

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**FETAL YARA İYİLEŞMESİNİN MODULASYONU: SKARLI VE
SKARSIZ İYİLEŞEN FETAL DOKULARDA ELASTİN,
HYALURONİK ASİT GİBİ EKSTRASELLÜLER MATRİKS
ELEMENLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Esra TEMELTAŞ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tanju AKTUĞ

ANKARA
2010

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**FETAL YARA İYİLEŞMESİNİN MODULASYONU: SKARLI VE
SKARSIZ İYİLEŞEN FETAL DOKULARDA ELASTİN,
HYALURONİK ASİT GİBİ EKSTRASELLÜLER MATRİKS
ELEMENLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Esra TEMELTAŞ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tanju AKTUĞ

**Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 110S248 proje numarası ile
desteklenmiştir**

ANKARA

2010

Kabul Onay

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

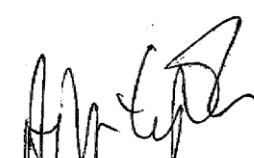
Fetal Yara İyileşmesinin Modülasyonu: Skarlı ve Skarsız İyileşen Fetal Dokularda Elastin, Hyaluronik Asit Gibi Ekstrasellüler Matriks Elemanlarının Değerlendirilmesi. Dr.Esra TEMELTAŞ'a ait, çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/ 11/ 2010

Prof.Dr.Hüseyin DİNDAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Tanju AKTUĞ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı
Tez Danışmanı



Prof.Dr.E.Aydın YAĞMURLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

ÖNSÖZ

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 110S248 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışmada her aşamasında gösterdiği yardım ve destek için danışmanım Prof. Dr. Tanju AKTUĞ'a, çalışma boyunca yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen Prof. Dr. Hüseyin DİNDAR ve Prof. Dr. E. Aydın YAĞMURLU, çalışmanın istatistik ve grafikleri sırasındaki yardımları için Doç. Dr. Meltem BİNGÖL-KOLOĞLU ve Doç. Dr. Zekeriya ALANOĞLU'na ve tez kapsamındaki cerrahi işlemlerin uygulanmasında verdikleri destek için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlusu Veteriner Hekim Atilla İŞGÖREN ve ekibine, parçaların incelenmesi, boyanması ve dokulardaki elastin ve Hyaluronik asit miktarına göre dokuların nümerik olarak sınıflandırma işlemini gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Patoloji AD'dan Doç. Dr. Aylin HEPER'e, tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Çocuk Cerrahisi AD'ndan, Uzm. Dr. Rahşan VARGÜN, Uzm. Dr. Gülnur GÖLLÜ, Uzm. Dr. Berkтуğ BAHADIR, Dr. Ufuk ATEŞ, Dr. Coşkun KÖSE, Dr. Halise AKPINAR, Dr. Gönül KÜÇÜK'e ayrıca eğitim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Esra TEMELTAŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vi
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. YARA İYİLEŞMESİNİN VE SKAR OLUŞUMUNUN TEMEL NOKTALARI	3
2.1.1. Hemostaz	4
2.1.2. İnflamasyon	4
2.1.3. Proliferasyon fazı	5
2.1.4. Yara iyileşmesinde skar redüksiyonu	6
2.2. EKSTRASELLÜLER MATRİKS VE GROWTH FAKTÖR ÜRETİMİ	7
2.3. PEPTİDOGLİKANLAR	8
2.4. ANJİOGENEZİS	8
2.5. REEPİTELİZASYON	10
2.6. YARA İYİLEŞMESİNİN MATURASYON FAZİ	13
2.7. FETAL YARA İYİLEŞMESİ	15
2.7.1. Fetal Çevre	15
2.7.2. Fetal Cilt	17
2.7.2.1. Gelişim	17

2.7.2.2. Yara iyileşmesi.....	17
2.7.2.3. Organ spesifitesi	18
2.7.2.4. Fetal hücreler, trombositler	19
2.7.2.5. İnflamatuar hücreler	19
2.7.2.6. Fibroblastlar	20
2.7.3. FETAL ECM	21
2.7.3.1. Kollajen	21
2.7.3.2. Adezyon Molekülleri.....	23
2.7.3.3. Matriks degradasyonu.....	23
2.7.3.4. Glikoaminoglikan.....	25
2.8. YARA ONARIMINDA HYALURONİK ASİT'İN FONKSİYONU ..	25
2.8.1. Hyaluronik asit'in fizikokimyasal özellikleri.....	26
2.8.2. Biyolojik Özellikleri	27
2.8.2.1. Hücre yüzey reseptörleri	27
2.8.2.2. Matriks komponentlerine bağlanma ve yapısal biyolojik fonksiyon	28
2.8.3. Hyaluronik asit bağlayan proteinler.....	29
2.8.4. Hyaluronik asit oligosakkaridlerinin hücre davranışlarına direk etkileri.....	29
2.8.5. Hyaluronik asit sentezi.....	30
2.8.6. Yara iyileşmesinde exojen Hyaluronik asit'e dair gözlemler	30
2.8.7. Yara iyileşme sürecinde Hyaluronik asit'in rolü.....	31
2.8.7.1. İnflamasyon.....	31
2.8.7.2. Granülasyon doku matriks organizasyonu ve granülasyon	32
2.8.7.3. Hyaluronik asit ve hücre migrasyonu	32
2.8.7.4. Hyaluronik asit ve inflammatuar cevabın düzenlenmesi.....	33

2.8.7.5. Anjiogenez	34
2.8.7.6. Reepitelizasyon.....	34
2.9. ELASTİK LİFLER	35
2.9.1. Elastogenezis	36
2.9.2. Matür Elastin.....	36
2.9.3. Elastin peptidleri doğası ve kökeni	37
2.9.3.1. Elastin turnoverı	37
2.9.3.2. Biyolojik aktivite.....	37
2.9.3.3. Elastik lif Fonksiyonu	37
3. MATERYAL VE METOD.....	38
4. BULGULAR	43
4.1. FETAL DOKULARDAKİ ELASTİN DAĞILIMI.....	43
4.2. ERİŞKİN DOKULARDAKİ ELASTİN DAĞILIMI.....	45
4.3. FETAL DOKULARDAKİ HYALURONİK ASİT DAĞILIMI	47
4.4. ERİŞKİN DOKULARDAKİ HYALURONİK ASİT DAĞILIMI	51
5. TARTIŞMA	53
ÖZET	59
SUMMARY.....	61
KAYNAKLAR	63

KISALTMALAR

ECM	Ekstrasellüler matriks
C5a	Kompleman 5a
FMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl- Phenylalanine
LTB ₄	Lökotrien B ₄
TGF- β	Transforming growth faktor- beta
GF	Growth Faktör
O ₂	Oksijen
VitC	Vitamin C
Fe	Demir
IL	İnterlökin
TNF α	Tümör Nekrozis Faktör alfa
PDGF	Platelet Derived Growth Faktör
NGF	Nerve growth faktör
PG	Peptidoglikan
GAG	Glycosaminoglycan
HA	Hyaluronik asit
DS	Dermatan Sülfat
KS	Kondroitin Sülfat
HS	Heparan sülfat
FGF ₂	Fibroblast Growth Faktör ₂
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
MMP	Matrix metalloproteinase
Ca	Kalsiyum

Mg	Magnezyum
HGF	Hepatocyte Growth Factor
UPA	Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü
MFB	Miyofibroblastlar
IF γ	İnterferon gama
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
mRNA	Mesenger RNA
CYR ₆₁	Cysteine-Rich 61
PMNL	Polimorfonüveli lökosit
DDR	Discoid Domain Reseptörü
HASA	Hyaluronic Acid Stimulating Factor
RHAMM	Receptor for Hyaluronic Acid–Mediated Motility
ICAM1	Intercellular adhesion molecule-1
LFA1	Lymphocyte function associated-1
TSG6	TNF-stimulated gene 6
ILGF1	Insulin Like Growth Factor 1
OS	Oligosakkaridler

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 3.1: Erişkin tavşan ve uterus içindeki fetal tavşanlar (histerektomi öncesi).....	38
Resim 3.2: Fetal tavşan (histerektomi sırasında).....	39
Resim 3.3: Fetal tavşan (histerektomi sonrası).....	39
Resim 3.4: Fetal tavşandan trakeal parça alınması	40
Resim 3.5: Fetal tavşanda mideden parça alınması	40
Resim 3.6: Fetal tavşanda diyafragmadan parça alınması	41
Resim 4.1: Skarsız iyileşen fetal trakea, elastik lif yok. EVGx400.....	44
Resim 4.2: Skarlı iyileşen fetal mide duvarı. Elastik lif yok. EVGx400 ..	45
Resim 4.3: Erişkin Trakea. Mukoza dökülmüş görünümde(kalın ok). Lamina propriada siyah lifler(ince kırmızı ok) şeklinde bol elastik lif bulunmakta. EVGx400	46
Resim 4.4: Erişkin Mide duvarı. Muskularis propriya içinde siyah renkli lifler halinde elastik lifler (ince kırmızı oklar) EVGx400	46
Resim 4.5: Fetal trakea. Örtücü epitelyum altında (ok), (++) düzeyinde mavi renkli hyaluridik asit ile uyumlu boyanma(yıldız). PAS-Alcian bluex200.....	49
Resim 4.6: Fetal mide. Örtücü epitelyum altında (ok), (+) düzeyinde mavi renkli hyaluridik asit ile uyumlu boyanma(yıldız). PAS-alcian bluex200.....	49
Resim 4.7: Erişkin deri. Epidermis (ok) altında, dermiste hyaluronik asit ile uyumlu boyanma yok. PAS-Alcian bluex200	51
Resim 4.8: Erişkin Trakea dokusu. Örtücü epitel (ok) altında (+/-) düzeyinde mavi renkli hyaluridik asit le uyumlu boyanma (yıldız). PAS-Alcian bluex100	52

TABLÖLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 3.1: Dokuların elastinle boyanma özellikleri	42
Tablo 3.2: Dokuların hyaluronik asit boyanma şiddetleri.....	42
Tablo 4.1: Fetal dokulardaki Elastin varlığı	43
Tablo 4.2: Fetal dokulardaki elastin ve hyaluronik asit Mean ve P değerleri.....	44
Tablo 4.3: Erişkin ve fetal dokular arasındaki elastin ve hyaluronik asit miktarlarının ortalamaları ve P değerleri.....	44
Tablo 4.4: Erişkin dokulardaki elastin varlığı.....	45
Tablo 4.5: Fetal dokulardaki hyaluronik asit varlığı ve miktarı.....	48
Tablo 4.6: Erişkin dokulardaki hyaluronik asit varlığı ve miktarları	51
Grafik 4.1: Elastinin erişkin ve fetal dokular arasındaki dağılımı.....	47
Grafik 4.2: Fetal dokular arasındaki elastin ve hyaluronik asit miktarları	50
Grafik 4.3: Fetal skarlı ve skarsız dokular arasındaki elastin ve hyaluronik asit farkları	50
Grafik 4.4: Hyaluronik asit miktarının erişkin ve fetal dokuları arasındaki dağılımı.....	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erken gestasyonel dönemde fetal deri yaralarının hızlı ve skarsız iyileştiği bilinmektedir. Fetal yaraların sonraki yaralar gibi inflamasyon, granülasyon dokusu, kontraksiyonu ve kollajen depolanması olmadan iyileşmesi tüm klinisyenlerin ilgisini çekmektedir.

Fetal ve erişkin yara çevreleri arasındaki birçok fark yara iyileşmesini etkileyebilir. Yaralı fetal deri ile temasta olan amniyotik sıvı fetal deri yarasının önemli komponentlerinden fibronektin, kondroitin sülfat (KS), hyaluronik asit (HA) gibi Ekstrasellüler matriks (ECM) elemanlarından zengindir.^{1,2} Fetus derisi de erişkin derisinden farklıdır. Yapılan çalışmalarda fetal deride farklı oranlarda keratin dağılımı ve ekstrasellüler matrikste farklı protein yapıları ve dağılımları gösterilmiştir.¹⁻⁴ Yara ve iyileşme ile ilgili sitokinler, çeşitli büyüme hormonları da fetuslarda doğumdan sonraki dokular ve yaralardan farklı bulunmuştur.¹⁻³

Anılan farkların hangisinin skarsız iyileşmeden sorumlu olduğu günümüzde tam bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda deri yanı sıra solunum yolu mukozasının da skarsız iyileştiği, ancak mide, diyafragma gibi bazı fetal dokuların ise skar ile iyileştikleri görülmüştür.⁵⁻⁹ Bu dokuların yaralarının amniotik sıvı ile temas etseler bile skarsız iyileşmemesi, skarsız iyileşmede amniotik sıvının rolünün çok sınırlı olduğunu göstermektedir.⁵⁻¹¹ Trombositler, beyaz küreler, fibrositler gibi iyileşmeye katılan dış hücrelerin aynı olmasına karşın fetal yara çeşitlerinin iyileşmesindeki farklar, onların da rolünün sınırlı olduğunu düşündürmektedir. Fetal sitokin, büyüme hormonu gibi hormonal etkenlerin anılan dış hücreler ile yakın bağlantısı ve genelde yaralı dokunun özelliklerine bağımlı bir yanıt olarak ortaya çıkmaları dikkati ECM'e yöneltmektedir.^{1-4,10-11}

Yetişkin derisi ile fetal deri ECM'in karşılaştırıldığı ayrıntılı çalışmada keratinlerdeki farklar dışında, fibronektin, kondroitin sülfat, HA'in fetal yarada erişkinden daha fazla olduğu saptanmıştır.¹⁻³ Fetal yarada erişkinde mevcut olan elastin ise bulunamamıştır.³ Erişkin gastrointestinal sisteminde barsak duvarının bütünlüğü ve mekanik gücünü elastin içeren submukoza sağlar. Submukoza barsak yara iyileşmesinde en önemli tabakadır.¹⁵ Yaraları skar ile iyileşen fetal gastrointestinal sistemin elastin içeriği ise bilinmemektedir.¹⁵

Fetusun skarlı ve skarsız iyileşen dokularında anılan ECM elemanlarının farklı olup, olmadığı bilinmemektedir. Eğer aynı gestasyonel yaşta olmasına karşın skarlı iyileşen fetal dokularda da ECM elemanlarının erişkin deridekine benzer farklı yapı ve dağılım gösterdiği saptanırsa ise, ECM elemanlarının skarsız iyileşmenin tetikleyici ana unsuru olduğu öne sürülebilir.

Bu çalışmada skarsız iyileştikleri bilinen fetal deri ve solunum yolu mukozası ile, skarlı iyileştikleri bilinen diyafragma ve mide dokularının ECM elemanları karşılaştırılacaktır. Amaç skarlı ve skarsız iyileşen deri dokularındakine benzer farkların skarlı, skarsız iyileşen fetal dokularda da bulunup bulunmadığının saptanmasıdır. Benzer farklar bulunması durumunda fetal yara iyileşmesinin modülasyonunda ECM elemanlarındaki farkın tetikleyici ana unsur olduğu öne sürülebilir.

Eğer skarsız yara iyileşmesinin ana tetikleyici unsuru saptanabilir ise, skarlı iyileşme sonucu gelişen klinik sorunlar olan tüm skarlara, yapışıklıklara, anastomoz darlıklarına, sinir ve damar anastomozu sonrası oluşan komplikasyonlara müdahale edilerek engellenmesi sağlanabilir.^{4,12-15} Estetik olarak skarlara bağlı komplikasyonlar için yapılacak olan müdaheler gereksiz olacaktır. Ayrıca siroz ve pulmoner fibrozis gibi fibroproliferatif hastalıkların çoğunun tedavisine yönelik olarak da ECM elemanlarının modülasyonu gündeme gelecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Yara iyileşmesi fibrin pıhtısının oluşumu ile başlayan, ardından inflamatuvar hücrelerin toplanması, anjiogenezis ve granülasyon dokusunun oluşumu, fibroblast proliferasyonu ve keratinositlerin migrasyonunun olduğu son derece koordineli bir programı içermektedir. Dermisdeki yaralarda yara kontraksiyonu sıklıkla oluşur ve hızlı kapanmaya yardımcı olur. Epitelyum kapandıktan sonra da skar remodelingi onarım sürecini tamamlar. Erişkinlerdeki yara iyileşmesinde doku bütünlüğü onarımla korumakta, ancak bunun karşılığında fibrozis ve skar gelişmektedir.¹⁻⁵

Erişkinde yara iyileşmesi, akut inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, anjiogenezis, kollajen ve matriks sentezi, kontraksiyon ve fibrozisten oluşmaktadır. Sonuçta olgun skar dokusu içeren kapanmış bir yara elde edilir. Fetüsteki yara iyileşmesi ise inflamasyon, granülasyon dokusu, yara kontraksiyonu ve kollajen depolanması olmadan gerçekleşmektedir.^{1-5,16-17}

Fetal yara iyileşmesini anlamak için yara iyileşmesinin bileşenlerini daha ayrıntılı anlamak gerekir.

2.1. YARA İYİLEŞMESİNİN VE SKAR OLUŞUMUNUN TEMEL NOKTALARI

Yara iyileşmesinin biyolojik süreci 4 faza ayrılır.

- 1) Hemostaz
- 2) İnflamasyon
- 3) Proliferasyon-yeniden yapılanma
- 4) Skar maturasyonu- Yeniden yapılanma

2.1.1. Hemostaz

Yara iyileşmesi, doku bütünlüğünün travmatik olarak bozulduğu anda başlar. Travma sonucu derinin epidermal, dermal ve damarsal elemanlarının veya diğer derin dokularının, dokuda bir boşluk kalacak şekilde bütünlüğü bozular. Bu duruma ilk fizyolojik yanıt hemostazdır. Bütünlüğü bozulan kan damarları ve dermisten açığa çıkan kollajen, trombosit agregasyonu ve degranülasyonu için ortam oluşturur. Pıhtılaşma mekanizmaları aktive olur ve fibrin polimerizasyonu ve ortama gelen trombositlerle birlikte geçici bir örtü oluşur. Hemostaz sırasında gerçekleşen olaylar, reaktif vazospazm sonrası pıhtı ve trombüs oluşumdur. Oluşan pıhtı ve trombüs daha fazla bakteriyel kontaminasyon ve sıvı kaybı meydana gelmesini engelleyen fiziksel bir bariyer olarak görev yapar. Bu ilk hemostatik faz, kendinden sonra başlayacak olan inflamatuvar fazı da etkiler.^{16,17}

2.1.2. İnflamasyon

Deri yaralanmasından sonraki birkaç dakika içinde inflamasyon başlamaktadır. İlk inflamatuvar hücreler kan kaynaklı nötrofillerdir ve kan damarlarının endotel hücrelerinin içerisinden geçerek gelirler. Vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu ve pıhtılaşma mekanizmalarının aktivasyonu ile hemostaz sağlanırken, yara bölgesine birçok madde salınır ve bu salınım sonucu sekonder vazodilatasyon, kapiller permeabilite artışı, lökositlerin bölgeye çekilmesi ve aktivasyonu meydana gelir. Kompleman 5a (C5a), N-Formyl-Methionyl-Leucyl- Phenylalanine (FMLP) peptidi içeren bakteriyel proteinler ve Lökotrien B4 (LTB4) nötrofiller için kemotaktiktir ve nötrofillerin endotelial hücrelere yapışmasını arttırıcı etkiye sahiptir. Nötrofiller, yara bölgesine ilk gelen ve akut inflamasyonu başlatan lökositlerdir. Bu hücreler, bakterisidal ve fagositik özellikleri sayesinde, lokal bakteriyel kontaminasyonu ve enfeksiyon oluşumunu engelleyen immünolojik bir role sahiptirler. Nötrofil infiltrasyonu, yara oluşumunun 24. saatinde pik yapar ve monositlerin yara yerine göçüyle yavaş yavaş azalmaya başlarlar.

Monositler de, nötrofillere benzer şekilde bakterilerin salgıladığı maddeler ve C5a etkisi ile yara yerine gelir. Trombosit ve nötrofillerden salınan TGF- β (transforming growth factor- beta), monositler için en potent kemotaktik ajanlardan biridir. Dolaşımdaki monositler, yara yerine geldiği zaman aktive olarak makrofajlara dönüşürler, bakterilerin yok edilmesini ve yara yerinin debridmanını sağlarlar. Makrofajların önemi, yara iyileşmesinde hücresel ve biyokimyasal olayları etkileyen birçok sitokin ve büyüme faktörünü salgılamalarından gelir. Örneğin, TGF- β 'nın makrofajlardan başka kaynakları olsa da, makrofajlar yara bölgesinde günlerce kaldığı için en önemli kaynağı oluşturmaktadır. Akut inflamasyon sırasında damarsal geçirgenlik artışı sonucunda plazma komponentlerinin transudasyonu meydana gelir. Böylece komplemanlar, antikorlar ve diğer plazma komponentleri yara bölgesine geçer. Normal yara iyileşmesinde görevli diğer inflamatuvar hücreler lenfositler, plazma hücreleri ve mast hücreleridir. Bir diğer inflamatuvar hücre olan monositlerde benzer mekanizma ile yaraya ulaşmaktadır.^{16,17}

2.1.3. Proliferasyon fazı

Tipik olarak proliferasyon fazı yaralanmanın 5. ve 14. günleri arasında meydana gelir ve derinin hem epidermal hem de dermal tabakalarının onarım sürecinin başlaması ile karakterizedir. Fibroblastlar, makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücreler granülasyon dokusunun oluşumunu başlatmak için yaraya koordineli bir şekilde girerler.^{16,17}

Bu faz sırasında kollajen gibi yapısal proteinlerin sentezi 6-12 ay boyunca yüksek kalmaya devam etmektedir. Ancak skar yaralanması derinin en fazla %70 gerilim kuvvetine ulaşabilmektedir. İyileşme sürecinin en son noktasında skarın algılanan görüntüsü, çok sayıda hücre ve doku spesifik faktörlerden etkilenir. Biriken fibrotik dokunun miktarı ve organizasyonu bunlardan biridir.^{16,17}

Deri yaralarının yeri ve hastanın yaşı fibrozis ve yara iyileşme cevabının belirlenmesinde rol oynamaktadır. Bir takım araştırmalar deri pigmentasyonundan sorumlu olan melanositlerin toplanmasının skar görüntüsüne genellikle katkıda bulunmadığını göstermiştir. Granülasyon dokusundaki ter ve sebase glandları da içeren epidermal ekler normal dokuya göre tipik olarak azalmıştır. Kılların seyrekliği de skar kontrastını arttırmaktadır. Son olarak iyileşmiş yarayı örten rejenere epidermis düzleşmiş görüntüsü ile ayrılabilir. Bunun nedeni yeni oluşmuş epidermin daha düşük yoğunlukta ondülasyon içermesidir. Bu aynı zamanda dokunun mekanik özelliklerini de etkilemektedir.^{16,17}

2.1.4. Yara iyileşmesinde skar redüksiyonu

Yara iyileşmesinde en son ve en uzun faz yeniden yapılanma'dır. Öncelikli süreç, kollajenin dinamik yeniden yapılanma ve matür bir skar formasyonudur. Kollajenolitik aktivite ile kollajen sentezi arasında bir denge kurulur. Yeniden yapılanma sırasında kollajen sentezinde bir azalma olmasına rağmen, yaranın yırtılma kuvvetinde bir artış söz konusudur. Bu kazanç, yeni oluşan kollajenin yapısal modifikasyonunun sonucudur. Histolojik olarak, erken dönemde organize olmamış kollajen fibrilleri, kalınlaşır ve yoğun liflerden oluşan fasiküllere dönüşürler. Kollajen fibrillerinde çapraz bağların oluşumu, bu morfolojik değişikliklerden ve yırtılma kuvveti artışından büyük oranda sorumludur. Bu çapraz bağlar kollajen molekülleri arasında oluşan güçlü kovalen bağlardır. Yeniden yapılanma fazı, kollajenin fibroblastlar tarafından ilk sentezinden sonra, skar matürasyonu sırasında aylar, hatta yıllar boyunca süren dinamik bir süreçtir. Bu süreç kusursuz değildir ve iyileşen derinin yırtılma kuvveti hiçbir zaman normal derinin yırtılma kuvvetine ulaşamaz. Yırtılma kuvvetindeki artış, ilk üç ay boyunca plato çizer.^{16,17}

2.2. EKSTRASELLÜLER MATRİKS VE GROWTH FAKTÖR ÜRETİMİ

Yarada fibroblastların üretim rollerinden ikisi kalıcı ECM ve GF (Growth factor) üretimidir. Buna göre fibroblastlar yara iyileşme sürecine sadece kollajen üretimi ile katılmazlar. Aynı zamanda matriksteki diğer hücrelerin büyüme ve fonksiyonunu da regüle ederler. Kollajen üretimi doku yaralanmasında yaklaşık 3-5 gün sonra başlar. Bu üretim çok çeşitli GF'ler tarafından uyarılır. Prokollajen olarak bilinen kollajen peptidleri fibroblastlar içerisinde sentezlenir ve ECM'e gönderilir. Prokollajen üretiminin kritik basamağı endoplazmik retikulum içinde gerçekleşen lizin ve prolin rezidülerinin hidroksilasyonudur. Bu süreç her bir molekülün ekstrasellüler agregasyonunun fibrillere dönüşmesi için gereklidir ve O₂-vitC- alfa ketoglutarat ile Fe iyonu gibi çok sayıda kofaktöre bağımlıdır. Prokollajenlerin intrasellüler işlenmesi bittiğinde her bir kollajen zinciri ECM'e sekrete edilir. Ardından burada enzimatik parçalanmaya uğrayarak fibrillere dönüşecek agregatlar olarak hazırlanır. Agregasyon süreci yara iyileşmesinin proliferatif fazı sırasında fibroblastların diğer bir ürünü olan Peptidoglikanlar ile kısmen kolaylaştırılır. Yaralanan dokuda ve matür skarlarda dermal kollajenin %80-90'ının Tip1 iken kalan %10-20'si Tip3 kollajenden oluşmaktadır. Ancak erken yara iyileşmesi sırasında bu oran Tip3 kollajen lehine değişmektedir ve Tip3 kollajen oranı %30'a çıkmaktadır. Yara iyileşmesinde kollajenin iki görevi vardır. Yara gücünü artırmasının yanında yara iyileşmesine katılan diğer hücrelerin hareketini de kolaylaştırmaktadır. Fibroblastlar; çeşitli sitokinler ve GF üretimi ile yara iyileşmesinin diğer süreçlerini de regüle etmektedirler. Özellikle fibroblastlar tarafından uyarılan IL₁ (interlökin 1) ve TNF α (Tümör nekrozis faktör alfa) üretiminin yara iyileşmesinin süreçlerinde birçok fonksiyonu olan PDGF (Platelet derived growth factor)'un üretimini uyardığına inanılmaktadır. Fibroblastlar ayrıca yara iyileşmesi sırasında sinir büyümesi ve keratinosit proliferasyonunu uyaran NGF (nerve growth factor)'yi de üretmektedirler.^{16,18}

2.3. PEPTİDOGLİKANLAR

Peptidoglikan (PG)'lar çeşitli yapı ve uzunlukta Glikoaminoglikan (GAG)'ların bağlandığı polipeptid zincirlerdir. Dermiste PG'lerin en yaygın örnekleri kısa decorin ve uzun versican'dır. Bu PG'lara bağlanabilen GAG'larsa HA, dermatan sülfat (DS), KS ve heparan sülfattır (HS). PG ve ona bağlı GAG'lar hep birlikte ECM içindeki sitokinleri, GF ve diğer solubl proteinleri yönlendiren, düzenleyen bilgi habercileri olarak hizmet eder. Bu etkisine iyi bir örnek anjiogenezisin en potent stimulanı olan Fibroblast growth faktör₂ (FGF₂) ve HS arasında olandır. HS eksikliğinde FGF₂ tam fonksiyon gören reseptöre rağmen hücreleri uyaramamaktadır. Yara iyileşmesinin dinamik süreçlerinde GAG'ın rolü yara içinde spesifik GAG'ların değişken ekspresyonu ile izlenebilir. Örnek olarak yara iyileşmesinin ilk 2 haftasında HA baskın GAG'tır ve daha sonra yerini KS ve DS'a bırakır. Zaman içinde HA tekrar predominant GAG olur. Bu değişiklikler HA'nin hücreler ve kollajen matriksi arasındaki adeziv etkileşimleri bozabilme ve dolayısıyla hücre migrasyonunu kolaylaştırabilme yeteneğine uymaktadır. Diğer yönden kondroitin sülfat ve dermatan sülfat kollajen moleküllerinin doğru polimerizasyonu ile matür fibrillere dönüşmesi için gerekli yardımı sağlar. Sağlam derinin normal komponenti olan elastin skarlarda üretilmez. ECM'in bu bileşeninin eksikliği skar dokusunda izlenen sertlik ve fleksibilite kaybının açıklaması olabilir. Skar dokusunda elastinin eksikliğinin altında yatan mekanizma tam anlaşılamamıştır.¹⁶

2.4. ANJİOGENEZİS

Hasarlanmış kan damarlarının yara çevresindeki intakt kapilerlerden filizlenme ile yer değiştirmesi sürecidir. Artmış laktat, düşük pH, düşük O₂ gibi doku çevresindeki lokal değişiklikler anjiogenezisi stimüle etmektedir. Ek olarak yara iyileşmesinin inflamasyon fazı sırasında üretilen çok sayıda GF ve sitokin, anjiogenezisi uyarmakta ve regüle etmektedir. Bu sırada anjiogenezde etkili 4 kritik GF olan VEGF (vascular endotelial growth factor),

FGF, eritropoetin ve TGF- β ortaya çıkar. Angiogenezde Peptidoglikanlar ve MMP (matrix metalloproteinase)'lerde ECM'in düzenlenmesini belirgin şekilde etkilemektedir. Yaralanmadan yaklaşık iki gün sonra endotel hücreleri yara içine fibroblastlara benzer şekilde göçerler. Endotel hücreleri VEGF, FGF, anjiopoetin ve TGF β tarafından uyarılır. Bu solubl faktörlere ek olarak endotel migrasyonunda kritik olan 2 yapısal özellik de kanıtlanmıştır.

- 1) ECM varlığının zorunluluğu
- 2) Komşu endotel hücrelerinin eksikliğinin gerekliliğidir ("serbest kenar etkisi" olarak bilinmektedir)

ECM'de yön bulabilmek için endotel hücrelerin integrin ve MMP ekspresyonu zorunludur. İntegrinler ECM için major hücre yüzey reseptörüdür ve endotel hücrelerindeki ekspresyonları VEGF, FGF, TGF β tarafından uyarılmaktadır. Angiogenez açısından en önemli integrin $\alpha_5\beta_3$ gibi görülmektedir. Bu özel integrin normal dokuda sürekli ekspresyon edilmemektedir. Buna karşılık $\alpha_5\beta_3$ ekspresyonu yara iyileşmesinin yaklaşık 3. gününde ortaya çıkar ve granülasyon dokusu matürasyonunun ardından belirlenemez. Angiogenezde $\alpha_5\beta_3$ 'ün özel önemi fibrin ve fibronektin içeren matriksteki birçok proteini tanıma ve bunlara bağlanabilme yeteneği olan tek integrin olmasıdır. $\alpha_5\beta_3$ integrinin rolü endotel hücrelerinde ECM reseptörü olma yanında endotel hücre yüzeyine MMP₂'nin yerleşmesini kolaylaştırmaktır. MMP'nin ekspresyonu angiogenez sırasında endotel migrasyonunu stimüle eden faktörlerin birçoğu ile stimüle edilmektedir. Bu faktörler GF, VEGF, FGF2, TNF α dir. Angiogenez sırasında MMP'nin fonksiyonel rolü bazal membranın yıkımı, endotel hücrelerini migrasyonu ve tübül oluşumu ile yeni kapillerin oluşumu için gereken ECM'in diseksiyonunu sağlamaktır. Günümüzde angiogenezdeki en önemli MMP'ler; MMP₁₋₉, MTMP, MT₁₉ dur. Kollajenaz olarak da bilinen MMP1, tip1 kollajenin matriks içinde endotel hücre migrasyonu için gereklidir. Daha önce bahsedildiği gibi $\alpha_5\beta_3$ integrin ile birlikte MMP₂ endotel hücrelerinin yüzeyine yerleşiktir ve ECM içine endotel hücrelerinin migrasyonunu sağlamak için kızak ayağının karı yarması gibi ECM'i yarmaktadır. MMP₂₋₉ birlikte endotel hücrelerinin

migrasyonu ile tübül formasyonunun oluşumunu etkilemektedir. MTMMP'lerin kesin rolü tam olarak bilinmemektedir ancak MTMMP'lerin inhibisyonu, yeni oluşan kapillerin gecikmiş diferansiyasyonuna yol açmaktadır. MMP19'un ekspresyonu inflame ve yaralanmış sinovyal dokunun endotelial hücrelerinde belirlenmiştir bu da anjiogeneizde rol oynadığını düşündürmektedir. Bütün olarak ECM anjiogenezi g   l  şekilde etkilemektedir. Fibronektin, kollajen, vitronektin gibi ECM'in çeşitli komponentleri hep birlikte kapillerin invazyonu için yapısal destek sağlamakta ve ek olarak FGF₂ ve TGF  gibi önemli GF'lere bir depolama alanı olarak görev yapmaktadır. Ayrıca her bir fibril kapillerin migrasyonu için tren yolu gibi görev yapmaktadır.

Anjiogenezin oluşması için ECM'in spesifik komponentlerinden biride laminindir. Özellikle laminin₈₋₁₀ insan dermal endotelial hücreleri tarafından üretilen major subtiplerdir. Laminin₈,  ₅- ₃ integrinle etkileşerek fonksiyon yapar gibi görünmekte ve kapiller tübül biçimlenmesine katkıda bulunmaktadır. Laminin₁'in ekspresyonu anjiogeneiz sırasında en yüksek seviyesindedir ancak rolü hala belirsizdir.

Anjiogeneizde PG'lerin rolü son derece fazladır. Daha önce bahsedildiği gibi heparan sülfat FGF'nin aktivasyonu için gereklidir. İmmatür kapiller son derece porlu bir yapıdadır. Bu porlu yapı VEGF stimülasyonu sonucu oluşmaktadır. Kapiller mat re oldukça anjiopoetinlerin stimülasyonu ile normal fizyolojik şartlarda sızdırmaz hale gelirler. Dolayısıyla her ne kadar birçok GF proanjiogenik olarak kategorize edilse de süreç sırasında son derece farklı ya da ters etkilerle katkıda bulunmaktadır.^{16,18}

2.5. REEP TEL ZASYON

Reepitelizasyon sırasında ortaya çıkan büyük morfolojik değişiklikler, kalan rezidüel skarların dökülmesi ve sonunda granülasyon dokusu boyunca

intakt epiderminin tekrar oluşturulmasıdır. Derin olmayan ya da dikişli yaralarda reepitelizasyon sıklıkla 24-48. saatte tamamlanmaktadır.

Reepitelizasyon süreci ilerledikçe keskin kenarlı keratinosit kitlesi granölasyon dokusu boyunca hareket eder. Bu kenarın önde giden kısmı migrasyon yapan keratinositlerdir. Geçtikleri yerde proliferen olan keratinosit tabakası bırakılır. Temas kılavuzluğu olarak bilinen bu süreç keratinositlerin yaranın karşılıklı kenarlarına ulaşana kadar sürmektedir. Bu migrasyon ve proliferasyon sürecine katılan keratinositler en az iki anatomik bölgeden kaynaklanmaktadır. En bilineni yara son derece yakın olan hücrelerdir. Detaylı histolojik değerlendirme bu hücrelerin migrasyon hazırlığı için gereken beş anahtar histolojik değişikliği sergilediğini göstermiştir.

- 1) Keratinosit hipertrofisi
- 2) Polarize morfoloji
- 3) Keratinositler arasında intrasellüler GAP'ların varlığı
- 4) İntersellüler keratinosit düzenlenmesi
- 5) Fagositik süreç ürünleri içeren büyük vakuollerin varlığı

Yara iyileşmesi sırasında reepitelizasyona katılan keratinositlerin ikinci kaynağı yakındaki kıl kökleridir

Yeni çalışmalar mikronişin keratinosit kök hücre için bir rezervuar görevi yaptığını göstermiştir. Deri yaralanmasının ardından bu keratinosit kök hücreler yara içine göçmekte ve neoepidermisle bütünleşmektedir. Fonksiyonel olarak bu keratinositlerin neoepiderminin tam olarak rejenerasyonuna katkıda bulunduğuna inanılmaktadır. Yara iyileşmesinde görev alan diğer kök hücreler gibi keratinositlerde migrasyon proliferasyon, diferansiyasyon için çok sayıda faktör tarafından stimüle edilir. Bu faktörler düşük Ca, yüksek Mg, bölgedeki lipitlerin, peptidlerin ve proteinlerin hasarlanması, pH değişiklikleri ve hipoksidir. Reepitelizasyonda pozitif etki gösterenler GF'ler ve sitokinlerdir (FGF2,7,10 ile TGFβ). Keratinosit migrasyonunda özellikli rolü olan GF ise NGF, HGF (hepatocyte growth factor)dir. Keratinositlerin migrasyonu tercihen sağlam bir bazal membran

boyunca olmaktadır. Ancak daha sık olarak yaralanmalar bazal membran yıkılmasına neden olmakta ve keratinositler kollajen 1, 5, fibronektin, vitronektin ve tenascin'in oluşturduğu matriks boyunca göç etmek zorundadırlar. Fibrin sadece destek ya da kılavuz rolü oynamamakta aynı zamanda hücrel adezyonları bozarak doğrudan veya keratinositlerle plazminojeni bir araya getirerek dolaylı olarak keratinosit migrasyonunu stimüle etmektedir. Fibroblastların ECM boyunca migrasyonuna benzer şekilde keratinositlerde ECM'in yıkımını kolaylaştırarak göç eden hücreler için temiz bir yol sağlamak amaçlı çok sayıda enzim salgırlar. Bu süreçteki anahtar enzimlerden biri ürokinaz plazminojen aktivatörüdür (UPA). Doku hipoksisi plazminojeni plazmine çeviren UPA üretimini stimüle etmektedir. Keratinosit migrasyonunda diğer önemli bir grup enzim olan MMP'lerde plazmin tarafından aktive edilen GF'ler tarafından aktive edilir. MMP'lerin üretimi aynı zamanda HGF tarafından da stimüle edilir. MMP1'in (kollajenazın) spesifik ve kritik önemi keratinosit migrasyonu ile ilişkilidir. Epitelizasyon için önemli rolü olduğu belirlenmiş diğer MMP'ler MMP2 ve MT1MMP'dir. İntegrinler reepitelizasyona keratinositler ve ECM arasındaki etkileşimi kolaylaştırarak katılmaktadır. Örnek olarak epidermis bütünlüğü bozulmadan önce eksprese edilen major integrinler $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ dir ve bunlar lamininlere, kollajen tip1, tenascinC, fibronektin'e bağlanma yeteneğine sahiptir. Yaralanmaya cevap olarak keratinositler fibrin reseptörü $\alpha 5\beta 1$, fibrin ve vitronektin reseptörü $\alpha 5\beta 5$, integrin, fibronektin, vitronektin, tenascin C, TGF β reseptörü $\alpha 5\beta 6$, integrinin ekspresyonu keratinositlerde artmaktadır. Yeni çalışmalar reepitelizasyon sürecinde $\beta 1$ integrin ailesinin üyelerinin kritik rolünü göstermiştir. Keratinler ve konneksinlerde yara iyileşmesine cevap olarak regüle olmaktadır. Yaralanmadan sonraki 2-3 saatte basit keratin K6 ve asidik keratinler K16-17nin upregülasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Bu yapısal lifler hücrelere destek sağlamakta ve keratinosit migrasyonunda bir rol oynamaktadır. Santral sinir sisteminde hücreden hücreye sinyal iletimini kolaylaştıran konneksinlerde yaralanmadan sonraki saatler içinde upregüle olmaktadır. Bu proteinlerin keratinositler

arasında mesajları ileterek hücresel migrasyonu ve proliferasyonu kontrol etmeleri olasıdır.¹⁶

2.6. YARA İYİLEŞMESİNİN MATURASYON FAZI

Yara maturasyonunun klinik görünümü, kontraksiyon ve kızarıklığın uzaması, kalınlığın azalması, endurasyonunun azalması, gücün artmasıdır. Her ne kadar bu değişiklikler haftalar, aylar hatta yıllar içerisinde gelişmeye devam etsede başlangıçları yara iyileşmesinin proliferasyon fazı sırasında granülasyon dokusunun üretimi ile çakışmaktadır. Fibroblastlar ve ürünleri olan kollajen ve MMP'ler kan damarları ile birlikte yara maturasyonu ara bileşenlerini oluşturmaktadır. Yara kontraksiyonu yaralanmadan sonra yaklaşık 4 ile 5. günlerde başlamakta ve yara iyileşme çevresine bağlı olarak 2 hafta kadar sürmektedir. Dikiş konmamış bir yarada yara kenarları birbirlerine yaklaşık 0,6 ile 0,75 mm/gün hızında yaklaşırlar. Bu süreç fibroblastların miyofibroblastlara (MFB) fenotipik dönüşüm süresi ile koreledir. MFB'lar yarada yaralanmadan 4-6 gün sonra ortaya çıkar ve artmış aktin filamanı seviyesine bağlı olarak kontraktıl özellikleri belirginleşir. Fibroblastların MFB'lara fenotipik dönüşümünde PDGF ve TGF'nin rolü olduğu belirlenmiştir. NGF'nin yara kontraksiyon sürecine katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Çünkü MFB'larda α düz kas aktinin üretimini upregüle etmektedir. IL₈'in varlığı yara kontraksiyonun inhibe ediyor gibi görünmektedir. Bu durum uzun inflamatuvar bir süreçte gelişen yaralarda maturasyonun neden düzgün olmadığını kısmen açıklayabilir. Artmış yara gücü, azalmış yara kalınlığı arasındaki ters ilişki esas olarak kollajen tabanlı ECM'in remodelingine bağlanmaktadır. Bu remodeling süreci kollajen üretimi, kollajen yıkımı arasındaki dengeyi sergilemektedir. Fibroblastlar tarafından kollajenin üretimi yaralanmadan sonraki 21. güne kadar artmakta bundan sonra kollajen sentez hızı azalmaktadır. ECM kollajenlerinin artan miktarı Fibroblastları uyararak kollajen üretimini azaltmalarına neden olur. Bu otoregülatör düzenlemeye ek olarak İnterferon gama (IF γ), TNF α 'da

Fibroblastları kollajen sentezini düşürme yönünde uyarır. Her ne kadar 21. gününde kollajen miktarı maximum olsada yara gerginliği normal derinin sadece %20 civarındadır. İlk yaralanmadan 6 hafta sonra bu alanın gerilim gücü yaklaşık %80-90 seviyelerine çıkar. Uzun süreli göç asla başlangıçtaki gücü yakalayamaz. 6 ay sonra %80 civarında kalır. 3-6 haftalarda ortaya çıkan ve yara gücünü arttıran esas süreç kollajen yıkımı ve kollajen düzenlemesidir. Kollajen yıkımı esas olarak MMP ve TIMP üretimi ve aktivitesine bağlanmaktadır. MMP₂, TIMP ve MMP₇'nin artmış mRNA seviyeleri ECM remodelingin erken fazlarında gösterilmiştir. Aksine MMP_{1,9} ve TIMP, mRNA seviyelerin ekspresyonu ECM remodelingi öncesi düşüktür. Dolayısıyla düzgün yara maturasyonu için MMP ve TIMP'lerin koordinasyonu gerekli olabilir. Bu regülasyonun kısmen TGF β , PDGF, IL₁ ve CYR₆₁ aracılığıyla olduğuna inanılmaktadır. Diğer özellikli MMP ve TIMP'lerin matriks remodelingindeki rolleri henüz belirlenememiştir. Kollajen üretiminin azalması ve kollajen yıkımı artışı gibi çok sayıda değişiklikler ECM de meydana gelir. Zaman içinde Tip 1 kollajenin oranı Tip 3 kollajenle uyumlu olarak artmaktadır. Kollajen fibrillerinde oluşan değişiklikler; çapın artması, fibriller arası bağların artması ve fibrillerin yeniden düzenlenmesidir. Yara iyileşmesinin erken fazlarında kollajen fibrilleri gelişigüzel bir şekilde düzenlenmektedir. Bu özellik yara iyileşmesinin erken evrelerinde neden yüksek seviyede kollajen varken düşük gerilim gücü olduğu kısmen açıklayabilir. Zaman içinde fibriller daha organize bir hale gelir ve fizyolojik seviyelerdeki gerilimlere karşı daha dayanıklı bir deri oluşmaktadır. ECM remodeling süreci ilk 6 ayda en aktif dönemini yaşar daha sonraki 6 ayda aktivitesi düşer ve bundan sonra en minimal düzeye iner (asla sıfırlanmazlar). Skar maturasyonu oldukça yaranın kızarıklığı azalır. Bu değişiklik zaman içinde yaradaki kapillerlerin yoğunluğundaki değişikliği yansıtmaktadır. Genç yaralar göreceli olarak yüksek seviyede kapiller yoğunluğu ile karakterize iken matür yaralar daha az vaskülerdir. Trombospondin 1 ve diğerlerini içeren çok sayıda antianjiyogenik mediatörler bu değişiklikte bir rol oynayabilir. Kan damarları yarada zaman içinde niceleyici azalma gösteren tek bileşenler değildir. Fibroblast sayıları da azalmaktadır. Hep birlikte bu değişiklikler

göreceli olarak asellüler matür skar ile sonuçlanmaktadır. Apoptoz olasılıkla bu Fibroblast kaybına katkıda bulunuyor olsada kesin moleküler mekanizma henüz belirlenememiştir. Matür skarlarla ilgili diğer bir özellikte eklerin yokluğudur. Klinik olarak en aşikar deri eki kaybı kıl foliküllerin yokluğudur. Neoepidermisi bir araya getiren epitelyum tabakasının üretimine katkıda bulunan keratinosit kök hücrelerin aksine epitelyal eklerden sorumlu kök hücreler bir skarda bir araya gelmiyor gibi görünmektedir.¹⁶

2.7. FETAL YARA İYİLEŞMESİ

Fetal ciltte yara iyileşmesi sırasında skar doku oluşumu yoktur. Bu özel onarım sürecinin, intrauterin sıvı ve çevreye bağlı olmadığı birtakım çalışmalarda gösterilmiştir.¹

Fetal ve erişkin deri yara iyileşmesi arasında fetal doku, fetal fibroblastlar, doku komponentlerinin hızlı ve düzenli birikimi ve özellikle inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonlarının belirgin azalması ve sitokin görünümü gibi farklar mevcuttur. Fetal deri yaralarının iyileşmesi hızlıdır ve erişkin deri yarasına eşlik eden skar ve inflamasyon yoktur.^{1-2,4-5}

2.7.1. Fetal Çevre

Fetus GF'den zengin, sıcak, steril bir amniyotik sıvı içerisinde yıkanmaktadır. Fetusun böyle özel bir çevrede yaşaması nedeniyle, yapılan ilk çalışmalarda skarsız iyileşmeyi araştıranlar inutero şartlara odaklanmıştır. Ancak çok sayıda çalışma skarsız iyileşme için bu şartların gereksiz olduğunu ileri sürmektedir. Bu konuya değinen ilk deneylerden biri maternal uterus dışında anatomik ve fizyolojik gelişimin olduğu keseli modelinde yapılmıştır. Amerikan opossumunun genç kesesi kullanılarak yapılan deneyde Ferguson ve arkadaşları skarsız fetal yara iyileşmesini uterus dışında da gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu sonuç göz önüne alınarak

insan fetus derisinin erişkin atimik fareye subcutan yerleştirilip ardından yara oluşturulan deneyler yapılmıştır. Bu modelde subkütan greftlenmiş fetal deri skarsız iyileşmiştir. Aksine aynı gestasyonel yaştaki fetal deri atimik fare alıcıya kutanöz yerleştirildiğinde skarla iyileşmiştir. Fare ve insan Tip1 ve 3 kollajenini göstermek için immunhistomya boyası kullanılan daha sonraki çalışmalar subcutan greftlerin insan kollajeni ile skarsız şekilde iyileştiğini göstermiştir. Skarsız iyileşen yaranın kollajen şekli retikülerdir. Çevre dermisten ayrılamamaktadır. Aksine skarla ile iyileşen kutanöz greftler disorganize kollajen lifleri sergilemekte, epidermisten belirgin olarak ayrılabilir. Fare kollajen skarı kutanöz greftlerin tabanı boyunca mevcuttur ve subcutan greftler çevresinde ince bir kapsül mevcuttur. Bu durum insan fetal derisinde hem 18. hemde 24. gebelik haftalarında görülmektedir. İnsanda kollajen üreten fetal fibroblastlar erişkin serum ile perfüze edildikten ve erişkin çevrede inflamatuvar hücrelerle karşılaştırıldıktan sonra bile skarsız iyileşmiştir. Bu veriler skarsız deri iyileşmesinde fetal fibroblastların major efektör hücreler olduğunu düşündürmektedir. Skarsız iyileşmeye dair ek bulgular erişkin derinin intrauterin çevrede yaralanması ve skarla iyileşmeye devam etmesi deneylerle gösterildiği gibi çevreye bağlı değil ve dokunun kendisine bağlı olduğu gösterilmiştir. Fetal kuzulara transplante edilen erişkin koyun derisi gebelik sırasında daha ileri haftalardaki yaralarda skarla iyileşmiş ve normal erişkin yaralarından farksız olduğu izlenmiştir. Bununla birlikte fetal deri ve erişkin grefti arasındaki bileşkede anlamlı skar formasyonu izlenmemiştir. Bu da fetal derisinin erişkin deriye yapışabildiğini ve erişkin derinin skar cevabı oluşturmadığını düşündürmektedir. Bu deneylerde desteklenmektedir ki skarsız deri iyileşmesi fetal derinin kendisine bağlıdır.^{1-2,4-5}

2.7.2. Fetal Cilt

2.7.2.1.Gelişim

İnsan embriyosunda primitif epidermis 20. gebelik gününde ortaya çıkar. Epidermis ardından iki katmanlı periderm ve bazal hücre tabakası 4.ve 8.haftalarda gelişmektedir. Bu sırada embriyonik dermis son derece sellülerdir. Fetal periyod 8. gebelik haftasından sonra başlamaktadır. Fetal epidermis tabakalanmaya 9.haftada, keratinizasyon ise 14. haftada başlamaktadır. 16. haftadan itibaren fetal epidermisin erişkin epidermisine benzer şekilde çok sayıda komponenti oluşmuştur:

- Bazal hücre tabakası
- Orta hücre tabakası
- Kıl folikülü
- Ter bezleri
- Foliküler keratinizasyon

Bu sırada dermis son derece sellüler embriyonik yapıdan, daha fibrozis yapıya geçmeye başlar. Gebeliğin 24. haftasından sonra insan fetal deri gelişimi büyüme ve maturasyonla karakterizedir. Doğumda yenidoğan derisi erişkin derisinden histolojik olarak ayrılamaz.⁵

2.7.2.2. Yara iyileşmesi

Skarsız iyileşme fetusun doğum haftasına ve yaranın büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir. Erken haftalarda insan fetusunda insizyonel yaralar skarsız iyileşirken daf ileri fetus haftasında fibrozis ve skarlar iyileşmektedir. Bu değişken durum koyun, kemirgen ve maymun fetuslarında da gösterilmiştir. Skar oluşumunun gelişimi ilk başta epidermal tabakanın

kaybolduğu ancak kollajen şeklinin retiküler kaldığı geçiş yarası ile karakterizedir. Gebelik haftasının daha sonraki dönemlerinde fetal yara tipik postnatal skar ile iyileşmektedir. Cass ve arkadaşları deneylerinde skarsız yara iyileşmesinin derecesinde yara boyutunda etkili olduğu gösterilmiştir. Erken gebelik haftalarında koyun fetuslarının eksizyonel yaralarının iyileşmesi skarsız oluşurken daha ileri gebelik haftalarında yapılan aynı boyutta yaraların skarlı olarak iyileşme sıklığı artmaktadır. Ancak her bir gebelik haftasında yara boyutunun artırılması skarlaşma sıklığını artırır. Bu verilerin gebelik haftasına ve hasarın boyutuna bağlı olarak skarsız iyileşme için bir eşik olduğunu düşündürmektedir.^{3,5}

2.7.2.3. Organ spesifitesi

Fetusun deri yaralarında normal doku mimarisini geliştirebilme yeteneği mevcuttur. Bu nedenle fetal derinin onarım becerisi diğer organ sistemleri içinde araştırılmıştır. Fetal kemik erişkin karşılığına göre farklı iyileşme karakteri göstermektedir. Koyun fetusu uzun kemikleri hızla küçük kallus oluşturmakta ardından intramembranöz ve endokondral ossifikasyon sergilemektedir. Koyun fetusu defekti üç kat daha hızlı onarmakta postnatal koyunda asla iyileşmeyecek boyuttaki yaralarda iyileşme gerçekleşmektedir. Aksine fetal koyunlardaki insizyon diyafragma yaraları (skarsız iyileşen deri yaralarının olduğu gestasyonel haftalarda yaratılan) skar oluşumu ile iyileşmekte ve kas rejenerasyonuna dair herhangi bir bulgu izlenmemektedir. Erken gebelik haftalarında koyun fetuslarına yapılan mide yaralarında tavşan fetuslarında yapılan intestinal yaralar gibi skarlar iyileşmektedir. Skar, yaralanmış fetal sinir dokusu ve myokard sonrasında da izlenmektedir. Bu bulgular fetal diyafragmatik herni onarımı sonrası aşırı yapışıklık izlenen insan fetus cerrahisinde gözlemlerle tutarlılık sergilemektedir. Bu çalışmalar ve klinik gözlemler fetusun iyileşmeye cevabını erken gebelikte sürekli skarsız olmadığının sadece kemik ve derinin benzer rejeneratif kaliteye sahip olduğunu düşündürür.^{3,5}

2.7.2.4. Fetal hücreler, trombositler

Erişkin yaradaki ilk proinflamatuvar sinyaller trombosit kümelerinden kaynaklanmaktadır. Hemostazı başlatmada ek olarak erişkin trombositler TGF- β , PDGF_{a-b}'yi içeren çok sayıda sitokin sergilemektedir. Böylece trombosit degranülasyonu erken evrelerde onarımı regüle etmektedir. Erişkin ve fetal trombosit sitokin salınımı arasındaki farklılıklar iyileşme sürecinde araştırılabilir. Olutoye ve arkadaşları fetal trombositlerin kollajene cevap olarak kötü agregasyon sergilediklerini ve erişkin trombositleri ile karşılaştırıldığında daha az TGF- β ve PDGF_{a-b} içerdiklerini göstermişlerdir. Ancak fetal trombositlerin oynadığı spesifik rol hala belirlenememişse de erken inflamatuvar sinyallerin göreceli yokluğu daha az inflamasyon ve daha sonraki rejeneratif onarımı düzenliyor olabileceğini düşündürür.⁵

2.7.2.5. İnflamatuvar hücreler

Skarsız yara iyileşmesi fetal dokunun intrensek özelliği gibi görülmesi nedeniyle fetal hücrelerin eşsiz özellikleri bu yeteneğe katkıda bulunuyor olabilir. Postnatal iyileşmedeki en erken evrelerden biri inflamatuvar kaskadın başlamasıdır. Erişkin yaralarında PMNL'ler yaraya toplanır. Ardından makrofajlar ve lenfositler gelir. Aksine fetal yaralarda PMNL infiltrasyonu yoktur. İyileşme süreci ilerledikçe fetal makrofajlar yaraya girmekte ancak erişkine göre çok daha az sayıda bulunmaktadır. Çok sayıda araştırmacı bu fetal hücrelerin proinflamatuvar sinyallere uygun yanıtlar verebildiğini göstermiştir. Fetal PMNL'ler, makrofajlar ve lenfositler kemoreaktanlara cevap vermekte ve migrasyon yapabilmektedir. Ayrıca ışınlanmış bakteri varlığında ya da turpante ve carregan gibi irritanların varlığında yara içinde toplanabilmektedir. Fetal PMNL'lerin üçüncü trimestra kadar opsonize staphylococcus aerusu fagosit etme yetenekleri sınırlıdır. Bu sınırlı fagositoz süresince fetal serumda bakterileri etkili şekilde opsonize edememektedir. İnflamatuvar cevapların eksikliğinin nedeni fetal yaralarda uygun sinyallerin eksikliği ve fetal inflamatuvar hücrelerin immatürlüğünün sonucu olabilir.⁵

2.7.2.6. Fibroblastlar

İyileşme sürdükçe yara fibroblastları ECM makromoleküllerini sentezlemekte ve ECM remodelingini koordine etmektedir. Organize şekilde matriksi döşemekten ve skarsız iyileşmeden sorumlu olmaları nedeniyle skarsız yara iyileşmesinde fetal fibroblastlar kritik rol oynamaktadırlar. Fetal fibroblastlar invitro ortamda erişkine göre daha fazla total kollajen sentezlemektedirler. Erken gebelik (20 haftadan az) haftalarındaki fetal fibroblastlar daha ileri gebelik haftasındaki ya da erişkin fibroblastlarına göre daha fazla prolil hidroksilaz aktivitesi sergilemektedir. Fetal fibroblastlar ayrıca erişkine göre daha büyük oranda tip 3 ve tip 5 kollajen sentezlenmektedir. Fetal fibroblastlar erişkin fibroblastlara göre daha hızlı migrasyon yeteneğine sahiptir. Onarım sırasındaki bu artmış migrasyon hızı olasılıkla kollajen birikimi ve çaprazlaşmasını da etkilemektedir. Fetal fibroblastlar gelişim sırasında izlendiğinde yüksek migrasyon hızlarından düşük erişkin hızlarına doğru değişim sergilemektedirler. Artmış fetal migrasyon hızı, normal ve değişen erişkin fibroblastların migrasyon hızı arasındadır.

HA fetal matriksin major komponentidir. fibroblast migrasyonunu stimule etmektedir. Erişkin fibroblastların aksine fetal fibroblastlar HA miktarını azaltmazlar, hücre reseptör dansitesini arttırlar. Fetal fibroblastların erişkin hücrelere göre 2 ya da 4 kat fazla HA reseptörü mevcuttur. Ancak HA reseptörünün artmış ekspresyonu insan ve koyun fetal derisinin iyileşme modellerinde artmış fibroplazi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Düz kas özellikleri kazanmış olan bir grup fibroblastda iyileşme sırasında önemli gibi görünmektedir. MFB adı verilen bu hücreler düz kas alfa-aktini içermektedir. MFB'lar kısmen yara kontraksiyonu, skar remodelingi ve fibrozisten sorumlu olabilirler. Erişkinde MFB yarananmadan 5-7 gün sonra ortaya çıkmakta, matriks remodelingi oluşana kadar yarada kalmaktadırlar. 75 günlük fetal koyunlardaki eksizyonel yaralarda MFB ve skar yoktur. Gebeliğin 100. gününden sonra MFB ortaya çıkar ve skar oluşumu da başlamaktadır.

Fetuste MFB'ların yarananmanın hemen ardından ortaya çıktığı ve iyileşme sürecinde de ortadan kaybolduğu çalışmalarla gösterilmiştir.

Fetal ve erişkin dokuları arasındaki fibroblast migrasyonu, matriks üretimi ve matriksin farklılaşmasına bağlı oluşan farklar, hücre sinyal sistemlerindeki temel farklılıkları yansıtabilir. Yeni deneylerde erişkin ve fetal derideki tirozin kinaz hücre yüzey reseptörü karşılaştırılmıştır. Erken gebelik haftasında fetal rat derisindeki fibroblastlar, erişkin rat derisindeki fibroblastlar ile karşılaştırıldığında kendilerine özel hücre yüzey reseptörü ve intrasellüler sinyal molekülleri olduğu görülmüştür. Bu eşsiz sinyaller farklı gen ekspresyonuna, farklı protein üretimine ve hücresel farklılaşmaya yol açabilmektedirler.⁵

2.7.3. FETAL ECM

2.7.3.1. Kollajen

ECM'in yara iyileşmesinde kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. Fetal ve erişkin ECM arasındaki birçok fark tanımlanmıştır. Birincisi fetal yaranın etrafındaki yaranmamış kısım dermal kollajenden ayrılamayan ince ve retiküler şeklindeki yara kollajeni ile iyileşmektedir. İkincisi kollajenin yapısal farklılıklarına ek olarak iyileşen fetal derinin iyileşen erişkin deriye göre farklı kollajen tip görünüşü vardır. Koyun fetuslarındaki çalışmalar skarsız iyileşmede bu kollajen tiplerinin birikimindeki farklılıkların katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Hem fetal hemde erişkin derideki baskın form kollajen Tip1 olsada erişkin deriye göre fetal deride Tip 3 daha fazla oranda bulunmaktadır. İnsan fetal derisinde kollajen Tip 3 totalin %10-20'sini oluşturmaktadır. Fetus geliştikçe derideki kollajen oranları erişkine yaklaşmakta bu da skarsız iyileşme ile skarlı iyileşmenin geçişi ile koreledir. Kollajen Tip 1, 3, 4, 5 sırasıyla 75, 100 ve 120. gebelik haftalarında hızla birikmekte ancak yapıları değişmektedirler. Yaralanmadan 2 hafta sonra 75. ve 100. günlerdeki fetuslarda yara kollajen yapısı etraftaki yaranmamış deri

ile aynıdır. Ancak 120. günündeki fetuslarda yoğun yara kollajen skarı mevcuttur. İnvitro fetal fibroblastlar erişkine göre daha fazla Tip 3 ve 5 kollajen üretmektedirler. Yakın zamanda polivinil asetat süngerlerde kollajen birikiminin analizi yapıldığında fetal koyunlarda iyileşmenin erken fazlarında artmış kollajen birikimi gösterilmiştir. Tip 5 kollajenin alfa1 zincirlerinden alfa 2 zincirlerine geçişi gebeliğin 120. gününden sonra meydana gelir. Bu da skarsız iyileşmede kollajen fibrillerinin moleküler yapısının da bir rolü olduğunu akla getirmektedir.

Kollajen çaprazlaşması gestasyon yaşıyla artmaktadır ve skarlaşma fenotipine geçişle paralellik göstermektedir. Kollajen Tip 3 lifleri Tip 1 liflere göre daha küçük ve daha incedir. Tip 3 liflerin yüksek oranı lif birikiminin daha retiküler şekilde olmasına olanak sağlayabilir. Fetus geliştikçe ve Tip 3/Tip 1 kollajen oranı değiştikçe onarım gidişatını da değiştirmektedir. Kollajen çaprazlaşması matriks rijiditesini artırmaktadır ve skar gelişimi ile ilişkilidir. Erken fetal yaralardaki kollajen çaprazlaşmasının fazlalığı daha esnek matrikse olanak sağladığı ve dolayısıyla skarsız iyileşmeye katkıda bulunduğu düşündürmektedir. Tip 1'in yüksek oranı ve çapraz kollajen skar formasyonuna yol açıp açmadığı ya da skar oluşumunun bunlara yol açıp açmadığı bilinmemektedir. Postnatal onarım sırasında Tip 1 kollajenin üretiminin upregülasyonu ve hızlı kollajen çaprazlanması yaranmaya hızlı yama cevabı şeklinde olur.

Fetal ve erişkin kollajen üretimi arasındaki farklılıklar fibroblastların spesifik hücre yüzey reseptörlerinin etkileşimi sonucu olabilir. Kollajen lifleri hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve yara iyileşmesini regüle eden tirozin kinaz ailesindeki discoid domain reseptörüne (DDR) bağlanır. Chin ve arkadaşları DDR1 reseptörünün erken gebelik haftalarındaki fetal fibroblastların hücre yüzeylerinde büyük miktarlarda eksprese edildiği ve bu ekspresyonun gebelik haftası ilerledikçe azaldığını göstermişlerdir. Aksine DDR2 reseptörü gebelik süresince daha sabit bir ekspresyona sahiptir. Dolayısıyla hücre yüzey reseptörünün farklı ekspresyonu kollajen üretimini

modüle edebilir ve skarsız yara iyileşmesinin kendine has özelliklerine katkıda bulunabilirler.⁵

2.7.3.2. Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri (Fibronectin, tenascin) ve hücre yüzey reseptörleri (integrinler), erişkin yaralarına göre fetal yaralarda daha erken ortaya çıkar. Bu durumda potansiyel olarak daha hızlı hücreyel infiltrasyona ve daha hızlı fetal fibroblast migrasyonuna olanak sağlamaktadır. Gelişim sırasında tenascin hücre hareketini kolaylaştırmaktadır. Fibronectin ise hücre bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Fibronectin erişkin yaralarına göre fetal yaralarda daha fazla miktarlarda birikmektedir. Yaralanmadan sonra fetal, neonatal ve erişkin fare dudak yaralarında bir saat içinde birikmektedir. Benzer şekilde tenascin fetüste bir saat içinde yenidoğanda iki saat içinde, erişkin farede 24 saat içinde ortaya çıkar. Buna göre tenascin'in ilk ortaya çıkma zamanı iyileşme hızı ile paraleldir. Fetüste en hızlı, erişkinde ise en yavaştır. Fetal yaralardaki Fibronectin'in büyük miktarı yara onarımı sırasında hücrelerin birbirine bağlanmasını ve aktivasyonunu stimüle edebilir, tenascinin erken birikimi erken hücre migrasyonunu uyarabilir. Bu faktörler hep birlikte hızlı matriks birikimini ve epitelizasyonunu uyarmaktadır.⁵

2.7.3.3. Matriks degradasyonu

Yara iyileşmesi için matriks komponentlerin sentezi ve degradasyonunun gerekli olması nedeniyle matriks yıkımından sorumlu enzimlerinde fetal ve erişkinde farklı olması beklenmektedir. MMP ECM remodelingi ve yara iyileşmesinde görevli olan proteinaz ailesidir. Bu aile çeşitli kollajenazlar, jelatinazlar ve stromelyelinler içermektedirler. Yaralanmamış fetal deride MMP ekspresyonları skarsız iyileşme ile ilişkili olarak gebelik haftasıyla belirgin olarak artmaktadır. İnterstisyel kollejenazlar

stromelysin1 ve jelatinaz a; fetal dermal hücreler, keratinositler ve çevredeki vasküler yapılarda eksprese edilmektedir. Proteinazlar erişkin deride de bulunmaktadır ancak çok daha az hücrede eksprese edilmektedir. MMP gen ekspresyonu fetal rat deri yaralarında oluşan skarlı iyileşme incelendiğinde ekspresyonun da bir artış izlenmektedir. Ancak bu artışın miktarı skarlı iyileşen yaralara göre skarsız fetal yaralar da daha yüksektir. Ayrıca MMP'lerin doku inhibitör ekspresyonları skarlı dokularda daha yüksektir bu da MMP/TIMP aktivite oranının skarsız dokularda daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir. MMP'lerin ve ilişkili inhibitörlerin üretimi matriks birikimi ve degradasyonu arasında ince bir denge oluşturabilmektedir. Fetal yaraların MMP aktivitesindeki çok küçük değişiklikler bu dengeyi değiştirerek skarsız iyileşme için gerekli olabilen daha hızlı ECM turnoverine olanak sağlayabilir. Sonuç olarak fibrotik kaskadı değiştirerek skarsız fetal yara iyileşmesinin altında yatan mekanizmaları anlamaya dair çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Fetal ve erişkin onarımına dair mekanizma faktörleri bilinmektedir ve ileri çalışma için bir yön sağlamaktadır. İlk çalışmalar bu olgunun fetal derinin kalıtsal özelliği olduğu ve intrauterin çevrenin bu işte rolünün çok az olduğu göstermiştir. Fetal deride bulunan çok sayıda kendine özgü özellikleri daha ideal iyileşmeye katkıda bulunuyor gibi görünmektedir.

- 1) Proinflamatuvar sinyallerin eksikliği iyileşme sırasında erken inflamatuvar infiltrasyonu sınırlayabilmektedir.
- 2) Yüksek sentez yeteneğine sahip fibroblastlar hızlı ve skarsız bir şekilde kollajen depolayabilmektedir.
- 3) Diğer sitokinlerle birlikte TGF β izoformların farklı ekspresyonu skar oluşumunu azaltmaktadır.
- 4) Proteolitik enzimler ve inhibitörler arasındaki değişiklikler skarsız onarım için gerekli hızlı matriks turnoverine olanak sağlamaktadır.
- 5) Çeşitli şekillerdeki gen ekspresyonu ve hücre sinyali ve fetal dokuyu skarsız iyileşmeye yönlendirmektedir.

Yeni terapotik keşifler erişkinlerde iyileşmeyi fetustakine benzetmeye yönelmiştir.⁵

2.7.3.4. Glikoaminoglikan

Fetal dermis GAG' dan da zengindir. Özellikle HA gebeliğin erken dönemlerinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. HA, ECM'in hidrasyonunu regüle etmektedir. Hidroskopiktir, ECM içinde yarattığı hacim kendi hacminin 1000-10000 katı fazladır. Bu da hücrelerin proliferasyonuna izin verirken inhibitör temasları önlemektedir. Fetal yara matriksi aşırı HA içermektedir ve erişkin yaralara göre fetal yaralarda da daha uzun süre kalmaktadır. Koyun fetuslarındaki çalışmalar HA'nın fetal yara sıvısında hızla arttığını ve üç hafta boyunca yüksek seviyelerde kaldığını göstermiştir. Erişkinde 3. günde pik yapıp 5. günde hızlı bir şekilde kaybolmaktadır. Ek olarak fetal yaralar erişkin yaralara göre daha büyük miktarda HASA(HA stimulating factor) içermektedir. Fetal ve erişkin yara sıvısında HA seviyeleri ve HASA paraleldir ve olasılıkla yaralarda HA miktarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. HA reseptöründe fetal hücrelerde erişkine göre daha fazla miktarda bulunmaktadır.

Ek olarak fetal ve erişkin insan fibroblastlarını karşılaştıran yeni deneyler inflamatuvar sitokinlere cevap olarak HA üretiminden sorumlu olan Hyaluronik asit sentaz ekspresyonunda farklı olduğunu göstermişlerdir. Bu farklı regülasyon dolayısıyla HA fetal yaralarda erişkin yaralara göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu da fetal yara matriksinde fibroblast migrasyonu için daha geçirgen yapmakta ve fetal yaranın daha hızlı onarımını sağlayabilmektedir.⁵

2.8. YARA ONARIMINDA HYALURONİK ASİT FONKSİYONU

Hyaluronik asit, glukuronik asit, N asetil glukozamin disakkaritlerinin lineer polimeridir. İlk olarak gözün vitröz cisminde keşfedilmiştir. Ancak ardından eklemlerin sinovyal sıvısı ve deri gibi birçok vücut bölgesinde keşfedilmiştir. Vücuttaki birçok hücre; hücre sikluslarının belirli bir noktasında Hyaluronik asit sentezleyebilme kapasitesine sahiptir. Bu durumda

Hyaluronik asit'in çeşitli temel biyolojik süreçlerde fonksiyonu olduğunu akla getirmektedir. Hyaluronik asit'in doku onarım süreçleri ile ilişkili olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Bu ilişkiye dair bulgular birçok kaynaktan gelmektedir. Kendine has hidroscopik, viskoelastik özellikleri nedeniyle Hyaluronik asit'ler; hücrelerin ECM komponentleri ile kompleks etkileşimleri sonucu mikro ve makro çevreyi değiştirirler.^{10,19,20,21,22,23,24}

Yapılan birçok çalışmada fetal yarada Hyaluronik asit miktarı erişkin yaralara göre çok daha fazla bulunmaktadır ve fetal yarada erişkinine göre uzun süre yüksek kalmaktadır. Bu da Hyaluronik asit'in kısmen kollajen birikimini azaltması ve dolayısıyla skarlaşmayı azalttığı düşüncesine yol açmıştır. Hyaluronik asit'in fetal yara kalitesini nasıl etkilediğine dair mekanizma henüz açıklığa kavuşmamıştır. Ancak uzun süre Hyaluronik asit'ten zengin ortamın hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimini etkilemesi sonucu olması öngörülmektedir.^{19,25,26}

Eşsiz fizikokimyasal özellikleri ve daha önemlisi saf formunun non immünojenitesi nedeniyle özellikle göz ve eklem cerrahisinde yıllardır tıbbi uygulama alanı bulmuştur. Daha yakın bir zamanda doku onarım amaçlı yaralara eksojen Hyaluronik asit uygulanması bildirilmiştir. Hyaluronik asit tabanlı biomateriyallerin ortaya çıkmasını sağlamıştır.¹⁹

2.8.1. Hyaluronik asit fizikokimyasal özellikleri

Hyaluronik asit'ler doğadaki en hidroscopik moleküllerden birisidir. Bu tek özellik biyolojik fonksiyonlarına katkıda bulunan esas özelliklerinden biridir. Hyaluronik asit'in viskoelastisite, yer kaplayan ve kayganlaştırıcı etkisi gözde ve eklem sıvısında gereklidir. Hyaluronik asit'in hidroscopik olması nedeniyle Hyaluronik asit solusyonları son derece osmotiktir. Bu osmotik özellik böbrekteki osmotik tampon için önemlidir. Deride ise embriyonik gelişme ve inflamasyon süreçler sırasında artan Hyaluronik asit'in seviyesi doku hidrasyonunun kontrolü için önemlidir. Bu ek olarak hücre

proliferasyonu ve migrasyonu için önemlidir. Hyaluronik asit ECM'de hücre bağlanmasını zayıflatarak hücre migrasyonu ve bölünmesini kolaylaştıran geçici bir ayrılmaya olanak sağlar. Hidrate durumdaki Hyaluronik asit molekülü etrafındaki suyun çoğu immobilizedir bu da suyun ve küçük moleküllerin hareketlerinin kısıtlanmasını sağlar. Hyaluronik asit'in visköz yapısı; Hyaluronik asit'den zengin perisellüler bölgede viral ve bakteriyel pasajın geciktirilmesine yardım eder. Hyaluronik asit fizyolojik durumlarda tam olarak iyonizedir, perisellüler matriksdeki hücrel sinyallerde önemli olan iyon akımına yardım eder. Hyaluronik asit aynı zamanda serbest radikalleri tutmakta ve antioksidan olarak görev yapmaktadır. Hyaluronik asit bu fonksiyonları güneş radyasyonuna karşı koruyucu olarak özellikle deri fizyolojisinde önemlidir. İnflamasyonda Hyaluronik asit'in serbest radikal yakalama yoluyla düzenleyici bir etkisi de olabilir. Ayrıca yine inflamasyonda doku yıkan enzimleri ortamdan uzaklaştırarak koruyucu etkiye sahiptir.^{19,20,21,22,23,24}

2.8.2. Biyolojik Özellikleri

2.8.2.1.Hücre yüzey reseptörleri

Hyaluronik asit, üç ana hücre yüzey reseptörü hücreye bağlanır.

- CD44
- RHAMM
- ICAM1

CD44 vücutta geniş yayılımı olan bir reseptördür ve Hyaluronik asit için hücre yüzey reseptörü olarak bulunmaktadır. CD44 aracılı Hyaluronik asit hücre etkileşimi hücre-hücre ve hücre-substrat adezyonlarını içeren çok sayıda fizyolojik olayda görev almaktadır. Hücrenin migrasyon, proliferasyon ve aktivasyonu ile Hyaluronik asit'in uptake ve yıkımı CD44 aracılıdır.

CD44'ün invivo ortamdaki biyolojik rolü birçok dokuda hala belirlenememiştir ancak Kaya ve arkadaşlarının yaptığı yeni bir çalışma CD44'ün ekstrasellüler uyarılara cevap olarak keratinosit proliferasyonun regülasyonunda ve lokal Hyaluronik asit hemeostazisinin sürdürülmesinde fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre yüzeyinde RHAMM ekspresyonu hücre hareketleri ile ilişkilidir ve göç eden fibroblastlar ve metastatik tümör hücreleri gibi çok sayıda hareketli hücrelerde belirlenebilmektedir.

ICAM1 Hyaluronik asit için metabolik bir reseptör olduğu düşünülmekteydi. Ancak ICAM1 endotel hücreleri, makrofajlar ve diğer hücrelerde yaygın dağılımı olan bir hücre adezyon molekülüdür. Hyaluronik asit'in ICAM1'e bağlanması LFA1 ve Mac1 gibi lökosit integrinlerine bağlanmasında etkilemektedir. ICAM1 ile birlikte LFA1 ve Mac1 etkileşimi yoluyla lökositlerin endotel hücreye bağlanması inflamatuvar aktivasyonunu erken basamaklarında önemlidir. Dolayısıyla Hyaluronik asit'e bağlanan ICAM1'in ICAM 1 aracılı inflamatuvar aktivasyon kontrolüne katkıda bulunması olasıdır.^{19,20,21,22,23,27}

2.8.2.2. Matriks komponentlerine bağlanma ve yapısal biyolojik fonksiyon

Hyaluronik asit ECM'in ayrılmaz bir parçasıdır. Özellikle PG'ların organizasyonu için bir destek oluşturur. Ayrıca kollajen, fibrin ve diğer matriks molekülleri ile birliktelik sağlar. Doku hasarına erken cevap Hyaluronik asit'den ve fibrinden zengin geçici matriksin oluşumudur. Matriksin oluşturduğu bu yara alanı endotel hücrelerin ve fibroblastların akımını sağlar. Hyaluronik asit, ECM bileşenleri hücrelere bağlandığında hidrofilik doğası ya da yapısı yenidoğu alanı için hücrenin göçüne olanak sağlayan bir çevre yaratır. Ayrıca serbest radikal yakalama ve protein uzaklaştırma özellikleri hücrelere ve ECM moleküllerine serbest radikal ve proteolitik hasarda

korunma olanağı sağlar. Bu da akut ve kronik yaraların her ikisinin iyileşmesinde de aracılık yaptığı gösterir. Hyaluronik asit kıkırdaktaki kollajen ağı içerisinde hareketsiz kompleks PG yapılar için bir destek oluşturur. Bu kompleks matriks yapısı bu yarı sert dokunun yapısal ve mekanik özelliklerinden sorumludur.^{19,20,23}

2.8.3. Hyaluronik asit bağlayan proteinler

Hyaladeninler olarakta bilinen Hyaluronik asit bağlayan proteinler vücutta geniş şekilde dağılmıştır ve farklı fonksiyona sahiptir. Bunların genel özellikleri hücreleri diğer hücrelere ya da matriks komponentlerine bağlamaktır ve dolayısıyla matriks bütünlüğü hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin düzenlenmesinde önemlidir. TNF-stimulated gen Hyaluronik asit reseptör olan CD44 ile yakından ilişkili bir hyaladenindir. Hyaluronik asit'e bağlanırken serumdaki bir serin proteinaz inhibitörü olan inter alfa inhibitör ile sabit bir kompleks oluşturmaktadır. Nötrofillerdeki TSG6 ekspresyonu TNF α ile indüklenir. TSG6/iai kompleksi serin proteazların bir inhibitörleridir. Plazmin, tripsin ve katepsin g'yi içeren bu proteazlar doğrudan veya matriks MMP proenzimlerinin aktivasyonu yoluyla bağ dokusu yıkımına neden olabilirler. Bunlar ayrıca önemli bir inflamatuvar mediatör latent TGF β 'yi aktive ederler ve aşırı aktivasyonda skarlaşma komplikasyonlarına yol açarlar. Dolayısıyla bu kompleks inflamasyonun kontrolü ve inflamasyon sürecinin ileri evrelerinde ECM sabitliği için önemli bir negatif feedback mekanizması oluşturabilmektedir. Yeni bulgular iai'nin Hyaluronik asit ile kovalent bağlı sabit bir kompleks oluşturduğu perisellüler matriks oluşumunda önemli rolü olduğunu göstermiştir.^{19,20,23}

2.8.4. Hyaluronik asit oligosakkaridlerinin hücre davranışlarına direk etkileri

Hyaluronik asit oligosakkaridlerinin çeşitli modellerde anjigenezi uyardığı gösterilmiştir. Bu özellik akut ve kronik yaraların iyileşmesinde

potansiyel olarak yararlı olabilir. Hyaluronik asit oligosakkaridlerinin anijeneze aracılık yaptığı mekanizma bilinmemektedir. Ancak solubl Hyaluronik asit parçalarının IL1b, TNF α , ILGF1 gibi çeşitli sitokinlerin ekspresyonunu upregüle ettiği CD44 reseptör aracılı mekanizma boyunca makrofajlarla çeşitli inflamasyon genlerinin ekspresyonunu indüklediği ve endotel hücrelerinde kollajen üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Bu özellikler Hyaluronik asit'in reseptör aracılı mekanizma ile hücrel aktiviteyi doğrudan etkileyebildiği görüşüyle tutarlılık sergilemektedir.^{19,20,21}

2.8.5. Hyaluronik asit sentezi

Hyaluronik asit'in matriks molekülleri arasında kendine has özellikleri vardır. Sentezin ardından doğrudan ekstrasellüler boşluğa salınır. Hyaluronik asit sentezi hücre membranında gerçekleşir. Yeni sentezlenen Hyaluronik asit ekstrasellüler çevreye doğrudan çıkar ve sentez alanında son derece hidrate bir mikroçevre oluşumunu sağlar. Bu da mitoz ve migrasyon sırasında Hyaluronik asit sentezinin nasıl hücre ayrılmasını kolaylaştırdığını açıklayabilir.^{19,20,21,22}

2.8.6. Yara iyileşmesinde ekzojen Hyaluronik asit'e dair gözlemler

Birçok rapor Hyaluronik asit'in yara iyileşmesinde iyi bir gidişat sağladığını doğrulamıştır. Hayvan deneylerinde deri yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir. Benzer sonuçlar farelerde perfore tympan zarın iyileşmesinde de gözlenmiştir. Kornea epitelyum yara iyileşmesinde Hyaluronik asit'in ekzojen uygulanması iyileşmeyi uyardığı bildirilmiştir. Hyaluronik asit'in uzun süreli varlığının fetal doku onarımında skarsızlıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Fetal yaralarda yaranın içeriğinde erişkin yaralarına göre daha uzun süre yüksek kalmaktadır. Hyaluronik asit'in kısmen kollajen birikimini azalttığı ve buna bağlı olarakta skarlaşmayı azalttığı

düşünülmektedir. Bu sonuçlarla tympanic membranlarda uygulanan Hyaluronik asit'in skarsız iyileşmeyle sonuçlandığını gösteren Lorent ve arkadaşları ayrıca Hyaluronik asit'den zengin ortamın fibröz skarlardan sorumlu matriks hücrelerini inhibe ettiğini ileri süren Balosz ve Denlengerin hipotezleri ile paralellik sergilemektedir. Yeni bir makalede Went ve arkadaşları erişkin de ve geç gestasyonal fetal yara iyileşmesinde Hyaluronik asit'in ortamdan kaldırılmasının fibrotik skarlaşmayla sonuçlandığını göstermektedir. Venöz bacak ülserleri gibi kronik yaralarda Hyaluronik asit uygulamasının iyileşmeyi uyardığı gösterilmiştir. Birçok kronik yarada, kronik doku hasarının serbest O₂ radikalleri ve matriks yıkan enzimler yoluyla ortaya çıkan uzamış inflamasyonun bir sonucu olduğu kabul edilmektedir. Hyaluronik asit'in doku onarımındaki fonksiyonunun kompleks olduğu ve birçok özelliğinden herhangi birine spesifik olarak bağlamayacağı açıktır. Ancak Hyaluronik asit'e dair bugünkü kimyasal ve biyolojik ve morfogenez, onkoloji ve inflamasyon gibi biyolojik süreçlerle ilgili çalışmaların sonuçlarına bakıldığında yara iyileşmesinin birçok evresinde Hyaluronik asit'in mekanik rolü olduğu ileri sürülebilir.^{19,20,23}

2.8.7. Yara iyileşme sürecinde Hyaluronik asit'in rolü

Hyaluronik asit aracılı biyolojik süreçlerin birçoğu yara iyileşme sürecinde de temeldir. Yaralanmadan sonra yara iyileşmesi sıkı şekilde düzenlenen birbirini izleyen süreçlerden oluşur. Bunlar inflamasyon, granülasyon doku oluşumu, reepitelizasyon ve remodelingtir. Hyaluronik asit'in bu hücresel ve matrikse dair olaylarda çok yönlü bir görevi vardır.

2.8.7.1. İnflamasyon

İnflamasyon yara iyileşmesi için gerekli olan ve birbirini izleyen adımlardan birçoğunu ortaya çıkarmaktadır. Bunlar içinde GF'ler, sitokinler,

eikozonoidler bulunmaktadır. Yara iyileşmesinin erken inflamasyon fazında yara dokusu Hyaluronik asit'den zengindir. Bu da olasılıkla artmış sentezi yansıtmaktadır. Hyaluronik asit'in inflamasyonda birçok rolü vardır. Yara iyileşme sürecinde önemli olan erken inflamasyonun bir uyarıcısı olarak görev yapmaktadır. Kabayashi ve teraoda daha önce bahsedildiği gibi insan uterus fibroblastlarında Hyaluronik asit'in CD44 aracılı mekanizmalarla doz bağımlı olarak proinflamatuvar sitokinleri arttığı gösterilmiştir. TNF α -IL1b ile bakteriyel liposakkaridler gibi inflamatuvar sitokinlere cevap olarak endotel hücrelerinde Hyaluronik asit sentezlediği gösterilmiştir. Bu fenomen sadece mikrovasküler endotel hücrelerine aittir. Büyük damar endotel hücreleri bu özelliği sergileyemez. Biraz tartışmalı olan rolüde granülasyon doku matriksinin stabilizasyonuna katkıda bulunan inflamatuvar cevabı düzenlemesidir.^{10,19,20,24}

2.8.7.2. Granülasyon doku matriks organizasyonu ve granülasyon

Granülasyon doku matriksi Hyaluronik asit'den zengindir. Hyaluronik asit zengin matriks doku onarımı için gerekli olan çeşitli hücre fonksiyonlarına katkıda bulunabilir. Yara matriksine hücre migrasyonunu kolaylaştırır. Ayrıca inflamasyonun başlamasıda granülasyon dokusu için önemlidir.

2.8.7.3. Hyaluronik asit ve hücre migrasyonu

Granülasyon dokusunun oluşumu için hücre migrasyonu zorunludur. Erken granülasyon dokusunun bir özelliği olan Hyaluronik asit'den zengin ECM'den oluşan öncü yara matriksi hücre migrasyonunun oluşması için uygun bir çevre olarak görülmektedir. Hyaluronik asit fizikokimyasal özellikleri ile hücrelerle doğrudan etkileşerek hücre migrasyonunda görev alabilir. Fizikokimyasal özellik olarak; Hyaluronik asit hücre migrasyonunu kolaylaştıran açık hidrate bir matriks sağlamaktadır. Hücre etkileşimi yoluyla

ise Hyaluronik asit hücre lökomotor mekanizmalarının kontrolünü sağlamaktadır. Özel hücre reseptörlerinden RHAMM, hücre hareketi ile ilişkili ekstrasellüler sinyal aracılı proteinkinazlar gibi çok sayıda proteinkinazlarla bağlantı sağlarlar. Fetal gelişme sırasında nöral crest hücrelerin göçtüğü yolak Hyaluronik asit'den zengindir. Hyaluronik asit'e cevap olarak artmış hücre hareketi deneysel olarak diğer hücre tiplerinde de gösterilir. Buna paralel olarak Hyaluronik asit yıkımı ya da Hyaluronik asit reseptör blokajı ile hücre hareketlerinin kısmen inhibe edildiğinde gösterilmiştir. Hyaluronik asit sentezinde hücre migrasyonu ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Hyaluronik asit sentezi kendi başına hücre migrasyonunu kolaylaştıran dinamik bir güç sağlayabilir. Plazma membranından sentezlenir ve ekstrasellüler bölgeye doğrudan salgılanır. Bu da hücre migrasyonunu kolaylaştıran hidrate bir alan sağlar.^{19,20}

2.8.7.4. Hyaluronik asit ve inflamatuvar cevabın düzenlenmesi

İnflamasyon granülasyon doku oluşumunun ayrılmaz bir parçası olsada normal doku onarımının yürüyebilmesi için inflamasyonun hafifletilmesi ya da düzenlenmesi gerekir. Oluşan ilk granülasyon dokusu son derece inflamatuardır ve matriks yıkıcı enzimlerle düzenlenen aşırı bir doku turnoverı vardır. Ayrıca aşırı miktarda reaktif O₂ metabolitleri inflamatuvar hücreler tarafından salınır. Granülasyon doku matriksin stabilizasyonuna izin vermek için inflamasyonun hafifletilmesi gerekir. İnflamasyon-stimulasyon fonksiyonuna ek olarak Hyaluronik asit'in inflamasyon düzenleyici fonksiyonu vardır. Hyaluronik asit hücreleri serbest radikal hasarına karşı korumaktadır. Büyük poliyonik polimerlerin fizikokimyasal özelliği olarak serbest radikal yakalayıcı özelliği aracılığı ile bunu gerçekleştirebilmektedir. Farelerdeki serbest radikalle indüklenen inflamasyon modelinde Hyaluronik asit'in granülasyon dokusundaki hasarı azalttığı gösterilmiştir. Serbest radikal yakalayıcı rolüne ek olarak inflamasyonun biyolojik maddeleriyle olan spesifik etkileşimler yoluyla Hyaluronik asit inflamatuvar aktivasyonda negatif feedback

olarak görev yapmaktadır. İnflamasyonda üretilen en önemli sitokin olan TNF α , fibroblast ve inflamatuvar hücrelerde TSG6 ekspresyonunu uyarmaktadır. Hyaluronik asit bağlayan protein olan TSG6, serum proteaz inhibitör iai ile stabil bir kompleks oluşturarak plazmin inhibitör aktivitelere sinerjistik etki yapar. Buna göre ECM'de Hyaluronik asit'e bağlanan TSG6 iai kompleksinin etkisi inflamasyonu hafifleten negatif feedback yaratmak ve iyileşme süresinde granülasyon dokusunu stabilize etmek olabilir.^{10,19,20}

2.8.7.5. Anjiogenez

Hyaluronik asit'in anjiogenezin kontrolünde rolü vardır. ECM'deki yüksek molekül ağırlıklı Hyaluronik asit'in anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna karşılık düşük molekül ağırlıklı Hyaluronik asit oligosakkaritlerinin çeşitli deneysel modellerde anjiogenezi uyardığı endotel hücreleri tarafından kollajen üretimini arttırdığı gösterilmiştir.

Hyaluronik asit Oligosakkaridler (OS) endotel hücre fonksiyonunu ICAM1 reseptörüne bağlanma yoluyla düzenleyebilir. Hyaluronik asit OS'i makrofajlardaki CD44 resptörüne bağlanır ve TNF α ve İL1b gibi çok sayıda genin ekspresyonu indükleyebilir. Buda ICAM1 in upregülasyonuna ve ardından endotel hücrelerinin stimülasyonuna yol açabilir. Ancak yüksek molekül ağırlıklı Hyaluronik asit'de bu reseptöre bağlanabilir. Bu durumda nasıl farklı etkiler yarattığı bilinmemektedir. Bununla birlikte çeşitli invivo sistemde hyaluronidaz artışı ve matriks Hyaluronik asit'in yıkımı anjiogenezle eş zamanlı gözlenmektedir. Bu durum Hyaluronik asit OS'nin anjiogenezin kontrolünde fiziksel bir rolü olduğu hipotezine destek sağlamaktadır.^{19,20,21}

2.8.7.6. Reepitelizasyon

Hyaluronik asit'in normal epidermiste de önemli fonksiyonları vardır. Öncelikle bazal keratinositlerde ECM'in bir parçası olarak görev yapmaktadır.

Serbest radikal yakalama fonksiyonu ve keratinosit proliferasyonu ve migrasyonundaki rolü Hyaluronik asit'in reepitelizasyon sürecinde de görev aldığını düşündürmektedir. Normal deride epidermisin bazal tabakasındaki keratinositlerde Hyaluronik asit proliferasyonu olduğundan göreceli olarak yüksek miktarda bulunmaktadır. Epidermisin bazal tabakasinda CD44 ve Hyaluronik asit birlikte bulunmaktadır. Hyaluronik asit'in epidermiste primer fonksiyonu ekstrasellüler alanın sürdürülmesi ve besinlerin geçişi için açık ve hidrate bir alan oluşturmaktadır. Hyaluronik asit içeriği deride topikal retinoik asit uygulaması ile artmaktadır. Retinoik asitin bildirilen etkileri derideki UV hasarının ve yaşlanmasının etkilerinin geri çevrilmesidir. Hyaluronik asit'in serbest radikal yakalama özelliğinin güneş radyasyonuna karşı koruyucu olduğu ileri sürülmüştür. Bu da CD44'ün epidermiste Hyaluronik asit'in reseptörü olarak görev yaptığı düşüncesini desteklemektedir. Epidermal Hyaluronik asit normal epidermis fonksiyonu ve doku onarımında gerekli olan keratinosit proliferasyonunun kontrolündede etkilidir. İyileşen yaralarda Hyaluronik asit yara kenarındaki bağ doku matriksinde ve yaraya göçen keratinositlerde eksprese edilmektedir. Kaya ve arkadaşları CD44 ekspresyon supresyonunun hayvanlarda yüzeysel dermiste defektif Hyaluronik asit birikimi ile sonuçlandığını, buna çeşitli mitojen ve GF'e cevap olarak bozuk keratinosit proliferasyonu ve bazal keratinositlerde farklı morfolojik değişikliklerin eşlik ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte doku elastisitesinde azalma, bozulma, lokal inflamasyona cevap ve bozulmuş doku onarımı da gösterilmiştir. Bu gözlemler doku onarımı ve deri fizyolojisinde Hyaluronik asit ve CD44'ün önemli rolü olduğunu desteklemektedir.^{19,20,21}

2.9. ELASTİK LİFLER

Vertebralı dokuların elastikliği ekstrasellüler bölgedeki elastik liflerin varlığı sayesinde sürdürülmektedir. Bu yapılar deri, akciğer, ligamanlar ya da büyük arterler gibi esnekliğin gerekli olduğu dokularda daha fazla miktardadır. Özel ve merkezi komponenti elastindir ve elastisitesinden

sorumlu ECM proteinidir. İnsolubl, amorf, hidrofobik, aşırı çapraz bağlı bu protein, dokuya bağlı olarak çeşitli miktarlarda mevcuttur. Elastinin merkezini çevreleyen mikrofibriller komponent büyük oranda glikoprotein'den oluşmaktadır.^{28,29}

2.9.1. Elastogenezis

İnsan elastin geni kromozom 7 de yerleşik tek kopya genidir. Ekzonları tekrarlayan hidrofobik ve lizin içeren proteinleri kodlar. Birçok dokuda elastin üretimi gebeliğin ortalarında başlar ve doğuma yakın ya da erken yenidoğan döneminde en yüksek seviyeye ulaşır. Ardından çarpıcı bir biçimde üretimi azalır ve matüriteyle tamamen baskılanır. Elastin gen ürünün adı tropoelastidir. Elastin ekspresyon kontrolü transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyelerde regüle edilir. Örneğin TNF α ve BFGF elastin gen ekspresyonunu down regüle ederken, glukokortikoidler, IL 1b-10, IGF1in tam aksi etkisi vardır. Bir diğer yandan TGF β 1 elastin birikimini, elastin mRNA stabilitesini artırarak posttranskripsiyonel seviyede upregüle etmektedir.²⁸

2.9.2. Matür Elastin

Tamamen insolubledür, birbirine kovalent bağlarla bağlı tropoelastin moleküllerinden oluşmuştur. Bu sıkı bağlı bileşikler arasında son derece hidrofobik segmentler meydana gelir. Son derece hidrofobik olmasına rağmen elastin son derece hidratedir. Suyun içinde yüzmektedir. Su yokluğunda elastik değildir. Elastinin hidrofobik ve son derece çapraz bağlı doğası onu sağlıklı dokularda neredeyse hiç turnover olmayan enzimatik proteolize dirençli son derece sağlam bir polimer haline getirmektedir.^{28,29}

2.9.3. Elastin peptidleri doğası ve kökeni

2.9.3.1. Elastin turnoverı

Elastin turnoverı normal fizyolojik şartlarda neredeyse olmamaktadır. Ancak büyük miktarda elastin peptidleri çeşitli patolojik ve fizyopatolojik süreçlerde üretilmektedir. MMP2-7-9-12 gibi MMP'ler elastin yıkımı ile ilişkili farklı patolojilerde eksprese edilen elastazlardır. Ek olarak inflamatuvar zeminde lökosit elastaz salınımı elastin ağında yıkıma neden olmaktadır. Bu şartlarda üretilen elastin peptidleri daha çok matriks yıkım ürünlerine benzer.^{28,29}

2.9.3.2. Biyolojik aktivite

Elastin peptidlerin fibroblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, lökositler, monosit ve lenfositlerin hücrel fizyolojisini module ettiği gösterilmiştir.²⁸

2.9.3.3. Elastik lif Fonksiyonu

Elastik liflerin enaz üç kritik fonksiyonu mevcuttur. Dinamik bağ dokunun elastisitesinden sorumlu ana yapısal elemandır. Ayrıca elastik lif molekülleri hücre bağlanmasına doğrudan aracılık etmekte ve böylece migrasyon, sağ kalım ve diferansiyasyonu regüle etmektedir. Mikrofibriller ve çapraz bağlı elastin içeren elastik lifler vertebralıların yüksek basınçlı dolaşım sistemlerinde ve diğer fonksiyonlarında desteklemek için gereklidir. Elastin lizil kaynaklı çapraz bağlantıları nedeniyle son derece insolubldur ve çapraz bağlı elastin merkez doku elastisitesine en az katkısı sağlayan bölümdür. Tekrarlayan şekilde elastik sarmallar ile bu etkisini gösterir.^{29,30}

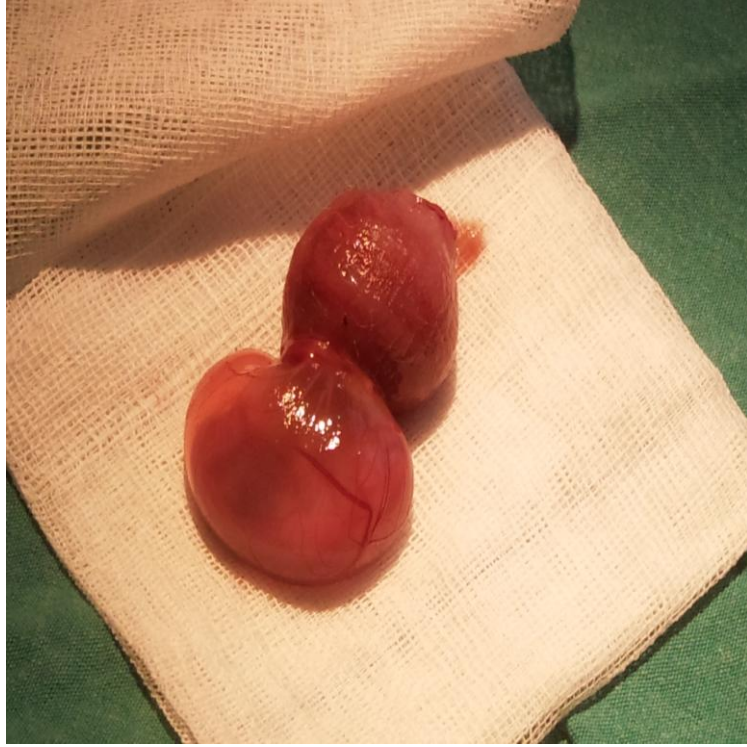
3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyi Lokal Etik Kurulunun onayı alındıktan sonra, Laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanımına dair kılavuz ilkelerine uygun olarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı'nda ve Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

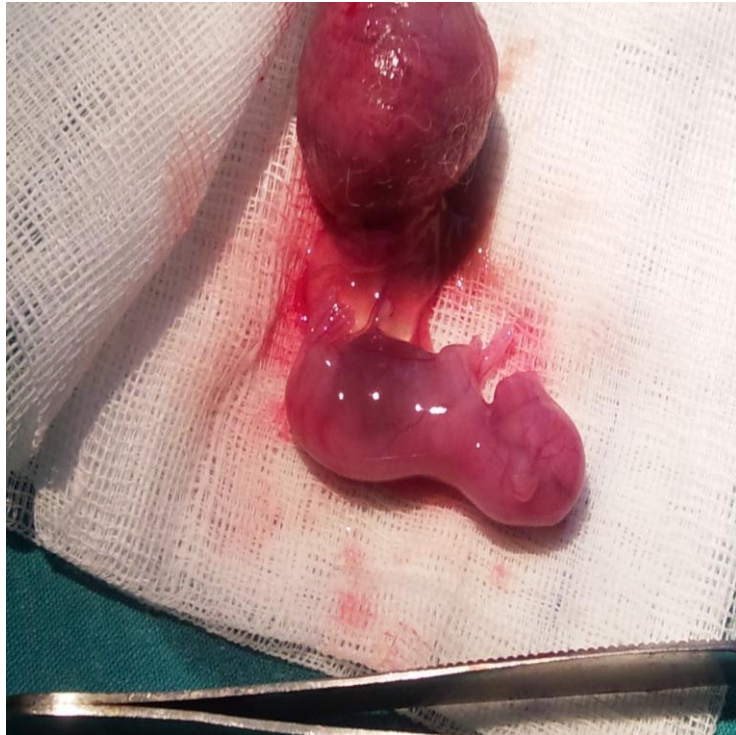
Çalışmanın ilk aşamasında denek olarak gebeliğinin 20. gününde olan üç adet yeni Zelanda cinsi tavşan dışarıdan satın alındı. Hamile tavşan 35mg/Kg'dan ketamin hidroklorid ve 5 mg/Kg'dan xylazine hidroklorid ile uyutulduktan sonra karın bölgesi temizlenerek cerrahi işleme hazırlandı. Karın vertikal kesi ile açılarak uterusu ulaşıldı (Resim 3.1). Histerektomi ile fetuslar dışarı alındı (Resim 3.2, 3.3). Dolaşımları durmadan skarsız iyileştikleri bilinen deri, trakea ile skarlı iyileştikleri bilinen mide ve diyafragmadan yaklaşık bir cm³ hacmindeki doku örnekleri alındı (Resim 3.4-3.6). Üç anneden altı fetusun örnekleri elde edildi.



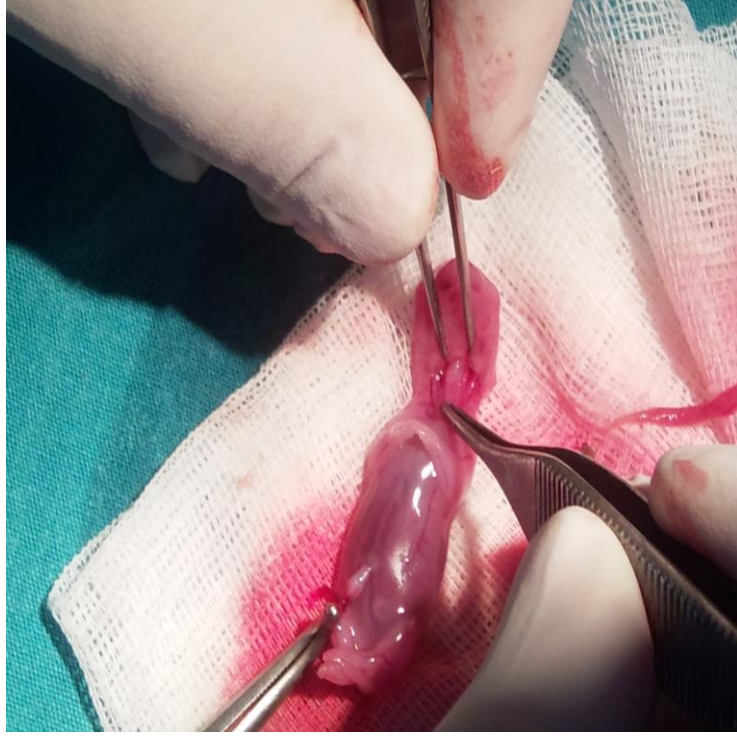
Resim 3.1: Erişkin tavşan ve uterus içindeki fetal tavşanlar (histerektomi öncesi)



Resim 3.2: Fetal tavşan (histerektomi sırasında)



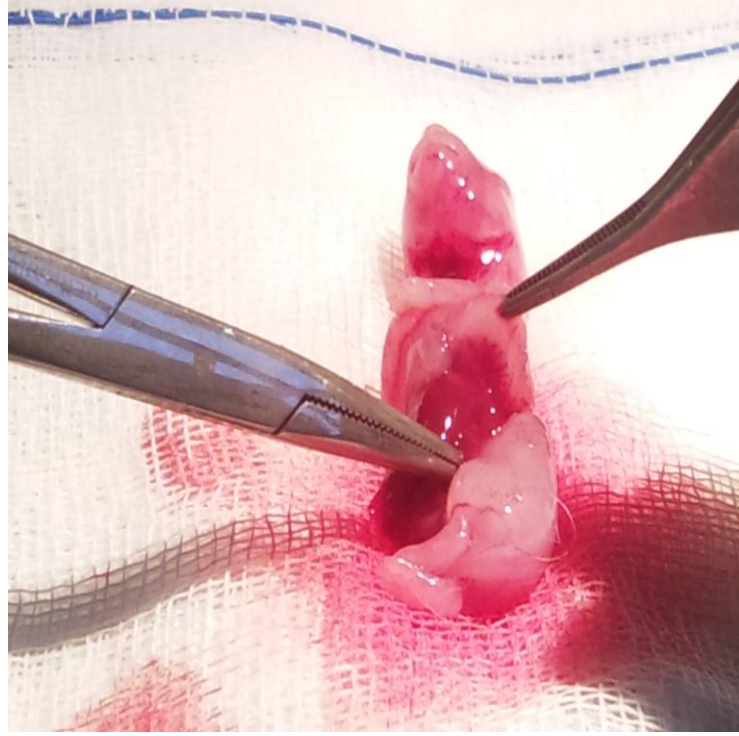
Resim 3.3: Fetal tavşan (histerektomi sonrası)



Resim 3.4: Fetal tavşandan trakeal parça alınması



Resim 3.5: Fetal tavşanda mideden parça alınması



Resim 3.6: Fetal tavşanda diyafragmadan parça alınması

Daha sonra yetişkin dokusu ile de karşılaştırmak için annenin deri, trakea, mide ve diyafragmasından doku örnekleri alındı. Örnek alma işlemi tamamlanınca tavşanlar derin anestezi ile öldürüldü.

Doku örneklerine uygulanan %10'luk formaldehid tespitinden sonra rutin parafin takip uygulanmıştır ve altı mikrometrelik kesitlerde hematoxilen eozin boyanarak ışık mikroskopik değerlendirme yapılmıştır.

Işık mikroskopik incelemede yetişkin ve fetal, solunum yolları, mide duvarı, peritona ait mezotelyal döşenme ve altında çizgili kas dokusu ve tam kat deriye ait doku örnekleri izlenmiştir.

Parafin bloklardan elektrik yüklü lamlara altı mikrometrelik kesitler alınarak immünohistokimyasal ve histokimyasal boyamalar yapılmıştır. İmmünohistokimyasal olarak elastik liflerini araştırma amacı ile anti alfa elastin antikoru (abcam-ab21607) ve hyalürik asit varlığını araştırma amacı ile anti

hyalürik asit antikoru (abcam-ab53842) kullanılmıştır. Boyama işlemleri streptavidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda, uygun sekonder antikolar kullanılarak (abcam-ab64264, ab53842) ve “HRP/DAP detection kit” (abcam-ab64264) ile gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal incelemelerde değerlendirmeyi çok zorlaştıran zemin boyanması bulunması nedeni ile ayrıca histokimyasal yöntem ile de elastik lifler için “Verhoeff’s Elastic” boyası hyalürik asit için de PAS/Alcian blue kombine boyası yapılmıştır. “Verhoeff’s Elastic” boyasında siyah lifler şeklindeki boyanma matür elastik lif boyanması olarak kabul edilmiştir. PAS/Alcian blue boyasındaki zemindeki parlak mavi boyanma hyalürik asit için pozitif boyanma olarak değerlendirilmiştir. Bu boyadaki PAS birleşimi immatür elastik liflerini eş zamanlı olarak gösterebilmek amacı ile yapılmıştır. Parlak pembe renkli boyanma PAS pozitif olarak kabul edilmiştir. Bütün mikroskopik değerlendirmeler OlympusBX50 ışık mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Mikroskopik değerlendirme elastik liflerin varlığı ve lokalizasyonu belirtilerek, hyalürik asit ise 100’lük mikroskopik büyütmede zemindeki boyanmanın yaygınlığı ve şiddetine göre derecelendirilmiştir (Tablo 3.1, 3.2).

Tablo 3.1: Dokuların elastinle boyanma özellikleri

Boyanma	(-)	(+)
Elastin varlığı	Yok	Var

Tablo 3.2: Dokuların hyaluronik asit boyanma şiddetleri

Boyanma şiddeti	(-)	(+/-)	(+)	(++)
Hyalüronik asit	Negatif	Soluk pozitif	Orta şiddette pozitif	Kuvvetli pozitif

Dokulardaki elastin ve HA miktarına göre dokular nümerik olarak sınıflandırıldı. İstatistiksel karşılaştırma için Mann-Whitney U. yöntemi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. FETAL DOKULARDAKİ ELASTİN DAĞILIMI

Fetal tavşandan alınan cilt, mide, diyafragma ve trakea dokularındaki elastin varlığı Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Fetal dokulardaki Elastin varlığı

Denek	Doku	Elastin
1. fetus	cilt	-
	trakea	-
	mide	-
	diyafragma	-
2. fetus	cilt	-
	trakea	-
	mide	-
	diyafragma	-
3. fetus	cilt	-
	trakea	-
	mide	-
	diyafragma	-
4. fetus	cilt	-
	trakea	-
	mide	-
	diyafragma	-
5. fetus	cilt	-
	trakea	-
	mide	-
	diyafragma	-
6. fetus	cilt	-
	trakea	-
	mide	-
	diyafragma	-

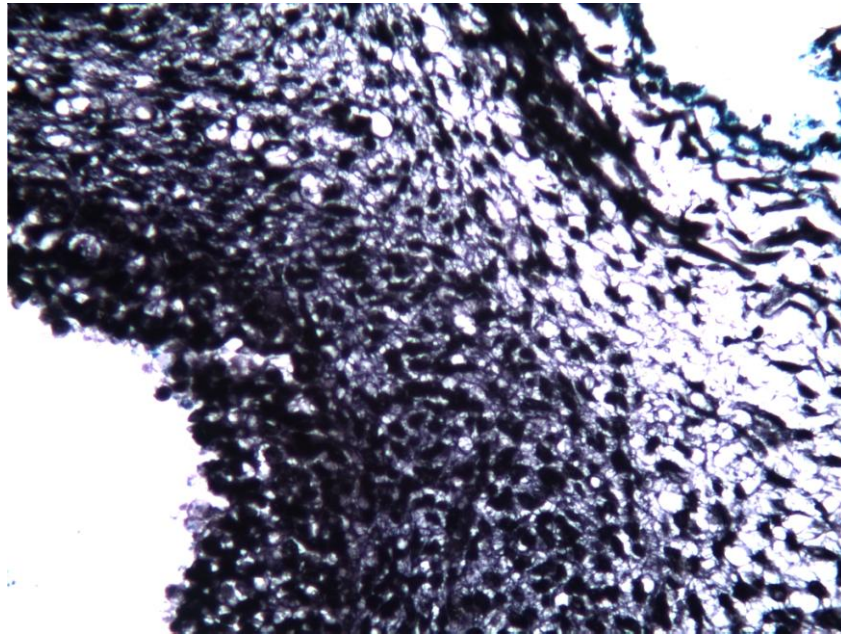
Hiçbir fetal dokuda elastin saptanmadı (Tablo 4.1). Skarla iyileştiği bilinen mide, diyafragma gibi fetal dokularda da skarsız iyileştiği bilinen cilt ve trakea gibi fetal dokularda da elastin açısından anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.2, 4.3) Resim 4.1, 4.2 - Grafik 4.1, ($p>0,05$).

Tablo 4.2: Fetal dokulardaki elastin ve hyaluronik asit Mean ve P değerleri

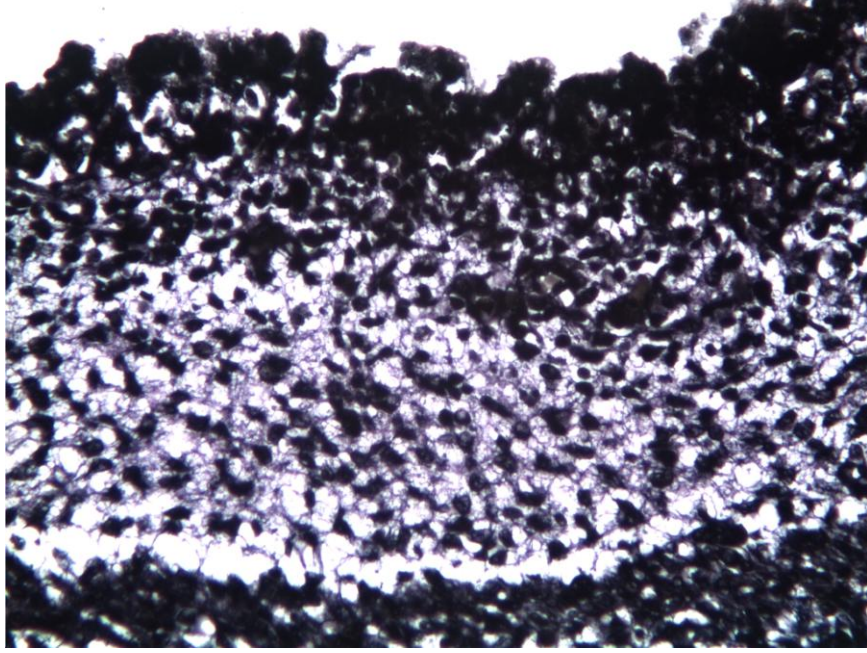
Fetal	Skarlı iyileşen dokular (mide, diyafragma)	Skarsız iyileşen dokular (cilt, trakea)	P değeri
Elastin	0±0	0±0	0
Hyaluronik asit	1,08±0,2	2±0	0,0001

Tablo 4.3: Erişkin ve fetal dokular arasındaki elastin ve hyaluronik asit miktarlarının ortalamaları ve P değerleri

	Elastin			Hyaluronik asit		
	Fetal	Erişkin	P değeri	Fetal	Erişkin	P değeri
Cilt	0±0	1±0	0,024	2±0	1±0	0,024
Trakea	0±0	1±0	0,024	2±0	0,5±0	0,024
Mide	0±0	1±0	0,024	1,1±0,4	0±0	0,024
Diyafragma	0±0	1±0	0,024	1±0	0,1±0,2	0,024



Resim 4.1: Skarsız iyileşen fetal trakea, elastik lif yok. EVGx400



Resim 4.2: Skarlı iyileşen fetal mide duvarı. Elastik lif yok. EVGx400

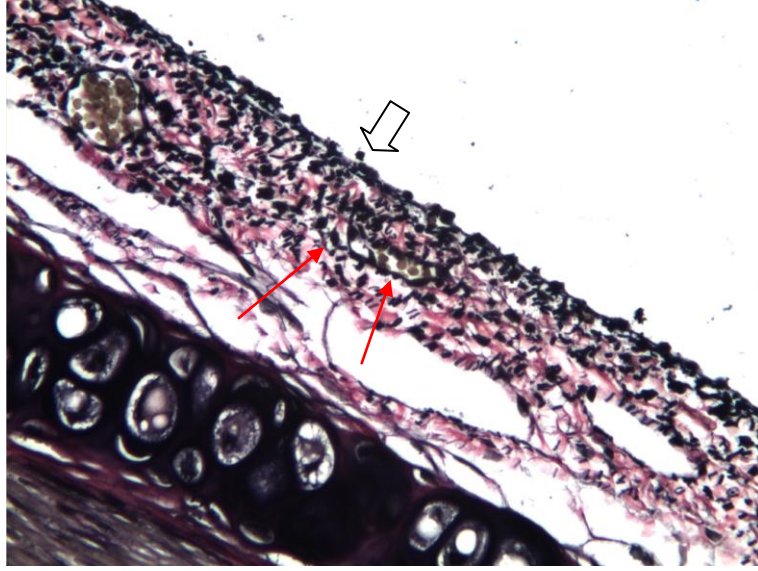
4.2. ERİŞKİN DOKULARDAKİ ELASTİN DAĞILIMI

Tablo 4.4’de erişkin dokulardaki elastin varlığı gösterilmiştir.

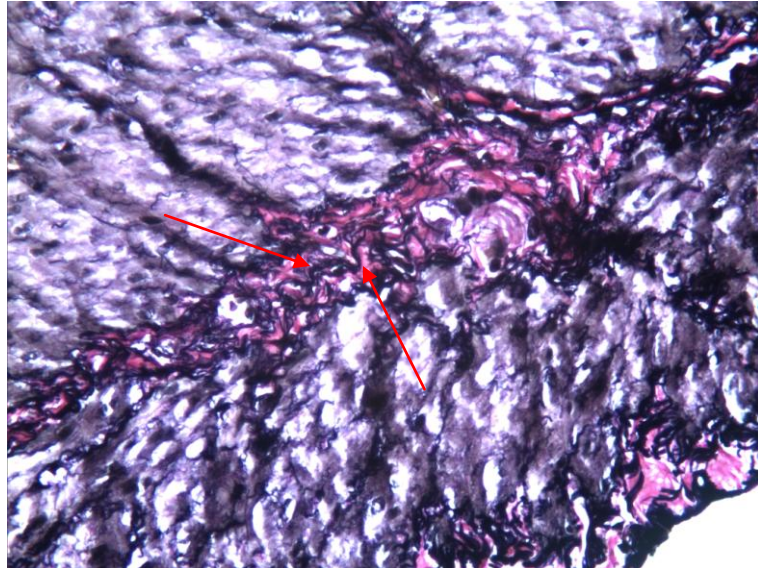
Tablo 4.4 :Erişkin dokulardaki elastin varlığı

Denek	Doku	Elastin
1. anne tavşan	cilt	+
	trakea	+
	mide	+
	diyafragma	+
2. anne tavşan	cilt	+
	trakea	+
	mide	+
	diyafragma	+
3. anne tavşan	cilt	+
	trakea	+
	mide	+
	diyafragma	+

Çalışmamızda aynı zamanda fetal dokularla karşılaştırmak üzere erişkin dokularda da elastin varlığı araştırıldı. Tüm dokularda elastinin mevcut olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3, 4.4, Resim 4.3,4.4). Deneklerin benzer dokuları arasında elastin varlığı konusunda anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

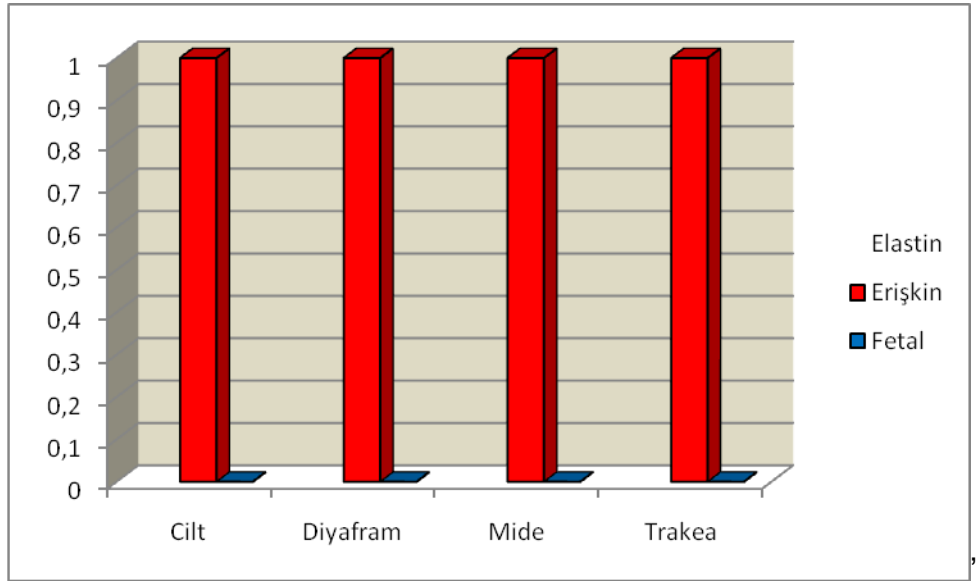


Resim 4.3: Erişkin Trakea. Mukoza dökülmüş görünümde (kalın ok). Lamina propriyada siyah lifler (ince kırmızı ok) şeklinde bol elastik lif bulunmakta. EVGx400



Resim 4.4: Erişkin Mide duvarı. Muskularis propriya içinde siyah renkli lifler halinde elastik lifler (ince kırmızı oklar) EVGx400

Fetal dokularda saptanmayan elastin erişkin dokularda mevcuttu (Grafik 4.1) ($p<0.05$).



Grafik 4.1: Elastinin erişkin ve fetal dokular arasındaki dağılımı

4.3. FETAL DOKULARDAKİ HYALURONİK ASİT DAĞILIMI

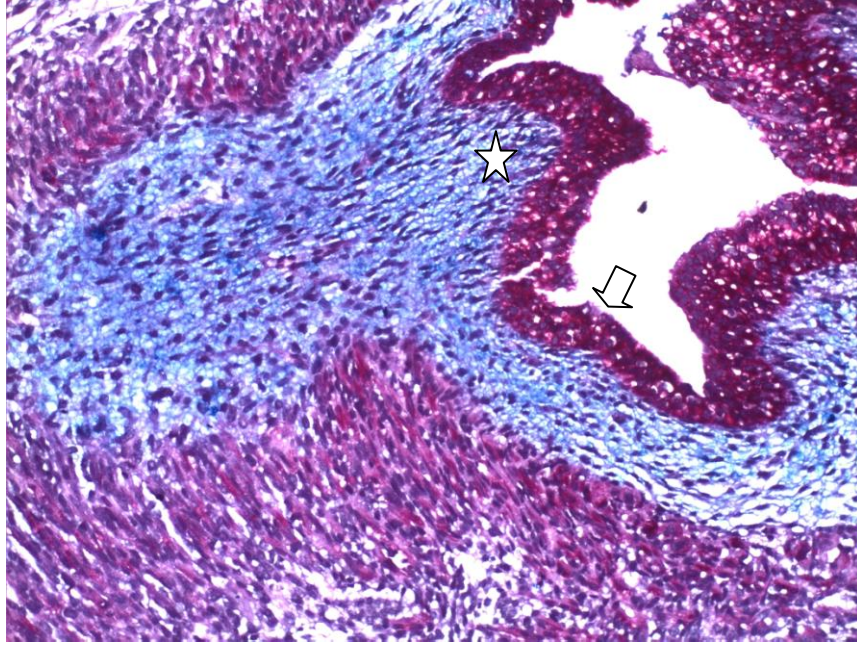
Fetal dokuların tümünde HA mevcuttu (Tablo 4.3, 4.5). Fetal cilt yanında skarsız iyileşen diğer bir doku olan trakea ve skarlı iyileşen mide ve diyafragma gibi dokulardaki HA miktarını saptadık ve birbirleriyle karşılaştırdık (Grafik 4.2, 4.3).

Skarla iyileşen mide ve diyafragma gibi dokularda (+) boyanma varken, skarsız iyileşen cilt ve trakea gibi dokularda (++) boyanma mevcuttu (Resim 4.5, 4.6). Skarsız iyileşen dokularla skarlı iyileşen dokular arasında HA miktarı açısından anlamlı farklılık saptandı (Tablo 4.2, 4.3 - Grafik 4.2, 4.3, 4.4, ($p<0,05$)).

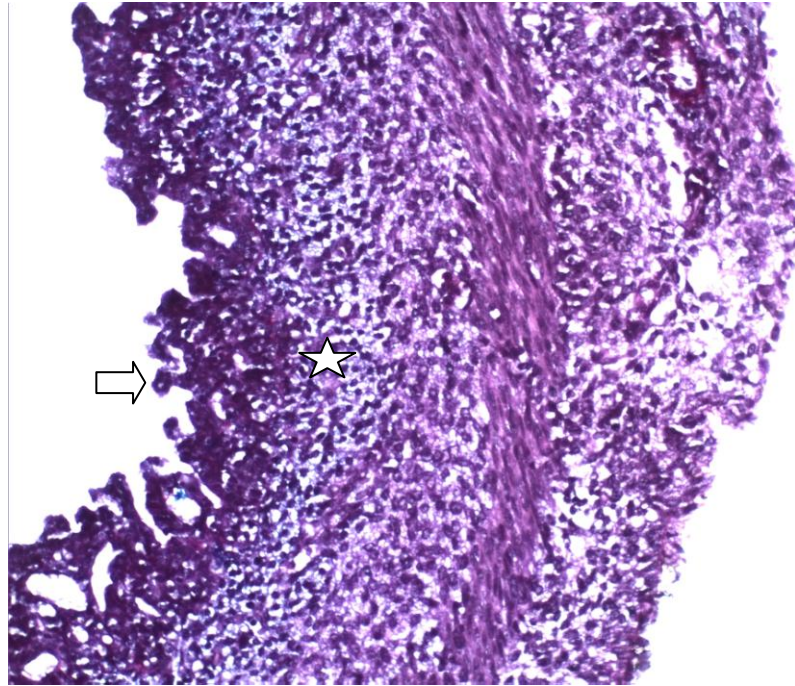
Tablo 4.5’de fetal dokulardaki HA varlığı ve miktarları gösterilmiştir.

Tablo 4.5 : Fetal dokulardaki hyaluronik asit varlığı ve miktarı

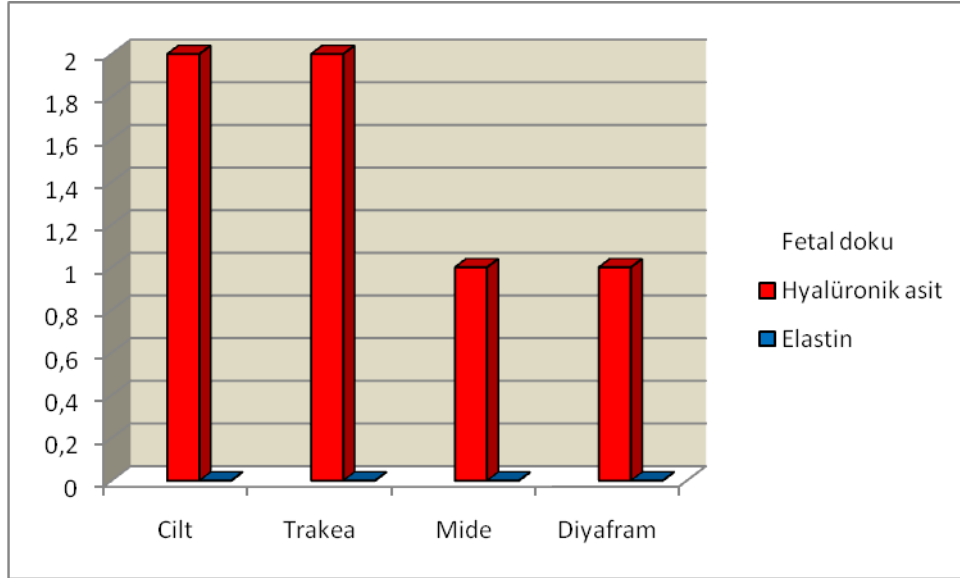
Denek	Doku	Hyalüronik asit
1. fetus	cilt	++
	trakea	++
	mide	+
	diyafragma	+
2. fetus	cilt	++
	trakea	++
	mide	+
	diyafragma	+
3. fetus	cilt	++
	trakea	++
	mide	++
	diyafragma	+
4. fetus	cilt	++
	trakea	++
	mide	+
	diyafragma	+
5. fetus	cilt	++
	trakea	++
	mide	+
	diyafragma	+
6. fetus	cilt	++
	trakea	++
	mide	+
	diyafragma	+



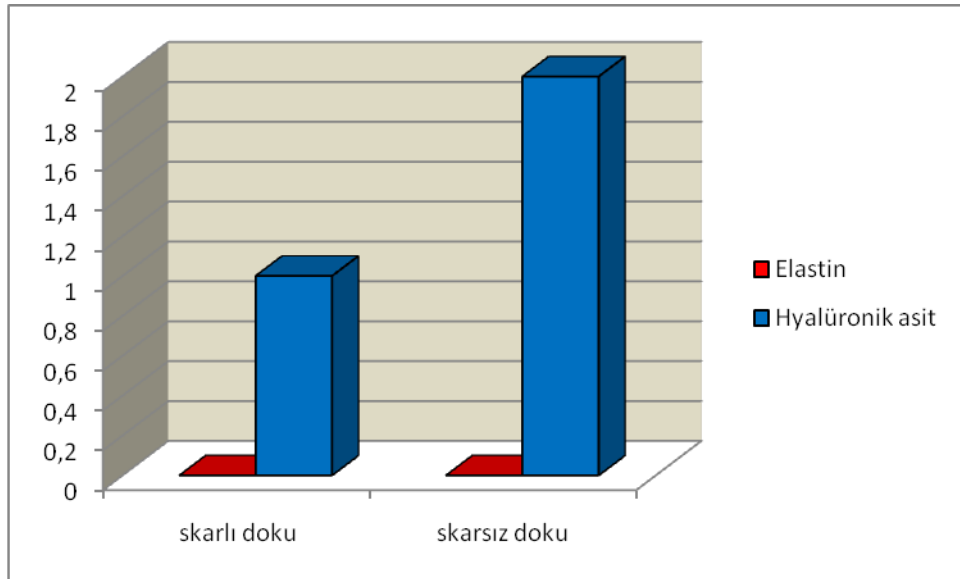
Resim 4.5: Fetal trakea. Örtücü epitelyum altında (ok), (++) düzeyinde mavi renkli hyaluridik asit ile uyumlu boyanma(yıldız). PAS-Alcian bluex200



Resim 4.6: Fetal mide. Örtücü epitelyum altında (ok), (+) düzeyinde mavi renkli hyaluridik asit ile uyumlu boyanma(yıldız). PAS-alcian bluex200



Grafik 4.2: Fetal dokular arasındaki elastin ve hyaluronik asit miktarları



Grafik 4.3: Fetal skarlı ve skarsız dokular arasındaki elastin ve hyaluronik asit farkları

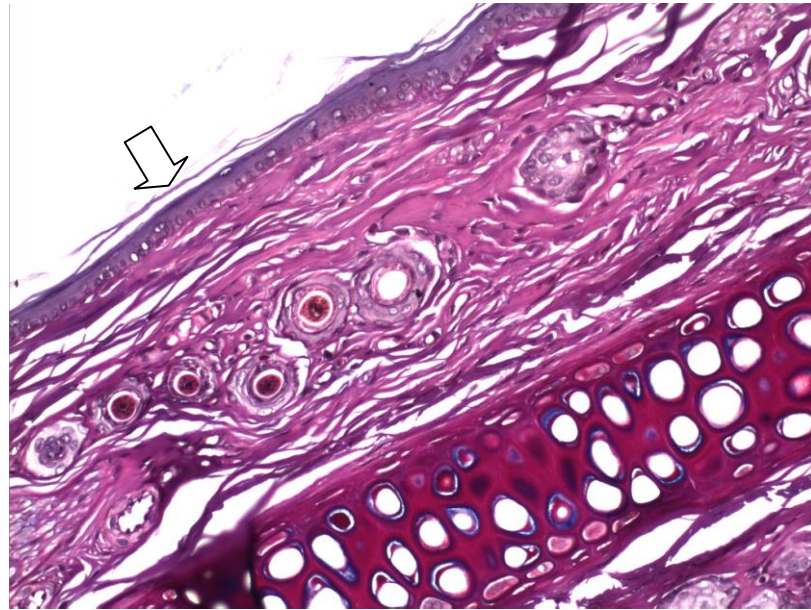
4.4. ERİŞKİN DOKULARDAKİ HYALURONİK ASİT DAĞILIMI

Tablo 4.6’de erişkin dokular arasındaki HA miktarları gösterilmiştir.

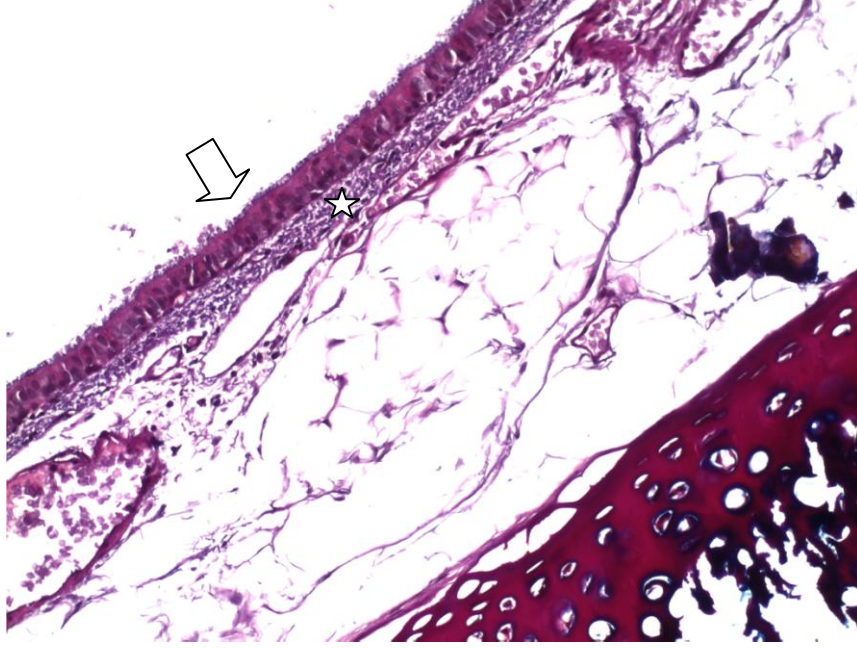
Tablo 4.6: Erişkin dokulardaki hyaluronik asit varlığı ve miktarları

Denek	Doku	Hyalüronik asit
1. anne tavşan	cilt	-
	trakea	+/-
	mide	-
	diyafragma	-
2. anne tavşan	cilt	-
	trakea	+/-
	mide	-
	diyafragma	-
3. anne tavşan	cilt	-
	trakea	+/-
	mide	-
	diyafragma	+/-

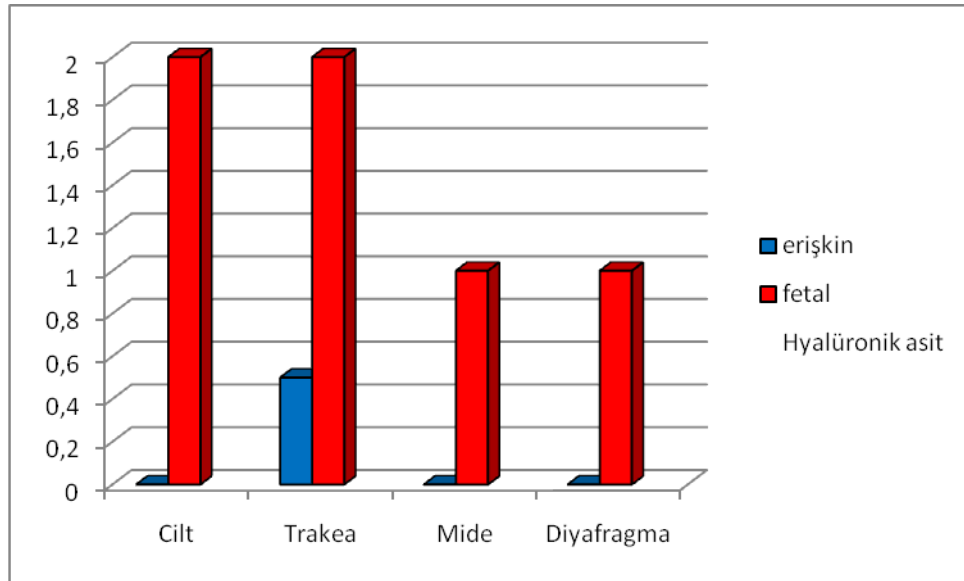
Erişkin dokular arasında trakea dışında tüm dokularda HA boyanması olmadı (Resim 4.7). Trakea ise (+/-) şeklinde boyanmıştır (Resim 4.8). Erişkin dokular arasındaki HA miktarı da anlamlı bulundu (Tablo 4.3, Grafik 4.4) ($p<0,05$).



Resim 4.7: Erişkin deri. Epidermis (ok) altında, dermiste hyaluronik asit ile uyumlu boyanma yok. PAS-Alcian bluex200



Resim 4.8: Erişkin Trakea dokusu. Örtücü epitel (ok) altında (+/-) düzeyinde mavi renkli hyalüronik asit le uyumlu boyanma (yıldız). PAS-Alcian blue x100



Grafik 4.4: Hyalüronik asit miktarının erişkin ve fetal dokuları arasındaki dağılımı

5. TARTIŞMA

Erken gestasyonel dönemde fetal deri yaralarının hızlı ve skarsız iyileştiği bilinmektedir. Fetal yaraların doğum sonrası yaralarda olduğu gibi inflamasyon, granülasyon dokusu, kontraksiyonu ve kollajen depolanması olmadan iyileşmesi tüm klinisyenlerin ilgisini çekmektedir. Erişkin yaralarında Yara iyileşmesi sonucu gelişen skarın “ameliyat izi” bırakması dışında da klinik sonuçları vardır. Özellikle çeşitli yanıkların, sinir yaralanmalarının, dejenerasyon sonrası rejeneratif süreçler ile düzelmenin olduğu çeşitli hastalıklarda yara iyileşmesinin komplikasyonları ve gelişen fibrozis ciddi klinik sorunlar oluşturmaktadır. Skarlı iyileşme sonucu gelişen yapışıklıklar, anastomoz darlıkları, yaralanan tübüler organlardaki striktürler hastalar için ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Ayrıca rejenerasyon yeteneği olan karaciğer, akciğer gibi dokularda, iyileşme sırasında gelişen skar sonucu ultrastrüktürün bozulması siroz, pulmoner fibrozis gibi istenmeyen klinik sonuçlar oluşmaktadır. Skarsız iyileşen fetal yaraların biyolojisini çözmek, skar ve fibrozisin önlenmesi ile gerek yaralanmalarda, gerekse ultrastüktürün korunmasında yepyeni tedavi stratejileri oluşturulmasını sağlayacaktır.

Fetal ve erişkin yara çevreleri arasındaki birçok fark yara iyileşmesini etkileyebilir. Fetal deri yaralarının skarsız iyileşmesi çalışmalarda ilk saptanan skarsız iyileşme olmuş, böylece yara çevresinin yepyeni bir elemanı olan amniotik sıvının rolü öncelikle araştırılmıştır. Yaralı fetal deri ile temasta olan amniotik sıvı fetal deri yarasının önemli komponentlerinden fibronektin, Kondroidin sülfat, Hyaluronik asit gibi ECM elemanlarından zengindir.^{1,2} Ancak yapılan çalışmalarda yalnızca amniotik sıvı ile temasın skar oluşumunu engelleyemediği çeşitli biçimlerde gösterilmiştir.⁵⁻¹¹ Bu çalışmalar sırasında bazı fetal dokuların da skar ile iyileştiği saptanmıştır. Özellikle amniotik sıvı ile teması olmayan diyafragma ve sınırlı teması olan

mide yaralarının skar ile iyileştiğinin gösterilmesi fetal yara ortamından çok dokuların özelliklerinin ön planda olduğunu düşündürmüştür. Fetal diyafragma ve mide yaralarının amniotik sıvı ile temas ettirildiği modeller geliştirilmiş ve her iki dokunun yaralarının da yine skar ile iyileştiği görülmüştür. Bu çalışmalar amniotik sıvının rolünün temel tetikleyici unsur olmadığını açıkça göstermiştir.^{1-2,4-5}

Çalışmalarda yara ve iyileşme ile ilgili sitokinler, çeşitli büyüme hormonları da fetuslarda doğumdan sonraki dokular ve yaralardan farklı bulunmuştur.¹⁻³ Bu etkenleri salgılayan fibroblast, monosit, trombosit vb. yara iyileşmesinde rol alan hücrelerde de çeşitli farklılıklar gösterilmiştir.^{1-4,10-11} Kuramsal olarak fizyolojik yolaklar göz önüne alınarak bu etkenlerin tetikleyici ana unsur oldukları ileri sürülebilse de aynı hücreler ve metabolik özelliklerin geçerli olduğu bazı fetal doku yaralanmalarında yine de skar gelişmesi anılan farkların neden değil sonuç olduğunu düşündürmektedir. Bu yangısal yanıtı tetikleyen ana yapının yaralanan dokunun kendi özellikleri olduğu öncelikle düşünülmelidir. Yangısal yanıtta gösterilen farklar yaralanan dokuların özelliklerindeki farklar sonucu tetiklenmiş olabilir.

Bu yangısal yanıtı tetikleyen ana yapının yaralanan dokunun kendi özellikleri olduğu öncelikle düşünülmelidir. Yangısal yanıtta gösterilen farklar yaralanan dokuların özelliklerindeki farklar sonucu tetiklenmiş olabilir.¹⁻³

Birçok çalışmada fetal yaralar ile skar ile iyileşme ile sonlanan erişkin yaraları asında birçok fark gösterilmiş olsa da, bu farklardan hangisinin skarsız iyileşmenin tetikleyicisi olduğu günümüzde tam bilinmemektedir. Amniotik sıvı ile temasın tek başına skar oluşumunu engellemediği erişkin ve fetal dokularda gösterilince,⁵⁻¹¹ dikkatler yaralanmadaki hücresel ve kimyasal yanıtı yönelmiştir. Trombositler, beyaz küreler, fibrositler gibi iyileşmeye katılan dış hücrelerin aynı olmasına karşın, fetal yaraların bazılarının skar ile iyileşmesi yaralanmaya verilen yanıtın farklılığının dokunun özelliklerine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Ne yazık ki birçok çalışma erişkin ve fetal dokular veya yaraları karşılaştırırken, skarlı ve skarsız iyileşen fetal dokuları

karşılaştıran çalışmalar fazla değildir. Yaralı dokunun hüceresel ve kimyasal yanıtı tetikleyen ana unsurunun ECM elemanları olması, dikkatleri ECM'e yöneltmektedir.^{1-4,10-11}

Yaralanma sonucu yangısal yanıtı tetikleyen ana unsurlardan birisi, o ana dek ilgili hücrelerden uzakta olan ECM elemanlarıdır. Yetişkin derisi ile fetal deri ECM'nin karşılaştırıldığı ayrıntılı çalışmada keratinlerdeki farklar dışında, fibronektin, kondroitin sülfat, Hyaluronik asit'in fetal deri dokusunda erişkinden daha fazla olduğu saptanmıştır.¹⁻³ Erişkin deri dokusunda bulunan elastin ise fetal dokuda bulunamamıştır.³ Anılan farkların fetusun skarsız iyileşmesini tetikleyen ana unsur olabileceği öne sürülmüştür.³

Çalışmamızda skarla ya da skarsız iyileşen fetal dokuların ECM'lerinde de benzer farklılıklar olup olmadığını araştırdık. Böylece skarsız iyileşme farkı gösteren aynı yara çevresine sahip dokularda farkı tetikleyenin hangi proteindeki fark olabileceği daha belirgin ortaya çıkacaktı. Daha önce yapılan çalışmalarda fetal ciltte elastin olmadığı ve skarsız iyileşmenin elastin yokluğuna bağlı olabileceği bildirilmiştir.³ Ancak çalışmamızda hiçbir fetal dokuda elastin saptanmadı. Skarla iyileştiği bilinen mide, diyafragma gibi fetal dokularda da, skarsız iyileştiği bilinen cilt ve trakea gibi fetal dokularda da ECM'de elastin varlığı gösterilemedi. Böylece erişkin dokuların ECM'indeki elastin varlığının tek başına skarlı iyileşmenin sorumlusu olamayacağı ortaya çıktı. Eğer skar ile iyileşmeyi tetikleyen temel fark elastinin varlığı olsa idi, elastin içermeyen fetal mide ve diafragman dokularının da skarsız iyileşmeleri gerekirdi. Her ne kadar elastin varlığının fetal skarsız iyileşmeyi başlatan uyarılara ek bir uyarı olarak, skarlı iyileşmeye dönüşü tetiklediği hala ileri sürülebilirse de, fetal yaraların bazılarının elastin olmadığı halde skarla sonlanması elastin dışında skar tetikleyicileri olduğunu kanıtlamaktadır.

Skarsız iyileşen fetal derinin, yetişkinlere göre, yüksek miktarlarda Hyaluronik asit içerdiği bilinmekte idi.³ Ancak diğer fetal dokulardaki Hyaluronik asit'in miktarları bilinmemekte idi. Bu nedenle fetal deri yanı sıra

skarsız iyileşen diğer bir fetal doku olan trakea ve skarlı iyileşen mide ve diyafragma gibi dokulardaki Hyaluronik asit miktarlarını saptadık ve birbirleriyle karşılaştırdık. Skarsız iyileşen dokulardaki Hyaluronik asit miktarının, skarlı iyileşen fetal ve yetişkin dokulara göre daha yüksek olduğunu saptadık. Bu bulgu Hyaluronik asit'in ECM'de fazla olmasının skarsız iyileşmenin önemli komponentlerinden birisi olduğunu düşündürmektedir.

Fetal yara matriksi aşırı Hyaluronik asit içermektedir ve erişkin yaralara göre fetal yaralarda Hyaluronik asit daha uzun süre kalmaktadır. Buna yönelik yapılan daha önceki çalışmalarda skar ile iyileşmelerde yaralanmadan önce erişkin dokularının da Hyaluronik asit içerdikleri görülmüş ve yaralanma sonrası Hyaluronik asit oluştuğu yönünde bulgular yayınlanmıştır.^{10,11,19} Yapılan bir takım deneysel çalışmalarda Hyaluronik asit kullanımı ile skarlı iyileşmenin komplikasyonlarının azaltılabileceği yönünde bulgular saptanmıştır. Skarla iyileşmesi beklenen trakeal anastomoz hattının, Hyaluronik asit uygulaması sonrasında çok az bir fibrozisle iyileştiği gösterilmiştir.³¹ Transvers vajinal septumlu hastada cerrahi rezeksiyon sonrası restenozu önlemek amacıyla Hyaluronik asit uygulaması ile başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca doku mühendisliği çalışmalarında Hyaluronik asit deri gibi dokuların revaskülarizasyonunu arttıran matriks olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.³² Çift üretere bağlı VUR tedavisinde ilk basamak tedavi için açık cerrahiye alternatif olarak subureterik Hyaluronik asit enjeksiyonu önerilmiştir.^{33,34} Ayak ve ayakbileğinde oluşan akut ve kronik yaraların, el ve dizdeki osteoartritlerin tedavisinde Hyaluronik asit kullanılmasının başarılı sonuçlar verdiği de bildirilmiştir.^{35,36,37} Ayrıca estetik girişimlerde de cerrahi sonrası dolgu maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir.^{38,39}

Yaralanmanın oluştuğu anda ECM'deki Hyaluronik asit miktarındaki fark yara iyileşmesini düzenleyen sistemlere farklı uyarılar göndererek iyileşmeyi temelden modüle edebilir. Hyaluronik asitin yara iyileşmesinde önemli olabilecek CD44, RHAMM gibi reseptörler için güçlü bir uyarıcı olduğu

bilinmektedir. Hyaluronik asit'nin hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve hücre migrasyonunun hücre yüzeyindeki adezyon reseptörleri yoluyla yaptığı daha önceden gösterilmiştir.¹⁹ Skarsız iyileşen fetal dokulardaki yüksek miktardaki hyaluronik asitin bu reseptörleri güçlü uyarısı ile gelişen yanıtın farklı olduğu öne sürülebilir. Hyaluronik asit, CD44 aracılığıyla hücre etkileşimi hücre-hücre ve hücre-substrat adezyonlarını içeren çok sayıda fizyolojik olayda görev almaktadır. Hyaluronik asit aynı zamanda hücreler ve kollajen matriksi arasındaki adeziv etkileşimleri bozabilme ve dolayısıyla hücre migrasyonunu kolaylaştırabilme yeteneğine sahiptir. Hücre yüzeyinde RHAMM ekspresyonu ise hücre hareketleri ile ilişkilidir. Yetişkin yara çalışmalarında yaralanma anında yüksek doku düzeyleri olmadığı için, yaralanmaya yanıtın başka reseptörlerce uyarıldığı ve skar bırakacak yönde geliştiği ön görülebilir. Yaralanmaya yanıtın Hyaluronik asit ile ilgili reseptörlerce nasıl etkilendiğinin çalışılması iyileşmenin modülasyonu konusunda ipuçları sağlayacaktır.

Çalışmamızda teknik olanaksızlık nedeni ile yetişkin ve fetal deri ECM'lerinde farklı düzeyleri olduğu gösterilen fibronektin, kondroitin sülfat'ın skar ile iyileşen fetal dokulardaki miktarını çalışamadık. Çalıştığımız deney hayvanı için ilgili boyaların temin edilememesi daha kesin sonuç alınmasını engelleyen önemli bir eksiklik olmuştur. Bu proteinlerden birisi veya bunların Hyaluronik asit ile birleşimi temel tetikleyici faktör olabilir. İleriki çalışmalarda ECM'in bu elemanlarının da skarlı ve skarsız iyileşen fetal dokulardaki miktarları çalışılmalıdır.

Sonuç olarak çalışmamızda fetal dokularda ECM'in elastin içermediği ve skarlı iyileşen erişkin dokulara göre en "keskin" farkın elastin yokluğu olduğu görülmüştür. Ancak skar ile iyileşen fetal dokularda da elastin bulunmaması bu açık farkın skar oluşumunu tetikleyen temel etkenin elastin varlığı olmadığını göstermiştir. Skarsız iyileşen fetal dokularda hyaluronik asit, skar ile iyileşen fetal dokularından daha fazla bulunmuş ve bunun yanında skarlı iyileşen erişkin dokularda Hyaluronik asit oldukça düşük düzeyde saptanmıştır. Bu durumda Hyaluronik asit varlığının skarsız iyileşme

için yeterli olmadığını, yüksek miktardaki Hyaluronik asit'in skarsız iyileşme ile ilişkili olduğu ileri sürülebilir. Sonuçlarımız Hyaluronik asit'nin skarsız iyileşen dokuda skarlı iyileşen dokulara göre yaralanmaya yanıt sürecinde ne gibi uyarılar yaptığının, oluşan inflamatuvar ve hormonal yanıtı nasıl etkilediğinin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Hyaluronik asit ile uyarılan süreçlerin tanımlanması klinisyenlerin hayali olan skarsız yara iyileşmesi sonucuna ulaşmada önemli ipuçları verecektir. ECM proteinlerinden fibronektin, kondroitin sülfat düzeylerinin de skar oluşumu ile ilgili belirleyici rol oynayabilecekleri gösterilmişse de, deney düzeneğimizde olduğu gibi farklı iyileşen fetal dokulardaki düzeylerinin saptanması ve sonuçlara göre rollerinin belirlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

FETAL YARA İYİLEŞMESİNİN MODULASYONU : Skarlı ve skarsız iyileşen fetal dokularda elastin, Hyaluronik asit gibi ekstrasellüler matriks elemanlarının değerlendirilmesi

Amaç: Skarsız iyileşen fetal deri, trakea dokuları ile, skar ile iyileşen fetal mide, diyafram ve erişkin benzer dokuları arasında ekstrasellüler matriks elemanlarında benzer farklılıklar olup, olmadığını göstererek, skarsız iyileşmenin temel tetikleyicisi olup, olmadıklarının araştırılması

Materyal metot: 20 günlük gebe üç adet yeni Zelanda cinsi tavşana uygun anestezi verildikten sonra karın bölgesi temizlendi. Karın içine vertikal kesi ile girilip uteruslar açılarak, fetuslar dışarı alındı ve dolaşımları durmadan skarsız iyileştikleri bilinen deri, trakea ile skarlı iyileştikleri bilinen mide ve diyafragmadan bir cm³'lük doku örnekleri alındı. Daha sonra yetişkin dokusu ile de karşılaştırmak için annenin deri, trakea, mide ve diyafragmasından doku örnekleri alındı. Örnek alma işlemi tamamlanınca tavşanlar derin anestezi ile öldürüldü. Dokular tüplere alınıp %10'luk formaldehitte fiske edildi. Fikse edilmiş dokulardan örnekler alınıp parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4-6 micron kalınlığında kesitler alınıp hemotoksilen-eozin boyası ile immünhistokimyasal ve histokimyasal boyalarla boyandı. Işık mikroskobu yardımıyla dokulardaki elastin ve Hyaluronik asit miktarına göre dokular nümerik olarak sınıflandırıldı. İstatistiksel karşılaştırma için Mann-Whitney U. yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Hiçbir fetal dokuda elastin saptanmadı. Skarla iyileştiği bilinen mide, diyafragma gibi fetal dokularda da skarsız iyileştiği bilinen cilt ve trakea gibi fetal dokularda da elastin açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Tüm dokularda elastinin mevcut olduğu gözlemlendi. Deneklerin benzer dokuları arasında elastin varlığı konusunda anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Fetal dokularda saptanmayan elastin erişkin dokularda mevcuttu ($p<0.05$). Fetal dokuların tümünde Hyaluronik asit mevcuttu. Skarla iyileşen mide ve

diyafragma gibi dokularda (+) boyanma varken, skarsız iyileşen cilt ve trakea gibi dokularda (++) boyanma mevcuttu. Skarsız iyileşen dokularla skarlı iyileşen dokular arasında Hyaluronik asit miktarı açısından anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Erişkin dokular arasında trakea dışında tüm dokularda Hyaluronik asit boyanması olmadı Trakea ise (+/-) şeklinde boyanmıştır Erişkin dokular arasındaki Hyaluronik asit miktarı da anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Sonuç: Skarsız ya da skarlı iyileşsin hiçbir fetal dokuda ECM'in erişkin dokularda bulunan elastini içermediği görülmüştür. Bunun yanında skarsız iyileşen dokulardaki Hyaluronik asit miktarının, skarlı iyileşen fetal ve yetişkin dokulara göre daha yüksek olduğunu saptadık.

Tartışma: Erişkin dokuların ECM'indeki elastin varlığının tek başına skarlı iyileşmenin sorumlusu olamayacağı ortaya çıkmıştır. Fetal yaraların bazılarının elastin olmadığı halde skarla sonlanması elastin dışında skar tetikleyicileri olduğunu kanıtlamaktadır. Bununla birlikte Hyaluronik asit'in ECM'de fazla olmasının skarsız iyileşmenin önemli komponentlerinden birisi olduğunu düşündürmektedir. Sonuçlarımız Hyaluronik asit'nin skarsız iyileşen dokuda skarlı iyileşen dokulara göre yaralanmaya yanıt sürecinde ne gibi uyarılar yaptığının, oluşan inflamatuvar ve hormonal yanıtı nasıl etkilediğinin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Hyaluronik asit ile uyarılan süreçlerin tanımlanması klinisyenlerin hayali olan skarsız yara iyileşmesi sonucuna ulaşmada önemli ipuçları verecektir.

Anahtar Kelimeler: Fetal yara iyileşmesi, skarsız yara iyileşmesi, elastin, hyaluronik asit, fetal deri, diyafragma, mide, trakea

SUMMARY

Modulation Of Fetal Wound Healing: To evaluate ECM members such as elastin, hyaluronic acid in fetal wounds with scar tissue and without scar tissue.

Aim: To find out whether there are similar differences fetal skin and trachea tissues which heal without scar tissue and fetal stomach, diaphragm and similar adult tissues which heal with scar tissue and to put forward whether these factors are the main triggering factors of scarless healing.

Material and Method: Abdominal regions of three 20-day pregnant New Zealand type rabbits were cleaned after applying appropriate anesthesia. Vertical incision was used to open the abdomen. After uterus were opened, fetuses were taken out and tissues samples of 1cm³ were taken from skin, trachea, known to heal without scar, and from stomach and diaphragm, known to heal with scar, before circulation stopped. After tissue sampling, rabbits were executed by using deep anesthesia. Tissues were fixated by using 10% formaldehyde. Samples were taken from those in formaldehyde and buried into paraffine. Cross-sections of 4-6micron thickness were taken from paraffine and stained with hemotoxylen-eosin, immunohistochemical and histochemical stains. Tissues were numerically classified according to elastin and hyaluronic acid quantity under the light microscope. Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

Results: Elastin was absent in all tissues. There was no statistically significant difference in elastin between fetal tissues like stomach, diaphragm which are known to heal with scar and fetal tissues like skin and trachea which are known to heal without scar ($p>0.05$). Elastin was present in all tissues. The presence of elastin in similar tissues wasn't significantly different ($p>0.05$). Elastin which was absent in fetal tissues was present in adult tissues ($p<0.05$). Hyaluronic acid was present in all fetal tissues. While tissues like stomach and diaphragm which heal with scar tissue had (+)

staining, tissues like skin and trachea which heal scarless had (+++) staining. There was statistically significant difference in hyaluronic acid between tissues healing with scar and without scar tissue ($p<0.05$). Hyaluronic acid was absent in all adult tissues except trachea. Trachea was stained as (+/-). The quantity of hyaluronic acid between adult tissues was significantly different ($p<0.05$).

Outcome: Elastin which is present in all adult tissues is absent in all fetal tissues regardless of scar. The amount of hyaluronic acid in scarless tissues was found to be much more relevant than those in fetal tissues which heal with scar and in adult tissues.

Conclusion: The presence of elastin in ECM of adult tissues is not only factor in tissue healing with scar. Fetal wounds which heal with scar tissue in the absence of elastin prove that there are factors other than elastin in scar formation. The presence of excess amount of hyaluronic acid in ECM shows that hyaluronic acid is one of the important components of scarless healing.

According to our results, the difference between the effects of hyaluronic acid in tissues with scar and without scar, the inflammatory and hormonal responses should be investigated.

Definition of processes stimulated by hyaluronic acid will give important clues about scarless wound healing.

Key words: Fetal wound healing, scarless wound healing, elastin, hyaluronic acid, fetal skin, diaphragm, stomach, trachea

KAYNAKLAR

- 1) Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors and the surgeon. *Annals of Surgery*. 1994;220(1):10-18
- 2) Roh TS, Rah DK, Park BY. The fetal wound healing: a review. *Yonsei Medical Journal*. 2001;42(6):630-633
- 3) Coolen NA, Schouten KCW, Middelkoop E, Ulrich MMW. Comparison between human fetal and adult skin. *Arch Dermatol Res*. 2009 Aug 23
- 4) Adzick NS. Longaker MT. Scarless fetal healing therapeutic implications. *Ann. Surg*. 1992;215:1
- 5) Bullard KM, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing: Current biology. *World J.Surg*. 2003;27:54-61
- 6) Longaker MT, Whithy DJ, Jennings RW, et al. Fetal diyafragmatic wounds heal with scar formation. *J. Surg. Res*. 1991;50:375-385
- 7) Meuli M, Lorenz HP, Hedrick MH, et al. Scar formation in the fetal alimentary tract. *J. Pediatr. Surg*. 1995;30:392-395
- 8) Mast BA, Albanese CT, Kapadia S. Tissue repair in the fetal intestinal tract occurs with adhesions, fibrosis and neovascularization. *Ann. Plastic Surg*. 1998;41:140-144
- 9) Dohar JE, Klein EC, Betsch JL et al. Fetal airway wound repair. *Arch Otolarnygol Head Neck Surg*. 1998;124:25-29
- 10) Longaker M, Chiu ES, Harrison MR et al. Studies in fetal wound healing IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Ann Surg*. Nov 1989;210:5
- 11) Longaker M, Chiu ES, Adzick NS et al. Studies in fetal wound healing V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann. Surg*. 1991;213:4

- 12) Korotky HSL, Hebda PA, Kelly LA et al. Identification of a pre-mRNA splicing factor, arginine/serine-rich 3 (Sfrs3), and its co-expression with fibronectin in fetal and postnatal rabbit airway mucosal and skin wounds. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1762:34 –45
- 13) Köksal C, Bozkurt K, Arslan C et al. Değişik dikiş materyallerinin sıçan aortasında oluşturdıkları histopatolojik değişiklikler. *GKDC* 1999; 7:130-134.
- 14) Bilgin M, Oğuzkaya F, Hasdıraz L. et al. Trakeal stenozlar: Cerrahi tedavi ve sonuçları. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;14(3):212-215
- 15) Kılıçoğlu B, Kılıçoğlu SS, Eren VÇ. Gastrointestinal sistemde yara iyileşmesi. *S.D.Ü.Tıp fak. Dergisi* 2005;12(1):67-76
- 16) Baum CL, Arpey CJ. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. *Dermatol Surg* 2005;31:674-686
- 17) Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA. et al. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends in Biotechnology* 2008;26(4):173-180
- 18) Schultz GS, Wysocki A. İnteractions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Rep Reg* 2009;17:153–162
- 19) Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep.R eg* 1999;7:79–89
- 20) Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007. 23:435–61
- 21) Toole BP. Hyaluronan: From Extracellular Glue to Pericellular Cue. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):528-39
- 22) Almond A. Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Jul;64(13):1591-6
- 23) Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*. 2007 May 1;80(21):1921-43

- 24) Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical Journal of Plastic. Reconstructive & Aesthetic Surgery (2007) 60:1110-1119
- 25) Sawai T, Usui N, Sando K, Fukui Y, Kamata S. Hyaluronic Acid of Wound Fluid in Adult and Fetal Rabbits. Journal of Pediatric Surgery, Vol32, No 1 (January), 1997: pp 41-43
- 26) Ellis IR, Schor SL. Differential Effects of TGF- β 1 on Hyaluronan Synthesis by Fetal and Adult Skin Fibroblasts: Implications for Cell Migration and Wound Healing. Experimental Cell Research 228, 326–333 (1996)
- 27) Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RCKumar S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. Matrix Biol. 2007 Jan;26(1):58-68. Epub 2006 Sep 19
- 28) Duca L, Floquet N, Alix AJP et al. Elastin as a matrikine. Critical Reviews in Oncology/Hematology 49 ;2004: 235–244
- 29) Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. Biochimie. 2005 Mar-Apr;87(3-4):353-60
- 30) Kielty C M. Elastic fibres in health and disease. Expert Rev. Mol. Med 2006;(8)19:1-23
- 31) Olmos-Zuniga JR, Hernandez-Jimenez C, Diaz-Martinez E et al. Wound healing modulators in a tracheoplasty canine model. J Invest Surg. 2007 Nov-Dec;20(6):333-8
- 32) Lataillade JJ, Albanese P, Uzan G. Implication of hyaluronic acid in normal and pathological angiogenesis. Application for cellular engineering. Ann Dermatol Venereol. 2010 Apr;137 Suppl 1:S15-22
- 33) Lackgren G, Wahlin N, Skoldenberg E, Neveus T, Stenberg A. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with dextranomer/hyaluronic acid copolymer is effective in either double ureters or a small kidney. J Urol. 2003 Oct;170(4 Pt 2):1551-5

- 34) Salman MC, Beksac S, Dogan NU. Use of hyaluronic acid for vaginal stenosis in a woman with a history of imperforate hymen and transverse vaginal septum: a case report. *J Reprod Med.* 2009 Jun;54(6):397-400
- 35) Migliore A, Giovannangeli F, Bizzi E et al. Viscosupplementation in the management of ankle osteoarthritis: a review. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010 Aug 10
- 36) Altman RD. Pharmacological therapies for osteoarthritis of the hand: a review of the evidence. *Drugs Aging.* 2010 Sep 1;27(9):729-45
- 37) Cervelli V, Lucarini L, Spallone D, Brinci L, de Angelis B. Use of platelet rich plasma and hyaluronic acid on exposed tendons of the foot and ankle. *J Wound Care.* 2010 May;19(5):186, 188-90
- 38) Greco TM, Elenitsas R. Localization and histological characterization of injected hyaluronic acid in excised nasolabial fold tissue. *J Drugs Dermatol.* 2010 Apr;9(4):399-404
- 39) Turlier V, Rouquier A, Black D et al. Assessment of the clinical efficacy of a hyaluronic acid-based deep wrinkle filler using new instrumental methods. *J Cosmet Laser Ther.* 2010 Aug;12(4):195-202