

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

**RAT İSKEMİK YARA MODELİNDE TOPİKAL CLİNOPTİLOLİTE
ZEOLİT KULLANIMININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. FATMA BETÜL AK BOZKIRLI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. OSMAN LATİFOĞLU**

**ANKARA
NİSAN 2012**

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

**RAT İSKEMİK YARA MODELİNDE TOPİKAL CLİNOPTİLOLİTE
ZEOLİT KULLANIMININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. FATMA BETÜL AK BOZKIRLI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. OSMAN LATİFOĞLU**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimse Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01/2011-77
proje numarası ile desteklenmiştir

**ANKARA
NİSAN 2012**

TEŞEKKÜR

Bana hekimlik mesleğini daha çocukken tanıtan, sevdiren, desteklerini ve sevgilerini kilometrelerce uzaktan da olsa daima hissettiren annem ve babam, Serpil AK ve Dr. Fikret AK'a,

Bu çalışma boyunca bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, sakinliği ile en telaşlı zamanlarımda beni rahatlatan tez danışmanım Prof. Dr. Osman LATİFOĞLU'na,

Beni bu konuda çalışmaya yönlendiren, tezimin ilk danışmanı ve fikir babası Prof. Dr. Reha YAVUZER'e,

Asistanlığımın başından sonuna kadar üzerimde çok emeği geçmiş, bana cerrahinin prensiplerini, disiplinini ve güzelliklerini tanıtan değerli hocalarım Prof.Dr.Cemalettin ÇELEBİ, Prof.Dr.Seyhan ÇENETOĞLU, Prof.Dr.Kenan ATABAY, Prof.Dr.Osman LATİFOĞLU, Prof.Dr.Sühan AYHAN, Doç.Dr.Selahattin ÖZMEN, Doç.Dr.Serhan TUNCER, Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU'na ve benden önce bu bölümden uzmanlığını alan kıdemlilerime,

Çalışmanın cerrahi aşamasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Ayşe ŞENCAN ve Dr. Bora ÖZEL'e,

GÜDAM veterinerleri Vet. Dr. Elif ERGÜVEN KAYA, Vet. Dr. Elvan ANADOL ve Vet. Dr. Şeyda DİKER'e ve GÜDAM personeline,

Biyokimya danışmanım Dr. Şehri ELBEG'e,

Histolojik incelemede emeği geçen Dr. Eser ve Dr. Neşe LORTLAR'a ve Gazi Üniversitesi Nanotıp Laboratuvar'ına,

İstatistiklerin çıkartılması ve yorumlanmasında katkıda bulunan Salih ERGÖÇEN'e,

Araştırma boyunca manevi desteğini eksik etmeyen ve en karamsar, en umutsuz zamanlarımda moral verip motivasyonumu tazeleyen biricik eşim Dr. Bahadır BOZKIRLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Fatma Betül AK BOZKIRLI

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yara İyileşmesi.....	3
2.2. İyileşmesi Geciken Yaralar.....	22
2.3. Yara İyileşmesini Geciktiren İntrinsik Faktörler	26
2.4. Yara İyileşmesini Geciktiren Ekstrinsik Faktörler.....	29
2.5. Matriks Proteinleri, Metalloproteinazlar ve İnhibitörleri.....	31
2.6. Clinoptilolite Zeolit.....	33
2.7. Rat İskemik Yara Modeli.....	41
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	43
3.1. Çalışma Grupları.....	44
3.2. Cerrahi Yöntem.....	45
3.3. Yara Alanlarının Değerlendirilmesi.....	51
3.4. Biyokimyasal Değerlendirme.....	52
3.5. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal değerlendirme.....	53
3.6. İstatistiksel Yöntem.....	54
4. BULGULAR.....	56
4.1. Yara Alanları.....	56
4.2. MMP-1 ve TIMP-1 Düzeyleri ve MMP-1/TIMP-1 Oranları.....	60
4.3. Histolojik Değerlendirme Bulguları.....	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	84
6. ÖZET.....	92
7. SUMMARY.....	94
8. KAYNAKLAR.....	96

1. GİRİŞ

Yara; doku bütünlüğünün travma, cerrahi veya çeşitli hastalıklar sonucu bozulmasıdır. İyileşmenin gerçekleşebilmesi, uygun ekstrasellüler matriks (ECM), anjiyogenez ve epitelizasyona bağlıdır. Yara iyileşmesi sürecinde, inflamatuvar hücreler, fibroblastalar, keratinositler, bu hücreler arasında iletişimi sağlayan sitokinler ve büyüme faktörleri önemli rol oynar [1].

Yaralar akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Akut yaralar iyileşme sürecine uygun olarak kendiliğinden iyileşirken, kronik yaralarda bu süreç çeşitli noktalarda kesintiye uğradığından doku bütünlüğü ve fonksiyonu tekrar sağlanamaz [2].

Kronik yaraların çoğu cilt ülserleri şeklinde görülür. Bası yaraları, diyabetik ayak ülserleri ve venöz staz ülserleri kronik yaraların %70'ini oluşturur [3].

Kronik yaralar sağlık sistemi için büyük bir maddi yük oluşturmaktadır. Yaraların iyileşmesi uzadıkça iş günü kaybı artmakta ve ülke ekonomisi de etkilenmektedir. Tüm bu maddi problemlerin yanı sıra, hastalar yaralarının iyileşmesi ne kadar uzun sürerse psikolojik olarak o kadar kötü etkilenmektedirler [4]. Tüm bu nedenlerden dolayı, yaraları en kısa zamanda iyileştirmek ve hastaları günlük yaşamlarına döndürebilmek için, yara bakımında kullanılan topikal ajanlar ve yara kapama malzemeleri günümüzde oldukça çeşitlenmiştir.

Clinoptilolite zeolite doğada varolan AlO_4 ve SiO_4 içeren hidrate mikroporöz kristallerdir. Katalizör, iyon değişicisi ve adsorban olmaları nedeniyle pek çok alanda kullanılmaktadırlar. Kimyasal etkilerinden asit gazları

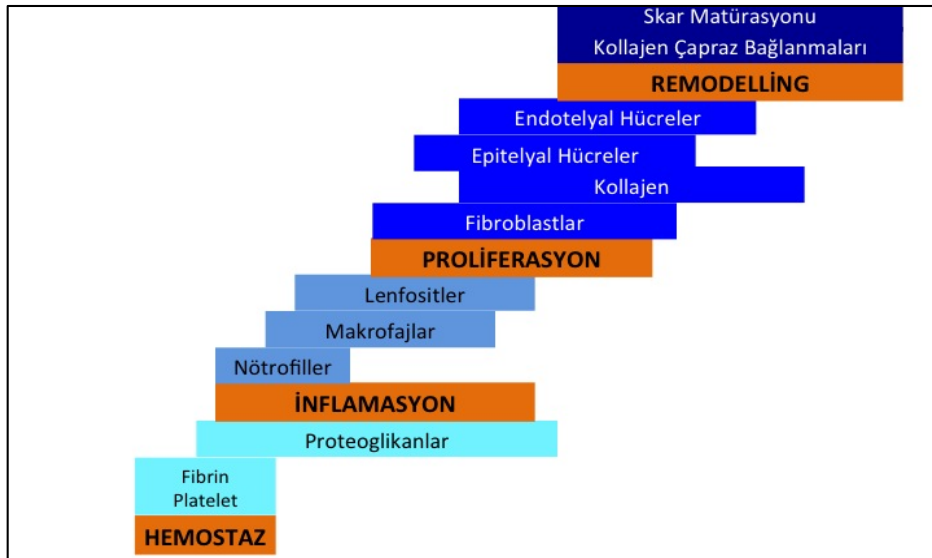
kurutmakta, havadan oksijeni ayırıştırmakta, içme suyu ve atık sulardan amonyağın uzaklaştırlılmasında, kumaş ve hayvansal ürünlerin kokusuzlaştırlılmasında, seralarda topraksız besin öğesi olarak faydalanılmaktadır [5]. Clinoptilolite zeolitın kimyasal ve biyolojik özellikleri ile ilgili çok sayıda çalışma olmakla beraber bu maddenin yara iyileşmesindeki etkilerini değeriendirmeyi düşündüren çalışma Pavelic ve arkadaşlarının 2001 yılında yayınladıkları invitro ve invivo olarak clinoptilolite zeolitın tümör boyutlarını küçülttüğünü gösteren çalışmasıdır. Bu çalışmada cilt kanseri olan, eksizyon yapıldıktan sonra yarası iyileşmeyen köpeklere hem oral hem de topikal clinoptilolite zeolit uygulanan hayvanların genel durumunun düzeldiğı, tümör boyutlarının küçüldüğü ve yaralarının hızla iyileştiğı belirtilmiştir [6]. Yapılan ingilizce literatür taramasında bu maddenin yara iyileşmesi üzerinde etkilerinin incelendiğı kontrollü deneysel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz bu deneysel çalışmamızda, rat üzerinde randomize ve kontrollü bir deney planladık. Yara alanlarını 14 gün boyunca takip ederek, biyokimyasal ve histopatolojik değeriendirmeler ile clinoptilolite zeolitın normal ve iskemik yara iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi ve tedavisi tıp literatüründe tartışılan en eski konulardan biridir. Doku tipinden ve yaralanmanın çeşidinden bağımsız olarak, her yara iyileşmesinde aynı olaylar meydana gelir. Cerrahi kesiler ve travmatik yaralar, duodenal ülserler, myokardiyal enfarktüsler, vb. hepsi aynı onarım sürecinden geçerler. Son yirmi yılda temel bilimlerin hücresel ve moleküler düzeyde yara iyileşmesi konusundaki keşifleri, yarayı manipüle edip iyileşmeyi hızlandırmak açısından faydalar sağladıysa da, iyileşmeyen yaralar, aşırı iyileşme gösteren yaralar ve tümörler gibi kontrolsüz büyüyen yaraların patofizyolojisi hala tam olarak anlaşılmış değildir [7].

Yara iyileşmesi çeşitli medyatörler, kan hücreleri, ekstrasellüler matriks ve parankimal hücreleri kapsayan, dinamik ve interaktif bir süreçtir. Yara iyileşmesinin, inflamatuvar, proliferatif ve yeniden yapılanma olmak üzere üç ana aşaması vardır. Bu aşamalar birbirleri üzerine örtüşürler.



Şekil 1. Yara İyileşmesi Evreleri

2.1.1. İnflamatuvar evre

İnflamasyon, yara iyileşmesinin ilk basamağıdır. Yaralanma bölgesinde, hasarlanan damarlarda anında vazokonstriksiyon meydana gelir. Endotel altındaki tabakadan salınan trombotik doku faktörleri sayesinde trombositler agrege olur ve ilk pıhtı tıkaçı oluşmuş olur. İntrinsik ve ekstrinsik koagülasyon yolları ile protrombinin trombine, fibrinojenin fibrine dönüşümü gerçekleşir, böylece oluşan pıhtı daha stabil bir yapıya kavuşur [8]. Burada fibrinin faktör XIII aracılığıyla direkt trombositlere bağlanmasının da rolü vardır. Faktör XIII eksikliğine bağlı pıhtılaşma bozukluğunda yara iyileşmesi de bozulur [9].

Fibrinojenin yokluğunda, yara iyileşmesinin engellenmediği ancak yara kuvvetinin azaldığı gösterilmiştir [10]. Fibrin ise hücre göçü ve ekstrasellüler matriks üretiminde oldukça önemlidir. Monositlerin, nötrofillerin, endotelial hücrelerin ve fibroblastların üzerinde bulunan reseptörlere integrin aracılığıyla bağlanır. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) -2 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) fibrine bağlanarak anjiyogenezi uyarırken, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 fibrine bağlanarak stromal hücrelerin işlevini ve proliferasyonunu artırır [11-13].

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) makrofaj ve fibroblastları uyarak ortama çeker. Kanama olmayan yaralanmalarda parankimal hücrelerden salınan çeşitli medyatör ve kemotaktik faktörler ile polimorfonükleer (PMN) lökositler yaralanma bölgesine çekilir. Yara iyileşmesinde oynadıkları önemli role rağmen trombositopenik ratlarda yara iyileşmesinde problem saptanmamıştır [14].

PMN lökositler

Hemostaz sağlandıktan sonra trombositlerden salınan serotonin ve mast hücrelerinden salınan histamin damar geçirgenliğini artırır. Böylece inflamatuvar hücrelerin yara ortamına gelmesi sağlanır [8]. Damar geçirgenliğinin artması inflamasyonun klinik bulguları olan eritem, ödem, ısı artışı ve ağrı bulgularının ortaya çıkmasına neden olur [7]. Yaralanma bölgesine gelen nötrofiller, ortamdaki bakteri ve yabancı partikülleri temizlerler, ardından eskar dokusu tarafından yüzeye itilir veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler. ECM protein fragmanları, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve monosit kemoatraktan protein-1 gibi özgül sitokinlere yanıt veren monositler olay yerine gelerek, PDGF ve VEGF salgılayan aktif makrofajlara dönüşürler [1].

Makrofajlar

Makrofajlar yirmiden fazla farklı sitokin salgılayarak keratinositleri, endotelial hücreleri ve fibroblastları uyarırlar. Makrofajlar düzenleyici rollerinden dolayı yara iyileşmesi sürecindeki en önemli inflamatuvar hücrelerdir [8]. Uyarılmış makrofajlar tromboksan-A2 ve prostoglandin-F2 α , lökotrien-B4 ve C4 salgırlar. Lökotrien-B4 nötrofiller için kemotaktiktir ve nötrofillerin endotelial hücrelere adheransını artırır [7].

Makrofajlar ayrıca ECM'i parçalamak, yabancı maddeleri uzaklaştırmak, doku boşlukları arasında hücre hareketini kolaylaştırmak ve ECM'in yeniden yapılanmasını sağlamak gibi görevleri olan matriks metalloproteinazları (MMP) salgırlar.

Makrofajların salgıladığı maddelerden biri de akut faz sitokini olan interlökin (IL)-1dir. Deneysel yara modellerinde proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1 düzeylerinin ilk 24 saatte artmaya başladığı 72. saatte tavan yaptığı ve birinci haftanın sonuna doğru hızla azaldığı gözlenmiştir. IL-1 hem lenfosit aktivasyonundan hem de hipotalamusun uyarılmasını sağlayarak febril yanıtın ortaya çıkışından sorumludur. IL-1'in etkisi endotelial hücrelerce üretilen tümör nekrozis faktör (TNF)- α ve endotoksin varlığında artar. IL-1 kollajenaz üretimini artırır, kırıkta yıkımını ve kemik geri emilimini uyarır, nötrofilleri aktive eder, adhezyon moleküllerini düzenler ve kemotaksisi kolaylaştırır, diğer hücrelerden inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olur. IL-1'in etkileri proliferatif fazda da devam eder; keratinosit ve fibroblast büyümesini ve kollajen sentezini artırır [15]. Yapılan çalışmalarda kronik yaralarda artmış IL-1 düzeyleri tespit edilmiş ve bunun yaraların inflamatuvar fazda takıldığına bir göstergesi olduğu savunulmuştur [16].

Makrofajlardan salınan diğer bir sitokin olan TNF- α yarada 12. saatte belirir ve 72. saatte tavan yapar. Hemostaz, damar geçirgenliği ve endotelial proliferasyon üzerinde etkilidir. IL-1 gibi ateşi tetikler, kollajenaz üretimini artırır, kırıkta yıkımını ve kemik geri emilimini uyarır ve PDGF salınımını artırır. İnflamatuvar fazda önemli bir sitokin olmasına rağmen TNF- α seviyelerinin devamlı yüksek seyretmesi yara matürasyonunda bozulmaya neden olur [16].

Monosit, makrofaj, PMN lökosit ve fibroblastlardan salınan IL-6; kök hücrelerin büyümesini, B ve T lenfositlerin uyarılmasını sağlar. IL-6 yarada 12.

saatte tespit edilebilecek düzeye gelir ve bir haftadan uzun bir süre boyunca yüksek konsantrasyonda bulunur. Fibroblast proliferasyonunu uyarır [17].

Makrofajlar ve fibroblastlar tarafından salgılanan IL-8; monosit ve PMN lökositler üzerine kemotaktik etki gösterir. İlk 24 saatte tavan yapar, PMN lökositlerin degranülasyonu ve endotelial hücre adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırıcı etki gösterir [18].

İnterferon (IFN)- γ T lenfosit ve makrofajlardan salgılanan diğer bir proinflamatuvar sitokindir. Makrofaj ve PMN lökositleri uyarır, lokal yara kontraksiyonunu azaltır ve dokuların yeniden yapılanmasına (remodeling) yardım eder. IFN- γ hipertrofik skar ve keloid tedavisinde kollajen üretimini ve çapraz bağlanmayı yavaşlatıcı etkileri nedeniyle kullanılmıştır.

Makrofajlar ayrıca fibroblast, endotelial hücre ve keratinositlerin çoğalmasını sağlayan büyüme faktörlerini de salgılar. PDGF; kollajen ve proteoglikan sentezini uyarır. Rekombinant PDGF'nin topikal kullanımının yaranın kırılma gücünü arttırdığını ve iyileşme süresini kısalttığını gösteren insan ve hayvanlarda yapılmış deneysel çalışmalar mevcuttur [19]. PDGF insanlarda ve hayvanlarda kronik ve diyabetik yaralarda olumlu etkiye sahipken, steroid tedavisi alan hayvanlarda etkisi gösterilememiştir [20].

TGF- α ve TGF- β makrofajlardan salınır. TGF- α epidermal büyümeyi ve anjiyogenezisi uyarır. TGF- β ise monositleri uyarak TGF- α , IL-1 ve PDGF salınımını artırır. β 1, β 2 ve β 3 olmak üzere 3 izomeri mevcuttur. TGF- β 1'in kollajen metabolizmasında, gastrointestinal yaraların ve anastomozların iyileşmesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir [21]. Deneysel çalışmalarda TGF- β 1 kullanımının akut, kronik ve radyasyon

nedeniyle oluşmuş yaraların iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. TGF- β fibroplaziyi uyaran en önemli sitokindir. Keloid ve hipertrofik skarlarda TGF- β 1 üretiminin arttığı saptanmıştır [22]. TGF- β 2 doku fibrozisi ve yaralanma sonrası nedbe oluşumunda rol alırken, TGF- β 3 skar oluşumunu sınırlar. TGF- β düzeylerindeki artış, inflamatuvar evreden proliferatif safhaya geçişi sağlar.

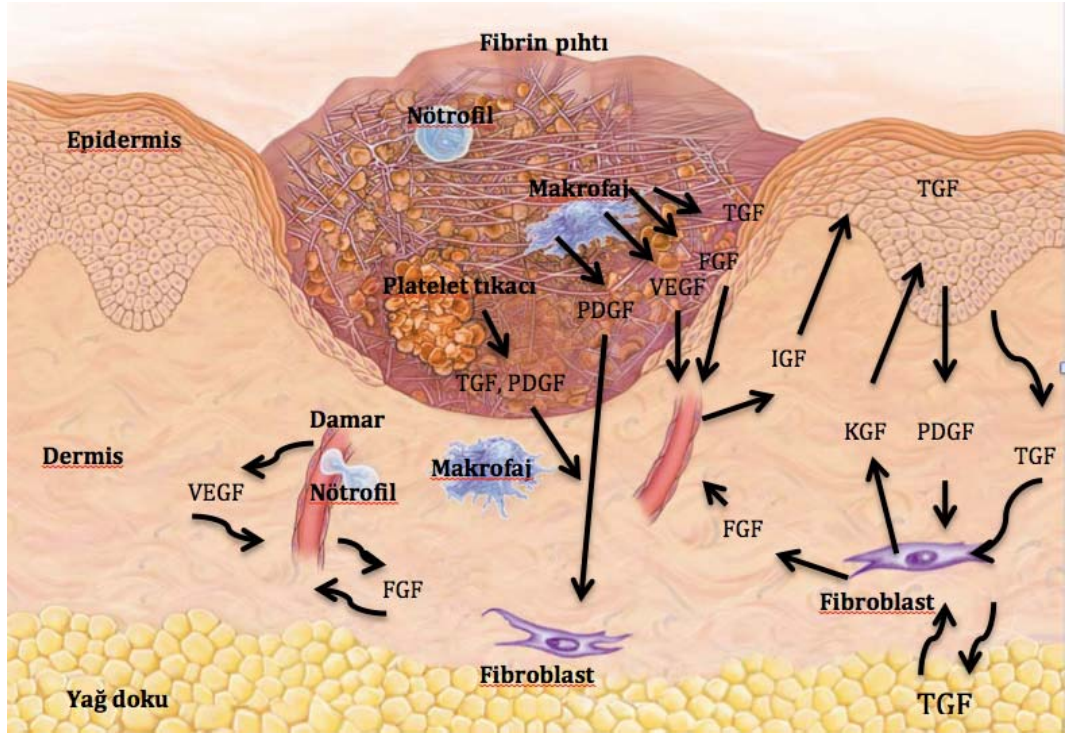
Tablo 1. Yara İyileşmesindeki Büyüme Faktörleri, Sitokinler ve Diğer Moleküller

Ad	Kısaltma	Kaynak	Tanım
Vasküler endotelial büyüme faktörü	VEGF	Endotelial Hücreler	Anjiyogenezi artırır
Fibroblast büyüme faktörü 2	FGF-2	Makrofajlar, mast hücreleri, endotelial hücreler, T lenfositler	Anjiyogenezi artırır. Endotelial hücre göç ve büyümesini uyarır
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü	PDGF	Trombositler, makrofajlar, endotelial hücreler	Proteoglikan ve kollajen sentezini artırır. Makrofaj ve fibroblastları toplar
Keratinosit büyüme faktörü	KGF	Fibroblastlar	Keratinosit büyüme ve matürasyonunu kontrol eder. Diğer büyüme faktörlerinin salgılanmasını artırır.
Epidermal büyüme faktörü	EGF	Trombositler, makrofajlar	Fibroblastların kollajenaz salgılamasını uyarır
Transforme edici büyüme faktörü- β	TGF- β	Trombositler, makrofajlar, T ve B lenfositler	Anjiyogenezi artırır. Adhezyon molekülü ekspresyonunu uyarır. Lökosit ve fibroblast göçünü uyaran proinflamatuvar molekülleri artırır. Proteaz aktivitesini inhibe ederek, kollajen ve proteoglikan sentezini artırarak ECM sentezini indükler.
Tümör nekrozis faktör- α	TNF- α	Makrofajlar, T ve B lenfositler, natural killer hücreler	Kollajen sentezini artırır. PMN lökosit marjinasyon ve sitotoksitesini düzenler
İnterferon- γ	IFN- γ	Makrofajlar, T ve B lenfositler, fibroblastlar, epitelyal hücreler	Makrofajları aktive eder. Fibroblast proliferasyonunu inhibe eder
İnterlökin-1	IL-1	Makrofajlar, keratinositler, endotelial hücreler, lenfositler	Proinflamatuvar peptiddir. PMN lökositlerin, fibroblastların, keratinositlerin kemotaksisini indükler. PMN lökositleri aktive eder

İnterlökin-4	IL-4	T lenfositler, bazofiller, mast hücreleri	Fibroblast proliferasyonunu aktive eder. Kollajen ve proteoglikan sentezini indükler
İnterlökin-8	IL-8	Monositler, nötrofiller, endotelyal hücreler, keratinositler, T lenfositler	PMN lökositleri ve makrofajları kemotaksise başlamak üzere aktive eder. Keratinositlerin marjinasyon ve matürasyonunu indükler

Lenfositler

T lenfositler yara ortamında 5. günde görünmeye başlar ve sayıları 7. günde tavan yapar. B lenfositlerin yara iyileşmesinde belirgin bir rolleri yoktur. Lenfositlerin esas etkileri fibroblast proliferasyonu üzerinedir. IL-2 ve fibroblast etkinleştirici faktör (FAF) gibi uyarıcı, TGF- β , TNF- α , IFN- γ gibi inhibe edici faktörleri salgırlar. Makrofajlar, bakterileri ve yabancı madde kalıntılarını işleyerek bunları antijen olarak lenfositlere sunarlar. Bu ilişki lenfosit çoğalmasını ve sitokin salınımını uyarır. T lenfositlerin ürettiği IFN- γ , makrofajları uyararak TNF- α ve IL-1'in de içinde bulunduğu birçok sitokin salgılanmasına neden olur. IFN- γ aynı zamanda prostoglandinlerin sentezini azaltarak inflamatuvar medyatörlerin etkisini arttırır. IFN- γ ayrıca kollajen sentezini baskılar ve makrofajların yara alanından ayrılmasını engeller. Bu nedenle, IFN- γ kronik iyileşmeyen yaralarda önemli bir sitokindir ve varlığı T lenfositlerin esas olarak kronik yara iyileşmesinde rol oynadığını düşündürmektedir. Steroid ve immunsupresan gibi T lenfositlerin fonksiyon ve proliferasyonunu bozan ilaçların yara iyileşmesini bozduğu tespit edildikten sonra T lenfositlerin akut yara iyileşmesi için esansiyel olmadığı görüşü azaldı [23].



Şekil 2. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazı (Singer, A.J. and R.A.F. Clark, *Mechanisms of disease - Cutaneous wound healing*. New England Journal of Medicine, 1999. 341(10): p. 738-746.)

2.1.2. Proliferatif evre

Akut inflamasyon döneminden sonra anjiyogenez, fibroplazi ve epitelizeasyonu içeren proliferatif evre başlar. Bu evre; granülasyon dokusu ve kapiller damar ağının oluşumu, fibroblastlar, makrofajlar, gevşek düzenlenmiş kollajen, fibronektin ve hyaluronik asit ile karakterizedir.

Anjiyogenezis

Anjiyogenez, yeni damar oluşumu anlamına gelir ve yara iyileşmesi için gereklidir. Yaralanmayı takiben, etkinleşmiş endotelial hücreler, postkapiller venüllerin bazal membranını aşındırarak hücrelerin bu boşluktan göç etmesine

imkan sağlarlar. Hücre göçü FGF, PDGF ve TGF- β tarafından yönetilir. Göç eden bu endotelial hücrelerin bölünmesi tübül ve lümen oluşumuyla sonuçlanır. Sonuçta, bazal membran birikimi meydana gelir ve kapiller olgunlaşma sağlanır.

Yaralanmadan sonra açıkta kalan endotele kan hücreleri yapışır. Bu etkileşim hücrelerin yüzeyinde, vasküler hücre yüzey adhezyon molekülü (VCAM)-1 gibi adhezyon moleküllerinin sentezlenmesine neden olur. Matriksin parçalanmasını sağlayan plazmin ve metalloproteinazlar, endotel bazal membranı tarafından salınıp etkinleştirilirler. Zedelenen endotelial hücreler, fibrin, fibronektin ve fibrinojene bağlanmayı sağlayan $\alpha_v\beta_3$ gibi yüzey adhezyon molekülleri sentezler. Böylece endotelial hücreler geçici matriks iskelesine tutunarak ilerlerler. Trombosit endotelial hücre adhezyon molekülü (PECAM)-1, endotelial hücrelerde bulunan ve göç sırasında hücrelerin birbiriyle iletişim kurmasını sağlayan bir diğer adhezyon molekülüdür [24].

Kapiller tüp oluşumu, karmaşık hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimi gerektiren, endotelial hücrelerin yüzeyinde bulunan adhezyon moleküllerince düzenlenen karmaşık bir süreçtir. PECAM-1 hücre-hücre temasına aracılık ederken, β_1 integrin reseptörleri bu bağlanmayı sağlamlaştırır. Oluşan yeni kapillerlerden bazıları arteriyol ve venüllere farklılaşırken bazıları apoptozise uğrar veya makrofajlar tarafından ortamdan temizlenir.

Anjiyogenez, ağırlıklı olarak makrofaj ve plateletlerden salınan çeşitli sitokinlerle uyarılır ve idare edilir. Makrofajlardan salınan TNF- α , inflamatuvar evrede anjiyogeneze hazırlık yapar. Heparin, bir grup anjiyogenik faktöre yüksek affinite ile bağlanarak kapiller endotelial hücre göçünü uyarır. Keratinosit, makrofaj ve fibroblastlar tarafından salınan VEGF güçlü bir anjiyogenik etkiye

sahiptir. Hücre bozunması ve hipoksi anjiogenik sitokinlerin salınmasını sağlayan en önemli lokal faktörlerdendir.

FGF-1 ve FGF-2 hasarlanmış parenkimal hücrelerden salınırlar ve anjiyogenezin erken uyarılarından. FGF-2 yara iyileşmesinin ilk üç gününde anjiyogenezi uyarırken sonrasındaki uzun süreli uyarı 4. ve 7. günler arasında VEGF tarafından sağlanır [25]. VEGF ve FGF-2'nin anjiyogenez üzerindeki etkileri doz bağımlıdır [25, 26]. TGF- α ve epidermal büyüme faktörü (EGF) endotelial hücre proliferasyonunu uyarırlar. TNF- α endotelial hücreler için kemotaktiktir ve kapiller tüp oluşumunu sağlar.

TGF- β fibroblastlar için kemoatraktandır ve fibroblastlardan daha fazla FGF salınmasını sağlar. Anjiyogenezde rolü olan diğer sitokinler; anjiyogenin, IL-8 ve laktik asittir [27, 28]. Fibronektin, kollajen ve hyaluronik asit gibi bazı matriks maddeleri de anjiyogenik etki gösterir. Fibronektin ve fibrin makrofajlar ve hasarlı endotelial hücreler tarafından üretilir. Sonuç olarak ECM ile sitokinler arasındaki karmaşık etkileşim ile anjiyogenez gerçekleşir.

Fibroplazi

Fibroblastlar, bağ dokudaki mezenşimal hücrelerden farklılaşmış özel hücrelerdir. Yara ortamına dolaşımdaki hücreler gibi ulaşmazlar. Yaralanmadan sonra pasif durumdaki fibroblastlar yara alanına çekilerek çoğalmaya ve ECM bileşenlerini üretmeye başlar. Normalde hücre siklusunun G₀ fazında bekleyen fibroblastlar, makrofajlar, trombositlerden salınan sitokinler ve büyüme faktörleri ile uyarıldıktan sonra replikasyon ve proliferasyon safhalarına geçer.

Fibroblastlar çoğalmaya devam etmek için EGF ve IGF-1 uyarımına gereksinim duyarlar [29].

Fibroblastların birincil görevi kollajen sentezlemektir. Mezenşimal hücrelerin fibroblastlara farklılaşması yaralanan dokunun tipine göre 3 veya 5 gün sürer. Bu döneme gecikme evresi denir. Kollajen sentez hızı 4. haftadan sonra azalmaya başlar ve kollajenaz (MMP-1)'in yaptığı yıkımla denge sağlanmış olur. Bu noktada yara kollajen matürasyonu evresine girer. Olgunlaşma evresi aylar boyunca devam eder ve bu süreçte glikoprotein ve mukopolisakkarit düzeyleri azalır, yeni kapillerlerin bir kısmı regrese olur. Bu değişiklikler yaranın görünümünü değiştirirken doku sağlamlığını artırır.

Epitelizasyon

Epidermis, sıvı kaybını ve bakteri invazyonunu önleyen fiziksel bir bariyer görevi görür. Epitel hücreleri arasındaki bağlantılar epidermisin geçirgenliğine katkıda bulunurken, bazal membran yapısal destek sağlar ve epidermis ve dermis bağlantısını kurar.

Bazal membran üç tabakadan oluşur:

- 1) Lamina lucida: Laminin ve heparan sülfat içerir.
- 2) Lamina densa: Tip IV kollajen içerir.
- 3) Lamina retikülaris: Lamina densa ve dermis arasında uzanır, tip IV kollajen ve retiküler liflerden oluşur.

Re-epitelizasyon yaralanmadan sonra saatler içerisinde başlar. İlk olarak yaranın üzeri pıhtıyla kaplanır ve epitel hücreleri defekte doğru göç etmeye başlarlar. Yara kenarlarında kalan epidermisin bazal tabakasında bulunan

keratinositler yara yüzeyine doğru hareket ederler. Epitelizasyon sırasında, keratinositlerde sırasıyla ayrılma, göç etme, çoğalma, farklılaşma ve katmanlaşma gibi değişiklikler izlenir. Bazal membran bütünlüğü bozulmamışsa epitelizasyon daha hızlı gerçekleşir. Bazal membran bütünlüğü bozulmuşsa önce onun tamir edilmesi gerekir. Epidermal hücreler integrin reseptörleri eksprese ederek fibronektin gibi ECM proteinleriyle etkileşime geçerler [30]. ECM, MMP-1 ve plazminojen aktivatörü ile yıkılarak hücrelerin eskar ile dermis arasında kolay hareket etmesi sağlanır [31]. EGF, TGF- α ve keratinosit büyüme faktörü (KGF) düzeylerindeki artış hücrelerin migrasyonunu ve proliferasyonunu uyarır [29]. yapılan bir çalışmada topikal KGF kullanımının epitelizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir [32]. Epitelizasyon tamamlanana kadar yığın halinde biriken hücreler, epitelizasyon tamamlandıktan sonra kolumnar şekillerini alıp, çok katlı yassı epitel oluşturacak şekilde düzenlenirler.

Ekstrasellüler matriks

Ekstrasellüler matriks dokuların fiziksel bütünlüğünü sağlar ve kendisine temas eden hücrelerin davranışlarını düzenler. ECM; glikozaminoglikanlar, polisakkarid zincirler, proteoglikanlar ve kollajen, elastin, fibronektin, laminin gibi fibröz proteinlerin bileşiminden oluşur [7].

Bağ dokuda, proteoglikan molekülleri jel benzeri yapıda “temel madde”yi oluştururlar. Bu yüksek oranda su içeren jel yapı, bir yandan besin, metabolit ve hormonların kan ve hücreler arasında diffüzyonuna izin verirken diğer yandan basınç oluşturan kuvvetlere karşı koyar. Kollajen lifleri matriksin sağlamlığını, elastin lifleri ise esnekliğini sağlar [7].

Yara matriksinin yapısı biriken ve yıkılan maddeler nedeniyle iyileşme süresince değişime uğrar. Yara iyileşmesinin başlarında, matriks yapısı, hücrelerin göçünü yönlendirecek şekilde düzenlenen fibrin, fibrinojen, fibronektin ve vibronektinden oluşur. İlerleyen dönemlerde glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar sentezlenir. Kollajen sentezi ise en son aşamadır ve skar dokusunu oluşturur [33].

Fibroblastlar ve ECM arasında karşılıklı dinamik bir etkileşim söz konusudur. Fibroblastların sitokinlerle uyarılması ECM kompozisyonunun değişmesine neden olur. Fibroblastlar sitokinlerle uyarıldıktan sonra matriksi parçalayan MMP'ların sentezi artar. Kollajenaz (MMP-1), IL-1 ile uyarılıp TGF- β tarafından inhibe edilir [24]. ECM enzimlerce bozulduğunda hücre göçü kolaylaşır.

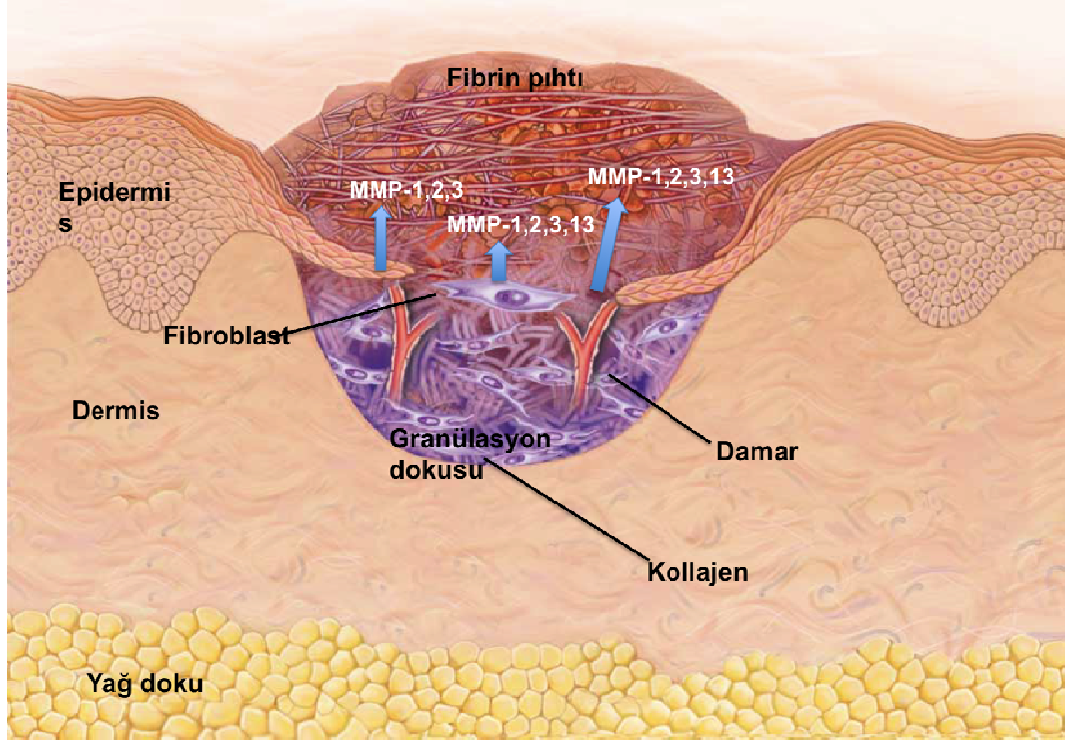
Kollajen yapı

Kollajen deri ve kemik gibi yapıların önemli bir bileşeni olup memelilerde toplam protein kütesinin %25'ini oluşturmaktadır. Yirmiden fazla kollajen tipi bulunmakla beraber, bağ dokuda en çok bulunanlar tip I, II, III, V ve XI'dir. Tip I deri ve kemikte en fazla bulunan kollajen tipidir. Yetişkinlerde ciltteki kollajenin %80'i tip I, %20'si tip III'tür. Yenidoğanlarda tip III kollajen oranı daha yüksektir. Erken yara iyileşme döneminde de tip III kollajen sentezi artar [34]. Tip I kollajen fibriller yapıdadır ve kümelenerek daha kalın demetler oluştururlar. Kablo benzeri bu yapılara kollajen lifleri denir.

Tip IV kollajenin fileye benzeyen bir yapısı vardı ve bazal laminanın önemli bir bileşenidir. Tip VII kollajen bazal laminanın bağ dokuya tutunmasında rol oynar ve özellikle deride oldukça fazla miktarlarda bulunur [7].

Kollajen polipeptid zincirleri ribozomlarda sentezlenir ve endoplazmik retikuluma proalfa zincirleri şeklinde geçerler. Endoplazmik retikulum lümeninde prolin ve lizin aminoasitlerinin bir kısmı hidroksilasyona uğrayarak hidroksiprolin ve hidroksilizine dönüşür. Hidroksilasyon sonucunda üç bantlı heliks yapısı oluşur. Prokollajen adı verilen bu madde ECM'e salgılandıktan sonra spesifik proteazlar tarafından kollajen monomerlerine ayrıştırılır. Bu monomerler ECM içerisinde kollajen liflerini oluşturmak üzere birleşirler. Kovalent çapraz bağlarla kollajenin tensil kuvveti arttırılır. Bu çapraz bağlar dokudan dokuya değişiklik gösterir. Örneğin tendonlarda kollajen monomerleri arasında çok fazla sayıda çapraz bağ bulunur. Derideki kollajen lifleri örme sepet tarzında dizilmişken, tendonlarda birbirine paralel demetler halinde organize olmuşlardır [35].

Askorbik asit (C vitamini), TGF- β , IGF-1 ve IGF-2 kollajen sentezini arttırır. [29] IFN- γ tip I prokollajen sentezini azaltır. Glukokortikoidler prokollajen gen transkripsiyonunu inhibe ederek kollajen sentezini azaltır.



Şekil 3. Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı (Singer, A.J. and R.A.F. Clark, *Mechanisms of disease - Cutaneous wound healing*. New England Journal of Medicine, 1999. 341(10): p. 738-746.)

Elastik lifler

Deri, damarlar ve akciğer gibi dokular işlevleri gereği hem dayanıklı hem de elastik olmak durumundadır. ECM’te bulunan elastin fibrilleri sayesinde doku gerilmeye maruz kaldıktan sonra tekrar toparlanabilmektedir.

Elastik lifler yüksek oranda hidrofobik bir protein olan elastin içerir. Elastik liflerin merkezinde elastin bulunur. Elastinin çevresi fibrillin gibi glikoproteinlerle çevrilidir. Elastin ve fibrillin arası bağlar elastik liflerin sağlam olmasını sağlar [36].

Elastin, yaşamın erken dönemlerinde üretilir, stabilize olur ve turnover hızları çok düşüktür. Bu nedenle yaşlanmaya beraber elastik lifler yıpranarak

poröz ve tortiyöz hale gelir. IGF-1 ve TGF- β elastin yapımını uyarırken glukokortikoidler elastin sentezini inhibe eder.

Glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar

Glikozaminoglikanlar (GAG) tekrarlayan disakkarid ünitelerinden oluşan dallanmamış polisakkarid zincirleridir. İçerdikleri sülfat ve karboksil grupları nedeniyle negatif yüklüdürler. Hyaluronik asit (HA), kondroitin sülfat ve dermatan sülfat, heparan sülfat ve keratan sülfat olmak üzere beş çeşit GAG mevcuttur [37]. Negatif yüklü olduklarından sodyum (Na^+) gibi katyonlarla birleşerek bulundukları ortama su çeker ve böylece ECM turgoru artarak basınç uygulayan faktörlere dayanıklı hale gelir [35].

Hyaluronik asit en basit GAG'dır, tekrarlayan sülfatsız disakkarid birimlerinden meydana gelir fetal dokularda daha fazla miktarda olmakla birlikte yetişkin dokularında da bulunur. Fetal dokularda yüksek oranda HA bulunmasının skarsız yara iyileşmesinde rolü olduğu düşünülmektedir [38]. Hyaluronik asit yara iyileşmesi sırasında fazla miktarlarda üretilir, su tutucu özelliği ile ECM'i genişleterek hücre göçünü kolaylaştırır. Ekstarsellüler matriks genişleyip yoğunluğu azaldığında, adhezyon kuvveti azalan hücreler daha kolay ilerler. Hücre göçü tamamlandığında HA'nın fazlası hyaluronidaz tarafından ortadan kaldırılır.

Proteoglikanlar merkezlerindeki protein ve bu proteine bağlı GAG zincirlerinden oluşur. Proteoglikanlar; büyüme faktörleri, proteazlar ve proteaz inhibitörleri gibi çeşitli sitokinlere bağlanarak bunların işlevlerini çeşitli mekanizmalarla düzenlerler:

- 1) Proteini sabitleyerek hareket alanını kısıtlarlar.
- 2) Gecikmiş salınım için protein rezervuarı sağlarlar.
- 3) Proteinleri değiştirerek hücre yüzey reseptörlerine daha efektif şekilde sunulmalarını sağlarlar.
- 4) Proteinleri enzimatik yıkımdan koruyarak etki sürelerini uzatırlar.
- 5) Proteinlerin işlevini engellerler [37, 39].

Fibronektin, ECM’te bulunan, diğer makromoleküllere ve hücre reseptörlerine bağlanabilen ve hücrelerin birbirlerine bağlanmasını kolaylaştıran bir proteindir. Çözünabilen ve fibriller olmak üzere iki formu vardır. Çözünabilen formu vücut sıvılarında bulunur ve pıhtılaşmayı, yara iyileşmesini ve fagositozu artırır. Fibriller formu hücre yüzeylerinde ve ECM’te bulunur. Fibroblastların yüzeyinde bulunan fibronektin transmembranöz integrin reseptörleri aracılığıyla hücre içindeki aktin lifleriyle ilişki kurar. Aktin filamanlar fibronektin liflerinin birleşmesini ve düzenlenmesini sağlar [35].

Bazal lamina

Bazal lamina 40-120 nm kalınlığında, epitel tabakasını alttaki bağ dokudan ayıran özelleşmiş bir ECM tabakasıdır. Bazal lamina bağ dokuya kollajen fibrillerle sıkı sıkıya bağlıdır. Bazal lamina ve kollajenin beraber oluşturduğu yapıya bazal membran (basement membrane) denir.

Bazal laminanın görevleri;

- 1) Makromoleküllerin geçişini engellemek için filtre görevi görür.
- 2) Belirli hücreler için bariyer oluşturur. (Örn: fibroblastların epitel hücreleriyle temas etmesini engellerken, makrofaj ve lenfositlere izin verir.)

3) Rejenere olan hücrelerin göçü için iskele görevi görür.

4) Doku yenilenmesine yardımcı olur.

Bazal lamina bileşenleri bulunduğu dokuya göre değişiklik göstermekle beraber genellikle tip IV kollajen ve laminin ve nidojen gibi glikoproteinlerden oluşur. Tip IV kollajen, fibriller kollajene göre daha esnek yapıdadır.

ECM yıkımı

Yaralanma ve enfeksiyon durumlarında ECM'in bölgesel olarak MMP'lar ile yıkılması, hücrelerin bazal laminadan yara sahasına gelmelerine olanak sağlar. Matriks lizisi ile matriks içerisinde hücre göçüne izin verecek bir yol açılır. Hücrelerin bağlanacağı noktalar açığa çıkarılarak hücrelerin bağlanması kolaylaşır. Adheziv özellik azaldığı için hücrelerin ayrılması da kolaylaşır, böylece hücrelerin ilerlemesi kolaylaşmış olur. Yıkım sırasında ortaya çıkan sinyal proteinleri de hücrelerin hareketini yönlendirir.

Proteoliz çok kontrollü işleyen bir süreçtir. Normalde inaktif durumda bulunan birçok prekürsör, ihtiyaç duyulduğunda aktif hale geçer. Hücre yüzeyinde bulunan bazı özel reseptörler ile proteazların yalnızca istenen alanlarda işlev görmesi sağlanır. Ayrıca proteazları engelleyecek doku metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) gibi maddelerle de proteaz aktivitesi sınırlanır.

2.1.3. Matürasyon evresi

Yara kontraksiyonu, yara çevresindeki derinin skar dokusunu azaltmak amacıyla merkeze doğru hareket etmesidir. Yara kontraksiyonu sırasında

fibroblastlar myofibroblastlara dönüşürler. Bu hücreler hem fibroblast hem düz kas hücresi işlevi görür ve düz kas aktini sentezlerler. Aktin 6. günde yarada görülmeye başlar ve iki hafta boyunca yüksek seviyelerde seyrederek, 4. haftada azalarak kaybolur [33]. Uyarılmış fibroblastlar, sitoplazmik aktin-myozin yapıları oluşturarak kontraksiyon yeteneği kazanırlar. Bu uyarılmış hücreler fibroblast dolu kollajen örgü içerisinde yerleştiğinde kontraksiyon daha hızlı gerçekleşir. Aşırı fibrozisle seyreden karaciğer sirozu, renal ve pulmoner fibrozis, Dupuytren kontraktürü gibi hastalıklarda dokuda bol miktarda myofibroblast bulunur. Aktin mikrofilamanları fibroblastın uzun eksenini boyunca doğrusal olarak dizilmişlerdir. Fibronexus adı verilen hücre zarını kateden protein ile hücre iskeletini oluşturan filamanlar ve ECM arasında bağlantı kurulur.

Matriks metalloproteinazları da başta MMP-3 olmak üzere yara kontraksiyonunda önemli rol oynarlar [40]. MMP'ları fibroblast ve kollajen arası bağlantıları ortadan kaldırarak kollajen örgünün kontraksiyonunu kolaylaştırır.

Yeniden yapılanma (Remodeling)

Bu dönemde fibroblast sayısı azalır ve yoğun kapiller damarlar regrese olur. Yara kuvveti 1. ve 6. haftalar arasında hızla artar, sonrasında 1. yıla kadar bir plato çizer. Skar dokusunun kuvveti sağlam deri kuvvetinin %70'i kadardır. Yirmi birinci günde yaranın kırılma gücünde çapraz bağlanmaların sonucu olarak bir artış meydana gelir. Kollajenin çapraz bağlanması yara

kontraksiyonunu ve kuvvetini arttırmakla beraber, normal cilde göre daha kırılğan ve daha az esnek skar dokusu oluşumuyla sonuçlanır [7].

2.2. İyileşmesi Geciken Yaralar

Diğer anormal yaralarda olduğu gibi, kronik yaralarda da yara iyileşmesinin çeşitli evrelerinde bozukluklar, yüksek ya da alçak sitokin, büyüme faktörü ve proteaz düzeyleri mevcuttur. Kronik yara sıvısında, akut yara sıvısından farklı olarak daha yüksek IL-1, IL-6 ve TNF- α düzeyleri olduğu gösterilmiştir. Ek olarak TNF- α ile EGF ve PDGF gibi gerekli büyüme faktörleri düzeyleri arasında ters orantı olduğu gösterilmiştir.

Yaradaki normal ECM miktarı, matriks sentezi, birikimi ve yıkımı arasındaki dinamik denge tarafından belirlenir. Hücre dışı matriksin proteolitik yıkımı derinin tamirinde ve yeniden yapılanmasında önemlidir. En son kanıtlar yara bölgesindeki proteolitik yıkımın iyileşme bozukluğunun ana nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir. Matriks metalloproteinazlar, ECM bileşenlerini yıkmaya yetisine sahip bir grup enzim olup substratlara olan özgünlükleri ile ayrılırlar ve TIMP'leri ile inhibe olurlar. TNF- α 'nın MMP'lerinin üretimini arttırırken TIMP'lerinin üretimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Tersine MMP'lerinin inhibisyonu, yara sıvısındaki TNF- α düzeylerinde azalmaya ve inflamatuvar hücrelerin sayısında düşüşe neden olurken, yaranın gerilim gücünde ve TGF- β düzeylerinde artışa sebep olur.

Hem insan hem hayvan modellerindeki çalışmalar, bası ülserleri gibi kronik yaralarda MMP düzeylerinde, özellikle de MMP-1, MMP-2, MMP-8 ve MMP-9'da artış ve TIMP düzeylerinde azalma olduğunu sergilemiştir. Bu

bulgular pek çok araştırmacının kronik yaraların MMP düzeylerindeki inatçı yüksekliği ve TIMP düzeylerindeki azalmanın sonucu olduğu neticesine varmasına neden olmuştur. Bu MMP'lerinin hücre göçünün adheziv substratlarını ve büyüme faktörleri ve sitokinler gibi sinyal moleküllerini yıktığı gösterilmiştir. Ek olarak aşırı proteoliz, inflamatuvar hücre süreçlerini uygunsuz biçimde etkileyen bağ doku yıkım ürünlerinin yüksek düzeylerde salınmasına neden olabilir. Yaradaki inflamasyonun artışı ile yaranın iyileşme sürecine girme olasılığı azalmaktadır. Denge, kollajen sentezinden kollajen yıkımına doğru kaymaktadır [7].

Kronik inflame ve kapanma sürecine girmeyen yaralar yassı epitel hücreli karsinom geliştirmeye meyillidir. İlk olarak kronik yanık skarlarında Marjolin ülseri olarak tanımlanan bu sorun, osteomyelit, bası yaraları, venöz staz ülserleri ve hidradenit gibi diğer durumlarla da birliktelik gösterebilir. Yara düzensiz, yüzeyden kabarıktır ve beyaz bir renk değişikliği vardır. Premalign hali psödoepitelomatöz hiperplazidir. Bir biyopsi sonucu bu şekilde raporlandığında biyopsi tekrarlanır; çünkü yaranın başka bölgelerinde skuamöz hücreli karsinom olabilir.

2.2.1. Bası yarası

Bası yarası cilt ve cilt altı dokuların nekrozu ile karakterizedir. Bası yarası sıklıkla yaşlı ve immobil hastalarda oluşmakta ve ciddi problemler yaratmaktadır. Bası yarası oluşumunun en önemli nedeni kemik çıkıntılar üzerinde bulunan devamlı yüksek basınçtır. Bunun yanında, sürtünme ve nem bası yarası oluşumuna zemin hazırlayan faktörlerdendir. Dışarıdan gelen basınç

kuvveti, kapiller basıncın üzerine çıktığında kan akımı durmaktadır. Deride ortalama kapiller basınç 20 mmHg'dır. Sırtüstü yatan hastada basınç en fazla topuk, sakrum ve kalçadayken (40-60 mmHg), oturan hastada iskiyal bölgededir (80-100 mmHg). Yüksek basınç nedeniyle, o noktada venöz ve lenfatik obstrüksiyon meydana gelir. Oluşan iskemi sonucunda biriken toksik metabolitler, normal insanlarda ağrıya neden olur. Herhangi bir nedenden ötürü bu ağrıyı algılayamayan ve/veya pozisyonunu değiştiremeyen hastalarda bası yarası oluşumu kaçınılmazdır [41].

2.2.2. Venöz ülser

Venöz ülserler çoğunlukla alt ekstremitelerde venöz yetmezlik sonucu oluşur. Venlerin kapaklarında yetmezlik, derin ven yetmezliği, trombozlar ya da bacak kaslarında fonksiyon bozukluğu nedeniyle oluşan venöz hipertansiyonun sonucu olarak dermisteki mikro dolaşım etkilenir. Eritrositler ve makromoleküller intersitisyuma ekstravaze olurlar ve endotelial hücreleri aktive ederler. Endotelial hücrelerce üretilen adhezyon molekülleri sayesinde lökositler uyarılır ve inflamatuvar süreç başlar. Venöz yetmezliğin de etkisiyle çevre dokuların savunması zayıflar. Sonuç olarak, sürekli inflamasyon ve artmış proteinaz aktivitesi venöz yetmezliğin daha da artmasına ve ülser oluşumuna sebep olur. Venöz ülser tedavisinin temelinde, venöz hipertansiyonun kompresyon veya cerrahi yöntemle düzeltilmesi yer alır. Venöz ülser oluşumunun patofizyolojisi anlaşıldıkça, moleküler düzeyde etki edecek yardımcı tedavi arayışları da artmıştır [42].

2.2.3. *Diabetes Mellitus*

Diyabet, en fazla amputasyon riski taşıyan kronik yara nedenidir. Kronik alt ekstremitte ülserleri diyabetik hastada sıklıkla amputasyonla sonuçlanmaktadır. Patogenezinde nöropati, ayak deformitesi, ateroskleroz ve periferik ödemin önemli yeri vardır. Diyabetik hastalarda, ateroskleroz nedeniyle büyük damarlarda tıkanıklık, bu damarlardan perifere atan emboliler sonucu ekstremitelerde yetersiz oksijenizasyon söz konusudur. Ayrıca bu hastalarda mikro dolaşım da bozulmuş ve bazal membran kalınlığında artış saptanmıştır. Kalınlaşan bazal membrandan lökosit geçişinin zor olması nedeniyle bozulmuş kemotaksis ve bakterisidal fonksiyonlar sonucu enfeksiyona eğilim artmıştır. Diyabeti olan hastalar renal fonksiyon bozukluklarına yatkındır. İdrarda fazla protein atılması ödeme neden olur ve ödem de yara iyileşmesini zorlaştırır. Bütün bunların yanında en önemli problem alt ekstremitelerde gelişen nöropatidir. Nöropatinin en önemli sonucu ise koruyucu reflekslerin kaybıdır. Ayrıca hastalarda ağrı olmaması nedeniyle bu yaralar genellikle ihmal edilmektedir. Duyusal nöropatiye ek olarak motor ve sempatik sinirlerde meydana gelen işlev kaybı nedeniyle ayak arkını kontrol eden kaslar normal pozisyonlarını koruyamazlar. Bu nedenle metatars başlarına normalden fazla basınç uygulanır ve en çok ikinci metatars üzerinde olmak üzere diyabetik hastalarda metatars yaraları çok sık görülür. Sempatik fonksiyon kaybı sonucunda terleme olmadığından ayak cildi aşırı kurur ve yara oluşma riski daha da artar. Ayrıca cilt çatlaklarında kolonize olan bakteriler de enfeksiyon riskini artırır. Diyabetik hastalarda yara oluşmasını önlemek, oluşan yaraları tedavi etmekten daha kolay ve daha ucuzdur [43].

2.3. Yara iyileşmesini geciktiren intrinsik faktörler

2.3.1. İskemi ve Hipoksi

Yaralanmış dokunun oksijenizasyonu yara iyileşmesi için çok önemlidir. Dokuya oksijenin ulaşmasını etkileyen çeşitli vasküler veya sistemik problemler olabilir. Genellikle en yaygın nedenler tıkaçıcı arter hastalıkları ve venöz yetmezliktir. Kan akımının kesintiye uğraması, yaradaki oksijen perfüzyon basıncının düşmesine neden olur. Kronik hipoksi, yaranın iyileşmesini engeller ve yarayı enfeksiyona açık hale getirir. Hipoksi ve enfeksiyon kırılsı bir kısır döngü oluşturur. Ekstremitelerde, çevresindeki dokunun oksijen basıncı 35 mmHg altında olan yaralar iyileşmezler [44]. Yaradaki oksijen basıncının düşük olduğu tespit edildiğinde hiperbarik oksijen tedavisi, hem oksijenizasyonu artırır hem de fibroblast ve kollajen sentezini artırarak yara iyileşmesine katkıda bulunur [45]. Tıkanmış damarların cerrahi yöntemlerle bypass edilerek ekstremitelerin dolaşımının düzeltilmesi yara iyileşmesini hızlandırır [46].

2.3.2. Enfeksiyon

Açık yaralar, koruyucu cilt örtülerini kaybettiklerinden çeşitli mikroorganizmalarla kontamine olurlar. Kontaminasyon yarada çoğalmayan mikroorganizmaların bulunmasıyken, kolonizasyon çoğalan mikroorganizmalara rağmen doku hasarının oluşmadığı durumu tanımlar. Çoğalan mikroorganizmalar doku hasarına da neden oluyorsa, o zaman enfeksiyondan söz edilir. Biyofilm, nekrotik dokulara ve cerrahi implantlara yapışan, polisakkarid, protein ve bakteri içeren sümüksü bir tabakadır. Kronik yaralarda, bakterilere öldürülmeden çoğalabilecekleri bir ortam sağlar. Biyofilm tabaka

içerisinde antibiyotiklere direnç gösterebilen bakteriler enfeksiyonun da kronikleşmesine katkıda bulunur [46]. Enfeksiyon durumunda iyileşme sürecinin inflamatuvar evresi uzar. Bakterilerin salgıladıkları maddeler ve enzimler nedeniyle fibrin ve büyüme faktörü gibi yara iyileşmesi için gerekli bileşenler yıkılır. Yarada bir gram dokuda 10^5 'ten fazla bakteri bulunması durumunda yara yeri enfeksiyonundan söz edilir [7]. Bu sayıdan daha fazla bakteri barındıran yaraların deri grefti veya flep ile kapatılmasının uygun olmadığı bildirilmiştir [47, 48].

Yarada enfeksiyon olup olmadığı, inspeksiyon, fizik muayene ve sürüntü ve biyopsi kültürü gibi laboratuvar testleriyle değerlendirilmelidir. Daha derin enfeksiyonların tanısında manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (BT) ve sintigrafi gibi ileri tetkikler kullanılmalı ve iskelet sistemi tutulumu olup olmadığı dikkatlice değerlendirilmelidir [46].

2.3.3. Yabancı cisim

Avasküler yabancı bir cismin varlığı bakterilerin üreyebileceği bir ortam sağlar. Ortopedik cihazlar, damar greftleri veya devitalize kemik fragmanları enfeksiyona yatkınlık yaratır ve iyileşme sürecini uzatır. Genellikle açığa çıkmış yabancı cisimler çıkarılırlar. Ancak son dönemde vakum yardımcı kapama sayesinde bu materyallerin bir kısmının kurtarılabildiği görülmüştür [49]. Yaşamını yitirmiş kemik fragmanları ve nekrotik dokular debride edilerek yaranın iyileşmesi hızlandırılabilir. Tek bir ameliyatta bütün ölü dokunun debridmanının zor olduğu durumlarda, yara yatağı kapamaya hazır hale gelene kadar seri debridmanlar yapılabilir [46].

2.3.4. Radyasyon

Radyoterapinin yara iyileşmesi üzerine etkileri; radyasyonun dozuna, verildiği bölgeye ve eşlik eden cerrahi girişim ve kemoterapiyle yakından ilişkilidir. Radyasyonun normal dokudaki etkileri akut ve kronik olmak üzere iki kısımda incelenir. Akut etkiler hastanın hayatını ileri derecede zorlaştırırsa da, asıl sorun teşkil eden kronik etkileridir. Akut dönemde eritem, mukozit ve ülserasyon; kronik dönemde fibrozis, lenfödem, osteoradyonekroz ve vasküler değişiklikler gözlenebilir. Bu zararlı etkilerin en önemlisi ise radyasyona maruz kalan alandaki damarların ve hücrelerin hasarlanmasıdır. Mikrovasküler düzeyde endarteritis obliterans geliştiği histolojik olarak gösterilmiştir. Bu durum yaralanan bölgede normal anjiyogenezi engeller. Radyasyona maruz kalan deride hipoksik, hiposellüler ve avasküler bir ortam oluşması ülserasyona ve gecikmiş yara iyileşmesine neden olur. Radyoterapiye bağlı yaraların tedavisi güç olduğundan mümkün olan en az dozu uygulamayı sağlayan teknolojilerin kullanılması ve bu yaralardan tümör varlığını ekarte etmek için biyopsi alınması uygundur [46].

2.3.5. Malignite

Malignitesi olan hastada malnütrisyon ve artmış katabolik aktivite nedeniyle yara iyileşmesinde gecikme meydana gelir. Hastanın kemoterapi ve/veya radyoterapi almış olması da yara iyileşmesi sürecini etkiler. Kronik yaralarda -genellikle yassı hücreli karsinom olmak üzere- neoplazi gelişme riski mevcuttur. Lenfoma gibi sistemik maligniteler ilk olarak iyileşmeyen cilt

ülserleri ile başvurabilirler. Uzun süredir mevcut olan yaralardan mutlaka biyopsi alınmalı ve tümör varlığı dışlanmalıdır [46].

2.4. Yara iyileşmesini geciktiren ekstrinsik faktörler

2.4.1. Kardiyovasküler yetmezlik

Kardiyovasküler yetmezlik durumunda, hayati organların kanlanması önem arz ettiğinden, deri perfüzyonu azaltılır. Bu nedenle yara oksijenizasyonu da azalır ve yara iyileşmesi gecikir [46].

2.4.2. Steroidler

Glukokortikoidler; dermatolojik, romatolojik hastalıklar, transplant alıcıları ve otoimmün hastalıklarda uzun yıllardır kullanılan ilaçlardır. Steroidlerin etkisi doz ve süre bağımlıdır. Kısa süreli kullanımlar yara iyileşmesini etkilemez. Sistemik steroid kullanımının inflamatuvar cevabı azaltır ve yara iyileşmesinin tüm evrelerini etkiler. Uzun süreli ve düzenli kullanım sonrası yara iyileşmesi üzerine olan etkileri bir yıl kadar devam edebilir. Steroidler makrofaj aktivitesini, anjiyogenezi ve yara kontraksiyonunu inhibe ederler. Steroidlerin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin A vitamini ile tersine çevrilebildiği gösterilmiştir [50].

2.4.3. Kemoterapi

Antineoplastik ilaçlar hızla çoğalan hücreleri hedef aldıkları için kanser tedavisinde kullanılırlar. Bu ilaçların yan etkileri olan anemi, granülositopeni ve trombositopeni gibi durumlar yara iyileşmesi için gerekli olan dengeleri altüst

eder. Başışıklık sistemi zayıflayan hasta enfeksiyonlara açık hale geldiği için bir kısır döngü başlar. Yara kapama işlemi yapılan bir hastaya kemoterapi başlanacaksa araya iki hafta gibi bir süre koymakta fayda vardır [46].

2.4.4. Malnütrisyon

Yara iyileşmesinin sorunsuz gerçekleşebilmesi için gerekli şartlardan biri de hastanın yeterli düzeyde beslenmesidir. Yara tedavisi yapılırken hastanın ihtiyacı olan kaloriyi aldığından emin olunmalıdır. Protein malnütrisyonunda hücre proliferasyonu, yeniden yapılanma (remodeling), anjiyogenez ve fibroblast proliferasyonu azalır, dolayısıyla yara iyileşmesi yeterli olmaz. Protein ve vitamin eksiklikleri hastanın başışıklık sistemini etkileyerek enfeksiyonlara karşı direncini azaltır. Özellikle kalori kısıtlı diyet yapan diyabetik hastalarda iyileşme için gerekli enerji sağlanamaz. Kronik yarası olan hastanın besin alımı, kas kitlesi ve cilt altı yağ dokusu, serum protein ve albümin değerlerini içeren laboratuvar testleri dikkatle incelenmelidir [50]. C vitamini eksikliğinde kollajen üretimindeki prolinin hidrosilasyon aşaması gerçekleştirilemediğinden yara iyileşmesi bozulur. Çinko, demir, bakır ve magnezyum eksiklikleri de yara iyileşmesini engeller [46].

2.4.5. Tütün kullanımı

Nikotin, sempatik sinir sistemi üzerinden etki gösteren, güçlü vazokonstrüktif etkiye sahip bir ajandır. Vazokonstrüksiyon sonucu yaraya ulaşan oksijen miktarı azalır. Ayrıca, sigara dumanında bulunan karbon monoksit hemoglobine bağlanarak, hemoglobinlerin oksijen taşıma kapasitesini

azaltır. Nikotin mikrovasküler cerrahide de başarısızlık riskini arttıran bir faktördür [50].

2.5. Matriks proteinleri, Metalloproteinazlar ve İnhibitörleri

Metalloproteinazlar (MMP) tüm ECM bileşenlerini yıkabilen, çinkoya bağımlı endopeptidazlardır [51]. Ekstrasellüler matriksin MMP'lar ile kontrollü olarak yıkılması, hücrelerin ayrılması ve göç etmesi açısından son derece önemlidir [52]. Normal şartlarda, dokularda MMP seviyeleri düşüktür, ancak bir hastalık veya yara iyileşmesi durumunda sentezleri artar. Proteazlar, yara iyileşmesinde hemostazdan skar matürasyonuna kadar her safhada rol alırlar [53]. MMP'lar keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından sentezlenir [54].

Metalloproteinaz ailesi birbirleriyle ilişkili toplam 23 enzimden oluşur. Bunlar, kollajenaz, jelatinaz, stromelizin ve membrana bağlı MMP şeklinde özgül oldukları substratlara göre sınıflandırılırlar. MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 kollajen liflerine etkili enzimlerdir. MMP-13 tip II kollajenin yıkımında tip I ve tip III kollajene göre altı kat daha etkindir, MMP-1 ve MMP-8'e göre elli kat daha güçlü jelatinaz etkisine sahiptir. Yapılan bir çalışmada MMP-1 yaranın 6. gününde yükselmeye başlarken MMP-8'in seviyesi 2-3. günden itibaren yüksek olduğu ve MMP-8 düzeylerinin her zaman MMP-1'den yüksek seyrettiği saptanmıştır. Dolayısıyla MMP-8'in yara iyileşmesi boyunca debridmandan sorumlu olan birincil proteaz olduğu söylenebilir [55]. MMP-13 aynı zamanda tip IV, IX, X ve XIV kollajen ve fibronektin yıkımında da rol oynar [56-58]. MMP-7 proteoglikanların parçalanmasında MMP-3 ve MMP-9'dan daha

güçlüdür [59]. MMP-12, MMP ailesi içinde en güçlü elastaz etkisine sahip enzimdir [54].

Stromelizin grubundan olan MMP-3 ve MMP-10, fibronectin, tip IV, V, IX, X kollajen, elastin, laminin, jelatin ve proteoglikan gibi pek çok substratın yıkımında etkilidir. Jelatinaz grubundan MMP-2 ve MMP-9 bölünmüş kollajen üzerinde daha güçlü etkiye sahiptirler ve ECM'in yeniden şekillenmesinde önemli rol oynarlar [60].

MMP-7 (matrilizin) MMP ailesinin en küçük molekülüdür. Elastin, fibronectin, laminin tip IV kollajen ve proteoglikan yıkımında etkilidir [59]. MMP-12 (makrofaj metalloelastaz) elastin, tip IV kollajen, laminin, fibronectin, vitronectin ve heparan sülfatı parçalar [61].

Ekstrasellüler matriksin yıkımı yara iyileşmesinin son derece önemli bir bölümünü oluşturur. Bu süreç, yara debridmanını, kapiller tomurcukların gelişimini, matriksin yeniden oluşumunu ve uzun dönemde dokunun yeniden yapılanmasını içerir. Kronik yaraların oluşumunda ECM'in yıkımındaki dengenin bozulmasının önemi vardır. ECM elementlerinin sentezinde yetersizlik, aktif MMP seviyelerinin çok yüksek olması ve TIMP düzeylerinin görece düşük seyretmesi dengeleri bozar [58]. Kronik yara sıvısında ve dokularda yüksek düzeyde aktif proteaz bulunur. MMP-2 ve MMP-9 kronik yaralarda fazlaca bulunduğu saptanmış proteazlardır. Bası yaraları ve staz ülserleri akut yaralara göre daha yüksek MMP-1 ve MMP-8 seviyelerine sahiptir [58, 62, 63].

Kronik yaralarda yükselmiş proteinaz seviyelerine karşılık metalloproteinaz inhibitörlerinin düzeyi azalmıştır. Kronik yaralarda yara

sıvılarından alınan örneklerde TIMP düzeylerinin, normal cerrahi yaradaki TIMP seviyelerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır [64].

Yara iyileşmesinin moleküler biyolojisi ortaya konuldukça, iyileşmenin gidişatını öngörebilecek bir biyomarker arayışı başlamıştır. Yapılan çalışmalarda yara iyileşmesi ile en çok ilişkili olan proteazların MMP-1,2,3,7,8,9,10,12,13 ve bunları inhibe eden TIMP olduğu gösterilmiştir [65]. MMP-9 ve TIMP arasındaki oranın bası yarasının iyileşme ihtimali ile bağlantılı olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur [66]. Proteaz düzeyleri genellikle yara sıvısından alınan örneklerde çalışılmış ancak bu şekilde örnek toplanması zahmetli olduğundan MMP ve TIMP'lerin doku ve serum düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Savaş yaralanması ile başvuran askerler üzerinde yapılan bir çalışmada, serum ve yara sıvısı MMP-2 ve MMP-7 düzeylerinin yaraları geç iyileşen grupta anlamlı biçimde yüksek olduğu saptanmıştır [67]. Başka bir çalışmada ise yara sıvılarından alınan örneklerde ve serumda saptanan sitokin düzeyleri arasında korelasyon saptanmıştır [68].

2.6. Clinoptilolite Zeolit

Clinoptilolite zeolit, doğada volkanik tüften zengin bölgelerde var olan AlO_4 ve SiO_4 içeren, hidrate, mikroporöz kristallerdir. Zeolitlerin çoğu volkanik küllerin çözülmesi ve ardından mikron boyutunda kristaller şeklinde çökmesiyle oluşur. Zeolitik tüf tortuları yumuşak, hafif, kolay dağılan bir yapıya sahiptirler

ve genellikle %50-95 oranında tek tip zeolit içerirler.



Şekil 4. Clinoptilolite zeolitinin elektron mikroskop görüntüsü (Mumpton, F.A., *La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(7): p. 3463-70.)

Katalizör, iyon değiştirici ve adsorban olmaları nedeniyle birçok alanda kullanılmaktadırlar. Kimyasal etkilerinden asit gazları kurutmakta, havadan oksijeni ayırtmakta, içme suyu ve atık sulardan amonyanın uzaklaştırılmasında, hayvansal ürünlerin, ahırların, kül tablalarının, buzdolaplarının ve spor ayakkabıların kokusuzlaştırılmasında ve seralarda topraksız besin ögesi olarak faydalanılır [5].

Yeraltı sularında bulunan uranyumun arıtılmasında clinoptilolite zeolit kullanılımasının etkin ve ucuz bir yöntem olduğu gösterilmiştir [69]. İçme

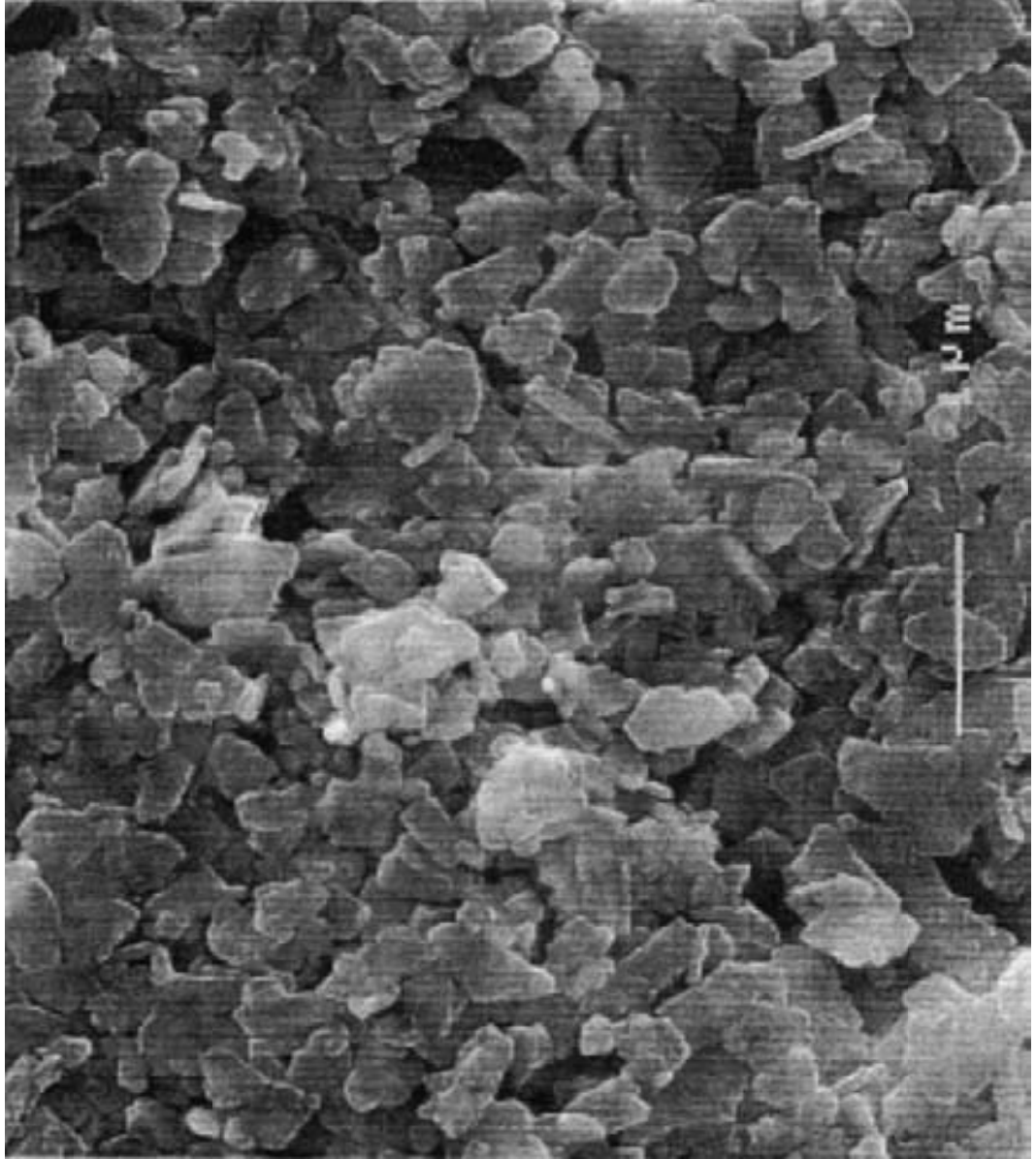
suyunun arıtılmasında az sayıda yöntem kullanarak çok sayıda maddenin temizlenmesi önem taşıdığından aynı anda bakır (Cu), manganez (Mn) ve çinkonun (Zn) arıtımını sağlayan demir (Fe) ile modifiye edilmiş clinoptilolite zeolit formu yakın zamanda önem kazanmıştır [70].

Nükleer atıklardan sezyum (Cz) ve stronsiyumun (Sr) ayrıştırılmasında da clinoptilolite zeolit kullanılmıştır. Nükleer saçılma bölgelerinde, clinoptilolite zeolit eklenmiş toprağa ekilen bitkilerde Sr ve Cz elementleri gözlenmemiştir[5]. Zeolitlerin kullanıldığı diğer bir alan, hayvan gübrelerinden amonyumun uzaklaştırılmasıdır [71]. Civa ile kirlenmiş toprağa eklenen zeolit sayesinde bitkilere civa geçişinin azaltıldığı gösterilmiştir [72]. Clinoptilolite zeolit toprakta ve suda canlı *Salmonella typhimurium* sayısını azaltır [71].

Zeolitler gıda endüstrisinde biranın stabilizasyonunda ve alkolsüzleştirilmesinde, mutfak yağlarındaki yağ asitlerinin azaltılmasında kullanılır. Birçok diğ macununun formülünde zeolit bulunur [71].

Clinoptilolite zeolit içeren diyet verilen domuzların, diğerlerine göre daha iştahlı oldukları, daha çok kilo aldıkları ve daha az hastalandıkları bu sayede et veriminin arttığı gösterilmiştir [71]. Küçükbaş hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada yemlerine clinoptilolite zeolit katılan hayvanların doğurdıkları yavruların, standart yemle beslenen hayvanların yavrularından daha fazla doğum ağırlığına sahip oldukları ve deney grubundaki hayvanların sütlerindeki yağ oranının kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı gösterilmiştir [73]. Kümes hayvanlarında yapılan bir çalışmada yemlerine clinoptilolite zeolit katılan grupta, tavukların yumurtlama sıklığının arttığı ve yumurta kabuğunun kalınlaştığı saptanmıştır [74]. Clinoptilolite zeolit ile beslenen kümes

hayvanlarında aflotoksin etkileri gözlenmemiş, aflotoksikozise bağlı kan değerlerinde değişiklik oluşmamıştır [75].



Şekil 5. Tribomekanik yöntemle mikronize edilmiş clinoptilolite zeolitin elektron mikroskop görüntüsü (Pavelic K, H.M., *Medical applications of zeolites*, in *Handbook of Zeolite Science and Technology*, C.K. Auerbach SM, Dutta PK, Editor 2003, Dekker: New York. p. 1143-1174.)

Zeolitlerin antimikrobiyal etkileri üzerinde sık çalışılan bir konudur. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* üzerine in vitro bakterisidal etkileri gösterilmiştir. Bakır iyonları içeren zeolitler hem gram pozitif hem gram negatif bakterilere etki eder. Gümüş iyonu içere zeolitlerin *Candida albicans*'a karşı etkili olduğu, ayrıca gümüş-zeolit içeren garagara kullanımında dental plak oluşumunun belirgin olarak azaldığı saptanmıştır [76, 77].

Zeolitler hemodiyaliz makinelerinde diyalizat sıvısından amonyumun uzaklaştırılmasında kullanılırlar. Bu işlevleri sırasında diyalizat sıvısına Al veya Si geçişi olmaz. Anestezi makinelerinin temizlik sistemlerinin çıkışına yerleştirilen filtrelelere eklenen yüksek Si içerikli zeolitler, desfluran ve diğer gaz anestezikleri adsorbe eder [71].

Zeolitlerin tavuk yumurtalarının kabuk kalınlığını arttırması kemik iyileşmesinde etkisi olup olmadığı sorusunu akla getirdi. İnsan osteoblast benzeri hücre kültürlerinde yapılan bir in vitro çalışmada Zeolit-A isimli sentetik zeolitin, proliferasyonu, farklılaşmayı ve TGF- β üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Zeolit-A ayrıca alkalen fosfataz ve aktivitesini ve osteokalsin salınımını arttırmıştır [78].

Gastrointestinal sistemden emilme oranı çok düşük olan zeolitler organofosfat zehirlenmeleri gibi çeşitli madde intoksikasyonlarında bağlayıcı ajan olarak kullanılırlar [71]. Adsorbe edici özelliği olduğu için, yapılan çalışmalar sonucunda Enterex® ismiyle diyare tedavisinde kullanılmak üzere piyasaya sürülmüştür [79]. Zeolitler kolera ve *E.coli* toksinlerini adsorbe edebildikleri için diyarede enterotoksin etkilerini azaltarak fayda sağlarlar [71].

Doğal clinoptilolite, sentetik zeolitler gibi gastrointestinal sistemden yapısı bozulmadan geçişini tamamlar. Saflaştırılmış doğal clinoptilolite mide içeriğinin asiditesini azaltır. Sodyum karbonat ile birleştirilmiş clinoptilolite zeolitin antiasit etkinliğinin sodyum karbonat içeren diğer preperatlardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca zeolit kullanımının pepsin enziminin konsantrasyonunu ve stabilitesini etkilemediği saptanmıştır [80].

Aspirin molekülü zeolit porlarından daha büyük olmasına rağmen, zeolitin dış yüzeyinin adsorbe edici özelliğinden etkilenir. Mide içeriğinde, asit zeolit sodyum zeolite göre, aspirini daha iyi adsorbe eder [81].

Silikat partiküllerine uzun süre maruz kalındığında otoimmün hastalıklar ortaya çıkabilir [82]. Asbest ve fibröz zeolitlerin, mezotelyoma, akciğer fibrozisi ve bazı otoimmün bozuklukların patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir [71].

Silikat materyalleri süperantijen gibi davranırlar [83]. Süperantijenler, T lenfositlerde hücre ölümünü uyarabilen, bir grup bakteriyel veya viral toksinden oluşur. Süperantijenler, makrofaj gibi antijen sunucu hücrelerle T lenfositlerin etkileşime girmesini uyarır. Bunun sonucunda abartılı bir aktivasyon ve ardından T lenfosit ölümü meydana gelebilir. Bu antijenler immün yanıtı arttırabilir veya azaltabilir [84].

Süperantijenler bir çok otoimmün ve diğer bağlantılı hastalıkların patogeneğinde suçlanırlar. Diğer yandan kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde immünmodülatör olarak kullanılabilirliği son zamanlarda oldukça sık araştırılan konulardan biridir. Asbest ve periferel kandaki mononükleer hücrelerle yapılan in vitro çalışmalar, aktivasyona bağlı T lenfosit ölümünü

göstermiştir. Antijen sunucu hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması asbestin T lenfositler üzerindeki etkilerini engeller [85].

Silikat materyalleri biyoaktivitelerini alternatif yollarla gösterirler. Obez olmayan diyabetik (NOD mice) ve diğer tip I diyabet modeli oluşturulmuş farelere intraperitoneal silika uygulanmasının diyabet gelişimini engellediği gösterilmiştir[86]. Silika partikülleri ayrıca proinflamatuvar (CD4+ Th1) T lenfositlerin uyarılması için gerekli olan makrofajların ölümüne sebep olurlar. Sonuç olarak antiinflamatuvar (CD4+ Th2) T lenfositler aktive olurlar. Makrofajların ölmesi sonucunda serbest radikal ürünleri düzeyi artar [87].

Farelerde yapılan bir çalışmada clinoptilolite zeolitinin peritonda makrofajların kümeleşmesini sağladığı gösterilmiştir. Clinoptilolite uygulanan grupta peritondaki makrofaj sayısı kontrol grubuna göre 7 kat, makrofajlardaki oksijen konsantrasyonu kontrol grubuna göre 10 kat yüksek bulunmuştur [88].

Alveoler makrofajların silikat partiküllerine maruz kalması, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), protein kinaz C ve stresle aktive olan protein kinaz (SAPK)'ların aktive olmasına neden olur [89]. Kısaca silika, silikat ve aluminosilikat partikülleri süperantijenler gibi nonspesifik immün stimülasyon yaparlar [90].

Glukoz adsorbanı olduğu bilinen zeolitlerin (özellikle FeSO₄ bağlanmış formu) diyabetes mellitus tedavisine ek olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [91, 92]. Diyabet modeli oluşturulan farelerde yapılan çalışmalarda doğal clinoptilolite kullanımının, diyabete bağlı komplikasyonları önlediği veya ortaya çıkışını geciktirdiği saptanmıştır [71].

Gadolite gibi bazı zeolitlerin gastrointestinal sistemin MRI incelemelerinde uygun bir kontrast olabileceği bildirilmiştir. Faz II ve faz III çalışmalarla gadolite'in tanısal görüntüleme amacıyla, oral kullanımının etkin, güvenli ve tolere edilebilir olduğu kanıtlanmıştır [93].

Hücre kültürlerinin bulunduğu ortamlarda biriken amonyum hücre çoğalmasını ve büyümesini olumsuz etkiler. Bu ortamlar clinoptilolite ile işlem gördüğünde amonyum ortamdan uzaklaştırılır [71].

Zeolitlerin, polimerleri ultraviyole ışınların yıkıcı etkisinden koruduğunun ispatlanması ile kozmetik ve dermatoloji alanlarında haricen kullanımı gündeme gelmiştir [94]. Toz formda zeolit kullanımının atlet ayağı tedavisinde etkin olduğu, yaraların ve cerrahi kesilerin iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir. Küba'da atların ve ineklerin yaralarına iyileşmeyi hızlandırmak için clinoptilolite toz sürülmesi oldukça yaygındır [5].

İnce toz halindeki clinoptilolite zeolit kanser tedavisinde adjuvan görevi görebilir. Değişik kanser olan köpek ve farelerde, clinoptilolite zeolit kullanımı genel sağlık durumunda iyileşme, yaşam süresinde uzama ve tümör boyutlarında küçülme sağlamıştır. Deri kanseri olan köpeklerde clinoptilolite zeolit topikal olarak kullanılması tümör boyutlarında belirgin küçülme sağlamıştır. İn vitro doku çalışmalarında clinoptilolite zeolit protein kinaz B (c-Akt)'yi inhibe ettiği, tümör baskılayıcı proteinler olan p21^{WAF1/CIP1} ve p37^{KIP1} ekspresyonunu uyardığı ve bazı kanser hücre kültürlerinde hücre büyümesini engellediği gösterilmiştir. Melanoma hücreleri enjekte edilen farelerden oral yolla clinoptilolite verilen grupta metastaz sayısında azalma saptanmıştır [6]. Clinoptilolite zeolit tedavisi uygulanan köpeklerde, tedavi öncesinde yüksek olan

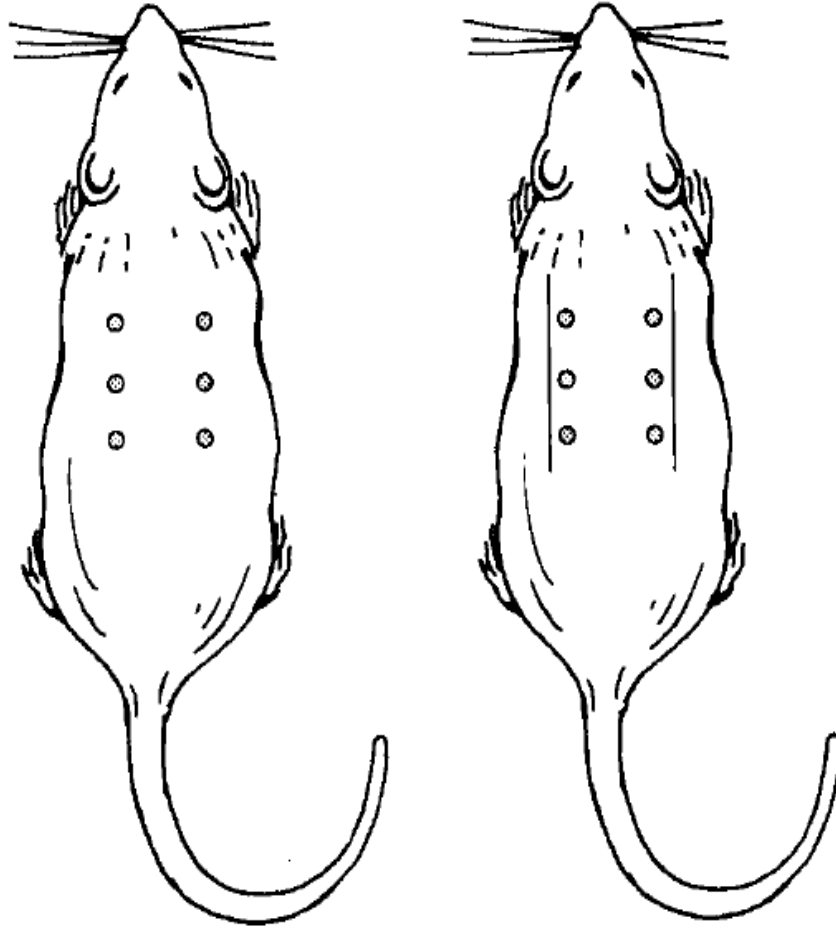
serum AST ve ALT değerleri bir aylık tedavi sonrasında normal düzeylere inmiştir [6].

Zeolitler insan sağlığını ilgilendiren alanlarda antidiyareik ilaç olarak [79], yaraların ve atlet ayağının tedavisinde haricen ve diyaliz sıvılarından amonyumu temizlemek amacıyla[5] kullanılmışlardır. Bu kullanımlar sırasında sistemik etkisi olduğu saptanmamıştır. Zeolitlerin hematopoez için ve tümörler dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda yararlı etkileri gösterilmiştir [6, 95]. Zeolitlerin hemostatik etkisi yapılan bir deneysel çalışmayla gösterilmiştir [96]. Uzun süreli ve yüksek dozla yapılan çalışmalar sonucunda maddenin karsinogenik ve toksik olmadığı ortaya konmuştur [6, 97, 98]. Cilt üzerinde de toksik veya alerjik etkisi görülmemiştir[6]. Akne tedavisinde topikal olarak kullanılan antibiyotik içeren preperatlarda taşıyıcı olarak kullanılmıştır [99]. Değişik zeolit türevleri ile yapılan çalışmalarda clinoptilolite zeolitin; erionite, mordenite gibi yapısal olarak asbeste benzeyen, iplik formunda zeolitlere göre çok daha az irritasyona ve doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir [100].

2.7. Rat İşkemik Yara Modeli

İşkeminin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini çalışabilmek için tavşan ve fare kulaklarında çeşitli modeller tanımlanmıştır. Sıçan sırtında 1965 yılında McFarlane'in tanımladığı flep [101] daha sonra Schwarz ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir. 1995 yılında yaptıkları çalışmada ratların sırtında 4x10 cm boyutlarında bipediküllü flep *panniculus carnosus* içerecek şekilde kaldırılmış ve yerine iade edilmiştir. Daha sonra bu flep üzerinde biyopsi punch aleti yardımıyla yaralar oluşturulmuş yapılan histolojik ve biyokimyasal

incelemelerin sonuçları iskemik yaralardakine benzer olarak bulunmuştur [102]. Bu çalışmada kontrol grubunda 7. günde gözlenen kollajen birikimi iskemi grubunda 9. günde saptanmıştır. Metalloproteinaz düzeylerinin iskemik grupta, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak başka çalışmalarda da bipediküllü flep modeli, inflamatuvar hücreler, oksidatif stres ve iskemi derecesi yönünden değerlendirildiğinde, iskemi çalışmaları açısından uygun bir flep olduğu gösterilmiştir[103-107].



Şekil 6. Sol tarafta normal yara modeli, sağ tarafta bipediküllü flep üzerinde oluşturulmuş iskemik yara modeli görülmektedir

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması için Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 30.06.2011 tarihinde G.Ü.ET-11.062 kod numarasıyla onayı alınmıştır. Çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirilmiş olup, kullanılan sıçanlar yine aynı merkezden temin edilmiştir. Çalışma dört ana grup ve her grupta üç alt grup olacak şekilde planlanmıştır. Her alt grupta 6 adet olmak üzere toplam 72 adet, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen Wistar soyu dişi sıçanlar kullanıldı. Çalışma boyunca sıçanlar uygun kafeslerde, $21\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat karanlık – 12 saat aydınlık döngüsünün sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuvar yemi ve su verilerek (ad libitum) düzenli olarak karşılandı. Tüm cerrahi işlemler intramusküler %10'luk ketamin HCl (50 mg/kg) ve ksilazin HCl (2.5 mg/kg) anestezisi altında, kornea refleksi ve ekstremitte çekme yanıtı kaybolduktan sonra başladı. Sırtlarındaki tüyler elektrikli tıraş makinesiyle temizlendi. Cerrahi işlem için sıçanlar yüzüstü olacak şekilde ön ve arka ayaklarından tespit edildi. Tüm deneklere steril koşullarda işlem uygulandıktan sonra yaralar bir gün süre ile pansumanla kapatıldı. İşlem bittikten sonra sıçanlar anesteziden uyanana kadar izlenip, ardından her bir kafeste 6 adet olmak üzere ayrı kafeslerde tutuldu.

3.1. Çalışma grupları

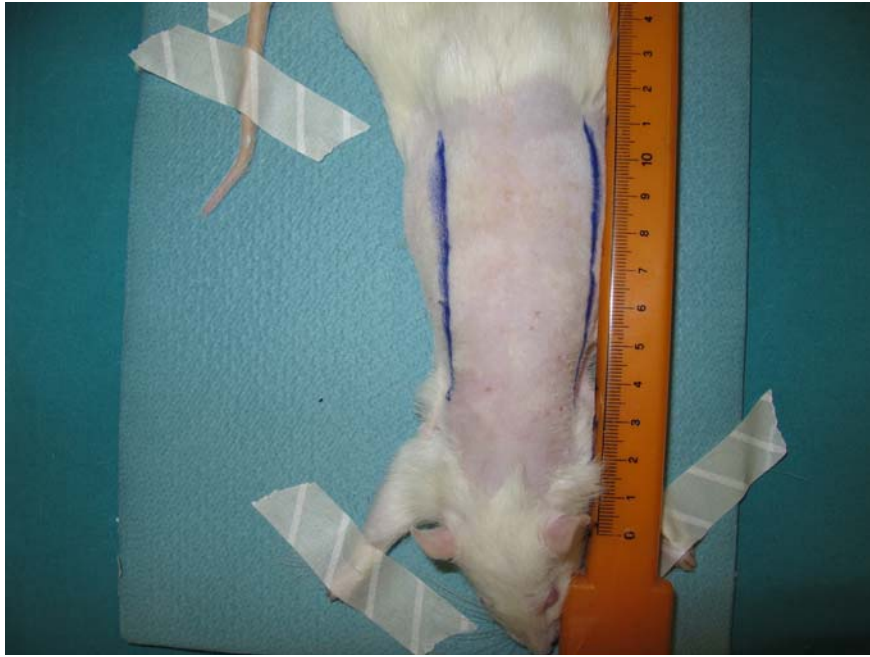
Denekler, iskemi durumu, ilaç kullanımına göre 4 ana gruba ayrıldı. Her ana grup da sıçanların sakrifiye edildikleri günlere göre 3 alt gruba ayrıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Denek grupları

Grup numarası	İskemi	Clinoptilolite	Sakrifiye edildiği gün
I Ia Ib Ic	Var	Kullanıldı	3. gün 7. gün 14. gün
II IIa IIb IIc	Var	Kullanılmadı	3. gün 7.gün 14. gün
III IIIa IIIb IIIc	Yok	Kullanıldı	3.gün 7. gün 14. gün
IV IVa IVb IVc	Yok	Kullanılmadı	3. gün 7. gün 14. gün

3.2. Cerrahi Yöntem

Uygun anestezi, tıraş, tespit ve cerrahi saha temizliğini takiben grup I ve II'deki ratların sırtında, 4x9 cm boyutlarında hazırlanmış karton kalıp kullanılarak yapılacak insizyonlar çizim kalemiyle işaretlendi.



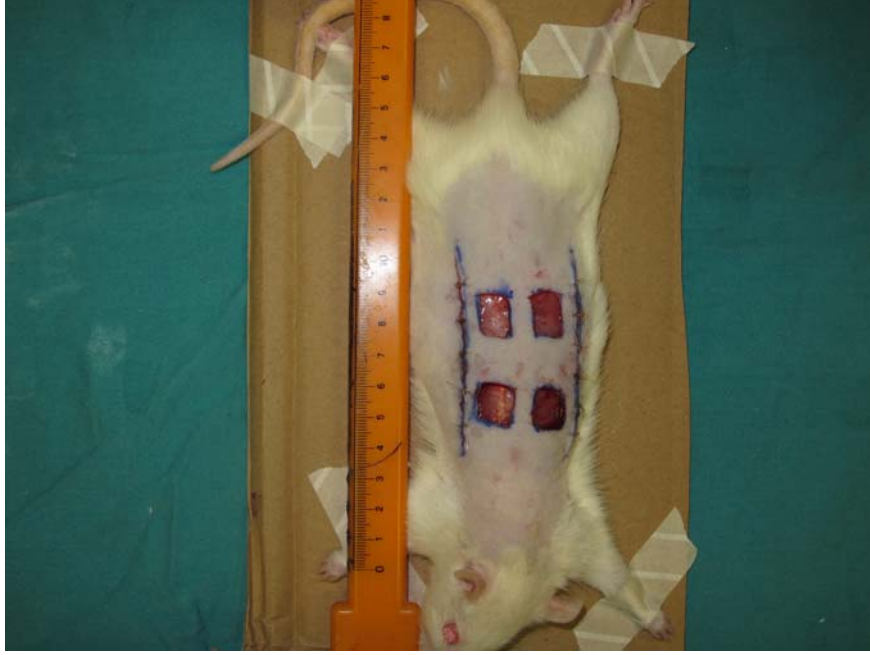
Şekil 7. Bipediküllü flep kaldırılmadan önce çizim kalemiyle işaretlenen kesi hatları

İşaretlenen yerlerden kesiler yapılarak *panniculus carnosus* dokusunun altına inilerek, bipediküllü deri flebi tam kat kaldırıldı. Ardından insizyonlar 2/0 Polyglytone 6211 (Caprosyn®; Syneture) ile basit tek dikişlerle kapatıldı.



Şekil 8. Flep kaldırılıp yerine iade edildikten sonraki görünüm

Ertesi gün, kaldırılıp yerine iade edilen fleplerin üzerinde, bistüri ve doku makası yardımıyla, ikisi sefalik ikisi kaudal olmak üzere 4 adet, 1x1 cm boyutlarında tam kat doku defekti oluşturuldu. Yaralar birbirlerinden ve flep kenarlarından transvers konumda 1 cm, vertikal konumda 2 cm uzaklıkta olacak şekilde planlandı.



Şekil 9. Bipediküllü flep üzerinde açılmış yaraların görünümü

Grup III ve IV'te aynı işlemler sıçanların sırtında flep kaldırılmadan gerçekleştirildi.

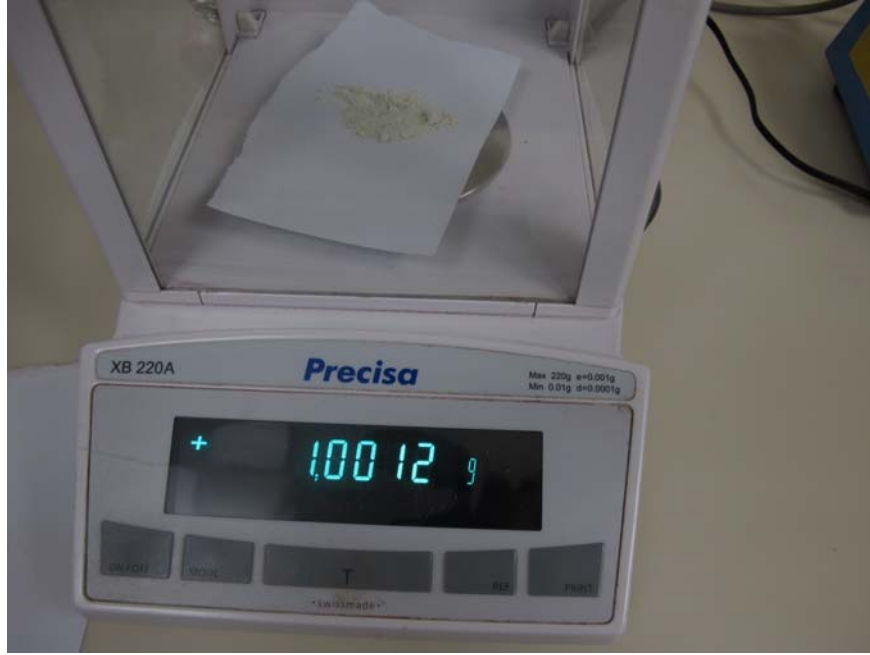


Şekil 10. Bipediküllü flep kaldırılmadan açılmış yaraların görünümü

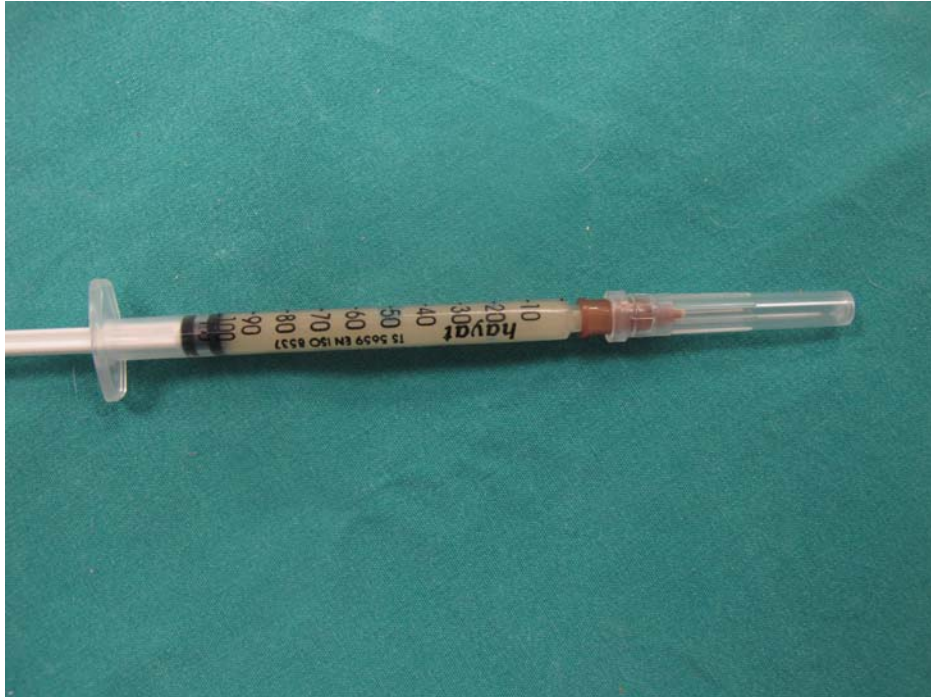
Doku defektleri oluşturulduktan sonra tüm deneklerin 0. gün fotoğrafları çekildi. Grup I ve III'teki deneklerin yaralarına 1 gr clinoptilolite zeolit hassas terazide tartıldıktan sonra 10 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak her yaraya 0,1 ml olacak şekilde insülin enjektörü ile uygulandı. Grup II ve IV'teki ratların yaralarına aynı miktarda serum fizyolojik uygulandı.



şekil 11. Çalışmada kullanılan clinoptilolite zeolit preparatı



Şekil 12. Clinoptilolite zeolitin hassas terazide tartılması



Şekil 13. 1 ml'lik insülin enjektöründe serum fizyolojik ile sulandırılmış clinoptilolite zeolit



Şekil 14. Yaralara sulandırılmış clinoptilolite zeolit uygulanması

Yaralar ilk 24 saat için pansumanla kapatıldı ve sıçanlar anesteziden uyanana kadar ayrı kafeslere konuldu.



Şekil 15. Pansumanın fileli sargı ile sabitlenmesi

Daha sonra her gün deneklerin yaralarına gruplarına uygun olarak clinoptilolite zeolit veya serum fizyolojik uygulandı ve yaralar açık olarak takip edildi. Grup Ia, IIa, IIIa ve IVa yaraların açılmasını takiben 3. günde fotoğrafları çekilip, doku örnekleri yara etrafında sağlam cilt olacak şekilde alındıktan sonra kalplerinden bir enjektör yardımıyla tüm kanı alınarak (kanatma yöntemi) sakrifiye edildi. Alınan kan örnekleri biyokimyasal değerlendirmeler için saklandı. Bu işlemler 7. günde Ib, IIb, IIIb, IVb ve 14. günde Ic, IIc, IIIc ve IVc grupları için tekrar edildi.

3.3. Yara alanlarının değerlendirilmesi

Yara alanlarını değerlendirilmesi için tüm gruptaki deneklerin fotoğrafları 0. Günden itibaren gūnaşırı çekildi. Fotoğraflar standart yu□kseklikten ve standart yöntem kullanılarak dijital fotoğraf makinesi (PowerShot G11, Canon Inc, Japonya) aracılığıyla, deneklerin yanlarına bir cetvel konularak çekildi ve bilgisayara aktarıldı. Fotoğraflar üzerinden yara alanları Image J 1.45 yazılım programı ile milimetrekare olarak ölçüldü.

3.4. Biyokimyasal değerlendirme

Deneklerin feda edilmesi sırasında alınan kanlar 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra toplanan serum örnekleri -80 °C’de muhafaza edildi. Serum örneklerinden MMP-1 tayini, Rat MMP-1 ELISA Kit (Cusabio Biotech

Co.,Ltd) kullanılarak yapıldı. TIMP-1 düzeylerini tayini ise Rat TIMP-1 ELISA Kit (Cusabio Biotech Co.,Ltd) ile usulüne uygun olarak yapıldı.

3.5. Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme

Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi

Beş mikron kalınlığında alınan kesitler önce 60 °C etüvde 2 saat ve iki kez 15'er dakika ksilolde deparafinize edildikten sonra azalan alkol gradiyentinden geçirilerek rehidrate edildiler. Havada kuruyan doku kesitleri Hematoksilen ile 10 dakika boyandıktan sonra musluk suyunda yıkanarak %1'lik amonyaklı suya daldırıldılar. Yeniden akarsuda yıkanan dokular eozinde 10 dakika boyandılar. 10 dakika boyunca musluk suyunda yıkanan dokular artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildiler. Ksilolde 45 dakika bekleyen dokular entellan ile kapatılarak değerlendirilmeye alındılar. Skorlamalar Tablo 3'te gösterildiği şekilde semikantitatif olarak yapıldı.

Tablo 3. Skarlama kriterleri

Skor	Reepitelizasyon	Granülasyon Dokusu	Kollajen Birikimi	İnflamatuvar hücre	Anjiyogenez	Ülser
0	Yok	Yok veya immatür	Yok	Yok	Yok	Geniş ve derin ülser, abse
1	Kısmi	Az	Az	Az	5 ten az damar sayısı	Geniş ülser
2	Tamamlanmış fakat immatüre ya da ince	Orta derecede matürasyon	Orta derece	Orta derece	6-10 damar	Yok veya çok küçük
3	Tamamlanmış ve matür	Matür	Bol mik-tarda	Bol miktarda	10 dan fazla damar sayısı	Yok

İmmünohistokimyasal Yöntem

Çalışmada indirekt immünohistokimya yöntemi kullanıldı. Doku örneklerinden hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler poli-lizinli lamlara alınarak önce 37°C etüvde bir gece, ardından 60°C’de 1 saat tutulduktan sonra ikişer kez 15 dakika ksilolde deparafinize edildiler. Azalan alkol gradiyentinde (Absolu etil alkol-%90-80-70) rehidrate edilerek distile suya kadar indirgendiler. Ardından fosfatlı tuz tamponunda (PBS= Phosphate Buffer Saline) üçer kez beş dakikalık süre boyunca yıkandılar. Bu aşamada dokuların çevresi hidrofobik kalemle (Super PAP Pen, PN IM3580, Immunotech, Beckman Coulter Company, Marseille Cedex 9, France) sınırlandırıldı ve ardından endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için dokular 15 dakika süreyle %3'lük hidrojen peroksitte inkübe edildiler. PBS ile yıkanan dokular Ultra V blokta 5 dakika tutulduktan sonra 1/100 oranında dilüe edilmiş (Large Volume UltraAb Diluent, TA-125-UD, LabVision, Fremont, CA, USA) PDGFR primer antikoru (Cat. No: Lot-1691P11A, LabVision, Fremont, CA, USA) ile 1 saat inkübe edildiler. Tekrar PBS ile yıkanan dokulara biotinile sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, TP-125-BN, LabVision, Fremont, CA, USA) 15 dakika süreyle uygulandı. Takiben PBS’de yıkanan dokulara 15 dakika “streptavidin peroksidaz” (Streptavidin Peroxidase, TS-125-HR, LabVision, Fremont, CA, USA) ve yeniden PBS uygulandı. Reaksiyonun görünür hale gelmesi için AEC kromojen (AEC Substrate System TA-125-HA, LabVision, Fremont, CA, USA) 10 dakika uygulandıktan sonra PBS’de yıkanan dokulara 10 dakika “Mayer's hematoksilan” ile zıt boyama uygulandı. Akan

musluk suyunda yıkanan dokular su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı. Leica DM 4000 B (Wetzlar, Germany) imaj analizerli fotoışık mikroskopta değerlendirildi.

Skorlamada HSCORE yöntemi uygulandı. $HSCORE = \sum P_i (i+1)$ formülü kullanıldı. P_i : her bir kesitteki toplam reaktivite yaygınlığının yüzde cinsinden değeri, i : yoğunluğu gösteren yarı nicel bir değerdir.

3.6. İstatistiksel yöntem

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımını normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile varyansların homojenliği Levene testiyle araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler yara alanı, yara alındaki iyileşme yüzdesi, MMP1, TIMP1 ve MMP1/TIMP1 için ortanca (25.-75. yüzdalik) olarak histoloji ve IHC skorları ise ortanca (en küçük – en büyük) şeklinde gösterildi.

Sakrifikasyon günleri içerisinde araştırma grupları arasında ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Bonferroni Düzeltmeli Kruskal Wallis testiyle araştırıldı. Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı bulunması halinde Conover'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durumlar belirlendi. Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Gruplar içerisinde sakrifikasyon günleri arasında ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Bonferroni Düzeltmeli Kruskal Wallis testiyle araştırıldı. Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı bulunması halinde

Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılarak farka neden olan durumlar belirlendi. Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0041$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bu çalışmada olası tüm çoklu karşılaştırmalarda Tip I hatayı kontrol edebilmek için Bonferroni Düzeltmesi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Yara alanları

Yara alanları ölçümleri 0. günden başlayarak gūnaşırı yapıldı. Tūm gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında 3. gūn sakrifiye edilen gruplar arasında Bonferroni dūzeltmesine gōre yara alanındaki dūzelme yūzdesi yōnünden istatistiksel olarak anlamlı fark gōrūlmedi ($p=0,037$). 3. gūnde sakrifiye edilen grupların yara alanları ölçūmleri Tablo 4'te gōsterilmektedir.

Tablo 4. Sakrifikasyon Zamanı 3.Gūn Olan Denekler İçerisinde Takip Zamanlarındaki Yara Alanları

Takip Zamanı	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
0.Gūn	123,8 (121,7-133,9)	128,3 (121,6-132,9)	131,4 (120,6-140,3)	119,0 (111,0-128,3)
2.Gūn	104,8 (100,6-112,2)	110,0 (106,7-115,2)	106,5 (97,1-111,5)	101,2 (92,9-120,6)
3.Gūn	95,2 (87,1-105,2)	95,8 (90,8-98,9)	88,4 (81,9-91,0)	93,3 (88,3-107,9)

7. gūn sakrifiye edilen gruplar arasında, grup Ib'nin yara alanındaki dūzelme miktarı, grup IIb, IIIb ve IVb'ye gōre anlamlı olarak daha dūşūk saptandı ($p<0,001$). Ayrıca, grup IVb'nin yara alanındaki dūzelme miktarı, grup IIb ve IIIb'ye gōre anlamlı olarak daha fazla bulundu ($p<0,001$). 7. gūnde sakrifiye edilen grupların yara alanları ölçūmleri Tablo 5'te gōsterilmektedir.

Tablo 5. Sakrifikasyon Zamanı 7.Gün Olan Denekler İçerisinde Takip Zamanlarındaki Yara Alanları

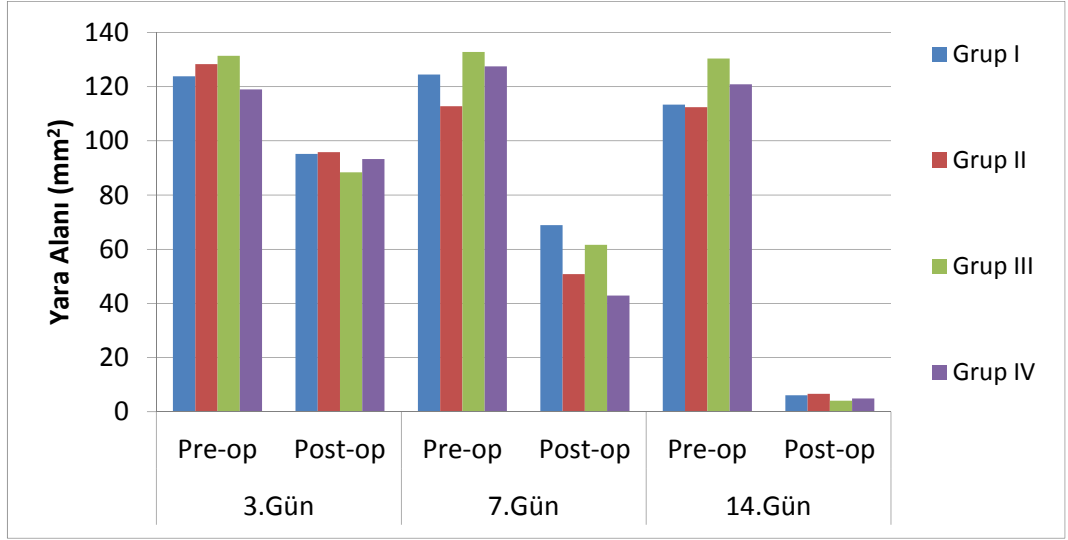
Takip Zamanı	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
0.Gün	124,5 (117,1-133,1)	112,8 (106,5-123,6)	132,8 (129,9-152,3)	127,5 (112,3-143,1)
2.Gün	110,6 (103,3-123,7)	87,7 (83,3-104,4)	115,6 (96,7-136,1)	103,8 (89,4-113,0)
4.Gün	99,9 (94,3-109,0)	79,0 (72,5-90,2)	80,9 (74,1-117,0)	72,9 (65,7-101,4)
6.Gün	90,6 (77,7-97,4)	62,9 (58,3-71,8)	73,7 (67,7-91,8)	62,4 (52,9-69,0)
7.Gün	68,9 (62,8-82,6)	50,8 (44,8-57,2)	61,6 (55,0-76,2)	42,9 (38,5-53,1)

14. gün sakrifiye edilen gruplar arasında, grup IIIc'nin yara alanındaki düzelme miktarı, grup Ic, IIc ve IVc'ye göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$). Ayrıca, grup IVc'nin yara alanındaki düzelme miktarı, grup Ic ve IIc'ye göre anlamlı olarak daha fazla bulundu ($p<0,001$). 14. günde sakrifiye edilen grupların yara alanları ölçümleri Tablo 6'da gösterilmektedir.

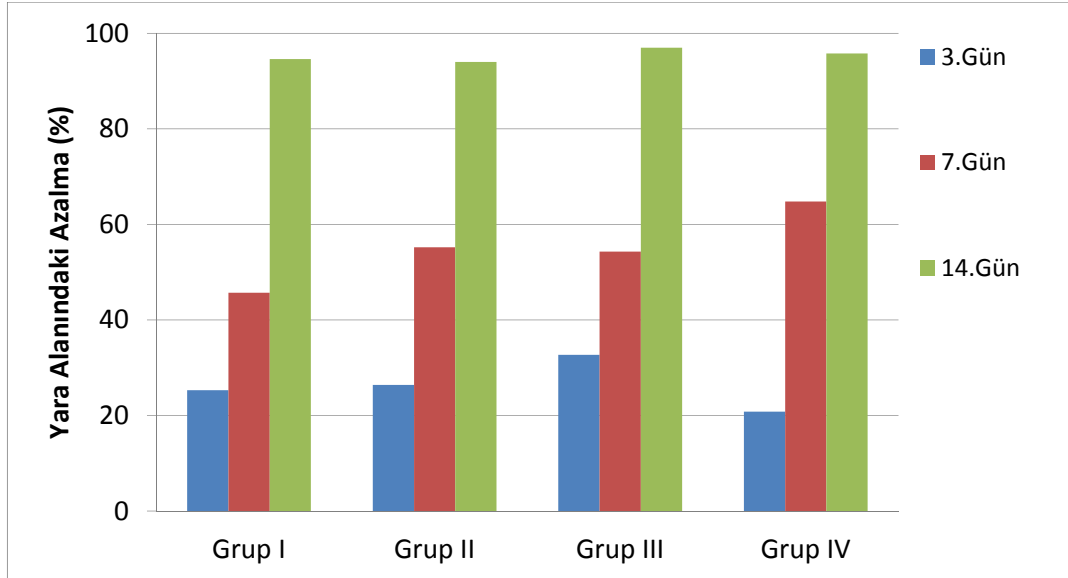
Tablo 6. Sakrifikasyon Zamanı 14.Gün Olan Denekler İçerisinde Takip Zamanlarındaki Yara Alanları

Takip Zamanı	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
0.Gün	113,4 (105,5-125,6)	112,4 (108,8-121,3)	130,4 (115,2-142,9)	120,9 (111,3-132,8)
2.Gün	87,5 (83,5-93,4)	95,3 (91,0-109,0)	96,5 (83,2-113,0)	95,5 (85,6-107,5)
4.Gün	75,8 (69,3-85,2)	84,1 (81,9-94,5)	72,2 (65,6-93,9)	73,0 (69,4-81,7)
6.Gün	66,2 (61,1-71,0)	69,5 (66,4-74,8)	59,0 (52,4-81,6)	63,1 (52,7-67,0)
8.Gün	43,6 (37,1-47,1)	38,0 (35,8-41,6)	38,8 (28,8-48,2)	34,9 (28,4-41,2)
10.Gün	27,1 (24,5-28,3)	22,2 (19,5-24,3)	18,9 (16,4-24,7)	17,8 (14,7-24,3)
12.Gün	19,1 (17,8-19,8)	12,8 (11,1-15,7)	12,5 (8,9-14,8)	10,2 (7,9-14,9)
14.Gün	6,1 (5,1-8,6)	6,6 (5,7-8,0)	4,1 (1,6-4,7)	4,9 (3,0-7,4)

Tüm grupların günlere göre yara alanları ölçümleri Şekil 16’da, yara alanlarındaki düzelme miktarları ise Şekil 17’de gösterilmektedir.



Şekil 16. Günlere göre grupların yara alanları ölçüm grafiği



Şekil 17. Günlere göre grupların yara alanlarındaki düzelme miktarları

Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiklerinde sakrifiye edilme zamanlarına göre yara alanındaki iyileşme düzeyleri de anlamlı farklılık göstermekteydi ($p<0,001$).

Grup Ic'de yara alanındaki düzelme miktarı, grup Ia ve Ib'ye göre daha fazlaydı ($p=0,002$).

Grup Iic'nin grup Iia ve Iib'ye göre yara alanları daha fazla iyileşmişti ($p=0,002$). Ayrıca, grup Iic'nin yara alanları grup Iib'ye göre daha fazla iyileşmişti ($p=0,002$).

Grup IIIa'ya göre grup IIIc'de yara alanlarındaki düzelme miktarı anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0,002$). Ayrıca, grup IIIb'ye göre grup IIIc'nin yara alanlarındaki iyileşme miktarı anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0,002$).

Grup IVa'ya göre grup IVb ve IVc'deki denekleri yara alanları daha fazla iyileşmişti ($p=0,002$). Ayrıca, grup IVc'deki deneklerin yara alanlarındaki düzelme miktarı grup IVb'ye göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0,002$).

Sakrifikasyon zamanı ve gruplara göre yara alanındaki yüzdesel azalma miktarları ve Bonferroni düzeltmesine yönelik açıklamalar Tablo 7'de gösterilmiştir.

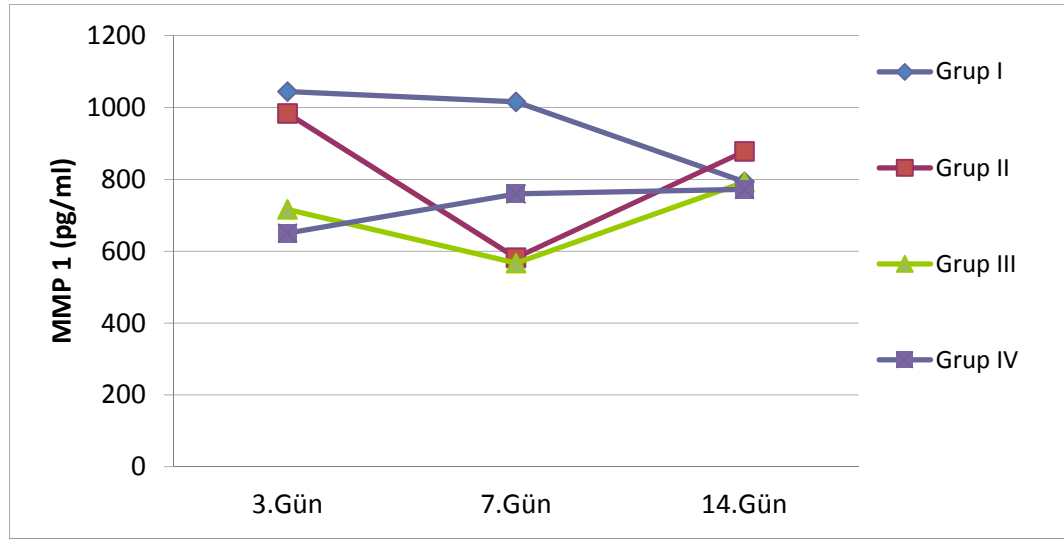
Tablo 7. Sakrifikasyon Zamanı ve Gruplara Göre Yara Alanındaki Yüzdesel Azalma Miktarları

Takip Zamanı	3.Gün	7.Gün	14.Gün	p-değeri ^a
Grup I	25,3 (17,6-29,8) ⁱ	45,7 (33,0-49,7) ^{c,d,e,j}	94,6 (92,4-95,6) ^{d,e,i,j}	<0,001
Grup II	26,4 (17,6-29,7) ^{i,k}	55,2 (51,5-59,0) ^{c,f,j,k}	94,0 (93,6-94,9) ^{f,h,i,j}	<0,001
Grup III	32,7 (25,5-40,6) ⁱ	54,3 (48,7-57,8) ^{d,g,j}	97,0 (96,2-98,6) ^{d,g,h,i,j}	<0,001
Grup IV	20,8 (15,0-23,4) ^{i,k}	64,8 (57,4-69,3) ^{e,f,g,j,k}	95,8 (94,4-97,5) ^{e,f,g,i,j}	<0,001
p-değeri ^b	0,037	0,002	0,013	

a=Gruplar içerisinde sakrifikasyon günleri arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b=Sakrifikasyon günleri içerisinde gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c= Grup I ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), d= Grup I ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), e= Grup I ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), f= Grup II ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), g= Grup III ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), h= Grup II ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), i=3.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$), j=7.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$), k=3.Gün ile 7.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$).

4.2. MMP-1 ve TIMP-1 düzeyleri ve MMP-1/TIMP-1 oranları

MMP-1 düzeyi açısından sadece 7. gün sakrifiye edilen gruplar arasındaki fark anlamlı olup, Grup Ib'deki deneklerin MMP-1 seviyeleri Grup IIb, IIIb ve IVb'dekilerden istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$). Grupların günlere göre değişen MMP-1 değerleri Şekil 18'de grafiksel olarak, Tablo 8'de sayısal olarak gösterilmiştir.



Şekil 18. Grupların günlere göre MMP-1 düzeyleri

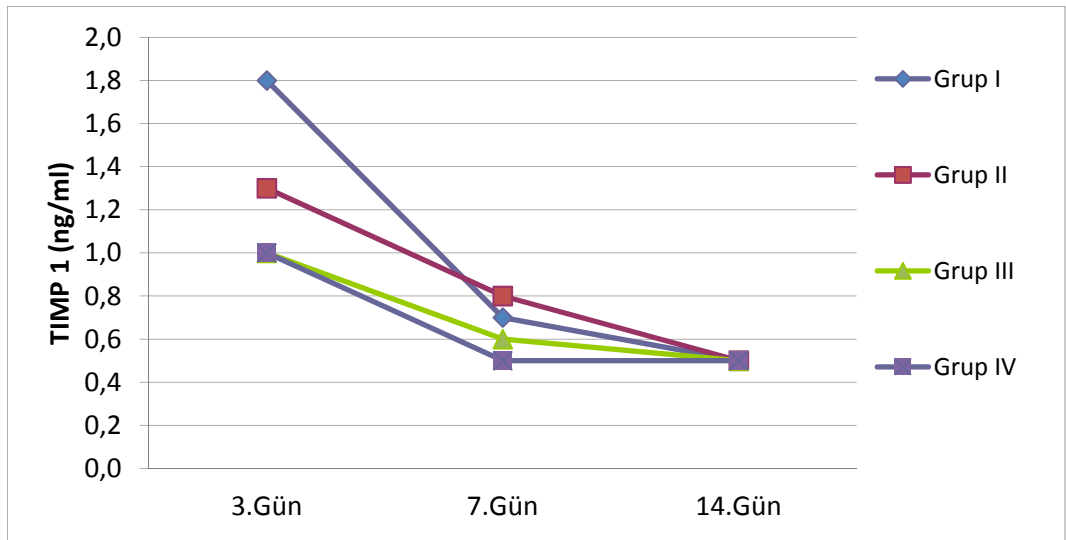
Tablo 8. Sakrifikasyon Zamanı ve Gruplara Göre MMP-1 Düzeyleri

Takip Zamanı	3.Gün	7.Gün	14.Gün	p-değeri ^a
Grup I	1044,3 (720,7-2248,4)	1015,7 (874,2-1236,0) ^{c,d,e}	793,1 (688,2-1093,7)	0,347
Grup II	983,6 (680,9-1768,6)	581,8 (540,9-649,5) ^{c,f}	878,0 (835,9-942,0)	0,030
Grup III	716,5 (596,0-870,5)	567,0 (480,9-872,0) ^{d,g}	729,2 (612,3-812,9)	0,532
Grup IV	650,3 (611,2-850,2)	759,7 (643,6-1237,6) ^{e,f,g}	772,3 (694,9-873,0)	0,476
p-değeri ^b	0,136	0,016	0,127	

a=Gruplar içerisinde sakrifikasyon günleri arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b=Sakrifikasyon günleri içerisinde gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c= Grup I ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), d= Grup I ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), e= Grup I ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), f= Grup II ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), g= Grup III ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), h= Grup II ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$).

TIMP-1 düzeyleri açısından 3. 7. ve 14. gün sakrifiye edilen denekler arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde sadece iki durumda anlamlı fark saptandı. Grup IIc'deki

deneklerin TIMP-1 düzeyleri, grup IIa'dakilere göre anlamlı olarak daha düşük saptandı ($p=0,002$). aynı şekilde grup IVc'deki deneklerin TIMP-1 düzeyleri, grup IVa'dakilere göre anlamlı olarak daha düşük tespit edildi ($p=0,002$). Grupların günlere göre değişen TIMP-1 değerleri Şekil 19'da grafiksel olarak, Tablo 9'da sayısal olarak gösterilmiştir.



Şekil 19. Grupların günlere göre TIMP-1 düzeyleri

Tablo 9. Sakrifikasyon Zamanı ve Gruplara Göre TIMP-1 Düzeyleri

Takip Zamanı	3.Gün	7.Gün	14.Gün	p-değeri ^a
Grup I	1,8 (1,0-3,9)	0,7 (0,6-1,0)	0,5 (0,3-1,1)	0,017
Grup II	1,3 (1,2-1,6) ^c	0,8 (0,8-1,1)	0,5 (0,4-0,9) ^c	0,003
Grup III	1,0 (0,9-1,7)	0,6 (0,5-1,1)	0,5 (0,5-0,9)	0,037
Grup IV	1,0 (0,9-1,2) ^c	0,5 (0,5-0,7)	0,5 (0,4-0,5) ^c	0,003
p-değeri ^b	0,155	0,113	0,442	

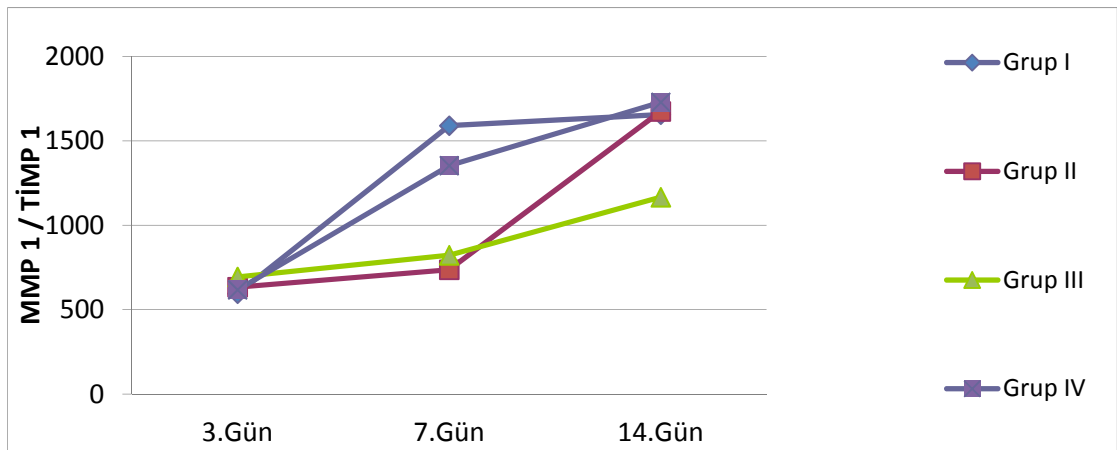
a=Gruplar içerisinde sakrifikasyon günleri arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b=Sakrifikasyon günleri içerisinde gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c=3.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$).

MMP-1/TIMP-1 oranları incelendiğinde 3. 7. ve 14. günlerde sakrifiye edilen gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,017$). Grup I, II ve III'teki deneklerden 3. 7. ve 14. gün sakrifiye edilenler arasında MMP-1/TIMP-1 oranı açısından anlamlı fark saptanmazken ($p>0,0125$), grup IVc'deki deneklerin MMP-1/TIMP-1 düzeyleri grup IVa'dakilere göre anlamlı olarak daha yüksek tespit edildi ($p=0,002$). Grupların günlere göre değişen MMP-1/TIMP-1 değerleri Tablo 10'da , grafiği Şekil 20'de gösterilmiştir.

Tablo 10. Sakrifikasyon Zamanı ve Gruplara Göre MMP1/TIMP1 Düzeyleri

Takip Zamanı	3.Gün	7.Gün	14.Gün	p-değeri ^a
Grup I	594,9 (85,3-2315,6)	1590,1 (940,0-1992,1)	1655,4 (1204,3-2355,8)	0,368
Grup II	633,4 (530,1-1371,9)	736,5 (511,2-817,3)	1674,4 (1044,7-2005,4)	0,024
Grup III	694,1 (471,3-808,8)	822,3 (634,8-1424,7)	1166,3 (788,5-1650,0)	0,095
Grup IV	617,4 (543,0-854,4) ^c	1353,1 (1129,4-1914,5)	1728,6 (1425,3-2116,1) ^c	0,004
p-değeri ^b	0,964	0,036	0,183	

a=Gruplar içerisinde sakrifikasyon günleri arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b=Sakrifikasyon günleri içerisinde gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c=3.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$).



Şekil 20. Grupların günler göre MMP-1/TIMP-1 oranları

4.3. Histolojik değerlendirme bulguları

3. gün sakrifiye edilen gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında, reepitelizasyon, granülasyon, kollajen birikimi, inflamatuvar hücre sayısı ve anjiyogenez açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark varken ($p<0,017$), ülser boyutu ve immünohistokimya (İHK) sonuçları arasında anlamlı fark saptanamadı ($p>0,017$).

Grup Ia'daki deneklerin reepitelizasyon skorları grup IIa, grup IIIa ve grup IVa'dan anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0,001$, $p<0,001$ ve $p=0,008$), grup IIa ve grup IVa'nın skorları grup IIIa'dan anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0,008$ ve $p<0,001$) ve grup IVa'nın skorları da grup IIa'dan ($p<0,001$) anlamlı olarak daha düşüktü.

Granülasyon skorları değerlendirildiğinde; grup IIa ve grup IIIa'nın skorları arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0,120$). Grup Ia ve grup IVa arasında da granülasyon sonuçları açısından önemli fark yoktu ($p=0,369$). Ancak grup IIa ve grup IIIa'nın skorları, grup Ia ve grup IVa'nın skorlarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,001$).

Kollajen birikimi ve anjiyogenez değerlendirildiğinde 3. günde en çok kollajen birikimi ve anjiyogenezin grup IIIa'daki deneklerde gözlendiği ve grup IIa'nın skorlarıyla arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p=0,003$). Grup IIa'deki kollajen birikimi ve anjiyogenez grup Ia'ya oranla daha yüksek olup ($p<0,001$), grup Ia ve grup IVa arasında kollajen birikimi ve anjiyogenez açısından anlamlı fark saptanamadı ($p=1,000$).

En yüksek inflamatuvar hücre sayısı grup IIIa'daki deneklerde saptanırken 3. günde en az inflamatuvar hücre barındıran grup IVa'ydı. Grup IIIa'nın

inflamasyon skoru grup IIa'dan anlamlı olarak yüksekti ($p<0,001$). Grup Ia'nın inflamasyon skoru da grup IVa'dan istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,008$). İnflamasyon soru bakımından grup Ia ve IIa arasında anlamlı fark yoktu ($p=0,154$).

7. gün sakrifiye edilen gruplar değerlendirildiğinde; reepitelizasyon, granülasyon, kollajen birikimi, inflamatuvar hücre sayısı, anjiyogenez ve ülser açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0,017$). Ancak İHK skoru açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,013$). Grup IIIb ve IVb'nin İHK skoru birbirlerine benzer olmakla beraber grup IIb'den anlamlı olarak yüksekti ($p=0,003$, $p=0,003$). Grup IIb'nin İHK skoru da grup Ib'den anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$).

14. gün sakrifiye edilen gruplar değerlendirildiğinde; reepitelizasyon, kollajen birikimi, anjiyogenez ve ülser boyutlarında anlamlı farklar saptanırken ($p<0,017$), granülasyon, inflamatuvar hücre sayısı ve İHK skoru açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0,017$).

Grup IVc'nin reepitelizasyon skoru grup Ic'den, grup Ic'nin skorları da grup IIc ve IIIc'den anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$). Grup IIc ve IIIc'nin reepitelizasyon skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=1,000$). Kollajen birikimi açısından değerlendirildiğinde de skorlarda benzer bir sıralanma mevcuttu. Anjiyogenez açısından ise grup Ic ile grup IVc arasında anlamlı fark olmayıp grup Ic ve grup IVc'nin skorları da grup IIc ve IIIc'den anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$).

Ülser boyutları incelendiğinde grup IVc'deki deneklerin ülser boyutları grup Ic'dekilerden anlamlı olarak daha küçüktü ($p<0,001$). Grup Ic'nin ülser boyutları grup IIc'dekilerden anlamlı olarak daha küçüktü ($p<0,001$). Grup IIc'nin ülser boyutları grup IIIc'dekilerden anlamlı olarak daha küçüktü ($p=0,005$).

Grupların günlere göre histoloji skorları Tablo 11 ve 12'de gösterilmektedir.

Tablo 11. Sakrifikasyon Zamanı ve Gruplara Göre Histoloji Skorları

Takip Zamanı	3.Gün	7.Gün	14.Gün	p-değeri ^a
REEPİTELİZASYON				
Grup I	0 (0-0) ^{c,d,e,i,j}	1 (1-1) ⁱ	2 (1-2) ^{c,d,e,j}	<0,001
Grup II	1 (1-1) ^{c,f,g}	1 (1-1)	1 (1-1) ^{c,g}	1,000
Grup III	1,5 (1-2) ^{d,f,h}	1 (0-1)	1 (1-1) ^{d,h}	0,036
Grup IV	0 (0-1) ^{e,g,h,j}	1 (0-2)	2,5 (2-3) ^{e,g,h,j}	0,002
p-değeri ^b	<0,001	0,590	<0,001	
GRANULASYON				
Grup I	0 (0-1) ^{c,d,j}	1 (0-2)	2 (1-3) ^j	0,004
Grup II	1 (1-1) ^{c,g}	1 (1-2)	1,5 (1-2)	0,119
Grup III	1 (1-2) ^{d,h}	1 (1-2)	2 (1-2)	0,119
Grup IV	0 (0-0) ^{g,h,i,j}	1 (1-2) ⁱ	3 (2-3) ^j	<0,001
p-değeri ^b	<0,001	0,925	0,019	
KOLLAGEN BİRİKİM				
Grup I	0 (0-0) ^{c,d,j}	1 (0-1) ^k	2 (2-3) ^{c,d,e,j,k}	<0,001
Grup II	1 (1-1) ^{c,f,g}	1 (1-1)	1 (1-1) ^{c,g}	1,000
Grup III	2 (1-2) ^{d,f,h}	1 (1-2)	1 (1-2) ^{d,h}	0,213
Grup IV	0 (0-0) ^{g,h,i,j}	1 (1-1) ^{i,k}	3 (2-3) ^{e,g,h,j,k}	<0,001
p-değeri ^b	<0,001	0,102	<0,001	
İNFLAMATUAR HÜCRE				
Grup I	1 (0-1) ^{d,e,j}	1,5 (1-2)	2 (2-3) ^j	0,003
Grup II	1 (1-1) ^{f,g}	1 (1-1)	2 (1-2)	0,008
Grup III	1,5 (1-2) ^{d,f,h}	1,5 (1-2)	2 (1-2)	0,413
Grup IV	0,5 (0-1) ^{e,g,h}	2 (1-2)	2 (1-2)	0,003
p-değeri ^b	0,017	0,042	0,127	

a=Gruplar içerisinde sakrifikasyon günleri arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b=Sakrifikasyon günleri içerisinde gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c= Grup I ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), d= Grup I ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), e= Grup I ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,017$), f= Grup II ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,008$), g= Grup II ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), h= Grup III ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$), i=3.Gün ile 7.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$), j=3.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$), k=7.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$).

Tablo 12. Sakrifikasyon Zamanı ve Gruplara Göre Histoloji Skorları – DEVAMI

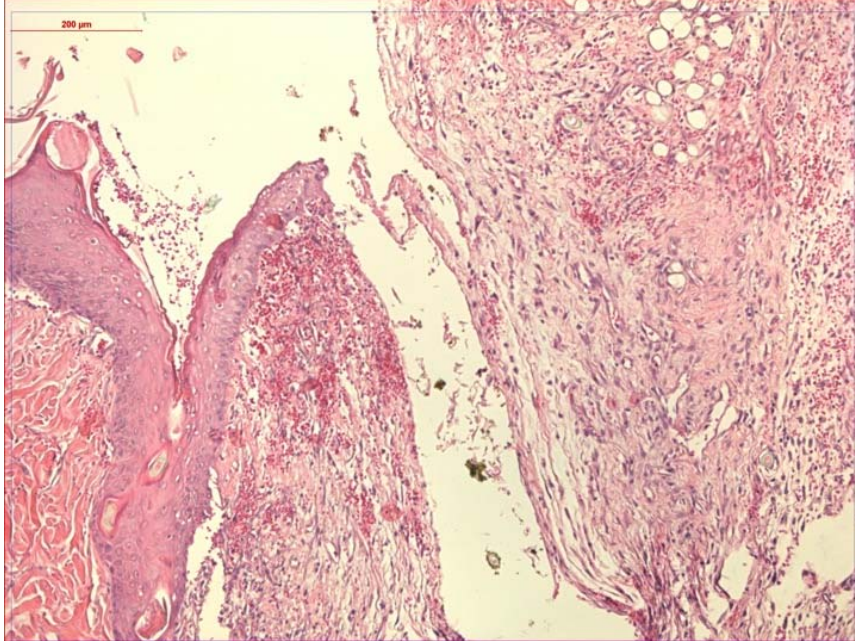
Takip Zamanı	3.Gün	7.Gün	14.Gün	p-değeri ^a
ANJİYOGENEZ				
Grup I	0 (0-1) ^{c,d}	1 (0-2)	2 (1-2) ^{c,d,h}	0,005
Grup II	1 (0-1) ^{c,e,f}	1 (0-1)	1 (1-1) ^{c,f}	0,297
Grup III	1 (1-2) ^{d,e,g}	1 (0-1)	1 (1-2) ^{d,g}	0,284
Grup IV	0 (0-0) ^{f,g,i,j}	1 (1-1) ^{i,k}	2 (2-2) ^{f,g,h,j,k}	<0,001
p-değeri ^b	0,002	0,520	0,002	
ÜLSER				
Grup I	1 (0-2)	2 (1-2)	2,5 (1-3) ^{c,d,h}	0,047
Grup II	2 (1-2)	1,5 (1-2)	2 (1-2) ^{c,e,f}	0,802
Grup III	2 (1-2)	1 (0-1)	1 (1-2) ^{d,e,g}	0,007
Grup IV	1 (1-2) ^j	1 (1-2) ^k	3 (3-3) ^{f,g,h,j,k}	<0,001
p-değeri ^b	0,200	0,025	<0,001	
IHC				
Grup I	1,4 (1,4-1,6) ⁱ	1,4 (1,4-1,4) ^{c,d,h,k}	2,1 (2,1-2,1) ^{i,k}	<0,001
Grup II	1,7 (1,4-2,1)	1,7 (1,4-2,1) ^{c,e,f}	2,4 (2,1-2,8)	0,022
Grup III	2,1 (1,4-2,1)	2,1 (1,4-2,1) ^{d,e}	2,8 (2,1-2,8)	0,013
Grup IV	1,4 (0,7-1,4) ^j	2,1 (1,4-2,1) ^{f,h}	2,8 (2,1-2,8) ^j	<0,001
p-değeri ^b	0,019	0,013	0,075	

a=Gruplar içerisinde sakrifikasyon günleri arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b=Sakrifikasyon günleri içerisinde gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c= Grup I ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), d= Grup I ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,008$), e= Grup II ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$), f= Grup II ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$), g= Grup III ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), h= Grup I ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,003$), i=3.Gün ile 7.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$), j=3.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$), k=7.Gün ile 14.Gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,002$).

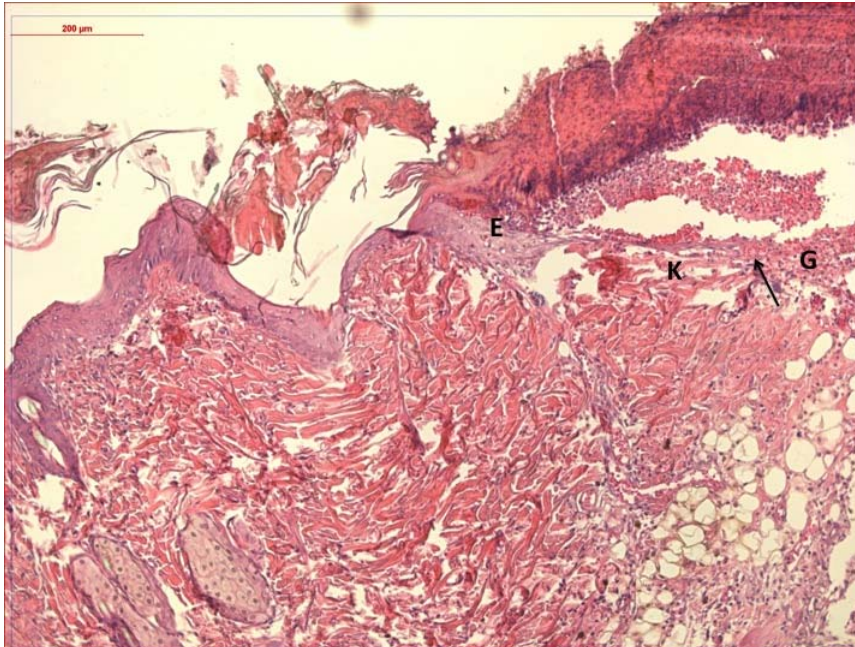
Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde; grup I'de 3. 7. ve 14. günlerde sakrifiye edilen deneklerin reepitelizasyon, granülasyon, kollajen birikimi, inflamatuvar hücre sayısı, anjiyogenez ve İHK sonuçları arasında

anlamli farklar bulunurken ulser skorlarında fark saptanmadı. Grup II’de 3. 7. ve 14. günlerde sakrifiye edilen deneklerin sadece inflamatuvar hücre skorları arasında anlamlı fark saptandı($p=0,008$). Grup III’te 3. 7. ve 14. günlerde sakrifiye edilen deneklerin sadece ulser skorları arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,007$). Grup IV’te 3. 7. ve 14. günlerde sakrifiye edilen deneklerin tüm histolojik skorları arasında anlamlı fark tespit edildi.

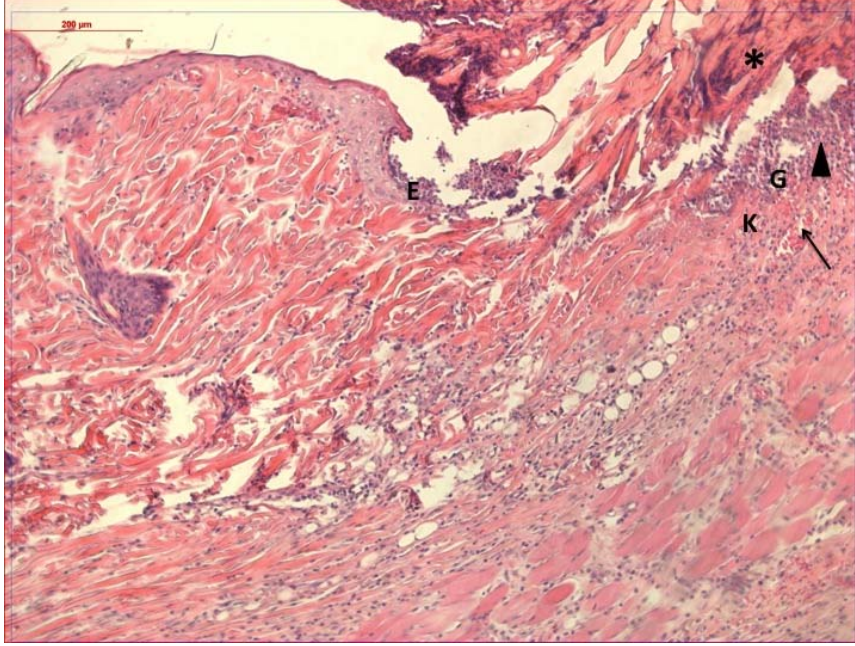
Grup I kendi içinde incelendiğinde; grup Ia ve grup Ib arasında sadece reepitelizasyon skorları arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,002$). Grup Ia ve grup Ic arasında anjiyogenez skoru dışında tüm histolojik parametrelerde anlamlı fark saptandı. Grup Ib ve grup Ic arasında ise sadece kollajen birikimi ve İHK skorları arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,002$). Grup Ia, Ib ve Ic’ye ait HE ile boyanan kesitler Şekil 21, 22, 23’de, PDGFR ile boyanan kesitler Şekil 24, 25 ve 26’da gösterilmiştir.



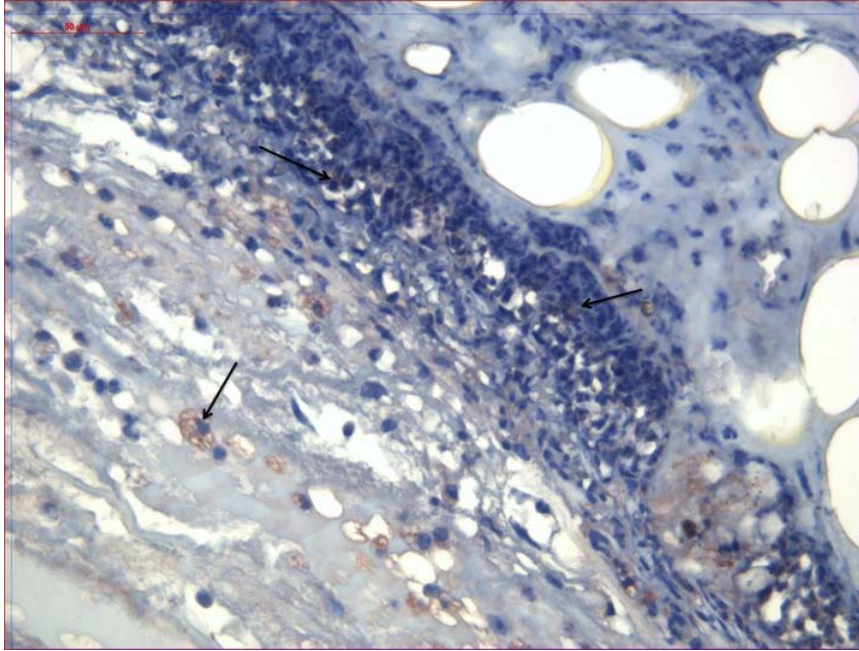
Şekil 21. Grup Ia'ya ait hematoxilen eozin (HE) ile boyanmış doku kesitlerinde epitelizasyonun ve granülasyon dokusunun oluşmadığı, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun orta derecede varlığı dikkati çekiyor. Anjiyogenezin belli belirsiz başladığı ve ülserin minimal olduğu izleniyor.



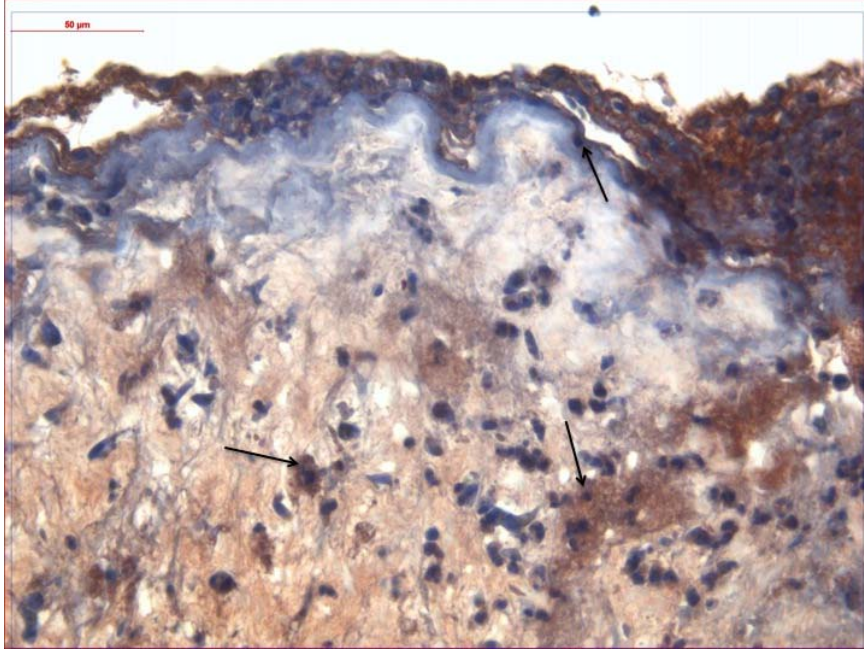
Şekil 22. Grup Ib'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde minimal düzeyde epitelizasyon (E) ve granülasyon dokusu (G), az miktarda inflamatuvar hücre ve kollajen lifler (K) izleniyor. Az miktarda damar oluşumu (oklar) dikkati çekiyor.



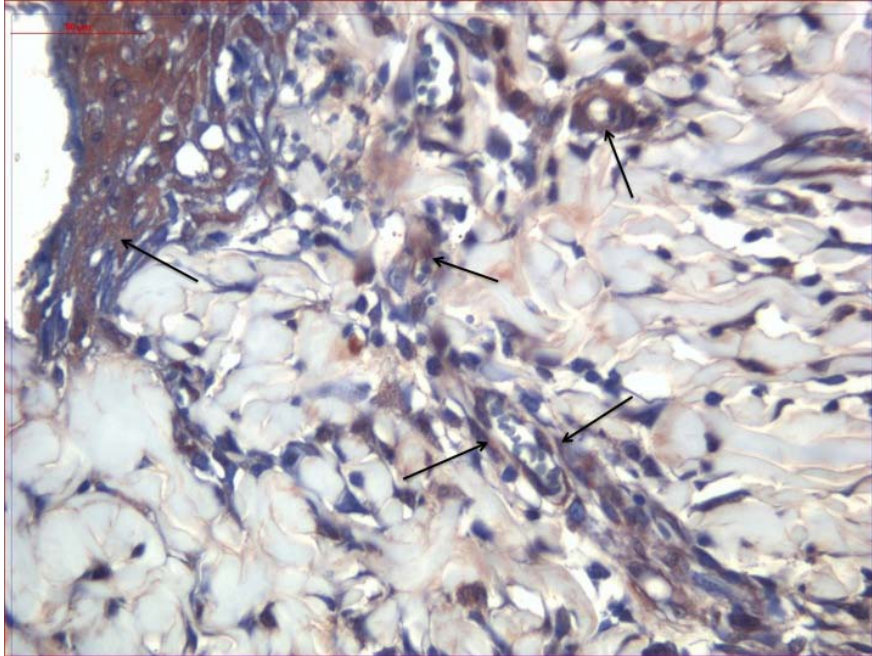
Şekil 23. Grup Ic'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde bir miktar epitelizasyonun (E) olduğu, granülasyon dokusunun (G) şekillendiği, kollajen liflerin (K) orta derecede olduğu ve inflamatuvar hücrelerin (ok başları) arttığı izleniyor. Ayrıca anjiyogenezin (oklar) orta derecede olduğu ve küçük ülser dokusu (*) dikkati çekiyor.



Şekil 24. Grup Ia'ya ait immunhistokimya uygulanmış doku kesitinde yara dokusu çevresinde epidermal hücreler ve dermisin bağ doku hücrelerinde hafif dereceli immünreaktivite (oklar) izleniyor. (Bar: Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

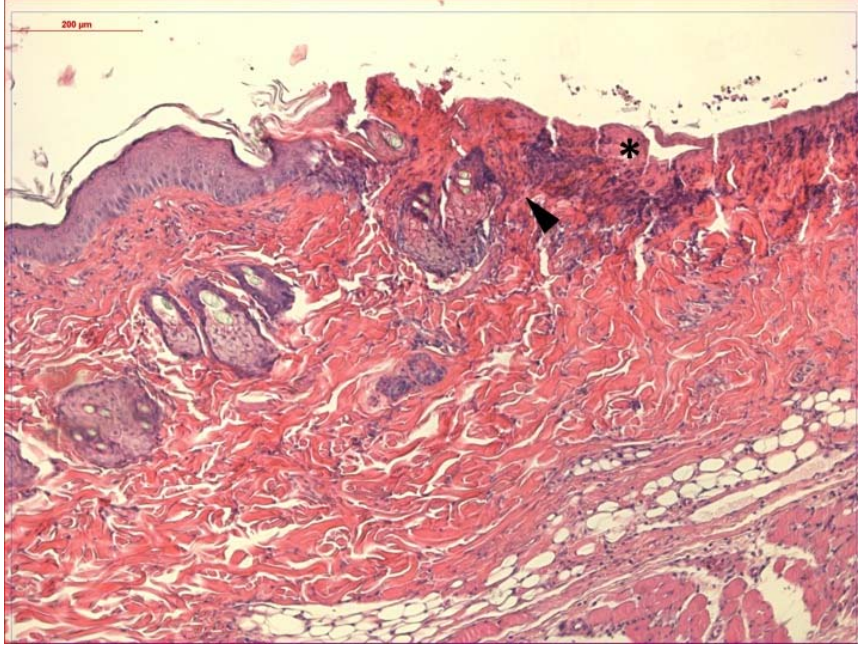


Şekil 25. Grup Ib'ye ait immünohistokimya uygulanmış doku kesitinde epitel hücrelerinde orta dereceli, bağ doku hücrelerinde hafiften orta dereceye doğru değişim gösteren immünreaktivite (oklar) izleniyor.(Bar: Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

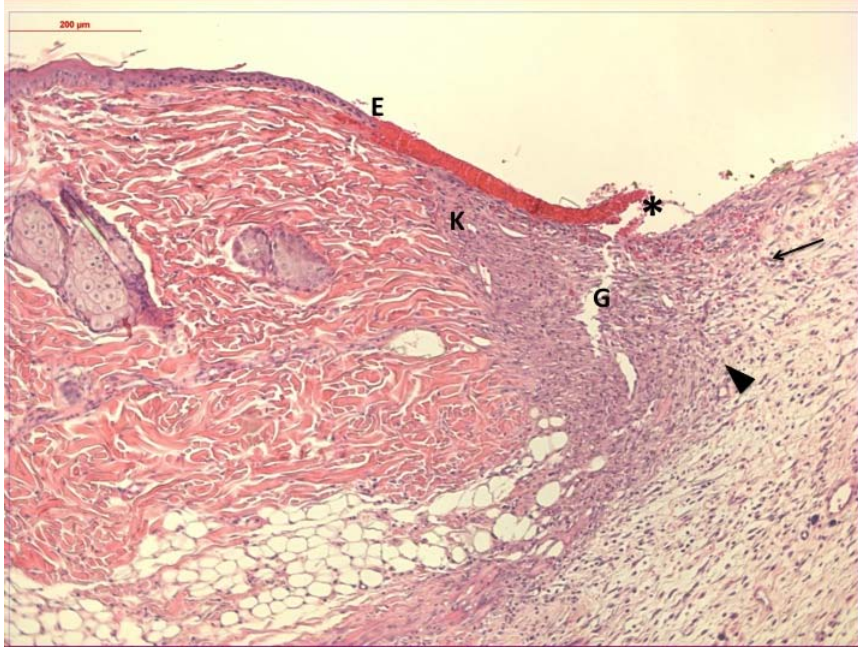


Şekil 26. Grup Ic'ye ait immünohistokimya uygulanmış doku kesitinde epidermis ve dermiste orta dereceli PDGFR tutulumu izleniyor. Perivasküler bölgede, endotel hücre ve bağ dokuda fibroblastlarda orta dereceli tutulum izleniyor. (Bar:Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

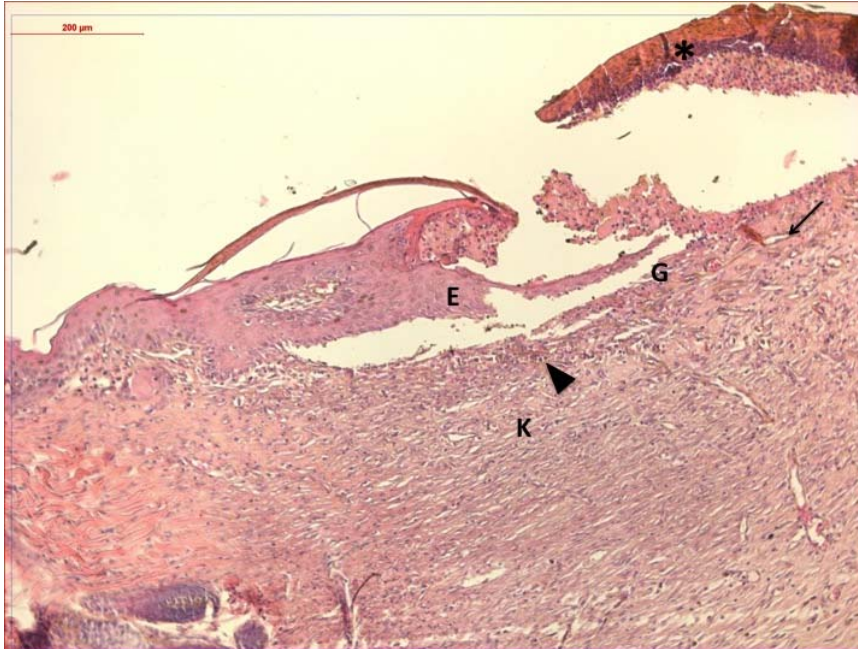
Grup II kendi içinde incelendiğinde; daha önce uygulanan testte anlamlı fark bulunan inflamatuvar hücre skorları arasında, Bonferroni düzeltmesine göre, grup IIa ve grup IIb arasında, grup IIa ve grup IIc arasında ve grup IIb ve grup IIc arasında anlamlı fark saptanamadı ($p>0,0041$). Grup IIa, IIb ve IIc'ye ait HE ile boyanan kesitler Şekil 27, 28, 29'da, PDGFR ile boyanan kesitler Şekil 30, 31 ve 32'de gösterilmektedir.



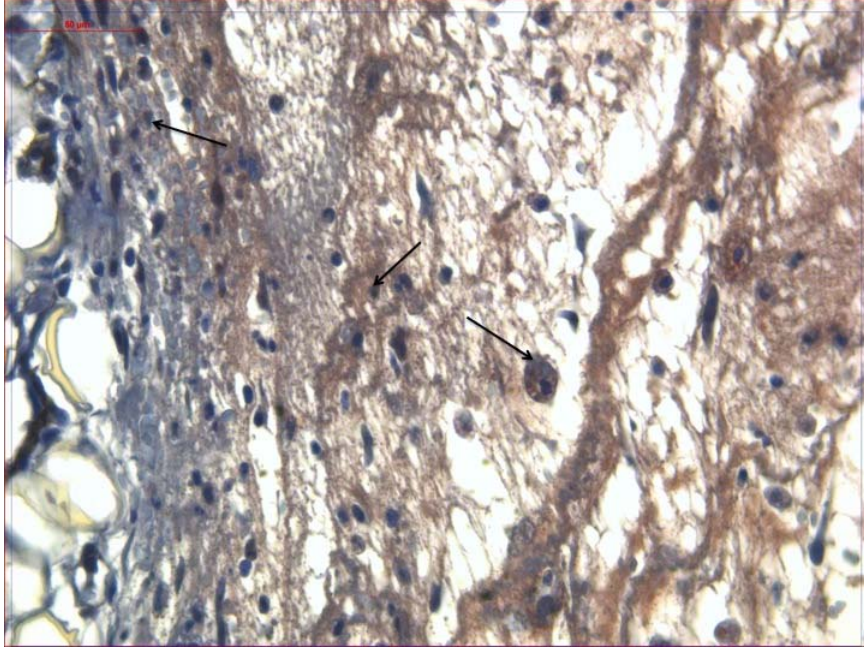
Şekil 27. Grup IIa'ya ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde epitelizasyonun başlamadığı, granülasyon dokusu ve kollajen liflerin gelişmediği, anjiyogenezin ortaya çıkmadığı görülüyor. Yer yer inflamatuvar hücrelerin varlığı (ok başları) ve ülser (*) dikkati çekiyor.



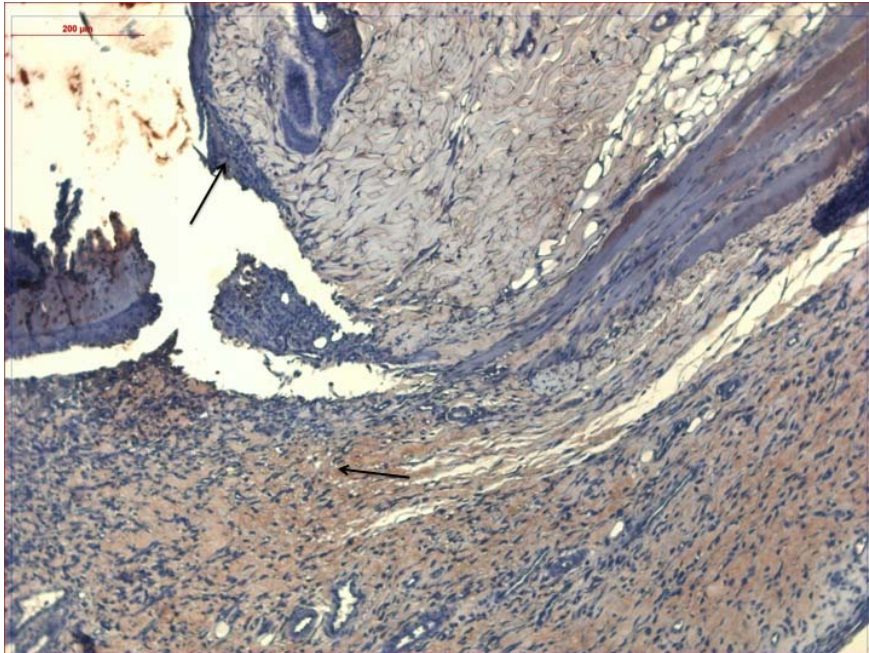
Şekil 28. Grup IIb'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde epitelizasyonun (E) minimal düzeyde geliştiği, granülasyonun (G) ve kollajen liflerin (K) orta derecede olduğu izleniyor. Anjiyogenez (oklar) ve inflamatuvar hücrelerin arttığı (ok başları) ve ülser (*) dokusunda küçülme dikkati çekiyor.



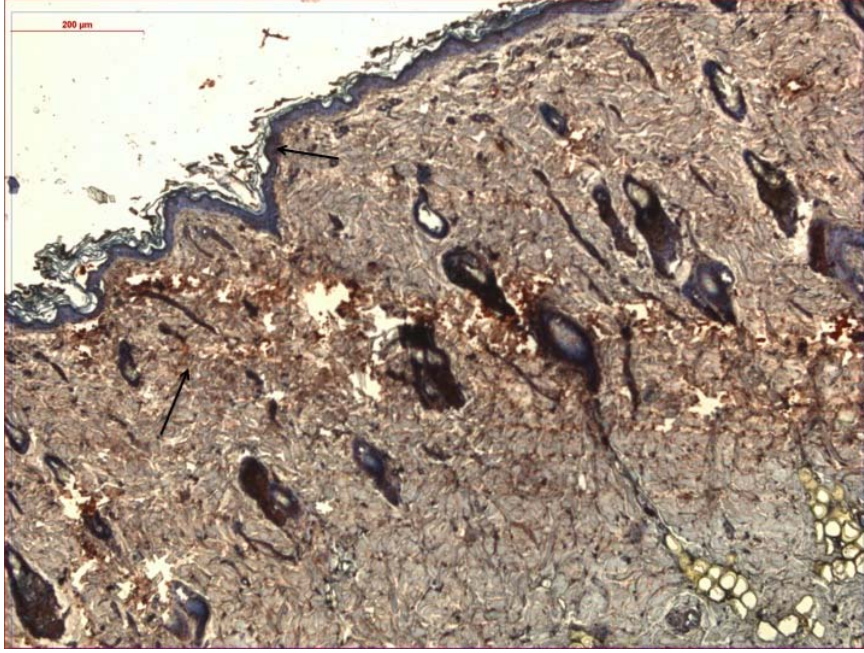
Şekil 29. Grup IIc'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde minimal derecede epitelizasyon (E), az miktarda granülasyon dokusu (G), minimal miktarda kollajen lifler (K), az miktarda inflamatuvar hücre (ok başları), birkaç yeni damarlanma (oklar) ve ülser dokusu (*) izleniyor.



Şekil 30. Grup IIa'ya ait immünhistokimya uygulanmış doku kesitinde hem epidermiste hem de dermiste hafiften orta dereceye değişen immünreaktivite izleniyor (oklar). (Bar: Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

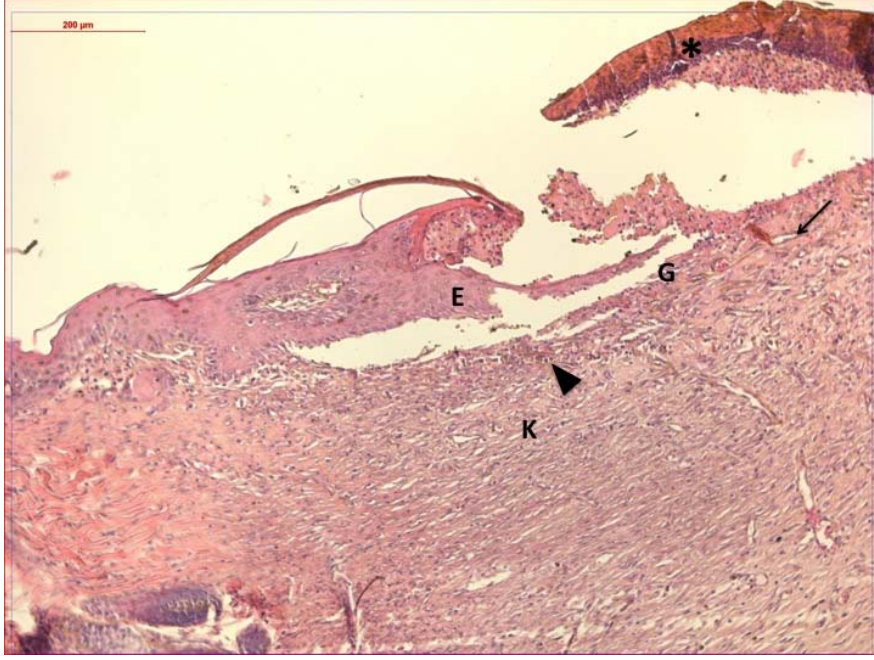


Şekil 31. Grup IIb'ye ait immünhistokimya uygulanmış doku kesitinde hem epitelde hem de dermisteki bağ doku hücrelerinde hafif immünreaktivite izleniyor (oklar). (Bar: Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

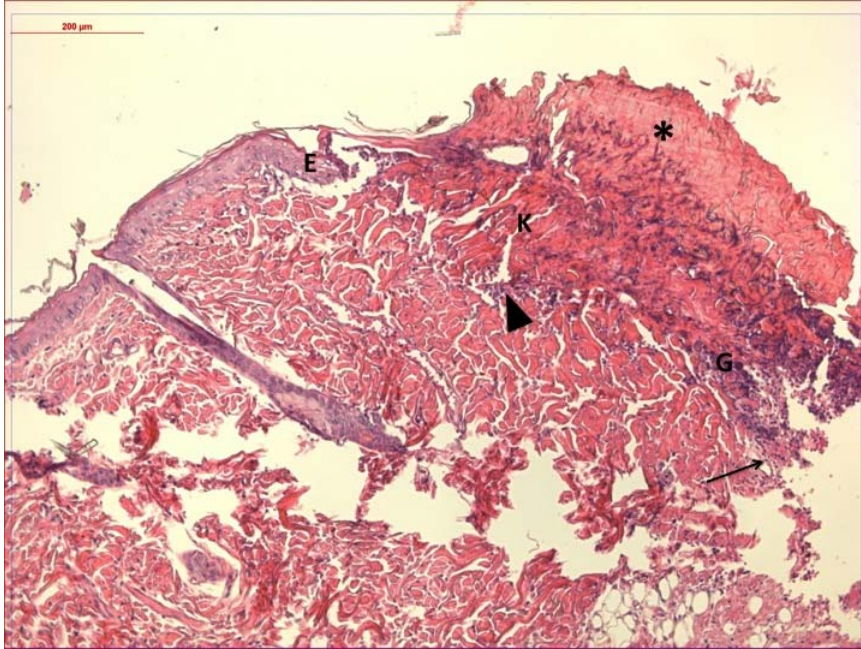


Şekil 32. Grup IIc'ye ait immünohistokimya uygulanmış doku kesitinde hem epidermiste hem de dermal hücrelerde orta dereceli immünreaktivite dikkati çekiyor (oklar). (Bar:Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

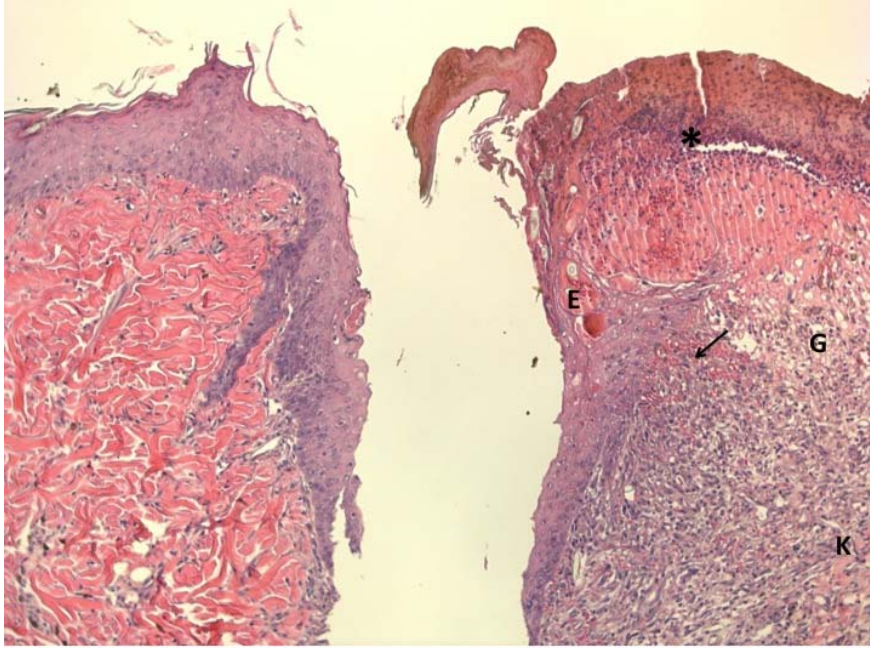
Grup III kendi içinde incelendiğinde; daha önce uygulanan testte anlamlı fark bulunan ülser skorları arasında, Bonferroni düzeltmesine göre, grup IIIa ve grup IIIb arasında, grup IIIa ve grup IIIc arasında ve grup IIIb ve grup IIIc arasında anlamlı fark saptanamadı ($p>0,0041$). Grup IIIa, IIIb ve IIIc'ye ait HE ile boyanan kesitler Şekil 33, 34 ve 35'te, PDGFR ile boyanan kesitler Şekil 36, 37 ve 38'de gösterilmektedir.



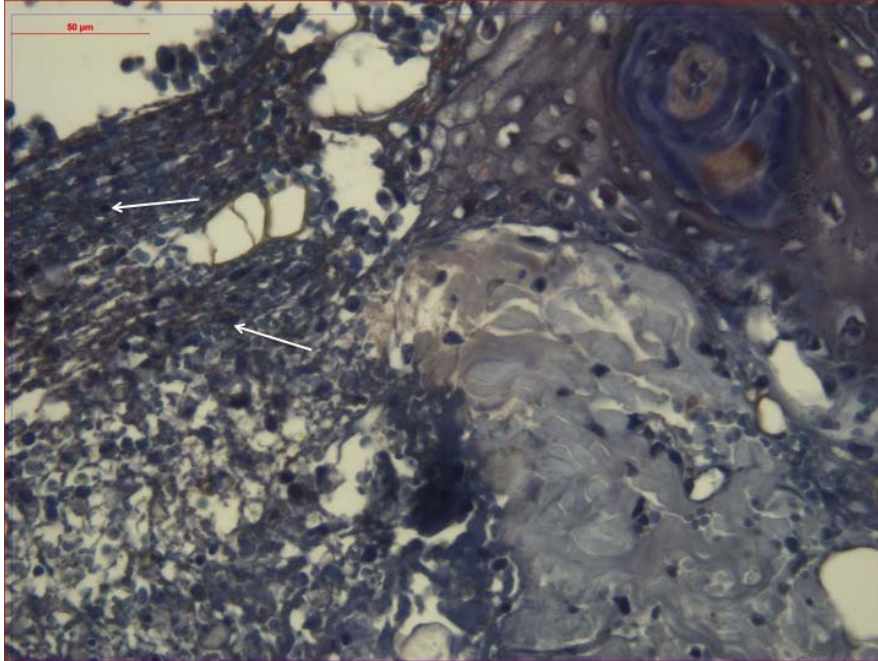
Şekil 33. Grup IIIa'ya ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde epitelizasyon (E) ve granülasyon dokusu (G) minimal düzeyde izlenirken, kollajen lif (K) miktarında bir miktar artış ve orta dereceli inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları) dikkati çekiyor. Birkaç yeni damar oluşumu (oklar) ve ülser (*) izleniyor.



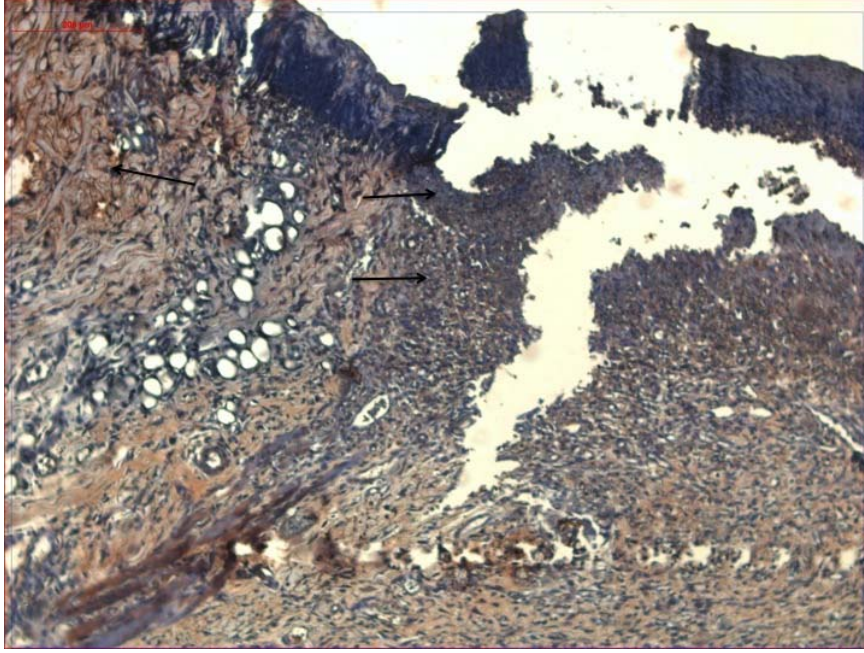
Şekil 34. Grup IIIb'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde minimal düzeyde epitelizasyon (E), orta derecede matüre olmuş granülasyon dokusu (G), kollajen liflerin (K) orta yoğunlukta olduğu ve birkaç yeni damar oluştuğu (oklar) izleniyor. Ülser dokusu (*) da dikkati çekiyor.



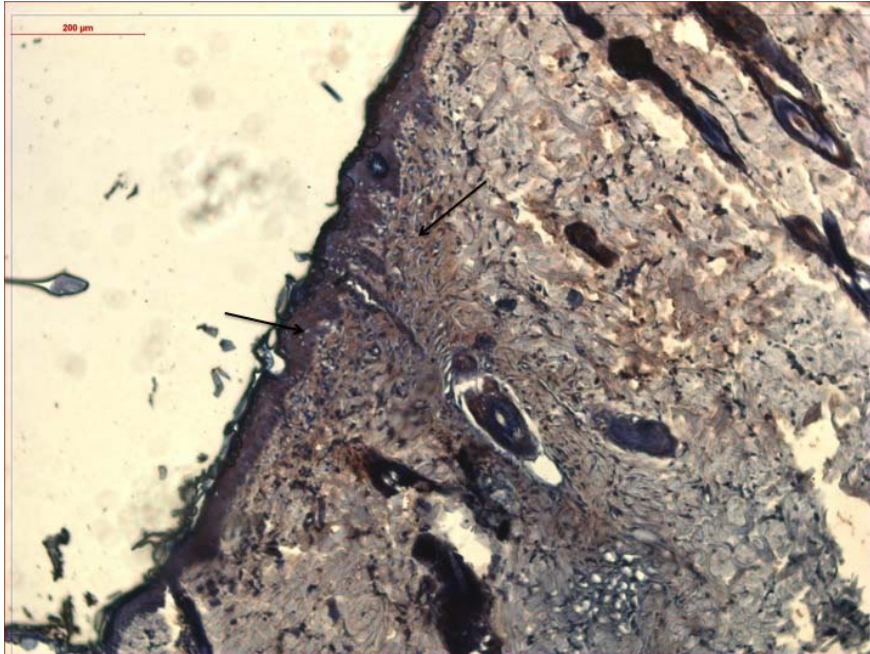
Şekil 35. Grup IIIc'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde tamamlanmış fakat ince bir epitel (E), orta derecede matüre olmuş granülasyon dokusu (G) ve kollajen lifler (K) izleniyor. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları) ve damarlanmada (oklar) artış dikkati çekiyor.



Şekil 36. Grup IIIa'ya ait immünohistokimya uygulanmış doku kesitinde granülasyon dokusu hücrelerinde orta dereceli tutulum ilgi çekiyor (oklar). (Bar:Anti-PDGFR Immunperoksidaz)

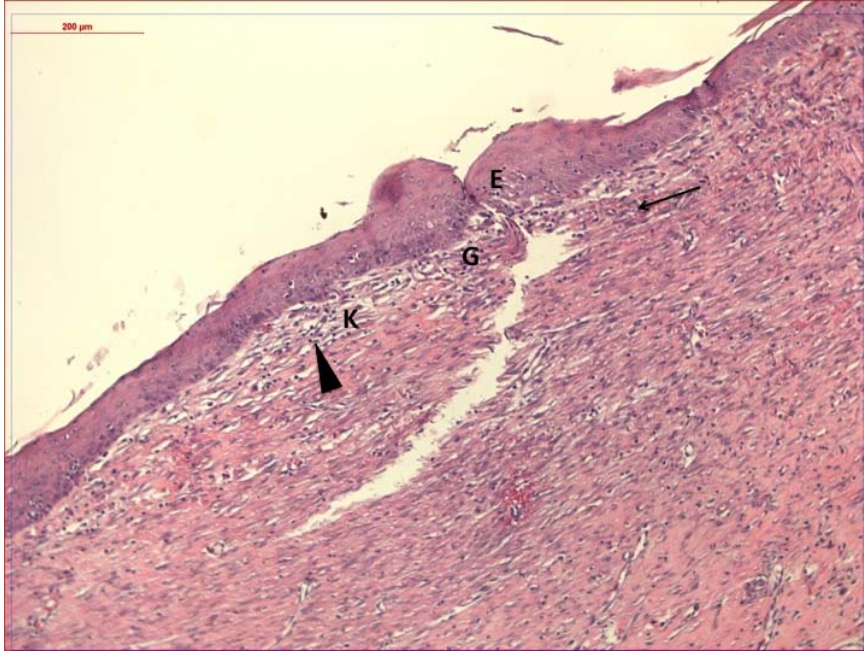


Şekil 37. Grup IIIb'ye ait immünhistokimya uygulanmış doku kesitinde hem epitel hem de dermal hücrelerde orta dereceli tutulum izleniyor (oklar). (Bar:Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

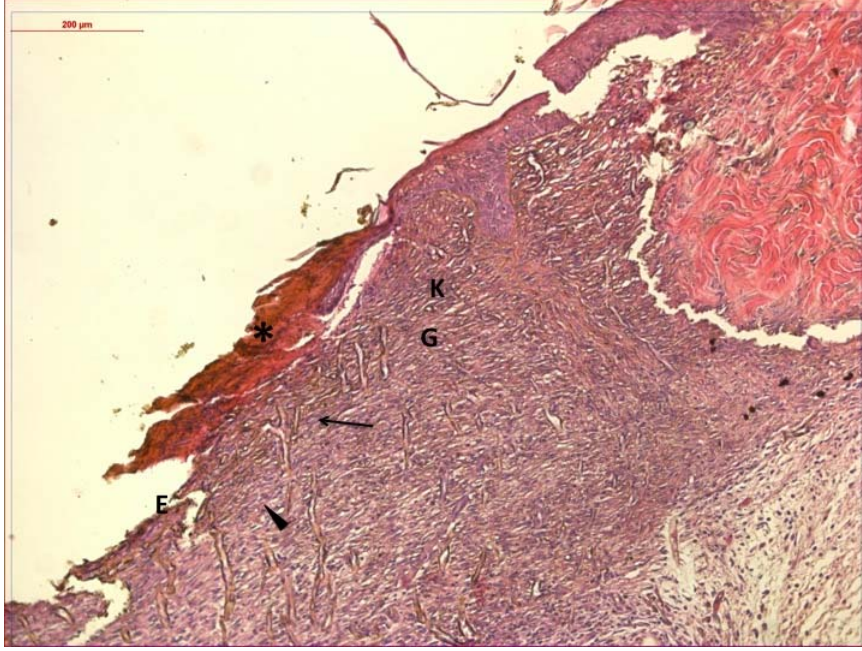


Şekil 38. Grup IIIc'ye ait immünhistokimya uygulanmış doku kesitinde hem epitelde hem de dermiste orta dereceli immünreaktivite izleniyor (oklar) (Bar:Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)

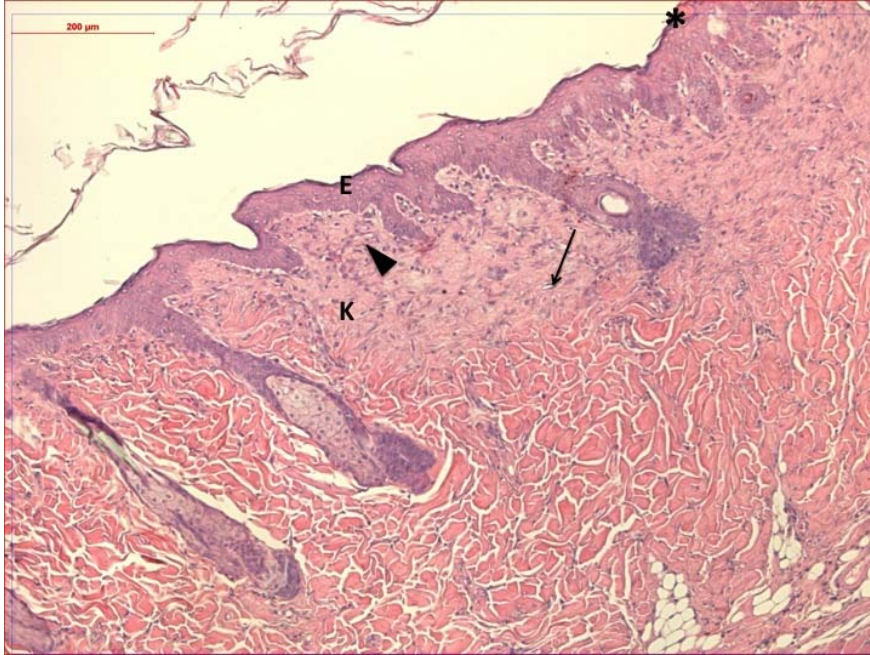
Grup IV kendi içinde incelendiğinde; grup IVa ve grup IVb arasında, granülasyon, kollajen birikimi ve anjiyogenez skorları açısından anlamlı fark saptandı ($p=0,002$). Grup IVa ve grup IVc arasında inflamatuvar hücre skorları hariç tüm parametreler arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,002$). Grup IVb ve grup IVc arasında, kollajen birikimi, anjiyogenez ve ülser skorları arasında anlamlı fark mevcuttu ($p=0,002$). Grup IVa, IVb ve IVc'ye ait HE ile boyanan kesitler Şekil 39, 40 ve 41'de, PDGFR ile boyanan kesitler Şekil 42, 43 ve 44'te gösterilmiştir.



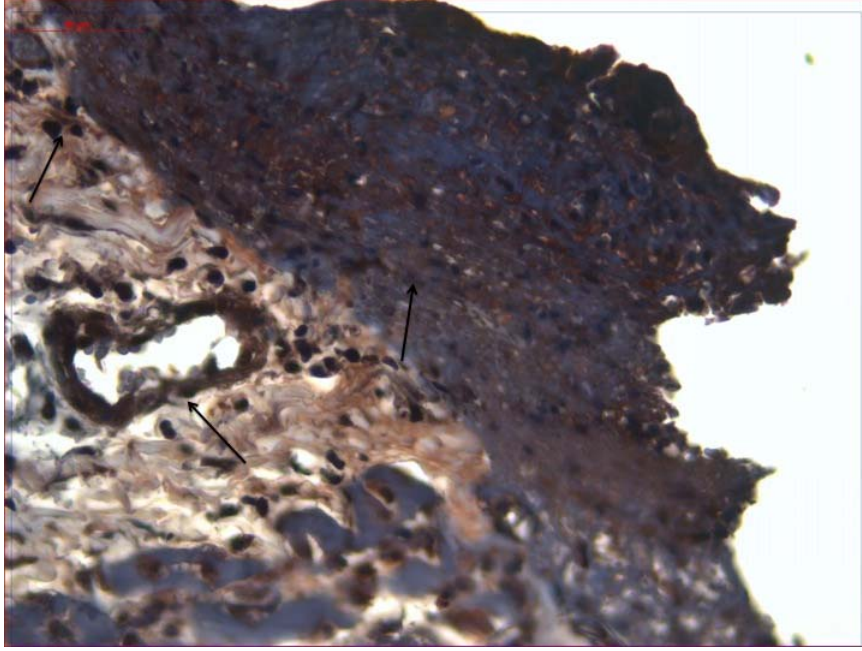
Şekil 39. Grup IVa'ya ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde minimal düzeyde epitelizasyon (E), orta dereceli granülasyon dokusu (G), kollajen lifler (K) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları) dikkati çekiyor. Damarlanmada (oklar) minimal düzeyde artış ve ülser (*) izleniyor.



Şekil 40. Grup IVb'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde minimal düzeyde epitel dokusu (E), orta derecede matüre olmuş granülasyon dokusu (G), minimal düzeyde kollajen lifler (K), orta yoğunlukta iltihabi hücre infiltrasyonu (ok başları) dikkati çekiyor. Birkaç yeni damar oluşumu (oklar) ve küçük ülserasyonlar (*) izleniyor.



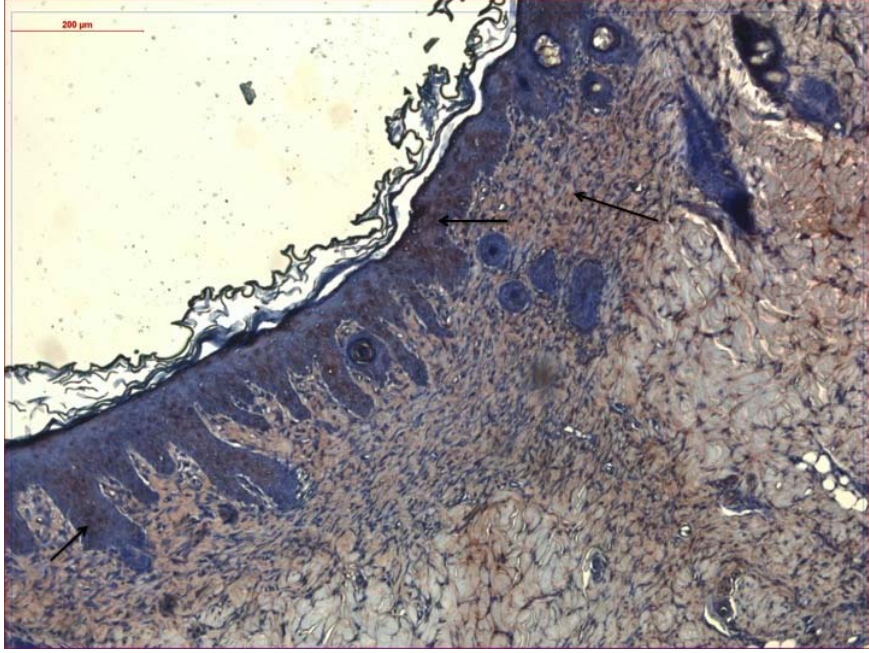
Şekil 41. Grup IVc'ye ait HE ile boyanmış doku kesitlerinde yer yer tamamlanmış ve matür epitelizasyon (E), olgun granülasyon dokusu (G), yoğun kollajen lifler (K), bol miktarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları) izleniyor. Orta derecede yeni damar oluşumu (oklar) ve ülser (*) dikkati çekiyor.



Şekil 42. Grup IVa'ya ait immünhistokimya uygulanmış doku kesitinde hem epidermiste hem de dermiste orta dereceden kuvvetliye doğru değişim gösteren PDGFR immünreaktivitesi izleniyor (oklar).(Bar:Anti-PDGFR İmmünperoksidaz)



Şekil 43. Grup IVb'ye ait immünhistokimya uygulanmış doku kesitinde hem epidermiste hem de dermisteki hücrelerde kuvvetli immünreaktivite izleniyor (oklar) (Bar: Anti-PDGFR Immunperoksidaz)



Şekil 44. Grup IVc'ye ait immünhistokimya uygulanmış doku kesitinde epidermis ve dermiste kuvvetli derecede PDGFR immünreaktivitesi izleniyor (oklar). (Bar:Anti-PDGFR Immunperoksidaz)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İskemik modellerde, oksidatif stres ve buna bağlı ortaya çıkan ürünler nedeniyle yarada MMP/TIMP oranının yükseldiği ve ECM'in yeniden düzenlenmesinde ve reepitelizasyonda yetersizliğin ortaya çıktığı gösterilmiştir. Kronik yara oluşumuna neden olduğu kabul edilen iskemi ve bunun sonucunda meydana gelen serbest oksijen radikalleri, azalmış protein sentezine, artmış lökosit göçüne ve ortamda artmış MMP seviyelerine neden olmaktadır. Bütün bu fizyopatolojik değişiklikler sonucunda anormal yapıda ECM oluşmaktadır [2, 15, 63, 64, 108].

Bu deneysel çalışmada, iskemik yara modeli olarak, rat bipediküllü dorsal flebi seçilmiş, bu flep üzerinde oluşturulan yaralarda, topikal clinoptilolite zeolit kullanımının yara iyileşmesi üzerine etkisi; yara alanlarının takibi, histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışma ve MMP-1 ve TIMP-1 düzeylerinin saptanması ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan rat iskemik yara modeli ilk kez McFarlane [101] tarafından tanımlanmış olup Schwarz tarafından modifiye edilmiştir [102]. Bu modelde yapılan çalışmalarda, gecikmiş yara iyileşmesi, flep kan akımında azalma ve yüksek MMP/TIMP oranları, ayrıca histopatolojik bulgular açısından da iskemik yaraya benzer özellikler ortaya konmuştur [63, 64, 102-104, 107-109]. Çalışmamızda, clinoptilolite kullanılmayan gruplarda iskeminin etkisine bakıldığında iskemik grupta (Grup II) kontrol grubuna göre (Grup IV) 7. ve 14. günlerde yara alanlarında izlenen düzelme oranını daha düşük olarak saptandı.

Elde edilen sonuçlar, rat iskemik yara modelinin iskemik/gecikmiş yara iyileşmesi çalışmalarında güvenle kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde deneysel yara modelleri üzerine yapılmış çalışmalar incelendiğinde, yara boyutlarını standardize edebilmek amacıyla, 4, 6 veya 8 mm çaplı biyopsi punchlarının kullanıldığı görülmektedir [102-105, 107, 109]. Ancak yaptığımız ön çalışmada, elde edebildiğimiz en büyük biyopsi punchı ile 6 mm çapında oluşturulan yaraların, 14 günden önce tamamen iyileştiği görüldü. Bunun üzerine 1x1 cm boyutlarında doku defektleri, cerrahi çizim kalemiiyle kalıp yardımıyla deneklerin sırtına yapılan işaretlemelerin ardından bistüri ile oluşturuldu. Yara boyutlarının değerlendirilmesinde ise yara alanı ölçümleri değil günlere göre her yaranın küçülme miktarı değerlendirildi.

Çalışmamızda bipediküllü flepler üzerinde oluşturulan yaraların (grup II) sağlıklı deneklerdeki (grup IV) yaralara göre daha uzun sürede iyileştiği gösterildi. 3. günde gruplar arasında yara alanlarındaki düzelme miktarı açısından fark gözlenmedi. Clinoptilolite zeolit uygulanan iskemik grupta (grup I) 7. ve 14. gündeki düzelme miktarı diğer gruplara göre daha düşük bulundu. Clinoptilolite zeolit uygulanan iskemik olmayan grupta (grup III) yara alanlarındaki düzelme miktarı, kontrol grubuna (grup IV) göre 7. günde daha düşükken, 14. günde anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç clinoptilolite zeolitinin, bir haftadan uzun süreli kullanımının yara iyileşmesini hızlandırdığını düşündürmektedir.

14. gün sakrifiye edilen gruplardan grup IVc'nin yara alanındaki düzelmenin grup Ic ve IIc'den daha fazla olması beklenen bir sonuçtu. Ancak

grup Ic ve IIc'nin yara alanlarındaki düzelmede fark saptanmaması clinoptilolite zeolit kullanımının iskemik yara iyileşmesine anlamlı yararı olmadığını göstermiştir.

Doku metalloproteinazları birbirleri ile ilişkili toplam 19 üye içermekte; kollajenaz, jelatinaz, stromelizin, matrilizin ve membran tipi MMP şeklinde primer yapılarına ve spesifik oldukları substratlara göre alt gruplara ayrılmaktadırlar. Kollajenaz-1 ya da fibroblast kollajenaz (MMP-1), tip I, II ve III kollajenin yıkımından sorumludur. Kronik yaralarda MMP yüksekliği yanında TIMP seviyeleri azalmıştır. Kronik yarada gözlenen anormal değişiklikler, ekstrasellüler elementlerin sentezinin yetersizliği, aktif matriks yıkım enzimlerinin seviyesinin yüksek olması, yıkım enzimlerinin regülasyonundan sorumlu inhibitörlerin düşük seviyede olması şeklindedir [58, 63, 64, 110, 111].

Ekstrasellüler matriksin yıkım ve sentezinin dengeli bir şekilde organizasyonu normal yara iyileşmesi için son derece önemlidir. Ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesi, ölü dokuların debridmanını, kapiller damarların gelişimini, kollajen sentezini ve uzun dönemde dokuların yeniden yapılanmasını içerir. MMP ve TIMP dengesinin MMP lehine bozulması, matriks yıkımında artışa yol açarak, yetersiz ECM oluşumu ve gecikmiş yara iyileşmesine neden olur. Ancak bu dengesizlik ekstrasellüler elemanların yetersizliği sonucunda da ortaya çıkabilir. İskemik yaralarda MMP/TIMP oranının MMP lehine bozulduğu gösterilmiştir [52, 58, 63, 64, 110, 111]. Ayrıca yapılan çalışmalarda venöz ülserler ve bası yaraları gibi oksidatif stresin bariz olduğu yaralarda MMP-1 ve MMP-8 (kollajenaz) düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. TIMP düzeylerinin yanı

sıra diğ er nonspesifik proteaz inhibitörlerinin seviyeleri de d    k olarak bulunmuştur [52, 64, 112, 113].

Yara iyileşmesinin gidişatının tahmin edilebilmesi için yararlı bir biyomarker bulunabilmesi için yapılan çalışmalarda en fazla   ne çıkan maddeler MMP ailesi olmuştur. Yara iyileşmesi ile en çok ilişkili olanlar; MMP-1, 2, 3 MMP-7, 8, 9 ve MMP-10, 12, 13 olarak belirlenmiştir [65]. Ladwig ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MMP-9/TIMP oranının bası yaralarının iyileşebilirliğini tahmin etmede fayda sağladığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada venöz ülserlerde kronik inflamasyon ve artmış MMP-8 ve 9 düzeyleri çok yüksek iken TIMP düzeylerinde belirgin bir değişiklik saptanmamıştır [66].

Yara iyileşmesi ile MMP ve TIMP düzeyleri arasındaki ilişkileri inceleyen araştırmalarda proteaz ve proteaz inhibitörlerinin düzeyleri genellikle yara sıvısından alınan örneklerde çalışılmıştır. Ulrich ve arkadaşları yanık hastalarında yaptıkları bir çalışmada, akut dönemde MMP-2 ve MMP-9'un serum düzeylerinde artış olduğunu göstermişlerdir [114]. Hawksworth ve arkadaşları, 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında, inflamatuvar sitokinlerin yara sıvısındaki düzeyleri ile serum düzeyleri arasında korelasyon olduğunu saptamışlardır [68]. Utz ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmada, hem yara sıvısında hem de serumda  l  len MMP-2 ve MMP-7 düzeyleri yüksek olarak saptanmış, proteazların serum düzeylerinin yara iyileşmesinin seyrini ve yaranın cerrahi olarak kapatılması için en uygun zamanı gösterebileceği   ne s r lm ştir [67]. Bu çalışmaların ışığında, biz de kendi  alışmamızda MMP-1 ve

TIMP-1 düzeylerini, deneklerin feda edilmesi sırasında alınan serum örneklerinden çalıştık.

Kontrol grubu olan grup IV'te, MMP-1 düzeyleri, 3. ve 14. günler arasında artmıştı. Bipediküllü flep kaldırılmadan clinoptilolite zeolit uygulanan grupta (grup III) ise bu enzimin düzeyleri, 3. ve 7. günler arasında azalma gösterirken 14. günde grup IV ile benzer seviyelerde saptandı. İskemik yara iyileşmesi gruplarında (grup I ve II) 3. gündeki MMP-1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da grup III ve IV'e göre daha yüksekti. Bu yükseklik grup I ve II'de iskemiye bağlı oksidatif stresin daha fazla olmasına bağlanabilir ve kronik yaralarda MMP düzeylerinin daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalarla tutarlılık göstermektedir. Grup I ve II'nin 7. gündeki MMP-1 değerlerine bakıldığında, clinoptilolite zeolit kullanılan grubun (grup I) MMP-1 düzeylerinin kullanılmayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek saptandığı görülmektedir. Bu sonuç grup III ve IV'ün 7. gündeki değerlerinin karşılaştırılmasıyla ortaya çıkan tabloya ters düşmektedir. Bu sonuçlar yara iyileşme hızlarının karşılaştırılmasıyla elde edilen bulgularla beraber değerlendirildiğinde, clinoptilolite zeolitın iskemik yaraların iyileşmesine katkı sağlamazken sorunsuz yaraların iyileşmesini hızlandırdığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu beklenmedik sonuç ileride yapılacak çalışmalarla açıklanmayı beklemektedir. Tüm grupların MMP-1 düzeylerinin 14. günde birbirlerine yakın seviyelerde saptanmış olmasının nedeni, 14. günde yara iyileşmesinin büyük ölçüde tamamlanıp plato yapması olabilir.

Clinoptilolite zeolit kullanılmayan gruplarda (grup II ve IV) 14. gündeki TIMP-1 düzeylerinin 3. gündeki düzeylerine göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlendi. 3. ve 14. günler arasında tüm grupların TIMP-1 düzeylerinde azalma mevcuttu ve 14. gün ölçülen değerler tüm gruplarda birbirlerine yakın olarak saptandı. Nwomeh ve arkadaşlarının çalışmasında da yaralarda TIMP-1 düzeyinin 1. günde en yüksek olduğu ve sonrasında giderek azaldığı gösterilmiştir [115]. Ancak iskemik gruplarda TIMP-1 düzeylerinin daha düşük olması beklenirken bizim çalışmamızda anlamlı bir fark saptanmamıştır.

MMP-1/TIMP-1 oranlarında da gruplar arasında 3. 7. ve 14. gün arasında anlamlı fark saptanamadı. Ancak 14. günde en düşük değer clinoptilolite zeolit kullanılan iskemik olmayan grupta (grup III) gözlemlendi. Bu sonuç da clinoptilolite zeolitin sorunsuz yaralarda iyileşmeye katkıda bulunduğu hipotezini desteklemektedir. Gruplar arasında MMP-1 ve TIMP-1 düzeyleri açısından saptanması beklenen farkların bizim çalışmamızda gözlenememesinin nedeni, bu parametrelerin yara sıvısı yerine serumdan çalışılmış olması olabilir. İleride yapılacak çalışmalarda, hem yara sıvısından hem de serumdan alınan örneklerde MMP-1 ve TIMP-1 düzeyi çalışılması, daha anlamlı sonuçlar verebilir.

Gecikmiş yara iyileşmesinin en belirgin özellikleri, keratinositlerde proliferasyon ve migrasyonda yetersizlik, ECM’te yetersiz kollajen depolanması ve matriksin yeniden şekillenmesinde ortaya çıkan düzensizlik ile birlikte kontraksiyon yetersizliğidir [2, 15].

Bizim çalışmamızda 3. günde yapılan histolojik değerlendirmeye göre bipediküllü flep kaldırılan gruplarda clinoptilolite zeolit kullanılan grubun

reepitelizasyon, granülasyon, kollajen birikimi, inflamatuvar hücre ve anjiyogenez skorları, clinoptilolite zeolit kullanılmayan gruba göre daha düşük bulunmuştur. İskemi oluşturulmayan grupta ise aynı skorlar clinoptilolite zeolit uygulanan grupta diğer gruba göre daha yüksek saptanmıştır. Bu sonuçlar yara alanlarındaki değişimlerle beraber değerlendirildiğinde clinoptilolite zeolit normal yara iyileşmesine katkı sağladığı ancak iskemik yara iyileşmesini olumsuz etkilediği söylenebilir.

7. günde yapılan histolojik değerlendirmede, beklenmedik bir şekilde, grupların histolojik skorları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. İHK skorları açısından da grup III ve IV arasında fark yokken, grup II'nin İHK skoru grup I'den daha yüksek olarak saptanmıştır.

14. günde sakrifiye edilen deneklerin histolojik değerlendirmesinde ise grup I'in reepitelizasyon, kollajen birikimi ve anjiyogenez skorları grup II'den, grup IV'ün skorları da grup III'ten anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. Bu sonuçlar yara alanlarındaki düzelme oranları ile tezat oluşturmaktadır. 14. günde yara grup III'ün yara alanlarındaki düzelme miktarı grup IV'ten, grup II'nin yara alanlarındaki düzelme miktarı ise grup I'de yüksek bulunmuştu.

Literatürde, yara iyileşmesini hızlandırmak için çok çeşitli yöntemlerin denendiği birçok çalışma mevcuttur. Topikal uygulanan ürünlerin yanı sıra, ultrason dalgaları, elektrik uyarısı ve elektromanyetik alanlar da yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılmıştır [116-118]. Son yıllarda en çok üzerinde durulan yöntem ise negatif basınçlı yara kapama terapisi. Suissa ve arkadaşlarının yaptığı bir meta-analizde negatif basınçlı tedavinin kronik yaraların kapanmasında

etkin bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır [119]. Yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olduğu düşünölen aloe vera, hint fesleğeni ve bal gibi birçok doğal madde ile yapılan çalışmalarda pozitif sonuçlara ulaşılmıştır [120-122].

Pavelic ve arkadaşlarının 2001 yılında yayınladıkları çalışmada [6], tümör tedavisi için oral clinoptilolite zeolit tedavisi denen köpeklerden, deri kanseri ve yarası olanlara bu maddeyi topikal olarak uyguladıklarında yara boyutlarında hızlı bir küçölme gözlemlediklerini anektodal olarak belirtmeleri ve o tarihten bu yana bu konuda yapılmış kontrollü deneysel bir çalışma olmaması bizim çalışmamız için esin kaynağı olmuştur. Clinoptilolite zeolitinin oral kullanımının, henüz tam olarak açıklanamamış mekanizmalarla immün sistemi uyardığı hem deneysel hem de klinik çalışmalarda gösterilmiştir [123, 124], ayrıca antibakteriyel özellikte olduğu da bilinmektedir [71]. Daha ileride yapılacak çalışmalarda, clinoptilolite zeolitinin topikal kullanımının yanı sıra diyetle beraber verildiğinde yara iyileşmesine nasıl bir etki göstereceğı ve yaradaki bakteri yoğunluğunu nasıl etkilediğı irdelenebilir.

Sonuç olarak, bu deneysel çalışmada iskemik yara iyileşmesinin incelenmesinde iyi bir model olarak kabul edilen, rat bipediküllü dorsal flebi üzerinde oluşturulan yaralarda topikal clinoptilolite zeolit tedavisinin yara iyileşmesine herhangi bir olumlu katkı sağlamadığı ancak, sorunsuz yara olarak değerlendirebileceğimiz bipediküllü flep kaldırılmadan oluşturulan yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir. Deneysel olarak etkinliğini gösterdiğimiz topikal clinoptilolite zeolit tedavisinin, klinikte dolaşım problemi olmayan yaraların iyileşmesine yardımcı olacağı sonucuna varılmıştır.

ÖZET

İskemiye bağılı olarak gelişen oksidatif stres, doku metalloproteinaz (MMP) artışı, ekstrasellüler matriks yıkımının artışı ve reepitelizasyonda yetersizlik gibi iyileşmeyi olumsuz etkileyen çeşitli fizyopatolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bu çalışmada immünstimülan, antitümöral ve antimetastatik etkileri olduğu ispatlanmış ve yara iyileşmesi üzerine olumlu etkisi olduğu belirtilmiş clinoptilolite zeolitın topikal uygulanmasının normal ve iskemik yara iyileşmesini üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Denekler iskemi durumu ve clinoptilolite zeolit kullanımına göre dört gruba ayrıldı. Her grupta 18 sıçan olmak üzere toplam 72 adet, 200-250 gram ağırlığında Wistar sıçan kullanıldı. İskemik yara modeli olarak bipediküllü dorsal flep kullanıldı. İskemik gruplarda iskeminin en belirgin olduğu birinci gün sonunda flepler üzerinde 1x1 cm'lik yaralar oluşturuldu. Yara alanları 14 gün boyunca takip edildi. 3, 7 ve 14. günlerde alınan serum örneklerinden MMP-1 ve doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP)-1 düzeylerinin tayini biyokimyasal (ELISA) yöntem ile yapıldı. Aynı günlerde alınan doku örnekleri histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi.

Yara alanları değerlendirildiğinde 14. gün sonunda clinoptilolite zeolit kullanılan iskemik olmayan yaralar en çok iyileşmeyi gösterdiler. Histopatolojik incelemede 3. günde reepitelizasyon, kollajen birikimi ve anjiyogenez skorlarının clinoptilolite zeolit kullanılan iskemik olmayan grupta en iyi olduğu saptanırken 14. günde iskemik olmayan ve clinoptilolite zeolit kullanılmayan grupta bu skorlar daha yüksekti. İmmünohistokimyasal değerlendirmede 3. ve 14. günlerde

gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken 7. günde iskemik olmayan grupların skorları birbirine benzer olmakla beraber iskemik grupların skorlarından anlamlı olarak daha yüksekti. MMP-1 düzeyleri 7. günde clinoptilolite zeolit kullanılan iskemik grupta daha yüksek saptanırken TIMP-1 düzeyleri ve MMP-1/TIMP-1 oranları açısından gruplar arasında fark yoktu.

Elde ettiğimiz sonuçlar, topikal clinoptilolite zeolit tedavisinin iskemik yara iyileşmesine olumlu bir katkı sağlamadığını ancak, iskemik olmayan yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığını göstermiştir. Deneysel olarak etkinliğini gösterdiğimiz topikal clinoptilolite zeolit tedavisinin, klinikte dolaşım problemi olmayan yaraların iyileşmesine yardımcı olacağı kanaatine varılmıştır.

SUMMARY

Oxidative stress secondary to ischemia can cause physiopathological changes that adversely effects wound healing, such as increased tissue MMP, increased extracellular matrix degradation and inadequate reepithelization. We evaluated utility of topical administration of clinoptilolite zeolite which has proven immunstimulating, antitumoral, antimetastatic effects and possible positive effects on wound healing.

The subjects were divided into four groups based on ischemia status and the use of clinoptilolite zeolite. A total of 72 -18 in each group- Wistar rats weighing 200-250 g were used. We used bibedicted dorsal flap as an ischemic wound model. Flaps were elevated on the dorsum of the rats. Wounds (1x1 cm) were created at the end of the first day when the ischemia was maximum. Wounds were monitorized and followed up till 14th day. Serum samples were collected at 3, 7 and 14th days for detection of MMP-1 and TIMP-1 levels with biochemical (ELISA) method. Tissue samples were also extracted at the same days underwent histopathologic and immunohistochemical analysis.

When the surface areas of the wounds were compared at the end of the 14th day, it was found that the non-ischemic wounds that were treated with clinoptilolite zeolite were the best healing ones. At the end of 3rd day, scores of reepithelization, kollagen deposition and anjiogenesis were higher in non-ischemic group treated with clinoptilolite zeolite but at the end of the 14th day these scores were higher in the group without ischemia and clinoptilolite zeolite. There was no immunohistochemical difference between the groups at the 3rd and

the 14th days. Scores of non-ischemic groups were similar to each other but significantly higher than the ischemic groups at the 7th day. While MMP-1 levels were higher in the ischemic group treated with clinoptilolite zeolite at the 7th day, there was no significant difference between groups in TIMP-1 levels and MMP-1/TIMP-1 ratios.

Our results showed that topical clinoptilolite zeolite treatment does not provide any positive contribution to ischemic wound healing but accelerates the healing of non-ischemic wounds. It is concluded that clinoptilolite zeolite which is experimentally shown to be effective in non-ischemic wound healing may be used clinically in wounds without circulatory problems.

KAYNAKLAR

1. Singer, A.J. and R.A.F. Clark, Mechanisms of disease - Cutaneous wound healing. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(10): p. 738-746.
2. Lazarus, G.S., et al., Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. Arch Dermatol, 1994. **130**(4): p. 489-493.
3. Stadelmann, W.K., A.G. Digenis, and G.R. Tobin, Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. American Journal of Surgery, 1998. **176**(2A): p. 26S-38S.
4. Fan, K., et al., State of the Art in Topical Wound-Healing Products. Plast Reconstr Surg, 2011. **127**(1): p. 44S-59S.
5. Mumpton, F.A., La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3463-70.
6. Pavelic, K., et al., Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. J Mol Med (Berl), 2001. **78**(12): p. 708-20.
7. Mimi Leong, M.D., Linda G. Phillips, M.D., Wound Healing, in Sabiston Textbook of Surgery 2004, Elsevier Saunders: USA. p. 183-207.
8. H. Peter Lorenz, M.D., Michael T. Longaker, M.D., Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment, in Plastic Surgery 2006, Saunders Elsevier: China. p. 209-234.

9. Baum, C.L. and C.J. Arpey, Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery*, 2005. **31**(6): p. 674-686.
10. Drew, A.F., et al., Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood*, 2001. **97**(12): p. 3691-8.
11. Campbell, P.G., et al., Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(42): p. 30215-30221.
12. Sahni, A., T. Odrliin, and C.W. Francis, Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(13): p. 7554-7559.
13. Werner, S. and R. Grose, Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 2003. **83**(3): p. 835-70.
14. Szpadarska, A.M., et al., The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 2003. **120**(6): p. 1130-1137.
15. Nwomeh, B.C., D.R. Yager, and I.K. Cohen, Physiology of the chronic wound. *Clinics in Plastic Surgery*, 1998. **25**(3): p. 341-+.
16. Trengove, N.J., H. Bielefeldt-Ohmann, and M.C. Stacey, Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 2000. **8**(1): p. 13-25.

17. Pajulo, O.T., et al., Correlation between interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 in early wound healing in children. *Wound Repair Regen*, 1999. **7**(6): p. 453-7.
18. Engelhardt, E., 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**(6): p. 1849-60.
19. Smith, P.D., et al., Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. *Journal of Surgical Research*, 2000. **92**(1): p. 11-17.
20. Karr, B.P., et al., Platelet-derived growth factor and wound contraction in the rat. *Journal of Surgical Research*, 1995. **59**(6): p. 739-742.
21. Buckmire, M.A., et al., Temporal expression of TGF-beta(1), EGF, and PDGF-BB in a model of colonic wound healing. *Journal of Surgical Research*, 1998. **80**(1): p. 52-57.
22. Tredget, E.E., et al., Transforming growth factor-beta mRNA and protein in hypertrophic scar tissues and fibroblasts: Antagonism by IFN-alpha and IFN-gamma in vitro and in vivo. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2000. **20**(2): p. 143-151.
23. Schaffer, M. and A. Barbul, Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg*, 1998. **85**(4): p. 444-60.
24. Nwomeh BC, O.O., Diegelmann RF, The basic biology of wound healing. *J Surg Pathol*, 1997. **2**: p. 143-62.

25. Nissen, N.N., et al., Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *American Journal of Pathology*, 1998. **152**(6): p. 1445-1452.
26. Nissen, N.N., et al., Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery*, 1996. **119**(4): p. 457-465.
27. Constant, J.S., et al., Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair and Regeneration*, 2000. **8**(5): p. 353-360.
28. Liu, S., Yu, Donghui, Xu, Zheng-ping, Riordan, James F., Hu, Guo-fu, Angiogenin Activates Erk1/2 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. **287**(1).
29. Rumalla, V.K. and G.L. Borah, Cytokines, growth factors, and plastic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2001. **108**(3): p. 719-733.
30. Decline, F. and P. Rousselle, Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 4): p. 811-23.
31. Pilcher, B.K., et al., The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*, 1997. **137**(6): p. 1445-57.
32. Xia, Y.P., et al., Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J Pathol*, 1999. **188**(4): p. 431-8.

33. Witte, M.B. and A. Barbul, General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 1997. **77**(3): p. 509-+.
34. Volk, S.W., et al., Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing. *Cells Tissues Organs*, 2011. **194**(1): p. 25-37.
35. Alberts B, J.A., Lewis J, et al (eds), Cell junctions, cell adhesions and the extracellular matrix, in *The Molecular Biology of the Cell* 2002, Garland: New York. p. 1091-1114.
36. Debelle, L. and A.M. Tamburro, Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. **31**(2): p. 261-72.
37. Gallo, R.L., Proteoglycans and cutaneous vascular defense and repair. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2000. **5**(1): p. 55-60.
38. Kennedy, C.I., et al., Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts. *J Pediatr Surg*, 2000. **35**(6): p. 874-9.
39. Iozzo, R.V., Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 609-52.
40. Bullard, K.M., et al., Stromelysin-1-deficient fibroblasts display impaired contraction in vitro. *J Surg Res*, 1999. **84**(1): p. 31-4.
41. Bauer, J. and L.G. Phillips, MOC-PSSM CME article: Pressure sores. *Plast Reconstr Surg*, 2008. **121**(1 Suppl): p. 1-10.
42. Raffetto, J.D. and W.A. Marston, Venous ulcer: what is new? *Plast Reconstr Surg*, 2011. **127 Suppl 1**: p. 279S-288S.

43. Greenhalgh, D.G., Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plast Surg*, 2003. **30**(1): p. 37-45.
44. Gordillo, G.M. and C.K. Sen, Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *Am J Surg*, 2003. **186**(3): p. 259-63.
45. Niinikoski, J.H., Clinical hyperbaric oxygen therapy, wound perfusion, and transcutaneous oximetry. *World J Surg*, 2004. **28**(3): p. 307-11.
46. Izadi, K. and P. Ganchi, Chronic wounds. *Clin Plast Surg*, 2005. **32**(2): p. 209-22.
47. Edwards, R. and K.G. Harding, Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis*, 2004. **17**(2): p. 91-6.
48. Heggers, J.P., Assessing and controlling wound infection. *Clin Plast Surg*, 2003. **30**(1): p. 25-35, v.
49. Yuan-Innes, M.J., C.L. Temple, and M.S. Lacey, Vacuum-assisted wound closure: a new approach to spinal wounds with exposed hardware. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001. **26**(3): p. E30-3.
50. Burns, J.L., J.S. Mancoll, and L.G. Phillips, Impairments to wound healing. *Clin Plast Surg*, 2003. **30**(1): p. 47-56.
51. Sterchi, E.E., W. Stocker, and J.S. Bond, Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 2008. **29**(5): p. 309-28.
52. Woessner, J.F., Jr., The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **732**: p. 11-21.

53. Moali, C. and D.J.S. Hulmes, Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging. *European Journal of Dermatology*, 2009. **19**(6): p. 552-564.
54. Parks, W.C., Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen*, 1999. **7**(6): p. 423-32.
55. Aiba-Kojima, E., et al., Characterization of wound drainage fluids as a source of soluble factors associated with wound healing: comparison with platelet-rich plasma and potential use in cell culture. *Wound Repair and Regeneration*, 2007. **15**(4): p. 511-520.
56. Knauper, V., et al., Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem*, 1996. **271**(3): p. 1544-50.
57. Mitchell, P.G., et al., Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 1996. **97**(3): p. 761-8.
58. Saarialho-Kere, U.K., Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res*, 1998. **290**: p. S47-S54.
59. Halpert, I., et al., Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9748-53.
60. Mackay, A.R., et al., Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J Biol Chem*, 1990. **265**(35): p. 21929-34.

61. Iwanami, H., et al., Expression of matrix metalloproteinases (MMP)-12 by myofibroblasts during alkali-burned corneal wound healing. *Curr Eye Res*, 2009. **34**(3): p. 207-14.
62. Pendas, A.M., et al., Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem*, 1997. **272**(7): p. 4281-6.
63. Vaalamo, M., et al., Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 1997. **109**(1): p. 96-101.
64. Vaalamo, M., T. Leivo, and U. Saarialho-Kere, Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1,-2,-3, and-4) in normal and aberrant wound healing. *Human Pathology*, 1999. **30**(7): p. 795-802.
65. Hahm, G., J.J. Glaser, and E.A. Elster, Biomarkers to Predict Wound Healing: The Future of Complex War Wound Management. *Plast Reconstr Surg*, 2011. **127**(1): p. 21S-26S.
66. Ladwig, G.P., et al., Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen*, 2002. **10**(1): p. 26-37.

67. Utz, E.R., et al., Metalloproteinase Expression is Associated with Traumatic Wound Failure. *Journal of Surgical Research*, 2010. **159**(2): p. 633-639.
68. Hawksworth, J.S., et al., Inflammatory biomarkers in combat wound healing. *Ann Surg*, 2009. **250**(6): p. 1002-7.
69. Camacho, L.M., S. Deng, and R.R. Parra, Uranium removal from groundwater by natural clinoptilolite zeolite: effects of pH and initial feed concentration. *J Hazard Mater*, 2010. **175**(1-3): p. 393-8.
70. Doula, M.K., Simultaneous removal of Cu, Mn and Zn from drinking water with the use of clinoptilolite and its Fe-modified form. *Water Research*, 2009. **43**(15): p. 3659-3672.
71. Pavelic K, H.M., Medical applications of zeolites, in *Handbook of Zeolite Science and Technology*, C.K. Auerbach SM, Dutta PK, Editor 2003, Dekker: New York. p. 1143-1174.
72. Haidouti, C., Inactivation of mercury in contaminated soils using natural zeolites. *Science of the Total Environment*, 1997. **208**(1-2): p. 105-109.
73. Katsoulos, P.D., et al., Effect of long-term dietary supplementation with clinoptilolite on performance and selected serum biochemical values in dairy goats. *Am J Vet Res*, 2009. **70**(3): p. 346-52.
74. Olver, M.D., Effect of feeding clinoptilolite (zeolite) on the performance of three strains of laying hens. *British Poultry Science*, 1997. **38**(2): p. 220-222.

75. Oguz, H., et al., Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *Research in Veterinary Science*, 2000. **69**(1): p. 89-93.
76. Matsuura, T., et al., Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *J Dent*, 1997. **25**(5): p. 373-7.
77. Nikawa, H., et al., Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1997. **24**(5): p. 350-357.
78. Keeting, P.E., et al., Zeolite A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res*, 1992. **7**(11): p. 1281-9.
79. G. Rodriguez-Fuentes, M.A.B., A. Iraizoz, and I. Perdomo, B. CedrC, Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. zeolites, 1997. **19**: p. 441-8.
80. Rivera, A., G. Rodriguez-Fuentes, and E. Altshuler, Characterization and neutralizing properties of a natural zeolite/ Na_2CO_3 composite material. *Microporous and Mesoporous Materials*, 1998. **24**(1-3): p. 51-58.
81. Lam, A., et al., Theoretical study of the physical adsorption of aspirin on natural clinoptilolite. *Microporous and Mesoporous Materials*, 1998. **23**(5-6): p. 247-252.
82. Sanchez-Roman, J., et al., Multiple clinical and biological autoimmune manifestations in 50 workers after occupational exposure to silica. *Ann Rheum Dis*, 1993. **52**(7): p. 534-8.

83. Colic, M. and K. Pavelic, Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J Mol Med (Berl)*, 2000. **78**(6): p. 333-6.
84. Liu, H., et al., Conventional antigen and superantigen may be coupled to distinct and cooperative T-cell activation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(19): p. 8705-9.
85. Kuge, S., et al., Superantigen-induced human CD4⁺ helper/killer T cell phenomenon. Selective induction of Th1 helper/killer T cells and application to tumor immunotherapy. *J Immunol*, 1995. **154**(4): p. 1777-85.
86. Papaccio, G., B. De Luca, and F.A. Pisanti, Macrophages and antioxidant status in the NOD mouse pancreas. *J Cell Biochem*, 1998. **71**(4): p. 479-90.
87. Martin, L.D., et al., The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environmental Health Perspectives*, 1997. **105**: p. 1301-1307.
88. Pavelic, K., et al., Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2002. **128**(1): p. 37-44.
89. Lim, Y., et al., Involvement of protein kinase C, phospholipase C, and protein tyrosine kinase pathways in oxygen radical generation by asbestos-stimulated alveolar macrophage. *Environ Health Perspect*, 1997. **105 Suppl 5**: p. 1325-7.

90. Ueki, A., et al., Polyclonal human T-cell activation by silicate in vitro. *Immunology*, 1994. **82**(2): p. 332-5.
91. Concepcion-Rosabal, B., J. Balmaceda-Era, and G. Rodriguez-Fuentes, Characterization of Fe²⁺-containing natural clinoptilolite and its interaction with saccharides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2000. **38**(2-3): p. 161-166.
92. Concepción-Rosabal B, R.-F.G., Simón-Carballo R, Development and Featuring of the Zeolitic Active Principle FZ: A Glucose Adsorbent. *Zeolites*, 1997. **19**(1): p. 47-50.
93. Rubin, D.L., et al., A multicenter clinical trial of Gadolite Oral Suspension as a contrast agent for MRI. *Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 1997. **7**(5): p. 865-872.
94. Shen, B., J.C. Scaiano, and A.M. English, Zeolite encapsulation decreases TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol*, 2006. **82**(1): p. 5-12.
95. Martin-Kleiner, I., et al., The effect of the zeolite clinoptilolite on serum chemistry and hematopoiesis in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2001. **39**(7): p. 717-27.
96. Eryilmaz, M., et al., Is the zeolite hemostatic agent beneficial in reducing blood loss during arterial injury? *Ulusal Travma Ve Acil Cerrahi Dergisi-Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, 2009. **15**(1): p. 7-11.
97. Elmore, A.R., Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate,

magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgite, bentonite, Fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite. *Int J Toxicol*, 2003. **22 Suppl 1**: p. 37-102.

98. Tatrai, E. and G. Ungvary, Study on carcinogenicity of clinoptilolite type zeolite in Wistar rats. *Pol J Occup Med Environ Health*, 1993. **6**(1): p. 27-34.
99. Cerri, G., et al., Zeolites in biomedical application: Zn-exchanged clinoptilolite-rich rock as active carrier for antibiotics in anti-acne topical therapy. *Applied Clay Science*, 2004. **27**(3-4): p. 141-150.
100. Adamis, Z., et al., In vitro and in vivo tests for determination of the pathogenicity of quartz, diatomaceous earth, mordenite and clinoptilolite. *Ann Occup Hyg*, 2000. **44**(1): p. 67-74.
101. McFarlane, R.M., et al., A Study of the Delay Phenomenon in Experimental Pedicle Flaps. *Plast Reconstr Surg*, 1965. **35**: p. 245-62.
102. Schwarz, D.A., W.J. Lindblad, and R.R. Rees, Altered collagen metabolism and delayed healing in a novel model of ischemic wounds. *Wound Repair Regen*, 1995. **3**(2): p. 204-12.
103. Canapp, S.O., Jr., et al., The effect of topical tripeptide-copper complex on healing of ischemic open wounds. *Vet Surg*, 2003. **32**(6): p. 515-23.
104. Chen, C., et al., Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wounds as a model for human chronic wounds. *Wound Repair Regen*, 1999. **7**(6): p. 486-94.

105. Gould, L.J., et al., Optimization and validation of an ischemic wound model. *Wound Repair Regen*, 2005. **13**(6): p. 576-82.
106. Norfleet, A.M., et al., Thrombin peptide TP508 accelerates closure of dermal excisions in animal tissue with surgically induced ischemia. *Wound Repair Regen*, 2000. **8**(6): p. 517-29.
107. Roy, S., et al., Characterization of a preclinical model of chronic ischemic wound. *Physiol Genomics*, 2009. **37**(3): p. 211-24.
108. Rees, R., et al., The Stress-Response in Skin - the Role of Neutrophil Products in Preconditioning. *Plast Reconstr Surg*, 1993. **92**(1): p. 110-117.
109. Kopal, C., et al., Effects of topical glutathione treatment in rat ischemic wound model. *Ann Plast Surg*, 2007. **58**(4): p. 449-55.
110. Barone, E.J., et al., Interleukin-1alpha and collagenase activity are elevated in chronic wounds. *Plast Reconstr Surg*, 1998. **102**(4): p. 1023-7; discussion 1028-9.
111. Grinnell, F. and M. Zhu, Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol*, 1996. **106**(2): p. 335-41.
112. Dodd, H.J., P.M. Gaylarde, and I. Sarkany, Skin oxygen tension in venous insufficiency of the lower leg. *J R Soc Med*, 1985. **78**(5): p. 373-6.
113. O'Toole, E.A., et al., Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. *Exp Cell Res*, 1997. **233**(2): p. 330-9.

114. Ulrich, D., et al., TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. *Plast Reconstr Surg*, 2003. **111**(4): p. 1423-31.
115. Nwomeh, B.C., et al., Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Repair Regen*, 1998. **6**(2): p. 127-34.
116. Czyz, C.N., et al., Efficacy of pulsed electromagnetic energy in postoperative recovery from blepharoplasty. *Dermatol Surg*, 2012. **38**(3): p. 445-50.
117. Ennis, W.J., et al., Current Status of the Use of Modalities in Wound Care: Electrical Stimulation and Ultrasound Therapy. *Plast Reconstr Surg*, 2011. **127**(1): p. 93S-102S.
118. Robert Goldman, M.M.R., MD; Barbara Brewley, RNC, CRC; and Michael Golden, MD, Electrotherapy Promotes Healing and Microcirculation of Infrapopliteal Ischemic Wounds: A Prospective Pilot Study. *ADV SKIN WOUND CARE*, 2004. **17**: p. 284-94.
119. Suissa, D., A. Danino, and A. Nikolis, Negative-pressure therapy versus standard wound care: a meta-analysis of randomized trials. *Plast Reconstr Surg*, 2011. **128**(5): p. 498e-503e.
120. Dat, A.D., et al., Aloe vera for treating acute and chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. **2**: p. CD008762.

121. Goel, A., et al., Wound healing potential of *Ocimum sanctum* Linn. with induction of tumor necrosis factor-alpha. *Indian J Exp Biol*, 2010. **48**(4): p. 402-6.
122. Jull, A.B., A. Rodgers, and N. Walker, Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2008(4).
123. Ivkovic, S., et al., Dietary supplementation with the tribomechanically activated zeolite clinoptilolite in immunodeficiency: Effects on the immune system. *Advances in Therapy*, 2004. **21**(2): p. 135-147.
124. Jung, B.G., et al., Dietary aluminosilicate supplement enhances immune activity in mice and reinforces clearance of porcine circovirus type 2 in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol*, 2010. **143**(2-4): p. 117-25.