T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BAŞAKŞEHİR ÇAM VE SAKURA SAĞLIK
UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

MAGNEZYUM SÜLFAT İÇEREN KREM FORMUNDAKİ TOPİKAL AJANLARIN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN RAT MODELİNDE İNCELENMESİ

Dr. Münevver Meltem ERMAN

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2021

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BAŞAKŞEHİR ÇAM VE SAKURA SAĞLIK
UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

MAGNEZYUM SÜLFAT İÇEREN KREM FORMUNDAKİ TOPİKAL AJANLARIN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN RAT MODELİNDE İNCELENMESİ

Dr. Münevver Meltem ERMAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zafer TÜRKOĞLU

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2021

Bu çalışma İstanbul Kent Üniversitesi "Bilimsel Araştırma Projeleri" kapsamında desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Pratisyen olarak görevlendirme ile geldiğim Haseki Dermatoloji'de, TUS'a çalışıp kazanacağıma güvenip beni yüreklendiren, asistan olarak döndüğümde ise tüm bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan, ihtisas sürecinde sadece hocalarımız değil aile büyüklerimiz gibi de hissettiren Prof. Dr. Zafer TÜRKOĞLU ve Doç. Dr. Filiz TOPALOĞLU DEMİR'e,

Birlikte çokça hasta bakıp kahve molalarında tatlı sohbetlerini özleyeceğim, bildiklerini öğretmekten hiçbir zaman çekinmeyen Uzm. Dr. Şenay AĞIRGÖL ve Uzm. Dr. Zehra Gülsevin ŞİMŞEK'e,

İhtisasımın son senesinde tanışma fırsatı bulduğum, bilgisine her zaman güvendiğim başasistanımız Uzm. Dr. Bilgen ERDOĞAN'a,

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Leyli Kadriye KOÇ, Uzm. Dr. Tuğba AKBULUT, Uzm. Dr. Tuğba ATÇI, Uzm. Dr. Dilek CANAT, Uzm. Dr. Meryem AYŞİT, Uzm. Dr. Armağan KUTLAY, Uzm. Dr. Yusuf KELLECİ, Uzm. Dr. Pınar SUN, Uzm. Dr. Gülşah KOÇAK, Uzm. Dr. Ozan ERDEM'e,

İlk biyopsi almamdan tezimi yazmama, kendisinden çokça şey öğrendiğim, asistanlık yıllarımı neşe ile hatırlatacak hem dostum hem kıdemlim Uzm. Dr. Ceyda ÇAYTEMEL 'e,

Asistanlık sürecini birlikte geçirmekten keyif aldığım ihtisas arkadaşlarım Uzm. Dr. Eda USTAOĞLU, Uzm. Dr. Yavuz TEZCAN, Dr. Mehmet Yunus MEYDAN, Dr. Nazlı CAF, Dr. Baran CAYHAN, Dr. Ozan YILDIRIM, Dr. Sefa YÜKSEL, Dr. Cem HEKİMOĞLU, Dr. Görkem ADALI, Dr. Kübra KILIÇPARLAR, Dr. Elif ÇETİNKAYA, Dr. Kamer Faruk COŞKUN, Dr. Merve KAYA, Dr.Burak ÜNLÜ, Dr. Osman GÖKDENİZ'e,

Tezimin değerlendirilme aşamasında çokça emeği olan, kısıtlı vaktimiz kaldığında bile hızla yardımcı olmaktan çekinmeyen sevgili patoloji doktorumuz Uzm. Dr. Begüm ÇALIM GÜRBÜZ'e,

Aldığım her kararda bana destek olan, uzakta bile olsak varlıklarını, sevgilerini hep yakınımda hissettiğim, emeklerini asla ödeyemeyeceğim güzel annem, canım babam ve kıymetli kardeşlerime,

Tanıştığımız ilk günden itibaren hayatımı rengârenk bir hale çeviren, bana olan güveni ve desteği ile her zaman yanımda olacağını bildiğim biricik eşim Dr. Emre ERMAN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Münevver Meltem ERMAN

İstanbul -2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... İ
İÇİNDEKİLER ..... İİ
TABLO LİSTESİ ..... İV
ŞEKİL LİSTESİ V
KISALTMALAR ..... Vİ
ÖZET ..... Vİİ
ABSTRACT X
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. YARANIN SINIFLANDIRILMASI 2
2.1.1. Zamana Göre Yaranın Sınıflandırılması 2
2.1.1.1. Akut yara 2
2.1.1.2 Kronik yara 2
2.1.2. Yaranın Enfeksiyon Riskine Göre Sınıflandırılması 3
2.2. YARA İYİLEŞMESİ 4
2.2.3 Yara İyileşmesi Tipleri 4
2.2.4 Yara İyileşmesinin Aşamaları 5
2.2.4.1.Hemostaz 6
2.2.4.2. İnflamasyon aşaması 6
2.2.4.3. Proliferasyon aşaması 7
a)Fibroplazi ve granülasyon dokusunun oluşumu 8
b) Re-Epitelizasyon 8
c) Anjiogenez 9
2.2.4.4. Re-Modelling aşaması 9
2.2.5.Yara İyileşmesinde Büyüme Faktörleri ve Görevleri 10
2.2.5.1.Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) 10
2.2.5.2.Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) 10
2.2.5.3. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-beta) 11
2.2.5.4.Epidermal büyüme faktörü (EGF) 11
2.2.5.5. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) 12

2.2.6. Yara İyileşmesi ve Hidroksiprolin 12
2.3. İNORGANİK MADDELERİN YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ 12
2.3.1. Magnezyum 13
3. GEREÇ VE YÖNTEM 16
3.1.HAYVANLARIN TEMİNİ 16
3.2.DENEY GRUPLARI 16
3.3. YARA OLUŞTURULMASI VE TEDAVİ UYGULANMASI 16
3.4. TEDAVİDE KULLANILACAK KREMLERİN TEMİNİ 18
3.5.ÇALIŞMANIN YAPILMASI 19
3.5.1.Fotoğraflama ve Yara Alan Ölçümü 19
3.5.2.Biyopsilerin Alınması ve İncelenmesi 20
3.5.3.Alınan Biyopsilerin Skorlanarak Değerlendirilmesi 22
3.6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM 22
4. BULGULAR 23
4.1.YARA ALANI ÖLÇÜMÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ 23
4.2.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME 24
4.2.1. Granülasyon Doku Kalınlığı 24
4.2.2.Epitelizasyonun Değerlendirilmesi 25
4.2.3. Anjiyogenezin Değerlendirilmesi 26
4.2.4. İnflamasyonun Değerlendirilmesi 28
4.3. İMMUNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME 30
4.3.1. Anti- VEGF Değerlendirilmesi 30
4.3.2. Anti-TGF-beta Değerlendirme 32
4.3.3. Anti-Hidroksiprolin Değerlendirme 33
5.TARTIŞMA 35
6. SONUÇLAR 41
7. KAYNAKLAR 42
8. ÖZGEÇMİŞ ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
9. EKLER ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Enfeksiyon riskine göre yara sınıflaması 3
Tablo 2: İnorganikler ve yara iyileşmesi..... 13
Tablo 3: Deney gruplarına uygulanan günlük tedaviler..... 18
Tablo 4 : Tedavide kullanılacak majistral kremlerin içeriği ve maddelerin oranı 18
Tablo 5: Alınan biyopsilerin değerlendirilmesinde kullanılacak skorlama 22
Tablo 6: Yara alanlarının karşılaştırılması..... 24
Tablo 7: Granülasyon dokusu ve epitelizasyonun değerlendirilmesi..... 26
Tablo 8: Anjiyogenez, inflamasyon ve krut varlığı değerlendirilmesi..... 30
Tablo 9: VEGF, TGF-beta ve hidroksiprolinin istatistiksel analazi 34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Yara iyileşmesi tipleri (19)..... 5
Şekil 2: Yara iyileşmesinin aşamaları (20)..... 5
Şekil 3: Demir, bakır ve magnezyumun yara iyileşmesinde etkili olduğu yerler..... 15
Şekil 4: İşlem yapılacak bölge seçildi ve tıraşlandı..... 17
Şekil 5: Her deneğin sırtında eşit boyutta iki adet yara..... 17
Şekil 6: Yara alanlarının fotoğraflanması..... 19
Şekil 7: Image J programı ile alan hesaplanması..... 20
Şekil 8: Günler ve yara alanlarının hesaplanması..... 23
Şekil 9: Yara alanı - gün grafiği..... 23
Şekil 10: Granülasyon dokusu değerlendirmesi..... 24
Şekil 11: 7. Gün epitelizasyon değerlendirilmesi..... 25
Şekil 12: 15. gün epitelizasyon değerlendirilmesi..... 25
Şekil 13: 7. Gün anjiyogenezin değerlendirilmesi..... 26
Şekil 14: 4.grupta 7.gün granülasyon dokusu gelişimi, belirgin artmış anjiogenez (x10)..... 27
Şekil 15: 15. Gün anjiyogenezin değerlendirilmesi..... 27
Şekil 16: 7. Gün inflamasyonun değerlendirilmesi..... 28
Şekil 17: 15. Gün inflamasyonun değerlendirilmesi..... 29
Şekil 18: Grup 5'in 15.günde plazma hücreleri, lenfositler ve histiositlerden oluşan inflamasyon bulguları (x10)..... 29
Şekil 19: 7. Gün VEGF değerlendirme..... 32
Şekil 20: 15. Gün VEGF değerlendirme..... 30
Şekil 21: Grup 1'de VEGF immunohistokimyasal incelemede ekspresyon saptanmaması (x40)..... 31
Şekil 22: Grup 5'te VEGF immunohistokimyasal incelemede hafif şiddette ekspresyon saptanması (x40)..... 31
Şekil 23: 7. Gün TGF-beta değerlendirme..... 32
Şekil 24: 15. Gün TGF-beta değerlendirme..... 32
Şekil 25: 7. Gün hidroksiprolin değerlendirme..... 33
Şekil 26: 15.Gün hidroksiprolin değerlendirme..... 34

KISALTMALAR

ECM : Extracellular Matrix
EGF : Epidermal Growth Factor
FGF : Fibroblast Growth Factor
FTU : Finger Tip Unit
HE : Hematoksilen- Eozin
HIF-1 : Hypoxia inducible factor-1
İH : İmmunhistokimyasal
IL-1 : İnterlökin 1
IgG : İmmunglobulin G
MgIG : Magnezyum İzoglisirizin
$MgSO_4$: Magnezyum Sülfat
MMP : Matriks Metalloproteinazlar
PDGF : Platelet Derivated Growth Factor
PMNL : Polimorf Nüveli Lökosit
TGF-α : Transforming Growth Factor-α
TGF-β : Transforming Growth Factor-β
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

MAGNEZYUM SÜLFAT İÇEREN KREM FORMUNDAKİ TOPİKAL AJANLARIN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN RAT MODELİNDE İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Dünya çapında yaygın bir sağlık sorunu olan yaraların hızlı ve düzgün bir şekilde iyileşmesi istenmekte ve bunun için birçok yeni formülasyon denenmektedir. Bu çalışmada, farklı formlarının yara iyileşmesinde etkili olduğu gösterilen magnezyumun, krem formunda topikal uygulamasının yara iyileşmesine etkisini saptamak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 30 adet yaklaşık 250 gram, 10 haftalık Spraque cinsi dişi sıçan her grupta 6 adet olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Her birinin sırtı traşlandıktan sonra 6 mm punch biyopsi aleti ile 2 adet eşit büyüklükte yuvarlak şekilli yara oluşturuldu. Grup 1(Negatif kontrol)'e izotonik solüsyon, Grup 2(Sham)'ye magnezyum sülfat ($MgSO_4$) içermeyen baz krem, Grup 3'e %1 $MgSO_4$ içeren krem, Grup 4'e %10 $MgSO_4$ içeren krem ve Grup 5 (pozitif kontrol)'e centella asiatica (Bayer Madecassol®) içeren krem günde 2 kez uygulandı. Çalışmanın 0, 2, 5, 7, 11, 14. günlerinde yara alanı fotoğraflandı. Yara ölçümleri 'Image J' programı ile yapıldı. Deneklerin sol taraflarındaki yaralardan 7. gün, sağ taraflarındaki yaralardan ise 15. gün biyopsi alındı. Örnekler hematoksilen-eozin (H.E.) ile histolopatolojik boyama ve anti-VEGF, anti-TGF-beta ve anti-Hidroksiprolin ile immunhistokimyasal boyama yapılarak incelendi.

Bulgular: Yedinci gün H.E. boyamada anjiyogenez en yüksek Grup 3 (%1 $MgSO_4$) ve 4 (%10 $MgSO_4$)'te, granülasyon doku oluşumu ise Grup 3'te tespit edildi. Yara alanı ölçümlerinde Grup 4'teki yaraların ilk 7 gün tüm gruplardan daha hızlı kapandığı görüldü. İmmunhistokimyasal değerlendirmelerde 7. gün Grup 3 ve 4'te VEGF boyama şiddeti Grup 1'den daha yüksek saptandı, 15.gün Hidroksiprolin değerlendirmesinde ise Grup 4, Grup 1'e nazaran daha şiddetli boyandı. 7. ve 15. gün TGF-beta değerlendirildiğinde Grup 3 ve 4'ün, Grup 1'den daha şiddetli boyandığı gözlemlendi. Ancak bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Grup 5 (pozitif kontrol)'in 7.gün VEGF boyanma şiddeti Grup 1'den anlamlı ($p < 0.05$) olarak

daha yüksekti. Grup 5'te 7.gün hidroksiprolin boyanma şiddeti grup 1'den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksek görüldü. H.E. boyamada ise Grup 3 ve grup 5'in 15.gün inflamasyon şiddeti, grup 1'den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksek saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada topikal magnezyumum yara iyileşmesi üzerine etkisi değerlendirildi. Magnezyum VEGF ve TGF-beta gibi büyüme faktörlerini uyarıp anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumu artırarak yara iyileşme hızını artıyor olabilir. Topikal magnezyum deneklerde herhangi bir yan etki gözlenmeden kullanıldı. Çok hastalı, insanlar üzerinde yapılacak çalışmalar topikal magnezyumun yara iyileşmesi üzerine etkisini daha net ortaya koyacaktır.

Anahtar Kelimeler: hidroksiprolin, magnezyum sülfat, TGF-beta, yara iyileşmesi, VEGF.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF TOPICAL AGENTS IN CREAM FORM CONTAINING MAGNESIUM SULFATE ON WOUND HEALING IN RAT MODEL

ABSTRACT

Aim: Many new formulations are being tried for rapid healing of wounds, which is a common health problem worldwide. Positive effects of magnesium on wound healing have been demonstrated in treatments by it's different forms. In this study, it was aimed to determine the effect of topical application of magnesium on wound healing.

Patients and Methods: Thirty female, approximately 250 grams, 10 weeks old Spraque rats were divided into 5 groups; 6 in each group. After the back of each subject was shaved, 2 equal sized, round shaped wounds were created with a 6 mm punch biopsy tool. Isotonic solution to Group 1 (Negative control), base cream without magnesium sulfate ($MgSO_4$) to Group 2 (Sham), 1% $MgSO_4$ containing cream to Group 3, 10% $MgSO_4$ containing cream to Group 4, and centella asiatica containing cream (Bayer Madecassol®) to Group 5 (positive control) was applied twice daily. The wound area was photographed on days 0, 2, 5, 7, 11, and 14 of the study. Wound measurements were made with the 'Image j' program. Biopsies were taken from the wounds on the left side of the subjects on the 7th day, and on the right side on the 15th day from the wounds. The samples were examined by histopathological staining with hematoxylin-eosin (H.E.) and immunohistochemical staining with anti-VEGF, anti-TGF-beta and anti-Hydroxyproline.

Results: On the seventh day in H.E. staining, angiogenesis was highest in Group 3 (1% MgSO4) and 4 (10% MgSO4), and granulation tissue formation was highest in Group 3. Wound area measurements showed faster wound closure in Group 4 than the other groups in the first seven days. In the immunohistochemical staining with VEGF antibody, the staining intensity was higher in Groups 3 and 4 than in Group 1 on the 7th day. Group 4 stained more intensely than Group 1 with the hydroxyproline antibody on the 15th day. Groups 3 and 4 stained more strongly than Group 1 with TGF-beta antibody on the 7th and 15th days. However, these findings were not statistically significant. Group 5 (positive control) VEGF staining intensity was

significantly higher than Group 1 on the 7th day ($p < 0.05$). The intensity of hydroxyproline staining in group 5 was also significantly higher than group 1 on the 7th day ($p < 0.05$). In the H.E. staining, the inflammation severity of Group 3 and Group 5 was significantly higher than Group 1 on the 15th day ($p < 0.05$).

Conclusion: In this study, the effect of topical magnesium on wound healing was evaluated. Magnesium may increase the rate of wound healing by stimulating growth factors such as VEGF and TGF-beta, increasing angiogenesis and granulation tissue formation. Topical magnesium was used in the subjects without any adverse effects. Studies on humans with multiple patients will reveal the effect of topical magnesium on wound healing more clearly.

Keywords: hydroxyproline, magnesium sulfate, TGF-beta, , VEGF, wound healing.

1. GİRİŞ

Yara iyileşmesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve re-modelling gibi birbiriyle örtüşen basamakları içeren fizyolojik bir süreçtir. Bu aşamalardan herhangi birinde yaşanan aksamalar yaranın kronikleşmesine ve ciddi morbiditelere neden olabilir. Kronik yaralar hastanın yaşam kalitesini ciddi şekilde düşürmesine ek olarak; maliyeti yüksek ve tedavinin her zaman etkili olmadığı bir halk sağlığı sorunudur. Medicare kayıtları yaklaşık olarak 8,2 milyon insanın akut veya kronik yaralardan muzdarip olduğunu ve bunun maliyetinin 96,8 milyar dolara vardığını göstermektedir (1). Avrupa'da yaklaşık 2 milyon insan kronik yaralardan muzdaripken, Amerika Birleşik Devletleri'nde toplam nüfusun %2'sinin kronik yaralardan etkilendiği tahmin edilmektedir (1,2). Bu kadar yaygın bir sağlık sorunu olan yaraları ideal estetik ve fonksiyonel sonuçlarla, hızlı bir şekilde iyileştirmek klinik tedavinin temel amacıdır.

Yara iyileşmesinin birçok aşamasında biyoaktif iyonlar rol oynamaktadır ve yıllardır dermatolojik tedaviler içerisinde yer almaktadır. Bakır, çinko, demir, kalsiyum, gümüş içerikli tedaviler yara iyileşmesinin pek çok farklı basamağına etki ederek süreci hızlandırır ve iyileşmeye katkıda bulundukları gösterilmiştir(3). Bu farklı biyoaktif iyonlar içinde magnezyum iyonunun da doku rejenerasyonu ve onarımı için dikkate değer özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Mg2 + iyonu, insan vücudundaki hücre proliferasyonu (4), hücre farklılaşması ve kollajen oluşumu (5) gibi birçok hücresel iyileşme basamağında enzimlerin kofaktörü olarak görev yapmaktadır. Literatürde birçok örnekte magnezyumun yara iyileşmesinde etkili olduğu, anti-inflamatuvar etkinliği, anjiogenez ve kollajen sentezini artırdığına dair çalışmalar mevcuttur. Ancak eksizyonel yara modelinde etkisini net olarak gösteren çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca optimum konsantrasyonun ne olması gerektiği konusu net değildir.

Amacımız magnezyumun krem formunda uygulanmasının yara iyileşmesi üzerine etkisi değerlendirmek, %1 ve %10 konsantrasyonda $MgSO_4$ içeren kremlerin etkinliğini kıyaslamaktır. Magnezyumun sülfat formunun tercih edilmesinin sebebi literatürde daha önce toksikolojik açıdan değerlendirilmiş olmasıdır. Yapılan bir çalışmada $MgSO_4$'ın yıkanabilen ürünlerde %25, yıkanmayan topikal ürünlerde %11'e kadar ciltte tahriş oluşturmadığı belirtilmiştir (6).

2. GENEL BİLGİLER

Primer görevlerinden biri vücudu dış etkilere karşı korumak olan cildin, herhangi bir travmayla anatomik yapısının, doku bütünlüğünün ve fonksiyonunun bozulmasına yara denir. Yara; cerrahi kesi, fiziki yaralanma, alev ile yanma, donma, kimyasal madde ile hasar, iskemi, kemoterapötik maddeler vb. sebeplerle oluşabilir (7).

2.1. YARANIN SINIFLANDIRILMASI

2.1.1. Zamana Göre Yaranın Sınıflandırılması

Yaralar zamanına göre akut ve kronik olarak sınıflandırılır.

2.1.1.1. Akut yara

Akut yaralar genellikle cilt bütünlüğünün bozulmasına yol açan, kolayca tanımlanabilen bir yaralanma mekanizmasına sahiptir ve tipik olarak bir tür travmadan kaynaklanır. Akut travmatik cilt yaralanması; abrazyon, avulsiyon, kontüzyon, ezilme, laserasyon, delinme, yüksek enerjili yaralar gibi birçok farklı şekilde ortaya çıkabilir. Cerrahi yaralar, ameliyathanede oluşturulan kontrollü bir akut yara şeklidir. Bu değişken tablolar karşısında kişiselleştirilmiş yönetim ve bakım gereklidir.

Akut yaralarda iyileşme, fagositoz, kemotaksi, mitogenez, kollajen sentezi ve diğer matriks bileşenlerinin sentezi dahil olmak üzere çeşitli hücresel aktivitelerin koordineli tamamlanmasını gerektiren, birbiriyle örtüşen süreçlerin ardışık bir dizisi olarak gerçekleşir. Bu aktiviteler gelişigüzel bir şekilde değil, iyileşme sürecinin çeşitli aşamalarında yaradaki farklı hücre tiplerinin ortaya çıkışı ile ilişkili olan dikkatli düzenlenmiş ve sistematik bir şekilde gerçekleşir. Doku hasarı ile tetiklenen bu süreçler birbiriyle örtüşen hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenmenin dört aşamasını içerir (7).

2.1.1.2 Kronik yara

Klinik olarak üç ay içinde iyileşmeyen yaralara kronik yara denir. Kronik yaralar, aşamalı fizyolojik iyileşme sürecini takip etmeyen, koordine edilmemiş ve kendi kendini devam ettiren bir inflamasyon evresinde takılı kalmış yaralar olarak da

tanımlanır (8). Bu durum öngörülen yara iyileşmesi süresinde anatomik ve fonksiyonel bütünlüğün oluşumuna engel olur.

Kronik yaraların etiyolojisi çeşitlidir, ancak %80'den fazlası venöz yetmezlik, yüksek tansiyon veya diabetes mellitus ile ilişkilidir (8,9). Altta yatan farklı etiyolojiye rağmen, çoğu kronik yarada benzer özellik ve ilerleyiş görülür. Bu benzerlik, çoğu kronik yaranın çok faktörlü patogenezinin bileşenlerinden kaynaklanmaktadır: lokal doku hipoksisi, bakteriyel kolonizasyon, tekrarlanan iskemi-reperfüzyon hasarı ve hücresel yaşlanmanın sistemik etkileri bunlardan bazılarıdır (10–13). Kronik yaralar hastanın sağlığı, hayat kalitesi ve sosyal durumunu da etkileyen bir sorundur ve sağlık profesyonelleri için uzun yıllardır önemsenen bir konu olmuştur.

2.1.2. Yaranın Enfeksiyon Riskine Göre Sınıflandırılması

Cerrahi yaralar, ameliyathanede oluşturulan kontrollü bir akut yara şeklidir. Cerrahi yaralar, bakteri yükü veya kontaminasyon derecesine göre dört kategoriye ayrılır (14).

Tablo 1: Enfeksiyon riskine göre yara sınıflaması (14).

Temiz	Elektif, travmatik olmayan, primer kapatılan; akut inflamasyon olmayan; solunum, gastrointestinal, safra ve genitoüriner sistemlere girilmeyen yaralar, kusursuz cerrahi teknik
Temiz-Kontamine	Enfekte idrar veya safra ile karşılaşmayan acil cerrahi durumlar; solunum, gastrointestinal, safra veya genitoüriner sistemin elektif açılması (örn. Apendektomi), minör teknik hata.
Kontamine	Pürülan olmayan inflamasyon, gastrointestinal sistemden büyük miktarda sızıntı, enfekte safra veya idrar varlığında safra veya genitoüriner sisteme giriş, penetran travma <4 saat, greftlenecek veya onarılacak kronik açık yaralar, majör teknik hata.
Kirli	Pürülan inflamasyon (örn. Apse); solunum, gastrointestinal, safra veya genitoüriner sistemin ameliyat öncesi perforasyonu; penetran travma> 4 saat.

2.2. YARA İYİLEŞMESİ

İnsan vücudundaki en büyük organ olan deri, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, termoregülasyon ve mikroorganizmalar da dahil olmak üzere harici zararlı maddelere bariyer görevi görerek yaşamın sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. Bu bariyer herhangi bir nedenden ötürü (ülser, yanık, neoplazm veya travma) bozulduğunda, bu işlevler artık yeterince yerine getirilemez. Bu nedenle, bütünlüğünü mümkün olan en kısa sürede eski haline getirmek hayati önem taşımaktadır.

2.2.3 Yara İyileşmesi Tipleri

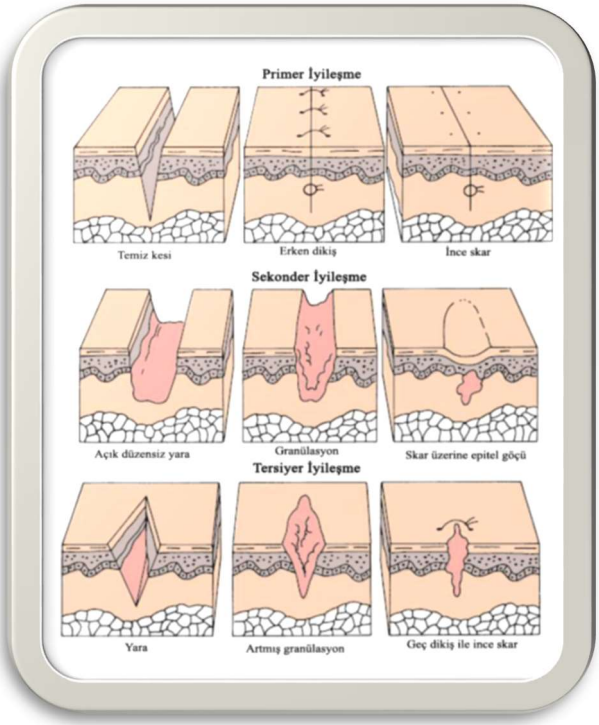
Yara iyileşmesinin temel olarak üç farklı tipi vardır. Bunlar; primer, sekonder ve tersiyer iyişmedir (10).

Primer iyileşme, yara kenarlarında belirgin bir doku kaybı ve kontaminasyon olmadan birbirine yaklaştırılmasıyla gerçekleşen iyileşmedir (15).

Gecikmiş primer kapatma, primer iyileşmenin alt tipidir. Bu alt tipte travmaya uğrayan alana steril şartlarda nemli pansuman yapılır. Travma sahası temizlendikten sonra yara dudakları sütüre edilerek kapatılır (16,17).

Sekonder iyileşme; yara bölgesi herhangi bir yaklaştırma yapılmadan, granülasyon dokusu ile iyileşmesi sonucu kendiliğinden onarım ve epitelizasyonun gelişmesine denir. Bu iyileşmede yara bakım hizmeti daha önemlidir (18).

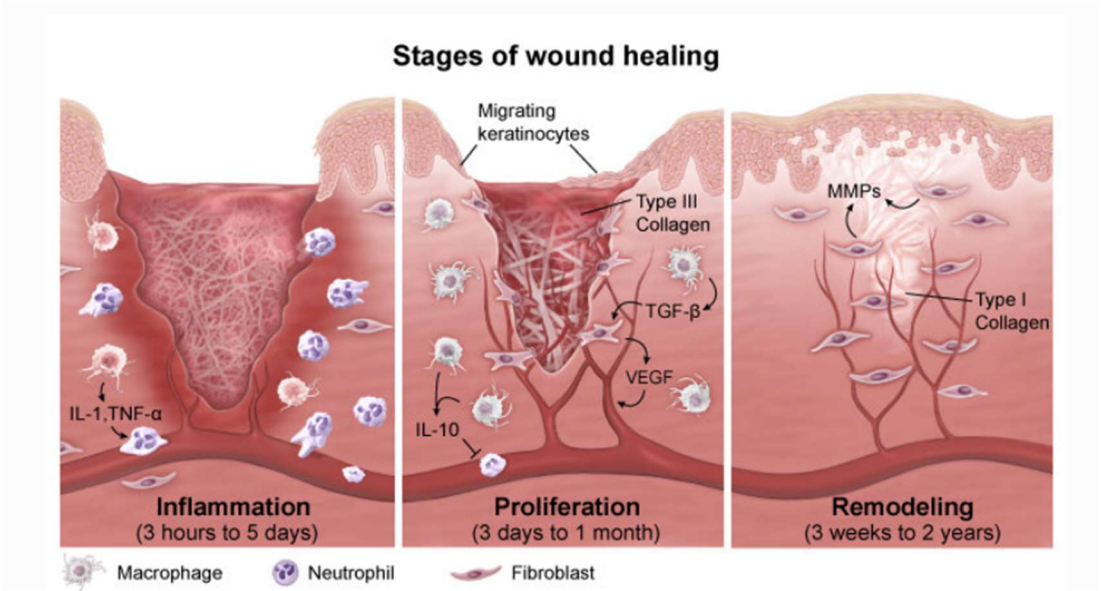
Tersiyer iyileşme, sekonder iyileşmeye bırakılan cerrahi alanın toparlanması sağlandıktan sonra süture edilerek kapatılmasına denir. Primer iyileşmede meydana gelen gerilme kuvveti tersiyer iyileşmede de aynı değere ulaşır (18).



Şekil 1 : Yara iyileşmesi tipleri (19)

2.2.4 Yara İyileşmesinin Aşamaları

Yara iyileşmesi aşamaları hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve re-modelling (yeniden şekillenme) olarak birbiri ile iç içe geçen dört aşamadan oluşur (Şekil 2).



Şekil 2: Yara iyileşmesinin aşamaları (20)

2.2.4.1.Hemostaz

Doku hasarı, mikrovasküler hasar ve dolayısıyla kanın extravazasyonu ile karakterizedir. Hasar gören vasküler yapılar hızla daralır ve pıhtılaşma kaskadı kan kaybını sınırlamak için aktive edilerek, pıhtı oluşumuna ve trombosit agregasyonuna yol açar (21).

Fibrin, fibronektin, vitronektin, von Willebrand faktörü ve trombospondinden oluşan pıhtı, hücresel göç için geçici matriks sağlar (21,22). Pıhtı içinde hapsolmuş trombositler, hemostaz için olduğu kadar normal bir inflamatuar yanıt için de gereklidir (23,24). Trombositlerin alfa granülleri; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β) dahil olmak üzere büyüme faktörlerini içerir. Bu proteinler, fibroblastları, endotel hücrelerini ve makrofajları çekip aktive ederek yara iyileşme sürecini başlatır. Trombositler ayrıca mikrovasküler geçirgenliği artıran serotonin gibi vazoaktif aminleri depolayan yoğun cisimler içerir. Bu, sıvının damar dışı boşluğa sızmasına yol açar ve doku ödemine neden olur, ancak bu özellik inflamasyon aşamasında daha belirgindir (25).

2.2.4.2. İnflamasyon aşaması

İyileşmenin bir sonraki aşaması, kompleman aktivasyonu ve yaranın granülositler veya polimorf nüveli lökositler (PMNL) ile infiltrasyonuna yol açarak patojenleri uzaklaştırmayı amaçlayan inflamasyondur (25). Bu hücreler, travmadan sonraki 24 ila 48 saat içinde, C5a, trombositler, bakterilerden gelen formil-metiyonil peptit ürünleri ve TGF-beta gibi bir dizi ajan tarafından yara bölgesine çekilir (26).

Kısa bir süre içinde, PMNL'ler, marjinasyonla endotelyal hücrelere yapışır ve diyapedez ile damar duvarından geçmeye başlar. Konsantrasyonları ilk 24 saatte 5 milyonu aşar ve 2. günde artmaya devam ederek nötrofilleri yarada bulunan en bol bağışıklık hücreleri yapar (27). İnflame dokuda nötrofiller, fagositozu kolaylaştıran opsonize patojenlerin Fc reseptörlerini yakalarken, nötrofil granüllerinde bulunan reaktif oksijen türleri ve antibakteriyel proteinler, patojeni ortadan kaldırmak için fagozoma salınır (28). PMNL aktivitesi genellikle, kontamine edici bakteriler temizlendikten sonra, yaralanmadan sonraki birkaç gün içinde durur. Artık hücreler,

makrofajlar tarafından fagosite edilerek yara yüzeyine ekstrüzyon yoluyla uzaklaştırılır.

Yaralanma sonrası inflamasyonun daha geç fazında ise, pıhtılaşma bileşenleri, immünoglobulin G (IgG) fragmanları, kollajen ve elastin parçalanma ürünleri ve lökotrien B4, trombosit faktörü IV, PDGF ve TGF-β gibi sitokinler dahil olmak üzere çeşitli kemoatraktanların varlığı dokuda yerleşik makrofajlar tarafından algılanır ve bu da sırayla yaraya göç etmek için devriye gezen monositleri aktive eder (29). Makrofajlar, inflamatuar sürecin sonraki aşamalarında (48-72 saat) bulunan en önemli hücrelerdir ve onarım için anahtar düzenleyici hücreler olarak işlev görmektedir. Hasarlı kan damarlarını onarmak için fibroblastları, keratinositleri ve endotel hücrelerini etkileyerek yaraya daha fazla sitokin ve büyüme faktörü salgılarlar (30). Makrofajlar ayrıca dokuyu debride edebilen kollajenaz gibi proteolitik enzimleri salgılayabilirler. Düzenli ve iyi kontrol edilen bir inflamatuar faz, doku onarımının ve yara iyileşmesinin yeniden şekillenme aşamalarının normal ilerlemesi için gereklidir (31,32). Dolaşımdaki monositlerin ve doku makrofajlarının tükenmesi, yara iyileşmesinde ciddi değişikliklere neden olarak zayıf yara debridmanına, gecikmiş fibroblast proliferasyonuna, yetersiz anjiyogeneze ve zayıf fibroza neden olur.

Lenfositler, inflamatuar faz sırasında yaraya giren son hücre türüdür (> 72 saat) ve interlökin-1 (IL-1), IgG ve tamamlayıcı ürünler tarafından yaraya çekilebilir. IL-1'in, kollajenazın düzenlenmesinde anahtar bir rol oynadığına inanılmaktadır, bu da lenfositlerin kollajen ve ekstrasellüler matriks (ECM)'in yeniden şekillenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, lenfositlerin yara iyileşmesindeki rolü net bir şekilde tanımlanmamıştır (33).

2.2.4.3. Proliferasyon aşaması

Proliferatif faz; fibroblast proliferasyonu, miyofibroblastlara farklılaşma, hücre dışı matriks birikimi ve yara kontraksiyonunu içeren fibroplazi, keratinositler ve fibroblastlar arasında epitel-mezenkimal etkileşim ve reepitelizasyon, endotel hücre proliasyonu ve yeni damar oluşumu ile anjiyojenez, kollateral reinnervasyon ve sinir rejenerasyonundan oluşan periferik sinir onarımı aşamalarından meydana gelmektedir. Makrofajlar, cilt yara onarımının proliferatif fazını yöneten baskın inflamatuar hücrelerdir (34,35).

a) Fibroplazi ve granülasyon dokusunun oluşumu

Yaralanmadan 2 ila 4 gün sonra yarada fibroblastlar ve miyofibroblastlar ortaya çıkar. Fibroblastlar, farklı dermal tabakalarda farklı rollere sahip heterojen bir hücre grubudur. IL-1, TNF-alfa, TGF-β1, PDGF, EGF ve trombositler, makrofaj, fibroblast, endotel hücreleri ve keratinositler tarafından salınan FGF-2 gibi sitokinler ve büyüme faktörleri, metalloproteinazların ve metalloproteinaz inhibitörlerinin üretimini çoğaltmak ve modüle etmek için fibroblastları aktive eder (36–40). Olgun fibroblastlar granülasyon dokusuna göç eder, kollajen sentezini başlatır, fibrin geçici matriksi değiştirir, kollajen birikimini artıran ve yara kontraksiyonunu başlatan miyofibroblastlara farklılaşır (41). Yüksek yoğunlukta fibroblastlar, granülositler, makrofajlar, kılcal damarlar ve gevşek organize kollajen demetlerininin meydana getirdiği geçici ortama granülasyon dokusu denir. Bu geçici ortamın oluşması ileri aşamada ECM'i oluşturarak; hücre yapışması için bir iskele sağladığı ve içindeki hücrelerin büyümesini, hareketini ve farklılaşmasını kritik olarak düzenlediği için önemli bir adımdır (42,43). Bu nedenle fibroblast, ilgili hücre göçü ve organizasyonunun içinde gerçekleştiği geçici yara matrisinin öncüsü olarak en önemli hücrelerden biridir (44).

b) Re-epitelizasyon

Re-epitelizasyon yaralanmadan 16-24 saat sonra başlar ve re-modelling aşamasına kadar devam eder (45). Yaralanmadan yaklaşık 12 saat sonra, yara kenarlarındaki mitotik aktivitede belirgin bir artış olur. Bu hücrelerin, altta yatan dermise olan normal sıkı bağlantıları gevşetilerek geçici matriks boyunca göç etmelerine izin verilir (46). İlerleyen epitel hücreleri bir araya geldiğinde, temas inhibisyonu ile daha fazla hareket durdurulur. Yara debridman gerektirmiyorsa, bazal lamina sağlamsa ve yara nemli tutulursa epitel kaplama oranı artar. Birkaç büyüme faktörü epitelizasyonu modüle eder. EGF, epitelyal mitogenez ve kemotaksinin güçlü bir uyarıcısıdır. FGF ve keratinosit büyüme faktörü gibi diğer büyüme faktörleri de epitel proliferasyonunu uyarır (25).

c) Anjiogenez

Kan akışının azalması, hasarı onarmaya çalışan hücrelerin hızlandırılmış metabolizması, yara dokularında anjiyogenezi uyaran hipoksinin oluşmasına katkı sağlar. Hipoksik koşullar, makrofajlarda (47,48), fibroblastlarda (49), vasküler endotel hücrelerinde (50) ve keratinositlerde (51) hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF1) sentezini uyarır. HIF-1, VEGF, FGF2, PDGF, TGF-β1 gibi proanjiyogenik faktörlerin salınımı ve endotel hücrelerinin metabolik değişimi neovaskülarizasyonu başlatır (52). Anjiyogenezin merkezinde üç endotel hücre tipi vardır: yeni büyüyen tomurcuğu yönlendiren yüksek oranda göç eden uç hücreleri, yeni damarı uzatan proliferatif sap hücreleri ve kan damarı astarını oluşturan hareketsiz falanks hücreleri (52–54). Endotel hücrelerinin her bir alt tipe farklılaşması, öncelikle VEGF ve makrofajların artan mevcudiyeti tarafından yönlendirilir (52). Olgunlaşmamış endotel hücrelerinin yapıları, makrofajlardan yardım alınan bir füzyon ile önceden var olan diğer kan damarlarına anastomoz yapar (53).

2.2.4.4. Re-Modelling aşaması

Ekstrasellüler matriks sentezi ve yeniden şekillenme aşaması, granülasyon dokusunun gelişimi ile eş zamanlı olarak başlar ve uzun süre devam eder. Matriks olgunlaştıkça, fibronektin parçalanır ve artan yara gerilme mukavemetine karşılık gelen kollajen demetlerinin çapı artar (55,56). Bununla birlikte, bu kollajen lifleri hiçbir zaman normal yaralanmamış derinin orijinal gücünü geri kazanamaz ve yaralanmamış cilt kuvvetinin maksimum %80'i elde edilebilir (57).

ECM sürekli olarak yeniden şekillenir ve yaralanmadan yaklaşık 21 gün sonra sabit bir durumda dengelenir. Bu denge durumunda kollajen sentezi ve yıkımı sürekli olarak birbirini izler. Kollajen yıkımı, fibroblastlar, granülositler ve makrofajlar dahil olmak üzere yara bölgesindeki birçok hücre tarafından üretilen spesifik matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ile sağlanır. Yaranın yeniden şekillenmesi devam ettikçe, MMP aktivitesi azalır ve metalloproteinazların doku inhibitörlerinin aktivitesi artar. TGF-β, buna aracılık etmede önemli bir rol oynar (33).

Erken kollajen birikimi oldukça düzensizdir, organize hale gelmesi öncelikle yara kontraksiyonu ile sağlanır. Yaranın yeniden şekillenmesi, alttaki kontraktil bağ dokusunun, yara kenarlarını birbirine yaklaştırmak için kısalması ile meydana gelir.

Kasılma, fibroblastlar ve çevreleyen ECM arasındaki etkileşimler yoluyla gerçekleşir. Bu etkileşimler, TGF-β, PDGF ve FGF dahil olmak üzere bir dizi hücre dışı faktörden etkilenebilir (58). Zamanla makrofajların ve fibroblastların yoğunluğu, bilinmeyen kaynaklar tarafından tetiklenen apoptoz ile azalır (59). Devam eden yeniden şekillenme ile kılcal damarların büyümesi durdurulur, bölgeye kan akışı azalır ve bölgedeki metabolik aktivite azalır.

2.2.5.Yara İyileşmesinde Büyüme Faktörleri ve Görevleri

Büyüme faktörleri, hücrelerin proliferasyonunu spesifik olarak uyaran sitokinlerin bir alt sınıfıdır. Büyüme faktörleri, çeşitli mekanizmalarla yara iyileşmesine aktif rol alır (60). İlk olarak, büyüme faktörlerinin inflamatuar hücreleri ve fibroblastları yaraya çeken kemotaktik aktiviteleri vardır. İkincisi, büyüme faktörleri, hücresel çoğalmayı mitojenik olarak uyarmaktadır. Üçüncüsü, büyüme faktörleri, yeni kan damarlarının büyümesi olan anjiyogenezi uyarabilir. Dördüncüsü, büyüme faktörlerinin hücre dışı matrisin üretimi ve bozulması üzerinde önemli bir etkisi vardır. Son olarak, büyüme faktörleri komşu hücreler tarafından sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin sentezini etkiler (61).

2.2.5.1.Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

PDGF yalnızca trombositlerin değil, makrofajların ve diğer birçok hücre tipinin de üretebildiği bir büyüme faktörüdür. PDGF, A ve/veya B zincirlerinden (AA, AB veya BB) oluşan bir dimer yapıdadır ve insan trombositlerinde en sık görülen form AB formudur (%70 AB, %30 BB) (62). PDGF, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve muhtemelen monositler ve nötrofiller için kemotaktiktir. PDGF, düz kas hücreleri ve fibroblastlar için bir mitojendir, proliferasyonu arttırır. Ayrıca hücre dışı matriksin yeniden düzenlenmesi üzerinde önemli etkileri vardır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile benzer bir etki ile anjiyojenik etkisi olan bir büyüme faktörüdür (63).

2.2.5.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), endotel hücreleri üzerinde mitojenik ve anti-apoptotik etkiye sahip, vasküler geçirgenliği artıran, hücre göçünü

teşvik eden önemli bir pro-anjiyogenik büyüme faktörüdür. Bu etkiler nedeniyle aktif olarak normal ve patolojik anjiyogenik süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulunur. VEGF, tirozin kinaz hücre reseptörlerine (VEGFR) bağlanır. VEGFR-1 ve VEGFR-2 ağırlıklı olarak vasküler endotelyal hücrelerde eksprese edilirken, VEGFR-3 özellikle lenfatik endotelyal hücrelerde eksprese edilir. VEGFR-2, VEGFR-1'den daha güçlü pro-anjiyojenik aktiviteye ve daha yüksek bir tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Hem VEGF hem de VEGFR'ler yalnızca endotelyal hücrelerde değil, aynı zamanda endotelyal olmayan hücrelerden de eksprese edilebilir (64).

2.2.5.3. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-beta)

Beş izoformu tanımlanan TGF-betanın insanlarda sadece üç tanesi mevcuttur. En iyi karakterize edilen TGF-beta izoformu hücre tipine ve çevreye bağlı olarak birden fazla etkiye sahip olduğu bilinen TGF-beta1'dir (65). TGF-β1, kemik ve trombositlerde yüksek miktarlarda bulunur. Trombositler veya makrofajlar tarafından çevreye salındığında, fibroblastları, kemik kök hücrelerini ve endotel hücrelerini uyarır (66). TGF-β1, kollajen birikimi için çok güçlü bir uyarıcıdır ve kollajen yıkımını engeller. Çalışmalar, TGF-β1 bloke edilirse skar üretiminin azaltılabileceğini göstermiştir (67). TGF-β1 inflamasyonun düzenlenmesi için de çok önemlidir. TGF-β1 seviyesi düşük olan hayvanların, yüksek inflamatuar yanıttan öldükleri gösterilmiştir (68).

2.2.5.4. Epidermal büyüme faktörü (EGF)

Tanımlanan ilk büyüme faktörlerinden biri epidermal büyüme faktörüdür. EGF trombositler, makrofajlar ve monositlerden salgılanır, tüm epitel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü uyarır (69) . Aynı zamanda neovaskülarizasyonu artırır, kollajen sentezini düzenler, epitelyal ve mezenkimal mitozu artırır. EGF hücre farklılaşmasından da sorumludur. EGF reepitelizasyon esnasında oldukça fazla şekilde yara kenarlarında üretilir ve MMP-1 ekspresyonunu artırır (66). EGF'nin ayrıca bağırsak mukozasının iyileşmesi için önemli olduğu, ülserler için koruyucu ve iyileştirici etkileri olabileceği bulunmuştur (70). Transforme edici büyüme faktörü-alfa, EGF ile çok benzer bir görev ve yapıya sahiptir; bununla birlikte, TGF-alfa, EGF'den daha güçlü etki edebileceği gösterilmiştir (71).

2.2.5.5. Fibroblast büyüme faktörü (FGF)

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombositler, makrofajlar, fibroblastlar ve hasarlanmış endotel hücrelerinden salgılanabilir. FGF ailesinin 19'dan fazla farklı üyesinden iki tanesi daha net olarak tanımlanmıştır. FGF-1 ve FGF-2 her ikisi de, fibroblastlar, keratinositler, düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve merkezi sinir sistemi hücreleri gibi birçok farklı hücre gruplarının proliferasyonunu uyarır (72). FGF'ler neovaskülarizasyonu ve damar geçirgenliğini artırırken, endotel hücrelerinin mitozunu da arttırır(73). Ayrıca FGF-1 ve FGF-2, travmanın ardından endotel hücrelerinin göçü ve çoğalmasını uyarır. Ek olarak kollajenaz ve plazminojen aktivatör üretimini arttırır ve ekstrasellüler matriksin tahrip olmasına yol açabilir.

2.2.6. Yara İyileşmesi ve Hidroksiprolin

Hidroksiprolin kollajenin yaklaşık olarak 1/3 ünü meydana getiren temel bileşenlerindendir. Hidroksiprolin ve prolin, kollajen stabilitesi için anahtar rol oynar. Kollajen sarmalının keskin bir şekilde bükülmesine izin verirler. Yara iyileşmesi esnasında da ölçülebilir bir aminoasit olan hidroksiprolin, kollajen sentezinin bir belirteci olarak çalışmalarda kullanılmaktadır (74,75).

2.3. İNORGANİK MADDELERİN YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİ

İnorganik iyonlar veya moleküller, özellikle metal iyonları, bazı proteinlerin, enzimlerin ve transkripsiyon faktörlerinin temel katalitik ve yapısal elementleridir. Bu maddeler bazen konformasyonel değişiklikler yoluyla ekspresyon seviyelerini ve aktivitelerini inhibe edebilir veya artırabilir (76).

Biyolojik/organik ajanlarla karşılaştırıldığında, bazıları güçlü bir etki gösterse de, inorganik iyonların yara iyileşmesi üzerindeki etkisine odaklanan nispeten az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda gösterilen inorganik maddelerin yara iyileşmesine etkileri tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2: İnorganikler ve yara iyileşmesi

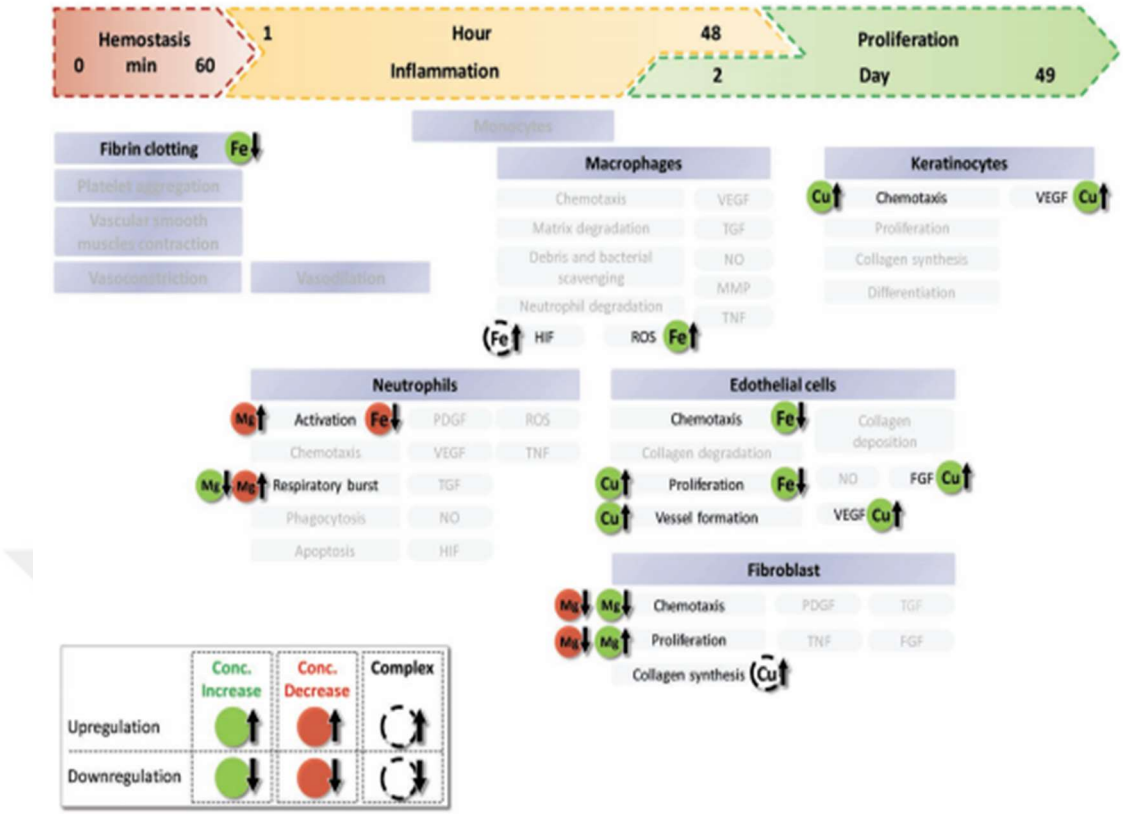
Kalsiyum	Endotel hücreleri ve fibroblastların proliferasyon ve göçünü artırdığı, in vivo büyüme faktörleri üzerine uyarıcı etki yaptığı gösterilmiştir **(77)**.
Hidrojen peroksit	Hidrojen peroksit içerikli ajanlar kutanöz enfeksiyonları tedavi etmek için geliştirilmiş ve yanık/ülser durumlarında yara iyileşmesinde faydalı bulunmuştur (78).
Bor	Bor bazlı jellerin antimikrobiyal etkisine ek olarak dermal hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve ayrıca büyüme faktörü ve gen ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur (79).
Çinko	Topikal uygulanan çinkonun, re-epitelizasyonu artırarak, inflamasyonu ve bakteri üremesini azaltarak yara iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (80).
Bakır	Bakır ve insan tripeptid kompleksinin makrofajlar, mast hücrelerini yara yerine çektiği, anti-inflamatuar bir etkiye sahip olduğu, kollajen, elastin, metalloproteinazlar, anti-proteazlar, büyüme faktörlerini ve angiogenezi artırdığı gösterilmiştir (81).
Demir	Diyabetik ülserlerde sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu modüle ederek yara kapanmasını iyileştirdiği ve anjiyogenezi kolaylaştırdığı gösterilmiştir (82,83).
Magnezyum	Oral ve topikal (tuz veya krem) formunda kullanılan magnezyumun yara iyileşmesini hızlandırıcı bir etki yaptığı, kollajen üretimini artırdığı gözlenmiştir (84,85).
Gümüş	Antimikrobiyal etkinin yanında yaşam kalitesini arttığı ve maliyetin azalacağı sonucuna varılmıştır (86).

2.3.1. Magnezyum

Vücutta bol miktarda bulunan minerallerden magnezyum; protein sentezi, kas ve sinir fonksiyonu, kan şekeri kontrolü, kan basıncı regülasyonu dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli biyokimyasal reaksiyonları düzenleyen 300'den fazla enzim sisteminde bir kofaktördür (84,87,88). Magnezyum; enerji üretimi, oksidatif fosforilasyon ve glikoliz için gereklidir. Kemiğin yapısal gelişimine katkıda bulunur, DNA, RNA ve antioksidan glutatyon sentezinde de görev alır. Ayrıca kalsiyum ve

potasyum iyonlarının hücre zarları boyunca aktif taşınmasında da rol oynar; bu, sinir uyarısının iletimi, kas kasılması ve normal kalp ritmi için önemli bir süreçtir (84). Bu nedenle magnezyumun tıbbi olarak kullanıldığı birçok alan vardır. Hipertansiyon, akut miyokard enfarktüsü, kardiyak aritmiler, ateroskleroz, kardiyopulmoner bypass cerrahisi, stroke, migren, epilepsi, diabetes mellitus, feokromositoma, preeklampsi, eklampsi, osteoporoz, astım bu hastalıklardan bazılarıdır (89).

Magnezyumun dermatolojik olarak kullanımı da son zamanlarda artan çalışmalarla yaygınlaşmıştır. Magnezyum, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında yer alan enzimlerin esansiyel kofaktörlerindendir. Ayrıca yara iyileşme sürecinde protein sentezi ve doku gelişimi için de gereklidir. Literatürde magnezyumun özellikle proliferayon aşamasında olmak üzere ilk 7 günde iyileşmeyi destekleyici bir kofaktör olduğu belirlenmiştir (90). Diyabetik ayak ülseri olan hastalarda magnezyum ve E vitamini kombine oral takviyesinin; yara iyileşmesi, glisemik kontrol, lipid profilleri, inflamasyon belirteçleri ve oksidatif stres üzerinde yararlı etkileri bulunmuş ve diyabetik ülserin kontrol grubuna oranla daha iyi ve hızlı şekilde iyileştiği gösterilmiştir (91). Kanıtlar, magnezyumun yara iyileşmesi sürecinde protein ve kollajen sentezinde yer alan enzimler için önemli bir kofaktör olarak hareket ettiğini göstermektedir. Yapısal bir çapa işlevi görmenin yanı sıra Mg^{+2}, metal bağlama bölgesinin ötesindeki integrin-kollajen etkileşimlerini modüle eder, böylece kollajeni bağlamaya eğilimli bir bileşik meydana getirmektedir (92).



Şekil 3: Demir, bakır ve magnezyumun yara iyileşmesinde etkili olduğu basamaklar (76)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Yeditepe Üniversitesitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 2021/03-1 sayılı kararı ile yapıldı (Ek-1).

3.1. HAYVANLARIN TEMİNİ

Bu çalışmada kullanılan Spraque cinsi dişi sıçanlar, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Çalışma süresince Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu esaslarına uyuldu. 10 haftalık, 250±10 gram ağırlığında 30 adet dişi sıçan deney gününe kadar standart barınma kafeslerinde tutuldu. Her kafeste üçer adet hayvan bulunduruldu. Deney boyunca içme suları günlük değiştirildi ve standart kafes temizliği yapıldı. Sıçanlar 21 C° sıcaklıkta, havalandırmalı, 12 saat aydınlık-karanlık sikluslar olan odalarda barındırıldı. Hayvanlara deney boyunca ad-libitum standart pelet yem ve içme suyu verildi.

3.2. DENEY GRUPLARI

Grup 1(N=6): Negatif kontrol grubu (%0.9 NaCl izotonik uygulanan)

Grup 2(N=6): Magnezyum içermeyen baz krem uygulanan grup (Sham)

Grup 3(N=6): %1 $MgSO_4$ içeren krem uygulanan grup

Grup 4(N=6): %10 $MgSO_4$ içeren krem uygulanan grup

Grup 5(N=6): Pozitif kontrol grubu (Centella asiatica içerikli merhem (Bayer Madecassol®))

3.3. YARA OLUŞTURULMASI VE TEDAVİ UYGULANMASI

5 mg/kg Ksilazin (Bavet Basilazin %2) + 80 mg/kg Ketamin (Pfizer Ketalar®) kullanılarak intraperitoneal(IP) yolla genel anestezi uygulandı. Deneklerin sırtı tıraş edildi (Şekil 4). Prone pozisyona alınarak tüm cerrahi işlemler asepsi, antisepsi kurallarına uygun gerçekleştirildi. Öncelikle povidon-iodin ile asepsi sağlandı, ardından 25 Cº su ile yıkandıktan sonra kurulandı.

Her bir sıçanın sırtında orta hattın sağında ve solunda olmak üzere tıraşlanmış deride punch biyopsi aleti ile eşit çaplı 6 mm iki adet yara oluşturuldu (Şekil 5).

Hayvanların kendi yaralarına zarar vermemeleri için ense kökü-sırt arasında kalan bölge seçildi.



Şekil 4: İşlem yapılacak bölge seçildi ve tıraşlandı.



Şekil 5: Her deneğin sırtında eşit boyutta iki adet yara

İlk günden itibaren günde 2 kez olmazk üzere her sabah ve akşam 1 finger tip unit (FTU) krem tedavisi, gruplara göre uygulandı. (Tablo 3)

Tablo 3: Deney gruplarına uygulanan günlük tedaviler

Gruplar	Uygulanan Tedavi	Uygulama sıklığı
Grup 1 (6)	%0,9 NaCl solüsyon	S:2x1
Grup 2 (6)	$MgSO_4$ içermeyen baz krem	S:2x1
Grup 3 (6)	%1 $MgSO_4$ içeren krem	S:2x1
Grup 4 (6)	%10 $MgSO_4$ içeren krem	S:2x1
Grup 5 (6)	Centella asiatica içerikli merhem (Bayer Madecassol®)	S:2x1

3.4. TEDAVİDE KULLANILAN KREMLERİN TEMİNİ

Grup 2, grup 3 ve grup 4'ün tedavisinde kullanılan majistral kremler SFA Ar-Ge merkezinde tablo-4'te belirtilen içerik ve oranlarda oluşturulmuştur.

Tablo 4 : Tedavide kullanılacak majistral kremlerin içeriği ve maddelerin oranı

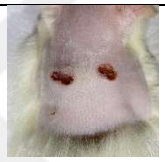
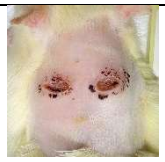
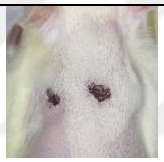
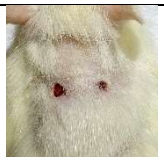
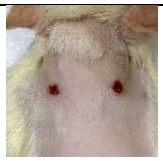
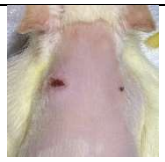
%	Vazelin	Beeswax	Lameform TGI	Nipaguard Sce	Gliserin	$MgSO_4$ x7H2O	Su
Grup 2	30	3,5	3	0,8	6	-	56,70
Grup 3	30	3,5	3	0,8	6	1	55,70
Grup 4	30	3,5	3	0,8	6	10	46,70

Grup 5 (Pozitif kontrol) için, 1 g merhemde 10 mg Centella asiatica'nın titre edilmiş ekstresini içeren topikal merhem (Yardımcı maddeler: Glikol stearat, propilen glikol, sıvı parafin kalın, terpen içermeyen ıtır yağı, terpen içermeyen lavanta yağı, saf su) kullanılmıştır.

3.5.ÇALIŞMANIN YAPILMASI

3.5.1.Fotoğraflama ve Yara Alan Ölçümü

Hayvanlarda yaranın oluşturulduğu gün olan sıfırıncı günden başlanarak, iki, beş, yedi, onbir ve ondördüncü günler yanlarına kılavuz uzunluk konularak fotoğraflanmıştır (Şekil 6). Sonrasında yara alanı ölçümleri kılavuza kalibre edilerek Image J programı ile yapılmıştır (Şekil 7).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Gün 0					
Gün 2					
Gün 5					
Gün 7					
Gün 11					
Gün 14					

Şekil 6: Yara alanlarının fotoğraflanması.



Şekil 7: Image J programı ile alan hesaplanması.

3.5.2.Biyopsilerin Alınması ve İncelenmesi

Tedavinin 7. Günü hayvanların sol tarafındaki yaralardan, 14. Günü ise hayvanların sağ tarafındaki yaralarından 3 mm punch aleti ile biyopsi örnekleri alındı. Doku örnekleri %10 formol içinde ayrı ayrı kaplarda saklanarak, boyanıp incelenmek üzere patoloji laboratuvarına gönderildi.

Cilt doku örnekleri ışık mikroskobik inceleme için ilk olarak % 10' luk Neutral Buffer formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 2 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 ve %100) geçirildi. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından parafine gömüldü.

Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi:

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %90, %70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen'de 2 dakika boyandı ve 2x2 dakika akar suda yıkandı. %1 Amonyak-Su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 2 dakika eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70,

%80, %96, %100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Cilt dokusu parafin bloklarından lamlara 3 μm kalınlığında kesitler alındı.

İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi:

Kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 3x5 dakika ksilole alınarak deparifinizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate (%100, %96, %80, %70) edildi. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 1'er dakika distile sudan geçirildi. Antigen maskesini kaldırmak için 1/10 dilue CitratBuffer (PH:6)(AP-9003-999 Thermoscientific) PT Modülü (A80400012 LabVision) ile uygulandı. IHC Boyama cihazında rack yuvalarına lamlar coverplate ile birlikte takıldı. PBS ile 5 dakika yıkama yapıldı.

10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile etkin bırakılan cilt dokuları endojenperoksidaz aktivitesi bloke edildi. Ardınan PBS ile yıkandı, 10 dakika protein bloke (TA-125-PBQ ThermoScientific) edildi. VEGF antibody (orb13750 Biorbyt) (Dilue:1/50) , Hydroxyproline antibody (orb184229 Biorbyt) (Dilue:1/50), TGF Beta antibody (orb7087 Biorbyt) (Dilue:1/50) ile 2 saat inkube edildi. PBS ile 5 dakika yıkama yapıldı. AmplifierQuanto (TL-125-QPB ThermoScientific)'da 20 dakika bekletildi. HRP PolymerQuanto'da (TL-125-QPH ThermoScientific) 30 dakika bekletildi. Her aşamada PBS ile yıkama yapıldı. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB Chromogen (TA-125-HAThermoScientific) ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 1 dakika süreyle Hematoksilen (HHS32Sigma) uygulandı. Distile su ile 2x1 dakika yıkandı. Lamlar artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

3.5.3.Alınan Biyopsilerin Skorlanarak Değerlendirilmesi

Alınan biyopsi örnekleri Tablo 5'te belirtildiği gibi granülasyon dokusu, epitelizasyon, angiogenez, inflamasyon, VEGF, TGF-beta ve hidroksiprolin için 0-3 arasında skorlandı.

Tablo 5: Alınan biyopsilerin değerlendirilmesinde kullanılacak skorlama

	0	1	2	3
Granülasyon	Granülasyon dokusu(GD) yok	GD İnce	GD Orta	GD Kalın
Epitelizasyon	Epitel intakt	%50> ülser	%50<ülser	Epitel yok %100 ülser
Angiogenez	Damarlanma yok	5>damar /1 BBA	6-10 damar /1 BBA	10<damar /1 BBA
İnflamasyon	İnflamasyon yok	Hafif	Orta	Şiddetli
VEGF	Boyanma yok	Zayıf şiddette boyanma	Orta şiddette boyanma	Şiddetli boyanma
TGF-beta	Boyanma yok	Zayıf şiddette boyanma	Orta şiddette boyanma	Şiddetli boyanma
Hidroksiprolin	Boyanma yok	Zayıf şiddette boyanma	Orta şiddette boyanma	Şiddetli boyanma

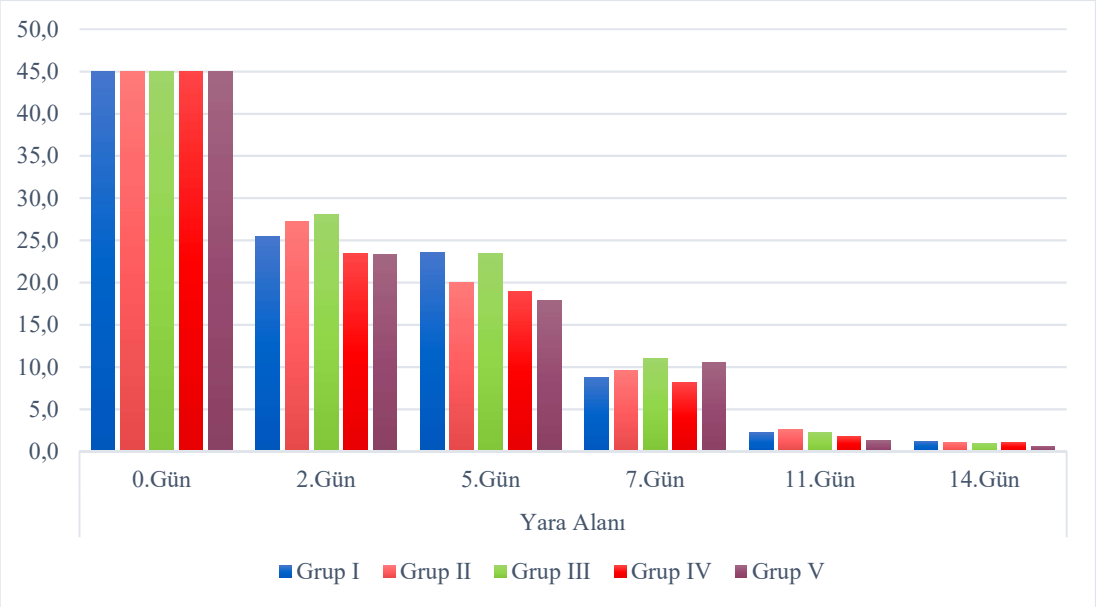
3.6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Verilerin incelenmesinde SPSS 27.0 programı kullanıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri verildi. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov testi ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde ki-kare test; ki-kare test koşulları sağlanmadığında Fischer test kullanıldı.

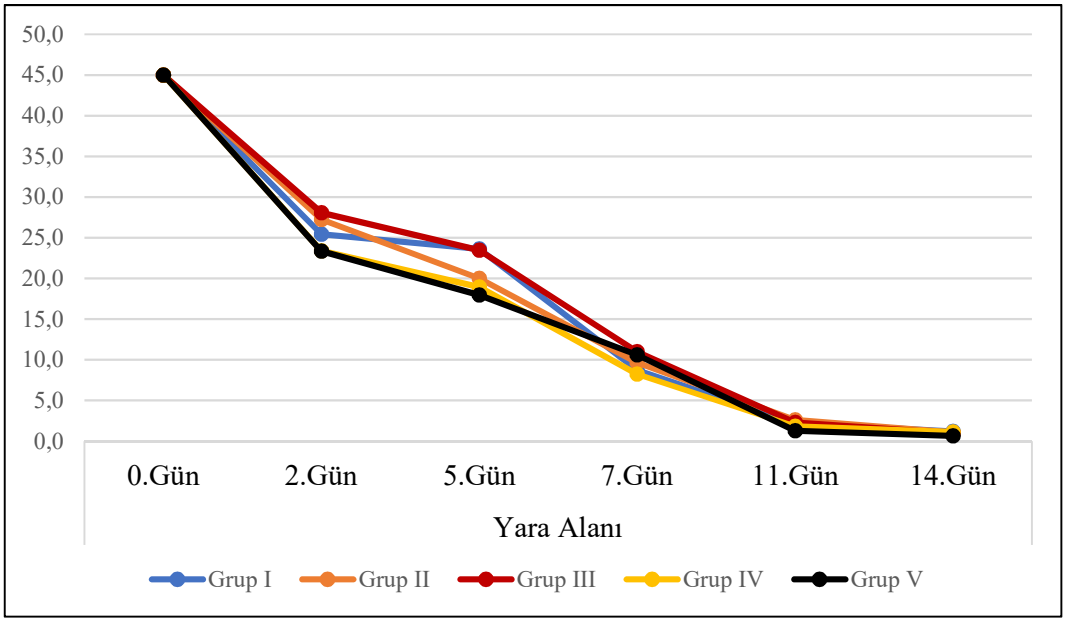
4. BULGULAR

4.1.YARA ALANI ÖLÇÜMÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 0. Gün, 2.gün, 5.gün, 7.gün, 11. Gün, 14.gün yara alanı anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 6).



Şekil 8 : Günler ve yara alanlarının hesaplanması



Şekil 9: Yara alanı - gün grafiği

Tablo 6: Yara alanlarının karşılaştırılması

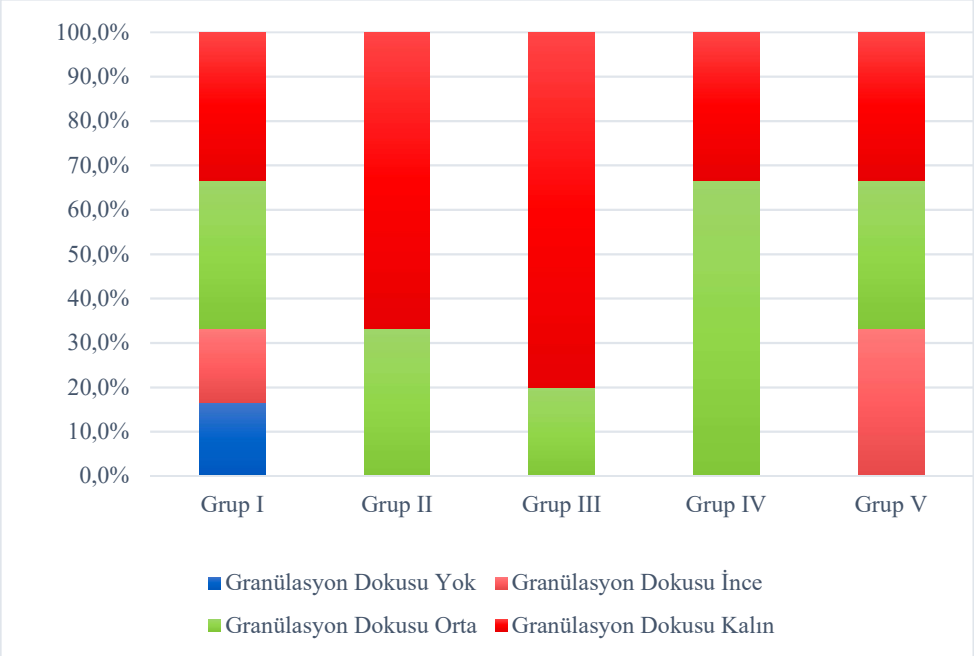
		Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	p
Yara Alanı							
0.Gün	Ort.±ss	45.0 ± 0.0	45.0 ± 0.0	45.0 ± 0.0	45.0 ± 0.0	45.0 ± 0.0	1.000 [K]
	Medyan	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	
2.Gün	Ort.±ss	25.4 ± 5.9	27.2 ± 2.7	28.1 ± 6.1	23.4 ± 7.4	23.3 ± 6.5	0.406 [K]
	Medyan	25.7	26.4	29.1	21.8	23.2	
5.Gün	Ort.±ss	23.6 ± 5.3	20.0 ± 5.5	23.4 ± 6.0	19.0 ± 5.6	17.9 ± 3.9	0.406 [K]
	Medyan	24.5	19.8	24.8	17.1	17.4	
7.Gün	Ort.±ss	8.8 ± 5.1	9.6 ± 3.5	11.0 ± 4.4	8.2 ± 6.3	10.6 ± 5.2	0.406 [K]
	Medyan	8.0	7.8	9.7	5.9	10.3	
11.Gün	Ort.±ss	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.9	2.3 ± 1.2	1.8 ± 1.3	1.3 ± 0.4	0.406 [K]
	Medyan	2.2	2.4	1.9	1.4	1.1	
14.Gün	Ort.±ss	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.9	0.6 ± 0.2	0.067 [K]
	Medyan	1.2	1.1	0.8	0.8	0.6	

[K] Kruskal-wallis

4.2.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

4.2.1. Granülasyon Doku Kalınlığı

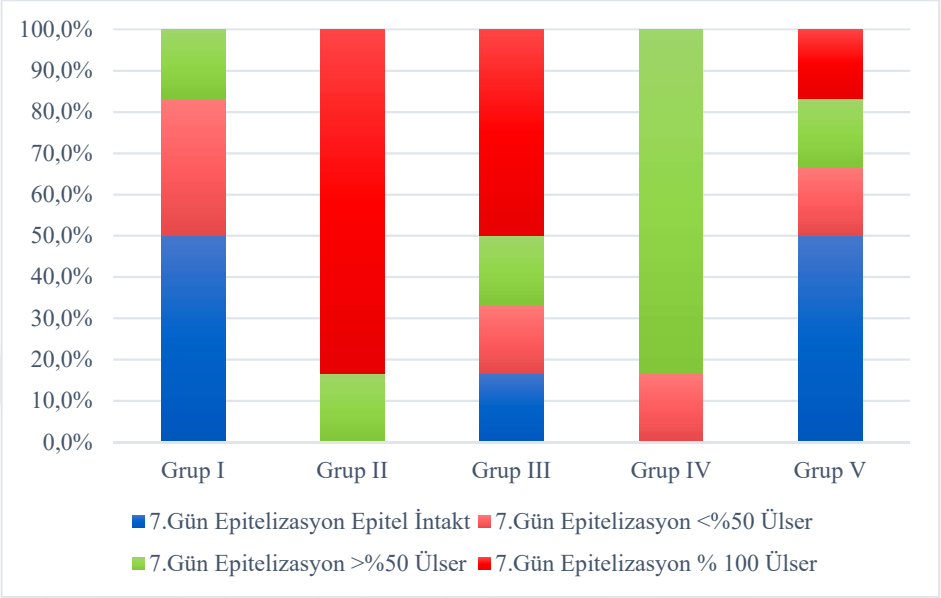
Deneyin 7. Gün alınan biyopsilerde grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında granülasyon derecesi anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 7).



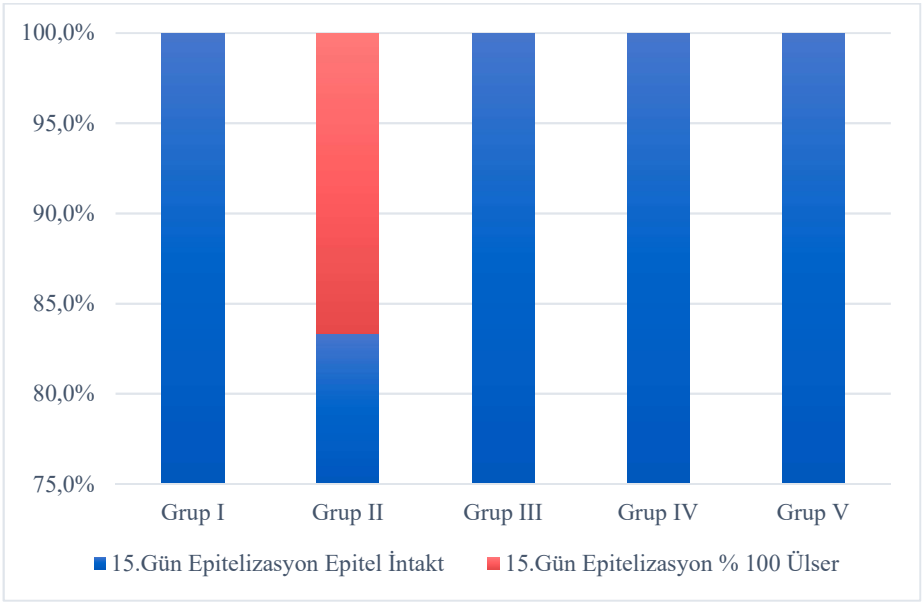
Şekil 10: Granülasyon dokusu değerlendirmesi

4.2.2.Epitelizasyonun Değerlendirilmesi

Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 7.gün epitelizasyon anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 6). Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 15.gün epitelizasyon anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 7).



Şekil 11: 7. Gün epitelizasyon değerlendirilmesi



Şekil 12: 15. gün epitelizasyon değerlendirilmesi

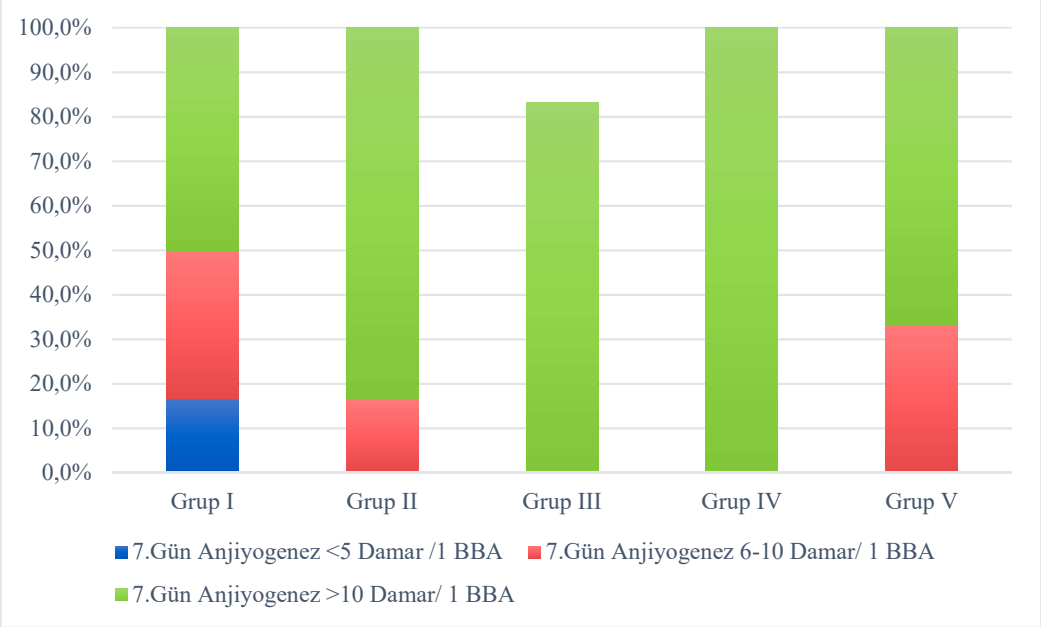
Tablo 7: Granülasyon dokusu ve epitelizasyonun değerlendirilmesi

			Grup I		Grup II		Grup III		Grup IV		Grup V		p
Granülasyon Dokusu	Yok	n-%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	p>0.05 X^2
	İnce	n-%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	2	33.3%	
	Orta	n-%	2	33.3%	2	33.3%	1	20.0%	4	66.7%	2	33.3%	
	Kalın	n-%	2	33.3%	4	66.7%	4	80.0%	2	33.3%	2	33.3%	
Epitelizasyon													
7.Gün	Epitel İntakt	n-%	3	50.0%	0	0.0%	1	16.7%	0	0.0%	3	50.0%	p>0.05 X^2
	<%50 Ülser	n-%	2	33.3%	0	0.0%	1	16.7%	1	16.7%	1	16.7%	
	>%50 Ülser	n-%	1	16.7%	1	16.7%	1	16.7%	5	83.3%	1	16.7%	
	% 100 Ülser	n-%	0	0.0%	5	83.3%	3	50.0%	0	0.0%	1	16.7%	
15.Gün	Epitel İntakt	n-%	6	100.0%	5	83.3%	6	100.0%	6	100.0%	6	100.0%	p>0.05 X^2
	% 100 Ülser	n-%	0	0.0%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	

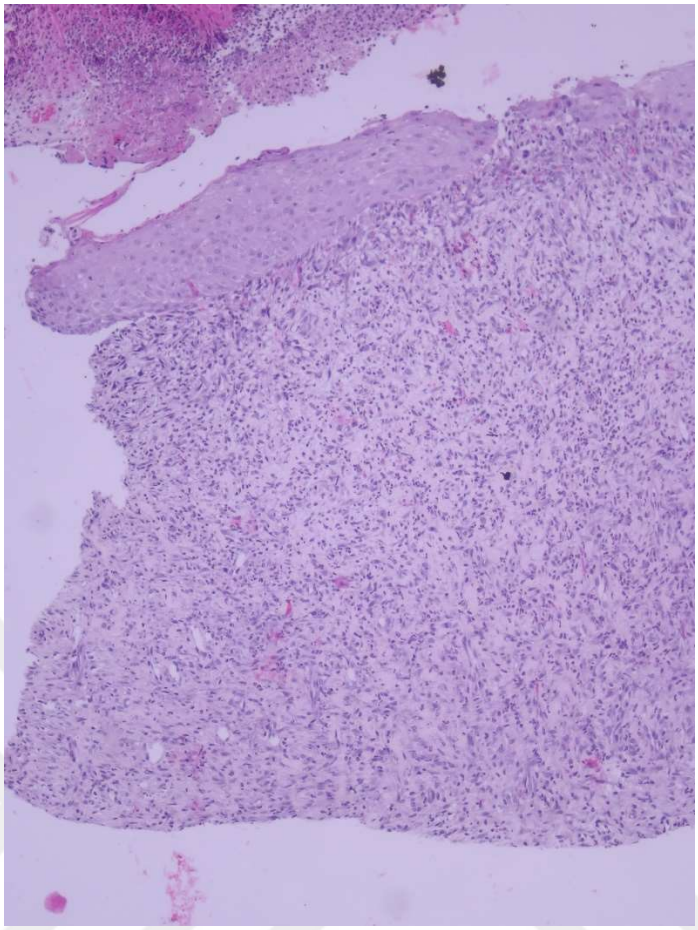
X^2 Ki-kare test (Fischer test)

4.2.3. Anjiyogenezin Değerlendirilmesi

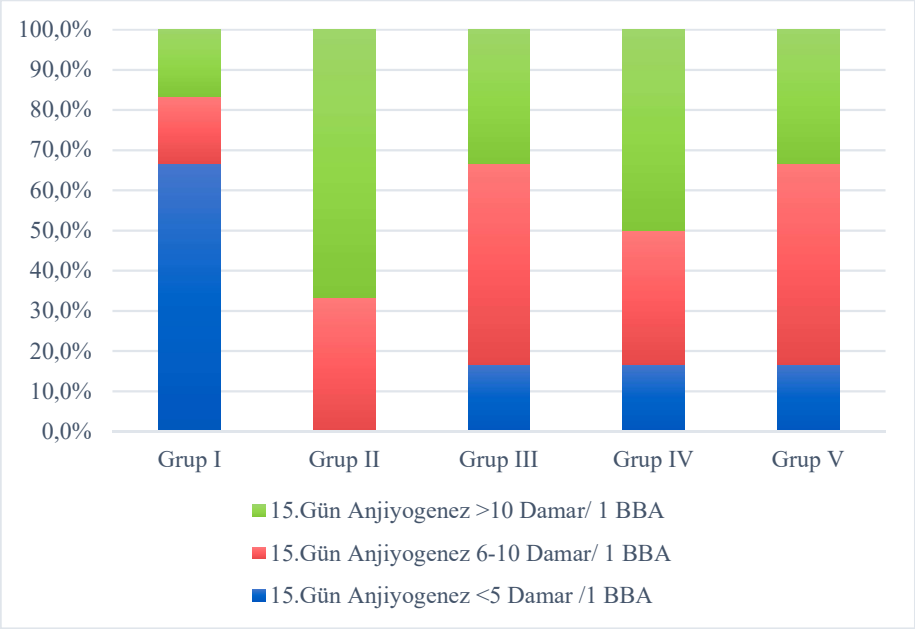
Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 7.gün anjiyogenez dağılımı anlamlı (p>0.05) farklılık göstermemiştir. Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 15.gün anjiyogenez dağılımı anlamlı (p>0.05) farklılık göstermemiştir (Tablo 8).



Şekil 13: 7. Gün anjiyogenezin değerlendirilmesi



Şekil 14: 4.grupta 7.gün granülasyon dokusu gelişimi, belirgin artmış anjiogenez (x10)



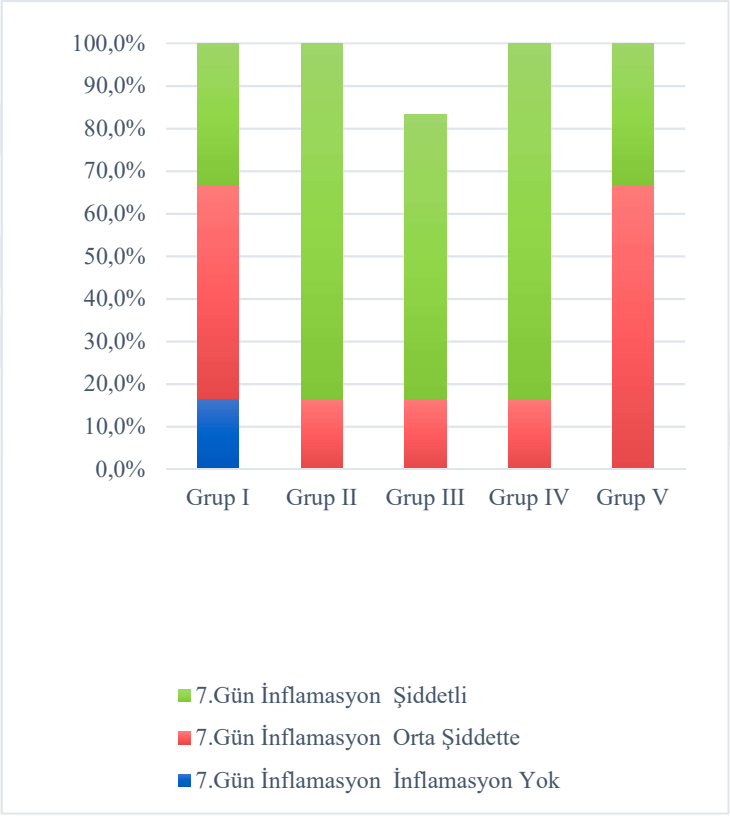
Şekil 15: 15. Gün anjiyogenezin değerlendirilmesi

4.2.4. İnflamasyonun Değerlendirilmesi

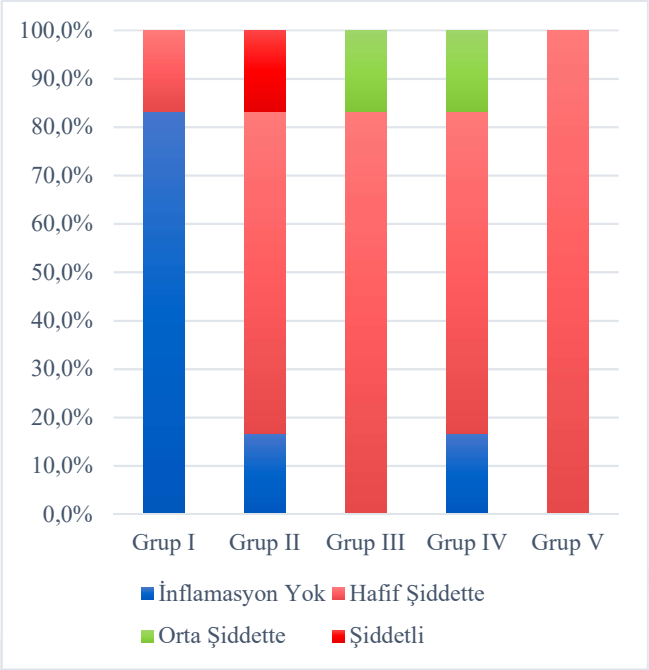
Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 7.gün inflamasyon şiddeti anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 8).

Grup III ve grup V de 15.gün inflamasyon şiddeti grup I den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti (Tablo 8).

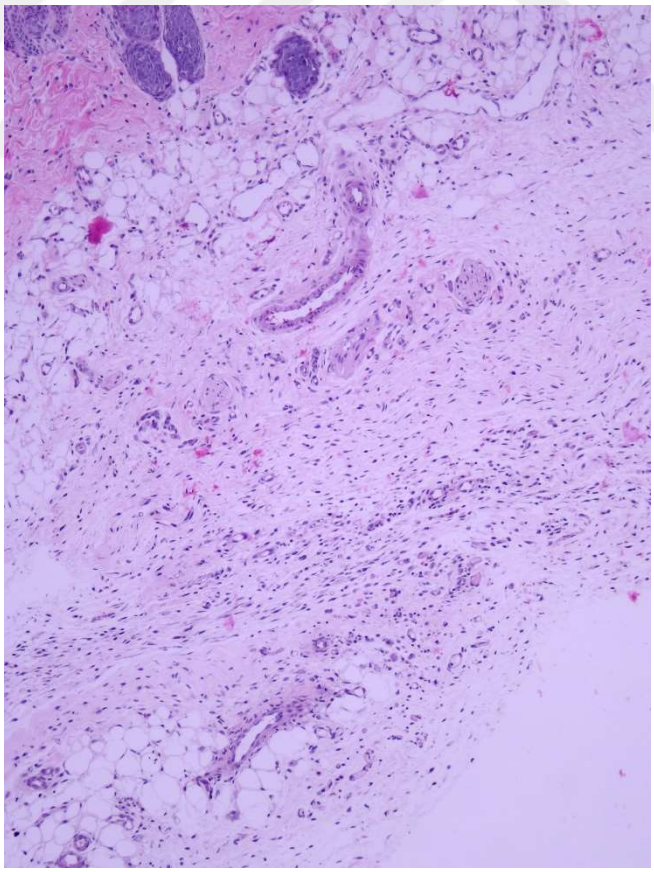
Grup I, grup II, grup IV arasında 15.gün inflamasyon şiddeti anlamlı ($p >0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup III, grup IV, grup II, grup V arasında 15.gün inflamasyon şiddeti anlamlı ($p >0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 8).



Şekil 16: 7. Gün inflamasyonun değerlendirilmesi



Şekil 17: 15. Gün inflamasyonun değerlendirilmesi



Şekil 18: Grup 5'in 15.günde plazma hücreleri, lenfositler ve histiositlerden oluşan inflamasyon bulguları (x10)

Tablo 8: Anjiyogenez, inflamasyon ve krut varlığı değerlendirilmesi

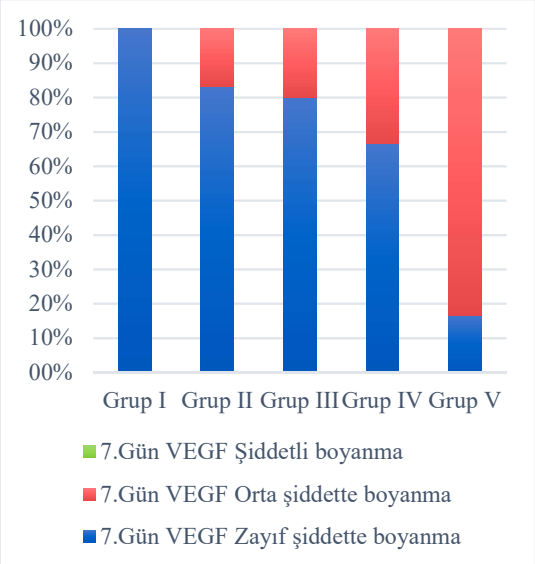
			Grup I		Grup II		Grup III		Grup IV		Grup V		p
Anjiyogenez													
7.Gün	<5 Damar /1 BBA	n-%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	p>0.05 X^2
	6-10 Damar/ 1 BBA	n-%	2	33.3%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	2	33.3%	
	>10 Damar/ 1 BBA	n-%	3	50.0%	5	83.3%	5	83.3%	6	100.0%	4	66.7%	
15.Gün	<5 Damar /1 BBA	n-%	4	66.7%	0	0.0%	1	16.7%	1	16.7%	1	16.7%	p>0.05 X^2
	6-10 Damar/ 1 BBA	n-%	1	16.7%	2	33.3%	3	50.0%	2	33.3%	3	50.0%	
	>10 Damar/ 1 BBA	n-%	1	16.7%	4	66.7%	2	33.3%	3	50.0%	2	33.3%	
İnflamasyon Şiddeti													
7.Gün	İnflamasyon Yok	n-%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	p>0.05 X^2
	Orta Şiddette	n-%	3	50.0%	1	16.7%	1	16.7%	1	16.7%	4	66.7%	
	Şiddetli	n-%	2	33.3%	5	83.3%	4	66.7%	5	83.3%	2	33.3%	
15.Gün	İnflamasyon Yok	n-%	5	83.3%	1	16.7%	0	0.0%	1	16.7%	0	0.0%	***p < 0.05*** X^2
	Hafif Şiddette	n-%	1	16.7%	4	66.7%	5	83.3%	4	66.7%	6	100.0%	
	Orta Şiddette	n-%	0	0.0%	0	0.0%	1	16.7%	1	16.7%	0	0.0%	
	Şiddetli	n-%	0	0.0%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
KURUT													
7.Gün	(-)	n-%	1	16.7%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	p>0.05 X^2
	(+)	n-%	5	83.3%	5	83.3%	6	100.0%	6	100.0%	6	100.0%	
15.Gün	(-)	n-%	5	83.3%	5	83.3%	6	100.0%	6	100.0%	6	100.0%	p>0.05 X^2
	(+)	n-%	1	16.7%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	

X^2 Ki-kare test (Fischer test)

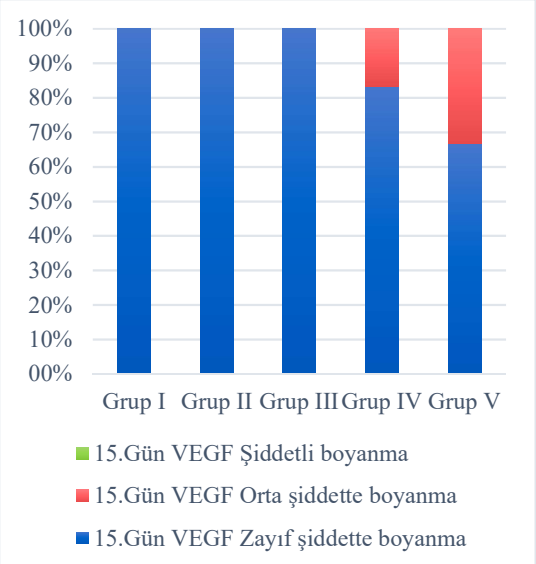
4.3. İMMUNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

4.3.1. Anti- VEGF Değerlendirilmesi

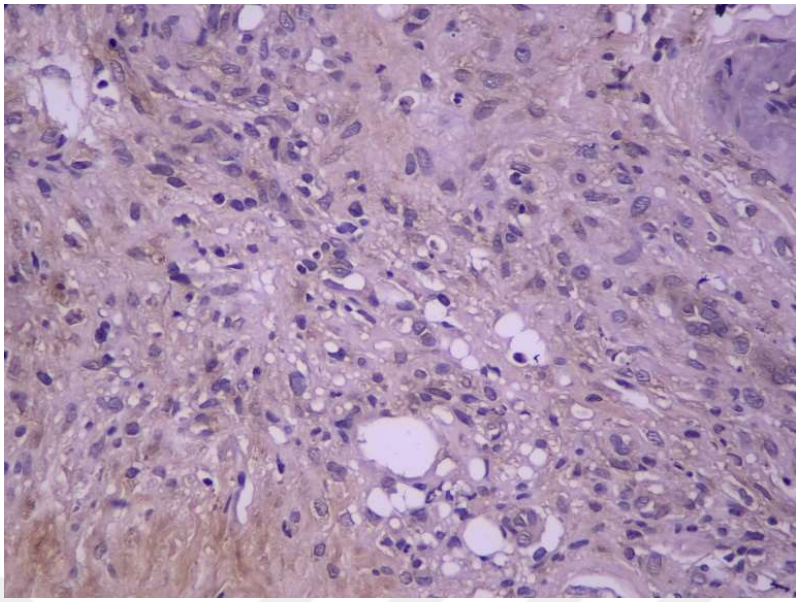
Grup V de 7.gün VEGF boyanma şiddeti grup I den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Grup I, grup II, grup III, grup IV arasında 7.gün VEGF boyanma şiddeti anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup V, grup II, grup III, grup IV arasında 7.gün VEGF boyanma şiddeti anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 15.gün VEGF boyanma dağılımı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 9).



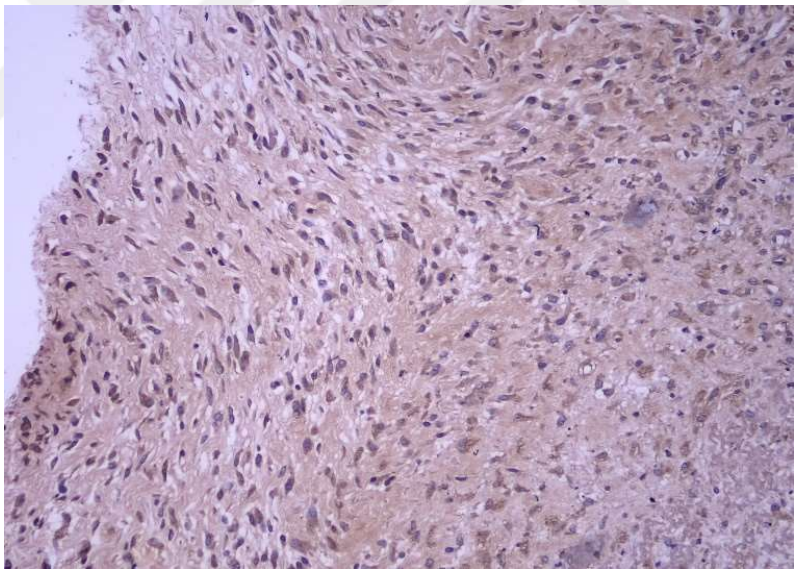
Şekil 19: 7. Gün VEGF değerlendirme



Şekil 20: 15. Gün VEGF değerlendirme



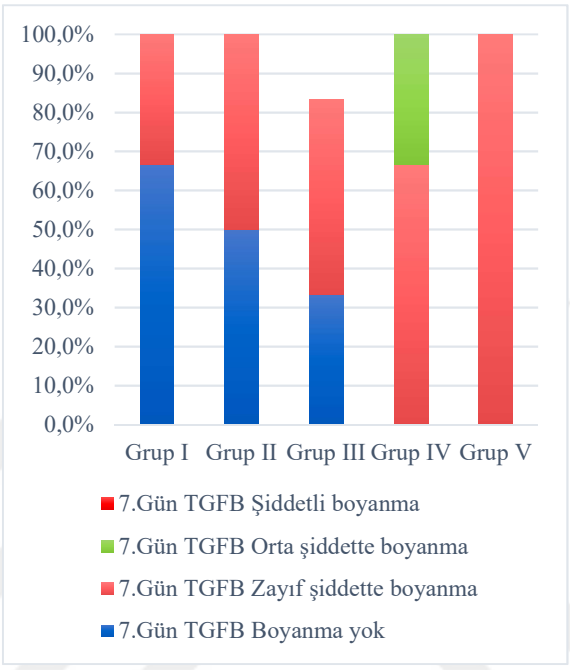
Şekil 21: Grup 1'de VEGF immunohistokimyasal incelemede ekspresyon saptanmaması (x40).



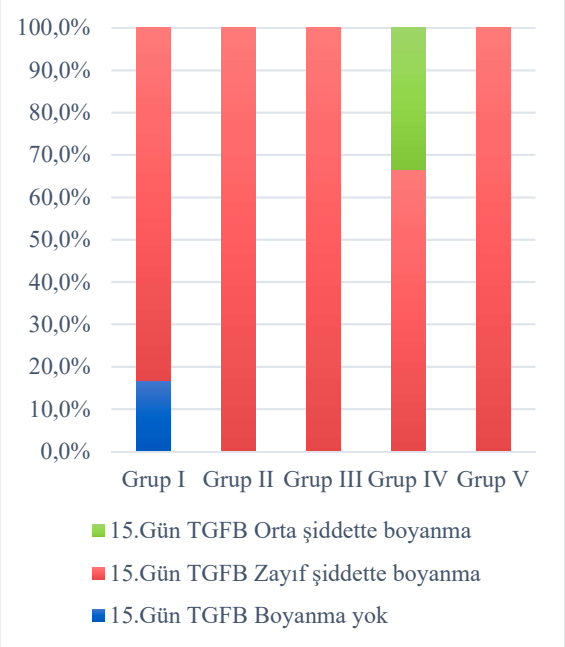
Şekil 22: Grup 5'te VEGF immunohistokimyasal incelemede hafif şiddette ekspresyon saptanması (x40).

4.3.2. Anti-TGF-beta Değerlendirme

Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 7.gün TGFB boyanma dağılımı anlamlı (p >0.05) farklılık göstermemiştir. Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 15.gün TGFB boyanma dağılımı anlamlı (p>0.05) farklılık göstermemiştir (Tablo 9).



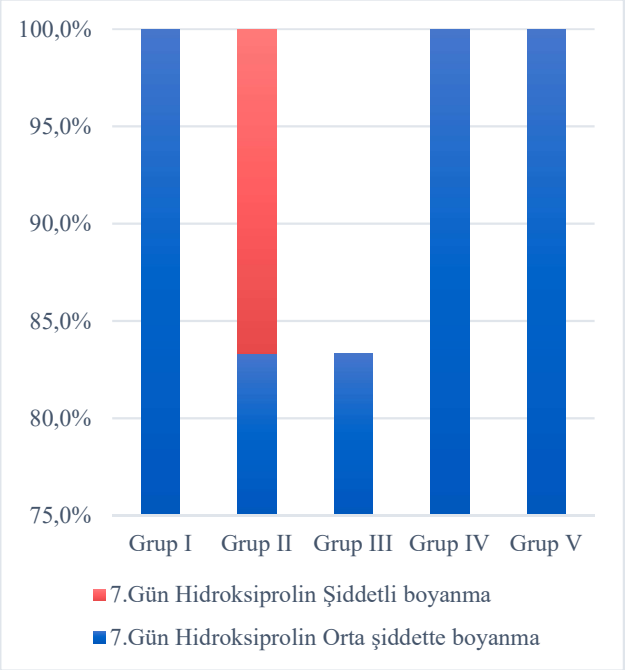
Şekil 23: 7. Gün TGF-beta Değerlendirme



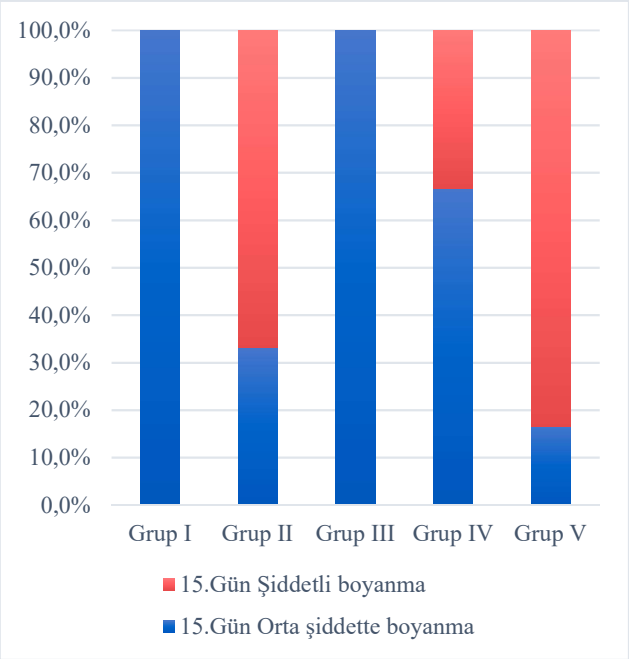
Şekil 24: 15. Gün TGF-beta değerlendirme

4.3.3. Anti-Hidroksiprolin Değerlendirme

Grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V arasında 7.gün hidroksiprolin boyanma dağılımı anlamlı (p >0.05) farklılık göstermemiştir. Grup V'de 15.gün hidroksiprolin boyanma şiddeti grup I'den anlamlı (p < 0.05) olarak daha yüksekti. Grup I, grup II, grup III, grup IV arasında 15.gün hidroksiprolin boyanma şiddeti anlamlı (p >0.05) farklılık göstermemiştir. Grup V, grup II, grup III, grup IV arasında 15.gün hidroksiprolin boyanma şiddeti anlamlı (p>0.05) farklılık göstermemiştir (Tablo 9).



Şekil 25: 7. Gün hidroksiprolin değerlendirme



Şekil 26: 15.Gün hidroksiprolin değerlendirme

Tablo 9: VEGF, TGF-beta ve hidroksiprolinin istatistiksel analazi

			Grup I		Grup II		Grup III		Grup IV		Grup V		p
VEGF													
7.Gün	Zayıf şiddette boyanma	n-%	6	100.0%	5	83.3%	4	80.0%	4	66.7%	1	16.7%	***p<0.05*** X^2
	Orta şiddette boyanma	n-%	0	0.0%	1	16.7%	1	20.0%	2	33.3%	5	83.3%	
	Şiddetli boyanma	n-%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
15.Gün	Zayıf şiddette boyanma	n-%	6	100.0%	6	100%	6	100.0%	5	83.3%	4	66.7%	p>0.05 X^2
	Orta şiddette boyanma	n-%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	1	16.7%	2	33.3%	
	Şiddetli boyanma	n-%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
TGFB													
7.Gün	Boyanma yok	n-%	4	66.7%	3	50.0%	2	33.3%	0	0.0%	0	0.0%	p>0.05 X^2
	Zayıf şiddette boyanma	n-%	2	33.3%	3	50.0%	3	50.0%	4	66.7%	6	100.0%	
	Orta şiddette boyanma	n-%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	2	33.3%	0	0.0%	
	Şiddetli boyanma	n-%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
15.Gün	Boyanma yok	n-%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	p>0.05 X^2
	Zayıf şiddette boyanma	n-%	5	83.3%	6	100%	6	100.0%	4	66.7%	6	100.0%	
	Orta şiddette boyanma	n-%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	2	33.3%	0	0.0%	
Hidroksiprolin													
7.Gün	Orta şiddette boyanma	n-%	6	100.0%	5	83.3%	5	83.3%	6	100.0%	6	100.0%	p>0.05 X^2
	Şiddetli boyanma	n-%	0	0.0%	1	16.7%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
15.Gün	Orta şiddette boyanma	n-%	6	100.0%	2	33.3%	6	100.0%	4	66.7%	1	16.7%	***p<0.05*** X^2
	Şiddetli boyanma	n-%	0	0.0%	4	66.7%	0	0.0%	2	33.3%	5	83.3%	

X^2 Ki-kare test (Fischer test)

5. TARTIŞMA

Yara iyileşmesi birbiri ile iç içe geçmiş olan hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve re-modelling aşamalarından oluşur. Her aşamada birçok farklı enzim, sitokin ve hücre grubu görev yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda magnezyumun hücre proliferasyonu (4), hücre farklılaşması ve kollajen oluşumu (5) gibi birçok hücresel iyileşme basamağında enzimlerin kofaktörü olarak görev yaptığı saptanmıştır. Dolayısıyla biyoaktif Mg2 + iyonu açığa çıkarabilen materyallerin kollajen sentezi ve neovaskülarizasyon için etkili olduğu, nihayetinde de yara iyileşme süreçlerini destekleyici bir etki yaratacağı varsayılabilir.

Sasaki ve ark.'nın 2017'de, Mg^{+2} ve Si^{+4} açığa çıkartan simektit ile yaptıkları bir hayvan yara iyileşme çalışmasında Mg-smektit grubunun kollajen lif oluşumunun yoğunluğu, kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Tedavi başlangıcından 1 hafta sonra Mg-smektit grubunda kontrol grubuna göre çok daha fazla sayıda yeni oluşmuş kan damarı gözlendi. Bu sonuçların Mg-smektit'in anjiyogenezi indükleyerek yara iyileşmesini desteklediğini gösterdiği düşünülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak bu iki iyonun birlikte yara iyileşmesini hızlandırdığı ve yara bakım malzemesi içerisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (93). Banai ve ark.'nın bir çalışmasında ise anjiyogenez ve yara iyileşmesinde önemli rol oynayan endotelyal hücre göçü ve proliferasyonu üzerinde hücre dışı magnezyumun rolü altı farklı $MgSO_4$ konsantrasyonunda ve çeşitli kültür koşullarında test edilmiştir. Magnezyum konsantrasyonu normal serum seviyesinin üzerine çıkarıldığında proliferasyonda doza bağlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu nedenle, magnezyumun endotel hücre göçü ve çoğalmasında önemli bir role sahip olduğu düşünülmüştür. Bu sonuçlarla magnezyum eksikliğinin vasküler yaralanmaların iyileşmesini, yeniden endotelizasyonunu ve miyokard enfarktüsünün iyileşmesini olumsuz etkileyebileceğini çalışmalarında öne sürmüşlerdir (94). Yine başka bir çalışmada yüksek doz sistemik Mg tedavisinin endotelyal proliferasyonu uyardığı, anjiyojenik faktörlere mitojenik yanıtı arttırdığı saptanmıştır (95). Literatüre uygun olarak bizim çalışmamızda da hem 7. Gün hem de 15. Gün H.E. değerlendirmesinde magnezyum içerikli krem ile tedavi edilen deney gruplarında tüm kontrol gruplarından daha fazla yeni damar oluşumu gözlenmiştir ve bu da diğer literatürleri destekleyici niteliktedir. Buna benzer şekilde 7.gün

granülasyon doku oluşumu da MgSO4 içeren krem kullanılan gruplarda kontrol gruplarına nazaran daha yüksek bulunmuştur. Makroskopik olarak deriden daha kabarık bir krut oluşturan MGSO4 kullanılan gruplarda, kontrol gruplarına kıyasla, histopatolojik olarak epitelizasyonun daha az olduğu saptandı. Bunun sebebinin abartılı bir granülasyon yanıtının epitelizasyonu geciktirmesi olabileceğini düşünmekteyiz. Burada kullandığımız topikal ajanın farklı aşamalarda farklı formlarda denenmesi ya da tedaviye emolyent eklenerek krutun azaltılması ve iyileşmenin hızlanmasına katkısı araştırılabilir.

Magnezyumun yara iyileştirmedeki rolünün yanı sıra antiinflamatuvar ve antinosiseptif etkisi de hastanın yaşam kalitesinde artış sağlayacağı düşünülmektedir. Singh ve ark. 2019 yılındaki çalışmasında genel anestezi için yapılan entübasyon öncesi uygulanan topikal $MgSO_4$'ın, postoperatif boğaz ağrısı insidansında azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir (96). Yine topikal $MgSO_4$'ın postoperatif boğaz ağrısı şiddetinde azalma sağlayarak hastanın yaşam kalitesini artıracağına işaret edilmiştir (97). Proksch ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise banyoda kullanılan deniz tuzları ile cildin hidrasyonunun sağlanması ve kızarıklığının azalmasının tuzlu denizdeki magnezyumdan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (98). Dermal yarada magnezyum tuzu kullanımı incelenmiş ve ürünün etkisinin kullanım yöntemine ve türüne bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (99). Nourbakhsh ve ark.'nın 2016'da yaptığı bir başka çalışmada diaper dermatitli iki yaşından küçük 64 çocuk hastada %2 Mg içeren krem etkisini araştırmış, yara onarıcı ve antiinflamatuar özellikleri bildirilen magnezyumun, krem formunda günlük hayatta cilt hastalıklarında kullanılabilirliğini göstermiştir (100). Jianguo ve ark.'nın 2010 yılında yaptıkları çalışmada magnezyum izoglisirizinatın (MgIG) alerjik kontakt dermatitli farelerde üzerindeki etkisini araştırılmıştır. 48 adet alerjik kontakt dermatitli fare, bir kontrol grubu, bir model grubu, üç dozaj grubu ve bir pozitif grup olmak üzere rastgele 6 gruba ayrılıp vena caudalis yoluyla ilaç enjekte edilmiştir. Deney sonucunda MgIG'ın fare serumunda kulağın şişmesini, kulak kalınlığı, eritem skorlarını, INF-gama ve IgE seviyesini azaltabildiğini göstermişlerdir (101). Her ne kadar literatüre benzer şekilde, biz de çalışmamızda klinik olarak inflamasyon bulgularını görmemiş olsak da H.E. boyama ile inflamasyon değerlendirildiğinde 7. Günde magnezyum içerikli kremler uygulanan deney gruplarında her iki kontrol grubundan daha fazla inflamasyon görüldü fakat

istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. 15. Gün değerlendirilmesinde ise grup 3 ve grup 5'in inflamasyon şiddeti, negatif kontrol olan grup 1'in iflamasyon şiddetinden daha yüksek bulunmuştur ve bu istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0,05$). İyileşmenin re-modelling aşamasında mevcut olan bu inflamasyon bize belki de bu grupların yaralarını kaşıyarak irrite ve enfekte ettiğini düşündürmektedir.

Magnezyumun yara iyileşmesine etkisi araştırılırken, birçok çalışmada oral ya da topikal magnezyum uygulanan yara alanının daha hızlı küçüldüğü tespit edilmiştir. Afzali ve ark.'nın yaptığı bir çalışma diyabetik ayak ülseri olan 57 hastaya 12 hafta boyunca sistemik magnezyum ve E vitamini tedavisi verilmiştir. Sonuçta glisemik kontrol, trigliserit, VLDL, LDL ve HDL, CRP, sedimentasyon üzerinde olumlıu etkileri görülmüştür ve bunun yanında ülser boyutu anlamlı olarak küçülmüştür (91). Yine başka bir çalışmada Alizadeh ve arkadaşları 48 adet sıçanı 4 gruba ayırarak farklı yara tiplerinde topikal magnezyum hidroksit tedavisinin sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Yaranın ilk gününden itibaren 3 günde 1 fotoğrafını çekip oranlamışlardır ve sonuç magnezyum hidroksit uygulanan grupların kontrol gruplarından hızlı iyileştiği olmuştur. Ayrıca yaranın gerilme kuvveti ölçüldüğünde de kontrol gruplarından daha yüksek saptanmıştır bu da araştırmacılara, magnezyumun hem fibroblastları, hem DNA ve protein üretimini artırarak kollajen sentezini arttırdığı nı düşündürmüştür (85). Yine başka bir örnek Pastorfide ve ark.'ı çinko klorür sprey ve magnezyum hidroksit merhem kombine tedavisi 85 jinekolojik insizyonu olan hastaya iki kez uygulanmıştır ve ardışık 7 gün boyunca gözlemlenmiştir. İnsizyonun uzunluğu, yara kenarlarının ayrılması ve derecesi, inflamasyon belirteçleri ve hastanın yaşadığı ağrı derecesi değerlendirilmiştir. Dördüncü ve yedinci günler plasebo grubuna kıyasla tedavi grubundaki hastalarda yaranın boyutunda daha belirgin bir azalma, daha kısa iyileşme süresi, daha iyi enfeksiyon kontrolü, daha az ayrılma ve daha etkili ağrı kontrolü gözlenmiştir. Çinko klorür sprey ve magnezyum hidroksit merhem ile ikili topikal tedavinin, obstetrik ve jinekolojik hastalarda yara iyileşmesini hızlandırmada güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmıştır (102).

Yaptığımız çalışmada 0, 2, 5, 8, 11 ve 14. günlerde yara yerlerinin fotoğrafları çekilerek Image j programında ölçüm yapılmıştır. Literatüre paralel şekilde özellikle ilk 7 gün, grup 4 (%10 $MgSO_4$ içerikli krem uygulanan grup)'te pozitif kontrol dahil diğer tüm gruplardan daha hızlı bir yara alanı küçülmesi görülürken (Şekil 7)

istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Yara alanının daha hızlı kapanıyor oluşunun sebebi immunhistokimyasal boyamada da grup 4'te daha yüksek saptanan TGF-beta olabileceğini düşünmekteyiz. Bunun sebebi TGF-β'nın; yaradaki doku büzüşmesinde önemli rol oynayan fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını uyardığı saptanmıştır(103). Ayrıca, TGF-β sinyal yolunun anjiyotensin II tarafından uyarılmasının, anjiyotensin tip 1 reseptörü yoluyla granülasyon dokusunun kontraksiyonunu indüklediği bildirilmiştir(104). Sonuç olarak en şiddetli boyamaya sahip olan grup 4 aynı zamanda ilk 7 günde yara alanı en çok küçülen grup olmuştur ve bu da literatür ile uyumludur.

Yara iyileşmesinin ilk basamağı olan inflamasyon aşamasından re-modelling aşamasına kadar her basamakta aktif görev yapan büyüme faktörleri birçok çalışmada immun-histokimyasal boyamalar ile değerlendirilmiş ve iyileşmenin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. VEGF, endotel hücreleri, makrofajlar ve diğer birçok hücre tarafından üretilen anjiyogenik bir peptittir ve endotel hücreleri için mükemmel bir belirteçtir (105). Perini ve ark.'nın 2015'te topikal Acheflan® ile yaptıkları yara çalışmasında VEGF'nin en yoğun dağılımını 8. günde sergilediğini saptamış ve bu faktörün esas olarak yara iyileşmesinin erken döneminde uyarıldığını göstermişerdir(75). Bu da aslında birçok basamağın yara iyileşmesinin erken döneminde yer aldığı, hücre hareketini, granülasyon dokusu oluşumunu ve anjiyogenezi kolaylaştırmak için birçok faktörün eş zamanlı çalışması gerektiği bulgularıyla uyumlu bulunmuştur (66,106). Biz de deneysel modelimizde VEGF işaretlemesi yoluyla, anjiyogenez sürecini gözlemlemek için immünohistokimyasal tekniği kullandık. Grup 5 (pozitif kontrol) 'in 7.gün VEGF değerlendirilmesi , grup 1(negatif kontrol) 'den anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Grup 4 (%10 $MgSO_4$) hem 7. hem 15.gün değerlendirmesinde daha yüksek şiddette boyanmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuca yine denek sayısının azlığının sebep olduğu düşülmekte olup, çok sayıda denekle yeni araştırmalar bu konuya ışık tutacaktır.

Kollajen, erken yara iyileşmesinde önemli bir işleve sahiptir ve hücre dışı dokuyu güçlendiren ve destekleyen ana bileşendir. Tip III kollajen, yaranın içinde yada çevresinde göç eden, çoğalan fibroblastlar tarafından salgılanır ve bu kollajen, proliferatif faz esnasında geçici matriksin oluşturulması için esastır. Doku kollajeni

için biyokimyasal bir belirteç olarak kullanılan amino asit, hidroksiprolindir (107,108). Literatürde birçok yara çalışmasında hidroksiprolin bir kollajen üretim belirteci olarak kullanılmıştır (75,109,110). Biz de kollajen üretimini değerlendirebilmek için hidroksiprolin immunhistokimyasal boyama ile çalıştık. Yapılan çalışmalarda sıklıkla kromatografi ile değerlendirilen hidroksiprolini bu şekilde değerlendirmemizin sebebi malzeme, transport ve bütçe kaynaklı eksikliklerden kaynaklıdır. Yaptığımız çalışmada grup 1, grup 2, grup 3, grup 4, grup 5 arasında 7.gün hidroksiprolin boyanma dağılımı anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermemiştir. Grup 5'de 15.gün hidroksiprolin boyanma şiddeti grup 1'den anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksek saptanmıştır. Grup 4'de ise 15.gün boyama negatif kontrolden daha yüksek fakat istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Literatür bilgisi de Magnezyumun kollajen üretimindeki önemini destekler niteliktedir. Nunes ve ark. 'ı yaptıkları bir çalışmada Mg^{+2}'un integrin-kollajen etkileşimlerinde ikili bir rol oynadığını belirlemişlerdir. Yapısal bir çapa işlevi görmenin yanı sıra, Mg'un metal bağlama bölgesinin ötesindeki integrin-kollajen etkileşimlerini modüle ettiği böylece kollajeni bağlamaya eğilimini artırdığını saptamışlardır (92). Lange ve ark. ise dermal fibroblastlar ve keratinositler ile çeşitli hücre dışı matris proteinlerinin beta-1 integrin aracılı bağlanmasında Mg^{+2} ve Ca^{+2}'un etki ettiğini göstermişlerdir (111). Bir başka çalışmada ise magnezyum aksorbil fosfat eklenmiş kollajen filmlerinin hem yara iyileşmesinde daha etkili olduğu hem de daha geç denatüre olduğunu saptamışlardır. Bunun sebebi olarak da magnezyumun kollajeni stabilize etme yeteneği olduğunu düşünmüşlerdir(112).

Çalışmamızda MgSO4 içeren krem ile tedavi edilen deney gruplarının negatif kontrol grubuna nazaran VEGF ve TGF-beta'yı artırarak, granülasyon doku oluşumu, kollajen sentezi ve anjiyogeneze pozitif yönde katkı sağladığı kanaatindeyiz. Aynı şekilde 3 günde 1 çekilen fotoğraflar ile yaptığımız yara alan ölçümlerimiz de histopatolojiyi destekler şekilde Mg+2'un iyileştirmeyi hızlandırdığı yönünde sonuçlanmıştır. Yara alanlarının makroskopik incelemesinde ise MgSO4 içerikli krem kullanılan gruplarda görülen deriden kabarık, fazlaca oluşturulan granülasyon dokusu bize bu içeriğin derin ülser tarzı yaralarda daha fazla fayda gösterebileceğini düşündürmüştür.

Hayvan çalışmalarının etik ilkeleri doğrultusunda minimum sayıda hayvan kullanılmıştır ve bu da istatiksel anlamlılık açısından bizim çalışmamamızın kısıtlılık yönü olmuştur. İyileştirmeyi hızlandırdığını düşündüğümüz Mg+2' nin en uygun form ve konsantrasyonunun araştırılması daha fazla sayıda denek içeren insan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

Yaptığımız çalışma ile vardığımız sonuçlar şu şekildedir:

1. Magnezyumun yara iyileşmesine pozitif etkisi vardır.
2. Magnezyum VEGF düzeyini ve buna paralel olarak anjiyogenezi artırarak yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır.
3. Magnezyum içerikli kremlerin granülsayon dokusunu daha fazla artırdığı düşünüldüğünden derin ülserlerin tedavisinde kullanılması planlanabilir.
4. Açık yara ile yapılan çalışmalarda aşırı granülasyon dokusu ve krut oluşması durumunda lezyonda enfeksiyon gelişebileceği akılda bulundurulması ve gerektiğinde tedaviye antimikrobiyal bir ajan eklenmesi düşünülebilir
5. Yara iyileşmesinde %10 $MgSO_4$ içerikli kremin %1 $MgSO_4$ içerikli kremden daha etkili olduğu düşünülmüştür.
6. Magnezyum Sülfat içerikli topikallerin %10 konsantrasyona kadar, açık ülserlerde kullanılabilir olduğu ve irritan yan etki oluşturmadığı gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, vd. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. Value Health. Ocak 2018;21(1):27-32.
2. Lindholm C, Searle R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. Int Wound J. Temmuz 2016;13 Suppl 2:5-15.
3. Bioinorganics and Wound Healing - Dalisson - 2019 - Advanced Healthcare Materials - Wiley Online Library [İnternet]. [a.yer 04 Ağustos 2021]. Erişim adresi: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.201900764
4. Ma J, Zhao N, Zhu D. Biphasic responses of human vascular smooth muscle cells to magnesium ion: SMC responses to Mg. J Biomed Mater Res. Şubat 2016;104(2):347-56.
5. Stechmiller JK. Understanding the Role of Nutrition and Wound Healing. Nutr Clin Pract. Şubat 2010;25(1):61-8.
6. Johnson W, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, vd. Safety Assessment of Magnesium Sulfate as Used in Cosmetics. Int J Toxicol. Mayıs 2018;37(1_suppl):47S-54S.
7. Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. Clark RAF, editor. London: Plenum Press, 1996; 3-50.
8. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, vd. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. Arch Dermatol. Nisan 1994;130(4):489-93.
9. Eming SA, Kaufmann J, Löhrer R, Krieg T. [Chronic wounds. Novel approaches in research and therapy]. Hautarzt. Kasım 2007;58(11):939-44.
10. Genel Cerrahi Cilt-1. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları Konu 4. Yara İyileşmesi 2002: 51-59.
11. Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. Am J Surg. Eylül 2003;186(3):259-63.
12. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. Plast Reconstr Surg. Haziran 2006;117(7 Suppl):35S-41S.
13. Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. J Surg Res. Şubat 1999;81(2):189-95.
14. An overview of surgical site infections: aetiology, incidence and risk factors [İnternet]. [a.yer 04 Haziran 2021]. Erişim adresi: http://www.worldwidewounds.com/2005/september/ Gottrup/ Surgical-Site-Infections-Overview.html
15. F. Charles Brunicardi, Dana K. Andersen, Timothy R. Billiar, David L. Dunn, John G. Hunter, Raphael E. Pollock. Schwartz‟s Principles of Surgery 8th ed, Mc- Graw Hill, 2005; 223-248.

16. Carrico TJ, Mehrhof Jr. AI, Cohen IK. Biology of Wound Healing. Surgical Clinics of North America 1984; 64: 721-733. İçinde.
17. Schilling JA. Wound Healing. Surgical Clinics of North America 1976; 56: 859- 874. İçinde.
18. Sayek İ. Temel Cerrahi. 3. baskı, Ankara 2004; 322-323.
19. Arslantaş, M.K. İskemik Yara Tedavisinde Eritropoetinin Etkinliği, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 2-17.(2007).
20. Wound Healing [Internet]. Wallin Biovisuals. [a.yer 01 Ağustos 2021]. Erişim adresi: https://www.mcwallin.com/wound-healing
21. Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. J Invest Dermatol. Kasım 1982;79(5):264-9.
22. Grinnell F, Billingham RE, Burgess L. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. J Invest Dermatol. Mart 1981;76(3):181-9.
23. Su Y, Richmond A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. Adv Wound Care (New Rochelle). 01 Kasım 2015;4(11):631-40.
24. Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The Role of Chemokines in Wound Healing. Int J Mol Sci. 18 Ekim 2018;19(10).
25. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. International Journal of Inflammation. 02 Haziran 2019;2019:1-15.
26. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. Ağustos 2011;11(8):519-31.
27. Kim M-H, Liu W, Borjesson DL, Curry F-RE, Miller LS, Cheung AL, vd. Dynamics of Neutrophil Infiltration during Cutaneous Wound Healing and Infection Using Fluorescence Imaging. Journal of Investigative Dermatology. Temmuz 2008;128(7):1812-20.
28. Schnoor M, Alcaide P, Voisin M-B, van Buul JD. Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. Mediators Inflamm. 2015;2015:946509.
29. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. Haziran 2010;10(6):427-39.
30. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol. Ocak 1975;78(1):71-100.
31. West HC, Bennett CL. Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. Front Immunol [Internet]. 2018 [a.yer 04 Haziran 2021];8. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01941/full
32. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. Cell Mol Life Sci. Ekim 2016;73(20):3861-85.
33. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged [İnternet]. [a.yer 04 Haziran 2021].

Erişim adresi: http://www.worldwidewounds.com/2004/august/Enoch/Pathophysiology-Of-Healing.html#ref16

34. Willenborg S, Eming SA. Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair: Macrophages in skin repair. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. Mart 2014;12(3):214-21.
35. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. Immunity. Mart 2016;44(3):450-62.
36. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. Journal of Investigative Dermatology. Mayıs 2007;127(5):998-1008.
37. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res. Şubat 2009;19(2):156-72.
38. Donovan J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. Front Biosci. 2013;18(1):106.
39. Kaltalioglu K, Coskun-Cevher S. A bioactive molecule in a complex wound healing process: platelet-derived growth factor. Int J Dermatol. Ağustos 2015;54(8):972-7.
40. Wynn T, Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. Semin Liver Dis. Ağustos 2010;30(03):245-57.
41. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. Physiological Reviews. Temmuz 2003;83(3):835-70.
42. Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. Fibrogenesis & Tissue Repair. 11 Mart 2010;3(1):4.
43. Barker TH. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. Biomaterials. 01 Haziran 2011;32(18):4211-4.
44. Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. Nat Cell Biol. Mayıs 2001;3(5):E117-23.
45. Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. Adv Drug Deliv Rev. Haziran 2019;146:344-65.
46. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. Nature. 20 Ocak 1962;193:293-4.
47. Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, vd. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. Blood. 19 Temmuz 2012;120(3):613-25.
48. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia Regulates Macrophage Functions in Inflammation. J Immunol. 15 Kasım 2005;175(10):6257-63.
49. Duscher D, Maan ZN, Whittam AJ, Sorkin M, Hu MS, Walmsley GG, vd. Fibroblast-Specific Deletion of Hypoxia Inducible Factor-1 Critically Impairs Murine Cutaneous Neovascularization and Wound Healing: Plastic and Reconstructive Surgery. Kasım 2015;136(5):1004-13.

50. Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, Mesquita RC, Mathew LK, Quinn ZL, vd. Endothelial HIF-2α regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes. J Clin Invest. 02 Nisan 2012;122(4):1427-43.
51. Rezvani HR, Ali N, Serrano-Sanchez M, Dubus P, Varon C, Ged C, vd. Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1α accelerates epidermal aging and affects re-epithelialization in human and mouse. J Cell Sci. 15 Aralık 2011;124(Pt 24):4172-83.
52. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism in Normal and Diseased Vasculature. Circ Res. 27 Mart 2015;116(7):1231-44.
53. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. Cell. Eylül 2011;146(6):873-87.
54. Wong BW, Marsch E, Treps L, Baes M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. EMBO J. Ağustos 2017;36(15):2187-203.
55. Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. J Cell Sci. Mart 1995;108 (Pt 3):1251-61.
56. Welch MP, Odland GF, Clark RA. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. J Cell Biol. Ocak 1990;110(1):133-45.
57. Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF, Berard CW, Rosen H. Healing of Rat Skin Wounds. Ann Surg. Şubat 1965;161(2):293-308.
58. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. J Cell Biol. 02 Şubat 1994;124(4):401-4.
59. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. Am J Pathol. Ocak 1995;146(1):56-66.
60. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. J Clin Invest. Ağustos 1986;78(2):329-32.
61. Greenhalgh DG. The Role of Growth Factors in Wound Healing. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. Temmuz 1996;41(1):159-67.
62. Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, vd. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. Biochemistry. 09 Ocak 1990;29(1):166-72.
63. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science. 08 Aralık 1989;246(4935):1306-9.
64. Melincovici CS, Bo AB, Mihu C, Istrate M, Moldovan I-M, Roman AL, vd. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. :13.
65. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). Growth Factors. 1993;8(1):1-9.
66. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science. 04 Nisan 1997;276(5309):75-81.

67. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. Lancet. 25 Ocak 1992;339(8787):213-4.
68. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, vd. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature. 22 Ekim 1992;359(6397):693-9.
69. Cohen S. The epidermal growth factor (EGF). Cancer. 15 Mayıs 1983;51(10):1787-91.
70. Skov Olsen P, Poulsen SS, Therkelsen K, Nexø E. Oral administration of synthetic human urogastrone promotes healing of chronic duodenal ulcers in rats. Gastroenterology. Nisan 1986;90(4):911-7.
71. Derynck R. Transforming growth factor-alpha: structure and biological activities. J Cell Biochem. 1986;32(4):293-304.
72. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA. Fibroblast growth factors and their receptors. Biochem Cell Biol. 1997;75(6):669-85.
73. Peifley KA, Alberts GF, Hsu DKW, Feng S-LY, Winkles JA. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor Regulates Fibroblast Growth Factor-2 Expression in Aortic Smooth Muscle Cells. Circulation Research. 01 Ağustos 1996;79(2):263-70.
74. Nayak BS, Anderson M, Pinto Pereira LM. Evaluation of wound-healing potential of Catharanthus roseus leaf extract in rats. Fitoterapia. Aralık 2007;78(7-8):540-4.
75. Perini JA, Angeli-Gamba T, Alessandra-Perini J, Ferreira LC, Nasciutti LE, Machado DE. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. BMC Complement Altern Med. 30 Haziran 2015;15:203.
76. Dalisson B, Barralet J. Bioinorganics and Wound Healing. Adv Healthc Mater. Eylül 2019;8(18):e1900764.
77. Yu H, Peng J, Xu Y, Chang J, Li H. Bioglass Activated Skin Tissue Engineering Constructs for Wound Healing. ACS Appl Mater Interfaces. 13 Ocak 2016;8(1):703-15.
78. Mohammadi AA, Seyed Jafari SM, Kiasat M, Pakyari MR, Ahrari I. Efficacy of debridement and wound cleansing with 2% hydrogen peroxide on graft take in the chronic-colonized burn wounds; a randomized controlled clinical trial. Burns. Eylül 2013;39(6):1131-6.
79. Demirci S, Doğan A, Aydın S, Dülger EÇ, Şahin F. Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. Mol Cell Biochem. Haziran 2016;417(1-2):119-33.
80. Agren MS. Studies on zinc in wound healing. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1990;154:1-36.
81. Pickart L. The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 01 Ocak 2008;19(8):969-88.
82. Hou Z, Nie C, Si Z, Ma Y. Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1α. Diabetes Res Clin Pract. Temmuz 2013;101(1):62-71.

83. Duscher D, Neofytou E, Wong VW, Maan ZN, Rennert RC, Inayathullah M, vd. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers. PROC NAT ACAD OF SCI (USA). 06 Ocak 2015;112(1):94-9.
84. Rude RK. Magnesium. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. Modern Nutrition in Health and Disease. 11th ed. Baltimore, Mass: Lippincott Williams & Wilkins; 2012:159-75. İçinde.
85. Alimohammad A, Mohammadali M, Mahmod K, Khadijeh S. A STUDY OF THE EFFECT OF MAGNESIUM HYDROXIDE ON THE WOUND HEALING PROCESS IN RATS. Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences. :6.
86. Dissemond J, Böttrich JG, Braunwarth H, Hilt J, Wilken P, Münter K-C. Evidence for silver in wound care - meta-analysis of clinical studies from 2000-2015: Silver in wound care. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. Mayıs 2017;15(5):524-35.
87. Office of Dietary Supplements - Magnesium [Internet]. [a.yer 07 Haziran 2021]. Erişim adresi: https://ods.od.nih.gov/factsheets/Magnesium-HealthProfessional/
88. Rude RK. Magnesium. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Moss J, White JD, eds. Encyclopedia of Dietary Supplements. 2nd ed. New York, NY: Informa Healthcare; 2010:527-37. İçinde.
89. Touyz R M. Magnesium in clinical medicine. Front Biosci. 2004;9(1-3):1278.
90. Coger V, Million N, Rehbock C, Sures B, Nachev M, Barcikowski S, vd. Tissue Concentrations of Zinc, Iron, Copper, and Magnesium During the Phases of Full Thickness Wound Healing in a Rodent Model. Biological Trace Element Research. 01 Eylül 2019;191.
91. Afzali H, Jafari Kashi AH, Momen-Heravi M, Razzaghi R, Amirani E, Bahmani F, vd. The effects of magnesium and vitamin E co-supplementation on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Wound Repair Regen. Mayıs 2019;27(3):277-84.
92. Nunes AM, Minetti CASA, Remeta DP, Baum J. Magnesium Activates Microsecond Dynamics to Regulate Integrin-Collagen Recognition. Structure. 07 Ağustos 2018;26(8):1080-1090.e5.
93. Sasaki Y, Sathi GA, Yamamoto O. Wound healing effect of bioactive ion released from Mg-smectite. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 01 Ağustos 2017;77:52-7.
94. Banai S, Haggroth L, Epstein SE, Casscells W. Influence of extracellular magnesium on capillary endothelial cell proliferation and migration. Circ Res. Eylül 1990;67(3):645-50.
95. Maier JAM, Bernardini D, Rayssiguier Y, Mazur A. High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. Biochim Biophys Acta. 24 Mayıs 2004;1689(1):6-12.
96. Singh N, Makkar J, Wourms V, Zorrilla-Vaca A, Cappellani R, Singh P. Role of topical magnesium in post-operative sore throat: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. Indian J Anaesth. 2019;63(7):520.

97. Kuriyama A, Maeda H, Sun R. Topical application of magnesium to prevent intubation-related sore throat in adult surgical patients: a systematic review and meta-analysis. Can J Anesth/J Can Anesth. Eylül 2019;66(9):1082-94.
98. Proksch E, Nissen H-P, Bremgartner M, Urquhart C. Bathing in a magnesium-rich Dead Sea salt solution improves skin barrier function, enhances skin hydration, and reduces inflammation in atopic dry skin. Int J Dermatol. Şubat 2005;44(2):151-7.
99. Denda M, Katagiri C, Hirao T, Maruyama N, Takahashi M. Some magnesium salts and a mixture of magnesium and calcium salts accelerate skin barrier recovery. Arch Dermatol Res. Ekim 1999;291(10):560-3.
100. Nourbakhsh SM-K, Rouhi-Boroujeni H, Kheiri M, Mobasheri M, Shirani M, Ahrani S, vd. Effect of Topical Application of the Cream Containing Magnesium 2% on Treatment of Diaper Dermatitis and Diaper Rash in Children A Clinical Trial Study. J Clin Diagn Res. Ocak 2016;10(1):WC04-06.
101. Xu J, Liu J, Peng C, Liu Y, Hu J. [Effect of magnesium isoglycyrrhizinate on allergy contact dermatitis (ACD) in mice]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. Mayıs 2010;35(10):1311-4.
102. Pastorfide GB, Gorgonio NM, Ganzon AR, Alberto RM. Zinc chloride spray--magnesium hydroxide ointment dual topical regimen in the treatment of obstetric and gynecologic incisional wounds. Clin Ther. Nisan 1989;11(2):258-63.
103. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol. Temmuz 1993;122(1):103-11.
104. Ehanire T, Ren L, Bond J, Medina M, Li G, Bashirov L, vd. Angiotensin II Stimulates Canonical TGFβ Signaling Pathway through Angiotensin Type 1 Receptor to Induce Granulation Tissue Contraction. J Mol Med (Berl). Mart 2015;93(3):289-302.
105. Soyer T, Ayva S, Aliefendioğlu D, Aktuna Z, Aslan MK, Senyücel MF, vd. Effect of phototherapy on growth factor levels in neonatal rat skin. J Pediatr Surg. Kasım 2011;46(11):2128-31.
106. Kim CH, Lee JH, Won JH, Cho MK. Mesenchymal stem cells improve wound healing in vivo via early activation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor. J Korean Med Sci. Haziran 2011;26(6):726-33.
107. Long KB, Burgwin CM, Huneke R, Artlett CM, Blankenhorn EP. Tight Skin 2 Mice Exhibit Delayed Wound Healing Caused by Increased Elastic Fibers in Fibrotic Skin. Adv Wound Care (New Rochelle). 01 Eylül 2014;3(9):573-81.
108. El-Mesallamy HO, Diab MR, Hamdy NM, Dardir SM. Cell-based regenerative strategies for treatment of diabetic skin wounds, a comparative study between human umbilical cord blood-mononuclear cells and calves' blood haemodialysate. PLoS One. 2014;9(3):e89853.
109. Shivananda Nayak B, Dan Ramdath D, Marshall JR, Isitor G, Xue S, Shi J. Wound-healing properties of the oils of Vitis vinifera and Vaccinium macrocarpon. Phytother Res. Ağustos 2011;25(8):1201-8.

110. Nayak SB, Rodrigues V, Maharaj S, Bhogadi VS. Wound healing activity of the fruit skin of Punica granatum. J Med Food. Eylül 2013;16(9):857-61.
111. Lange TS, Bielinsky AK, Kirchberg K, Bank I, Herrmann K, Krieg T, vd. Mg2+ and Ca2+ differentially regulate beta 1 integrin-mediated adhesion of dermal fibroblasts and keratinocytes to various extracellular matrix proteins. Exp Cell Res. Eylül 1994;214(1):381-8.
112. Lakra R, Kiran MS, Korrapati PS. Effect of magnesium ascorbyl phosphate on collagen stabilization for wound healing application. Int J Biol Macromol. 01 Ocak 2021;166:333-41.