

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TAVŞAN AŞIRI DERMAL SKARLAŞMA MODELİNDE
DUYU DENERVASYONUNUN ETKİLERİ:
KANTİTATİF DEĞERLENDİRMELER**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Çağlayan YAĞMUR**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ethem GÜNEREN**

SAMSUN- 2009

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında tam desteğini ve yapıcı eleştirilerini esirgemeyen değerli insan ve tez danışmanı hocam Sayın Doç. Dr. Ethem GÜNEREN'e, araştırma görevliliğim boyunca tüm acemiliklerime anlayış ve sabırla yaklaşan değerli hocam bölüm başkanı Sayın Doç. Dr. Lütü EROĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Ahmet DEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Yener DEMİRTAŞ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Volkan TAYFUR'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Tekin ŞİMŞEK'e teşekkürü borç bilirim.

Sayın Prof. Dr. Murat HÖKELEK'e, tez çalışmamın laboratuvar sürecini bizzat yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet KEFELİ'ye, Sayın Vet. Dr. Fadime YETKİN'e, cerrahi araştırma merkezinin ve patoloji laboratuvarının değerli teknisyenlerine teşekkür ederim.

Araştırma görevliliğim boyunca benden desteğini esirgemeyen biricik eşime, anneme, kardeşlerime ve beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Babam Dr. İsmail Safa YAĞMUR'un anısına...

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
RESİM DİZİNİ	III
ŞEKİL VE TABLO DİZİNİ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
A. Dermisin Moleküler Bileşimi	3
B. Normal Yara iyileşmesi	3
C. Proliferatif Skarlaşma (Aşırı Yara İyileşmesi)	15
D. Enflamasyon ve Proliferatif Skarlaşma İlişkisi	19
E. Nöropeptidlere Bağlı Enflamasyon ve Nöropeptidlerin Skarlaşmaya Etkisi	20
F. Tavşan Kulağında Aşırı Dermal Skarlaşma Modeli	28
GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
1-Cerrahi teknik	30
1-1 Denerve ve İntakt Kulak Gruplarının Elde Edilmesi	30
1-2 Kulaklara "Aşırı Dermal Skarlaşma Yara Modeli"nin Uygulanması	36
2-Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Biyopsi Materyallerinin Temini	39
3-Histomorfometrik, Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal İnceleme	40
3-1 Görüntü Analiz Programı Yardımıyla SEE nin Ölçümü	40
3-2 Skar Kesitlerinde Enflamasyon Puanlaması	42
3-3 Yara Kontraksiyonunun Ölçümü ve Epitelizasyon Zamanı	42
4-İstatistiksel Analiz	42
BULGULAR	43
TARTIŞMA	51
SONUÇ	56
KAYNAKLAR	57

RESİMLER

- Resim 1** : Edwin-Smith Papirüsü
- Resim 2** : Ameliyat öncesi hazırlık ve aurikulokraniyal sulkusların işaretlenmesi
- Resim 3** : Küçük oksipital Sinir ve Büyük Aurikular Sinir diseksiyonu
- Resim 4** : Sinirlerin komşuluğundaki arter ve ven yapıların korunması.
- Resim 5** : Aurikulokraniyal sulkus insizyonları ve sinir diseksiyonları.
- Resim 6** : Denervasyon amacıyla sinir eksizyonundan önce ipek sutür ile bağlama ve ölçüm.
- Resim 7** : Sağ kulağın Küçük Oksipital Sinir ve Büyük Aurikular Sinir' inden eksizyon .
- Resim 8** : **A:** Kulağın anterior 1/3 proksimalinde bilateral horizontal cilt –cilt altı kesisi.
B: Sağ tarafta insizyondan proksimal tabanlı olarak kaldırılan cilt flebi.
C: Flebin üzerinde ve zemindeki ince sinir ve damar demetlerinin koterizasyonu
- Resim 9** : 14. gün sonunda dişsiz forseps yardımıyla kulak cildinde duyu muayenesi
- Resim 10** : **A:** 7 mm lik panç biyopsi aleti. **B:** Panç aleti ile yara sınırlarının oluşturulması
- Resim 11** : Epidermis- dermis ve perikondrium tabakalarının büyütme altında uzaklaştırılması
- Resim 12** : Her kulakta 4 adet, bir hayvanda toplam 8 adet yara oluşturulması
- Resim 13** : İntakt ciltte sinirlerin immunhistokimya ile değerlendirilmesi için yaralara eşit uzaklıktan spesimen alınması
- Resim 14** : Histomorfometrik ve histopatolojik değerlendirme için her bir skarın en yüksek noktasından kesit alınması(biseksiyon).
- Resim 15** : “Image J” programı kullanılarak SEE nin hesaplanması
- Resim 16** : Yara modelinin uygulanmasından 28 gün sonra aynı hayvanda sağ ve sol taraftaki skarların makroskopik görüntüsü.
- Resim 17** : Cilt bölgeleri ekstrakorporal olarak incelendiğinde sol taraftaki skar kabarıklığı farkının belirginleşmesi.

ŞEKİLLER

- Şekil 1** : Yara iyileşmesinin fazları
- Şekil 2** : Ciltte serbest sinir sonlanmaları
- Şekil 3** : “Akson refleksi” mekanizmasının şematik anlatımı.
- Şekil 4** : Serbest sinir sonlanmalarının uyarılmasıyla oluşan nörojenik enflamasyonun aşırı skarlaşma ile ilişkisi.
- Şekil 5** : Büyük Aurikular Sinir ve Küçük oksipital Sinir
- Şekil 6** : Kesitlerde “Skar Elevasyon Endeksi”(SEE) nin hesaplanması.
- Şekil 7** : SEE ortalama değerlerinin grafik karşılaştırması.
- Şekil 8** : Son yara genişliğinin karşılaştırılması
- Şekil 9** : Epitelizasyon zamanının karşılaştırılması
- Şekil 10** : Enflamasyon puanlarının karşılaştırılması

TABLolar

- Tablo 1** : Yara iyileşmesinde etkili başlıca enflamatuar sitokinler
- Tablo 2** : Enflamasyon puanlaması cetveli
- Tablo 3** : Denerve gruba ait, SEE, yara çapı ve epitelizasyon zamanı verileri
- Tablo 4** : İntakt gruba ait, SEE, yara çapı ve epitelizasyon zamanı verileri
- Tablo 5** : SEE ölçümlerinde iki gruba ait ortalama değerler ve standart deviyasyonlar

ÖZET

Cildin aşırı skarlaşmasının patofizyolojisi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Ciltteki serbest sinir sonlanmalarının uyarılmasıyla salınan nöropeptidler, enflamasyon hücreleri de dahil birçok hücreyi uyararak "aşırı skarlaşma"ya neden olabilir. Belirli bir cilt bölgesine duyu denervasyonu oluşturmak nöropeptid miktarını azaltır. Bu çalışmada, tavşan kulağında tanımlanmış bir "aşırı dermal skarlaşma modeli" kullanarak denervasyonun dermal skarlaşmaya olan etkisi incelendi.

Çalışmamızda, 16 adet dişi beyaz Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Denerve edilmiş ve intakt iki farklı grup elde etmek amacıyla, her hayvanın sağ kulağına ait "santral aurikular sinir" ve "küçük oksipital sinir" den 1 cm eksizyon yapıldı. Aynı insizyonlar ve diseksiyonlar sol tarafa da uygulandı. Ancak bu tarafta sinirler intakt bırakıldı. 14 gün sonunda kulaklar arasında belirgin duyu farkı vardı. Ardından, her iki kulakta 4'er adet (1 tavşanda toplam 8 adet) "aşırı skarlaşma modeli"ne uygun 7 mm çapında yara oluşturuldu. Günlük pansuman ve gözlem yapıldı ve yaraların tam epitelizasyon süresi kaydedildi. Yara oluşturulmasından sonraki 28. günde hayvanlar sakrifiye edilerek dokular çıkarıldı. Gruplar, skar elevasyon indeksi (SEE), yara kontraksiyon miktarı ve enflamasyon skorları bakımından değerlendirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ayrıca, her iki grupta aurikulokraniyal sulkusun distalindeki intakt dermiste sinir dokusunun immün histokimyasal değerlendirmesi yapıldı.

Histolojik değerlendirmede, intakt (sol) skarların SEE değerleri denerve (sağ) skarlara göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,05$). Gruplar arasında epitelizasyon, yara kontraksiyonu ve enflamasyon skorları açısından anlamlı fark tespit edilmedi ($p < 0,05$). Denerve (sağ) taraftaki immunhistokimya incelemesinde sinir yoğunluğunda fark gözlenmedi.

Literatürde "denerve dokularda yara iyileşmesi" konusunda çalışmalar mevcut olsa da, "duyu denervasyonunun skarlaşmaya olan etkisi"ni kantitatif olarak ölçen deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, denervasyon ve azalmış dermal skarlaşma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi. Denervasyona bağlı dokudaki nöropeptid miktarının azalması bu sonuç için uygun bir açıklama olabilir.

Anahtar Kelimeler: Keloid, Hipertrofik Skar, Aşırı Skarlaşma, Denervasyon, Nöropeptid, Nörojenik Enflamasyon.

SUMMARY

The pathophysiology of excessive dermal scarring remains uncertain in many aspects. The neuropeptides from free nerve endings may potentially cause excessive scarring by activating inflammatory cells besides many type of skin cells. Selective sensory denervation of a skin region may impair the secretion and effect of neuropeptides. Our purpose is to quantify the “effect of denervation on dermal scarring” by using an “rabbit ear excessive dermal scarring model”.

16 New Zealand White Rabbits are used. For obtaining denervated and control groups, denervation of the right ears are performed mainly by 1cm excision of “central auricular” and “lesser occipital” nerves. Same incisions and dissections are also made to the left sides without any nerve excision. Comparable denervation accomplished in all subjects. After 14 days, application of “excessive dermal scarring model” on both ears is performed. A second follow up for 28 days is ended by sacrifice. Scars are evaluated by H&E staining for Scar Elevation Index (SEI) measurement, wound contraction and inflammation scoring. Also epithelization time is recorded and immunohistochemical staining for nerve bundles is performed .

Histomorphometrical evaluation (SEI measurement) yielded significant difference between groups depicting a clear connection between denervation and decreased scarring. The measurements of epithelization time, wound contraction and inflammation scoring yielded no difference. Immunohistochemical staining of intact skin regions showed no difference between dermal nerve bundle density.

Although studies concerning “wound healing in denervated tissue” exist in literature, “the effect of denervation on scarring quantity” has not been studied experimentally. To our findings, denervation and reduced scarring shows strong correlation. Which may be attributed to possible depletion of tissue neuropeptide levels and impaired sensory transmission.

Key Words: Keloid, Hypertrophic Scar, Excessive Scarring, Denervation, Neuropeptide, Neurogenic Inflammation.

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Yara iyileşmesi, birçok hücre çeşidinin rol aldığı, hücreler arasında ve hücreler ile matris arasında kesintisiz bir etkileşimin olduğu karmaşık bir süreçtir ^(1,2). Bu süreç incelemeyi kolaylaştırmak amacıyla, enflamasyon, proliferasyon ve maturasyon fazlarına ayrılır ^(3, 4, 5). Enflamasyon fazı, hemostaz ve enflamasyon oluşumu ile karakterizedir. Proliferasyon fazında, epitelizasyon, anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumu ve kollajen depolanması başlıca olaylardır. Son sırada yer alan maturasyon fazında ise iyileşen yaraya ait skar dokusu şekillendirilir (remodelling). Ancak bu süreç her zaman “kendini sınırlamış bir skar dokusu” oluşumuyla sonuçlanmaz. Dermiste, yoğunlaşan hücre miktarına eşlik eden kollajen sentezindeki artışla beraber kollajen yıkımının azalması “aşırı skar” oluşumuyla sonuçlanabilir ⁽⁶⁾. Aşırı skarlaşma, sadece insanda görülen fibroproliferatif bir hastalıktır ^(7, 8). Oluşan kabarık, eritemli ve sert yapılı skar dokusu, kaşıntı ve ağrının yanı sıra ciddi fonksiyonel ve estetik problemlere de neden olur ⁽⁷⁾.

Enflamasyonun etkisi yara iyileşmesinin başlangıç döneminde ortaya çıkar ve proliferasyon fazının başlamasıyla azalarak sonlanır diye bilinmesine rağmen, enflamasyonun yara iyileşmesini uyararak ve koordine ederek tüm yara iyileşme fazları boyunca sürdürdüğü iddia edilmektedir⁽³¹⁾. Enflamasyon, bir yandan enfeksiyona karşı doğal bir koruma sağlarken diğer yandan iyileşme için gerekli olan “bağ doku oluşumu”nu (fibrozis) uyarır ⁽¹³⁸⁾. Proliferatif skarlaşma artmış ve uzamış enflamasyon yanıtı ile ilişkilidir.

Aşırı skar oluşumunda, sinir sonlanmalarından salınan nöropeptidlerin rolü giderek daha fazla dikkat çekmektedir ^(9,10,11). Deride sonlanan sinir uçlarının (C ve A δ lifleri), uyarılması, “antidromik” (ters yönde oluşan) aksiyon potansiyelleri oluşturur. Bu aktivite, sinir sonlanmalarından Substans P (SP) ve Calcitonin Gene Related Protein (CGRP), Nörokinin A (NKA), Vazoaktif İntestinal Peptide (VIP) ve Somatostatin (SOM) gibi nöropeptidlerin hücrelerarası mesafeye salınımına sebep olur. Nöropeptidler, sinir uçlarından salındıklarında, eritem, ödem, hipertermi ve kaşıntı ile karakterize enflamasyon oluştururlar ^(9,12). Sinir uyarılmaya devam ettikçe bu mekanizma devam eder ve kronik enflamasyon tetiklenebilir ^(9,10). Enflamasyonun yanı

sıra, nöropeptidlerin fibroblastların proliferasyonunu ve aktivasyonunu doğrudan artırıcı özellikleri de vardır (13,14).

Bu çalışmada, denervasyonun aşırı dermal skarlaşma üzerindeki etkisini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek amaçlandı. Literatürde benzer bir çalışma bulamadık. Çalışmamız, "tavşan kulağında aşırı dermal skarlaşma modeli (15) " kullanılarak planlandı.

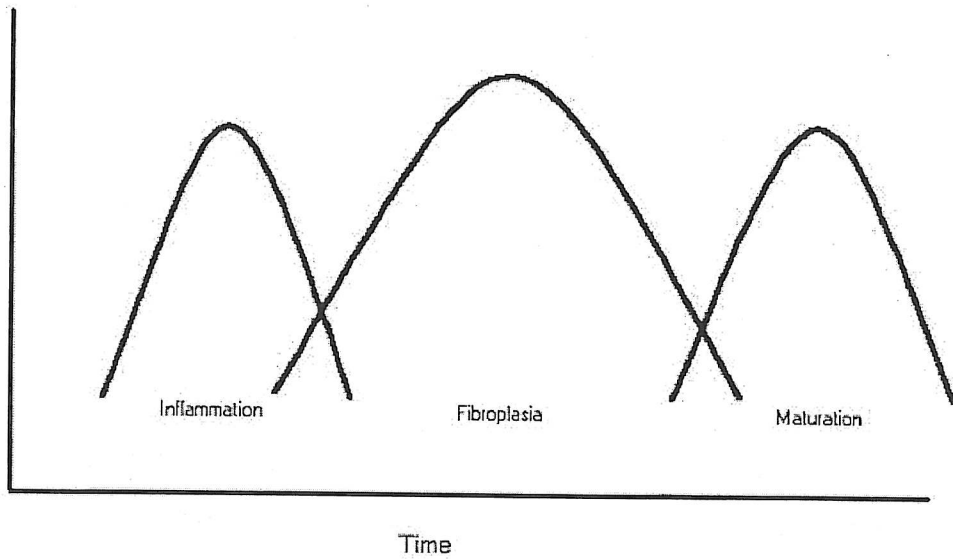
2- GENEL BİLGİLER

A- Dermisin Moleküler Bileşimi

Dermisin kuru ağırlığının yaklaşık %80'i kollajenden oluşur ⁽¹⁶⁾. Geri kalan maddeler; lipid, elastin, proteoglikanlar (PG), hyaluronik asit(HA) ve yapısal glikoproteinlerdir. Dermiste başlıca kollajen tipleri Tip I ve Tip III tür ^(17, 18). Toplam kollajenin yaklaşık % 80 i Tip I kollajendir ve dermisin gerime dayanıklılığını sağlar ⁽¹⁹⁾. Normal iyileşmede, yaralanmadan sonraki 1. haftada toplam kollajenin yaklaşık % 60 ı Tip III iken bu oran olgunlaşmış skarlarda %30 lara düşer ⁽²⁰⁾. Hipertrofik skarlarda ise başlangıçtaki yüksek Tip III kollajen oranları sabit kalır ⁽²¹⁻²⁵⁾. Dermiste çok sayıda proteoglikan (PG) ve Glikozaminoglikan (GAG) tipi bulunur. Kondrotin 4 ve/veya 6 sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat ve heparin bunlardan en önemlileridir ⁽²⁶⁻²⁹⁾.

B- Normal Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, birçok değişik hücre tipinin yanı sıra çözünebilen medyatörlerin ve ekstrasellüler matriksin dâhil olduğu dinamik bir süreçtir. Bu sürecin tüm bileşenleri, koagülasyon, enflamasyon, fibroplazi, kollajen depolanması, epitelizasyon, skar kontraksiyonu ve maturasyon fazlarıdır ⁽³⁻⁵⁾. Süreçler keskin sınırlarda olmayıp birbirleriyle geçişmelidirler ⁽³⁰⁾. (Şekil 1)



Şekil 1: Yara iyileşmesinin fazları

1- Enflamasyon Fazı

1-1 Hemostaz

Enflamasyon fazı, hemostaz ve enflamasyon ile karakterizedir. İlk enflamasyon sinyali, yara kenarındaki travmaya uğramış trombositlerin degranulasyonu ile verilir ⁽³¹⁾.

Trombositlerin α granüllerinde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinler:

- PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü)
- TGF- β (transforme edici büyüme faktörü β)
- FGF (fibroblast büyüme faktörü)
- EGF (epidermal büyüme faktörü)
- β -Tromboglobulin
- PF4(trombosit faktör 4)
- PDAF (trombosit kaynaklı anjiogenez faktörü)
- Histamin
- IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü)
- Serotonin
- Bradikinin
- Prostaglandinler
- Prostatiklinler
- Thromboksan
- PAF(trombosit aktivasyon faktörü) olarak sıralanabilir.

Trombositlerin degranulasyonu, hemostazı ve enflamasyonu aynı anda uyarır. Thromboksan A2 ve Prostaglandin 2- α , hasarlanmış kan ve lenf damarlarında ani başlayan ve 2-10 dakika süren vazokonstriksiyon oluşturur ^(3, 32). Başta kollajen olmak üzere, subendotelyumdaki tromboplastik doku ürünleri ekspozit olur ve trombositler hasarlı damarların endotelinde kümeleşirler. Bu esnada, koagülasyon ve kompleman kaskadı başlar. Ekstravasküler hücre yüzeyinde bulunan doku faktörünün etkisiyle intrinsik ve ekstrinsik koagülasyon yolları aktive olur. Protrombin trombine dönüşerek fibrinojeni fibrine çevirir. Sonuçta pıhtı oluşur. Trombosit kümeleşmesi ve pıhtı oluşumu hasarlanmış damarlardan kan sızmasını engeller. Son halini alan pıhtıda, fibrin, kollajen, fibronektin, vitronektin ve trombospondinden oluşan bir matriks içinde trombositler ve diğer kan hücreleri gömülü haldedir ⁽³³⁾. Bu ortam, yara hücrelerinin

(fibroblastlar, nötrofiller, monositler, vasküler endotel hücreleri ve epidermis hücreleri) içinde hareket edeceği geçici bir matriks işlevi görür ^(34, 35).

Trombositlerden salınan medyatörler, vazodilatasyona ve kapiller geçirgenlik artışına neden olurlar. Bu sayede yara bölgesindeki kan akımı artar. Kapiller geçirgenliğin artması; nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri, komplemanlar ve antikorların bölgede kümelenmesini sağlar.

Trombositler geçici yara matriksinin bir bileşeni olan fibronektin salınımında rol alırlar. Fibronektin, enflamasyon hücrelerinin göçünde yol gösterici olarak görev yapar ^(7, 34). Başlangıçta trombositlerce üretilirken ileri safhalarda fibroblastlar, endotel ve epitel hücreleri tarafından üretilir. Aşırı skarlaşma görülen dokularda artmış miktarda fibronektin tesbit edilmiştir ⁽³⁶⁻³⁸⁾.

Pıhtı oluşumuna neden olan uyarı ortadan kalkınca koagulasyon ve trombosit kümeleşmesi durur. Fibrin yapıdaki pıhtının yıkılması proteoliz ile olur. Temizlenen pıhtının yerini, fibronektin ve hyaluronik asitten zengin ikinci yara matriksi alır ⁽³⁹⁾. Pıhtının yıkılması, “yüksek plazminojen aktivatörü (PA) aktivasyonu” ve “düşük plazminojen aktivatör inhibitör1 (PAI-1) aktivitesi” gösteren fibroblastlarca başlatılır. Böylece plazminojen, fibrinoliz yapan plazmine çevrilir.

Keloid dokularından elde edilen fibroblastlarda fibrinoliz işleminde aksaklıklar görülür. Çünkü plazminojen aktivatör seviyeleri düşük, inhibitör aktiviteyi yüksektir ⁽⁴⁰⁾.

1-2 Hücre İnfiltrasyonu

Enflamasyon mediyatörleri (EM), sitokinler ve büyüme faktörleri olarak 2 ye ayrılabilir. Günümüzde yara iyileşmesinde önemli olduğu bilinen EM ler; IL-1 (İnterlökin 1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF (granulosit-monosit koloni stimule edici faktör), G-CSF (granulosit koloni stimule edici faktör), M-CSF (makrofaj koloni stimule edici faktör), MIP-1 (makrofaj enflamatuar protein 1), MCP-1 (monosit kemotaktik protein 1), NAP-2 (nötrofil aktive edici peptid 2), IP-10 (immun protein 10), interferonlar, PDGF, PF4, TGF β ve TNF α (tümör nekroz faktör alfa) dır ⁽³¹⁾. PDGF, aynı zamanda bir “ bağ dokusu büyüme faktörü” dür ⁽³¹⁾. Yara iyileşmesinde etkili başlıca enflamatuar sitokinler **Tablo 1** de verilmiştir.

Yara yerine ilk gelen enflamatuar hücreler nötrofillerdir. Yaralanmadan sonraki 24-48 saat içindeki baskın enflamatuar hücre tipini oluştururlar. Pıhtıdaki trombositler ve nötrofiller tarafından IL-8 ve NAP-2 salınımı, nötrofil kemotaksisini başlatan ilk sinyallerdendir ^(41, 42). Yaralanmanın erken aşamasında, hasarlanmış keratinositlerden ve endotel hücreleri tarafından salgılanan MCP-1, TNF α ve IL-1, nötrofillerin ve monositlerin kemotaksisi sağlarlar ⁽⁴³⁾. Nötrofil kemotaksisinde, FGF ve PDGF gibi bağ dokusu büyüme faktörlerinin de etkisi vardır ^(44, 45).

Pıhtıda bulunan trombositlerin degranulasyonu enflamatuar hücre kemotaksisinde etkilidir. Kemotaksis sağlayan trombosit kaynaklı medyatörler; TGF β , PDGF, PF4, C5a kompleman proteini, lökotrien B₄ ve Platelet Aktivasyon Faktörü (PAF) dır ⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Bunlar arasında, TGF β , PDGF ve PF4 nin seviyeleri normal yara iyileşmesinin tüm basamakları boyunca yükselmiş olarak kalır ⁽³¹⁾.

Nötrofillerin ana görevi; yaradaki yabancı cisim, ölü doku ve bakterileri fagositoz yaparak hidrolitik enzimler ve oksijen radikalleri ile sindirmektir. Bunun yanı sıra, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), TNF α ve IL-1 gibi anjiyogenik (yeni damar oluşumu sağlayan) faktörler de salgırlar ⁽⁵⁰⁾. Ek olarak, salgıladıkları matriks metalloproteinazları (MMP) ile yara matriksinin yıkılmasını sağlarlar. Bu sayede makrofaj, fibroblast ve keratinositlerin yerleşmesi kolaylaşır ⁽⁵¹⁾. Lokal yara enfeksiyonu ve/veya yabancı cisim varlığı enflamasyonun uzamasına neden olur. Bu durumun, fibrojenik sitokinlerin aktivitesini artırarak artmış fibrozise neden olabileceği ileri sürülmektedir ^(49, 52).

Yara komşuluğundaki ve kandaki monositlerin yara bölgesine akın edip makrofajlara dönüşmeleri, yaralanmadan sonraki 48-96 saat içinde gerçekleşir ⁽³⁾. Yaralanmadan sonraki 3. günde yaradaki baskın enflamasyon hücre tipi makrofajlardır ⁽⁴⁴⁾. Monositlerin kemotaksisini sağlayan başlıca faktörler; MCP-1, TGF β , IL-1 ve TNF α dır ⁽⁵³⁻⁵⁶⁾. Monositler; IL-2, TNF α , IFN γ (T hücrelerinden salınır) ve PDGF yardımıyla aktiflenmiş makrofajlara dönüşürler ^(52, 53).

Aktiflenmiş makrofajlar, yara iyileşmesinin asıl hücresi olarak düzenleyicisi rolündedir. Çoğu sitokin ve büyüme faktörü olan 100 den fazla madde salgırlar ⁽³¹⁾. Bu yolla enflamasyonu uyarırlar ve yara onarımının daha etkin olmasını sağlarlar. Makrofajlar tarafından salınan TNF α ve IL-1; adezyon molekülü üretimini artırır, nötrofil aktivasyonunu sağlar ve makrofajların otokrin aktivasyonuna neden olur ⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾.

Otokrin aktivasyonla makrofajlar; IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, MCP-1 ve IL-1 salınımı yaparlar. Aktive makrofajlar, anjiyogenez ve fibroplazi'de rol alırlarken nitrik oksit sentezi de yaparlar ⁽⁶⁰⁾. Salgıladıkları PDGF ve TGF β fibroblastların kemotaksisini ve aktivasyonunu sağlar ⁽⁶¹⁻⁶³⁾. Makrofajlar, tıpkı nötrofiller gibi, MMP salgısı yaparlar. Bu yolla gereksiz yara matriksi uzaklaştırılır ve fibroblastların, endotel hücrelerinin ve diğer mezenkimal hücrelerin bölgeye göçü kolaylaşır ⁽⁶⁴⁾. Fagositoz yoluyla hasarlı hücreleri, mikroorganizmaları ve yabancı cisimleri uzaklaştırırlar.

Hipertrofik skar dokularında çok sayıda makrofaj bulunur ⁽⁶⁵⁾. Makrofajların salgıladıkları fibroblast aktive edici faktörler (PDGF, TGF β) nedeniyle aşırı skarlaşmada rol aldıkları düşünülmektedir ⁽⁷⁾.

Enflamasyon fazında yaranın gerim gücü sıfıra yakındır. Fetal yaradaki geçiş fazından önceki skarsız iyileşme döneminde, yaradaki enflamasyon hücresi sayısı minimaldir ⁽⁶⁶⁾. Postnatal dönemde, fibroblastların yanı sıra enflamasyon hücrelerinden de salınan bir medyatör olan TGF β ' nın etkisizleştirilmesi, enflamasyon yanıtını azaltarak daha az skar oluşumu sağlamaktadır ⁽⁶⁷⁾. Bu bulgu, "geçiş fazı" ndan sonra yara iyileşmesinde enflamasyon hücresi etkinliğinin arttığını göstermektedir.

Yara iyileşmesinde rol alan bir diğer enflamatuar hücre tipi lenfositlerdir. Yara bölgesine gelen lenfositler enflamasyonu artırıcı etkisi olan IL-1 ve IFN γ salınımı yaparlar ^(65,68). Ayrıca EGF, FGF ve matriks metalloproteinazları (MMP) salgırlar ^(69,70). Hipertrofik skarlardaki dermal enflamasyon infiltratlarından elde edilen spesimenler, "anti-human lökosit antijen" ile güçlü biçimde boyanmaktadır ^(71,72).

Hipersensitivite reaksiyonlarında önemli rolü olan "mast hücreleri"de yara bölgesine gelerek IL-4 salınımı yaparlar. IL-4 fibroblast proliferasyonunu artırır ⁽⁷³⁾. Aşırı skarlaşma, artmış serum immunoglobulin E (Ig E) seviyeleri ile korelasyon gösterir. Keloidli hastalarda alerjik belirti sıklığı, hipertrofik skarlı hastalara göre daha yüksektir ^(74,75). Bu bulgular, mast hücrelerinin aşırı skarlaşma ile olan muhtemel ilişkisini düşündürmektedir ⁽⁷⁶⁾.

Enflamasyon mediyatörlerinin tümü enflamasyonu stimule etmez. IL-10 ve IL-4 diğer enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu azaltır ^(42,77).

Tablo 1: Yara iyileşmesinde etkili başlıca enflamatuvar sitokinler

SİTOKİN	KAYNAK HÜCRE	FONKSİYON
EGF	Trombosit / makrofaj	Keratinosit ve fibroblastlar için mitojenik. Keratinosit migrasyonunu stimule eder
FGF	Makrofaj / mast hücresi / T lenfosit / endotel hücresi	Fibroblastlar /keratinositler için kemotaktik ve mitojenik. Anjiyogenezi stimule eder
IFN(α, β, γ)	Lenfosit / fibroblast	Makrofaj aktivasyonu, fibroblast proliferasyonunun inhibisyonu
IL (1, 2, 6 ve 8)	Makrofaj / mast hücresi / keratinosit / lenfosit	IL-1: ateşi tetikler ve adrenokortikotropik hormon salınımı sağlar. TNF α ve IFN γ nın etkisini artırır. Granulositleri ve endotel hücrelerini aktive eder. Hematopoezi stimule eder
		IL-2: makrofaj/T hücre/NK hücre ve lenfokin activated killer hücre aktivasyonunu. B hücre farklılaşmasının stimülasyonu. Aktive B ve T hücrelerin proliferasyonunun stimülasyonu. Ateşin tetiklenmesi
		IL-6: ateşin tetiklenmesi. Karaciğerden akut faz reaktanlarının salınımını artırır
		IL-8: nötrofil adezyonunun artırılması. Kemotaksis ve granül salınımı
KGF	Fibroblast	Keratinosit migrasyon/diferansiyasyon/proliferasyonu stimülasyonu
PDGF	Trombosit / makrofaj/endotel hücresi	Hücre kemotaksisi. Fibroblastlar için mitojenik. Anjiyogenez ve yara kontraksiyonunun stimülasyonu
TGF- α	Makrofaj / T lenfosit/keratinosit	Fibroblast/keratinosit için mitojenik. Keratinosit migrasyonunun stimülasyonu
TGF- β	Trombosit / T lenfosit / makrofaj / endotel hüç. / keratinosit	Hücre kemotaksisi. Anjiyogenez ve fibroplazinin stimülasyonu
Tromboksan A2	Hasarlanmış yara hücreleri	Güçlü vazokonstriktör
TNF	Makrofaj/mast hücre/ T lenfosit	Makrofaj aktivasyonu. Fibroblastlar için mitojenik. Anjiyogenezin stimülasyonu

EGF: epidermal growth factor; **FGF:** fibroblast growth factor; **IFN:** interferon; **IL:** interleukin; **KGF:** keratinocyte growth factor; **PDGF:** platelet-derived growth factor; **TGF:** transforming growth factor; **TNF:** tumor necrosis factor

2- Proliferasyon Fazı

Proliferasyon fazında, ekstrasellüler matriks (ECM) sentezi, anjiyogenez, epitelizasyon, ve yara kontraksiyonu görülür. Bu faz yaralanmadan sonraki 2-4 gün içinde başlar. İlk aşamada oluşan fibrin matriks içindeki trombositler ve makrofajlar, fibroblastların aktivasyonlarını başlatan büyüme faktörleri salgırlar. Proliferasyon fazında, fibrin matriksin yerini; fibroblastlarca üretilen kollajen, fibronektin ve hyaluronik asit den zengin yeni ECM alır. Fibrin matriksin yıkımında, fibroblast kaynaklı MMP (matriks metalloproteazları) ve makrofaj aktivitesi etkilidir.

Hyaluronik asit'e ek olarak, adezyon glikoproteinleri olan fibronektin, laminin ve tenaskin, başta fibroblastlar olmak üzere, yaraya hücre göçünü kolaylaştırır (78). Hücreler bu moleküllere integrin reseptörleri ile bağlanarak yol alırlar. Hyaluronik asit'in hücre göçüne olan etkisinde, yapısında bulunan çok miktardaki suyun sağladığı hidrasyonun da rolü vardır. Yara matriksinin viskozitesindeki denge, hücrelerin göçünü kolaylaştıran bir etken olarak iyileşmeye olumlu etki yapar.

İntegrinler, fibroblast yüzeyinde bulunan transmembran reseptör kompleksleridir. Yara iyileşmesi esnasında hücre fonksiyonunu düzenlerler. İntegrin reseptörleri ayrıca, büyüme faktörleri, kollajen, elastin gibi moleküllerin yanı sıra diğer hücre yüzeyleri ile de etkileşime geçer ve fibroblast fonksiyonunu etkiler (79).

PDGF, TGF β ve EGF, fibroblastlar için en önemli uyarılardır. Fibroblastların PDGF üretimi, otokrin ve parakrin sinyaller ile artar. Hâlihazırda yaranın içinde bulunan fibroblastlara "yara fibroblastları" adı verilir. Bu hücreler kollajen sentezlemeye başlarlar ve miyofibroblastlara dönüşürler. Bu dönüşüm makrofajlardan salınan TGF β sayesinde olur. Miyofibroblastlar diğer normal fibroblastlara göre daha az proliferer olurlar (80-82). Fibroblastların PDGF ye yanıtı; başlıca tip III kollajen, glikozaminoglikanlar ve fibronektinden oluşan matriksin sentezidir (83). Fibroblastlar ayrıca hyaluronidaz enzimi üreterek hyaluronik asitten zengin matriksi sindirmeye de başlarlar. Böylece daha büyük boyutlu moleküller olan sülfatlanmış GAG lar oluşturulur ve depolanır. Fibroblastlar bu aşamadan sonra GAG ve fibronektin yapıdaki iskele üzerine düzensiz biçimde kollajen depolaması yaparlar (78).

Aşırı skarlaşmada rol alan fibroblastların aktivitesi normalden yüksektir. Bu durum hipertrofik skarlarda (HTS) geri dönüşümlü olabilirken keloidlerde kalıcıdır. HTS ve keloidlerde matriks yıkımı ve fibrinolizde azalma tesbit edilmiştir (52, 84).

Keloidlerden elde edilen fibroblastlarda fibronektin üretimi normal cilde ve normal skarlara göre artmıştır ^(37, 38). Normal skarlarda yara kapanmasını takiben fibronektin üretimi durur. Ancak hipertrofik skarlarda ve keloidlerde fibronektin aktivitesi aylarca hatta yıllarca yüksek kalır ⁽⁸⁵⁾.

2-1 Kollajen Sentezi

Granulasyon dokusunun ve dermisin ana proteini, kollajendir. Kollajenin tanımlanmış en az 19 tipi vardır ⁽⁸⁶⁾. Sağlam yapılı, üçlü sarmal oluşturan 3 polipeptid zincirinden oluşan bir moleküldür. Uzunluğu 300 Å genişliği 15 Å dır. Doğal kollajen vücut ısısında jel kıvamındadır.

Kollajen molekülünde bulunan aminoasitlerin % 33 ü glisin, % 20 si prolindir. Glisin ve prolin, güçlü bir yapı oluşturan üçlü sarmalın oluşumundaki bağlarda rol alırlar. Kollajenin yapısındaki aminoasit dizilimi oldukça önemlidir. Tekrarlayan tripeptid yapılarda, glisin sabitken diğer iki aminoasit değişkendir. Kollajenin sentezden sonra hücre dışına sekresyonu için prolinin ve bazı lizin rezidüleri posttranslasyonel hidroksilasyonu gerekir. Oksijen molekülü, ferröz demir, α ketoglutarat ve askorbat hidroksilasyon işlemi için gereklidir. Bu faktörlerin eksikliği kollajen sentezinin aksamasına ve yara iyileşmesinin bozulmasına neden olur.

Fibroblastlar kollajen sentezinin yanı sıra kollajenin özelleşmiş hücre yarıklarında paketlenmesini de gerçekleştirirler ⁽⁸⁷⁾. Bu yarıklar ekstrasellüler kompartmanın bir parçasıdır. Buralarda kollajen molekülleri birleşerek fibrilleri oluşturur. Oluşan fibriller paketlenmiş lif demetleri halinde düzenlenir. “Kollajen lif demeti paketleri” kompartmandan çıkarak kalın kollajen liflerine eklenirler. Yara iyileşmesi esnasında artan kollajen sentezi sadece artmış fibroblast sayısından değil hücre başına üretilen kollajen miktarındaki artıştan da kaynaklanır ^(88, 89).

Oluşan skarın gücü, yeni oluşan fibrillerin eklenmesine ve kovalent bağlar ile sabitlenmesine bağlıdır. Lizin aminoasitlerinin ek işlem görmesi sayesinde intramoleküler ve intermoleküler yeni kovalent bağlar oluşturulur. Kollajenin çözünmezliğini artıran bu işlem, interstisyel alanda “lizil hidroksilaz” enzimi ile yapılır. Lizil hidroksilaz yine fibroblastlarca üretilir.

Tip I ve Tip III kollajenler, ekstrasellüler matriks (ECM) in ve normal insan dermisinin başlıca kollajen çeşididir. Toplam kollajenin yaklaşık % 80 i Tip I

kollajendir ve dermise tensil gücünü verir ⁽¹⁹⁾. Normal dermiste kollajen liflerinin % 20 si Tip III iken bu oran granulasyon dokusunda % 30 a çıkar ⁽⁹⁰⁾. Normal matur bir skarda sadece % 10 oranında tip III kollajen bulunur. Yaralanmadan sonraki ilk hafta içinde Tip III kollajen fibronektinle beraber depolanır. Bu durum 2-4 hafta süreyle devam eder. Sonradan Tip III kollajen Tip I ile değiştirilir ⁽⁹¹⁾. Fibronektin, tip III kollajeni kaplayarak fagositozunu kolaylaştırır ⁽⁹²⁾. Yaranın gerim gücünü artırmayan tip III kollajenin ilk aşamada yüksek miktarda üretilmesinin sebebi bilinmemektedir.

Aşırı skarlaşmada kollajen metabolizması artmıştır. Artmış prolil-4 hidroksilaz aktivitesi ve kollajen mRNA ekspresyonu bunun bir göstergesidir ^(22, 93). Artmış skarlaşmada kollajen sentezi zirve noktasına, yaralanmadan 6 ay sonra ulaşır ve yaralanma sonrasındaki 2-3 sene içinde normale döner ^(93, 94). Ancak keloidlerde kollajen sentezi yıllarca devam edebilir ⁽⁹⁵⁾. Hipertrofik skarlarda ise posttranskripsiyonel mekanizmalar sayesinde artmış mRNA seviyeleri düşürülebilir. Böylece kollajen sentezi azalabilir ^(21,96).

Hipertrofik skarlarda sentezlenen kollajen fibrilleri keloidlere göre daha küçük ve daha düzenlidir ^(97, 98). Görece olarak düzenli kollajen yapıları nedeniyle keloidlerin tersine skar kontraktürü oluşturabilirler ⁽⁹⁷⁾.

Halka şeklinde düzenlenmiş, nodüler, hyalinize kollajen demetleri hipertrofik skarlarda daima görülür. Bu oluşumlar keloidlerde seyrekdir ⁽⁹⁹⁾. Eğer granulasyon dokusunda bulunurlarsa aşırı skarlaşmanın habercisidirler ⁽⁷⁾.

Aşırı skarlaşmada, artmış kollajen sentezine ek olarak azalmış kollajen yıkımı da görülür Aktive hipertrofik skar ve keloid fibroblastlarının kollajeni yıkamamaları mevcut kollajenin daha organize ve matür hale dönüştürülmesini engeller ^(93, 100). Keloidlerde; α -1- antitripsin ve α -2-makroglobulin gibi kollajenaz enzim inhibitörlerinin arttığı tesbit edilmiştir ⁽¹⁰¹⁾. Ancak aşırı skarlaşmalarda kollajen miktarı artmış olsa da kollajen yoğunluğu normal ciltten farklı değildir ^(102,103). Aşırı skarlaşmada oluşan skar sertliğinin diğer bir sebebi de artmış su miktarıdır ⁽¹⁰⁴⁾.

Hyaluronik asit, decorin, biglikan gibi proteoglikanlar kolajen liflerine bağlanarak liflerin düzenlenmesini ve yıkımını etkilerler. Aktif keloidlerde, biglikan ve tip I kollajen miktarları birbirleri ile uyumlu biçimde artar ⁽¹⁰⁵⁾. Hipertrofik skarlarda biglikan miktarı artmıştır ^(106,107).

2-2 Anjiyogenez

Yara yatağında kılcal damar proliferasyonu, iyileşme için kritik öneme sahiptir. Granulasyon dokusu oluşumu ve doku rejenerasyonu için kılcal damarların gelişmesi gerekir. Yara komşuluğundaki intakt venüller, VEGF (vascular endothelial growth factor) tarafından stimule edilir ve yeni kapiller tüpler oluşmaya başlar. VEGF en fazla yara kenarındaki keratinositlerden salgılanır. Makrofajlar, fibroblastlar, trombositler ve endotel hücreleri VEGF' nin diğer kaynaklarıdır. TGFβ1, IL-1, TNF α ve KGF keratinositlerden VEGF salınımına neden olur. Hipoksi, endotel hücrelerinden nitrik oksit(NO) salınımına neden olur. NO, VEGF salınımını artırır. NO ayrıca yeni oluşan dokuyu "iskemi reperfüzyon hasarı" na karşı korur ⁽¹⁰⁸⁾.

Aşırı skarlaşmada anjiyogenez ve yeni damar oluşumunda farklılıklar görülür. Bu lezyonlar, çok sayıda dilate damar içermelerine rağmen hipoksiktirler. Aşırı skarlaşmadaki damarlarda endotel adventisya hücreleri aşırı çoğalmıştır. Bu durum mikrovasküler tıkanıklıklara ve sonuçta hipoksiye neden olur ⁽¹⁰⁹⁾. Hipoksi, TGFβ sentezini uyararak fibroplaziyi daha da artırır ⁽¹¹⁰⁾.

2-3 Epitelizasyon

Epidermis, sıvı ve elektrolit kaybını engellemesinin yanı sıra mikroorganizmalara ve yabancı cisimlere karşı koruyucu bir bariyer görevi yapar. Epidermis hasarı sonrasında yeni epitel oluşumu yarananmadan hemen sonra başlar. Kısmi kalınlıkta deri grefti donör sahaları, yüzeysel yanıklar, sıyrıklar gibi tam kat olmayan yaraların iyileşmesinde epitelizasyon ön plandadır. Hasar sonrasında epidermal tabaka kalınlaşır ve yara kenarındaki bazal hücreler defekte doğru tek tabaka halinde göç etmeye başlar. ECM, epidermal hücrelerin göç edebileceği bir köprü niteliğindedir. Keratinositlerin yara üzerindeki göçü, fibronektin gibi adezyon glikoproteinleri tarafından sağlanır. Epitel tabakası oluşturulduğunda fibroblastlar ve keratinositler, laminin ve tip IV kollajen üreterek bazal membranı oluştururlar. Reepitelizasyonun tamamlanmasıyla ECM yapımı azalır ve hücre apoptozu artar.

Epitelizasyonun ilk uyararı, enflamatuar sitokinlerdir. IL-1 ve TNFα, fibroblastlardaki keratinosit büyüme faktörü (KGF) ekspresyonunu artırır. Böylece fibroblastlar KGF-1, KGF-2 ve IL-6 üretimini artırır. Keratinositler proliferasyon olarak

yaraya göç ederler ve stratifiye epidermisi oluştururlar ^(111, 112). KGF-2 insanlardaki en önemli keratinosit büyüme faktörüdür ⁽¹¹³⁾.

Makrofajlar ve trombositler tarafından salgılanan EGF (epidermal büyüme faktörü) ve TGF α epitel proliferasyonunu ve kemotaksisini sağlamakta etkilidir ^(114, 115). Bazal membran intakt ise epitelyal hücreler yüzeye doğru göç ederler. Oluşan hücrelerin şekli yüzeye yaklaştıkça yassılaştır ve uzar ⁽¹¹⁶⁾. Eğer bazal membran hasarlı ise yara kenarındaki epitel hücreleri proliferasyon olarak çıkıntılar oluştururlar. İlerleyen hücreler birbirleri ile temas edince “kontakt inhibisyon”la proliferasyon durur.

Epitelizasyon süresi uzadıkça hipertrofik skar oluşma ihtimali de artar ⁽¹¹⁷⁾. Hipertrofik skarlarda (HTS) dermis kalınlığının yanı sıra epidermis kalınlığı da artmıştır. HTS lerde normal cilt epidermisinde bulunan “rete yarıkları” bulunmaz ⁽¹¹⁸⁾. HTS lerden elde edilen keratinositlerde; azalmış IL-1 ve artmış PDGF ekspresyonu tesbit edilmiştir ⁽¹¹⁸⁾. IL-1 yaradaki ECM nin yıkımında önemli rol oynar. PDGF ise doku fibrozunda etkilidir.

2-4 Kontraksiyon

Yara kontraksiyonu yaralanmadan sonraki birkaç gün içinde başlar. Bu aşamada, intakt olan normal cilt dokusu defekte doğru çekilir. Böylece defekti doldurmak için sentezlenecek doku miktarı azaltılır. Çevredeki cildin merkeze doğru hareketi, granülasyon dokusundaki hücrelerin oluşturduğu gerim kuvveti ile sağlanır. Kontraksiyon oluşumunda, kollajen liflerinin yeniden düzenlenmesi ve doku fibroblastlarının myofibroblastlara dönüşmesi önemlidir ^(33, 82, 119). Kontraksiyon esnasında, ince kollajen fibrilleri, kalın ve uzun kollajen liflerine dönüşürler.

Myofibroblastlar, düz kas hücrelerine has özellikler gösteren değişime uğramış hücrelerdir ⁽¹²⁰⁾. Miyofibroblastların başlıca kaynağı “doku fibroblastları”dır. Ancak vasküler düz kas hücreleri (perisitler) ve dolaşımda bulunan fibrositler de miyofibroblastlara dönüşebilir ⁽¹²¹⁾. Doku kontraksiyonunun olduğu tüm fibrotik durumlarda miyofibroblastlar bulunur ⁽¹²²⁾. Dokudaki fibroblastlar öncelikle göç eden fenotiptedirler. Ardından profibrotik fenotipe geçerek tip I/III kollajen ve ECM sentezi yaparlar. Yaralanmadan sonraki 9. gün civarında son olarak miyofibroblast fenotipi ortaya çıkar ⁽¹²³⁾. Yapılarındaki α -SMA (alfa smooth muscle actin) düz kaslarda bulunan ve kontrakte olabilen bir proteindir. Bu protein, gerim kuvvetinin oluşturulmasında

önemli role sahiptir ^(124, 125). Miyofibroblastlar ayrıca “SM-miyozin ağır zincir” ve “desmin” gibi diğer kontraktıl proteinler içerirler ⁽¹²⁶⁾. Kontraktıl miyofilamentlerin yara kontraksiyonu oluşturmasında kafes örgüsü şeklinde organize olan ECM nin katkısı büyüktür.

Miyofibroblastlarca oluşturulan izometrik gerim, düz kas hücrelerindekiinden farklıdır. Düz kas hücrelerinin kontraksiyonu geri dönüşümlü iken; miyofibroblastlarınkı geri dönüşümsüzdür ^(127, 128). Normalde kontraksiyon sona erdiğinde miyofibroblastlar ortadan kalkarlar ^(97, 129).

Hipertrofik skarlarda çok sayıda miyofibroblast bulunur. Bunun nedeni miyofibroblast apoptozunun inhibisyonu olabilir ^(130, 131). TGF β 1, fibroblastlarda α -SMA üretimini artırır. Ayrıca otokrin aktivasyonla PDGF üretimine neden olur. PDGF fibroblast aktivasyonunu artıran ve kontraksiyona neden olan bir faktördür ⁽¹³²⁾.

3-Maturasyon (remodelling) Fazı

Maturasyon fazı, iyileşmenin son aşamasıdır. Bu fazın özelliği proliferasyon fazında üretilen kollajenin düzenli ve uygun biçimde depolanmasıdır. Bu nedenle maturasyon fazında yapım ve yıkım arasındaki denge önemlidir. Yetersiz matriks sentezine neden olan durumlarda yaranın tensil gücü azılırken aşırı kollajen sentezinde keloid ve hipertrofik skar gibi lezyonlar oluşur.

Bu faz başladığında, doku proliferasyonu halen sürmektedir. İyileşmenin ilk aşamalarında salgılanan çoğu medyatör halen yara ortamındadır ve etkilerini bu fazda da sürdürürler. İyileşmenin en başında fibrin ve fibronektinden oluşun matrikse sonradan fibroblastlarca GAG ve proteoglikanlar eklenir. Proliferatif faz boyunca sentezlenen ECM nin yapısı hem yara kontraksiyonuna hem de epitelizasyon için hücre göçüne kolaylık sağlar. Maturasyon fazında kollajen sentezi devam ederken daha önceki geçici matrikste bulunan fibronektin gibi moleküller yıkıma uğrar ⁽¹³³⁾.

Oluşun skar dokusunun şekillendirilmesinde ECM üretiminin ve yıkımının düzenlenmesi önemlidir. Bu düzenleme, ECM yi yıkan proteazların (MMP) sentezi ve bu enzimlerin “metalloproteinazların doku inhibitörleri” (TIMP) tarafından inhibisyonu ile yapılır. MMP ve TIMP yara ortamında çeşitli hücrelerce salınırlar. Bu konuda en aktif hücreler, fibroblastlardır.

Başlangıçta daha seyrek ve şekillenebilir olan matriks, maturasyon fazı ilerledikçe yoğunlaşmaya ve sertleşmeye başlar. Bunda kollajen liflerinin rolü büyüktür. Maturasyon fazında önemli yeri olan matriks proteinazları: MMP-1 (kollajenaz), MMP-2(jelatinaz A), MMP-3 (stromelizin-1), MMP-9, hyaluronidaz ve ürokinazdır. MMPler üzerinde etkisi olan başlıca sitokinler; TGF β , PDGF, IL-1 ve EGF dir ⁽¹³⁴⁻¹³⁷⁾. TNF α ve IL-1, MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinde önemlidir. TGF β ve IL-6 fibroblastlardan TIMP üretilmesini artırır. TNF- α ise fibroblastlardan IL-6 salınımını artırır ⁽³¹⁾.

. Fibroblastlar ilerleyen maturasyon esnasında değişen doku gerimine uyum gösterirler. İzometrik gerim oluşmadan önce yaranın şekillendirilmesi, hücre göçüne ve matriks proteinlerinin proteolizine bağlıdır. Matriks yoğunlaşp sertleştikçe hücrelerin matrikse tutunması mümkün hale gelir. Sert ve yoğun matrikste izometrik gerim oluşur. Fibroblastlar bu ortama tutunarak kontraksiyonu sağlarlar. TGF β , fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü sağlar. Bu etki sadece gerim kuvvetinin olduğu durumda geçerlidir. Bu nedenle, gerim kuvvetinin varlığı veya yokluğu miyofibroblastların proliferasyonuna veya regresyonuna neden olur. Mekanik gerimin ortadan kaldırılması apoptoza ve kollajen sentezinin azalmasına neden olurken kalıcı gerim kuvveti hipertrofik skar oluşumuyla sonlanır ^(9, 10, 138).

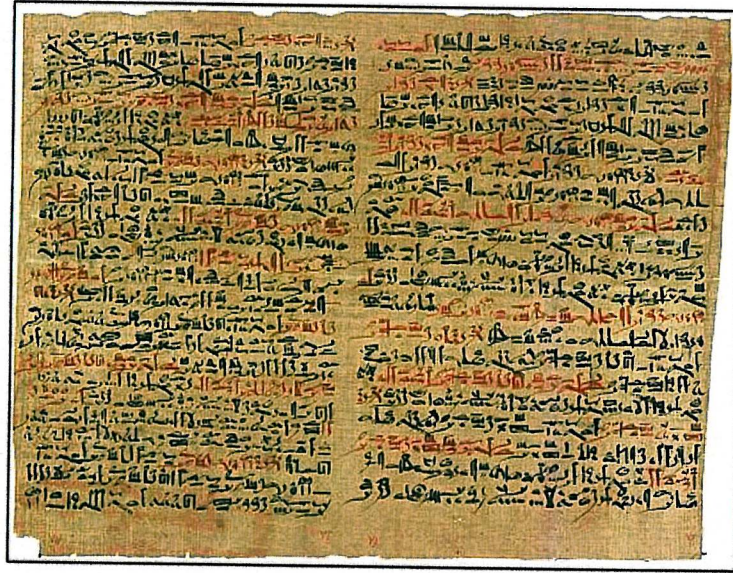
Yara maturasyonunun erken safhasında yapısındaki bol miktarda damar yapısı nedeniyle skar kırmızı renktedir. İyileşme tamamlanınca kapiller damarların sayısı azalır ve gerçek skar pigmentasyonu oluşmaya başlar. Tam mature olan skarlar genelde hipopigmentedirler. Koyu renk derili insanların skarları, açık ten rengine sahip ve güneşe maruz kalmış insanların skarları hiperpigmente olabilir. Maturasyon süresi ne olursa olsun skar dokusunda bulunan kollajen hiçbir zaman intakt ciltte bulunan kollajen gibi düzenli olmaz. Yaranın tensil gücü de hiçbir zaman %100 geri dönmez. 1. hafta sonunda % 3, 3. hafta sonunda % 30, 3 ay ve daha sonrasında yaklaşık % 80 olarak gerçekleşir ⁽¹³⁹⁾.

C- Proliferatif Skarlaşma (Aşırı Yara iyileşmesi)

Aşırı yara iyileşmesi; enfeksiyon, iyileşememe veya kontraktür gibi bir yara komplikasyonudur ⁽¹⁰⁹⁾. Aşırı skarlaşma, sadece cilde has bir durum değildir ve her organ sisteminin her tip yarasında görülebilir. Tendon onarımı sonrasında görülen

adezyonlar, karaciğer sirozu, safra kanalı darlıkları, glomerulonefrit, sistemik skleroz (skleroderma) bunun patolojik örnekleridir ⁽¹⁴⁰⁾.

Keloid ve hipertrofik skar (HTS) derideki aşırı yara iyileşmesinin farklı biçimleridir. Aşırı skarlaşma ilk olarak M.Ö. 1700 yıllarında yazılan Edwin-Smith papirüsünde tanımlanmıştır (Resim 1). Fakat yara iyileşmesinde sık karşılaşılan bu komplikasyonu ilk tartışan kişi 1806 yılına Alibert olmuştur. Mancini 1962 yılında ve Peacock ise 1970 yılında ayrı ayrı hipertrofik skar ve keloid tanımını yapmışlardır.



Resim 1: Edwin-Smith Papirüsü

Muir 1990 yılında her iki aşırı skarlaşma tipinin de özelliklerini taşıyan bir ara çeşit tanımlasa da bu yeni skar tipi pek popularize olmamıştır. Skarların sınıflandırılmasını amaçlayan şemalar mevcuttur ⁽¹⁴²⁾. Bu şemalarda skarlaşma normalden aşırıya doğru; matur skar, immatur skar, linear hipertrofik skar, yaygın hipertrofik skar, minor keloid ve major keloid olarak sınıflandırılmıştır ^(141, 142).

HTS ve keloidlerde, dermis ve subkutan dokularda aşırı miktarda ECM depolanması vardır. Tedavileri farklılık gösterdiğinden HTS ile keloidi ayırmak önemlidir. İyileşmenin erken evrelerinde HTS yi muhtemel bir keloidden ayırmak zordur. Belirgin farklılıklar ancak iyileşmenin 2. ayından sonra ortaya çıkar. HTS ler tipik olarak, deriden kabarık, kırmızı ya da pembe renkte bazen ağrılı ve kaşıntılı olabilen ve asıl yara sınırını aşmayan lezyonlardır. Oysa keloidler, asıl yara sınırını aşan, yuvarlak ve düzgün yüzeye sahip ve çevredeki intakt dokuyu infiltre eden lezyonlardır. HTS,

yaralanmadan haftalar sonra ortaya çıkar genelde zamanla geriler. Keloidler ise aylar hatta yıllar sonra ortaya çıkabilirler. Keloidler, gerilemenin aksine herhangi bir duraklama olmadan büyürler ⁽¹⁴³⁻¹⁴⁶⁾. HTS genelde tedaviye yanıt verir ancak keloidler genelde tedaviye dirençlidir ve yüksek nüks oranlarına sahiptirler. Keloidler cildin minör travmaları sonrasında (örneğin piercing uygulaması) oluşabilirler. HTS genelde derin dermisin hasarlandığı yaralanmalarda ortaya çıkar ^(8, 52). Herhangi bir travma olmaksızın keloid gelişen vakalar bildirilmiştir.

HTS, eklem komşulukları, göğüs ön duvarı, ekstremitelerin flekör yüzleri ve boyun ön kısmı gibi yüksek gerim kuvvetinin olduğu yüzeylerde ortaya çıkar ⁽¹⁴⁷⁾. Lezyon başlangıçta eritemli bir görünümdeydir. Zamanla kahverengimsi bir hal alır ve olgunlaştıkça rengi açılır. Eklem komşuluğundaki lezyonlarda eklem hareketi gerilemekte olan lezyonun yeniden progresyonuna neden olur ^(148, 149). Hastalar genelde dış görünümüm şikâyetleri ile gelseler de HTS ve keloidler kaşıntı, ağrı ve baskı yapabilirler ⁽¹⁵⁰⁾. Keloidler genelde eklem bölgelerini etkilemezler. Vücudun üst bölgelerinde keloid oluşumu daha sık görülür ⁽⁵²⁾. Lezyonu etkileyen bir diğer faktör ise başlangıçtaki hasarın büyüklüğüdür. Hasar ne kadar büyükse lezyonda o kadar büyük olacaktır. HTS ler nadiren 4mm den fazla kabartı yaparlar ancak keloidler çok kabarık nodüller oluşturabilirler ⁽¹⁵¹⁾.

Keloid ve HTS her iki cinsiyeti eşit biçimde etkiler ⁽¹⁵²⁾. Kadınlarda HTS ve keloidlerin semptomları menapozdan sonra ortadan kalkar. Gebelikte önceden var olan keloidlerin büyümesinin hızlandığı rapor edilmiştir ⁽¹⁴⁸⁾. Siyah veya koyu renkli cilt rengi olan populasyonlarda keloid görülme sıklığı, % 4,5 ile % 16 arasındadır. Keloid ve HTS ler en sık, 10-30 yaş arasında görülürler ⁽¹⁵³⁾. Yaşlılıkta görülme sıklığı azalır ⁽¹⁴⁹⁾. Genelde, HTS lerin insidansı keloidlerden yüksektir. Ancak bu konuda istatistik çalışması için yeterli bilgi yoktur.

Proliferatif skarlaşmayı normal ciltten ve normal skarlardan ayıran özellikler; yoğun damarlanmaları, yüksek mezenkimal hücre yoğunluğu, enflamatuar hücre infiltrasyonu ve kalınlaşmış epidermis tabakasıdır ⁽¹⁵⁴⁾. Keloidler ve HTS arasındaki farkı ışık mikroskopisi ile belirlemek zordur. Normalde her ikisinde de sebace bezler ve rete yarıkları yoktur. Deri ekleri kaybolmuştur, endotel hücreleri yuvarlak ve damar lümenine çıkıntı yapmıştır. Dermiste belirgin nodüllerin varlığı HTS nin özelliğidir. Bu nodüller, keloidlerde ve normal skar dokusunda bulunmayan "alfa smooth muscle

aktin” içeren miyofibroblastlar içerirler. Noduler yapılar keloidlerde genelde bulunmaz (97).

Işık mikroskopisindeki zorluklara rağmen elektron mikroskopisi belirgin farklılıklar ortaya koyar. Normal ciltte, çoğunluğu epitele paralel seyreden kollajen demetleri bulunur. HTS nin kollajen yapısı normal deriden ve matur skar dokusundan belirgin ölçüde farklıdır. HTS de kollajen demetleri daha dağınık yerleşimli, sınırları daha az belirgin, fragmente olmuş ve kısalmış haldedirler (141). Keloidlerde, kalın kollajen demetleri ve çok sayıda ince kollajen fibrili bir arada paketlenmiş haldedir. Epidermis, kollajenin bu sıkışmış düzeninden dolayı düzleşmiş görünümde olsa da diğer açılardan normal yapıdadır (52).

Langerhans hücreleri (LH), HTS de önemli derecede artmıştır. LH ve keratinositler dermis hücreleri ile yakın etkileşimdedirler ve ECM nin düzenlenmesinde aktif rol alırlar. LH ler, T lenfositleri yara yerine çekerler. HTS de LH tarafından sentezlenen IL-1 miktarları önemli ölçüde azalmıştır. Keratinositler, T lenfositler ve epidermal LH birleşerek deride bir bağışıklık sistemi oluştururlar. Bu sistem, hem fibroblastların hem de epidermin fonksiyonunu etkileyerek proliferatif skarlaşmada rol oynayabilir. HTS dokularındaki (epidermis ve subpapiller dermisteki) lenfosit miktarları keratinosit yüzeylerindeki ICAM-1 ve HLA Sınıf II ekspresyonu ile doğru orantılıdır. ICAM-1 ve HLA II enflamasyon hücrelerinin göçü ve fonksiyonları için önemlidir (52, 155). Bu bilgiler, deride etkili olan immunolojik değişikliklerin proliferatif skarlaşmada etkili olduğunu düşündürmektedir.

Proliferatif skarların, normal ciltlere göre elastikiyeti azalmıştır. Elastin ve fibrillin liflerinin oluşturdukları elastik sistem cildin kuvvetler karşısında uzayıp genişlemesini sağlar. Normal ciltlerin yüzeysel dermisindeki elastin ve fibrillin konsantrasyonları proliferatif skarlarınkine göre daha yüksektir (156, 157, 159). Keloidlerin derin dermisinde hipertrofik skarlara göre daha fazla miktarda elastin bulunur.

Dokunun remodelling aşamasında “hücre apoptozu” mekanizmaları önemli rol oynar (158). Hücre apoptozu programlanmış hücre ölümüdür ve diğer hücre ölümlerinden morfolojik ve biyokimyasal olarak farklıdır. Normal yara iyileşmesinde apoptoz, granülasyon dokusundan skarlaşmaya geçişte rol oynar (159). Literatürde, proliferatif skarlaşmanın, apoptozu düzenleyen genlerdeki değişiklikten kaynaklandığı yönünde bulgular rapor edilmiştir (141, 158). Bu çalışmalarda keloid dokularından elde

edilen fibroblastlarda düşük apoptoz oranı saptanmıştır ^(160, 161). Keloid dokularındaki fibroblastlar normalden daha fazla kollajen üretirler. Apoptoza geç uğramaları nedeniyle kollajen depolaması katlanarak artar. IGF-1 ve IGF-2 apoptozu engeller ⁽¹⁶²⁾. Skar oluşumu ve skar proliferasyonunda etkili genler, p53 ve p73 tür ⁽¹⁶³⁾.

HTS deki fibroblastlar, bazal kollajen üretimleri artmasına rağmen büyüme faktörleri ve sitokinlere normal tepki verirler ^(148, 159, 164). Oysa keloidler için durum böyle değildir. Keloid fibroblastları, normal skar fibroblastlarından yaklaşık 4 kat fazla fibronektin ve 20 kat fazla kollajen üretimi yaparlar ⁽¹⁶⁵⁾. Keloidler ayrıca HTS lerden yaklaşık 3 kat fazla kollajen üretirler.

TGF- β , büyüme faktörü olarak isimlendirilmesine rağmen sitokin olarak sınıflandırılan düşük molekül ağırlıklı bir moleküldür. Birçok enflamatuar olay üzerinde seçici etkisi mevcuttur. Üç izoformu bulunur. TGF- β 1 ve TGF- β 2 fibrozis ve skar remodelling aşamasında etkilidir ve proliferatif skarlaşmada rol oynarlar. TGF- β 3, tam tersine fizyolojik iyileşmeyi kuvvetlendirir ⁽¹⁶⁶⁾. TGF- β 1, kollajen ve pretoglikan üretimini artırmasının yanı sıra kollajen yıkımını da azaltır ⁽¹⁵⁹⁾. TIMP ve PAI (plazminojen aktivatör inhibitör) genleri TGF β 1 tarafından kontrol edilebilir. TGF β , fibroblastların kemotaksisini sağlar. TGF β nin etkinliği yara onarımı tamamlandığında son bulur. Proliferatif skarlarda TGF β ekspresyonu yara kapanmış olmasına rağmen sürmektedir. Keloidler, HTS le ve normal skarlardan farklı olarak, yüksek miktardaki TGF β uyarısına tam cevap verirler.

D- Enflamasyon ve Proliferatif Skarlaşma İlişkisi

Enflamasyon normal yara iyileşmesinin doğal bir parçasıdır. Bakteriyel kolonizasyon/enfeksiyon, yabancı cisim, mekanik aktivite ve yaranın aşırı büyük ve/derin olması enflamasyon yanıtını artırıcı etki yapar. Hipertrofik skarlar ve fetal yara iyileşmesine ait spesimenlerden elde edilen bulgular, aşırı fibrozis'i güçlü ve tüm iyileşme fazlarında etkin enflamasyonla ilişkilendirmiştir ^(138, 167, 168). Ek olarak, hipertrofik skar oluşumu görülen yaralarda yaralanma ve reepitelizasyon arasında geçen zaman uzundur ⁽¹¹⁷⁾. Bu nedenle enflamasyon fazı daha uzun sürmektedir ⁽¹⁶⁹⁾. Proliferatif skarlarda görülen artmış damar yoğunluğu, mikrovasküler tıkanıklıklar ve damar malformasyonları artmış enflamasyon hücresi varlığı ile ilişkilidir. Ancak,

enflamasyonun mu damarlanma artışını, damarlanma artışının mı enflamasyonu tetiklediği bilinmemektedir ⁽¹³⁸⁾.

Enflamasyon sürecinde, mast hücreleri, makrofajlar ve lenfositler birlikte rol alarak TGF β ve İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gibi fibrinojenik sitokinlerin salınımına neden olurlar ^(138, 152, 167, 168). TGF β 1 ve TGF β 2 izotopları özellikle aşırı skar oluşumuyla ilişkilidir. Yaygın yanık skarları bulunan vakaların serum örneklerinde artmış IL-1, IL-6, TNF α ve TGF- β 2 seviyeleri belirlenmiştir ⁽¹⁷⁰⁾.

Proliferatif skarlaşma ve enflamasyon arasındaki ilişkinin ortaya konması, tedavide bazı antiinflamatuvar ajanların kullanılmasına olanak vermiştir. Başta kortikosteroidler olmak üzere, sitokin inhibitörleri, interferon α ve β , metotreksat ve tamoksifen proliferatif skar oluşumunu azaltmakta değişen oranlarda başarı sağlamıştır ⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾.

Her ne kadar, artmış enflamasyon ve proliferatif skarlaşma arasında tutarlı bir ilişki tanımlansa da, normal(fizyolojik) enflamasyon ile proliferatif skarlaşmaya neden olan patolojik enflamasyon ayrımının nasıl yapılacağı ve enflamasyonu başlatıp sonlandıran etkenlerin tam olarak neler olduğu soruları henüz cevaplanamamıştır. Bu noktada, proliferatif skarlaşma ve enflamasyon ilişkisine yeni bir pencereden bakmak faydalı olabilir. "Proliferatif skarlaşmada sinir kaynaklı(nörojenik) enflamasyon hipotezi" bu aşamada önem kazanır.

E- Nöropeptidlere Bağlı Enflamasyon ve Nöropeptidlerin Skarlaşmaya Etkisi

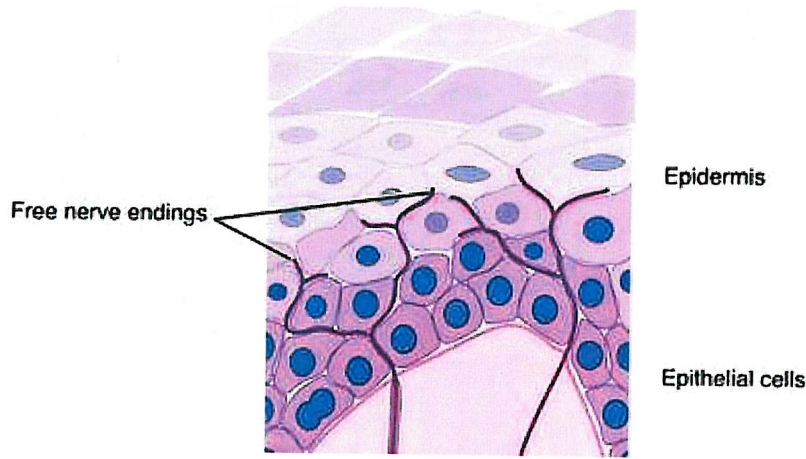
1- Ciltteki Serbest Sinir Sonlanmaları (Noziseptörler)

Periferik sinirler, kalınlıkları ve myelin kılıf varlığına göre A, B ve C olarak üçe ayrılırlar. A lifleri 3–20 μ m kalınlıkta olup myelin kılıfla örtülüdür 120 m/sn ye varan hızlarda iletim yapabilirler. B liflerindeki akson kalınlığı en fazla 3 μ m tır, myelin kılıf zayıftır ve iletim hızı azami 15 m/sn kadardır. Myelinsiz olan C lifleri azami 2 m/sn ile en yavaş iletimi yaparlar. C lifleri sürekli (kesintisiz) iletim yapabilirler. Buna karşılık A ve B lifleri sıçrayıcı (saltatuvar) tarzda iletimden sorumludurlar.

İnsan vücudundaki duyu lifleri; Tip Ia, Tip Ib, A β lifleri(A beta, Tip II), A δ lifleri(A delta, Tip III) ve C lifleri (Tip IV) olmak üzere 5 çeşittir. Tip Ia(A α) kas iğine, Tip IIa golgi tendon organına bağlantılıdır. Tip II(A β) lifler, derinin mekanoreseptör aktivitesi

gösteren; Ruffini organı, Pacinian/Meissner korpuskülleri ve kıl folikülleri ile ilişkidir. Tip II(A β) lifler ayrıca kasta gerim reseptörleri ile bağlantıdadır.

Ciltte nozisepsiyon(hasar verme potansiyeli olan uyarının santral Sinir Sistemi'ne aktarılması), “serbest sinir(SS) sonlanmaları” ile yapılır (Şekil 2). Nozisepsiyon genelde ağrı algısına neden olur. SS sonlanmaları, diğer reseptörlerden farklı olarak enkapsüle değildirler. Basit yapıdırlar ve sinir sonlanmalarının en sık görülen tipini oluştururlar. Isı, mekanik uyarılar(dokunma, basınç, gerilme) ve ağrının algılanması büyük oranda bu yapılar sayesinde gerçekleşir.



Şekil 2: Ciltte serbest sinir sonlanmaları

A δ (Tip III) ve C(Tip IV) liflerinin büyük çoğunluğu ciltte SS sonlanmaları şeklindedir. A δ lifleri, soğğun ve basıncın algılanması ile noziseptör (hasar verebilecek uyarıları SSS ye ileten duyu reseptörü) görevini yürütürler. A δ lifleri, myelinli yapıları sayesinde ağrının hızlı ileticisidirler ve spinal refleks arkının afferent kolunda görev yaparlar. İnce yapıları, diğer A grubu liflere göre daha yavaş iletim yapmalarına neden olur.

Ciltteki diğer noziseptörler, C liflerine ait SS sonlanmalarıdır. Düşük iletim hızları ile yavaş, yanıcı ve künt tarzda ağrının iletilmesinde rol alırlar. C lifleri; termal, mekanik, ve kimyasal uyarılara cevap verebildikleri için polimodal olarak değerlendirilirler. Ciltte ağrı algısının yanı sıra hafif dokunuşta da görev yaparlar. Ultra-yavaş histamin selektif C lifleri kaşıntı hissi oluşumunu sağlar.

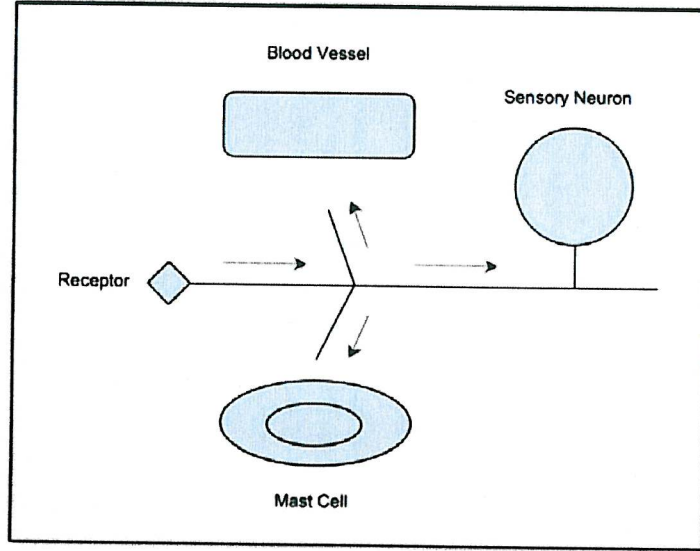
C ve A δ lifleri epidermis dâhil tüm cilt katmanlarını katederler ⁽¹⁷⁴⁻¹⁷⁶⁾. Kılcal damarlara paralel seyir gösterip kıl foliküllerinin etrafını dolaşırlar ⁽¹⁷⁷⁻¹⁷⁸⁾. A δ lifleri

ciltteki primer duyu sinirlerinin % 80 nini oluşturlarken C lifleri %20 oranındadır ^(179, 180). Cilt içerisinde bulunan liflerin Mast hücreleri, Langerhans ve Merkel hücreleri ile doğrudan temas halinde olmaları sinir kaynaklı mediyatörlerin enflamasyonda rolü olabileceğini düşündürmektedir ⁽¹⁸¹⁾.

2- Nörojenik Enflamasyon ve Nöropeptidlerin Fibroblast Aktivitesine Doğrudan Etkisi

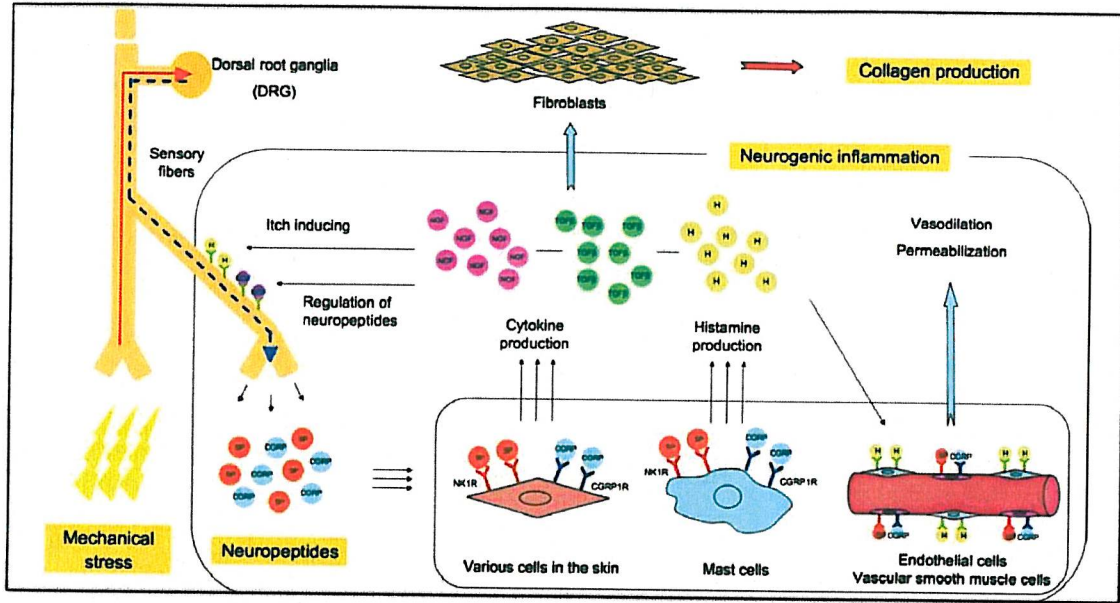
Son yıllarda sinir dokusunun; immün yanıt, enflamasyon ve yara iyileşmesindeki rolü daha çok araştırılır olmuştur ⁽¹⁸²⁻¹⁸⁷⁾. Normalde, ağrı, propriyosepsiyon(vücut bölgelerinin hareket ve konumlarının algılanması) ve ısının oluşturduğu sinyaller, dorsal kök gangliyon hücreleri tarafından retrograd biçimde santral sinir sistemine iletilir. Bayliss 1901 yılında dorsal duyu kökünün elektrostimulasyon ile ciltte vazodilatasyon oluşturduğunu rapor etmiştir ⁽¹⁸⁸⁾. Bu, antidromik(ters yönde) sinir uyarısının ciltte enflamasyon etkisi oluşturduğunu ispatlayan ilk çalışmadır. 1927 yılında Lewis; histamin ve Substans P (SP) ile ciltte “üçlü yanıt” oluşturduğunu rapor etmiştir ⁽¹⁸⁹⁾. Üçlü yanıt; ciltte önce eritem ardından daire şeklinde ödem ve nihayet ödemin etrafında kırmızı bir sınır oluşumunun gözlemlenmesidir.

Elektrostimulasyonun yanı sıra “axon refleksi” mekanizması da antidromik uyarıya neden olur. Axon refleksi, sinire ait distal dallardan birinin uyarılması sonrasında uyarının santraldeki (proksimaldeki) dallanma seviyesine kadar ilerlemesi ve diğer dallara aktarılmasıdır ⁽¹⁹⁰⁾ (**Şekil 3**). Böylece bir dala ait retrograd uyarı başka bir dalda anterograd (antidromik) etki gösterir. Antidromik etki serbest uçlardan nöropeptid salınımına neden olur.



Şekil 3: “Akson refleksi” mekanizmasının şematik anlatımı. Reseptörde oluşan retrograd uyarı diğer dallarda anterograd(antidromik) uyarıya neden oluyor. **The Axon reflex.** Mevlut Y. Neuroanatomy (2008) 7: 17–19

Nörojenik enflamasyon, antidromik uyarı ve akson refleksi mekanizmalarıyla SS sonlanmalarından “nöropeptid” salınımı sonucu oluşur (Şekil 4). Nöropeptidler; sinir sonlanmaları-immun sistem-cilt arasında medyatörlük yapan ve enflamasyon oluşumuna neden olan moleküllerdir ^(188, 191-193). Hücre gövdesinde(soma) sentezlenip “hızlı akson transportu” ile SS sonlanmalarına gönderilirler ⁽¹⁹⁴⁾. Birçok hücre tipinde nöropeptid reseptörü bulunmaktadır. Dokuya salındıklarında endotel hücrelerinin şeklini değiştirerek kapiller sızmaya, düz kas hücrelerini gevşeterek vazodilatasyona ve enflamasyon hücrelerinin uyarılmasına neden olurlar ^(195, 196).



Şekil 4: Serbest sinir sonlanmalarının uyarılmasıyla oluşan nörojenik enflamasyonun aşırı skarlaşma ile ilişkisi. **Keloid and Hypertrophic Scar: Neurogenic Inflammation Hypotheses** Satoshi Akaishi, Rei Ogawa, Hiko Hyakusoku. *Medical Hypotheses* (2008) 71, 32–38

Nöropeptidlerin hedef hücreler üzerindeki etkisi parakrin, endokrin ve jukstakrin (hücrelerin fiziksel teması) etki ile gerçekleşir. Mast hücreleri, ciltteki sinir lifleri ile olan anatomik ilişkileri nedeniyle bu etkide önemli rol oynarlar. Nöropeptidlerin, mast hücrelerdeki etkilerinin PAR-2 (protease activated receptor-2) ile gerçekleştiği düşünülmektedir⁽²⁰³⁾. PAR-2, G proteine ilişiktir. Keratinositler, endotel hücreleri, kıl folikül hücreleri ve miyoepitelyal hücrelerde bulunur^(204, 205).

Ciltteki duyuşal nöropeptidlerin büyük çoğunluğu, nörokininler ve CGRP (calcitonin gene related peptide) den oluşur. Ek olarak, insan da dâhil farklı türlerin cildinde 20 den fazla nöropeptid tanımlanmıştır. Somatostatin, endorfin, enkefalin, galanin, dinorfin, ANP (atrial natriuretic peptide), MSH (melanotropik hormon), CRH (corticotropin releasing hormone). VIP (vasoactive intestinal peptide) ve ürokortin bunlardan bazılarıdır⁽²⁰³⁾.

SP, NKA ve CGRP hem dermiste hem de epidermiste bulunurlarken VIP sadece dermiste bulunur⁽¹⁹⁴⁾. SP, NKA ve CGRP nin en fazla bulunduğu cilt bölgeleri, ayak tabanı ve el derisidir. Bu bölgelerin dokunmaya hassas olmaları dikkat çekicidir. En düşük seviyeler uyluk, kol ve kasıktadır. Bu alanlar görece olarak dokunmaya daha az

duyarlıdır. Bu bulgular SP ve CGRP nin duyu nöropeptidleri olarak önemini ortaya koyar ⁽²⁰⁶⁾.

Kapsaisin (8-methyl N-vanillyl 6-nonamide), duyu sinirlerini doğrudan stimule eder. Acı bibere yakıcı özelliğini veren bu molekül, nörojenik enflamasyon araştırmalarında önemli yere sahiptir. Cilde doğrudan kapsaisin uygulanması, yanma hissine neden olur. Bu his soğuk uygulamasıyla azalırken ısının artırılmasıyla artar ⁽¹⁹⁸⁾. C lifleri kapsaisine oldukça duyarlıdır ⁽¹⁹⁷⁾. Kapsaisin, hızlı başlayan güçlü etkisi nedeniyle duyu sinirlerinde nöropeptid depolarının tükenmesine neden olur. Bu olaya “kapsaisin desensitizasyonu” adı verilir ^(199, 200). Kapsaisin desensitizasyonunda uzun süren analjezi ve ciltte termoregulasyon bozukluğu görülür. Bu bulgular, ciltteki C liflerinde özel kapsaisin reseptörleri olduğu hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur ⁽²⁰⁰⁻²⁰²⁾. Günümüzde, TRPV-1 (transient receptor potential vanilloid 1) isimli bir “kapsaisin reseptörü keşfedilmiştir. Ciltte kapsaisine duyarlı sinir lifleri hem afferent hem de efferent görev yaparak aynı sinir sonlanmasından nöropeptid salınımını yaparlar.

2-1 Nörokininler

Nörokininler, 10-13 aminoasitten oluşan küçük peptidlerdir. Sinir hücrelerinin hasar verici uyarıya cevabında rol oynarlar. “Nörokinin” ismi bu peptid ailesinin memelilerde bulunan üyelerine verilen addır. Bu moleküller, memelilerden alt seviyedeki organizmalarda “taşikinin” olarak adlandırılır.

Memelilerin sinir dokusunda 5 farklı nörokinin (NK) bulunur. Bunlar; “Substans P” (SP), “nörokinin A” (NKA), “nörokinin B” (NKB), “nöropeptid K” ve “nöropeptid γ ” (gamma) dır ⁽²⁰⁷⁾. NK ler sinir hücrelerine özgüdür. Duyu sinirlerince salınan NK’ler sinapslarda rol alarak noziseptif ağrının iletilmesini sağlarlar. Ayrıca periferik sinir dokularından salınarak nörojenik enflamasyon oluştururlar.

NK ler biyolojik etkilerini “G proteini bağlantılı nörokinin reseptörleri” ne bağlanarak gerçekleştirirler. NK reseptörlerinin; NK1, NK2 ve NK3 olmak üzere 3 çeşidi vardır. SP NK1 reseptörüne, NKA NK2 reseptörüne, NKB ise NK3 reseptörüne afinite gösterse de her nörokinin her reseptör tipine bağlanabilir ⁽²⁰⁷⁾.

SP, 11 aminoasitten oluşan bir peptiddir. SP aktivitesi NEP (neutral endopeptidase) tarafından denetlenir. NEP, hücre zarına bağlı bir metallopeptidazdır ve SP yi hücre

zarında yıkar. Bu enzim endotel, epitelyum ve düz kas hücre zarlarında hücre zarlarında NK reseptörleri ile yarışa girer ⁽²⁰⁸⁾.

SP, farklı farklı dokularda vazodilatasyon ve ödem oluşturabilir. İnsan cildinde damarların proteinlere olan geçirgenliğini artırır. Cildin dermal papillalarında ve epidermisinde SP içeren SS sonlanmaları bulunur. Bu sonlanmalar ter bezleri, damarlar, kıl folikülleri, mast hücreleri, fibroblastlar ve epidermal hücreler ile yakın komşuluktadır. SP reseptörleri (NK1) mast hücreleri, langerhans hücreleri, keratinositler, ter bezleri, kıl folikülleri lenfositler ve makrofajlarda da bulunur. Makrofajlar, SP uyarısıyla, prostoglandin E₂ (PGE₂), tromboksan B2 ve süperoksit iyonu salgılamak mast hücreleri ve lenfositler IL 1 ve TNF α salınımı yaparlar ^(209, 210). SP, endotel ve lökositlerin etkileşimini direkt olarak etkiler ^(203, 207, 211). Bunu hücre adezyonunda ve transmigrasyonunda önemi olan ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) ve VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) moleküllerini düzenleyerek yapar. SP ve NKA keratinositlerden IL-1 ve IL-8 ve TGF α salınımını artırır ^(203, 212). İn vitro keratinositlerin SP yi bağladığı gösterilmiştir. SP ayrıca mononükleer ve multilobule lökositler için kemotaktiktir ⁽²¹²⁾. Bu özelliği nedeniyle nörojenik uyarılar sonrasında ciltte enflamasyon hücresi sayısı artar. SP nin hedef hücrelerde NO(nitrik oksit) üretimini artırıcı özelliği vardır ⁽²¹³⁾. NO, SP nin proinflatuar etkisini kuvvetlendirir. Sinir rezeksiyonu, kapsaisin ile duyu denervasyonu ve laser kaynaklı fokal nöropati durumlarında dokudaki SP miktarı azalır ⁽²¹⁴⁻²¹⁸⁾.

İnsan cildinde nörokininler (özellikle SP) fibroblast proliferasyonunu ve aktivitesini artırır ^(207, 219). Bu etkileri büyük oranda NK1 reseptör üzerindedir. Nörokininler ayrıca endotel ve keratinosit proliferasyonunu da artırır ⁽¹⁹²⁾.

NKA, yapı olarak SP ye benzerdir. IL-1, lipopolisakkaridler ve nöral büyüme faktörleri NKA nın ekspresyonunu artırır. NKA mast hücrelerinden, TNF, histamin, prostaglandin, lökotrien B4 salınımını artırır ^(203, 221). Kaşıntı ve vasküler yanıtı neden olur.

2-2 Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)

CGRP, 37 aminoasitten oluşan bir peptiddir. Hem C hem de A δ duyu liflerinde bulunur. İlk olarak, meduller tiroid kanseri bulunan yaşlı deney hayvanlarında ve

insanlarda saptanmıştır ⁽²²¹⁾. Etkisini CGRP₁ ve CGRP₂ reseptörleri ile gösterir ⁽²²²⁾. CGRP 1 reseptörü ile etkileşim arteriol dilatasyonu ve hiperemiye neden olur. Hücre infiltrasyonunu artırıcı etkisi vardır. T lenfositler ve nötrofiller için kemotaktiktir ⁽²¹²⁾. Endotel hücrelerinin ve keratinositlerin proliferasyonunu artırır. Sinir rezeksiyonu ve kapsaisin ile duyu denervasyonu yaradaki CGRP içeren sinirleri azaltır ^(223, 224). CGRP, NEP aktivitesini kısıtlayarak SP yıkımını azaltır. Ayrıca SP salınmasını artırıcı etki yapar ⁽²⁰⁷⁾. Triptaz enzimi CGRP yi yıkar.

2-3 Diğer Nöropeptidler

Nöropeptidlerin ve duyu sinirlerinden salınan biyoaktif ajanların sayısı giderek artmaktadır. Peptid yapıda olmayan pürinler ve nitrik oksitin yanı sıra; somatostatin, endorfin, enkefalin, galanin, dinorfin, ANP (atrial natriuretic peptide) , MSH (melanotropik hormon), CRH (corticotropin releasing hormone), urocortin, VIP (vasoactive intestinal peptide) diğer nöropeptidlerdir.

Ciltte duyu liflerine ek olarak az sayıda otonomik sinir lifi de bulunur. Bu lifler, asetilkolin ve katekolaminlerin yanı sıra; VIP, CGRP, nöropeptid Y (NKY) gibi nöropeptidleri de salarlar.

3- Proliferatif Skarlaşmada Nöropeptidlerin Yeri

Uyarılmış sinir liflerinden salınan nöropeptidler, keratinositler, fibroblastlar, mast hücreleri ve endotel hücrelerinde bulunan NK1 ve CGRP1 reseptörlerine bağlanırlar. Takiben vazodilatasyon ve permeabilite artışı olur. Bu olayda SP bağımlı NO sentezinin ve mast hücrelerinden salınan histaminin rolü vardır. Histamin etkisini damar düz kas hücrelerindeki H1 reseptörleri ile gösterir ^(225, 226). Histamin ayrıca C lifleri üzerindeki H1 reseptörlerine bağlanarak kaşıntıyı tetikler.

Nöropeptidler birçok hücre tipinde TGF β ve NGF (neural growth factor) gibi sitokinlerin salınmasına neden olurlar. TGF β , fibroblast aktivitesini ve kollajen sentezini güçlü biçimde artırır ⁽¹³⁾. Ek olarak, ortamda miktarı artan NGF sinir liflerinden daha fazla miktarda nöropeptid salınmasını sağlar ⁽²²⁷⁾. Bu durum enflamasyonu ve kollajen depolanmasını artıran bir kısır döngüye neden olur. Kültür edilmiş insan fibroblastlarında eksojen SP uygulaması ile bir ara medyatör olan “preprotaşikin A” seviyelerinde önemli artış saptanmıştır. SP, insan fibroblast

kemotaksisini doz bağımlı biçimde artırmaktadır ⁽²²⁸⁾. Endopeptidaz enzimi kullanılarak elde edilen SP fragmanları ile yapılan çalışmalarda, fibroblast kemotaksis etkisinin “COOH” terminalleri sayesinde gerçekleştiği bulunmuştur ⁽²²⁹⁾. Bu uçlar aynı zamanda nörokinin reseptörleri için de aktiftirler ⁽²³⁰⁾. Optimal NK1 ve NK2 agonist konsantrasyonlarının bulunduğu bir deney ortamında fibroblastlar NK1 agonistine doğru göç etmektedirler ⁽²²⁸⁾.

SP, fibrinojenik sitokin uyarımlı fibroblast proliferasyonunu da artırır ^(13, 231). IL 1 ve PDGF ile sinerjik çalışarak kemik iliği kaynaklı fibroblastların proliferasyonuna neden olur ⁽²³²⁾. İnsan cildinden elde edilen fibroblastların proliferasyonları SP tarafından doz bağımlı biçimde artırılır. SP uygulanan fibroblastlarda 48 saat içinde fibrinojenik bir sitokin olan TGF β ' ya ait mRNA ekspresyonunda önemli artış oluşmaktadır ⁽²³²⁾. SP ayrıca lökositlerde doğrudan TNF α ve IL-6 salınması sağlar ⁽⁹⁾.

İnsan ve hayvan proliferatif skar örneklerinde çok miktarda nöropeptid içeren sinir lifi tesbit edilmiştir ⁽²³³⁻²³⁵⁾. Ayrıca, HTS örneklerindeki SP miktarı normal cilde göre anlamlı derecede yüksektir ⁽²³⁶⁾. HTS dokularında artmış SP aktivitesinin yanı sıra azalmış NEP(neutral endopeptidase) aktivitesi de tesbit edilmiştir. NEP, SP yi yıkan başlıca enzimdir. Tüm bu bulgular nöropeptidlerin nörojenik enflamasyon ve doğrudan etki yoluyla proliferatif skarlaşmada rol aldıklarını düşündürmektedir.

F- Tavşan Kulağında Aşırı Dermal Skarlaşma Modeli

Cildin skarlaşması dinamik ve kesintisiz bir süreçtir. İnsanlarda yapılan skar çalışmaları etik problemler nedeniyle kısıtlı olanaklar sunarlar. Bu nedenle ideal bir hayvan modeline ihtiyaç vardır.

Günümüzde HTS ve keloid çalışmalarında kullanılan başlıca 5 model bulunmaktadır⁽²³⁷⁾:

1. Bağışıklık sistemi güçsüzleştirilmiş (immündefisitli) hayvanlara (atimik fare ve sıçan) HTS ve keloid dokularının heterolog implantasyonu (atimik fare ve sıçan modeli)
2. Bağışıklık yanıtın farklı olduğu bölgelere HTS ve keloid dokularının heterolog implantasyonu (hamster yanağı modeli)
3. Kimyasal hasar yoluyla HTS oluşturulması (guinea domuzu modeli)
4. Özel anatomik bölgelerde HTS oluşturulması (tavşan kulağı modeli)
5. Derin dermis yaralarında HTS indüksiyonu (domuz modeli)

Her modelin kendine has avantajları ve dezavantajları vardır. “Bağışıklık sistemi güçsüzleştirilmiş hayvanlara insan HTS ve keloid dokularının implante edilmesi” yönteminde skar dokusu in vivo ortamından uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle skar dokusunun gelişimi durur. Ayrıca bağışıklık sistemindeki yetersizlik, hayvanlarda morbidite ve mortalitenin artmasına neden olmaktadır (238, 239). Fare, sıçan ve hamsterlere skar implantasyonu yöntemlerindeki ana problemlerden birisi de, hayvan ve insan dokularında yara iyileşmesinde görülen farklılıklardır (237). Bu yöntemlerde, hâlihazırda oluşmuş proliferatif skarlar başka bir organizmaya implante edildikleri için skar oluşum mekanizmalarının incelenmesinde kullanılamazlar.

Guinea domuzlarında tanımlanmış olan “kimyasal hasar yoluyla HTS” oluşturulması yönteminde deneklerin küçük bir bölümünde HTS oluşumu görülmektedir (240). Düşük başarı oranı bu yöntemin etkisini azaltmaktadır. Domuzlarda tanımlanmış olan derin dermal yara modeli ise; pahalı, uygulaması ve idamesi zor bir yöntemdir.

Çalışmamız için, tutarlı biçimde “aşırı dermal skarlaşma” oluşturan bir modelin ilgili cilt bölgesinde kalıcı duyu denervasyonu gerekliydi. Bu nedenle, anatomik duyu sinirlerine sahip ve aşırı dermal skarlaşmaya yatkın bir cilt bölgesinde çalışmayı uygun bulduk. Dahası, denervasyon işleminin yara iyileşmesini komplike etmeyecek bir uzaklıktan yapılması gerekiyordu. Çalışılacak bölgeyi innerve eden anatomik duyu sinirlerinin varlığı, anterior bölgede kıl foliküllerinin azlığı, tutarlı biçimde aşırı skarlaşma oluşturması ve skarlaşmanın kantitatif biçimde ölçülebilir olması nedeniyle çalışmamızı, “tavşan kulağı modeli”nde planladık.

Tavşan kulağında aşırı dermal skarlaşma modeli, Morris ve ark (15) tarafından tanımlandıktan sonra birçok çalışmada kullanılmıştır. Araştırmacılar, tavşan kulağında kabarık skarların oluştuğunu gözlemleyerek bu modelin tanımlandığı bir çalışma yayınlamışlardır. Model, bazı ajanların aşırı skarlaşma tedavisindeki etkisini araştırmanın yanı sıra, aşırı skarlaşmada etkili moleküler mekanizmaların araştırılmasında da kullanılmıştır (169, 241-244). Lu ve ark. Bu modelde yara içine anti-TGF β antikoru enjekte ederek skarlaşmaya olan etkiyi incelemiştir (244). Bu çalışmaya göre; 0-4 gün arası uygulanan anti-TGF β antikoru herhangi bir fark yaratmazken, 7-13. günler arasında yapılan uygulama skarlaşmayı azaltmıştır.

3-GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulunun (HADYEK) "TCAM 09/20" sayılı izini ile planlandı. Ağırlıkları 2900-3700 gr, yaşları 5-7 ay arasında değişen 16 adet dişi Beyaz Yeni Zelanda Tavşanı (BYZT) kullanıldı. Deney hayvanlarının bakımı ve cerrahi girişimlerin tümü Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi. Deney hayvanlarının tamamı standart fiziki şartların sağlandığı odalarda ayrı kafeslerde tutuldu ve standart tavşan diyeti ile beslendi.

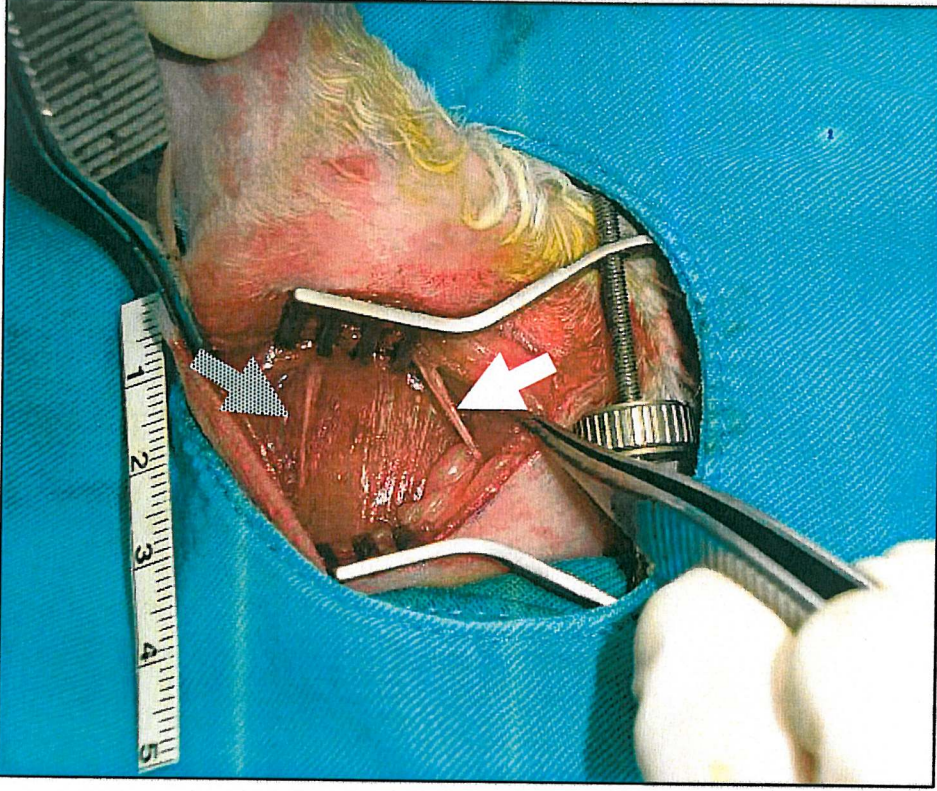
1- Cerrahi teknik

Tüm deney hayvanlarına 2 aşamalı cerrahi uygulandı. İlk aşamada, hayvanların sağ kulakları denerve edilerek, denerve (sağ, n:16) ve intakt (sol, n:16) kulak grupları elde edildi. İkinci aşamada ise tüm kulaklardaki (n:32) ilgili cilt bölgesine Morris ve ark (REF) tarafından tanımlanmış "aşırı dermal skarlaşmanın akut modeli"ne uygun yara modeli oluşturuldu.

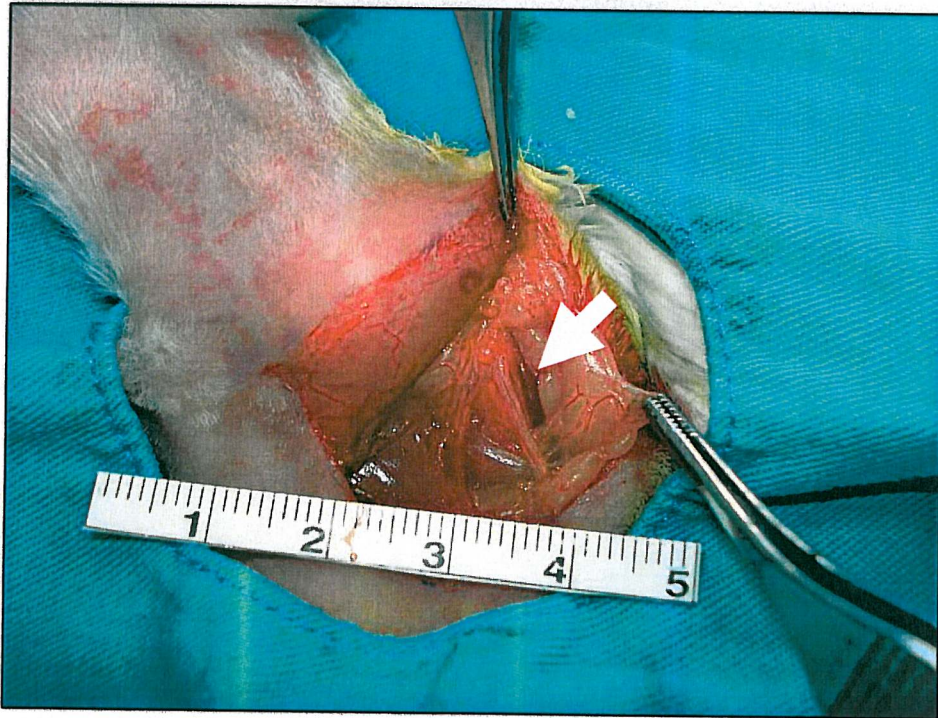
1-1- Denerve ve İntakt Kulak Gruplarının Elde Edilmesi

Tüm hayvanlara 45 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® 50 mg/ml flakon Pfizer) ve 6 mg ksilazin (Rompun® flakon Bayer) intramusküler yolla uygulanarak anestezi sağlandı. Ardından, cerrahi profilaksi amacıyla 30 mg/kg sefazolin (Sefazol® 500mg/ml flk Mustafa Nevzat) tek doz uygulandı. Her iki kulak arkasında aurikulokraniyal sulkuslar ve çevre bölgesi traş edilerek yüzüstü pozisyonda ameliyat masasına tespit yapıldı. % 10 betadine antiseptik solüsyon uygulanarak antisepsi sağlandı. Uygun örtümün ardından steril cerrahi kalem ile bilateral aurikulokraniyal sulkuslarda insizyon hatları işaretlendi (**Resim 2**).

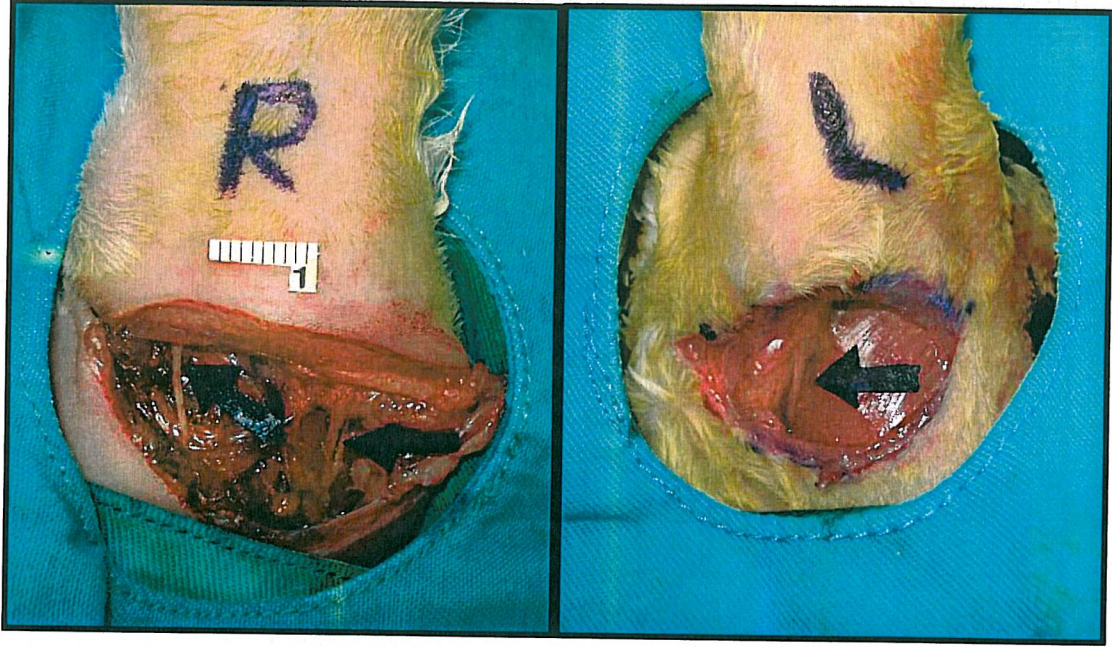
15 numaralı bistüri ile her iki sulkusta 2 cm lik cilt ve cilt altı insizyonu yapıldı. Tavşan kulağının 2 önemli duyu siniri; "Büyük Aurikular Sinir" ve "Küçük Oksipital sinir" dir (**Şekil 5**). "Büyük aurikular sinir", lateralde musculus parotidoaurikularis'in üzerinde kulağa doğru yöneldiği konumda ortaya kondu. Kulak proksimalinin mediyalinde derin aurikular kasların derininden çıkarak musculus frontoskutularisin ön sınırında seyreden "küçük oksipital sinir" de bulundu. (**Resim 3**). Kulağın bu iki önemli



Resim 3: Küçük oksipital Sinir(gri ok) ve Büyük Aurikular Sinir(beyaz ok) diseksiyonu

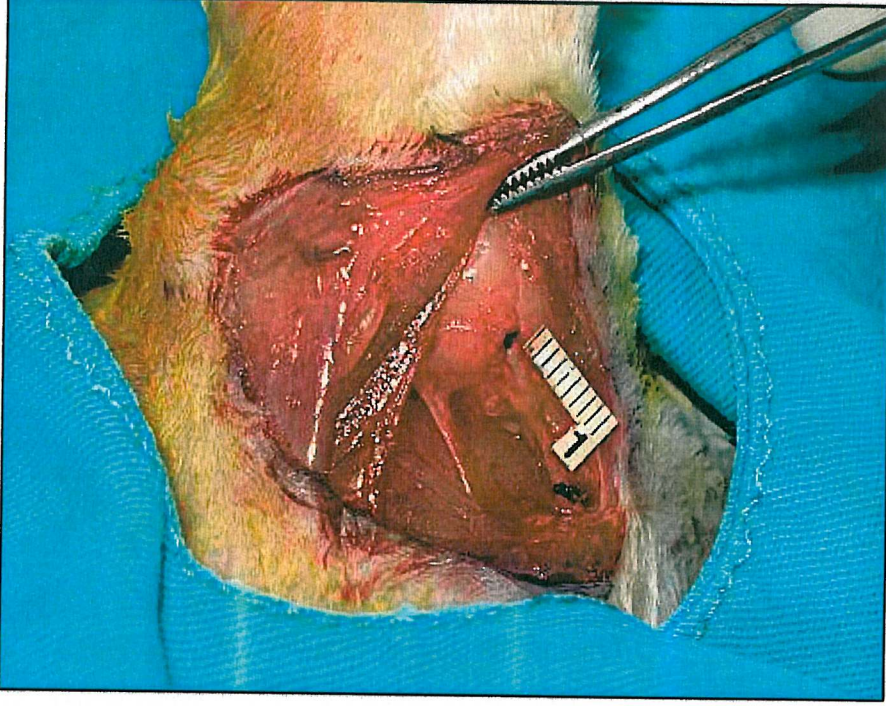


Resim 4: Sinirlerin komşuluğundaki arter ve ven yapıların(ok) korunması.



Resim 5: Aurikulokraniyal sulkus insizyonları ve sinir diseksiyonları bilateral olarak yapıldı. Sinirler ok ile gösterilmiştir.

Sadece sağ kulağa ait sinirlerden eksizyon yapıldı. Sinir eksizyonu öncesinde bölgeye lokal anestetik (prilokain hidroklorür, Citanest® % 2 20 ml flakon, Astra Zeneca) damlatılarak nörotomiden kaynaklanacak ani ve güçlü ağrı oluşumu engellendi. 1 cm lik eksizyon uzunluğu ölçülerek proksimal ve distal güdüklere 4/0 ipek sutür ile bağlama yapıldıktan sonra sinirlerden eksizyon gerçekleştirildi (**Resim 6, Resim 7**).

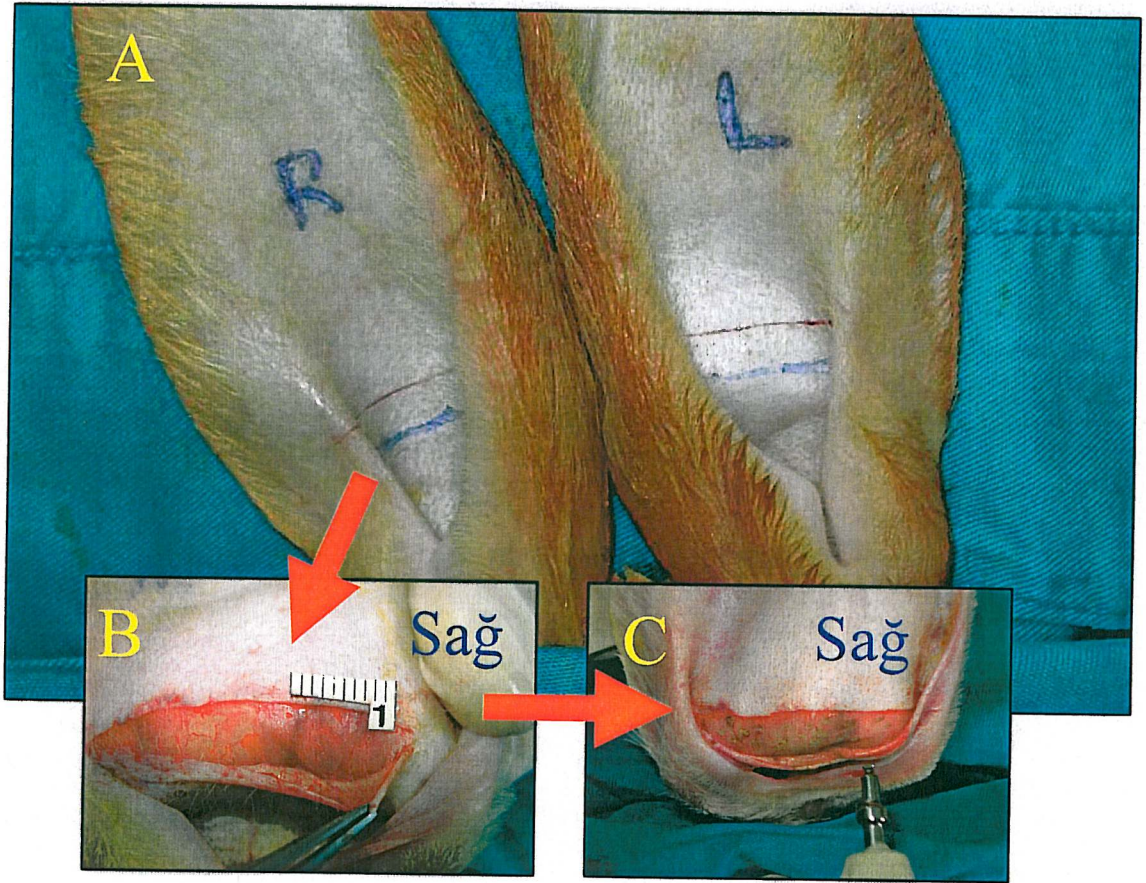


Resim 6: Denervasyon amacıyla sinir eksizyonundan önce ipek sutür ile bağlama ve ölçüm. Eksizyon sadece sağ tarafta yapıldı



Resim 7: Sağ kulağın Küçük Oksipital Sinir ve Büyük Aurikular Sinir' inden eksizyon

Sağ tarafta kulağın anterior cildinin duyu denervasyonunu artırmak için ek bir işlem gerçekleştirildi (**Resim 8**). Bu işlemde, kulağın proksimal anterior 1/3 sınırında horizontal tam kat cilt insizyonu yapıldı. Yapılan insizyondan proksimal tabanlı 0,5 cm kalınlığında cilt flebi kaldırıldı. Distaldeki denervasyonu artırmak amacıyla flebin üzerindeki ve zemindeki ince damar ve/veya sinir grupları düşük seviyede ayarlanmış elektrokoter ile koterize edildi. Grupları eşitlemek amacıyla tariflenen cilt kesisi sol tarafa da uygulandı. Ancak sol tarafta cilt flebi ve koterleme işlemi yapılmadı.



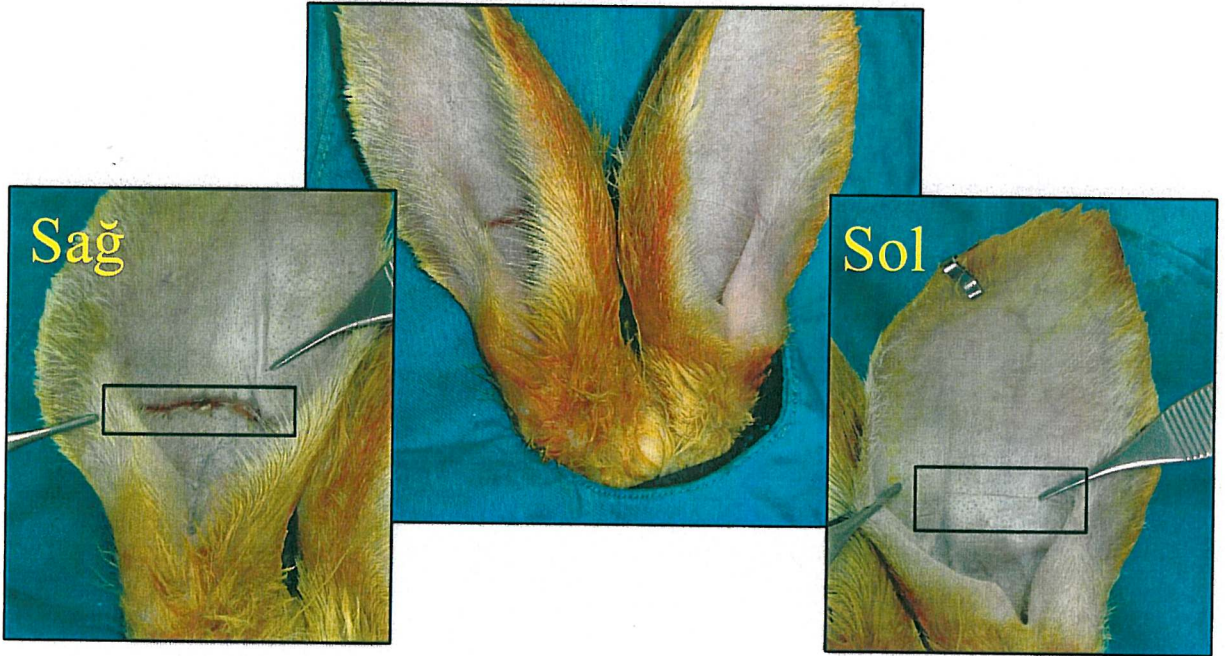
Resim 8: A: Kulağın anterior 1/3 proksimalinde bilateral horizontal cilt -cilt altı kesisi. B: Sağ tarafta insizyondan proksimal tabanlı olarak kaldırılan cilt flebi. C: Flebin üzerinde ve zemindeki ince sinir ve damar demetlerinin koterizasyonu.

İşlem sonunda kanama kontrolü yapıldıktan sonra insizyonlar derin ve yüzeysel planlarda sutüre edildi. Günlük olarak pansuman yapıldı. Bu aşamadan sonra hayvanlar, insizyonların iyileşmesi ve kalıcı denervasyon etkisinin gözlenmesi amacıyla 14 gün boyunca ek bir işlem yapılmaksızın standart koşullarda takip edildiler.

14. gün sonunda kulaklarda duyu muayenesi yapıldı. Duyu muayenesi için hayvanlara anestezi yapılmaksızın 2 farklı test uygulandı

1. “Dişsiz forseps” yardımıyla ilgili kulak bölgesinin sıkıştırılması (pinch testi)
2. 21 G lik enjektör iğnesi ile kulağın anterior ve posterir cildinde duyu muayenesi (iğne ucu testi)

Bu testlerde verilen ağrılı uyarın sonucunda “istemli/ istemsiz olarak kulağı ve/veya başı geri çekme hareketinin yokluğu” ilgili cilt bölgesinde duyu kaybı olarak değerlendirildi. 14. gün sonunda tüm hayvanlarda sağ kulağın sinir eksizyonu ve koterizasyonu yapılan seviyesinin distalindeki posterior ve anterior cilt bölgelerinde sol tarafa göre belirgin duyu kaybı gözlemlendi (**Resim 9**) . Denervasyon yapılmayan taraftaki (sol) tüm kulaklarda ağrılı uyarınla “geri çekme” hareketi gözlemlendi.

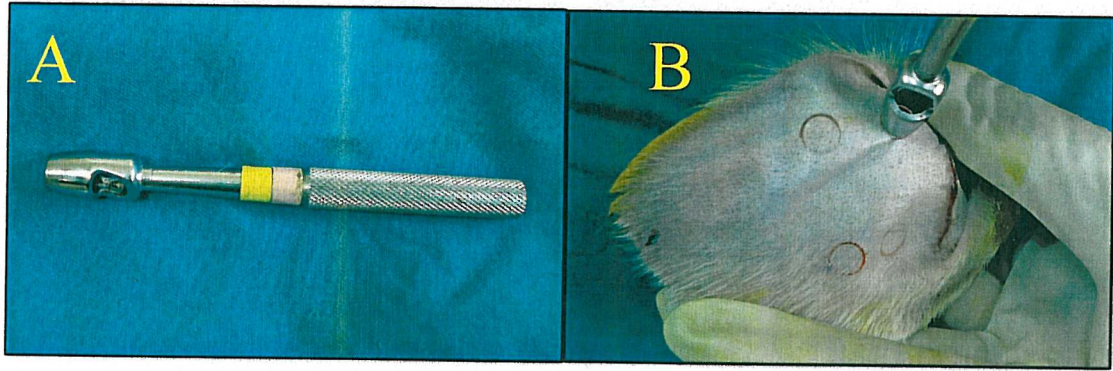


Resim 9: 14. gün sonunda dişsiz forseps yardımıyla kulak cildinde duyu muayenesi. Sağ taraftaki horizontal insizyonun flep kaldırılması ve koterizasyona bağlı olarak daha geç ve skarlı iyileştiği gözlemlendi.

1-2 Kulaklara “Aşırı Dermal Skarlaşma Yara Modeli”nin Uygulanması

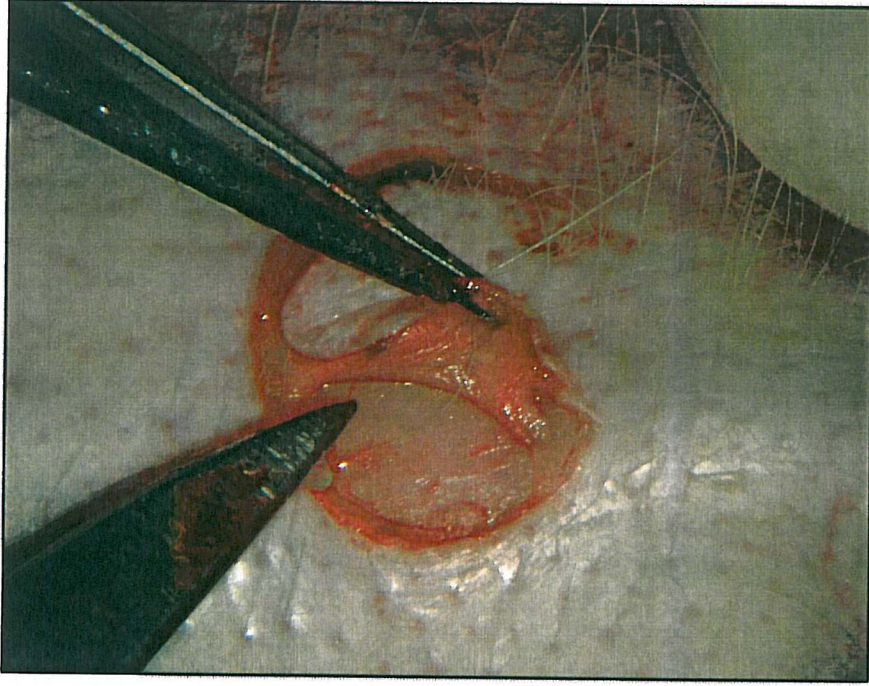
Birinci aşamadaki anestezi ve diğer hazırlıklar aynen tekrarlandıktan sonra, her bir kulağın anteriorunda orta 1/3 lük cilt bölgesinde eksizyonel yaralar oluşturuldu. Bunun için öncelikle, Morris ve ark⁽¹⁵⁾ nin tanımladığı “aşırı dermal skarlaşmanın akut

modeli” ne uygun olarak, 7 mm lik pa biyopsi aleti yardımıyla (**Resim 10**) yara sınırları belirlendi. Bu esnada yaranın orijinal genişliğini belirlemek için zemindeki kıkırdak dokusunda pa aleti yardımıyla kısmi kalınlıkta insizyon yapıldı. Ardından, epidermis-dermis ve perikondrium tabakaları zeminde çıplak kıkırdak dokusu kalacak şekilde mikrocerrahi aletler ve ameliyat mikroskobu yardımıyla eksize edildi (**Resim 11**). Her kulakta 4 adet, bir hayvanda toplam 8 adet yara oluşturuldu (**Resim 12**). Yaralara yukarıdan aşağı, medialden laterale olacak sırayla “1, 2, 3, 4” şeklinde numara verildi. Yaralar oluşturulduktan sonra ilgili bölgeye şeffaf poliüretan film rt (Tegaderm[®], 3M Health Care) kullanılarak pansuman yapıldı. Oluřturulan toplam 128 yaranın yarısı (n:64) denerve kulak, diğer yarısı (n:64) intakt kulak grubundaydı.

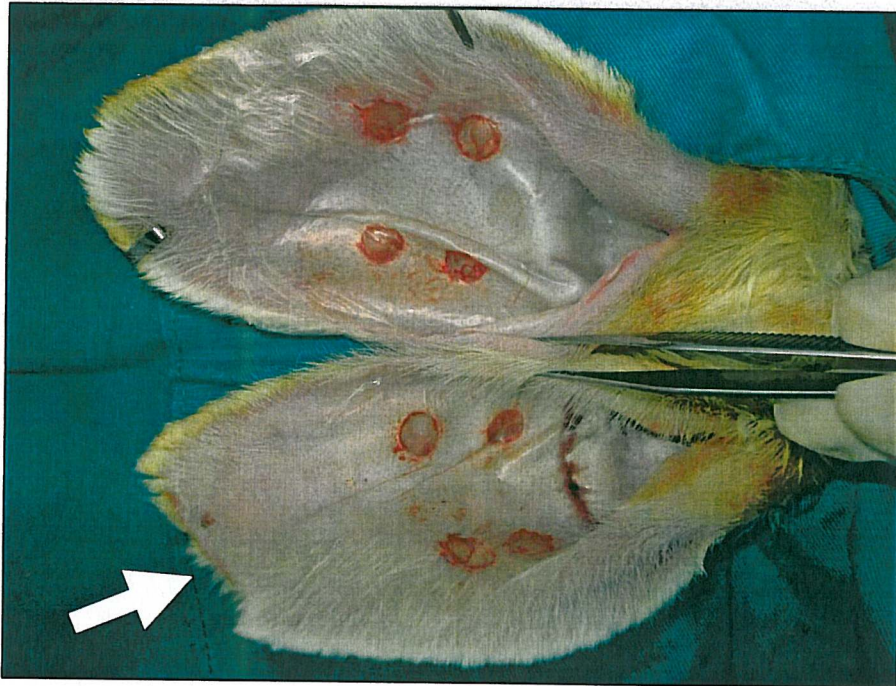


Resim 10: A: 7 mm lik pa biyopsi aleti.

B: Pa aleti ile yara sınırlarının oluşturulması



Resim 11: Epidermis- dermis ve perikondriyum tabakalarının büyütmeye altında uzaklaştırılması

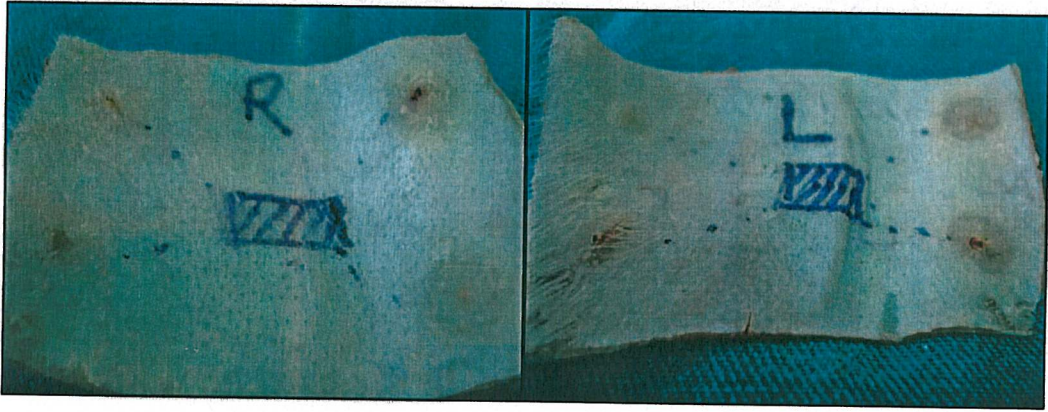


Resim 12: Her kulakta 4 adet, bir hayvanda toplam 8 adet yara oluşturuldu. Denervasyon sonrası sağ kulak distalindeki "self- mutilasyon"a bağlı doku kaybı dikkat çekiyor (ok).

Yara modelinin uygulanmasını takiben hayvanlar 28 gün boyunca standart koşullarda takip edildiler. Günlük pansuman kontrolü yapıldı ve yaraların epitelizasyon zamanı ayrı ayrı kaydedildi. 28. gün sonunda, iyileşen yaralara ait skarların fotoğrafları alındı.

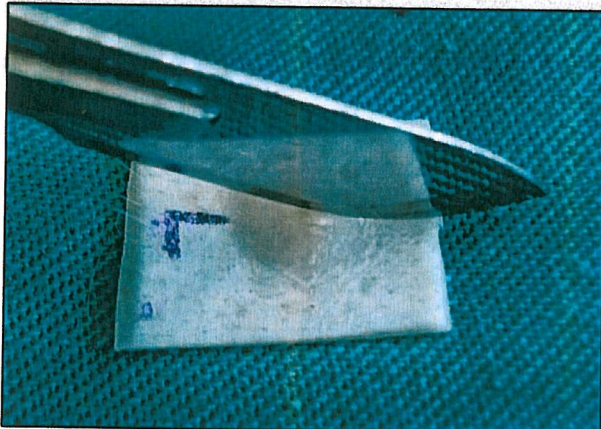
2- Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Biyopsi Materyallerinin Temini

28. gün sonunda hayvanlar, 45 mg/kg ketamin hidroklorür ile anestiyi takiben intravenöz 6 mEq KCl uygulanarak sakrifiye edildiler. Hemen ardından yara modeline ait skar dokuları, çevresinde en az 3 mm intakt cilt bölgesi olacak şekilde eksize edildi. Ayrıca intakt ciltteki sinir liflerinin immunhistokimya değerlendirmesi için her kulaktaki 4 yara modeline eşit uzaklıktaki cilt bölgesinden örnek alındı (sağ:16, sol:16, toplam:32 örnek) (Resim 13)



Resim 13: İntakt ciltte sinirlerin immunhistokimya ile değerlendirilmesi için yaralara eşit uzaklıktan spesimen alındı

Skar kesitinin histolojik ve histomorfometrik incelemesi için her bir skar dokusu en yüksek noktasından 20 numaralı bistüri ile kesilerek ikiye ayrıldı (biseksiyon)(Resim 14). Değerlendirmeler tek bir kesitten yapıldı.



Resim 14: Histomorfometrik ve histopatolojik değerlendirme için her bir skarın en yüksek noktasından kesit alındı (biseksiyon)

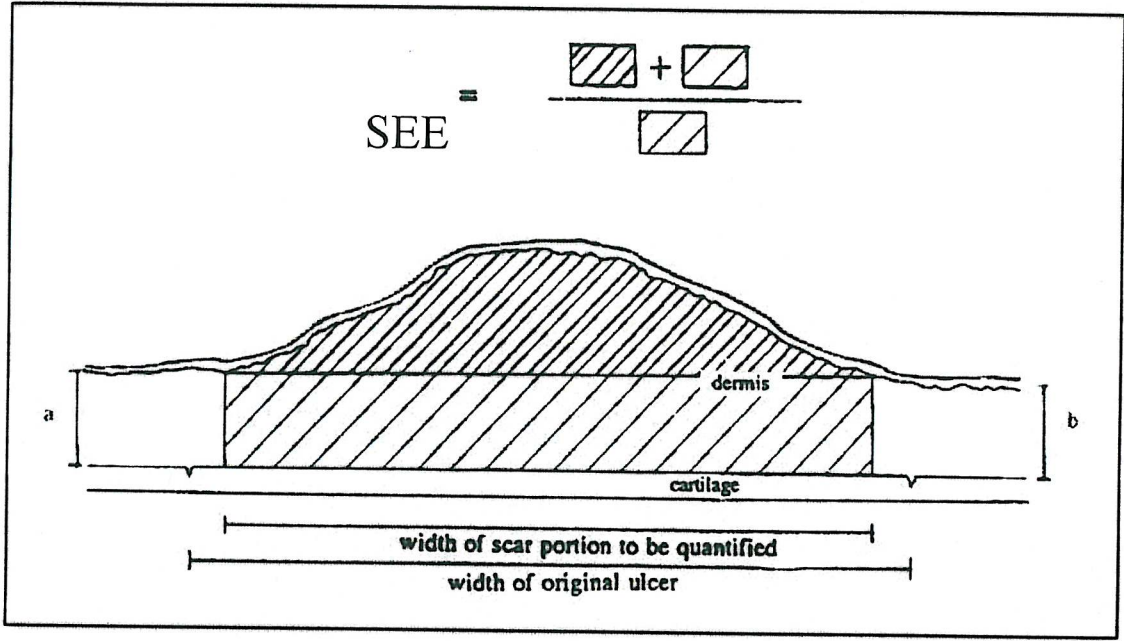
3- Histomorfometrik, Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal İnceleme

Biseksiyon yapılmış skar dokularına ait örnekler tamponlanmış nötral formalin ile 24 saat boyunca fiske edildikten sonra “Shandon Citadel 2000” cihazında rutin takibe alındılar. Ardından dokular parafin bloklara gömüldü ve 4-6 mm kalınlığında histolojik kesitler alındı. Kesitler Hematotoksilin ve Eosin ile boyandı. Boyanmış kesitler gruplar hakkında bilgi sahibi olmayan bir patoloji uzmanı tarafından, skar elevasyon endeksi, yara çapı ölçümü, enflamasyon skorlaması açısından değerlendirildi.

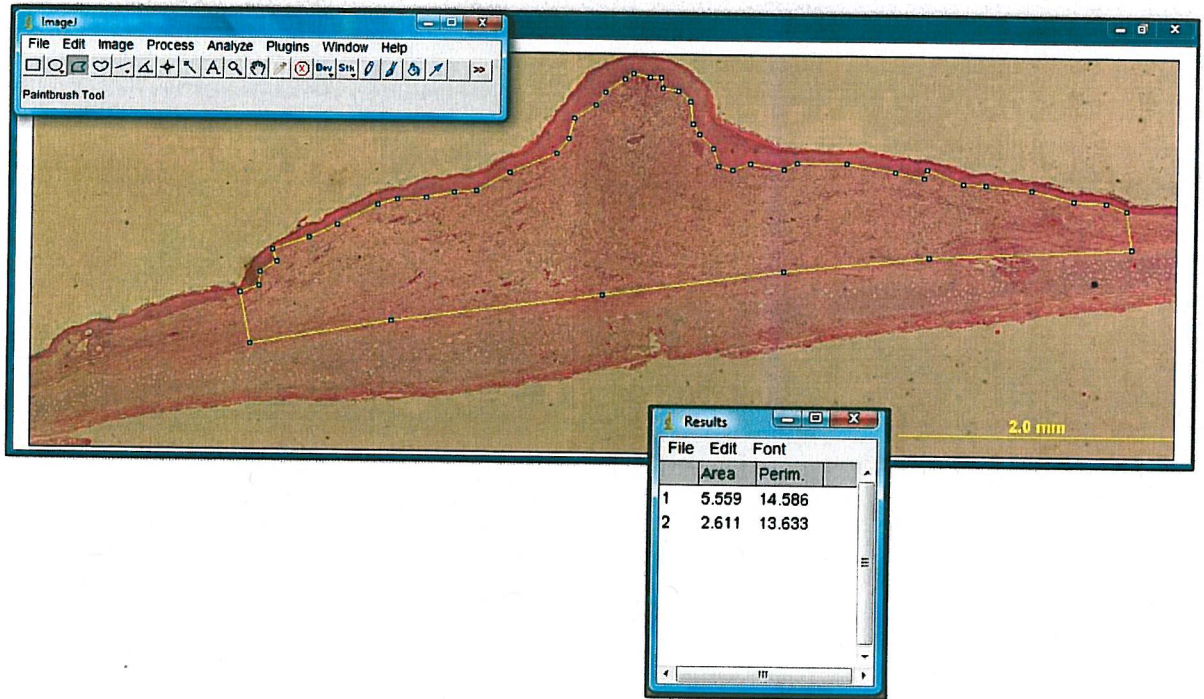
Her hayvanın kulağındaki intakt cilt bölgelerinden birer örnek (16 adet sağ ve 16 adet sol) alınarak periferik sinir demetlerini daha iyi gösterebilmek için S-100 (1:100, Clone 4C4.9, Neomarkers, CA, USA) primer antikoru ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Dokuların tümü %10 tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonunda en az 24 saat tesbit edilmiş ve parafinde bloklanmıştı. İmmünistokimyasal metod için 4µm kalınlığındaki kesitler deparafinize edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilerek giderildi. Kesitler mikrodalga fırında 0.01mol/L sitrat buffer içerisinde 5 dakika kaynatılıp oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Bundan sonra 20 dakika süre ile non-spesifik protein bloke edici ajan (Dako, Carpinteria, CA, USA) uygulandı. Kesitler S-100 (1:100, Clone 4C4.9, Neomarkers, CA, USA) primer antikoru ile oda ısısında 30 dakika inkübe edilerek sekonder antikor uygulandı. Renklendirici ajan olarak 3,3'-diamino benzidin (DAB) içeren kit (DAKO, Carpinteria, USA) kullanıldı. Son olarak kesitler Mayer hematoksilen ile 60 saniye boyandı. Kesitler DAB uygulamasına kadar tüm aşamalarda pH 7,6 fosfat tamponu ile DAB uygulamasından sonra ise distile su ile yıkandı. İşlemler oda ısısında gerçekleştirildi

3-1 Görüntü Analiz Programı Yardımıyla Skar Elevasyon Endeksi (SEE) nin Ölçümü (Histomorfometrik Analiz)

SEE, Morris ve ark. tarafından tanımlanmış olan tavşan aşırı dermal skarlaşma modeline özgü bir değerlendirmedir ⁽¹⁵⁾. SEE; kıkırdağın işaretli olduğu sınırlar içerisinde ; “kesitte görülen yara sınırlarındaki dermis kalınlığını geçen skara ait bağ doku alanının” ve “skar tabanındaki öngörülen dermis alanının “ toplamının yine “skar tabanında öngörülen dermis alanı “ na oranıdır (**Şekil 6**). SEE ölçümü, kesitlerin mikroskoba bağlı kamera ile alınan görüntülerinin bilgisayarda görüntü analiz programı (Image J)⁽²⁸⁰⁾ kullanılarak değerlendirilmesiyle yapıldı (**Resim 15**).



Şekil 6: Kesitlerde “Skar Elevasyon Endeksi”(SEE) nin hesaplanması. SEE nin 1’ e eşit olması skarın tamamen düz olduğu anlamına gelirken, 1 den büyük değerler kabarık skarlaşma anlamına gelmektedir.



Resim 15: “Image J” programı kullanılarak SEE nin hesaplanması

3-2 Skar Kesitlerinde Enflamasyon Puanlaması

Skar kesitlerinde enflamasyonun değerlendirilmesi için preparatlarda enflamasyon hücresi sayımı yapıldı. Alandaki ortalama hücre sayısına göre puanlama yapıldı⁽²⁸¹⁾ (Tablo 2)

PUAN	1	2	3	4
Enflamasyon Hücresi Sayısı	0-10	11-100	101-1000	>1000

Tablo 2: Alandaki polimorfonükleer lökosit (PMNL), lenfosit ve plazmosit sayılarının ortalamasına göre enflamasyon puanlaması (Gungor A, Poyrazoglu E, Cincik H, Sali M, Candan H, Ay H. The effectiveness of hyperbaric oxygen treatment in tracheal reconstruction with auricular cartilage grafts (experimental study). Am J Otolaryngol. 2003;24(6):390-4.)

3-3 Yara Kontraksiyonunun Ölçümü ve Epitelizasyon Zamanı

Yara kontraksiyonunun ölçütü olarak iyileşmiş yaraların çap ölçümü kullanıldı. Biseksiyonla elde edilen skar kesitlerinde fibrozis görülen alanlardan intakt dermise geçiş noktaları arasındaki uzaklık "Image J" programı kullanılarak hesaplandı. Ayrıca günlük takiplerde, tam epitelizasyonun kaç günde tamamlandığı her yara için ayrı ayrı kaydedildi.

4- İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin bağımlı gözlemler olması ve ölçümlerin normal dağılım göstermesi nedeniyle istatistiksel analiz SPSS 15.0 Windows kullanılarak "Student t testi" ile yapıldı.

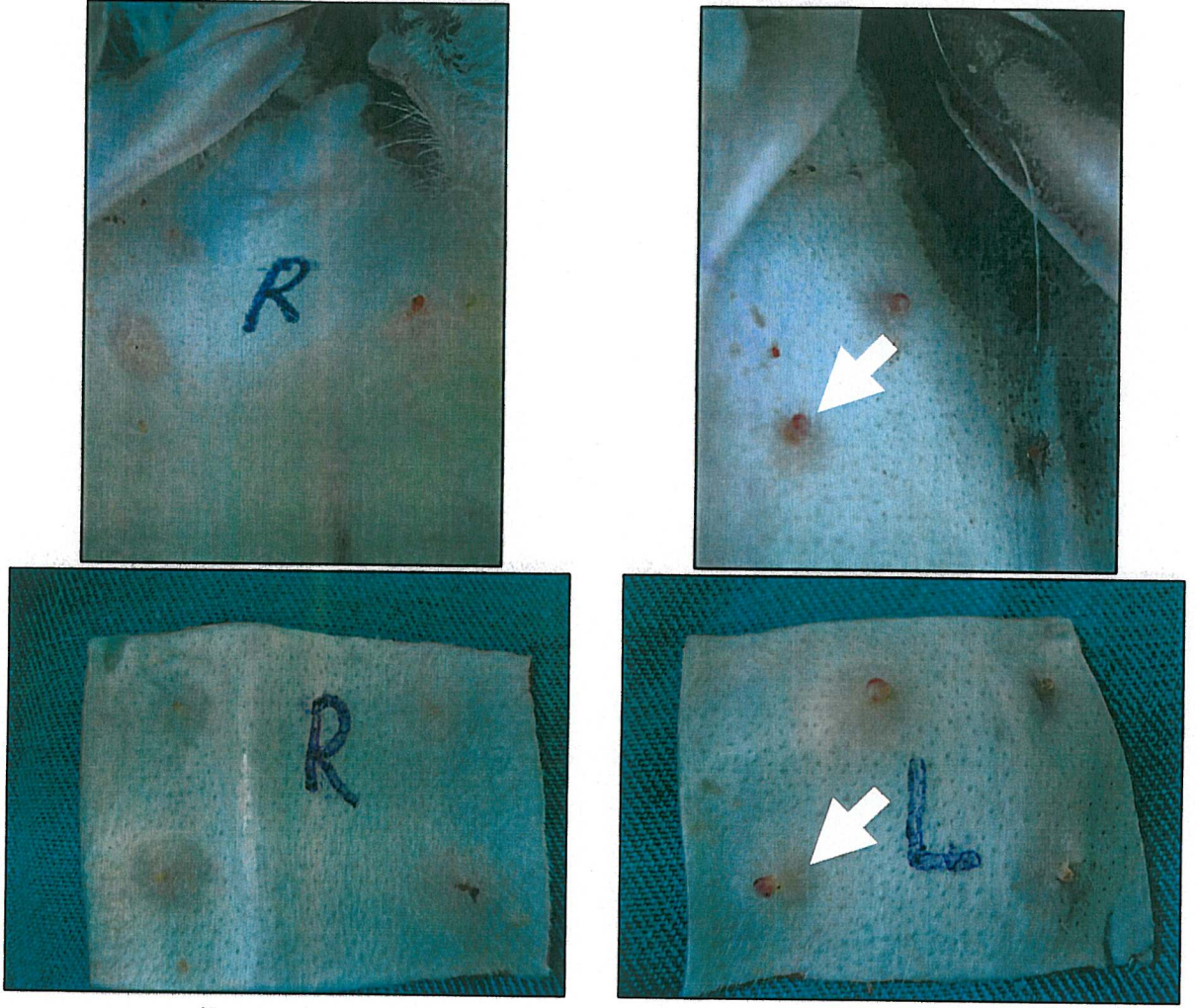
4-BULGULAR

Çalışmadaki tüm hayvanlar sakrifiye edilene kadar yaşadı. Yaraların hiçbirinde enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Ancak, 128 yaranın 8 tanesi (sağ:3, sol:5) kuruma (desikkasyon) nedeniyle epitelizasyon oluşmadığı için çalışmadan çıkarıldı. Değerlendirmeler epitelizasyonunu tamamlayan ve skarlaşma oluşan 120 yara üzerinden yapıldı. SEE, son yara çapı ölçümü ve epitelizasyon zamanına ait veriler deney hayvanı ve yara numarasına göre denerve (sağ) ve intakt (sol) taraflar için **Tablo 3** ve **Tablo 4** de verilmiştir.

28. gün sonundaki makroskopik değerlendirmede sağ ve sol kulaklardaki skarların kabarıklığı arasında belirgin fark olduğu görüldü (**Resim 16**). İlginç olarak, skar kabarıklığı arasındaki fark ilgili cilt bölgeleri ekstrakorporal olarak incelendiğinde daha belirgindi (**Resim 17**).



Resim 16: Yara modelinin uygulanmasından 28 gün sonra aynı hayvanda sağ ve sol taraftaki skarların makroskopik görüntüsü. İntakt(sol) tarafta skar kabarıklığı denerve(sağ) tarafa göre daha belirgin.



Resim 17: Cilt bölgeleri ekstrakorporal olarak incelendiğinde sol taraftaki skar kabarıklığı farkının belirginleşmesi. (ok)

Tablo 3: Denerve gruba ait, SEE, yara çapı ve epitelizasyon zamanı verileri

SAG (n=61) HAYVAN NO- YARA NO	SKAR ELEVASYON ENDEKSİ	SON YARA GENİŞLİĞİ (mm)	EPİTELİZASYON ZAMANI (gün)
1-1	2,21	4,6	12
1-2	1,24	5,4	12
1-3	1,14	5,3	12
1-4	1,14	5,4	12
2-1	1,37	5,1	13
2-2	1,33	6,3	12
2-3	1,22	5,0	13
2-4	1,29	5,1	12
3-1	1,17	4,9	9
3-2	1,32	5,1	13
3-3	1,25	5,1	12
3-4	1,43	4,9	13
4-1	1,21	4,9	12
4-2	1,17	4,8	11
4-3	1,35	4,6	10
4-4	1,51	4,8	10
5-1	1,06	4,6	12
5-2	1,18	4,5	12
5-3	1,50	4,2	12
5-4	1,25	4,7	12
6-1	1,46	4,3	14
6-2	1,06	4,9	14
6-3	1,07	4,6	10
6-4	1,26	4,3	14
7-1	0,97	5,1	13
7-2	1,45	4,2	9
7-3	0,99	5,3	13
8-1	1,50	5,0	15
8-2	1,28	4,4	11
8-3	1,35	4,5	15
8-4	1,32	4,3	13
9-1	1,37	4,4	13
9-2	0,97	4,9	13
9-3	1,26	3,8	13
9-4	1,49	4,2	13
10-1	1,68	4,3	12
10-2	1,15	4,5	12
10-3	1,68	5,1	12
11-1	1,05	4,4	14
11-2	1,04	5,1	14
11-3	0,98	5,3	14
11-4	0,95	5,4	14
12-1	1,31	5,3	13
12-2	1,56	3,6	13
12-3	1,48	5,5	13
12-4	1,06	4,9	13
13-1	1,13	5,2	14
13-2	1,19	5,6	14
13-3	1,52	5,4	14
13-4	1,01	5,0	13
14-1	1,40	4,4	13
14-2	1,37	4,0	13
14-3	1,48	5,5	13
14-4	1,04	5,9	13
15-1	1,05	5,4	12
15-2	1,10	5,3	12
15-3	1,44	4,9	12
15-4	1,02	4,1	8
16-1	1,26	4,2	14
16-2	1,14	4,9	14
16-3	1,02	4,4	10

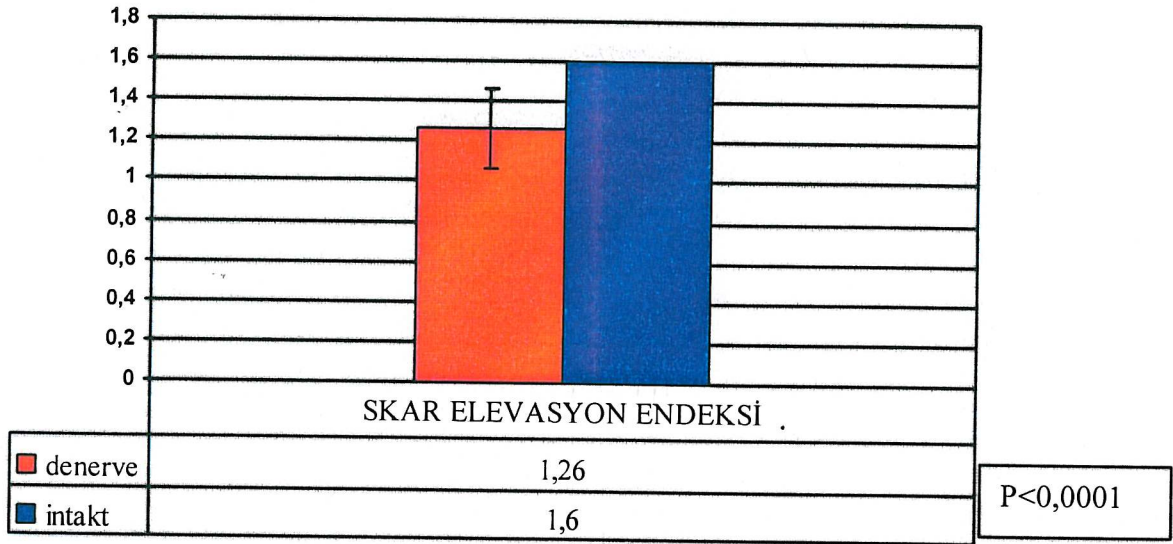
Tablo 4: İntakt gruba ait, SEE, yara çapı ve epitelizasyon zamanı verileri

SOL (n=59) HAYVAN NO- YARA NO	SKAR ELEVASYON ENDEKSİ	SON YARA GENİŞLİĞİ (mm)	EPİTELİZASYON ZAMANI(gün)
1-1	2,10	4,1	9
1-2	2,50	4,0	12
1-3	1,96	4,3	12
2-1	1,40	4,5	12
2-2	1,81	5,3	13
2-3	1,74	4,5	12
2-4	1,51	4,8	12
3-1	1,32	5,2	12
3-2	1,69	4,6	12
3-3	1,21	4,9	13
4-1	1,36	5,4	12
4-2	1,71	4,4	12
4-3	1,46	4,0	11
4-4	1,90	5,2	11
5-1	1,34	4,8	12
5-2	1,47	3,7	12
5-3	1,27	3,9	12
5-4	1,32	5,0	12
6-1	1,60	4,7	10
6-2	1,44	4,2	14
6-3	1,66	5,2	14
6-4	1,83	5,2	13
7-1	1,68	4,9	13
7-2	2,00	4,9	9
7-3	1,87	5,4	13
7-4	2,14	5,3	13
8-1	1,67	4,8	15
8-2	1,06	4,5	15
8-3	2,00	5,5	15
8-4	1,39	5,2	15
9-1	1,61	5,1	13
9-2	2,44	4,3	13
9-3	1,67	4,6	14
9-4	1,67	5,0	13
10-1	1,25	4,3	12
10-2	1,73	4,2	12
10-3	2,02	4,8	8
11-1	1,49	5,4	10
11-2	1,90	5,2	14
11-3	1,95	5,4	14
11-4	1,98	6,0	14
12-1	1,78	5,4	13
12-2	2,04	4,8	13
12-3	1,68	4,7	13
12-4	1,33	3,5	13
13-1	1,24	5,3	14
13-2	1,13	5,2	14
13-3	1,43	4,7	14
14-1	1,80	5,1	13
14-2	1,36	5,0	13
14-3	1,63	4,4	13
14-4	1,52	4,1	13
15-1	1,03	5,3	11
15-2	1,17	4,7	11
15-3	1,01	4,3	11
16-1	1,15	4,4	13
16-2	1,24	4,8	10
16-3	1,56	4,4	13
16-4	1,10	4,4	13

Skar elevasyon endeksi (SEE) ölçümlerinde, intakt (sol) tarafta en düşük “1.01”, en yüksek “2.50” olarak bulundu. Denerve (sağ) tarafta ise en düşük değer; “0.95”, en yüksek değer; “2.21” oldu. Ortalama SEE denerve grupta “1.26” iken, intakt grupta “1.60” olarak bulundu (Tablo 5). İki taraf arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edildi ($p<0,0001$) (Şekil 7)

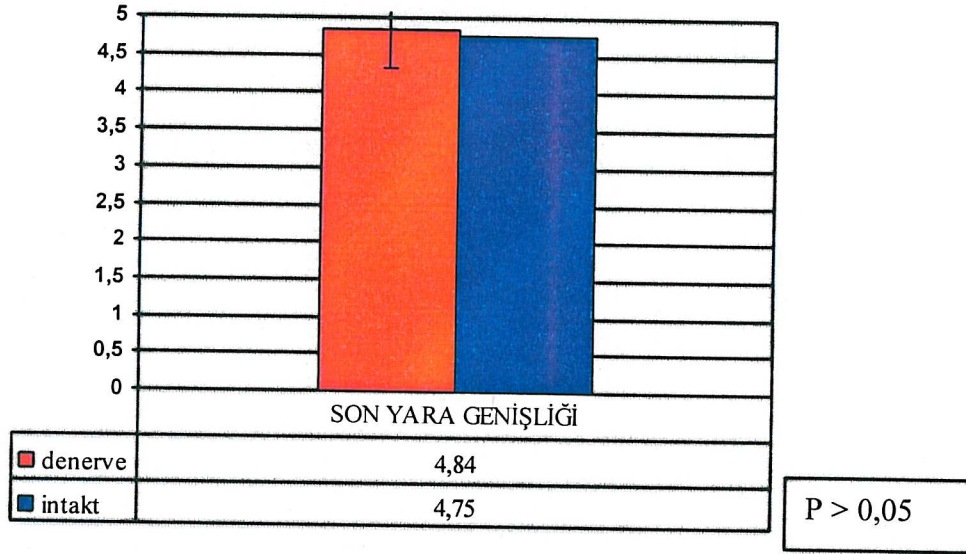
	Denerve (Sağ) n:61	İntakt (Sol) n:59
Ortalama SEE	1,26	1,60
Standart Deviasyon	0,22	0,34

Tablo 5: SEE ölçümlerinde iki gruba ait ortalama değerler ve standart deviyasyonlar



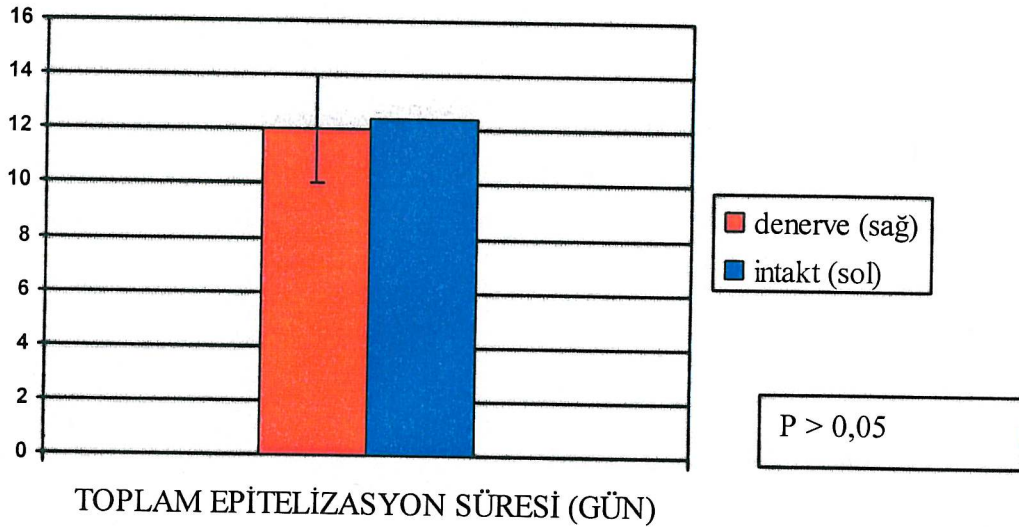
Şekil 7: SEE ortalama değerlerinin grafik karşılaştırması. Denerve tarafta skarlaşmanın miktarı intakt tarafa göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,0001$)

Yaranın son genişliğine ait ölçümlerde, intakt tarafta en düşük 3.5, en yüksek 6.0 olarak ölçüldü. Denerve tarafta ise en düşük yara çapı 3.6, en yüksek 6.3 olarak bulundu. Son yara genişliği ortalamaları açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). (Şekil 8)



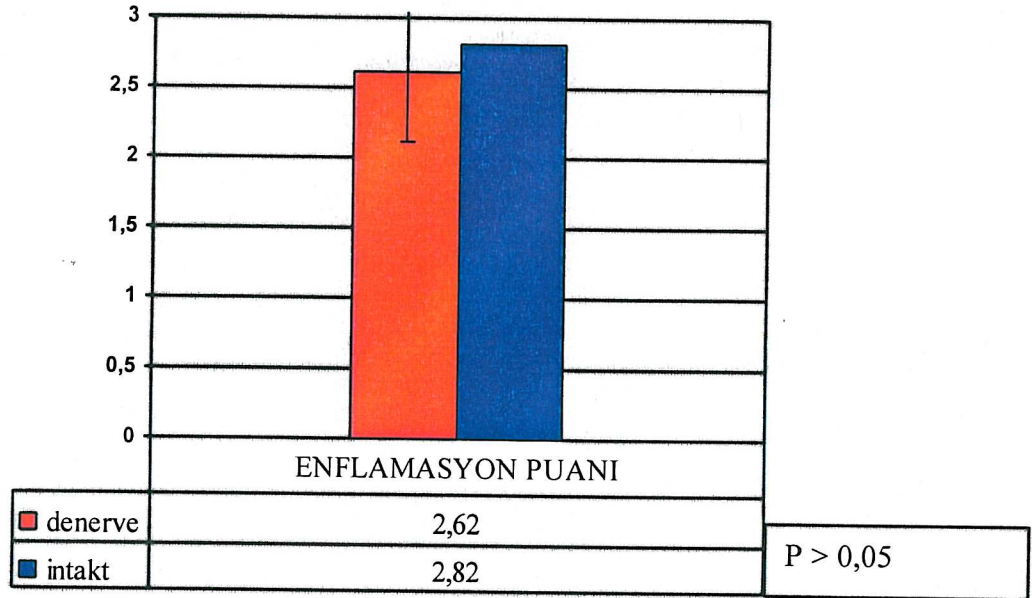
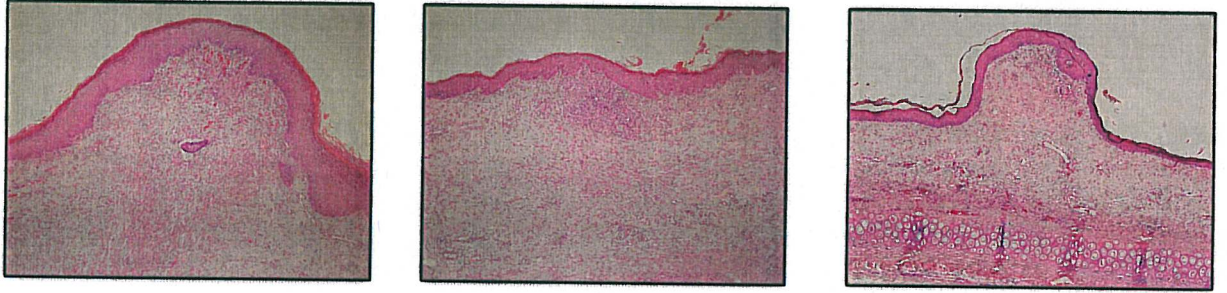
Şekil 8: Son yara genişliği ortalamaları açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Yaraların tam epitelizasyon zamanları her iki grupta da 8 ile 15 gün arasında değişmekteydi. Gruplar arasında epitelizasyon zamanı ortalamaları açısından anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 9)



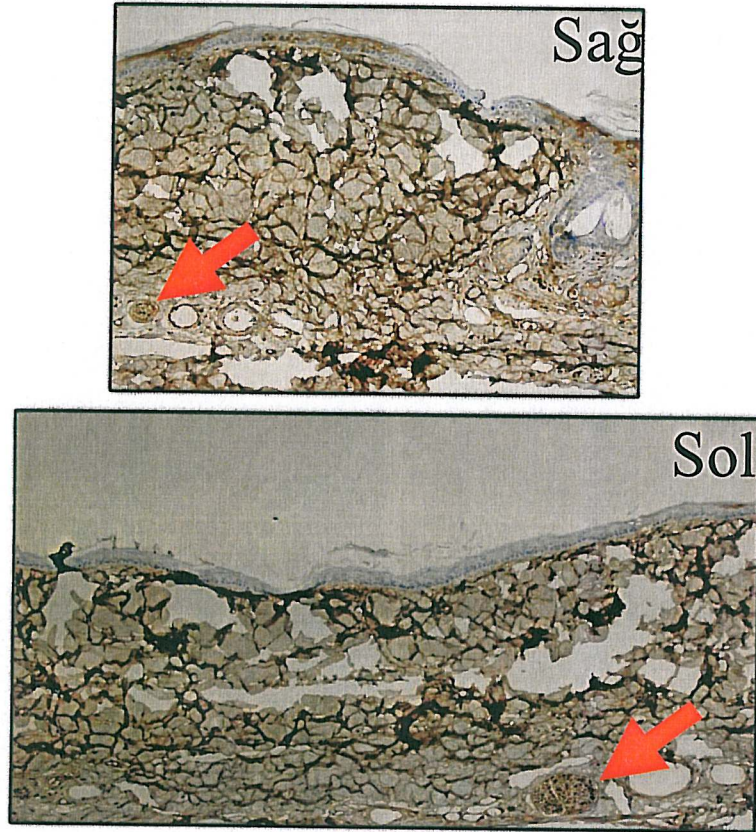
Şekil 9: Gruplar arasında epitelizasyon zamanı açısından anlamlı fark bulunmadı. ($p > 0,05$)

Alandaki ortalama enflamasyon hücre sayısına göre enflamasyon puanlamasında her iki gruptaki puanlar 1 ile 4 arasında değişmekteydi. Enflamasyon puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 10). Ortalamalar intakt tarafta 2,8 ve denerve tarafta 2,6 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre, ortalama enflamasyon hücre sayısı her alanda “101-1000”aralığındaydı.



Şekil 10: Gruplar arasından enflamasyon puanları açısından anlamlı fark bulunmadı. (P>0,05)

S-100 ile yapılan immünohistokimyasal çalışma sonuçları Olympus BX50 ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Her iki tarafta da dermiste periferik sinir demetleri gözlemlendi. Gruplar arasında periferik sinir kesitlerinin yoğunluğu açısından anlamlı bir fark gözlemlenmedi.(Resim 18)



Resim 18: İmmunohistokimya boyaması sonucunda her iki tarafta da dermal sinir demetleri (ok) gözlemlendi. Yoğunluk açısından anlamlı fark bulunmadı.

5- TARTIŞMA

Cildin en önemli fonksiyonlarından biri, dış ortamdan gelen uyarıları santral sinir sistemi' ne aktarmaktır. Buna karşılık, sinir sistemi de cilt dokusunun fonksiyonlarına etki ederek bazı değişiklikler oluşturur ⁽²⁴⁵⁻²⁴⁷⁾. Bu noktada, "nöro-immuno-kütan sistem"den (NİKS) bahsedilebilir ^(198, 248-249). NİKS, duyu sinirleri ve cilt hücreleri arasındaki etkileşimlerin oluşturduğu bir sistemdir ⁽¹⁹⁸⁾. Bu etkileşimlerde rol alan nöroendokrin ve immunolojik olaylar, nöromedyatörler, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından gerçekleştirilir. "Nörojenik enflamasyon" kavramını bu çerçevede anlamak ve değerlendirmek, aşırı cilt skarlaşması konusuna yeni bir bakış açısı sağlar.

Ciltteki duyu ve otonom sinirler, birçok fizyolojik (embriyogenez, vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, vücut ısısının ayarlanması, sekresyon, farklılaşma) ve patofizyolojik (enflamasyon, bağışıklık yanıtı, apoptoz, proliferasyon, yara iyileşmesi) fonksiyonu etkilerler. Duyu sinirlerinde; fiziksel (travma, termal, ultraviyole ışık, elektriksel uyarı), kimyasal, mikrobiyolojik ve alerjik uyarıları takiben nöropeptid, nörotropin, nörotransmitter ve oksijen ürünleri (örnek: NO) miktarları ve salınımları önemli ölçüde artar ⁽²⁴⁵⁾.

Nöropeptidlerin, enflamasyonun yanı sıra, anjiyogenez, keratinosit proliferasyonu ve fibrinogenezi artırıcı etki yapmaları, normal yara iyileşmesinde sinir dokusunun rolünü ortaya koymaktadır. İyileşmekte olan yanık yaralarında çok sayıda nöropeptid içeren sinir lifi tespit edilmiştir ⁽²⁵¹⁻²⁵³⁾. Sinir liflerinin miktarı zamanla normal cilt seviyesine gerilese de, artışın en fazla olduğu dönem ile iyileşme/epitelizasyon süreci eşzamanlıdır ^(251, 254). Akut yanık modelindeki bir mikrodiyaliz çalışmasında, yanık bölgesinde SP miktarının yanık derinliği ile doğru orantılı olarak arttığı raporlanmıştır ⁽²⁵⁵⁾.

Kronik ülseratif yaraları olan diabetes mellitus (DM) hastalarında periferik nöropati sıklıkla gözlenir. Bu durumda, normal cilt ve yara kenarlarındaki sinir liflerinin sayısı azalır ⁽²⁵⁶⁾. Ek olarak, diyabetik insan ve fare dokularında artmış nötral endopeptidaz (NEP) aktivitesi tesbit edilmiştir ⁽²⁵⁷⁾. NEP, SP'yi yıkan başlıca enzimdir ve aktivitesiyle nöropeptid miktarı azalır. Eksizyonel kronik yara modellerine eksojen SP ve NEP inhibitörü uygulandığında enflamasyon hücrelerinin sayısında artış ve yara

iyileşme kinetiklerinde normalleşme gözlemlenmiştir ⁽²⁵⁸⁾. Dolayısıyla, kronik diyabetik yaraların etiyojisinde nöropeptid miktarındaki düşüşün etkili olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda, her bir tavşanın tek (sağ) kulağındaki cilt duyusu, sinir rezeksiyonu yoluyla engellendi ve denerve edilen taraf ile intakt bırakılan taraf (sol) arasında skar miktarı açısından anlamlı bir fark bulundu. Aksonotomi/rezeksiyon yapılan sinirlerde doğal olarak sinyal iletimi bozulur. Bütünlüğü bozulan nöronlarda, gen ekspresyonundaki değişimler sonucu, nörotransmisyonla ilgili maddelerin sentezi azalırken hücre zarı bileşenlerinin ve büyüme ile ilgili proteinlerin sentezi artar ⁽²⁵⁰⁾. Nöronlar, “sinyal iletilici” durumdan “rejeneratif” bir duruma geçerler.

Sıçan derisinde yapılan çalışmalarda kapsaisin ve/veya nörotomi ile denervasyon sonrasında yara iyileşmesinin ve epitelizasyonun geciktiği/azaldığı bildirilmiştir ^(223, 259, 260). Buna karşılık, Ranne ve ark ⁽²⁶¹⁾ ile Wallengren ve ark ⁽²⁶²⁾ kapsaisin ve/veya nörotominin yara iyileşmesini/epitelizasyonu etkilemediğini bildirmişlerdir. Wallengren ve ark, denervasyon (kapsaisin ve/veya nörotomi) ile ciltteki C liflerinin sayısının % 70 oranında azaldığını ve kalan % 30 luk bölümün normal yara iyileşmesi için yeterli olduğu sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda, denerve edilen tarafta epitelizasyon ve yara kontraksiyonu bakımından anlamlı fark bulunmadı. Çalışmamızda, tavşan kulağının büyük bölümünü innerve eden iki duyu sinirine (santral aurikular ve küçük oksipital sinirler) rezeksiyon yapıldı. Kulağın tam denervasyonu için, trigeminal sinirin aurikulotemporal dalı, vagusun aurikular dalı ve servikal sempatik zincirin de rezeksiyonu gerekmektedir ⁽²⁶³⁾. Ancak, sayılan sinirlerin innervasyon alanı, yara modeli uygulanan bölgenin proksimalinde ve dorsalinde kalmaktadır. Ek olarak bu sinirlerin tümünün rezeksiyonu kulağın dolaşımını, dolayısıyla yara iyileşmesini etkilememek için tercih edilmemiştir. Bunun yerine, anterior cildin proksimalinde horizontal bir kesi yapılarak proksimal tabanlı bir cilt flebi kaldırılmış ve gözlenen ince sinir demetleri 0,5 cm kalınlığındaki bir zonda koterize edildi.

Her iki kulakta yara bölgelerine eşit uzaklıkta intakt cilt bölgesinden alınan örneklerde dermisteki periferik sinir demetlerinin yoğunluğu açısından anlamlı fark bulunmadı. Duyu sinirinin devamlılığının bozulmasından sonra (sağ tarafta) intakt tarafa göre histolojik bir fark bulunmaması, duyu iletimindeki aksamının skarlaşma üzerindeki etkisini göstermek açısından dikkat çekicidir.

Her iki gruptaki örneklerin büyük çoğunluğunda, nötrofil ağırlıklı, karışık (mixed) tip enflamasyon tesbit edilmiştir. Gruplar arasında, skarlaşma miktarındaki farklılığa rağmen enflamasyon skorları açısından belirgin fark bulunmadı. Skarlaşma miktarı arasındaki farkın enflamasyon skorlarına yansımamış olması, nöropeptidlerin skarı inşa eden hücrelerin (fibroblast) aktivasyon ve proliferasyonu doğrudan artırıcı özelliğini akla getirmektedir (9, 13, 231, 245). Nöropeptidler ayrıca endotel hücreleri, keratinoitlerden TGF β ve PDGF gibi fibrinojenik sitokinlerin salınımına neden olmaktadır (Tablo-1). Çalışmamızda doku örneklerindeki nöropeptidlerin ve sitokinlerin ölçümü ve karşılaştırılması yapılmadı. Buna karşılık, sinir rezeksiyonunun distal dokudaki nöropeptid miktarlarını doğrudan azalttığı bilinmektedir (215-218).

SS sonlanmalarının hangi tip uyarıyla nörojenik enflamasyon oluşturduğu konusunda kesin bir ayırım yoktur. Cildin aşırı skarlaşmasında “mekanik gerim” tipi uyarıya bağlı nörojenik enflamasyonun etkili olduğu ileri sürülmüştür (9, 10). HTS lerin, göğüs ön duvarı, omuz, suprapubik bölge ve kulak memesi gibi günlük aktivitelerle gerilen cilt bölgelerinde sıklıkla oluşması bu görüşü destekler (10). Ancak C ve A δ lifleri mekanik gerim haricinde diğer birçok fiziksel ve kimyasal uyarı tipine cevap verebilirler (203, 245). “Mekanik gerim” tipi uyarının yanı sıra, kaşıma hareketi, elbiselerin sürekli sürtünmesi, yara bölgesine tekrarlayan travma, kimyasal iritan maddelerle temas gibi günlük hayatta yaşanması muhtemel diğer olaylar da sinir liflerini uyararak nörojenik enflamasyona bağlı süreci başlatabilir.

Yaralanma sonrasında hasarlanan sinir lifleri noziseptör aktivite göstermeye başlarlar. Oluşan ağrının azaltılmasında yaranın uygun şekilde örtülmesinin faydalı etkisi vardır. Yaranın nemli ortam sağlayan bir örtü (pansuman) kapatılması hasarlı sinir uçlarının sıvıyla kapalı olmasını sağlayarak uyarı (ağrı) oluşmasını engeller (264). Bu durumda nörojenik enflamasyonun azalması beklenir. Epitelize olmuş hipertrofik skarlarda epitelyum ve dermis içerisinde sinir sonlanmaları bulunmaktadır. Bu nedenle skar yüzeyinin uyarılması nöropeptid salınımıyla sonuçlanabilir. Skar yüzeyinin yumuşak, doku yanıtına neden olmayan ve yüzeye tam olarak oturan okluziv bir malzeme ile örtülmesi sinir uyarılmasını da azaltacaktır. Bu öneri, aşırı skarlaşmada kullanılan slikon jel tedavisinin etki mekanizmasına ışık tutabilir. Bilindiği gibi, silikon örtü tedavisinin aşırı skarlaşmayı nasıl tedavi ettiği henüz aydınlatılamamıştır. Bunun yanı sıra, Akaishi ve ark.(Nippon Medical School Tokyo Japonya) yayınlanmak üzere

olan bir çalışmalarında silikon tabaka uygulamasının skar gerilimini azalttığını bilgisayar simülasyonu yardımıyla göstermişlerdir.

Aşırı skarlaşmanın patofizyolojisinde halen anlaşılammış birçok nokta mevcuttur. Cerrahi eksizyon, lazer, radyoterapi, brakiterapi, kriyoterapi ve intralezyonel sitotoksik/antiproliferatif ajanların enjeksiyonu gibi ampirik yöntemlerin kullanılması bu belirsizliğe bağlı olabilir. Diğer yandan, skara dışarıdan uygulanan kompresyon giysileri, silikon uygulaması ve okluziv cilt bantlaması gibi yöntemler de aşırı skarlaşmanın tedavisinde etkilidirler. Silikon tabaka uygulaması ve cilt bantlamasında olduğu gibi kompresyon tedavisinin de etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (144, 265). Etki mekanizmasında doğrudan basınç etkisiyle kan akımı ve ödem azaltmasının yanı sıra, kollajen sentezinin azalması, PG E2 salınımı ve MMP salınım ve aktivasyonunun artırıyor olması öne sürülmüştür (266-268). Reno ve ark. in vitro olarak skar dokusuna kompresyon yapıldığında apoptozun arttığını bildirmişlerdir (269). Skar maturasyonu boyunca (yaklaşık 1 sene) giyilen kompresyon uygulayıcı giysiler, skarın kalınlığını ve eritemini azaltırlar (144, 265). Giysiler, bu uzun süre boyunca, skar yüzeyini basınçlı biçimde örterek dış etkilerden korumaktadır. Bu durumda skardaki sinir sonlanmalarının daha az uyarılması beklenir. Dolayısıyla azalmış uyarıya bağlı azalmış nöropeptid miktarı, kompresyon tedavisinin etki mekanizmasında da rol oynuyor olabilir.

Aşırı skarlaşmanın farmakolojik tedavisinde kullanılan ajanlar; kortikosteroid, florourasil, bleomisin, tamoksifen, tretinoin, takrolimus (immün modulator), pentoksifilin, kolşisin, kalsiyum kanal blokerleri (verapamil), tranilast, çinko, vitamin E, vitamin A, imiquimod, interferon, allium cepa (soğan ekstresi) dır. Bu tedavi seçenekleri arasında en tutarlı ve etkili sonuçlar, intralezyonel kortikosteroid tedavisi ile alınmaktadır (144, 152, 265, 270). Sıklıkla kullanılan steroid preparatları; hidrokortizon asetat, metilprednizon (Depomedrol), deksametazon ve triamsinolon asetat (Kenakort) tır (271). İntralezyonel kortikosteroid enjeksiyonu, güçlü antiinflamatuvar etkisinin yanı sıra, fibroblast proliferasyonunu, kollajen sentezini ve glikozaminoglikan sentezini azaltır.

Kortikosteroidlerin aşırı skarlaşmadaki bir diğer etki mekanizması nöroenflamasyonu engellileyici etkisiyle ilgili olabilir. Ahluwalia ve ark. topikal kortikosteroid uygulamasının antidromik sinir uyarımı ve dermis içine nöropeptid enjeksiyonu ile oluşan nöroenflamasyonu lipokortin 1 (kortikosteroidler için ikinci

mesajcı) üzerinden engellediğini göstermişlerdir ⁽²⁷²⁾. Benzer biçimde, rat trakeasındaki nöroenflamasyonun kortikosteroidler ile engellenebildiği gösterilmiştir. Pledimonte ve ark. kortikosteroidlerin bu etkilerini NEP (nötral endopeptidaz) ve kininaz enzimlerinin aktivitesini artırarak gerçekleştirdiğini göstermişlerdir ⁽²⁷³⁾. Bu etkilerin yanı sıra, kortikosteroidlerin sitokinleri dolayısıyla hücre proliferasyonu ve migrasyonunu engelleyici etkisi nöroenflamasyon mekanizmalarının da aksamasına neden olabilir

Kalsiyum kanal blokerleri (KKB) tedavide kullanılan bir diğer ilaç grubudur. KKB lerin ECM oluşumunu azalttıkları, damar düz kas hücreleri ve fibroblastların gelişimini inhibe ettikleri bilinmektedir ⁽²⁷⁴⁻²⁷⁶⁾. Verapamil, fenilalkilamin türü bir KKB dir. İntralezyonel verapamil uygulaması tek başına ya da diğer yöntemlerle kombine edildiğinde keloidlerde ve yanık skarlarında artmış tedavi başarısı sağlamıştır ⁽²⁷⁷⁻²⁷⁹⁾. KKB' ler, in vitro ve in vivo olarak lenfosit fonksiyonlarını etkilerler ve immün disfonksiyona neden olurlar ⁽²⁷⁶⁾. Buna ek olarak, verapamil, mast hücre degranulasyonunu, trombosit kümelenmesini ve nötrofil fonksiyonlarını inhibe eder. Bu etkilerini kalsiyum bağımlı yollarla gösterir ⁽²⁷⁶⁾. Verapamilin enflamatuar hücrelerdeki inhibitör etkisi, aşırı skarlaşmayı azaltma mekanizmasında rol oynayabilir. Verapamil ayrıca, sinir liflerinden nöropeptid salınımını ve nöropeptidlerin hedef hücrelerdeki etkilerini kalsiyum bağımlı yollarla inhibe ederek nöroenflamasyonu azaltıcı etki yapıyor olabilir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde, intralezyonel KKB uygulamasının skar tedavisindeki etki mekanizmasını nörojenik enflamasyon ile bağdaştıran bir rapor bulunmamaktadır.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Yara iyileşmesi kesintisiz ve karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte birçok hücre tipi rol almaktadır. Şüphesiz hücre tiplerinden herhangi birinin yokluğu ya da fonksiyon bozukluğu iyileşmenin aksamasına neden olur. Klasik yaklaşımda sinir hücreleri ve ilgili elemanlar ağrının giderilmesi konusu haricinde genelde göz ardı edilmiştir. Yara ortamının, yaralanma öncesinden iyileşme sonrası dönemine kadar sabit ve aktif bir parçası olan “sinir lifleri”nin iyileşmeye olan katkısı konusunda giderek büyüyen bir bilgi havuzu oluşmaktadır. Aşırı skarlaşmanın bir “yara iyileşme komplikasyonu” olduğu düşünülürse, ciltteki sinir elemanlarının bu süreçteki rolü araştırmaya değer önemdedir. Çalışmamız bir cilt bölgesinin denervasyonunun ilgili bölgedeki dermal skarlaşmayı nasıl etkilediğini araştıran ilk çalışmadır. Duyu denervasyonu ve azalmış skarlaşma arasında anlamlı bir ilişkinin tespit edilmesi, tedavi stratejilerini etkileyebilecek ve gelecekte yeni tedavi preparatları geliştirilmesini mümkün kılacak bir yaklaşımın oluşturulmasına katkı sağlayacaktır. Önümüzdeki dönemde bu konuda daha geniş ve ayrıntılı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Robson MC. Growth factors as wound healing agents. *Curr Opin Biotechnol* 1991;2:863-7.
2. Clark RAF. Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin* 1993;11:647-666.
3. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(1): 32-47
4. Serhan, C, Chiang, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution entre'e for resoleemics. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2004;30: 69,
5. Schilling, J. Wound healing. *Surg. Clin. North Am.* 1976; 56: 859,-871
6. Tandara AA The role of the epidermis in the control of scarring: evidence for mechanism of action for silicone gel. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008
7. Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(5):1435-1458.
8. Tredget EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A: Hypertrophic scars, keloids and contractures. The cellular and molecular basis for therapy. *Surg clin North Am* 1997;77;701-730
9. Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophicscar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med Hypotheses* 2008;71(1):32-38.
10. Ogawa R. Keloid and hypertrophic scarring may result from a mechanoreceptor or mechanosensitive nociceptor disorder. *Med Hypotheses*. 2008;71(4):493-500.
11. Scott JR, Muangman P, Gibran NS. Making sense of hypertrophic scar: a role for nerves. *Wound Repair Regen*. 2007 Sep-Oct;15 Suppl 1:27-31.
12. Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep* 2006;58(1):13-21.
13. Younai S, Nichter LS, Wellisz T, Reinisch J, Nimni ME, Tuan TL. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-beta in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. *Ann Plast Surg* 1994;33(2):148-51.
14. Katayama I and Nishioka K. Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 1997; 15: 201-206.

15. Morris DE, Wu L, Zhao LL, Bolton L, Roth SI, Ladin DA, Mustoe TA. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. *Plast Reconstr Surg.* 1997 Sep;100(3):674-81.
16. Pearce RH, Grimmer BJ. Age and the chemical constitution of normal human dermis. *J Invest Dermatol* 1972; 58:347-361.
17. Epstein EH Jr, Munderloh NH. Human skin collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis. *J Biol Chem* 1978; 253:1336-1337.
18. Epstein EH Jr. Human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem* 1974; 249:3225-3231.
19. O'Toole EA. Extra-cellular matrix and keratinocytes migration. *Clin and Exp Dermatol* 2001;26:525-530.
20. Horslev-Petersen, K., Kim, K. Y., Pedersen, L. R., et al. Serum aminoterminal type III procollagen peptide. Relation to biosynthesis of collagen type III in experimentally induced granulation tissue in rats. *APMIS* 1988; 96: 793
21. Friedman, D. W., Boyd, C. D., Mackenzie, J. W., Norton, P., Olson, R. M., and Deak, S. B. Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J. Surg. Res.* 1993; 55: 214,
22. Lee, K. S., Song, J. Y., and Suh, M. H. Collagen mRNA expression detected by in situ hybridization in keloid tissue. *J. Dermatol. Sci.* 1991; 2: 316-322
23. Uitto, J., Perejda, A. J., Abergel, R. P., Chu, M. L., and Ramirez, F. Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985; 82: 5935
24. Bailey, A.J., Bazin, S., Sims, T. J., Le Lous, M., Nicoletis, C., and Delaunay, A. Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. *Biochim. Biophys. Acta* 1975. 405: 412,
25. Weber, L., Meigel, W. N., and Spier, W. Collagen polymorphism in pathologic human scars. *Arch. Dermatol. Res.* 1978; 261: 63,
26. Davidson EA, Small W. Metabolism in vivo of connective-tissue mucopolysaccharides. II. Chondroitin sulfate B and hyaluronic acid of skin. *Biochim Biophys Acta* 1963; 69:453-458.

27. Szirmai JA, Tyssonnsk EVB, Gardell S. Microchemical analysis of glycosaminoglycans,
28. collagen, total protein and water in histological layers of nasal septum cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1964; 136:331–350.
29. Barker SA, Crickshank DND, Webb T. Mucopolysaccharide in rat skin. Part I. Isolation and identification. *Carbohydr Res* 1965; 1:52–61.
30. Schiller S. Isolation of heparitin sulfate from skin of normal rats. *Biochem Biophys Acta* 1966; 124:215–217.
31. Singer A, Clark R. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738–46.
32. G. Henry, W.L. Garner . Inflammatory mediators in wound healing *Surg Clin N Am* 83 (2003) 483–507
33. Iocono JA, Ehrlich HP, Gottrup F, et al: The biology of healing. In: Leaper DJ,Harding KG (eds). *Wounds: Biology and Management*. Oxford, New York: Oxford University Press. 1998; 10–22
34. Mehendale F, Martin P: The cellular and molecular events of wound healing. In: Falanga V (ed) *Cutaneous Wound Healing*, 1st edn. London: Martin Dunitz. 2001; 15–37
35. Anderson RG. Wound Healing, Scars, and Burns. In: Kenkel JM, Barton FE, Darling G, Darling JL, Quisenberry S. *Selected Readings in Plastic Surgery*. Texas 2001; 10: 1-25
36. Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P., et al. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab. Invest.* 1980; 43: 47,
37. Babu, M., Diegelmann, R., and Oliver, N. Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing. *Mol. Cell. Biol.* 1989; 9: 1642,
38. Kischer, C. W., Wagner, H. N., Jr., Pindur, J., et al. Increased fibronectin production by cell lines from hypertrophic scar and keloid. *Connect. Tissue Res.* 1989; 23: 279,
39. Oliver, N., Babu, M., and Diegelmann, R. Fibronectin gene transcription is enhanced in abnormal wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 1992; 99: 579,
40. Clark, R. A. Basics of cutaneous wound repair. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1993. ;19: 693,

41. Tuan, T. L., Zhu, J. Y., Sun, B., Nichter, L. S., Nimni, M. E., and Laug, W. E. Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 may account for the altered fibrinolysis by keloid fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106: 1007,
42. Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J. Med* 1998;338:436–45.
43. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 2001;69:513–21.
44. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, et al. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 1998;153:1849–60.
45. Fine NA, Mustoe TA. Wound Healing. In Greenfield LJ, editor. *Surgery: scientific principles and practice*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 67–83.
46. Steed DL. The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin N Am* 1997;77:575–86.
47. Jueng DY, Deuel TF, Huang JS. Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation. *Blood* 1985;66:179
48. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *J Vasc Surg* 1995;21:71–81.
49. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998;25:321–40.
50. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738–46.
51. Kibbey MC, Corcoran ML, Wahl LM, et al. Laminin SIKVAV peptide-induced angiogenesis in vivo is potentiated by neutrophils. *J Cell Physiol* 1994;160:185–93.
52. Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:67–71.
53. Tuan TL, Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today*. 1998; 4 (1): 19-24

54. Riches DW. Macrophage involvement in wound repair, remodeling, and fibrosis. In Clark RA, Henson PM, editors. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd edition. New York: Plenum Press; 1996. p. 95–141.
55. Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, et al. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 1988; 167:570–81.
56. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12:593–633.
57. Luster AD, Rothenberg ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol* 1997;62:620–33.
58. Burbach GJ, Ansel JC, Armstrong CA. Cytokines in the skin. In: Woodley DT, Feinkel RK, editors. *The biology of the skin*. New York: Parthenon Publishing Group; 2000. 299–330.
59. Mandracchia VJ, John KJ, Sanders SM. Wound healing. *Clin Podiatr Med Surg* 2001;18:1–33.
60. Cohen KI, Diegelmann RF, Lindblad WJ. *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Philadelphia: WB Saunders; 1992.
61. Witte, M., and Barbul, A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.* 2002; 183: 406,
62. Grotendorst GR, Chang T, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR. Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1983; 113:261–266.
63. Seppa H, Grotendorst GR, Seppa SI, Schiffman E, Martin GR. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 1982; 92:584–588.
64. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UJ, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4167–4171.
65. Werb Z, Banda MJ, Jones PA. Degradation of connective tissue matrices by macrophages: I: proteolysis of elastin, glycoproteins and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J Exp Med* 1980;152:1340.

66. Castagnoli, C., Trombotto, C., Ondei, S., et al. Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues. *Burns* 1997;28: 565,
67. Ferguson MW, Whitby DJ, Shah M, et al. Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. *Plast Reconstr Surg* 1996;97:854–60.
68. Shah M, Foremann DM, Ferguson MW. Neutralization of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995;108:985–1002
69. Castagnoli, C., Stella, M., Berthod, C., Magliacani, G., and Richiardi, P. M. TNF production and hypertrophic scarring. *Cell. Immunol.* 1993; 147: 51
70. Blotnik S, Peoples GE, Freeman MR, et al. T lymphocytes synthesize and export heparin binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2890–4.
71. Xia M, Leppert D, Hauser SL, et al. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* 1996;156:160–7.
72. Castagnoli, C., Stella, M., Magliacani, G., Alasia, S. T., and Richiardi, P. Anomalous expression of HLA class II molecules on keratinocytes and fibroblasts in hypertrophic scars consequent to thermal injury. *Clin. Exp. Immunol.* 1990; 82: 350,
73. Cracco, C., Stella, M., Teich Alasia, S., and Filogamo, G. Comparative study of Langerhans cells in normal and pathological human scars. II. Hypertrophic scars. *Eur. J. Histochem.* 1992; 36: 53,
74. Trautmann A, Toksoy A, Engelhardt E, et al. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J Pathol* 2000;190:100–6.
75. Placik, O. J., and Lewis, V. L., Jr. Immunologic associations of keloids. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1992; 175: 185,

76. Smith, C. J., Smith, J. C., and Finn, M. C. The possible role of mast cells (allergy) in the production of keloid and hypertrophic scarring. *J. Burn Care Rehabil* 1987; 8: 126
77. . Atkins, F. M., and Clark, R. A. Mast cells and fibrosis. *Arch. Dermatol.* 1987; 123: 191,
78. Sato Y, Ohshima T, Kondo T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:194-9.
79. K.J. Cross, T.A. Mustoe . Growth factors in wound healing *Surg Clin N Am* 83 2003; 531-545
80. Heino J: The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signalling functions. *Matrix Biol* 2000; 19: 319-323.
81. Regan, M., Kirk, S., Wasserkrug, H., et al. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *J. Surg. Res.* 1991; 50: 442,
82. Ehrlich, H., and Krummel, T. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair Regen.* 1996; 4: 203,
83. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 1993; 122: 103,
84. Pierce, G., Mustoe, T., Altrock, B., et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell Biochem.* 1991; 45: 319,
85. Peled ZM, Chin GS, Liu W, Galliano R, Longaker MT. Response to tissue injury. *Clin Plastic Surg.* 2000; 27 4: 489-500
86. Kischer, C. W, Hendrix, M. J. Fibronectin (FN) in hypertrophic scars and keloids. *Cell Tissue Res.* 1983; 231: 29,
87. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991; 5:2814-2823.
88. Birk DE, Zycband EI, Winkelmann DA, Trelstad RL. Collagen fibrillogenesis in situ: discontinuous segmental assembly in extracellular compartments. *Ann NY Acad Sci* 1990; 580:176-194

89. Diegelmann, R. Analysis of collagen synthesis. *Methods Mol. Med.* 2003; 78: 349,
90. Madden, J. W., and Smith, H. C. The rate of collagen synthesis and deposition in dehisced and resutured wounds. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1970; 130: 487,
91. Bailey AJ, Sims TJ, LeLouis M, Bazin S. Collagen polymorphism in experimental granulation tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 66(4):1160–1165.
92. Clark RA. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13:701–725.
93. Grinnell, F., Feld, M., and Minter, D. Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: Requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell* 19: 1980; 517, 1980.
94. Abergel, R. P., Pizzurro, D., Meeker, C. A., et al. Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. *J. Invest. Dermatol.* 1985; 84: 384,
95. Craig, R. D. Collagen biosynthesis in normal human skin, normal and hypertrophic scar and keloid. *Eur. J. Clin. Invest.* 1975; 5: 69,
96. Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., and McCoy, B. J. Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro. *J. Cell. Physiol.* 1979; 98: 341,
97. Sollberg, S., Peltonen, J., and Uitto, J. Combined use of in situ hybridization and unlabeled antibody peroxidase anti-peroxidase methods: Simultaneous detection of type I procollagen mRNAs and factor VIII-related antigen epitopes in keloid tissue. *Lab. Invest.* 1991;64: 125,
98. Ehrlich, H. P., Desmouliere, A., Diegelmann, R. F., et al. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 105,
99. Kischer, C. W. Comparative ultrastructure of hypertrophic scars and keloids. *Scan. Electron Microsc.* 1984; Pt 1: 423,
100. Hunt, T. K. Basic principles of wound healing. *J. Trauma* 30 1990; (12 Suppl): S122,
101. Ghahary, A., Shen, Y. J., Nedelec, B., Wang, R., Scott, P. G., and Tredget, E. E. Collagenase production is lower in post-burn hypertrophic scar fibroblasts than in

- normal fibroblasts and is reduced by insulin-like growth factor-1. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106: 476,
102. Ueyama, M., Maruyama, I., Osame, M., and Sawada, Y. Marked increase in plasma interleukin-6 in burn patients. *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 120: 693,
 103. Ala Kokko, L., Rintala, A., and Savolainen, E. R. Collagen gene expression in keloids: analysis of collagen metabolism and type I, III, IV, and V procollagen mRNAs in keloid tissue and keloid fibroblast cultures. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 89: 238,
 104. Bazin, S., Nicoletis, C., Delbet, J. P., and Delaunay, A. Comparative study of water, collagen and mucopolysaccharide contents in healthy human skin, in normal and keloid cicatrix. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D.* 1970; 270: 1532,
 105. Kischer, C. W. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1992; 24: 281,
 106. Hunzelmann, N., Anders, S., Sollberg, S., Schonherr, E., and Krieg, T. Coordinate induction of collagen type I and biglycan expression in keloids. *Br. J. Dermatol.* 1996; 135: 394,
 107. Garg, H. G., Siebert, J. W., Garg, A., and Neame, P. J. Inseparable iduronic acid-containing proteoglycan PG(IdoA) preparations of human skin and post-burn scar tissues: Evidence for elevated levels of PG(IdoA)-I in hypertrophic scar by N-terminal sequencing. *Carbohydr. Res.* 1996; 284: 223,
 108. Garg, H. G., Lippay, E. W., Carter, E. A., Donelan, M. B., and Remensnyder, J. P. Proteoglycan synthesis in human skin and burn scar explant cultures. *Burns* 1991; 17: 452,
 109. Goldman, R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future. *Adv. Skin Wound Care* 2004; 17: 24,
 110. M.C. Robson. Proliferative scarring *Surg Clin N Am* 83 2003; 557-569
 111. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001;38:61-140.
 112. Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. Mutual induction of growth factor gene expression in by epidermaldermal cell interaction. *J. Cell Biol.* 1993;122: 417,

113. Xia, Y., Zhao, Y., Marcus, J., et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischemia impaired rabbit ear model and on scar formation. *J. Pathol.* 1999;188: 431,
114. Jimenez, P., and Rampy, M. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J. Surg. Res.* 1999; 81: 238,
115. Lawrence, W., and Diegelmann, R. Growth factors in wound healing. *Clin. Dermatol.* 1994; 12: 157,
116. Grotendorst, G., Soma, Y., Takehara, K., et al. EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J. Cell Physiol.* 1989; 139: 617,
117. Odland G, Ross R. Human wound repair. I Epidermal regeneration. *J Cell Biol* 1968; 39:135-151.
118. Deitch, E. A., Wheelahan, T. M., Rose, M. P., Clothier, J., and Cotter, J. Hypertrophic burn scars: Analysis of variables. *J. Trauma* 1983; 23: 895,
119. Andriessen, M. P., Niessen, F. B., Van de Kerkhof, P. C., and Schalkwijk, J. Hypertrophic scarring is associated with epidermal abnormalities: An immunohistochemical study. *J. Pathol.* 1998; 186: 192,
120. Ehrlich HP, Rajaratnam, JRM. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: An in vitro model of wound contraction. *Tissue Cell* 1990; 22(4):407-417.
121. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971;27:549-50.
122. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994;1:71-81.
123. Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathological soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003;83:1689-707.
124. Darby, I., Skalli, O., and Gabbiani, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Invest.* 1990; 63: 21,

125. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. α -Smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001;12:2730–41.
126. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2001;159:1009–20.
127. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349–63.
128. Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol* 2001;153:569–84.
129. Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Contractile activity and smooth muscle α actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 52: 82–90.
130. Clark RAF. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci.* 1993; 306 (1): 42-8
131. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;146:56–66.
132. Moulin V, Larochelle S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Valle CA, Roy M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. *J Cell Physiol* 2004;198:350–8.
133. Harrop, A. R., Ghahary, A., Scott, P. G., Forsyth, N., Uji Friedland, A., and Tredget, E. E. Regulation of collagen synthesis and mRNA expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts in vitro by interferon-gamma. *J. Surg. Res.* 58: 471, 1995.
134. Holund B, Clemmerson I, Junker P. Fibronectin in experimental granulation tissue. *APMIS* 1982;90:159.
135. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992;119:1017

136. Werb Z, Banda MJ, Jones PA. Degradation of connective tissue matrices by macrophages: I. proteolysis of elastin, glycoproteins and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J Exp Med* 1980;152:1340.
137. Circolo A, Welgus HG, Pierce GF. Differential regulation of the expression of proteinases/antiproteinases in fibroblasts: effects of interleukin-1 and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1991;266:12283.
138. Laato M, Niinkoski J, Lebel L. Stimulation of wound healing by epidermal growth factor. *Ann Surg* 1986;379:1798
139. Aarabi S, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. *PLoS Med.* 2007 Sep;4(9):e234
140. Sabiston, D. *Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 15th Ed. St. Louis, Mo.: Saunders, 1997. P. 209
141. Hunt TK, Hopf HW. Wound healing and wound infections: what surgeons and anesthesiologists can do. *Surg Clin N Am* 1997;77:587–606.
142. Atiyeh Bishara S, Costagliola M. Hayek S H. Keloid or Hypertrophic scar. The controversy: review of the literature. *Annals of Plastic Surgery* • Volume 54, Number 6, June 2005 676-680
143. Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH, et al, for the International Advisory Panel on Scar Management. International clinical recommendations on scar management. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110:560–571.
144. English RS, Shenefelt PD. Keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg* 1999;25:631–8.
145. Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr Opin Pediatr* 2006;18:396–402.
146. Murray JC. Scars and keloids. *Dermatol Clin* 1993;11:697–707.
147. Nemeth AJ. Keloids and hypertrophic scars. *J Dermatol Surg Oncol* 1993;19:738–46.
148. Cohen IK, McCoy BJ. The biology and control of surface overhealing. *World J Surg* 1980; 4:297–299.
149. Shaffer JJ, Taylor SC, Cook-Bolden F. Keloidal scars: a review with a critical look at therapeutic options. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:S63–97.

150. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayekar SN. Keloid and hypertrophic scar. *Ann Plast Surg* 2005;54:676–80.
151. Segev F, Jaeger-Roshu S, Gefen-Carmi N, Assia EI. Combined mitomycin C application and free flap conjunctival autograft in pterygium surgery. *Cornea* 2003;22:598–603.
152. Child FJ, Fuller LC, Higgins EM, et al. A study of the spectrum of skin disease occurring in a black population in south-east London. *Br J Dermatol* 1999;141:512–7.
153. Alster T S, Tanzi L E Hypertrophic scars and Keloids Etiology and Management . *Am J Clin Dermatol* 2003; 4 (4): 235-243
154. Datubo-Brown DD. Keloids: a review of the literature. *Br J Plast Surg* 1990; 43: 276-80
155. Amadeu T, Braune A, Mandarim-de-Lacerda C, et al. Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathol Res Pract.* 2003;199:469–473.
156. Castagnoli C, Stella M, Magliacani G. Role of T-lymphocytes and cytokine in post-burn hypertrophic scars. *Wound Rep Regen* 2004;110:107–8.
157. Amadeu TP, Braune AS, Porto LC, et al. Fibrillin-1 and elastin are differentially expressed in hypertrophic scars and keloids. *Wound Rep Regen* 2004;12:169–74.
158. Satish L, Babu M, Tran K, et al. Keloid fibroblast responsiveness to epidermal growth factor and activation of downstream intracellular signalling pathways. *Wound Rep Regen* 2004;12:183–92.
159. Amadeu T, Braune A, Mandarim-de-Lacerda C, et al. Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathol Res Pract.* 2003;199:469–473.
160. Kose O, Waseem A . Keloids and Hypertrophic Scars: Are They Two Different Sides of the Same Coin. ? *Dermatol Surg* 2008;34:336–346
161. Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, et al. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes and hypertrophic scars. *J Dermatol Sci.* 1999;22:31–37.
162. Ladin DA, Hou Z, Patel D, et al. p53 And apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1998;6:28 –37.

163. Phan TT, Lim IJ, Bay BH, et al. Role of IGF system of mitogens in the induction of fibroblast proliferation by keloid-derived keratinocytes in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284: C860–9.
164. Tanaka A, Hatoko M, Tada H, et al. Expression of p53 family in scars. *J Dermatol Science*. 2004;34:17–24.
165. Lee JY, Yang CC, Chao SC, et al. Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar. *Am J Dermatopathol* 2004;26:379–84.
166. Prathiba V, Rao KS, Gupta PD. Altered expression of keratins during abnormal wound healing human skin. *Cytobios* 2001;104:43–51.
167. Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, et al. Keloid pathogenesis and treatment. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:286–300.
168. Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738–746.
169. Bauer B S, Tredget EE Scott PG Ghahary A Molecular and Cellular biology Of dermal Fibroproliferative Disorders. Scarless wound healing. MerceL decker Inc. Chapter 9. Edited By Michael Longaker
170. Saulis AS, Mogford JH, Mustoe TA. Effect of Mederma on hypertrophic scarring in the rabbit ear model. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Jul;110(1):177-83
171. Polo M, Ko F, Busillo F, et al. The 1997 Moyer Award: cytokine production in patients with hypertrophic burn scars. *J Burn Care Rehabil* 1997;18:477–82.
172. Mikulec AA, Hanasono MM, Lum J, et al. Effect of tamoxifen on transforming growth factor beta1 production by keloid and fetal fibroblasts. *Arch Fac Plast Surg* 2001;3:111–4.
Sheridan RL, Tompkins RG (2004) What's new in burns and metabolism. *J Am Coll Surg* 198: 243–263.
173. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW (1992) Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet* 339: 213–214.
174. Dalsgaard CJ, Bjorklund H, Jonsson CE, Hermansson A, Dahl D. Distribution of neurofilament-immunoreactive nerve fibers in human skin. *Histochemistry* 1984; 81: 111–4.

175. Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hokfelt T, Cuello AC. Localization of substance P-immunoreactive nerve fibers in the human digital skin. *Experientia* 1983; 39: 1018–20.
176. Dalsgaard CJ, Rydh M, Haegerstrand A. Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. *Histochemistry* 1989; 92: 385–90.
177. Paus R, Peters EM, Eichmuller S, Botchkarev VA. Neural mechanisms of hair growth control. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 61–8.
178. Wang L, Hilliges M, Jernberg T, Wiegleb-Edstrom D, Johansson O. Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. *Cell Tissue Res* 1990; 261: 25–33
179. Alvarez FJ and Fyffe RE. Nociceptors for the 21st century. *Curr Rev Pain* 2000; 4: 451–458,
180. Lawson SN. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol* 2002; 87: 239–244,
181. Hosoi J, Murphy G, Egan C, Lerner E, Grabbe S, Asahina A, Granstein R. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1993; 363: 159–63.
182. Payan DG, Goetzl EJ. Dual roles of substance P: modulator of immune and neuroendocrine functions. *Ann NY Acad Sci* 1987; 512: 465–75
183. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 1998; 7: 81–96.
184. Broome CS, Miyan JA. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production. A key axis for neuroimmunomodulation. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917: 424–34.
185. Gibran NS, Jang YC, Isik FF, Greenhalgh DG, Muffley LA, Underwood RA, Usui ML, Larsen J, Smith DG, Bunnett N, Ansel JC, Olerud JE. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *J Surg Res* 2002; 108: 122–8.
186. Khalil Z, Helme R. Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996; 51: B354–61.

187. Muangman P, Muffley LA, Anthony JP, Spenny ML, Underwood RA, Olerud JE, Gibran NS. Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 44–52.
188. Schmelz M, Petersen LJ: Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci*, 2001, 16, 33–37.
189. Lewis T: The blood vessels of the human skin and their responses. In: *Neurotransmitter Functions of Mammalian Tachykinins*, Ed. Otsuka M, Yoshioka K. *Physiol Rev*, 1993, 73, 265–270
190. Mevlut Y. The axon Reflex. *Neuroanatomy* 2008 7: 17–19
191. OSullivan RL, Lipper G, Lerner EA: The neuroimmuno- cutaneous-endocrine network: relationship of mind and skin. *Arch Dermatol*, 1998, 134, 1431–1435
192. Scholzen TE, Brzoska T, Kalden DH, O_Reilly F, Armstrong CA, Luger TA, Ansel JC: Effect of ultraviolet light on the release of neuropeptides and neuroendocrine hormones in the skin: mediators of photodermatitis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1999, 4, 55–60
193. Scholzen TE, Ständer S, Riemann H, Brzoska T, Luger TA: Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin converting enzyme. *J Immunol*, 2003, 170, 3866–3873.
194. Slominski A, Wortsman J: Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev*, 2000, 21, 457–487.
195. Foreman JC. Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 366–71.
196. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6 : S336–43.
197. Otsuka M, Yoshioka K: Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*, 1993, 73, 265–270.
198. Boulais N, Misery L. The Epidermis a Sensory Tissue. *Eur J Dermatol* 2008; 18 2: 119-27
199. Jancso N, Jancso-Gabor A, and Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 1967; 31: 138–151,

200. Szolcsanyi J. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog Brain Res* 1996; 113: 343–359
201. Szolcsanyi J, Bolcskei K, Szabo A, Pinter E, Petho G, Elekes K, Borzsei R, Almasi R, Szuts T, Keri G, and Helyes Z. Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic mechanical allodynia. *Eur J Pharmacol* 498: 103–109, 2004.
202. Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J, and Jancso N. Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. *J Physiol* 206: 495–507, 1970
203. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T: Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*, 2003, 139, 1479–1488.
204. Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC et al.: Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol*, 1999, 8, 282–294.
205. Seeliger S, Derian CK, Vergnolle N, Bunnett NW, Nawroth R, Schmelz M, Von Der Weid PY et al.: Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation *in vivo*. *FASEB J*, 2003, 17, 1871–1885
206. Eedy DJ, Shaw C, Johnston CF, Buchanan KD: The regional distribution of neuropeptides in human skin as assessed by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography. *Clin Exp Dermatol*, 1994, 19, 463–472.
207. Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T. Clinical and Experimental Aspects of Cutaneous Neurogenic Inflammation. *Pharmological Reports*. 2006: 58;13-21
208. Okamoto A, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Interactions between neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and the substance P (NK1) receptor expressed in mammalian cells. *Biochem J* 1994; 299: 683–93.
209. Black PH: Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immunol*, 2002, 10, 1–32.

210. Campos MM, Calixto JB: Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides*, 2000, 34, 314–322.
211. Quinlan KL, Song IS, Naik SM, Letran E, Olerud JE, Bunnett NW, Armstrong CA et al.: VCAM-1 expression on human dermal microvascular endothelial cells is directly and specifically up-regulated by substance P. *J Immunol*, 1999, 162, 1656–1661.
212. Anad P, Foley P, Navsaria HA, et al. Nerve growth factor levels in cultured human skin cells: effect of gestation and viral transformation. *Neurosci Lett*. 1995;184:157–160.
213. Hughes SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur J Pharmacol* 1990; 191: 481–4.
214. Miller MS, Buck SH, Sipes IG, et al. Regulation of substance P by nerve growth factor: disruption by capsaicin. *Brain Res*. 1982;250:193–196.
215. Chiang HY, Chen CT, Chien HF, et al. Skin denervation, neuropathology, and neuropathic pain in a laser-induced focal neuropathy. *Neurobiol Dis*. 2005;18:40 – 53.
216. Gamse R, Holzer P, Lembeck F. Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br J Pharmacol*. 1980;68:207–213
217. Jessell TM, Iversen LL, Cuello AC. Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain Res*. 1978;152:183– 188.
218. Fitzgerald M. Capsaicin and sensory neurones: a review. *Pain*. 1983;15: 109–130.
219. Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*. 1985 May 2-8;315(6014):61-3.
220. Furutani K, Koro O, Hide M, Yamamoto S: Substance P-and antigen-induced release of leukotriene, prostaglandin and histamine from guinea pig skin by different mechanisms *in vitro*. *Arch Dermatol Res*, 1999, 291, 466–473.
221. Rosenfeld, M.G., Mermod, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., Evans, R.M., 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304, 129–135.

222. Dennis, T., Fournier, A., St Pierre, S., Quirion, R., Structure- activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989. 251, 718–725.
223. Smith PG, Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2002;307:281–291
224. Senapati A, Anand P, McGregor GP, et al. Depletion of neuropeptides during wound healing in rat skin. *Neurosci Lett.* 1986;71:101–105.
225. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993;150:4478–85.
226. Columbo M, Horowitz EM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Substance P activates the release of histamine from human skin mast cells through a pertussis toxin-sensitive and protein kinase C-dependent mechanism. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;81:68–73.
227. Yamaoka J, Di ZH, Sun W, Kawana S. Erratum to “changes in cutaneous sensory nerve fibers induced by skin-scratching in mice”. *J Dermatol Sci* 2007;47:172–82.
228. Kahler CM, Sitte BA, Reinisch N, and Wiedermann CJ. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by substance P. *Eur J Pharmacol* 1993;249: 281–286
229. Vigna SR. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides* 2001; 35: 24–31,
230. Vigna SR. The role of the amino-terminal domain of tachykinins in neurokinin-1 receptor signaling and desensitization. *Neuropeptides* 2003; 37: 30–35,
231. Katayama I and Nishioka K. Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 1997; 15: 201–206,
232. Rameshwar P. Substance P: a regulatory neuropeptide for hematopoiesis and immune functions. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 129–133,

233. Crowe R, Parkhouse N, McGrouther D, Burnstock G. Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. *Br J Dermatol* 1994; 130: 444–52.
234. Zhang LQ, Laato M. Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat. *Ann Chir Gynaecol* 2001; 90 (215): 29–32.
235. Liang Z, Engrav LH, Muangman P, Muffley LA, Zhu KQ, Carrougher GJ, Underwood RA, Gibran NS. Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar. *Burns* 2004; 30: 57–64.
236. Scott JR, Muangman PR, Tamura RN, Zhu KQ, Liang Z, Anthony J, Engrav LH, Gibran NS. Substance P levels and neutral endopeptidase activity in acute burn wounds and hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115: 1095–102.
237. Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? *J Burn Care Res.* 2008 Mar-Apr;29(2):363-8.
238. Hillmer MP, MacLeod SM. Experimental keloid scar models: a review of methodological issues. *J Cutan Med Surg* 2002; 6:354–9.
239. Hochman B, Vilas Boas FC, Mariano M, Ferreiras LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch, Brazil. *Acta Cir Bras* 2005;20:200–12.
240. Aksoy MH, Vargel I, Canter IH, et al. A new experimental hypertrophic scar model in guinea pigs. *Aesthetic Plast Surg* 2002;26:388–96
241. Kim I, Mogford JE, Witschi C, Nafissi M, Mustoe TA. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase reduces scar hypertrophy in a rabbit model of cutaneous scarring. *Wound Repair Regen* 2003;11:368–72.
242. Reid RR, Mogford JE, Butt R, deGiorgio-Miller A, Mustoe TA. Inhibition of procollagen C-proteinase reduces scar hypertrophy in a rabbit model of cutaneous scarring. *Wound Repair Regen* 2006;14:138–41.
243. Lee JP, Jalili RB, Tredget EE, Demare JA, Ghahary A. Antifibrogenic effects of liposome-encapsulated IFN-alpha2b cream on skin wounds in a fibrotic rabbit ear model. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:627–31.
244. Reid RR, Roy N, Mogford JE, Zimmerman H, Lee C, Mustoe TA. Reduction of hypertrophic scar via retroviral delivery of a dominant negative TGF-beta receptor II. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007;60:64–72,

245. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006;86:1309-79.
246. Misery L. Are Biochemical Mediators the Missing Link between Psychosomatics and Dermatology? *Dermatol Psychosom* 2001; 2: 178-83
247. Saraceno R, Kleyn CE, Terenghi G, Griffiths CE. The role of neuropeptides in psoriasis. *Br J Dermatol* 2006; 155: 876-82.
248. Misery L. Skin, immunity and the nervous system. *Br J Dermatol* 1997; 137: 843-50.
249. Brazzini B, Ghersetich I, Hercogova J, Lotti T. The neuroimmuno- cutaneous- endocrine network: relationship between mind and skin. *Dermatol Ther* 2003; 16: 123-31.
250. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol.* 2007 Jul;82(4):163-201.
251. Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM. Substance P has a role in neurogenic mediation of human burn wound healing. *J Burn Care Rehabil* 1996; 17: 390–6.
252. Ward RS, Tuckett RP, English KB, Johansson O, Saffle JR. Substance P axons and sensory threshold increase in burn-graft human skin. *J Surg Res.* 2004;118(2):154-60.
253. Altun V, Hakvoort TE, van Zuijlen PP, van der Kwast TH, Prens EP. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns* 2001; 27: 717–722.
254. Hermanson A, Dalsgaard CJ, Bjorklund H, Lindblom U. Sensory reinnervation and sensibility after superficial skinwounds in human patients. *Neurosci Lett* 1987; 74: 377–82.
255. Papp A, Valtonen P. Tissue substance P levels in acute experimental burns. *Burns.* 2006 ;32:842-5.
256. Underwood RA, Gibran NS, Muffley LA, Usui ML, Olerud JE. Color subtractive-computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1285–91.

257. Olerud JE, Usui ML, Seckin D, Chiu DS, Haycox CL, Song IS, Ansel JC, Bunnett NW. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 873–81.
258. Scott JR, Muangman P, Gibran NS. Making sense of hypertrophic scar: a role for nerves. *Wound Repair Regen.* 2007;15: 127-31
259. Kjartansson MD, Dalsgaard CJ, Jonsson CE. Decreased survival of experimental critical flaps in rats after sensory denervation with capsaicin. *Plast Reconstr Surg.* 1987;79:218 –221.
260. Richards AM, Mitsou J, Floyd DC, et al. Neural innervation and healing. *Lancet.* 1997;350:330 –340.
261. Ranne J, Kalimo H, Pyykko K, et al. Wound healing in denervated rat groin skin flap. *Eur Surg Res.* 2000;32:197–202.
262. Wallengren J, Chen D, Sundler F. Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing. *British Journal of Dermatology* 1999; 140: 400–408.
263. Weddell G, Pallie W, Palmer E. Studies on the innervation of skin. I. The origin, course and number of sensory nerves supplying the rabbit ear. *J Anat.* 1955 89:162-74.
264. Emflorgo CA. The assessment and treatment of wound pain. *J Wound Care* 1999; 8: 384-5.
265. Zurada JM, Kriegel D, Davis IC. Topical treatments for hypertrophic scars. *J Am Acad Dermatol.* 2006 ;55:1024-31
266. Kischer CW, Shetlar MR, Shetlar CL: Alteration of hypertrophic scars induced by mechanical pressure. *Arch Dermatol* 1975, 111:60–64
267. Reno` F, Grazianetti P, Cannas M. Effects of mechanical compression on hypertrophic scars: prostaglandin E2 release. *Burns* 2001;27: 215–218
268. Baur PS, Larson DL, Stacey TR, Barrat GF, Dobrkovsky M: Ultrastructural analysis of pressure-treated human hypertrophic scars. *J Trauma* 1976; 16:958–967
269. Renò F, Sabbatini M, Lombardi F, Stella M, Pezzuto C, Magliacani G, Cannas M. In vitro mechanical compression induces apoptosis and regulates cytokines release in hypertrophic scars. *Wound Repair Regen.* 2003;11:331-336.

270. Wolfram D, Tzankov A, Pülzl P, Piza-Katzer H. Hypertrophic scars and keloids-- a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg.* 2009 ;35:171-81.
271. Boyadjiev C, Popchristova E, Mazgalova J. Histomorphologic changes in keloids treated with Kenacort. *J. Trauma.* 1995; 38: 299
272. Ahluwalia A, Newbold P, Brain SD, Flower RJ. Topical glucocorticoids inhibit neurogenic inflammation: involvement of lipocortin 1.
273. Piedimonte G, McDonald DM, Nadel JA. Neutral endopeptidase and kininase II mediate glucocorticoid inhibition of neurogenic inflammation in the rat trachea. *J Clin Invest.* 1991 ;88:40-4.
274. Lee RC, Ping JA. Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. *J Surg Res* 1990;49:463–6
275. Doong H, Dissanayake S, Gowrishankar TR, LaBarbera MC, Lee RC. The 1996 Lindberg Award: calcium antagonists alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblasts. *J Burn Care Rehabil* 1996;31;17:497–514.
276. Ioulios P, Charalampos M, Efrossini T. The spectrum of cutaneous reactions associated with calcium antagonists: A review of the literature and the possible etiopathogenic mechanisms. *Dermatol Online J.* 2003 ;9(5):6.
277. Copcu E, Sivrioglu N, Oztan Y. Combination of surgery and intralesional verapamil injection in the treatment of the keloid. *J Burn Care Rehabil.* 2004 ;25:1-7.
278. Lee RC, Doong H, Jellema AF. The response of burn scars to intralesional verapamil: report of five cases. *Arch Surg* 1994; 129:107–11.
279. Lawrence WT. Treatment of earlobe keloids with surgery plus adjuvant intralesional verapamil and pressure earrings. *Ann Plast Surg* 1996;37:167–9.
280. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.
281. Gungor A, Poyrazoglu E, Cincik H, Sali M, Candan H, Ay H. The effectiveness of hyperbaric oxygen treatment in tracheal reconstruction with auricular cartilage rafts (experimental study). *Am J Otolaryngol.* 2003;24(6):390-4.