

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
DENİZ VE SUALTI HEKİMLİĞİ SERVİSİ

KRONİK İYİLEŞMEYEN YARALARDA
HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ VE TAKİP
KRİTERİ OLARAK PROLİDAZ ENZİMİNİN
DEĞERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr.Őenol YILDIZ

İSTANBUL-1997

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
1. YARA İYİLEŞMESİ	2
2. KOLAJEN METABOLİZMASI	10
3. PROLİDAZ ENZİMİ	14
4. HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ	17
III. GEREÇ ve YÖNTEM	27
IV. BULGULAR	33
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
VI. ÖZET	44
VII. YABANCI DİLDE ÖZET	45
VIII. KAYNAKLAR	46

ÖNSÖZ

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Deniz ve Sualtı Hekimliği Servis Şefliğince 26.2.1996 tarihinde verilmiş ve çalışılmaya başlanmıştır.

Bu araştırmayı bana tez olarak veren ve yetişmemde büyük katkıları olan sayın hocam Doç.Dr. M. Emin ELBÜKEN'e minnet ve şükran duygularımı sunarım.

Eğitimimde ve asistanlık sürem boyunca katkılarıyla bana destek veren sayın Uzm. Dr. Kadir DÜNDAR'a teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışmam esnasında her türlü laboratuvar desteği sağlayan GATA HEH Biyokimya Servis Şefi Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜLTEPE ve laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Dr. Oğuz CAYMAZ'a teşekkür ederim.

Patoloji Servisi olarak her türlü kolaylığı gösteren ve çalışmalarımıza katkıda bulunan servis personeline teşekkürlerimi sunarım.

İhtisasım süresince ve bu çalışmayı hazırlarken her türlü koşluda bana destek olan ve birlikte çalışmaktan zevk duyduğum tüm Dz. ve Sualtı Hekimliği servis personeline teşekkür ederim.

GİRİŞ

İskemi ve hipoksinin yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkisi çok eskiden beri bilinmektedir. Bu olumsuz etkinin düzeltilmesi için flepler ve hiperbarik oksijen tedavisi gibi yöntemler kullanılmagelmiştir. Doku oksijenasyonunu artırıcı tekniklerin klinik olarak başarılı olması ve son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalar oksijenin yara iyileşmesinin temel faktörü olduğunu göstermiştir. Hiperbarik oksijen (HB0₂) plazmada eriyik oksijen miktarını ve arteryel parsiyel oksijen basıncını artırarak dokuların daha iyi oksijenlenmesini sağlar, bunun yanısıra dokularda kollajen sentezini, matriks birikimini , anjioneogenezi, epitelizasyonu ve bakterial fagositozu artırarak yara iyileşmesini hızlandırır.

Hiperbarik oksijen tedavisinin kollajen sentezini artırdığı yönünde bilgiler vardır. Bu fikirden yola çıkarak, yara tedavisinde HB0₂ tedavisinin etkisiyle kollajen yapımının takip kriteri olup olamayacağını düşündük. Kollajen sentezinde rol alan prolil hidroksilaz enziminin her laboratuvarda çalışılmaması, pahalı yöntem olması ve hatalı sonuç olasılığının da yüksek olması nedeniyle daha kolay çalışılan prolidaz enzimini değerlendirmeye aldık. Kollajen metabolizmasının yıkım basamağında rol alan prolidaz enzim değerlerinin HB0₂ tedavisi ile ilişkisi ve buna bağlı artış artmayacağı araştırıldı. İyileşme esnasında kollajen sentezinin artış, kollajen yıkımının azaldığını gösterebilmek için yara kenarından alınan cilt biopsilerinin patolojik incelemeleri yapıldı.

HB0₂ ve medikal tedavi uygulamasıyla yara iyileşmesinde klinik gözleme ek olarak prolidaz enziminin objektif tanı kriteri olup olmayacağı araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

1.YARA İYİLEŞMESİ

Yara, deri, mukoza ve organların büyük yada küçük genişlikte doku bütünlüğünün bozulması olarak tarif edilir.Yaralanma sonrası farklı pekçok prosesin ardısıra gelmesinin tek amacı tamirdir. Bu çok kompleks ve dinamik yollarla dokunun yıkılması (katabolik faz) ve yeniden sentezi (anabolik faz) ile başarılıdır. Yara iyileşmesi belirli hücre tipleri, biokimyasal denge, lokalizasyon ve zamanla ilişkilidir. Tüm yara tiplerinde iyileşme prosesi birbirinin içine kısmen geçmiş 3 faz'dan oluşur.

- 1.İnflamatuar veya eksudatif faz
- 2.Proliferatif faz
- 3.Regeneratif faz (9,59).

EKSUDATİF FAZ:

Eksudatif faz yaklaşık olarak 72 saat sürer ve kan koagülasyon sistemi aktive olup platelet derived growth factor (PDGF), platelet activating factor (PAF), tromboksan, serotonin, adrenalin ve kompleman faktörleri gibi çeşitli mediatörler salınır ve plateletler aktive olur.

Kan koagülasyonu: Biolojik tamirin primer amacı hemostazi sağlamaktır. Plateletler taze ortaya çıkarılmış kollajen ve doku agregatlarına yapışır ve tıkaç oluşumu ile koagülasyonun ilk basamağını oluşturur. Plateletler ve hasarlanmış hücreler tüm pıhtılaşma faktörlerini aktive eden çeşitli faktörler salgırlar. Sonunda fibrinojen fibrine dönüşerek hemostaz sağlanmış olur. Kan koagülasyonunun son basamağı esnasında faktör 13a, çözünür fibrinin çözünmeyen formuna dönüşümünde rol alarak fibrini stabilize eder ve buna ek olarak fibronektinin fibroblastlara bağlanmasına yol açar. Monomerik fibrin agregatları faktör 13a ile aktive olan ve fibroblast migrasyonu için matriks oluşturan yapılar oluşturur. Faktör 13 yara iyileşmesinde hücrel proseslerle koagülasyon arasında birleştirici elementtir. Kan koagülasyonu ve platelet agregasyonunu fizyolojik sınırlarda tutmak için endotel, prostasiklin, protein-C ve t-plazminojen aktivatör gibi düzenleyici faktörler üretir (33, 59).

Yara iyileşmesinde plateletlerin etkileri;

1.Hemostaz

*Adezyon, agregasyon

*Koagulasyon

2.Biyolojik aktif komponentlerin salınımı

*Vazoaktif mediatörler

*Kemotaktik faktörler

*Büyüme faktörleri

İnflamatuar hücreler: Yara tamirinin ilk fazı içindeki hücresel elemanlar 2-4 saat sonra migrasyon eden inflamatuvar hücreler ve 32 saat sonra migrasyon eden fibroblastlardan ibarettir. Yarayı çoğunlukla nötrofilik granülositler ve eş zamanlı olarak makrofajlar infiltre eder. Makrofaj ve nötrofilik granülositlerin migrasyonunda, kompleman faktör C3a ve C5a, kan pıhtısından salınan kollajen ve fibrin yıkım ürünleri gibi kemotaktik faktörler rol alır.

Nötrofilik Granülositler: İnflamatuar faz, erken ve geç periyod olarak ikiye ayrılır. İlk 6 saat içinde granülositlerin yara alanına migrasyonu gerçekleşir. Yaralanmadan sonra ilk saatte granülositlerin lokal endoteliuma yapışmasında artış vardır. Koagulasyon sistemi aktivasyonu ve platelet agregasyonundan kaynaklanan bir çok kemotaktik substansın (kallikrein, fibrinopeptidler, kompleman C3a ve C5a, lökotrien B4 ve bakteriel dış membran proteinleri) migrasyonu ile endotelial hücreler ve bozulan bazal membran aracılığı ile yara infiltre edilir. Granülositler bakteriel defans ve debridmanda primer olarak rol alırlar. Granülositer, myeloperoksidaz, elastaz, asidik hidrolaz, nötral proteaz ve lizozim gibi enzim yüklü granüller taşır. Yara içine infiltre olan serum ile birlikte parçalanmış granülositler püy birikimine yol açarlar. Yara eğer patojen bakterilerle infiltre olmazsa granülositik infiltrasyon birkaç gün sonra son bulur (59).

Kontaminasyon: Enfekte yaralarda granülositik hareketlerin devam etmesi tamirin birinci fazını uzatarak, yara iyileşmesinde gecikmeye

yol açar. Opsonizasyon ve fagositoz bakteriel eliminasyon esnasında çok önemli 2 granülositik olaydır.

Bakteriel organizmanın yüzeyi immünoglobulinler ve kompleman C3b ile kaplanır (opsonizasyon). Bu olay bakteri yüzeyine yapışmayı (adherens) ve granülositler tarafından fagositozu artırır. Büyük operasyon ve travma gibi katabolik durumlar, Diyabetes Mellitus ve kronik hastalıklar immun sistemin opsonik kapasitesini düşürür. Fagositoz sonrası mikroorganizma O_2 bağımlı bir yolla öldürülür. Fagolizozomun membran bağımlı enzim kompleksi 3 tane reaktif O_2 türü üretir. Bunlar hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijen radikali (O_2^-) ve hidroksil radikalidir (OH^-). Bunlar da bakteriel membranı atake eder. Sürepoksitdismutaz ve myeloperoksidaz bu yıkımı tamamlar. Sonuç olarak 20 mmHg den yüksek doku O_2 saturasyonu yara alanında bu kimyasal reaksiyonlar için yeterlidir. Kronik granulomatoz ve O_2 radikal üretiminin azaldığı hastalıklarda doku oksijen parsiyel basıncı yüksek olsa da oksijene bağlı bakteriel öldürme tam olmayabilir. Oksijen desteği yara iyileşmesinin kalitesi ve iyileşmenin devamı için kritiktir (27, 29, 59).

Yara iyileşmesinde 2.tip immünositler aynı anda migrasyon eden makrofajlardır. Bunlar geç inflamatuvar fazda regülatör olarak fonksiyon yaparlar ve bunu izleyen monosit/makrofaj aktivasyonunu etkilerler. 2. basamakta lokal mediatörler (interferon α , β , ve γ) ileri makrofaj aktivasyonunu artırır. Bakteriel endotoksinler gibi diğer uyarılarla oluşan tetikleme ile (3.aktivasyon basamağı) yara makrofajı sitolitik ve fagositik hücreye dönüşür (27, 59).

Yara iyileşmesinde makrofaj fonksiyonu bir taraftan debridman için diğer taraftan da salınan sitokinlerle tamirin regülasyonu için gereklidir. Yaralanmadan sonraki birkaç hafta sonra bile önceki yaralanma alanında makrofajlar tespit edilmektedir. Makrofajlar granülositlerle birlikte aktivasyon sonrası doku parçalanma ürünleri üretirler. Sahip oldukları proteolitik enzimlerin (elastaz, kollajenaz, katapsin B, plazmin aktivatör) hücre içi fagositozla beraber hücre dışı etkileri de vardır. Enzimatik yıkılmadan kaynaklanan yıkım ürünleri kendi kendilerine kemotaktiktir ve damar

yolundan yeni monositler çekerler. Tabii ki sistemik steroid tedavisi veya immunosüpresif tedavi esnasında olduğu gibi monositopeni varsa yara iyileşmesi bozulacaktır (3, 59).

Makrofajlar iyileşme prosesinde merkezi düzenleyici hücre olarak iş yaparlar. Salınan mediatörler (en iyi bilineni interlökin-1 "IL1" ve tümör nekroz faktör α "TNF- α "), lenfosit, fibroblast, keratinosit ve endotelial hücrelerin fonksiyon ve proliferasyonlarını etkiler. IL-1 lenfosit ve fibroblast proliferasyonunu artırır ve kollajen sentezini tetikler . TNF- α yara alanına genişleyen kapillerleri uyaran bir majör anjioneogenetik faktör olarak tespit edilmiştir. TNF- α uyarısı ile yara kenarlarından başlayan bir neovaskularizasyon O_2 gradientini yükselterek fagositozu artırır. Makrofajlar tarafından üretilen basic fibroblast growth faktör (bFGF), epidermal growth faktör (EGF), transforming growth faktör β (TGF- β) yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. Bu mediatörler hücre büyüme ve hücre bölünmesini uyarıcı veya inhibe edici peptidler olarak bilinir. Her bir faktör hücre yüzeyinde reseptörlerle belirlenen özel hedef hücreye sahiptir (59).

Bakteriel yara kontaminasyonunda eliminasyon basamakları:

- *Kompleman ile bakterinin opsonizasyonu
- *Kemotaktik faktörlerin oluşumu
- *Lökositlerin endotel hücrelerine yapışması
- *Kan hücrelerinden lökositlerin uzaklaştırılması
- *Opsonize bakterilerin polimorfonükleer granüositlere yapışması
- *Bakterilerin fagositozu
- *Bakterilerin elimine edilmesi

Fibroblast growth faktör (FGF) endotelial hücreler üzerinde mitojenik etkiye sahiptir ve fibroblast proliferasyonunu uyarır. Epidermal growth faktör (EGF) migrasyon ve keratinositlerin büyümesi üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir. Platelet kaynaklı growth faktör (PDGF) fibroblastlar için mitojenik ve kemotaktiktir. Transforming growth faktör (TGF- β) reversibl bir şekilde keratinosit, T ve B lenfosit ve fibroblastların proliferasyonunu inhibe eder, monosit ve makrofajların kemotaksisini etkiler. Büyüme faktörleri sinerjistik olarak çalışabilir fakat tam anlaşılmayan bir yolla kompleks bir

şekilde yara iyileşmesinin düzenlenmesinde antagonist etki yapar. Yara iyileşmesinde büyüme faktörlerinin terapötik değerinin olup olmadığı açıklama beklemektedir.

PROLİFERATİF FAZ

Yara tamirinin ikinci fazı proliferasyonla karakterize olduğu için proliferatif veya regeneratif faz olarak isimlendirilir. Yaralanmadan bir gün sonra başlar ve maksimum 14 güne kadar devam edebilir.

Granülasyon dokusu oluşumu: Neovaskülarizasyonla çok damarlı bir doku oluşur, inflamatuvar fazdaki dominant hücre olan lökositlerle beraber histiyositler, fibrositler, fibroblastlar, plazma hücreleri, mast hücreleri, anjioblastlar ve myofibroblastlar lezyon alanına hareket eder. Aktive lökositlerin endotele yapışmasının ve mast hücrelerinden bradikinin salınmasının sonucu olarak vasküler permeabilite artar, büyük moleküler ağırlıklı maddeler (albumin, fibrinojen) hücre dışına çıkar ve ödeme yol açar. Yara ödemi fibrositlerin fibroblastlara dönüşümü için başlatıcı sinyal görevi yaparlar. Sıvı birikimi, fibrositlerin fibroblastlara çevrilmesi ve hücre proliferasyonunu başlatması hızlı doku granülasyonuna yol açan tetikleyici mekanizmadır. Yeni kapiller ve fibroblastların oluşumu epitelizasyon için hayatidir. Fibroblastlar substrat olarak parçalanmış kan pıhtılarından kaynaklanan aminoasitleri kullanarak tüm iyileşme prosesi boyunca çoğalıp migrasyon eder.

Anjiogenezis: Venöz endoteliumdan kaynaklanan hücreler, anjiogeneozde migrasyon etmeye başlayan ilk hücrelerdir. Sitoplazmik pseudopodlar ile parçalanmış bazal membran arasından hareket ederler. Bunu endotelial hücreler izler. Bu kayıp damar kaynaklı endotelial hücrelerin çoğalması ile telafi edilir.

Myofibroblastlar: Myofibroblastlar yapı olarak düz kas hücresine benzeyen fibroblastlardır. Bunlar kontraktıl fiberler içerir. Granülasyon dokusu gebe rat uterusundan daha çok aktinomyosin içerir. Yara yüzeyi myofibroblastların kontraksiyonu ile küçültülür. Kollajen fibril maturasyonu yara kontraksiyonuna çok az katkıda bulunur. Kontraksiyondan dolayı yara kenarları her gün yaklaşık 1-2mm ilerler. Bununla beraber yara

kontraksiyonu hayvanlarda olduğu kadar iyileşme prosesinde karar verici rol oynamaz.

Fibronektin: Fibronektin proliferatif fazda esastır. Bu glikoprotein hücre yüzeylerinde, konnektif doku matriksinde ve hücre dışı sıvıda bulunur. Bu, hücrelerin fibrin matriksine yapışmasında rol oynar.

REPERATİF FAZ

Yara iyileşmesinin son fazı esnasında yeni konnektif doku oluşumu çok önemlidir. Fibroblastlar kollajen fibrillerini sentezler sentezlemez onların mitotik aktivitesi biter. Kollajen fibrilleri mature olurken hücre dansitesi ve yara vaskularizasyonu azalır. Nedbe formasyonu başlar. Hem kollajen birikimi hem de fibroblast oriyantasyonu, son fazda hücre dışı matriksin çoğunu oluşturan fibronektinle belirlenir (19, 57, 59).

Yeni oluşmuş granülasyon dokusunda hücre hareketi hyaluronik asitin varlığına bağlıdır. Hyaluronik asit hücre motilitesi ve mitozunu arttırır. Hücre laminası ve yer substansı arasındaki yapışma ve ayrılma kolaylaştırılır. Yoğun hidratasyon ile kollajen fibrilleri ve hücreler arası boşluk yaratan şişme meydana gelir.

Proteoglikanlar: Bu moleküller en az bir glukozaminoglikan (mukopolisakkarid) ve kovalent bağlı bir kor proteininden oluşur. Kondroidin-4-sulfat invitro kollajen monomer polimerizasyonunu düzeltir. Heparan sÜlfat yara içinde hücre substanslarına bağlanır. Hyalüronik asit ve kollajenle beraber proteoglikanlar yara tamiri esnasında sürekli sentez edilir.

Kollajen: İyileşen yaralarda kollajen tip 3 baskındır. Kollajen tip 5 neovaskularizasyona analog olarak artar. Endotelial hücreler ile kollajen tip 5 arasında güçlü bir korelasyon vardır. Yara teşekkülünün bozulmaya direnci hala zayıftır, yaralanmadan 3 hafta sonra taze skar nihai gerginliğinin %20' sine sahip olur. Zamanla oluşan artış sadece kollajen birikimi ile değil aynı zamanda kollajenin çekilmesi ile oluşur (19).

Epitelizasyon: Eğer tüm epidermal katlar etkilenmişse epitelizasyon yara kenarlarından başlar. Yüzeysel yaralarda bazal hücre tabakaları sağlam ise epitelizasyon sağlam kalan diferansiye matür epidermis hücrelerinin mitozu ile sağlanır.

Epitelizasyonun bölümleri: Reepitelizasyon şu 3 bölümü izler: bazal lamina hücrelerinin hareketi, yara yüzeyinin karşısına geçen hücrelerin mitozu ve yeni oluşmuş hücrelerin maturasyonu.

Epitelial hücrelerin migrasyonu: Sağlıklı deri epitel ünitesinin mekanik stabilitesini sağlayan desmozomlar, doku yaralanması sonrası erken fazda ayrılır. Onların sitoplazmasındaki keratinositler periferel aktin fibrillerini etkilerler. Buna ek olarak tonofibril retraksiyonu muhtemel hücre hareketini oluşturur. Yaralanmadan 24 saat sonra bazal hücre tabakasından hücreler ameboid tarzda yaranın karşısına geçer. Bazal laminanın üzerine veya bazal lamina parçalandığı takdirde fibrin, tip 5 kollajen ve fibronektinden oluşan geçici lamina üzerine migrasyon ederler (59).

Keratinositler kendi matrikslerini oluşturur. Hareket kapasitelerinin yanında keratinositlerin fibronektin üretme kapasitesi de vardır. Yukarıda anlatıldığı gibi fibronektin, hücrelerin hareket ettiği matriksi de oluşturur. Hücre hareketi esnasında geçici bazal lamina, üretilen tip 4 kollajen ve laminin ile nihai formuna çevrilir.

Epitelial hücrelerin migrasyon için uyarılması: Tahrip olmuş epitelial hücrelerde temas kaybolur ve bu migrasyonu başlatır. Bunu izleyen yara kapanması esnasında tüm yüzler temas edince migrasyon biter. Yeni bazal lamina adım adım yapılır. Birinci hücre yaranın yüzeyinde kalır (self - implantasyon olarak isimlendirilir), ikincisi bunun üzerine hareket eder ve orada kalır ve bir sonraki de onun üzerine gelir (Lead-frog hipotezi). Sadece bazal lamina hücreleri DNA üretimi ve hücre bölünmesi yeteneğine sahiptir. Hücre migrasyonu ve proliferasyonu aynı anda oluşan fakat birbirinden bağımsız proseslerdir (59).

Bazal hücrelerin bölünmesi: Yaralanma sonrası 12-48 saat içinde yaralanma alanına yakın bazal hücre mitotik aktivitesi artar. Matür epidermis genellikle hücre proliferasyonunu düzenleyen, mitozu inhibe eden chalonlar üretir. Yarada epidermis fonksiyonları bozulur ve böylece chalonlar sentez edilmez. Mitoz üzerindeki inhibisyonun kaybolması ile kalan hücreler proliferere olur.

Mitozun uyarılması: EGF ve FGF gibi çeşitli faktörler mitozu uyarır böylece granülasyon ve epitelizasyonu etkiler.

İnterlökinler: IL-1'in mitoz üzerinde uyarıcı etkisi vardır. IL-1, IL-2 üreten T-lenfositleri tetikler ki bu IL-2 T-lenfosit, B lenfosit, granülosit, monosit ve naturel killer hücrelerini aktive eder ve fibroblast proliferasyonunu uyarır.

Epitelial matürasyon: Epidermal yara iyileşmesinde son basamak olarak tarif edilir. Epidermal tabakanın rejenerasyonuna yol açan hücre matürasyonu ile karakterizedir. Bu hücre farklılaşması esnasında enzimatik metabolizma belirgin artar. Anahtar enzim ornitin dekarboksilazdır. Epitelial glikojen, RNA ve DNA içeriği artar. Keratinizasyon başlar ve sonunda desmosomlar bir hücrenin diğerine yapışmasını artırır. Yara matür epidermisle kaplanır (33, 59).

BOZULMUŞ YARA İYİLEŞMESİ:

Gecikmiş yara kapanması, cerahat, detritus, yetersiz arterial dolaşım, azalmış venöz dönüş, vaskülit, kapiller şebekenin vaküliti, yara enfeksiyonu yetersiz yara iyileşmesinin karakteristik özellikleri olarak tarif edilebilir.

Bozulmuş yara iyileşmesini tamamlayan lokal faktörler:

Yara enfeksiyonu detritus (yara kabuğu, nekrotik materyal, fibrin agregatları) ve cerahattır. Sık gözlenen vasküler komponentler azalmış venöz geri dönüş, yetersiz arteriyel dolaşım, genel vaskülit veya kapiller şebekede vaskülitdir. Daha sonra yara bakteri, virus veya funguslarla enfekte olabilir. Tüm bu durumlar metabolik bozukluğa, böylece gecikmiş yara kapanmasına yol açar.

Yara tamirini etkileyen sistemik durumlar:

1. Protein yetmezliği.
2. Vitamin eksikliği
 - Vitamin A
 - Vitamin C
 - Vitamin K
 - Vitamin B
 - Vitamin E eksikliği
3. Hiperbilürubinemi
4. Faktör 13 eksikliği
5. Yara tamirini etkileyen ilaçlar:
 - Glukokortikoidler
 - Sitostatikler
 - Siklosporin
 - Kolşisin
 - Penisilamin
 - Kalsitonin

Yara iyileşmesinde risk faktörleri:

Yaş: Yaş yara iyileşmesinin tüm fazlarında etkilidir:

- Yara kontaminasyonunu azaltır
- Hücre proliferasyonu azalır
- Neovaskularizasyon azalır
- Mast hücre sayısı azalır
- Epitelizasyon yavaşlar
- Mitojenik uyarıyı takiben keratinositlerin proliferasyonu azalır.

Nadir konnektif doku hastalıkları: Ehlers-Danlos sendromu ve prolin hidroksilaz yetersizliği yara iyileşmesinin bozulmasına yol açar (59, 61, 63).

2.KOLLAJEN METABOLİZMASI

Kollajen konnektif doku iskeletinin temelini sağlar. Kollajenler hayvansal bağ dokularının ana bileşimidir ve vücutta en fazla bulunan

proteindir (57). Birçok hücre bir kollajen bazal laminanın üzerinde yatar veya bir kollajen matriksin içinde bulunur. İnflamasyonda, kollajen hücre hareketi, yara iyileşmesi, trofoblast implantasyonu, fetal gelişim için temeldir. Tek bir kollajenin aminoasit kompozisyonu %33 glisin, %20-25 prolin ve hidrokisprolin, %5-11 lizin ve hidrokisilizinden oluşur. Herbiri ayrı genden oluşturulan en az 24 α zincirinden oluşan 15 kollajen tipi vardır. Tip 1, 2, 3, 5 ve 11 fibriler kollajen olarak isimlendirilir. Adult kollajen %85-90 tip 1, %8-11 tip 3, %2-4 tip 5 içerir. Kollajenler elektroforez ve aminoasit analizi ile ayrılabilir; değişiklikler hidrokisprolin, prolin, hidrokisilizin ve lizinde oluşur (19).

KOLLAJENİN YAPISI:

a. Kollajenin tipleri: Kollajen molekülleri alfa-zincirleri adı verilen, birbiri etrafında bir üçlü heliks halinde sarılarak ip-benzeri bir yapı oluşturan üç polipeptitten meydana gelir. Üç polipeptid zinciri, zincirler arasındaki hidrojen bağlarıyla birarada tutulur. Alfa zincirlerindeki aminoasit dizesindeki farklılıklar, aynı boyda (ortalama 1000 aminoasit uzunlukta) fakat hafifçe farklı özellikleri olan yapısal birimlerinin meydana gelmesine neden olur. Bu alfa zincirleri dokularda bulunan çeşitli kollajen tiplerini oluşturmak üzere birleşir. Örneğin en sık rastlanan kollajen olan tip 1 kollajen $\alpha 1$ diye isimlendirilen iki zincir ve $\alpha 2$ diye isimlendirilen bir zincir içermektedir (56).

b. Aminoasit dizisi: Kollajenin primer yapısı, polipeptid zincirlerindeki her üç pozisyondan birinde en küçük aminoasit glisinin bulunması açısından farklıdır. Glisin heliksin üç zincirinin biraraya geldiği kısıtlı alana sığabilmektedir. Glisin kalıntıları Gli-X-Y olarak tekrarlayan, X in genelde prolin olduğu ve Y nin sıklıkla hidrokisprolin veya hidrokisilizin olduğu dizinin bir parçasıdır. Bu yüzden, molekülün büyük bir kısmı dizisi Gli-X-Y olarak gösterilebilen bir politripeptit gibi kabul edilebilir.

c. Üçlü heliks yapısı: Paketlenmiş şekilde katlanan çoğu globüler proteinin tersine kollajen, aminoasitlerin yan zincirlerinin çoğunu molekülün dışında bırakacak şekilde uzamış bir üçlü heliks yapıya sahiptir. Bu üçlü

heliks, yapıdaki moleküller arasında etkileşimi sağlayarak kollajen monomerlerinin uzun lifler halinde birleşmesine neden olur.

d. Hidroksiprolin ve hidroksilizin: Kollajen diğer bir çok proteinde bulunmayan hidroksiprolin ve hidroksilizin içerir. Bu kalıntılar belli prolin ve lizin kalıntılarının polipeptit zinciri içine yerleştikten sonra hidroksillenmesiyle oluşur. Hidroksiprolin kollajenin üçlü heliks yapısının dayanıklılığını sağlamada önemlidir.

e. Glikozillenme: Kollajenin hidroksilizin kalıntılarının hidroksil grubları glikozillenebilir. En sık olarak glukoz ve galaktoz üçlü heliks oluşumundan önce sıralı olarak polipeptit zincirine bağlanır (19).

Kollajen sentezi oldukça karmaşık bir koordinasyona sahiptir. Bu sentezin basamakları aşağıda gösterildiği gibi özetlenebilir.

Kollajen Sentezinin Basamakları

1. Transkripsiyon (genlerin seçimi)
2. Translasyon (peptit sentezi)
 - a. mRNA kodlanması
 - b. tRNA
 - c. Aminoasit havuzları
3. Hücre içi posttranslasyonel modifikasyon
 - a. Prolin ve lizin kalıntılarının hidroksilasyonu
 - b. Hidroksilizin' in glikozilasyonu
 - c. Heliks oluşumu
4. Kollajenin hücreler arası hareketi
5. Hücre dışı posttranslasyonel modifikasyon
 - a. Prokollajenin kollajene değişimi
 - b. Fiber oluşumu
 - c. Lizin ve hidroksilizin kalıntılarının aldehitlere oksidasyonu
 - d. Molekül içi çapraz bağlarının oluşumu
 - e. Moleküller arası çapraz bağların oluşumu
6. Kollajen yıkımı

KOLLAJEN YIKIMI

Kollajen yıkımı doku turnoverinin bir parçası olarak oluşur. Kollajen yarılanma ömrü 50-300 gündür (41). Bu gelişme, büyüme, doku yapımı, yara iyileşmesi, gebelik serviksi ve uterus involüsyonunda artar. Tam kollajen yıkımı genellikle nötral pH da aktif olan pek çok matriks metalloproteinlerinin sinerjistik aktivitesinin bir sonucudur. Bu enzimler Zn^{+2} ve Ca^{+2} gerektirirler, fibroblast, kondrosit, osteoblast ve endotelial hücreler gibi hücrelerden latent proenzim formunda salınırlar ve homojen yapıya sahiptir. Hayvan kollajenazları 30-80 kD (kilodalton) moleküler ağırlığa sahip iken, bir çok memeli dokusundaki aktif formu 45 kD moleküler ağırlığa sahiptir. Çeşitli konnektif dokulardaki kollajenazlar (MMPs=matrix metalloproteinase) benzerdir fakat polimorf kollajenaz farklıdır (MMP8=matrix metalloproteinase 8). İlki X hidrofobik aminoasit kalıntısı olduğu yerde Gly-X bağlarını parçalar. Hayvan kollajenazları üçlü heliksde tek bir noktadan fibriler kollajeni parçalar, iki parçaya ayırır (19).

Parçaların akibeti: Çapraz olmayan kollajen bağlar kollajenaz aksiyonuna çok duyarlı olmalarına rağmen bu enzim sonunda çözünmeyen çapraz bağlı kollajeni de parçalar. Bununla beraber gelatinaz , stromelizinler, polimorf elastaz ve katapsin gibi nonspesifik proteinazlarda bu parçalamaya katılır. Kollajen yıkım ürünleri hidrokisprolin peptidleridir ve idrarla atılır. Hidrokisprolin tekrar kollajen sentezinde kullanılmaz ve bu ürün kollajen turnoverinin bir indeksidir. Tip 3 kollajen katabolizmasındaki nonspesifik proteinazların önemli bir rolü, tripsin, elastaz ve termolizin gibi kollajene yakın üçlü heliksleri parçalamasıdır. Kollajen yıkımının sekonder hücre içi yolu, ön hücre dışı yıkımı yapıldıktan sonra oluşur. Kollajen parçaları endositozla hücre içine girer ve sekonder lizozomlar, endoplazmik retikulum sisternaları ve golgi apparatusu içinde kollajenolitik katapsin tarafından parçalanır (19).

Kollajenin kollajenaza farklı duyarlılığı: İnterstisyel kollajenazlar tip 1, 2, 3, 7 ve 10u parçalararken , tip 4, 5, 6, 9 ve 11 dirençlidir. Bazı kollajenazlar tip 3 ü tip 1 den daha hızlı parçalar. Diğerleri için tersi doğrudur. Çoğu kollajenazlar tip 2 kollajene onun fazla derecede glikolize

olmasından dolayı oldukça yavaş atak yaparlar. Yüksek oranda çapraz bağlar kollajen yıkımını zorlaştırır. Daha kalın bir kollajen fiberi enzim yalnızca fiberin yüzeyinden parçalama yaptığı için daha yavaş parçalanır (19).

Dokularda kollajen yıkımını gösteren testler kantitatif sonuç vermezler. Kollajenaz aktivitesi ile oluşan parçalar üzerinde nonspesifik proteazların etkili olması sonuçları etkiler.

Kollajen sentezi ve fibrilogenезin kontrolü:

Prokollajenin yıkım sonrası oluşan N-, ve C-terminal propeptidler kollajen sentezini inhibe eder ve m-RNA prokollajen miktarının azalmasına yol açar. N-propeptidlerin C-propeptidlerden daha potent olduğu gözlenmiştir. m-RNA seviyesini kontrol eden çeşitli faktörler vardır; IL-1 ile stimule edilir, TGF ile deprese edilir. Dokudaki artmış kollajen sentezi hiperplaziden dolayı olabilir. Epidermal growth faktör ve granülasyon dokusundaki artmış fibroblast proliferasyonu kollajen üretimini uyarır. Hem N-, hem C-propeptidler fibrilogenез kontrolünde rol oynayabilirler. Yıkım olmazsa fibril büyümesi sınırlıdır (19).

3. PROLİDAZ ENZİMİ (EC: 3. 4. 3. 7) : (İminodipeptidaz)

Bergmann ve Fruton, bilinen dipeptidazlardan farklı olarak glisil-prolini hidrolize eden bir enzimi 1937 yılında tanımladılar. Bu enzim prolidaz olarak isimlendirildi ve bir çok hayvan dokusunda varlığı gösterildi (49).

Prolidaz, C terminalinde prolin veya hidroksiprolin bulunan iminodipeptidleri yıkan enzimdir. Bu dipeptidler organizmada kollajen yıkımında açığa çıkar. Kollajen ardarda birkaç reaksiyonla iminodipeptidlere ve bunlar da serbest aminoasidlere ayrılır. Bu aminoasidler, genel sistemik aminoasid havuzuna katılmadan tekrar kollajen yapımına girer. Prolin ve hidroksiprolinin herbiri kollajendeki amino asidlerin % 10'unu oluşturur. Fakat hidroksiprolin kollajen sentezine katılmadığından ve ancak polipeptid zincirinin posttranslasyonel modifikasyonu sonucu prolinin hidroksillenmesiyle ortaya çıktığından kollajendeki amino asidlerin % 20'sini prolinin oluşturduğu kabul edilir. (57)

Prolidaz aktivitesi birçok dokuda bulunur. Bunlar arasında incebarsak mukazası, uterus ,beyin, kas dokusu, eritrosit ve serum sayılabilir.

PROLİDAZ ENZİMİNİN KLİNİK ÖNEMİ .

Barsak mukozasında protein sindiriminde rol alır. İntestinal hidrolazlar imido bağlarını tanıma yeteneğinde olmadıklarından prolin ve hidroksiprolin içeren oligopeptitlere etki edemezler. Periferel dokularda bulunan sitozolik prolidaz enzimi, C terminalinde prolin veya hidroksiprolin içeren dipeptitleri ayırarak fonksiyon yapar. Yüksek prolidaz aktivitesi, prolinin böbreklerden atılmasında önemli bir rol oynar. Bu dönüşüm sinir sistemindeki düşük prolin seviyeleri için gereklidir. Hiperprolinemili hastalarda, konjenital böbrek defekti, sağırılık, mental retardasyon ve konvülsiyon görülür. Beyinde prolidaz aktivitesi, barsak mukozası ve böbreğe göre daha belirgindir (32). Hipofiz ve plazmada hipotalamik releasing faktör hızla metabolize olur. Diğer dokulara göre, bu iki dokudaki düşük prolin seviyelerinin nedeni tam olarak açık değildir (43). Prolidaz, özellikle prolinin büyük bir miktarını içeren prokollajen gibi proteinlerin hücreiçi parçalanmasında, son basamağı içerir. Sinir sisteminde prolin ve oluşturduğu peptidler, önemli fonksiyonlar üstlenir. Beyin proteinlerini oluşturan aminoasidlerin % 5'i prolidir. Birçok fizyolojik aktif nöropeptidler de prolin içerir. Prolidaz'ın kollajen metabolizmasındaki rolü, karaciğer sirozu ve prolidaz eksikliği gibi patolojik durumlarda gözlenir. Prolidaz eksikliğini ilk olarak Buist ve arkadaşları tanımladı. Prolidaz eksikliği nadir, otozomal resesif geçen, çeşitli sistemleri tutan bir hastalıktır (8). Özellikle bacaklarda kronik deri ülserleri, mental retardasyon, enfeksiyona yatkınlık, splenomegali, periferik sinir sisteminde değişiklikler ve immünglobulin A seviyelerinde azalma ve aşırı iminodipeptidüri gözlenir (2).

Glisil-prolin, kollajen molekülünde en bol bulunan iminodipeptittir, ve prolidaz eksikliği olan hastalarda bol miktarda idrara çıkarılır. Bu hastaların fibroblastlarında prokollajen miktarlarının normal kalıp değişmediği gözlendi. Prolin havuzu belirgin olarak azalırken, tip-1 ve tip-3 prokollajen oranı değişmiştir. Prolin, iminodipeptit sentezini

uyarır ve prokollajen katabolizmasını arttırır. Bu bulgulara rağmen prolidaz eksikliği ile prokollajen arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir.

Buna karşılık kollajen katabolizması, serum ve asit sıvısında prolidaz aktivitesi ölçümleri yapılarak izlenmiştir. Bazı sirozlu hastalarda serum prolidaz aktivitesinin arttığı bazılarında ise normal kaldığı saptanmıştır (47). Myara ve arkadaşları kollajen turn-over hızı ile prolidaz aktivitesi arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır. Bu enzim, yıkımda önemli bir rol oynar. Kollajen turn-over'u, fetal gelişim esnasında belirgin olarak artmıştır. Bundan dolayı prolidaz aktivitesi fetal gelişimin derecesini yansıtabilir. Gelişme geriliği olan bebeklerde prolidaz aktivitesi belirgin olarak düşük bulunmuştur (22).

Prolidaz enzim aktivitesi ölçümü için Mn^{+2} ile ön inkübasyon sonderece gereklidir. Normal prolidaz değeri 1000 U/L nin altındadır. 1500 U/L yi aşan değerler kronik karaciğer hastalıklarında görülür. Kemik hastalıklarında hiçbir zaman yüksek prolidaz değerine rastlanmamıştır (63). Prolidaz ölçümlerinde glisin-prolin, fenilalanin-prolin dipeptitleri kullanılmış, glisin-prolin ve alanin-prolin prolidaza uygun substratlar olarak bulunmuştur. İnsan prolidazı (glisin-prolin) ile daha iyi sonuçlar vermektedir (45, 46).

Prolidaz eksikliği, eritrositler, lökositler ve deri kültür fibroblastlarındaki prolidaz aktivitesinin analizi ile teşhis edilebilir (39).

İyon-değiştirici kromatografi ile insan eritrosit prolidazının iki formu belirlenmiştir (50). Prokollagen'in intrasellüler yıkımında prolidaz I, iyonik gücü düşük olduğu için ön inkübasyon ile aktivesi uyarılır. Prolidaz I, gly-pro substratına ilgi gösterirken, Prolidaz II, ön inkübasyon sonucunda belirgin bir şekilde azalmış, gly-pro substratına rağmen oldukça düşük seviyelere inmiştir. Prolidaz 2 ise metil-prolin substratına ilgi göstermektedir. Prolidaz 2 aktivitesi, plazma proteinleri tarafından inhibe edilir. Albumin altı saatlik inkübasyondan sonra prolidaz 2 aktivitesini tamamen ortadan kaldırır (11). Karaciğer hücre yıkımı olan hastalarda plazmadaki prolidaz aktivitesi yüksektir fakat sadece prolidaz I aktivitesi mevcuttur (7). Bu durum iki nedenle oluşabilir.

1-Doku dağılımlarının farklı olmasından

2-Prolidaz 2 subsellüler organellerde bulunabilir ve plazmaya salınamaz.

Fibroblastlardan elde edilen prolidaz 1'in mol ağırlığı 105 000 ve prolidaz 2'in mol ağırlığının ise 151 000 olduğu bildirilmiştir. Prolidaz enziminin seçiciliği sadece peptid hidrojeni bulunmayan peptid bağı ile sınırlıdır. Bu özellikteki dipeptidlere örnek olarak Glisil-L-Prolin ve Glisil-OH-L-Prolin dir (2). Glisin-prolin substrat olarak kullanılarak:

Endo ve arkadaşları eritrositlerde 1982

Priestman ve Butterwat fibroblastlarda 1984

Myara ve Stalder plazmada 1986

Kodama lökositlerde 1989 da çalışma

yaptılar. Butterwort ve Priestman 1985 de prolidaz 1 ve 2 yi tanımladı. Endo ve Boringth prolidaz eksikliği için 1989 ve 1990 yılında anti prolidaz antikorları kullandılar.

Prolidaz polimorfizm gösteren bir proteindir. Kromozom 19'un kısa kolu üzerinde yer alan prolidaz geni ile myotonik distrofi geni arasında sıkı bir bağ vardır (61, 16).

4.HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ (HBO₂)

Hiperbarik oksijen tedavisi kapalı bir basınç odasında, 1 atmosferden (1 ATA= Absolu Atmosfer = 760 mmHg) daha yüksek basınç altında, maske, başlık veya endotrakeal tüple oksijen solutmak suretiyle uygulanan bir tedavi yöntemidir (12).

Tedavi tek veya çok kişilik basınç odalarında yapılmaktadır. Çok kişilik basınç odalarında hasta oksijeni, maske, başlık veya endotrakeal tüpten solur. Tek kişilik basınç odasında hasta oksijeni maske veya endotrakeal tüpten soluyabildiği gibi ortamdan da soluyabilir. 1 atmosfer basınçda % 100 oksijen solunumu veya topikal uygulanımı hiperbarik oksijen tedavisi olarak kabul edilmez, hastanın basınç odasında inhalasyonla 1 ATA'dan daha yüksek basınçda oksijen soluması gerekmektedir (12, 13, 42).

TARİHÇE:

Hiperbarik sistem ilk olarak 1662 de Henshaw tarafından, körük düzeneği ve kapaklar kullanılarak kapalı bir oda içinde hem yüksek hem de alçak basınç sağlamak suretiyle kurulmuş, yüksek basınç akut hastalıkların, alçak basınç ise kronik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Oksijenin tedavi edici özelliği ise, 1775'de oksijenin keşfinden sonra ilk kez Priestley tarafından bildirilmiştir. 1830'lu yıllarda Fransa'da Junod, Tabarie, Pravaz adlı araştırmacılar hiperbarik basınç odası sistemi kullanarak 2-4 ATA arasındaki basınçlarda bazı hastalıkları tedavi etmişlerdir. 1841 yılında Triger, Loire nehri yatağı kazılırken çalışan işçilerde disbarik problemlerin oluştuğunu tespit ederek ilk Caisson deneyimini bildirmiş, 1879'da Fransız cerrah Fontain tarafından yapılan mobil basınç odası ise çeşitli girişimler ve hernili hastalar için kullanılmıştır. Bu arada hiperbarik oksijenin santral sinir sistemi (CNS) ve pulmoner sistem üzerine olan toksik etkileri 19. yüzyılın başlarında Paul Bert ve Lorrain Smith tarafından tanımlanmıştır (37). Hiperbarik oksijen tedavisi 1930'lardan itibaren Amerikan ve İngiliz donanmaları tarafından dekompresyon hastalığının tedavisi için rutin olarak kullanılmaya başlandı. Daha önceleri uzun süren hava tedavi tabloları kullanılmaktaydı (15,42). Klinik hiperbarik oksijen kullanımı Churchill-Davidson ve Boerema'nın çalışmalarına başlamıştır. 1961 yılında Boerema ve Brummelkamp'ın hiperbarik oksijeni gazlı gangren tedavisinde uygulamaya başlamalarını takiben bilim adamları ve klinisyenler tecrübelerini ve çalışmalarını paylaşmak için ilk defa 1963'te Amsterdam'da uluslararası bir toplantıda bir araya gelmişlerdir. Bu tarihten günümüze, oluşturulan uluslararası komiteler her yıl yeniden toplantılarda hiperbarik oksijen tedavisinin esaslarını ve yeni gelişmeler ile uygulamaları belirlemektedir (6, 42).

FİZYOLOJİ:

Anaerobik bakterilerin haricindeki mikroorganizmalar yeryüzündeki yaşamlarını ve normal hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmek

için oksijene ihtiyaç gösterirler. Oksijen hücre içinde enerji açığa çıkaran biyokimyasal reaksiyonlar zincirinde gereklidir.

Hiperbarik oksijenasyonun klinikte uygulanımı ile insan vücudu üzerine iki temel etkisi sözkonusudur. 1. Mekanik etki veya basıncın direk etkisi, 2. Vücuttaki tüm dokularda, kanda ve hücrelerde oksijen parsiyel basıncının artışı.

1. Basıncın direk etkisi:

Temel gaz kanunlarından Boyle kanununa göre, gazların basınçları ve hacimleri arasında ters bir orantı söz konusudur. Basıncın artışıyla, dolaşımdaki ve dokulardaki gazların hacimleri ve gaz kabarcıklarının çapları küçülür. Ayrıca kabarcıkların yüzey gerilimleri de büyüklükleri ile ters orantılıdır ve büyük kabarcıklar, küçüklerden daha stabildir. Kabarcıklar küçüldükçe yüzey gerilimi artacağından, çap belli bir değere düştükten sonra kollabe olup absorbe edilir. Basıncın mekanik etkisi en iyi dekompresyon hastalığı ve iatrojenik hava embolisi vakalarının tedavisinde görülür. Bu gibi hastalıkların tedavisinde kabarcıkların küçülüp kollabe olması önem taşımaktadır. Böylece doku perfüzyonu tekrar sağlanabilmektedir (23).

2. Artmış oksijen parsiyel basıncı:

Hiperbarik ortamda % 100 oksijen solunduğunda Henri kanunu gereğince plazmada oksijenin çözünürlüğü artar. Hastanın fizyolojik ve fizyopatolojik koşullarına bağlı olarak, artmış oksijen basıncının etkisi dokularda, biyokimyasal reaksiyonlarda gözlenir.

2.a. Plazmada çözülmüş oksijen miktarının artması

Normalde 1 gram hemoglobin 1.34 ml oksijenle bağlanabilir. 100 ml kanda hemoglobin konsantrasyonu 15 gramdır. Hemoglobin % 100 sature edildiğinde 100 ml kan 20.1 ml hemoglobinle bağlı oksijen barındırır. 1 ATA'lık atmosfer basıncında hava solunduğunda % 97 sature olan hemoglobinin saturasyonunu % 100 den daha fazla artırmak mümkün olmayacağından kanda hemoglobinle taşınan oksijen miktarı da artmayacaktır. Hiperbarik koşullarda, solunan oksijen parsiyel basıncındaki artıştan ötürü, plazmada çözünen oksijen miktarıda artar. Tablo 1 de görüldüğü gibi 1 ATA'da hava solunduğunda kanın 100 ml'sinde 0.3 ml olan çözülmüş oksijen

miktarı, 3 ATA'da % 100 oksijen bulunduğunda 100 ml kanda 6.8 ml'ye kadar yükselir.

1 ATA'lık atmosfer basıncında hava bulunduğunda 100 ml arteryel kanda 20 ml oksijen bulunurken, karışık venöz kanda 14 ml'ye düşmektedir. Yani, 100 ml kandan dokularda kullanılan oksijen miktarı 6 ml'dir. Bu değer 3 ATA'da % 100 oksijen bulunduğunda sadece plazmada çözünen oksijen miktarına eşittir. Bu durumda oksihemoglobine gerek kalmaksızın, dokuların ihtiyacını karşılayacak yeterli oksijenasyon mümkündür. Plazmada çözülmüş oksijen hücreye direk utilize olabilmektedir. HB₀₂ tedavisiyle hemoglobinsiz yaşamı devam ettirmek mümkündür (21, 35).

Total basınç		İdeal çözülmüş oksijen içeriği	
<u>ATA</u>	<u>mmHg</u>	<u>Hava soluma</u>	<u>%100 oksijen soluma</u>
1	760	0.32	2.09
1.5	1140	0.61	3.26
2	1520	0.81	4.44
2.5	1900	1.06	5.62
3	2280	1.31	6.80
4	3040	1.80	3 ATA'dan daha fazla
5	3800	2.30	basınçta oksijen
6	4560	2.80	kullanılmaz

TABLO 1:Basıncın arteriyel oksijen üzerindeki etkisi (35)

2 b. Hiperbarik ortam myokard hücreleri üzerine doğrudan etkiyle uyarılabilirlik ve iletiyi azaltır. Böylece bradikardiye sebep olur. HB₀₂ kalp atım hacminde azalmadan ziyade, bradikardiye bağlı olarak kardiyak outputta %10-20 arasında düşmeye yol açar. Kan basıncında herhangi bir değişiklik olmaz. Hiperoksinin vazokonstriktif etkisinden dolayı dokulara giden kan miktarı azalır, fakat plazmada artmış olan çözülmüş oksijen parsiyel basıncı nedeniyle akım azaldığı halde dokuların yüksek düzeyde oksijenasyonu sağlanır.

HB₀₂ nun oluşturduğu vazokonstriksiyon, kapiller kan basıncını düşürerek diapedesis ve vasküler permeabilite artışını azaltır. Böylece

transkapiller sıvı geçişi değişerek ekstravasküler sıvı rezorpsiyonu hızlanır. İnterstisyel sıvı basıncını düşürerek hipoksi ve iskeminin yarattığı ödemin gerilemesinde yardımcı olmaktadır. Hiperbarik oksijenin bu etkisinden yanıklarda, serebral ödemde, periferik travmalarda, embolilerde, purpura fulminans tedavisinde yararlanılmaktadır (12, 23, 35, 42, 48).

2 c. Yara iyileşmesine etkisi : Yaralanmış doku hipoksiktir; parsiyel oksijen basıncı 5-15 mmHg'ye ve hatta daha düşük değerlere kadar düşebilir. Oysa yara iyileşmesi için gerekli kollajenin fibroblastlarca sentezlenmesi için minimum 30-40 mmHg parsiyel oksijen basıncı gereklidir. HB₂ ile doku oksijen parsiyel basıncının artırılması, fibroblastik aktivite artışı ve kollajen matriks birikimine yol açar. Angioneogenesis ise hipoksi ile uyarılır. Böylece günde 2-4 saat süreyle uygulanacak hiperbarik oksijen kollajen matriks birimini sağlarken geri kalan sürede de hipoksinin angiogenesisi uyarıcı etkisiyle vasküler proliferasyonun gelişimine katkıda bulunur (13, 29, 42).

HB₂, kemik dokuda bozulan iyileşme süreçlerinde de, hipoksiyi ortadan kaldırıp osteogenesisi uyararak iyileşmeyi sağlar ve hızlandırır. Bu etkileriyle HB₂'den diabetes ve varis ülserlerinde, termal yanıklarda, deri greft ve fleplerinde, osteoradyonekrozda, osteomyelitte, mikrocerrahiden sonra yardımcı tedavi olarak yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılır (13).

2 d. İnfeksiyon üzerine etkisi (Antibakteriyel etki): Oksijen için tedavi sınırları oldukça önemlidir. Tedavide amaç hastaya zarar vermeksizin bakteriyi ortadan kaldırmaktır. Tek hücreli mikroorganizmalar özellikle bakteriler, hiperoksiye bifazik cevap verirler. 1 ATA'da % 100 oksijenli ortamda E.koli, Psödomonas auroginosa, Stafilokokkus aureus gibi aerob bakterilerin gelişmeleri hızlıdır. Fakat 1.3 ATA üzerinde oksijen inhibisyon yapar (53).

Oksijen-NADPH oksidaz sistemi temel mikrobisidal sistem olsa da, lökositlerin bakterisitik etkilerinin tek mekanizması değildir. Temelde ikiye ayrılan bu mekanizmaların birincisi oksijenden bağımsız, ikincisi ise oksijene bağımlı antimikrobial sistemlerdir.

Oksijenden bağımsız antibakteriyal sistemler: Hipoksik şartlarda bakteriler fagosite edilebilmelerine rağmen, öldürülmeleri bozulabilir. Fagositoz anında vakuol içi pH düşer, ve asid vakuol pnömokoklar gibi bazı organizmalara öldürücü olabilir. Düşük moleküler ağırlıklı olan lizozom hücre duvarını hidrolize ederek bakteriyi lizise uğratar. Laktoferrin, bakteri gelişimi için gerekli olan Fe^{+2} ile şelasyon oluşturarak, mikrobiyostatik etki gösteren bir proteindir. Ayrıca vakuol içine salınan hidrolitik enzimler, katyonik proteinler mikroorganizmanın lipid, karbonhidrat ve proteinlerini bozarak etkili olurlar. Bu aktivitelerin oksijene bağımlı sistemlerden daha az ve yavaş etkili olduğu tespit edilmiştir (25).

Oksijene bağımlı antibakteriyal sistemler: Fagositoz düşük oksijen parsiyel basıncından etkilenmese de oksidatif patlama ile bakterilerin öldürülmesi dokudaki oksijen basıncına bağlıdır. HBO_2 hipoksik ve infekte dokulardaki oksijen basıncını nötrofillerin bakterileri öldürebileceği seviyeye kadar yükseltir (21, 55).

HBO_2 bakteriostatik ve bakteriyositik özelliğini, serbest oksijen radikalleri aracılığı ile göstermektedir. Serbest oksijen radikalleri membran lipid ve proteinlerini okside edip, DNA'ya hasar vererek mikroorganizmanın büyümesi için temel metabolik fonksiyonları inhibe ederler. Serbest radikaller ve reaktif oksijen ürünleri oluşumunu artıran HBO_2 , antioksidan savunma sistemleri olmayan veya sınırlı olan bazı mikroorganizmaların hızla ortadan kaldırılmasını sağlar. Anaerobların serbest radikallere ve diğer oksidanlara karşı savunma mekanizmaları olmadığından, oksijenin öldürücü etkisine duyarlıdırlar. Hiperbarik oksijen infekte ve nekrotik dokulardaki doku onarımı ve rejenerasyonu düzenleyerek, infeksiyonun progresyonunu indirek olarak ta etkileyebilir (42, 53). Antibakteriyal ajan olarak seçici değildir. Gram negatifler kadar gram pozitif bakterileride etkileyen, spektrumu geniş bir ilaç olarak düşünülebilir.

2 e. Antitoksik etkisi: Hiperbarik oksijenizasyon, direk üretimini inhibe ederek ya da toksinlerin etki metabolizmasını engelleyerek antitoksik özellik gösterir. Bunlardan ilkinde örnek; hücre membranını parçalayarak kapiller permeabilityyi bozan Clostridial alfa toksin ve lesitinaz üretiminin

inhibisyonudur. CO zehirlenmesinde ise etki mekanizması üzerinde inhibisyon yaratarak yararlılık göstermektedir. Bilindiği üzere CO toksik bir gaz olup yangınlarda, farkına varılmadan veya intihar amaçlı solunduğunda öldürücü olabilmektedir. CO'in hemoglobine affinitesi 200 kat daha fazla olduğundan oksihemoglobin yerine karboksihemoglobin oluşturarak kanda yeterli düzeyde oksijen taşınmasını zorlaştırır. HBO₂ oksijen parsiyel basıncını artırarak, karboksihemoglobine veya sitokroma bağlanmış olan CO'in eliminasyonunu hızlandırır, plazmada yeterli miktarda çözülmüş oksijen taşınarak dokuların metabolizmasının ve yaşamasının devamını sağlar (1, 13, 21, 42, 44).

KLİNİK KULLANIM

Amerika Birleşik Devletlerinde 1989 yılında Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS) tarafından oluşturulan Hiperbarik Oksijen Tedavisi Komitesinin yayınladığı indikasyon listesi Tablo 2 de belirtilmiştir. Bu liste tüm ülkelerde kabul edilmiş olan indikasyon listesidir. Tedaviden yarar gören fakat halen araştırmaların devam ettiği hastalıklar ise HBO₂'nin araştırıldığı indikasyonlar grubunda sıralanmıştır (Tablo 3) (42).

- *Akut hava veya gaz embolisi
- *Dekompresyon hastalığı
- *Karbon monoksit zehirlenmesi, akut duman inhalasyonu, siyanid zehirlenmesi
- *Klostridyal Myonekroz (Gazlı gangren)
- *Yara iyileşmesinin geciktiği durumlar: Diabetik yara, venöz staz ülserleri, dekübitus ülserleri, arteryel dolaşım yetersizliği ülserleri
- *Aşırı kan kaybı
- *Yumuşak dokunun nekrotizan infeksiyonları (derialtı, fassia, kas)
- *Kronik refrakter osteomyelit
- *Radyasyon nekrozu: Yumuşak doku radyasyon nekrozu ve osteoradyonekroz
- *Tutması şüpheli deri greft ve flepleri
- *Termal yanıklar
- *Crush İnfüri, travmatik iskemiler
- *Akut beyin ödemi

Tablo 2: Hiperbarik Oksijenin kesinleşmiş endikasyonları (42)

Kırık iyileşmesi
Mikst ve anaerobik beyin abseleri
Akut trombotik veya embolik serebrovasküler hastalıklar
Hidrojen sülfid zehirlenmesi
Lepramatöz lepra
Menenjit
Akut karbontetraklorid zehirlenmesi
Pyoderma gangrenozum
Radyasyon enteriti ve proktiti
Radyasyon myeliti
Akut santral retinal arter yetmezliği
Ani işitme kaybı
Refrakter mikozlar
İntraabdominal abseler
Örümcek sokması: Kahverengi redusa
Psödomembranöz kolit
Skleroderma, Felty sendromu gibi kollajen metabolizması hastalıkları
Medulla spinalis yaralanmaları
Migren

Tablo 3: Hiperbarik Oksijen Tedavisinin araştırıldığı endikasyonlar (42).

Avrupa ülkelerinde UHMS listeleri kabul görmeye birlikte, Eylül 1994'te Fransa'da ve Eylül 1996'da İtalya'da biraraya gelen Avrupa Hiperbarik Tedavi Komitesi (ECHM) HB₀₂ endikasyonlarını daha farklı bir yaklaşımla saptamıştır (4, 51).

<u>Akut endikasyonlar</u>	<u>Kronik endikasyonlar</u>
*Gaz embolisi	*Problem yaralar
*Dekompresyon hastalığı	-Diyabetik
*CO zehirlenmesi	-Non diyabetik
*Duman inhalasyonu	*Radyonekroz
*Gazlı gangren	-Enterit
*Diyabetik gangren ve yumuşak dokunun karma infeksiyonları	-Myelit
*Crush Sendromu	-Osteoradyonekroz
*Kompartman sendromu	-Yumuşak doku nekrozu
*Termal yanık	*Kronik refrakter osteomyelit
*Anoksik ansefalopati	*Deri greft ve flepleri
*Ani işitme kaybı	*Kemik iyileşmesi
*Oftalmolojik patolojiler (Santral retinal arter oklüzyonu:CRAO)	

Tablo4 : ECHM indikasyon listesi (42)

Komplikasyonlar:

Hiperbarik Oksijen Tedavisinin uygulanımı süresince en sık rastlanan komplikasyon ortakulak barotravmasıdır. Daha çok üst solunum infeksiyonunun varlığında ve valsalva ile orta kulak basınç eşitleme hareketinin doğru yapılmamasından kaynaklanmaktadır. Bunun dışında zorlu valsalva sonrasında kulakta oval veya yuvarlak pencere rüptürü, sinüs sıkışması, myopi, oksijenin santral sinir sistemi ve pulmoner sisteme toksisitesi görülebilecek diğer komplikasyonlardır. Yapılan çalışmalarda 2-2.4 ATA basınçta hava molalı oksijen tedavisiyle pulmoner semptomlar görülmemiştir. 2.4 ATA'da CNS konvülsiyon görülme sıklığı ise 1.3 /10.000 dir (14, 21).

Kontrendikasyonlar: Göğüs tüpü yerleştirilerek tedavi edilmemiş pnömotoraks olgularında HB0₂ tedavisi kesinlikle kontrendikedir. Bunu dışında ağır aritmiler, kronik obstrüktif akciğer hastalıkları da (KOA)H)

dikkat edilmesi gereken durumlardır. Üst solunum yolu infeksiyonu, yüksek ateş, konjenital sferositoz, amfizem, epilepsi, geçirilmiş toraks operasyonu, kondüktif tip sağırlıkla ilgili geçirilmiş cerrahi müdahale, gebelik ise relatif kontrendikasyonlardır (38).

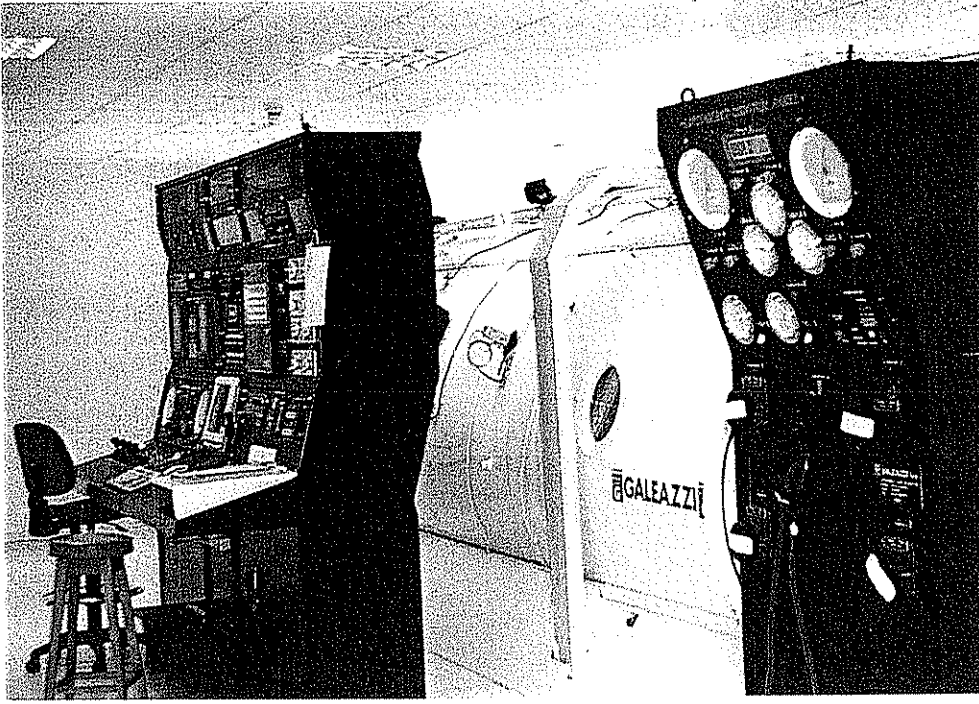
GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Şubat-1996, Haziran-1997 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Deniz ve Sualtı Hekimliği'nde yapıldı. Farklı sebeplerden kaynaklanan kronik refrakter yaraları olan hastalar çalışma kapsamına alındı. Yaş ortalaması 45 olan 15 bayan 20 erkek toplam 35 hasta tedavi edildi. En küçük yaş 22, en büyük yaş 76 idi. Tedaviye alınan yaraların sebepleri şunlardı.

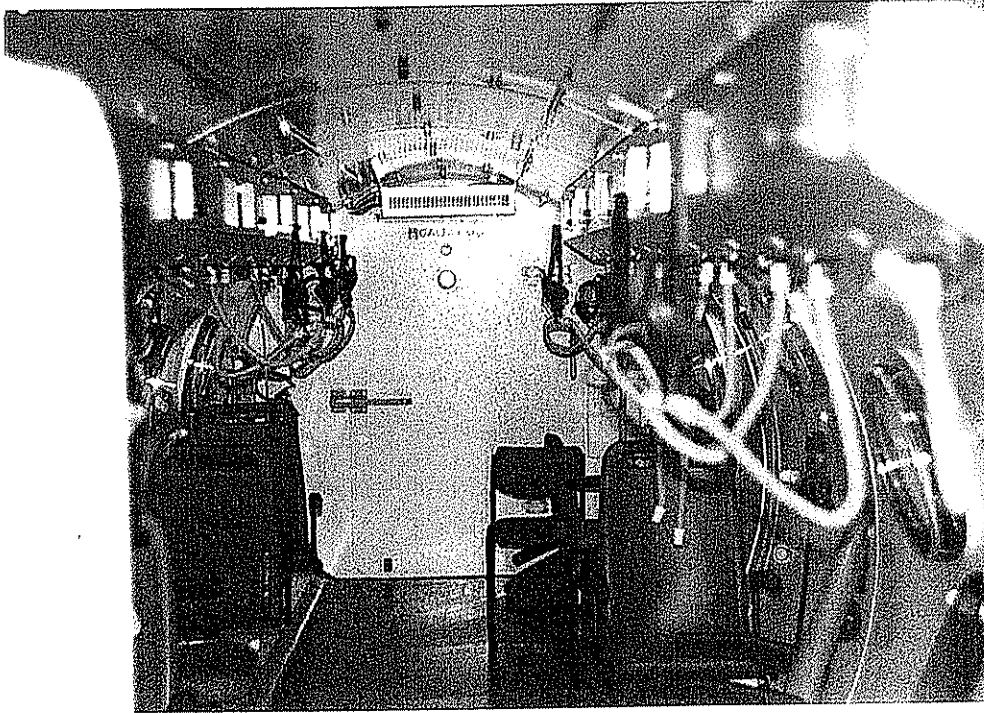
<u>Yaranın sebebi</u>	<u>Hasta sayısı</u>
1. Diyabetik yara	21
2. Periferik vasküler yetersizliğe bağlı ülser	4
3. Dekübitus ülseri	2
4. Crush ezilme yarası	1
5. İyileşmeyen cerrahi yara	4
6. İnfekte yara	2
7. Radyasyona bağlı nekroz	1

Kronik iyileşmeyen yaralı hastalardan tedavi öncesi 3 cc venöz kan ve yara kenarından 2 adet cilt biopsisi alındı. Venöz kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip, -50 °C de saklandı. Cilt biopsilerinden bir tanesi doku prolidaz enzimi ölçümü için - 50 °C de saklandı, diğeri patolojik inceleme için kesitleri alınıp hematoksilin-eozin ve masson trichrome boyaları ile boyandı.

Örnekler alındıktan sonra hastalara günde 2 kez 2 ATA'da 90 dakikalık hiperbarik oksijen tedavisi uygulandı. Tedaviler Deniz ve Sualtı Hekimliğinde bulunan 17 kişilik, çift bölmeli, GALEAZZİ marka basınç odasında yapıldı (Resim 1-2). Günlük pansumanları yapıldı. Alınan kültür sonuçlarına göre uygun antibiyotik başlandı. Tedaviler 30 seansa tamamlanınca hastalardan tekrar 3 cc venöz kan ve 2 adet yara kenarından cilt biopsisi alındı. Venöz kan aynı şekilde 3000 rpm'de santrifüje edilip serumu - 50 °C de saklandı. Biopsilerden biri - 50 °C de saklandı, diğeri patolojik inceleme için kesitleri alınıp aynı şekilde boyandı.



Resim 1. Deniz ve Sualtı Hekimliğinde bulunan Galeazzi marka basınç odası



Resim 2. Basınç odasının içten görünüşü

Haziran 97 de tüm hastalar tamamlandıktan sonra tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum ve dokulardan prolidaz enzimi ölçümleri yapıldı ve tedavi öncesi ve sonrası cilt biopsilerinde yara iyileşmesi değerlendirildi.

PROLİDAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜM YÖNTEMİ:

Prolidaz ölçümünde modifiye edilmiş Myara yöntemi kullanıldı (45, 46, 47)

PRENSİP: Serum örneğinin Mn^{+2} ile ön inkübasyonundan sonra glisin-L-prolin substrat olarak kullanılır, prolidaz enziminin dipeptidaz aktivitesi prolin açığa çıkarır, oluşan prolin ninhidrin ile reaksiyona girerek renkli bir bileşik oluşturur. Oluşan renkli bileşiğin şiddetinin 515 nm de ölçülmesiyle indirek olarak prolidaz aktivitesi hesaplanır.

A. GEREÇLER:

1. Hassas terazi (Libror-EB 330 Shimadzu)
2. WTW marka mikroişlemlerli pH metre
3. Kötterman (Labor Technic) sıcak su banyosu
4. Transsonic T460 model magnetik karıştırıcı
5. Elektro-mag girdap karıştırıcı (Vorteks)
6. Biohit-Prolin otomatik pipet
7. Cam eşya
8. Spektrofotometrik çalışma için Philips PU8700 UV
9. Serum ve doku örnekleri için Bio-freezer (Forma Scientific) - 50 °C de derin dondurucuda saklandı.
10. Enzimatik çalışmalarda Mili-QPlus su sistemi tarafından üretilen deiyonize su kullanıldı.
11. Ultra -Turraks T25 homojenizatör
12. Serumlar için Mega fuge, dokular için Beckman soğutmalı santrifüj

B. AYIRAÇLAR:

1. Glisial asetik asit (Merck)
2. 6 mol/L ortofosforik asit (Merck) : 406.8 l ortofosforik asit alınır, distile su ile 1 lt ye tamamlanır.
3. Ninhidrin (Merck)

4. 0.45 mol/L TCA (Triklor asetik asit) : 73.52 gr. TCA alınıp distile su ile 1 lt ye tamamlanır.
5. L-prolin (Sigma) : 650 mol/L 7.5 mg prolin , 100 ml 0.45 mol/L lik TCA içinde eritilir. 10 gün dayanıklıdır.
6. 50 mmol Tris : 6.05 mgr Tris alınır, 100 ml ye distile su ile tamamlanır. 1 N HCL ile PH: 7.8'e ayarlanır.
7. 5 mmol Mn CL₂ - 4 H₂O = 100 mg / 100 ml
8. 94 mmol/L Glisin- L-prolin (Sigma), 5 mmol MnCl₂ 4 H₂O kapsayan Tris-HCl tampondan 10 ml alınır ve içine 160 mgr glisin -L- prolin çözülür.
9. Triton X 100 % 0.1 lik
10. GSH (Glutatyon) 0.001M

Chinard ayıracı

-600 ml Glisial asetik asit

-400 ml 6M ortofosforik asit

-25 gr ninhidrin

70 °C de karıştırılarak çözülür.

DENEYİN YAPILIŞI

Serum: Düz tüpe venöz kan alınır. Örnek 3000 rpm de 15 dk santrifüj edilir. Serum ayrılır. Örnekleri - 50 °C de saklanır. Serum 1/5 olacak şekilde 0.005 M MnCl₂ 4 H₂O, %0.001 Tx100, 0.001 M GSH içeren Tris/ Hcl pH: 7.8 tamponu ile sulandırılır.

Ön inkübasyon: Sulandırılmış serum 3 saat, 37 °C de ön inkübasyona bırakılır.

Enzimatik reaksiyon: Örnek tüpüne, 100 mikrolitre sulandırılmış serum ve 100 mikrolitre glisin-L-prolin konur. Örnek kör tüpüne glisin-L-prolin içermeyen sadece sulandırılmış 100 mikrolitre serum konur. Her iki tüp 30 dk 37 °C de inkübe edilir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu sonlandırmak için 1 ml 0.45 mol/L lik TCA her iki tüpe eklenir. Kör tüpüne TCA ilavesinden sonra enzimatik reaksiyon durduğu için 100 mikrolitre glisin- L-prolin ilave edilir. Tüpler vortekste karıştırılır. 4000 rpm de 10 dk santrifüj edilir.

Prolin ölçümü: Santrifüj edilmiş örnek ve örnek körü tüplerinden alınan 0.5 ml süpernatant, spektrofotometre tüplerine konur. Standart tüpüne ise 0.5 ml prolin standart çözeltisi, ayıraç kör tüpüne ise 0.5 ml 0.45 mol TCA konur. Dört tüpe de 1'er ml glisial asetik asit, 1'er ml modifiye Chinard's çözeltisi ilave edilir (Modifiye Chinard's çözeltisi, 550 ml glisial asetik asit, 450 ml 6 M ortofosforik asit, 30 gr ninhidrin içerir). Tüpler vorteksde 15 sn karıştırıldıktan sonra sıcak su banyosunda 90 °C de 20 dk inkübe edilir. Vorteks de 15 sn karıştırıldıktan sonra, oda ısısına getirilir, 515 nm de renk reaksiyonları okunur.

	Ayıraç körü	Örnek körü	Örnek	Standart
0.45 M TCA	0.5 ml	-	-	-
Glisin-prolin içeren üst faz sıvısı	-	-	0.5 ml	-
TCA eklendikten sonra glisin-prolin	-	0.5 ml	-	-
G.asetik asit	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Modifiye Chinard	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Standart	-	-	-	0.5 ml

TABLO 5: Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

$$\text{HESAP: } \frac{(A \bar{O} - A \bar{O} K) - A K}{(A S - A K)} \times \text{Standart} \times \frac{T.V(12)}{S.V(5)} \times \frac{0.5}{1000} \times 10000 \times 6 \times \frac{1}{30}$$

$$\text{HESAP: } \frac{(A \bar{O} - A \bar{O} K) - A K}{(A S - A K)} \times \text{Standart} \times 2.4 \text{ mmol min}^{-1} / \text{L}$$

$$\text{HESAP: } \frac{(A \ddot{O} - A \ddot{O} K) - A K}{(A S - A K)} \times \text{Standart}(0.650) \times 2400 \mu \text{ mol min}^{-1} / \text{L} (\ddot{U}/\text{L})$$

- A \ddot{O} : Örneğin absorbansı
A.Ö.K: Örnek Körünün absorbansı
A.K : Ayıraç Körü
A.S : Standartın absorbansı
T.V : Total volüm
S.V : Örnek volümü

Doku Ölçümü: Örnekler %0.9 luk NaCl ile 1/50 seyreltildikten sonra Ultra-Turraks T 25 homojenizatörde 20500 devir / dakikada ve ultrasonik T460 manyetik karıştırıcı ile homojenize edildi. Homojenizatlar Beckman soğutmalı santrifüjde 10.000 x g de santrifüj edildi. Üst fazdan 100 mikrolitre alınarak, 1/1 olacak şekilde 0.005 M MnCl₂ 4 H₂O,%0.001 Triton X100, 0.001 M GSH içeren Tris/ Hcl pH: 7.8 tamponu ile sulandırılır. Bundan sonraki basamaklar olan ön inkübasyon, enzimatik reaksiyon ve prolin ölçümleri serum örneklerinde olduğu gibi çalışıldı ve prolidaz aktivitesi hesaplandı.

$$\text{HESAP: } \frac{(A \ddot{O} - A \ddot{O} K) - A K}{(A S - A K)} \times \text{Standart} \times \frac{12}{5} \times \frac{0.5}{1000 \times D} \times 10000 \times 50 \times 2 \times \frac{1}{30}$$

$$\text{HESAP: } \frac{(A \ddot{O} - A \ddot{O} K) - A K}{(A S - A K)} \times \frac{\text{Standart}}{D} \times 40000 \text{ U/mg doku başına}$$

BULGULAR:

35 hastanın serum ve doku prolidaz aktiviteleri ölçüldü ve aşağıdaki sonuçlar bulundu.

Serum prolidaz seviyeleri (Ü/L):

<u>Hasta no:</u>	<u>Tedaviden önce</u>	<u>Tedaviden sonra</u>
1.	735	599
2.	842	729
3.	728	801
4.	738	689
5.	742	693
6.	1113	947
7.	664	533
8.	553	505
9.	958	912
10.	701	475
11.	644	527
12.	903	954
13.	840	679
14.	654	571
15.	516	427
16.	596	490
17.	456	440
18.	569	451
19.	650	675
20.	964	765
21.	690	597
22.	627	496
23.	915	863
24.	619	527

25.	768	697
26.	638	568
27.	649	561
28.	658	438
29.	764	658
30.	650	543
31.	976	821
32.	1242	1134
33.	678	564
34.	767	671
35.	687	621

Doku prolidaz örnekleri (Ü/mg doku başına)

<u>Hasta no:</u>	<u>Tedavi öncesi</u>	<u>Tedavi sonrası</u>
1.	3480	2750
2.	2460	2150
3.	2760	2350
4.	3150	2870
5.	2670	2150
6.	3340	3120
7.	2960	2710
8.	2370	2400
9.	2340	1880
10.	2910	2750
11.	3540	3220
12.	3280	3010
13.	2840	2710
14.	2330	1750
15.	4100	3750
16.	2640	2410
17.	2660	2710

18.	3270	3080
19.	3040	2870
20.	3330	3120
21.	2450	2110
22.	3670	3560
23.	3240	3100
24.	3870	3760
25.	3900	3760
26.	2550	2340
27.	4280	3770
28.	3610	3420
29.	3540	3270
30.	2760	2500
31.	3510	3310
32.	4100	3870
33.	3200	3070
34.	3940	3750
35.	3700	3680

Tedavi öncesi ve tedavi sonu sonuçlar karşılaştırıldı. Serumda tedavi öncesi değerlerin ortalaması 739.8286, standart deviasyonu 166.4730 olup, tedavi sonrası değerlerin ortalaması 646.3143, standart deviasyonu 169.4928 bulundu. Student-t testine tabi tutulan sonuçlarda p: 0.0114 ($p<0.05$) bulundu.

Doku prolidaz sonuçlarında tedavi öncesi değerlerin ortalaması 3194.000, standart deviasyonu 559.8435, tedavi sonrası değerlerin ortalaması 2943.7143, standart deviasyonu 594.5937 idi. Student-t testine göre anlamlılığı p:0.0371 ($p<0.05$) bulundu.

Doku örneklerinin patolojik incelemesinin de ise;
TEDAVİ ÖNCESİ;

Dermisde yoğun, özellikle kollajen demetleri arasında baskın olarak PMNL'lerden daha az oranda lenfosit ve plazmositlerden oluşan iltihabi hücre infiltrasyonu ile beraber,

- Ödem,
- Kapiller proliferasyon,
- Kollajen degenerasyon ve kaybı saptandı.

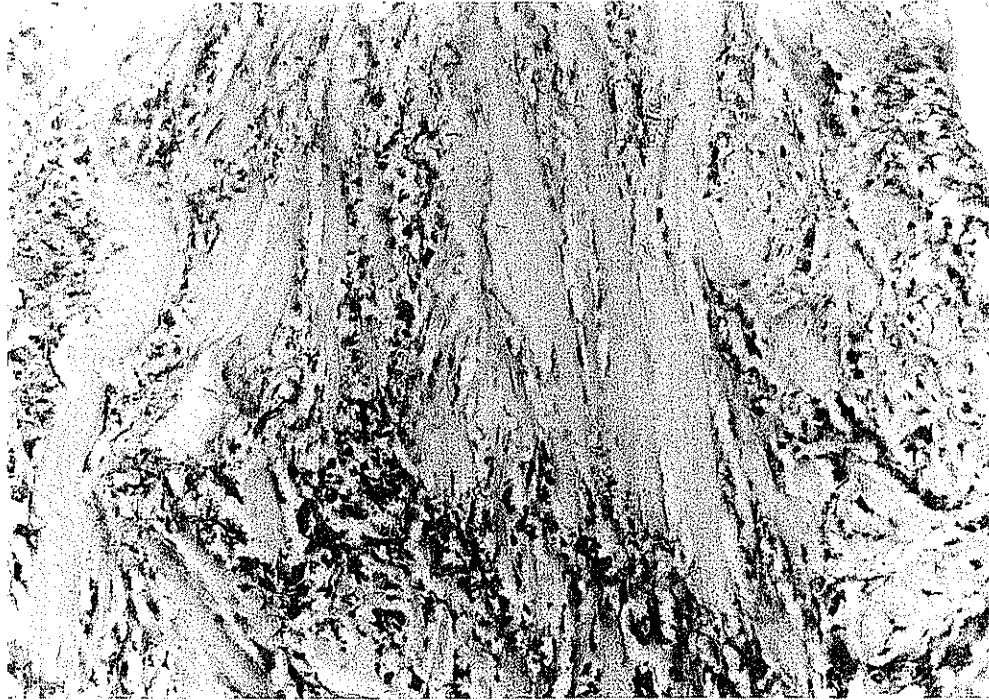
Epidermisde hiperkeratoz, granüler tabaka kalınlaşması, akantoz ve ülser gözlemlendi (Resim 3-4-5).

TEDAVİ SONRASI;

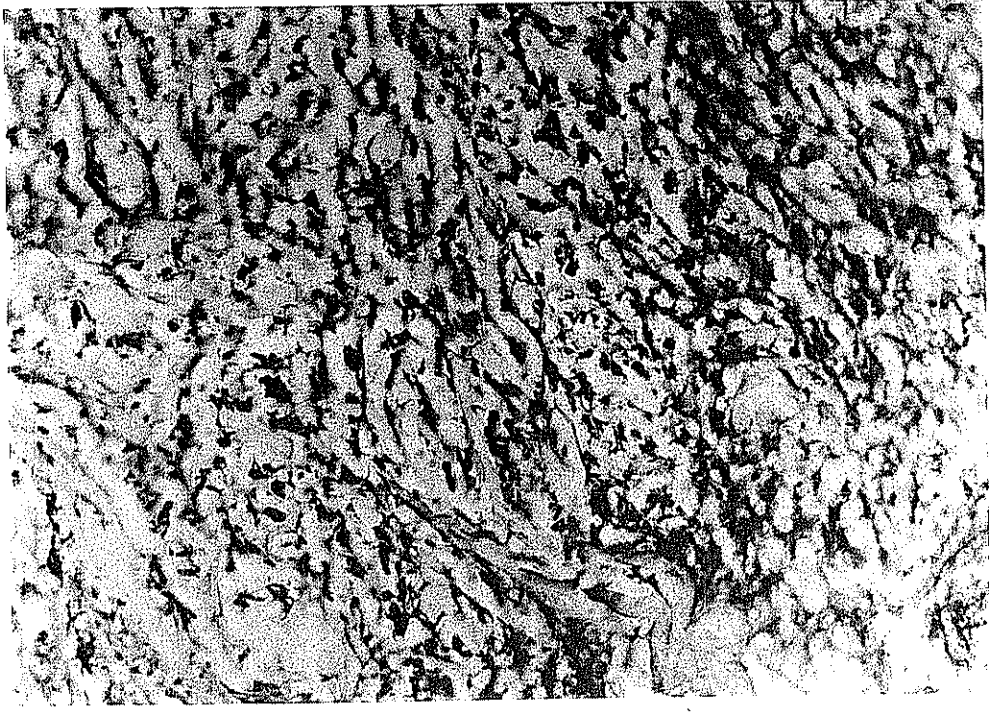
Dermisde baskın olarak lenfosit ve plazmositlerden oluşan, özellikle perivasküler mononükleer iltihabi infiltrasyonla beraber,

- Ödemin kaybolduğu,
- Kollajen artımı,
- Damar sayısının normal sınırlara döndüğü (hafif proliferasyon),

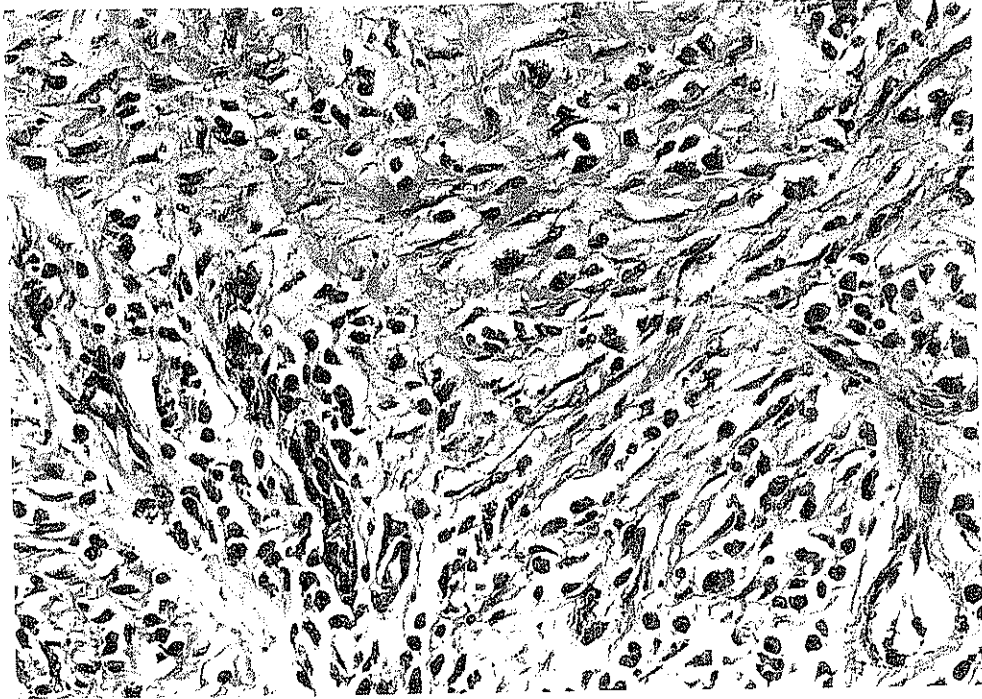
Epidermisde hiperkeratoz ve akantozda belirgin derecede azalma olduğu gözlemlendi (Resim 6).



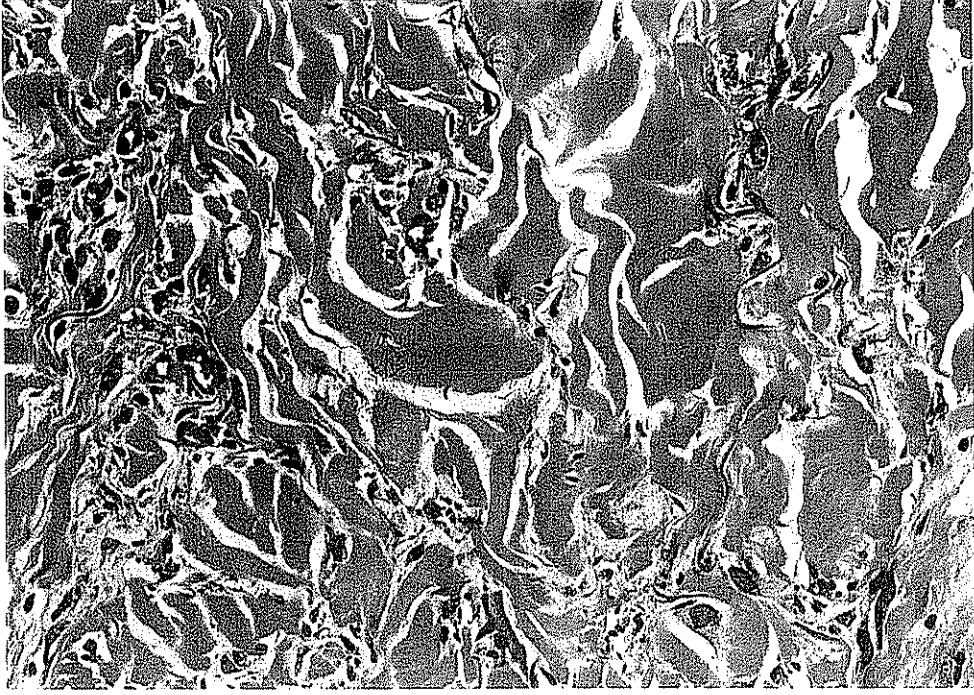
Resim3. Tedavi öncesi kollajen yıkımı, hematoxilen eozin, x 200



Resim 4: Tedavi öncesi aktif iltihap ve nekroz, hematoksilin eozin, x 200



Resim 5. Tedavi öncesi yoğun inflamasyon alanı, masson trichrome, x200



Resim 6. Tedavi sonrası artan kollajen demetleri, masson trichrome, x 400

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yara iyileşmesi geleneksel olarak inflamatuvar, proliferatif ve rejeneratif faz olarak üç bölümde incelenen kompleks bir prosesdir (9). Bu fazlarda oluşan lökosit aktivasyonu, angiogenesis, kollajen sentezi, ve reepitelizasyon gibi tüm prosesler doku oksijen basıncı ile yakından ilişkilidir. Problemlili yaralarda yara iyileşmesi için oksijen ihtiyacı kan tarafından yeterince sağlanamaz (54-52).

Lokal hipoksi doku injürisinin sonucu olarak kaçınılmaz ve normal bir sonuçtur (26,60). Hipoksi tamir için stimulus gibi davranır. Diğer taraftan pek çok reperatif proseslerde kritik moleküler oksijen ihtiyacından dolayı lokal iskemi ve enfeksiyon yetersiz doku iyileşmesine yol açabilir. Doku oksijenasyonun düzelmesi tamir işlevini kolaylaştırır. Deniz seviyesinde % 100 oksijen ile orta derecede arteriel hiperoksi oluşturulursa yarayı çevreleyen lokal damarlarda oksijen basıncı beklenmeyen ölçüde pik yapar. Fakat yaranın ciddiyetine bağlı olarak hipoksi relatif olarak merkez bölgede daha az değişir. Kollajen sentezi, matriks deposizyonu, anjioneogenezis, epitelizasyon ve bakterial öldürme hızlanır. Bunun tek açıklaması, yüksek oksijen basıncında yara hücrelerinin daha fazla oksijen kullandıklarıdır. Oksijen sadece protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi enerji gerektiren proseslerde değil, aynı zamanda kollajen alfa zincirlerinin oluşumunda, onun fiberlere bağlanmasında ve salgılanmasında gerekli olan prolin ve lizin moleküllerinin hidrosilasyonu için gereklidir. Pek çok rolünden dolayı oksijen yara iyileşme prosesinde kontrol edici durumdadır. Beyin ve kalpde olduğu gibi oksijen yarada da kritik moleküldür (28).

Kollajen Oksijene bağımlı olarak lizin ve prolinin hidrosilasyonu sonucu hücrelerden salgılanır. Prolinin hidrosilasyonu için oksijenin Km (Kinetik sabiti) değeri yaklaşık 20 mmHg olarak tahmin edilmiştir. Michaelis-Menton kinetiğine göre, diğer tüm substratlar ve kofaktörler yeterli miktarda olduğu takdirde kollajenin hidrosilasyon hızı pO_2 nin 0-50 Torr arasındaki basınçlarda basınca orantılı olarak değişir. Normal yarada pO_2 0-60 Torr arasındadır. Lokal doku oksijen basıncı tamir esnasında kollajen sentez ve deposizyonunu etkiler. Eğer anoksi olursa, fibroblastlar invitro olarak

intraselüler polipeptit kollajen prokürsörlerini yapacaklardır fakat onları salgılayamayacaklardır (28). Oksijen tekrar uygun konsantrasyona eriştiğinde kollajen üretilir (47). Prockop geçici bir anoksinin bile daha az hidroksile kollajen oluşumu ile sonuçlandığını göstermiştir. İnvivo sınırlı bir anoksik periyod düşük mekanik gerilime neden olacak daha az dayanıklı kollajen sentezine yol açar (62). Chvapil ve arkadaşları kollajenin çapraz bağ ve maturasyonlarının çevre oksijen basıncının yükselmesiyle lineer olarak arttığını göstermişlerdir (10). Young invivo olarak cerrahi hastalarda ve tavşan modellerinde ince ve kalın bağırsak anastomozlarında kan akımını ölçerek, perianastomotik oksijen basınçlarını, kırılma gerginliği ve kan akımı ile uyumlu bulmuşlardır. Tavşanlarda pO_2 55 mmHg'nin üstünde % 10 kırılma hızına rağmen 25 mmHg'nin altında bu % 100'e erişmiştir (54). Diğerleri oksijen ile doku gerginlik kuvveti, total kollajen depozisyonu, total protein ve total hücre DNA'sı arasında yakın ilişki olduğunu göstermiştir. Oksijen ihtiyacı epitelizasyonla da ilgilidir. Rejenere olan epitelial hücreler başlangıçta anaerobik yaşam için hazırlanırlar fakat aerobik fonksiyonlarını da muhafaza ederler (31). Daha fazla oksijen verildiği takdirde bu aerobik metabolizmaya dönüşür. Pek çok araştırmacı 1-2 ATA arası oksijen verildiği takdirde normal ve iskemik yaralarda epitelizasyon hızını oksijen sunusunun kontrol ettiğini rapor etmişlerdir. Epitelial hücreler bazal membran kollajenini yaparlar ve tabii ki bu etkinin bir parçası da onların kendi kendini sınırlama yeteneklerindeki artıştır. Keza replikasyon hızı da oksijen bağımlıdır (40). Bazen sürpriz olarak açık yaralarda epitelial hücre oksijen kaynağı damarsal olmaktan ziyade topikaldir. Kurumuş eksuda ve skar dokusu kan akımına bağlı olan oksijen difüzyonu için bariyer oluşturur. Difüzyon bariyerinin artışında, gaz geçirmeyen pomatların kullanımı anjiogenesi uyarır, fakat epitelizasyonu baskılar. Diğer taraftan oksijen geçirgen pomat sürülmüş yaralar artmış epitelizasyon gösterir. Tatmin edici sonuçlar yeterli gaz geçirgenliği ve uygun çevre nemi arasındaki denge ile sağlanır (28). Tabii ki sonuç olarak yara perfüzyonu yeni damar yapımına bağlıdır. 1984 yılında Knighton ve arkadaşlarının tavşan kulak kepçelerinde yaptığı kontrollü oksijen basınçları çalışmaları anjiogenezin oksijen gradienti ile yürütüldüğünü göstermiştir

(5,33). Yüksek arteriel pO_2 nin hipoksik alanlarda anjiogenezisi başlattığı gözlenmiştir. Diğer taraftan yaranın merkez kısmının yüksek pO_2 ye maruz kalması damar gelişimini durdurur. Bunun arkasında yatan mekanizma makrofajların hipoksi veya yüksek laktat seviyesi olduğu zaman anjioneogenetik faktör üretme kabiliyetleri olmasındandır (33). Oksijen solunduğu zaman yara oksijen basıncı yeterli kapiller büyüme olana kadar, bu faktör üretimini veya laktat oluşumunu inhibe edecek kadar yeterli yükselmez. Bu, muhtemelen kronik iskemik dokularda aşırı kapiller oluşumla açıklanabilir (27, 33). Böylece günde 2 kez 90 dakikalık $HB0_2$ tedavisi ile kişi ortalama olarak 3 saat hiperbarik ortama, 21 saat de hipobarik ortama maruz kalır. Bu kombinasyon neticesinde hem yüksek oksijen basıncı ile anjioneogenez artacak, hemde düşük oksijen basıncı ile makrofajların salgıladığı anjioneogenetik faktör sayesinde yeni damar oluşumu uyarılacaktır.

Vaskülarize temiz yaralar enfeksiyona dirençlidir. İskemik alanlardaki yaraların enfeksiyona oldukça yatkın oldukları bilinmektedir. Oksijenasyonun herhangi bir yolla kesilmesi enfeksiyona meyli artırır. Aynı zamanda oksijen basıncındaki düzelme de yaranın enfekte olması ihtimalini azaltır (28).

Çalışmamızda $HB0_2$ tedavisi uygulanan kronik yaralı hastalarda kollajen yıkımında rol alan prolidazın tedavi kriteri olup olmayacağı amacı güdüldü. Günde 2 kez toplam 30 seans 2 ATA da 90 dakikalık $HB0_2$ tedavisinden sonra, tedavi öncesi ve sonrası alınan doku örneklerinin patolojik incelemelerinde kollajen sentezinin arttığı, kollajen yıkımının azaldığı, epitelizasyonun arttığı, ödemin azaldığı gözlemlendi. Serum ve doku prolidaz enzim örneklerinde ise kollajen yıkımında rol alan prolidaz enzim aktivitesi tedavi sonrası değerler itibarıyla tedavi öncesi değerlere göre istatistiksel bakımdan anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$).

Prolidaz enzimi, özellikle prolinin büyük bir kısmını içeren prokollajen gibi proteinlerin hücre içi parçalanmasında son basamakta rol almaktadır (57).

İyileşmeyen yaralar genellikle hipoksiyle beraberdir. Bölünen fibroblastların metabolik ihtiyaçları artmıştır. Lokal sirkülasyon bozulduğu zaman tamir için enerji ihtiyacı artacağından yarada bir enerji krizi vardır.

Oksijen hücrelerden kollajenin serbestleşmesi ve fibroblastlara yapışması basamağında gerekli olan prolin ve lizinin hidrosilasyonunda gereklidir. Böylece hipoksi kollajen sentezini bozar ve oluşan kollajenler düşük gerginlik kuvvetine sahip olurlar. Çevre oksijen basıncı 10 mmHg'nın altında olunca fibroblastlar uygun olarak migrasyon yapamazlar. Anoksida amonyum gibi metabolitlerin birikmesine yol açarak hücrelerin şişmesine ve yara iyileşmesinin bozulmasına yol açar. Hipoksi kollajen sentezindeki enzimleri aktive eder. Bu paradoks şöyle açıklanabilir: Hipoksinin oluşturduğu laktat yükselmesi (5-15 mmol) kollajen sentezini 2 kat artırırken, doku pO_2 'si 40 mmHg'ya çıktığı zaman kollajen sentezi 7 kat artmaktadır. Aralıklı olarak $HB0_2$ tedavisi verilmesi fibroblast replikasyonu ve kollajen sentezini artırır (58). Kollajen sentezi artışı ile kollajen turn-over hızı arasında ilişki olup olmadığını da inceledik. $HB0_2$ tedavisi sonrasında hem serum örneklerinde hem de doku örneklerinde prolidaz enzim aktivitesinin düşmesi, doku kesitlerinin patolojik incelemesi sonucunda da kollajen yıkımının azaldığının, sentezinin arttığının gözlenmesi ile $HB0_2$ tedavisinin yara bölgesinde kollajen yıkımını azalttığı sonucuna varıldı. Serum prolidaz enzimidaki azalmanın, ve bu azalma göz önüne alındığında, $HB0_2$ tedavisi takibinde kullanılacak bir parametre olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yanısıra bir diğer önem taşıyan prolil hidrosilaz enzim ölçümünün de bu çalışmanın anlamlılığını artırma bakımından parametre olarak kullanılması düşünüldü. Ancak prolil hidrosilaz ölçüm yönteminin hata kaynaklarının fazla olması, ileri teknikler gerektirmesi, ve pahalı bir laboratuvar yöntem olması nedeniyle çalışma kapsamına alınmadı. Modifiye Myara yöntemi ile ön inkübasyon süresi 24 saatten 3 saate indirilen prolidaz enziminin pratik olarak kullanılacak bir test olduğunu düşündük. Deneyde kullanılan materyal de hem ucuz hem de her laboratuvarda bulunabildiği için prolidaz enziminin rutin olarak kronik refrakter yaraların tedavisi esnasında kollajen yıkım sürecinin azalıp yapımının attığını gösterebilmek amacıyla kullanılabilirliği sonucuna vardık.

Sonuç olarak;

1. Patolojik inceleme sonucunda yara iyileşmesi esnasında HB0₂ tedavisi ile kollajen yapımı artmıştır.

2. Kollajen yıkımı ve yıkımda rol alan prolidaz enzimi anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$).

3. Prolidaz enzimi yara iyileşmesinde takip kriteri olarak kullanılabilir. Modifiye Myara yöntemi ile prolidaz enzim ölçümü pratik olup her laboratuvarında uygulanabilir.

4. HB0₂ tedavi derinliği ve tedavi süresinin prolidaz enzimi ve kollajen yıkımı üzerindeki etkisi hususunda, optimal değerlerin ortaya konabilmesi için değişik derinlik ve sürelerin kullanıldığı tedavi profillerinin uygulandığı farklı çalışmaların yapılmasına gerek vardır.

ÖZET

Hiperbarik oksijen tedavisinin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisini gösterebilmek amacıyla planladığımız bu çalışmaya yaşları 22 ve 76 arasında değişen 15 bayan, 20 erkek hasta dahil edildi. Olgular çeşitli nedenlerle kronik refrakter yaraları olan kişilerden seçildi. Hastalara HBO₂ tedavisinin yanısıra medikal tedavi de uygulandı. HBO₂ tedavisi günde 2 kez 90 dakikalık seanslar halinde 2 ATA'da uygulandı. Tedavi toplam 30 seansa tamamlandı.

Tedavi öncesi ve sonrasında hastalardan venöz kan örnekleri ve yara kenarından cilt biopsileri alındı. Tedaviler tamamlandıktan sonra serum ve doku örneklerinde prolidaz enzimi değerlendirildi.

Tedavi sonrası serum ve doku örneklerinde prolidaz enzim aktivitesi anlamlı olarak azalma gösterdi ($p<0.05$). Patolojik incelemelerde tedavi sonrası kollajen yıkımı azaldı ve kollajen sentezi arttı.

Sonuç olarak serum ve doku örneklerinde prolidaz enzim aktivitesi değerlendirilmesinin yara tedavi takibinde kullanılabileceği düşünüldü.

SUMMARY

15 female and 20 male patients between the ages 22 and 76 were included in this study in which we aimed to demonstrate the positive effect of Hyperbaric oxygen therapy (HBO₂) on wounds. All the cases had chronic refractory wound.

In this study, we measured the prolidase enzyme activity to see whether it could be used as a parameter in wound management. All the cases had chronic refractory wounds. We used HBO₂ therapy besides medical therapy. HBO₂ therapy was applied twice a day in 90 minute periods at 2 ATA. The treatment was discontinued after 30 periods.

We collected venous blood samples and made skin biopsies before and after treatment.

The prolidase enzyme was evaluated in serum and tissue samples before and after treatment. Tissue samples were studied pathologically as well. The prolidase enzyme activity in serum and tissue samples had a significant decrease after therapy.

In pathologic observations we determined an increase in collagen synthesis and a decrease in collagen degradations after therapy.

Finally it is concluded that the evaluation of prolidase enzyme in serum and tissue samples may be used while treating chronic refractory wounds.

KAYNAKLAR:

1. Akpir, K.: Karbon monoksit zehirlenmesi ve anaerobik infeksiyonların tedavisinde Hiperbarik oksijenizasyon, Tıbbi Ekoloji ve Hidroklimatoloji Dergisi, Hiperbarik oksijenizasyon sempozyumu özel sayısı, cilt: 2, sayı: 1, 32-36, 1984
2. Arata, J., Umemura, S., Yamamoto, Y., Hagiya, M.: Prolidase deficiency: TS Dermatological manifestations and some biochemical studies. Arch Dermatol, 115:62- 67, 1979.
3. Babior B. M. : Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N Engl. J. Med. 198:659, 1978.
4. Bakker, D. J., Niinikoski, J.: Chronic Hyperbaric Oxygen Therapy Indications Final Report. 1st European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine. Reports and Recommendations. Ed: Wattel F., Mathieu, D. 71-86, Lille (France) 1994.
5. Banda, M. J., Knighton, D. R., Hunt, T. K., et al.: Isolation of non-mitogenic angiogenesis factor from wound fluid. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:7773- 7777, 1983
6. Behnke, A. R.: A Brief History of Hyperbaric Medicine, Hyperbaric Oxygen Therapy, Ed: Davis, J. C., Hunt, T. K., Undersea Medical Society Inc., 3-10, Maryland 1977.
7. Brosset, B., Myara, I., Fabre, M., Lemonnier, A.: Plazma prolidase and prolinase activity in alcoholic liver disease. Clin. Chim. Acta, 175:291-296, 1988.
8. Buist, N. M. R., Strandholm, Bellinger, J. F.: A probable case of prolidase deficiency. Metabolism, 211: 113-1124, 1972.
9. Clark, R. A. F. :Cutaneous tissue repair. Basic biologic considirations. I. J. Am. Acad. Dermatol. 13: 701, 1985.
10. Chvapil, M., Hurych, J., Ehrlichova, E. : The influence of varying oxygen tensions upon proline hydroylation and the metabolism of collagenous and non-collagenous proteins in skin slices. Z. Physiol Chem 349:211, 1968.
11. Cosson, C., Myara, I., Miech, G., Moatti, N., Lemonnier, A.: Only

- prolidase I activity is present in human plazma. *Int. J. Biochem*, 24:427-432,1992.
12. Çimşit, M.: Hiperbarik oksijenin kullanım alanları, *Tıbbi Ekoloji ve Hidroklimatoloji Dergisi*, Hiperbarik Oksijenasyon özel sayısı, Cilt:2, Sayı:1, 8-15, 1984
 13. Çimşit, M.: Hiperbarik Oksijen Tedavisi. *Sendrom*. Yıl: 2, Sayı: 6, 67- 69, 1990.
 14. Davis, J. C., Dunn, J. M., Heimbach, R. D.: Hyperbaric Medicine: patient selection, treatment procedures, and side effects. In *Problem Wounds: The role for oxygen*. Eds: Davis, J. C., Hunt, T. K. Elsevier Science pub. 225-235.,New York 1988.
 15. Davis, J. C., Hunt, T. K.: *Hyperbaric Oxygen Therapy*, preface and background, Undersea Medical Society Inc., Maryland 1977.
 16. Endo, F., Tanoue, A., Nakai, H., Matsuda, I.: Primary structure and gene localization of human prolidase. *J. Biol. Chem*, 264:4476-4481, 1989.
 17. Fisher, A.: Intracellular production of oxygen-dependent free radicals. *Upjohn Symposium, Oxygen Radicals*. April 1987, 34-39
 18. Fridovich, I.: Thee Biology of oxygen radicals. General concepts. *Upjohn Symposium, Oxygen Radicals*. April 1987, 1-5.
 19. Gardner, D. G.: *Biochemical Basis of Connective Tissue Disease*. In *Pathological Basis of the Connective Tissue Diseases*. Eds: Gardner, D. G., Anderson, J. J. Edward Arnold Publ. London, Melbourne, Auckland, 173-189, 1992
 20. Gottlieb, S. F.: Oxygen under pressure and microorganism, *Hyperbaric Oxygen Therapy*, Ed: davis, .C., Hunt, T. K., Undersea Medical Society Inc., 79-100, Maryland, 1977.
 21. Grim, P. S., Gottlieb, L. J., Boddie, A., Batson, E.: *Hyperbaric Oxygen Therapy*. *Jama*. Vol 263, No: 16, 2216-2220, 1990.
 22. Gürdöl ,F., Genç, S., Yalçın, Ö., Gültepe, M.: The presence of prolidase activity in amniotic fluid and its evaluation as a maturity test. *Biol. Neonate*, 67:34- 38,1995.
 23. Hammerlund, C.: The physiologic effects of hyperbaric oxygen, In:

- Hyperbaric Medicine Practice Ed: Kindwall E., Best Publishing Company., 17-32, Arizona 1995.
24. Hohn, D. O.: Host resistance of infection. Established and emerging concepts. In Hunt, T. K. (ed). Wound healing and Wound infection. Theory and surgical practise. New York, Appleton-Century-Crofts, 264-280, 1980.
 25. Hohn, D. C.: Oxygen and Leukocyte Microbial Killing, Hyperbaric Oxygen Therapy, Ed: Davis, J. C., Hunt, T. K., Undersea Medical Society Inc., 101-110, Maryland 1977.
 26. Hunt, T. K., Banda, M. I., Silver, I. A. : Cell interactions in posttraumatic fibrosis. Ciba symposium 114, London, Pitman, 1985, 124-149.
 27. Hunt, T. K., Conolly, W. B., Aranson S. B., et al.: Anaerobic metabolism and wound healing. An hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds. AM J. Surg. 135: 328-332, 1978
 28. Hunt, T. K., La Van, F. B. : Oxygen and Wound Healing. Clinics in Plastic Surg., Vol 17, No. 3, July 1990.
 29. Hunt, T. K., Niinikoski, J., Zederfeldt, B. H., Silver, I. A.: Oxygen in Wound Healing Enhancement: Cellular effect of oxygen, Hyperbaric oxygen therapy, Ed: Davis, J. C., Hunt, T. K., Undersea Medical Society Inc, 111-122, Maryland 1977.
 30. Hunt, T. K., Twomey, P., Zederfeldt, B. : Respiratory gas tensions in healing wounds. Am. J. Surg., 114:302-307, 1967.
 31. Hut, K. S., Lajtha, A.: Prolidase activity in brain; comparison with other organs. Journal of Neurochemistry, 30:321-327, 1978.
 32. Im, M. J. C., Hoopes J. E.: Energy metabolism in healing skin wounds. J. Surg. Res. 10:4559, 1970
 33. Jain, K. K.: Hyperbaric Oxygen Therapy in Wound Healing. In: Textbook of Hyperbaric Medicine Eds: Jain, K. K., Neabauer, R., Correa, J. G. Hogrefe and Huber Publ. Toronto 193-199, 1989.
 34. Jain, K. K., Physical, Physiological and Biochemical aspects of Hyperbaric oxygenation. In: Textbook of Hyperbaric Medicine. Eds: Jain, K. K., Neabauer, R., Correa, J. G. Hogrefe and Huber Publ. Toronto,

11-25, 1990.

35. Jensen, J. A, Hunt, t. K., Scheuentuhl, H., et al.: Effect of lactate, pyruvate and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages. *Lab. Invest* 54:574-578, 1986.
36. Juva, K., Prockop, D. J., Cooper, G. W., et al: Hydroxylation of proline and intracellüler accumulation of a polypeptide precursor of collagen. *Secience*, 152:92, 1966.
37. Kindwall, E. P.: A history of hyperbaric medicine. In: *Hyperbaric Medicine Practice*. Ed: Kindwall, E. P., Best Publishing Company. Arizona, 2-16, 1995.
38. Kindwall, E. P.: Clinical Hyperbaric Oxygen Therapy. In: *The Physiology and Medicine of Diving*. Ed: Bennett P. B. Saunders Company. London, 542-562, 1993.
39. Kodoma, H., Mikasa, H., Ohhashi, T., Ohno, T., Arata, J.: Biochemical investigations on prolidase and prolinase in erythrocytes from patients with prolidase deficiency. *Clinica Chimica Acta*, 173:317-324, 1988.
40. Laurent, G. J.: Dynamic state of collagen. Pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of mass. *American Journal of Physiology* 1987, 252:C1-C9.
41. Mader, J. T.: *Hyperbaric Oxygen Therapy: A Committe Report*. Bethesda, Md: Undersea and Hyperbaric Medical Society; 1989.
42. Marks, N, Datte, K, Lahjta, K.: Prolidase activity in sciatic nerve. *J. Neuro. Chem.* 17:53-63, 1970
43. Medaver, P. B.: The cultivation of adult mammalian skin epithelium. *Q. J. Micr. Sci.* 89:187, 1948
44. Meyers, R. A. M., Thom, S. R.: Carbon monoxide and cyanide poisoning. In: *Hyperbaric Medicine Practice* Ed: Kindwal, E., Best Publishing Company. 343-372, Arizona 1995.
45. Myara, I.: Effect of long preincubation on the two forms of human erythrocyte prolidase. *Clinica Chimica Acta*, 170:263-270, 1987.
46. Myara, I., Charpentier, C., Lemonnier, A.: Optimal conditions for prolidase assay by proline colorimetric determination. *Clinica Chimica*

- Acta, 125:193-205, 1982
47. Myara, T., Mangeot, A., Fabre, M., Charpentier, C., Lemonier, A.: Plasma prolydase activity; a possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. *Clin. Chem*, 30:211- 215,1984
 48. Nachum, Z., Reissman, P., Dolberg, S., Melamed, Y.: Hyperbaric Oxygen for purpura fulminans. *Proceedings of the 15th Meeting of the E.U.B.S.* Ed: Bitterman, N., Lincoln, N., 251-257, Eilat 1989.
 49. Neil, C. D., Emil, L. S: Purification and some properties of prolydase of swine kidney. *Biol. Chem*, 224:261-275, 1956.
 50. Oono, T., Yasutomi, H., Ohhahi, T., Kodama, H., Arata, J.: Characterization of fibroblast-derived prolydase; the presence of two forms of prolydase. *J. Dermatol. Sci*, 1:319-324,1990.
 51. Oriani, G.: Acute indications of HBO₂ therapy: Final report. 1st European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine. Reports and Recommendations. Ed: Wattel F., Mathieu D.: 45-55, Lille (France) 1994.
 52. Pai, M. P., hunt, T. K. Effect of varying oxygen tension on healing of open wounds. *Surg. Gynecol. Obstet.* 135: 756, 1972.
 53. Park, M. K., Muhvich, K. H., Myers, R. A., Marzella, R.: Effects of Hyperbaric oxygen in infectious Diseases: Basic Mechanisms. *Hyperbaric Medicine Practice*, Ed: Kindwall, E. P., Best Publishing Company, 141-171, Arizona 1995.
 54. Rabkin, J. M., Hunt, T. K.: Infection and oxygen, In: *Problem Wounds: The role of oxygen*. Eds: Davis, J. C., Hunt, T. K. Elsevier Science publ. 1-16, New York 1988.
 55. Ramachandran, G. N.: Stereochemistry of collagen. *International Journal of peptide and protein research* 1988; 31:1-16.
 56. Rojkind M, Dunn M : Hepatic Fibrosis :*Gastroenterol* 76 :849-863,1979.
 57. Rojkind,M.,Gatmaitan, Z.: Connective tissue biomatrix in rat hepatocytes. *J. Cell. Biol*, 87: 255-256, 1980.
 58. Shandall, A., Lowndes R., Young H. L.: Colonic anastomotic healing and

- oxygen tension. *Br. J. Surg.* 72:606-609, 1985.
59. Schildberg, F. W., Hatz, R. A., Niedner, R., Vanscheidt, W., Westerhof, W.: *Wound Healing and Wound Management*. 1st edition, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barselona, Budapest, Springer-Verlag Co, 1994, 1-23.
60. Silver, I. A. : Cellular microenvironment in healing and non-healing wounds. In Hunt, T. K., Heppenstall, R. B., Pines, E.: *Soft and hard tissue repairs*, New York, Praeger, 1984, 50-66.
61. Tanoue, A., Endo, F., Matsuda, I.: Structural organization of the gene for human prolidase and demonstration of a partial gene deletion in a patient with prolidase deficiency. *J. Biol. Chem.* 265:11306-11311, 1990
62. Uitto, J., Prockop, D. J. :Synthesis and secretion of under-hydroxylated procollagen at various temperatures by cells subject to temporary anoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 60: 414, 1974.
63. Zuyderhouldt, F. M. C., Brugman, A. M., Smit, J. J. H., Jong, L.: Plazma prolidase in the rat; no index of liver fibrosis. *Clinical Chemistry*, 31:4, 1985.