



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**RATLARDA TIBBİ SÜLÜK VE TIBBİ SÜLÜK SALGI
EKSTRAKTININ İNSİZYONEL YARA İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

NURMUKHAMAD KHUSAINOV

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

OCAK 2024



**RATLARDA TIBBİ SÜLÜK VE TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKTININ
İNSİZYONEL YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Nurmukhamad KHUSAINOV

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2024

Nurmukhamad KHUSAINOV tarafından hazırlanan ‘‘RATLARDA TIBBİ SÜLÜK VE TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKTININ İNSİZYONEL YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi TIBBİ BİYOKİMYA Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Kübranur ÜNAL

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Didem Tuba AKÇALI

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Aysun BARANSEL ISIR

Adli Tıp Anabilim Dalı, Gaziantep Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 09/01/2024

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Advıye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nurmukhamad KHUSAINOV

09/01/2024

RATLARDA TIBBİ SÜLÜK VE TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKTININ İNSİZYONEL YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nurmukhamad KHUSAINOV

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2024

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda insizyonel yara oluşturulmuş ratlarda tıbbi sülük ve tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulamasının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin in vivo şekilde araştırılması amaçlandı. **Yöntem:** Çalışmada Hirudo verbana türü steril tıbbi sülüklerden sağım yöntemi ile elde edilen sülük salgı ekstraktında, Bradford yöntemi ile total protein konsantrasyonu tayin edildi (50µg/ml). Çalışma, 250 ± 30 g vücut ağırlıklarına sahip 24 adet dişi rat ile yürütüldü. Ratların dorsal bölgelerine 2 cm boyutlarında tam insizyonel kesi yapıldı. I (sülük), II (tıbbi sülük salgısı), III (fagostimülatör solüsyon) ve IV (kontrol) olmak üzere dört deney grubu tanımlandı. Postoperatif 7. günde tüm hayvanlar sakrifiye edildi. Ardından biyokimyasal, histolojik ve immünohistopatolojik yöntemler için kan ve doku örnekleri alındı. **Bulgular:** Morfolojik bulgular, Sülük ve SSE gruplarında hızlanmış yara iyileşmesi ve artmış kıl büyümesini ortaya koydu. Histopatolojik analiz, SSE (II) grubunun diğer gruplara kıyasla üstün bir iyileşme süreci sergilediğini gösterdi. SSE ile tedavi edilen sıçanlarda epitel rejenerasyonu, granülasyon dokusu kalınlığı, fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon skorları önemli ölçüde arttı ($p < 0,05$). Ayrıca, VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) Grup III'te belirgin bir şekilde daha yüksekti, bu da gözlemlenen iyileşme süreçlerinde VEGF'nin potansiyel bir rolünü işaret ediyor olabilir. ELISA yöntemi ile ölçülen; serum, distal doku ve proksimal doku örneklerine ait HIF1- α , TGF- α ve IGF-1 parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu, ($p > 0,05$). **Sonuç:** Histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile araştırılan epitel rejenerasyonu, granülasyon dokusu kalınlığı, neovaskülarizasyon bulguları ve VEGF (+) hücre sayısı SSE (II) grubunda en üst seviyede izlendi.

Bilim Kodu : 1090
Anahtar Kelimeler : İnsizyonel yara, Tıbbi sülük tedavisi, Tıbbi sülük salgısı,
Yara iyileşmesi
Sayfa Adedi : 78
Danışman : Doç. Dr. Kübranur ÜNAL

EFFECT OF MEDICINAL LEECH AND MEDICINAL LEECH SECRETION
EXTRACT ON INCISIONAL WOUND HEALING IN RATS

(M. Sc. Thesis)

Nurmukhamad KHUSAINOV

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2024

ABSTRACT

Objective: Our study aimed to investigate the effects of medicinal leech and medicinal leech saliva extract applications on wound healing in rats with an incisional wound. **Methods:** The saliva extract (50µg/ml) of *Hirudo verbana* species was obtained using the milking method via phagostimulatory solution. The study was conducted with 24 female rats weighing 250 ± 30 g. A 2 cm incisional cut was made on the dorsal regions of the rats. Four experimental groups were defined as I (leech), II (leech saliva extract), III (phagostimulatory solution), and IV (control). On the seventh postoperative day, all animals were sacrificed. Blood and tissue samples were then collected for experimental evaluations. **Results:** Morphological findings indicated accelerated wound healing and increased hair growth in the Leech and LSE groups. Histopathological analysis showed that the LSE (II) group exhibited a superior healing process compared to the other groups. In rats treated with LSE, epithelial regeneration, granulation tissue thickness, fibroblast proliferation, and neovascularization scores were significantly increased ($p < 0.05$). Moreover, the percentage of VEGF (+) cells was significantly higher in Group II, indicating a potential role of VEGF in the observed healing processes. There was no significant difference between the groups regarding HIF1- α , TGF- α , and IGF-1 parameters measured by the ELISA method for serum, distal tissue, and proximal tissue samples ($p > 0.05$). **Conclusion:** Epithelial regeneration, granulation tissue thickness, neovascularization, and the number of VEGF (+) cells investigated by histopathological and immunohistochemical methods were observed at the highest level in the LSE (II) group.

Science Code : 1090

Key Words : Incisional wound, Medical leech therapy, Medical leech saliva,
Wound healing

Page Number : 78

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Kübranur ÜNAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca insani, ahlaki ve mesleki değerleri ile örnek aldığım, her konuda her zaman desteğini gördüğüm, üzerimde büyük emekleri olan, çalışma sürecimiz boyunca süregelen hoşgörü, sabır ve yardımlarını unutmayacağım, Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapan, Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Kübranur ÜNAL'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamızda, mesleki bilgilerinden yararlanma fırsatı bulduğum, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu DAYANIR'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca, ekip olmanın zorluğunu ve zevkini birlikte yaşadığım, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve birikiminden sonsuz faydalandığım, deneysel aşamalarda yardımlarını esirgemeyen, Arş. Gör. Dr. Leyla İBRAHİM KHALILI'ya, Uzm. Bio. Mehmet Emre EROL'a ve Bio. Başak SAMUR'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi-manevi desteklerini bir an olsun üzerimden eksik etmeyen, başta annem ve babam olmak üzere; çok kıymetli aile üyelerime ve ayrıca dayım, Doç. Dr. Sultanberk HALMATOV'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

TYL-2023-8867 no.lu proje ile tezimi destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim. Ayrıca, çalışma süresince desteklerini esirgemeyen GÜDAM sorumlularına da teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yara Çeşitleri	3
2.2. Yara İyileşmesi.....	4
2.2.1. Yara iyileşmesi aşamaları	5
2.2.2. Hemostaz ve inflamasyon fazı.....	7
2.2.3. Proliferasyon veya granülasyon fazı.....	7
2.2.4. Maturasyon ve remodeling	8
2.3. Anjiyogenez	9
2.3.1. Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)	9
2.4. Büyüme Faktörleri (Growth Factors - GFs).....	10
2.4.1. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF).....	11
2.4.2. Transforming büyüme faktörü (TGF).....	12
2.4.3. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF).....	12
2.5. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri.....	13
2.5.1. Tıbbi sülüklerin tarihçesi	14

	Sayfa
2.5.2. <i>Hirudo verbana</i> 'nın genel özellikleri	16
2.5.3. Tıbbi sülüklerin etki mekanizmaları	18
2.5.4. Tıbbi sülüklerin salgısında bulunan biyoaktif maddeler	19
2.5.5. Tıbbi sülüklerin medikal kullanım alanları	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Tıbbi Sülüklerin Temini	25
3.1.1. Deneyde kullanılan sülükler ve prosedür	25
3.1.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktının elde edilmesi	25
3.1.3. Tıbbi sülük salgısında total protein tayini	26
3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Laboratuvar Koşulları	28
3.3. Cerrahi Yöntem ve İnsizyonel Yara Modeli	29
3.4. Deney Grupları	30
3.4.1. Tıbbi sülük uygulaması	31
3.4.2. SSE enjeksiyonu	32
3.4.3. FSS enjeksiyonu	32
3.5. Diseksiyon	33
3.7. İmmünohistokimyasal İncelemeler	34
3.8. Doku Homojenizasyonu	34
3.9. ELİSA Yöntemi ve Prensibi	35
3.9.1. Standartların hazırlanması	35
3.9.2. Testin yapılışı	36
3.10. İstatistiksel Yöntem	38
4. BULGULAR	39
4.1. Biyokimyasal Bulgular	39
4.1.1. Serum örneklerine ait bulgular	39
4.1.2. Doku örneklerine ait bulgular	42

	Sayfa
4.2. Histopatolojik bulgular.....	45
4.2.1. Epitel rejenerasyon	50
4.2.2. Granülasyon doku kalınlığı	51
4.2.3. Fibroblast proliferasyonu.....	52
4.2.4. Neovaskülarizasyon.....	53
4.2.5. İnflamatuvar hücre varlığı	54
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	55
4.3.1. VEGF (+) hücre yüzdesi (%).....	55
4.4. İnsizyonel Yara İyileşmesinin Makroskopik Değerlendirilmesi.....	56
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
6.1. Sonuçlar.....	65
KAYNAKLAR	67
EKLER.....	75
ÖZGEÇMİŞ	78

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Etkene göre yara çeşitleri.....	4
Çizelge 2.2. Yara iyileşmesinde etkili büyüme faktörleri.....	10
Çizelge 2.3. Tıbbi sülük salgısının temel etki mekanizmaları	22
Çizelge 4.1. Serum örneklerinde biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması	39
Çizelge 4.2. Doku örneklerinde biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması.....	42
Çizelge 4.3. Histopatolojik parametrelerin skor sonuçları.....	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşme dönemleri ve bu dönemlerde etkili hücre tipleri	6
Şekil 3.1. Sülük salgı ekstraktında total protein tayini	28
Şekil 3.2. Deney Grupları	31
Şekil 3.3. HIF-1- α standart grafiği	37
Şekil 3.4. TGF- α standart grafiği	37
Şekil 3.5. IGF-1 standart grafiği	38
Şekil 4.1. Serum örneklerindeki HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.2. Serum örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.3. Serum örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.4. İnsizyonel doku homojenatlarında HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.5. İnsizyonel doku örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.6. İnsizyonel doku örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.7. İnsizyonel yara dokusunda epitel rejenerasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.8. İnsizyonel yara dokusunda granülasyon doku kalınlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.9. İnsizyonel yara dokusunda fibroblast proliferasyonu skorunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.10. İnsizyonel yara dokusunda neovaskülarizasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.11. İnsizyonel yara dokusunda inflamatuvar hücre varlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.12. İnsizyonel yara dokusunda VEGF (+) hücre yüzdesi (%) skorunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	56

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Hirudo verbana</i> türüne ait tıbbi sülükler	17
Resim 2.2. <i>Hirudo verbana</i> 'nın anterior ve posterior çekmenlerinin stereozoom ve elektron mikroskobu görünümü	18
Resim 3.1. Fagostimülatör solüsyon ile beslenmeleri sırasında tıbbi sülükler	26
Resim 3.2. Deney hayvanlarının dorsal bölgelerinde yapılan insizyonel operasyon	29
Resim 3.3. Vertikal tam kat insizyonel kesiye steril tıbbi sülük uygulaması	32
Resim 3.4. Vertikal tam kat insizyonel kesiye tıbbi sülük salgısı enjeksiyonu	32
Resim 4.1. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulanan insizyonel yara dokusu örneklerinin görünümü.....	47
Resim 4.2. Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan insizyonel yara dokusu örneklerinin görünümü.....	48
Resim 4.3. İnsizyonel yara dokusu örneklerinin immünohistokimyasal yöntem sonuçları	49
Resim 4.4. Postoperatif 71 gün, insizyonel yara iyileşmesi. (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

ADP	Adenozin 5 'Difosfat
DAB	Diaminobenzedin
DM	Diabetes Mellitus
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FDA-USA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FSS	Fagostmülatör Solüsyon
G-CSF	Granülosit-Koloni Stimülan Faktör
GF's	Büyüme Faktörleri
GH	Büyüme Hormonu
GM-CSF	Granülosit Makrofaj-Koloni Stimülan Faktör
HIF	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
IFN-γ	İnterferon Gamma
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

Kısaltmalar	Açıklamalar
IL-1	İnterlökin 1
IL-2	İnterlökin-2
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IR	İskemi-Reperfüzyon
KGF	Keratinosit Büyüme Faktörü
LDTI	Sülük Türevi Triptaz İnhibitörü
MCP-1	Monosit Kemotaktik Protein 1
MIP-1α	Makrofaj İnflamatuvar Protein-1 α
NAP-2	Nötrofil Aktive Edici Peptit 2
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NO	Nitrik Oksit
OD	Optik Yoğunluk
PAF	Trombosit Aktive Edici Faktör
PAFA	Trombosit Aktive Edici Faktör Antagonisti
PBS	Fosfat Tampon Salin
PDGF	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PLGF	Plasental Büyüme Faktörü
SSE	Sülük Salgı Ekstraktı
TGF	Transforming (Dönüştürücü) Büyüme Faktörü
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEPF	Vasküler Endotelyal Permeabilite Faktörü
vWF F	von Willebrand Faktörü

1. GİRİŞ

Yara, vücudun iç veya dış yüzeyinde dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün fiziksel, kimyasal, cerrahi ya da mikroskobik veya herhangi bir sebeple bozulması veya doku kaybı ile birlikte dokunun fizyolojik özelliklerinin kısmen veya tamamen bozulmasıdır. Doku hasarına yanıt olarak organizmada ortaya çıkan yara iyileşmesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, kollajen oluşumu, ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin sentezi, maturasyon, remodeling ve epitelizasyon gibi birbirinden net sınırlarla ayrılamayan karmaşık süreçlerin bütünüdür. Yaraların tedavisi; yaranın türüne, büyüklüğüne, yerine, enfeksiyon durumuna ve altta yatan hastalığa göre değişebilir. Buna ek olarak piyasada yara tedavisinde kullanılan ekipmanlar oldukça zor temin edilebilmektedir ve bu durumda maliyeti arttırmaktadır [1].

Modern yara bakımında esas olan yarayı doğru sınıflandırmak ve yara iyileşmesi için uygun koşulları sağlayarak tedaviyi desteklemektir. Yara iyileşmesini sağlayabilmek için modern tıbbın yanı sıra dünya çapında geleneksel ve tamamlayıcı tıp yeniden popülerleşmektedir. Tıbbi sülük tedavisi (hirudoterapi), yara iyileşmesinde kullanılan geleneksel tıp yöntemlerinden birisidir. Tıbbi Sülük tedavisinin ilk kez ne zaman kullanıldığı ile ilgili kesin kaynaklar bulunmamasına rağmen Mısır, Antik Yunan, Hint, Pers, Çin, Arap ve Anadolu medeniyetlerinin en eski yazıtlarında ve Osmanlı döneminde tıbbi sülük kullanımına rastlanmıştır. Tıbbi sülükler tıp tarihinde belgelenmiş en eski yara iyileştirme metotlarından biridir [2].

Günümüzde tıp alanındaki geniş kullanım olanakları nedeniyle bilim alanında dikkatleri çeken tıbbi sülük salgısı yara iyileşme sürecinde çok büyük etkiler göstermektedir [3]. Sülüklerin kan emmeleri sırasında ısırıkları dokuya vermiş oldukları salgısında 100'den fazla peptid ve protein yapıdaki, farmakolojik ve biyolojik açıdan pek çok sayıda etkili biyoaktif bileşikler; analjezik, anti-koagülan, anti-inflamatuvar, vazodilatör, miyorelaksan, immün modülatör, vasküler sirkülasyon düzenleyici, ağrı olaylarını giderici, hipoksi giderici ve kan basıncını düzenleyici gibi bir ilaç benzeri farklı etkiler oluşturmaktadırlar. Bu bileşikler, yara bölgesinde kan akışını artırarak, iltihabı azaltarak, ağrıyı gidererek, enfeksiyonu önleyerek ve yeni damar oluşumunu teşvik ederek yara iyileşmesine katkıda bulunurlar [2, 4]. Tıbbi sülüklerin salgısında bulunan calin, hirudin, destabilaz, hirustasin, bdellin, hyaluronidaz, eglin, triptaz inhibitörü, faktör Xa inhibitörü, asetilkolin, apiraz,

kollajenaz, kompleman inhibitörleri, karboksipeptidaz A inhibitörleri, histamin benzeri maddeler ve anesteziik maddeler yara iyileşmesi için çok önemli bir yere sahip olabilir [5, 6].

Bir insizyonel cilt yarası, cerrahi bir kesi sonucunda oluşan bir yara türüdür. Cerrahi işlem sırasında, deri ve altındaki dokular kesilir ve daha sonra dikiş veya klipsler ile kapatılır. Bu kesi bölgesinde, doku bütünlüğü bozulduğu için bir yara oluşur. Sülüklerin, kan pıhtılaşmasını bloke ederek konakçılardan beslenmek için oldukça spesifik mekanizmalar geliştirdikleri için, yara iyileşme sürecinde tedavi etmek için yararlı bir ilaç kaynağı olduğu kanıtlanmıştır [7, 8].

Bu çalışmada; insizyonel yara bölgesinde tıbbi sülüklerin ve tıbbi sülük salgı ekstraktının, yara iyileşmesi üzerindeki olası etkilerine biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara Çeşitleri

Yara, dokunun fonksiyonel ve anatomik bütünlüğünün fiziksel, kimyasal, cerrahi veya mikroskobik nedenlerle bozulması veya doku kaybı ile birlikte dokunun fizyolojik özelliklerinin kısmen veya tamamen bozulmasıdır. Yara terimi, bazen erozyon ve ülser gibi ifadelerle de anlatılabilir. Yaraların iyileşme süreleri kişiden kişiye ve yaranın özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Makul bir süre içinde iyileşmeyen yaralar, yavaş ya da sınırlı ilerleme gösteren yaralar kronik olarak isimlendirilebilir. İlerleme, hastaların genel sağlık durumundan, yaranın nedenine ve tedaviye kadar pek çok faktöre bağlıdır. Postoperatif yara bakımında, temel prensipler haricinde standart bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Her yara kendi özelliklerine göre değerlendirilmeli ve tedavi edilmelidir. Postoperatif dönemde yara bakımına başlarken dikkat edilmesi gerekli noktalar; yaranın türü, yaranın lokalizasyonu, peroperatif kontaminasyon derecesi, hastanın hemodinamik stabilitesidir. Yara iyileşmesi, skar gelişimi ve komplikasyonları multifaktöriyel, oldukça karışık patofizyolojik komponentleri içerir [9, 10].

Yaralar; etkenine göre, yara oluşma mekanizmasına göre, akut ya da kronik sürecine göre sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1). Akut yaraların yapım ve yıkım fazları birbirleri ile dengeli bir şekilde süre gelirken, kronik yaralarda bu denge bozularak katabolik süreç ön plana çıkmaktadır. Kronik yaralarda sıklıkla inflamatuvar evrede uzama gerçekleşmektedir. Bu yüzden kronik yaralarda iyileşme süreci uzamakta ya da iyileşme gerçekleşmemektedir [11, 12]. Laserasyon, insizyon, abrazyon, penetrasyon, yanık gibi yara çeşitleri akut yara sınıfına girerken; diyabetik ayak yaraları, dekübit ülserleri, venöz ülserler, iskemik ülserler gibi yaralanmalarda kronik yaralar sınıfı içerisinde yer almaktadır.

İnsizyon: Keskin uçlu nesnelere tarafından oluşturulan yaralar ya da cerrahi yaralar bu gruba girmektedir. Bu tür yaralarda derinin fasya tabakası hasarlı ve yara ağzı açıktır. Yara kontaminasyon riski diğer yaralara göre daha nadirdir [13]. Laserasyon (yırtık): Özellikle künt cisimlerle ya da kuvvetin cilde penetrasyonu ile meydana gelen, cildin bütün katmanlarını etkileyen doku yırtığı şeklindeki yaralardır. Etkilenen cilt bölgesi geniş, yara dudakları çok parçalı, ölü doku miktarı düz kesilere göre fazladır. Kontaminasyon ve enfeksiyon riski yüksektir [14].

Abrazyon (sıyrık): Derinin süperfisiyal epitel tabakasının pürüzlü-düzensiz yüzeye sürtünmesiyle epidermisin kaybı ile oluşan yüzeysel yaralardır.

Delici yaralar: İğne gibi sivri uçlu nesnelere neden olduğu yaralardır.

Penetrasyon yaraları: Bıçak benzeri keskin objelerin vücut bütünlüğünü bozması ile oluşan yaralardır [12, 14].

Yanıklar: Yanık; kimyasal maddeler, elektrik, ısı veya radyoaktif ışınlar ile meydana gelen doku harabiyetidir.

Diyabetik ayak yaraları: Kan glikoz değerlerinin yüksek olması; büyüme faktörlerinin üretiminin azalması, anjiyojenik yanık bozulması, makrofaj fonksiyonunun bozulması, kollajen üretiminde azalma, fibroblast fonksiyonunda ve proliferasyonunda bozulma, ekstrasellüler matriks komponentlerinin üretiminde azalma nedeni ile yara iyileşmesinin bozulmasına neden olur. Tüm bunlara bağlı olarak Diabetes Mellitus (DM) hastalarında; nöropati, vaskülopati, iskemi ve ülserlere neden olabilir. Dekübit ülserleri: Genellikle bir dış yüzey ile kemik çıkıntı arasındaki yumuşak dokunun sıkışması sonucu ortaya çıkan lokalize doku nekrozu bölgesidir.

Venöz ülserler: Kronik venöz yetmezlik sonrası alt ekstremitelerde gelişir [11].

Çizelge 2.1. Etkene göre yara çeşitleri

Yara Çeşitleri	Etken
Vasküler Nedenli Yaralar	Ateroskleroz, vaskülitler, embolizm ve damar anomalileri, arteriyel yetmezlik ve venöz yetmezlik sonucu oluşan yaralar
Travmatik Yaralar	İnsizyon, laserasyon, abrazyon, avülsiyon, ateşli silah yaralanmaları, açık kırıklar
Nörojenik Yaralar	Duyu ve nöropatik bozukluklar
Basınç Yaraları, Termal Yaralar	Hayvan ısırıkları ile oluşan yaralar, hastalık nedeni ile oluşan yaralar

2.2. Yara İyileşmesi

Yaranın iyileşmesi, hasar görmüş olayların bütünlüğü ve fonksiyonun geri kazanılması için bir dizi kompleks süreci içerir. Bu süreçte birçok hücre ve bu hücreleri ürettikleri sitokinler

ve mediyatörler önemli bir rol oynar. Bu değişim, yaranın dönmesiyle doku yenilenmesini sağlar ve iyileşme sürecinin başlamasını sağlar [15]. Bu süreçte birçok mediyatör, parankimal hücreler, ekstrasellüler matriks elemanları ve kanın şekilli elemanları görev almaktadır. Hasar görmüş bir dokudaki yara iyileşmesi yaralanmanın şiddetine ve yaraya sebep olan etkene bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Aynı zamanda bireyin yaşı, sağlık durumu ve metabolizması gibi lokal ve sistemik faktörlerde yara iyileşme mekanizmasında ve sürecinde farklılıklara neden olabilmektedir. Bu sürecin herhangi bir aşamasında meydana gelen aksaklık veya süreci bozan bir etken yara iyileşmesinde gecikmeye ve yaranın geç kapanmasına veya kapanmamasına neden olabilmektedir [16].

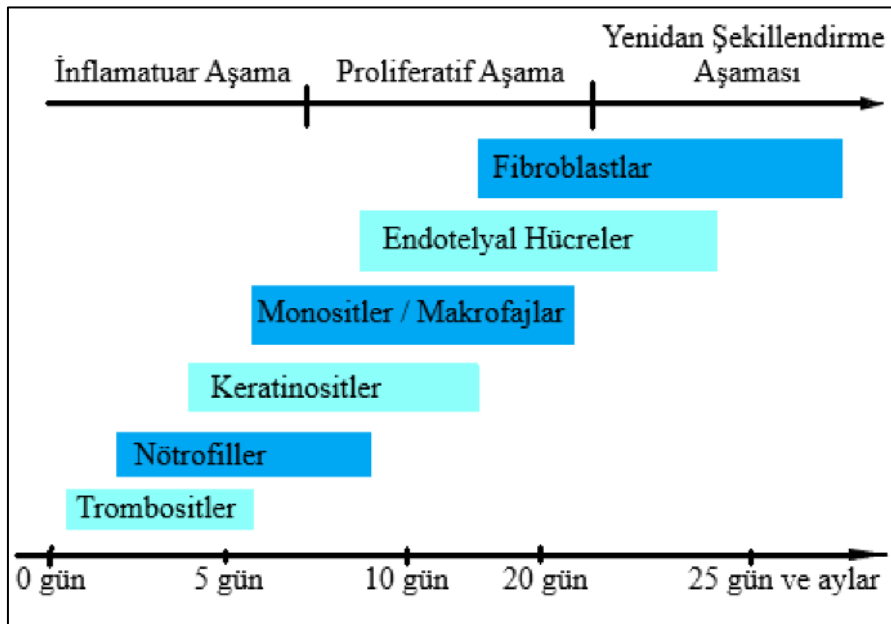
Primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere 3 tip yara iyileşmesi vardır. Primer İyileşme: Belirgin bir kontaminasyon riski bulunmadığında, yara oluşumundan birkaç saat içinde meydana gelen iyileşmedir. Primer iyileşme, yara dudaklarının doğrudan birleştirilmesiyle gerçekleşir ve genellikle hızlı bir iyileşme süreci sunar. Bu süreç, yaraların birleşmesini kolaylaştırarak doku yenilenmesini teşvik eder [11, 17]. Sekonder İyileşme: Doku kaybının olduğu yaralarda, bazen cerrahi bir işlem yapılmadan yaranın açık bırakılarak iyileşme sürecidir. Bu iyileşme türü, granülasyon yapısının oluşumuyla başlar ve ardından yara kontraksiyonu ve epitelizasyonuyla devam eder. Granül oluşumu dokusu, yara yüzeyini kaplayan yeni doku oluşumunu ifade eder. Yara kontraksiyonu ise yara parçalarının bir araya gelerek yaranın daralmasını sağlar. Son olarak, epitelizasyon süreciyle yara yüzeyi epitel sistemi tarafından kaplanır ve iyileşme tamamlanır. Bu yöntem, cerrahi olarak değiştirilemeyen bir yöntemle kullanılabilir. Tersiyer İyileşme: Geniş doku yaralanmaları veya ciddi bakteri kontaminasyonu durumlarında, yara sıcaklığını önlemek için bazen yara iyileşmeden önce bırakılır ve daha sonra uygun koşullar sağlandığında yara primer olarak kapatılır. Bu iyileştirme türüne tersiyer iyileşme veya gecikmiş primer iyileştirme adı verilir. Sekonder iyileşme sürecinde, yara açık bırakılır ve granülasyon oluşumu, yara kontraksiyonu ve epitelizasyon gibi doğal olarak büyür. Daha sonra, Sıcaklık riski azaldığında veya doku iyileşmesi ilerlediğinde, yara primer olarak kapatılır. Bu yöntem, kişisel verilerin korunması ve daha iyi bir iyileştirme sağlamak için kullanılabilir [11, 17].

2.2.1. Yara iyileşmesi aşamaları

Yara iyileşmesi, vücudun doku bütünlüğünü yeniden oluşturmak için başlattığı fizyolojik bir süreçtir. Yara iyileşmesi, bir dizi karmaşık olayın bir araya gelmesiyle gerçekleşir. İlk

olarak, yaranın kanaması durdurulur ve pıhtılaşma süreci başlar. Ardından, inflamasyon aşaması başlar ve bağışıklık sistemi hücreleri yara bölgesine göç eder. Bu hücreler, enfeksiyon riskini azaltmak ve yabancı maddeleri temizlemek için çalışır. Daha sonra, granülasyon dokusu oluşur ve yara yüzeyini kaplar. Bu dokunun içinde yeni kan damarları ve bağ dokusu hücreleri bulunur. Son olarak, yara kontraksiyonu ve epitelizasyon gerçekleşir. Yara kenarları bir araya gelir ve epitel hücreleri yara yüzeyini kaplar. Bu süreçler bir araya gelerek yara iyileşmesini tamamlar [18]. Yara iyileşmesi, yalnızca yara alanıyla sınırlı kalmayan, tüm sistemleri kapsayan bir süreçtir. Bu süreçte, hücresel, biyokimyasal ve fizyolojik olaylar bir araya gelerek iyileşmeyi sağlar. Tüm dokular benzer temel mekanizmalarla iyileşir. İyileşme sürecinde, birçok hücre ve sitokin karmaşık bir şekilde etkileşir ve uyumlu bir şekilde çalışır. Örnek olarak keratinositler, fibroblastlar, endoteller, kollajen, sitokinler, makrofajlar ve trombositler gibi hücreler görev alır. Bu hücreler ve moleküller, yara iyileşmesinin farklı aşamalarında önemli roller üstlenirler [17, 19]. Yara komşuluğundaki hücreler, trombositler ve nötrofillerden salgılanarak hasarı sınırlayan ve iyileşmeye yol açan sitokinler, büyüme faktörleri, proteazlar, eikozanoidler, kininler ve hücresel metabolitlerin tümüne inflamatuvar mediyatörler denir.

Bu sürecin tamamı incelendiğinde yara iyileşmesi aslında birbiri ile bağlantılı 3 fazdan oluşmaktadır. Bu evrelerden hemostaz ve inflamasyon evresi 3-6 gün, proliferatif evre 4-21 gün ve remodeling evresi ise yaklaşık 21 gün-1/2 yıl arası sürmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Yara iyileşme dönemleri ve bu dönemlerde etkili hücre tipleri

2.2.2. Hemostaz ve inflamasyon fazı

Yaralanmadan sonra yara yerindeki kanamanın kontrolü için ilk fizyolojik yanıt, hemostaz başlamaktadır. Doku bütünlüğünün bozularak ekstrasellüler matriksin trombositlere direkt maruz kalması sonrası trombosit agregasyonu, degranülasyonu ve koagülasyon kaskadının aktivasyonu başlar. Trombositlerin degranülasyonu sonrası ortama fibrinojen, prostaglandin, fibronektin, serotonin, tromboksan, von-willebrand faktör (vWF), transforming büyüme faktörü (TGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi faktörler salınır. İnflamasyon fazını oluşturacak hücresel yanıt, ortama salınan bu faktörlerin kemotaktik ve mitojenik görevler üstlenmesiyle başlamış olur.

İnflamatuvar faz, erken inflamatuvar faz ve geç inflamatuvar faz olmak üzere iki bölümde incelenir. Kemotaktik faktörler sayesinde yara yerine inflamatuvar hücreler göç eder. Erken inflamatuvar fazda ilk 24 saat içinde en çok görülen hücreler nötrofillerdir. Nötrofillerin görevleri; yabancı partikülleri, nekrotik dokuyu, bakteri yükünü fagositoz ile ortamdaki uzaklaştırmaktır. Nötrofiller sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımında rol alırlar [17]. Geç inflamasyon fazında ortamdaki monosit ve makrofaj sayısının artışıyla beraber, nötrofil sayısında azalma meydana gelir. 48-72 saatleri arasında ortamdaki makrofaj sayısı en yüksek konsantrasyonuna ulaşır. Makrofajlar yara iyileşmesinde majör öneme sahip hücrelerdir. Fagositoz, anjiyogenik faktörlerin salınımı ve diğer inflamatuvar hücrelerin yönetimi gibi görevleri üstlenir. Daha sonra yara iyileşmesinin 72. saatinde ortama lenfositlerin gelmesi ile salınan sitokinler sayesinde ekstrasellüler matriks ve kollajen oluşumu sağlanır [11, 13].

Salınan sitokinler sayesinde ekstrasellüler matriks ve kollajen oluşumu sağlanır.

2.2.3. Proliferasyon veya granülasyon fazı

Proliferasyon fazı anjiyogenez, granülasyon, kollajen depozisyonu, epitelizasyon ve yara kapanması bölümlerinden oluşur. İnflamatuvar fazda ortaya çıkan kemotaktik faktörler, büyüme faktörleri, proteolitik enzimlerin indüksiyonuyla granülasyon dokusunun oluşumu başlar [13, 18]. Granülasyon dokusunun içerisinde fibroblast, inflamatuvar hücreler, yeni oluşan kapiller damarlar, gevşek ekstrasellüler kollajen matriksi, fibronektin ve hyalüronik

asit bulunur. Fibronektin ve hyalüronik asit, makrofaj ve fibroblastların göç etmelerini ve göç ettikleri yerde tutunabilecekleri iskelet görevini görür. Granülasyon dokusu yaklaşık 4. günde meydana gelir. Dermisin ve granülasyon dokusunun ana proteini kollajendir. Fibroblastlar kollajeni kompleks bir ekstrasellüler ve intrasellüler işlem ile sentezlemekte ve salgılamaktadır. Fibroblastlar bir yandan kollajen sentezi yaparken aynı zamanda bunların paketlenmesini de de görev alırlar. Yara iyileşmesi sırasında hem fibroblast sayısı hem de her bir fibroblast başına üretilen kollajen miktarı arttığı için toplam kollajen sentezi de artmıştır. Yaralanma sonrası erken dönemde sentezi artmış olan Tip 3 kollajen 4. haftadan itibaren fagositoza uğrar ve yerini Tip 1 kollajen sentezi ve deposu alır [20, 21]. Makrofajlardan salınan büyüme faktörleri fibroblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini başlatır. Ardından endotel hücreleri tomurcuklanarak yara yerinin orta kısmına doğru hareket eder ve neoanjiyogenezi başlatır.

2.2.4. Maturasyon ve remodeling

Yara iyileşmesi sürecinde proliferasyon fazında başlayan matriks sentezi granülasyon dokusu oluşurken önemli kademelerden geçer. Geçici matrikste bulunan fibronektin süreç içerisinde yıkılarak yerini önce tip 3 kollajene sonrasında ise deride hakim olan tip 1 kollajene bırakır. Bu faz kollajen liflerinin yeniden şekillendirildiği süreç olduğu için yeniden yapılanma (remodeling) fazı olarak adlandırılır. Yara oluşumundan birkaç hafta sonra kollajen miktarı plato değere ulaşır. Remodeling sırasında gerçekleşen kollajen yıkımı, matriks metalloproteazlarca sağlanır ve büyüme faktörlerince sıkıca kontrol edilir. Ekstrasellüler matrikste kollajenin sentezi ve yıkımı denge halindedir. Kollajen üretim ve yıkımının bu dengesi yara kuvveti ve bütünlüğünü oluşturan en önemli mekanizmadır. Bu süreç içerisinde kollajen yıkımı ile eş zamanlı olarak erken matrikste bulunan hyalüronik asit de yıkılarak yerini kollajen, kondroitin sülfat ve dermatan sülfata bırakır. Bu sürece de olgunlaşma (maturasyon) denir. Maturasyon 2 yıl kadar devam edebilir. Maksimum olgunluğa ulaşan skar dokusu normal dokunun %70-80'i kadar kuvvete ulaşabilir [11, 17].

Doku bütünlüğü ve kuvveti temel olarak epitel hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonu ile sağlanır. Epitelizasyon yaralanmadan 24 saat sonra başlar ve yara kenarındaki epidermal kalınlaşma bunun göstergesidir. Yara yerindeki defekt, marjinal ve sabit bazal hücrelerin hareketlenmesi ve çoğalması ile kapatılır. Yara yerindeki defekt kapatıldığında

hareketli olan epitel hücreleri kolumnar şekle dönüşür ve mitozla çoğalma hızları artar. Böylece epitelyum tekrar döşenmiş olur ve yüzeyi de keratinize olur [13, 16, 22].

2.3. Anjiyogenez

Yara yatağındaki hasarlanan damarlarda bulunan endotel hücreleri; vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF), anjiyopietin, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve TGF- β etkisi ile matris metalloproteinazları ve integrinleri sentezler ve yeni kapiller oluşumunu sağlar. Yara alanında kılcal damar proliferasyonu, yara iyileşmesi için kritik bir öneme sahiptir. Yara yatağındaki hipoksik ortam endotel hücrelerinden nitrik oksit (NO) salınımını uyarır. NO miktarı artarak VEGF salınımını sağlar ve dokuyu iskemik reperfüzyon (IR) hasarına karşı korur [23].

2.3.1. Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)

Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), oksijene duyarlı bir şekilde aktive olan bir faktördür. HIF, HIF-1 α ve HIF-1 β olarak iki alt birimden meydana gelir. HIF-1 α , hipoksiye tepki veren bölgelere bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Bu süreç, hücrelerin oksijen eksikliği durumunda hayatta kalma mekanizmalarını etkinleştirmesine yardımcı olur. HIF, oksijen seviyeleri normale döndüğünde deaktive olur. Bu mekanizma, hücrelerin hipoksi koşullarında uygun yanıtları vermesini sağlar [24]. Hipoksi durumunda, HIF-1 α miktarında artış meydana gelir. Bu artış, oksijen eksikliği durumunda hayatta kalma mekanizmalarının etkinleştirilmesine yardımcı olur. HIF-1 α , anjiyogenezi düzenleyen bir mekanizmanın devralınmasını sağlar. Anjiyogenez, yeni kan damarlarının oluşum sürecidir ve hipoksi durumunda, daha fazla oksijen ve besin sağlamak için önemlidir. HIF-1 α , anjiyogenezi uyararak bu yeni kan damarlarının gelişimini teşvik eder. Bu mekanizmanın, hipoksi koşullarına uygun yanıtlar vermesine yardımcı olur. Bununla birlikte, anjiyogenezde HIF-1- α aracılığıyla düzenlenen ana faktörlerden birisi VEGF'dir [25, 26].

2.4. Büyüme Faktörleri (Growth Factors - GFs)

Büyüme faktörleri (GF'ler), biyolojik bir analize özel analizlerin tepkilerinin gerçekleştirilmesi için talimat verebilen ve içerisinde birçok molekül barındıran molekül grubudur. Bu moleküller, hedef boyutuna göre belirli aktiviteler sergilerler [27]. Yara iyileşmesinde etkili birçok büyüme faktörleri vardır (Çizelge 2.2).

Büyüme faktörleri, protein üretimini, hücre dışı matriks sentezini, matriks döngüsünü ve hücre ölümü uyararak yara iyileşmesini düzenleyen maddelerdir. Etkilerini fosforilasyonla aktive olan tirozin kinaz yapısında transmembran glikoproteini reseptörler aracılığı ile oluştururlar. PDGF endotel hücrelerine etki ederek kemotaksise ve proliferasyona sebep olur. VEGF endotel hücrelerini çoğaltarak anjiyogenezde rol oynar. EGF epitel, endotel ve fibroblast hücrelerinin kemotaksisini ve çoğalmasını güçlü bir şekilde uyarır; ayrıca anjiyogenez ve kollajen yıkımında görevlidir. FGF endotel hücrelerinin çoğalmasında ve anjiyogenezde görevlidir. TGF trombositlerin granül içeriklerinin boşalması, monositlerden diğer büyüme faktörlerinin salınması gibi olaylarda rol alır ve kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısıdır.

Çizelge 2.2. Yara iyileşmesinde etkili büyüme faktörleri

Ad	Kaynak	Tanım
EGF	Makrofajlar, trombositler, fibroblast, platelet,	Keratinosit ve fibroblastlar için mitojenik; Kreatinosit migrasyon stimülasyonu Matriksi yeniden şekillendirmek için fibroblastlardan, kollajenez salgılanmasını uyarır.
FGF-1 ve FGF-2	Mast hücreleri makrofaj, T lenfosit, endotel hücre, fibroblast, kondrosit keratinosit, düz kas hücresi	Granulasyon dokusu ve matriks oluşumu ve remodelleme; reepitelializasyon; fibroblastlar için kemotaktik ve mitojenik; keratinositler için mitojenik; keratinosit migrasyon stimülasyonu; anjiyogenez; yara kontraksiyonu ve matriks depolanması Anjiyogenezi, Keratinosit ve fibroblast göç ve çoğalmasını artırarak epitelizasyonu artırır.
IGF-I	Fibroblast, makrofaj	Kollajen sentezi ve elastin üretiminde artış, fibroblast proliferasyonu
KGF	Fibroblastlar, kondrosit, keratinosit, mast hücresi, düz kas hücresi, endotel hücre	Keratinositlerin olgunlaşmaları ve büyümelerini kontrol eder. Epitelden diğer büyüme faktörlerinin salgılanmasını artırır. Keratinosit migrasyonu ve proliferasyonunu stimüle eder. ROS temizlenmesi için transkripsiyon faktörlerini artırır; VEGF'yi artırır; vasküler endotel hücreler için potent bir mitojen;; endotel hücrelerin UPA yapımını artırır.

Çizelge 2.2. (devam) Yara iyileşmesinde etkili büyüme faktörleri

PDGH	Platelet, fibroblast makrofaj, endotelial hücreler, keratinosit	İnflamasyon; granülasyon dokusu oluşumu; reepitelizasyon; matriks formasyonu ve remodelleme; PMNH, makrofaj, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaksis; PMNH, makrofaj ve fibroblastlar için aktivatör; fibroblast ve endotelial hücreler için mitojenik; Matriks metalloproteinazları, fibronektin, ve Hyalüronik asit üretimini artırır; anjiyogenez ve yara kontraksiyonu stimüle eder.
PDGF	Trombositler, endotelial hücreler makrofajlar	Kollajen ve proteoglikan sentezini artırır. Fibroblast ve makrofajları toplar.
TGF	Platelet, fibroblast, T lenfosit, keratinosit, makrofaj, endotelial hücre,	İnflamasyon; granülasyon doku ve matriks oluşumu; reepitelializasyon; remodelleme; PMNH, lenfosit, makrofaj, ve fibroblast için kemotaktik; TIMP sentezi, keratinosit migrasyonu, anjiyogenez, ve fibroplazi stimülasyonu; MMP ve keratinosit proliferasyon inhibisyonu; TGF üretim indüksiyonu
TGF- β	Trombositler, Hepatositler, Plasenta, makrofajlar, T ve B hücreleri, timositler	Anjiyogenezi artırır. Lökosit ve fibroblast göçünü uyaran pro-inflamatuvar molekülleri artırır. Hücre dışı matriks sentezini artırır.
TGF- α	Makrofaj, T lenfosit, keratinosit, platelet, fibroblast	Reepitelializasyon; keratinosit migrasyon artışı ve proliferasyon
VEGF	Keratinosit, makrofaj, platelet, PMNH, endotelial hücre, düz kas hücresi, fibroblast	Granülasyon dokusu oluşumu; vazopermeabilite artışı; endotelial hücreler için mitojenik anjiyogenezi artırır.

2.4.1. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) ailesi, geçmişte somatomedinler olarak bilinirdi. Bu faktörler, karaciğer başta olmak üzere tüm vücut dokularında üretilebilir ve otokrin mekanizmalar yoluyla etki gösterebilir. Otokrin mekanizmalar, bir hücrenin kendi kendine etki etmesini sağlayan bir süreçtir. IGF'ler, büyüme, gelişme ve doku onarımı gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynarlar. Bunlar, hücre büyümesini ve bölünmesini uyarak büyüme teşvik ederler. Ayrıca, IGF'lerin insülin benzeri etkileri de vardır ve kan şekeri düzenlemesine katkıda bulunurlar [28].

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-2), disülfid bağları ile birbirine bağlanan iki alt birimden oluşan ve proinsülin ile yapısal homoloji paylaşan 7-kDa ağırlığında proteinlerdir. IGF'ler, birçok organın büyüme ve gelişmesinde, akciğerler de dahil olmak üzere, önemli bir rol oynar. Ayrıca, farklı dokulardaki endotel hücrelerinde bulunurlar ve

mitojenik etki gösterirler, yani hücre bölünmesini ve çoğalmasını teşvik ederler. IGF'lerin bu etkileri, büyüme ve doku onarımı süreçlerinde önemli bir rol oynar [29].

IGF, özellikle yara iyileşmesinin granülasyon aşaması ile yeniden şekillenme aşamasında artarak granülasyon doku oluşumundan ve epitel rejenerasyonundan sorumludur. IGF, hücre büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını uyararak yara iyileşmesini sağlar. Ayrıca IGF, hücre çoğalmasını ve doku yenilenmesini teşvik eder. Bu nedenle IGF'nin yara iyileşmesinde önemli bir rolü vardır.

2.4.2. Transforming büyüme faktörü (TGF)

Transforming büyüme faktörü (TGF), başlangıçta normal sistemin kötü niyetli olduğu, dönüştürüldüğü kişinin adını almıştır. Ancak daha sonra bu şekilde yanlış olduğu ortaya çıkmasına rağmen ad değişikliği yapılmamıştır. TGF- α , çeşitli proteinler ve dokular üzerinde önemli miktarda varlığını sürdürür. Epitelyal, gastrointestinal sistem, akciğer, kalp, böbrek, meme bezi, dermis ve gonadlar gibi birçok hedefe etki eder. TGF- α , hücre göçü, büyüme ve farklılaşmasında diğer büyüme özellikleri gibi önemli bir rol oynar. Ayrıca yara iyileşmesinin ilk aşamaları TGF- α , EGF salgılanmasını teşvik eder [28].

2.4.3. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinden biri olan VEGF, endotelin bakımına özgü bir faktördür ve anjiyogenezin (yeni damar oluşumu) ana işleyişinden biridir. VEGF, endotel hücrelerinin bölünmesini, çoğalmasını ve göçünü gerçekleştirir. Ayrıca kan damarlarını ve geçirgenliğini artırarak doku içindeki kan değerlerini artırır. Bu faktör, normal gelişimde ve doku iyileşmesinde önemli bir rol oynar. VEGF, vücutta pek çok farklı hücrede sentezlenen bir proteindir. Ovaryum folikülleri, akciğer alveolar hücreleri, korpus luteum, böbrek proksimal tübül hücreleri, renal glomerül visseral epitel hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, aktive makrofajlar, leydig hücreleri, arteriyoller çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositler gibi pek çok hücrede bulunur. VEGF; yara iyileşmesi, postnatal damarlanma, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma ve kalp damar hastalıkları gibi birçok patofizyolojik durumda önemli bir rol oynar. Özellikle, VEGF, yeni damar oluşumunu

teşvik ederek tümör büyümesi ve metastazını destekleyebilir. Bu nedenle, VEGF üzerindeki araştırmalar son yıllarda artmıştır [30, 31].

2.5. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri

Sülükler, Annelida filumuna ait olan ve 15.000'den fazla türü bulunan canlılardır. Çoğu sülük, kan emerek beslenir ve ektoparazitlerdir. Hirudinea sınıfı içerisinde ise yaklaşık 650'den fazla tür bulunmaktadır. Bu sınıfta genellikle tatlı su deniz ve kara sülükleri yer almaktadır. Sülüklerin çeşitliliği ve yaşam alanları oldukça geniştir [45]. Tedavide en sık kullanılanlar farklı özelliklere sahiptir. Tıbbi sülükler genellikle koyu yeşil, koyu kahverengi, kahverengi, yeşil ve kırmızı kahverengidir. Genellikle sırtlarında renkleri değişkenlik gösteren şeritler (kırmızı, açık kahverengi, sarı veya siyah) barındırırlar. Tedavide en sık kullanılanlar *Hirudo medicinalis* ve *Hirudo verbana*'dır [32]

Sülükler oldukça karmaşık bir vücut yapısına sahiptirler. Vücutları orjinal olarak dorso-ventral olarak yassılaştırmıştır. Genellikle vücutları 34 ila 36 segmentten (halkadan) oluşur. Boyutları 20 cm'ye kadar uzayabilir. Sülüklerin en büyük kısmı, bedenlerinin yaklaşık %65'ini oluşturan karın ve kaslardır. Bu yapılar, sülüklerin hareket etmesini ve beslenmesini sağlar. Üçgen biçimli ön tutaç delikler, vakum etkisi yaratan çeşitli katmanlardan oluşur. Sülükler, vücutlarının baş ve kuyruk bölgesinde yer alan vantuzları aracılığıyla avına yapışır. Ağızın etrafında yer alan vantuz 100'den fazla dişi içeren üç çeneden meydana gelir ve "Y" şeklinde yara izi bırakır. Dişler arasında sülüğün salyasının salgılandığı küçük ağızlar yer alır. Sülük beslenmeye başladığında kanın akışkanlığını artıran, damarları genişleten ve ağrıyı durduran kimyasalları salgılar. Yaklaşık 10-30 dakika tutunarak 2-20 ml civarında kan emen sülük, tamamen doyduğunda kendiliğinden bırakır [46].

Sindirim sistemi içinde kan endo enzimler tarafından korunur ve bir buçuk yıl boyunca sülüğün beslenme ihtiyacını karşılar. Kanın sindirimi, kanın kokuşmasını önleyen ve sindirim için önemli enzimleri sağlayan, *Aeromonas hydrophila* ve *Pseudomonas hirudinea* gibi endosimbiyotik bakterilerin yardımı ile olur. Ayrıca kan ile beslenen hayvanlarda oluşan vitamin B kompleksi eksikliğini *Aeromonas* türü bakteriler de önler. *H. Medicinalis*'in boşaltım sistemi görevi böbreklere benzeyen, 17 çift organ ile olur ve nefrit

adı verilir. Nefridiyoporlar aracılığıyla idrar atılımı sağlanır. Farklılaşmış bir solunum sistemleri yoktur ve solunumu doğrudan epidermisten yaparlar.

Sinir sistemi, sülüğün uyarılara tepki vermesini ve yönelmesini sağlayan, bir çift serebroid gangliyon, 5 çift göz, duyu papillaları, segmental sinirler ve birçok termoreseptörden ve kemoreseptörden oluşmuştur. Sülük; ısı, ses, sudaki titreşimler, dokunma, ışık, kuruluk ve kimyasallara karşı duyarlıdır. Sülüklerde segmental (halkasal) olarak sıralı duyuusal papillalar (noktasal, kabarcık benzeri yapılar) ve özelleşmiş duyu organları bulunmaktadır. Bu papillalar belirgin bir şekilde görülebilir ve genellikle hafif koyu renkte noktasal pigment şeklindedirler. Bu papillalar her segmentin ortasına yerleşmiş küçük disk oluşumlarıdır. Bunların her biri terminal kıl bulundururlar. Ayrıca 5 çift göz dorsalde (vücudun sırt tarafı) hilal şeklinde sıralanmış halde bulunur. Duyu hücreleri, sülüklerin konakçı ve avlarını bulmalarını ve karanlıkta hareket edebilmelerini sağlamaktadır. Bu reseptörler (almaçlar) sayesinde ortamdaki titreşim ve ışıkların yanı sıra, konakçıların salgıladıkları salgıları algılayarak harekete geçerler. Böylece uyarılan sülükler canlıya doğru hareket ederek yapışır ve beslenme gerçekleşir [48].

2.5.1. Tıbbi sülüklerin tarihçesi

Hirudoterapi; tedavi amacıyla sülük veya sülükten elde edilen ürünlerin kullanılması olarak tanımlanmaktadır. “Hirudo” Latince “sülük” anlamına gelmektedir. Sülüğün uygarlığın başlangıcından beri olan klinik uygulamalardaki önemi Anglo Saxon diline ait “doktor” anlamına gelen “laece” ile olan basit benzerliği ile ilgili olabilir [33, 34]. Hirudoterapi, birçok ülkede tedavi yöntemi olarak kabul edilen bir uygulamadır. Özellikle Avrupa, Rusya, Ukrayna ve Amerika gibi yaygın olarak tercih edilmektedir.

Sülükler tıp tarihinde belgelenmiş en eski yara iyileştirme yöntemlerinden biri olarak biliniyor. Tıbbi Sülük tedavisinin ilk kez ne zaman kullanıldığına dair kesin kaynaklar olmamasına rağmen Mısır, Antik Yunan, Arap, Pers, Hint, Çin ve Anadolu medeniyetlerinin en eski yazıtlarında tıbbi sülük kullanımına rastlanmıştır, Avrupalı ve Galenler tarafından Avicenna olarak isimlendirilen İbni Sina'nın tedavi protokollerinde yer almıştır. Mısır'da bulunan MÖ 1500'lü yıllardan kalma firavunların mezar taşları üzerinde tıbbi sülüklerin kullanımını gösteren resimler yer almaktadır. Kleopatra'nın gençlik ve güzellik için tedavi edici sülük kullandığına dair bir inanış bulunmaktadır [35].

Sülük kullanımı, Galen'in (130-201 M.S.) ve Hipokrat'ın (460-370 M.S.) belirttiği gibi vücuttaki sıvıların dengesizliğinden kaynaklı hastalıkların ortaya çıktığı hipotezine dayandırılmıştır. Suriyeli Dr. Laodice ise kanın sülükler aracılığıyla uzaklaştırılmasının hastalıklara sebep olan şeytani ruhların vücuttan çıktığına inanmıştır [36]. İslam tıbbının önde gelen hekimi İbn-i Sina (MS 980- 1037), ünlü kitabı El Kanun Fi't-Tıbb'da sülüklerin tedavi amaçlı uygulama yöntemlerini ve hangi hastalıklarda kullanıldığını yazmıştır. İbn-i Sina, sülük uygulamasının kanın vücudun daha derin kısımlarından atılmasında kupa terapisine göre daha başarılı olduğunu belirtmiş ve cilt hastalıklarında uygulanmasını önermiştir [37]. Ayrıca İbn-i Sina eserinde lepra, gangren, mantar hastalıkları ve yılan zehirlenmeleri gibi birçok hastalığın tedavisinde sülüğün kullanılabileceğini yazmış ve sülükler hakkında çok detaylı bilgiler paylaşmıştır.

19. yüzyılın başlarında sülük tedavisinin neredeyse her hastalıkta kullanılması, İngiltere ve Avrupa'da tıbbi sülüklerin neslinin tehlikeye girmesine yol açmış ve tükenme noktasına gelmelerine sebep olmuştur. Özellikle Fransa ve Rusya'da büyük bir popülerlik kazanan sülük tedavisi, her yıl 130 milyondan fazla sülüğün kullanıldığı belirtilmiştir. Bu yüksek talep sebebiyle, İngiliz hekimler 1810'lardan itibaren sülük ithal etmek zorunda kalmışlardır. 1825 ile 1850 yılları arasında Avrupa'da sülük kullanımı zirveye ulaştı ve ayrıca sülük temininde zorluk çekilmeye bile başlandı. Bu yüzyılda Osmanlı İmparatorluğu'nda padişahlar ve üst düzey yöneticiler, her yıl mayıs ve haziran aylarında çeşitli hastalıklardan korunmak amacıyla sülük tedavisi uygulamışlardır. Bu konu ile ilgili yazılı eserler hazırladıkları bildirilmiştir. Osmanlılar ile birlikte Fransızlar da tedavide tıbbi sülüklerden faydalanmışlardır ve 1830'da Paris hastanelerinde beş milyon sülük kullandıklarına dair kanıtlar mevcuttur. 1850 tarihli bir belgeden ise Osmanlı Devleti'nin göllerinden sülük çalınmasına mani olmak için bir layiha yayınlandığı ve bunun için ciddi çaba sarf edildiği anlaşılmaktadır. Bununla beraber sülük ticaretiyle uğraşan ecnebi tüccarların sülük yetiştirmek için havuz yapmalarında bir mahzur olmadığı belirtilmiştir [2]. Ayrıca bu dönem Avrupa devletlerine de çok büyük miktarda tıbbi sülük ihracatı yaptıkları biliniyor.

Doktorlar, özellikle mikrocerrahi uzmanları, 20. yüzyılın ikinci yarısına doğru sülük tedavisini yeniden desteklemeye başlamışlardır. Bu dönemde yapılan çalışmalarda venöz konjesyon gelişen dokularda erken dönemde sülük uygulandığında belirgin bir iyileşmenin

sağlandığı gözlemlenmiştir. Özellikle yara iyileşmesini hızlandırdığı, flep ve insizyonel yara kanlanmasında etkili olduğu için, plastik cerrahi yaygın kullanıldığı alanlardan biri olmuştur [38].

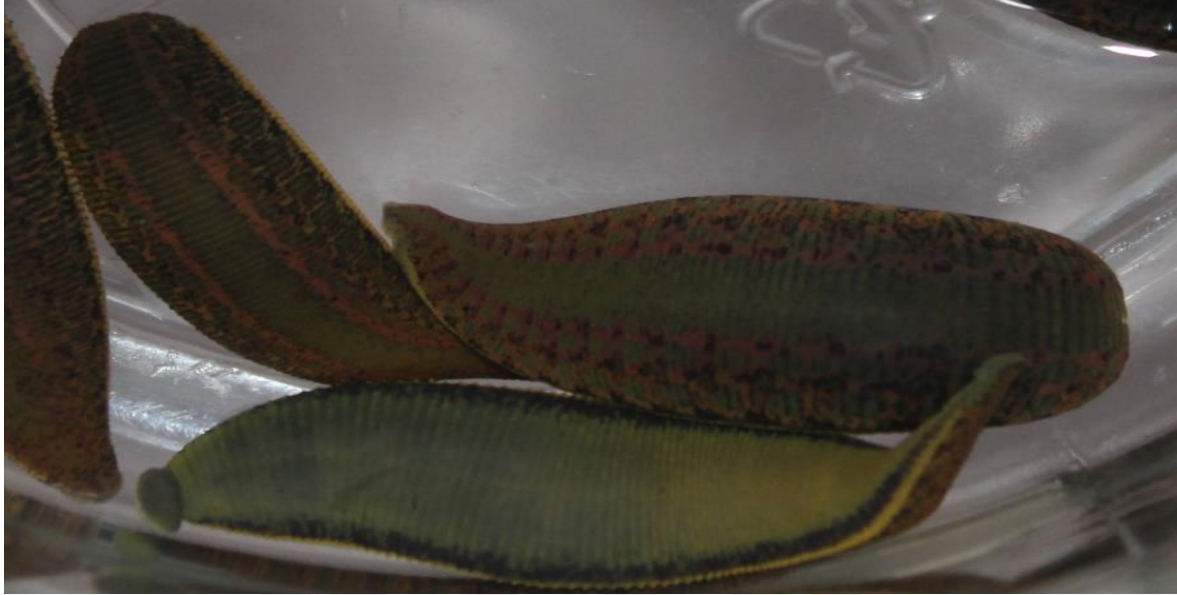
Türkiye, dünyada sülük ihracatında önde gelen ülkeler arasında yer almaktadır. Avrupa'da tedavi amacıyla kullanılan sülüklerin önemli bir kısmı ülkemizden ihraç edilmektedir. Kullanılan sülüklerin Avrupa ülkelerinde yapılan araştırmalarda ve bu konuda yazılan kitaplarda, Türkiye'den sağlandığı açıkça bildirilmektedir [36]. Ülkemizdeki sülük varlığını korumak amacıyla, çeşitli Avrupa ülkelerine yapılan sülük ihracatına kota uygulanmaya başlanmıştır. Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre, 2022 yılı için yıllık sülük ihracatı kotası 1500 kg olarak belirlenmiştir. Bu önlem, sülük popülasyonunu koruma amacıyla alınmıştır. Neslinin tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalan tıbbi sülük türlerinden *Hirudo medicinalis* CITES Sözleşmesiyle koruma altına alınmıştır. Ülkemiz tatlı sularında sülük avlanma yasağı, 15 Nisan-15 Haziran tarihleri arasında uygulanırken, bu yasak 1 Mart – 1 Temmuz olarak değiştirilip 2 aydan 4 aya uzatılmıştır. İhraç edilen sülükler genellikle canlı olarak ihraç edilirken, kozmetik sanayinde kullanılacak olanlar ise dondurulmuş olarak gönderilmektedir.

27.10.2014 tarih ve 29158 sayılı Resmi Gazete'de 'Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği' yayımlanarak yürürlüğe girmiştir ve hirudoterapinin sertifikalı hekimler tarafından uygulanabileceğini kanunlaştırmıştır [39]. Türkiye'de bu yönetmelikte, *H. medicinalis*'in ve *H. verbana*'nın tedavi amaçlı kullanım kriterleri, "Sülük Uygulaması" başlığı altında düzenlenmiştir. Bu düzenleme, sülük tedavisinin eğitim almış uzmanlar tarafından gerçekleştirilmesini sağlamayı amaçlamaktadır. Böylelikle hirudoterapi olması gereken çağdaş kimliğine kavuşturulmuştur.

2.5.2. *Hirudo verbana*'nın genel özellikleri

Hirudo verbana türü sülüklerin uzunluğu genellikle ortalama olarak 55,4-123,0 mm arasında değişir. Vücut genişlikleri ise ortalama olarak 8,5-13,1 mm civarındadır. Bu tür sülüklerin pigmentasyonu çeşitli renklerden oluşur, genellikle sarı, kırmızı, yeşil ve siyah tonları bulunur. Bu renkler, sülüklerin vücutlarında bulunan pigment hücrelerinden kaynaklanır. *Hirudo verbana*'nın bu renkli pigmentasyonu, onları diğer türlerden ayırt etmek için kullanılabilir. *Hirudo verbana* dorso-ventral şekilde yassılaşılarak yeşil, siyah,

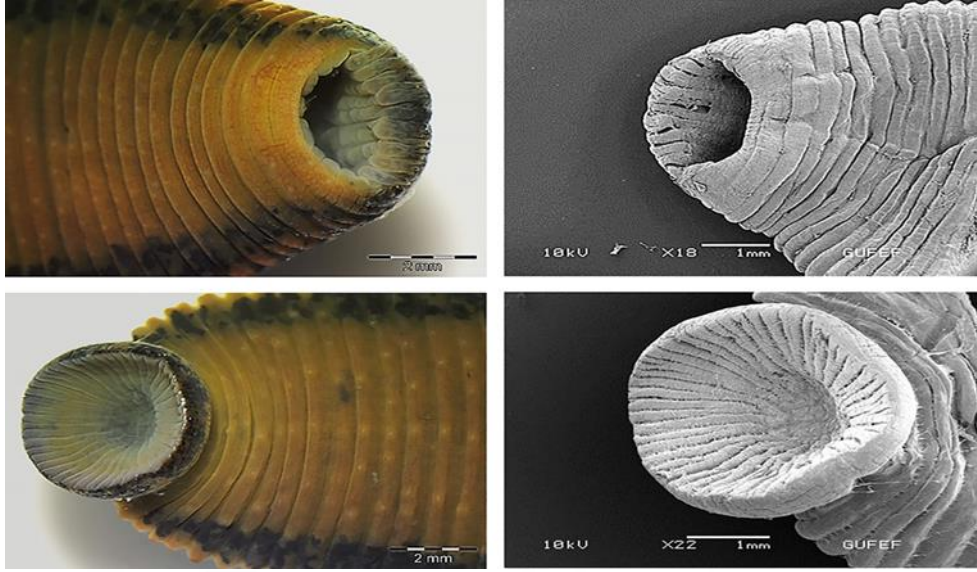
sarı ve kırmızı renklerden meydana gelen desenlerden oluşmaktadır. *Hirudo verbana*'nın görüntüleri aşağıdaki Resim 2.1'de gösterilmiştir.



Resim 2.1. *Hirudo verbana* türüne ait tıbbi sülükler

Resimde de görüldüğü üzere *Hirudo verbana* türünün dorsalinde boydan boya koyu yeşil bir hat mevcuttur. Bu hattın kenarlarında kesik turuncu çizgilerden sonra laterale kadar halı desenine benzer siyah, yeşil ve sarı tonlarda lekeler izlemektedir. Aynı zamanda lateralde boydan boya sarı çizgiler bulunmaktadır. *Hirudo verbana* türünün ventralinde ise medianda sarı-yeşil renkte bir bölge bulunmaktadır. Lateralde ise longitudinal uzanan birer koyu şerit çevrelemektedir [40].

Hirudo verbana'da çekmenler posterior ve anteriorda yuvarlak ve ovalimsi bir yapıdadır. Anterior çekmen çoğunlukla posterior çekmenden daha küçük olup, 6 segmentten oluşmaktadır. Anterior çekmenin çapı ortalama 4,2-7,6 mm boyutundadır. Posterior çekmenin çapı ise ortalama 7,0-9,1 mm'dir. Kaudal çekmen büyük olmasına rağmen maksimum gövde genişliğini geçmemektedir (Resim 2.2). Bu çekmenler sülüklerin yüzeylere tutunarak hareket etmelerini sağlamaktadır. Arka çekmen disk şeklinde olup yüzeylere tutunması ön çekmene göre daha fazladır. Ön çekmen de ise ağız bulunmaktadır [41].



Resim 2.2. *Hirudo verbana*'nın anterior ve posterior çekmenlerinin stereozoom ve elektron mikroskobu görünümü [42]

Sülüklerin sindirim sistemi ön çekmenin orta kısmında yer alan ağız ile başlamaktadır. Sülükler ön çekmen yardımıyla avına tutunarak avının derisine açtığı Y şeklindeki açıklıktan beslenirler. Ağız takip eden farinks kanı emmeyi ve yutmayı sağlayabilmek için güçlü kaslardan oluşmuştur. Aynı zamanda farinksin etrafında sülüğün salgısını üreten çok sayıda ekzokrin bezden oluşmuş salgı bezleri yer almaktadır. Farinksin arkasından mide gelmektedir. Mide 22 adet keseden oluşmaktadır. Bu keselerden en büyüğü posterior kısımda bulunmaktadır. Aynı zamanda bu mide keseleri sindirim kanalına bağlanarak emilen kanı uzun süre depolayabilmektedir. Sindirimin en yoğun gerçekleştiği yer orta bağırsak bölgesi olup, bunun ardından ise son bağırsak gelmektedir. Ayrıca posterior çekmenin önünde, dorsalden anüs açılmaktadır. Sülüğün boşaltım sistemi ventralde 6. segmentten başlayıp 22. segmentte bitmektedir. Ayrıca boşaltım sistemi 17 çift boşaltım organından (Nephridia) oluşmaktadır [43].

2.5.3. Tıbbi sülüklerin etki mekanizmaları

Sülük salyasında 100'den fazla terapötik etkisi olan biyoaktif madde bulunur. Bu maddeler içinde başlıcaları hyaluronidaz, hirudin, kallikrein inhibitörü, kollajenaz, salin, histamin gibi vazodilatörler ve zayıf anestezik ve analjezik maddelerdir. Ayrıca, sülük salyasında birçok farmakolojik olarak aktif madde yer alır [44]. Hirudin, koagülasyon inhibisyonundan sorumlu bir madde olarak bilinir ve cerrahi operasyonlardan sonra

tromboflebiti ve pulmoner inflamasyonu önlemek için kullanılabilir. Salin ise pıhtılaşmayı inhibe eden bir madde olarak bilinir. Sülük ayrıldıktan sonra, salgıladığı salin nedeniyle kanama süresi uzayabilir ve yaklaşık 12 saat kadar sürebilir. Bu kanama, sülük tedavisinin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve genellikle kontrol altına alınır. Ancak, her bireyin tepkisi farklı olabilir, bu nedenle sülük tedavisi uygulandıktan sonra kanama süresi ve şiddeti kişiden kişiye değişebilir. Histamin benzeri bir madde vazodilatasyona, yara yerinden sızıntı biçiminde kanamaya sebep olur. Hyaluronidaz, iyileşmeyi kolaylaştıran maddelerin emilimi için yara yerini hazırlar. Bu maddeler, sülük ayrıldıktan sonraki 24 saate kadar kanamanın devam etmesine sebep olur. Sülük salyasında bulunan hyaluronidaza karşı irritasyon gelişebilir [45, 46].

Bu maddelerden bazıları anti-inflamatuvar etkilerine ek olarak, lipotropik aktivitelere de sahip oldukları için diyabet ve iskemik kalp hastalığı gibi ateroskleroza sebep olabilen hastalıklarda da yararlı olabilir. Sülük salyasında bulunan bu maddeler uygulandıkları bölgede kan dolaşımını artırır, anti-inflamatuvar, trombolitik, ve immünstimulan etki yapar. Hirudoterapi; sertlik, ağrı ve diz osteoartritinde görülen eklem disfonksiyonunu azaltır [47, 48].

2.5.4. Tıbbi sülüklerin salgısında bulunan biyoaktif maddeler

Tıbbi sülük salgısında 100'den fazla biyoaktif madde yer almaktadır. Bu biyoaktif maddeler; analjezik ve anti-koagülan, anti-inflamatuvar, anti-platelet ve anti-mikrobiyal etkiler gibi çok farklı özellikler göstermelerine ek olarak artmış kanlanmaya ve hücre dışı matriks degradasyonuna da sebep olurlar [49].

- Hirudin, sülüklerin salgıladığı en önemli madde olarak bilinir. İlk kez 1903 yılında Jakob tarafından isimlendirilmiştir. Kan pıhtılaşmasını önleyici etkisi ise 1950'lerin ortalarında Markwardt tarafından tanımlanmıştır. Hirudin, 9000 molekül ağırlığında bir polipeptittir ve 65-66 amino asit içerir. Özellikle aspartik ve glutamik asit kalıntıları yüksek oranda bulunur. Ayrıca, 20'den fazla izoformu mevcuttur. Hirudin, trombin enzimine özgü bir inhibitördür. Trombine bağlanarak kan pıhtılaşmasını engeller ve trombozun neden olabileceği tüm reaksiyonları bloke eder. [50]

- Calin (saratın) – vWF faktörünün kollajene bağlanmasını bloke eder ve kan koagülasyonunu inhibe eder. Kollajen aracılı trombosit agregasyonunu inhibe eder. Bu da çok önemli olan kemik kırık dokusunun temel yapıtaşıdır [2].
- Destabilaz – Glikozidaz aktivitesine sahiptir. Destabilaz, kombine enzimatik ve enzimatik olmayan antibakteriyel etki gösterir. Ayrıca fibrin lifli protein, pıhtı ağını yapan trombinin çözülmesini sağlayan trombolitik etkileri vardır [51].
- Hirustatin – Bir çeşit amino asit proteini olup kas gelişiminde ve sağlıklı bir bağışıklık sistemi için oldukça önemlidir. Kallikrein, kimotripsin, tripsin ve katepsin G'yi inhibe eder ve reperfüzyonu hızlandırır [52].
- Bdelinler – İltihaplanma karşıtı özellikleri içeren maddedir. Anti-inflamatuvar etki göstermektedir. Plazmin, tripsin ve akrosini inhibe ederek kanama zamanını uzatmada önemli rol oynar. Ayrıca bdelinler, proteinaz inhibitörü olarak da görev yaparlar. Bu etkilerine ek olarak duyu nöronlarını uyarıcı etkileri de vardır.
- Hiyaluronidaz - Sülüklerden elde edilen hiyaluronidaz, hyalüronik asidin tanımlanmasında kullanılan en spesifik enzimdir. Doku arasında bulunan çatlığa ait yarı sıvı antibiyotik görevini görür. İnterstisyel viskoziteyi artırır. Hiyaluronidaz sayesinde tüm tükürük sekresyonlarının yayılımının artması sağlanır [6]. Hiyaluronidaz, şuan insan derisi aracılığıyla ilaç dağılımı çalışmalarında kullanılarak incelenmektedir. Ayrıca kemoterapötik ilaçların antikanser etkilerinin artırılması amacıyla çeşitli çalışmalarda incelenmektedir [53].
- Sülük Türevi Triptaz İnhibitörü (LDTI) – Bir çeşit enzimdir. Sülük cildi deldiğinde, ev sahibinin mast hücreleri tarafından salınan proteolitik enzimleri (triptazlar) önlemek için LDTI'yi salgırlar. Bu sülüğün kendini beslerken ağız bölgesindeki proteolitik enzimlerden koruma yöntemidir [54].
- Eglinler – Sülük özütünden ayrıştırılan, iltihaplanma önleyici, düşük molekül ağırlıklı proteinlerin bir başka grubudur. Ağrılı kimotripsin, subtilisin, kinaz ve elastaz, nötrofilik proteinazlar ve katepsin G'nin aktivitesini inhibe eder.
- Apiraz (adenosin 5'-difosfat difosfohidrolaz) adenosin 5 'difosfat (ADP), trombosit aktive edici faktör (PAF), epinefrin ve araşidonik asit üzerindeki etkisi ile trombosit agregasyonunu inhibe eden bir moleküldür. İlk defa 1987 yılında Rigbi ve diğerleri tarafından ayırt edilmiştir.

- Gelin - Eglin benzeyen güçlü bir trombin inhibitörü olup *Hirudinaria manillensis* tükürüğünden izole edilir. Gelin, eglin gibi katepsin G, elastaz ve kimotripsini inhibe eder. Fakat plazmin, pepsin, tripsin veya trombin üzerinde daha az aktiviteye sahiptir.
- Antistasin - Protrombini trombine çeviren faktör Xa'ya bağlanır ve görevini yapmasını engeller. Ayrıca protrombinaz inhibitörü görevine de sahiptir.
- Asetilkolin - Vasküler dilatasyon oluşturur. Bu etki ile uygulandığı bölgede kan akımını artırır ve dolaşımın devamlılığını sağlar.
- Kollajenaz - Kollajeni yıkmakla görevlidir.
- Kloromisin - Potansiyel antibiyotik rolü oynamaktadır [55].
- Hementerin - Fibrinojeni fibrinden daha hızlı parçalayan, kan pıhtılaşmasını önleyen ve *in vitro* olarak fibrin pıhtılarını yok eden, plazminojenden bağımsız bir fibrinolitik metalloproteinazdır [56].
- Bufridin - *H. manillensis*'ten izole edilmiştir. Hirudin'e benzer bir trombin inhibitörü olup, yapısal ve immünolojik farklılıklar göstermektedir [2].
- Decorsin - Amerikan tıbbi sülüğü olarak bilinen *Macrobdella decora*'dan izole edilmiştir. Trombosit agregasyonunun güçlü bir inhibitörüdür [57].
- Guamerin - Bir insan lökosit elastaz inhibitörü olup anti-inflamatuvar etki göstermektedir. *H. nipponia*'dan elde edilerek saflaştırılmıştır [58].
- Piguamerin - *H. nipponia*'dan elde edilmiş olup, plazma kallikreinin serin proteaz inhibitörüdür. Ayrıca plazma ve doku kallikreini ve tripsinini kuvvetli bir şekilde inhibe etme görevi de vardır [59].
- Gama-glutamil transpeptidaz - *H. medicinalis*'ten izole edilmiş olup sığır gama-glutamil transpeptidaz enzimi ile benzer özelliktedir. Hücre içi glutatyon sentezi için öncül aminoasitleri temin etmekte görevli bir enzimdir [51].
- Karboksipeptidaz A - Isırık etrafındaki kan akışını artırmada görevlidir. Bu madde ayrıca sülük beslenirken oluşabilecek herhangi bir kan pıhtısının çözülmesine yardımcı olabilir.
- Faktör Xa inhibitörü – Pıhtılaşma kaskadına etki eden sülük salgı bileşenidir. Xa faktörü, kan pıhtılaşma işlemi sırasında protrombinin trombin haline dönüşmesini katalize eder. Faktör Xa inhibitörü, Faktör Xa ile sabit bir eş molar ile kompleks oluşturur ve böylece aktivitesini inhibe eder [2].
- Trombosit Aktive Edici Faktör Antagonisti (PAFA) - Liyofilize sülük tükürüğünden elde edilmiş bir fosfogliserittir. PAF güçlü iltihap taşıyıcısıdır. Yaralanma bölgesinde

salgılanarak hemostaz ve iltihap reaksiyonunu tetikler. Tromboembolik bozuklukların ve inflamasyonun tedavisinde kullanılan bir fosfogliserit olarak tanımlanmaktadır. Bunun yanı sıra tromboembolik bozuklukların ve inflamasyon tedavisinde önemli bir yere sahiptir [60]. Tıbbi sülük salgısının temel etki mekanizmaları Çizelge 2.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Tıbbi sülük salgısının temel etki mekanizmaları

Etki	Fonksiyonu
Antikoagülan Etkiler	Hirudin; trombini inhibe eder. Faktör Xa inhibitörü; faktör Xa’yı inhibe eder. Destabilaz; stabilize fibrini çözer. Gelin; katepsin G, elastaz ve kimotripsini inhibe eder.
Analjezik ve Anti-inflamatuvar Etkiler	Bdellinler; plazmin, sperm akrozini ve tripsini inhibe eder. Hirustasin; doku kallikreini inhibe eder. LDTI (Sülük türevi triptaz inhibitörü I); triptazı inhibe eder. Eglinler; kimaz, α -kimotripsin, subtilisin, elastaz ve nötrofil proteinazlar, ve katepsin G’yi inhibe eder. LCI (sülük karboksipeptidaz inhibitörü); Karboksipeptidaz A’yı inhibe eder. Guamerin; lökosit elastazını inhibe eder. Piguamerin; Tripsini ve kallikreini inhibe eder.
Anti-Platelet Etkiler	Apiraz; Araşidonik asiti, adenosin 5' difosfat’ı, PAF’ü ve epinefrini inhibe eder. Calin; Kollajen kaynaklı trombosit agregasyonunu inhibe eder. Saratin; $\alpha 2$ integrin alt birimi I bölgesinin kollajene bağlanmasını inhibe eder.
Kan Akışı Üzerine Etkiler	Asetilkolin; vazodilatasyon yapar. Histamin-benzeri maddeler; Vazodilatasyon yapar.
Anti-Mikrobiyal Etkiler	Klorometin; bakteriyel hücre duvarını parçalar.
Hücre Dışı Matris Degredasyonu	Hyalüronidaz; hyaluronik asitin endoglukuronid bağlarını yıkar. Kollajenaz; kollajen partiküllerini yıkar.

2.5.5. Tıbbi sülüklerin medikal kullanım alanları

Uzun yıllardır, sülük tedavisi her derde deva olarak bilinirken, sonraları bir köşede unutulmuştur. Günümüzde ise insanlar, sülük tedavisinin yan etkisi olmadığını ve güvenli olduğunu bilmelerine rağmen ilaç tedavilerini tercih etmektedirler. Ancak bazen, denenmiş kanıtlanmış eski yöntemlere dönmek, yenisini keşfetmeye göre daha düşük maliyetli olabilirken, hata oranı da daha az olabilmektedir. Üstelik modern tıbbın birçok farklı

alanda etkisiz olduğu kanıtlanırken bu durum sülük tedavisine karşı ilginin artması için başka bir neden olmuştur [61, 62].

Günümüzde birçok ülkede hirudoterapi, çeşitli klinik durumlarda tıbbi tedaviye yardımcı olarak kullanılmaktadır. Hirudoterapi; artrit, apse, glokom, dental tedaviler, myastenia gravis, hematoma, gangren ve tromboz gibi durumların tedavisinde etkili olabilir. Ayrıca, varisler, arteriyoskleroz, diyabetik damar komplikasyonları ve diğer kardiyovasküler hastalıklar gibi damar bozukluklarında da kullanılabilir. Hirudoterapi, kardiyoloji, jinekoloji, üroloji, cerrahi, travmatoloji ve oftalmoloji gibi farklı tıbbi alanlarda uygulanabilir. Bu tedavi yöntemi, kan emici sülüklerin salgıladığı bazı bileşiklerin olumlu etkilerine dayanır [2, 51, 54].

Anti-koagülan, anti-inflamatuvar, trombolitik, anestezi ve vazodilatör özellikleri sebebiyle günümüzde çeşitli hastalıklarda sülük tedavisi uygulanabilmektedir. Özellikle mikrocerrahi ve plastik-rekonstrüktif cerrahide tedaviye yardımcı olarak postoperatif sülük kullanımı, vaskülarizasyonun ve dolaşımın düzenlenmesini sağlamak için yapılan çalışmalarda başarılı sonuçların yayınlanması ile yeniden dikkatlerin odaklanmasına sebep olmuştur. ABD İlaç ve Gıda Dairesi FDA (Food and Drug Authority of USA) sülüklerin bu ülkede satışına, genel amaçlar, mikrocerrahi ve plastik cerrahide kullanımına 2004 yılında izin vermiştir. Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı'nın çalışmaları ile 27.10.2014 tarihinde 29158 sayılı Resmi Gazete'de "Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği" yayınlanarak sülük uygulamasına standart getirilmiştir. Bu yönetmeliğe göre, tıbbi sülük kullanılarak yapılan uygulamanın tedaviyi destekleyici bir şekilde sertifikalı tabip tarafından yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Sülük tedavisi için en iyi bilinen endikasyonlardan biri venöz hastalıktır. Halen standart profilaktik ajan olarak kullanılan heparinin bulunmasından önce ameliyat sonrası trombozun önlenmesinde sülük uygulanmasıyla ilgili birçok deneysel çalışma ve vaka raporu bulunmaktadır [63]. Osteoartrit, yaşlılarda en yaygın görülen dejeneratif eklem hastalığıdır. Kıkırdak dejenerasyonu, sinoviyal membran değişiklikleri ve periferik kemik hipertrofisi ile karakterizedir. Yaygın semptomlar arasında aktivite sonrası eklem ağrısı ve hareketsizlik dönemlerinden sonra tutukluk bulunur. Hirudoterapi, yapılan çalışmalarda özellikle diz osteoartriti için etkili bir semptomatik tedavidir [64]. Mikrocerrahi, ampute uzuvların veya dokuların replantasyonu için mikroskop altında mikro aletler kullanılarak

küçük arterleri ve venleri anastomoz etmeyi amaçlayan bir cerrahi işlem türüdür. Bu tür operasyonlardan sonra arteriyel tromboz gelişimi yaygın olmadığı halde, venöz oklüzyon dokular için ciddi bir tehdittir ve trombüs oluşumu, staz, nihayetinde doku nekrozuna sebep olabilir. Tıbbi sülükler, ilk tedavi denemelerine yanıt vermeyen postoperatif venöz tıkanıklık semptomları gösteren insizyonları ve flepleri kurtarmak için kullanılır [65]. Periferik vasküler komplikasyonlar, diyabetik hastalarda vücudun distal bölgelerinde kanlanmanın azalmasına yol açarlar ve uzuvlarda iskemik hastalıklara sebep olabilirler. Diyabet kanın tam olarak nüfuz edemediği kapillerlerde kan akımını yavaşlatarak küçük bir yaranın dahi iyileşmemesi veya daha kötüsü nekroz ve doku ölümüne ilerlemesine sebep olabilir. Birçok çalışmada hirudoterapinin diyabetik iyileşmeyen yara tedavisinde etkili olduğu bildirilmektedir [66]. İbni Sina kloazma, skatrisyel alopesi, dermatofitler ve anjiyom gibi cilt hastalıklarında sülük tedavisini kullanmıştır. Shanker ve diğerleri 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, egzama semptomlarını azaltmada ve yaşam kalitesini artırmada sülük tedavisinin etkili olduğunu bildirmişlerdi [33].

Modern tıbbi ilaç uygulamalarına kıyasla hirudoterapi daha düşük maliyetli, daha az yan etkili ve birçok hastalıkta daha etkili olsa da geçmişte yaşanan olumsuzlukların yeniden yaşanmaması için sağlam bilimsel ilkelere dayanarak uygulanmalıdır. Tedavide gelişebilecek komplikasyonlara karşı her aşamada dikkatli olunmalı, endikasyonlar iyi belirlenmeli, güvenilir kaynaklardan elde edilen medikal amaç sertifikalı sülükler kullanılmalıdır. Hastalara sülük tedavisinin kendi başına bir tedavi yöntemi olmadığı belirtilmeli, ancak multidisipliner yaklaşımın önemli bir parçası olabileceği vurgulanmalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel tez çalışması için Gazi Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 15.03.2023 tarih ve G.Ü. ET-23.026. kod numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayını takiben çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nın olanakları kullanılarak, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında (GÜDAM) yürütülmüştür.

3.1. Tıbbi Sülüklerin Temini

Hirudo verbana cinsi tıbbi sülükler Tarım ve Orman Bakanlığı onaylı ticari steril sülük üretim biyoçiftliğinden temin edildi. Klorsuz musluk suyuyla dolu, iyi havalandırılmış plastik kaplarda oda sıcaklığında muhafazaları sağlandı. Her 2-3 günde bir düzenli olarak suları değiştirilerek bakımları yapıldı.

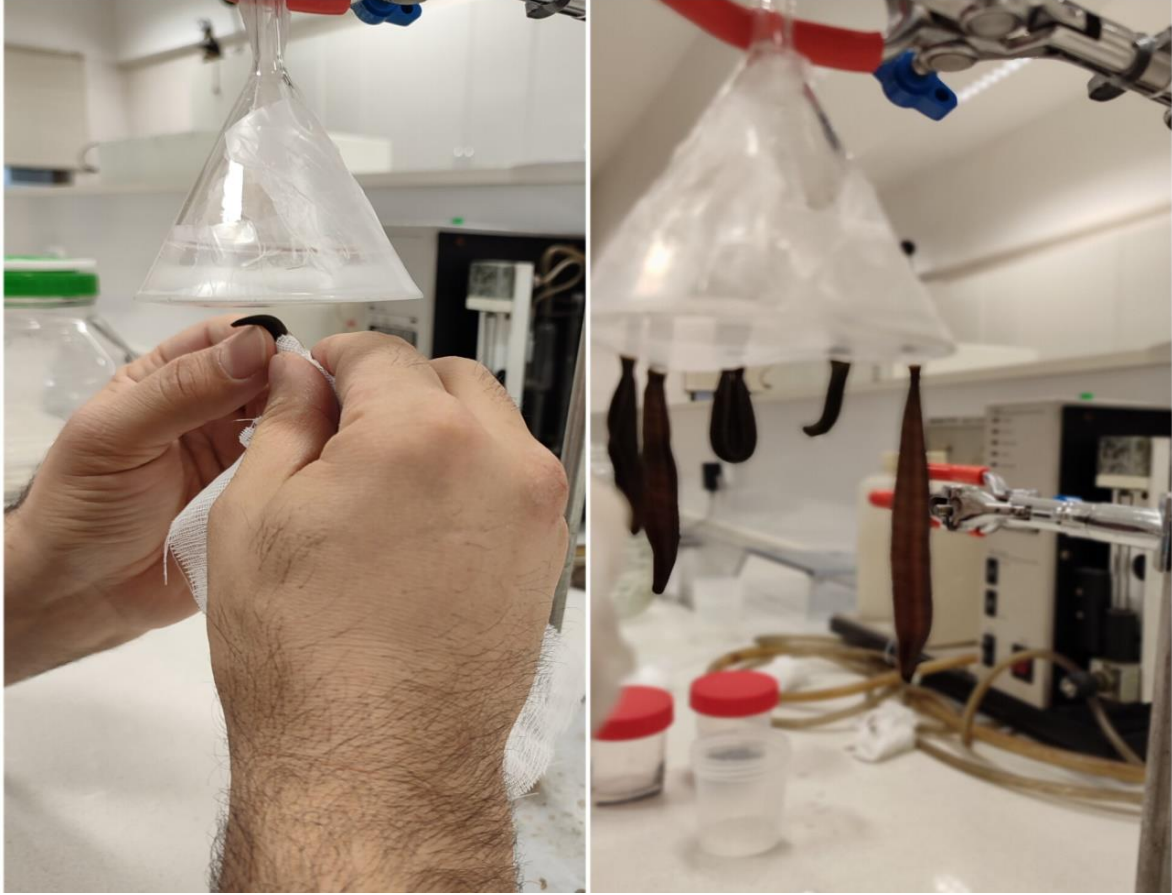
3.1.1. Deneyde kullanılan sülükler ve prosedür

Bu çalışmamızda tüm deney boyunca standart olarak 0,5 gr ağırlığındaki *Hirudo verbana* cinsi küçük tıbbi sülükleri kullanıldı. Çalışma süresince aynı boyut ve aynı tür tıbbi sülük kullanıldı.

3.1.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktının elde edilmesi

Bu çalışmada *Hirudo verbana* cinsi sülükler kullanılarak sülük salgı ekstraktı temin edildi. Sülük salgısı toplama işlemi için; 37°C sıcaklığında 0.001 M arginin ve 0.15 M sodyum klorür solüsyonundan oluşan bir fagostimülatör solüsyon aracılığıyla sülüklerin telef olmadan salgılarının elde edilmesini sağlayan yöntem olan Abdulkadir ve arkadaşlarının yöntemi uygulandı [67]. Fagostimülatör solüsyon bir parafilm tabakası ile kaplanmış ters çevrilmiş bir huniye aktarılarak sülükler doyuncaya ve kendilerini parafilminden ayırmaya kadar bu solüsyonu emmelerine izin verilir. Parafilminden ayrılan doymuş sülükleri posterior kısımdan anterior (ağız) kısma doğru emiciye doğru yumuşak bir şekilde sağırmak suretiyle tıbbi sülük salgısı toplandı (Resim 3.1.).

Elde edilen bu sıvı, 0.22 µm'lik bir filtreden geçirildi ve 4°C'de 2500 rpm hızında 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu sıvı, içeriğindeki proteinin korunması amacıyla eppendorf tüplerine bölünerek -20°C'de ışık görmeyecek şekilde saklandı.



Resim 3.1. Fagostimülatör solüsyon ile beslenmeleri sırasında tıbbi sülükler

3.1.3. Tıbbi sülük salgısında total protein tayini

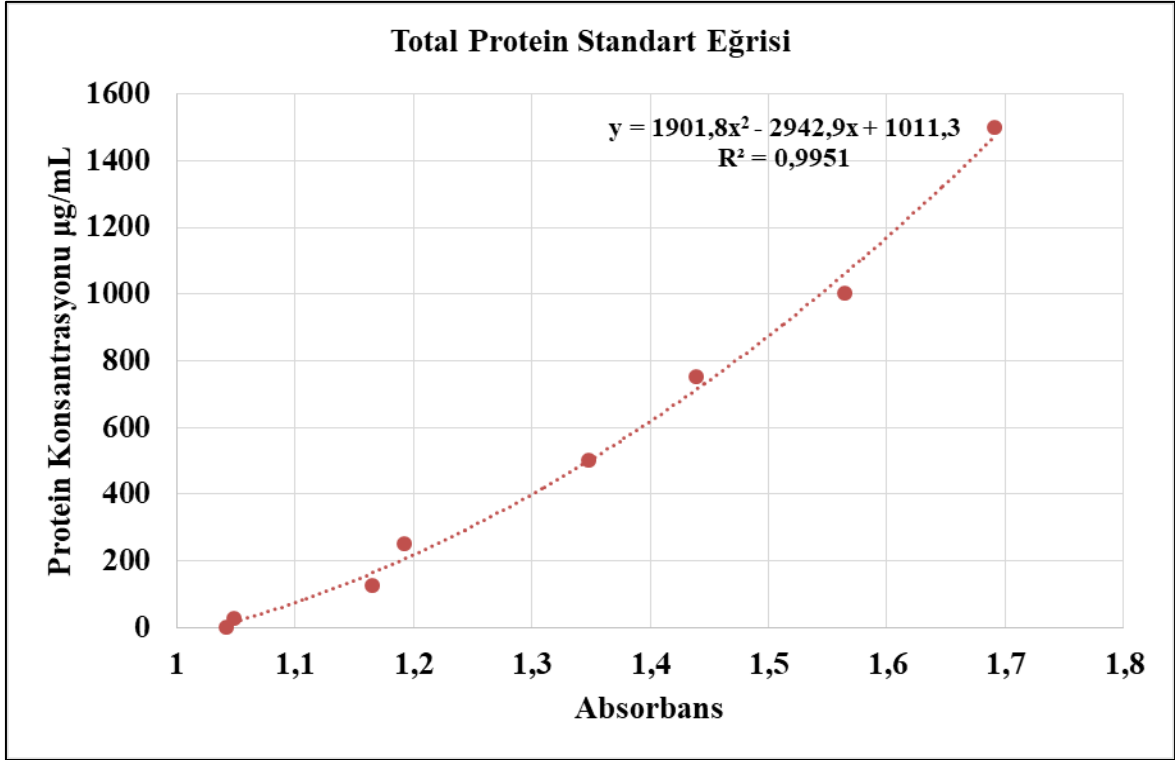
Sülük salgısı farklı görevleri olan 100'ün üzerinde farklı protein içermektedir. Bu sebeple ayrı ayrı her bir protein tayin etmenin yöntemsel zorluklarından ötürü total protein ölçümü yapıldı. Literatürde sülük salgı protein içeriği hem Bradford metodu ile total protein konsantrasyonu tayini yapılmış hem de SDS PAGE metodu ile protein bantları gösterilmiştir. Çalışmamızda sülük salgı ekstraktının total protein tayini için Bradford yöntemini kullanarak, Bradford Protein Assay Kit (ABP Biosciences - A.B.D.) aracılığıyla total protein tayini yapıldı [68].

Protein-boya bağlanma ilişkisini baz alan bu teknik, proteinlerin mikrogram miktarlarının niceliklerinin belirlenmesi için oldukça pratik, hızlı ve hassas bir yöntemdir. Protein ve peptit içeriği yüksek olan tıbbi sülük salgısı için bu tekniği tercih etme sebebimiz ise çalışma sırasındaki bekleme süresinin mümkün olan en kısa süreye indirilerek protein kaybının önüne geçmektir. Sülük salgısı ile ilgili doz hesaplamaları yapılırken protein konsantrasyonu üzerinden dozlar verilmiştir [69, 70]. Bu çalışmada da elde edilen sülük salgısından protein konsantrasyon analizi yaparak dozlarımızı $\mu\text{g}/\text{ml}$ cinsinden belirlendi.

Uygulama basamakları:

1. Konsantrasyonları $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ – $1500 \mu\text{g}/\text{mL}$ arasında olan standartlar, seri dilüsyon ile 6 farklı konsantrasyonda hazırlandı.
2. Standartlar ve sülük salgı ekstraktı, 1 mL olacak şekilde etiketlenmiş test tüplerine pipetlendi.
3. Her bir tüpe 1 mL Bradford reaktifi eklenerek iyice karıştırıldı.
4. Örnekler 5 dakika boyunca, 37°C 'de inkübe edildi.
5. Örneklerin absorbans değerleri 595 nm 'de köre karşı spektrofotometrede ölçüldü.
6. Protein miktarları oluşturulan standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. (Şekil 3.2.)

Total Protein Miktarı Hesaplama: (Numune Absorbansı / Standart Absorbansı) * standart konsantrasyonu



Şekil 3.1. Sülük salgı ekstraktında total protein tayini

Sonuçlar $\mu\text{g}/\text{mL}$ cinsinden verilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız sülük salgı ekstraktının total protein konsantrasyonu $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur.

3.2. Deneysel Hayvanlarının Temini ve Laboratuvar Koşulları

Çalışmada Gazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yerel yetiştirilmiş toplam 24 adet, 300-350 gram arasında değişen Wistar Albino cinsi dişi ratlar (*Rattus norvegicus albinus*) kullanıldı.

Ratlar hayvan laboratuvarında uygun kafeslerde, 21 ± 2 santigrat derece sıcaklıkta ve ışıkların saat 08:00'de yakılıp, saat 20:00'de söndürülmesiyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritminin sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanları ve bakımlarını içeren prosedürler kurumsal yönergelere uygun olarak yürütüldü. Gazi Üniversitesi Etik Kurulu ve Kılavuzda belirtilen kriterlere uygun laboratuvarda yetiştirilmiş ratlar kullanıldı. Hayvanlar standart rat yemi ile beslendi, herhangi bir diyet ya da su kısıtlaması yapılmadı.

3.3. Cerrahi Yöntem ve İnsizyonel Yara Modeli

Gerekli anestezi maddelerinin; ketamin (80 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu ile tüm gruplardaki tüm sıçanların anestezisi uygun şartlarda gerçekleştirildi. Anestezi sonrası tıraş makinesi ile sıçanların kıl tıraşı yapıldı. Genel anestezi altında cerrahi operasyon tamamlandı. Tüm gruplardaki tüm sıçanlara Resim 3.2.'de gösterildiği gibi dorsal bölgeye vertikal tam kat insizyon uygulandı.

Ratların dorsal bölgelerine, medial hatta 2 cm uzunluğunda vertikal insizyon modeli cerrahi cetvel ile ölçülerek, cerrahi kalem yardımıyla çizildi. İnsizyonların anatomik sınırlarının belirlenmesinin ardından, tam kat insizyonel kesi yapıldı. Sonrasında tüm insizyonlar basit dikiş ile ilk pozisyonlarına yeniden dikildi.



Resim 3.2. Deney hayvanlarının dorsal bölgelerinde yapılan insizyonel operasyon

3.4. Deney Grupları

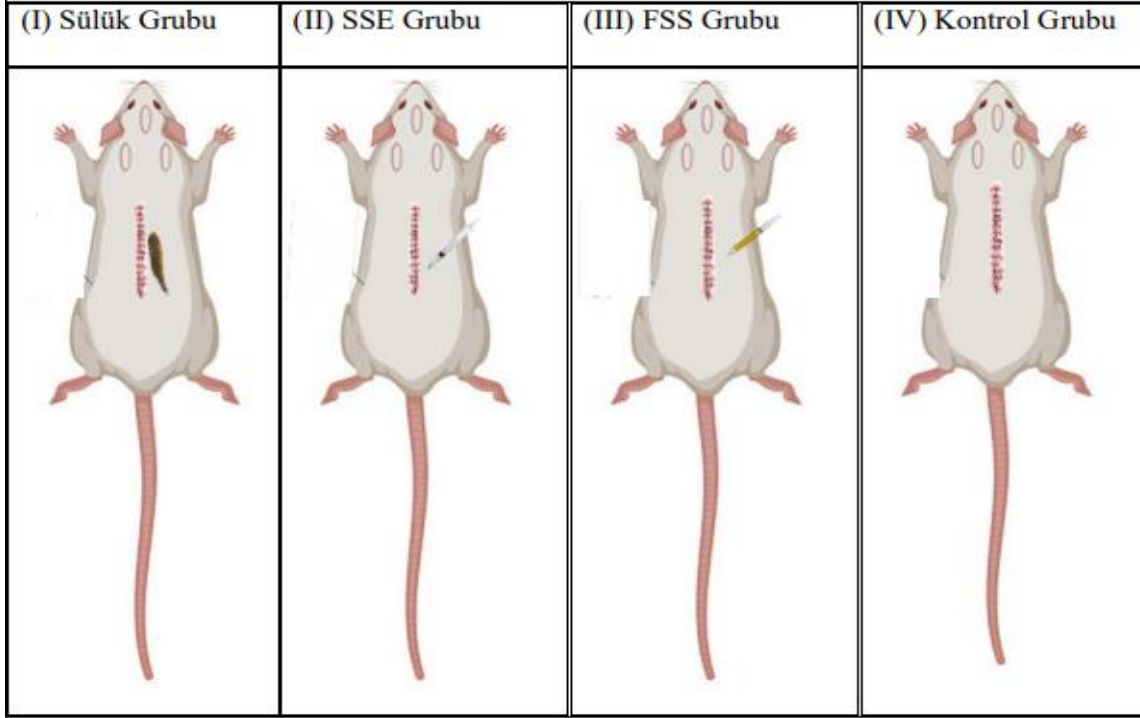
(I) Grubu: Tıbbi sülük uygulanan gruptur. Operasyon günü primer kapatılmış vertikal insizyon uygulaması sonrası, anestezi altında insizyonun sağına 1 adet tıbbi sülük uygulanıp, 48 saat sonra aynı işlem insizyonun sol tarafına uygulandı.

(II) Grubu: Sülük salgı ekstraktı (SSE) enjekte edilen gruptur. Operasyon günü primer kapatılmış vertikal insizyon uygulaması sonrası, anestezi altında insizyonun sağına 0,5 cc tıbbi sülük salgı ekstraktı subkütan olarak uygulandı, 48 saat sonra insizyonun sol tarafına aynı işlem uygulandı.

(III) Grubu: Fagostimülatör solüsyon (FSS) enjekte edilen gruptur. Operasyon günü primer kapatılmış vertikal insizyon uygulaması sonrası, anestezi altında insizyonun sağına 0,5 cc fagostimülatör solüsyon subkütan olarak uygulandı, 48 saat sonra aynı işlem insizyonun sol tarafına uygulandı.

(IV) Grubu: Kontrol grubudur. Operasyon günü vertikal insizyon yapıldıktan sonra primer kapatılmış, daha sonra yara bölgesine herhangi bir müdahale edilmedi.

Postoperatif yedinci günde tüm hayvanlara uygun anestezi ve etik koşullar altında disekte edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Deney Grupları

3.4.1. Tıbbi sülük uygulaması

Tıbbi sülük uygulanan gruptur. Operasyon günü primer kapatılmış vertikal insizyon uygulaması sonrası, anestezi altında insizyonun sağına 1 adet küçük boy (ortalama 0.5 g) steril tıbbi sülük uygulanıp, 48 saat sonra aynı işlem insizyonun sol tarafına uygulandı (Resim 3.3). Sülükler beslenmelerini tamamladıktan sonra (ortalama 0.5 mL kan emdiler) kendiliğinden uygulandıkları bölgeden ayrıldılar. Sülüklerin ağırlıkları uygulama öncesinde ve sonrasında tartılarak kaydedildi. Uygulama sonrasında tıbbi sülükler %90 etanol içerisine koyularak imha edildiler.



Resim 3.3. Vertikal tam kat insizyonel kesiye steril tıbbi sülük uygulaması

3.4.2. SSE enjeksiyonu

Operasyon günü primer kapatılmış vertikal insizyon uygulaması sonrası, anestezi altında insizyonun sağına 0,5 cc tıbbi sülük salgı ekstraktı subkütan olarak uygulandı, 48 saat sonra insizyonun sol tarafına aynı işlem uygulandı (Resim 3.4).



Resim 3.4. Vertikal tam kat insizyonel kesiye tıbbi sülük salgısı enjeksiyonu

3.4.3. FSS enjeksiyonu

Fagostimülatör solüsyon; sülük salgısı elde etmek amacıyla sülükleri beslerken kullanılan, 0.001 M arginin ve 0.15 M sodyum klorürden oluşan bir besleme solüsyonudur. Operasyon günü primer kapatılmış vertikal insizyon uygulaması sonrası, anestezi altında insizyonun

sağına 0,5 cc fagostimülator solüsyon subkütan olarak uygulandı, 48 saat sonra aynı işlem insizyonun sol tarafına uygulandı.

Deney protokolünde SSE elde etmek için tıbbi sülükler FSS ile beslendi, bu nedenle tıbbi sülük salgısının etkilerini daha iyi anlamak amacıyla bu gruba FSS enjeksiyonu uygulandı.

3.5. Diseksiyon

İnsizyonel cerrahisinin postoperatif 7. gününde tüm sıçanların anestezisi uygun şartlarda gerçekleştirildi. Hayvanların tamamen anestezisi altına girmelerinin ardından, intrakardiyak şekilde kan alınarak ötanazi işlemi gerçekleştirildi. Kan örnekleri, kan tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüj ardından kandan elde edilen serum örnekleri eppendorf tüplerine ayrıştırılarak, -80 °C'de muhafaza edildiler.

Dorsal cilt dokusu ötanazi sonrası insizyon hattının etrafından histopatolojik değerlendirme için eksize edildi. Dokuların bir kısmı içerisinde %10'luk tamponlu formaldehit bulunan kaplar içerisinde muhafaza edildiler. Geriye kalan doku numuneleri ise biyokimyasal incelemeler için sıvı azotta dondurularak -80 °C'de muhafaza edildiler.

3.6. Histolojik İncelemeler

Alınan örnekler öncelikle %10 nötral formaldehit solüsyonunda 72 saat boyunca tespit edildiler. Tespit işleminin tamamlanmasının ardından, rutin takip işlemleri sağlandı. Tüm dokular, kasetlere konularak akarsu altında yıkanmalarının ardından, suyun uzaklaştırılması (dehidratasyon) için artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirildiler. Dokular, parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirilerek erimiş parafine gömüldüler ve parafin bloklar haline getirildiler. Hazırlanan parafin bloklarından 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı.

Alınan kesitler, Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson's trichrome yöntemleri ile boyanarak elde edilen örneklerdeki histomorfolojik değişimler ve OMP tutulumları, Leica DM4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde ışık mikroskobu ile incelendi. Histomorfolojik olarak incelenen alanlar, Leica – Qwin programında resimleri

çekilerek değerlendirilmeleri yapıldı ve histomorfolojik değerlendirme için skorlamalar yapıldı [71].

3.7. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Elde edilen 4-5 mikronluk kesitler, 2 kez 15 dakika boyunca ksilol içinde bekletildi. Ksilolden ayrılan örnekler, sırasıyla %100, %95, %90, %80 ve %70 içeriğindeki etil alkol çözeltilerinde 10'er dakika tutuldu. Daha sonra, 2 defa 5 dakika boyunca distile su içerisinde bekletilerek rehidrate edildiler.

Nemli ortamda immünohistokimya barına dizilen dokuların etrafı PAP-Pen ile çizilerek 3'er dakika boyunca 3 kez PBS (Phosphate Buffer Saline, pH: 7,4) ile yıkandı. Özgün olmayan bağlanmayı engellemek için 10 dakika serum blokaj çözelti analiz örnekleri VEGF (Kat: 114409 Lot: 05310) primer antikoru ile +4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra PBS ile yıkandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için %3 hidrojen peroksit çözeltisi uygulandı.

Örnekler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra biotinli sekonder antikor uygulandı. Yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkanan örnekler diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen uygulanarak örneklerde gözle görülebilen immün reaksiyonlar oluşana kadar bekletildi. PBS ile yıkanan örnekler zemin boyası olarak Mayer'in Hematoksileni boyandı.

Alkol serisinden geçirilerek dehidrate edilen örnekler, ksilolde bekletildikten sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Tüm örnekler Leica DM4000 (Almanya) bilgisayar destekli görüntüleme sistemi aracılığıyla Leica Q Vin 3 programı fotoğraflandı ve değerlendirildi. Her hücre için seçilen bağımsız 10 alanda, belirtilen antikorlara ait hücre tutulumları yüz hücre üzerinden değerlendirildi. İmmünohistokimyasal analizler için skorlamalar yapıldı [72].

3.8. Doku Homojenizasyonu

İnsizyonel yara bölgesinden alınan dokulardan homojenat elde etmek için doku homojenizasyon işlemi uygulandı.

Uygulama basamakları şu şekildedir:

1. Cilt dokusu öncelikle küçük parçalara bölünmüş ve daha sonra fazla kanın sonuçları etkilenmemesi için PBS (pH 7.4) ile yıkandı.
2. Fazla solüsyondan arındırılan dokudan her bir örnek için 100 mg tartılarak 900 µL PBS eklendi.
3. Deney tüpü içerisine aktarılan bu karışım, buz banyosu içerisinde bıçaklı homojenizatör (Heidolph, SilentCrusher) aracılığıyla homojenize edildi.
4. Homojenizatlar, buz üzerinde 15 dakika inkübe edilmelerinin ardından +4°C'de 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi (Nüve NF815). Santrifüj sonrasında süpernatant ivedi şekilde alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

3.9. ELİSA Yöntemi ve Prensibi

Doku homojenizasyonu ile elde edilen süpernatantlardan ve serumlardan IGF-1, TGF- α ve HIF-1- α konsantrasyon tespiti için sandwich test prensibine sahip ELİSA yöntemi kullanıldı. Rat IGF-1 Cat: ELK1136; Rat TGF- α , Cat: ELK2464 ve Rat HIF-1- α Cat: ELK1604, ELK Biotechnology marka ELISA kitleri kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan tüm ELISA kitleri aynı test prensibine ve basamaklara sahiptir.

Kitlere ait mikrotitre plakası; Rat IGF-1, Rat TGF- α veya Rat HIF-1- α 'ya özgü antikorlarla önceden kaplanmıştır.

3.9.1. Standartların hazırlanması

1. Standart, 1,0 mL standart seyreltici tampon ile sulandırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında tutularak ardından, köpürmeyecek şekilde hafifçe çalkalandı.
2. Stok solüsyondaki (konsantrasyonu HIF-1- α ve IGF-1 için; 10 ng/ mL ve TGF- α için; 500 pg/ mL) olan standarttan, 0,5 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.
3. HIF-1- α ve IGF-1 standartları için : 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,63 ng/mL, 0,32 ng/mL, 0,16ng/ mL ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi tüp hazırlandı.

4. TGF- α standartı için : 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL, 15,63pg/mL, 7,82pg/mL ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.

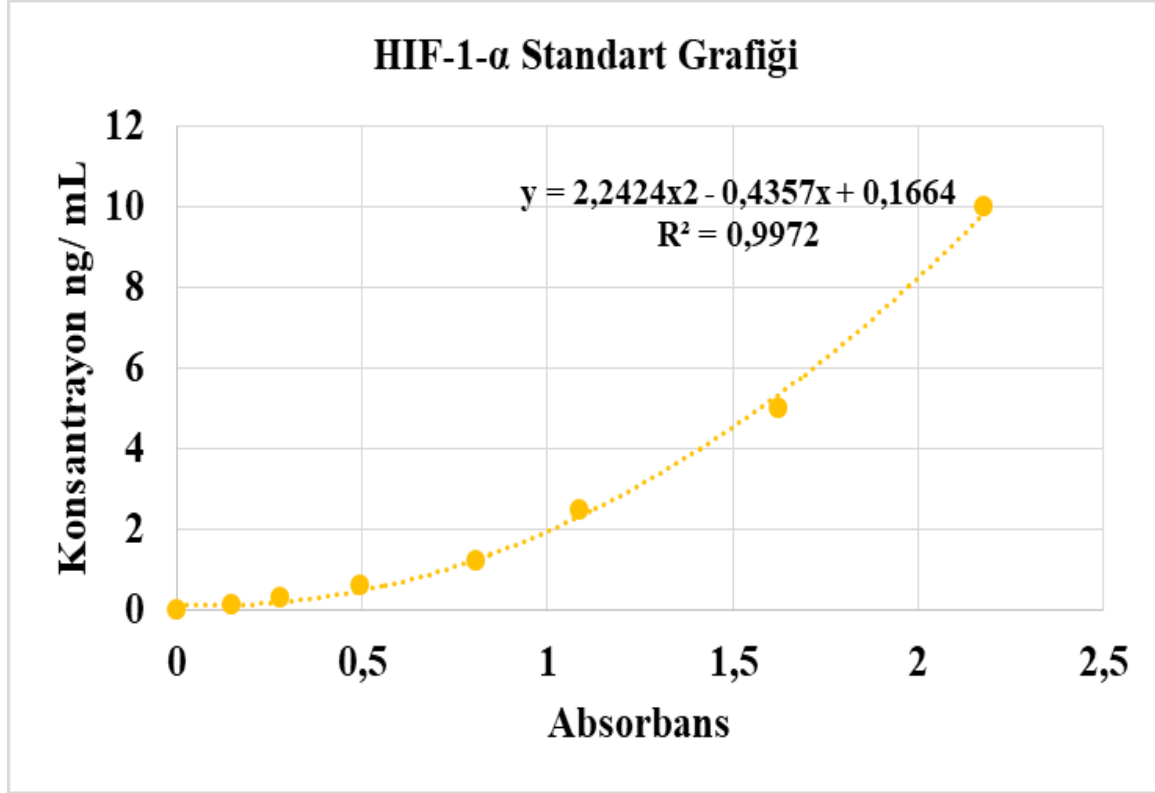
3.9.2. Testin yapılışı

Serum ve doku homojenatlarındaki HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 konsantrasyonlarının tespiti için ELISA testinin basamakları aşağıda verildiği şekilde yapıldı.

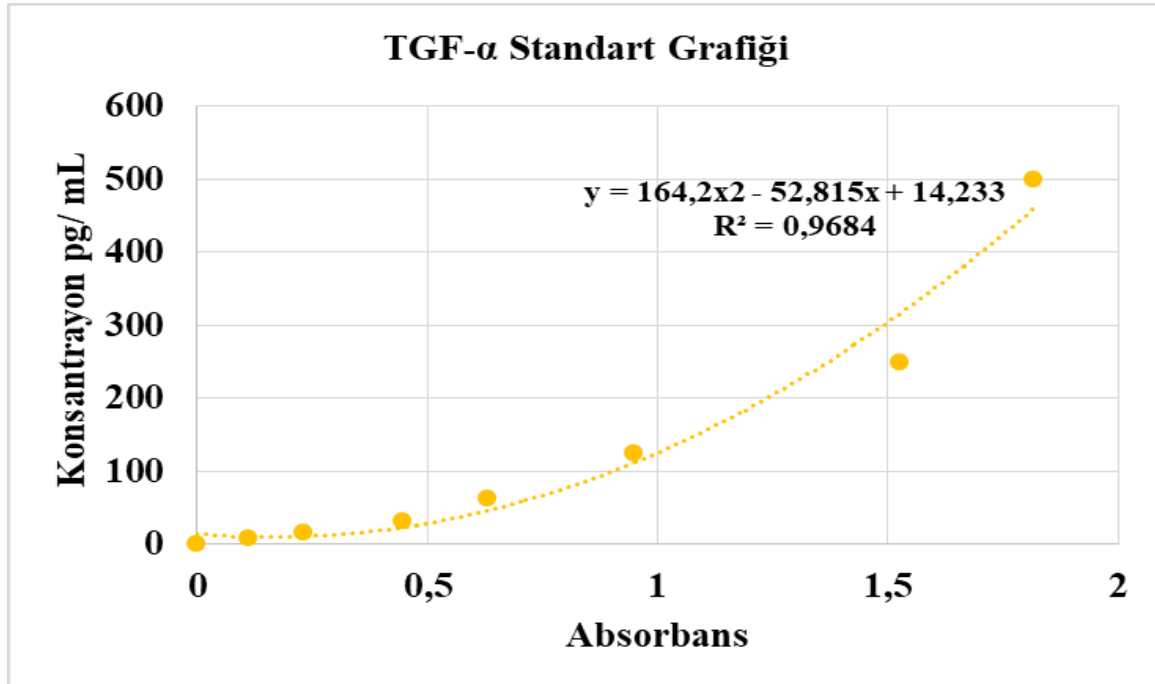
1. Kit oda sıcaklığına geldikten sonra, her kuyucuğa 100 μ L olacak şekilde standart çalışma tamponu veya numune eklenerek 37°C'de 80 dakika inkübe edildi.
2. Plakadaki sıvıdan arındırılarak, her kuyucuğa 200 μ L 1 \times wash buffer (Yıkama solüsyonu) eklenerek 3 kez yıkandı. Sıvının plakadan tamamen uzaklaştırılmasının ardından, her kuyucuğa 100 μ L Biotinlenmiş Antikor Çalışma Solüsyonu (1 \times) eklendi ve 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.
3. Plakanın ters çevrilerek bir zemine vurulması suretiyle solüsyon uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 200 μ L 1 \times wash buffer eklendi ve plaka 3 kez yıkandı. Kuruduktan sonra her bir kuyucuğa 100 μ L 1 \times Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenerek 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.
4. Plakadaki sıvı uzaklaştırılarak, her kuyucuğa 200 μ L 1 \times wash buffer eklendi ve plakayı beş kez yıkandı. Döndürerek kurutmanın ardından, her kuyucuğa 90 μ L TMB Substrat Solüsyonu eklendi ve karanlıkta 20 dakika 37°C'de inkübe edildi.
5. Her kuyucuğa 50 μ L durdurma solüsyonu eklendi.
6. Ardından plaka, bir plaka çalkalayıcı üzerinde 1 dakika boyunca çalkalandı. Mikroplaka ivedilikle 450 nm'ye ayarlanmış olan Elisa Mikroplaka Okuyucuda okutularak, OD (optik yoğunluk – optical density), sonuçlarının kaydedilmesi suretiyle alındı.

Standart konsantrasyonlar Y, standartlara ait absorbanslar X eksenine yerleştirilerek standart eğrisi çizildi. Örnek konsantrasyonları standart eğriden hesaplandı. HIF-1- α

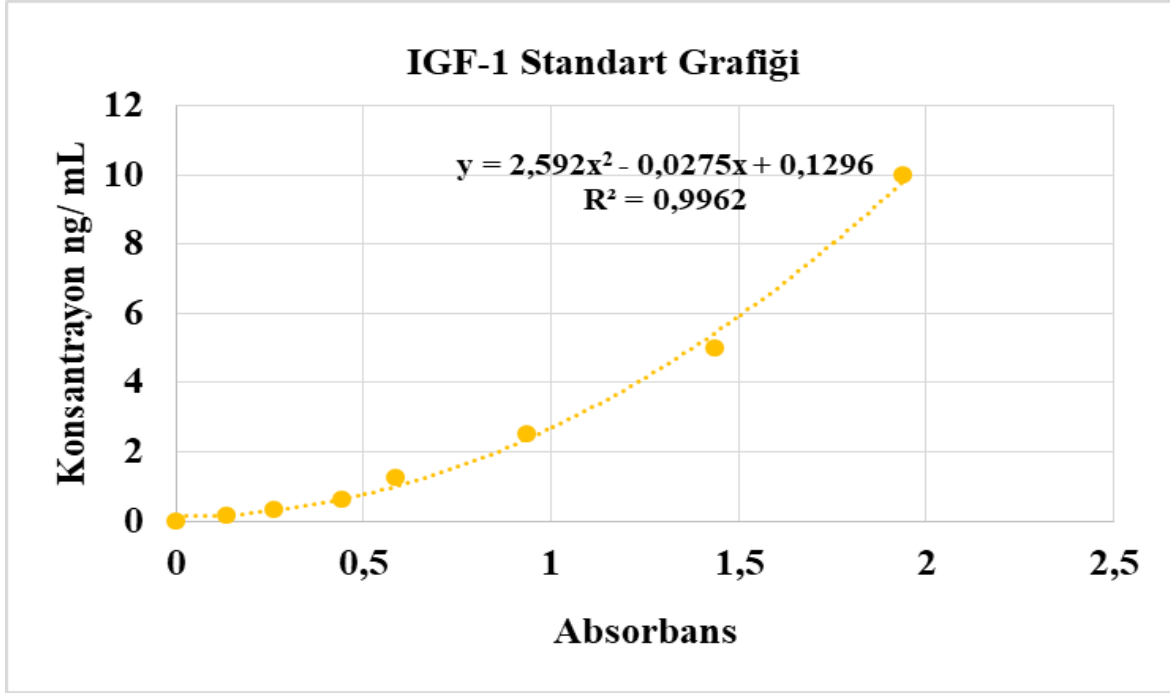
konsantrasyonu ng/ mL (Şekil 3.3.), TGF- α konsantrasyonu pg/ mL (Şekil 3.4.) ve IGF-1 konsantrasyonu ng/ mL olarak verildi (Şekil 3.5.).



Şekil 3.3. HIF-1- α standart grafiği



Şekil 3.4. TGF- α standart grafiği



Şekil 3.5. IGF-1 standart grafiği

3.10. İstatistiksel Yöntem

Çalışmadan elde edilen veriler, IBM SPSS 21 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL) programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Veriler ortalama (mean) ve SEM (standard error of mean - ortalamanın standart hatası) olarak ifade edildi. Bağımsız grup incelemelerinde; parametrik test varsayımları sağlandığından Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc: Tukey testi) kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında da tek tek karşılaştırıldı. Tüm analizler %95 güven aralığında ve 0.05 anlamlılık düzeyinde kabul edilmiş olup, bu değerin altında kalan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. MedCalc – version 20.305 Programı aracılığıyla istatistiksel verilerden figürler çizildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmada deney gruplarına ait hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde ve insizyonel yara dokusu numunelerinden elde edilen homojenatlarda HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 parametreleri değerlendirildi.

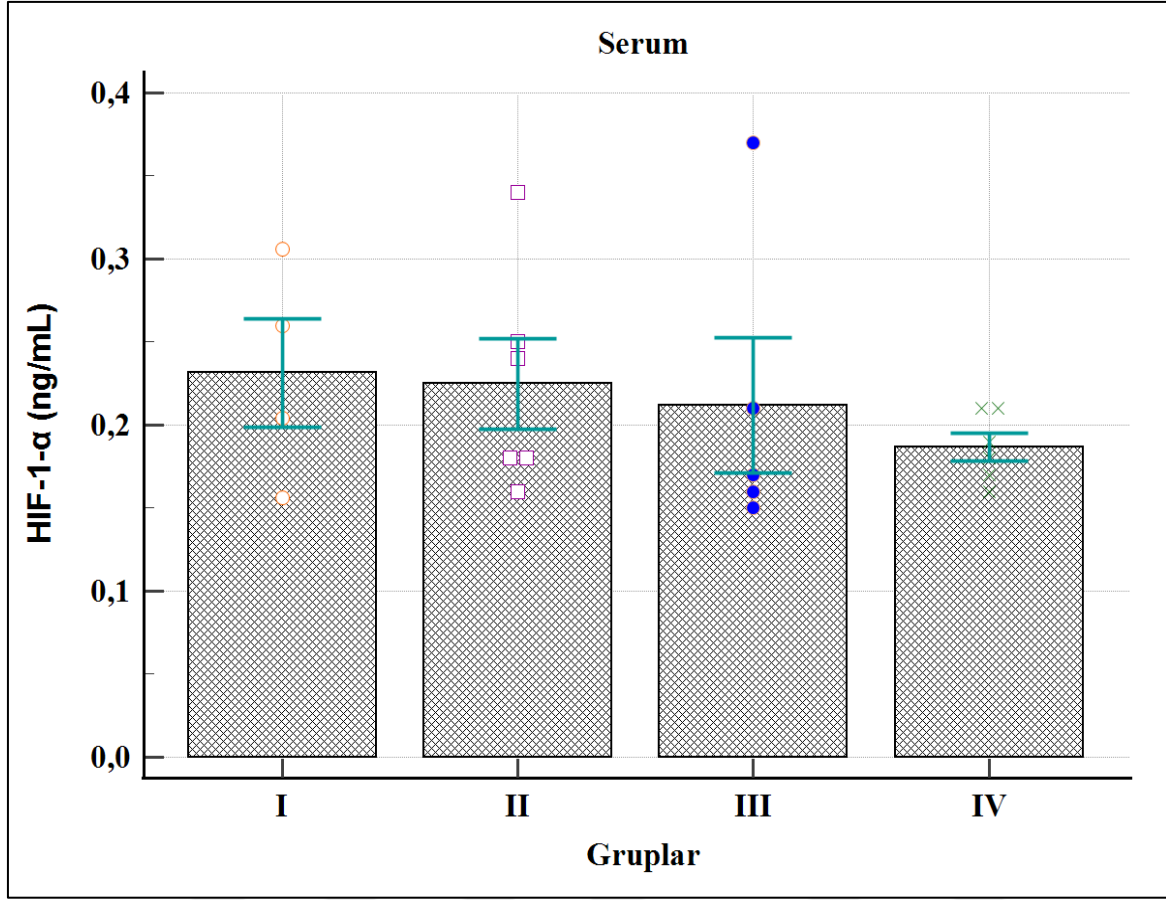
4.1.1. Serum örneklerine ait bulgular

Serum örneklerindeki HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 konsantrasyonları Çizelge 4.1.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Serum örneklerinde biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

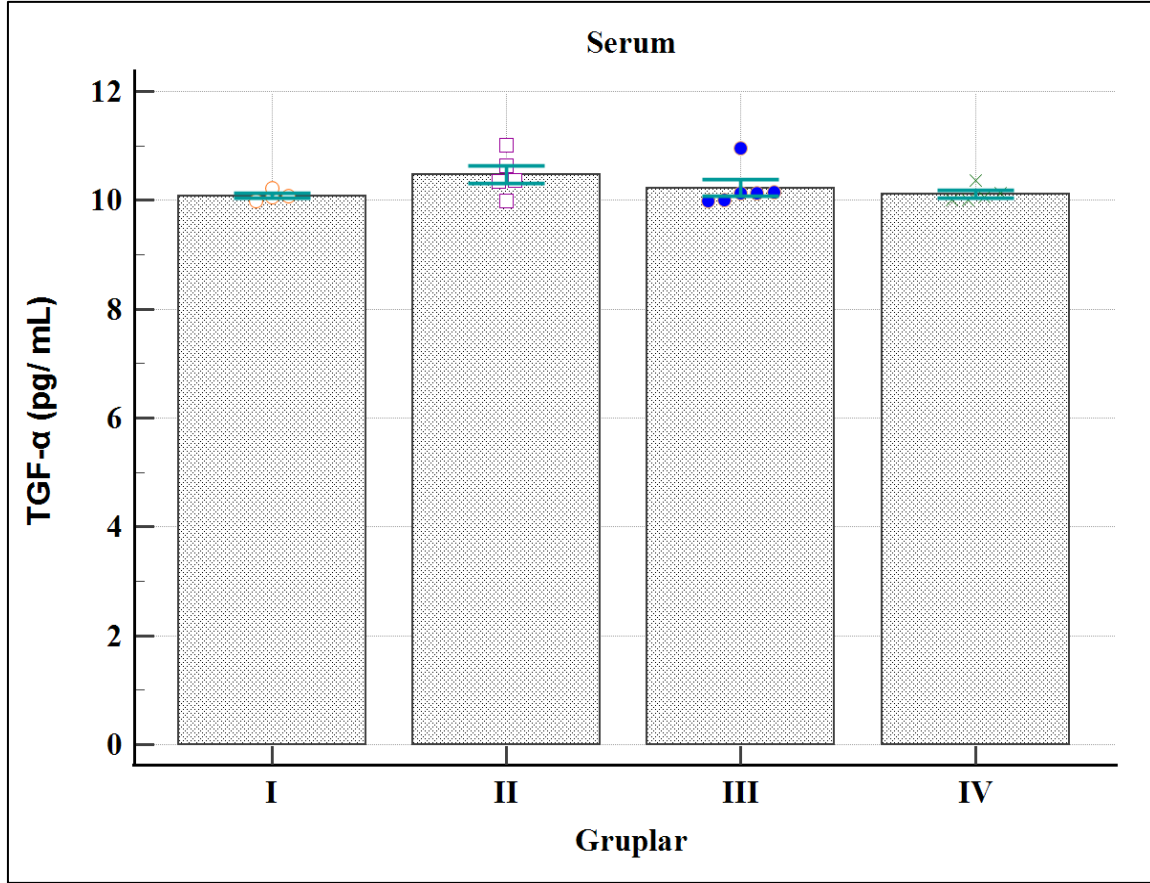
Serum	Gruplar	Ortalama \pm SEM	p değeri
HIF-1- α (ng/mL)	(I) Sülük Grubu	0,23 \pm 0,03	0,662
	(II) SSE Grubu	0,23 \pm 0,03	
	(III) FSS Grubu	0,21 \pm 0,04	
	(IV) Kontrol Grubu	0,18 \pm 0,008	
TGF- α (pg/ mL)	(I) Sülük Grubu	10,08 \pm 0,05	0,200
	(II) SSE Grubu	10,47 \pm 0,17	
	(III) FSS Grubu	10,23 \pm 0,15	
	(IV) Kontrol Grubu	10,11 \pm 0,09	
IGF-1 (ng/ mL)	(I) Sülük Grubu	0,22 \pm 0,016	0,575
	(II) SSE Grubu	0,21 \pm 0,02	
	(III) FSS Grubu	0,19 \pm 0,005	
	(IV) Kontrol Grubu	0,22 \pm 0,02	

Serum örneklerinde, deney grupları arasında HIF-1- α (ng/mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,662$). Deney gruplarındaki ortalama \pm SEM değerleri; sülük (I) grubu (0,23 \pm 0,03), SSE (II) grubu (0,23 \pm 0,03), FSS (III) grubu (0,21 \pm 0,04) ve kontrol (IV) grubu (0,18 \pm 0,008) olarak tespit edildi, (Şekil 4.1.).



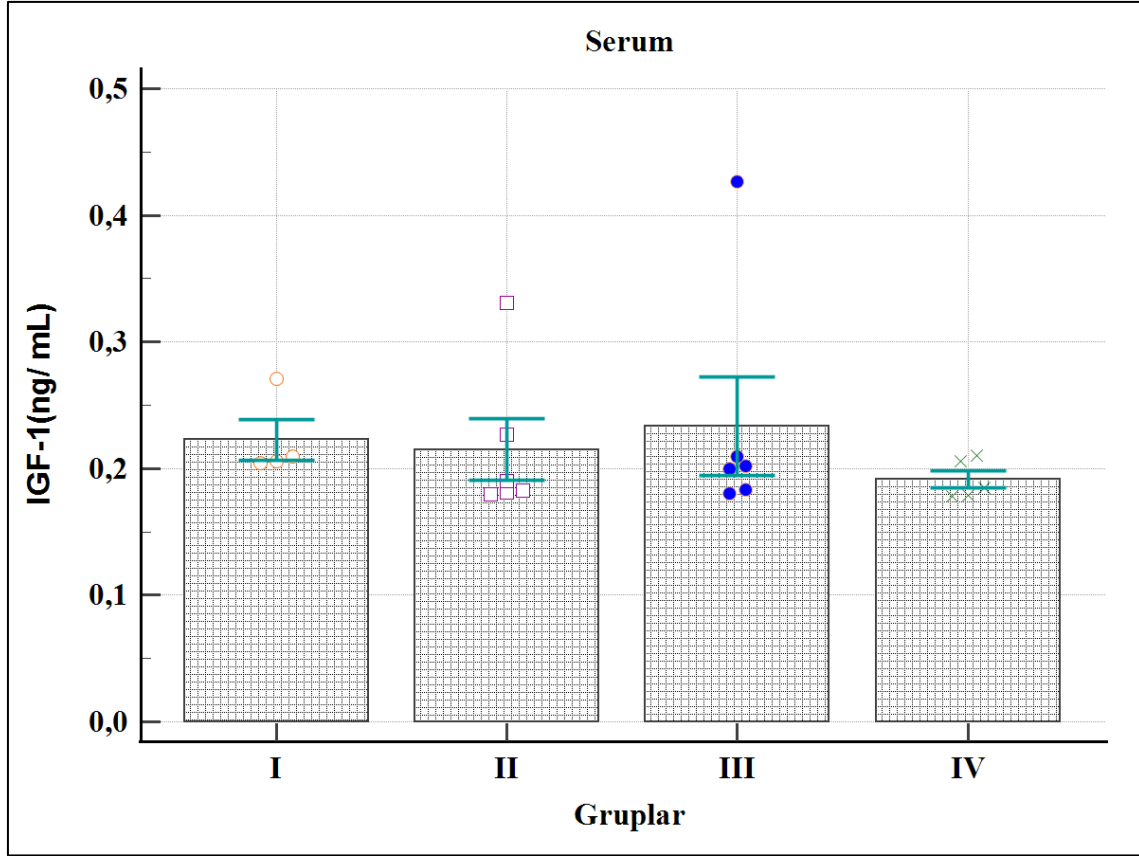
Şekil 4.1. Serum örneklerindeki HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

Serum örneklerinde, deney grupları arasında TGF- α (pg/ mL) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,200$). Deney gruplarındaki ortalama \pm SEM değerleri; sülük (I) grubu ($10,08 \pm 0,05$), SSE (II) grubu ($10,47 \pm 0,17$), FSS (III) grubu ($10,23 \pm 0,15$) ve kontrol (IV) grubu ($10,11 \pm 0,09$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Serum örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

Serum örneklerinde, deney grupları arasında IGF-1 (ng/ mL) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,575$). Deney gruplarındaki ortalama \pm SEM değerleri; sülük (I) grubu ($0,22 \pm 0,016$), SSE (II) grubu ($0,21 \pm 0,02$), FSS (III) grubu ($0,19 \pm 0,005$) ve kontrol (IV) grubu ($0,22 \pm 0,02$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.3). [32]



Şekil 4.3. Serum örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

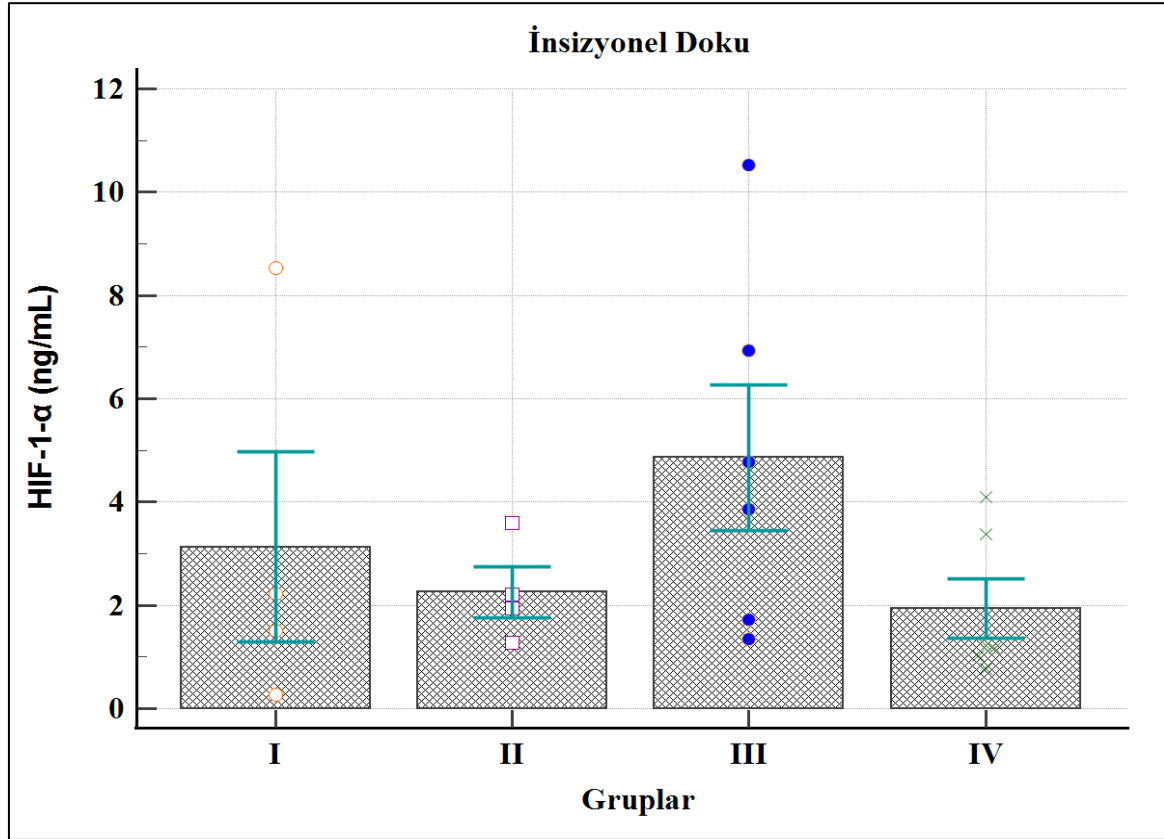
4.1.2. Doku örneklerine ait bulgular

Doku örneklerindeki HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 konsantrasyonları Çizelge 4.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Doku örneklerinde biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

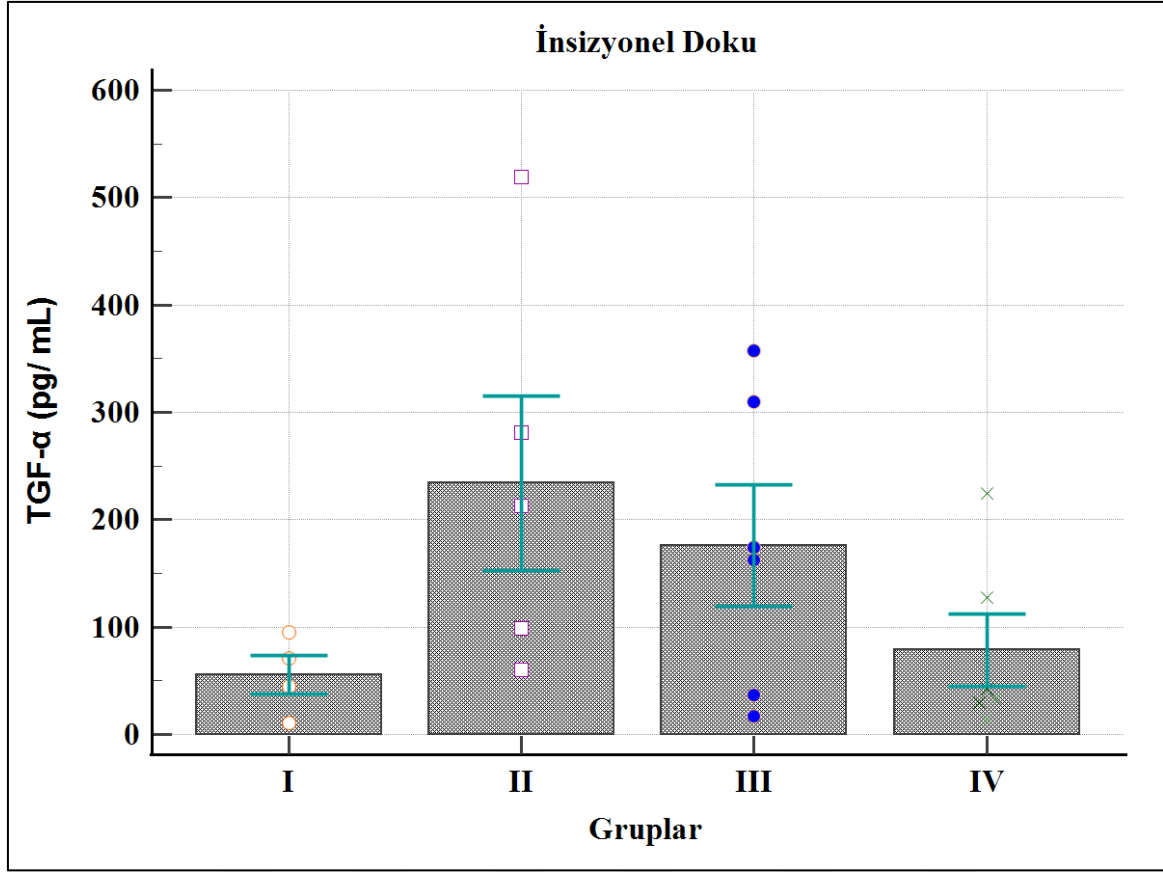
İnsizyonel Doku	Gruplar	Ortalama ± SEM	p değeri
HIF-1- α (ng/mL)	(I) Sülük Grubu	3,13 ± 1,85	0,357
	(II) SSE Grubu	2,25 ± 0,49	
	(III) FSS Grubu	4,86 ± 1,41	
	(IV) Kontrol Grubu	1,94 ± 0,58	
TGF- α (pg/ mL)	(I) Sülük Grubu	55,48 ± 18,07	0,141
	(II) SSE Grubu	234,21 ± 81,32	
	(III) FSS Grubu	176,24 ± 56,55	
	(IV) Kontrol Grubu	78,63 ± 33,48	
IGF-1 (ng/ mL)	(I) Sülük Grubu	1,71 ± 0,82	0,634
	(II) SSE Grubu	3,7 ± 1,83	
	(III) FSS Grubu	2,30 ± 0,81	
	(IV) Kontrol Grubu	2,46 ± 0,91	

İnsizyonel yara dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında HIF-1- α açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,357$). Deney gruplarındaki ortalama \pm SEM değerleri; sülük (I) grubu ($3,13 \pm 1,85$), SSE (II) grubu ($2,25 \pm 0,49$), FSS (III) grubu ($4,86 \pm 01,41$) ve kontrol (IV) grubu ($1,94 \pm 0,58$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.4.).



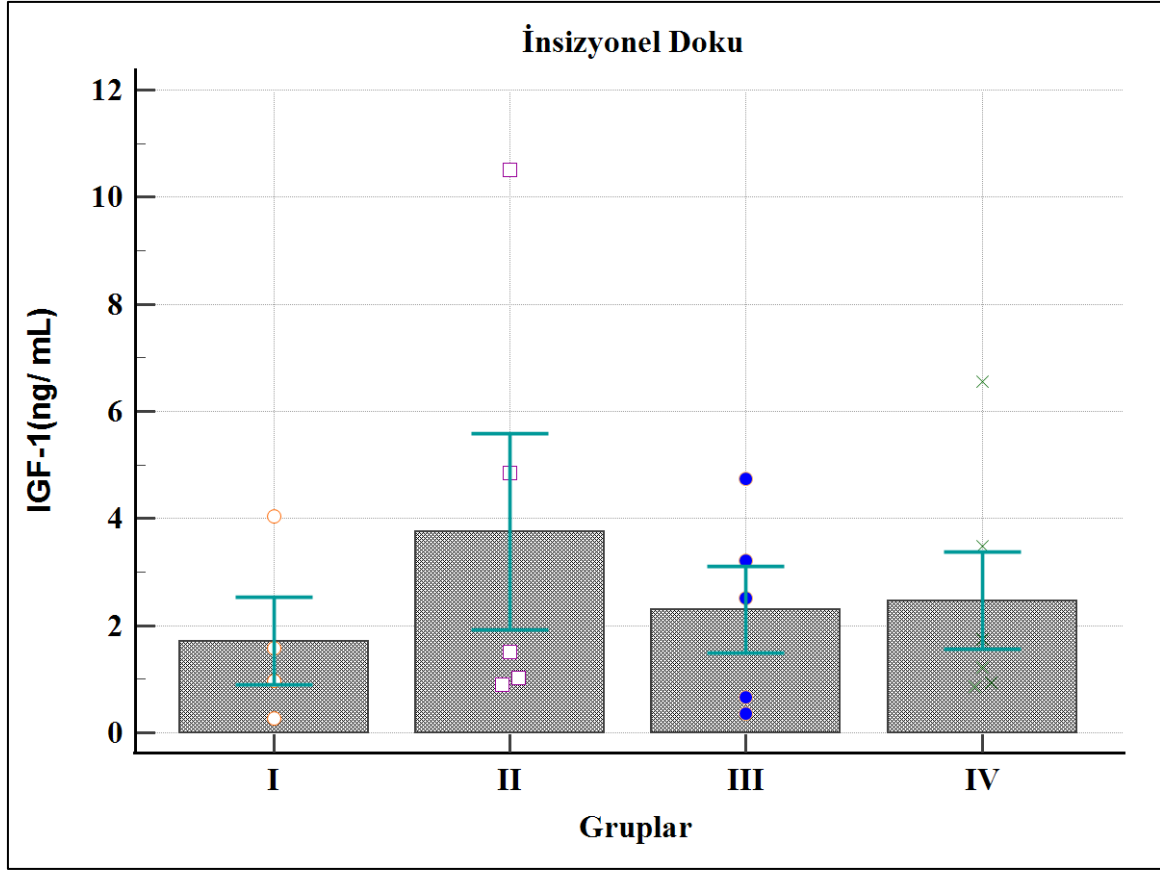
Şekil 4.4. İnsizyonel doku homojenatlarında HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

İnsizyonel yara dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında TGF- α açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,141$). Deney gruplarındaki ortalama \pm SEM değerleri; sülük (I) grubu ($55,48 \pm 18,07$), SSE (II) grubu ($234,21 \pm 81,32$), FSS (III) grubu ($176,24 \pm 56,55$) ve kontrol (IV) grubu ($78,63 \pm 33,48$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. İnsizyonel doku örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

İnsizyonel yara dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında IGF-1 açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,634$). Deney gruplarındaki ortalama \pm SEM değerleri; sülük (I) grubu ($1,71 \pm 0,82$), SSE (II) grubu ($3,7 \pm 1,83$), FSS (III) grubu ($2,30 \pm 0,81$) ve kontrol (IV) grubu ($2,46 \pm 0,91$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. İnsizyonel doku örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

4.2. Histopatolojik bulgular

İnsizyonel yara dokusu örnekleri; epitel rejenerasyon, granülasyon dokusu kalınlığı, fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon, inflamatuvar hücre varlığı ve VEGF (+) hücre (%) parametreleri açısından değerlendirildi.

Epitel rejenerasyonu, granülasyon doku kalınlığı, fibroblast proliferasyonu ve neovaskülarizasyon bulguları SSE (II) grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek seviyede izlendi.

İnflamatuvar hücre ve nekroz varlığı kontrol (IV) grubunda en yüksek oranda tespit edilirken, en sınırlı ölçüde SSE (II) grubunda izlendi.

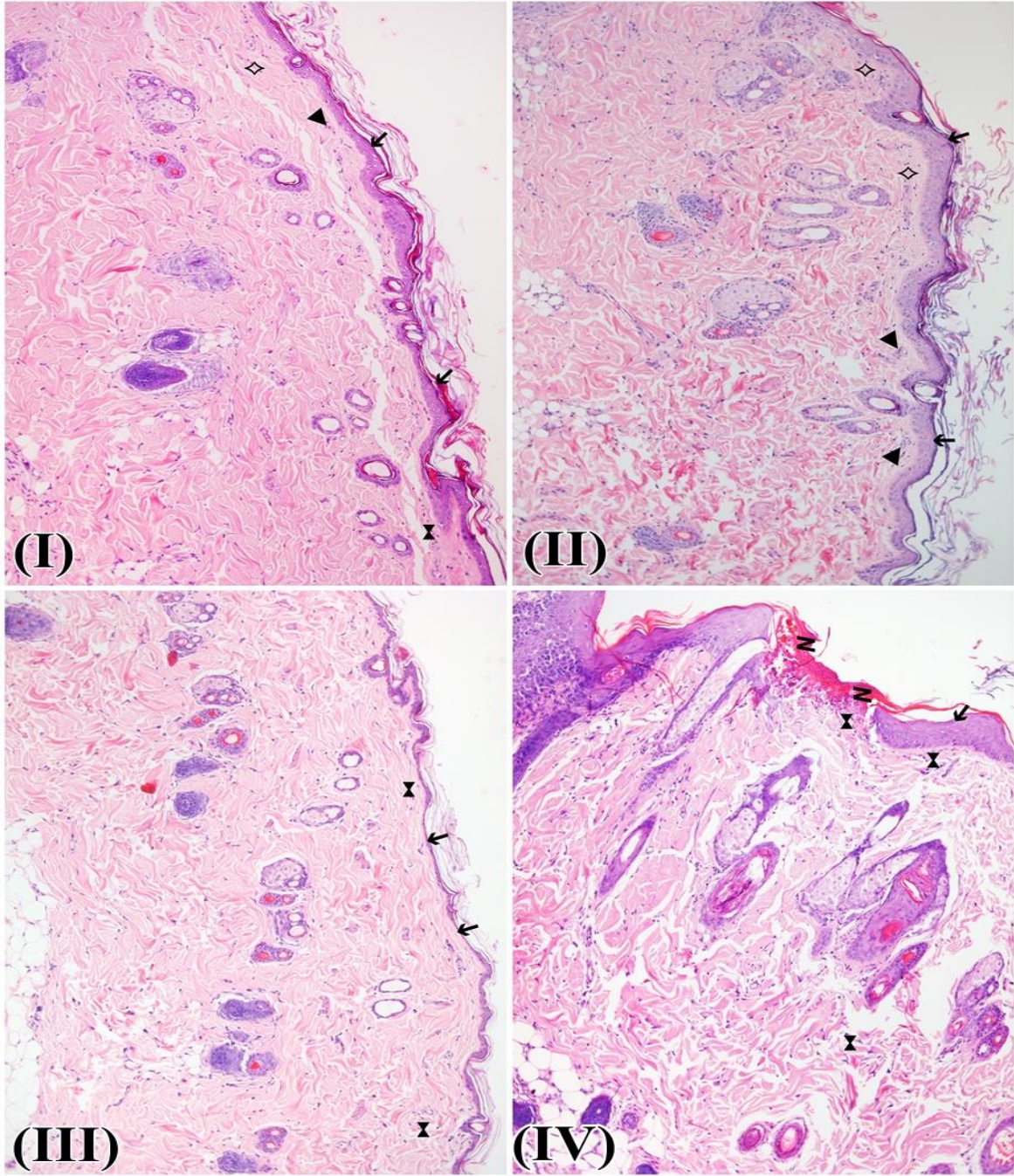
VEGF (+) hücre (%) bulguları ise en üst seviyede SSE (II) grubunda izlendi. Bu grubu sırasıyla sülük (I) ve FSS (III) grupları izledi.

Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulanan insizyonel yara dokusu örneklerinin ışık mikroskobu altındaki görünümüleri Resim 4.1.'de sunulmuştur.

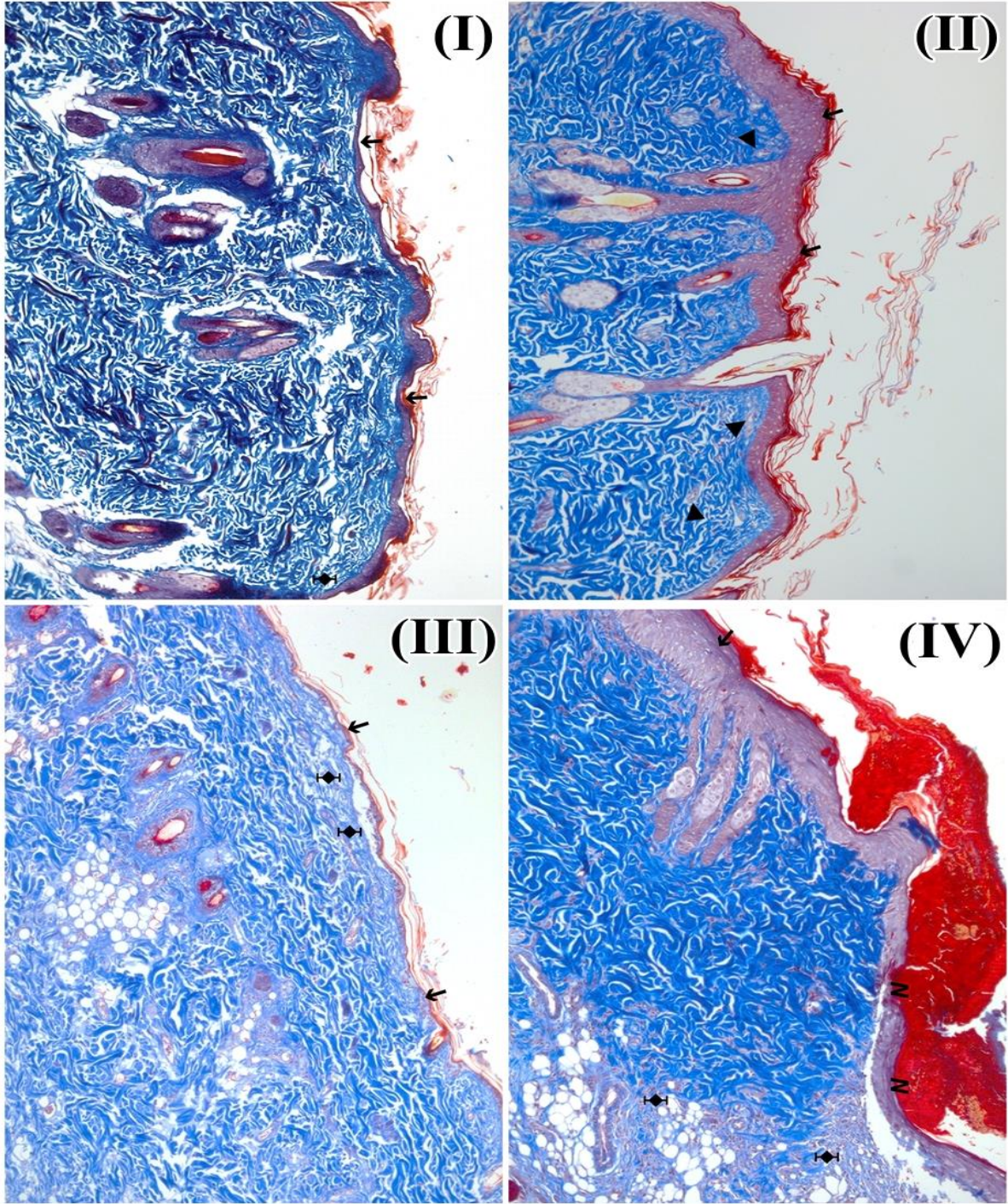
Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan insizyonel yara dokusu örneklerinin ışık mikroskobu altındaki görünümüleri Resim 4.2.'de sunulmuştur.

İmmünohistokimyasal yöntem uygulanan insizyonel yara dokusu örneklerinin ışık mikroskobu altındaki görünümüleri Resim 4.3.'de sunulmuştur.

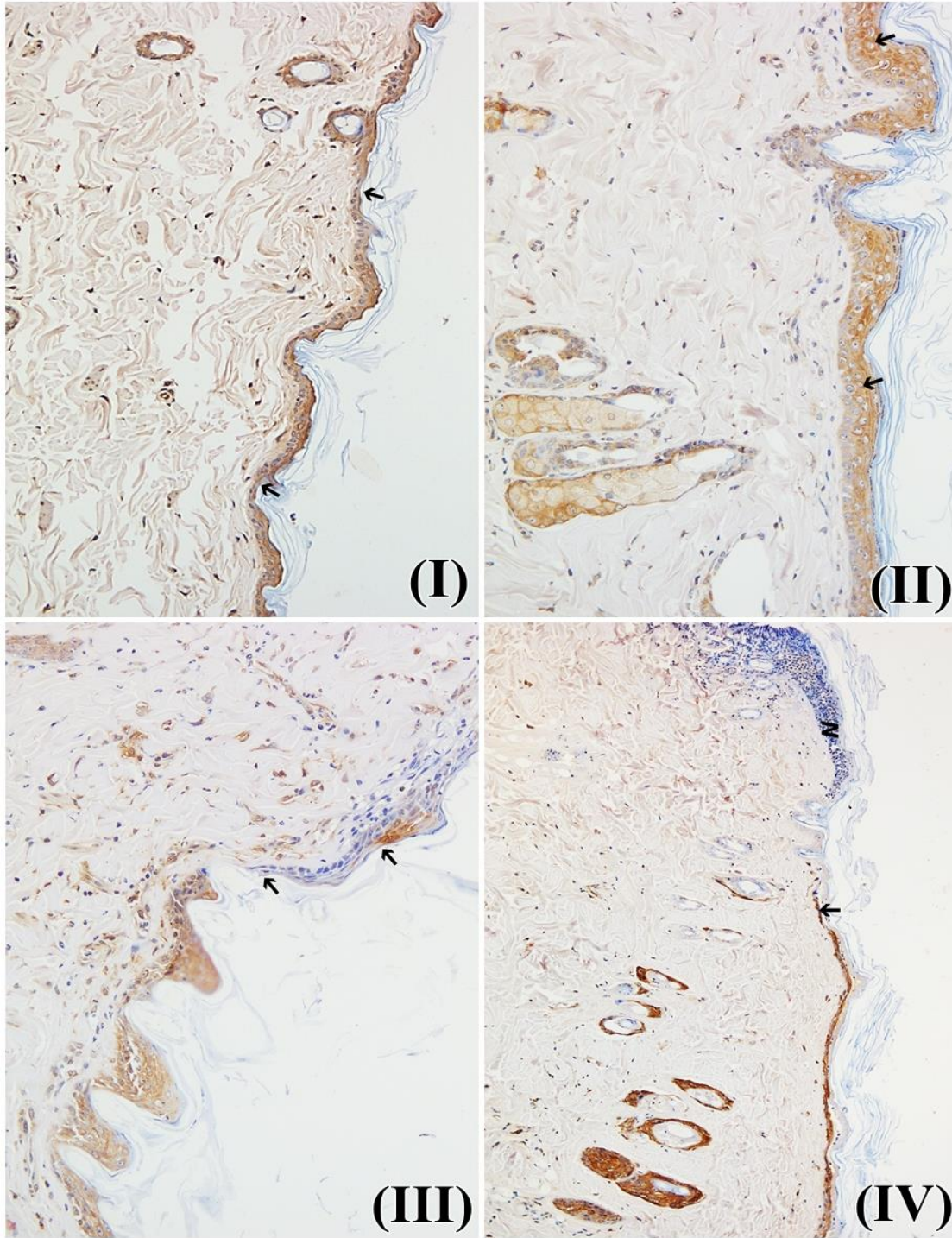
Deney gruplarına ait epitel rejenerasyon, granülasyon dokusu kalınlığı, fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon, inflamatuvar hücre varlığı ve VEGF (+) hücre (%) skorlarının Ortalama \pm SEM değerleri Çizelge 4.3'de sunulmuştur.



Resim 4.1. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulanan insizyonel yara dokusu örneklerinin görünümü. (I) Sülük grubu, (II) SSE grubu, (III) FSS grubu, (IV) Kontrol grubu- Epitel rejenerasyon: →, Neovaskularizasyon: ►, Kollajen yoğunluğunda azalma:◊, Granülasyon dokusu: ◊, Fibroblast proliferasyonu: ◊, İnflamatuvar hücre: ►, Nekroz: N



Resim 4.2. Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan insizyonel yara dokusu örneklerinin görünümü. (I) Sülük grubu, (II) SSE grubu, (III) FSS grubu, (IV) Kontrol grubu - Epitel rejenerasyon: →, Neovaskularizasyon: ►, Kollajen yoğunluğunda azalma: ⚭, Granülasyon dokusu: ❖, Fibroblast proliferasyonu: ⚡, İnflamatuvar hücre: ⚡, Nekroz: N



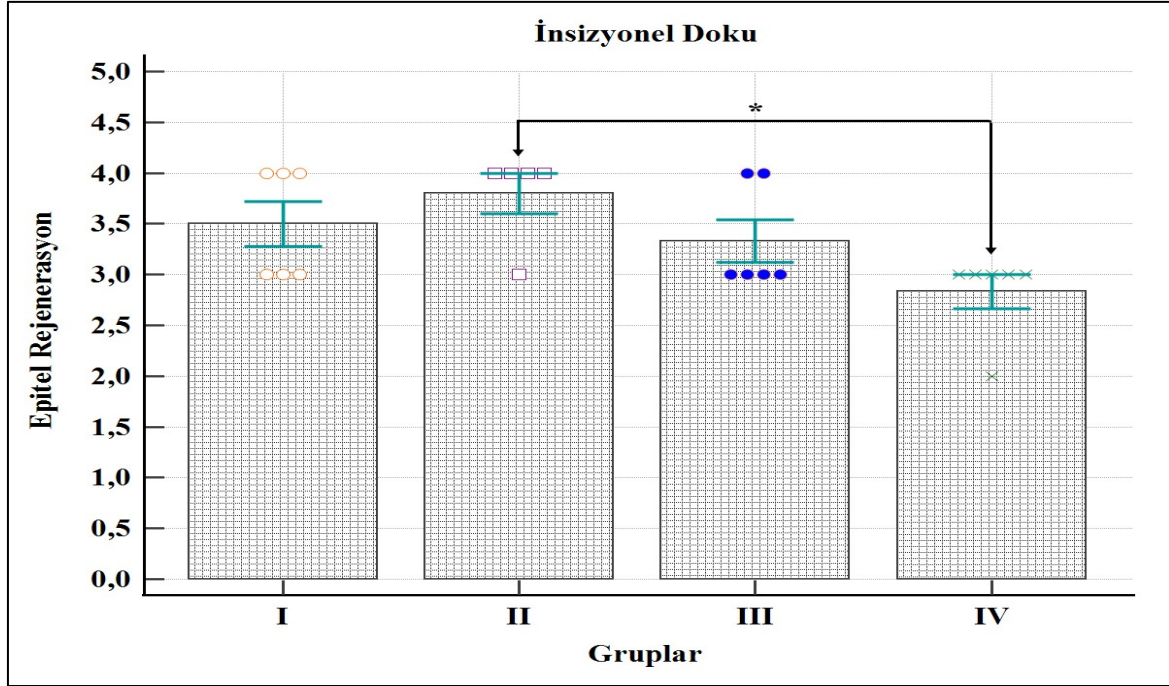
Resim 4.3. İnsizyonel yara dokusu örneklerinin immünohistokimyasal yöntem sonuçları: (I) Sülük grubu, (II) SSE grubu, (III) FSS grubu, (IV) Kontrol grubu - Epitel rejenerasyon: →, Granülasyon dokusu: ❖, Fibroblast proliferasyonu: ◆, İnflamatuvar hücre: ►, Nekroz: N

Çizelge 4.3. Histopatolojik parametrelerin skor sonuçları

	Gruplar	Ortalama \pm Sem	P Değeri
Epitel Rejenerasyon			
	(I) Sülük Grubu (II) SSE Grubu (III) FSS Grubu (IV) Kontrol Grubu	3,50 \pm 0,22 3,80 \pm 0,20 3,33 \pm 0,21 2,83 \pm 0,16	0,025
Granülasyon Dokusu Kalınlığı			
	(I) Sülük Grubu (II) SSE Grubu (III) FSS Grubu (IV) Kontrol Grubu	3,33 \pm 0,21 3,60 \pm 0,24 3,16 \pm 0,16 2,66 \pm 0,21	0,035
Fibroblast Proliferasyonu			
	(I) Sülük Grubu (II) SSE Grubu (III) FSS Grubu (IV) Kontrol Grubu	3,16 \pm 0,16 3,40 \pm 0,24 3,00 \pm 0,01 2,50 \pm 0,22	0,016
Neovaskülarizasyon			
	(I) Sülük Grubu (II) SSE Grubu (III) FSS Grubu (IV) Kontrol Grubu	3,50 \pm 0,22 3,60 \pm 0,24 3,33 \pm 0,21 2,66 \pm 0,21	0,032
İnflamatuvar Hücre Varlığı			
	(I) Sülük Grubu (II) SSE Grubu (III) FSS Grubu (IV) Kontrol Grubu	1,66 \pm 0,21 1,40 \pm 0,24 2,00 \pm 0,01 2,33 \pm 0,21	0,015
Vegf (+) Hücre (%)			
	(I) Sülük Grubu (II) SSE Grubu (III) FSS Grubu (IV) Kontrol Grubu	67,00 \pm 1,15 75,60 \pm 0,67 60,33 \pm 0,88 46,16 \pm 1,01	0,0001

4.2.1. Epitel rejenerasyon

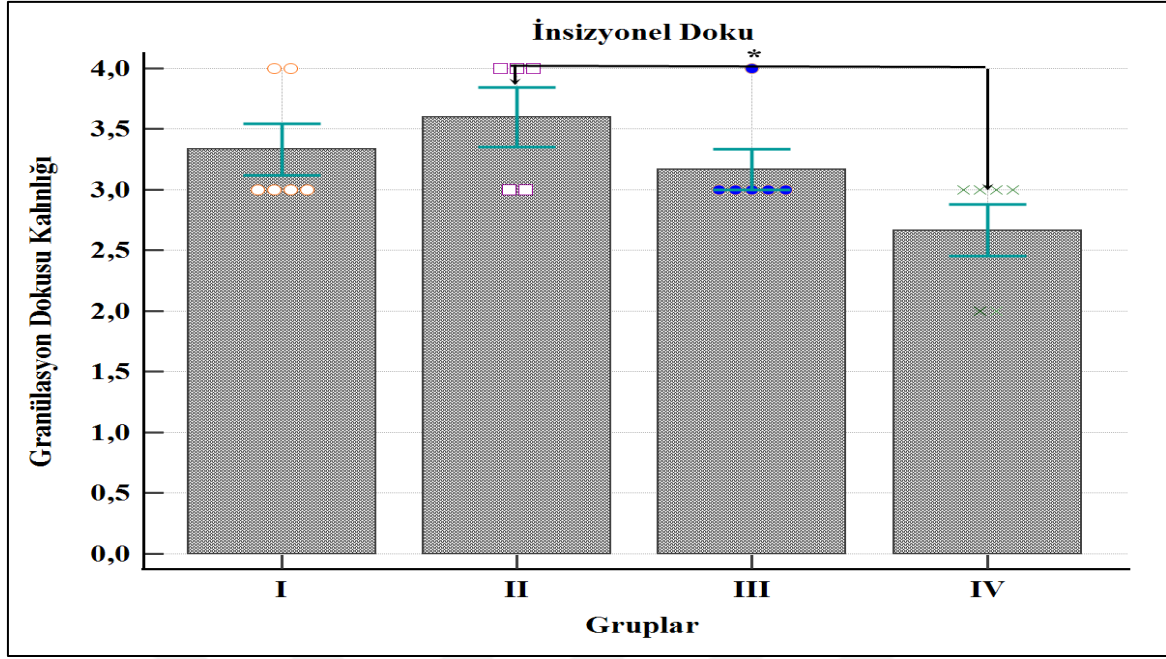
İnsizyonel yara dokusunda, deney grupları arasında epitel rejenerasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü, ($p = 0,025$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. SSE (II) grubundaki epitel rejenerasyon skorunun ($3,80 \pm 0,20$), kontrol (IV) grubundan ($2,83 \pm 0,16$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($*p = 0,018$). Diğer gruplar arasında epitel rejenerasyon skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü, (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. İnsizyonel yara dokusunda epitel rejenerasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.2.2. Granülasyon doku kalınlığı

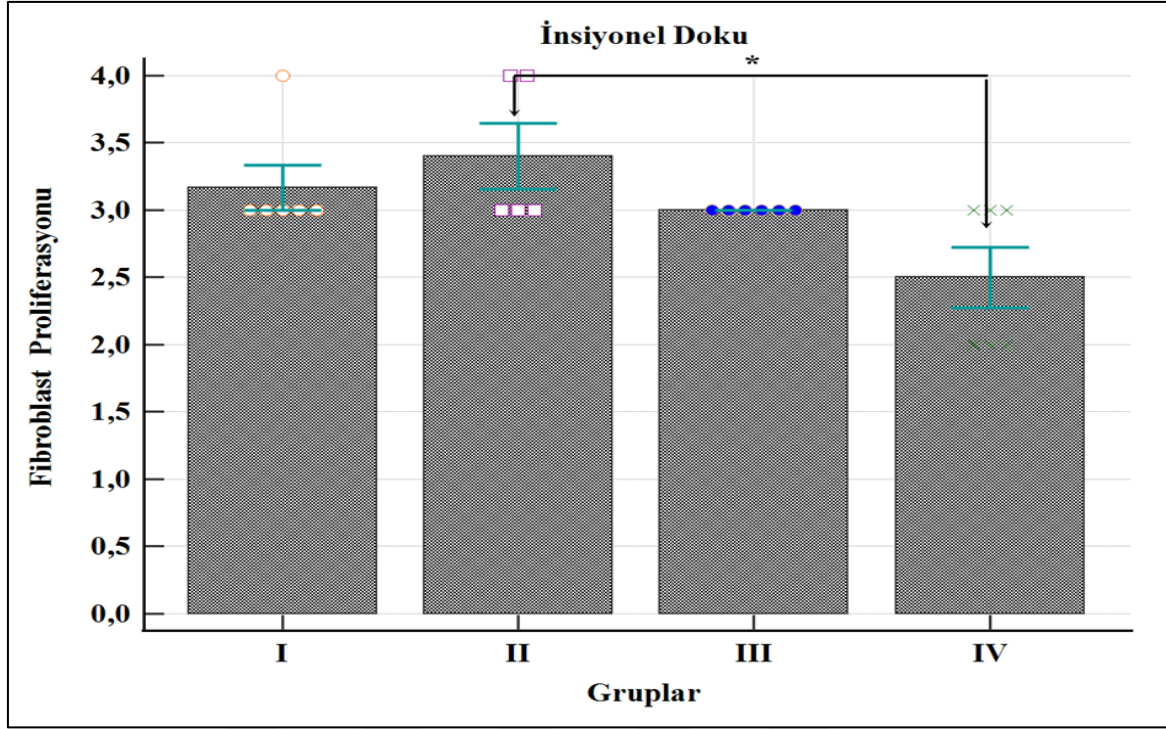
İnsizyonel yara dokusunda, deney grupları arasında granülasyon dokusu kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,035$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. SSE (II) grubundaki granülasyon dokusu kalınlığı skorunun ($3,60 \pm 0,24$), kontrol (IV) grubundan ($2,66 \pm 0,21$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($*p = 0,028$) Diğer gruplar arasında granülasyon dokusu kalınlığı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü, (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. İnsizyonel yara dokusunda granülasyon doku kalınlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.2.3. Fibroblast proliferasyonu

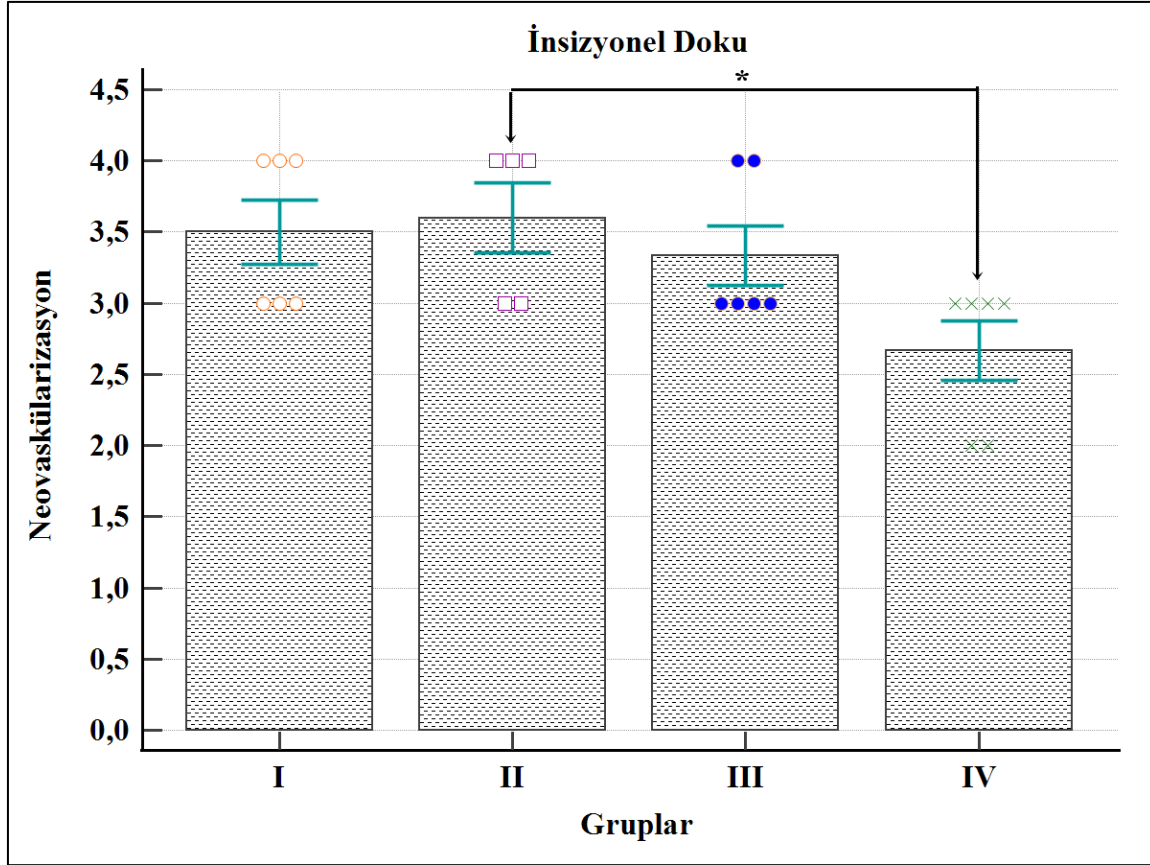
İnsizyonel yara dokusunda, deney grupları arasında fibroblast proliferasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü, ($p = 0,016$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. SSE (II) grubundaki fibroblast proliferasyonu skorunun ($3,40 \pm 0,24$), kontrol (IV) grubundan ($2,50 \pm 0,22$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($*p = 0,013$). Diğer gruplar arasında fibroblast proliferasyonu skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. İnsizyonel yara dokusunda fibroblast proliferasyonu skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.2.4. Neovaskülarizasyon

İnsizyonel yara dokusunda, deney grupları arasında neovaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü, ($p = 0,032$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. SSE (II) grubundaki neovaskülarizasyon skorunun ($3,60 \pm 0,24$), kontrol (IV) grubundan ($2,66 \pm 0,21$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($*p = 0,042$). Diğer gruplar arasında neovaskülarizasyon skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü (Şekil 4.10).



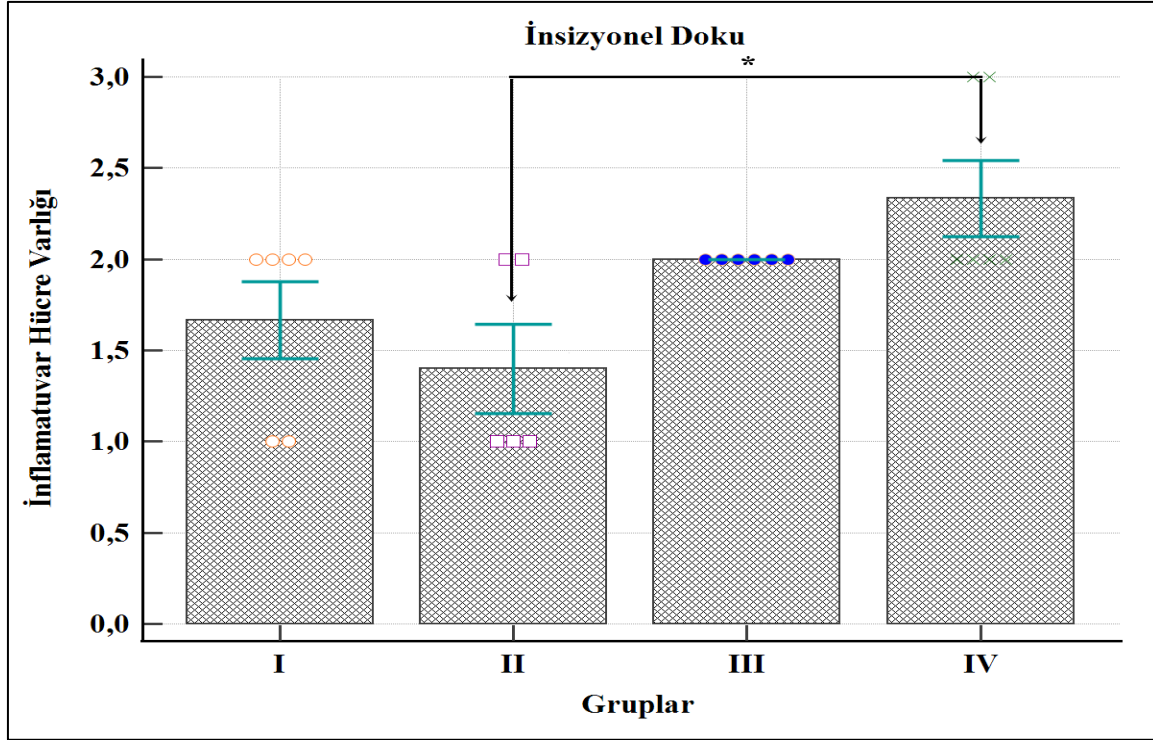
Şekil 4.10. İnsizyonel yara dokusunda neovaskularizasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.2.5. İnflamatuvar hücre varlığı

İnsizyonel yara dokusunda, deney grupları arasında inflamatuvar hücre varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü, ($p = 0,015$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı.

SSE (II) grubundaki inflamatuvar hücre varlığı skorunun ($1,40 \pm 0,24$), kontrol (IV) grubundan ($2,33 \pm 0,21$) anlamlı derecede düşük olduğu bulundu, ($*p = 0,014$).

Diğer gruplar arasında inflamatuvar hücre varlığı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü (Şekil 4.11).



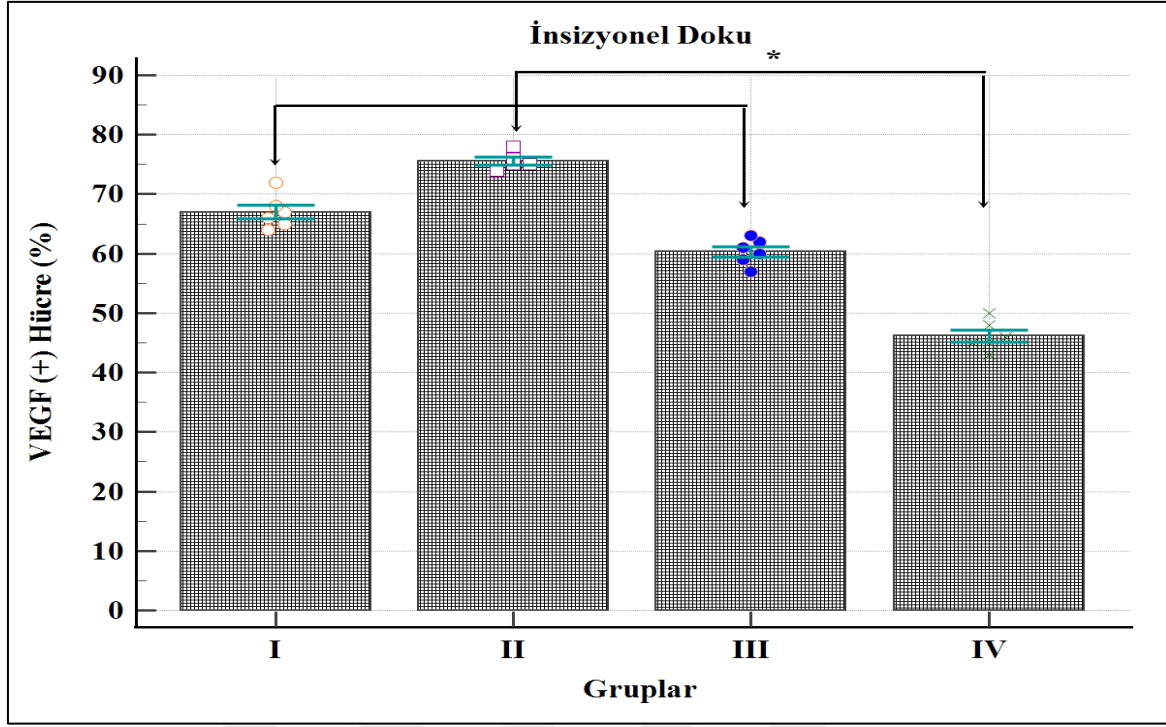
Şekil 4.11. İnsizyonel yara dokusunda inflamatuvar hücre varlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.3.1. VEGF (+) hücre yüzdesi (%)

İnsizyonel yara dokusunda, deney grupları arasında VEGF (+) hücre yüzdesi (%) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,0001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. Sülük (I); ($67,00 \pm 1,15$), SSE (II); ($75,60 \pm 0,67$) ve FSS (III); ($60,33 \pm 0,88$) grubundaki VEGF (+) hücre yüzdesi (%) skorlarının kontrol (IV) grubundan ($46,16 \pm 1,01$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (* $p = 0,001$) (Şekil 4.12.).

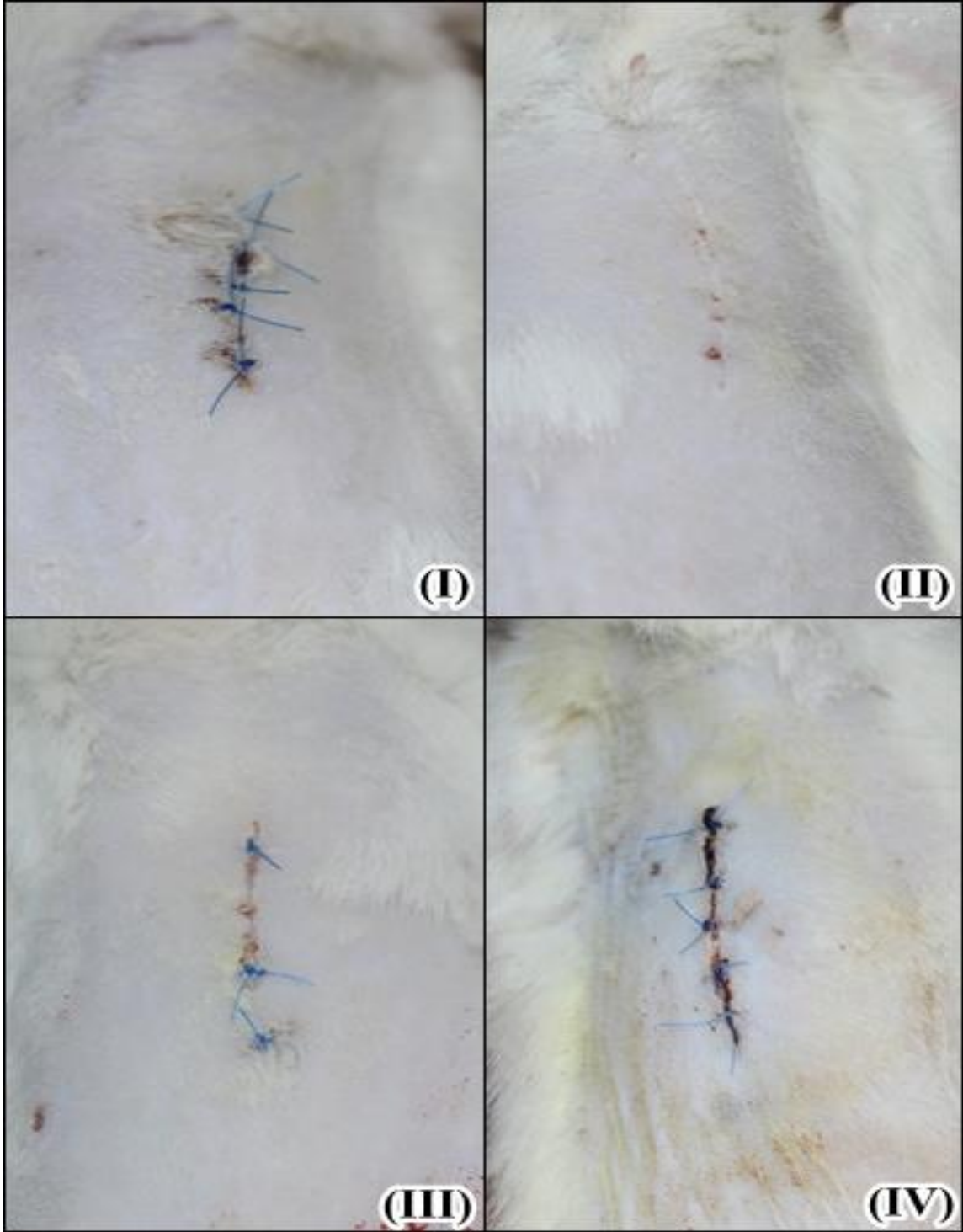
VEGF (+) hücre (%) bulguları SSE (II) grubunda en üst seviyede izlendi, bu grubu sırasıyla sülük (I) ve FSS (III) grupları izledi.



Şekil 4.12. İnsizyonel yara dokusunda VEGF (+) hücre yüzdesi (%) skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.4. İnsizyonel Yara İyileşmesinin Makroskopik Değerlendirilmesi

Postoperatif 7. gün deney gruplarının insizyonel yara bölgesinde makroskopik değerlendirme yapılmıştır (Resim 4.4.). Özellikle SSE (II) grubunda diğer gruplara göre makroskopik yara iyileşmesinin hızlı olduğu ve sülük salgı ekstraktının yara iyileşme sürecini daha olumlu etkilediği gözlemlendi. Kontrol (IV) grubundaki insizyonel yara bölgesi belirgindi ve yara iyileşmesinde gecikme olduğu gözlemlendi.



Resim 4.4. Postoperatif 71 gün, insizyonel yara iyileşmesi. (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu



5. TARTIŞMA

Tıbbi sülüklerin tükürük bezlerinde 100'den fazla biyoaktif madde bulunduğu bilinmektedir. Tıbbi sülük tedavisi, Türkiye ve dünya genelinde geleneksel ve tamamlayıcı bir tedavi yöntemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde, tıbbi sülüklerin içerdikleri biyoaktif maddeler halen merak konusu olup ve bu maddelerin yara iyileşme üzerindeki etkileri hakkında birçok araştırma devam etmektedir.

Bu çalışmada, tıbbi sülüklerin ve tıbbi sülük salgı ekstraktının; insizyonel yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle incelenmesi amaçlandı. Çalışmamızda *H. verbana* türü steril tıbbi sülükler kullanıldı. Sülüklerin fagostimülatör solüsyon ile beslendikten sonra sülük sağım yöntemi ile salgı toplandı. Elde edilen salgıdaki total protein konsantrasyonu, Bradford yöntemi ile 50 µg/ mL şeklinde belirlendi.

Çalışmamızda tüm deney gruplarındaki tüm hayvanların dorsal bölgelerine insizyonel yara oluşturularak; I grubundaki hayvanlara tıbbi sülük uygulaması, II grubundaki hayvanlara SSE enjeksiyonu ve III grubundaki hayvanlara FSS enjeksiyonu yapıldı. IV grubu ise kontrol grubu olup, bu gruptaki hayvanlara başka bir müdahalede bulunulmadı.

Çalışmamızın ilk aşamasında tüm gruplardaki hayvanlardan serum örnekleri alındı. Ayrıca insizyonel yara bölgelerinin doku örnekleri alınarak doku homojenatları elde edildi. Tüm bu örneklerden ELİSA testi ile HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 parametrelerini açısından değerlendirildi. Serum ve insizyonel doku homojenat örneklerinde, deney grupları arasında HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 konsantrasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1, özellikle proliferasyon ve anjiyogenez gibi belirli yara iyileşmesi aşamalarında rol oynayan ve mitojenik etkiler gösteren moleküllerdir. HIF-1- α hipoksik koşullarda, hücrenin hayatta kalmasında kritik roller oynar ve yara iyileşmesinin tüm aşamalarında, hücre bölünmesinden, büyüme faktörü salınımına ve matris sentezine kadar oksijen homeostazının kilit düzenleyicisi olarak görev yapar [73]. TGF- α , normal iyileşme sürecine doğal olarak dahil olan önemli bir büyüme faktörüdür ve TGF- α ve reseptörlerinin yüksek ekspresyonunun bulunduğu dokular arasında başta deri dokusu olmak üzere çeşitli dokular mevcuttur [74]. IGF-1, endotel hücreleri için bir kemotaktik ajan olarak hareket ederek fibroblast ve keratinositlerin proliferasyonunu ve göçünü teşvik eder, bu da yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar

[75]. Çalışmamızda, diseksiyon günü dışında deneysel süreçte yara iyileşmesini değerlendirmek amacıyla herhangi bir örnek almadık. Bu bilgiler ışığında büyüme faktörleri açısından deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememesini; örnek toplama sıklığı, zamanı ve büyüme faktörlerinin ekspre edilme süreçlerindeki farklılıklar şeklinde değerlendirdik.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, deney gruplarının insizyonel yara bölgelerinden elde edilen doku örneklerini rutin histopatolojik prosedürlere tabi tuttuk. Ardından örnekler, H&E ve Masson's Trichrome yöntemleri ile boyanmalarının ardından ışık mikroskopu ile incelendiler. Bunun yanı sıra doku örnekleri, immünohistokimyasal yöntem ile çalışılarak yara iyileşmesi açısından oldukça önemli olan VEGF pozitif hücre yüzdesi açısından da değerlendirildiler.

Epitel rejenerasyonu, granülasyon dokusu kalınlığı, fibroblast proliferasyonu neovaskülarizasyon ve VEGF pozitif hücre yüzdesi bulguları SSE (II) grubunda en üst seviyede izlendi. Bu grubu sırası ile Sülük (I), FSS (III) ve kontrol (III) grupları izledi.

Deney grupları arasında SSE (II) grubunun en yüksek epitel rejenerasyon skorunu göstererek kontrol grubunu (IV) anlamlı bir şekilde aştığını gördük. Bu, II. gruptaki SSE tedavisinin özellikle epitel rejenerasyonunu teşvik etmede etkili olduğunu düşündürmektedir. Bu da SSE'nin yara iyileşmesinin bu yönü üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Epitel rejenerasyonuna benzer şekilde, granülasyon dokusu kalınlık skorları SSE (II) grubunda anlamlı şekilde yüksek bulundu. Bulgularımız ayrıca fibroblast proliferasyonu ve neovaskülarizasyon skorlarında da önemli bir farklılık ortaya koydu ve SSE' nin (II) bir kez daha diğer grupları geride bıraktığı tespit edildi. Bu, SSE tedavisinin fibroblast proliferasyonu [76] ve neovaskülarizasyon [77] gibi yara iyileşmesi sürecinde oldukça önemli olan unsurlar üzerindeki olumlu etkilerini vurgulamaktadır. SSE (I) grubunda kontrole kıyasla anlamlı derecede düşük tespit edilen inflamatuvar hücre varlığı ise SSE uygulamasının anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir, dolayısıyla bu da yara iyileşme sürecini destekleyici bir etki gösterebilmektedir.

VEGF, özellikle anjiyogenezin - yeni kan damarlarının oluşturulmasının- düzenlenmesinde ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar [23]. Sonuçlarımız, Sülük (I) ve SSE (II)

gruplarındaki VEGF pozitif hücre yüzdelерinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir artış gösterdi. Bu, hem sülük tedavisinin hem de SSE'nin anjiyogenezi uyarma potansiyelini vurgulamaktadır.

Tıbbi sülük salgısının sağlıklı veya sağlıklı hücreler üzerindeki çeşitli etkilerine dair (hücre göçü, hücre ölümü) çeşitli *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür [70, 78]. Mahmoudi ve diğerleri, tıbbi sülük (*Hirudo medicinalis*) salgısının pankreas adacık hücreleri üzerindeki etkinliğine dair yürüttükleri çalışmada, yüksek dozda SSE' ye maruz bırakılan pankreatik adacık hücrelerinde hem düşük doz uygulamasına hem de kontrol grubuna kıyasla hücre çoğalmasında %20'lik bir artış gözlemlenmişlerdir. Ayrıca çalışmada, sülük salgısı uygulamasının hücreler üzerinde toksik etkiye neden olmadığı öne sürülmüştür [79].

Xu ve diğerleri, *Whitmania pigra* 'dan elde edilen SSE'nin etkilerini insan endotel hücre hattına (EA. Hy926) uygulayarak değerlendirdikleri çalışmalarında sülük salgısının insan endotel hücre hattında 48 saat sonra proliferasyona neden olduğunu MTT testi ile göstermişlerdir [80].

Tırık ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada ise SSE' nin sağlıklı bir hücre hattı olan İnsan Umbilikal Ven Endotelial Hücreler (HUVEC) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları, SSE'nin hücre proliferasyonu ve göçü ile birlikte VEGF gen ekspresyonunu artırarak yara iyileşmesini teşvik ettiğini göstermiştir [61].

Literatür incelendiğinde deney hayvanları üzerinde flep, insizyonel ve benzeri yara modellerinde tıbbi sülük tedavisinin etkinliğinin araştırıldığı çeşitli çalışmaları görmek mümkündür [61, 62, 81]. Bu çalışmalar incelendiğinde kendi araştırmamızda, *H. verbana* türü sülüklerin insizyonel yara modeline sahip sıçanlara uygulamış olmamız ve gruplarımızdan birine fagostimülatör çözelti aracılığıyla elde ettiğimiz sülük salgısını enjekte etmiş olmamız nedeniyle bir yenilik ortaya çıkmaktadır.

Darestani ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, sülük tedavisi ve topikal fenitoin (PHT) uygulamasının yara iyileşme üzerindeki etkileri insizyonel yara modeli oluşturulan Wistar albino ratlar kullanılarak incelenmiştir [81]. Bulgular, tıbbi sülüklerle tedavi edilen sıçanlarda yara iyileşme sürecinde dikkate değer bir hızlanma ortaya koymuştur. Çalışmalarındaki histopatolojik analiz, tıbbi sülüklerle tedavi edilen grupta, kontrol

grubunda sıkça görülen inflamasyon gözlemlenmeden yara iyileşme sürecinin sağlıklı bir şekilde tamamlandığını göstermiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi yara iyileşmesi insizyonel cilt yarası üzerinde fakat farklı bir sülük türü olan *H. orientalis* ile gerçekleştirilmiştir.

Zakian ve diğerleri, tıbbi sülük tedavisi ve %1 sodyum fenitoin tedavisinin etkinliğini herhangi bir tedavi almayan negatif kontrol grubu ile karşılaştırarak kapsamlı bir çalışma yapmışlardır [82]. Deney için sırt bölgelerinde yaralar oluşturulan bir fare modeli kullanmışlardır. Operasyondan sonraki 6. ve 16. günlerde yara bölgesinden alınan doku örnekleri incelenmiştir. Sonuçlar, tıbbi sülük terapisinin yara iyileşme sürecini önemli ölçüde hızlandırdığını ve kollajen olgunlaşmasını teşvik ettiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak eksizyonel yara modeli oluşturulan farklı bir sülük türü olan *H. Medicinalis* kullanılan bu çalışmada da tıbbi sülük uygulamasının epitel rejenerasyonunu artırdığını ve eş zamanlı olarak inflamasyon hücrelerinin varlığını azalttığını göstermiştir. Bu bulgular, tıbbi sülük terapisinin yara iyileşmesini artırmada dikkate değer bir başarı oranına işaret etmektedir.

Mousavi ve diğerleri, insizyonel yara modeli oluşturulan farelerde sülük tedavisi ve heparin uygulamasının etkinliğini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, tıbbi sülükler ve heparin ile tedavi edilen grup ile kontrol grubu arasında ödem miktarının belirgin şekilde azaldığını gözlemlədiler [83]. *H. verbana* türü tıbbi sülükler kullandığımız çalışmamızın aksine, Mousavi ve ekibi, *H. medicinalis* kullanarak deneysel olarak indüklenen venöz konjesyonu tedavi etmeyi amaçlamışlardır. Çalışmamıza benzer şekilde elde ettikleri sonuçlar; inflamatuvar hücre varlığında, nekrozda ve doku hasarında önemli ölçüde azalma olduğunu göstermiştir. Bu etki, tıbbi sülük salgısında bulunan ve anti-inflamatuvar özellik gösteren çeşitli maddelerden kaynaklanabilir [3].

Cottler ve diğerleri, flep modeli kullanarak sıçanlarda iki seanslık tıbbi sülük tedavisinin flep sağ kalımı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir [83]. Bu çalışmada, insizyonel yaralara odaklanan çalışmamızın aksine, bir flep modeli tercih edilmiş ve flep karın bölgesine uygulanmıştır. Ayrıca, flep bölgesi iki seans boyunca iskemiye maruz bırakılmış ve 48 saat arayla iki kez sülük tedavisi uygulanmıştır. Bulgular, tıbbi sülüklerle tedavi edilen grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bir flep sağ kalım oranını göstermiştir.

Amani ve diğeri, krem formuna getirilmiş sülük salgısı ekstraktının (*H. orientalis*) yara iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. 1 x 1 cm boyutlarında antral yara oluşturulan bu çalışma, 14 gün boyunca sürmüştür [84]. Çalışmada, sülük içeren kremin epitelizasyonu ve anjiyogenezi arttırdığı gözlenmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak SSE, krem şekline getirilerek yara bölgesine direkt şekilde uygulanmıştır. Bu sonuç sülük salgısı içeren kremlerin yara iyileşmesinde yaygın olarak kullanılan farmasötik ürünlere alternatif olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Yingxin ve diğeri tarafından yürütülen çalışmada, flep modeli oluşturulan sıçanlarda doğal ve rekombinant hirudin enjeksiyonlarının, VEGF gen ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. VEGF mRNA gen ekspresyonları PCR kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar, doğal hirudin uygulamasının rekombinant hirudin uygulamasına kıyasla flep modelinde VEGF gen ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Sonuç olarak, doğal hirudin uygulamasının flep sağ kalımında daha etkili olduğunu öne sürülmüştür [85].

Tıbbi sülük tedavisi, özellikle başta flep cerrahi olmak üzere travma kaynaklı yaraların tedavisinde ve kronik-iyileşmeyen yaraların tedavisinde, geleneksel ve tamamlayıcı bir tıp pratiği olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Durrant ve diğeri tarafından bildirilen bir vaka sunumunda, *H. medicinalis* tıbbi sülük uygulamanın pediatrik bir hastada yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisi gösterilmiştir. Yanlış turnike uygulaması nedeniyle venöz iskemi yaşayan hastanın parmağına sülük tedavisi uygulanmış ve duyu-sal-fonksiyonel parametrelerde 7. gününde iyileşme gözlemlenmiştir [86].

Nair ve diğeri tarafından yapılan bir çalışmada, *H. manillensis* tıbbi sülük tedavisinin ağrı ve yara iyileşmesi üzerindeki etkinliği gösterilmiştir. Bu çalışma, diyabetle ilişkili yaralara ve ülserlere sahip hastalarda gerçekleştirilmiştir. Hastaların yara bölgelerine doğrudan sülük uygulaması, sülüklerin ağrıyı azaltmada ve perfüzyonu artırmada etkili olduğunu göstermiştir [87].

Mortenson ve diğeri, *H. medicinalis* tıbbi sülük uygulamasının flep uygulamalarındaki etkisini inceledikleri çalışmada, bisiklet kazası ardından flep cerrahisi yapılan hastaya sülük tedavisi uygulamışlardır. Sülük tedavisi, operasyondan sonraki 4 gün boyunca uygulanmış ve komplikasyon olmaksızın tatmin edici bir iyileşme gözlemlenmiştir [88].

Çalışmamızın 3. aşamasında ise post-operatif yedinci günde çekilen yara bölgeleri fotoğrafları, yüzeysel yara görünümündeki değişiklikler açısından inceledi. Sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla Sülük (I) ve SSE (II) gruplarında yara bölgesinde kıl büyümesi ve yara kapanmasının daha fazla olduğunu gösterdi. Ancak, bu oran SSE grubunda daha da yüksekti. Bu bulgular hem sülük tedavisinin hem de SSE' nin insizyonel yaraların iyileşmesi üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermektedir, hatta SSE'nin sülük tedavisine kıyasla yara iyileşmesi üzerinde daha belirgin bir etkisi olabilir. Gözlemlenen bu etkiler, tıbbi sülük salgısında bulunan ve vazodilatör etki göstererek kan akışını artırma kapasitesi gösteren çeşitli biyoaktif maddelerin varlıklarına bağlanabilir [89]. Sonuç olarak, bu maddeler tarafından indüklenen artmış kan akışının, tedavi edilen bölgelerde genel durumun dengelenerek, güçlendirilmiş bir yara iyileşme sürecine neden olması makul bir hipotez olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda dorsal bölgeye vertikal tam kat insizyonel yara modeli oluşturulmuş ratlarda tıbbi sülük ve tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulamasının yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Çalışma kapsamında deney gruplarında yara iyileşmesine dair parametrelere biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle bakıldı.

Literatürde tıbbi sülüklerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini inceleyen çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Özellikle plastik-rekonstrüktif cerrahide sülüklerin yara iyileşmesindeki etkinliğine yönelik çalışmalar mevcut olsa da bizim çalışmamızda insizyonel yara bölgesine tıbbi uygulamasının yanı sıra direkt sülük salgı enjeksiyonu uygulanması literatürde bir ilk teşkil etmektedir. Çalışma sonucunda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulamasının yara iyileşmesi açısından etkili bir ajan olabileceğine dair önemli veriler elde ettik. Tıbbi sülük salgı ekstraktının yara modeli üzerinde denenmesi ve deney sürecinde bakılan hem biyokimyasal hem de histolojik parametrelerin çeşitliliği açısından çalışmamız mevcut literatür bilgisine önemli katkılar sağlamaktadır. Bahsedilen sonuçlar sonraki çalışmalara kapı aralamakla birlikte yara iyileşmesinde tıbbi sülük salgısının etki mekanizmaları daha detaylı incelenmelidir.

6.1. Sonuçlar

1. Deney grupları arasında epitel rejenerasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü. SSE (II) grubundaki epitel rejenerasyon skorunun kontrol (IV) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).
2. Deney grupları arasında granülasyon dokusu kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü. SSE (II) grubundaki granülasyon dokusu kalınlığı skorunun, kontrol (IV) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).
3. Deney grupları arasında fibroblast proliferasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü. SSE (II) grubundaki fibroblast proliferasyonu skorunun, kontrol (IV) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).
4. Deney grupları arasında neovaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü. SSE (II) grubundaki neovaskülarizasyon skorunun kontrol (IV) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).

5. Deney grupları arasında inflamatuvar hücre varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü. SSE (II) grubundaki inflamatuvar hücre varlığı skorunun, kontrol (IV) grubundan anlamlı derecede düşük olduğu bulundu, ($p < 0,05$).
6. Deney grupları arasında VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü. Sülük (I), SSE (II) ve FSS (III) grubundaki VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) skorlarının kontrol (IV) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$). VEGF (+) Hücre (%) bulguları SSE (II) grubunda en üst seviyede izlendi, bu grubu sırasıyla sülük (I) ve FSS (III) grupları izledi.
7. SSE (II) grubunda diğer gruplara göre makroskopik yara iyileşmesinin hızlı olduğu ve sülük salgı ekstaktının yara iyileşme sürecini daha olumlu etkilediği gözlemlendi. Kontrol (IV) grubundaki insizyonel yara bölgesi belirgindi ve yara iyileşmesinde gecikme olduğu gözlemlendi.
8. Serum örneklerinde, deney grupları arasında HIF-1- α (ng/mL), TGF- α (pg/ mL) ve IGF-1(ng/ mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p > 0,05$).
9. İnsizyonel yara dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında HIF-1- α (ng/mL), TGF- α (pg/ mL) ve IGF-1(ng/ mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p > 0,05$).

KAYNAKLAR

1. George Broughton, I., Janis, J. E. and Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7S), 12S-34S.
2. Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B. and Sağlam, N. (2011). Tıbbi sülükler ve hirudoterapi. *Türkiye Parazitol Dergisi*, 35(4), 234-239.
3. Ünal, K., Erol, M. and Ayhan, H. (2023). Literature review on the effectiveness of medicinal leech therapy in the wound healing. *Ankara Medical Journal*, 23(1), 45-52.
4. Ayhan, H. and Mollahaliloğlu, S. (2018). Tıbbi sülük tedavisi: Hirudoterapi. *Ankara Medical Journal*, 18(1), 141-148.
5. Abdullah, S., Dar, L. M., Rashid, A. and Tewari, A. (2012). Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Archives of Clinical and Experimental Surgery*, 1(3), 172-180.
6. Öner Küçük, M. and Yaman, O. (2019). Tıbbi sülük terapisi (Hirudoterapi). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 29-46.
7. Das, B. K. (2014). An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 34.
8. Baskova, I. P., Aguejouf, O. M., Azougagh-Oualane, F., Zavalova, L. L., Basanova, A. V. and Doutremepuich, C. (1995). Arterial antithrombotic effect of piyavlt, the novel pharmacological preparation from the medicinal leech, and of its components, prostanooids and enzyme destabilase. *Thrombosis Research*, 77(6), 483-492.
9. Arnold, M. and Barbul, A. (2006). Nutrition and wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7S), 42S-58S.
10. Parsak, C. K., Sakman, G. ve Çelik, Ü. (2007). Yara iyileşmesi, yara bakımı ve komplikasyonları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 16(2), 145-159.
11. Şener, A. and Siliv, N. (2021). *Gastrointestinal sistem acilleri*. Ankara: Akademisyen Kitabevi, 38-42.
12. Diegelmann, R. F. and Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9(1), 283-289.
13. Winter, G. D. (1962). Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*, 193(4812), 293-294.
14. Savcı, A. (2016). *Gentamisin sülfat, amoksisilin ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin fare kalp dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri, protein ve gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkilerinin incelenmesi*. Doktora Tezi, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl, 82-93.

15. Spetz, A.-L., Strominger, J. and Groh-Spies, V. (1996). T cell subsets in normal human epidermis. *The American Journal of Pathology*, 149(2), 665.
16. Kurt, N. (2003). Yara iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler. *Akut ve Kronik Yara Bakımı* içinde (s. 9-33). Ankara: Pegem.
17. Yılmaz, S., Kirmaci, M. B. ve Uğurlu, E. T. (2020). *Genel cerrahi dersleri birinci kitap temel konu ve kavramlar*: Ankara: Akademisyen Kitabevi, 45-52.
18. Brölmann, F., Ubbink, D. T., Nelson, E., Munte, K., Van Der Horst, C. and Vermeulen, H. (2012). Evidence-based decisions for local and systemic wound care. *Journal of British Surgery*, 99(9), 1172-1183.
19. Taştan Eroğlu, Z., Kurtiş, M., Şahin, S., Tüter, G., Yıldırım Torun, Ö., Barış, E., Hasanzadeh, S. and Museyibev, F. (2015). *Topikal ozon gazı uygulamasının gingival yara iyileşmesi üzerine etkisinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi*. Türk Periodontoloji Derneği 45. Bilimsel Kongresi ve 25. Sempozyumu, Ankara, 22-32.
20. Öztaş, P. (2021). Yara iyileşmesi, bakımı ve tedavisi. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 54(2), 341-351.
21. Baum, C. L. and Arpey, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic surgery*, 31(6), 674-686.
22. Gonzalez, A. C. d. O., Costa, T. F., Andrade, Z. d. A. and Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing-A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91, 614-620.
23. Garg, H., Lippay, E., Carter, E., Donelan, M. and Remensnyder, J. (1991). Proteoglycan synthesis in human skin and burn scar explant cultures. *Burns*, 17(6), 452-457.
24. Semenza, G. L. (2013). Regulation of gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. In *Encyclopedia of biological chemistry*. New York: Elsevier Inc., 67-71.
25. Huhtaniemi, I. (2018). *Encyclopedia of endocrine diseases*. New York: Academic Press,
26. Chao, Y., Zhong, Z.-F., Sheng-Peng, W., Chi-Teng, V., Bin, Y. and Yi-Tao, W. (2021). HIF-1: Structure, biology and natural modulators. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 19(7), 521-527.
27. De, P., Dey, N. and Leyland-Jones, B. (2013). *Growth factor and signaling networks*. New York: Elsevier, 42-52.
28. Grazul-Bilska, A. T., Johnson, M. L., Bilski, J. J., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Abdullah, A. and Abdullah, K. M. (2003). Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)*, 39(10), 787-800.

29. Ha, C. E. and Bhagavan, N. (2011). *Essentials of medical biochemistry: with clinical cases*. New York: Academic Press, 22-32.
30. Vural, P. (2018). Fizyolojik ve patolojik anjiogenezde vasküler endotelial büyüme faktörünün rolü. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 16(1), 53-62.
31. Hu, D., Hori, Y. and Fan, T.-P. D. (1993). Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation*, 17, 135-143.
32. Ünal, K., ve Emre, K. (2022). Tıbbi sülük tedavisinin bilimsel değeri. *Anadolu Tıbbi Dergisi*, 1(3), 37-45.
33. Knobloch, K. (2010). Leeches in microsurgery—An evidence-based approach. *Toxins and Hemostasis: from Bench to Bedside*, 3, 735-745.
34. Whitaker, I. S., Rao, J., Izadi, D. and Butler, P. (2004). Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(2), 133-137.
35. Maden, R. Ş. Y. Varis tedavisinde rutin tedaviler ile tıbbi sülük tedavisinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, 48-62.
36. Younis Munshi, I. A., Rafique, H. and Ahmad, Z. (2008). Leeching in the history-a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(13), 1650-1653.
37. Louis, P. C. A. (1828). *Recherches sur les effets de la saignée dans plusieurs maladies inflammatoires*. New York: Mignoret, 32-38.
38. Sağlam, N. (2000). Sülük biyolojisi ve yetiştirme teknikleri. *Ticari Balık Türlerinin Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri Hizmet İçi Eğitim Semineri*, 1(5), 51-56.
39. Resmi Gazete (2014). *Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları yönetmeliği*. Tarih:27.10.2014, Sayı: 299158.
40. Petrauskienė, L., Utevskaya, O. and Utevsky, S. (2009). Can different species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) interbreed? *Invertebrate Biology*, 128(4), 324-331.
41. Sağlam, N. (2019). Internal and external morphological characteristics of the medicinal leech species *Hirudo sulukii* and *Hirudo verbana*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 43(4), 204.
42. Ayhan, H., Özyurt Koçakoğlu, N. and Candan, S. (2021). Functional morphology of the suckers and teeth of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Annelida; Clitellata; Hirudinida): A scanning electron microscope study. *Microscopy Research and Technique*, 84(12), 2930-2935.
43. Orevi, M., Eldor, A., Giguzin, I. and Rigbi, M. (2000). Jaw anatomy of the blood-sucking leeches, *Hirudinea Limnatis nilotica* and *Hirudo medicinalis*, and its relationship to their feeding habits. *Journal of Zoology*, 250(1), 121-127.
44. Ceylan, M. and Erbatur, İ. (2012). A study on nutrition of medicinal leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820): Cannibalism? *Su Ürünleri Dergisi*, 29(4), 167-170.

45. Haycox, C. L., Odland, P. B., Coltrera, M. D. and Raugi, G. J. (1995). Indications and complications of medicinal leech therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 33(6), 1053-1055.
46. Godfrey, K. (1997). Uses of leeches and leech saliva in clinical practice. *Nursing Times*, 93(9), 62-63.
47. de Chalain, T. M. (1996). Exploring the use of the medicinal leech: a clinical risk-benefit analysis. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 12(03), 165-172.
48. Sawyer, R. T. (1986). *Leech biology and behavior*. New York: Oxford University Press, 62-72.
49. Ünal, K. E. ve Mehmet (2022). Tıbbi sülük salgısının biyokimyası. In O. Karaman (Ed.), *Sağlık & bilim medikal araştırmalar-IV*. Ankara: Efe Akademi, 215-228.
50. Ünal, K., Tirik, N., Erol, M. E., İbrahimkhanli, L., Elçi, M. P. and Ayhan, H. (2023). The investigation of effects of medicinal leech saliva extract on the breast fibroblast cell line in vitro: an experimental study. *Journal of Traditional Medical Complementary Therapies*, 6(2).
51. Singh, A. P. (2010). Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 16(4), 213-215.
52. Nikonov, G. I. and Titova, E. A. (1999). Destabilase complexes-natural liposome produced by medicinal leeches *Hirudo medicinalis*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 13(1), 102-106.
53. Abdisa, T. (2018). Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, 2(6), 235-242.
54. Hovingh, P. and Linker, A. (1999). Hyaluronidase activity in leeches (Hirudinea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(3), 319-326.
55. Zaidi, S., Jameel, S., Zaman, F., Jilani, S., Sultana, A. and Khan, S. A. (2011). A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Alternative Medicine Review*, 16(1), 59-65.
56. Gülay, T. (2019). Hirudoterapi ve cerrahide kullanımı. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 47-54.
57. Chudzinski-Tavassi, A. M., Kelen, E. M. A., de Paula Rosa, A. P., Loyau, S., Sampaio, C. A., Bon, C. and Anglés-Cano, E. (1998). Fibrino (geno) lytic properties of purified hementerin, a metalloproteinase from the leech *Haementeria depressa*. *Thrombosis and Haemostasis*, 80(07), 155-160.
58. Seymour, J., Henzel, W., Nevins, B., Stults, J. and Lazarus, R. (1990). Decorsin. A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(17), 10143-10147.

59. Jung, H. I., Kim, S. I., Ha, K.-S., Joe, C. O. and Kang, K. W. (1995). Isolation and characterization of guamerin, a new human leukocyte elastase inhibitor from *hirudo nipponia**. *Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13879-13884.
60. Kim, D. R. and Kang, K. W. (1998). Amino acid sequence of piguamerin, an antistatin-type protease inhibitor from the blood sucking leech *Hirudo nipponia*. *European Journal of Biochemistry*, 254(3), 692-697.
61. Tırık, N. and Ünal, K. (2022). *Farklı hücre hatlarında tıbbi sülük salgı ekstraktının in vitro etkisinin araştırılması*. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje 2021-2022, Gazi Üniversitesi, Ankara, 1-2.
62. Erol, E. ve Ünal, K. (2022). *Flep modeli oluşturulmuş sıçanlarda tıbbi sülük ve tıbbi sülük salgı ekstrakt uygulamasının etkilerinin araştırılması*. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje 2022-2023, Gazi Üniversitesi, Ankara, 1-2.
63. Baskova, I., Kostjukova, E., Vlasova, M., Kharitonova, O., Levitskiy, S., Zavalova, L., Moshkovskii, S. and Lazarev, V. (2008). Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *Biochemistry (Moscow)*, 73, 315-320.
64. Karahancı, O. N., Öztoprak, Ü. Y., Ersoy, M., Ünsal, Ç. Z., Hayırlıdağ, M. and Büken, N. Ö. (2015). Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları yönetmeliği ile yönetmelik taslağı'nın karşılaştırılması. *Türkiye Biyoetik Dergisi*, 2(2), 117-26.
65. Gileva, O. (2010). *Modern hirudotherapy: Experimental background and clinical efficacy*. 8th International Conference on Biotherapy, Karnataka, 8-13.
66. Lauche, R., Cramer, H., Langhorst, J. and Dobos, G. (2014). A systematic review and meta-analysis of medical leech therapy for osteoarthritis of the knee. *The Clinical Journal of Pain*, 30(1), 63-72.
67. Abdulkader, A., Ghawi, A., Alaama, M., Awang, M. and Merzouk, A. (2013). Leech therapeutic applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2), 127.
68. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
69. Abdulkader, A. M., Merzouk, A., Ghawi, A. M. and Alaama, M. (2011). Some biological activities of Malaysian leech saliva extract. *IIUM Engineering Journal*, 12(4), 85-92.
70. Merzouk, A., Ghawi, A., Abdulkader, A., Abdullahi, A. and Alaama, M. (2012). Anticancer effects of medical Malaysian leech saliva extract (LSE). *Pharm Anal Acta S*, 15, 2-6.
71. Mao, Y., Zhang, D.-W., Wen, J., Cao, Q., Chen, R.-J., Zhu, J. and Feng, Z.-Q. (2012). A novel LMP1 antibody synergizes with mitomycin C to inhibit nasopharyngeal carcinoma growth in vivo through inducing apoptosis and

- downregulating vascular endothelial growth factor. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2208-2218.
72. Yun, I. S., Kim, Y. S., Roh, T. S., Lee, W. J., Park, T. H., Roh, H., Lew, D. H. and Rah, D. K. (2017). The effect of red ginseng extract intake on ischemic flaps. *Journal of Investigative Surgery*, 30(1), 19-25.
 73. Lee, J.-W., Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, S.-H. and Kim, K.-W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental & Molecular Medicine*, 36(1), 1-12.
 74. Schultz, G., Clark, W. and Rotatori, D. S. (1991). EGF and TGF- α in wound healing and repair. *Journal of Cellular Biochemistry*, 45(4), 346-352.
 75. Garoufalia, Z., Papadopetraki, A., Karatza, E., Vardakostas, D., Philippou, A., Kouraklis, G. and Mantas, D. (2021). Insulin-like growth factor-I and wound healing, a potential answer to non-healing wounds: A systematic review of the literature and future perspectives. *Biomedical Reports*, 15(2), 1-5.
 76. Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22(8), 38-82.
 77. Schultz, G. and Grant, M. (1991). Neovascular growth factors. *Eye*, 5(2), 170-180.
 78. Shakouri, A., Adljouy, N. and Abdolalizadeh, J. (2018). *Anti-cancer activity of liposomal medical leech saliva extract (LSE)*. Proceedings of the 3rd World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'18). Budapest, Hungary,
 79. Mahmoudi, S., Ebtia, M., Merzouk, A., Stratton, S., Jalili, R. and Ghahary, A. (2016). Evaluation of the anti-glucotoxic effects of leech saliva extract (lse) on mouse and human pancreatic islets. *Canadian Journal of Diabetes*, 40(5), S71.
 80. Xu, L., Li, X., Zhang, E., Liang, H., Li, W., Wang, S., Song, S. and Ji, A. (2019). The effect of leech extracts on endothelial cell coagulation-related factors and endothelial dysfunction-related molecules. *Clinical and Experimental Hypertension*, 41(3), 220-230.
 81. Darestani, K. D., Mirghazanfari, S. M., Moghaddam, K. G. and Hejazi, S. (2014). Leech therapy for linear incisional skin-wound healing in rats. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 7(4), 194-201.
 82. Zakian, A., Ahmadi, H. A., Keleshteri, M. H., Madani, A., Tehrani-Sharif, M., Rezaie, A., Davoodi, F., Kish, G. F., Raisi, A. and Langerudi, M. T. (2022). Study on the effect of medicinal leech therapy (*Hirudo medicinalis*) on full-thickness excisional wound healing in the animal model. *Research in Veterinary Science*, 153, 153-168.
 83. Mousavi, S. A., Ghasemi, M., Mousavi, S. J., Mousavi Darka, S. S. and Bagheri, V. (2016). Comparison of leeching and heparin therapy in management of acute venous congestion of limbs in rat. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 2(3), 25-30.

84. Amani, L., Motamed, N., Ardakani, M. M., Shasaltaneh, M. D., Malek, M., Shamsa, F., Fatemi, E. and Amin, M. (2021). Semi-solid product of medicinal leech enhances wound healing in rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(4), 38-62.
85. Yingxin, G., Guoqian, Y., Jiaquan, L. and Han, X. (2013). Effects of natural and recombinant hirudin on VEGF expression and random skin flap survival in a venous congested rat model. *International Surgery*, 98(1), 82-87.
86. Durrant, C., Townley, W., Ramkumar, S. and Khoo, C. (2006). Forgotten digital tourniquet: salvage of an ischaemic finger by application of medicinal leeches. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 88(5), 462-464.
87. Nair, H. K., Ahmad, N. W., Lee, H. L., Ahmad, N., Othamn, S., Mokhtar, N. S. H. M. and Chong, S. S. Y. (2022). Hirudotherapy in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 21(4), 425-431.
88. Mortenson, B., Dawson, K. and Murakami, C. (1998). Medicinal leeches used to salvage a traumatic nasal flap. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36(6), 462-464.
89. Ünal, K., Erol, M. E. and Ayhan, H. (2023). Literature review on the effectiveness of medicinal leech therapy in the wound healing. *Ankara Medical Journal*, 23(1), 72-82.





EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.03.2023-E.611930



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-611930
Konu : Değerlendirme ve Onay

15.03.2023

Sayın Doç. Dr. Kübranur ÜNAL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Kübranur ÜNAL, Nurmukhamad KHUSAİNOV, Duygu DAYANIR ve Leyla MAMMADOVA'dan oluşan, G.Ü.ET-23.026 kod numaralı ve "*Ratlarda Tıbbi Sülük ve Tıbbi Sülük Salgı Ekstraktının İnsizyonel Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-23.026 and entitled "*Effect of Medicinal Leech and Medicinal Leech Saliva Extract on Incisional Wound Healing in Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 24

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSU7RVU3M3

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :5/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuiversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarihi ve Sayısı: 15.05.2023-E.011930

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 17/02/2023		TOPLANTI SAYISI : 02	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)			
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.İlker ŞEN			
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Prof.Dr.Serkan YAVUZ			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN			
Doç.Dr.Elvan ANADOL			
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ			
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN			
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ			
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ			
Dr.Öğr.Üyesi Sühan GÜRBÜZ			
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIĞMAN			
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : KHUSAINOV, Nurmukhamad

Uyruğu : Tacikistan

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	2024
Lisans	Sadriddin Ayni Adına Tacikistan Devlet Pedagoji Üniversitesi/ Biyoloji-Kimya	2021
Lise	Tacikistan, Tursunzoda şehri 33 No'lu Lisesi	2016

Yabancı Dil

Rusça, Farsça

Yayınlar

1. Khusainov, N. (2023). *Ratlarda tıbbi sülük ve tıbbi sülük salgı ekstraktının insizyonel yara iyileşmesi üzerine etkisi*. 13. Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi, 15-16 Aralık 2023



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

