aktive eder(7).

Matur skar dokusuna göre HTS'da fibrosit sayısı daha fazla olmakla birlikte fibrosit ve lökositlerde bulunan özel bir yüzey belirleyicisi olan lökosit spesifik protein-1(LSP-1) izole edilmiştir. Bu yüzey belirleyici lökosit kemotaksisinde önemli rol oynamakta olup normal fibroblastlarda yoktur. LSP-1 defisitli farelerde yapılan eksizyonel yaraların fibrosit infiltrasyonunda artışı ile yara iyileşmesinin hızlandığı ve aynı zamanda TGF- β 'nin arttığı izlenmiştir(7).

Kemokinler ve HTS

Kemokinler küçük proteinler olup, yaralanma alanındaki hücrelerin kemotaksisini indüklerler. CC, CXC, C ve CX₃C olmak üzere 4 tipe ayrılır. CXC grubuna ait olan ve CXCL12 olarak bilinen SDF-1 insanlar, domuz ve rat cildinde eksprese edilmektedir ve perisitler, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından üretilmektedir(7). CXCR4 CXC kemokin reseptörü olup özellikle olarak stromal-cell derivate factor-1 (SDF-1)'i bağlamaktadır. SDF-1/CXCR4 sinyal yolağı hemopoetik hücrelerin fetal karaciğerinden kemik iliğine göçünü sağlar. Aynı zamanda anjiogenezisi uyararak progenitör hücreleri ortamda tutar. SDF-1/CXCR4 sinyal yolağı ile ilgili çalışmalar bu sinyalizasyonun akciğer hasarı ve fibrozis patogenezinde rol aldığı göstermiştir. Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmalarda bu sinyalizasyon yolağının aktive olmuş CD14⁺ CXCR4⁺ hücrelerin hasarlı dokuya göçünü uyararak HTS patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir. Bu göç eden hücrelerin fibrosit ve myofibroblastlara dönüşerek HTS patogenezi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir(28).

HTS formasyonu ile ilişkili olabileceği düşünölen diğer bir kemokin ise monosit kemotaktik protein- 1(MCP-1)'dir. CC kemokin ailesine aittir ve CCR2 ve CCR4 olmak üzere 2 reseptörü mevcuttur. Makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından salgılanır ve inflamatuvar alana monositleri ve dendiritik hücreleri çeker. Yapılan deneysel çalışmalarda MCP-1'in fibrozis ile ilişkili olduğu bulunmuştur ve HTS fibroblastlarındaki ekspresyonu normal fibroblastlardakine göre belirgin artmış olduğu izlenmiştir(7).

Dekörin ve HTS

Dekörin küçük bir proteoglikan olup dermal ECM'de yaygın olarak bulunmaktadır. Kollajen fibril, fiber ve fiber-dal organizasyonunu düzenler. HTS'da %75 azalmış olarak bulunmaktadır. TGF- β 'ya bağlanma ve onu nötralize etme eğiliminde olup bu sitokinin kollajen, fibronektin ve glikozaminglikanların üretimi üzerindeki etkilerini minimize etmektedir. HTS'daki düşük düzeyleri kollajen organizasyonundaki düzensizlik ve artmış ECM üretimi ile ilişkilendirilmiştir(5,7).

Apoptoz ve HTS oluşumu

Erken immatur HTS hipersellöler olup olgunlaşmaya başladıkça apoptozun indüklenmesi ile fibroblast hücre yoğunluğu azalarak normal cilde benzer. Normal yara iyileşmesinde myofibroblastların apoptozu 12. günde başalar ve 20. günde pik yapar. HTS ve keloid formasyonunda ise fibroblast ve myofibroblastlarda apoptoz görülmemektedir(5).

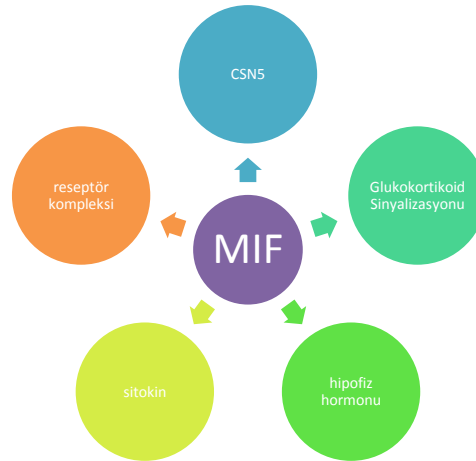
Aşırı skarlaşmada, apoptozun inhibitörü olan p53'ün odaksal artışı izlenmiştir. Yara iyileşmesinin erken proliferasyon fazında p53 aracılı apoptozun inhibisyonu ile oluşan mekanik yük HTS'a yol açmaktadır(22). İlaveten ölüm ligandı olan Fas' ın HTS ve HTS fibroblastlarında azaldığı; apoptozu önleyen Bcl-2 proto-onkogenin ise yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir.

2.3. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör Tanımı

Makrofaj inhibitör faktör(MIF) ilk kez 1966 yılında keşfedilmiş olup bu dönemde T lenfosit kaynaklı immun aktiviteye sahip ve makrofajların rastgele migrasyonunu önleyen bir sitokin olarak tanımlanmıştır(30,31). Yıllar içerisinde MIF aktivitesinin makrofajların fagositozu ve gecikmiş tip hipersensivite ile ilişkili olduğu bulunmuştur(9). Ancak daha sonraki yıllarda moleküler yapısı izole

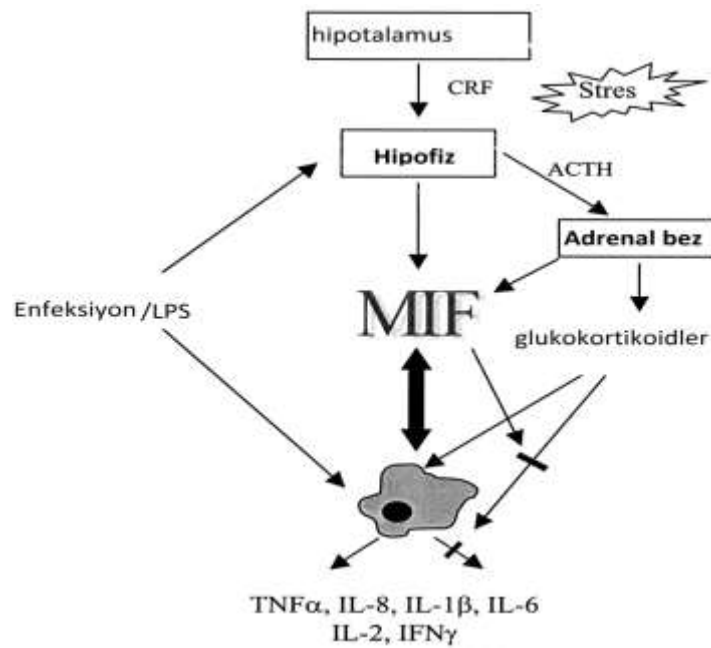
edilemediği için MIF hakkında yeterli araştırma yapılamamış ve yaklaşık 3 dekat boyunca herhangi bir gelişme olmamıştır(9). 1989 ise insan MIF cDNA'sı izole edilmiş, günümüzde ise MIF klonlanmış ve gelişen yöntemler ile moleküler yapısı iyi bir şekilde karakterize edilmiştir(31). Bu gelişmeler ışığında MIF'in basit bir sitokin olmadığı; birçok hastalığın patogenezinde rol alan pleiotropik bir molekül olarak yeniden tanımlanmıştır(şekil2)(9,10). Proinflamatuvar bir sitokin olması yanında endotoksemiye şiddetlendiren hipofiz kaynaklı bir hormon olduğu bulunmuştur ve deri, beyin, böbrekler gibi birçok organda özellikle olarak eksprese edilmektedir(32).

MIF' i diğer sitokinlerden ayıran önemli birkaç özelliği bulunmaktadır(9). Bunlardan biri tautomerase ve oksidoredüktaz aktivitesi gibi tanımlanmış en az iki katalitik aktivitesinin olmasıdır(9). Buna göre MIF enzimatik özellikleri olan sitokin veya sitozom olarak isimlendirilmektedir ve enzim salgılamaktadır. İlaveten hem immun hem de non-immun hücreler dahil olmak üzere çeşitli periferik hücrelerde özellikle olarak eksprese edilmektedir(9). En önemli görevleri arasında; makrofaj fonksiyonlarının düzenlenmesi, lenfosit immunitesi ve endokrin görevleri yer almaktadır. Ekspresyon profili açısından da diğer sitokinlerden ayrılmaktadır. Sitokinler uyarı sonrasında salınmakta iken, MIF çeşitli immun ve non-immun hücrelerde eksprese edilmektedir ve doku dağılımı kendine özgüdür. Bu nedenle dolaşımında bulunan MIF' in hücre içi depolardan kaynaklandığı düşünülmektedir(9).



Şekil 2.6. Makrofaj migrasyon inhibitor faktör(MIF) multifonksiyonel bir moleküldür.

Glukokortikoidlerin immünsüpresif ve anti-inflamatuar aktivitesinin tek zıt düzenleyicisi olan MIF ön hipofiz bezinde kortikotrop hücreler içinde bulunmaktadır ve kortikotropin release hormon(CRH) uyarısı ile salınmaktadır(13,31). Aynı şekilde CRH uyarısı ile salınan ACTH ise glukokortikoidlerin salınımını tetiklemektedir(Şekil 7). Glukokortikoidler ise çok düşük konsantrasyonlarda makrofajlardan MIF salınımını uyarmaktadır(31). Proinflamatuvar stokin olan MIF'in anti-inflamatuar özellikteki glukokortikoidlerin uyarısı ile salınması ve onun etkilerini inhibe etmesi ile glukokortikoidlerin tek zıt düzenleyicisi olarak tanımlanır.



Şekil 2.7. MIF ve glukokortikoid ilişkisi

Geniş düzenleyici özelliklerinden dolayı septik şok, gecikmiş tip hipersensivite, ateroskleroz, romatoid artrit, sistemik lupus eritamatozis, inflamatuvar akciğer hastalığı ve kanser gibi birçok immün ve inflamatuvar hastalıklarda önemli bir mediatör olarak görev yapmaktadır. Bunların haricinde glomerulonefrit, astım, neonatal respiratuvar distress sendromu, depresif semptomlar gibi daha birçok hastalığın patogenezi de etkilemektedir(9).

2.3.1. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör Etki Mekanizması

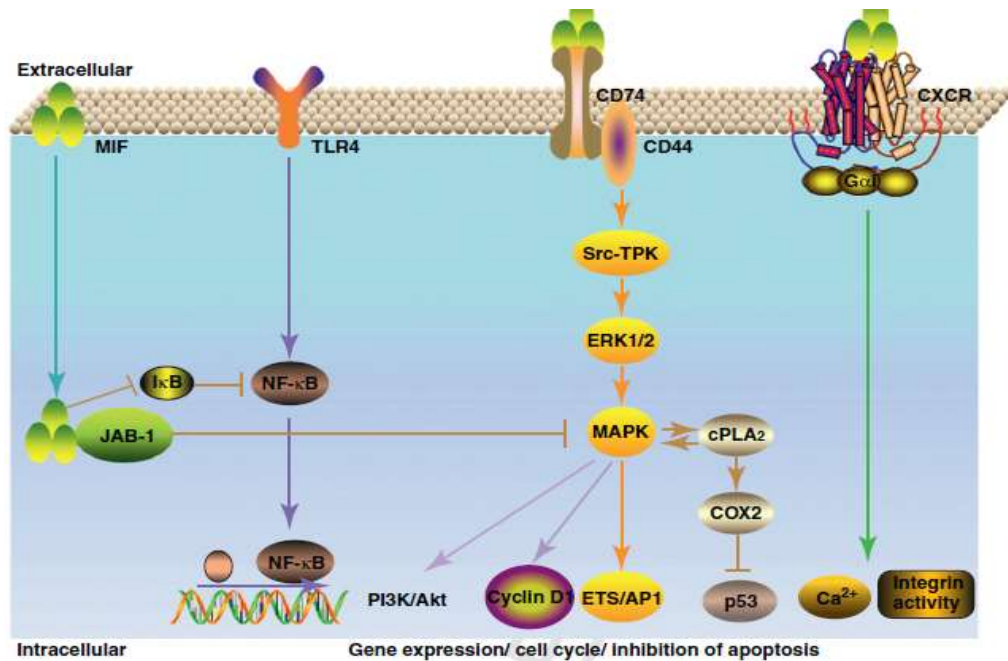
Biyolojik görevleri hakkında geniş bilgiye sahip olunmakla birlikte MIF in etki mekanizması hakkında yeterli bilgiye henüz ulaşılammıştır. Normalde sitokinler hedef hücre membranında bulunan reseptör aracılığı ile sinyal iletimini ve etkilerini gerçekleştirirler(9). Ancak MIF için böyle bir spesifik reseptör henüz bulunamamıştır. MIF tarafından oluşturulan pleotropik biyolojik ve katalitik aktivitelerin kompleks sinyal iletim mekanizması ile ilgili olduğu düşünülmektedir(33).

MIF' e bağlı olayların hücreSEL ERK aktivasyonu ve JAB-1(c-Jun aktivatin domain binding protein) aracılığı ile geliştiği düşünölmekle birlikte, primer sinyal iletim mekanizmasının bir transmembran protein aracılığı ile mi, yoksa hücre zarından direk sinyal iletim mekanizması ile olduğu bilinmemektedir(31). Muhtemel sinyal iletimi MIF 'in CD74 e bağlanarak reseptör bağımlı MAPK' ı aktive etmesi ile meydana gelmektedir. Son yapılan çalışmalarda transmembran protein olan CD44'ün MIF-CD74 kompleksinin sinyal iletiminde güçlü bir aksesuar protein olarak gerekliliği ortaya konmuştur. MIF-CD74-CD44 kompleksinin oluşumu MAPK ailesinden olan ERK1/ERK2 i aktive etmektedir. MIF, ERK1-ERK2-MAPK yolağını geçici ve kalıcı fosforilasyonunu ve aktivasyonu uyarır. Aktive olmuş ERK1/2 sitozolik proteinlerin ve proinflamatuvar kaskadın önemli bir komponenti olan sitozoplamik fosfolipaz A2 (cPLA2) nin fosforilasyonunu sağlar. cPLA2 nin ürünü olan araşidonik asid(AA) ise prostoglandin ve lökotrienlerin prekürsörüdür. Ayrıca AA TNF- α ve diğer sitokinlerin mRNA translasyonunu sağlayan JUN N-terminal kinazı(JNK) aktive eder(33).

CXCR2 ve CD74 etkileşimi MIF sinyal iletiminin fonksiyonel CXCR-CD74 kompleksi ile de ilişkili olduğunu gösterir. Bu sinyalizasyon kalsiyum akışı, MAPK aktivasyonu veya G_{α} - bağımlı integrin aktivasyonu gibi hücre içi olayları başlatır(33).

Kleemann ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada MIF'in *aktivatör protein-1* (AP-1) in transkripsiyonel aktivitesinden sorumlu genleri JAB-1 aracılığı ile direk etkilediği bulunmuştur. AP-1 Fos ve Jun onkoproteinler ile birlikte DNA yı bağlayan transkripsiyon faktörüdür. JAB-1 AP-1 bağlanma noktalarına bağlanarak AP-1-c-jun kompleksini stabilize eder. Ayrıca hücre bölünme döngüsünde rol alan

protein p27^{kip1} e bağlanır ve parçalanmasını sağlar(30). MIF'in JAB-1 e bağlanması p27^{kip1} in parçalanmasının azalması ile sonuçlanır. MIF'in aşırı ekspresyonu ise fibroblastlarda JAB-1' in büyüme hızlandırıcı özelliklerini inhibe eder. AP-1'in bazı proinflamatuvar genlerin en önemli düzenleyicisi olması MIF' in proinflamatuvar özelliğini tartışmaya açılmasını sağlayan ilk verilerdir. Benzer şekilde başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise MIF'in hücre büyümesini tetikleyici etkisinin bulunması MIF'in etki mekanizmasındaki tartışmalara neden olmaktadır. MIF'in çan eğrisi şeklinde doz bağımlı etkisi onun karakteristik özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir. Düşük seviyesi ile yüksek seviyesi arasında düzenleyici etkisi bakımından belirgin fark vardır(30). Bucala'nın yapmış olduğu çalışmada yüksek MIF konsantrasyonlarda MIF'in tipik enzimatik etkisi ve makrofajlardan TNF ve NO salınımını direk uyararak reseptör aracılı olmayan JAB-1- MIF sinyalizasyonu ile ilişkili olduğunu; düşük konsantrasyonlarda ise reseptör aracılı sinyalizasyonu kullandığını iddia etmiştir(9). İlâveten MIF NO-indüklü p53 ün intrasellüler akümülyasyonu süprese eder ve bu da p53 aracılı apoptozis inhibisyonu ile sonuçlanır. p53 ü inhibe etmek için MIF in ERK1/2,PLA2, siklooksijenaz 2(COX2) ve PGE2 nin seri aktivasyonuna ihtiyaç duyar(33).



Şekil 2.8. MIF sinyal iletim yolları

2.3.2 Yara İyileşmesi ve MIF

MIF gelişmekte olan ve erişkin cildinde güçlü bir şekilde eksprese edilmekte olup gelişim sürecinde ve homeostazide rol aldığı düşünülmektedir. Ekspresyonu geç embriyonik dönemde ilk olarak epidermis ve kıl folliküllerinde daha sonra kıl folliküllerinin epitelyal kılıf hücrelerinde başlar(34). MIF'in embriyolojik dönemde eksprese edilmeye başlanmasının tesadüf olmadığı, cilt bariyerinin oluşumda kritik bir role sahip ve skarsız iyileşmeden kusurlu cilt onarımına geçişte bir belirleyici olduğu düşünülmektedir(34).

İnsan cildinde MIF dermal vasküler ağın endotel hücrelerinde, melanositlerde, epidermiste, proksimal tırnak matriksinde, ekrin ter hücreleri ve sebaceos bezlerde lokalizedir. Epidermiste özellikle keratinositlerde eksprese edilmekte olup diğer sitokinlerin üretimini uyarmaktadır(34).

MIF, kutanöz yara iyileşmesi sırasında güçlü şekilde uyarılır ve eksprese edilir. İnsanlarda MIF, iyileşmenin erken döneminde inflamatuvar hücreler tarafından eksprese edilir ve hemen sonrasında fibroblastlar tarafından MIF seviyesi artırılır. Yara yerinden köken alan fibroblastlar normal fibroblastlara göre LPS'ye cevap olarak daha fazla miktarda MIF salgılar(11,34). TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ gibi stokinlerin ekspresyonunu etiklemesi, NO salınımı, MMP-2 ekspresyonu ve COX-2 yolaklarını aktive etmesi nedeniyle direk proinflamatuvar faktör olarak kabul edilmektedir(11). MIF'in zarar verici pro-inflamatuvar etkileri aşırı inflamasyon tabanlı patoloji sınıfı ile ilişkilendirilmektedir.

Trombin ve faktor Xa'nın insan dermal mikrovasküler endotel hücrelerinde MIF ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. Trombin benzer şekilde dermal fibroblastlarda MIF salgılanmasını indükler. Bu bilgiler MIF in trombin ve Fxa aracılığı ile inflamatuvar fazda rol oynadığını düşündürmektedir(34). İlâveten MIF ekspresyonunun spinal kord, akciğer, vasküler, kardiyak, renal, korneal hasarlarda lokal; travma ve yanık hastalarında ise sistemik artışı bildirilmiştir.

MIF'in doku onarımındaki bu yaygın ekspresyonuna rağmen yara iyileşmesindeki spesifik rolü hakkındaki tartışmalar devam etmektedir. Abe ve arkadaşları MIF'in iyileşme üzerine etkileri hakkında ilk bilgiyi sunanlardır. Yaptıkları çalışmada MIF'in keratinositlerin göçünü artırdığı ve gecikmiş yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir(11). Hemen sonrasında Zhao ve

arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada MIF knockout farelerde yara iyileşmesinin geciktiğini ve diyabetik yaralara MIF uygulandığında iyileşmesinin hızlandığını belirtmişlerdir(32). Bu bulgular birlikte ele alındığında MIF'in yara iyileşmesinde etkin rol aldığını düşündürmektedir. Ancak daha sonra yapılan bazı çalışmalarda MIF'in yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir. Genel bakış açısı ise MIF' in yara iyileşmesini, kontraksiyon, inflamatuvar cevap ve ECM homeostazisinde rol alan genlerin ekspresyonu ile yönettiği yönündedir(35).

2.4 . Hipertrofik Skarda Kullanılan Deneysel Modeller

HTS insanlarda dermal hasarı gösteren patolojik bir belirteçdir. HTS' a neden olan moleküler ve hücreyel olaylar detaylı şekilde çalışılmış olmasına rağmen patogenezi henüz tam anlayamamıştır ve etkin tedavisi güçtür. Bunun sebebi ise hipertrofik skar gelişimi zaman içerisinde yavaşça olmaktadır ve bu şekilde insan dokusunu sistematik olarak elde etmek zordur(36). Bu nedenle ideal bir hayvan modeli oluşturmak bu hastalığın patogenezi anlamaya yardımcı olacaktır. Ancak, insan dışında herhangi bir hayvanda hipertrofik skar gelişmediği için ideal bir model bulunmamaktadır ve istenilen araştırmalar yeterince yapılamamaktadır(37).

İdeal bir hayvan hipertrofik skar modeli insan hipertrofik skarı ile aynı klinik görünümde olması, histolojik, biyokimyasal, immunolojik, moleküler biyoloji açısından ve klinik davranış olarak örtüşmesi gerekir.

Ramos ve arkadaşlarının yapmış oldukları literatür taraması sonucunda günümüze kadar tanımlanmış olan hayvan modellerini 5 gruba ayırmışlardır(38):

- 1- Atimik fare veya rat gibi immunitesi olmayan hayvana heterolog hipertrofik skar ve keloid implant
- 2- Hamster yanak poşu: Heterolog keloid veya hipertrofik skarın bağışıklığın olmadığı alana implantı
- 3- Guinea pig: Kimyasal aracılı hasar ile hipertrofik skarlaşma veya keloid indüksiyonu
- 4- Tavşan kulağı: Özel anatomik bölgelerde hipertrofik skarlaşma veya keloid indüksiyonu

- 5- Domuz modelinde derin dermal yaralama ile hipertrofik skarlaşma veya keloid indüksiyonu

2.4.1. Heterolog Hipertrofik Skar ve Keloidin İmmunitesi Olmayan Hayvana İmplant

İnsan keloid dokusunun atimik fareye implantı yaklaşık 20 yıl önce tariflenmiştir. İmplant edilen greft(keloid dokusu)in 60 gün sonra hala yaşayabilirliğini koruduğu ve histolojik karakterini koruduğu gösterilmiştir. 1990 ların geç dönemlerinde aynı şekilde ratlarda bir model tanımlanmıştır. Bu modelde de implantasyondan 12 ay sonra histolojik özelliklerini korumasına rağmen prokollajen tip peptid 3 seviyelerinin sadece ilk 6 aydaki cerrahi örneklerle aynı olduğu bulunmuştur. 2004 yılında ise genetik olarak modifiye edilen cildi insanlaştırılmış fare modeli ortaya atılmıştır. Bu model biyomühendislik ile kültüre edilmiş cilt eşdeğerinin nude fare sırtına trasplantasyonu ve rejenerasyonu temeline bağlıdır. Son zamanlarda ise tam kalınlıklı insan cildinin nude farelerin sırtına implante edilmesi ile bir model oluşturulmuştur. 2006 yılında Yang Y.D. ve arkadaşları(48) tarafından tariflenen bu nude fare sırtında oluşturulan hipertrofik skar modeli daha sonra 2011 yılında Wang J.W ve arkadaşları, 2012 yılında Momtazi M. ve arkadaşları(36,37) tarafından moleküler ve histolojik incelemeleri içeren çalışmalar ile geliştirilmiştir. Bu modelde oluşan skarın makromorfolojik ve histolojik özellikleri insan hipertrofik skarı ile benzer olup ortalama 135 gün devam etmektedir.

2.4.2 Heterolog Keloid veya Hipertrofik Skarın Bağışıklığın Olmadığı Alana İmpantı

Hochman ve arkadaşları klinik olarak aktif olan insan keloid dokusunu hamsterların yanak bölgesindeki poşların subepitelyumuna implate etmişlerdir. Greftlerin 168 gün sonra vaskülarizasyonunu koruduğu görülmüştür. Histolojik incelemelerde vaskülarizasyon artışı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kollajen depozitlerinin görülmesi keloid ve HTS çalışmalarında model olarak kullanılabileceğini önermişlerdir(40). Bu model atimik fare modelinden daha kolay oluşturulabilir ve daha az maliyetli olarak değerlendirilmiştir(38).

2.4.3 Kimyasal Aracılı Hasar ile Hipertrofik Skarlaşma veya Keloid İndüksiyonu

Aksoy HM.(41) tarafından tariflenen bu modelde Guinea pigleri kullanılmıştır. I grupta cilt eksizyonu ile birlikte pannikülüs karnozus eksizyonu yapılmış ve cilt primer sütüre edilmiş. Post-op 3 hafta sonra bu insizyon hattından 2cm çapında cilt adası eksize edilerek sekonder iyileşmeye bırakılmıştır. 2. Grupta ise aynı cerrahi işlem uygulanmış ancak 3 hafta sonra cilt eksizyonu yapılmadan derin dermal yanık oluşturulmuştur. 3. grupta ise bir alandan daire şeklinde cilt adası çıkarılarak bu bölgeye 48 saat aralıklar ile kömür katranı sürülmüştür. Oluşturulan modellerin sadece son gruptaki 12 hayvanın 6 tanesinde hipertrofik skar oluşumu izlenmiştir(41). Kömür katranın toksik ve kanserojenik olması bu modelin dezavantajlarıdır. Modelin kabul görmesi için daha çok hipertrofik skar oluşturulması ve mortlitenin azaltılması önerilmiştir.

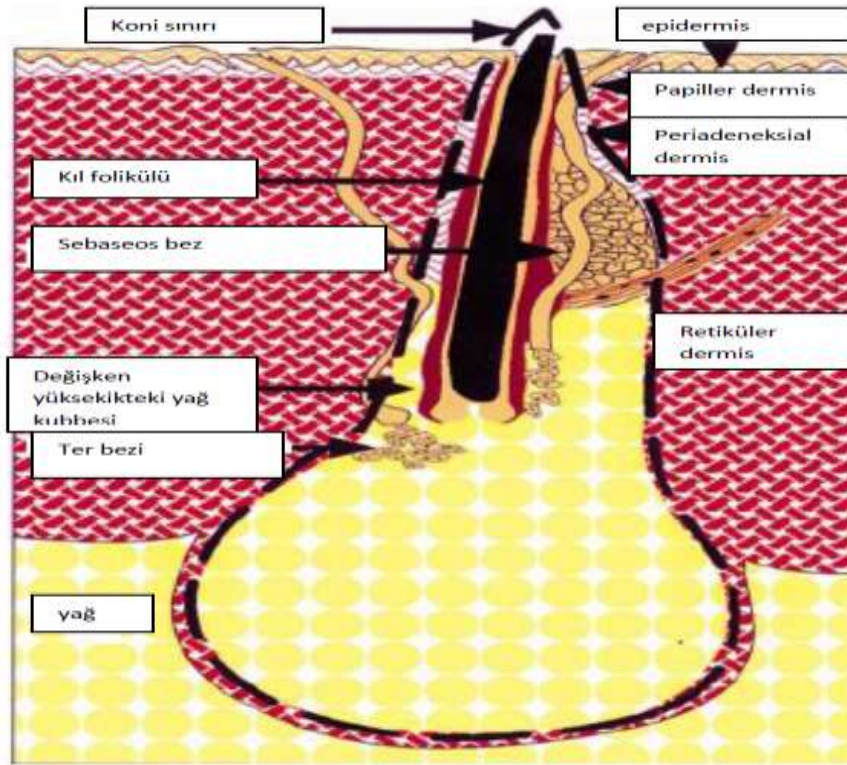
2.4.4 Özel Anatomik Bölgelerde Hipertrofik Skarlaşma veya Keloid İndüksiyonu

Bazı cerrahi işlemler sonrasında tavşanların kulaklarında oluşan kabarık skarların aylar boyunca izlenmesi sonucu bu modelin aşırı dermal skarlaşma çalışmalarında kullanılabileceğini akla getirmiştir. Hemen sonrasında yapılan deneysel çalışmada bu modelin insandaki hipertrofik skar ile paralel olduğu ve hipertrofik skar patofizyolojisinin ve tedavi yöntemlerinin araştırılmasında kullanılabileceği kanısına varılmıştır(42). Tavşan kulağı modeli hipertrofik skarın patofizyolojisinin araştırılmasında ilerlemeler sağlasa da modeli oluşturmak için perikondriumunda alınmasının gerekliliği ve gecikmiş yara iyileşmesinin ardından görülen kabarık skar oluşumunda cilt hücreleri ile birlikte kondrositlerin yer alması dezavantajdır. Ayrıca insanlarda görülen hipertrofik skar her zaman kıkırdak üzerinde bulunmamaktadır ve derin dermis hasarında oluşmaktadır(37,38).

2.4.5 Domuz Modelinde Derin Dermal Yaralama ile Hipertrofik Skarlaşma veya Keloid İndüksiyonu

Koniler epidermal ekleri ve yağ doku içeren cilt yapılarıdır. Dermal konilerin üst bölümü kıl gövdesi, ter kanalları ve pliosebaseoz üniteleri içerir. Alt bölümü ise ter bezleri, kıl folliküllerinin derin kısımları ile yağ kubbesini içerir. Koniler ilk kez

Shoemaker tarafından yaklaşık 100 yıl önce tanımlanmış ve daha sonra 1953'te Jackson tarafından tekrar tariflenmiştir. 2001 yılında ise Matsumura ve arkadaşları(43) hipertrofik skar ile konilerin ilişkisini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada konilerin hipertrofik skar gelişmesi yönünden yüksek riskin olduğu yanak, boyun, gövde önyüz, karın, sırt, glutea, ekstremiteler ve kulak heliksi ile lobülünde bulunduğu; ancak, skalp, konka, alın, göz kapağı, palmar bölge gibi keloid veya hipertrofik skarın izlenmediği veya görülme oranının düşük olduğu yerlerde konilerin olmadığı görülmüştür.



Şekil 2.9. Dermal koninin vertikal şeması



Şekil 2.10. Cilt greft alınması sonrasında konilerin tanjansiyel yarada görünümü

Koniler insan fetusu, fare ve tavşan cildinde yoktur. Ancak, koniler dışı kırmızı Duroc domuz tipinde mevcuttur ve bu hayvanlarda insan hipertrofik skarına benzer skar oluşumu tanımlanmıştır. 1972 ve 1976 da Silverstein ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 12 adet kırmızı Duroc domuzunda oluşturulan derin dermal hasar sonucu 12 hayvanda da hipertrofik skar izlenmiştir. Bu çalışmadan 12 yıl sonra farklı 2 grup tarafından bu hayvanlarda insizyondan sonra 5 ay boyunca hipertrofik skarın oluştuğu belirtilmiştir. Aynı şekilde 2003'te Zhu ve arkadaşları(44) tarafından bu domuz modelinde cilt konilerinin olduğu ve derin dermal hasar sonucunda hipertrofik skarlaşma gösterilmiştir. Bu hayvanlarda görülen hipertrofik skarın insanlardaki ile aynı histolojik özelliklere sahip olmasına rağmen bunlarda kollajen nodülleri görülmemiştir. Ancak 2004-2005 te Zhu ve arkadaşları(45) ile Gallant-Behm(46) ve arkadaşlarının yapmış olduğu moleküler, immunohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar sonunda oluşturulan hipertrofik skarın insanlardaki ile benzer olduğu gösterilmiş ve daha önce izlenmeyen kollajen nodüllerinin teknik hataya bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. 2006 yılında da Stewart ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da *kırmızı duroc domuzlarında* oluşan hipertrofik skarın anjiogenezis ve neovaskularizasyon patternin insanlardaki ile aynı olduğunu göstermesi modelin değerini daha da arttırmıştır(47).

Sonuç olarak her model avantaj ve dezavantajları göz önünde bulundurularak çalışmanın amacına göre değerlendirilmelidir. Bu çalışmada amaç hipertrofik skarın oluşumu süreci içerisinde makrofaj migrasyon inhibitör faktör ekspresyon düzeylerinin saptanması olması nedeniyle sürekliliği olan bir model seçildi.

Günümüzde planan çalışmaya uygun 2 model mevcut olup biri *nude fare* diğeri ise *kırmızı duroc domuz* modelidir. Domuz modelinin tercih edilmeme sebebi ise hayvanların büyük, bakımının ve kontrol altında tutmanın zor olmasıdır. Seçilen model çalışma sürecine uygun, bakım ve kontrolü nispeten daha rahat olan ve günümüzde üzerinde çalışmalar yapılan en güncel modeldir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 274-1/2012 sayılı onayı ile 15.03.13 - 31.12.13 tarihleri arasında Ankara Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı San. ve Tic. A.Ş.'de gerçekleştirildi. Çalışmada 4-6 haftalık, 18-25 gr ağırlığında 30 adet balb-c nu/nu fare kullanıldı. Farelerin 5'şerli gruplar halinde özel havalandırma sistemine sahip steril IVC kafeslerde bakımı yapıldı.



Şekil 3.1. IVC kafesler

3.2. Anestezi ve Cerrahi Öncesi Bakım

Anestezi 40mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, EWL Eczacıbaşı Warner Lambert İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul) ve 5mg/kg Ksilazin (Rompun Bayer İstanbul) intraperitoneal verilerek sağlandı. Anestezi ve cerrahi işlem laminar hava akımlı özel kabinlerde uygun sterilizasyon şartlarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Cerrahi işlemin gerçekleştirildiği laminer hava akımlı kabin

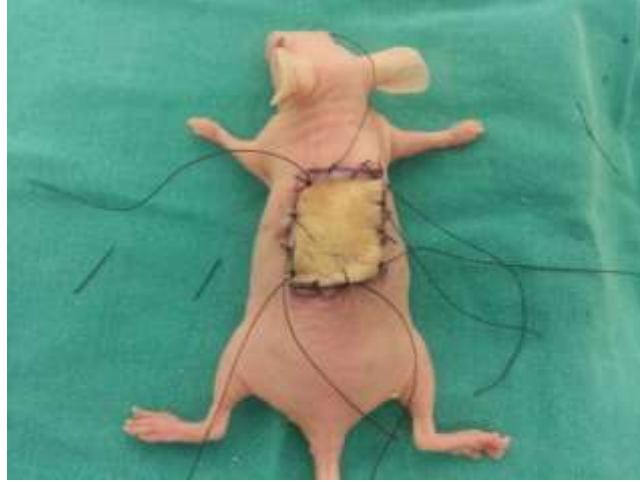
3.3. Cilt Greftlerinin Hazırlanması

Abdominoplasti operasyonu yapılan hastalardan çıkarılan fazla cilt dokusundan dermatom yardımı ile yaklaşık 1.2 mmlik kısmi kalınlıklı cilt greftleri alındı. Alınan greftler 2x1.5 cmlik parçalara kesilerek steril nemli gazlı beze sarıldı ve +4 derecede muhafaza edildi.

3.4. Eksizyonel Yara Modeli

İlk kez 2006 ta Yang ve arkadaşları(48) tarafından geliştirilen ve daha sonra Wang J.F(36) ve Momtazi M.(37) tarafndan desteklenen nude farede deneysel hipertrofik skar modelinin uygulanması planlandı. Deneklerin sırtında 2x1.5 cmlik tam kalınlıklı cilt eksize edildi. Oluşan defekte insan cildinden hazırlanan kısmi kalınlıklı deri grefti konularak 4-0 ipek ile sütüre edildi. Greft üzerine klorheksidinli tül gaz ve basınçlı pansuman yapıldı. Operasyondan 7 gün sonra pansumanlar açıldı

ve skar gelişimi gözlemlendi.



Şekil 3.3. İnsan xenogreftin fare sırtına konulması

3.5 Deney Grupları

Deneyde kullanılan fareler her grupta 5 adet olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubu olarak MIF ekspresyon düzeylerinin saptanması için insan abdominoplasti materyalinden alınan cilt biyopsileri, histolojik olarak dermis kalınlıklık ölçüm karşılaştırılması için fare cildinden alınan biyopsi örnekleri kullanılmıştır.

Kontrol grubu 1(K1)(n:5):İnsan cildinden 0.gün alınan alınan biyopsi örnekleri

Kontrol grubu 2(K2)(n:5): Fare cildinden 0.gün alınan biyopsi örnekleri

Grup 1(I)(n:5): Sırtına insan cildi implate edilerek 3 gün yaşatılan ve 3. gün cilt örnekleri alınan nude fare grubu

Grup 2(II)(n:5): Sırtına insan cildi implante edilerek 21 gün yaşatılan ve 21. gün cilt örnekleri alınan nude fare grubu

Grup 3(III)(n:5): Sırtına insan cildi implate edilerek 60 gün yaşatılan ve 60.gün cilt örnekleri alınan nude fare grubu

Grup 4(IV)(n:5): Sırtına insan cildi implate edilerek 120 gün yaşatılan ve 120.gün cilt örnekleri alınan nude fare grubu

Grup 5(V)(n:5): Sırtına insan cildi implate edilerek 150 gün yaşatılan ve 150.gün cilt örnekleri alınan nude fare grubu

Grup 6(VI)(n:5): Sırtına insan cildi implate edilerek 210 gün yaşatılan ve 210.gün cilt örnekleri alınan nude fare grubu

3.6. Sakrifikasyon Yöntemi ve Örneklerin Toplanması

I. grupta yer alan 5 adet fare 3.gün, II. grupta yer alan 5 adet fare 21. gün, III. grupta yer alan 5 adet fare 60.gün, IV. grupta yer alan 5 adet fare 120. gün, V.grupta yer alan 5 adet fare 150. gün, VI. grupta yer alan 5 adet fare 210.gün kafeslerine eter emdirilmiş pamuk konularak sakrifiye edildi. Farelerin sırt bölgesinde oluşan skar dokusu eksize edilerek 2'ye bölündü ve bir kısmı histojik inceleme için %10'luk formaline konuldu; diğer kısmı MIF ekspresyonu için 1ml'lik eppendorf tüplerinde RNA later solüsyonu içine konuldu. I. grupta yer alan ve 3. gün sakrifiye edilen farelerden alınan örneklerde hipertrofi beklenmediği için sadece MIF gen ekspresyon düzeylerine bakılmıştır.

3.7 Histolojik İnceleme

Alınan örneklerin histolojik incelemeleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.7.1 Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Işık mikroskopunda inceleme için 1 cm³ büyüklüğünce kesilen doku parçaları %10'luk nötral formalinde 72 saat süreyle tespit edildiler. Daha sonra bilinen izleme yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar haline getirildiler. Hazırlanan parafin bloklardan polilizinli lamlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hemotoksilen-Eozin ve Mallory-Azan boyamaları yapıldı.

3.7.2. Histolojik Değerlendirme

Hemotoksilen-Eozin ve Mallory-Azan ile boyanan kesitlerin histolojik değerlendirmesi için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus Corp. Tokyo, Japonya) kullanıldı. Hipertrofik skar kalınlığı; H&E boyamalarda epidermal-dermal birleşke ile dermal-yağ dokusu birleşkesi arasında kalan, randomize seçilmiş 5 farklı alanda 5 veya daha fazla lamda

mikroskop sistemine bağlı BAB Bs200Pro Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi kullanılarak değerlendirildi.

3.8. MIF Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney süresi sonunda sakrifiye edilen fareleri, sırtında oluşan skar dokusundan alınan örneklerden MIF ekspresyon düzeyleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı tarafından çalışılmıştır.

3.8.1 Doku Eldesi (Genetik)

Alınan doku örnekleri Real-Time PCR çalışmaları için eppendorf tüp içerisine alındı ve tüm dokuyu kaplayacak şekilde 1 ml RNA Later stabilizasyon solüsyonu ilave edildi. Doku içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra, dokular -80°C 'de muhafaza edildi.

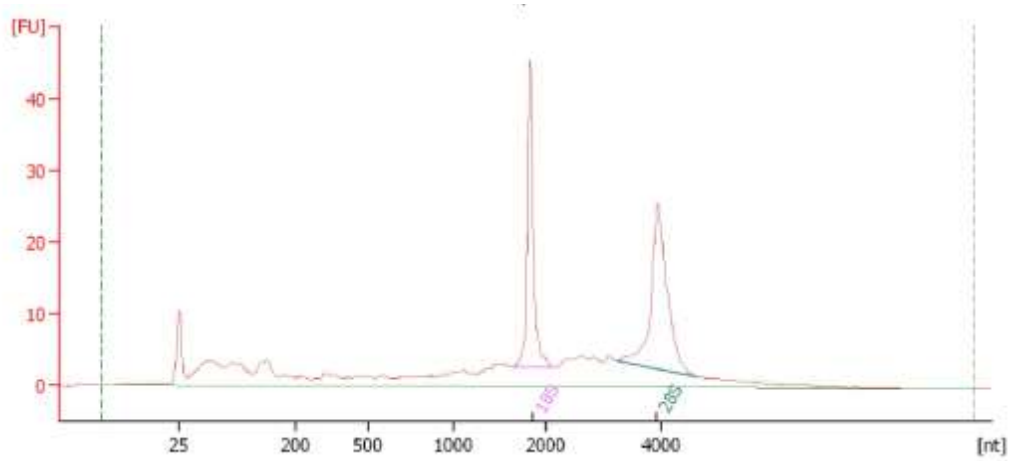
3.8.2. RNA İzolasyonu

1. Skar dokusu örnekleri , -80°C 'den çıkartıldıktan sonra, oda ısısında 10 dak. çözülmesi beklendi.
2. Dokular RNA later içerisinden çıkartılarak Magna Lyser Green Beadslere aktarıldı ve üzerine 450 μl Tissue Lysis Buffer eklenerek, Magna Lyser (Roche) cihazında 6500 rpm'de 50 sn parçalanarak homojenize edildi.
- 3.Homojenize edilen dokular oda sıcaklığında bekletildi.
- 4.13000 rpm de 2 dk. 4°C ' de santrifüj edildi.
- 5.Santrifüjden sonra, en üst fazda oluşan süpernatanın 350 μl 'si Manga Pure Compact numune tüplerine aktarıldı.
- 6.Magna Pure Compact (Roche) RNA izolasyon kitinin kullanım kılavuzuna uygun şekilde, Manga Pure Compact ekstraksiyon cihazında total RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

3.8.3 Total RNA Kalitesinin ve Miktarının Spektrofotometre ve Bioanalizer Cihazıyla Tayini

İzole edilen RNA'lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere jel elektroforezi (%1.5 Agaroz) ile incelendi. Kaliteli total RNA istatistiksel olarak doğru karşılaştırılma yapılması için gereklidir. İzole edilen total RNAların nanodrop spektrofotometre cihazıyla ölçümleri yapıldı. A260/280 oranı 1.8'in altındaki veya

A260/230 oranı 2.0' ın altında olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Kalite ve miktarı uygun olan örneklerde Bioanalizer (Agilent) cihazında nano 6000 RNA kiti (Agilent) kullanılarak fragman analizi yapıldı ve RIN (RNA Integrity Number) değerleri 7-10 arasındakiler mikroarray analizine alındılar.



Şekil 3.4. Agilent 2100 Bioanalize' de total RNA elektroforegram görüntüsü

3.8.4. cDNA Sentezi

RNA miktarları totalde 500ng olacak şekilde Rnase free distile su ile tamamlandı. cDNA sentezi için, aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi toplam hacim 20 μ l olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı ve cDNA sentez işlemi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

Tablo3.1. cDNA için kullanılan karışım içeriği

Karışım	Miktar(μ L)
Oligo-dT Primer	1
Random hexomer	1
RNase free water	
RNA	9.4
Toplam	11,4

Karışım 65° C 'de 10 dk termal cyclerda da inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak, ayrı bir tüpte 8,6 µl revers transkripsiyon karışımı ile tüm örnekler pipetaj yapıldı.

3.8.5: Real Time-PCR

Tablo 3.2 RT-PCR için kullanılacak olan karışım içeriği

içerik	hacim	Son konsanstrasyon
Transcriptor High fidelity reverse Transcriptase reaction buffer, 5x conc. (vial 2)		4 µl 1x(8MmMgCl ₂)
Protector Rnase inhibitor, 40 U/µl(vial 3)	0.5 µl	20U
Deoxynucleotide Mix, 10Mm (Vial 4)	2 µl	1 mM(her biri)
DDT (vial 7)	1 µl	5mM
Transcriptor high fidelity Reverse Transcritase (vial1)	1.1µl	10 U
Son hacim	20 µl	

Toplam 20 µl olacak şekilde 11,4 µl RNA + primer karışımı, 8,4 µl reverse transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda Applied Biosystems- 9700 PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

PCR şartları şöyle idi:

55 °C 'de 30 dk ,

85 °C 'de 5dk (enzim inaktivasyonu)

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 40 µl'ye sulandırıldı (20 µl cDNA +20 µl distile su = 40 µl).

Skar dokusundaki makrofaj inhibitör faktör gen ekspresyonu Real time 480 I cihazında incelendi. İnsan cildinden alınan biyopsi örnekleri kontrol olarak

kullanıldı. Çalışma kapsamında GAPDH house-keeping gene ve hedef gen MİF için özgü *Roche Real Time Single Assay* primer probe seti ile çalışıldı.

RT-PCR Koşulları:

Probe master mix 10 µl

Real time single assay primer probe 1 µl

cDNA 5 µl

Distile su 4 µl

Toplam: 20 µl

20 µl RT-PCR reaksiyonu Real time 480 I cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

Programs

Program Name	preincubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	4.4		0	0	0	None

Program Name	pcr						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:10	4.4		0	0	0	None
60	00:00:30	2.2		0	0	0	None
72	00:00:01	4.4		0	0	0	Single

Program Name	cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:30	2.2		0	0	0	None

Şekil.3.5. real-time PCR koşulları

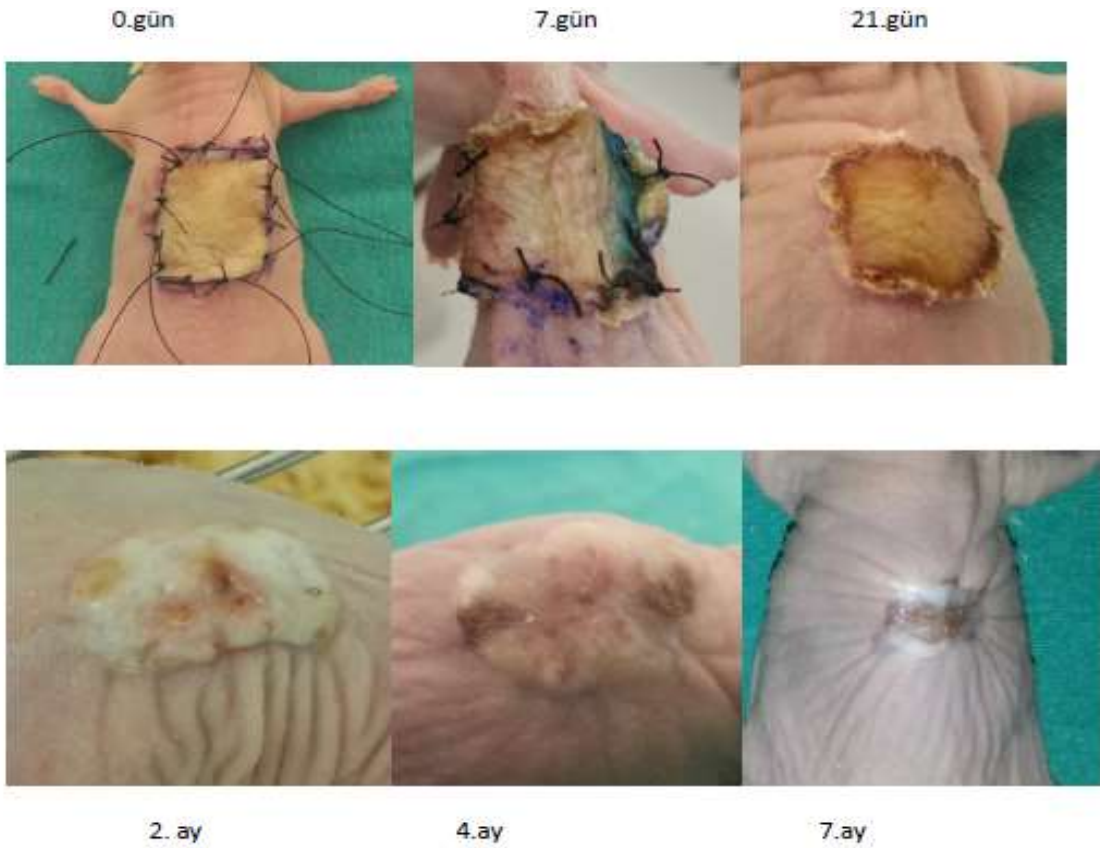
3.8.6 Verilerin Analizi

MİF gen ekspresyonunun kantitatif analizi için amplifikasyon sırasında örneklerin Ct değerleri belirlenmiş, house-keeping gen GAPDH seçilerek $2(-\Delta\Delta C(T))$ metodu kullanılarak relatif quantifikasyon yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Makroskobik Bulgular

Literatürde nude fare sırtında oluşturulan HTS modeli ile ilgili yapılan benzer çalışmalarda hem kısmi hem de tam kalınlıklı insan deri grefti kullanılmıştır. Çalışmamızda 1,2 mmlik kısmi kalınlıklı deri greftleri kullanılmıştır. Deri greftlerinin fare sırtına tranplantasyonu sonrasında 7. gün açıldığında greftin yaşadağı ve yumuşak olduğu görüldü. 21 gün sonra epidermis ve dermisin üst kısımlarının sertleştii ve renk değişikliği olduğu görüldü. 2-aylarda transplante edilen greftin etraftaki normal cilde göre kabarmış olduğu, maksimum kalınlığa ulaştığı, takip eden 5. ve 7. aylarda ise gerilediği gözlemlendi(şekil17).

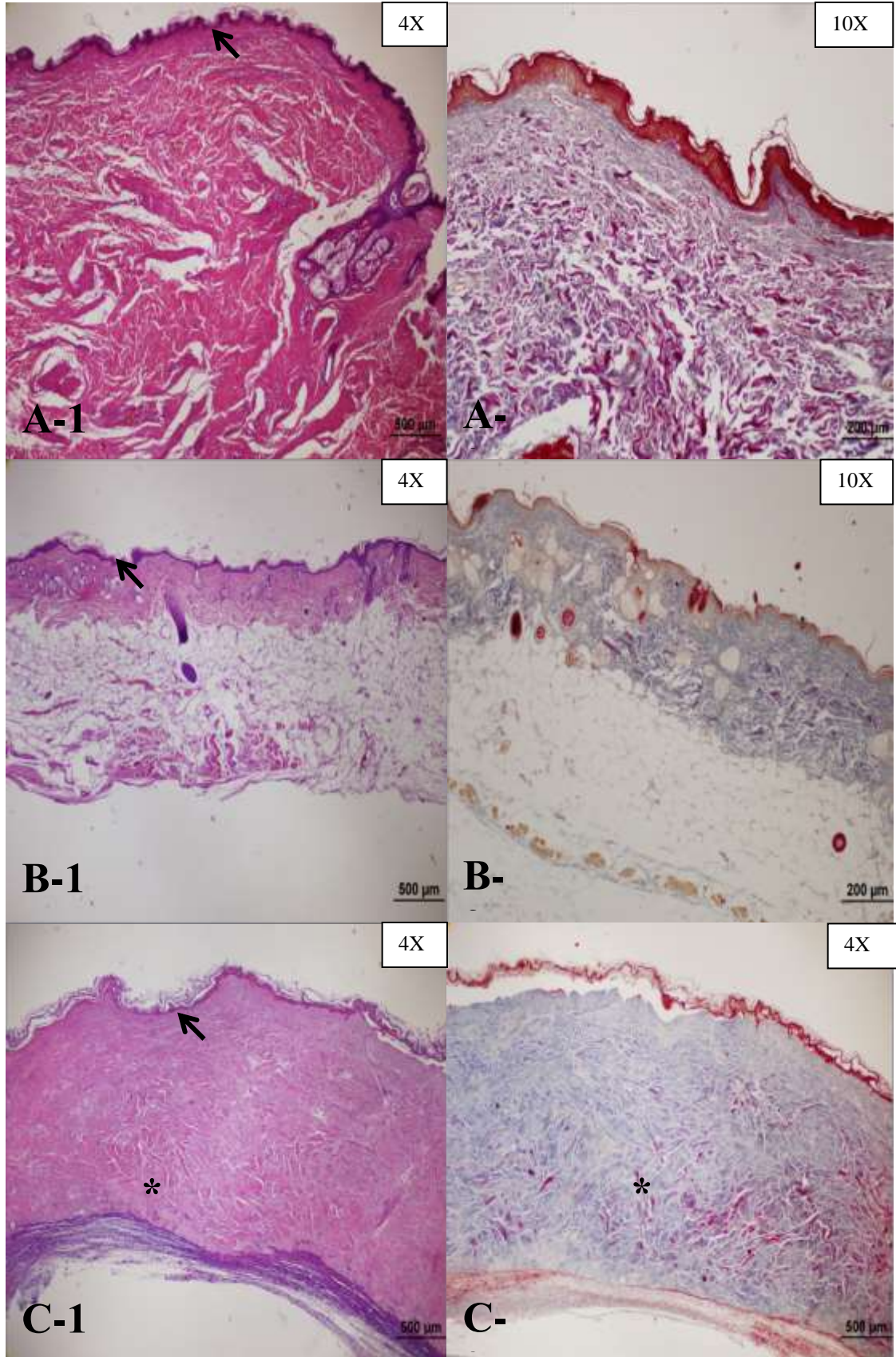


Şekil 4.1. Oluşan skarların makroskobik görünüşleri

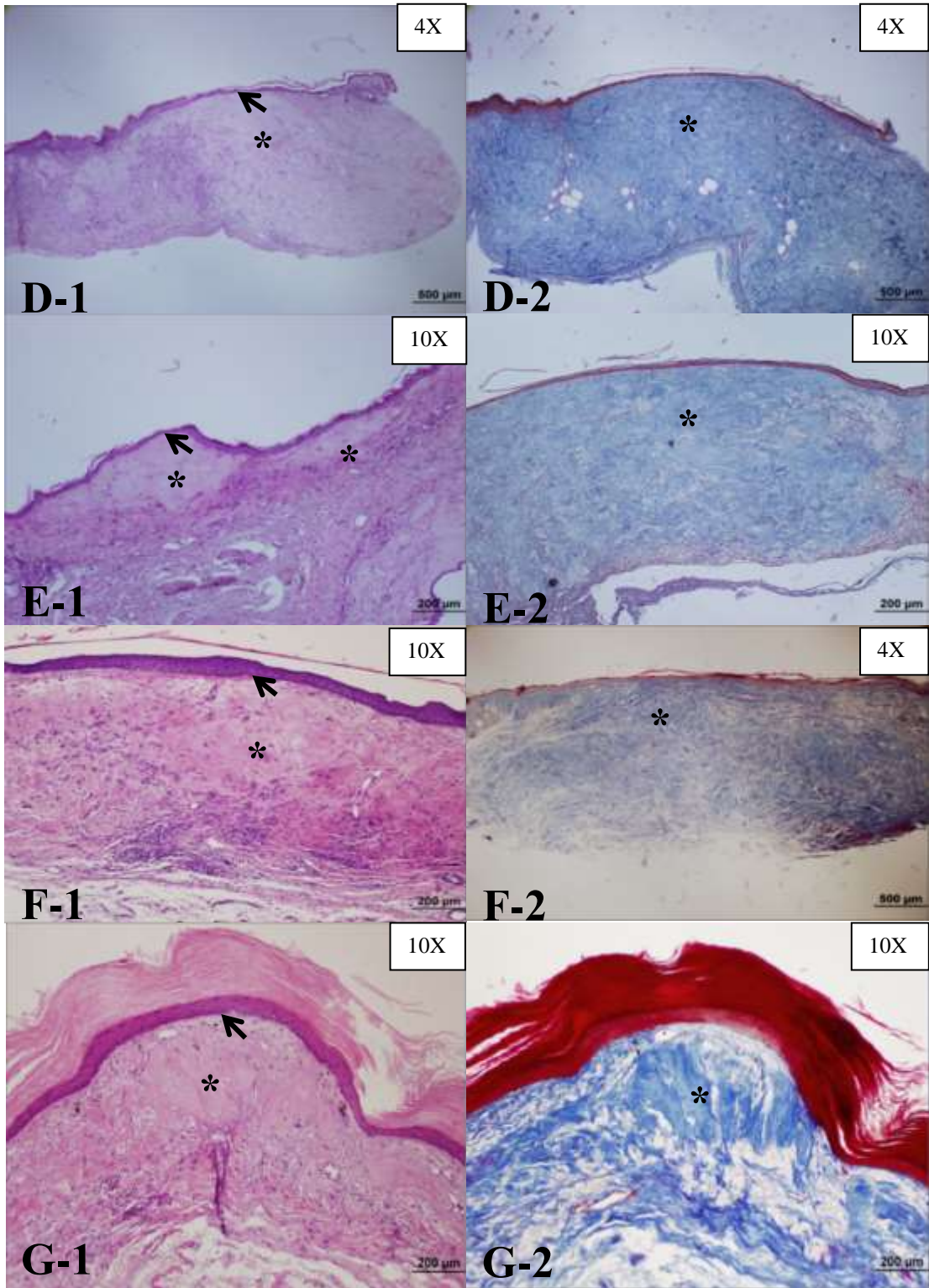
4.2. Histolojik Bulgular

Tüysüz farelerin (nude fare) sırt derisinden alınan parça yerine yerleştirilen insan greftinin 21 gün, 2 ay, 4 ay, 5 ay ve 7 aylık etkilerinin yanı sıra kontrol grubu olarak insan ve fare deri örnekleri ışık mikroskopi düzeyinde incelenmiştir. Çalışmada fare sırtına implante edilen 3. güne ait ksenografta hipertrofi beklenmediği için histolojik inceleme yapılmamıştır. İnsan ve fare cildinden alınan biyopsi örneklerinde keratinizasyon, dermal papilla, düzenli epidermis, dermis tabakasında sağlıklı kollajen lifler, kıl kökleri ve ter bezleri gözlenmektedir (Şekil A-B). 21 günlük ksenograft skar dokusu incelendiğinde hipertrofik skar yapısının oluşmaya başladığı, kıl kökü ve yağ bezlerinin kaybolduğu, dermal papilla girintilerinin ise azaldığı gözlenmiştir (Şekil C). 2, 4, 5 ve 7 aylık ksenograft hipertrofik skar dokuları incelendiğinde dermal papillalarının, kıl köklerinin ve ter, yağ bezi gibi deri eklentilerinin tamamen kaybolduğu, skar doku çaplarının zamanla küçüldüğü, epidermis kalınlığı ve keratin yapısının kalınlaşma gösterdiği belirlenmiştir. Mallory Azan boyamasında ise 2, 4, 5 ve 7 aylık gruplarda hipertrofik skar bölgesindeki kollajen demetlerinin sarmal şeklini aldığı gözlenmiştir.

Deri ölçümlerine bakıldığı zaman ise kontrol fare grubunun dermis çapının ortalaması 308.69 μm iken 21 günlük ksenograft hipertrofik skar dokusu kalınlığı 1835.219 μm , 2 aylık skar dokusu kalınlığı 1340.12 μm , 4 aylık skar dokusu kalınlığı 611.59 μm , 5 aylık skar dokusu kalınlığı 349.1494 μm iken 7 aylık gruptaki ksenograft hipertrofik skar dokusu kalınlığının ortalaması 266.5317 μm 'dir. Bu değerlere bakıldığında artan sürenin aksine hipertrofik skar dokusunun kalınlığının azaldığı gözlenmiştir.



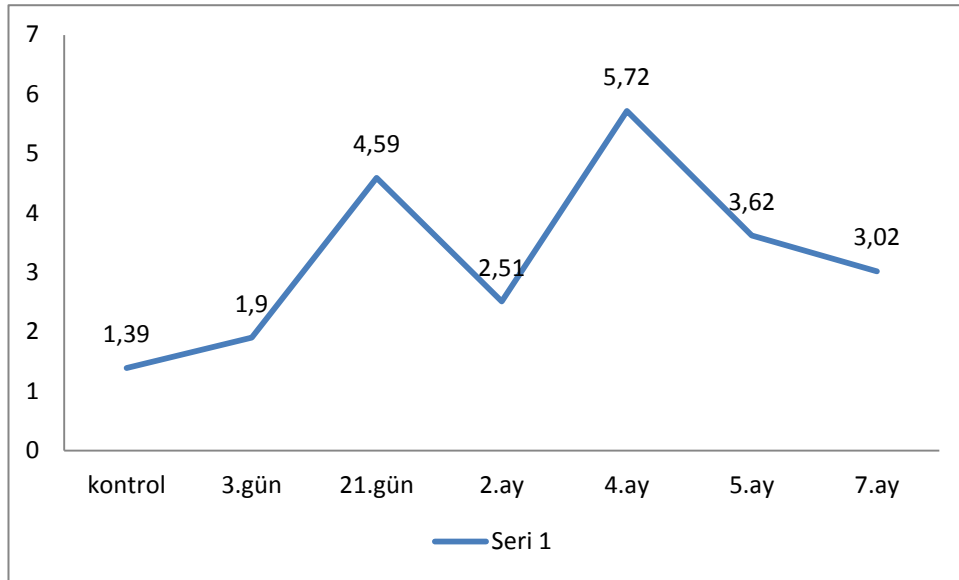
Şekil 4.2. Hematoksilen-eozin ve Mallory Azan ile boyanmış deri kesitleri. Uygulama yapılmamış insan (A-1, A-2) ve çıplak fare (B-1, B-2) derisi örneklerinde dermal papilla girintileri, kıl kökü, ter ve yağ bezi gibi deri ekleri gözlenmektedir. 21 günlük ksenograft hipertrofik skar dokusu grubunda ise skar oluşumu (*) görülmekte ancak deri eklerinin kaybolduğu ve dermal papilla girintilerinin (→) azalmaya başladığı izlenmektedir (C-1, C-2) (x4, x10)



Şekil 4.3. Hematoksilen-eozin ve Mallory Azan ile boyanmış deri kesitleri. 2 ay süreyle greft uygulanmış grupta skar bölgesinde (*) dermal papillalar tamamiyle kaybolmuş (→), epidermis kalınlığı incelmış, keratin yapısı azalmıştır (D-1, D-2). 4 ve 5 ay süreyle greft uygulanmış gruplarda skar bölgeleri giderek küçülmüş (*), epidermis ve keratin yapısı incelmış, dermal papillalar gözlenmemektedir (→) (E-1, E-2; F-1, F-2). 7 ay süreyle greft uygulanmış grupta ise helazon şeklinde kollajen liflerden oluşmuş olan skar yapısı çok küçük bir alan kaplamakla beraber (*), dermal papilla gözlenmemektedir (→). (G-1, G-2) (x4, x10).

4.3. MIF mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Yapılan çalışmada MIF'in ekspresyon düzeylerinin kontrol gruba artış gösterdiği, grupların kendi arasında ise bifazik salınım paterni göstermiştir. 3. gün mRNA düzeylerinde kontrol grubuna göre minimal artış olurken, 21. gün belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artma 2. ayda tekrar azalma eğiliminde iken 4. ayda maksimum seviye ulaşılmış takip eden 5. ve 7 ayda ise düşme eğilimi göstermiştir.

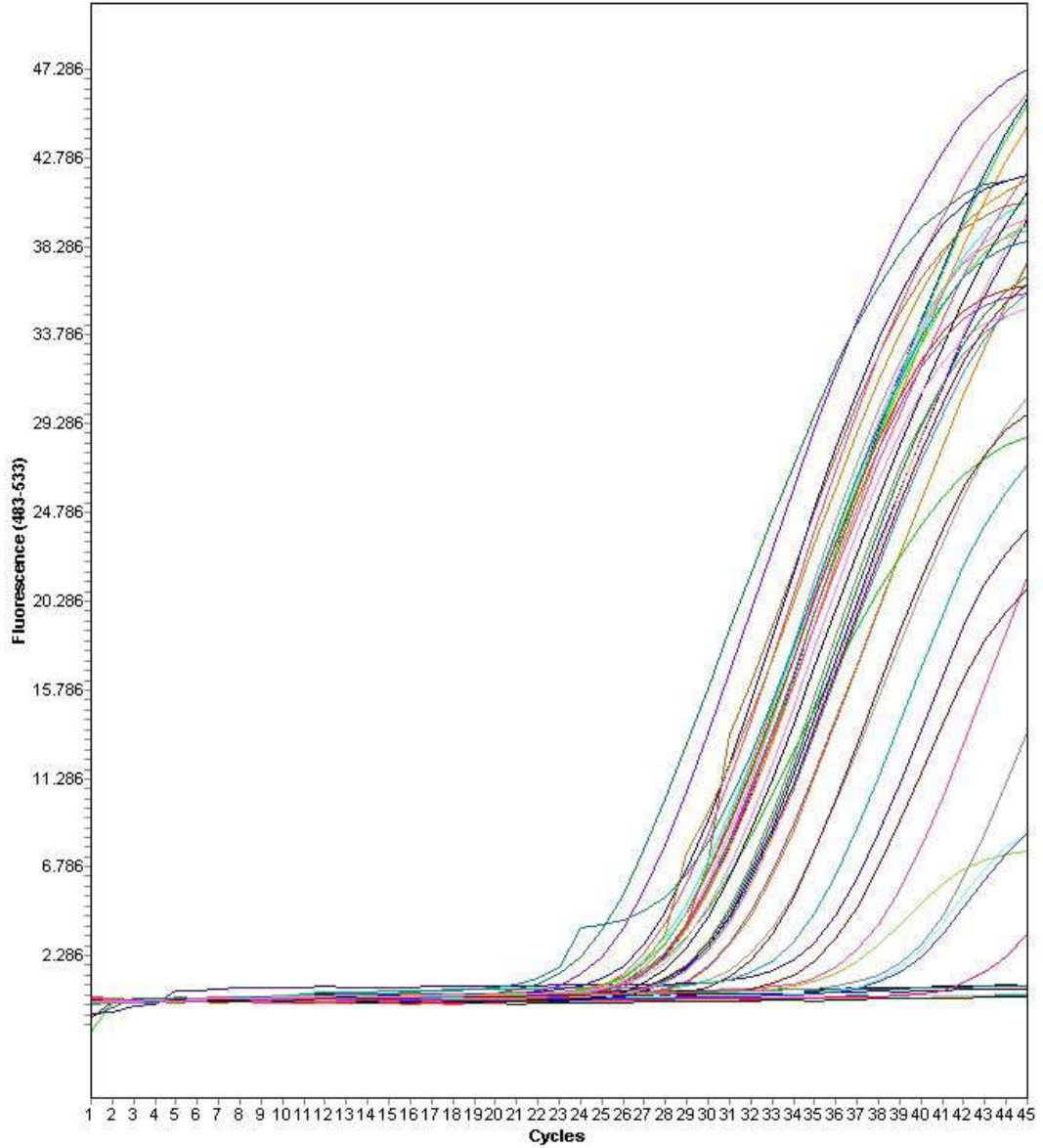


Şekil 4.4. MIF ekspresyon düzeyleri

4.3.1. MIF Gen Amplifikasyon Sonuçları

Target Amplification Curves

A1: h-1	A2: h-2	A3: 4-1	A4: 4-2	A5: 4-3	A6: 4-4	A7: 4-5	A8: 2-1	A9: 2-2	A10: 2-3
A11: 2-4	A12: 2-5	B1: 21-1	B2: 21-2	B3: 21-3	B4: 21-4	B5: 21-5	B6: 21-6	B7: 21-7	B8: 3-1
B9: 3-2	B10: 3-3	B11: 3-4	B12: 3-5	C1: 3-6	C2: 3-7	C3: 4-1t	C4: 4-2t	C5: 4-5t	C6: 2-2t
C7: 2-5t	C8: 4-4t	C9: k-1	C10: k-2	C11: k-3	C12: k-4	D1: k-5	D2: 7-1	D3: 7-2	D4: 7-3
D5: 7-4	D6: 7-5	D7: 5-1	D8: 5-2	D9: 5-3	D10: 5-4	D11: 5-5			



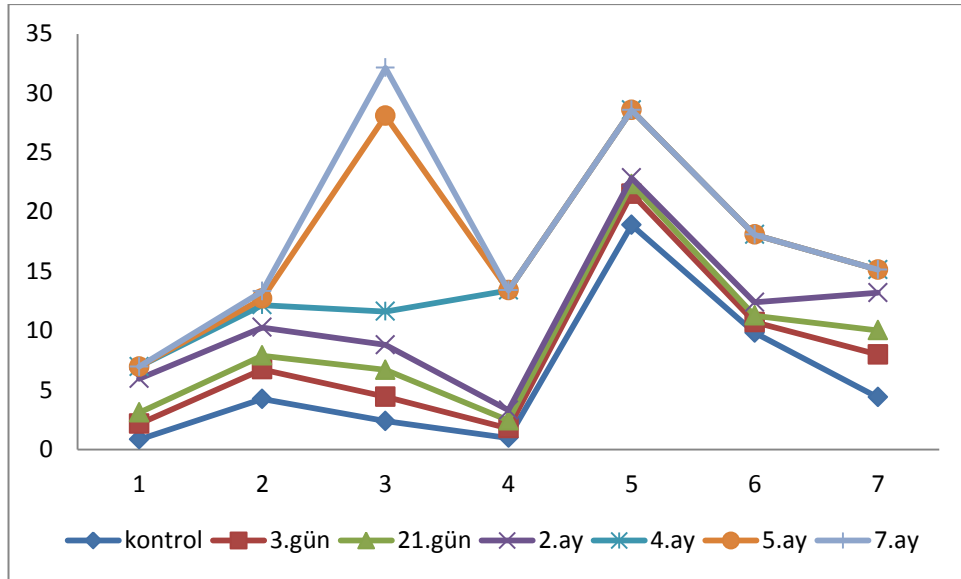
Şekil 4.5. Real-Time PCR'da yapılan gen amplifikasyonunun yazılım görüntüleri
MIF geninin amplifikasyonu

4.4. İstatik Değerlendirme Sonuçları

Verilen gruplara ait istatistiksel analiz sonuçları Minitab 14 paket programı yardımıyla $\alpha=0.05$ anlam seviyesinde hesaplamalar sonucu elde edilmiştir

4.4.1.MIF mRNA ekspresyon düzeyleri

Herbir grubun başlangıç gen düzey değerlerinin grafikte gösterimi aşağıda verilmektedir.



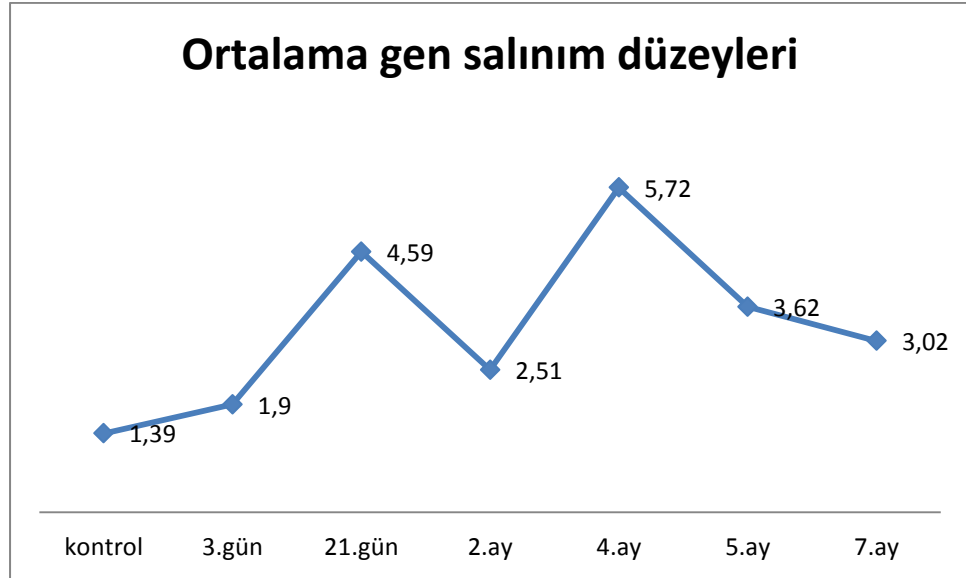
Şekil 4.6. Başlangıç gen düzeyleri

Grupların Ortalama ve Standart Sapmaları

Her bir gruba ait ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tabloda verilmektedir.

Tablo 4.1. Ortalama ve standart sapmalar

Grup	ORT	SS
I. Grup(kontrol grubu)	1,39	0,84
II. Grup(3.gün)	1,90	1,29
III. Grup(21.gün)	4,59	5,28
IV. Grup(2.ay)	2,51	4,26
V. Grup(4.ay)	5,72	7,65
VI. Grup(5.ay)	3,62	4,06
VII. Grup(6.ay)	3,02	1,04



Şekil 4.7.Ortalama Gen düzeyleri

Kontrol grubundaki ortalama gen salınım seviyesinin diğer gruplardaki gen salınım seviyelerine göre düşük olduğu görülmektedir. En yüksek gen salınım seviyesine V. Grup sahiptir. Bu gruplara ait ortalama gen salınım düzeyleri arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığına bakılması gerekmektedir.

Gruplar arasındaki gen salınım düzeylerindeki değişimin anlamlı bir değişim olup olmadığına karar verebilmek için tek yönlü varyans analizi yapılması gerekmektedir.

Öncelikle herbir grup (I., II., III., IV., V. ve VI. Gruplara ait) verisinin normallik varsayımını sağlayıp sağlamadığına bakmak için Anderson -Darling test istatistiği hesaplanmış ve buna ait $p = 0.099$ çıkmıştır. $p > \alpha = 0.05$ olduğu için verilerin normallik varsayımını sağladığı görülmüştür. Sonrasında herbir grubun homojen varyanslı olup olmadığına Levene test istatistiği hesaplanarak karar verilmiştir. Levene test istatistiği $p = 0,354$ hesaplanmıştır. $p > 0.05$ olduğu için grupların homojen varyanslı olduklarına karar verilmiştir. Normallik varsayımı ve homojen varyansa sahip olma varsayımlarının sağlandığı görüldükten sonra tek yönlü varyans analizi yapılarak I., II., III., IV., V. ve VI. Ve VII. gruplarına ait F test istatistiği ve buna ait p değeri hesaplanmıştır. Tablo 4.2' de bu gruplara ait hesaplanan istatistik değeri ve p olasılık değeri verilmektedir. $p = 0,661 > 0,05$ olduğu

için bu altı gruba ait gen salınım düzeylerindeki değişimin istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığına karar verilmiştir.

Tablo4.2. Tek yönlü varyans analizi sonuçları

Grup	F	P
I,II,III,IV,V, VI,VII	0,688	0,661

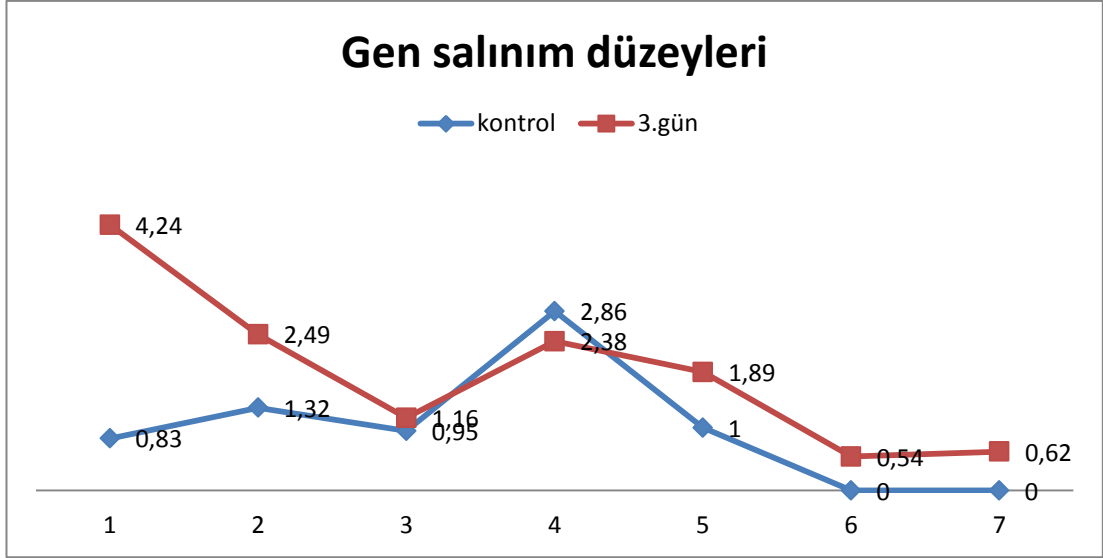
Belirtilen altı grubun çoklu karşılaştırılmasından sonra sırasıyla aynı grupların ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Veriler normal dağılım varsayımını sağladığı için ikili karşılaştırmalarda Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey test istatistiğine ilişkin olasılık değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.3. Gruplar arası ikili karşılaştırma sonuçları

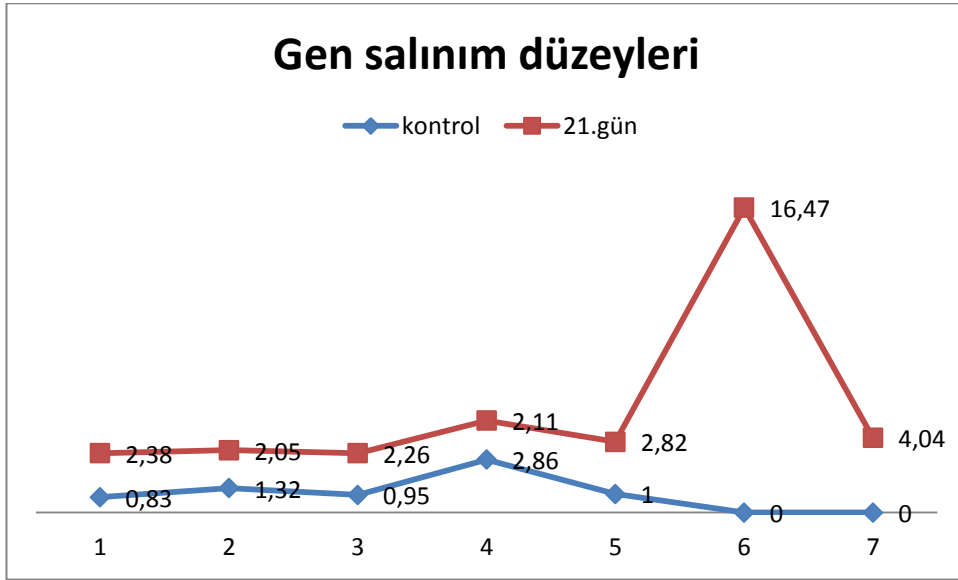
Grup		P
1	2	0,998
	3	0,999
	4	0,998
	5	0,536
	6	0,947
	7	0,992
2	1	0,998
	3	1,000
	4	1,000
	5	0,781
	6	0,997
	7	1,000
3	1	0,999
	2	1,000
	4	1,000
	5	0,758
	6	0,995
	7	1,00
4	1	0,998
	2	1,000
	3	1,000
	5	0,797
	6	0,998
	7	1,00
5	1	0,536
	2	0,781
	3	0,758
	4	0,797
	6	0,958
	7	0,908
6	1	0,947
	2	0,997
	3	0,995
	4	0,998
	5	0,958
	7	1,000

Tablo 4.3’deki p olasılık değerleri $p > 0.05$ olduğu görülmektedir. Bu da grupların ikişerli karşılaştırılmalarında da gen salınım düzeyleri arasındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

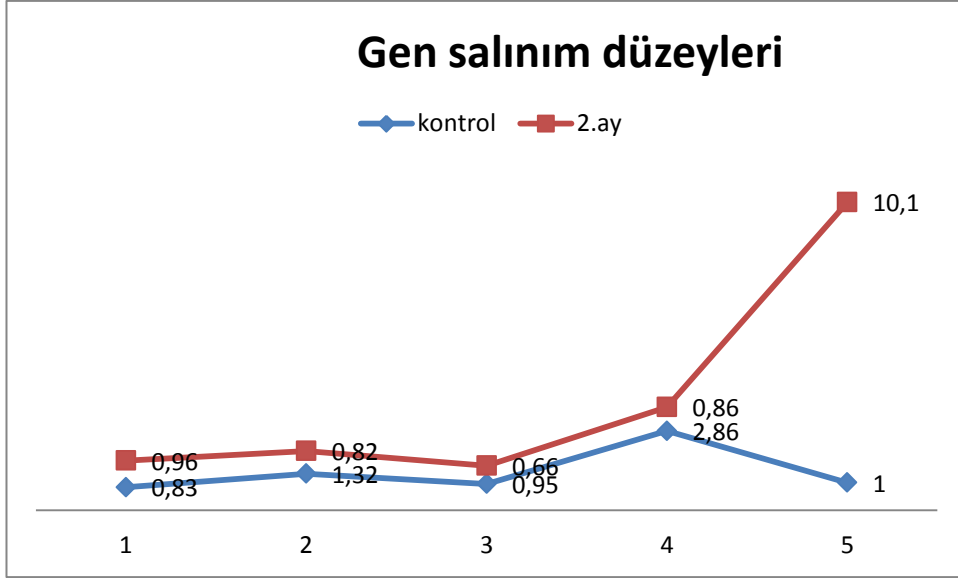
Aşağıda sırasıyla I. grubun sırasıyla II,III,IV,V ve VI. grup ile birlikte grafikleri verilmiştir.



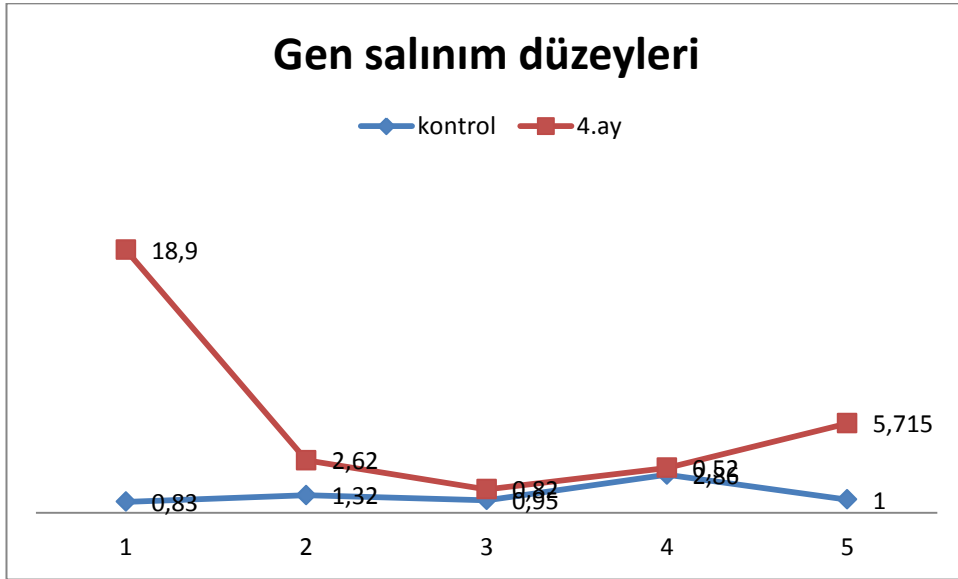
Şekil 4.8. 3. güne ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması



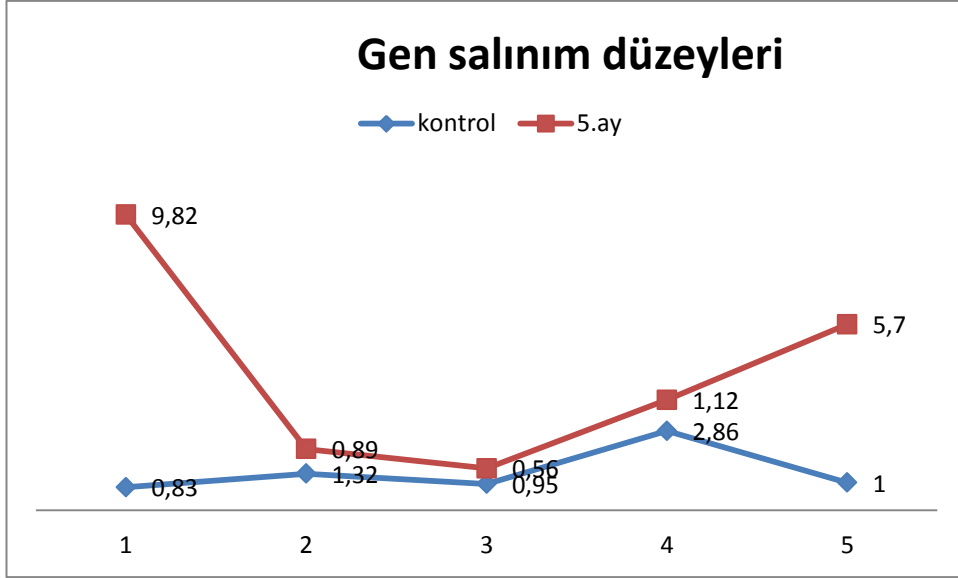
Şekil 4.9. 21. güne ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması



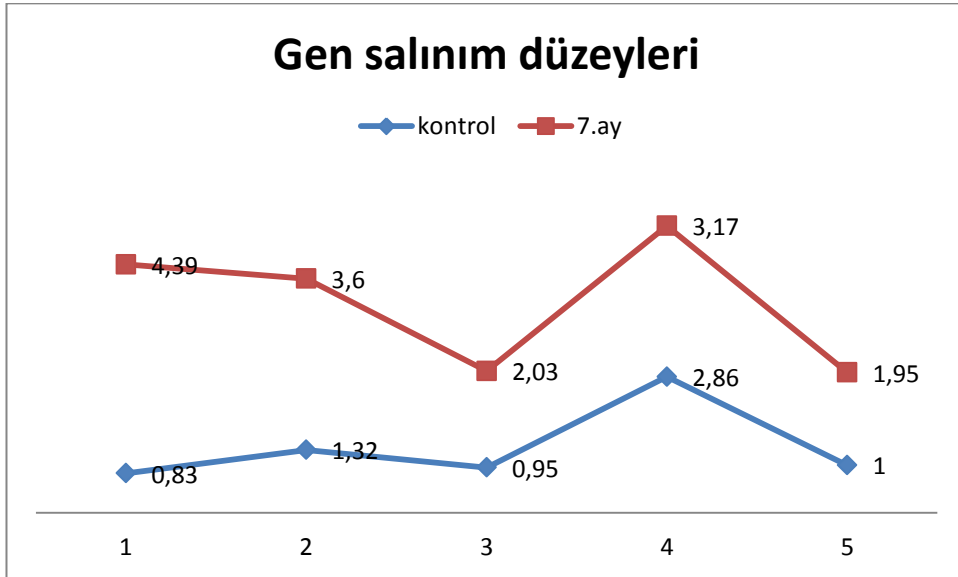
Şekil 4.10. 2. aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.11. 4. aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması



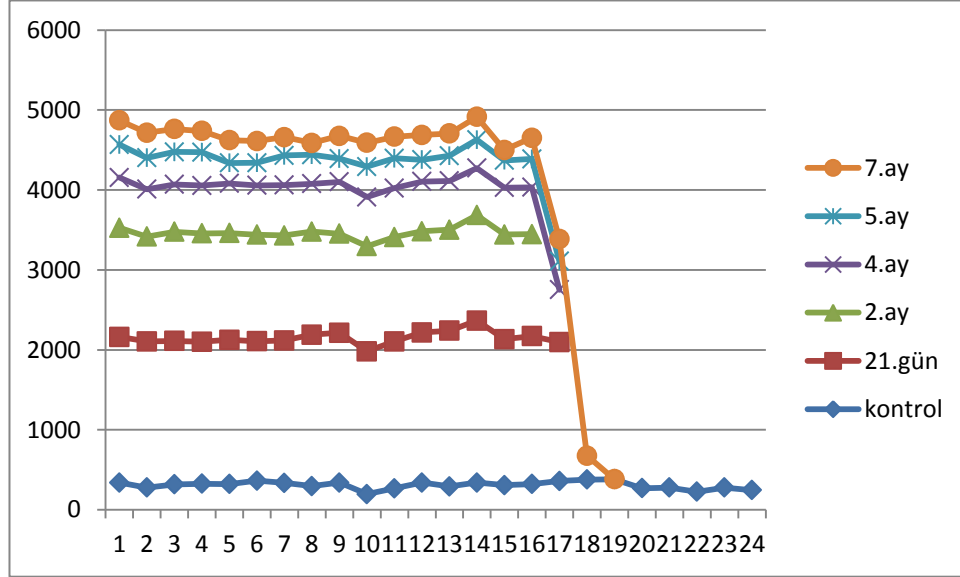
Şekil 4.12. 5.aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.13. 7.aya ait MIF mRNA ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırılması

4.4.2. Histolojik Dermal Kalınlık Ölçüm Analizi

Her bir grubun sırtında oluşan yara kalınlıklarının birlikte grafikte gösterimi aşağıda verilmektedir.



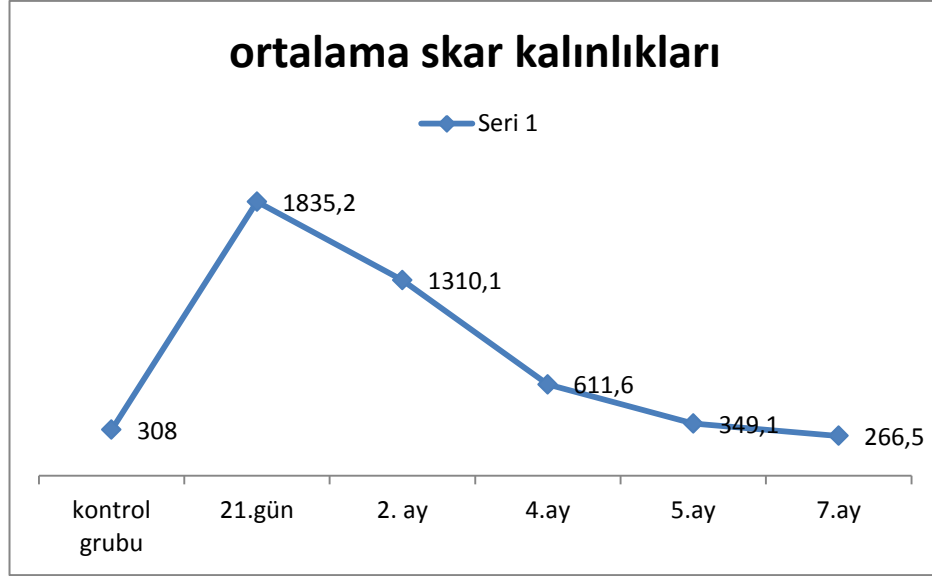
Şekil 4.14. Farelerin sırtında oluşan skarların kalınlık ölçüleri

Grupların Ortalama ve Standart Sapmaları

Her bir gruba ait ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tabloda verilmektedir.

Tablo4.4. Grup ortalama ve standart sapmaları

Grup	ORT	SS
Kontrol grubu	308,7	47,37
21 günlük grup	1835,2	73,6
2 aylık grup	1310,1	37,0
4 aylık grup	611,6	21,09
5 aylık grup	349,1	49,9
7 aylık grup	266,5	50,6



Şekil 4.15. Farelerin sırtında oluşan ortalama yara kalınlıkları değişimi

Gruplara göre farelerin sırtında oluşan ortalama yara kalınlık ölçülerine bakılınca en büyük yara kalınlığına sahip olan 21 günlük fare grubudur. 21 günlük gruptan sonra ele alınan fare gruplarında oluşan ortalama yara kalınlıklarının azaldığı görülmektedir. En düşük ortalama yara kalınlığına sahip fare grubu 7 aylık gruptur.

Bu fare gruplarının sırtında oluşan yara kalınlıklarındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığına bakılması gerekmektedir. Bunun için öncelikle gruplara ait verilerin normallik varsayımını ve homojen varyans varsayımını sağladıkları görülmüştür. Gerekli varsayımlar sağlandıktan sonra grupların sırtında oluşan yara kalınlıklarındaki değişimin anlamlı olup olmadığına bakmak için tek yönlü varyans analizi yapılarak F test istatistiği ve buna ait p olasılık değeri hesaplanmıştır. Tablo 4.5' te bu grupların sırtında oluşan yara kalınlıklarının anlamlı olup olmadığını anlamak için hesaplanan istatistik değeri ve p olasılık değeri verilmiştir.

Tablo 4.5. Tek yönlü varyans analizi sonuçları hesaplanan değerler

Grup	F	P
Kontrol grubu, 21 günlük, 2 aylık, 4 aylık, 5 aylık, 7 aylık	3055,65	0,0001

Tek yönlü varsans analizi sonucu elde edilen $p=0.0001 < 0,05$ olduğu için fare gruplarının sırtında oluşan yara kalınlıklarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bu farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını ya da hangi gruplar arasında anlamlı bir değişim olduğunu göstermek için Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey test istatistiğine ilişkin olasılık değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.6. Gruplar arası ikili karşılaştırma sonuçları

Grup	P	
Kontrol Grubu	21 günlük grup	0,00
	2 aylık grup	0,00
	4 aylık grup	0,00
	6 aylık grup	0,10
	7 aylık grup	0,07
21 günlük grup	Kontrol grubu	0,00
	2 aylık grup	0,00
	4 aylık grup	0,00
	5 aylık grup	0,00
2 aylık grup	7 aylık grup	0,00
	Kontrol grubu	0,00
	21 günlük grup	0,00
	4 aylık grup	0,00
	5 aylık grup	0,00
4 aylık grup	7 aylık grup	0,00
	Kontrol grubu	0,00
	21 günlük grup	0,00
	2 aylık grup	0,00
	5 aylık grup	0,00
5 aylık grup	7 aylık grup	0,00
	Kontrol grubu	0,11
	21 günlük grup	0,00
	2 aylık grup	0,00
	4 aylık grup	0,00
7 aylık grup	5 aylık grup	0,00
	Kontrol grubu	0,07
	21 günlük grup	0,00
	2 aylık grup	0,00
	4 aylık grup	0,00
	5 aylık grup	0,00

Tablo 4.6' da bütün grupların tek tek diğer gruplarla olan karşılaştırılmaları sonucu hesaplanan p olasılık değerleri verilmektedir. Öncelikle kontrol grubunun sırtında oluşan yara kalınlığı sırasıyla 21 günlük grup, 2 aylık grup, 4 aylık grup, 5 aylık grup ve 7 aylık gruplarındaki farelerin sırtında oluşan yara kalınlıkları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırılmalarda, kontrol grubundaki farelerin sırtında oluşan yara kalınlıkları ile 21 günlük grup, 2 aylık grup ve 4 aylık gruplarındaki farelerin sırtında oluşan yara kalınlıkları arasındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve bunların her biri için hesaplanan $p = 0.000 < 0,05$ olduğu görülmektedir. Kontrol grubu sırasıyla 5 aylık grup ve 7 aylık grup ile karşılaştırılmıştır ve bunlar için hesaplanan olasılık değerleri $p = 0,10$ ve $p = 0.07$ ' dir. Bu olasılık değerleri $p > 0.05$ olduğu için kontrol grubu ile 5 aylık grup ve kontrol grubu ile 7 aylık gruplarındaki farelerin sırtında oluşan yara kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde diğer gruplarında birbirleriyle karşılaştırılmaları Tablo 4.6' da verilmiştir ve diğer grupların sırtında oluşan yara kalınlıklarındaki değişimlerin anlamlı olduğu görülmüştür $p = 0.00 < 0.05$.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma hiperrofik skar gelişim sürecinde MIF düzeylerini gösteren ilk çalışmadır. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında etkili olduğu düşünülen ve fibrozis ile ilişkili birçok hastalığın patogeneğinde temel rolü olan MIF'in fibroproliferatif hastalıkların dermal formu olan HTS'da da rolü olabileceği düşünülmüştür. Yara iyileşmesi sürecinde uzamış inflamatuvar cevap fibrozis ile sonuçlanır ve bu cevabın ciltteki karşılığı dermal fibrozis iken akciğer, karaciğer, barsaklar ve eklemlerde meydana gelmesi ciddi morbidite ve hatta mortalite ile sonuçlanır(50). Bazı yazarlara göre uzamış inflamatuvar cevap fibrozis ve aşırı skar oluşumunun en önemli nedenidir. İnflamasyon ve fibrozis arasındaki bu net ilişki embriyonik çalışmalar ile ortaya konmuştur(49). Yara iyileşme sürecinde inflamatuvar hücre göçünün olmaması embriyonun skarsız iyileşmesini sağlamaktadır(49). Buna karşılık bazı yazarlar ise inflamasyonun fibrotik cevap oluşmasında tek önemli basamak olmadığına inanmaktadırlar ve bu hipotezlerini fibroproliferatif hastalıklarda tek başına kullanılan anti-inflamatuvar ajanların etkili olmaması ancak immünsüpresif ajanlar ile kombine edildiğinde iyi sonuç vermesi ile desteklemektedir(20). İlâveten Gawronska-Kozak ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada nude/nu farelerde oluşturulan yaraların insan fetusuna benzer şekilde skarsız iyileştiğini gösterilmiş olup bu olay doku rejenerasyonunda immunojenik cevabın etkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu düşüneyi destekleyen en önemli bulgu ise insan fetusunun 3. trimestera kadar rejenerasyon kapasitesinin devam etmesi sonrasında skar oluşturma eğiliminin olması ve aynı dönemde olgun T hücrelerinin belirmesidir(51). Abartılı yara iyileşmesi olarak nitelendirilen hipertrofik skar oluşumunun pozitif ve negatif etkili sitokinler ve ECM sentezi ile yıkımı arasındaki dengelerin bozulması ile meydana geldiği düşünülmektedir(29).

Skarsız iyileşme ve hipertrofik skar oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalarda üzerinde en çok durulan sitokin TGF- β , multifonksiyonel bir protein olup hücre büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesi, normal yara iyileşmesinde ekstrasellüler matriks üretimi gibi görevlerde yer alır(57). Birçok hücre çeşidi tarafından üretilmekte olup fibroblastlar üzerindeki fibrojenik aktivitesinden dolayı doku fibrozisinde major rol alır(8,57). TGF- β ailesinin alt formu olan TGF- β 1'in skar formasyonundaki önemli rolünden yola çıkılarak H Washio ve arkadaşlarının(57)

yapmış oldukları çalışmada oluşturulan HTS'da TGF- β 1 mRNA ekspresyonunun 3. gün pik yaptığı ve sonrasında azaldığı izlenmiştir. Aynı çalışmada AP-1 bağlanma noktasına spesifik pirol-imidazol poliamidi kullanılarak TGF- β 1 promoter aktivitesi inhibe edilmiştir. Poliamid ile inhibisyonun makroskobik olarak hipertrofik skar oluşumunun hemen hemen tamamının önlendiğinin gözlenmesinin yanısıra TGF- β 1, CTGF, kollajen tip 1 ve fibronektin mRNA ekspresyon düzeylerinin de belirgin şekilde inhibe olduğu görülmüştür(57). Kleemaann ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise MIF JAB-1 aracılığı ile AP-1'in, transkripsiyonundan sorumlu olduğu genlerin ekspresyonunu direk etkilediği bildirilmiştir(58). Hu Xiaolong ve arkadaşlarının(29) CCN2(CTGF)'in hipertrofik skarda kullandığı sinyal mekanizması ile ilgili çalışmada CCN2'nin ERK ve JNK yollarını kullandığı, bunların inhibisyonu ile aşırı fibrotik cevabın önlenebileceğini öne sürmüşlerdir. Nitekim yapılan çalışmalarda MIF'in inflamatuvar cevaptaki muhtemel etki mekanizması ERK ve JNK üzerinden olmaktadır. Leung JCK ve arkadaşlarının(67) IgA nefritlerinde yaptıkları çalışmada anti-MIF uygulanan grupta TGF- β 1 düzeylerinin düşmüş olduğu görülmüştür. Glomerulosklerozda TGF- β 1 ve MIF yüksek düzeyde bulunması ve HTS mekanizmasında üzerinde en çok durulan TGF- β 1, CNN2, kollajen tip 1 moleküllerinin MIF ile aynı sinyal kaskadını kullanarak fibrotik cevapta etkili olmaları, MIF'in de HTS oluşmasında rol alabileceği düşünülmüştür(13,52,59).

HTS oluşumunda suçlanan diğer bir mekanizma ise p53 aracılı apoptozun inhibisyonudur. Apoptozun gerçekleşmemesi HTS da gözlenen hipersellülritye neden olmasının yanısıra nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücreler ve fibroblastlardan sitokin salınımının devam etmesine yol açmakta ve inflamatuvar cevabın uzmasına neden olmaktadır(64). Pro-inflamtuvar sitokin olan MIF'in ise çeşitli hücre tiplerinde (nötrofil, makrofaj vb.) p53 aracılı apoptozu inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(13,33). Ayrıca Kim YJ ve arkadaşlarının(65) yapmış oldukları çalışmada ise sistemik sklerozlu hastaların dermal fibroblastlarında MIF aracılığı ile bcl-2, ERK ve Akt sinyal yollarının aktive olması ile apoptozun azalmış olduğu ve bu hastalarda görülen dermal fibrozisin buna bağlı olabileceği bildirilmiştir. Bu da MIF'in bcl-2 yolağını da kullanarak hipertrofik skar gelişim mekanizmasında rol oynadığını düşündürmektedir.

HTS oluşumunda etkili olduğu düşünülen diğer bir mekanizma ise MMP' lar arasındaki dengenin bozulmasıdır. MMP-2 yara iyileşmesinin geç döneminde etkili olmaktadır ve denatüre kollajen yıkımını sağlarken MMP-9 ise erken dönemde etkili olup natif kollajen tip IV ve V'in yıkımından sorumludur. HTS'larda yapılan çalışmalarda ise MMP-1 ve 9 azaldığı, MMP-2 düzeylerinin artmış olduğudur(5,20). Buna karşılık skarsız iyileşme modellerinde MMP 9 ve 13 düzeylerinde erken ve geç dönemde olmak üzere bimodal artışı görülmüştür(60). Pro-inflamatuar sitokin olan MIF'in MMP-1, 9, 13'ü aktive etmesinin yanısıra romatoid artrit sinovial sıvılarında MMP-2 düzeylerinin MIF tarafından arttırıldığı gösterilmiştir. Skarsız iyileşmede MMP- 9 ve 13 düzeylerinin yüksek olması buna karşılık fibrotik bir molekül olduğu düşünülen MIF'in bu proteinlerin artışını tetiklemesi MIF'in etki mekanizması konusunda çelişkili sonuçlar doğurmaktadır. Çalışmamızda ise MIF ekspresyon düzeyindeki artış remodeling fazında daha belirgindir. Salınımında MIF'in etkili olduğu bilinen ve HTS'ın erken döneminde etkili olan ve düşük düzeyde bulunan MMP-9 ile korele olarak çalışmamızın erken döneminde MIF düzeylerinde belirgin artış izlenmemiştir. Aynı şekilde geç dönemde artışı belirgin olan MIF ekspresyon düzeyleri ile HTS'da artışı görülen MMP-2 arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Fibroproliferatif skar oluşumunda etkili olduğu düşünülen mekanizmalardan biri de derinin nöro-immun-endokrin fizyolojisinin yaralanmaya verdiği cevaptır(54). Deri periferik duyu sinir sistemi, otonomik sinir sistemi ve santral sinir sistemi ile ilişkilidir(70). Periferik sinirler ve immun sistem arasındaki ilişki nöromediatörler salınan ve onları spesifik reseptörlerde aktive eden farklı tiplerdeki kutanöz sinir lifleri aracılığı ile düzenlenmektedir. Deride bu sinir liflerinin bağlandığı reseptörleri bulduran hedef hücreler arasında keratinositler, mast hücreleri, Langerhans hücreleri, mikrovasküler endotel hücreler, fibroblastlar ve immun hücreler yer almaktadır(68). Bu hücrelerden salınan nöropeptidler duysal sinirlerin aktivasyonuna neden olur ve bu da nörojenik inflamasyon olarak adlandırılır(69). Nörojenik inflamasyonda akson-refleks hipotezine göre dokunun hasarlanması duysal sinirler aracılığı ile dorsal kök ganglionlarına ve santral sinir sistemine ulaştırılır(70). Santral sinir sisteminde bu uyarı hipotalamus/hipofiz aksını aktive eder ve adrenokortikotropin hormon(ACTH), melanosit uyarıcı hormon(MSH), hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptid(PACAP) veya MIF salınımını uyarır(54,70).

Bu nöromediatörlerin etkisi ile salınan norepinefrin ve kortizol lenfositler, granülositler ve makrofajlar gibi immün hücreleri etkilemektedir. Bu immün hücrelerden salınan sitokinler, kemokinler ve nöropeptidler derinin inflamatuvar cevabını düzenler(70). Derinin bu nöro-immun endokrin ilişkisinin ortaya çıkması son zamanlarda kutanöz patolojilerde bu aksında rolünün olabileceğini gündeme getirmiştir. Lydaia M. ve arkadaşlarının(54) yapmış olduğu literatür çalışmasında yara iyileşmesi sürecinde nöronal dengesizliğin patolojik skar oluşumunda iki tip sonuca neden olmaktadır; birincisi artmış sinir lifleri, pro-inflamatuvar nöropeptidler ve ekstrasellüler matriks ile karakterize olan fibrproliferatif skarlar, ikincisi ise bu parametrelerin azalması ile karakterize olup yanık yaralarında görülmektedir. 2004 yılında Zhi Liang ve arkadaşlarının(72) kırmızı duroc domuzlarında yapmış oldukları hipertrofik skar modelinde oluşan hipertrofik skarlarda sinir yoğunluğunun artmış olduğunu göstermişlerdir ve bu kutanöz sinir sisteminin aşırı skar oluşumunda etkili olabileceğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Henüz hipertrofik skar ve MIF'in nörojenik inflamasyondaki rolü ile ilgili bir çalışma olmamasına rağmen MIF'in multiple skleroz(MS)lu hastların aktif MS lezyonlarında MIF düzeyinin artmış olmasına ilaveten IL-6, IL-1 β , TNF- α ve iNOS sentazın artmış olduğu ve nöroinflamasyonda önemli role sahip bir transkriptör faktörü indüklediği görülmüştür(71). Yukarıda da bahsedildiği üzere bu aksta rol alan MIF'in nörojenik inflamasyon yolağında da direkt veya indirekt yolla etkili olabileceğini düşündürmektedir.

HTS gelişim mekanizmasında MIF'in rolü hakkındaki çelişkili sonuçlar yara iyileşmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda da görülmüştür. Zhao ve arkadaşlarının(32) MIF defektif farelerde oluşturdukları eksizyonel yara modelinde yara iyileşmesinin geciktiğini ve yine diyabetik ve MIF defektif farelerde oluşturulan yaraların MIF- emdirilmiş jelatin bantlar uygulanması ile yara iyileşmesinin hızlandığını bildirmişlerdir. Buna karşılık yapılan bazı çalışmalarda MIF geninin defektif olması tek başına insizyonel yara iyileşmesini artırmadığı veya inhibe etmediği yönündedir(62). Bunun olası nedeninin ise yara modellerinin insizyonel veya eksizyonel olduğudur. Ashcroft /Hardman çalışma gruplarının bu çelişkiyi ortadan kaldırarak için yapmış oldukları çalışmada hem insizyonel hem de eksizyonel yara modelleri kullanılmışlardır(35,66). Bu çelişkili sonuçların kullanılan rekombinant

MIF ve anti-MIF antikorlarına, yara modeline, veriliş şekline, dozuna ve uygulanma zamanı ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara rağmen teknik değişikliklerin bu kadar farklı sonuç vermesi hala bir tartışma konusudur. Bu tartışmalı sonuçlara rağmen herkes tarafından kabul gören hipotez MIF'in yara iyileşmesini önemli bir düzenleyicisi olduğu yara iyileşmesinde etkili olan birçok genin direk ekspresyonunu etkilemekte ve ilaveten hücre çoğalması, farklılaşması apoptozis mekanizmalarını da direk etkilemektedir(35).

Çalışmamızda hipertrofik skar gelişim sürecinde MIF ekspresyon düzeylerinin saptanması hedeflenmiş olup bu amaçla daha önce Yang ve arkadaşları tariflenen ve sonrasında Wang ve arkadaşları(36) ile Momtazi ve arkadaşları(37) tarafından detaylı bir şekilde çalışılan nude fare modelinde oluşan hipertrofik skar modeli kullanılmıştır. Bu hayvan modelinin insandaki hipertrofik skar ile benzer özellikleri taşıması ve uzun süre hipertrofik değişiklikleri koruması nedeniyle tercih edilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda transplante edilen ksenogreftler kısmi kalınlıklı ve tam kalınlıklı olarak kullanılmıştır. Çalışmamız öncesinde yaptığımız pilot çalışmada 0,4mm'lik, 1,2mm'lik kısmi kalınlıklı ve tam kalınlıklı deri greftlerinin adaptasyonu ve takiplerinde HTS gelişme potansiyali 1,2 mm'lik kısmi kalınlıklı deri grefti kullanılan grupta daha belirgin olması üzerine çalışmamızda 1,2 mm'lik kısmi kalınlıklı deri grefti kullanılmıştır. Oluşan skarlar histolojik inceleme ile gösterilmiştir. Literatürde yayınlanan benzer çalışmalarda nude fareninin derisi temel alınarak HTS karşılaştırılması yapılmıştır(36,37). Bu çalışmalar referans alınarak histolojik inceleme için kontrol grubu nude fare cildinden alınan örneklerin dermis kalınlığı kullanılmıştır. Çalışmamızda makroskopik ve histolojik olarak ksenogreftin etraf normal deriden daha yüksek olduğu görülmüştür. Nitekim yapılan karşılaştırmada literatür ile uyumlu olarak skar kalınlığında artış gözlemiştir ve skarın 7 ay boyunca kalıcı olduğu görülmüştür. 7. ayda ise skarın iyice azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgu Yang ve arkadaşlarının(48) 2006 yılında tarifledikleri nude fare hipertrofik skar modeli ile benzerdir. Onların yapmış oldukları çalışmada oluşan hipertrofik skarların 6. ayda yumuşadığı, skar dokusunun azaldığı ve düzensiz kollajen yapısının kaybolmaya başladığı görülmüştür. Benzer değişiklikler Wang ve arkadaşlarının(36) yapmış olduğu çalışmada da gösterilmiştir. 21. gündeki histolojik değişiklikler bu ksenogreftin fare sırtına adapte olduğu, greftin yaşadığının ve

hipertrofinin yeni yeni başladığının göstergesidir. 21. güne ait bulgular arasındaki kıl kökü ve yağ bezlerinin kaybolduğu, dermal papilla girintilerinin ise azalması bunun kanıtıdır.

Histolojik olarak hipertrofi ile uyumlu olduğu görülen bu skarlardan MIF ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. MIF ve aşırı skar oluşumu ile ilgili bulunan tek çalışma Ong ve arkadaşlarına ait olup MIF düzeylerinin keloidlerde normal cilde göre daha yüksek oranda olduğunu gösteren çalışmadır(56). Çalışmamızda da MIF ekspresyon düzeyleri hipertrofik skar gelişimi sürecinde kontrol grubu olarak kullanılan normal cilde göre yüksek bulunmuştur. 3. günde belirgin artış olmamakla birlikte 21. günde bu artış nerdeyse 3 kat olmuştur ve 2. ayda ise kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen artışta azalma görülürken 4. ayda maksimuma ulaşmış, 5. ve 7. aylarda düşme eğiliminde olup salınım düzeyleri arasında belirgin fark gözlenmemiştir. Çalışmamızda gözlenen bu bifazik salınım paterni R. Abe ve arkadaşlarının(11) yaptıkları yara iyileşmesi ile ilgili çalışmada iyileşmenin erken döneminde gözlenmişlerdir. Yaralanmadan 1 saat sonra MIF mRNA ekspresyonu artmaya başladığı ve 3. saatte maksimuma ulaştığı; 6. saatte hızlıca düştüğü, ardından MIF ekspresyonun 24. saatte tekrar artmaya başladığı ve 48. saatte tekrar düştüğü görülmüştür. MIF'in bu çan eğrisi şeklinde salınımı onun karakteristik özelliklerinden biri olup düşük ve yüksek konsantrasyonlarının hücresel olaylarda birbirinden farklı düzenleyici etkisi olabileceğini düşündürmüştür(30). Ancak çalışmamızda gözlenen bu artışlar yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmamıştır. Çalışmada HTS'deki MIF düzeyleri ile kontrol grubu olarak kullanılan normal derinin MIF değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması gruplardaki denek hayvan sayısının azlığına bağlı olabileceği düşünülmüştür. İlaveten anlamlı düzeyde olmayan bu artışın aynı zamanda MIF'in HTS oluşumunu düşük düzeylerde tetikleyebileceğini de düşündürmüştür. Nitekim yapılan çalışmalarda MIF'in aşırı ekspresyonun proinflamatuvar özelliğini inhibe ettiği iddia edilmiştir(30).

Günümüze kadar HTS'a ait kollajen, fibroblast ve büyüme faktörleri hakkında birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen hala patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır ve bu nedenle de tam bir tedavisi bulunamamıştır(55). Gauglitz ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladıkları çalışmada HTS'ların cerrahi sonrası

görülme insidansı %40 ile 70 arasında iken bu oran yanık travmalarında %91 olarak belirtilmiştir(5). Lawrence ve arkadaşlarının(63) 2012 yılında yayınlamış olduğu çalışmada ise yanık travmalarında bu oran %32-71 arasında değişmektedir. İnsidansı bu kadar yüksek olan fibroproliferatif skarların ağrı, kaşıntı, ülserasyon, eklemlerde fonksiyon kaybı gibi fiziksel etkilerinin yanısıra boyutlarına bakılmaksızın hastalar üzerinde önemli estetik, sosyal ve psikolojik etkileri olmaktadır(54). Bu nedenle etkin bir tedavi bulma veya önleme amaçlı yapılan çalışmalar devam etmektedir. Moleküler ve genetik alanda teknolojik gelişmelere rağmen hipertrofik skarın insanlara özgü olması ve uzun sürede meydana gelmesi altında yatan mekanizmayı çözmeyi zorlaştırmaktadır. Bu amaçla günümüze kadar birçok hayvan modeli tanımlanmış, hücre kültürü ortamlarında özellikle fibroblastların davranışları araştırılmış, birçok büyüme faktörü ve sitokinlerin etkileri ortaya konmuştur.

Yukarıda da bahsedildiği gibi günümüze kadar tanımlanan olası hipertrofik skar gelişim mekanizmalarının hepsinde MIF bir şekilde yer almaktadır. T. Shimizu'nun(53) yapmış olduğu çalışmada trombin ve FXa'nın insan dermal endotelal hücrelerinde MIF'in ekspresyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Bu da MIF'in trombin ve FXa aracılığı ile inflamatuvar fazda rol oynadığını düşündürmektedir. Chesney ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise MIF'in angiogenezi indüklediği ve VEGF ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar ele alındığında MIF'in yara iyileşmesinin anahtar rolü olan neovaskülarizasyon ve granülasyon dokusunun oluşmasında rol aldığını düşündürmektedir. Bunlara ilaveten p53 inhibisyonu ile hücre apoptozunu inhibe etmesi, Th 2 cevabını tetiklemesi ile immunolojik cevapta rol alması(52), TNF- α artışı ile birlikte inflamatuvar cevabı şiddetlendirmektedir. İlaveten embriyonik dönemde skarsız iyileşmeden skar oluşturarak iyileşme dönemine geçiş zamanı MIF'in eksprese edilmeye başladığı zamanla aynı olması sadece bir tesadüf olmadığını göstermektedir(34). Yara iyileşmesinin tüm fazlarında etkili olan MIF'in hipertrofik skarda da anahtar role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Fibrozis ile seyreden ARDS, glomeruloskleroz, sistemik skleroz, ateroskleroz da MIF'in önemli role sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(30, 53, 73).

Çalışmamızda oluşturulan HTS örneklerinde MIF düzeylerinin artmış olması MIF'in HTS gelişiminde rolü olabileceğini desteklemektedir. Ancak yukarıda da

bahsedildiği üzere MIF birçok mekanizmayı etkilemektedir. Fibrotik cevabı indüklediğini gösteren çalışmaların yanı sıra tam tersi eksikliğinde yara iyileşmesini geciktirdiğini gösteren bulgular da mevcuttur. Bu zıt sonuçlar MIF'in düşük ve yüksek konstrasyondaki etkinliğinin farklı olduğunu desteklemektedir. Nitekim çalışmamızda da MIF düzeylerinde sistematik bir artış veya azalma yerine bifazik artış görölmüşür. MIF'in aşırı ekspresyonu JAB-1 aracılı AP-1 kompleksini destabilize ederek proinflamatuvar etkisini inhibe ettiği düşünölmektedir(30). Bu da çalışmamızda MIF düzeylerinin erken dönemde düşük olması ile MIF'in inflamatuvar cevapta etkili olduğunu desteklemektedir. Geç dönemdeki MIF artışlarının ise bu dönemde artışı ile HTS'da etkili olan MMP-2 ile korele olduğu düşünölmektedir. Sonuç olarak MIF'in HTS'ın bütün dönemlerini etkilediği ve HTS'da anahtar role sahip olduğu düşünölmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız hipertrofik skar ve MIF ilişkisini gösteren ilk ve ön çalışma niteliğindedir. Çalışmada oluşturulan HTS dokularında MIF ekspresyonunda bifazik artış olduğu bunun literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırmalar temel alındığında ise MIF'in HTS oluşumunda anahtar role sahip olduğunu düşündürmüştür. Ancak günümüze kadar açıklanan tüm hipertrofik skar mekanizmalarında yer alan ve yara iyileşmesinde anahtar role sahip olan MIF'in hipertrofik skardaki gerçek rolü hakkında daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Böylelikle MIF'in hangi konsantrasyonda hangi mekanizma üzerinden etkili olduğunu bulunarak HTS tedavisi veya önlenmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Afshar, M. and R.L. Gallo, Innate immune defense system of the skin. *Veterinary Dermatology*, 2013. 24(1): p. 32-e9.
2. Zhong, S.P., Y.Z. Zhang, and C.T. Lim, Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2010. 2(5): p. 510-525.
3. Gauglitz, G.G. and M.G. Jeschke, Combined Gene and Stem Cell Therapy for Cutaneous Wound Healing. *Molecular Pharmaceutics*, 2011. 8(5): p. 1471-1479.
4. Sgonc, R. and J. Gruber, Age-Related Aspects of Cutaneous Wound Healing: A Mini-Review. *Gerontology*, 2013. 59(2): p. 159-164.
5. Gauglitz, G.G., et. al., Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies, *M o l M e d*, 2011. 17 (1 - 2):p. 1 1 3 - 1 2 5
6. Urioste S. S., Kenneth A. Arndt, and Jeffrey S. Dover, Keloids and Hypertrophic Scars: Review and Treatment Strategies, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, (1999) 18, 2: p 159-171
7. Zhu, Z., et al., The molecular mechanism of hypertrophic scar. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2013.
8. Wang Rijian, et. al., Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor- β 1 mRNA and protein than normal skin and cells, *Wound Repair and Regeneration*, 2000. 8, 2:p. 128-136
9. Lue Hongqi, Robert Kleemann, Thierry Calandra, Thierry Roger, Jürgen Bernhagen, Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease, *Microbes and Infection* 4 (2002) 449–460
10. Dewor, M., et al., Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes fibroblast migration in scratch-wounded monolayers in vitro. *FEBS Letters*, 2007. 581(24): p. 4734-4742.

11. Abe Riichiro, Tadamichi Shimizu, Akira Ohkawara, Jun Nishihira, Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts, *Biochimica et Biophysica Acta* 1500 (2000): p.1
12. Shimizu T, Ogata A, Honda A, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Zhao Y, Shimizu H. Expression of macrophage migration inhibitory factor in rat skin during embryonic development. *Exp Dermatol* 2005; 14: 819–823.
13. Baugh John A., Richard Bucala, Macrophage migration inhibitory factor, *Crit Care Med* 2002. 30, 1:p. s27-s35
14. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 2009. 37(5): p. 1528-1542.
15. Profyris, C., C. Tziotzios, and I. Do Vale, Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2012. 66(1): p. 1-10.
16. Broughton, G., J.E. Janis, and C.E. Attinger, The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2006. 117(SUPPLEMENT): p. 12S-34S.
17. Guo, S. and L.A. DiPietro, Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 2010. 89(3): p. 219-229.
18. Stephen J. Mathes, second edition, vol.1 p: 209-218
19. Guo, L., et al., PTEN inhibits proliferation and functions of hypertrophic scar fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011. 361(1-2): p. 161-168
20. Armour, A., P.G. Scott, and E.E. Tredget, Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment. *Wound Repair and Regeneration*, 2007. 15(s1): p. S6-S17.
21. Honardoust, D., et al., Reduced Decorin, Fibromodulin, and Transforming Growth Factor- β 3 in Deep Dermis Leads to Hypertrophic Scarring. *Journal of Burn Care & Research*, 2012. 33(2): p. 218-227.

22. Sarrazy, V., et al., Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair and Regeneration*, 2011. 19: p. s10-s15.
23. Ivan Stamenkovic Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases *The Journal of Pathology* 2003
24. Manuel, J.A. and B. Gawronska-Kozak, Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biology*, 2006. 25(8): p. 505-514.
25. S. Tanriverdi-Akhisaroglu, A. Menderes and G. Oktay Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities in human keloids, hypertrophic and atrophic scars: a pilot study *Cell Biochemistry and Function*, 2009. 27(2):p. 81-87
26. Honardoust, D., et al., Deep Dermal Fibroblasts Refractory to Migration and Decorin-Induced Apoptosis Contribute to Hypertrophic Scarring. *Journal of Burn Care & Research*, 2012. 33(5): p. 668-677.
27. Castagnoli C. et al., Role of T-lymphocytes and cytokines in post-burn hypertrophic scars, *Wound Repair Regen.* 2002.10(2):p107-8
28. Jie Ding, Keijiro Hori, Rainny Zhang, Yvonne Marcoux, Dariush Honardoust, Heather A. Shankowsky and Edward E. Tredget Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 in the formation of postburn hypertrophic scar (HTS). *Wound Repair and Regeneration*,2011. 19(5):p.568-578
29. Hu xiaolong et. al., the role of ERK nad JNK signaling in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production and scar formation. *Arch dermatolo res.*,2013,305:p. 433-445
30. J A Baugh and S C Donnelly, Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation, *Journal of Endocrinology* (2003) 179, 15–23
31. R P Donn, and D W Ray, Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule, *Journal of Endocrinology* (2004) 182, 1–9

32. Yunan Zhao, et. al., Tissue Regeneration Using Macrophage Migration Inhibitory Factor-Impregnated Gelatin Microbeads in Cutaneous Wounds, *American Journal of Pathology*, (2005)167, 6, 1519-1529
33. Xu, L., et al., Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors. *Drug Discovery Today*, 2013.
34. Gilliver, S.C., et al., MIF: a key player in cutaneous biology and wound healing. *Experimental Dermatology*, 2011. 20(1): p. 1-6.
35. Matthew J. Hardman, Alexander Waite, Leo Zeef, Matthew Burow, Toshinori Nakayama, and Gillian S. Ashcroft, Macrophage Migration Inhibitory Factor A Central Regulator of Wound Healing. *American Journal of Pathology*, 2005.167,(6):p.1561-157
36. Wang, J., et al., Human hypertrophic scar-like nude mouse model: Characterization of the molecular and cellular biology of the scar process. *Wound Repair and Regeneration*, 2011. 19(2): p. 274-285.
37. Momtazi, M., et al., A nude mouse model of hypertrophic scar shows morphologic and histologic characteristics of human hypertrophic scar. *Wound Repair and Regeneration*, 2013. 21(1): p. 77-87.
38. Luiza M. Et. Al., is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring?, *journal of burn care&research*, 2008. 29(2):p.363-367
39. Thomas A. Wynn, Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. 117(3): p. 524-529
40. Hochman B, Vilas Bôas FC, Mariano M, Ferreiras LM, Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch, *Acta Cir Bras*. 2005;20(3):200-12.
41. Aksoy MH, A new experimental hypertrophic scar model in guinea pigs. *Aesthetic Plast Surg*. 2002; 26 (5): 388-96.
42. Morris DE, et al., Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. *Plast Reconstr Surg*. 1997 Sep;100(3):674-81.

43. Matsumura H. et al., Cones of skin occur where hypertrophic scar occurs. *Wound Repair Regen.* 2001 ;9(4):269-77.
44. Kathy Q Zhu et. al., The female, red Duroc pig as an animal model of hypertrophic scarring and the potential role of the cones of skin. *Burns* 2003;29: 649-64
45. Gallant CL, Olson ME, Hart DA. Molecular, histologic, and gross phenotype of skin wound healing in red Duroc pigs reveals an abnormal healing phenotype of hypercontracted, hyperpigmented scarring. *Wound Repair Regen* 2004;12:305–19.
46. Zhu KQ, Engrav LH, Tamura RN, et al. Further similarities between cutaneous scarring in the female, red Duroc pig and human hypertrophic scarring. *Burns* 2004;30:518–30.
47. Stewart CJ, Gallant-Behm CL, Forrester K, Tulip J, Hart DA. Kinetics of blood flow during healing of excisional fullthickness skin wounds in pigs as monitored by laser speckle perfusion imaging. *Skin Res Technol* 2006;12:247–53.
48. Yang, D.Y., et al., Establishment of a Hypertrophic Scar Model by Transplanting Full-Thickness Human Skin Grafts onto the Backs of Nude Mice. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2007. 119(1): p. 104-109.
49. Lundvig, D.M.S., S. Immenschuh, and F.A.D.T.G. Wagener, Heme Oxygenase, Inflammation, and Fibrosis: The Good, the Bad, and the Ugly? *Frontiers in Pharmacology*, 2012. 3
50. Mohammad Reza Namazi, Mohammad Kazem Fallahzadeh, and Robert A. Schwartz, Strategies for prevention of scars: what can we learn from fetal skin? *International Journal of Dermatology* 2011, (50), 85–93
51. Gawronska-Kozak, B., et al., Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair and Regeneration*, 2006. 14(3): p. 265-276.

52. Javeed A, Zhao Y, Zhao Y., Macrophage-migration inhibitory factor: role in inflammatory diseases and graft rejection. *Inflamm Res.* 2008;57(2):45-50
53. Shimizu, T., Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. *Journal of Dermatological Science*, 2005. 37(2): p. 65-73
54. Lydia M. Ferreira, Alfredo Grangnani, Fabianne Furtado, and Bernardo Hocman, Control of the skin scarring response, *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2009) 81(3):p. 623-629
- 55- Zhu KQ, Carrougher GJ, Gibran NS, Isik FF, Engrav LH, Review of the female Duroc/Yorkshire pig model of human fibroproliferative scarring. *Wound Repair Regen.* 2007;15 (1):S32-9
56. Ong, C.T., et al., Comparative proteomic analysis between normal skin and keloid scar. *British Journal of Dermatology*, 2010. 162(6): p. 1302-1315.
57. Washio, H., et al., Transcriptional Inhibition of Hypertrophic Scars by a Gene Silencer, Pyrrole–Imidazole Polyamide, Targeting the TGF- β 1 Promoter. *Journal of Investigative Dermatology*, 2011. 131(10): p. 1987-1995.
58. Kleemann R et al., Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature.* 2000;408(6809):211-6.
- 59- Ihn, H., Autocrine TGF- β signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*, 2008. 49(2): p. 103-113.
60. Gawronska-Kozak, B., Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biology*, 2011. 30(4): p. 290-300.
61. Pakozdi A. et. al., macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis research&therapy*, 2006.8(4):p.1-14
62. Emmerson, E., et al., Unique and Synergistic Roles for 17 β -Estradiol and Macrophage Migration Inhibitory Factor during Cutaneous Wound Closure Are Cell Type Specific. *Endocrinology*, 2009. 150(6): p. 2749-2757.

63. Lawrence, J.W., et al., Epidemiology and Impact of Scarring After Burn Injury. *Journal of Burn Care & Research*, 2012. 33(1): p. 136-146
64. Baumann, R., Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *The FASEB Journal*, 2003. 17(15): p. 2221-2230.
65. J.-Y. Kim et al. Up-regulated macrophage migration inhibitory factor protects apoptosis of dermal fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 2008. 152: 328–335
66. Ashcroft, G.S., et al., Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. 111(9): p. 1309-1318.
67. Leung JCK. et. al., Anti-macrophage migration inhibitory factor reduces transforming growth factor-b1 expression in experimental IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. 19(8): p.1976–1985
68. Steinhoff M. et. al., Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*. 2003;139(11): p.1479-88.
69. Barbara Zegarska, Agnieszka Lelińska, Tomasz Tyrakowski, Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacological reports*,2006. 58: 13-21
70. Roosterman D. et al., Neuronal Control of Skin Function:
The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ, *Physiol Rev*, 2006. 86: 1309-1379
71. Cox GM et. al., Macrophage migration inhibitory factor potentiates autoimmune-mediated neuroinflammation. *J Immunol*. 2013,1;191(3):1043-54.
72. Zhi Liang, et al., Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar, *Burns*. 2004, 30, (1) , P: 57-64
73. Leilani L. Santos, Eric F. Morad, Macrophage migration inhibitory factor: A key cytokine in RA, SLE, and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 2009. 399: 1-7

