

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



ENFEKTE İSKEMİK YARA OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
L. PLANTARUM KULLANIMININ YARA İYİLEŞME
SÜRECİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

ELİF ÇAKMAK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. HAYRETTİN AKDENİZ

BOLU, HAZİRAN- 2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Elif ÇAKMAK tarafından hazırlanan “Enfekte İskemik Yara Oluşturulan Sıçanlarda *Lactobacillus plantarum* Kullanımının Yara İyileşme Sürecine Etkilerinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliği kabul edilmiştir. 7/06/2022

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Hayrettin AKDENİZ
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Erol AYZAZ
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTÜRK
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ
Düzce Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Şerif DEMİR
Düzce Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim 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.

Teze ilişkin 26/06/2022 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %7 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan Araştırmalar Etik Kurulundan 2019/25 sayısı ile etik izin alınmıştır.

.....

ELİF ÇAKMAK

ÖZET

ENFEKTE İSKEMİK YARA OLUŞTURULAN SIÇANLARDA *L. PLANTARUM* KULLANIMININ YARA İYİLEŞME SÜRECİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
DOKTORA TEZİ
Elif ÇAKMAK
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HASTANE ENFEKSİYONLARINI ÖNLEME BİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. HAYRETTİN AKDENİZ)

BOLU, HAZİRAN – 2022

XIV + 89 sayfa

Amaç; Bu çalışma, iskemik ve enfekte iskemik yara modeli oluşturulan sıçanlarda, 21 gün boyunca yara bölgelerine *Lactobacillus plantarum* uygulanmasıyla yara iyileşmesine etkilerinin morfolojik, mikrobiyolojik, histopatolojik ve moleküler olarak değerlendirilmesini amaçlamaktadır.

Yöntem; Deneysel tipteki araştırma yetişkin erkek sıçanlarla yapılmıştır. İskemik yara gurubu ve enfekte iskemik yara grubu olmak üzere 2 ana deney grubu bulunmaktadır. İskemik yara grubu, iskemik yara kontrol grubu (İ1), iskemik yara *L. plantarum* grubu (İ2) ve iskemik yara antibiyotik gruplarından (İ3) oluşmuştur. Enfekte iskemik yara grupları, enfekte iskemik yara kontrol grubu (E1), enfekte iskemik yara *L. plantarum* grubu (E2) ve enfekte iskemik yara antibiyotik gruplarından (E3) oluşmaktadır. Tüm grupların 1,3,5,7,14 ve 21. günlerinde yara bölgelerinin fotoğrafları çekilmiş ve 3'er hayvan sakrifiye edilerek alınan doku örnekleri mikrobiyolojik, histopatolojik ve moleküler olarak analiz edilmiştir. Çekilen yara bölgelerinin fotoğrafları image j programı kullanılarak yara boyutu ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular; Morfolojik değerlendirmelerde *L. plantarum* uygulanan gruplarda yara boyutu diğer gruplara göre anlamlı olarak küçüktür. Mikrobiyolojik değerlendirmelerde E1, E2 ve E3 grupları arasındaki değerlendirmeler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Histopatolojik değerlendirmelerde proliferasyon evresinde anjiyogenez ve granülasyonda, remodelling evresinde fibrozis ve kollajen değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. IL-1 seviyesinin değerlendirmesinde 7. güne kadar *L. plantarum* uygulanan grupta en düşük seyrettiği görülmektedir. IL-8 seviyelerinin 1,5,7 ve 14. günlerde anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. Enfekte iskemik yara grubunda *L. plantarum* uygulanan grubun IL-8 seviyesinin diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç; İskemik ve enfekte iskemik yara modeli uygulanan sıçanlarda *L. plantarum* kullanımının yara iyileşmesi üzerine etkileri morfolojik, mikrobiyolojik, histopatolojik ve moleküler analizlerle ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: İskemik yara, enfekte iskemik yara, *Lactobacillus plantarum*, yara iyileşmesi, deneysel çalışma, rat.

ABSTRACT

EVALUATION OF HEALING PROCESS IN INFECTED ISCHEMIC WOUND RATS THAT ARE THREATED WITH *L. PLANTARUM*

PHD THESIS

ELİF ÇAKMAK

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF INFECTIOUS DISEASES

PREVENTION OF NOSOCOMIAL INFECTIONS PROGRAM

(SUPERVISOR: PROF.DR. HAYRETTİN AKDENİZ)

BOLU, JUNE 2022

XIV + 89 pages

Aim; This study aims to evaluate the effects of morphological, microbiological, histopathological and molecular wound healing effects by applying *L. plantarum* to the wound sites for 21 days in rats with ischemic and infected ischemic wound models.

Method; Experimental type research was conducted with adult male rats. Experimental groups were made two main groups. These are ischemic wound and infected ischemic wound groups. Ischemic wound group consisted of control, *L. plantarum* treated group and the antibiotic treated groups. Infected ischemic wound group consisted of control, *L. plantarum* treated group and antibiotic treated groups. Photographs of wound areas were taken on days 1,3,5,7,14 and 21 in all groups, and tissue samples taken after sacrificing 3 animals were analyzed microbiologically, histopathologically and molecularly. Wound size measurements were performed using the images of the wound areas taken using the image j program.

Results: Wound size was significantly smaller in *L. plantarum* applied groups compared to other groups. In microbiological evaluations, there was no statistically significant difference between the groups. Histopathological evaluation was evaluated over 3 main stages: inflammation, proliferation and remodelling. In the analyzes performed, it was observed that there were statistically significant differences in angiogenesis and granulation in the proliferation stage, and in fibrosis and collagen evaluations in the remodelling stage.

In the evaluation of IL-1 level, it was observed that it was the lowest in the I2 group, which was administered *L. plantarum* until the 7th day. Significant differences were observed in IL-8 levels on days 1,5, 7 and 14, and it was observed that the significant difference was due to the lower expression level of the group in which *L. plantarum* was used.

Conclusion: The effects of using *L. plantarum* on wound healing in rats treated with ischemic and infected ischemic wound models were demonstrated by morphological, microbiological, histopathological and molecular analyzes.

KEYWORDS: Ischemic wound, infected ischemic wound, *Lactobacillus plantarum*, wound healing, experimental study, rat.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
FOTOĞRAF LİSTESİ	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Yara İyileşmesi ve Evreleri	3
2.1.1 Hemostaz	3
2.1.2 Enflamasyon	4
2.1.3 Proliferasyon.....	6
2.1.4 Yeniden Şekillenme/Modelleme	8
2.2 Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	9
2.3 Yaraların Sınıflandırılması ve İskemik Yaralar.....	10
2.4 Sitokinler ve Büyüme Faktörlerinin Yara İyileşmesindeki Rollerini	11
2.5 Yara Enfeksiyonları ve <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.6 Yara ve Yara Enfeksiyonlarının Tedavisi.....	14
2.7 Yara Tedavilerinde Probiyotikler ve <i>Lactobacillus plantarum</i>	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması	16
3.2 İskemik Yara ve Enfekte İskemik Yara Modelinin Oluşturulması	17
3.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un ve Antibiyotik Tedavisinin Uygulanması ..	20
3.4 Yara Gözlemi ve Yara Bakımı; Metrik Ölçüm, Makroskopik Değerlendirme	21
3.5 Mikrobiyolojik, Histolojik ve Moleküler Analizlerin Gerçekleştirilmesi	23
3.5.1 Mikrobiyolojik İncelemeler	24
3.5.2 Histopatolojik İncelemeler	27
3.5.3 Moleküler İncelemeler.....	27
3.6 İstatistiksel Olarak Verilerin Değerlendirilmesi	29
4. BULGULAR	30
4.1 Morfolojik Bulgular	30
4.2 Mikrobiyolojik Bulgular	44
4.3 Histopatolojik Bulgular	52

4.4 Moleküler Bulgular.....	59
4.4.1 RNA İzolasyonu	59
4.4.2 cDNA Sentezi	63
4.4.3 Kantitatif Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR)	63
4.4.4 qRT-PCR Sonuçlarının Analizi	65
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
7. KAYNAKLAR.....	84



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2-1. Yara İyileşmesinde Hemostaz Evresi.....	4
Şekil 2-2. Yara İyileşmesinde Enflamasyon Evresi.....	5
Şekil 2-3. Yara İyileşmesinde Proliferasyon Evresi	7
Şekil 2-4. Yara İyileşmesinde Yeniden Şekillenme/Modelleme Evresi.....	9
Şekil 3-1. İskemik Yara Modelinin Oluşturulması.....	18
Şekil 3-2. Mikrobiyolojik, Histolojik ve Moleküler Analizlerin Gerçekleştirilmesi	23
Şekil 4-1. Tüm Grupların 1. Gün Yara Boyutları Grafiği.....	39
Şekil 4-2. Tüm Grupların 3. Gün Yara Boyutları Grafiği.....	40
Şekil 4-3. Tüm Grupların 5. Gün Yara Boyutları Grafiği.....	41
Şekil 4-4. Tüm Grupların 7. Gün Yara Boyutları Grafiği.....	42
Şekil 4-5. Tüm Grupların 14. Gün Yara Boyutları Grafiği.....	43
Şekil 4-6. Tüm Grupların 21. Gün Yara Boyutları Grafiği.....	44
Şekil 4-7. Enfekte İskemik Yara Grupları 1. Gün <i>S.aureus</i> Koloni Sayısı.....	48
Şekil 4-8. Enfekte İskemik Yara Grupları 3. Gün <i>S.aureus</i> Koloni Sayısı.....	49
Şekil 4-9. Enfekte İskemik Yara Grupları 5. Gün <i>S.aureus</i> Koloni Sayısı.....	49
Şekil 4-10. Enfekte İskemik Yara Grupları 7. Gün <i>S.aureus</i> Koloni Sayısı.....	50
Şekil 4-11. Enfekte İskemik Yara Grupları 14. Gün <i>S.aureus</i> Koloni Sayısı...	50
Şekil 4-12. IL- 1 Primerine Ait Reaksiyon Grafiği.....	64
Şekil 4-13. IL-8 Primerine Ait Reaksiyon Grafiği.....	64
Şekil 4-14. VEGF Primerine Ait Reaksiyon Grafiği	65
Şekil 4-15. İ Grupları 1. Gün IL-1 Seviyesi Grafiği.....	70
Şekil 4-16. İ Grupları 7. Gün IL-1 Seviyesi Grafiği.....	70
Şekil 4-17. İ Grupları 1. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği.....	71
Şekil 4-18. İ Grupları 5. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği.....	71
Şekil 4-19. İ Grupları 7. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği.....	72
Şekil 4-20. İ Grupları 14. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği.....	72
Şekil 4-21. E Grupları 21. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği.....	73
Şekil 4-22. İskemik Yara Grupları 1. Gün VEGF Seviyesi Grafiği	73
Şekil 4-23. İskemik Yara Grupları 7. Gün VEGF Seviyesi Grafiği	74
Şekil 4-24. İskemik Yara Grupları 14. Gün VEGF Seviyesi Grafiği	74

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2-1. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	10
Tablo 2-2. Yaraların Sınıflandırılması	10
Tablo 2-3. Sitokinler ve Büyüme Faktörlerinin Rollerini	12
Tablo 3-1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	16
Tablo 3-2. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerler	28
Tablo 4-1. Günlere Göre Gruplardaki Yara İyileşmelerinin Morfolojik Görüntüsü	32
Tablo 4-2. Ratlarda Grup İ1 Yara Boyutları	33
Tablo 4-3. Ratlarda Grup İ2 Yara Boyutları	34
Tablo 4-4. Ratlarda Grup İ3 Yara Boyutları	35
Tablo 4-5. Ratlarda Grup E1 Yara Boyutları	36
Tablo 4-6. Ratlarda Grup E2 Yara Boyutları	37
Tablo 4-7. Ratlarda Grup E3 Yara Boyutları	38
Tablo 4-8. Ratlarda Grup E1 <i>S.aureus</i> Koloni Sayıları.....	45
Tablo 4-9. Ratlarda Grup E2 <i>S.aureus</i> Koloni Sayıları.....	46
Tablo 4-10. Ratlarda Grup E3 <i>S.aureus</i> Koloni Sayıları.....	47
Tablo 4-11. Ratlarda İ2 Grubu <i>L. plantarum</i> Koloni Sayıları.....	51
Tablo 4-12. Ratlarda E2 Grubu <i>L. plantarum</i> Koloni Sayıları.....	52
Tablo 4-13. Ratlarda 1. Gün Değerlendirmeleri.....	53
Tablo 4-14. Ratlarda 3. Gün Değerlendirmeleri.....	54
Tablo 4-15. Ratlarda 5. Gün Değerlendirmeleri.....	55
Tablo 4-16. Ratlarda 7. Gün Değerlendirmeleri.....	56
Tablo 4-17. Ratlarda 14. Gün Değerlendirmeleri.....	57
Tablo 4-18. Ratlarda 21. Gün Değerlendirmeleri.....	58
Tablo 4-19. İ1 Grubu RNA Konsantrasyonları	59
Tablo 4-20. İ2 Grubu RNA Konsantrasyonları	60
Tablo 4-21. İ3 Grubu RNA Konsantrasyonları	61
Tablo 4-22. E1 Grubu RNA Konsantrasyonları	61
Tablo 4-23. E2 Grubu RNA Konsantrasyonları	62
Tablo 4-24. E3 Grubu RNA Konsantrasyonları	63
Tablo 4-25. İ1 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri.....	65
Tablo 4-26. İ2 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri.....	66
Tablo 4-27. İ3 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri.....	67
Tablo 4-28. E1 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri.....	67
Tablo 4-29. E2 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri.....	68
Tablo 4-30. E3 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri.....	69

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3-1. Ratlarda İskemik Yara Modeli (A) ve Modifiye Edilmiş İskemik Yara Modeli (B)	18
Fotoğraf 3-2. Yara Modeli Oluşturulan Ratların Operasyona Hazırlanması (Traşlama, Asepsi ve Antisepsi).....	19
Fotoğraf 3-3. Ratlarda Punch ile Yara Oluşturma ve Silikonun Yerleştirilmesi	19
Fotoğraf 3-4. Ratlarda Silikonun Düzeltilmesi ve Dikiş ile Sonlandırma	20
Fotoğraf 3-5. Ratlarda Yara Bölgesine <i>L.plantarum</i> ve Antibiyotik Uygulaması	21
Fotoğraf 3-6. Yaranın Ölçümü ve Değerlendirilmesi	22
Fotoğraf 3-7. Yara Bölgelerinin İmaj J Programı ile Ölçümü	22
Fotoğraf 3-8. Ratlarda Yara bölgesinden Doku Alınması.....	23
Fotoğraf 3-9. Örneklerin Besiyerine Ekilmesi.....	25
Fotoğraf 3-10. Koloni Sayımları	25
Fotoğraf 3-11. Hızlı Antijen Testi (<i>Staphylococcus</i> türleri için)	26
Fotoğraf 3-12. <i>Lactobasillus plantarum</i> Kolonilerin Değerlendirilmesi	26
Fotoğraf 4-1. Ratlarda Yara Bölgesinin Fotoğraflanması.....	30
Fotoğraf 4-2. Ratlarda Yara Bölgesinin İmaj J Programı ile Ölçeklendirilmesi	31
Fotoğraf 4-3. Ratlarda İmaj J Programı ile Yara Boyutunun Ölçülmesi	31
Fotoğraf 4-4. Enfekte İskemik Yara Grubu Örneği	48

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
cfu	: Koloni oluşturan birim
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E1	: Enfekte iskemik yara kontrol grubu
E2	: Enfekte iskemik yara <i>L. plantarum</i> grubu
E3	: Enfekte İskemik yara antibiyotik grubu
ECM	: Hücre dışı matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
g	: Gram
HE	: Hematoksilen ve Eozin
IL-1	: İnterlökin 1
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
İ1	: İskemik yara kontrol grubu
İ2	: İskemik yara <i>L. plantarum</i> grubu
İ3	: İskemik antibiyotik grubu
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MRS	: DE Man Rogosa Sharpe Agar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
RNA	: Ribonükleik asit
TGF-α	: Transforme edici büyüme faktörü alfa
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü beta
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

°C : Derece
µl : Mikrolitre



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Hayrettin AKDENİZ'e, tez çalışmam boyunca her konuda bana destek olan ve yol gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda yer alan mikrobiyolojik analizlerde bilgi ve tecrübesiyle her türlü yardımda bulunan Doç. Dr. Mustafa BEHÇET'e, çalışmanın histopatolojik değerlendirmelerini yapan ve bu süreçte özveri ile bilgilerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Ali Can ÖNAL'a, moleküler çalışmalarım sırasında her türlü tecrübesi ve desteğiyle bana yardımcı olan değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Cansu ÖNAL'a çok teşekkür ederim.

Hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesinde her türlü yardım ve destekleri ile yanımda olan değerli arkadaşlarım Vet. Hekim Enes EĞİLMEZ, Bihter Gökçe BOZAT, Firdevs ULUÇ, Esra FİDAN KARAMADEN, Serhat GÖKDAŞ'a ve Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin değerli çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve her türlü fedakarlığı gösteren çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin her aşamasında yanımda olan ve çalışmalarımı gerçekleştirmemde benimle birlikte çaba gösteren değerli eşim Mücahit ÇAKMAK'a ve sevgili kızım Hüsna ÇAKMAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek projeleri kapsamında 220S322 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Bu araştırma Türkiye Cumhuriyeti Yükseköğretim Kurulu'nun YÖK 100/2000 Doktora Bursu programı kapsamında desteklenmiştir.

1. GİRİŞ

Yara, cilt ve mukozayı oluşturan dokuların çeşitli faktörler sebebiyle bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara iyileşmesi yalnızca yara bölgesini değil birçok sistemi içeren hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal durumları kapsar (1).

Yara iyileşmesi, kan hücrelerini, sitokinleri, parankimal hücreleri ve hücre dışı matriks reorganizasyonunu içeren dinamik bir evredir ve hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve rejeneratif fazdan oluşan süreçleri içermektedir. Bu süreçler sırasıyla ve birbiriyle organize şekilde gerçekleşmektedir. Yara iyileşme evrelerinde büyüme faktörleri ve sitokinler önemli görevlere sahiptirler. Büyüme faktörleri yara iyileşme sürecinde hücrelerin bölünmesi, migrasyonu, farklılaşması gibi olaylarda rol alırken, iyileştirici etkilerini özellikle anjiogenezi ve hücresel çoğalmayı uyararak gösterirler. Sitokinler ise yara iyileşme fazlarının hepsinde farklı etkilerle görev alırlar (2).

İyileşme sürecini etkileyebilecek en önemli faktörlerden biri de dokunun oksijenizasyonudur. Normal yara iyileşmesinin kilit noktası oksijendir ve kollajen birikimi, epitelizasyon, fibroplazi, anjiogenez ve enfeksiyona direnç dahil olmak üzere yaraların iyileşmesinde kritik düzeyde oksijene ihtiyaç duyulmaktadır. Dokuya oksijenin ulaşmasını etkileyebilecek çeşitli vasküler veya sistemik problemler olabilir. Kan akımının kesintiye uğraması, yaradaki perfüzyon basıncının düşmesine neden olur ve bu durum doku hipoksisini meydana getirir (2,3). İyileşme sürecinde nötrofillerin antibakteriyel aktivitesi, kollajen sentezi, epitel hücre replikasyon hızı ve anjiogenez gibi oksijen perfüzyonunun gerekli olduğu basamaklar durabilir. Kronik hipoksi, yarayı enfeksiyona açık hale getirir. Hipoksi ve enfeksiyon kırılması güç bir kısır döngü oluşturur (2).

Kronik yara olguları oldukça sık karşılaşılan ve hem hastayı hem de sağlık sistemlerini sıkıntıya sokan durumlardır. Oluşan kronik, iskemik ve enfekte yara olguları uzuv kaybına sebebiyet verebilir ve hayatı tehdit edebilir. Bu sebeple yara ve yara enfeksiyonlarının tedavilerinde her zaman farklı bakış açılarına ve çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (4–6).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte, probiyotiklerin konakçı ve mikroplar arasındaki etkileşimi düzenleyerek zor iyileşen yaraların önlenmesinde ve tedavisinde faydalı olabileceği öngörülmektedir (7–12). Bu amaçla probiyotiklerin yara iyileşme sürecindeki etkileri ve yara tedavisinde potansiyel

kullanımları dikkat çekmektedir (13). Probiyotik bakterilerin yara iyileşme evrelerinde olumlu etki göstererek evreleri hızlandırması, immün sistemi aktive etmesi ve antimikrobiyal etkinlik göstermesi ile tedavi seçenekleri arasında değerlendirilebileceği fikrini güçlendirmektedir.

Bu çalışmada enfekte iskemik yara modelinin ilk defa denenmesiyle beraber bu süreçlerin nasıl ilerlediğine dair gözlemler ortaya konulmuştur. Yara vakalarında muhtemel iskemi ve enfeksiyon birlikteliğinin karşılaştırılmasıyla birlikte enfekte iskemik yara modeli oluşturulan ratlarda *Lactobacillus plantarum*'un yara iyileşme sürecine katkılarının morfolojik, mikrobiyolojik, histopatolojik ve moleküler analizler doğrultusunda araştırılması amaçlanmıştır.



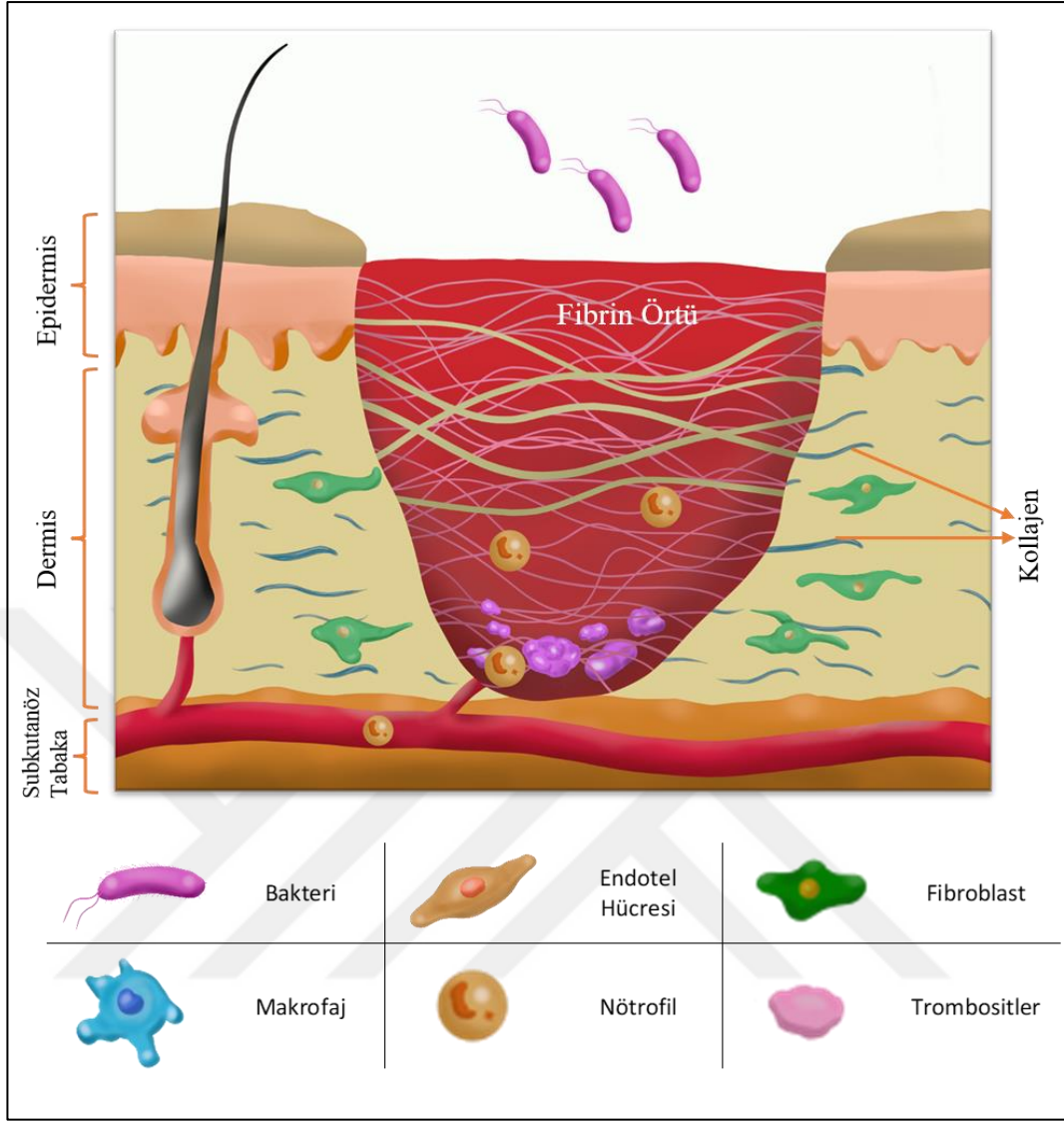
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Yara İyileşmesi ve Evreleri

Yara, normal deri anatomisinde ve fonksiyonunda bozulma ya da epitel bütünlüğünün kaybolmasına neden olan doku hasarı olarak tanımlanmaktadır (14). Yara iyileşme süreci, enflamatuvar faktörleri, yara bölgesindeki hücreleri ve büyüme faktörlerini içeren birbiriyle etkileşimli olaylar dizisi ile karakterizedir (15). Bu süreç genellikle hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (modelleme) olmak üzere 4 ana aşamada gerçekleşir. Her evre, farklı birçok hücre türü, büyüme faktörleri ve hücre dışı matriks (ECM: ekstraselüler matriks) arasında gerçekleşen birtakım etkileşimler ile gerçekleşir. Ancak bu aşamalar kesin bir çizgi ile ayrılamaz, birbiri ile örtüşen ve kesintisiz devam eden olaylar olarak kabul edilir (16–18).

2.1.1 Hemostaz

Hemostaz, vücudun kanamayı durdurmak için gerçekleştirdiği olaylar bütünüdür. Yaralanma anında kanamanın meydana gelmesi ile hemostaz aktive olur. Bu süreçte gerçekleşen olayların asıl amacı kan kaybını önleyerek vasküler sistemi korumaya çalışmaktır. Bir diğer amaç ise iyileşmenin diğer süreçlerinde ihtiyaç duyulan matriks yapısının oluşturulmasıdır. Hemostaz, birçok faktör tarafından başlatılır. İlk önce damarların kasılması ile vazokonstriksiyon meydana gelir, kan kaybının minimuma inmesi sağlanır. Yara bölgesindeki hücreler tarafından salgılanan pıhtılaşma faktörleri pıhtılaşma kaskadını aktive eder. Trombosit agregasyonu meydana gelir ve fibrin pıhtısı oluşturulur. Vazokonstriksiyon daha fazla kan kaybını önlerken, fibrin pıhtısı ise yara bölgesinde geçici sızdırmaz bir yapı oluşturarak mikroorganizma akışını önler. Fibrin pıhtısı, fibroblast ve keratinositleri yönlendiren geçici bir matriks veya yapı iskelesidir (19–21).

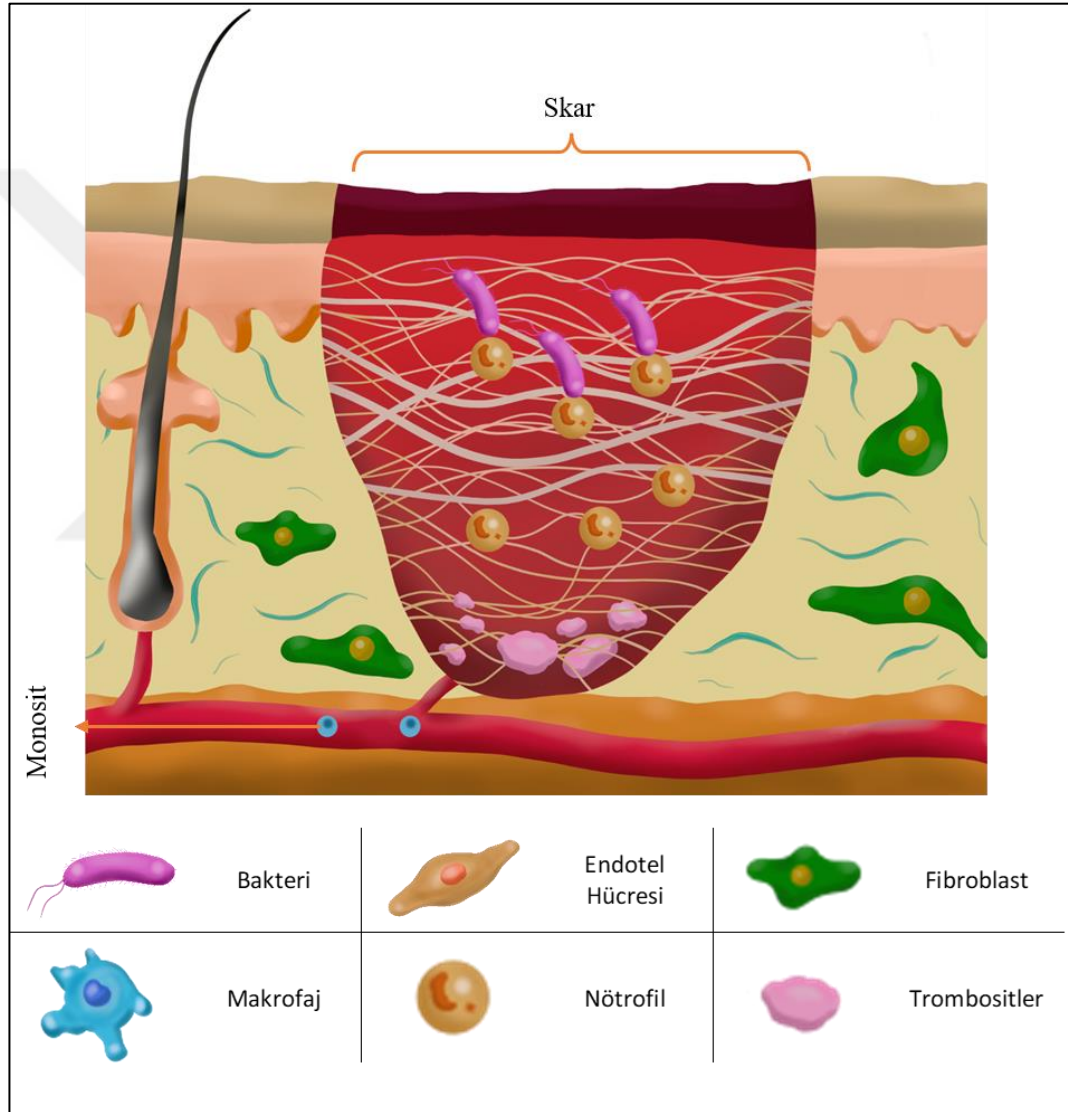


Şekil 2-1. Yara İyileşmesinde Hemostaz Evresi

2.1.2 Enflamasyon

Yara iyileşmesinin ikinci aşaması enflamasyondur. Bu aşama, trombositler, salgılanan sitokinler ve hemostazın yan ürünlerinden salınan çeşitli araçlar ile aktive olur. Yaralanmadan sonraki dakikalar içinde nötrofiller yara bölgesine ulaşır. Nötrofiller, yara bölgesinde bulunan mikroorganizmaları kontrol altına alır. Ayrıca bölgede bulunan fibroblastlar ve epitel hücreleri nötrofiller tarafından aktive edilir. Enfeksiyon varlığında nötrofil infiltrasyonu devam eder. Enfeksiyon yokluğunda ise yara bölgesinde bulunan monositler farklılaşarak makrofaja dönüşür. Yara iyileşme sürecinin geri kalan kısmında makrofajların yoğunluğu ve baskınlığı görülür. Makrofajlar, mikroorganizmaları, nötrofil artıklarını, fibrin pıhtılarını ve

diğer hücre kalıntılarını sindirmeye ek olarak, onarım aşamasını başlatmak için nitrik oksidi sentezler ve sitokinlerin (PDGF, TGF- β , TGF- α , FGF, IL-1, IL-8 vb.) salgılanmasını sağlar. Makrofajlar immun savunma ihtiyacı azaldıkça iyileşme süreçlerinin düzenlenmesinde görev alırlar. Yara iyileşmesinin enflamasyon aşamasında kanama kontrol edilir ve yara bölgesi temizlenir. Böylece hücre çoğalmasının ve onarımının bir sonraki aşaması için uygun ortam hazırlanmış olur (5,15,22–24).



Şekil 2-2. Yara İyileşmesinde Enflamasyon Evresi

2.1.3 Proliferasyon

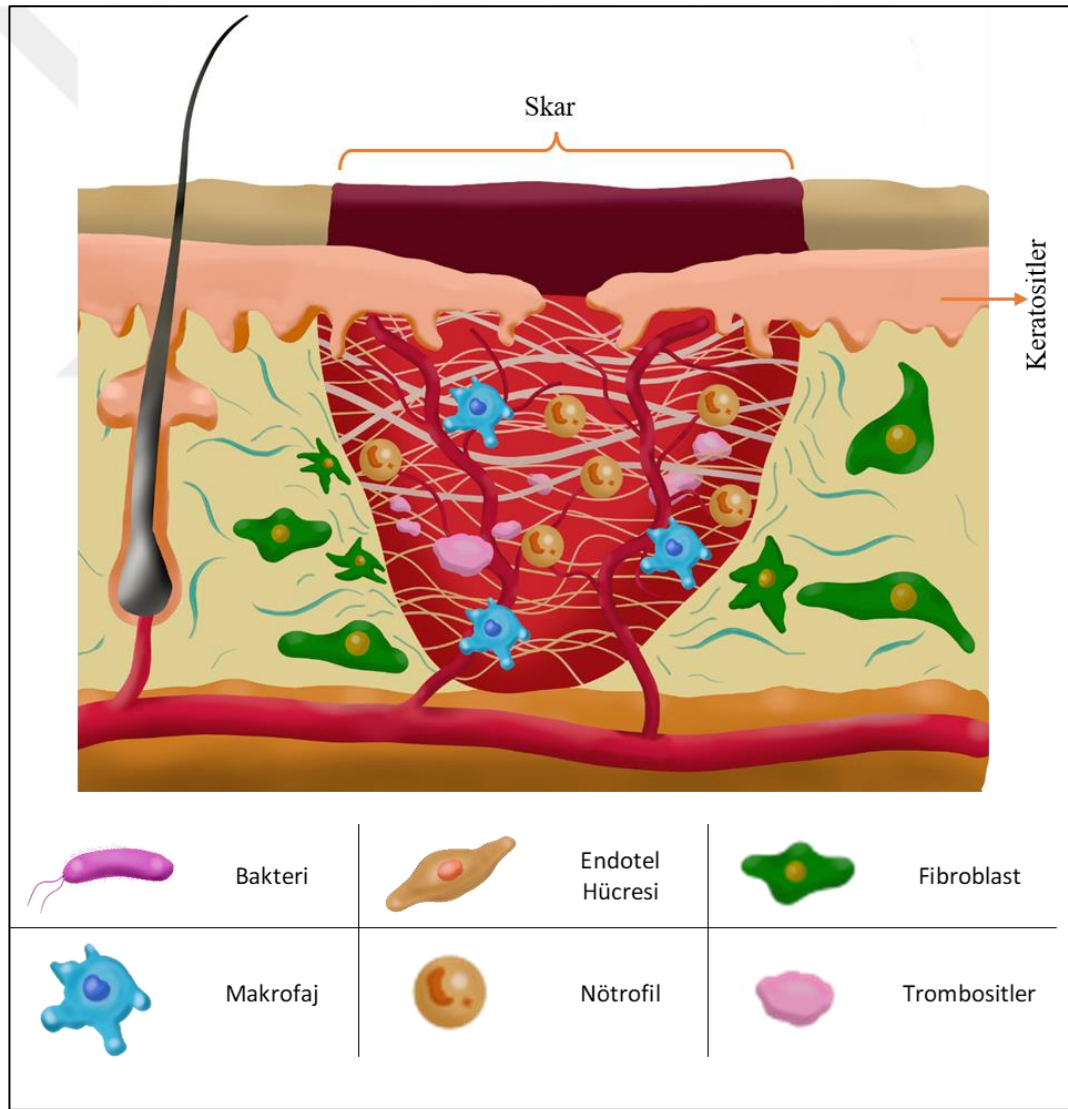
Proliferasyon evresi fibroblast ve endotel hücrelerinin göçünün ardından ekstraselüler matriksin birikimi ve granülasyon dokusunun oluşumu ile karakterizedir. Bu evre spesifik mekanizmalardan oluşur. Bu mekanizmalar, yara yüzeyinin yeni doku ile kaplanması; yeniden epitelizasyon, damar bütünlüğünün geri kazanılması; anjiyogenez ve doku hasarının ve bütünlüğünün yeni bağ dokusu ile doldurularak onarılması; granülasyon evreleridir. Bu evrede yaranın gerilme kuvvetinin artışı gözlenir. Bu aşama için anahtar hücreler fibroblast ve keratinositlerdir (16,25,26).

Yeniden epitelizasyon süreci doku hasarından birkaç saat sonra başlar. Epidermal hasarın onarımından çoğunlukla keratinosit göçü sorumludur. Yaranın meydana gelmesinden birkaç gün sonra yara kenarındaki ve yara içindeki epidermal hücreler bölünmeye ve çoğalmaya başlar. Böylece yara bölgesine göç eden hücre popülasyonuna katkıda bulunur. Çeşitli sitokinler ve matriks proteinleri keratinositlerin yara yatağına göçünü hızlandırır. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) keratinositleri göç etmeye teşvik eder (20,27–29).

Herhangi bir onarım sürecinin temel basamakları, düzenli bir besin kaynağı ve sağlam bir dağıtım sisteminin varlığıdır. Bu işlemler vasküler sistem tarafından gerçekleştirilir. Yaralanma ve benzeri durumlar sonucu işlevi bozulan vasküler sistemin eski haline getirilmesi süreci, anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç dokuda meydana gelen hipoksi ve salgılanan büyüme faktörleri tarafından uyarılır. Hemostaz ile oluşturulan fibrin pıhtısının yerini alan epidermal hücreler geçici bir örtü meydana getirir. Böylece anjiyogenezin ilerleyebileceği kapalı bir yapı oluşturulmuş olur. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri endotel hücreleri tarafından salgılanır ve yara kenarları boyunca anjiyogenezi uyarır. Anjiyogenezin diğer bir temel amacı, yeterli oksijen kaynağı ile hücre dışı matriksin oluşturulmasıdır (30–34).

Yeniden epitelizasyon işlemi gerçekleşirken aynı zamanda fibroplazi ve anjiyogenez de gerçekleşmektedir. Fibroplazi, granülasyon dokusunun oluşumu ve dermal matriksin yeniden oluşturulmasıdır. Granülasyon, fibrin pıhtısının hyaluronik asit, fibronektin ve diğer hücre dışı matriks bileşenleri bakımından

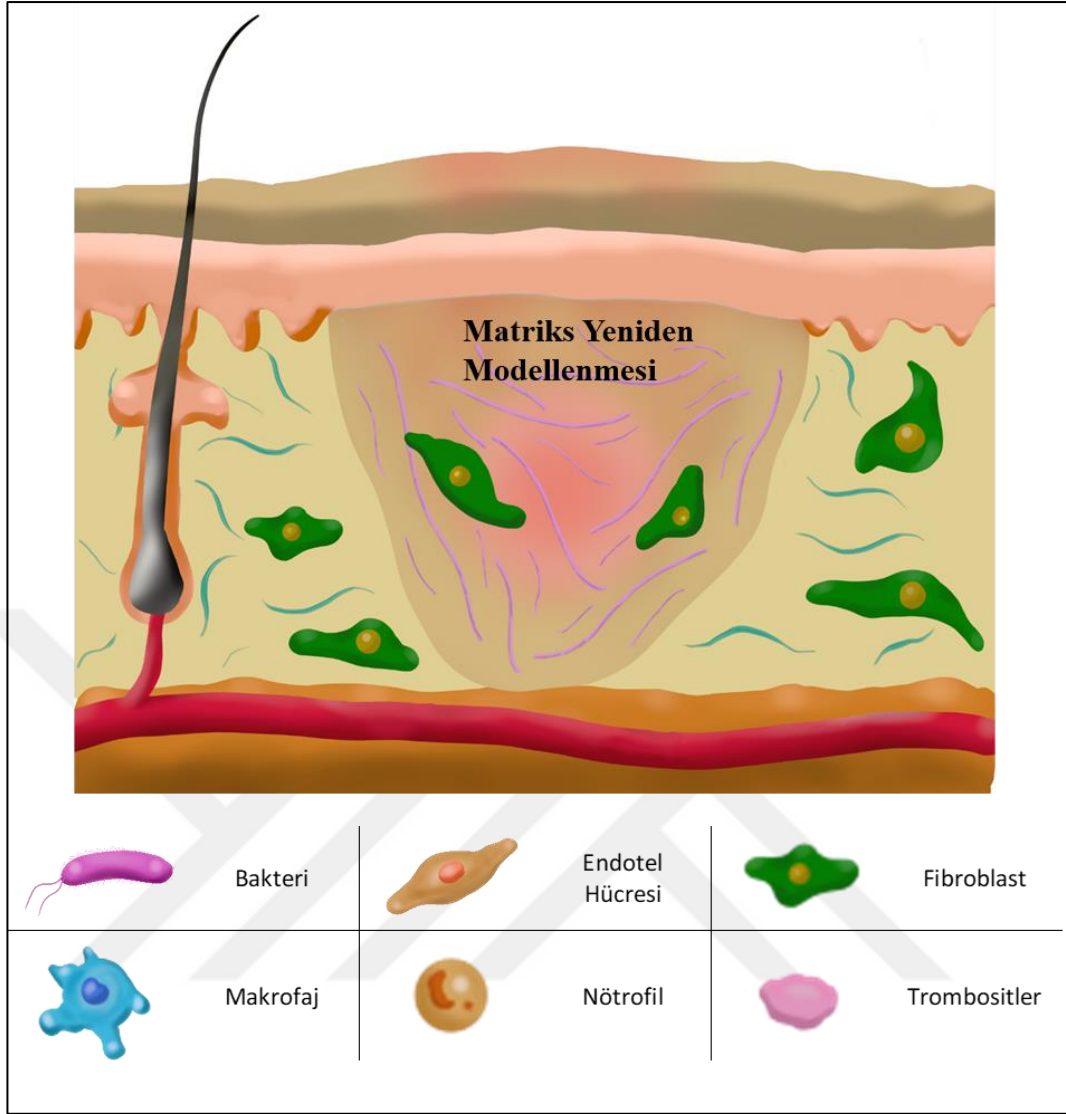
zengin yeni doku ile değiştirildiğinde meydana gelir. Granülasyon dokusunda baskın hücreler fibroblastlardır. Fibroblastlar, kollajen ve hücre dışı matriksi oluşturan birçok maddeyi üretir. Normal fibroblastlar ile granülasyon dokusunda yer alan fibroblastlar hem yapı hem de işlev bakımından farklılık gösterirler. Yara bölgesindeki granülasyon dokusunda yer alan fibroblastlar proliferasyondan ziyade kollajen sentezinde görev alırlar. Ayrıca zamanla miyofibroblastlara farklılaşarak yara kasılma sürecine katılırlar. Granülasyon dokusunun yapısı ve bileşimi olgunlaştıkça devamlı olarak değişime uğrar. Kollajen, baskın protein olmasına rağmen dokuda farklı tiplerde bulunur. Zamanla kollajen tipleri değişerek iyileşen yaranın gerilme gücünün artması sağlanır (16,35,36).



Şekil 2-3. Yara İyileşmesinde Proliferasyon Evresi

2.1.4 Yeniden Şekillenme/Modelleme

Yeniden şekillenme yara iyileşme sürecinin son aşamasıdır. Bu aşamanın amacı, dokunun işlevsel bariyerini eski haline getirmek ve yaranın gerilme mukavemetini arttırmaktır. Bu aşamanın temel hücreleri fibroblastlar ve makrofajlardır. Makrofajlar programlı hücre ölümü ile yaranın yeniden şekillendirilmesinde rol oynar. Fibroblastlar, fibronektin, hyaluronik asit, proteoglikan ve kollajen üretirler. Bütün bu maddeler, hücrelerin hücre göçünde miyofibroblastların yara kasılmasına neden olacak bir bağlantı ve kollajen birikimi için bir şablon işlevi görür. Hyaluronik asit hücre göçünü ve bölünmesini teşvik eder. Proteoglikanlar, doku esnekliğine katkıda bulunurlar. Kollajen sentezi, yaralanmadan yaklaşık 5 gün sonra zirveye ulaşır. Ancak bu üretim haftalar ve aylarca devam eder. Bu süre boyunca, kollajen ve hücre dışı matriks dokusu yarada birikmeye devam ederken, gelişen bağ dokusu hücre olgunlaşması ve apoptoz ile şekillendirilir. Üretilen kollajen yapısal destek sağlayarak dokunun gerilme mukavemetini artırır. Yara mukavemeti artmasına rağmen, yaralanma öncesi gücün yüzde 80'inden fazlası elde edilemez (20,25,28,29,37).



Şekil 2-4. Yara İyileşmesinde Yeniden Şekillenme/Modelleme Evresi

Onarılan doku ile hasar görmemiş doku arasında önemli farklılıklar bulunur. Yeni bağ dokusu, alttaki bağ dokusu matrisine iyi sabitlenmemiş ve normal deriden daha kalındır. Bu süre zarfında kollajen demetleri boyut ve güç olarak büyür ve anjiyogenez durur. Hücre dışı matriks içindeki metabolik aktivite azalır. Makrofajlar, keratinositler, fibroblastlar ve miyofibroblastlar gibi hücreler apoptoz ile azaltılır (19,25).

2.2 Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara iyileşmesi, birçok faktörü ve evreyi içeren karmaşık süreçler bütünüdür. Bu süreçte yara iyileşmesini etkileyen birtakım faktörler bu süreçlerin

seyrini değiştirebilmektedir. Bu faktörler genel olarak lokal ve sistemik olmak üzere iki başlıkta toparlanabilir. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler Tablo 2-1’de gösterilmiştir (38,39) .

Tablo 2-1. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

LOKAL FAKTÖRLER	SİSTEMİK FAKTÖRLER
Kan Akışının Yetersiz Olması	Obezite
Derinin Gerilmesi	Sigara Kullanımı
Cerrahi Yaranın Uygun Kapatılmaması	Beslenme Bozukluğu
Yetersiz Venöz Drenaj	İleri Yaş
Yabancı Cisim Varlığı	Vitamin ve Mineral Eksikliği
Enfeksiyonun Varlığı	Metabolik Hastalıklar
Yaranın Eklem Gibi Hareketli Bölgede Olması	Kemoterapi ve Radyoterapi Tedavileri
	İmmun Sistemi Baskılayıcı İlaç Kullanımı
	Steroid ve Antikoagölan İlaç Kullanımı

2.3 Yaraların Sınıflandırılması ve İskemik Yaralar

Yaraların sınıflandırılması, yaranın iyileşme süresine, bütünlüğüne, kontaminasyon durumuna, kökenine, etiyolojisine ve yapılan farklı sınıflandırmalara göre çeşitlilik arz etmektedir. Yaraların sınıflandırılması Tablo 2-2’de gösterilmiştir (34,39).

Tablo 2-2. Yaraların Sınıflandırılması

Kökenine Göre Yaralar	Etiyolojisine Göre	Yara İyileşme Süresine Göre	Kontaminasyon Durumuna Göre	Bütünlüğüne Göre
<ul style="list-style-type: none"> • Mekanik Yaralar • Kimyasal Yaralar • Radyasyondan Kaynaklanan Yaralar • Termal Stres Yaraları • Hastalıklardan Kaynaklanan Yaralar • Cerrahi Yaralar 	<ul style="list-style-type: none"> • Travma • Yanık • Penetran Yaralanmalar • Cerrahi Yaralar 	<ul style="list-style-type: none"> • Akut • Kronik 	<ul style="list-style-type: none"> • Temiz Yaralar • Temiz Kontamine Yaralar • Kontamine Yaralar • Ağır Kontamine/ Kirli Yaralar 	<ul style="list-style-type: none"> • Açık Yaralar • Kapalı Yaralar

<ul style="list-style-type: none">• Mikrobiyal İnfeksiyondan Kaynaklı Yaralar• Hayvan Isırıkları				
---	--	--	--	--

İyileşme süresine göre yaralar akut ve kronik yaralar olarak sınıflandırılırlar. Akut yaralar çevresel faktörlerden kaynaklanan ve iyileşme süresi hızlı ve iyileşme süreçleri düzenli ilerleyen yaralardır. Kronik yaralar ise iyileşmenin çok daha uzun sürdüğü, iyileşme evrelerinin düzenli bir şekilde ilerlemediği, çoğunlukla tekrar eden ve genelde iyileşme göstermeyen yaralardır (23,40). Kronik, iyileşmeyen yaralarda sebebi ne olursa olsun hipoksik bir ortam bulunur. Hipoksi, dokudaki oksijen oranının düşmesini, bir dokunun veya organın sınırlı kan akışının olmasını ifade eder. Bu durum iskemi ortamını oluşturur. İskemik yara, arterden azalan kan akışının neden olduğu bir ülserdir. Düşük oksijen seviyeleri nötrofillerin ve fibroblastların işlevlerini azaltır, kollajen sentezini azaltır ve yara enfeksiyonunu artırır. Kanda yeterli miktarda oksijenin bulunmaması ve perfüzyonda aksaklıkların görülmesi ile iskemik yaralar meydana gelir. İskemik yaralar, basınç uygulanan, ayakkabının sürtünme yaptığı ve tekerrür eden travmaya maruz kalan bölgelerde sıklıkla görülür. İskemik yaralara sebep olan risk faktörleri 2 ana gruba ayrılabilir. Obezite, alkol ve tütün kullanımı, hareketsiz yaşam ve kolesterol gibi değiştirilebilir risk faktörleridir. Periferik damar hastalığı, hipertansiyon, diyabet, talasemi, orak hücre hastalığı, kronik böbrek rahatsızlıkları ve ileri yaş gibi faktörler de değiştirilemeyen risk faktörleri olarak açıklanabilir (2,3,6,41).

2.4 Sitokinler ve Büyüme Faktörlerinin Yara İyileşmesindeki Roller

Yara iyileşmesi, birçok metabolik olayı ve hücreyi kapsayan karmaşık ve kapsamlı bir süreçtir. İyileşme süreçlerinin düzenli ve sağlıklı bir şekilde ilerleyebilmesinde sitokinler ve büyüme faktörleri önemli görevler üstlenirler (42). Büyüme faktörleri, hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve göçü gibi görevlerde rol aldıkları gibi protein ve enzim üretiminde de aktif durumdadırlar. Yara iyileşmesine, anjiyogenezi ve hücrel çoğalmayı aktive ederek katkıda bulunurlar (43).

Sitokinler ise düşük moleküler ağırlığa sahip protein yapıda moleküllerdir. Sitokinlerin doğal ve edinsel bağışıklık cevabında hücresel büyüme, farklılaşma, Enflamasyon ve onarım gibi birçok görevi bulunmaktadır. Yara iyileşmesinde ise özellikle hücre bölünmesi ve çoğalmasının uyarılmasında oldukça önemlidir. Bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin yara iyileşme evrelerinde aldığı görevler Tablo 2-3'te gösterilmiştir (21,42,44).

Tablo 2-3. Sitokinler ve Büyüme Faktörlerinin Rollerini

SITOKİN-BÜYÜME FAKTÖRÜ	KAYNAĞI	GÖREVLER
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)	Makrofajlar, endotel hücreleri, trombositler, düz kas hücreleri,	Makrofaj ve nötrofillerin proliferasyonu ve kemotaksisinde görev alırlar. Fibroblastların proliferasyonunda ve anjiyogeneizde yardımcı olurlar.
TGF-α (Transforme edici büyüme faktörü alfa)	Epidermal hücreler, T hücreleri ve makrofajlar	Birçok epitel hücresinin replikasyonunu uyarır, nötrofillerin aktivasyonunu ve anjiyogenezin uyarılmasını sağlar
TGF-β (Transforme edici büyüme faktörü beta)	Trombositler, T lenfositler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücreleri	Enflamasyon, anjiyogenez ve reepitelizasyonda görev alır. Kollajen sentezini uyarır.
EGF (Epidermal büyüme faktörü)	Aktive makrofajlar, tükrük bezleri, keratinosit, fibroblast	Keratinosit ve fibroblastların proliferasyonu, keratinositlerin göçü ve granülasyon dokusunun oluşumu
FGF (Fibroblast büyüme faktörü)	Makrofajlar, keratinositler, fibroblast, endotel hücreler, kondrositler ve düz kas hücreleri	Fibroblast ve keratinosit proliferasyonu, keratinositlerin göçü, anjiyogenezin uyarılması, yara kontraksiyonunu ve matris depolanmasını uyarır.
VEGF (Vasküler endotel büyüme faktörü)	Makrofajlar, endotel hücreleri, keratinositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri	Anjiyogeneizde endotel hücrelerinin çoğalmasını ve hareketini uyarır. Pıhtılaşma mekanizmasında rol alır.
TNF- α (Tümör nekrozis faktör alfa)	Makrofajlar, T ve B hücreleri	Fibroblast proliferasyonu
IL-1 (İnterlökin 1)	Aktive makrofajlar, endotel hücreleri, mast hücreleri	Lökosit bağlanmasını ve toplanmasını artırır, doku fibroblastlarını aktive ederek ekstraselüler matrisin proliferasyonuna ve yapımına yardımcı olur.

IL-6 (İnterlökin 6)	Nötrofil, makrofaj	Enflamasyon ve reepitilizasyonda görev alır.
IL-8 (İnterlökin 8)	Nötrofil, makrofaj	Nötrofil adezyonu ve göçünü uyarır.

2.5 Yara Enfeksiyonları ve *Staphylococcus aureus*

Yara ve yara enfeksiyonları sağlık sisteminin en önemli sorunlarından biridir. Özellikle kronikleşen yaraların, etkin bir biçimde yönetilmesi ve sağaltımı, morbiditenin azalmasını ve yaşam kalitesinin artırılmasını sağlar (39).

Bütün yaralar derinin mikroflorasının bir parçası olan mikroorganizmalarla kontamine olur (45). Yaraların mikrobiyal kolonizasyonu, yaranın yüzeyinde çoğalan mikroorganizmaların mevcudiyeti ile karakterize edilir, ancak konakçıdan hiçbir bağışıklık tepkisi, klinik belirti ve semptom yoktur. Aynı zamanda, yara enfeksiyonu mikroorganizmaların patojenitesine ve konağın immün cevabına bağlıdır. Ağrı, hassasiyet, ısı, eritem, ödem ve apse gibi klinik belirtilerinin varlığı enfeksiyonu belirler. Ayrıca, pozitif kültür bulguları her zaman enfeksiyon varlığının kanıtı değildir. Çünkü yarada enfeksiyon oluşturmeyen bakteri kolonileri bulunabilir. Bir yarada 1ml'de 10^5 'ten daha fazla mikroorganizma bulunmasıyla yara enfekte kabul edilir (39,46,47).

Yara enfeksiyonları çeşitli şekillerde meydana gelebilir. Enfeksiyona sebep olabilecek etkenler konakçı florastan ya da kontaminasyondan kaynaklanabilir. Bu etkenlerden biri de insanlarda doğal yaşam alanı deri ve nazofarenks olan *Stapylococcus aureus*'tur. *Stapylococcus aureus*, gram pozitif, kok şeklinde, hareketsiz, sporsuz ve katalaz pozitif bir bakteridir. Bu bakteri, postoperatif yara enfeksiyonlarında ya da travma sonrası enfeksiyonda olduğu gibi, yaranın doğrudan kontaminasyonu sonucunda da enfeksiyona sebebiyet verebilir. *Stapylococcus aureus*'un yayılması ve bakteriyemi oluşması sonucunda endokardit, akut hematojen osteomyelit, menenjit veya akciğer enfeksiyonu gelişebilir. *S. aureus*'un yumuşak doku ve kemiğe yayılması alt ekstremitte amputasyonuna sebebiyet verebilir. Bu nedenle erken tanı ve uygun yara yönetimi önem taşımaktadır. Sonuç olarak *S. aureus* toplumda önemli bir patojen olmaya devam etmekte ve hastanelerde yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır (48–51).

2.6 Yara ve Yara Enfeksiyonlarının Tedavisi

Kronik yaralar son yıllarda önemli mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Yara tedavilerinin uzun sürmesi, maliyetlerin artışına ve hastanede yatış sürelerinin uzamasına sebebiyet vermektedir. Bu durum, hastayı fiziksel ve psikososyal olarak olumsuz etkilemesinin yanında sağlık sisteminin iş yükünün artmasına da neden olur(39).

Kronik yara enfeksiyonlarının tedavisinde sistemik antimikrobiallerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Topikal antibiyotikler de önemlidir, ancak antibiyotik direncinin gelişmesi klinik kullanımlarının sınırlandırılmasına neden olur. Enfekte kronik yarası olan hastaların tedavilerinde süreci kısaltmak için en uygun ve etkili antibiyotiğin seçimi çok önemlidir. Günümüzde antibiyotik direnci, en etkili tedavinin bulunmasını zorlaştırmakta ve enfekte yara tedavisinde en zorlu sorunu temsil etmektedir(52).

Antimikrobiyal tedavilerin yanında yara tedavi süreçlerinin sağlıklı ilerlemesinde yara bakım ürünlerinin kullanılması ve destek tedavi uygulamaları oldukça önemlidir. Yaranın türüne, hastanın metabolik ve fiziki durumuna göre yara bakımı farklılık göstermektedir. Günümüzde yara bakımında esas olan yaranın doğru değerlendirilip gereksinimlerinin belirlenmesi ve yara bölgesinin nemli tutulmasıdır. Yara bakım ürünleri olarak hidrokolloidler, aljinatlar, hidrojel, transparan filmler ve köpük örtüler gibi çeşitli ürünler kullanılabilir. Kullanılan ürünlerin esas amacı yara iyileşmesine engel olan faktörlerin ortadan kaldırılarak yaranın normal fizyolojik sürecine devam etmesini sağlamaktır. Yara bakım ürünlerinin yanı sıra tedavilerde yeni ve farklı yaklaşımlarda ön plana çıkmaktadır. Bunlar; vakum yardımcı kapama (VAC) tedavisi, hiperbarik oksijen tedavisi, topikal oksijen tedavisi, larva tedavisi, lazer tedavileri, yapay deri mühendisliği ürünleri ve kök hücre tedavileri olarak örneklendirilebilir. Tüm bu tedavi yöntemleri yara iyileşmesinin farklı evrelerinde etki göstermekte ve süreçlerin düzenli ve sağlıklı ilerlemesine yardımcı olmaktadır (53,54).

2.7 Yara Tedavilerinde Probiyotikler ve *Lactobacillus plantarum*

Laktik asit bakterilerinin yem ve gıda fermentasyonunda yüzyıllardır kullanıldığı bilinmektedir. Laktik asit bakterileri sebze, meyve, balık, et ve süt

ürünlerinin fermentasyonunda kullanılmaktadır (55). Ayrıca ekmeğin yapımında kullanılan unların zenginleştirilmesinde, yiyeceklerin bozulma sürelerini ve raf ömrünü uzatmak için sıklıkla laktobasiller kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri, gram pozitif, anaerobik-aerotolerant, homofermentatif bakterilerdir (56).

Laktik asit bakterileri içerisinde bilinen en büyük genoma sahip türlerden biri *Lactobacillus plantarum* türüdür. *L. plantarum* 15-45° C arasında üreyebilen gram pozitif aerotolerant bir bakteridir. *L. plantarum* kefir, yoğurt gibi bazı süt ürünlerinin ve sebze ve meyvelerin fermentasyonu ile üretilen geleneksel bazı yiyecek ve içeceklerin üretiminde sıklıkla kullanılır (56-58).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte, probiyotiklerin konakçı ve mikroplar arasındaki etkileşimi düzenleyerek zor iyileşen yaraların tedavisinde faydalı olabileceği öngörülmektedir. Tutanma bölgelerinde patojen mikroorganizmalarla rekabet eden probiyotikler, konağın bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde aktif olarak rol oynarlar. Özellikle laktik asit üreten bakteriler, organik asitler, hidrojen peroksit, düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal maddeler, bakteriyosinler ve adhezyon inhibitörleri gibi çeşitli antimikrobiyal maddeler üretebilirler (59). Bu amaçla probiyotiklerin yara iyileşme sürecindeki terapötik etkilerine bağlı olarak, topikal veya oral uygulama, yara ve ülserlerin tedavisinde potansiyel kullanımları dikkat çekmektedir (13).

L. plantarum'un hem yara iyileşme süreçlerinde hem de enfeksiyon tedavilerinde etkili olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (60-63). Yapılan çalışmalarda *L. plantarum*'un makrofaj ve lenfositleri aktive ettiği böylece immün sistemi harekete geçirdiği ve laktik asit üretimi ile antimikrobiyal etkinlik göstererek biyofilm oluşumuna engel olduğunu bildirmektedir (13,64). Aynı zamanda *L. plantarum*'un ürettiği plantacirin ile hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğinin bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca *L. plantarum*'a ait zengin protein fraksiyonlarının yara iyileşme safhalarında sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini arttırdığını ve *S. aureus* enfeksiyonunu inhibe ettiği görülmüştür (65). Yanık yara iyileşmesine katkıda bulunduğu ve enflamatuar dönemi kısalttığı görülmüştür. Aynı zamanda *L. plantarum*'un topikal uygulanmasının, bağışıklık sistemi tepkisinin güçlendirilmesine, enflamasyonun azalmasına ve yara iyileşmesi sürecinin hızlanmasına katkıda bulunduğu belirtilmektedir (9).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, 12.06.2019 tarihli, 2019/25 numaralı Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kararı ile onaylanmıştır. Çalışma deneysel olarak Wistar albino cinsi 2- 4 aylık erkek sıçanlar (rat) üzerinde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan deney hayvanları BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Hayvanlar çalışma başlayıncaya kadar ve çalışma süresince Deney Hayvanları Uygulama Araştırma Merkezinde, 12 saat aydınlık/karanlık, nispi nemi %60-70 olan ortamda tutulmuş ve ad libitum beslenmişlerdir.

Çalışma iş akışı olarak; 1) Deney hayvanlarının temini ve grupların oluşturulması, 2) İskemik ve enfekte iskemik yara modellerinin oluşturulması, 3) *L. plantarum* ve antibiyotik tedavilerinin uygulanması, 4) Yara gözlemi ve Yara bakımı; Metrik ölçüm ve makroskopik değerlendirme 5) Mikrobiyolojik, histopatolojik ve moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi 6) İstatistiksel olarak verilerin değerlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır.

3.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada iskemik yara ve enfekte iskemik yara oluşturulan 2 ana grup bulunmaktadır. Her iki grup altında 3'er olmak üzere 6 alt grup bulunmaktadır. Çalışmada her alt grupta 18 hayvan, toplamda 108 hayvan bulunmaktadır. Çalışma grupları ve uygulanan işlemler Tablo 3-1'de açıklanmıştır.

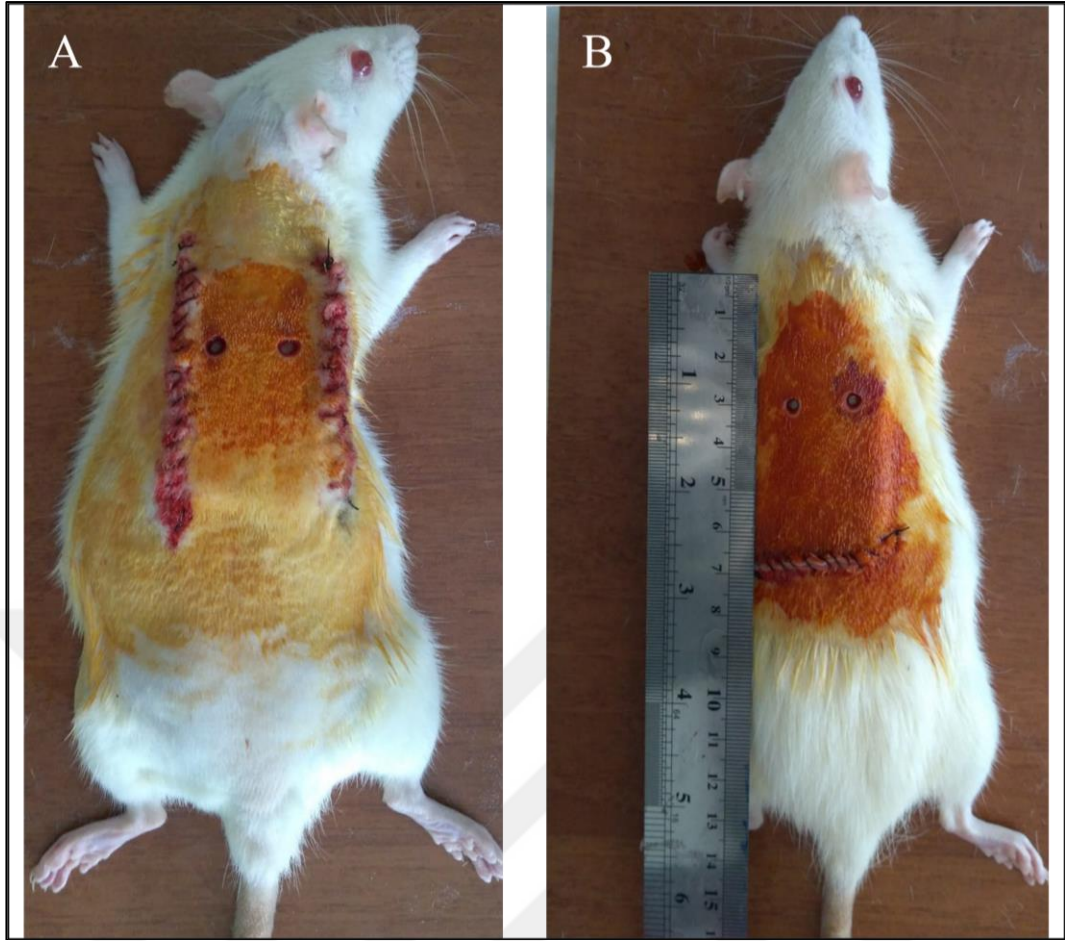
Tablo 3-1. Deney Gruplarının Oluşturulması

İSKEMİK YARA GRUBU (İ GRUBU)	ENFEKTE İSKEMİK YARA GRUBU (E GRUBU)
İ1 GRUBU; Bu gruptaki hayvanlara iskemik yara modeli uygulandıktan sonra başka bir işlem yapılmamıştır (Kontrol grubu).	E1 GRUBU; Bu gruptaki hayvanlara iskemik yara modeli uygulandıktan sonra yara bölgeleri <i>S. aureus</i> ile enfekte edilmiş ve başka işlem yapılmamıştır. (Kontrol grubu)
İ2 GRUBU; Bu gruptaki hayvanlara iskemik yara modeli uygulanmış ve 21 gün boyunca yara bölgesine <i>L. plantarum</i> lokal olarak uygulanmıştır (Deneme grubu).	E2 GRUBU; Bu gruptaki hayvanlara iskemik yara modeli uygulandıktan sonra yara bölgeleri <i>S. aureus</i> ile enfekte edilmiş ve 21 gün boyunca yara bölgesine <i>L. plantarum</i> lokal olarak uygulanmıştır (Deneme grubu)..

İ3 GRUBU; Bu gruptaki hayvanlara iskemik yara modeli uygulandıktan sonra 14 gün boyunca yara bölgesine antibiyotik tedavisi uygulanmıştır (Pozitif kontrol).	E3 GRUBU; Bu gruptaki hayvanlara iskemik yara modeli uygulandıktan sonra yara bölgeleri <i>S. aureus</i> ile enfekte edilecek ve 14 gün boyunca yara bölgesine antibiyotik tedavisi uygulanmıştır (Pozitif kontrol).
---	---

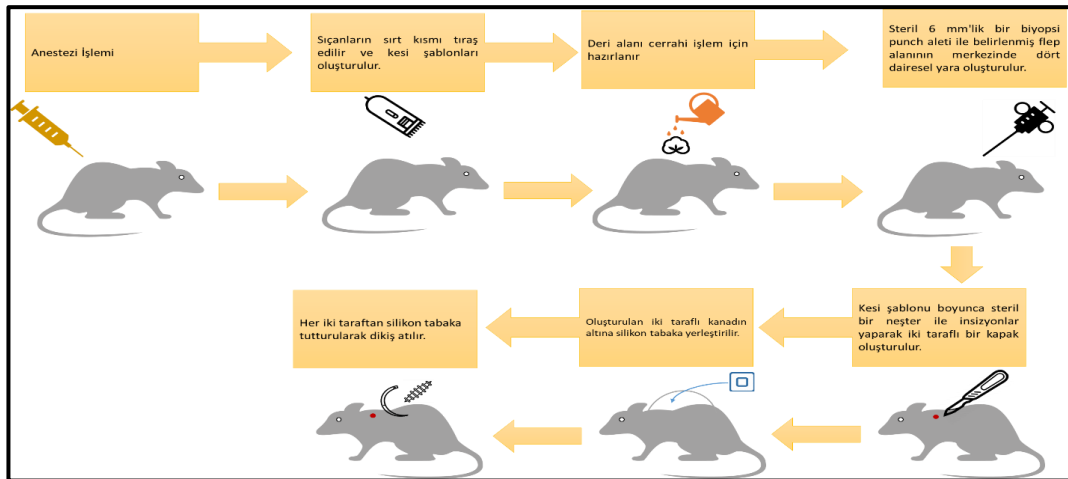
3.2 İskemik Yara ve Enfekte İskemik Yara Modelinin Oluşturulması

İskemik yara modelinin uygulanışı: Sıçanlara ketamin/ksilazin (75mg/kg; 10mg/kg) anestezi işlemi uygulanmıştır. Anestezi uygulandıktan sonra sıçanlar yüzüstü pozisyona getirilerek boyun kökünden başlayarak aşağıya doğru tıraş edilmiştir. Traşlanmış ve temizlenmiş sıçan cerrahi alana alınmıştır. Deri yüzeyi cerrahi işlem öncesi sterilize edilmiştir. Steril, tek kullanımlık 6 mm'lik bir punch aleti kullanarak, belirlenmiş flep alanının merkezinde dört dairesel “iskemik” yara bölgesi oluşturulmuştur. Alt kısımdan tek bir insizyon açılarak küt makasla yukarıya doğru deri ve bağ dokunun ayrılması sağlanmıştır. Açılan ve bağ dokusunun ayrıldığı kısma silikon tabaka yerleştirilip ve sabitlenmiş, sonrasında dikiş işlemi gerçekleştirilmiştir (66). Yapılan ön çalışma ile modelin uygulanışı literatürde belirtilen modelden farklı olarak geliştirilmiştir. Literatürde model, çift taraflı kesilerin oluşturularak, deri altına silikon yerleştirilmesiyle uygulanmaktadır. Yaptığımız ön çalışmada çift taraflı dikiş uygulanmasının zorluğu, hayvanın bu bölgelere rahatça uzanıp dikiş ve yara bölgelerine zarar verebileceği ve silikon tabanın sabitlenmesinin sıkıntı oluşturabileceği görülmüştür. Bu sebeple model modifiye edilmiştir. Literatür modeli ve modifiye edilen model fotoğraf 3-1’de gösterilmiştir.



Fotoğraf 3-1. Ratlarda İskemik Yara Modeli (A) ve Modifiye Edilmiş İskemik Yara Modeli (B)

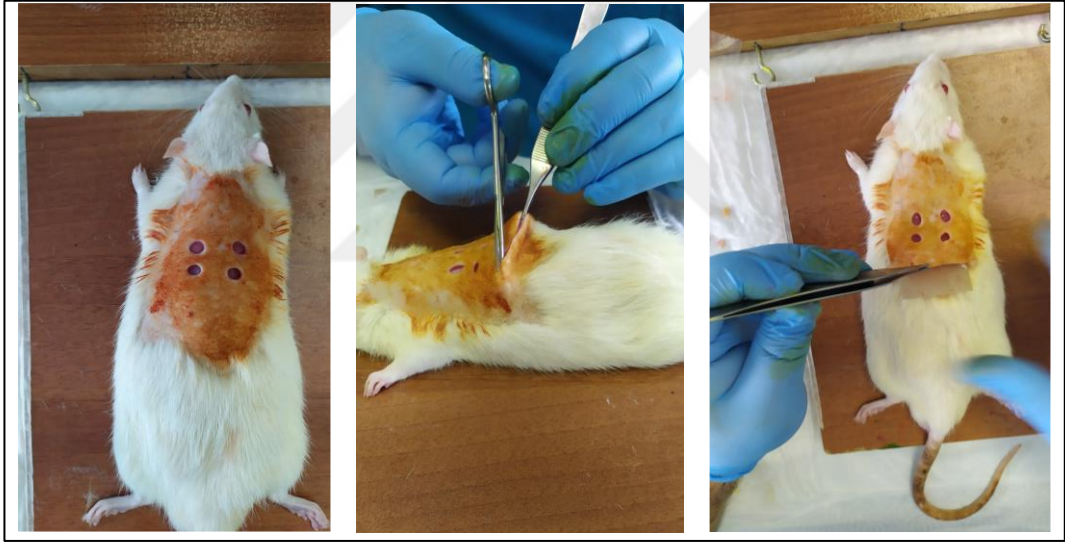
Modelin uygulanışı Şekil 3-1’de ve uygulanmış hali Fotoğraf 3-1, 3-2, 3-3 ve 3-4’te gösterilmiştir. Modelin oluşturulmasından sonra her hayvan tekli kafeslere alınarak deney ve gözlemler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-1. İskemik Yara Modelinin Oluşturulması



Fotoğraf 3-2. Yara Modeli Oluşturulan Ratların Operasyona Hazırlanması
(Traşlama, Asepsi ve Antisepsi)



Fotoğraf 3-3. Ratlarda Punch ile Yara Oluşturma ve Silikonun Yerleştirilmesi



Fotoğraf 3-4. Ratlarda Silikonun Düzeltilmesi ve Dikiş ile Sonlandırma

İskemik yaralar oluşturulduktan sonra enfeksiyon grubundaki sıçanların yara bölgelerine (enfekte iskemik yara grubuna) 1mL’de 10^6 cfu/ml *S. aureus* ATCC29213 standart suşu kullanılarak hazırlanan salin solüsyon 50 µl tek doz olarak inoküle edilmiştir (65).

3.3 *Lactobacillus plantarum*’un ve Antibiyotik Tedavisinin Uygulanması

L. plantarum standart suş olarak temin edilmiştir. Her iki gruptaki hayvanlara 10^{10} cfu/mL, *L. plantarum* (ATCC14917) serum fizyolojik içerisinde yara bölgesine 21 gün boyunca topikal olarak uygulanmıştır (67).

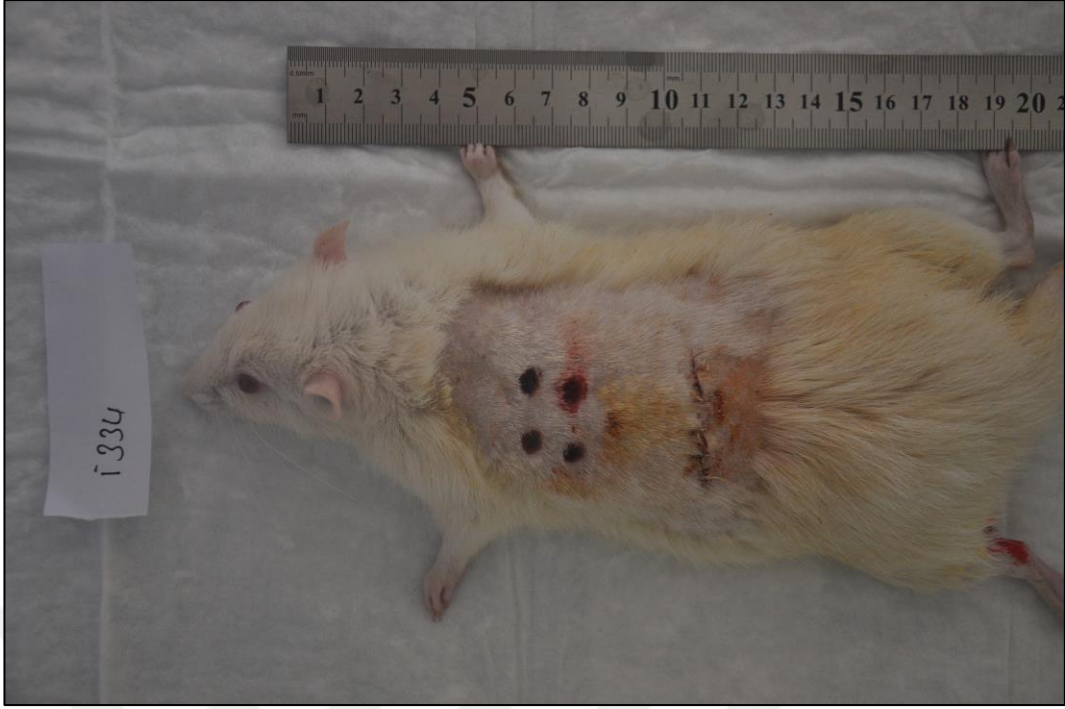
S. aureus ATCC29213 suşu ile oluşturulan yara enfeksiyonuna Gentamisin 14 gün boyunca 50mg/mL dozunda topikal olarak uygulanmıştır (68,69).



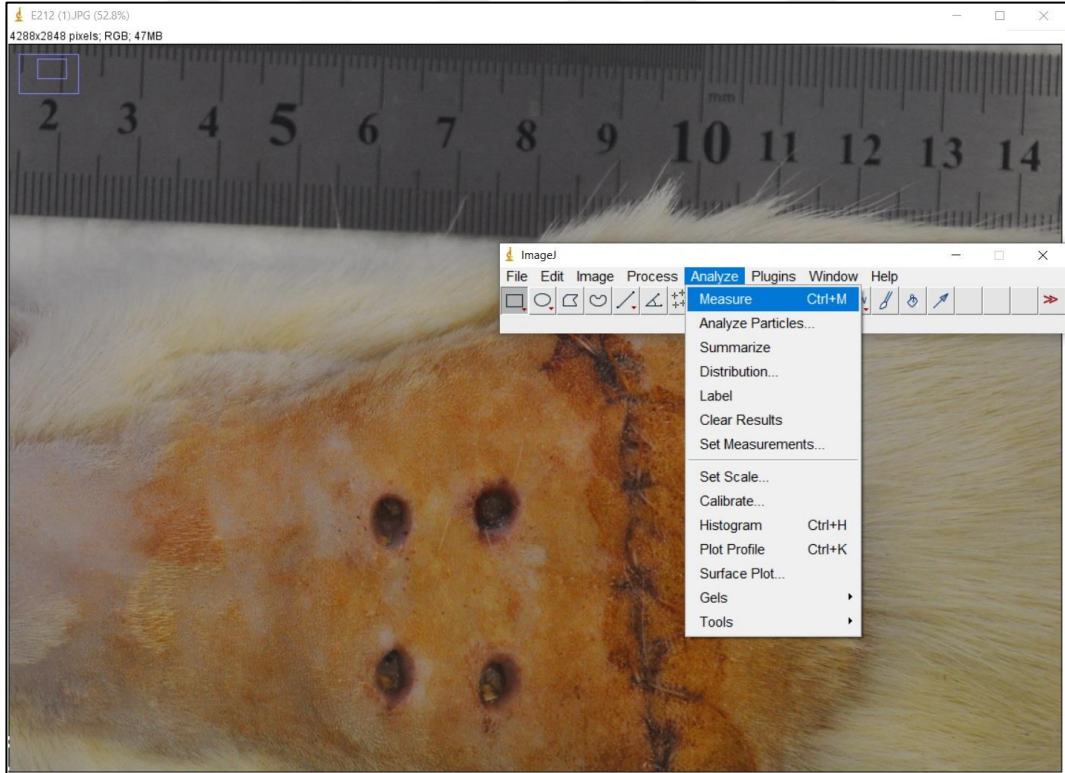
Fotoğraf 3-5. Ratlarda Yara Bölgesine *L.plantarum* ve Antibiyotik Uygulaması

3.4 Yara Gözlemi ve Yara Bakımı; Metrik Ölçüm, Makroskopik Değerlendirme

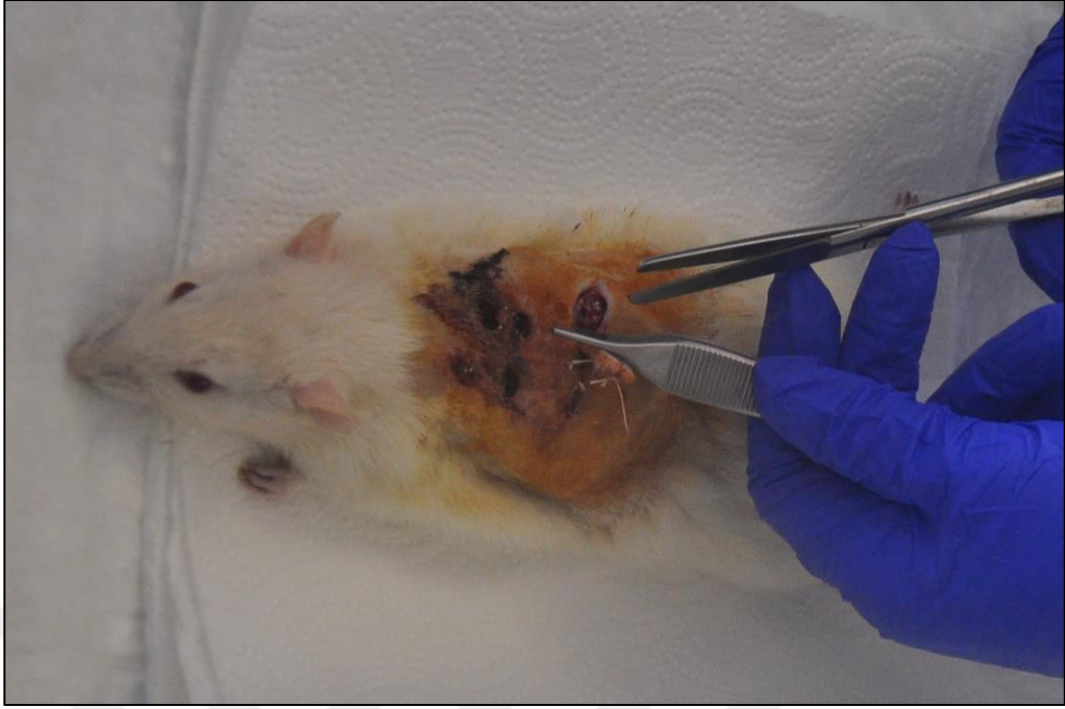
İskemik yaranın ve enfeksiyonun oluşturulmasından sonraki 1,3,5,7,14 ve 21. günlerde yara bölgesinin fotoğrafları, yara bölgelerinin büyüklüğünü belirtecek şekilde bir cetvel eşliğinde çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar image j programı kullanılarak yaraların iyileşme oranları belirlenmiştir.



Fotoğraf 3-6. Yaranın Ölçümü ve Değerlendirilmesi



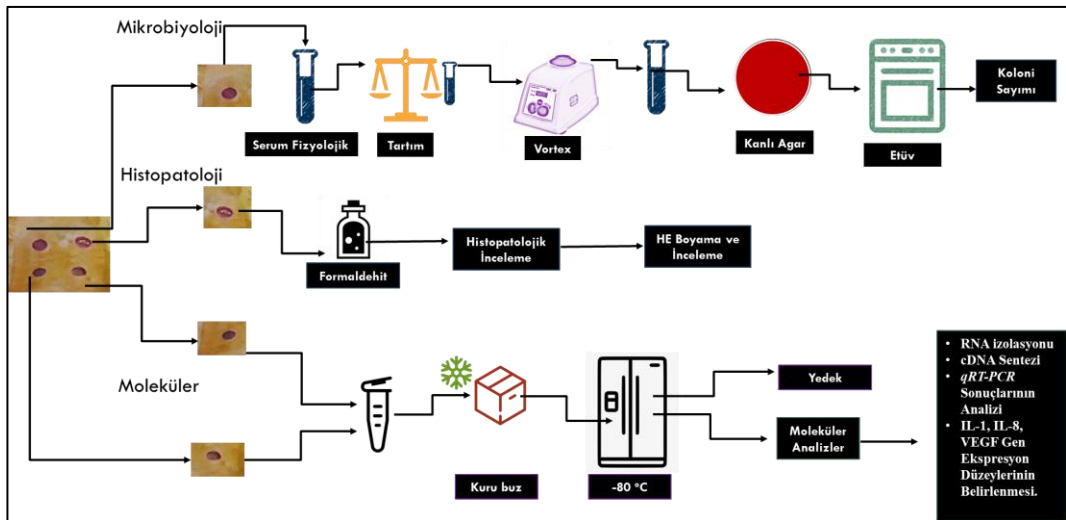
Fotoğraf 3-7. Yara Bölgelerinin İmaj J Programı ile Ölçümü



Fotoğraf 3-8. Ratlarda Yara bölgesinden Doku Alınması

3.5 Mikrobiyolojik, Histolojik ve Moleküler Analizlerin Gerçekleştirilmesi

Tüm deneme gruplarında uygulamanın 1.,3.,5.,7.,14., ve 21. günlerinde her bir gruptan 3'er hayvan yüksek doz anestezi verilmek suretiyle sakrifiye edilmiş ve yara dokuları alınarak mikrobiyolojik, histopatolojik ve moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-2. Mikrobiyolojik, Histolojik ve Moleküler Analizlerin Gerçekleştirilmesi

3.5.1 Mikrobiyolojik İncelemeler

İskemik yaralar oluşturulduktan sonra enfekte iskemik yara grubundaki sıçanların yara bölgelerine 1mL'de 10^6 cfu/ml *S. aureus* (ATCC29213) olacak şekilde hazırlanan salin solüsyon 50 µl tek doz olarak inoküle edilmiştir.

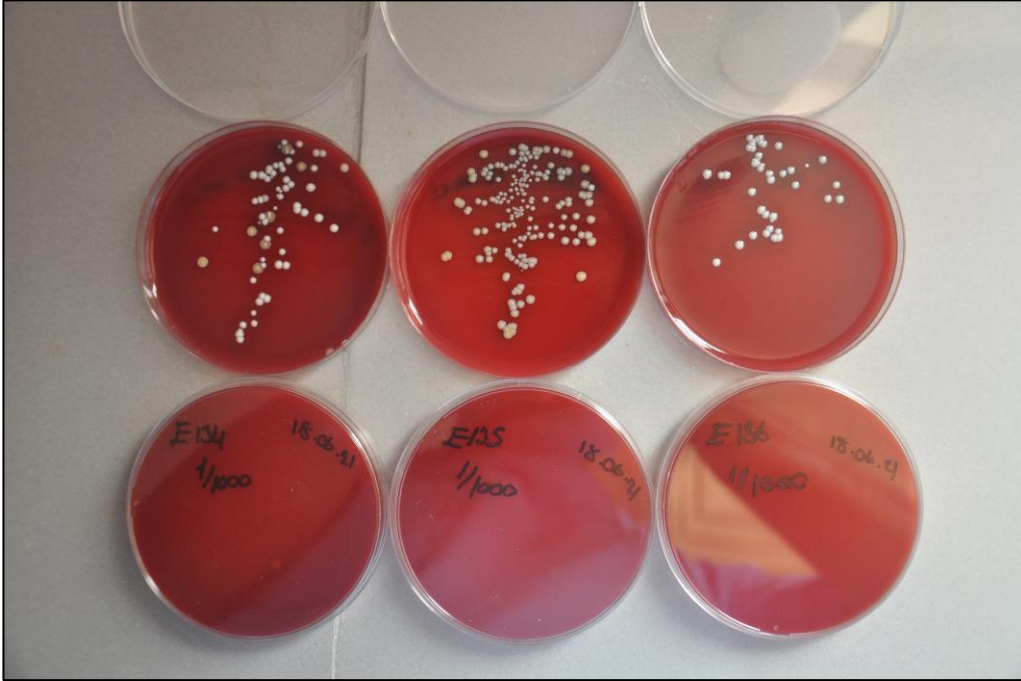
Mikrobiyolojik inceleme için 1.,3.,5.,7.,14., ve 21. günlerde her gruptan 3'er sıçan sakrifiye edilmiş ve sıçanların yara bölgesinden bistüri ile dikey olarak tüm deri tabakası kesilerek doku örnekleri alınmıştır. Doku örnekleri tartılarak steril şartlarda kıyma haline getirildikten sonra her numune 1 ml Müller Hinton Broth içerisine alınarak ve numuneler steril serum fizyolojik sıvı eklenerek 10 ml'ye tamamlanmış ve kuvvetlice vortekslenmiştir. Seri halinde 10 kat seyreltiler hazırlanarak koyun kanlı agar besiyerlerine ekim yapılarak 37°C' de 24 saat boyunca inkübe edilip, koloni sayımları gerçekleştirilmiştir.

Gram doku başına üreyen koloni sayısı (cfu/gr) = $(N \times D \times 10) / W$ (N: Plaktaki koloni sayısı, D: İnokulum sulandırım değeri, W: Örneğin ağırlığı (g)) formülüne göre hesaplanmıştır (70,71).

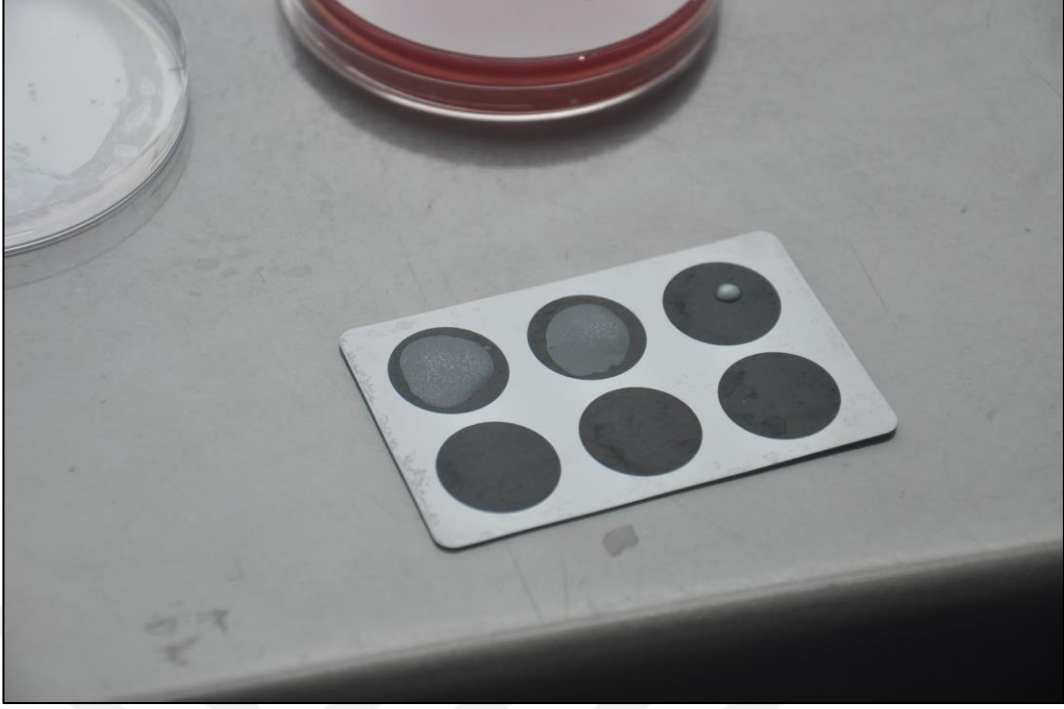
L. plantarum'un gözlemlenmesi ve değerlendirilebilmesi için 1.,3.,5.,7.,14., ve 21.günlerde doku örneklerinden mikrobiyolojik değerlendirilme yapılmıştır. Mikrobiyolojik değerlendirmenin yapılabilmesi için doku örneği aynı yöntemle hazırlanıp DE Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerine ekim yapılarak aynı şartlarda inkübe edilmiştir. Sonrasında koloni sayımı yapıp, aynı formülasyonla hesaplama gerçekleştirilmiştir.



Fotoğraf 3-9. Örneklerin Besiyerine Ekilmesi



Fotoğraf 3-10. Koloni Sayımları



Fotoğraf 3-11. Hızlı Antijen Testi (*Staphylococcus* türleri için)



Fotoğraf 3-12. *Lactobasillus plantarum* Kolonilerin Değerlendirilmesi

3.5.2 Histopatolojik İncelemeler

Çalışma kapsamında 1.,3.,5.,7.,14., ve 21. günlerde her gruptan 3'er sıçan sakrifiye edilip, elde edilen doku örnekleri %10'luk formalinli fiksasyon sıvısında 24 saat bekletilmiştir. Doku örnekleri şerit halinde kesilerek deri katmanları kesit yüzünde görünecek şekilde doku takibine alınmıştır. İçindeki suyu kaybetmiş, yapısı korunmuş doku parçaları parafin bloklara gömülerek kesit alma aşamasına hazır hale getirilmiştir. Sertleştirilmiş dokuların kesilecek yüzleri bir tarafa gelecek şekilde parafin bloklar hazırlanıp numaralandırılmıştır. Parafin donması için özel soğutucuda bekletilmiştir. Parafin bloklardan kesit alma işlemi mikrotom ile yapılmıştır. Alınan kesitler 40°C sıcaklıktaki su banyosuna alındıktan sonra burada kesitlerin su yüzeyine düzgün yayılması ile su yüzeyinden lam üzerine alınmıştır. Bloklama ve kesit aşamalarından sonra lamlar üzerindeki dokunun parafini 30 °C etüvde 30 dakika ve ksilende 60 dakika tutularak uzaklaştırılmıştır. Kurutulan lamlar boyama aşamasına alınmıştır. Boyama işlemi sonrası lamlar sentetik reçine balsam kullanılarak lamel ile kapatılmış ve 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Rutin inceleme esnasında x10 büyütmede dokunun genel taraması yapıldıktan sonra x40'luk büyütmede inceleme yapılmıştır (72).

3.5.3 Moleküler İncelemeler

Tüm çalışma gruplarında 1.,3.,5.,7.,14., ve 21. günün sonunda her gruptan 3'er hayvanın sakrifiye edilmesiyle elde edilen dokular, -80°C'de saklanmış ve dokulardan total mRNA izole edilerek, cDNA sentezi yapılmış ve kantitatif eş zamanlı PCR (qRT-PCR: Real Time PCR) ile sitokinlerin (IL-1, IL-8, VEGF) gen ekspresyonları incelenmiştir.

3.5.3.1 Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

RNA izolasyonu

Doku örnekleri alındıktan sonra sıvı azotta ezilerek homojen bir yapı haline getirilmiştir. Santrifüje edilerek toplanan hücre pelletine 1 ml Trizol (Thermo, Cat. No: 15596026) solüsyonu eklenip, pipetlenerek homojenize edilmiştir. Tüpler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 200 µl kloroform eklenip 15 saniye

hızlıca elde çalkalanmıştır. 3 dakika oda sıcaklığında bekletilen tüpler, 12.000 g ve 4°C’de 15 dakika santrifüje edilmiştir. Oluşan şeffaf renkli üst faz yeni tüpe alınıp 500 µl %100 izopropanol eklenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası, 12.000g ve 4°C’de 10 dakika santrifüje edilmiştir. Bu aşamada, örnekteki RNA tüp dibinde beyaz bir çökelti oluşturur. Bu çökeltiye dokunmamaya dikkat ederek tüpteki sıvı boşaltılmış ve RNA çökeltisi 1 ml%75 etanol ile yıkanıp, 7500g ve 4°C’de 5 dakika santrifüje edilmiştir. Elde edilen RNA, 20-50 µl DEPC-ddH₂O ile çözülüp konsantrasyonu ölçülmüştür.

cDNA Sentezi

Her bir örnek için 1 µg RNA, 2 µl oligo dT ve DEPC-ddH₂O son hacmi 8 µl olacak şekilde karıştırılıp 70°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. 10 µl 2X reaksiyon buffer ve 2 µl reverse transkriptaz enzimi eklendikten sonra, örnekler 42°C’de 1 saat ve 80°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. cDNA örnekleri -20°C’de saklanmıştır.

Kantitatif Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR)

mRNA ekspresyonu seviyesini incelemek amacıyla, her bir qRT-PCR reaksiyonuna 1 µl cDNA, 1 µl primer karışımı (10 µl, forward+reverse), 10 µl 2X SYBR Green ve 8 µl ddH₂O eklenmiştir. Reaksiyon için aşağıdaki program kullanılmıştır: 95°C 5 dk, (95°C 15 sn, 60°C 30 sn, 72°C 30 sn) x40, 72°C 5 dk.

qRT-PCR Sonuçlarının Analizi

mRNA ekspresyon seviyelerinin tespiti sırasında örnekler arası farklılıkların ve olası pipetleme hatalarının önüne geçilmesi amacıyla, B-actin gibi bir house keeping gen ile normalizasyon gerçekleştirilmiştir. $ddCt = Ct$ (hedef gen) - Ct (house keeping). Hedef gen ekspresyonu = $2^{-(ddCt)}$ formülleriyle hesaplamalar yapılmıştır. Kullanılan primerler Tablo 3-2’de verilmiştir.

Tablo 3-2. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerler

Primer	Baz Dizilimi (5’-3’)
IL-1	(forward) 5 -CACCTCTCAAGCAGAGCACAG-3 (reverse) 5 -GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC-3
IL-8	(forward) 5'-GCAAACCTAGTGTGCTATGCCTAA (reverse) 3'-AGATACCCATCGACAGGATATATTTTCT
VEGF	(forward) 5'-CCTCGTGGAAGTGGATTTCG (reverse) 3'-TATGTGGGTGGGTGTGTCTA

3.6 İstatistiksel Olarak Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirmede kullanılacak parametreler, 1,3,5,7,14 ve 21. günlerde hayvanlarda alınan dokuların analizlerin gerçekleştirilmesi sonucunda, morfolojik olarak ölçülen yara bölgesi ölçümleri, mikrobiyolojik olarak doku gram koloni sayımları, histopatolojik değerlendirmeler ve sitokin ve büyüme faktörü gen ekspresyon seviyeleri değerlendirilip, karşılaştırmalar yapılmıştır. Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



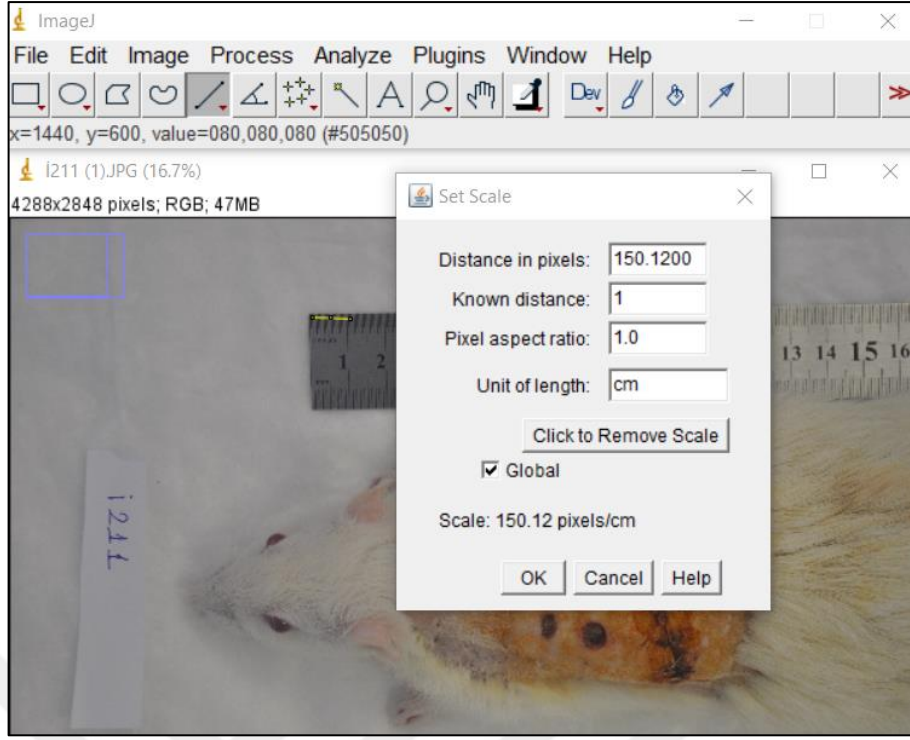
4. BULGULAR

4.1 Morfolojik Bulgular

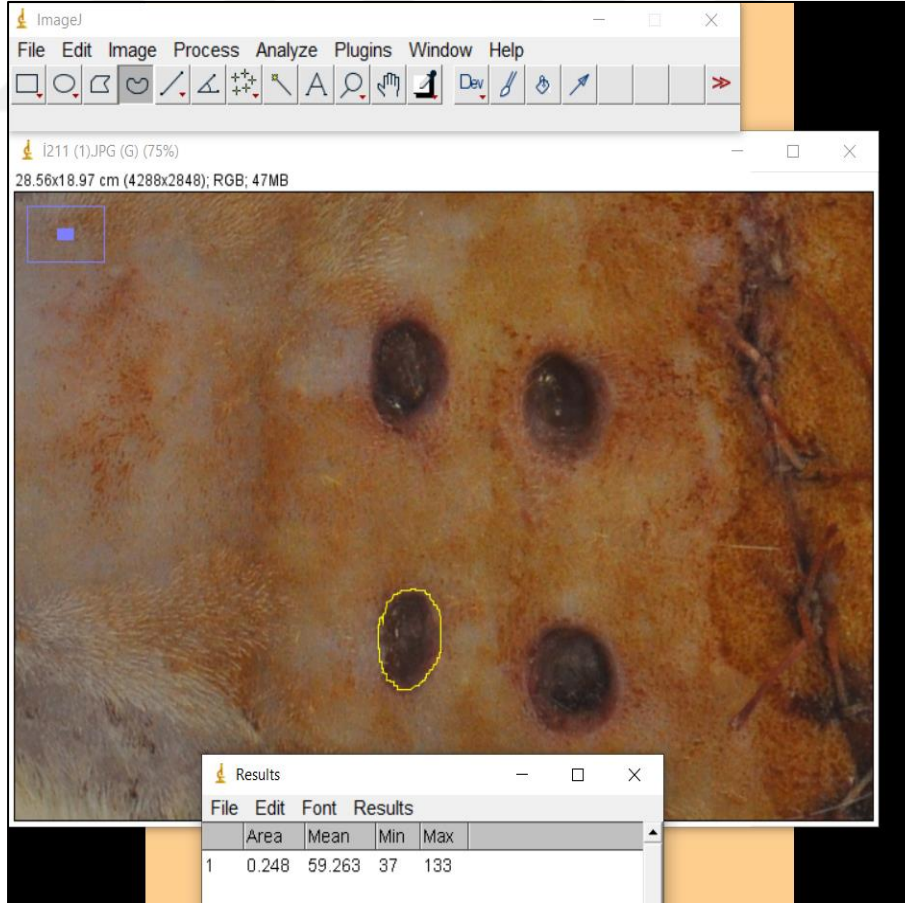
İskemik ve enfekte iskemik yara modeli oluşturulan sıçanlarda 1.,3.,5.,7.,14., ve 21. günlerde morfolojik gözlemler gerçekleştirilmiştir. Yara boyutları 1,3,5,7,14. ve 21. günlerde her gruptan 3'er hayvanın sakrifiye edilmesi ile ölçülmüştür. Yara bölgesinin fotoğrafları belirli bir yükseklikten sıçanların yara bölgelerinin yanına bir cetvel konularak çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar image j programı kullanılarak yara bölgelerinin büyüklüğü ölçülmüştür. Morfolojik değerlendirmelere ait görseller fotoğraf 4-1, 4-2, 4-3'te ve tablo 4-1'de gösterilmiştir. Ölçüm sonuçları SPSS v10 programı ile One way Anova analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler gün bazında yapılmış olup grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır. Yara bölgelerinin fotoğraflanması Şekil 4.1.1'de gösterilmiştir. Gruplara ait yara bölgelerinin ölçümleri Tablo 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7'de yer almaktadır.



Fotoğraf 4-1. Ratlarda Yara Bölgesinin Fotoğraflanması

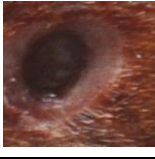
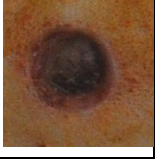
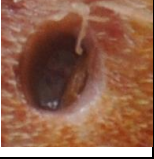













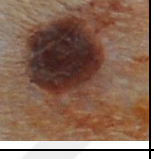






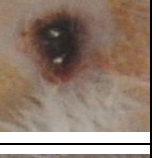
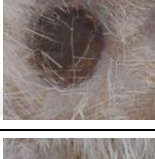

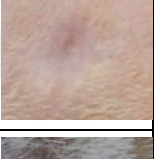



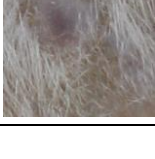







Fotoğraf 4-2. Ratlarda Yara Bölgesinin İmaj J Programı ile Ölçeklendirilmesi



Fotoğraf 4-3.Ratlarda İmaj J Programı ile Yara Boyutunun Ölçülmesi

Tablo 4-1. Günlere Göre Gruplardaki Yara İyileşmelerinin Morfolojik Görüntüsü

	İ1 Grubu	İ2 Grubu	İ3 Grubu	E1 Grubu	E2 Grubu	E3 Grubu
1.Gün						
3.Gün						
5.Gün						
7.Gün						
14.Gün						
21.Gün						

Tablo 4-2. Ratlarda Grup İ1 Yara Boyutları

Grup İ1	1.Yara Boyutu	2.Yara Boyutu	3.Yara Boyutu	4. Yara Boyutu
İ111	0,295	0,314	0,31	0,28
İ112	0,278	0,318	0,318	0,295
İ113	0,309	0,29	0,3	0,29
İ134	0,27	0,289	0,284	0,252
İ135	0,308	0,319	0,249	0,26
İ136	0,297	0,277	0,243	0,254
İ157	0,211	0,244	0,209	0,227
İ158	0,25	0,286	0,22	0,212
İ159	0,286	0,236	0,217	0,196
İ1710	0,204	0,186	0,121	0,169
İ1711	0,145	0,205	0,189	0,211
İ1712	0,118	0,205	0,177	0,181
İ11414	0,211	0,154	0,127	0,153
İ11415	0,098	0,145	0,14	0,084
İ12116	0,071	0,084	0,088	0,075
İ12117	0,066	0,076	0,077	0,079
İ12118	0,066	0,094	0,081	0,11

Tablo 4-3. Ratlarda Grup İ2 Yara Boyutları

Grup İ2	1. Yara Boyutu	2 Yara Boyutu	3 Yara Boyutu	4 Yara Boyutu
İ211	0,293	0,309	0,251	0,248
İ212	0,251	0,243	0,238	0,241
İ213	0,257	0,288	0,253	0,259
İ234	0,181	0,191	0,206	0,192
İ235	0,189	0,202	0,214	0,222
İ236	0,223	0,222	0,209	0,232
İ257	0,189	0,221	0,144	0,154
İ258	0,206	0,197	0,185	0,194
İ259	0,163	0,17	0,2	0,164
İ2710	0,094	0,115	0,13	0,137
İ2711	0,103	0,091	0,087	0,0102
İ2712	0,087	0,137	0,064	0,094
İ21413	0,062	0,048	0,068	0,071
İ21414	0,051	0,048	0,054	0,053
İ21415	0,043	0,046	0,053	0,046
İ22116	0,03	0,038	0,032	0,043
İ22117	0,034	0,028	0,046	0,045
İ22118	0,034	0,026	0,039	0,038

Tablo 4-4. Ratlarda Grup İ3 Yara Boyutları

Grup İ3	1. Yara Boyutu	2.Yara Boyutu	3. Yara Boyutu	4. Yara Boyutu
İ311	0,295	0,284	0,273	0,291
İ312	0,31	0,294	0,297	0,301
İ313	0,307	0,311	0,311	0,317
İ334	0,298	0,292	0,284	0,296
İ335	0,257	0,298	0,278	0,287
İ336	0,294	0,284	0,296	0,294
İ357	0,18	0,212	0,173	0,159
İ358	0,187	0,166	0,22	0,225
İ359	0,252	0,196	0,158	0,187
İ3710	0,211	0,175	0,151	0,156
İ3711	0,156	0,221	0,11	0,105
İ3712	0,196	0,113	0,255	0,157
İ31413	0,093	0,093	0,069	0,081
İ31414	0,101	0,074	0,125	0,1
İ31415	0,094	0,094	0,118	0,087
İ32116	0,047	0,073	0,082	0,089
İ32117	0,081	0,089	0,064	0,063
İ32118	0,064	0,058	0,065	0,05

Tablo 4-5. Ratlarda Grup E1 Yara Boyutları

Grup E1	1. Yara Boyutu	2. Yara Boyutu	3. Yara Boyutu	4. Yara Boyutu
E111	0,357	0,361	0,295	0,297
E112	0,274	0,293	0,283	0,327
E113	0,325	0,27	0,311	0,328
E134	0,225	0,246	0,243	0,221
E135	0,244	0,225	0,242	0,222
E136	0,274	0,235	0,23	0,232
E157	0,218	0,225	0,217	0,187
E158	0,216	0,243	0,212	0,183
E159	0,269	0,241	0,205	0,219
E1710	0,149	0,168	0,178	0,16
E1711	0,141	0,189	0,174	0,208
E1712	0,138	0,187	0,166	0,211
E11413	0,156	0,166	0,164	0,19
E11414	0,148	0,184	0,134	0,094
E11415	0,114	0,128	0,087	0,111
E12116	0,075	0,071	0,073	0,042
E12117	0,059	0,074	0,089	0,086
E12118	0,069	0,065	0,073	0,066

Tablo 4-6. Ratlarda Grup E2 Yara Boyutları

Grup E2	1. Yara Boyutu	2. Yara Boyutu	3. Yara Boyutu	4. Yara Boyutu
E211	0,285	0,245	0,289	0,280
E212	0,287	0,289	0,249	0,251
E213	0,305	0,303	0,279	0,287
E234	0,202	0,206	0,194	0,233
E235	0,255	0,27	0,274	0,252
E236	0,231	0,224	0,221	0,249
E257	0,197	0,218	0,187	0,176
E258	0,229	0,2	0,192	0,15
E259	0,211	0,192	0,209	0,216
E2710	0,119	0,098	0,134	0,095
E2711	0,158	0,129	0,147	0,093
E2712	0,13	0,141	0,138	0,143
E21413	0,051	0,07	0,063	0,082
E21414	0,081	0,082	0,108	0,097
E21415	0,096	0,068	0,064	0,073
E22116	0,062	0,042	0,058	0,046
E22117	0,084	0,057	0,082	0,083
E22118	0,073	0,055	0,062	0,059

Tablo 4-7. Ratlarda Grup E3 Yara Boyutları

Grup E3	1. Yara Boyutu	2. Yara Boyutu	3. Yara Boyutu	4. Yara Boyutu
E311	0,278	0,288	0,278	0,27
E312	0,288	0,268	0,313	0,274
E313	0,296	0,279	0,287	0,282
E334	0,266	0,286	0,267	0,25
E335	0,238	0,27	0,232	0,23
E336	0,28	0,264	0,274	0,288
E357	0,204	0,196	0,213	0,217
E358	0,192	0,222	0,241	0,205
E359	0,204	0,203	0,209	0,212
E3710	0,196	0,197	0,188	0,189
E3711	0,157	0,181	0,17	0,123
E3712	0,134	0,195	0,207	0,191
E31413	0,079	0,131	0,083	0,061
E31414	0,103	0,071	0,113	0,167
E32116	0,049	0,048	0,058	0,035
E32117	0,096	0,066	0,085	0,089
E32118	0,049	0,098	0,08	0,073

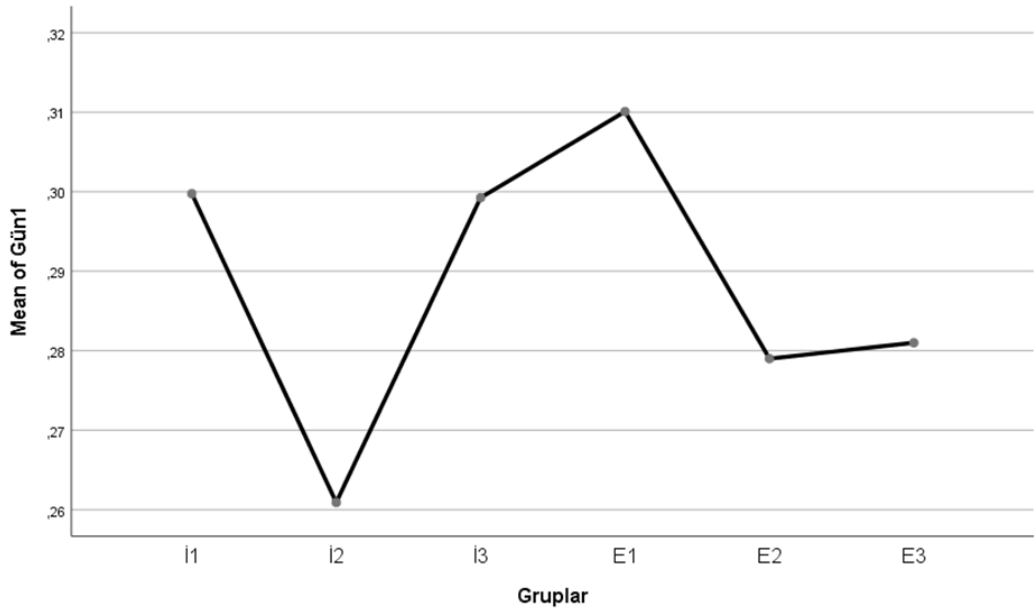
Morfolojik ölçümler sonucu elde edilen veriler SPSS v.10 programı kullanılarak One way Anova ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler grup içi ve gruplar arası analiz edilerek değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler ölçümlerin gerçekleştirildiği sakrifikasyon günleri olan 1,3,5,7,14 ve 21. günlerde gerçekleştirilmiştir.

Birinci gün ölçümlerinde iskemik yara grupları (İ1, İ2 ve İ3) değerlendirilmiştir. İ1, İ2 ve İ3 gruplarının ortalamasına bakıldığında İ2 grubunun yara boyutu ortalaması, diğer İ gruplarına oranla daha küçük olduğu görülmüştür. Gruplar arasında anlamlı farklılık vardır ($p < 0,05$). Hangi grupların anlamlı olduğunu bulmak için Post Hoc testi kullanılmıştır. Yapılan test sonucunda 1. günde İ1 ve İ3 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. İ2 ve İ1 ile İ2 ve

İ3 grupları arasında anlamlı bir fark ($p<0,05$) olduğu, İ2 grubunun diğer İ gruplarından daha küçük yara boyutuna sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4-1).

Birinci günde enfekte iskemik yara grupları (E1, E2 ve E3) değerlendirilmiştir. E2 grubunun yara boyutu ortalaması diğer gruplara göre daha küçüktü. E2 ile E3 grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Bununla birlikte E2 ve E3 gruplarının yara boyutları E1 grubundan daha küçük ve anlamlı olarak farklıydı (Şekil 4-1).

Birinci günde gruplar arası karşılaştırmada İ2 grubunun yara boyutunun E2 ve E3 gruplarından daha küçük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte İ2 grubu E2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha küçük yara boyutuna sahipti. Ayrıca İ1 grubu, E1 grubundan daha küçük yara boyutuna sahiptir fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-1).



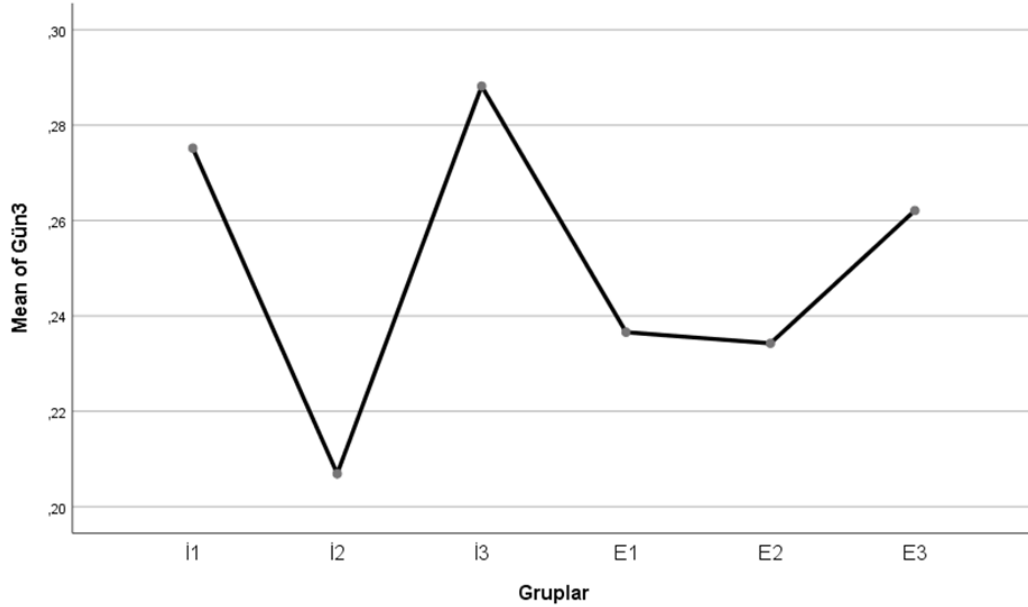
Şekil 4-1. Tüm Grupların 1. Gün Yara Boyutları Grafiği

Üçüncü gün İ grupları arasındaki değerlendirmelere bakıldığında İ2 grubunun yara boyutu İ1 ve İ3 gruplardan daha küçük ve anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür. İ1 ve İ3 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4-2).

Üçüncü gün E grupları arasındaki farklara bakıldığında E1 ve E2 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte E3 grubunun

yara boyutunun E1 ve E2 gruplarından daha büyük ve istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı (Şekil 4-2).

Üçüncü gün İ ve E grupları arasındaki farka bakıldığında ise İ1 grubunun yara boyutunun E1 ve E2 gruplarından anlamlı derecede daha büyük olduğu görülmüştür. İ2 grubunun yara boyutu ise E gruplarının hepsinden anlamlı derecede daha küçüktür (Şekil 4-2).

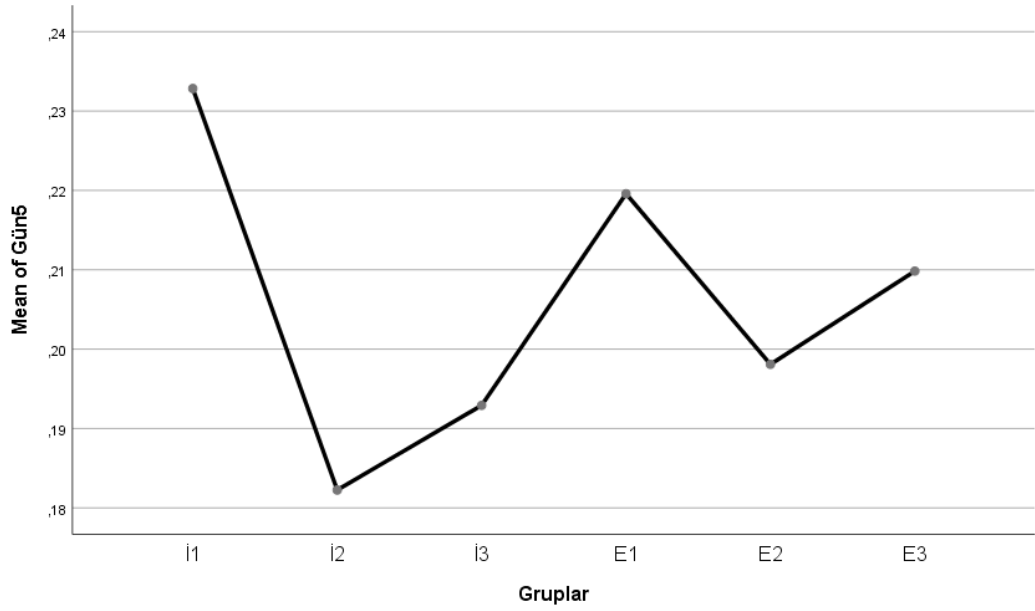


Şekil 4-2. Tüm Grupların 3. Gün Yara Boyutları Grafiği

Beşinci gün İ grupları arasındaki değerlendirmelere bakıldığında İ1 grubunun yara boyutunun İ2 ve İ3 gruplarından daha büyük olduğu görülmüştür. İ2 grubunun yara boyutları İ1 ve İ3 gruplarından daha küçüktü (Şekil 4-3).

Beşinci gün E grupları arasındaki değerlendirmede E2 grubunun en küçük ve E1 in en büyük yara boyutuna sahip olduğu görülmüştür. Fakat gruplar arası anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4-3).

Beşinci günde E ve İ grupları arasındaki değerlendirmelerde E2 grubunun yara boyutunun İ2 grubundan yara boyutundan büyük olduğu fakat bu farkın anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4-3).

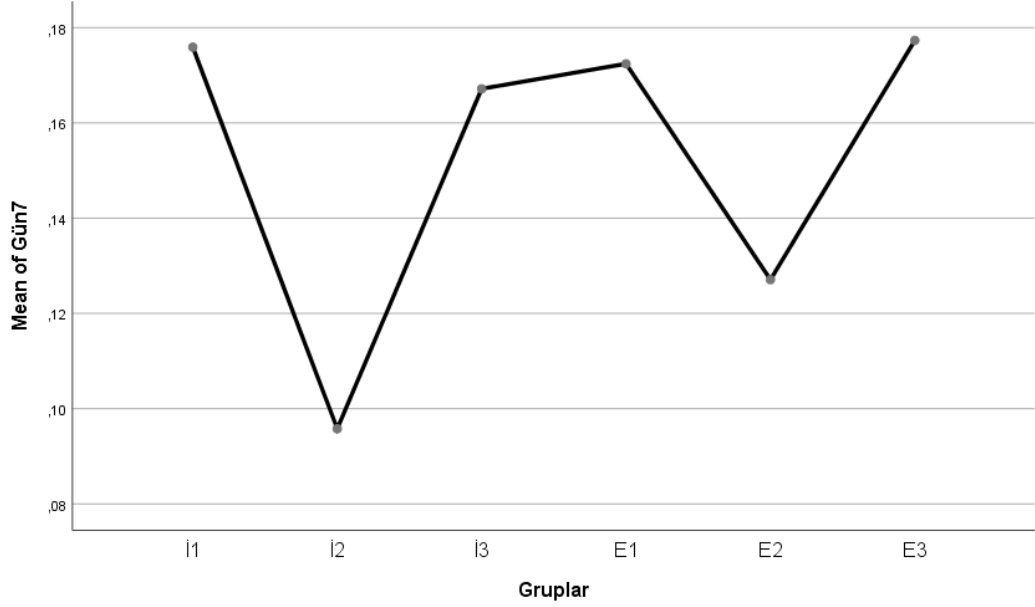


Şekil 4-3. TümGrupların 5. Gün Yara Boyutları Grafiği

Yedinci gün İ grupları arasındaki değerlendirmelerde İ2 grubunun yara boyutunun İ1 ve İ3 gruplarından daha küçük olduğu görülmüştür. İ3 grubunun yara boyutunun İ1 grubundan daha küçük olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4-4).

Yedinci gün E grupları arasındaki değerlendirmelerde ise E2 grubunun yara boyutunun en küçük olduğu ve E1 ve E3 gruplarından anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür. E1 ve E3 gruplarının arasında ise anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4-4).

Yedinci gün E ve İ grupları arasındaki karşılaştırmada ise İ2 grubunun yara boyutunun E1 ve E3 gruplarından anlamlı derecede daha küçük yara boyutuna sahip olduğu görülmüştür. İ2 grubunun yara boyutunun E2'den daha küçüktü fakat gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. E2 grubunun yara boyutunun İ1 grubundan anlamlı derecede daha küçüktü (Şekil 4-4).

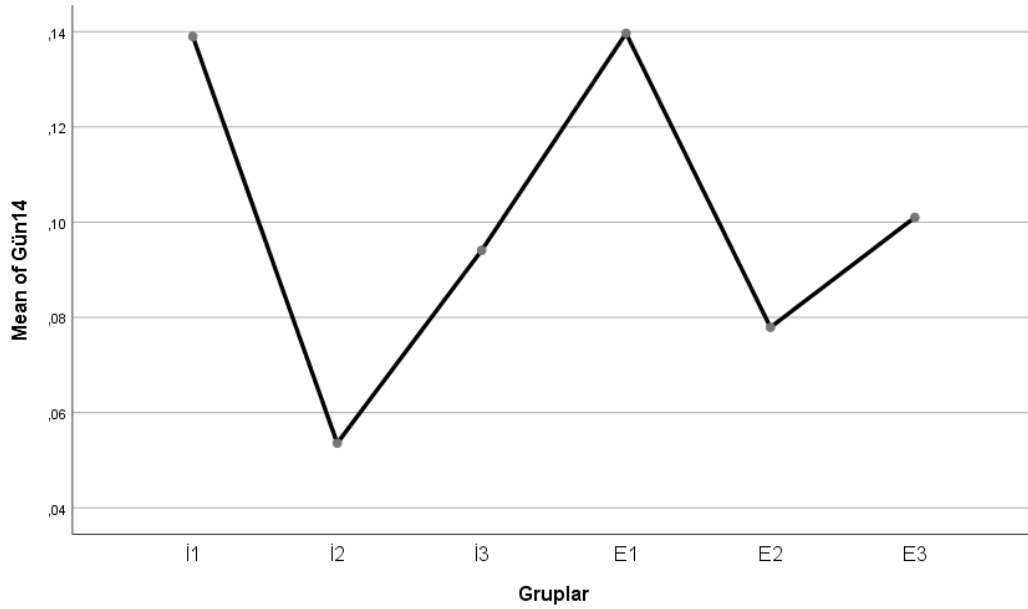


Şekil 4-4. Tüm Grupların 7. Gün Yara Boyutları Grafiği

14. gün İ grupları arasındaki değerlendirmelerde İ2 grubunun yara boyutunun İ1 ve İ3 gruplarından daha küçük olduğu ve aradaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4-5).

E grupları arasındaki değerlendirmelere bakıldığında ise E2 grubunun yara boyutu E1 ve E3 gruplarından daha küçüktü. E2 ile E1 arasındaki fark anlamlı iken, E2 ve E3 arasındaki fark anlamlı değildi (Şekil 4-5).

İ ve E grupları arasındaki değerlendirmelerde İ2 grubunun yara boyutunun E1 ve E3 gruplarından anlamlı derecede daha küçük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte İ2 grubunun yara boyutunun E2 grubundan daha küçük olmasına rağmen aradaki fark anlamlı değildi. E1 grubunun yara boyutu ise İ1 grubundan daha büyüktür fakat gruplar arası anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4-5).

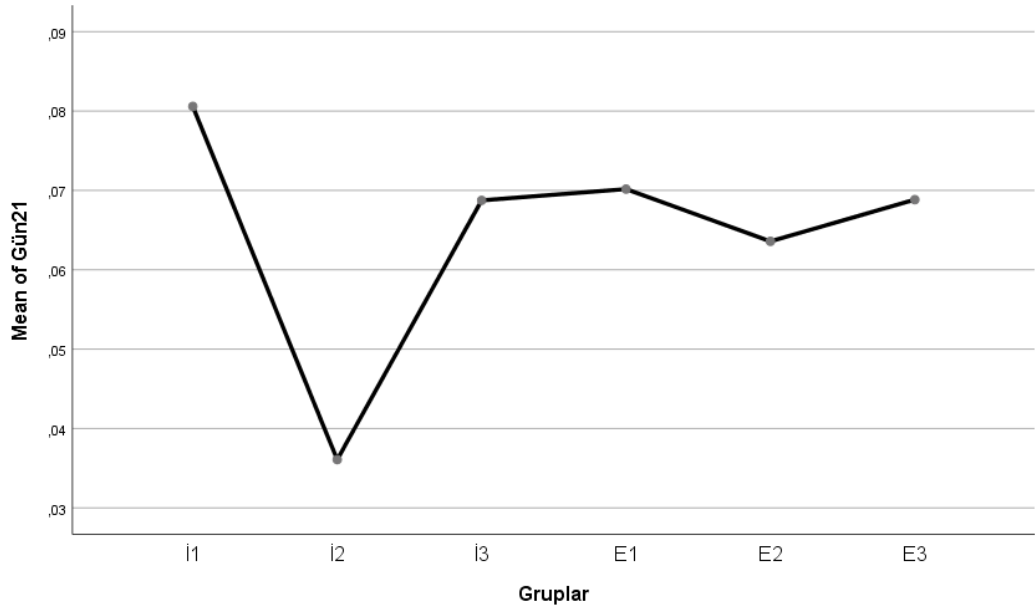


Şekil 4-5. Tüm Grupların 14. Gün Yara Boyutları Grafiği

21. gün İ grupları arasındaki değerlendirmelere bakıldığında İ2 grubunun yara boyutunun İ1 ve İ3 gruplarından anlamlı derecede daha küçük yara boyutuna sahip olduğu görülmektedir. İ3 grubunun yara boyutunun İ1 grubundan daha küçük olduğu fakat aradaki fark anlamlı değildi (Şekil 4-6).

21. gün E grupları arasındaki değerlendirmelerde ise E2 grubunun yara boyutunun E1 ve E3 gruplarından daha küçük olduğu görülmekle beraber aradaki fark anlamlı değildi (Şekil 4-6).

İ ve E grupları arasındaki değerlendirmelere bakıldığında İ2 grubunun yara boyutu tüm E gruplarından anlamlı derecede daha küçüktü. E2 grubunun yara boyutu ise İ1 grubundan anlamlı derecede daha küçüktü (Şekil 4-6).



Şekil 4-6. Tüm Grupların 21. Gün Yara Boyutları Grafiği

4.2 Mikrobiyolojik Bulgular

Mikrobiyolojik inceleme için 1.,3.,5.,7.,14., ve 21.günlerde her gruptan 3'er sıçan sakrifiye edilerek doku örnekleri alınmıştır. Gram doku başına üreyen koloni sayıları literatürde belirtilen formüle göre hesaplandı (71). Doku gramı başına düşen koloni sayısı (cfu/gr) = $(N \times D \times 10) / W$ (N: Plaktaki koloni sayısı, D: İnokulum sulandırım değeri, W: Örneğin ağırlığı (gr)) (70). Hesaplamaların yanı sıra enfeksiyon oluşturulan gruplarda hayvanların yara bölgesinin şişmesi ve yarada akıntı oluşması gibi semptomlarda gözlenmiştir. Enfekte iskemik yara grubuna ait örnek fotoğraf 4-4'te gösterilmiştir.

Gruplara ait koloni sayıları tablo 4-8, 4-9, 4-10, 4-11 ve 4-12'de gösterilmiştir. Hesaplamalar sonunda çıkan sonuçlar istatistiksel olarak One way Anova ile analiz edildi.

Tablo 4-8. Ratlarda Grup E1 *S.aureus* Koloni Sayıları

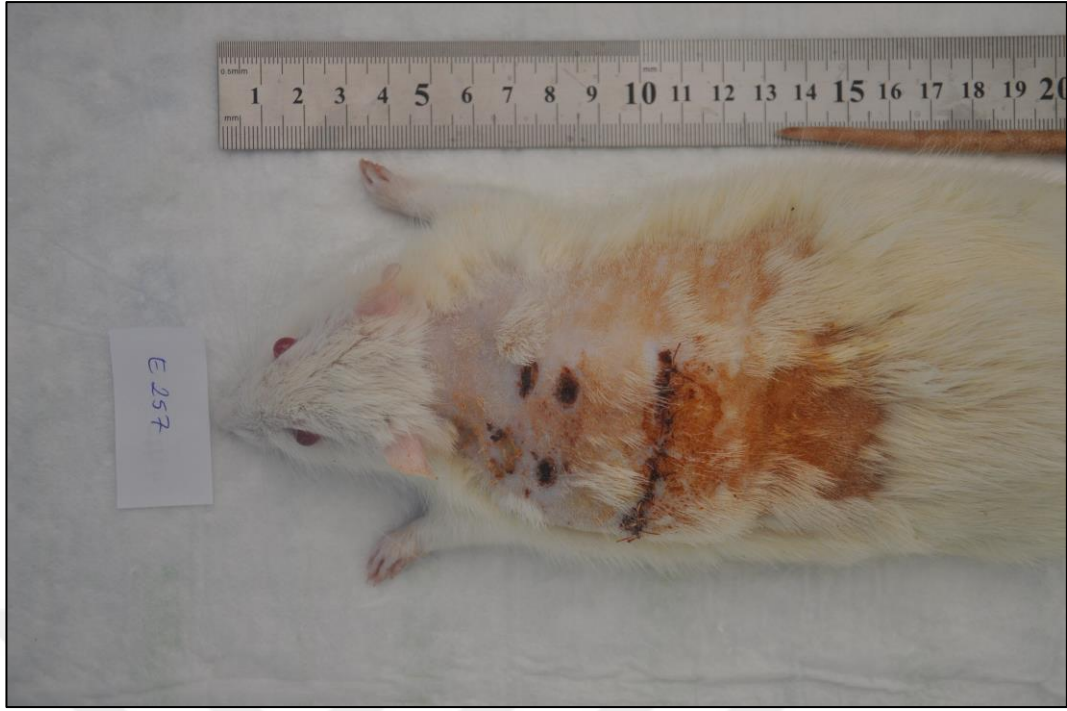
Örnek No	Doku Ağırlığı	<i>S. aureus</i> Koloni Sayısı	Hesaplama
E111	0,2914	8	27453,67193
E113	0,4391	750	1708039,171
E134	0,733	8	10914,05184
E135	0,432	183	423611,1111
E136	0,3035	800	2635914,333
E157	0,4629	62000	133938215,6
E158	0,5178	16	30899,96138
E159	0,4467	4	8954,55563
E1710	1,3779	16	11611,87314
E1711	0,1528	190	1243455,497
E1712	0,5955	670	1125104,954
E11413	0,2422	90	371593,7242
E11414	0,3817	3	7859,575583
E11415	0,5244	6	11441,6476
E12116	0,3458	0	0
E12117	0,1521	0	0
E12118	0,4826	0	0

Tablo 4-9. Ratlarda Grup E2 *S.aureus* Koloni Sayıları

Örnek No	Doku Ağırlığı	<i>S. aureus</i> Koloni Sayısı	Hesaplama
E211	0,5809	1	1721,46669
E212	0,7712	2	2593,360996
E213	0,5717	260	454783,9776
E234	0,3925	5	12738,8535
E235	0,4376	5	11425,95978
E236	0,3892	5	12846,86536
E257	0,5357	13	24267,3138
E258	0,3263	21	64357,9528
E259	0,4287	5	11663,16772
E2710	0,3672	0	0
E2711	0,3455	700	2026049,204
E2712	0,4878	16	32800,328
E21413	0,3981	0	0
E21414	0,3768	45	119426,7516
E21415	0,3222	9	27932,96089
E22116	0,3229	0	0
E22117	0,325	6	18461,53846
E22118	0,2023	8	39545,22986

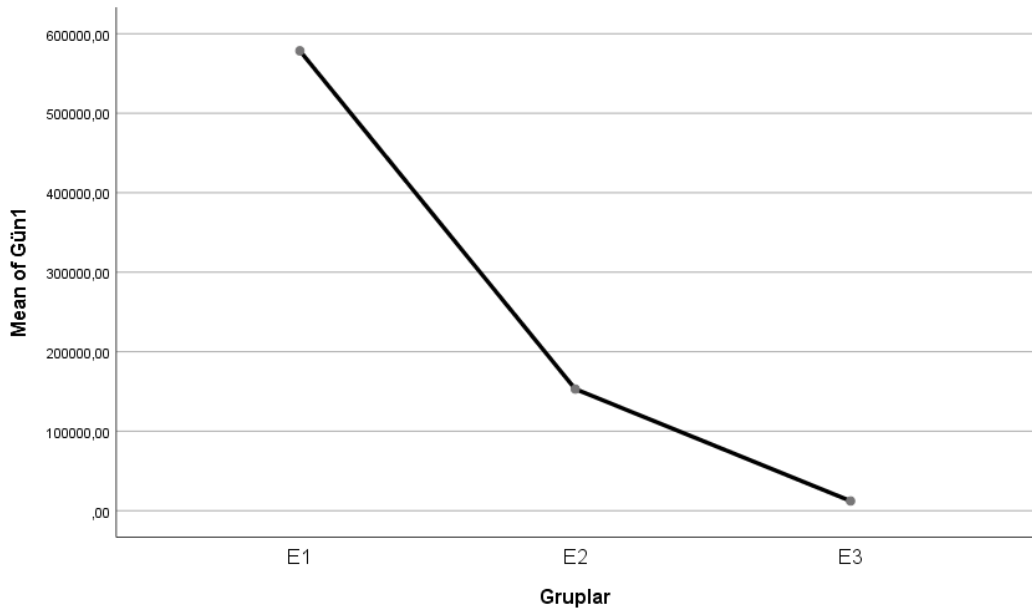
Tablo 4-10. Ratlarda Grup E3 *S.aureus* Koloni Sayıları

Örnek No	Doku Ağırlığı	<i>S. aureus</i> Koloni Sayısı	Hesaplama
E311	0,6007	0	0
E312	0,5198	19	36552,5202
E313	0,4388	0	0
E334	0,3635	0	0
E335	0,3217	0	0
E336	0,3919	0	0
E357	0,3355	0	0
E358	0,3398	0	0
E359	0,4341	0	0
E3710	0,3742	1	2672,367718
E3711	0,572	0	0
E3712	0,1742	0	0
E31413	0,4116	0	0
E31414	0,2741	7	25538,12477
E31415	0,731	0	0
E32116	0,3334	0	0
E32117	0,1831	0	0
E32118	0,4826	0	0



Fotoğraf 4-4. Enfekte İskemik Yara Grubu Örneği

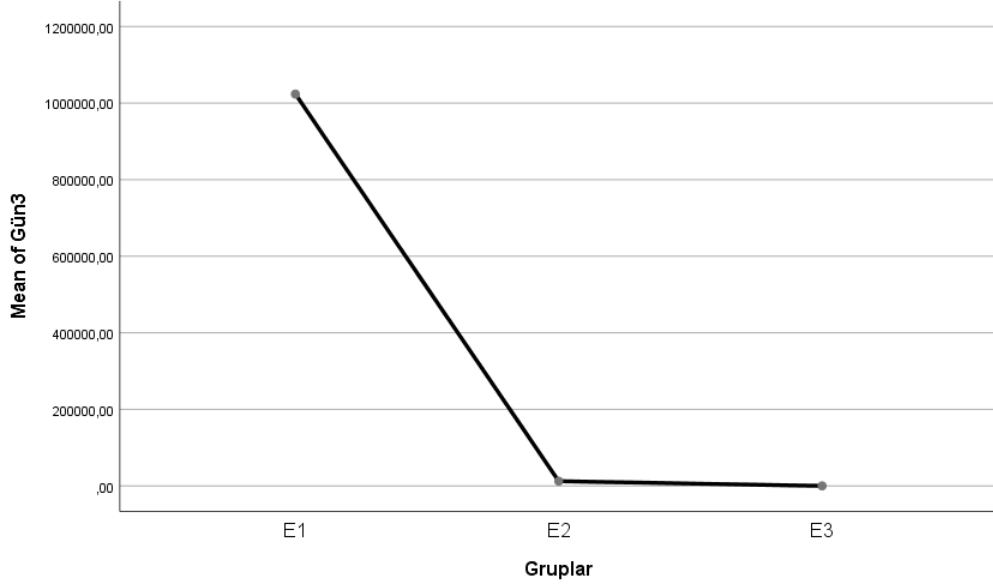
Birinci günde enfekte iskemik yara grupları (E1, E2 ve E3) değerlendirildi. E1 grubunun *S. aureus* koloni sayısı E2 ve E3 gruplarından daha fazladır. E3 grubu ise en az koloni sayısına sahiptir (Şekil 4-7).



Şekil 4-7. Enfekte İskemik Yara Grupları 1. Gün *S.aureus* Koloni Sayısı

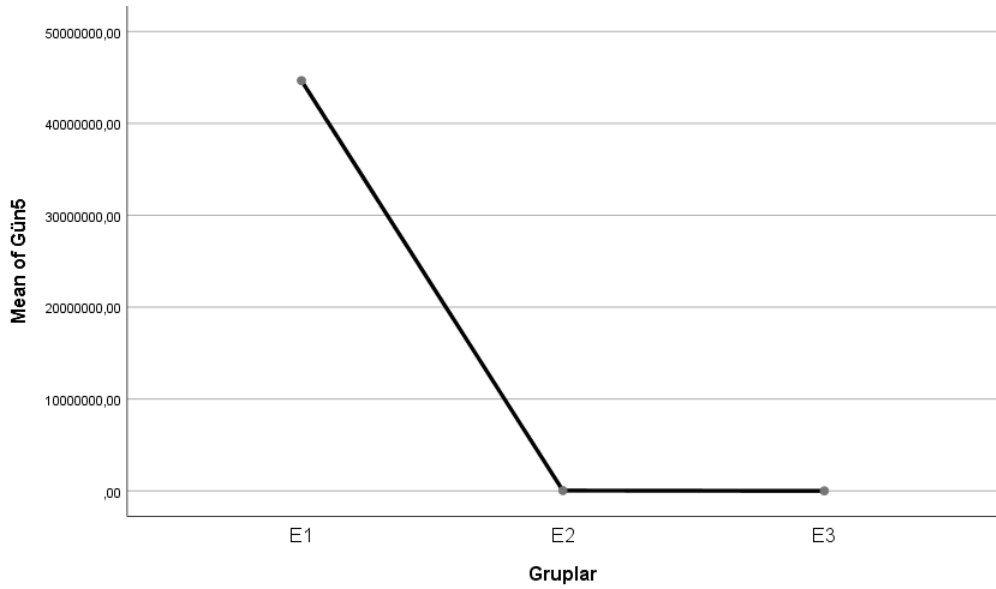
Üçüncü günde E1 grubunun *S. aureus* koloni sayısı E2 ve E3 gruplarından

daha fazladır. E2 grubunun koloni sayısı E3 grubundan fazladır. E3 grubu en az koloni sayısına sahiptir. Üçüncü gün sonunda özellikle E1 grubu hayvanlarında yara bölgelerinin çok daha şişkin ve akıntılı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4-8).



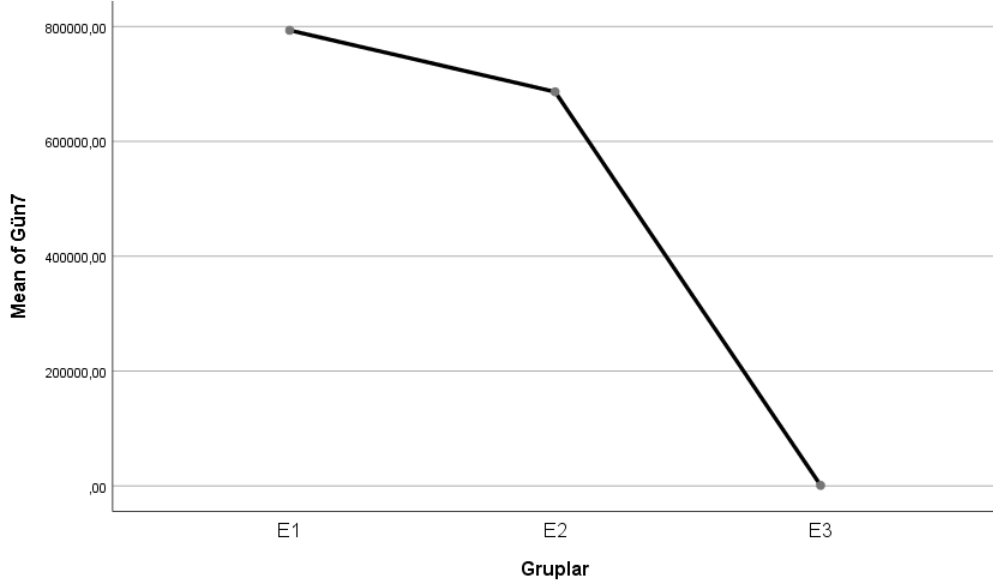
Şekil 4-8. Enfekte İskemik Yara Grupları 3. Gün *S.aureus* Koloni Sayısı

Beşinci gün değerlendirmelerine bakıldığında E1 grubunun *S. aureus* koloni sayısı E2 ve E3 gruplarından daha fazladır. E2 grubunun koloni sayısı E3 grubundan fazladır. E3 grubu en az koloni sayısına sahiptir (Şekil 4-9).



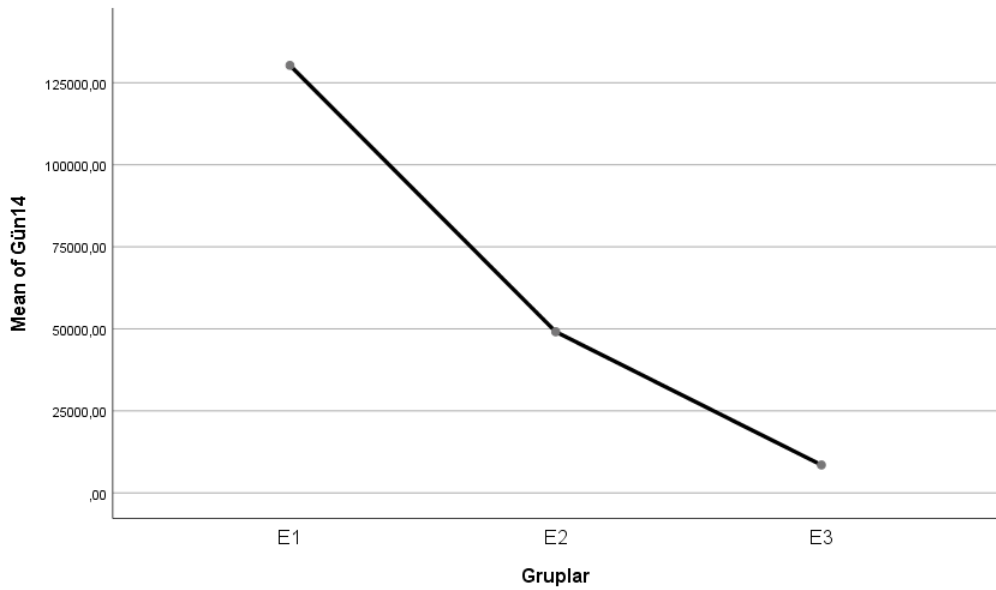
Şekil 4-9. Enfekte İskemik Yara Grupları 5. Gün *S.aureus* Koloni Sayısı

Yedinci günde E1 grubunun *S. aureus* koloni sayısı E2 ve E3 gruplarından daha fazla olduğu görülmüştür. E2 grubunun koloni sayısı E3 grubundan fazladır. E3 grubu en az koloni sayısına sahiptir (Şekil 4-10).



Şekil 4-10. Enfekte İskemik Yara Grupları 7. Gün *S.aureus* Koloni Sayısı

On dördüncü gün E1 grubunun *S. aureus* koloni sayısı E2 ve E3 gruplarından daha fazladır. E2 grubunun koloni sayısı E3 grubundan fazladır. E3 grubu en az koloni sayısına sahiptir (Şekil 4-11).



Şekil 4-11. Enfekte İskemik Yara Grupları 14. Gün *S.aureus* Koloni Sayısı

21. günde yalnızca E2 grubunda mikroorganizmaya rastlanmıştır.

L. plantarum uygulanan İ2 ve E2 grupları arasında günler bazında değerlendirmeler yapılmıştır. İki grup arasında *L. plantarum* koloni sayısı karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. *L. plantarum*'a ait koloni sayıları ve hesaplamalar aşağıdaki tablolarda yer almaktadır.

Tablo 4-11. Ratlarda İ2 Grubu *L. plantarum* Koloni Sayıları

Örnek No	Doku Ağırlığı	<i>L. plantarum</i> Koloni Sayısı	Hesaplama
İ211	0,4452	93	208894,8787
İ212	0,4237	76	179372,1973
İ213	0,6031	160	265295,9708
İ234	0,3925	67	170700,6369
İ235	0,4376	300	685557,5868
İ236	0,3892	400	1027749,229
İ257	0,3663	12	32760,03276
İ258	0,2349	6	25542,78416
İ259	0,5278	4	7578,628268
İ2710	0,4863	100	205634,3821
İ2711	0,2738	2	7304,601899
İ2712	0,4525	1	2209,944751
İ21413	0,462	10	21645,02165
İ21414	0,3353	2	5964,807635
İ21415	0,3231	1	3095,017023
İ22116	0,3728	0	0
İ22117	0,2676	0	0
İ22118	0,2664	0	0

Tablo 4-12. Ratlarda E2 Grubu *L. plantarum* Koloni Sayıları

Örnek No	Doku Ağırlığı	<i>L. plantarum</i> Koloni Sayısı	Hesaplama
E211	0,5809	300	516440,0069
E212	0,7712	84	108921,1618
E213	0,5717	600	1049501,487
E234	0,3925	500	1273885,35
E235	0,4376	600	1371115,174
E236	0,3892	300	770811,9219
E257	0,5357	70	130670,1512
E258	0,3263	3	9193,993258
E259	0,4287	8	18661,06835
E2710	0,3672	1	2723,311547
E2711	0,3455	100	289435,6006
E2712	0,4878	200	410004,1
E21413	0,3981	0	0
E21414	0,3768	1	2653,927813
E21415	0,3222	0	0
E22116	0,3229	0	0
E22117	0,325	0	0
E22118	0,2023	0	0

Birinci gün değerlendirilmesinde İ2 grubunun *L. plantarum* koloni sayısı E2 grubundan daha azdır. Üçüncü günde İ2 grubunun *L. plantarum* koloni sayısı E2 grubundan daha azdır. Beşinci günde İ2 grubunun *L. plantarum* koloni sayısı E2 grubundan daha azdır. Yedinci güne bakıldığında yine İ2 grubunun *L. plantarum* koloni sayısı E2 grubundan daha azdır. 14. günde İ2 grubunun *L. plantarum* koloni sayısı E2 grubundan daha fazla olduğu görülmüştür. Son olarak 21. gün değerlendirmesinde her iki grupta da *L. plantarum* varlığına rastlanmamıştır.

4.3 Histopatolojik Bulgular

İskemik ve enfekte iskemik yara modeli oluşturulan sıçanlarda 1.,3.,5.,7.,14., ve 21. günlerde her gruptan 3'er sıçan kurbanı edilerek, elde edilen

doku örnekleri %10'luk formalinli fiksasyon sıvısında 24 saat bekletilmiştir. Doku takibine alınan örnekler parafin bloklara gömülerek kesit alma aşamasına hazır hale getirilmiş ve inceleme aşamasına hazırlanmıştır. Rutin inceleme esnasında x10 büyütmede dokunun genel taraması yapıldıktan sonra x40'lık büyütmede inceleme yapılmıştır. İncelemeler gün bazında yapılarak tablolar oluşturulmuştur. Tablo 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17, 4-18'de değerlendirmeler gösterilmiştir. (Derecelendirme: +++ şiddetli, ++ orta, + zayıf, - yok).

Tablo 4-13. Ratlarda 1. Gün Değerlendirmeleri

Örnek	Enflamasyon			Proliferasyon			Remodelling		
	Şiddeti	Yaygınlık	Ödem	Re-epitelizasyon	Anjiogenezis	Granülasyon	Fibrozis	Kollajen	Deri ekleri
İ111	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
İ112	+	+	-	-	-	-	-	-	-
İ113	+	++	-	-	-	-	-	-	-
E111	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E112	++	++	+	-	-	-	-	-	-
E113	++	+	+	-	-	-	-	-	-
İ211	+	+	+	-	-	-	-	-	-
İ212	+	++	-	-	-	-	-	-	-
İ213	+	+	-	-	-	-	-	-	-
İ311	+	++	-	-	-	-	-	-	-
İ312	++	++	+	-	-	-	-	-	-
İ313	++	++	+	-	-	-	-	-	-
E311	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E312	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E313	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E211	+	++	-	-	-	-	-	-	-
E212	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E213	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4-14. Ratlarda 3. Gün Değerlendirmeleri

Örnek	Enflamasyon			Proliferasyon			Remodeling		
	Şiddeti	Yaygınlık	Ödem	Re-epitelizasyon	Anjiogenezis	Granülasyon	Fibrozis	Kollajen	Deri ekleri
i134	+	+	-	-	-	-	-	-	-
İ135	+	+	-	+	-	-	-	-	-
İ136	+	++	-	+	+	+	-	-	-
E134	++	++	+	-	-	-	-	-	-
E135	++	++	-	+	+	-	-	-	-
E136	+	++	-	+	-	-	-	-	-
İ234	++	++	++	+	+	-	-	-	-
İ235	+	+	++	++	+	+	-	-	-
İ236	+	+	+++	++	-	-	-	-	-
E234	++	+	+	++	-	-	-	-	-
E235	+	++	+	+++	+	-	-	-	-
E236	+	+	-	-	-	-	-	-	-
İ334	+	+	+	-	-	-	-	-	-
İ335	+	+	-	-	-	-	-	-	-
İ336	+	++	+	+	+	-	-	-	-
E334	+	++	-	+	+	-	-	-	-
E335	+	+	-	+	+	-	-	-	-
E336	++	++	++	-	-	-	-	-	-

Tablo 4-15. Ratlarda 5. Gün Değerlendirmeleri

Örnek	Enflamasyon			Proliferasyon			Remodelling		
	Şiddeti	Yaygınlık	Ödem	Re-epitelizasyon	Anjiogenezis	Granülasyon	Fibrozis	Kollajen	Deri ekleri
İ157	+	++	-	++	++	++	+	-	-
İ158	+	+	+	+	-	+	-	-	-
İ159	+	-	-	+	+	+	+	-	-
E157	++	+	++	+	-	-	-	-	-
E158	+	-	-	++	++	+	-	-	-
E159	-	-	-	++	+++	+++	+	-	-
İ257	+	-	-	++	+	++	++	-	-
İ258	+	-	-	++	++	++	++	-	-
İ259	+	++	+	++	+++	+++	++	-	-
E257	++	++	-	++	++	++	++	-	-
E258	-	+	-	++	+++	+++	+	-	-
E259	+	++	+	++	+++	+++	+	-	-
İ357	+	+	+	+	++	+	+	-	-
İ358	+	+	+	+	++	+++	+	-	-
İ359	-	-	+	++	+++	+++	+	-	-
E357	+	+	++	++	+	+	+	-	-
E358	-	-	+	+++	+++	+++	+	-	-
E359	++	++	++	+	++	++	+	-	-

Tablo 4-16. Ratlarda 7. Gün Değerlendirmeleri

Örnek	Enflamasyon			Proliferasyon			Remodelling		
	Şiddeti	Yaygınlık	Ödem	Re-epitelizasyon	Anjiogenezis	Granülasyon	Fibrozis	Kollajen	Deri ekleri
İ1710	-	-	-	+++	++	+	++	+	-
İ1711	+	+	+	++	++	++	+	-	-
İ1712	+	-	-	+	+++	++	++	+	-
E1710	+	+	-	+++	++	++	++	+	+
E1711	-	-	+	+++	++	++	++	+	+
E1712	+	-	-	++	++	+++	++	+	-
İ2710	-	-	-	++	+	+	+++	+	+
İ2711	+	-	-	++	+++	+++	++	+	-
İ2712	+	-	-	++	+++	+++	++	++	-
E2710	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-
E2711	-	-	+	+++	++	++	+++	+	-
E2712	-	-	+	+++	+	+	+++	+	-
İ3710	+	-	+	++	+	+	++	+	+
İ3711	+	+	+	+++	++	++	+++	+	-
İ3712	-	-	-	++	+++	+++	+++	+	-
E3710	+	+	++	++	+++	+++	++	-	-
E3711	+	+	+	++	+++	+++	+++	-	-
E3712	++	+	++	++	++	++	++	-	-

Tablo 4-17. Ratlarda 14. Gün Değerlendirmeleri

Örnek	Enflamasyon			Proliferasyon			Remodeling		
	Şiddeti	Yaygınlık	Ödem	Re-epitelizasyon	Anjiogenezis	Granülasyon	Fibrozis	Kollajen	Deri ekleri
İ11413	+++	++	-	++	+++	+++	++	++	-
İ11414	+	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
İ11415	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
E11413	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
E11414	-	-	-	+++	+++	+	+++	+++	++
E11415	-	-	-	+++	+++	+	+++	++	++
İ21413	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
İ21414	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
İ21415	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E21413	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E21414	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+
E21415	+	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
İ31413	+	-	-	++	+++	+++	+++	++	-
İ31414	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
İ31415	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E31413	+	-	-	+++	-	-	+++	+++	+
E31414	+	+	-	+++	+	+	+++	+++	+
E31415	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++

Tablo 4-18. Ratlarda 21. Gün Değerlendirmeleri

Sıra No	Enflamasyon			Proliferasyon			Remodelling		
	Şiddeti	Yaygınlık	Ödem	Re-epitelizasyon	Anjiyogenezis	Granülasyon	Fibrozis	Kollajen	Deri ekleri
İ12116	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+
İ12117	-	-	-	+++	-	-	+++	++	+++
İ12118	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E12116	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E12117	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E12118	-	-	-	+++	-	-	+++	++	+++
İ22116	-	-	-	+++	-	-	+++	++	++
İ22117	-	-	-	+++	-	-	+++	++	+++
İ22118	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E22116	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+
E22117	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E22118	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	++
İ32116	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
İ32117	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	++
İ32118	-	-	-	+++	-	-	+++	++	+
E32116	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	++
E32117	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
E32118	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++

Histopatolojik değerlendirme enflamasyon, proliferasyon ve remodelling olmak üzere 3 ana evre üzerinden skorlandı. Bulgular Kruskal Wallis ve Mann Whitney U analizleri ile değerlendirildi. Yapılan analizlerde proliferasyon evresinde anjiyogenez ve granülasyonda, remodelling evresinde fibrozis ve kollajen değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. Enflamasyon evresinin değerlendirme sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bununla birlikte enflamasyon evresi şiddet, yaygınlık ve ödem ölçütlerine göre değerlendirilmiş, yapılan değerlendirmelerde 7. günden sonra İ2 ve E2 gruplarında yaygınlığın (enflamasyonun yara yeri dışına taşma derecesi) görülmediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda İ2 grubunda 7. günden sonra ödem varlığı görülmemiştir. Proliferasyon evresinde anjiyogenez değerlendirmesinde 14. günde istatistiksel olarak anlamlı

farklılıklar bulunmaktadır. Anjiyogenez varlığına 14. günde E2 ve İ2 gruplarında rastlanmamıştır. Granülasyon değerlendirmesinde de 14. günde istatistiksel olarak farklılık göstermiş ve bu farklılık İ2 ve E2 gruplarından kaynaklanmıştır. İ2 ve E2 gruplarında 14. günde granülasyon görülmemiştir. Remodelling evresinin değerlendirilmesinde fibrozis ve kollajen varlığı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Fibrozis değerlendirmesinde 5. günde İ2 grubu anlamlı olarak diğer gruplardan daha yoğun ve farklıdır. Kollajen varlığının değerlendirilmesinde 7. günde anlamlı bir farklılık görülmüştür. Bu farklılık E3 grubunun kollajen varlığının olmamasından kaynaklanmaktadır.

4.4 Moleküler Bulgular

Gen Ekspresyonlarının belirlenmesi sırasıyla; RNA izolasyonu, cDNA sentezi, kantitatif eş zamanlı PCR (qRT-PCR) ve qRT-PCR sonuçlarının analizi aşamaları ile gerçekleştirilmiştir.

4.4.1 RNA İzolasyonu

Tüm gruplarda 1.,3.,5.,7.,14., ve 21. günün sonunda her gruptan 3'er hayvanın sakrifiye edilerek elde edilen doku örnekleri -80C'de muhafaza edilmiştir. Doku örnekleri alındıktan sonra sıvı azotta ezilerek homojen bir yapı haline getirilmiştir. RNA izolasyonu gerçekleştirilerek saflık ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Tablo 4-19, 4-20, 4-21, 4-22, 4-23 ve 4-24'te ölçümler verilmiştir.

Tablo 4-19. İ1 Grubu RNA Konsantrasyonları

Örnek No	260/280 (Saflık)	RNA Konsantrasyonu (ng/ µl)
i111	1,9	258,5
i112	1,93	328,8
i113	1,96	573,8
i134	1,91	159,5
i135	1,91	159
i136	1,95	900,5

i157	2,01	5370,8
i158	2,03	704,9
i159	1,99	689,7
i1710	2,04	1144
i1711	2	561,6
i1712	1,96	239,3
i11414	1,97	378,5
i11415	1,95	469,6
i12118	2,01	743,8

Tablo 4-20. İ2 Grubu RNA Konsantrasyonları

Örnek No	260/280 (Safılık)	RNA Konsantrasyonu (ng/ µl)
i211	1,92	193,6
i212	2	1074,9
i213	2,01	2356,2
i234	1,99	2390,6
i235	2,05	1975,3
i236	1,99	1514,1
i257	2,04	3458,9
i258	2,02	1552,3
i259	2,06	3357
i2710	2	456
i2711	1,99	1177,3
i2712	2,01	1037,1
i21413	1,99	1077,1
i21414	1,93	1554
i21415	1,97	965,3
İ22116	1,98	432,6
İ22118	2,01	804,1

Tablo 4-21. İ3 Grubu RNA Konsantrasyonları

Örnek No	260/280(Saflık)	RNA Konsantrasyonu (ng/ µl)
İ311	1,83	186,6
İ312	1,95	231,3
İ313	1,91	335,1
İ334	2	649,9
İ335	1,95	909,8
İ336	2,02	1966,6
İ357	1,95	320,3
İ358	2	1109
İ359	2,02	1397,4
İ3710	1,95	522,7
İ3711	2	804,1
İ3712	2,02	2197,4
İ31413	1,98	667,7
İ31414	1,99	654,4
İ32116	2,02	1962,3

Tablo 4-22. E1 Grubu RNA Konsantrasyonları

Örnek No	260/280 (Saflık)	RNA Konsantrasyonu (ng/ µl)
E111	1,92	233,3
E112	2,01	1231,3
E134	2,01	1608,2
E135	2,02	1926,3
E136	2,01	3287,9
E157	2	3225,1
E158	1,96	741,1
E1710	1,93	180,5
E1711	2,02	785,6
E1712	2,04	2214,8

E11413	2,02	3882,9
E11414	1,94	898,6
E11415	2,03	2077,6
E12116	2,05	4430,5
E12117	2,02	2644,1
E12118	1,99	771,1

Tablo 4-23. E2 Grubu RNA Konsantrasyonları

Örnek No	260/280(Saflık)	RNA Konsantrasyonu (ng/ µl)
E211	2,01	3200,7
E212	1,99	764,3
E213	2,03	1010,7
E234	2,04	1621,8
E235	2,03	2195,4
E236	2,03	2371,1
E257	2,05	3424,4
E258	1,98	1853,6
E259	2,02	1772,3
E2710	2,02	1679,1
E2711	1,92	459,8
E2712	2,02	3172,2
E21413	2	1094,1
E21414	2,03	5200,5
E22117	1,97	637,2
E22118	1,95	654,4

Tablo 4-24. E3 Grubu RNA Konsantrasyonları

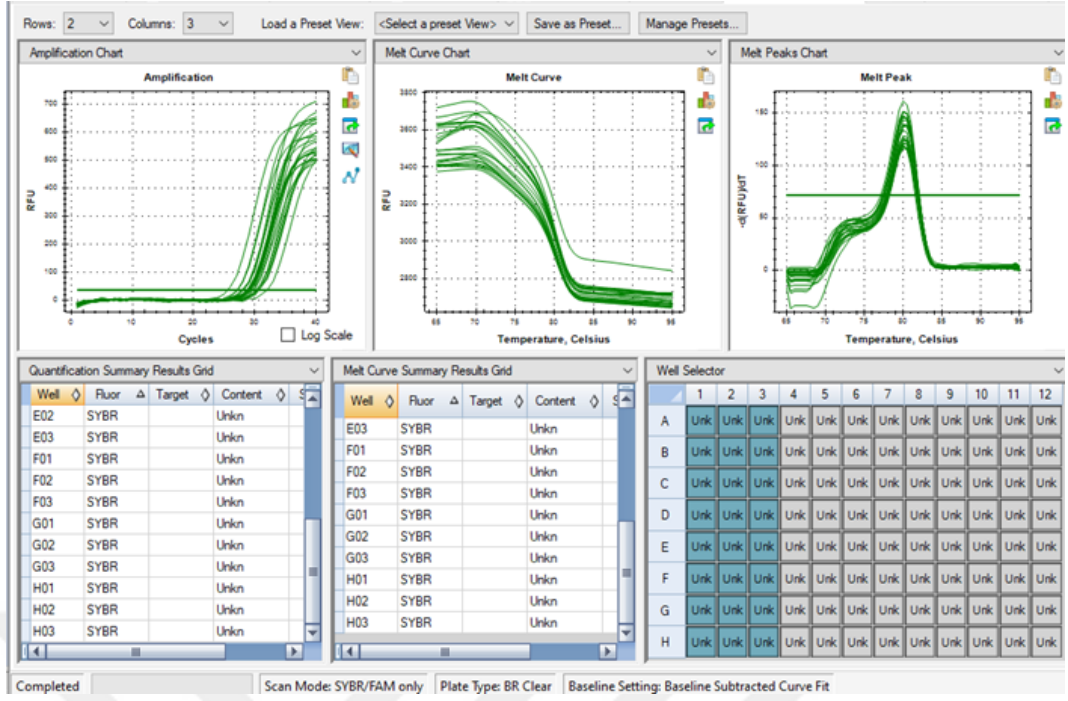
Örnek No	260/280 (Safılık)	RNA Konsantrasyonu (ng/ µl)
E311	2,01	1762,3
E312	2,02	1691
E313	2,01	1050,8
E334	2,01	1042,6
E335	1,97	912,2
E336	2,02	2391,8
E357	2,01	1579,1
E358	2,03	3955
E359	2,01	1703,2
E3712	2,02	1767,9
E31413	2,04	2133,2
E31414	1,99	7548,3
E32116	1,88	125,7
E32118	1,99	791,1

4.4.2 cDNA Sentezi

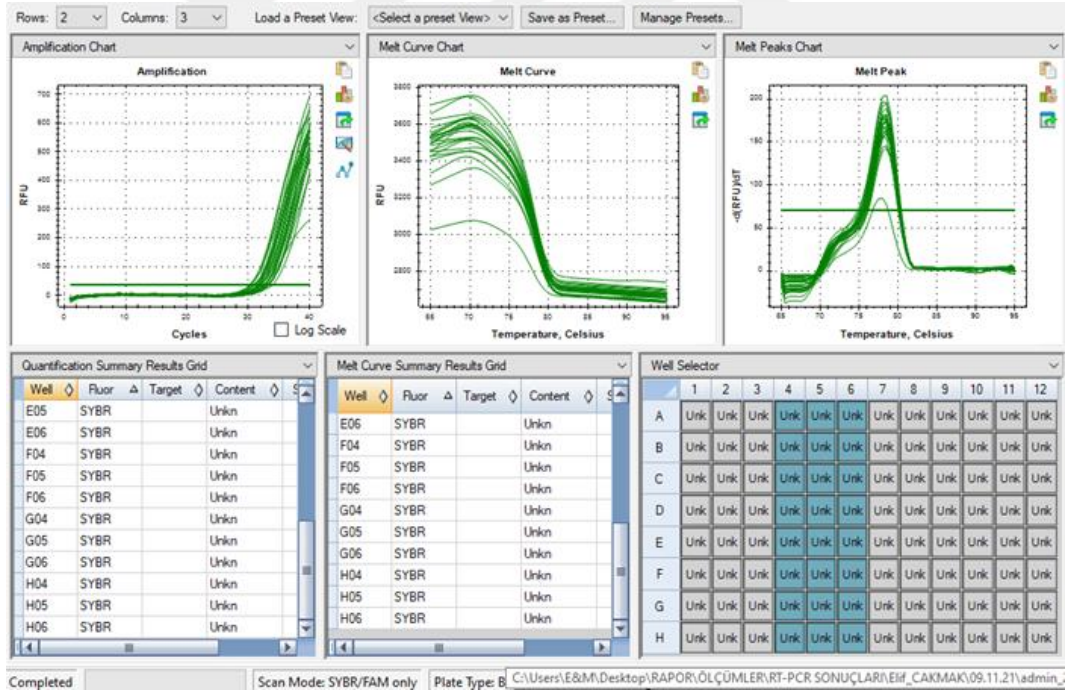
Her bir örnek için 1 µg RNA, 2 µl oligo dT ve DEPC-ddH₂O son hacmi 8 µl olacak şekilde karıştırılıp ve 70°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. 10 µl 2X reaksiyon buffer ve 2 µl reverse transkriptaz enzimi eklendikten sonra, örnekler 42°C'de 1 saat ve 80°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. cDNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

4.4.3 Kantitatif Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR)

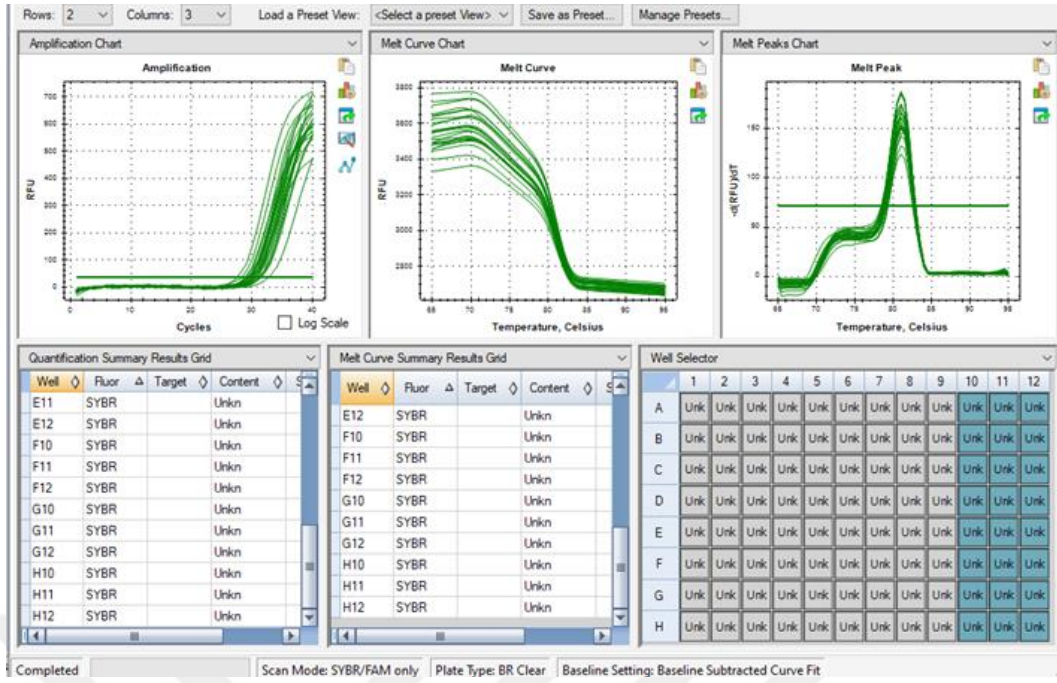
mRNA ekspresyonu seviyesini incelemek amacıyla, her bir qRT-PCR reaksiyonuna 1 µl cDNA, 1 µl primer karışımı (10 µM, forward+reverse), 10 µl 2X SYBR Green ve 8 µl ddH₂O eklenmiştir. Reaksiyon için; 95°C 5 dk, (95°C 15 sn, 60°C 30 sn, 72°C 30 sn) x40, 72°C 5 dk programı kullanılmıştır. IL-1, IL-8 ve VEGF primerlerine ait reaksiyon grafikleri örnekleri şekil 4-1, 4-2 ve 4-3'te gösterilmiştir.



Şekil 4-12. IL- 1 Primerine Ait Reaksiyon Grafiği



Şekil 4-13. IL-8 Primerine Ait Reaksiyon Grafiği



Şekil 4-14. VEGF Primerine Ait Reaksiyon Grafiği

4.4.4 qRT-PCR Sonuçlarının Analizi

mRNA ekspresyon seviyelerinin tespiti sırasında örnekler arası farklılıkların ve olası pipetleme hatalarının önüne geçilmesi amacıyla, B-actin gibi bir house keeping gen ile normalizasyon gerçekleştirilmiştir. ddCt yöntemi, aşağıdaki formül doğrultusunda kullanılarak analiz yapılmıştır.

$$ddCt = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{house keeping})$$

$$\text{Hedef gen ekspresyonu} = 2^{-(ddCt)}$$

Analiz sonucunda tablo 4-25, 4-26, 4-27, 4-28, 4-29 ve 4-30'daki veriler elde edilmiştir.

Tablo 4-25. İ1 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri

Örnek No	IL-1	IL-8	VEGF
İ111	4,35	0,73	1,68
i112	6,19	0,43	3,36
i113	11,24	1,33	5,10
i134	5,50	0,71	3,32
i135	116,97	2,55	11,08

i136	5,90	0,89	3,58
i157	4,82	1,21	2,99
i158	3,10	0,38	1,89
i159	4,92	0,88	2,57
i1710	9,51	1,39	5,03
i1711	6,63	0,86	1,93
i1712	3,58	1,44	2,20
i11414	6,28	0,37	2,50
i11415	3,05	0,26	2,55
i12118	9,51	1,26	5,46

Tablo 4-26. İ2 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri

Örnek No	İL-1	İL-8	VEGF
İ211	0,14	0,03	0,11
i212	0,21	0,04	0,23
i213	0,31	0,05	0,51
i234	0,17	0,03	0,26
i235	0,23	0,04	0,22
i236	0,23	0,05	0,26
i257	0,18	0,04	0,17
i258	0,17	0,03	0,21
i259	0,35	0,07	0,28
i2710	0,08	0,01	0,08
i2711	0,28	0,04	0,22
i2712	0,14	0,01	0,15
i21413	0,12	0,03	0,11
i21414	0,15	0,03	0,18
i21415	0,21	0,01	0,20
i22116	6,36	0,74	4,50
i22118	0,08	0,01	0,09

Tablo 4-27. İ3 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri

Örnek No	IL-1	IL-8	VEGF
	4,56	0,82	3,18
i312	4,59	0,53	2,51
i313	5,94	0,78	1,39
i334	6,45	1,00	4,00
i335	5,35	0,81	2,93
i336	4,53	2,22	2,97
i357	7,52	0,52	6,02
i358	2,91	0,49	2,03
i359	0,15	0,04	0,14
i3710	0,15	0,08	0,27
i3711	0,11	0,21	0,09
i3712	0,05	0,01	0,05
i31413	0,03	0,01	0,04
i31414	0,09	0,02	0,12
i32116	0,11	0,01	0,11

Tablo 4-28. E1 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri

Örnek No	IL-1	IL-8	VEGF
E111	1,80	0,46	2,57
E112	11,31	2,35	15,03
E134	7,36	2,30	8,63
E135	3,89	1,11	5,58
E136	1,69	0,40	1,41
E157	2,38	0,58	3,29
E158	5,10	1,28	4,79
E1710	8,06	1,51	5,74
E1711	2,55	0,37	2,33
E1712	3,36	1,31	6,54
E11413	2,89	0,24	2,79

E11414	9,51	1,16	11,96
E11415	10,34	0,88	10,63
E12116	1,80	0,31	2,30
E12117	5,31	0,80	5,66
E12118	7,46	1,35	7,94

Tablo 4-29. E2 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri

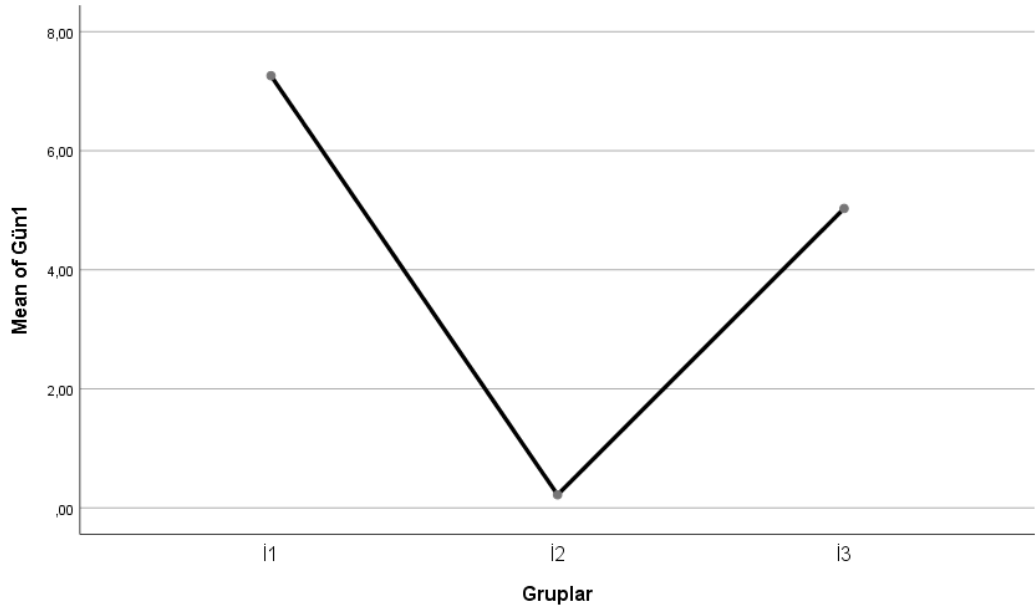
Örnek No	IL-1	IL-8	VEGF
E211	3,66	1,05	6,11
E213	2,2	0,42	2,04
E234	7,9	1,74	9,06
E235	4,7	0,89	5,21
E236	9,9	5,43	5,43
E257	18,4	23,75	23,75
E258	5,2	6,06	6,06
E259	6,5	7,62	7,62
E2710	5,8	6,92	6,92
E2711	6,1	8,17	8,17
E2712	0	18,90	18,90
E21413	6,3	2,19	2,19
E21414	10,5	10,78	10,78
E22117	8,1	9,65	6,41
E22118	10,6	13,09	13,09

Tablo 4-30. E3 Grubunun qRT-PCR Sonucuna Hesaplanan Gen Ekspresyon Değerleri

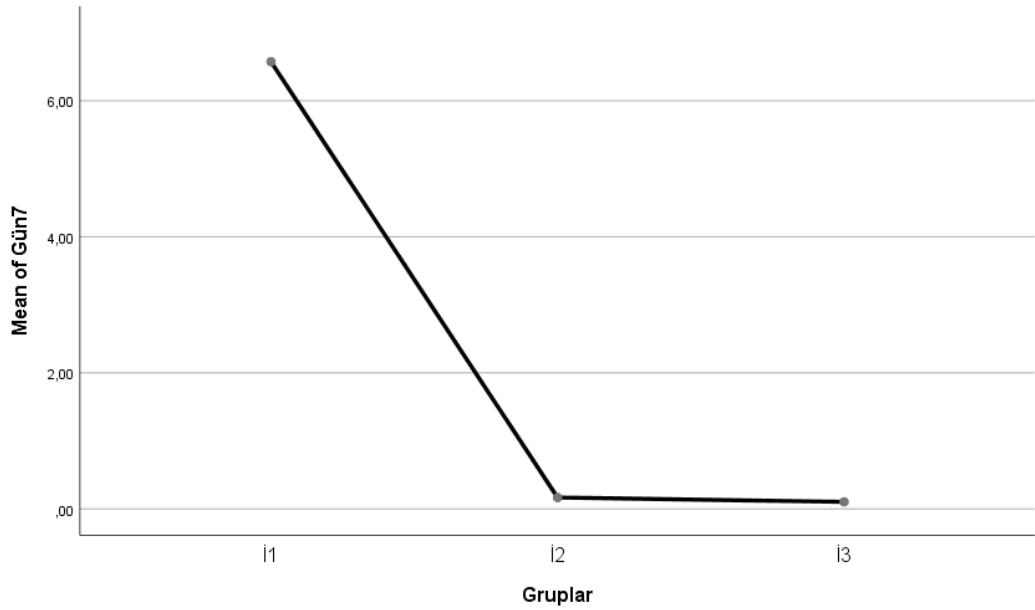
Örnek No	IL-1	IL-8	VEGF
E311	10,48	1,11	13,64
E312	8,82	2,97	13,36
E313	54,95	9,71	64,00
E334	10,13	1,07	7,16
E335	8,17	0,60	12,04
E336	5,24	0,68	8,17
E357	5,66	1,25	6,87
E358	19,56	1,38	15,14
E359	9,25	1,73	10,48
E3712	16,00	2,60	20,82
E31413	86,82	0,77	6,73
E31414	0,67	1,30	11,16
E32116	2,58	0,33	2,87
E32118	0,11	0,02	0,14

Gruplar hem kendi içlerinde hem de gruplar arası karşılaştırılmıştır. Bulgular One way Anova ile analiz edilmiştir. Çıkan sonuçlar grup içi ve gruplar arası gün bazında değerlendirilmiştir.

İ1, İ2 ve İ3 grupları karşılaştırıldığında IL-1 seviyelerinde 1 ve 7. günlerde anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. 1. günde İ2 grubunun seviyesi anlamlı derecede diğer gruplardan daha düşüktü. 7. günde İ2 grubunun seviyesi anlamlı derecede diğer gruplardan daha düşüktü. 7. güne kadar İ2 grubu en düşük seviyede seyrederken 14 ve 21. günlerde genel olarak bir fark görülmemiştir. E1, E2 ve E3 grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Birinci günde E2 grubunun IL-1 seviyesi en düşüktür. 3, 5, 7 ve 14. günlerde E3 grubunun IL-1 seviyesi en yüksekti. İ ve E grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür. 1. günde İ2 ve E2 gruplarının IL-1 seviyeleri diğer gruplardan daha düşüktü. İ2 grubunun IL-1 seviyesi 21. güne kadar en düşük düzeyde seyretmektedir. 21. günde en düşük IL-1 seviyesi İ3 grubuna aitti.



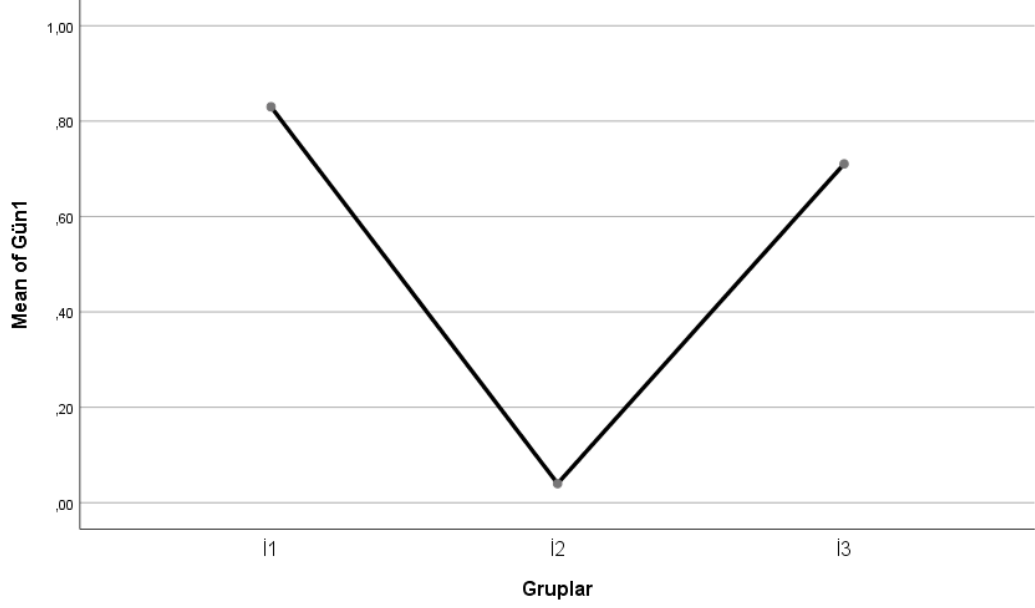
Şekil 4-15. İ Grupları 1. Gün IL-1 Seviyesi Grafiği



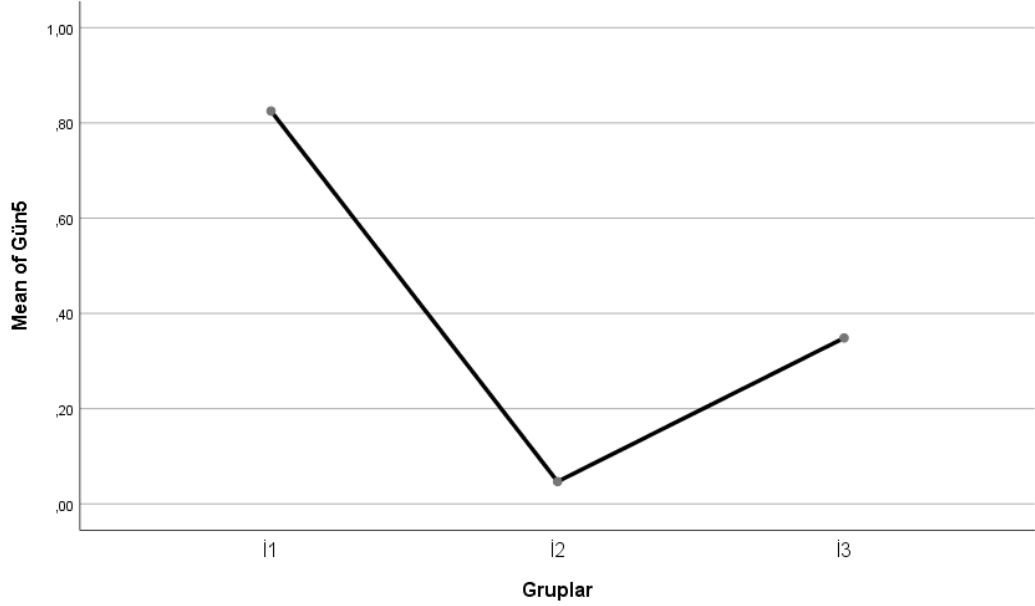
Şekil 4-16. İ Grupları 7. Gün IL-1 Seviyesi Grafiği

İ1, İ2 ve İ3 grupları karşılaştırıldığında IL-8 seviyelerinin 1, 5,7 ve 14. günlerde anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. İ2 grubunun IL-8 seviyesi 1 ve 5. günlerde anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. İ2 ve İ3 gruplarının IL-8 seviyeleri 7 ve 14. günlerde İ1 grubundan anlamlı derecede daha düşüktü. E1, E2 ve E3 grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında yalnızca 21. günde anlamlı bir farklılık bulunmuştur. E2 grubunun seviyesi 3, 5, 7 ve 14. günlerde diğer gruplardan daha yüksekti. Yirmi birinci günde ise E2 grubunun seviyesi diğer gruplardan anlamlı derecede yüksekti. İ ve E grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında

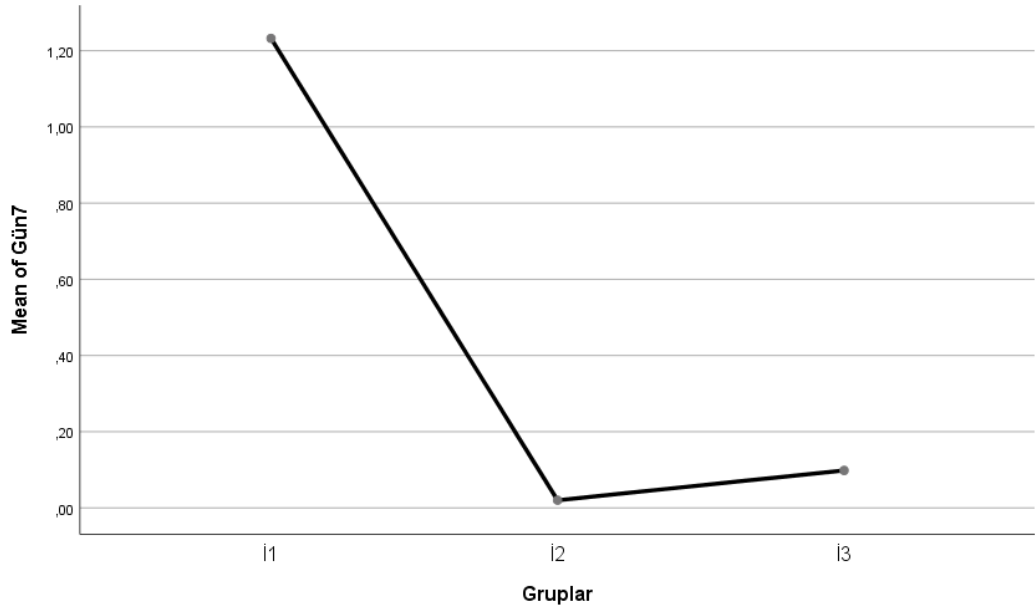
5, 7 ve 21. günlerde anlamlı farklılıklar görülmüştür. İ2 seviyesinin 5. günde E2 seviyesinden anlamlı derecede daha düşük olduğu görülmüştür. E2 grubunun seviyesi diğer gruplardan 7 ve 21. günlerde ise anlamlı derecede yüksekti.



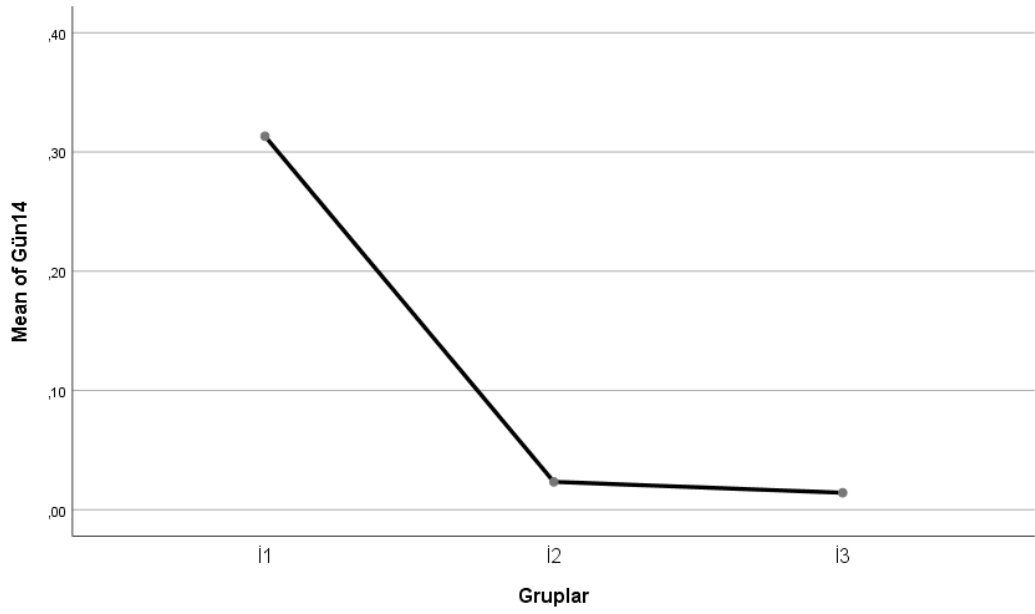
Şekil 4-17. İ Grupları 1. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği



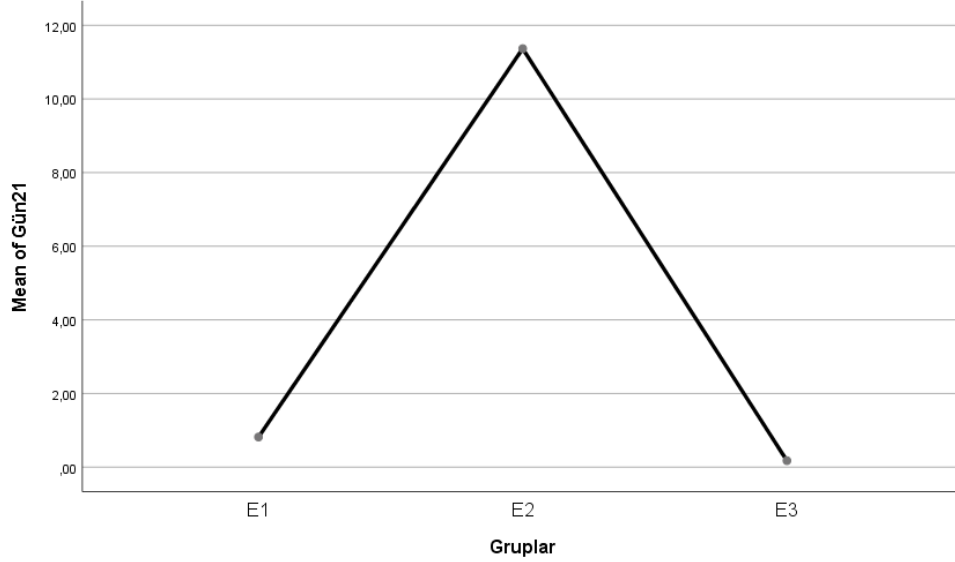
Şekil 4-18. İ Grupları 5. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği



Şekil 4-19. İ Grupları 7. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği

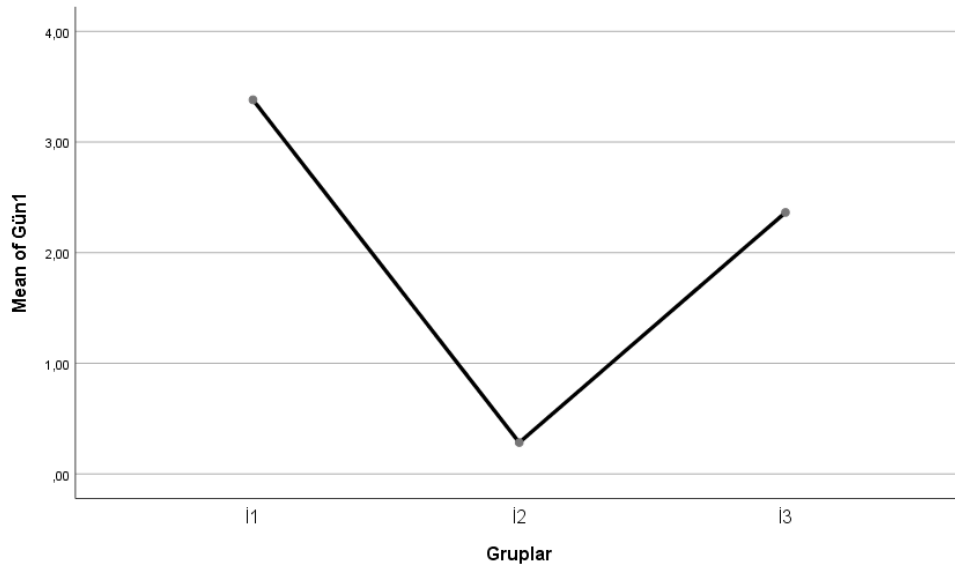


Şekil 4-20. İ Grupları 14. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği

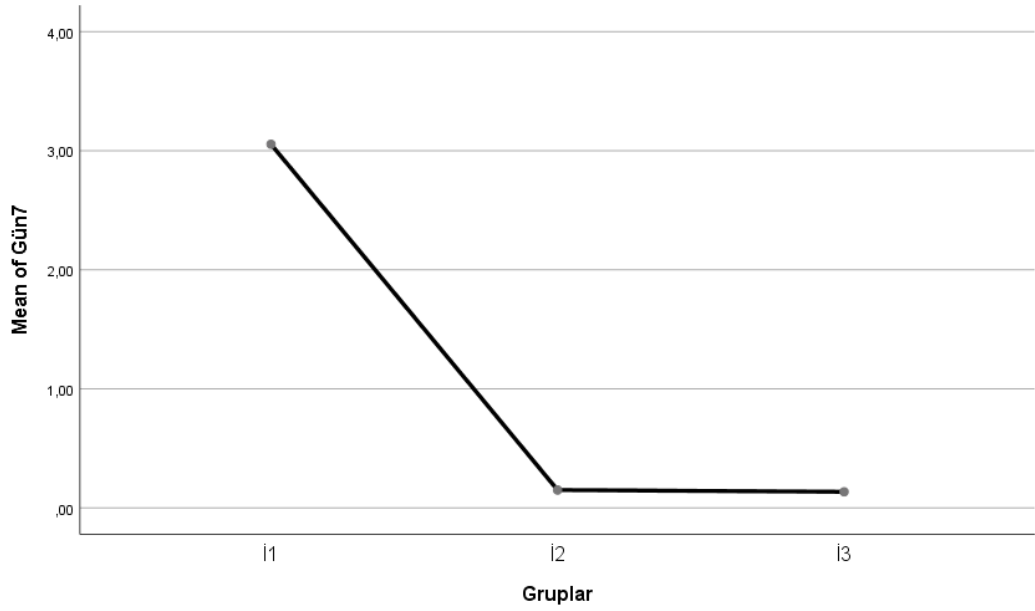


Şekil 4-21. E Grupları 21. Gün IL-8 Seviyesi Grafiği

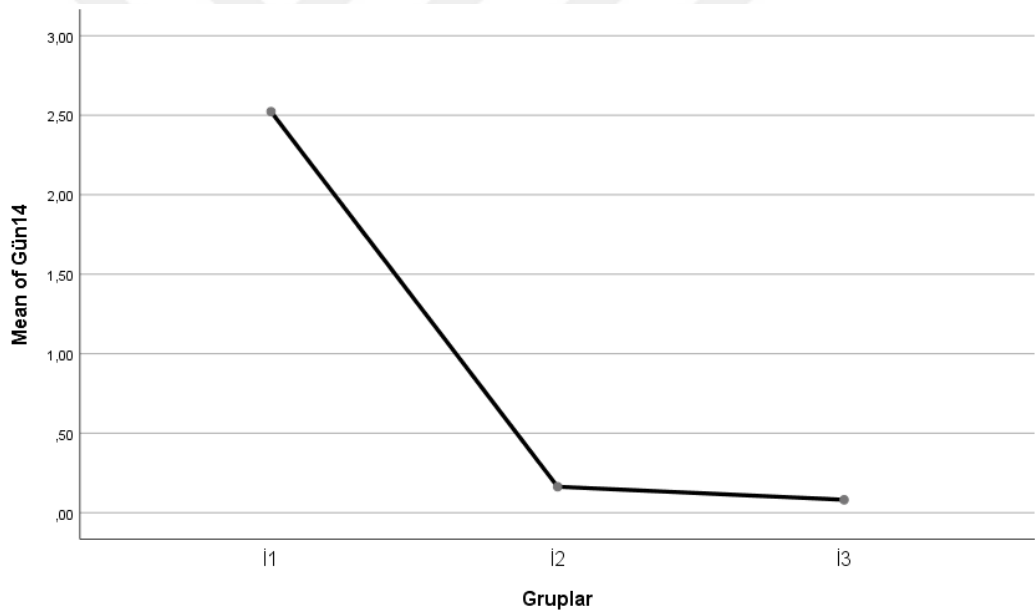
İ1, İ2 ve İ3 grupları karşılaştırıldığında VEGF seviyelerinde 1,7 ve 14. günlerde anlamlı farklılar olduğu görülmüştür. 1 ve 7. günlerde İ1 grubunun VEGF seviyesi İ2 grubundan anlamlı derecede yüksekti. 14. günde İ1 grubunun VEGF seviyesinin İ2 ve İ3 gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. E1, E2 ve E3 grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. İ ve E grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında 3,5 ve 7. günlerde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. 3 ve 5. günlerde E3 grubunun seviyesinin İ2 grubunun seviyesinden anlamlı derecede yüksekti. 7. günde E3 grubunun seviyesinin İ3 grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 4-22. İskemik Yara Grupları 1. Gün VEGF Seviyesi Grafiği



Şekil 4-23. İskemik Yara Grupları 7. Gün VEGF Seviyesi Grafiği



Şekil 4-24. İskemik Yara Grupları 14. Gün VEGF Seviyesi Grafiği

5. TARTIŞMA

Kronik yara olguları oldukça sık karşılaşılan hem hastayı hem de sağlık sistemlerini sıkıntıya sokan durumlardır. Oluşan kronik, iskemik ve enfekte yara olguları uzuv kaybına sebebiyet verebilir ve hayatı tehdit edebilir. Bu sebeple yara ve yara enfeksiyonlarının tedavilerinde her zaman farklı bakış açılarına ve çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (4–6).

Bu çalışmada enfekte iskemik yara modelinin ilk defa denenmesiyle beraber bu süreçlerin nasıl ilerlediğine dair gözlemler ortaya konulmuştur. Yara vakalarında muhtemel iskemi ve enfeksiyon birlikteliğinin karşılaştırılmasıyla birlikte enfekte iskemik yara modeli oluşturulan ratlarda *Lactobacillus plantarum*'un yara iyileşme sürecine katkılarının morfolojik, mikrobiyolojik, histopatolojik ve moleküler analizler doğrultusunda araştırılması amaçlanmıştır.

Probiyotiklerin, topikal ve oral uygulamalarının, bağışıklık sistemi yanıtının güçlendirilmesinde, iltihaplanmanın azalmasında ve yara iyileşme sürecinin hızlanmasında katkıda bulunduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (10,12,62,73–75). *L. plantarum* ile yapılan çalışmalarda, yanık ve yara iyileşmesinde etkili olduğu ve iyileşme sürecini hızlandırdığı bildirilmektedir (13,76). Aynı zamanda *L. plantarum* tedavisinin granülasyon dokusunun oluşumunu ve yara kenarlarından yeniden epitilizasyonunu teşvik etmede cerrahi debridmandan belirgin şekilde daha etkili olduğu bildirilmiştir (77).

Mohtashami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *L. plantarum*, diyabetik sıçanlarda yara iyileşme sürecini hızlandırmış, inflamatuvar hücreleri modüle etmiş, proinflamatuvar mediatörleri azaltmış ve anti-inflamatuvar ajanları arttırmıştır. Aynı zamanda *L. plantarum* uygulanan yaralarda 7. gün iyileşmesinin en yüksek olduğu bildirilmektedir (10).

Yapılan bu çalışmada morfolojik bulgular değerlendirildiğinde, iskemik ve enfekte iskemik yara gruplarında bulunan *L. plantarum* uygulanmış grupların (İ2 ve E2) yara boyutlarının değerlendirme günlerinin tümünde diğer gruplara göre daha küçük olduğunu belirledik. İskemik yara grubunda *L. plantarum* uygulanan grubun (İ2) yara boyutunun 1,3,7,14 ve 21. günlerde iskemik yara grupları içinde anlamlı derecede küçük olduğu ayrıca 3,5,7 ve 21. günlerde yara boyutunun diğer tüm gruplardan anlamlı derecede daha küçük olduğu görüldü ($p<0,05$). Aynı

zamanda enfekte iskemik yara grubunda yer alan *L. plantarum* uygulanan grubun (E2) yara boyutu diğer enfekte iskemik yara grupları içinde tüm günlerde daha küçük olduğu belirlendi. Fakat E2 grubunun yara boyutu yalnızca 7. günde anlamlı bir farklılık gösterdi. Grup içi ve gruplar arası değerlendirmelerden anlaşılacağı üzere *L. plantarum* uygulanan grupların yara kapanma süreci daha hızlı gerçekleşti.

Mohtashami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde yaptığımız çalışmada da 7. günde tüm gruplar içinde *L. plantarum* uygulanan grupların (İ2 ve E2) yara boyutlarının anlamlı derecede daha küçük olduğu görülmüştür (10). Bu veriler ışığında iskemik ve enfekte iskemik yaralarda *L. plantarum* kullanımının yara kapanmasını hızlandırdığı ve iyileşme süreçlerine katkıda bulunduğu görülmektedir. Literatürde belirtildiği gibi *L. plantarum*'un yanık, enfekte yaraların iyileşmesine katkıda bulunmasının yanında bu çalışmada da ratlarda oluşturulan iskemik ve enfekte iskemik yarada da benzer şekilde etkinliği görülmüştür.

Kronik yara enfeksiyonlarının tedavisinde sistemik antimikrobiklerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Enfekte kronik yarası olan hastaların tedavilerinde süreci kısaltmak için en uygun ve etkili antibiyotik seçimi çok önemlidir (52). Yapılan birçok çalışmada antimikrobiyal tedavilerin yanı sıra probiyotiklerin de patojenlere karşı etkin olduğu ve medikal kullanımları öne çıkmaktadır(8,9,51,78–80) *L. plantarum*'dan elde edilen ekstraktlar ile yapılan bir çalışmada mukoza yüzeylerinde anti-adezyon ve antimikrobiyal etkilerinin olduğu belirtilmiştir (81) *L. plantarum* makrofaj ve lenfositleri harekete geçirerek immün sistemi aktive etmekte ve ürettiği laktik asit ile antimikrobiyal etkinlik göstererek biyofilm oluşumuna engel olabilmektedir (13) Aynı zamanda bakteriyosin benzeri bir madde olan plantacirin üretimi ile hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (82). Başka bir çalışmada ise *L. plantarum*'a ait zengin protein fraksiyonlarının yara iyileşme safhalarında sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini arttırdığını ve *Staphylococcus aureus* enfeksiyonunu inhibe ettiği görülmüştür (8).

Bu çalışmada mikrobiyolojik bulgular iki farklı amaçla değerlendirilmiştir. İlk olarak enfekte iskemik yara grubunda enfeksiyon etkeninin (*S. aureus*) varlığının tespiti ve enfeksiyonun seyri için değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler enfekte gruplar olan E1, E2 ve E3 grupları arasında gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ancak değerlendirmelerde antibiyotik

tedavisi uygulanan gruptaki (E3) koloni sayısının tüm günlerde en az olduğu görülürken, *L. plantarum* uygulanan grubun (E2) koloni sayısının kontrol grubundan (E1) 21. güne kadar daha az olduğu görülmüştür. Yapılan birçok çalışmada *L. plantarum*'dan elde edilen ekstraların mukoza yüzeyinde patojenlere karşı anti-adhezyon etkilerinin olduğu belirlenmiştir (81,83,84). Bu çalışmada, *L. plantarum* uygulamasının antibiyotik tedavisi uygulanan grup kadar etkili olmadığı görülürken, kontrol grubuna nazaran daha az koloni sayısının olması belirtilen çalışmaları destekleyen niteliktedir.

İkinci amaç, *L. plantarum* uygulanan gruplarda (İ2 ve E2) etkenin varlığının tespitidir. Veriler genel olarak incelendiğinde *L. plantarum* uygulanması ve dokudan sayımının yapılması 14. güne kadar gerçekleştirilirken, 21. günde *L. plantarum* varlığına rastlanmamıştır. Bu durum morfolojik bulgularda belirtildiği gibi *L. plantarum* uygulanan gruplarda (İ2 ve E2) diğer gruplara göre yaranın daha hızlı kapanması ve bakterinin uygulanmış olmasına rağmen dokuya nüfuz edememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda enfekte iskemik yara grubundaki (E2) *L. plantarum* varlığının iskemik yara grubuna (İ2) göre daha yoğun olduğu görülmüştür. Bu durum yine iskemik yara grubunun yara boyutunun enfekte gruba göre daha küçük olmasından kaynaklanmış olması muhtemeldir.

Yapılan çalışmalarla topikal probiyotik tedavisinin yara iyileşmesinde, enflamasyon evresini kısaltması, kollajen konsantrasyonunu artırması, granülasyon ve anjiyogenezin hızlandırması gibi etkilere neden olduğu bildirilmektedir (73,85). Aynı zamanda *L. plantarum* ile yapılan bakterioterapinin granülasyon dokusu, kan damarları ve doku iyileşme süreci ile ilgili faktörlerin etkinliğini artırarak diyabetik yara ülserlerinin iyileşmesini modüle ettiği belirlenmiştir (62).

Yaptığımız bu çalışma da iyileşme evrelerinin histopatolojik olarak değerlendirmesi enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme olmak üzere 3 ana evre üzerinden değerlendirilmiştir. Yara iyileşmesinde, enflamasyon evresi yaralanmadan sonra hasara karşı gelişen lokalize, dokuyu koruyucu cevap olarak tanımlanabilir (19,86). Enflamasyon evresinin değerlendirme sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Bununla birlikte enflamasyon evresi şiddet, yaygınlık ve ödem ölçütlerine göre değerlendirildi, yapılan değerlendirmelerde 7. günden sonra İ2 ve E2 gruplarında yaygınlığın görülmediği

tespit edildi. Aynı zamanda İ2 grubunda 7. günden sonra ödem varlığı görülmedi. Bu durum yapılan birçok çalışmada da belirtildiği gibi enflamasyonun yara iyileşme süreci üzerine geciktirici etkisinin enfeksiyon ajanına göre *L. plantarum* uygulanan İ2 ve E2 gruplarında daha düşük seyredebileceğini düşündürmüştür (65,75,87).

Proliferasyon evresi epitel hücrelerinin proliferasyonu ve geçici matrikse göç etmeleri ile karakterizedir. Proliferasyon, yeniden epitelizasyon, anjiyogenezis ve granülasyon evrelerinden oluşmaktadır (34). Bu evrelerin değerlendirilmesinde anjiyogenez ve granülasyon evrelerinde farklılıklar görülmüştür.

Anjiyogenez değerlendirmesinde 14. günde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Anjiyogenez varlığına 14. günde E2 ve İ2 gruplarında rastlanmadı. Bu durum İ2 ve E2 gruplarında anjiyogenezin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında 14. günden daha önce bittiğini göstermektedir. Bekiaridou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada probiyotik kullanımının vaskülarizasyonu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (88). Bu çalışmada da *L. plantarum* kullanılan İ2 ve E2 gruplarının iskemik yara iyileşme süreçlerinde anjiyogenez safhalarının daha hızlı ilerlediği görülmüştür.

Granülasyon değerlendirmesinde de 14. günde istatistiksel olarak farklılık göstermiş ve bu farklılık yine *L. plantarum* kullanılan İ2 ve E2 gruplarından kaynaklanmıştır. İ2 ve E2 gruplarında 14. günde granülasyon görülmedi. Bu sonuç angiogenezis evresiyle benzerdir. Bu fark aynı şekilde 14. günde İ2 ve E2 gruplarında granülasyon oluşumun bittiğini göstermektedir. Yaptığımız bu çalışmada *L. plantarum*'un normal yara iyileşmesinde olduğu gibi iskemik yara iyileşmesinde de hem anjiyogenez hem de granülasyon safhalarını hızlandırdığı görülmekte ve literatür ile benzerlik göstermektedir.

Yara iyileşmesinin son evresi olan yeniden şekillenme, yeni epitel ve skar dokusunun oluşması ile karakterizedir (89). Yeniden şekillenme evresinin değerlendirilmesinde fibrozis ve kollajen varlığı istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Fibrozis değerlendirmesinde 5. günde İ2 grubu anlamlı olarak diğer gruplardan daha yoğun ve farklıdır. *L. plantarum*'un fibrozisi arttırdığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (75). Bu çalışmada da İ2 grubunun belirtilen literatürle aynı etkiyi gösterdiği söylenebilir. Kollajen varlığının değerlendirilmesinde 7. günde anlamlı bir farklılık görülmüştür. Bu farklılık E3 grubunun kollajen varlığının olmamasından kaynaklanmıştır. E3 grubunun kollajen varlığı 7. günden

sonraki değerlendirmelerde görüldü. Diğer gruplarda kollajen varlığının daha önceki günlerde başladığı tespit edildi. Yara iyileşmesinde kullanılan bazı antibiyotiklerin protein sentezinin inhibisyonuna neden olduğu ve kollajen sentezinde olumsuz etkileri literatürde bildirilmektedir (90,91). Yapılan bu çalışmada da antibiyotik uygulanan E3 grubunun kollajen sentezinin 7. güne kadar görülmemesinin, antibiyotik kullanımının bir sonucu olduğunu düşündürmüştür.

Büyüme faktörleri ve sitokinler, hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve göçü gibi görevlerde rol aldıkları gibi protein ve enzim üretiminde de aktif durumdadırlar. Yara iyileşmesinin her evresinde rol alarak, iyileşme süreci olumlu ve olumsuz olarak etkileyebilirler (27,42). Bu çalışmada da moleküler bulgular IL-1, IL-8 ve VEGF gen ekspresyon seviyeleri üzerinden değerlendirilmiştir.

Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-1 iyileşen dokuda epitel hücreleri tarafından üretilir ve IL-1'in epidermal iyileşmeyi hızlandırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bununla birlikte zor iyileşen kronik yaralarda IL-1'in aşırı eksprese edildiğine dair bulgular, IL-1'in iyileşme sürecini olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir (92,93). Ayrıca yapılan çalışmalar yara ve yanık iyileşme dönemlerinde kullanılan *L. plantarum* suşlarının enflamasyon döneminde proinflamatuvar sitokinleri üzerinde etkili olabileceği ve bu dönemi hızlandırabileceği yönündedir (67)

IL-1 gen ekspresyon seviyeleri iskemik ve enfekte iskemik yara gruplarında gün bazında hem grup içi hem de gruplar arası karşılaştırıldı. İskemik yara grupları (İ1, İ2 ve İ3) karşılaştırıldığında IL-1 seviyelerinde 1,7 ve 14. günlerde anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. İskemik yara *L. plantarum* uygulanan grubun (İ2) ekspresyon seviyesi 1 ve 7. günlerde diğer İ gruplarından anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$). Yedinci güne kadar İ2 grubu en düşük seviyede seyrederken 14 ve 21. günlerde genel olarak bir fark görülmedi. Enfekte iskemik yara grupları (E1, E2 ve E3) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmesine rağmen 1. günde enfekte iskemik yara *L. plantarum* uygulanan grubun (E2) IL-1 seviyesi en düşüktü. İ ve E grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Birinci günde *L. plantarum* uygulanan İ2 ve E2 gruplarının IL-1 seviyeleri diğer gruplardan daha düşüktü. İ2 grubunun IL-1 seviyesi 21. güne kadar en düşük düzeyde seyretmekteydi. En düşük IL-1 seviyesi 21. günde İ3 grubuna aittir. Yaptığımız bu çalışmada görüldüğü üzere *L. plantarum* uygulanan gruplarda enflamasyon döneminde IL-1 seviyelerinin diğer gruplara

göre daha düşük seyrettiği görülmekte ve yanık iyileşmesinde olduğu gibi iskemik yara iyileşmesinde de literatürü destekler niteliktedir.

IL-8'in akut yaralarda ekspresyonunun arttığı keratinosit göçünü ve proliferasyonunu arttırarak yeniden epitelizasyonda rol aldığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, IL-8 nötrofillerin aktivasyonda ve kemotaxisinde görev alarak inflamatuvar yanıtı katılır (62,94). Aynı zamanda *L. plantarum* kullanılan yaralarda IL-8 ekspresyon seviyesinin azaldığı da rapor edilmektedir (95).

IL-8 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması grup içi ve gruplar arası gün bazında değerlendirildi. İ1, İ2 ve İ3 grupları karşılaştırıldığında IL-8 seviyelerinin 1,5,7 ve 14. günlerde anlamlı farklılıklar olduğu görülmüş, anlamlı farklılığın *L. plantarum* kullanılan grubun (İ2) ekspresyon seviyesinin daha az olmasından kaynaklandığı görülmüştür. *L. plantarum* kullanılan İ2 grubunun IL-8 seviyelerinin diğer gruplara göre daha az olması literatürde belirtildiği gibi *L. plantarum* kullanımının etkinliğini göstermektedir. Fakat bu durum enfekte iskemik yara grubunda farklı şekilde seyretmiştir. Enfekte iskemik yara grubunda *L. plantarum* uygulanan grubun IL-8 seviyesinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada da enfekte ortamdaki *L. plantarum* varlığı IL-8 ekspresyonunun arttığını göstermiştir (62). Çalışmamızda da enfeksiyon gruplarında IL-8 seviyesinin daha da arttığını göstermektedir. Bu durum IL-8'in nötrofil aktivasyonunda ve inflamatuvar yanıtta görev almasından dolayı enfeksiyon ortamında etkinliğinin artmasıyla açıklanabilir.

VEGF'nin vasküler geçirgenliği arttırdığı, endotel hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği ve temel anjiyojenik fonksiyonlarda önemli görevleri olduğu bilinmektedir (76).

VEGF ekspresyon seviyeleri grup içi ve gruplar arasında gün bazında değerlendirildi İskemik yara grupları (İ1, İ2 ve İ3) arasında yapılan karşılaştırmada özellikle kontrol grubu VEGF ekspresyon seviyelerinin her zaman daha yüksek olduğu görülürken, *L. plantarum* uygulanan grubun (İ2) ekspresyon seviyesinin 7. günden itibaren antibiyotik uygulanan gruptan daha yüksek olduğu görüldü. Bu durum *L. plantarum* uygulanan grubun anjiyojenik etkinliğinin daha yoğun olduğunu göstermektedir. Enfekte iskemik yara grupları (E1, E2 ve E3) arasında ise anlamlı bir farklılıklar gözlenmemiş gruplar arasında seviyelerin değişken olduğu belirlendi. İki grubun karşılaştırılmasında ise E gruplarının İ gruplarına göre daha yüksek ekspresyon seviyesi olduğu görüldü. Yapılan çalışmalarda VEGF gibi

anjiyojenik faktörlerin hipoksi koşulları veya diğer hücre stresi türleri altında ekspresyonu, yara iyileşmesi sırasında neovaskülarizasyona katkıda bulunduğu bildirilmektedir (76,96). E gruplarının ekspresyon seviyelerinin İ gruplarına göre daha yüksek olması enfeksiyon varlığının göstergesidir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda iskemik ve enfekte iskemik yara modeli oluşturulan sıçanlarda *L. plantarum* kullanımının etkileri ortaya konmuştur. Bulgular ışığında;

1. *L. plantarum* kullanılan gruplarda morfolojik ölçümlerde yara bölgesinin daha hızlı kapandığı görülmüştür.
2. Mikrobiyolojik analizlerde *L. plantarum* uygulanan grupların kontrol gruplarına göre daha az enfeksiyon etkenine sahip olduğu görülmektedir.
3. Histopatolojik değerlendirme Enflamasyon, proliferasyon ve remodelling olmak üzere 3 ana evre üzerinden değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde proliferasyon evresinde anjiyogenez ve granülasyonda, remodelling evresinde fibrozis ve kollajen değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür.
4. Aynı zamanda IL-1 gen ekspresyonunun bu gruplarda enflamasyonu kısa sürmesine sebep olacak düzeyde daha düşük olduğu görülürken, IL-8 gen ekspresyon seviyesinin *L. plantarum* gruplarında azaldığı görülmüştür. VEGF gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında E gruplarının İ gruplarına göre daha yüksek ekspresyon seviyesi olduğu görülmektedir. E gruplarının ekspresyon seviyelerinin İ gruplarına göre daha yüksek olması enfeksiyon varlığı sonucunda ortaya çıkan bir durumdur. Sonuç olarak *L. plantarum* IL-1, IL-8 ve VEGF gen ekspresyon seviyelerini normal yara iyileşme evrelerinde olduğu gibi iskemik yara modelinde de literatürle örtüşen doğrultuda etkilemiştir.

Yapılan bu araştırma sonuçlarının da gösterdiği gibi farklı ajanların destekleyici kullanımları yara iyileşme süreçlerinde olumlu sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir. Yara iyileşmesinde *L. plantarum* kullanımının olumlu etkileri bilinmektedir. Bu olumlu etkilerin iskemik ve enfekte iskemik yara modellerinde de aynı doğrultuda olduğu görülmektedir. Çalışmamızda *L. plantarum*'un kullanımının olumlu etkilerinin görülmesine rağmen kısıtlamalar da bulunmaktadır. Sonraki çalışmalarda *L. plantarum*'un yara yüzeyinde daha uzun

tutunmasına yardımcı olacak bir ajanla verilmesi *L. plantarum*'un etkinliğinin artmasını sağlayabilir. Bir başka kısıtlılık ise histopatolojik değerlendirmelerdeki örnek sayısının azlığıdır. Örnek sayısının arttırılması analizlerin istatistik olarak daha iyi değerlendirmesini sağlayabilir.



7. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.

1. Benbow M. Best practice in wound assessment. *Nurs Stand.* 2016;30(27):40–7.
2. Castilla DM, Liu ZJ, Velazquez OC. Oxygen: Implications for wound healing. *Advances in Wound Care.* 2012;1(6):225–30.
3. Gottrup F. Oxygen in wound healing and infection. *World Journal of Surgery.* 2004;28(3):312–5.
4. Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *American Journal of Surgery.* 2003;186(2):259–63.
5. Izadi K, Ganchi P. Chronic wounds. *Clinics in Plastic Surgery.* 2005;32(2):209–22.
6. Schäffer M, Witte M, Becker HD. Models to Study ischemia in chronic wounds. *The International Journal of Lower Extremity Wounds.* 2002;1(2):104–11.
7. Wong VW, Martindale RG, Longaker MT, Gurtner GC. From germ theory to germ therapy: Skin microbiota, chronic wounds, and probiotics. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2013;132(5):854–61.
8. Ong JS, Taylor TD, Yong CC, Khoo BY, Sasidharan S, Choi SB, et al. *Lactobacillus plantarum* USM8613 aids in wound healing and suppresses *Staphylococcus aureus* infection at wound sites. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 2020;12(1):125–37.
9. Sonal Sekhar M, Unnikrishnan MK, Vijayanarayana K, Rodrigues GS, Mukhopadhyay C. Topical application/formulation of probiotics: Will it be a novel treatment approach for diabetic foot ulcer? *Medical Hypotheses.* 2014;82(1):86–8.
10. Mohtashami M, Mohamadi M, Azimi-Nezhad M, Saeidi J, Nia FF, Ghasemi A. *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* improve diabetic wound healing through modulating inflammatory factors. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2021;68(6):1421–31.
11. Peral MC, Huaman Martinez MA, Valdez JC. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *International Wound Journal.* 2009;6(1):73–81.
12. Zahedi, F. Comparison of the effects of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* on cutaneous wound healing in rats. *African Journal of Microbiology Research.* 2012;5(24):4226–33.
13. Vasilopoulos G, Tsiouris CG, Papageorgiou EG, Kelesi M, Kalemikerakis I. The efficacy of probiotics as pharmacological treatment of cutaneous wounds: Meta-analysis of animal studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017;104:230–9.
14. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453:314–21.
15. Thiruvoth F, Mohapatra D, Sivakumar D, Chittoria R, Nandhagopal V. Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plastic and Aesthetic Research.* 2015;2(5):250–6.
16. Falanga V. Chronic wounds: pathophysiologic and experimental considerations. *J Invest Dermatol.* 1993;100(5):721–725.
17. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research.* 2017;58:81–94.

18. Öhnstedt E, Lofton Tomenius H, Vågesjö E, Phillipson M. The discovery and development of topical medicines for wound healing. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2019;14:485–97.
19. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: A cellular perspective. *Physiol Rev*. 2019;99:665–706.
20. Strodbeck F. Physiology of wound healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews*. 2001;1(1):43–52.
21. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Basic Science Surgery*. 2007;26(2):31-37.
22. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: An overview. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;117(7):1-32.
23. Ramasastry SS. Acute wounds. *Clinics in Plastic Surgery*. 2005;32:195–208.
24. Krzystek MK, Kedzior K, Masłowski L, Mierzchala M, Bednarz Misa I, Bronowicka Szydelko A, et al. Impact of chronic wounds of various etiology on systemic profiles of key inflammatory cytokines, chemokines and growth factors, and their interplay. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2019;28(10):1301–9.
25. Janis JE, Harrison B. Wound healing: Part I. basic science. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016;138(3):9-17.
26. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *American society for dermatologic surgery*. 2005;31:674-86.
27. Grazul AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, et al. Wound healing: The role of growth factors. *Drugs of Today*. 2003;39(10):787–800.
28. Hatz RA, Niedner R, Vanscheidt W, Westerhof W. *Wound Healing and Wound Management*. Berlin: Springer; 1994.
29. Mathew Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in wound healing. *Bioengineering*. 2021;8(63):1-15.
30. Arnold F, West DC. *Angiogenesis in wound healing*. Great Britain: Pergomon Press; 1991.
31. Sen CK. Wound healing essentials: Let there be oxygen. *Wound Repair and Regeneration*. 2009;17(1):1–18.
32. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26:812–20.
33. Halper J, Leshln LS, Lewis SJ, Lit AWI. Wound healing and angiogenic properties of supernatants from lactobacillus cultures. *Experimental Biology and Medicine*. 2003;228(11):1329-37.
34. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research*. 2009;37(5):1528-42.
35. Kobayashi N, Hirano K, Nakano M, Muramatsu T, Tsukahara R, Ito Y, et al. Wound healing and wound location in critical limb ischemia following endovascular treatment. *Circulation Journal*. 2014;78(7):1746–53.
36. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010 ;63(5):866–81.

37. Kumar P, Kothari V. Wound Healing Research Current Trends and Future Directions. Singapore: Springer;2021.
38. Norris SO, Provo B, Stotts NA. Physiology of wound healing and risk factors that impede the healing process. AACN Clinical Issues. 1990;1(3):545-52
39. Umar DÇ, Damar HT. Akut ve Kronik Yaralar ve Hemşirelik Bakımı. Journal of surg nurs special topics. 2017;3(3):157–63.
40. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. British Journal of Dermatology. 2010;163: 257–68.
41. Morse JN, Gray BH. The essentials of ischemic wound care. Endovascular Today. 2009;51–56.
42. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair and Regeneration. 2008;16:585–601.
43. Firat Öztöpalan D, Işık R, Durmuş AS. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin rolü. Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 2017;10(1):83-88.
44. Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. Wound Repair and Regeneration. 2006;14(5):558–65.
45. Scales BS, Huffnagle GB. The microbiome in wound repair and tissue fibrosis. Journal of pathology. 2013;229:323–31.
46. Bessa LJ, Fazii P, di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection. International Wound Journal. 2015;12(1):47–52.
47. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clinical Microbiology Reviews. 2001;14:244–69.
48. Foster TJ. The Staphylococcus aureus “superbug”. The Journal of Clinical Investigation. 2004;114(12):1693-96.
49. Archer GL. Staphylococcus aureus: A well-armed pathogen. Clinical Infectious Diseases. 1998;26:1179-81.
50. Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of Staphylococcus aureus in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. European Journal Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases. 2020;39:2235–46.
51. Sikorska H, Smoragiewicz W. Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant Staphylococcus aureus infections. International Journal of Antimicrobial Agents. 2013;42:475–81.
52. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimo UF, Caroleo B, et al. Chronic wound infections: The role of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Vol. 13, Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2015;13:605–13.
53. Mirasoğlu B. Yara bakım ürünleri. TOTBID Dergisi. 2015; 14:456–461.
54. Shiffman MA, Low M. Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds Chronic Wounds, Wound Dressings and Wound Healing. Switzerland: Springer Cham;2021.
55. Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suarez V, Vinderola G, et al. Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. Food Microbiology. 2011;28(5):1033–40.

56. Behera SS, Ray RC, Zdolec N. Lactobacillus plantarum with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*. 2018;2018:1-18.
57. Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, et al. Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1. *Pnas*.2003;100(4):1990-95.
58. Corsetti A, Gobbetti M. Lactobacillus spp.: Lactobacillus plantarum taxonomy, identification, and genetics of the species. *Pnas*. 2002;3:1501-1507.
59. Salaran M, Oryan A, Nikahval B, Kamali A, Ghaemi M, Abbasi-Teshnizi F, et al. Topical application of Lactobacillus plantarum on burn wound healing in diabetic rats. *Iranian Veterinary Surgery Association*. 2019;14(1):59-70.
60. De Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vos WM. Lactobacillus plantarum survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. 2006;16:1018–28.
61. Garcia-Vello P, Sharma G, Speciale I, Molinaro A, Im SH, de Castro C. Structural features and immunological perception of the cell surface glycans of Lactobacillus plantarum: A novel rhamnose-rich polysaccharide and teichoic acids. *Carbohydrate Polymers*. 2020;233:1-9.
62. Peral MC, Huaman MA, Valdez JC. Bacteriotherapy with Lactobacillus plantarum in burns. *International Wound Journal*. 2009;6:73–81.
63. Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Tiwari BK. Stimulation of biosurfactant production by Lactobacillus plantarum using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2019;59:1-9.
64. Mohammedsaeed W, McBain AJ, Cruickshank SM, O’Neill CA. Lactobacillus rhamnosus GG inhibits the toxic effects of Staphylococcus aureus on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80(18):5773–81.
65. Ong JS, Taylor TD, Yong CC, Khoo BY, Sasidharan S, Choi SB, et al. Lactobacillus plantarum usm8613 aids in wound healing and suppresses Staphylococcus aureus infection at wound sites. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020;12:125–37.
66. Trujillo AN, Kesl SL, Sherwood J, Wu M, Gould LJ. Demonstration of the rat ischemic skin wound model. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;2015(98):1-7.
67. Heydari Nasrabadi. Study of cutaneous wound healing in rats treated with Lactobacillus plantarum on days 1, 3, 7, 14 and 21. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;5(21):2395–401.
68. Hawk C, Leary S, Morris T. *Formulary for laboratory animals*. 3. Iowa: Blackwell Pub; 2005.
69. Yarboro SR, Baum EJ, Dahners LE. Locally administered antibiotics for prophylaxis against surgical wound infection an in vivo study. *The journal of bone and joint surgery*. 2007;89:929-933.
70. Hashemzaei M, Alihemmati AR, Barzegari AA, Majdani R. Effects of topical treatment of second-degree burn wounds with Lactobacillus acidophilus on the wound healing process in male rats. *Pharmaceutical and Biomedical Research*. 2018;3(3):23–30.
71. Adibhesami M, Ahmadi M, Amir Farshid A, Sarrafzadeh Rezaei F, Dalir-Naghadeh B. Effects of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus contaminated open wounds healing in mice: An experimental study. *Veterinary Research Forum*. 2017; 8(1): 23-28.
72. Firidin Ş. Histolojik çalışmalar için doku örnekleri alma ve işleme prosesi. *SÜMAE Yunus Araştırma Bülteni*. 2004;4(1):15-17.

73. Tsiouris CG, Kelesi M, Vasilopoulos G, Kalemikerakis I, Papageorgiou G. The efficacy of probiotics as pharmacological treatment of cutaneous wounds : Meta-analysis of animal studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;104:230–9.
74. Nam Y, Kim JH, Baek J, Kim W. Improvement of cutaneous wound healing via topical application of heat-killed lactococcus chungangensis CAU 1447 on diabetic mice. *Nutrients*. 2021;13(8):1-16.
75. Gudadappanavar AM, Hombal PR, Timashetti SS, Javal SB. Influence of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus plantarum on wound healing in male Wistar rats - an experimental study. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 2017;7(4):233–8.
76. Woo YM, Kim OJ, Jo ES, Jo MY, Ahn MY, Lee YH, et al. The effect of Lactobacillus plantarum hydrolysates promoting VEGF production on vascular growth and hair growth of C57BL/6 mice. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2019;10(1):1-19.
77. Bekiaridou A, Karlafti E, Oikonomou IM, Ioannidis A, Papavramidis TS. Probiotics and their effect on surgical wound healing: A systematic review and new insights into the role of nanotechnology. *Nutrients*. 2021;13:1-14.
78. Lee CS, Kim SH. Anti-inflammatory and anti-osteoporotic potential of Lactobacillus plantarum A41 and L. fermentum SRK414 as probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020;12(2):623–34.
79. Carmo MS, Santos CI, Araujo MC, Giron JA, Fernandes ES, Neto VM. Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food Funct*. 2018;9:5074-95.
80. Siddharthan R, Chapek M, Warren M, Martindale R. Probiotics in prevention of surgical site infections. *Surgical Infections*. 2018;19(8):831–5.
81. Messi P, Bondi M, Sabia C, Battini R, Manicardi G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a Lactobacillus plantarum strain. *International Journal of Food Microbiology*. 2001;64(1–2):193–8.
82. Silva Sabo S, Vitolo M, González JMD, Oliveira RP de S. Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*. 2014;64:527–36.
83. Min WH, Fang X bin, Wu T, Fang L, Liu CL, Wang J. Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from Lactobacillus plantarum JLAU103. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019;127(6):758–66.
84. Wu L, Wang W, Wu Z, Pan D, Zeng X, Guo Y, et al. Effect of acid and alkali stress on extracellular metabolite profile of Lactobacillus plantarum ATCC 14917. *Journal of Basic Microbiology*. 2020;60(8):722–9.
85. Knackstedt R, Knackstedt T, Gatherwright J. The role of topical probiotics on wound healing: A review of animal and human studies. *International Wound Journal*. 2020;17(6):1687–94.
86. Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2010;28(5):519–26.
87. Satish L, Gallo PH, Johnson S, Yates CC, Kathju S. Local probiotic therapy with lactobacillus plantarum mitigates scar formation in rabbits after burn injury and infection. *Surgical Infections*. 2017;18(2):119–27.
88. Beniodakis E, Karlafti E, Bekiaridou A, Didangelos F, Papavramidis TS. Gestational diabetes, colorectal cancer, bariatric surgery, and weight loss among diabetes mellitus

- patients: A mini review of the interplay of multispecies probiotics. *Nutrients*. 2022;14(192):1-12.
89. Tepebaşı MY, Şahin Calapoğlu N. Yara iyileşmesinin hücresel ve moleküler mekanizması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2016;23(4):140-146.
 90. Friberg Ö, Dahlin LG, Levin LÅ, Magnusson A, Granfeldt H, Källman J, et al. Cost effectiveness of local collagen-gentamicin as prophylaxis for sternal wound infections in different risk groups. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. 2006;40(2):117–25.
 91. Zimmermann A, Truss F. The Effect of Antibiotic Drugs on Wound-Healing, *Urological Research*. 1974;2:73-77.
 92. Xiao T, Yan Z, Xiao S, Xia Y. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Research and Therapy*. 2020;11(232):1-9.
 93. Hu Y, Liang D, Li X, Liu HH, Zhang X, Zheng M, et al. The role of interleukin-1 in wound biology part II: In vivo and human translational studies. *Anesthesia and Analgesia*. 2010;111(6):1534–42.
 94. Iocono JA, Collieran KR, Remick DG, Gillespie BW, Ehrlich PH, Garner WL. Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds importance of the individual components and order of tory cytokines on wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2000;8:216-223.
 95. Ko JS, Yang HR, Chang Y, Seo JK, Seo K. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- α . *World J Gastroenterology*. 2007;13(13):1962–65.
 96. Svendsen MN, Werther K, Nielsen HJ, Kristjansen PEG. VEGF and tumour angiogenesis. Impact of surgery, wound healing, inflammation and blood transfusion. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2002;37:373–79.