

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SUALTI HEKİMLİĞİ VE HİPERBARİK TIP
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**YARA SIVISI ÖRNEĞİ TOPLAMA METOTLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Münire Kübra ÖZGÖK KANGAL

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi'nin
Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Programı İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak HazırlanmıŐtır.

ANKARA
2016

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SUALTI HEKİMLİĞİ VE HİPERBARİK TIP
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**YARA SIVISI ÖRNEĞİ TOPLAMA METOTLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Münire Kübra ÖZGÖK KANGAL

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi'nin
Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Programı İçin ngrdĞ
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak HazırlanmıŐtır.

TEZ DANIŞMANI
Günalp UZUN
Prof.Dz.Tbp.Bnb.

**ANKARA
2016**

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına:

“Yara sıvısı örneği toplama metotlarının karşılaştırması” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı Başkanlığı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Tez Danışmanı: Prof.Dz.Tbp.Bnb. Günalp UZUN

GATA Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp AD. Bşk.lığı

Üye :Prof.Dz.Tbp.Kd.Alb. Şenol YILDIZ

GATA Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp AD. Bşk.lığı

Üye :Yrd.Doç.Dr.Abdullah Arslan

Sağlık Bakanlığı Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Kliniği

ONAY:

Dr. Münire Kübra ÖZGÖK KANGAL’ın 22.07.2016 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Hayati BİLGİÇ

Prof.Dz.Tbp.Tümamiral

GATA Komutan Bilimsel Yardımcısı,

Askeri Tıp Fakültesi Dekanı ve

Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasına GATA Etik Kurulu Başkanlığı'nın 06 Mart 2015 tarihli kararı gereği GATA Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı Başkanlığı'nda yapılmıştır. Bu çalışma ile yara sıvısı toplama metotlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Uzmanlık eğitimimin başlangıcından beri bilgi ve becerimin gelişmesinde değerli katkıları bulunan, mesleki etik değerleri ile yol gösteren ve çalışmamda desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dz.Tbp.Kd.Alb. Şenol YILDIZ'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleğimin bilimsel yönünün değerini anlamamı sağlayan, değerli bilgi ve deneyimlerini her zaman paylaşan, çalışmamın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük katkısı olan tez danışmanım Prof.Dz.Tbp.Bnb. Günalp UZUN'a teşekkür ederim.

Çalışmamda desteklerini eksik etmeyen değerli hocalarım Prof.Hv.Tbp.Alb. Emin ÖZTAŞ, Prof.Dz.Tbp.Alb. Halil YAMAN, Doç.Hv.Tbp.Alb. Ömer COŞKUN, Yrd.Doç.Dr. İpek Boşgelmez ve Doç.Tbp.Yzb. Türker TÜRKER'e teşekkürü borç bilirim.

Çalışmam boyunca yardımları için Biyokimya Laboratuvarı personeline teşekkür ederim. Tüm destekleri için Dr. Gökhan AKCALI, Dr. Abdullah KART, Uzm.Dz.Tbp.Bnb. Adem ÖZDEMİR, Ayşegül SOYDAN, Kıymet KOÇ, Nurhan ÖZCAN, Şevkiye KUTLU, Sevinç KORUCU, Arif DÜĞÜM, Elvan SELÇUK, Burçin GÜL, Celal KARAKAŞ, Ümit ATABEY, Ahmet ÖKSÜZ, Gülay YURDAYARDIM, Engin AVCI'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sonsuz sevgilerini her daim hissettiğim, her zaman yanımda olan, değerli yardımlarını eksik etmeyen sevgili annem Prof.Dr. Ayşegül ÖZGÖK, sevgili babam Prof.Dr. Yaşar ÖZGÖK ve biricik kardeşim Mısra ÖZGÖK'e herşey için sonsuz teşekkür ediyorum. Eşim sayesinde hayatıma giren sevgili annem Meral KANGAL, babam Tahir KANGAL ve kardeşim Gizem KANGAL'a da destekleri için teşekkür ediyorum. Her zaman eşsiz sevgisi ve desteğiyle yanımda olan, etik değerleri ile bana yol gösteren, tez çalışmam boyunca yardımları ve sabrı için sevgili eşim ve meslektaşım Dr. Görkem KANGAL'a sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunuyorum.

ÖZET

Yara Sıvısı Örneği Toplama Metotlarının Karşılaştırılması

Kolayca elde edilebilen yara sıvısının biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin tanımlanması ile daha etkin kişiye özel tedavi protokollerinin gelişimine katkıda bulunulabilir. Günümüzde yara sıvısı toplanması için bir altın standart yöntem tanımlanamamıştır. Çalışmamızda, 3 ayrı emici yara sıvısı örneği toplama metodunu (Whatman GF/D filtre kağıdı, poliviniliden florid (PVDF) filtre kağıdı, naylon uçlu swab) karşılaştırmayı amaçladık. Çalışmamıza 24 Temmuz 2015- 22 Haziran 2016 tarihleri arasında çalışma kriterlerine uyan kronik alt ekstremitte ülseri olan 20 hasta dahil edilmiştir; ancak bir hasta vizitlere katılmamıştır. Yöntemler; yara sıvısı ağırlığı, total protein ve albumin değerleri üzerinden karşılaştırılmıştır. Protein ve albümin sonuçları (g/dL), uygulanan testin o vizitte topladığı yara sıvısı ağırlığına (g) bölünmüş ve yeni bir oran elde edilmiştir (g/dL/g yara sıvısı). Yara sıvısı ağırlıklarına göre test içi güvenilirlikleri analiz edildiğinde, sadece swab yöntemi için istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır (p=0.012). Ancak, yara sıvısındaki total protein ve albumin seviyelerine göre tüm yöntemlerde tekrarlı ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar saptanmıştır. Whatman ve PVDF filtre kağıtları, swab yöntemine göre daha fazla yara sıvısı toplamıştır (sırasıyla p<0.001, p=0.002). Sonuç olarak, swab yöntemi Whatman ve PVDF filtre kağıtları ile karşılaştırıldığında daha güvenilirdir ve daha yüksek miktarda protein temin edilmesine imkan vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Yara, Yara İyileşmesi, Tanı Testleri,

Yazar Adı : Dr. Münire Kübra ÖZGÖK KANGAL

Danışman : Prof.Dz.Tbp.Bnb Günalp UZUN

ABSTRACT

The comparison of wound fluid collection techniques

Defining the biochemical and physiological characteristics of chronic wound fluid will contribute to the development of more efficient personal medical therapy protocols. Unfortunately, there is no current gold standard wound fluid collection technique. The aim of this study is to compare the efficiency of the 3 different absorbent wound collection techniques (Whatman GF/D filter paper, polyvinylidene fluoride (PVDF), nylon flocked swab). Between July 24, 2016 and June 22, 2016, 20 patients with chronic lower extremity ulcer were prospectively enrolled. However, one patient didn't attend to visits. The collection techniques were compared according to wound fluid weight, total protein concentration, and albumin concentration. Total protein and albumin concentrations (g/dL) were divided into their related wound fluid weight (g) and a new ratio (g/dL/d wound fluid) was created for these parameters. Among three techniques, a significant correlation between repeated wound fluid weight measurement was found only for swab technique ($r=0.536$, $p=0.012$). However, there were significant correlations between repeated measurements with regard to wound fluid total protein and albumin levels for all three techniques. Whatman and PVDF filter papers collected more wound fluid compared to nylon flocked swab ($p<0.001$, $p=0.002$, respectively). In conclusion, swab technique is more reliable than Whatman and PVDF filter papers and provides a higher protein concentration in wound fluid samples.

Keywords : Wound, Wound Healing, Diagnostic Tests

Author : ÖZGÖK KANGAL Münire Kübra, MD

Counsellor : UZUN Günalp, MD, Professor

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yara Tanımı ve Sınıflandırmaları	3
2.2. Yara İyileşmesi	3
2.2.1. Primer Yara İyileşmesi	3
2.2.2. Sekonder Yara İyileşmesi	3
2.3. Yara İyileşmesinin Evreleri	4
2.3.1. İnflamatuvar Evre	4
2.3.2. Proliferatif Evre	9
2.3.3. Maturasyon Evresi (Remodelling Evresi) ve Epitelizasyon	15
2.2. Kronik Yara	16
2.2.1. Tanım	17
2.2.2. Epidemiyoloji	17
2.2.3. Sınıflandırma	17
2.2.4. Patofizyoloji	17
2.3. Yara Mikroçevresi ve Yara Sıvısı	20
2.4. Yara Sıvısı Toplama Yöntemleri	23
2.4.1. Örneklerin Saklanması, İşlemler ve Analiz	32
2.5. Yara Sıvısında Araştırılan Belirteçler	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Dahil Etme ve Dışlama Kriterleri	41
3.2. Yara Sıvısı Örneği Toplanması	41

3.3. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAM	: Bir Disintegrin ve Metalloproteinaz
ADPR	: Adenozin Difosforiboz
AKŞ	: Açlık Kan Şekeri
bFGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BK	: Beyaz Küre
BSA	: Sığır Serum Albumin
Cl ⁻	: Klor
CRP	: C-Reaktif Protein
CXCL9	: Kemokin (C-X-C motif) Ligand 9
C3	: Kompleman 3
C5	: Kompleman 5
DM	: Diyabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzim İlişkili İmmunosorbent Analiz
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktör
FMN	: Flavin Mononükleotid
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
G-CSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HA	: Hyalüronik Asit
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktör
HIF1 α	: Hipoksiyle İndüklenebilir Faktör 1 α
HOCl \cdot	: Hipoklor Radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
IFN	: İnterferon
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Bağlayıcı Protein
IL	: İnterlökin

KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
KVY	: Kronik Venöz Yetmezlik
Lcn-2	: Lipocalin-2
LDS-PAGE	: Lityum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
MIF	: Migrasyon İnhibisyon Faktörü
MIP	: Makrofaj İnflamatuvar Protein
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrojen
NBYT	: Negatif Basıncılı Yara Tedavileri
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NOx	: Nitrat ve Nitrit
O ₂	: Oksijen
O ₂ [·]	: Süperoksit Radikali
PAH	: Periferik Arter Hastalığı
PAI-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PBS	: Fosfatla Tamponlu Salin
PDGF	: Trombosit Türevi Büyüme Faktörü
PMN	: Polimor nüveli Hücreler
PVDF	: Poliviniliden Fluorid
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDF-1 α	: Stromal Derive Faktör-1 α
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktör
TIMP	: Doku Matriks Metalloproteinaz İnhibitörü
TLR	: Toll Like Reseptör
tPA	: Doku Plazminojen Aktivatör
TNF	: Tümör Nekroz Faktör

uPA	: Ürokinaz Plazminojen Aktivatör
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör
VKI	: Vücut Kitle İndeksi
vWF	: von Willebrand Faktör
2-D	: 2 boyutlu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Yara iyileşme fazları. Yara kontraksiyonu sadece sekonder yara iyileşmesinde görülür.	4
2.2. Fagozom içinde oksidanların üretimi.	6
2.3. Anjiyogenez	10
4.1 Tüm yöntemlerin topladığı yara sıvısı ağırlık (mg) ortalamaları	50
4.2. Whatman yöntemlerinin yara sıvısı ağırlığı (mg) açısından korelasyon grafikleri	51
4.3. PVDF yöntemlerinin yara sıvısı ağırlığı (mg) açısından korelasyon grafikleri	51
4.4. Swab yöntemlerinin yara sıvısı ağırlığı (mg) açısından korelasyon grafikleri	52
4.5. Elektroforez görüntüleri	57

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
3.1. Filtre kağıtlarının ve naylon uçlu swab çubuğunun ağırlıkları hassas terazi (Prescisia model, İsviçre) ölçülmüştür.	42
3.2. Whatman filtre kağıdının yara üzerine yerleştirilmesi ve yara üzerinde bekletildikten sonra satüre olmuş hali. (Satüre olana kadar ya da en fazla 10 dakika bekletilmiştir.)	43
3.3. PVDF filtre kağıdının yara üzerine yerleştirilmesi ve yara üzerinde bekletildikten sonra satüre olmuş hali. (Satüre olana kadar ya da en fazla 10 dakika bekletilmiştir.)	43
3.4. Naylon uçlu swab çubuğu, 5 saniye boyunca 1 cm ² alanda rotasyonel olarak çevrilmiştir.	44
3.5. Örnekler PBS içeren tüplerde 5 dakika hafifçe manuel olarak sallanır. Sonra tüplerin içerisindeki filtre kağıtları ve swab çubuğu çıkartılır. Ardından tüpler, +4°C'de 3000 devirde 15 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonundaki süpernatant bölümlere ayrılır.	45
5.1. PVDF filtre kağıdı kaldırıldıktan sonra yara yüzeyine yapışmış olan parçalar ve salin solüsyonu ile yara temizlendikten sonraki hali	64

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Rejenerasyon ve yara iyileşmesinde yer alan büyüme faktörleri	12
2.2. Akut ve kronik yaralar arasındaki farklar	19
2.3. Yara sıvısı örneği toplama metodları ve örnek çalışmalar	25
2.4. Yara sıvısında araştırılan bazı parametreler	38
4.1. Hastaların tanımlayıcı özellikleri ve kan tabloları	47
4.2. Hastaların etyolojilerine ait sayısal bilgiler	48
4.3. Yöntemlerin yara üzerinde bekletilme süreleri	48
4.4. Her bir testin topladığı yara sıvısı ağırlık ortalamaları ve bu parametreye göre yapılan korelasyon analizi sonuçları	50
4.5. Her bir testin elde ettiği total protein değeri (g/dL) ilgili testin yara sıvısı ağırlığına (g) bölünerek elde edilen ortalama oranlar (g/dL/g) ve bu parametreye göre yapılan korelasyon analizi sonuçları.	52
4.6. Her bir testin elde ettiği albumin değeri (g/dL) ilgili testin yara sıvısı ağırlığına (g) bölünerek elde edilen ortalama oranlar (g/dL/g yara sıvısı) ve bu parametreye göre yapılan korelasyon analizi sonuçları.	53
4.7. İkişer defa uygulanan yöntemlerin, her uygulaması ayrı örnek olarak değerlendirildi. Buna göre, araştırılan parametreler için ortalama sonuçlar hesaplandı.	54
4.8. Serum ve yara sıvısındaki biyokimyasal parametrelerin korelasyon analizi.	55
4.9. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile yara sıvısı ağırlığına (mg) göre yöntemlerin her hasta için ayrı ayrı karşılaştırması	55
4.10. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile testlerin yara sıvısı ağırlığı için ikili karşılaştırması	56
4.11. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile total protein oranlarına (g/dL/g) göre yöntemlerin her hasta için ayrı ayrı karşılaştırması	56
4.12. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile testlerin total protein oranı (g/dL/g) için ikili karşılaştırması	57

1. GİRİŞ

Yara, herhangi bir etkenin epidermis, dermis veya daha derin dokularda hasar oluşturması nedeniyle vücudun anatomik ve fizyolojik bütünlüğünün bozulmasıdır (1). Yara iyileşmesi süreci 3 basamaktan oluşur. Bunlar sırasıyla; inflamasyon, proliferasyon ve remodelling basamaklarıdır (2). Bu basamaklardan herhangi birinin uzaması, doğal iyileşme sürecini durdurur ve yaranın kronikleşmesine sebep olur (3). Ne yazık ki, kronik yara gelişimindeki mekanizmalar, kronik yaraların biyokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri tam olarak bilinmemektedir (4). Girişimsel olmayan yöntemlerle elde edilebilen kronik yara sıvısının analizi, yara iyileşmesi ile ilişkili bileşenlerin tanımlanmasına ve tüm bu özelliklerin incelenmesine olanak sağlamaktadır (4,5).

Yara sıvısı, yara alanındaki protein ve metabolitlerin, dinamik ve heterojen karışımıdır. Ve bu sıvı, inflamatuvar evrenin bir parçası olarak üretilir (6). Bu bağlamda yara mikroçevresini yansıtan yara sıvısının incelemesi, yara iyileşmesinde rol oynayan ekstrasellüler sinyallerin (sitokinler, kemokinler, H₂O₂,...) paternlerini göstermede kritik öneme sahiptir (4). Ayrıca yara sıvısının, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin tanımlanması, yaranın iyileşme durumu hakkında bilgi sağlayabilir (7). Yara sıvısının kolayca elde edilebilmesiyle kişiye özel değerlendirmeler yapılabilir. Bu değerlendirmeler ışığında, yeni moleküler tekniklerle mikroçevrenin değerlendirilmesi, daha etkin tedavi protokollerinin ve yeni tedavilerin gelişimine katkıda bulunabilir (8). Ne yazık ki, altın standart bir yara sıvısı elde etme yöntemi henüz tanımlanmamıştır (9). Birçok farklı yöntem kullanılmakta, standardizasyon eksikliği de çalışma sonuçlarının beraber değerlendirilmesini güçleştirmektedir.

İdeal yara sıvısı elde etme ve analiz yöntemi için önerilen kriterler şöyle sıralanabilir;

- ✓ Yeterli hacimde sıvı toplayabilmeli,
- ✓ Öncesinde yapılan temizlikte hedef moleküller yıkılmamalı,
- ✓ Degradasyondan kaçınmak için örnek, uygun şartlarda saklanmalı,

- ✓ Hedef moleküllerin ekstraksiyon sıvısına kolayca salınımına izin verecek bir materyal ile sıvı toplanmalı,
- ✓ Sonuçlar yorumlanmalı,
- ✓ Uygun kontrol kullanımı gerekir (8).

Bu çalışmanın amacı, güncel yara sıvısı elde etme yöntemlerini karşılaştırarak sonraki klinik çalışmalarımızda kullanılacak standart bir yöntemin geliştirilmesidir. Standart bir yara sıvısı toplama yöntemi oluşturulmasıyla yara mikroçevresi kolayca incelenerek, yaranın iyileşme durumu görülüp, kişiye özel tedavilerin seçilmesi, gereksiz tedavi basamakları atlanarak zaman ve para kaybının önlenmesine, tedaviye yanıtın izlenmesine ve kronik yaraların doğası öğrenilerek yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunulması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara Tanımı ve Sınıflandırmaları

Yara, herhangi bir etkenin epidermis, dermis veya daha derin dokularda hasar oluşturması nedeniyle, vücudun anatomik ve fizyolojik bütünlüğünün bozulmasıdır. Etkenine göre; mekanik (travmatik), fiziksel (termal etken, radyasyon) ve kimyasal yara olarak sınıflandırılırlar. Derinliklerine göre ise yüzeysel, tam kat ve kompleks yara olarak sınıflandırılırlar. Ülserler ise genellikle deride lokal beslenme bozukluğu olan, kronikleşme olasılığı yüksek olan yaralardır. Diyabetik ayak ve radyasyona bağlı gelişen ülserler bu gruba örnek verilebilir (1).

2.2. Yara İyileşmesi

Derideki yaraların iyileşmesi, primer ve sekonder iyileşme olarak sınıflandırılır (10).

2.2.1. Primer Yara İyileşmesi

Bu grubun en basit örneği, cerrahi dikişle cerrahi kesi kenarlarının yaklaştırıldığı, enfekte olmayan yara onarımıdır. Kesi yalnızca epitel bazal membranının devamlılığını noktasal şekilde bozmuştur. Dar kesi alanı, önce fibrin kan tıkaçı ile dolar, ardından hızla granülasyon dokusu gelişir. Epitel rejenerasyonu ile kapanır. Skar küçüktür, yara kontraksiyonu minimaldir (10).

2.2.2. Sekonder Yara İyileşmesi

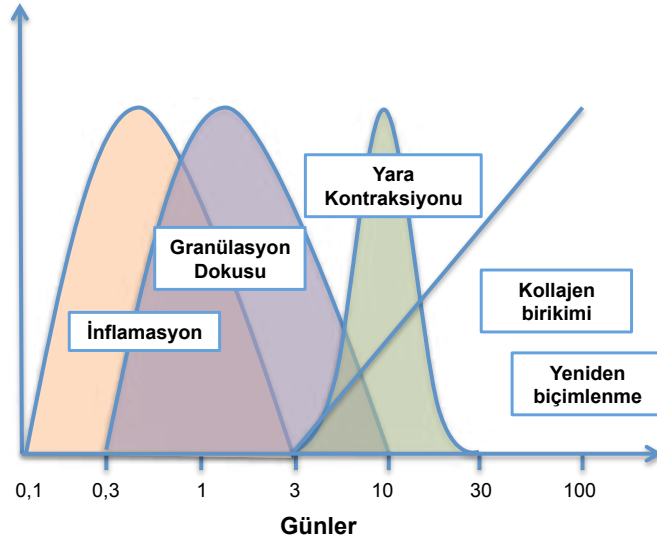
Büyük yaralarda, apse oluşumu ve ülserasyonda, hücre veya dokular büyük ölçüde kaybedildiğinde iyileşme daha karmaşık hale gelir. Sekonder yara iyileşmesinin farkları şunlardır;

- ✓ Yara yüzeyinde fibrin ve fibronektinden zengin daha büyük tıkaç veya kabuk vardır.

- ✓ Büyük doku defektleri nedeniyle oluşan daha büyük nekrotik artık hacminin, eksüdanın ve fibrinin uzaklaştırılması için gelişen iltihap daha yoğundur. İnflamatuvar evre uzamıştır.
- ✓ Daha fazla granülasyon dokusu oluşur. Genellikle daha fazla skar doku kitlesi oluşur.
- ✓ Yara kontraksiyonu görülür (10).

2.3. Yara İyileşmesinin Evreleri

Yara iyileşmesindeki basamaklar birbiri üzerine eklenir ve birbirinden tam olarak ayrılamaz (Şekil 2.1) (10).



Şekil 2.1. Yara iyileşme fazları. Yara kontraksiyonu sadece sekonder yara iyileşmesinde görülür (10).

2.3.1 İnflamatuvar Evre

Bu evre, yara iyileşmesinin ilk basamağıdır. Yaralanma anında başlar ve 24-48 saat içerisinde sonlanır. Hemostaz (vasküler yanıt) ve inflamasyon (hücre sel yanıt) ile karakterizedir (11).

Doku travması, yara yatağında vazokonstrüksiyona yol açacak olan tromboksan-A₂ ve prostoglandin 2- α salınımına neden olur. Bu geçici vazokonstrüksiyon, ilk vasküler yanıttır. Aynı zamanda doku travmasını

takiben, açığa çıkan kollajen nedeniyle, hageman faktörü aktive olur ve pıhtılaşma mekanizması devreye girer. Vazokonstrüksiyon ve pıhtı oluşumu, hemorajinin sınırlandırılmasına yardım edip, hücre göçü için başlangıç ekstrasellüler matriksini (ECM) sağlar (11).

Agrege olan trombosit granüllerinden ortama, kemotaktik ve vazoaaktif medyatörler salınır. Bunlardan bazıları; Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), fibronektin, fibrinojen, histamin, Trombosit Türevi Büyüme Faktörü (PDGF), serotonin ve von Willebrand Faktördür (vWF). Bu faktörler, pıhtı oluşumu boyunca yaranın stabilizasyonuna yardım eder. (11). Kanamayı kontrol etmekte ve yaranın sınırlandırılmasında görev alırlar. Makrofaj ve fibroblastları ortama çekip, aktive ederler. Ayrıca, platelet degranülasyonu, kompleman kaskadını, özellikle potent nötrofilik kemotaktik protein olarak bilinen kompleman 5'i (C5) aktive ederler (12).

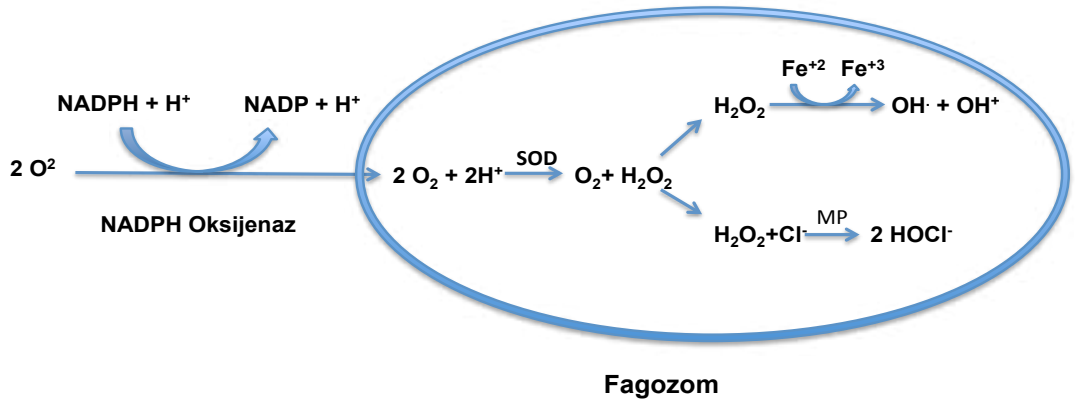
Geçici vazokonstriksiyondan sonra, lokal histamin salınımı ile arteriyal vazodilatasyon oluşur. Yara çevresinde eritem ve ısı artışı olur. Artan kan akımı, transüda niteliğindeki (proteinden fakir kan ultrafiltratı olan) sıvının dokulara geçişine neden olur. Bu arada mikrovasküler yapı daha geçirgen hale gelir, eksüda (proteinden zengin sıvı) ve hücreler interstisyuma çıkar (13).

Postkapiller venüllerdeki hücreler arası açıklıklara yol açan endotelial hücre kontraksiyonu, artmış vasküler geçirgenliğin en sık sebebidir. Geri dönüşümlü bir süreçtir. Genellikle kısa sürelidir (15-30 dakika). Endotel hücresinin daha uzun süren retraksiyonuna, tümör nekroz faktör (TNF) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler neden olur. Bu reaksiyon başlangıç uyarısından sonra 4-6 saatte oluşup, 24 saat ve daha fazla süre devam eder. Artmış vasküler geçirgenliğin diğer nedenleri arasında hücrelerin birbirinden ayrılmasına neden olan endotel hasarı da vardır. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) gibi bazı medyatörlere maruz kaldıktan sonra intrasellüler veziküllerin füzyonu ile oluşan kanallar aracılığıyla gelişen artmış transsitoz da venüler geçirgenliği arttırır (13).

Artmış kan akımı ve vasküler geçirgenlikle, inflamatuvar hücreler olay yerine gelirler. Nötrofiller, ilk gelen hücrelerdir; ilk 6 saat içinde yarada

görülürler. Daha sonra lenfositler, inflamasyon bölgesindeki baskın hücre haline gelirler. Lenfosit ve nötrofillerden sonra bölgeye gelen diğer hücreler ise makrofajlardır (13). Makrofajlar, yara iyileşmesinde kilit rol oynarlar. Bakteri ve yabancı madde fagositozu görevinin yanısıra birçok enzim ve sitokin salgırlarlar (14).

Ödem gelişiminin sebebi ekstravasküler alandaki bu birikimdir. Bu, eritrositlerin daha konsantre olmasına, kan viskozitesinde artışa ve dolaşım yavaşlamasına (staz) sebep olur. Staz gelişimiyle beraber lökositler (başlıca nötrofiller), vasküler endotelial yüzey boyunca birikmeye başlar ve bu sürece marjinyasyon denir. Lökositler sırasıyla; marjinyasyon, yuvarlanma, adezyon, transmigrasyon ve kemotaksis basamaklarını gerçekleştirerek olay bölgesine toplanırlar. Daha sonra lökositler, fagositik vakuol oluşturarak fagositoza başlar. Mikroorganizmaları öldüren en önemli maddeler; lizozomal enzimler ve reaktif oksijen türleridir (ROS). Fagositoz, oksijen tüketiminde ani artış, glikojen katabolizması, glikoz oksidasyonunda artış ve reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi ile karakterize olan oksidatif patlamayı uyarır. NADPH, NADPH oksidaz ile oksidasyona girer ve oksijeni süperoksit iyonuna ($O_2\cdot^-$) dönüştürür. Sonra $O_2\cdot^-$, spontan dismutasyon ile hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşür. Süperoksit dismutaz (SOD), bu reaksiyonu hızlandırır. Bu reaktif oksijen türleri mikroorganizmaları öldürür. H_2O_2 , myeloperoksidaz ile klor (Cl^-) varlığında hipoklor radikaline ($HOCl\cdot$) dönüşür (Şekil 2.2). $HOCl\cdot$, çok kuvvetli bir oksidan ve antimikrobiyaldir (13).



Şekil 2.2. Fagozom içinde oksidanların üretimi. MP, myeloperoksidaz (15).

İnflamatuvar hücrelerin ürettiği oksidanların, yara iyileşmesinde ikili rolü vardır. Enfeksiyona direncin sağlanmasının yanı sıra iyileşme sürecinin başlatılması ve devam ettirilmesinde de önemli rol oynarlar. Örneğin oksidanlar, özellikle H_2O_2 , VEGF ekspresyonunu arttırarak, neovaskülarizasyon ve kollajen birikimini in vivo ve in vitro olarak arttırmaktadır (16). Enfekte olmayan yaralarda uzun süreli düşük seviyede H_2O_2 bulunabilir ve bu mikromolar H_2O_2 düzeyleri hem inflamatuvar hem de proliferatif yara iyileşmesi fazlarında tespit edilebilirler (17). Ayrıca, NADPH oksidazlar, fagositik olmayan hücrelerde de bulunurlar (18).

Fagozom içi oksidan üretimi, oksijenin O_2 dönüşümüne bağlıdır; bu nedenle bu işlemler için dokunun kısmi oksijen basıncı önemlidir. Oksijeni substrat olarak kullanan NADPH oksidazın, K_m 'i (reaksiyonun maksimum hızının yarı hızında gerçekleşebilmesi için gereken konsantrasyon) 40 ile 80 mmHg arasındadır. Bu, enfeksiyonlara direncin, yaradaki hipoksi nedeniyle azaldığını göstermektedir (19).

Yara çevresi hipoksik ve asidotiktir (20,21). Aktif inflamatuvar hücreler, yüksek oranda oksijen kullanmaktadırlar ve bu mikrosirkülasyonda bozulma ile birleşince hipoksi ile sonuçlanır. Bu durum özellikle yaranın merkezi için geçerlidir; burası inflamatuvar hücrelerin en yoğun bulunduğu bölgedir. Aslında, dermal yaralardaki kısmi oksijen basıncı heterojendir; yara merkezinden (ölü boşluk) artere komşu kısma kadar 0 ile 10 mmHg arasında değişir (22). Yara merkezindeki bu hipoksi, kötü yara iyileşmesi ve enfeksiyona yatkınlığa neden olurken aynı zamanda tamir için de bir uyarandır (23–26).

Yara çevresinin hipoksik ve asidotik olmasının yanısıra, laktat seviyesi de artmıştır (20,21). Bu, azalmış oksijen desteği ve inflamatuvar hücrelerle oluşan, aerobik ve anaerobik glikoliz sonucu artan metabolizmaya bağlıdır (27,28). Örneğin lökositler, birkaç mitokondri içerirler ve yeterli oksijen varlığında bile çoğunlukla laktat üreterek glukozdan enerji oluştururlar (28). Yara çevresindeki laktat, kollajen sekresyonu ve neovaskülarizasyon için kuvvetli bir uyarandır (28–30).

Çözünebilen bir oksijen radikali olan nitrik oksit (NO); L-arjinin, moleküler oksijen (O₂) ve NADPH'dan NO sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenir. NOS'un 3 izoformu vardır. Yapısal olan iki formu endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS); indüklenebilir formu ise iNOS'dur (31). iNOS, sitokinler, bakteriler, bakteriyel ürünler ve hipoksiye cevap olarak yara iyileşmesinin erken fazlarında sentezlenir (32). iNOS ekspresyonu yara oluşumu ile, özellikle de platelet degranülasyonu ile uyarılır. Yaralanmadan yaklaşık 48 saat sonra pik yapar. NOS'lar kofaktör olarak NADPH, O₂, tetrahydrobiopterin, flavin mononükleotid (FMN) ve Flavin adenin dinükleotid (FAD) gerektirirler (31). NO'nun yara iyileşmesindeki görevlerine bakacak olursak, öncelikle reaktif nitrojen türleri (RNS) oluşturmak üzere, oksijen ile reaksiyona girer (33). Bu antimikrobiyal aktivitenin yanısıra, vazodilatasyon, antiplatelet-agregasyonu, artmış vasküler geçirgenlik, NO'nun inflamatuvar fazdaki primer etkileridir (30). VEGF, PDGF ve EGF gibi bazı büyüme faktörlerinin aktivasyonu için de optimal NO aktivitesi gerekmektedir (34). NO'nun ayrıca; anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumu, epidermal migrasyon, kollajen depozisyonu ve mikrovasküler homeostazda da düzenlenleyici görevleri vardır (34–39).

ROS ve RNS ile öldürülen mikroorganizmalar, daha sonra lizozomal asit hidrolazlarca parçalanırlar. Lizozomal enzimlerden olan asit proteazlar, sadece fagolizozom içinde aktifken; elastaz, kollajenaz ve katepsin gibi enzimleri de içeren nötral proteazlar ECM'de aktiftir. Bunlar elastin, kollajen, bazal membran ve diğer matris proteinlerini parçalayarak doku yıkımı oluştururlar. Nötral proteazlar, ayrıca C3a ve C5a'yı oluşturmak üzere C3 ve C5 proteinlerini ayırabilir ve kininojenden bradikinin benzeri peptidleri meydana getirebilirler. Lizozomal enzimlerin bu yıkıcı etkileri, serumda ve doku sıvılarında bulunan antiproteazlarca (α 1-antitripsin vb.) kontrol edilir. Ayrıca, lökosit granüllerinin içerdiği bakterisidal geçirgenlik artırıcı protein, lizozim, major bazik protein ve defensinler de mikroorganizmaları öldürebilirler (13).

2.3.2 Proliferatif Evre (Fibroblastik Evre)

Proliferatif evrede; granülasyon dokusu gelişimi, yeni damarların oluşumu, hücre proliferasyonu ve kontraksiyon görülür. Bu evre, 4. gün civarında başlayıp yaranın türüne, derinliğine ve ortam şartlarına bağlı olarak 14. günde tamamlanabilir ya da haftalar boyunca devam edebilir. Bu evredeki baskın hücreler ise fibroblastlardır (1). Proliferasyon evresini iki alt başlıkta inceleyebiliriz; yeni damar oluşumu ve proliferasyon.

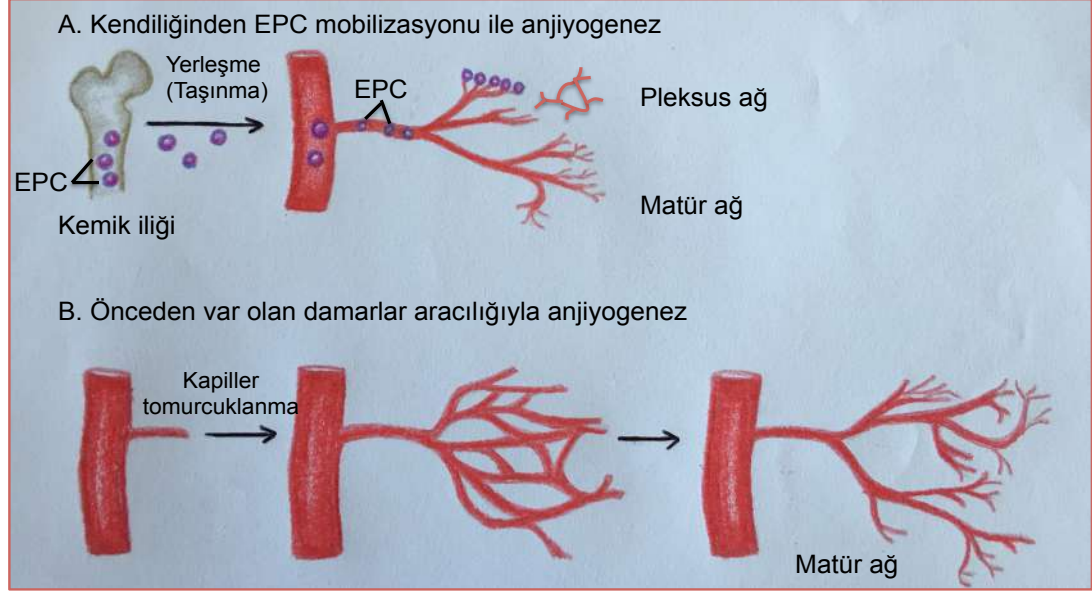
Yeni Damar Oluşumu

Kan damarları iki mekanizma ile oluşur; vaskülogenez ve anjiyogenez/neovaskülarizasyon. Vaskülogenez; embriyonik dönemde anjiyoblastlardan, erişkin dönemdeyse kemik iliğinden göç eden endotelial öncül hücrelerden farklılaşarak, damarlanma olmayan bir bölgede, yeni damar ağı oluşumudur. Anjiyogenez veya neovaskülarizasyon ise, mevcut damarların kapiller tomurcuklanmalarıyla yeni damar oluşumudur (Şekil 2.3) (10). Granülasyon dokusundaki yeni damar oluşumu için temel mekanizma, anjiyogenez olarak bilinmektedir. Ancak son zamanlardaki çalışmalarda, yeni kan damarlarının %15-20'sinin hematopoetik kök hücrelerden geliştiği gösterilmiştir. Anjiyogenez ve vaskülogenez benzer uyaranlara yanıt olarak oluşur; hipoksi, redoks stresi ve laktat konsantrasyonu. Anjiyogenik ajanlara olan kapiller endotelial cevaplar, oksijen gerektirir (40–42).

Anjiyogenezde, yara çevresindeki en yakın sağlam olgun damarlardan, özellikle postkapiller venüllerden endotelial tomurcuklanma gelişmeye başlar. Normalde bitişik dokudaki oksijen, bu işlemi desteklemek için yeterlidir. Yeni damar büyümesi genişleyerek hasarlı doku alanına girer; burada laktat artmış, kısmi oksijen basıncı azalmıştır. Olgun damarların büyüebilmesi için olgun ECM gereklidir (40).

Vaskülogenezde ise, doku hipoksisi, kemik iliğindeki stromal NOS'u aktive eden VEGF-A'nın salınımını uyarır. Kemik iliğinde artan NO, endotelial öncül hücrelerin dolaşıma salınmalarını sağlar. Doku hipoksisi ile uyarılan, stromal hücrelerden türeyen faktör-1 α 'nın (SDF-1 α) artışıyla, dolaşımdaki kemik iliği kökenli endotelial öncül hücreler, hasarlı dokuya

çekilirler. Hasarlı dokuda çoğalır ve farklılaşırlar; yeni damar tübüllerinin içlerine doğru büyürler (30).



Şekil 2.3. Anjiyogenez (10).

Anjiyogenezde oluşan yeni damarlar zayıftır; çünkü endotel hücreleri arası bileşkeler tam oluşmamıştır ve VEGF, damar geçirgenliğini artırır. Bu zayıflık, granülasyon dokusunun ve akut inflamatuvar yanıt rezorbe olduktan sonra iyileşen yaranın, neden uzun süre ödemli olduğunu açıklar (10).

Anjiyogenez üç büyüme faktör dalgasına cevap olarak uyarılır. İlk büyüme faktör dalgası; inflamatuvar fazda salınan PDGF, TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve diğerleri ile gelir. İkinci büyüme faktör dalgası; fibroblast büyüme faktörü (FGF) ile gelir. Üçüncü ve baskın dalga ise fibrinopeptidler, hipoksi, laktat varlığında uyarılan makrofajlar tarafından salınan VEGF ile gelir (43). Genel olarak bakıldığında anjiyogenez uyarıcı en önemli faktörler; VEGF ve bazik FGF'dir (FGF-2). Oluşan yeni damarlar, perisit ve düz kas hücrelerince bağ dokusu depolanması ile birlikte stabilize edilmelidirler. Anjiyopoetin 1 ve 2, PDGF ile TGF- β stabilizasyona katılırlar (10).

Fibroblast Proliferasyonu ve ECM Depolanması

Yaradaki inflamasyon hücrelerinin sayısı zamanla azalır. Nötrofil, makrofajlar, fibroblastlar, endotel ve epitel hücreleri tarafından salgılanan proteaz enzimleri (nötrofil elastaz, nötrofil kollajenaz, matriks metalloproteinaz (MMP), makrofaj metalloelastaz, vb.) hasarlı proteinleri uzaklaştırırlar (1).

Fibroblastlar yara kenarındaki sağlam dokudan yara merkezine, inflamasyon evresinde oluşmuş olan, pıhtıya doğru hareketlenir ve böylece hücre proliferasyonu başlar (1). Bu hücre proliferasyonu; nötrofiller, makrofajlar, aktive endotel tarafından salınan sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından regüle edilir. Fibroblastların uyarılması ve yönlendirilmesinde rol alan bazı büyüme faktörleri; PDGF, FGF-2, TGF β 'dir. Aynı büyüme faktörlerinin birçoğu fibroblast proliferasyonunu ve aynı zamanda ECM yapımını da düzenlerler. TGF β , PDGF ve FGF'yi de içeren birçok büyüme faktörü, ECM depolanması ve skar oluşumunda rol alırlar (Tablo 2.1) (10).

Yara çevresindeki sağlam dokudan, yara merkezine gelerek çoğalan fibroblastlar, ECM yapım ve yıkımında düzenleyici olarak önemli rol oynarlar (1,44). İyileşme ilerledikçe, myofibroblastlara dönüşürler. Miyofibroblastlar, fenotipik olarak fibroblast ile düz kas hücresi arasında bir hücre formudur. Miyofibroblastlar, yara boyutunu küçültmek için önemli olan kasılabilme özelliğine sahiptir; ancak miyofibroblastların aşırı aktivitesi, skar oluşumu ve fibrozisle sonuçlanabilir (44). Ayrıca ECM için gereken proteinleri (kollajen tip 1-6 ve tip18, glikoproteinler, proteoglikanlar) salgılayabilen hücrelerdir. Bunların yanı sıra; matriksin diğer molekülleri olan laminin, tomboşpondin, glikozaminoglikanlar, hyalürik asit, heparan sülfat ve beraberinde MMP, doku MMP inhibitör (TIMP) gibi matriks modifikasyonunda gerekli olan proteinleri de salgırlar (45).

ECM, hücre adezyonu için maddeler içermesi ve büyüme faktörleri deposu olması nedeniyle, hücrelerin farklılaşmaları, hareket ve çoğalmalarına uygun, içinde yaşayabilecekleri ortamı sağlar. ECM'nin üç temel bileşeni vardır; gerilme ve kasılma gücünü sağlayan kollajen, elastin gibi fibröz yapısal proteinler, kayganlığı ve esnekliği sağlayan proteoglikanlar

ile hyalüronan gibi sulu hidrate jeller ve matriks elementlerini birbirlerine ve hücrelere bağlayan adhezif glikoproteinlerdir (10).

Tablo 2.1. Rejenerasyon ve yara iyileşmesinde yer alan büyüme faktörleri (10). HGF, Hepatosit Büyüme Faktör; KGF, Keratinosit Büyüme Faktör; HA, hyalüronik asit; MMP, matriks metalloproteinaz; PMN, polimorf nüveli hücre.

Büyüme Faktörleri	Kaynak	Fonksiyonlar
EGF	Aktive makrofaj, tükrük bezleri, keratinositler ve birçok diğer hücre	Keratinositler ve fibroblastlar için mitojenik; keratinosit göçünü ve granülasyon dokusu oluşumunu uyarır
TGFα	Aktive makrofaj, T lenfosit, keratinositler ve birçok diğer hücre	EGF'ye benzer; hepatosit ve çoğu epitel hücrelerinin replikasyonunu uyarır.
HGF	Mezenkimal hücreler	Epitelyal, endotel hücreleri ve hepatositlerin proliferasyonu ile hücre motilitesini artırır
VEGF (A,B,C,D izoformlar)	Mezenkimal hücreler	Damar geçirgenliğini artırır; endotel hücreleri için mitojen
PDGF (A,B,C,D izoformları)	Trombositler, makrofajlar, endotel hücreleri, keratinositler, düz kas hücreleri	PMN, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaktik; PMN, makrofajlar ve fibroblastların aktivasyonu; fibroblastlar, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri için mitojenik; MMP, fibronektin ve HA yapımını uyarır; anjiyogenezi, yara model oluşumunu uyarır; integrin ekspresyonunu düzenler

Tablo 2.1. (Devam) Rejenerasyon ve yara iyileşmesinde yer alan büyüme faktörleri (10). TIMP, doku matriks metalloproteinaz inhibitörü.

FGF-1 (asidik), FGF-2(bazik) ve ailesi	Makrofajlar, mast hücreleri, T lenfositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, çeşitli dokular	Fibroblastlar için kemotaktik; fibroblast ve keratinositler için mitojenik; keratinosit migrasyonu, anjiyogenez, yara kontraksiyonu ve matriks depolanmasını uyarır
TGFβ (1,2,3 izoformları)	Plateletler, T lenfositler, makrofajlar, endotel hücreleri, keratinositler, düz kas hücreleri, fibroblastlar	PMN, makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaktik; TIMP sentezini, anjiyogenezi, fibroplaziyi uyarır; MMP yapımını ve keratinosit proliferasyonunu inhibe eder; integrin ekspresyonunu ve diğer sitokinleri düzenler
KGF (FGF-7)	Fibroblastlar	Keratinosit göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır

Fibroblastlar; yara iyileşmesinin erken döneminde (3-6 gün içinde), yara merkezindeki yüksek laktat düzeyi, hipoksi ve büyüme faktörlerinin uyarılmasıyla, kollajen transkripsiyonu ve sentezine başlarlar (1,10). Kollajenin modifiye edilmesi, polimerizasyonu, çapraz bağlanması ve ekstrasellüler mesafeye sekresyonu ile devam eder (1). Kollajen sentezinde, lizil hidroksilaz ve prolil hidroksilazlarca gerçekleştirilen posttranslasyonel modifikasyon, kollajen peptidlerin üçlü helikslere dönüşmesi için gereklidir. Bu helikal konfigürasyon, dokunun kuvvetinden primer sorumludur. Bu basamakta görevli hidroksilazların aktivitesi, C vitamini ve doku oksijenine (O_2 Km 25 mmHg) bağlıdır. Bu nedenle yara kuvveti, yara hipoksisine oldukça duyarlıdır (46–49).

Neovaskülarizasyon ve ECM üretimi birbiri ile bağlantılıdır. Fibroblastlar alana oksijen getiren olgun kan damarları olmadan olgun kollajen üretemezken, yeni damarlar da kuvvetli kollajen matriks olmadan olgunlaşamazlar (50).

Laktatın Rolü

Hipoksi, neovaskülarizasyon için tek uyarıcı değildir (51,52). Enerji depleksiyonu ve azalmış redoks potansiyeli, neovaskülarizasyon için dikkati daha çok çekmektedir. Adenozin difosforiboz ribozilasyon (ADPR-ribozilasyon), düşük redoks potansiyelini hissedip; kollajen formasyonu, anjiyogenez, sitozoldeki ve çekirdekdeki proteinlerin uyarılması gibi biyolojik hareketlere dönüştürebilen bir mekanizmadır. Bu mekanizma, metabolik durum ve gen regülasyonu arasında bağ kurar (28,40,53,54). Laktat seviyeleri artınca, NAD/NADH oranı NADH lehine değişir ve ribozillenen ADPR tarafından oluşturulan inhibisyon bozulur; olgun kollajen üretimi ve VEGF aktivitesi artar (55,56).

Laktat, aynı zamanda hipoksiyle indüklenebilir faktör 1α (HIF1 α) ile neovaskülarizasyonu kontrol edebilir (56). HIF1 α , hipoksi modelinde tanımlanmıştır. Fakat yeni çalışmalar daha çok redoks stresine yanıt vermekte olduğunu önermektedirler (17,40,57). HIF1 α fonksiyonu, prolin hidrosilaz ile düzenlenir. Normalde enzim, HIF1 α 'yı hidrosiller ve bu da yıkıma neden olur; sonuçta neovaskülarizasyon önlenir. Ama hipoksi, hidrosilasyon hızını azaltır, HIF1 α aktivitesini artırır ve bunun sonucunda neovaskülarizasyon yolları aktive olur (29). Hipoksi, HIF1 α regülasyonu için gerekli değildir. Laktat, oksijen varlığında bile HIF1 α 'yı stabilize eder; çünkü laktat ve piruvat HIF prolin hidrosilazlara bağlanır ve inhibe eder (58,59).

Nötrofil ve makrofajlar, aerobik olarak yarada laktat oluşturabilirler. Yani birikim hipoksiye bağımlı değildir. Laktat seviyesi 5 mmol'den 15 mmol'e çıkınca, neovaskülarizasyon ve matriks depozisyonunu başlatır. Oksijen ile katkı olur. Bu nedenle laktat seviyelerinde az da olsa bir artış (akut inflamasyon fazında), uzamış hipoksi gelişiminden önce kan damarı

büyümesini uyarabilir. Gerçekte, oksijen varlığındaki laktat, neovaskülarizasyon için hipoksiden daha büyük bir uyarandır (28).

Özet olarak; biriken laktat, suprafizyolojik ya da normal oksijen doku konsantrasyonunda bile, neovaskülarizasyonu ve bağ doku sentezini başlatabilir. Bu işlem HIF1 α stabilizasyonunu ve ADPR inaktivasyonunu içerir (30).

Granülasyon Dokusu

Yeni damarların oluşmasıyla birlikte granülasyon dokusu oluşumu da başlamıştır. Granülasyon dokusu, daha sonra epitelizasyonla kapatılacak olan yara yatağını oluşturur (1). Düşük laktat seviyeleri yetersiz granülasyona neden olur. Genellikle aşırı inflamasyon yada enfeksiyonla ilişkili olabilen aşırı yüksek laktat seviyeleri (15 mmHg) ise granülasyon dokusu oluşumunu ertelerler (60).

Granülasyon dokusunun oluşumunda, fibroblastlar ile pıhtı arasında yakın bir ilişki vardır. Makrofajların yıktığı pıhtıdan açığa çıkan aminoasitler yapımda kullanılırken, pıhtıdaki fibrin ise kollajenin yerleşebileceği zemin görevini görür. Ayrıca zamanı geldiğinde, fibrin plazmin ile yıkılır ve buna fibrinolizis denir (1).

2.3.3 Maturasyon Evresi (Remodelling Evresi) ve Epitelizasyon

Bu evrede ECM moleküllerinin üretiminin yanısıra, proteaz enzimleri aracılığıyla yıkımı ve böylece matriksin yeniden yapılanması gerçekleşir (1). Bu faz granülasyon dokusunun remodellingi ile karakterizedir ve yara gerim kuvvetinin oluşumunu da içerir (30).

Fibroblastlar, yeni streslere karşı yarayı şekillendirmeye yardım etmek için matriks boyunca hareket ederler. MMP'ler ve diğer proteinazlar, matriks remodelizasyonuna ve fibroblast göçüne yardım ederler (10,30,61). Aktivitesi için çinko iyonuna bağlı MMP ailesi ile, kollajen ve diğer ECM bileşenlerinin parçalanması sağlanır. Nötrofil elastaz, katepsin G, plazmin ve diğer serin proteazlar, MMP'lerden ayrı olarak ECM'yi parçalarlar ve metalloenzim değildirler. MMP'ler, fibriller kollajeni parçalayan jelatinazları (MMP-2 ve -9)

ve proteoglikanlar, laminin, fibronektin ve amorf kollajeni içeren çeşitli ECM komponentlerini parçalayan stromelizinleri (MMP-3, -10 ve -11) kapsar. MMP'ler çeşitli hücre tipleri tarafından (fibroblastlar, makrofajlar, nötrofiller, sinoviyal hücreler ve bazı epitel hücreleri) yapılır. Yapım ve salgılanması bazı büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer ajanlar tarafından düzenlenir. PDGF, EGF, IL-1, TNF ile yapımı uyarılırken, TGF β ile yapımı inhibe edilir ve farmakolojik olarak steroidlerle baskılanabilir. TIMP'ler ile aktive kollajenazlar hızla inhibe olur. MMP'lerle ilişkili büyük bir enzim ailesi de ADAM (bir disintegrin ve metalloproteinaz) olarak adlandırılır. ECM birikimi fibrojenik ajanlarla, onları sindiren MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengeye bağlıdır (10).

Granülasyon dokusu daha organize olur (1). Epitelizasyon fazında, yara yatağı üzerine epitel hücre migrasyonu ile başlar. Bu hücre migrasyonu; yaşayan keratinositler, kıl folikülleri, sebese bezler, yaşayan epidermis adacıkları yada normal yara kenarından başlayabilir. Epitelizasyon da, büyüme faktörleri ve oksijen bağımlıdır (30). Keratinositlerin proliferasyon ve migrasyonu KGF tarafından uyarılır (10). Keratinositlerin differansiasyonunda ise EGF'nin rolü vardır. Remodelizasyon ve epitelizasyonun tamamlanması ile skar dokusu oluşur (1).

2.2. Kronik Yara

Kronik alt ekstremitte yaraları, tüm dünyada önemli bir sağlık problemidir (62). Çalışmalarda, kronik bacak ülseri olan hastalarda iyileşme süresinin yaklaşık 13 ay olduğu ve %24'ünün hastane yatışı gerektirdiği bildirilmiştir (6,63). İngiltere'de yıllık toplam sağlık harcamalarının %3'ünün (2.3-3.1 milyar İngiliz sterlini) kronik yaraların tedavi ve bakımına harcandığı bildirilmiştir (64). Amerika'da kronik yaraların yaklaşık %50-70'ini oluşturan, venöz ülserler için yıllık maliyet 14.9 milyar dolar, diyabetik ayak ülserleri için 9-13 milyar dolar arasındadır (65-67). Amerika'da 2006 yılında basınç ülseri nedeniyle hastaneye yatış yapılan hastaların hastane harcamaları ise 11 milyon dolar olarak hesaplanmıştır (68). Ne yazık ki, kronik yaralar tüm

dünyada sağlık sistemi üzerinde oldukça büyük bir ekonomik yük oluşturmaktadır (8,66–68).

Ciddi maliyetinin yanı sıra, kişinin sosyal hayatı ve yaşam kalitesi üzerine de önemli etkileri mevcuttur. Kronik yaraların iyileşmesi aylar hatta yıllar alabildiği için hastaların bu süreçte yaşadığı duygusal ve fiziksel stres, mobilitede azalma ve üretim gücünde azalma da önem kazanmaktadır (62). Ülseri olan bir kişinin depresyona, malnutrisyona ve fonksiyonel hastalıklara olan yatkınlığı daha fazladır (69).

2.2.1 Tanım

Uygun tedavi yaklaşımı ile 4-6 haftada iyileşemeyen yaralar, kronik yara olarak tanımlanır (1). Alt ekstremitte ülserleri multifaktöryeldir. Arteriyal yada venöz vasküler yetmezlik, diyabet, enfeksiyonlar ve travma bilinen ana sebeplerdir (6).

2.2.2 Epidemiyoloji

Kronik kompleks yaralar tüm dünyada tahminen 34,5 milyon insanın hayatını etkilemektedir (70). Kronik bacak ülseri prevalansı %1.9-%13.1 arasında değişmektedir (71). Avusturalya'da kronik bacak ülserlerinin 60 yaş üzeri nüfusun %1-2'sinde görüldüğü ve yaşla beraber arttığı bildirilmiştir (72). Sadece Avusturalya'daki 65 yaş üzeri nüfusun, 2036 yılında toplam nüfusun %24'üne ulaşması beklentisini göz önüne alındığımızda; bu problemin, gelecekte sağlık sisteminde daha büyük bir yer kaplayacağı aşıkardır (73).

2.2.3 Sınıflandırma

Kronik alt ekstremitte yaraları temel olarak 4 ana grupta sınıflandırılır; diyabetik, venöz yetmezlik, arteriyal yetmezlik ve basınç ülserleridir. Alt ekstremitte ülserlerinin %50-70'i venöz yetmezlik; %10'u ise periferik arteriyal hastalık nedeniyle gelişmektedir (65,74).

2.2.4 Patofizyoloji

Kronik yaralar; normal yara iyileşmesi sürecinde bir ya da daha fazla noktadaki aksamalardan kaynaklanırlar (75). Genellikle inflamasyon veya proliferasyon basamaklarında, bazen de epitelizasyon basamağında takılmıştır (1). Sitokinler, büyüme faktörleri, proteazlar ve ECM bileşenlerindeki hafif değişiklikler, kronik yara oluşumuna yol açabilir. Ayrıca, serbest radikallerce oluşan oksidatif hasar, enfeksiyon, iskemi, diyabet gibi nöropatiler, nekrotik doku birikimi olan venöz staz gibi lokal ve sistemik faktörler de iyileşmeyen yaraların altta yatan sebepleri olarak sayılabilirler (76).

Birçok çalışmada akut ve kronik yara çevreleri arasındaki farklar incelenmiştir (77–79). Kronik yarada, proteazların seviyesi yükselmiş ve proteaz inhibitörlerinin seviyeleri azalmıştır. Doku sentez ve yıkımı arasındaki denge bozulmuştur (80). Sitokin salınan inflamatuvar hücrelerin, yıkım enzimlerinin ve serbest radikallerin seviyeleri de artmıştır (81,82). Tüm bunların sonucu olarak hücre dışı matriksin, büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin yıkımı hızlanır. Sonuçta, kronik yara sıvısında mevcut olan büyüme faktörlerinin, seviyeleri ve proliferasyonu uyarma yetenekleri azalır (79,83). Kronik yara sıvılarında hücrelerin proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir (83,84). Bu nedenle, iyileşme sürecinin inflamatuvar fazda takılıp kaldığı düşünülmektedir (6).

Kronik yaraların; infiltre olan nötrofiller ve makrofajlardan salınan reaktif oksijen radikallerine bağlı olarak, yüksek oksidizan bir çevresi olduğu düşünülmektedir (85). Bu serbest radikaller, hücre membranları, DNA, ECM proteinlerinde hasara yol açarlar. Ayrıca, proinflamatuvar sitokin ve proteolitik enzim ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açan sinyal yollarını etkilerler (85,86). Redoks dengesindeki bozulma, inflamatuvar fazı şiddetlendirir ve kronik yaraların oluşumuyla sonuçlanır. Bu faktörlerin kombinasyonu, proliferasyonda azalmaya, yetersiz vaskülarizasyona ve iskemiye bağlı olarak nekrotik dokunun birikimine sebep olur. Hücre ölümü sonucunda, yaranın üzerinde bakteriyel kolonizasyonu arttıran fibrinöz bir doku oluşur; bu da inflamatuvar cevabı devam ettirir, tam

iyileşmeyi ve yara kontraksiyonunu engeller (87). Akut ve kronik yara arasındaki farklar tabloda görülmektedir (Tablo 2.2) (88).

Tablo 2.2. Akut ve kronik yaralar arasındaki farklar (88).

Akut Yara	Kronik Yara
Yüksek mitojenik aktivite	Düşük mitojenik aktivite
Normal fibroblastlar	Prematür yaşlanması olan fibroblastlar
Normal MMP(TIMP oranı)	Aşırı MMPIlar
Net ECM depozisyonu	ECM yıkımı
İnflamasyonun kendiliğinden kısıtlanması	KontROLSÜZ inflamasyon
Normal iyileşme süresi	Uzamış iyileşme süresi

Kronik venöz ülser patofizyolojisinde, uzamış venöz hipertansiyon sonucunda alt ekstremitelerde gelişen ödem, metabolitlerin dokulara olan difüzyon mesafesini artırır. Venöz yetmezlikte, dokularda gelişen kronik reperfüzyon hasarı inflamatuvar olayların gelişimi ile sonuçlanır (89).

Arteriyel yetmezlikte ise daha çok büyük damar veya çoklu hastalık durumunda doku ülserlerine yol açan doku iskemisi oluşur. İskemik ekstremitelerde, kan desteğinden yoksun kalır ve bu, doku kaybına, ülserlere ve gangrene yol açar (74).

Diyabet, kronik inflamatuvar durum ve hasar sonrası uzamış inflamatuvar yanıt ile karakterizedir. Ayrıca hiperglisemi, mikrosirkülatuvar ve makrosirkülatuvar disfonksiyon, hipoksi, otonomik nöropati, duyuşal nöropati ve bozulmuş nöropeptid sinyalleri, diyabetik hastalarda normal yara iyileşme sürecini bozan diğer sebeplerdir. (90). Özellikle kötü glisemik kontrolü olanlarda, glikozilasyon sonucu nötrofil ve makrofaj fonksiyonlarında bozulmayla beraber inflamatuvar fazda uzama görülür (91,92). Ayrıca diyabette redoks dengesinde bozulma ve indirgeyici enzimlerde azalma sonucunda, normal iyileşme döngüsünde yer alan hücrelerde DNA hasarı da

görülebilmektedir (93). Bunların yanı sıra, diyabetik yaralarda fibroblastların, azalmış proliferasyon, artmış apoptoz ve azalmış migrasyon yeteneği gösterdiği bulunmuştur (94,95). Keratinositlerin de artmış proliferasyon, azalmış farklılaşma, bozulmuş migrasyon yeteneği gibi anormal özellikleri olduğu bildirilmiştir (95,96). Büyüme faktör ekspresyonunun ve fonksiyonel seviyelerinin de diyabetik yaralarda azalmış olduğu görülmüştür (97,98). Ayrıca, diyabetik hastalarda dolaşımda ve yara alanında kemik iliği kaynaklı endotelial öncül hücrelerin azalmış olduğu bildirilmektedir (99,100). Diyabette, endotelial öncül hücrelerin disfonksiyonu ve kemik iliğinden göçündeki bozukluğun ana sebebinin hiperglisemi ve kronik inflamasyon olduğu düşünülmektedir (101–103). Diğer yandan, periferik nöropatinin ve periferik arteriyel hastalığın eşlik ettiği mikrosirkülasyondaki bozukluklar da diyabetik ayak problemlerine katkıda bulunurlar. Dahası, plantar yüzeyi boyunca bozulmuş yüklenmeye sebep olan birçok anatomik ayak deformitesi de önemli faktörlerdendir. Diyabette, yaralanmadan hemen sonra, ciltteki periferik sinir liflerinden salınan nöropeptidlerin ekspresyonunda da azalma olduğu bildirilmiştir. Diyabetik nöropatide sinir akson-ilişkili vazodilatasyon azalmış yada kaybolmuştur. (104)

Basınç ülserleri ise cilde ve altındaki kas doku üzerine, uzamış basınç uygulaması ve sürtünme kuvveti sonucunda gelişir. Oksijenlenmede azalma, iskemi-reperfüzyon hasarı ve doku nekrozuna kadar ilerler (105).

2.3 Yara Mikroçevresi ve Yara Sıvısı

Yara sıvısı, yara alanındaki proteinlerin ve metabolitlerin, dinamik ve heterojen bir karışımıdır (106,107). İnflamatuvar evrenin bir parçası olarak üretilir ve yara çevresinin önemli bir düzenleyicisi olarak görülür (108,109). Koruyucu, nemli bir çevre sağlar ve iyileşme için gerekli molekülleri barındırır (109). Yara sıvısının biyokimyasal ve fizyolojik bileşiminin tanımlanması, yaranın iyileşme durumu hakkında bilgi sağlayacaktır. Bu nedenle, yaranın kronikliği ile orantılı olabilecek faktörlerin ve tedaviye yanıtın monitorize edilmesi için, yara sıvısının karakterizasyonu kullanılabilir (6). Ayrıca, kan

kökenli belirteçlerin aksine yara sıvısı, çeşitli sistemik süreçlerden daha az etkilenmektedir (110). Tabii yara sıvısının miktarı da önemlidir (111).

Yara sıvısının kompozisyonu, iyileşmenin evresine göre kan akımı ile göç etmiş hücreler, lokal hücreler gibi endojen kaynaklar ve bakteriyal kolonizasyon gibi eksojen kaynaklardan oluşur (9) . Yara iyileşme sürecinin sürekli değişmesi ile yaradaki hücresel popülasyon da değiştiğinden, yara sıvısı zaman geçtikçe farklılıklar gösterebilir. Kalp yetmezliği, hidrasyon, vazokonstriksiyon, diyabet gibi birçok bağımsız faktörden de etkilenir (112). Ayrıca, evaporasyon, yara örtüleri, topikal yara tedavileri de yara sıvısı kompozisyonunu etkiler (9).

Akut ve kronik yaraların sıvılarında önemli farklar mevcuttur. Temel olarak iyileşen dokudaki yara sıvısı, doku büyümesi ve inflamatuvar aktiviteden korunmada yer alan proteinler ile karakterize iken; iyileşmeyen yaralarda primer olarak lökosit proteazlar ve inflamatuvar medyatörleri içeren kronik inflamatuvar bir çevre mevcuttur (113).

Akut yaralarda, inflamatuvar dönemde normal iyileşme sürecinin bir parçası olarak, yara çevresindeki nemi sağlayan eksüda üretilir. Kapillerler dilate ve geçirgen hale geldikçe, yara sıvısı yara alanına doğru ilerler. Bu yara sıvısı; su, elektrolitler, inflamatuvar medyatörler, MMP gibi protein-sindirici enzimler, nötrofiller ve makrofajları içerir (114). Akut yara sıvısı PDGF, FGF ve EGF açısından da zengindir (115).

Kronik yara sıvısı ise, yüksek viskozite ve protein içeriğine (>30 mg/mL) sahip eksüda olarak tanımlanmıştır (116). Eksüda üretimi sürekli ve abartılı olabilir (117). Nemli yara çevresi, yara iyileşmesi için gereklidir; ancak aşırı eksüda varlığı da yara iyileşmesini kötü yönde etkileyen bir faktördür. (78). Liu ve diğ., kronik yaralardaki gidişatın artmış eksüdadan kaynakladığını bildirmişlerdir (118). Kronik yaralar, abartılı ve uzamış inflamatuvar faz ile karakterizedir (6,114). Kronik inflamatuvar yara sıvısında, polimorfonükleer lökositler, nötrofiller, makrofajlar, salgıladıkları proteazlar ve birçok proinflamatuvar sitokin bulunur (77,79,119,120). Akut yaralarda TNF- α ve IL-1 seviyesi birkaç gün sonra pik yapıp sonrasında çok düşük seviyelere dönerken; kronik yara sıvılarında yüksek seviyelerde kalır. Kronik yara

eksüdasında daha düşük düzeyde IL-6, TGF- α ve TGF- β vardır. Kronik yaralarda proteolitik aktivite artmıştır (121). Tüm bunlar; matriksin, büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin yıkımına yol açar. Bunlar, kronik yara sıvısındaki büyüme faktörlerindeki azalma ve yaradaki, fibroblast ve keratinositlerin büyümelerinin uyarılmasındaki bozulmayı açıklar (78,83). Kronik yara sıvısındaki makromoleküllerin, büyüme faktörlerine bağlanabildikleri ve böylece büyüme faktörlerini rejeneratif işlemler için elverişsiz hale getirdikleri bilinmektedir (121,122). İki ayrı çalışmada, kronik yara sıvısının normal cilt hücre kültüründe proliferatif büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (83,123). Ayrıca kronik yara sıvısında glukoz seviyeleri de daha düşüktür (121). Ek olarak, kronik yara eksüdasının akut yaraların aksine, antianjiyogenik özellikte olduğu kanıtlanmıştır (77,80,124,125).

Fizyolojik yara iyileşmesinde süreklilik gösteren bir değişim vardır. Yara dokusu, statik bir dokudan ziyade, geçişler gösteren bir dokudur. Bu da uygun örneklerin elde edilmesinde zorluklara neden olur (112). Ayrıca belirteçlerin seviyelerinde yaranın merkezine ve periferine göre rölatif değişkenlik olabilir. Yara iyileşmesi belirteçlerinin, yara boyunca olan heterojenliği de bilgi verebilir. Tarlton ve diğ., yaranın tamamında örnek elde etmenin, bölgesel varyasyonlar açısından bilgilerin kaybedilmesine yol açabileceğini öne sürmüşlerdir (126).

Birçok yara değerlendirme metodu vardır ve çoğu subjektiftir (127). Yaranın doğru biyokimyasal durumunu gösteren yara mikroçevresi, genellikle gözden kaçırılır. Yaranın mikroçevresini yeni moleküler tekniklerle değerlendirmek, yaranın durumuna göre daha efektif tedavi protokollerinin geliştirilmesini, yeni terapötiklerin keşfedilmesini sağlayacaktır (8). Araştırmalarda sonuçların değerlendirilmesi için genellikle biyopsiler, sürüntü örnekleri, ölü dokuların sert debridmanı ve yara sıvıları kullanılmaktadır. Potansiyel biyobelirteçlerin değerlendirilmesi ve analizlerin kolaylığı düşünüldüğünde, yara sıvısı diğer örneklerle göre daha üstündür (107). Birçok çalışmada da biyobelirteç analizi için kullanılan örnek yara sıvısıdır. Tam kat biyopsiler, gen ekspresyon analizi için uygundur (128,129). Ayrıca yara biyoyükünün değerlendirilmesinde de altın standart yöntemdir; ancak

süperfişyal pamuk swablar daha çok kullanılmaktadır (130–132). Yara yatağının ve fibrinin, küret ile debridmanı, eskar ve sarı ölü dokuların toplanması da yara biyoyükünün analizinde kullanılır (133). Ancak herşey gözönüne alındığında, yara biyoyükünün analizi için ideal bir örnek toplama yöntemi yoktur (8).

2.4 Yara Sıvısı Toplama Yöntemleri

Yara sıvısının toplanması ve analizindeki önemli basamaklar şunlardır; yeterli miktarda sıvı toplayabilmek, hedef moleküller yıkılmadan yarada uygun temizliğin yapılması, örneğin uygun koşullarda saklanması, hedef moleküllerin ekstraksiyon sıvılarına kolayca geçişini sağlayabilen uygun bir materyal ile sıvının toplanması, sonuçların yorumlanması ve uygun kontrollerin kullanılmasıdır (8). İdeal olarak yara sıvısı, invazif olmayan yöntemlerle kolayca toplanmalıdır (112). Seçilen yöntem, basit ve uygun olmalı, protein ekspresyonunda değişiklik yapmamalı ve yara yatağında minimal bozulmaya sebep olmalıdır (134). Yapılacak analize göre uygun tekniğin seçilmesi önemlidir. Günümüzde yeterli miktarda örneğin nasıl elde edileceği ile ilgili bir görüş birliği ve altın standart yöntem yoktur (9,112). Günlük klinik rutinde, hızlı ve güvenilir tanısal prosedür sağlayacak bir teknik geliştirilmelidir (112). Yapılan çalışmalarda yara sıvısı toplama yöntemi olarak üç metodoloji ön plana çıkmaktadır;

1- Negatif basınçlı yara tedavilerinin (NBYT) kanisterlerinden yada yara drenlerinden yara sıvısının elde edilmesi (135–137).

2- Yarı oklüzif yada oklüzif yara örtüsünün altında biriktirilen yara sıvısının aspire edilmesi ile yara sıvısının elde edilmesi (5,138–143).

3- Emici materyaller ile yara sıvısının elde edilmesi (85,119,126,144–150).

Daha az olarak mikrokapiller toplama yöntemi ve mikrodiyaliz de kullanılmaktadır (151–153). Mikrokapiller yöntemi, oldukça zahmetlidir ve büyük hasta grupları için uygun değildir (154). Mikrodiyaliz yönteminde, konsantrasyon gradiyenti boyunca bileşiklerin pasif diffüzyonu mevcuttur (153). Membranların mikrodiyalizi geniş aralıkta proteinlerin toplanması ve

analizine izin verirken, invazif olması ve küçük hacimde örnek elde edilmesi bu prosedürün dezavantajlarıdır (6,155). Ayrıca yabancı bir materyalin yerleştirilmesi yara mikroçevresini etkileyebilir, sinyal moleküllerinin ekspresyonunda karışıklığa neden olabilir (156,157). Ancak bu teknik interstisiyal aralıktaki sıvının örneklenmesi için güzel bir yöntemdir ve genellikle elde edilen örnekler yüksek kalitededir (152,153). Ambrosch ve diğ. tarafından önerilen diğer bir yöntem ise yara alanının 5 ml steril salin ile yıkanıp, iğne aspirasyonu ile tekrar sıvının toplanmasıdır (158). Tablo 2.3'te sık kullanılan yara sıvısı toplama metotları görülmektedir.

İnvazif teknikler de mevcuttur. Subkütan olarak implante edilen bakır mesh silindirler hayvanlarda kullanılmış ve yıllardır altın standart olarak tanımlanmıştır; ancak insanlarda kullanımı uygun değildir (9,91,145,159–161).

Büyük hacimlerdeki yara sıvı örnekleri akut cerrahi drenlerinden yada NBYT rezervuarlarında toplanabilir; ancak dokudan çekilen aşırı sıvı nedeniyle, potansiyel belirteçlerin seyrelme riski vardır (162). Ayrıca, NBYT rezervuarlarından toplanan örneklerin, pasif absorpsiyon ile toplanan örneklerden daha farklı olduğu gösterilmiştir; bu da bu yöntemin gerçek yara fizyolojisini gösterip göstermediği konusunda kuşku uyandırmıştır (8,163,164). Moues ve diğ. çalışmalarında, topikal negatif basınçlı tedavilerin yaranın mikroçevresini etkilediği bildirilmişlerdir (165). Bu yöntemle toplanan örneklerde, artmış protein konsantrasyonu mevcuttur (112). Diğer önemli bir nokta ise, drenaj rezervuarındaki yara sıvısının proteolitik doğası gereği, proteaz inhibitörlerinin kısa süreli yokluğunda bile biyobelirteçlerin önemli bir kısmının yıkılmasıdır (80,166). Ancak toplama rezervuarlarına proteaz inhibitörlerinin eklenmesi başka bir problem yaratmaktadır. Bu yöntemle toplanan yara sıvısının hacmi ve birikme hızı büyük oranda değişkendir; bu nedenle proteaz inhibitörünün etkin konsantrasyonda tutulması oldukça zordur (8).

Tablo 2.3. Yara sıvısı örneği toplama metotları, avantaj-dezavantajları

Yöntem	Avantaj ve Dezavantajları
NBYT kanisterleri/Drenler	Dilüsyon riski vardır. Yara mikroçevresini değiştirir. Uzun bekleme sürecinde proteaz inhibitörü yokluğunda, proteoliz oluşur. Proteaz inhibitörü eklenirse optimal doz ayarlanması zordur. Büyük hacimlerde örnek elde edilebilir. Zaman kaybı olmaz.
Okluzif örtülerin altından aspirasyon	Az eksüdalı yaralarda zorlaşır. Bazı hedef moleküller, kullanılan materyaller ile etkileşime girebilir.
OPSITE Tegaderm Bioclusive-HTM	
Emici Materyaller	Yabancı materyal yerleştirilmesi yara mikroçevresini etkileyebilir. Bağlanma özellikleri çok iyi bilinmemektedir. Ekstraksiyon gerektirir. Ekstraksiyon bazı proteinlerin kaybına yol açabilir. Sature olmayan alanlar kalabilir.
Whatman kağıt filtre Whatman 54 kağıt filtre Whatman GF/D kağıt filtre Cam mikro fiber daireler Schirmer kağıt stripler Polivinil alkol süngerler Poröz poliviniliden filtreler Nitratsız filtre kağıtları Swab Hidrofilik dekstranomer boncuk Nitro sellüloz membran Köpük yara örtüsü Yara örtüsü	
Mikrokapiller	Uygulaması zordur. Büyük hasta gruplarında uygun değildir.
Mikrodiyaliz	İnvaziftir. Küçük hacimde örnek elde edilir. Yabancı materyal yerleştirilmesi yara mikroçevresini etkileyebilir. Geniş aralıkta protein analizi sağlar. Yüksek kalitede örnek elde edilir.

Oklüzif yara örtülerinin altında biriken sıvının aspire edilmesi, en geleneksel yöntemdir(77,138,139,148,167–169). Broadbent ve diğ. derlemelerinde, standardize yara sıvısı toplama yöntemi olarak oklüzif bir yara örtüsü altında biriktirilen sıvının aspirasyonu önerilmişlerdir. Diğer tekniklerin aynı non-selektiviteye sahip olmadığı ve seyreltilmemiş bir örnek elde edilmesini sağlamadığı belirtilmektedir (62). Ayrıca, bu yöntemde ekstraksiyon gerekliliği yoktur. Bu nedenle, bu yöntem yüksek eksüdalı yaralarda oldukça uygundur. En çok buhar-geçirgen poliüretan filmler olan Tegaderm veya OPSITE kullanılmıştır (83,116,138–142). Biriken eksüda, mikropipet, iğneler yada serum toplama tüplerine vakum ile aspire edilir (116,170,171). Bu yöntemler, kullanılan materyal, hasta hazırlığı, yara yatağı hazırlığı ve süre açısından farklı modifikasyonlarla uygulanmaktadır (5,77,138,142,166–168,172–174). Örneğin, sitokin analizi yapılan bir çalışmada yara yatağı hazırlığı için prednizolon içeren kremler kullanılmıştır (175). Başka çalışmalarda ise hasta hazırlığı açısından işlem öncesi 8 saatlik açlık istenmesi yada bacağı aşağı sarkıtırken 1 litre su içirilmesi gibi uygulamalar mevcuttur (116). Ancak bu uygulamalar, günlük klinik rutini için uygun değildir (112). Ayrıca çalışmalarda, eksüda birikimi için bekleme süreleri 30 dakika, 1 saat ile 5 gün arasında değişmektedir (5,116,138,142,143,175). Bu yöntem ile eksüdatif olmayan yaralarda yeterli miktarda sıvı toplayabilmek sıklıkla zordur ve hastanın işlem için daha uzun süre beklemesini gerektirir (8). Gohel ve diğ., bu yöntem ile venöz ülserli hastalarda yara sıvısı örneği elde ederken, ülserlerin sıklıkla kuru olması nedeniyle zorluk yaşadıklarını dile getirmiştir. (142). Az miktarda sıvıyı toplayabilmek için oluşturulan bir çözüm, kısa süreli oklüzyondan sonra, önceden tanımlanmış miktarlarda salin solüsyonu ile yarayı yıkayarak toplanmasıdır (7,176). Buradaki sorun ise belirlenemeyen dilüsyondur (9). Oklüzif yöntemlerin diğer bir dezavantajı, bazı hedef moleküllerle materyalin etkileşime girebilmesidir. Bu açıdan, kininojen gibi moleküller analiz edilirken, örnekleme esnasında, yüzeylerce hidrofilik kontakt aktivasyon göz önünde bulundurulmalıdır (177).

Emici yara örtülerinin toplama materyali olarak kullanılması oldukça popülerdir ve kolaydır; ancak bu gibi materyallerin bağlanma özellikleri çok iyi gösterilemediği için ideal yöntemler değildir. Ayrıca bu yöntemde ekstraksiyon işlemi gerekmektedir. Bunların yanı sıra birçok farklı emici materyal yara sıvısı toplanmasında kullanılmaktadır. Analitik düzey filtre kağıtlarının salınım özellikleri genellikle belirlenmiştir, ancak çalışılan moleküllere en uygun materyalin seçimi için dikkatli bir araştırma gerekmektedir (8). Schmidtchen'in 1999 ve 2000 yılında yaptığı iki ayrı çalışmada cam mikrofiber daire filtre kağıdı (Whatman GF/D filtreleri) kullanılmıştır. Yazar, ilk çalışmasında 4 saat, ikinci çalışmasında 2 saat boyunca cam mikrofiber daire filtre kağıdını yara üzerinde bekletmiştir. Filtre kağıtları, sature olduktan sonra 12 ml olan tüplere alınmış ve ardından ekstraksiyon işlemi için tüplere, 10 ml fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu ekleyip, soğuk bir odada 5 dk boyunca tüpler nazikçe sallanmıştır. Ardından makromoleküler materyallerin çökmesi için 1000g +4°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. Süpernatant, proteolitik aktiviteyi durdurmak için, proteaz inhibitörleriyle desteklenmiştir; 1 ml olan örnekler -20°C'de saklanmıştır (154,177). Whatman GF/D filtre kağıtları, hidrofilik filtrelerdir ve yara sıvısındaki bileşenlerle az etkileşime girerler. Schmidtchen'in 1999 yılındaki çalışmasında, plazmadan türeyen materyaller, bu filtreler ile düşük karışıklık oluşturmuştur. Yazar, Whatman GF/D filtre kağıdını kullandığı yöntemin, major yara sıvısı bileşenlerinin araştırılması için uygun olduğu sonucuna varmıştır (154). Tarlton ve diğ. ise, venöz ülserli hastalardan Whatman 54 kağıt filtreler ile yara sıvısı elde etmişler, yara sıvısı toplamadan önce ve sonra filtre kağıtlarının ağırlıklarını ölçmüşlerdir. Filtre kağıtlarının yara üzerinde ne kadar süre beklettiklerini ise belirtmemişlerdir. Kullanılan filtre kağıtlarını, -20°C'de diğer analizler için saklamış, ekstraksiyon tamponu içeriği ise 20 mM trietanolamin içinde %0.1 Brij 35'dir (BDH, Poole, UK); 50:1 (v:w) oranında eklenmiştir. Çalkalanmış ekstraksiyondan 4 saat sonra, sıvı ayrılır. Ekstraksiyondan sonra hiçbir analitin, filtreler üzerinde kalmadığı bildirilmiştir (126). Benzer olarak Moor ve diğ. çalışmasında da, yara sıvısı Whatman 54 kağıt filtresiyle toplanmış, bu yöntemle 50-200µl örnek elde

edilebileceği ve ortalama total protein konsantrasyonunun ortalama 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olduğu belirtmiştir. Yazarlar, sature olan filtreleri steril tp içerisinde -80°C 'de saklayıp, tüm gece 50:1 (v/W) CAB tamponu, pH 7.5'de (25mM Tris-HCl pH 7.5, 200mMNaCl, 3mM CaCl_2 , ve 0.03% Brij-35) uygulanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmişlerdir. Ekstraktlar, 15 dakika boyunca 10000 devir ve 4°C 'de santrifüje alınmış, sonrasında temiz mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Protein konsantrasyonu tanımlanması işleminde, sığır serum albuminden (BSA) elde edilen standart eğriler ile BCA kit (Pierce, Rockford, IL) kullanılmıştır. Örnekler bölümlere ayrılarak -80°C 'de saklamıştır. Ekstraksiyon işlemlerinde yada saklanma sürecinde proteaz inhibitörleri kullanılmamıştır (119). Moseley ve diğ. de benzer Şekilde, Whatman 54 filtre kağıtlarını yara üzerinde sature olana kadar bekletmiş ve sonrasında protein elüsyonu için 1 ml PBS içerisinde, 4°C 'de 1 saat bekletmiştir. Sonraki analizlere kadar rnekler -20°C 'de saklanmıştır. Yazarlar bu yöntemi seçme sebeplerini; kendi çalışma gruplarının önceki çalışmalarında bu filtre kağıtlarının yara sıvısı komponentlerinin büyük çoğunluğuyla az etkileşime girdiğinin gösterilmesi ve protein elsyonunun $>95\%$ olması nedeniyle olduğunu belirtmiştir. Yazarlar, bu yöntem ile topladıkları kronik yara sıvısı ortalama protein konsantrasyonunun 0.644 ± 0.153 mg/ml (aralık= 0.136-1.445 mg/ml) olduğunu bildirmiştir (85). Diğer bir yöntemde ise Schirmer testi modifiye edilmiştir. Muller ve diğ., emici kağıt stripleri yara yüzeyinde 5 dakika bekleterek yara sıvısını toplamış ve ardından en az 2 saat boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de tampon solüsyonu içerisinde karıştırılarak ekstraksiyonu sağlamıştır (144). Ayrıca, hidrofilik dekstranomer boncukların kullanıldığı ve tanımlanmış protein miktarlarıyla yapılan bir çalışmada, eşit hacimde PBS içerisinde 12 saat süren ekstraksiyon sonucunda, $88-98\%$ oranında kurtarıldığı bildirilmiştir (150). Ancak bu materyalin kemotaktik bir uyaran olarak lökositlere çekildiği ve böylece sitokinlerine ait sonuçların göreceli olarak değiştiği bildirilmiştir (178).

Ekstraksiyon için birçok yöntem kullanılmıştır; emici materyaller çeşitli tampon solüsyonlar içerisinde yada hücre kültür ortamında bekletilmiştir. (125,179–181). Bazen satüre olmayan parçalar kesilmiş ve tampon miktarı,

yara örtüsünün yüzey alanı için, normalize edilmiştir (182). Başka çalışmalarda polivinil alkol süngerler kullanılmış ve oklüzif bir film örtü ile kapatılmıştır (183,184). Bunun içerisine hapsedilen eksüdaya salın içeren 2 mL proteaz inhibitörü eklenerek, ekstrakte edilmesinin ardından santrifüj uygulanmıştır (184). Son olarak, Minematsu ve diğ., yara eksüdasının toplanması için “*wound blotting*” olarak adlandırdıkları bir yöntem kullanmıştır. Bu yöntemde; yara sıvısı temizlendikten sonra, nitrosellülöz membran yara üzerinde 1 dakika bekletilmiştir. Yazarlar bu yöntemin üç avantajı olduğunu belirtmiştir. İlki, çok küçük miktardaki yara sıvısının bile toplanabilmesidir. Tüm örneklerde protein komponentleri elde edilmiştir. Bu membranın immuno-boyanması ile hedef proteinlerin varlığı gösterilmiştir. Ancak TNF ölçümü yapılabilirken, tip 4 kollajen ölçümü yapılamamıştır. Yazarlar bunu hedef proteinin çözünebilir olup olmamasıyla ilişkilendirmiştir; sonuçta bu yöntem ile sadece çözünebilir proteinlerin kantitatif analizinin yapılabileceği sonucuna varılmıştır. Diğer avantajı ise, taze örnek toplama imkanındır. Bu sayede alkalın fosfataz aktivitesi gibi enzim aktivitesi analizi de yapılabilir. Üçüncü avantajı ise, protein dağılım paternini görüntüleme olanağı sağlar. Bu çalışmada, bu membranın immuno-boyanması ile TNF dağılımı gösterilmiştir. Örneğin yara oluşumundan sonraki altıncı günde, beş farede üç farklı TNF dağılım paterni gösterilmiştir; yara kenarı paterni, yara yatağı paterni, negatif patern. Bu paternlerin yara iyileşmesindeki ilerleme ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Yara kenarı paterni olanlarda iyileşmenin geciktiği, yara yatağı paterni olan yaralarda ise hızlandığı görülmüştür. Yazarlar, bu sonuçlar doğrultusunda sitokin dağılım paterninin önemli olabileceğini ancak çalışmalarındaki örnek sayısının kesin bir sonuca varmak için yetersiz olduğunu belirtmiştir (141).

Yeni kullanılmaya başlanan bir diğer teknik ise swablardır. Broszczak ve diğ. çalışmasında, diyabetik ayak ülserlerinden yara sıvısı toplanması için Levine swab tekniği kullanılmıştır. Kullanılan swabların uçları 500µL %20 asetonitril, 25 mM amonyum asetat içeren tüplere koyulmuş ve 15 dakika bekletilmiştir. Ardından ileri analizler için -80°C’de saklanmıştır (148). Başka bir çalışmada, polyester uçlu aplikatörler satüre olana kadar basınç ülseri

üzerinde rotasyonel olarak döndürülür, uçları kırılıp, evaporasyonu önlemek için 150 uL PBS (10 mM, pH 7.4) ile birlikte bir tüpün içerisine yerleştirilir. Soğutucu içerisinde hızla laboratuvara gönderilir. Proteinler deiyonize suda 30 saniye vortekslenerek yıkanır ve santrifüjlenir. Sonrasında örnekler analiz edilir. Protein miktar analizi (Bradford metod) sonrasında örnekler ileri analizler için -80°C'de saklanır (149). Löffler ve diğ. ise, Levine teknik ile swab (Minitip Flocked Swabs; MicroRheologics, Brescia, Italy) kullanarak yara sıvısı örneği toplamıştır. Ardından swab uçlarını 10000 devirde 3 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüje almış, süpernatantı analizler için kullanmıştır (145). Bu yöntem sitokin, kemokin ve MMP örneklenmesinde de geçerlidir. Schmohl ve diğ., swab yöntemi ile oklüzif yara örtüsünün altında biriktirilen sıvının aspire edilmesi yöntemini karşılaştırmıştır. Çalışmalarında, Levine teknik modifiye edilerek, naylon uçlu swablar (Minitip Flocked Swabs 551C; MicroRheologics, Brescia, Italy, now Copan Diagnostics Inc., Murrieta, CA) aracılığıyla yara sıvısı örneği toplanmıştır. Bu swablar, kapiller hareket ile sıvı örneğinin hidrolik tutuluşuna izin veren, dikey naylon fiberler içerirler. Yara sıvısı, swabdan hemen 10000 devirde 3 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenerek ayrılır. Santrifüj için, swabların uçları kesilir ve santrifüj filtre (Oxy Fill Centrifugal filter/product discontinued; replaced by centrifuge filter, Ultrafree-MC 0.5 mL; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) içerisine eklenir ve filtre membranı olmadan eppendorf kapların içine yerleştirilir. Örnekler -80°C'de saklanmıştır. Analizler için önce tüm örnekler 10000 devirde 4°C'de 20 dakika santrifüje alınarak hücresiz süpernant elde edilir. Bu çalışmada swab tekniği ile toplanan median örnek hacmi 40 µL'dir (2-120 µL). Hastaların %75'inde (n=71) en az 20 µL hacimde örnek toplanırken, sadece 2 hastada hiç örnek elde edilememiştir. Yazarlar bu çalışmada swab tekniğinin, oklüzif bir örtü altından aspirasyon tekniğine göre yetersiz olmadığını göstermiştir. Sitokin, kemokin ve MMP ölçümleri karşılaştırıldığında swab tekniğinde diğer yöntemlere göre hedef molekül kaybının olmadığı gösterilmiştir. İlginç olarak, süperfisyal swab tekniğinde aspirasyona göre hedef moleküllerde azalma yerine artış eğilimi görülmüştür. Bu etkinin açıklanmasında, yara üzerine swabın sürülmesinin daha fazla

protein elde edilmesini sağlamış olabileceği üzerinde durulmuştur. Ayrıca yazarlar, yara sıvısı emdirilmiş swabların, direk dondurulması veya santrifüj sonrası elde edilen örneğin dondurulması arasında, anlamlı bir fark bulamamıştır. Bu nedenle hızla swabın dondurulmasının günlük klinik rutinde değerli bir örnek-işlem protokolü olduğu sonucuna varılmıştır (147). Bu yöntem klinik rutinine uygun olarak, hızlı örnek toplama protokolüdür ve az eksüdası olan yaralarda bile orjinal sıvı kompozisyonunu bozmadan ortalama 40 µL örnek toplamayı sağlar (9).

Periodontal araştırmalarda ise *Periotron*, *Periopaper*, *Sialopaper* yada *PerioCol* kağıt çubuklar (Oralflow, Inc, Smithtown, NY) sıklıkla kullanılmaktadır (185–187). Araştırmacılar kağıt çubuklardan protein de ekstrakte etmiştir (188). Yara sıvısı toplanması ve değerlendirilmesinde de faydalı olabilirler (8).

Emici materyallerin kullanıldığı yöntemlerde de bazı dezavantajlar mevcuttur. Ekstraksiyon, yara sıvısındaki biyokimyasal kompozisyonun değişmesine bağlı olarak proteinlerin kaybına yol açabilir. Ayrıca bu yaklaşımda küçük moleküller tutulamayabilir; yara durumunu yansıtabilecek pH ve redoks durumu gibi, fiziksel ve kimyasal özelliklerin ölçülmesini engelleyebilir (6). Ayrıca, yara örtülerinin hedef moleküller ile etkileşime girebileceği unutulmamalıdır (9). Diğer bir potansiyel risk ise örneğin dilüsyonudur; dilüsyon nedeniyle hedef moleküllerde değişiklikler görülebilir ve emici materyal içerisinde değerli miktarda sıvı kalabilir (112).

Günümüzde, yeni örnek toplama yöntemlerinin karşılaştırılabileceği altın standart bir yöntem yoktur ve farklı yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarını açıklayabilecek bir derleme de bulunmamaktadır (112). Kanıtlar oldukça sınırlıdır. Farklı teknikleri karşılaştırırken, teknik problemler ve muhtemel artefaktlar hakkındaki bilgi birikimi yetersizdir (9). Trengove yara sıvısını, toplama yöntemlerinin standardize edilememiş olmasından dolayı, “tanımlanmamış bir çorba” olarak adlandırılmıştır (116). Bu eksiklikler, yara sıvısı kompozisyonunu, karmaşık bir analiz materyali haline getirmektedir (112).

Yara sıvısı toplanması için hangi tekniğin seçileceği sorusu, ilk bakışta önemsiz görünebilir. Dikkat çekilmesi gereken nokta, yara sıvısı elde etme yönteminin, ileri analizlerin sonuçlarını etkileyebileceğidir. (147). Araştırılan belirtecin laktat gibi stabil bir kimyasal bileşik olması önemlidir (Löffler et al., 2011). Birçok parametrenin kantitatif ölçümü, biyoaktivitelerini daima yeterli derecede yansıtamayabilir; örnekleme süresinin kritik bir faktör olduğu kanıtlanmıştır (190). Bir soru için uygun olan bir teknik, farklı bir düzenekte uygun olmayabilir. Bu özellikle sitokinler gibi frajil yara sıvı medyatörleri için doğrudur (147,179).

Ayrıca, yara sıvısı örneği toplama yöntemleri, günlük klinik rutinde kolayca uygulanabilir olmalıdır. Yukarıda anlatılan birçok yöntem önemli gayret gerektirmektedir ve teknik problemleri vardır. Bu nedenle birçok yara, düşük yara sıvı eksüdası nedeniyle, çoğaltılabilir şekilde örneklenememektedir (116,142).

Yara sıvısındaki belirteçleri ölçerken bazı teknik yaklaşımlar göz ardı edilmemelidir. Yara sıvısı toplanırken, hastanın bacağına pozisyonu ve hastanın hidrasyon durumu yara sıvısının kalitesini değiştirmektedir (116). Ayrıca proteaz aktivitesi yüksekken, anlamlı sonuçlar elde etmek problemlidir. Bu nedenle yara sıvısını, çok hızlı bir şekilde, değişiklikler başlamadan önce toplamak gereklidir. Yara sıvısında protein miktarları değerlendirilmek isteniyorsa, çevrenin proteolitik aktivitesinin tanımlanması tavsiye edilir. Laktat gibi inert metabolitler daha avantajlı olarak görülebilir. Çünkü proteinlerdeki birçok kısıtlama burada geçerli değildir (145).

2.4.1 Örneklerin Saklanması, İşlemler ve Analiz

Örneklere uygulanan işlemler ve saklama prosedürleri, hedef moleküllerin stabilitesini büyük ölçüde etkiler (191–195). Yapılan çalışmalarda, yara sıvısı örnekleri - 20°C ile - 80°C arasındaki sıcaklıklarda saklanmıştır. Bazı yazarlar toplanan örnekler proteaz inhibitörleri eklemiştir. Toplanan yara sıvı örneklerinin santrifüj hızları 800 ile 14000 g arasında, sıcaklıkları 4°C ile oda sıcaklığı arasında, süreleri ise 4 ile 15 dakika arasında değişmektedir. Bazı çalışmalarda ise santrifüj yapılmamıştır. Toplanan

örneklerden hedef moleküllerin ekstrakte edilmesinde kullanılan yöntemler de çok değişkendir; farklı ekstraksiyon tampon tipleri mevcuttur ve süreleri de değişkendir. Normalizasyon da tutarsızdır; bazı yazarlar total proteine göre bazı yazarlar ise hacime göre normalizasyon yapmıştır (8).

Yüksek proteaz seviyelerine sahip olduğu kabul edilen kronik yara sıvısında, proteinlerin sürekli olarak yıkılıp, sonuçları etkileyebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle örnek toplama süresi önem kazanmaktadır. Bu işlem proteaz inhibitörleri eklenerek yada düşük sıcaklıklarda saklanarak azaltılabilir. Proteaz inhibitörlerinin eklenmesi, örneklerin dilüsyonu ve analizlerle olabilecek etkileşimleri nedeniyle, belirsiz etkiler ortaya çıkartabilir (9). Kütle spektrometre analizleri, özellikle bu inhibitörler tarafından üretilen potansiyel artefaktlar nedeniyle tartışmalıdır (196). Broszczak ve diğ. çalışmalarında, proteaz inhibitörleri varlığında ve yokluğunda, çeşitli sürelerde ve çeşitli sıcaklıklarda saklanan kronik yara sıvı örneklerinin stabilitesi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, uzun dönemde (1 ay) +4°C, +24°C ve -80°C'de saklanan örnekler karşılaştırılmıştır. Sadece -80°C'de saklanan örneklerde, proteaz inhibitörleri yokluğunda, degradasyon görülmemiştir ve inhibitörlerin varlığında ya da yokluğunda protein profillerinde fark oluşmamıştır. Bu nedenle uzun dönemde -80°C'de saklanan örneklere proteaz inhibitör kokteyli eklenmesi tavsiye edilmemiştir (148).

Saklama sıcaklıkları, saklama süresi ve tekrarlı dondurma/çözdürme işlemleri önemli faktörlerdir (9). Farklı sıcaklıklarda saklanan örnekler birbiriyle karşılaştırılmaz; çünkü -80°C'de saklanan bir örnek, -20°C'de saklanan bir örnekten daha stabildir (191–195). Hedef moleküllerin kaybını önlemek için -20°C'nin yetersiz olabileceği ve -70°C'nin altındaki sıcaklıkların daha iyi olduğunu bildirilmiştir (193). Broadbent ve diğ. derlemelerinde de yara sıvısının en kısa zamanda santrifüje alınıp, ardından analize kadar -80°C'de saklanması önerilmiştir (62). Ancak uzun dönem saklama nedenli kayıplar da oluşabilir (9). Broszczak ve diğ., uzun dönem (1 ay) saklama sürecinde -80°C'yi tavsiye etmektedir. Çalışmalarında kısa dönem (<24 saat) saklama sürecinde, örneklerin +24°C'de ya da buz üzerinde saklanmasının gros protein profillerinde görünür değişikliğe yol açmadığı gösterilmiş; ancak

24 saatin sonrasında +24°C'de saklanan örneklerde SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez) analizinde, ortalama 37 kDa'da fazla bir protein bandı görülmüştür. Ancak yazarlar, kısa süreli saklama sürecinde protein degradasyonunu önlemek için sıcaklığın 4°C'de veya buz üzerinde olmasını önermiştir (148). Ayrıca hedef moleküllerin yıkıma duyarlılıkları da değişkendir (8). Bir çalışmada, MMP'ların stabil hedef molekül oldukları gösterilmiştir. Aksine kemokinlerin ve sitokinlerin ise dondurma işlemine bağlı olarak, immunoanalizlerde hedef molekül kaybına yatkın oldukları bildirilmiştir (147). Bu bilgiler ışığında, bazı proteinlerin sayılan problemlerden etkilendikleri ve bileşiklerin çok stabil olması gerektiği açıktır. Ancak evaporasyon, konformasyonel değişiklikler, protein denatürasyonu ve dondurma/çözdürme döngüleri ile gelişen aggregasyon, istemeyen ve tanımlanmamış bias, tek hedef molekül kaybı yada birikimini ortaya çıkartabilir. Süre ve sıcaklık açısından saklama koşulları biasdan kaçınmak için sabit tutulmalıdır (9).

Tekrarlı dondurma/çözdürme daha problemlidir. Bazı proteinler yada peptidler bu işleme daha duyarlıdır (197). Tekrarlı dondurma/çözdürme işleminden kaçınılması ve mümkün olduğunca düşük sıcaklıkta örneklerin saklanması önerilir (9). Broszczak ve diğ. çalışmasında, 10 defa dondurma-çözdürme işlemine kadar, gümüş boyanmış SDS-PAGE analizinde 10 kDa üzerindeki protein profilinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Yazarlar, kütle spektrometre analizlerinde ise 5 döngüye kadar azaltılması gerektiğini vurgulamıştır. İdeal olarak bu örnekler çözdürdükten sonraki 8 saat içerisinde kullanılmalıdır (148).

Saklama tüplerinin yüzey bağlama özellikleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Cam yada plastik seçilirken dikkat edilmelidir (8). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada sık kullanılan, laboratuvar plastik ve camının yüzey peptid bağlama özelliği araştırılmıştır. Ghrelin, polipropilene göre cama daha çok bağlanırken; insülin, polipropilene daha çok bağlanmıştır (198). Sığır serum albumininin eklenmesi, spesifik olmayan bağlanmayı azaltmış ve çoğu peptidin kurtulmasını sağlamıştır (8).

Ne yazık ki, çoğu araştırmacı, yayınlarında saklama tüpü, saklama süresi, dondurma-zdrme sayısı ve metodlarını bildirmemektedir (8). Son zamanlarda, de Jager ve diğ. alışmalarında, multipleks analizler ile serum ve plazma örneklerinde sitokin ölçümleri için gerekli n koşulları izah etmiştir (199). Yara sıvısında sitokin/biyobelirteç stabilitesinin değerlendirildiği benzer bir çalışma, standart işlemler ve saklama parametrelerinin oluşturulmasını sağlayabilir (8).

Kullanılan analitik teknikler de karmaşıklık ve duyarlılık açısından oldukça değişkendir. Hangi analiz tipinin kullanıldığı, sonuçları etkileyen diğer bir durumdur. Analizlerin uygulanma şekli, hatta ticari olarak piyasada bulunan kitlerin uygulamasındaki operatör tekniklerindeki farklılıklar bile farklı sonuçlara yol açabilir. Negatif ve pozitif kontrollerin dahil edilmesi, örneklerin normalizasyonu, doğru ve genellenebilir sonuçlar elde etmek için kritik önem taşır. Ne yazık ki, birçok çalışmada bu gerekliliklerin bir yada daha fazlası çalışmaya dahil edilmemiştir (8).

Ktle spektrometre ve proteomik teknikler de, iki boyutlu (2D) jeller ve 2D sıvı kromatografi, kronik yara araştırmalarında kullanılmaktadır (7,200). Geleneksel olarak proteinlerin ayrılması için 2D elektroforezler ve bu proteinlerin tanımlanması için, ktle spektrometreler kullanılmaktadır (201).

Western Blot, enzim ilişkili immunosorbent analiz (ELISA) ve multipleks analizler gibi antikörlara dayanan teknikler, biyobelirteçlerin analizinde sıkça kullanılmaktadır. Düşük hacimli örneklerde, çoklu biyobelirteçlerin analizinde, rölatif olarak çok miktarda örnek gerektiren Western blot ve ELISA gibi geleneksel "singleplex" tarama metodlarının kullanımı pratik değildir. Multipleks teknoloji ile araştırmacılar, artık birçok hedefi ve onların fosforilasyon durumlarını eř zamanlı olarak, düşük hacimlerle karşılaştırılabilir bir şekilde analiz etme şansına sahiptir. Yeni cihazlar ve kitler, biyobelirteç araştırmalarında bu teknolojinin daha etkin ve güvenilir bir seçenek olmasını sağlamaktadır (8).

Kesin miktar belirlemek için ilk kaynak ELISA tarafından sağlanırken; Western blot, analiz ve immunohistokimya tanımlama stratejilerine hakimdir. Jeltain, kazein ve kollajen zimografik teknikleri, proteazlar için önemlidir.

Kromojenik ve fotometrik analizler, proteolitik aktivite seviyesinin çalışılması için kullanılır (62). Birçok alışmada MMP tanımlamasında genel teknikler kullanılmıştır; azocoll analizi, jelatin zimografi ve antikor taraması (77,79,124,172,174,202). Bu tekniklerin bazı eksiklikleri vardır; MMP türlerini sadece moleküler ağırlığa göre ayırt etmek zordur. Ayrıca, kullanılan antikorlar, ilişkili türler arasında çapraz reaktivite gösterebilirler (88).

Broadbent ve diğ. derlemesinde, in situ Western blot tekniğinin geliştirilmesi ile kolayca uygulanabileceği belirtilmektedir. Bu teknikte membran yara yüzeyine direk olarak yerleştirilebilir. Daha sonra bu membran ilgilenilen hedef için araştırılabilir; böylece molekülün var olduğu yara alanı tanımlanarak uygun tedavi için bölge en iyi Şekilde hedeflenebilir (62).

Diğer yandan, birçok madde, multipleks analizler ve ELISA ile etkileşime girebilir (203). Yaralar potansiyel olarak, etkileşime girebilecek bileşenleri olan maddelerle tedavi edilmektedir. Bu nedenle yara alanının uygun Şekilde hazırlanması, örnek toplanması için çok önemlidir. Günümüzde metal iyonları, iyodin, kollajen ve aljinat gibi çeşitli yara tedavi komponentlerinin, sitokin stabilitesine ve aktivitesine etkisi pek bilinmemektedir (8).

Günümüzde, birçok yara sıvısı toplama yöntemi kullanılmaktadır. Araştırmacılar ve klinisyenler kanıta dayalı, standardize edilmiş örnek toplama yöntemlerine ihtiyaç duymaktadır (8). Normalizasyon, henüz dokunulmamış bir konudur; bu nedenle sonuçların hacimlere, total protein içeriklerine ya da albumine göre normalize edilmesi, henüz açık değildir ve tartışmalıdır (9). Örneğin, kronik bacak ülserlerinde iyileşme dönemleri boyunca albuminin varyans gösterdiği belirtilmiştir ve bu kullanımını kısıtlayıcı bir durumdur (5,9). nemli biyobelirteçler keşfedildikçe, rutin olarak yara örneklerinde uygulanabilen geçerli test setlerinin geliştirilmesi gündeme gelecektir. Bu setler hızlı biyoyk testi (antibiyotik duyarlılığı da içeren), biyobelirteç testi ve proteaz aktivitesi testi de içermelidir (8).

2.5 Yara Sıvısında Araştırılan Belirteçler

Biyobelirteç Tanımları Çalışma Grubu tarafından biyobelirteç; normal biyolojik işlemlerin, patojenik işlemlerin yada terapötik bir girişime yanıtın göstergesi olarak değerlendirilebilen ve objektif olarak ölçülebilen bir özellik olarak tanımlanmıştır (204). Yara yönetiminde kullanılan tanısal belirteçler kesin tanı sağlamalıdır ya da spesifik fizyolojik, biyokimyasal durum veya hastalık durumu hakkında ayırt edici bilgi sağlamalıdır. Bunlarla birlikte testin sonuçları, ek parametreler gerektirmeden yorumlanabilmelidir. Günümüzde, spesifik olmayan tanısal yara testleri, laboratuvar temelli testlerdir. Örnekler analiz için veya analize hazırlanması için laboratuvarlara gönderilir. Yorumlama için gereken zaman genellikle birkaç gün gerektirir. Birçok hasta için efektif tedavinin verilmesi gecikir. Yara yöntemindeki tanısal testlerin yeni jenerasyonları, mobil (elde taşınabilir), invazif olmayan, kendinden test kitlerini içeren, yatak başı veya hasta başı için tasarlanmış testler olacaktır. Yara değerlendirmesi için doğru ve hızla sonuç veren bu sistemler, ilk klinik değerlendirme işlemlerini anlamlı şekilde geliştirecek ve etkili tedavinin hızla verilmesini sağlayacaktır. Yara iyileşmesindeki zorluklardan olan hastaların erken tanınması, yara değerlendirmesi esnasında risk faktörlerinin tanımlanmasını ve endike olduğunda daha agresif medikal ya da cerrahi hazırlıkların yapılmasını sağlayacaktır. Bu testler sayesinde, uygulanan gereksiz tedaviler en aza inecek ve doğru zamanda uygulanan tedavilerle, hızlı sonuç alınması açısından tasarruf sağlanacaktır (205).

Yager ve diğ.'e göre yara durumunu değerlendirmeye yarayan kabul edilmiş bir biyobelirteç yoktur (162). Hiçbir sistemik belirtecin tek başına tanısal bir araç olarak yeterli olduğu kanıtlanmamıştır. Günümüze kadar, hiçbir yara sıvısı belirteci de bu boşluğu dolduramamıştır. Yara sıvısındaki belirteçler, lokal yara çevresini tanımlamak için, sistemik belirteçlere göre daha uygundur. Dokuya spesifik olan belirteçler hariç, sistemik serum temelli belirteçler, tüm vücuttaki farklı etkilerin tamamını yansıtabilir. Kan dolaşımında bulunan çoğu belirteç, lokal değişikliklerden ziyade sistemik değişikliklerden etkilenir. Vücudumuzun birçok yerinde yara iyileşmesi süreci olabilir. Bu nedenle yara mikroçevresinin değerlendirilmesinde serum belirteçlerinin etkisi tartışmalıdır. Klinik olarak yara değerlendirmesi için yara

sıvısındaki biyobelirteçler muhtemel olarak en iyi seçenektir (112). En çok gelecek vaadeden aday biyobelirteçler; MMP'ler, sitokinler ve kemokinlerdir (162). Ancak hedef moleküllerin miktarının belirlenmesinin, biyoaktiviteyi göstermediği unutulmamalıdır (9). Ayrıca yara iyileşme sürecinin karmaşıklığı, tek bir biyobelirtecin tüm kronik yara formları için tanımlanmasının mümkün olmadığını düşündürmektedir. Bunun yerine iyileşmenin farklı evrelerinde kullanılan yeni tanısal araçlar dizisinin tanımlanması daha uygulanabilir gibi durmaktadır. Boykin ve diğ., diyabetik ayak enfeksiyonları için NO biyoaktivitesinin yetersizliğinin, yarada aşırı MMP üretiminin ve önemli bakteriyel yükün tanısal değerlendirme için önemli anahtar noktalar olduğunu bildirmiştir (205). Yara sıvısında araştırılan parametreler Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Yara sıvısında araştırılan bazı parametreler. uPA, ürokinaz plazminojen aktivatör; tPA, doku plazminojen aktivatör; PAI, plazminojen aktivatör inhibitör.

Proteazlar	MMP-9	Proteaz aktivitesi	Nötrofil elastaz
	MMP-8	MMP aktivitesi	Katepsin G
	MMP-2	Pro- ve Aktif MMP-9	Ürokinaz
	MMP-1	MMP-9 aktivitesi	Plazmin
	MMP-3	MMP/TIMP	Prolidaz
	MMP-13	MMP-9/TIMP-1	Kollajenaz aktivitesi
	MMP-10	MMP-2/TIMP-2	Kollajenaz/TIMP-1 kompleksleri
	MMP-11	MMP-1/TIMP-1	uPA
			tPA
Anti-Proteazlar	TIMP	alfa-2-makroglobulin	
	TIMP-1	alfa-1-antiproteaz (alfa-1-antitripsin)	
	uPA/PAI-1 kompleks	alfa-1 antiproteaz inhibitörü	
	Serbest PAI-1		

Tablo 2.4. (Devam) Yara sıvısında araştırılan bazı parametreler. CRP, C-reaktif protein; TLR, toll like reseptör; Lcn-2, lipocalin-2; MIP, makrofaj inflamatuvar protein; IFN, interferon; CXCL9, kemokin (C-X-C motif) ligand 9; G-CSF, Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör; GM-CSF, Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör; IGFBP, insulin benzeri büyüme faktör bağlayıcı protein; NOx, nitrat ve nitrit.

İnflamasyon	CRP	S100A12	S100A7
	TLR- stimülasyon aktiviteler	S100A10	S100A8
	Lcn-2	S100A6	S100A9
Sitokinler	IL-1	IL-6	TGF- β
	IL-1 biyoaktivite	IL-6 biyoaktivite	MIP-1 δ
	IL- α	TNF- α	IL-8
	IL-1 β	TNF- α biyoaktivite	MIF
	IL-4	IFN-gama	Heparin binding protein
	IL-10	MIP-1alfa	CXCL9
	IL-12p40	MIP-1beta	
	IL-8	IL-1 reseptör antagonisti	
Büyüme Faktörleri	bFGF	VEGF	IGF-1
	FGF	GM-CSF	IGFBP-2
	EGF	G-CSF	IGFBP-3
	PDGF		
Matriks	Fibronektin		
	Vitronektin		
	Total protein		
Oksidatif çevre	Total protein karbonil içeriği	Ürik asit	NOx
	Malondialdehit	Allantoin	3-Nitrotirozin
	8-izoprostan	Allantoin/ürük asit	
	Total demir	Ksantin oksidaz	
	Ferritin	Antioksidan kapasite	
	Transferrin		
Diğer	Albumin	Bikarbonat	Kortizol
	Albumin/globulin	Laktat	Çinko
	γ -Globulin	Çinko	
	Glukoz	Alkalın fosfataz aktivitesi	

Araştırmaların çoğunda öncelikle, total protein konsantrasyonu incelenmiştir (5,116,149). İyileşen yaralarda, kronik kalan yaralara göre daha fazla total protein konsantrasyonuna sahip olma eğilimi mevcuttur. Ayrıca Edsberg ve diğ., yaraların tiplerine göre de (basınç ülseri ve diyabetik ayak ülseri) protein konsantrasyonlarında değişkenlik olduğunu bildirmiştir (149). James ve diğ. ise, 4 hastanın bacak yaralarından elde edilen yara sıvılarında total protein konsantrasyonu ölçümlerinde; iyileşen bir hastada total proteinde artış olduğunu, iyileşmeyen diğer iki hastada düşüş olduğunu, iyileşmeyen son hastada ise hep düşük seyrettiğini bildirmiştir (5). Trengove ve diğ. çalışmasında ise iyileşen bacak ülserlerinin eksüdasında total protein konsantrasyonlarında artış bildirilmiştir. İyileşme ile değişme gösteren total protein değerlerindeki bu fark, yaraların farklı etyolojileri ile ilişkili olabilir (116). Ayrıca NBYT gibi aktif yöntemlerle elde edilen yara sıvılarının, daha yüksek total protein konsantrasyonlarına sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (164).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın protokolü, GATA Etik Kurul Başkanlığının 3 Mart 2015 tarihli 05 sayılı oturumunda onaylanmıştır. Çalışma, GATA Araştırma Bilimsel Kurulu tarafından desteklenmiştir (AR-2015/44). Bu tarihten itibaren (3 Mart 2015) GATA Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp polikliniğine kronik yara nedeniyle başvuran ve aşağıdaki kriterlere uyan 20 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bütün hastalardan imzalı onam formu alınmıştır. Hastalar takip formuna göre izlenmiştir. Hastalardan ilk başvuruda, 2. haftada ve 4. haftada, her seferinde ikişer defa olmak üzere üç farklı yöntem ile yara sıvısı toplanmıştır. Hastaların tedavilerinde değişiklik yapılmamıştır.

3.1. Dahil Etme ve Dışlama Kriterleri

Dört hafta boyunca standart tedaviye rağmen kapanmayan, cilt ve ciltaltı dokuları tutan, çapı veya kısa kenarı en az 2 cm ülser lezyonu olan 18 yaşından büyük toplam 20 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Acil amputasyon endikasyonu olanlar, ekstremiteyi tehdit edecek şiddette enfeksiyonu olanlar veya yara zemininde büyük oranda kemik veya eklem aralığı olan hastalar çalışma dışında tutulmuştur.

3.2. Yara Sıvısı Örneği Toplanması

Hastalardan, steril Whatman mikrofiber filtre kağıdı (GF/D), polyvinylidene fluoride (PVDF) filtre kağıdı ve naylon uçlu swab çubuğu olmak üzere girişimsel olmayan 3 farklı yöntem ile yara örneği toplanmıştır.

Whatman mikrofiber filtre kağıdı (GF/D), 25 mm çapında, 0.67 mm kalınlığındadır ve 2.7 μ m por büyüklüğüne sahiptir (Katalog No. WHA1823025, Sigma Aldrich). Borosilikat camdan üretilmiştir. Kimyasal bağlayıcı içermez.

PVDF filtre kağıdı ise, 25 mm çapındadır ve 0.45 μ m por büyüklüğüne sahip olan Durapore hidrofilik membranlardır (Katalog No. P1813-100EA, Sigma Aldrich). Protein bağlaması 1 μ g/cm²'dir.

Swab çubuklar, ise naylon uçludur ve 30 mm'de kırma noktasına sahiptir (Katalog No. 520CS01, Copan Flock Technologies Srl, Brescia,

İtalya). Dikey naylon fiber iplikler arasında kapiller hareket ile sıvı örnekler için güçlü hidrolik tutuşu kolaylaştırır. Örneğin yüzeye yakın kalması ise kolayca yıkama olanağı sağlar.

Çalışmanın başında, Whatman filtre kağıdı ve PVDF filtre kağıdının ağırlıkları hassas terazi (Precisia model, İsviçre) ile ölçülmüştür (Resim 3.1). Benzer ağırlıklara sahip oldukları için, iki yöntem için de 3 ayrı filtre kağıdının ağırlığının ortalaması alınarak Whatman filtre kağıdı ve PVDF filtre kağıdı için ayrı olarak standart ağırlıkları belirlenmiştir. Whatman filtre kağıdı için ölçülen 3 ayrı ağırlık; 34 mg, 34,7 mg ve 34,3 mg'dır. Whatman filtre kağıdının ortalama ağırlığı 34,3 mg olarak hesaplanmıştır. PVDF filtre kağıdı için ölçülen 3 ayrı ağırlık ise; 61,7 mg, 62,4 mg ve 61,8 mg'dır. PVDF filtre kağıdının ortalama ağırlığı ise 62 mg olarak hesaplanmıştır. Swab çubuklarının ağırlıkları ise daha büyük farklılıklar gösterdiği için standart ağırlık belirlenmemiş olup, her bir ölçümden önce hassas terazi ağırlıkları ölçülmüştür.



Resim 3.1. Filtre kağıtlarının ve naylon uçlu swab çubuğunun ağırlıkları hassas terazi (Precisia model, İsviçre) ölçülmüştür.

Yara sıvısı örneği toplanmadan önce standart olarak nekrotik dokular uzaklaştırılmıştır. Öncelikle yara serum fizyolojik ile yıkanmıştır, ardından steril gazlı bez ile kurulanmıştır.

Yöntem 1: Steril Whatman filtre kağıdı yara üzerine koyulmuştur. On dakikayı aşmayacak şekilde tam satüre olana kadar beklenmiştir (Resim 3.2). Yara üzerinden alınan filtre kağıdının ağırlığı hassas terazi (Precisia

model, İsviçre) ile ölçüldükten sonra 5 ml PBS içeren steril tüp içerisine konulmuştur.



Resim 3.2. Whatman filtre kağıdının yara üzerine yerleştirilmesi ve yara üzerinde bekletildikten sonra satüre olmuş hali. (Satüre olana kadar ya da en fazla 10 dakika bekletilmiştir.)

Yöntem 2: Steril PVDF filtre kağıdı yara üzerine koyulmuştur. On dakikayı aşmayacak şekilde tam satüre olana kadar beklenmiştir (Resim 3.3). Yara üzerinden alınan filtre kağıdının ağırlığı hassas terazi (Prescisia model, İsviçre) ile ölçüldükten sonra 5 ml PBS içeren steril tüp içerisine konulmuştur.



Resim 3.3. PVDF filtre kağıdının yara üzerine yerleştirilmesi ve yara üzerinde bekletildikten sonra satüre olmuş hali. (Satüre olana kadar ya da en fazla 10 dakika bekletilmiştir.)

Yöntem 3: Naylon uçlu swab çubuğu 1cm²'lik alanda 5 saniye eksüda toplanması için rotasyonel olarak çevrilmiştir (Resim 3.4) . Swab çubuğunun ucunun ağırlığı hassas terazi (Precisia model, İsviçre) ile ölçüldükten sonra 5 ml PBS içeren tüpe yerleştirilmiştir.



Resim 3.4. Naylon uçlu swab çubuğu, 5 saniye boyunca 1 cm² alanda rotasyonel olarak çevrilmiştir.

Örnekler ekstraksiyon işlemi için PBS içeren tüplerde, oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca hafifçe manuel olarak sallanmıştır; sonunda tüp içerisindeki filtre kağıtları ve swab çubuğu çıkartılmıştır. Ardından tüpler 4°C'de 3000 devirde 15 dakika boyunca santrifüje alınmıştır. Süpernatantın bir bölümü ile total protein, albumin, glukoz, üre, kreatinin, AST, ALT, ürik asit, sodyum, potasyum, klor ölçümleri yapılmıştır. Kalan süpernatant bölümlere ayrılarak ileri analiz yapılınca kadar -80°C'de saklanmıştır. Aşağıda analiz süreci görülmektedir (Resim 3.5) .

Her bir örnek toplanmasından sonra 5 dakika ara verilmiştir. Örnekler her vizitte farklı sırayla toplanmıştır. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin denetlenmesi amacıyla her yöntem için ikişer örnek toplanmıştır. Yara iyileşme sürecindeki ilerleme ile birlikte yara sıvısının kompozisyonunda oluşabilecek değişikliklerin de değerlendirilebilmesi amacıyla yara sıvısı örnekleri 3 farklı zamanda toplanmıştır.



Resim 3.5. Örnekler PBS içeren tüplerde 5 dakika hafifçe manuel olarak sallanır. Sonra tüplerin içerisindeki filtre kağıtları ve swab çubuğu çıkartılır. Ardından tüpler, +4 °C'de 3000 devirde 15 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonundaki süpernatant bölümlere ayrılır.

Biyokimyasal ölçümler Cobas 8000 ve Beckman Coulter AU5800 biyokimya otoanalizör ile yapılmıştır. Protein elektroforezi ise, INTERLAB G26 (Los Angeles, CA – USA) tam otomatik elektroforez cihazı ile Interlab H.R. Protein elektroforez kiti (Interlab-SRE600K) kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda elektroforez yapıldı. Ancak görüntü elde edilemediği için protein duyarlılığı daha yüksek olan başka bir kit ile (BIORAD) agaroz jel üzerinde üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gümüş boyama yapıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde IBM SPSS 21.0 paket program kullanılmıştır. Verilerin tanımlanmasında sayı, %, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu "Kolmogrov-Smirnoff testiyle" değerlendirilmiştir. Değişkenler

arası doğrusal ilişki incelemesinde “Pearson veya Spearman Korelasyon analizi” kullanılmıştır. Ölçüm yöntemlerinde elde edilen değerlerin karşılaştırmasında “Tekrarlayan Ölçümlerde ANOVA testi” kullanılmıştır. *P* değerinin 0.05’den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya, 24 Temmuz 2015 - 22 Haziran 2016 tarihleri arasında çalışma kriterlerine uyan ve onam veren 20 hasta dahil edilmiştir. Bir hasta örnek toplanması için gelmediği için çalışmadan çıkarılmıştır. Hastaların 15'i (%78,9) erkek, 4'ü (%21,1) kadındı; yaş ortalamaları $53,2 \pm 15,4$ yıl idi. Vücut kitle indeks ortalaması $28,2 \pm 3,8$ kg/m² olarak hesaplandı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hastaların tanımlayıcı özellikleri ve kan tabloları. VKI= Vücut kitle indeksi, AKŞ=Açlık Kan Şekeri, BK=Beyaz Küre, CRP= C-Reaktif Protein.

	Sayı	En düşük	En yüksek	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca
Yaş	19	22	75	53,2	15,4	58
VKI	18	21	36	28,2	3,8	28,6
Yara Alanı (cm ²)	19	4	42	11,5	11,0	6,25
Yara Süresi (ay)	19	1	60	8,8	15,0	3
Kan Tablosu						
AKŞ (mg/dL)	18	67	187	106,6	32,9	95
Üre (mg/dL)	21	18	75	37,1	16,5	33
Kreatinin (mg/dL)	21	0,57	1,5	0,85	0,21	0,85
AST (U/L)	21	8	31	15,7	4,9	15
ALT (U/L)	21	7	88	18,0	16,7	14
Sodyum (mmol/L)	15	135	141	138,4	1,7	138
Potasyum (mmol/L)	15	4,13	4,97	4,6	0,2	4,71
Klor (mmol/L)	2	107	107	107	0	107
Ürik Asit (mg/dL)	10	2,5	8,5	5,3	1,8	5,4
Total Protein(g/dL)	11	6,18	7,9	7,31	0,54	7,5
Albumin (g/dL)	15	3	4,88	4,09	0,58	3,94
BK (x10 ³ /µm ³)	23	4,98	15,55	8,12	2,58	8,01
Sedimentasyon (mm/sa)	21	4	118	43,5	32,5	36
CRP (mg/L)	11	2,91	35,8	10,45	9,48	8,71

Hastaların 10'unda (%52,6) diyabetes mellitus, 4'ünde periferik arter hastalığı (%21,1), 4'ünde (%21,1) kronik venöz yetmezlik (KVY), 4'ünde (%21,1) ise başka etyolojiler mevcuttu (Tablo 4.2). Hastaların 18'inde (%94,7) sigara kullanım öyküsü bulunuyordu. Hastalarda ortalama yara süresi $8,8 \pm 15,0$ aydı. Yara alanları ise ortalama $11,5 \pm 11,0$ cm² olarak hesaplandı. Hastaların 15'i (%78,9) bu çalışma esnasında HBO tedavisi almaktaydı.

Tablo 4.2. Hastaların etyolojilerine ait sayısal bilgiler. DM= Diyabetes Mellitus, PAH= Periferik arter hastalığı, KVY= Kronik venöz yetmezlik.

Etyoloji	Sayı	Sıklık	Yüzde (%)
DM	19	10	52,6
PAH	19	4	21,1
KVY	19	4	21,1
Diğer	19	4	21,1

Çalışmaya dahil edilen 19 hastanın, sadece birinin 3 viziti tamamlanabildi; dört hastanın ise 2. viziti tamamlanabildi. Vizitler arası karşılaştırma için 2 ve üzeri viziti tamamlanan hasta sayısının yetersiz olması sebebiyle, bu hastaların 2. ve 3. vizitleri ayrı örnekler olarak tanımlandı. Toplamda 19 hastaya ait 25 örnek değerlendirildi. Yara sıvısı elde etme yöntemlerinin yara üzerinde bekletilme sürelerine ait veriler Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Yöntemlerin yara üzerinde bekletilme süreleri.

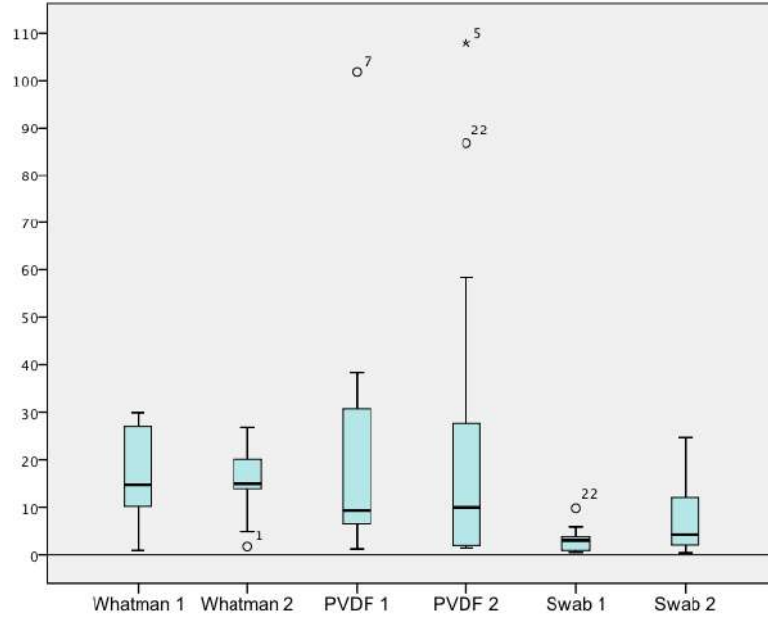
	Sayı	En Düşük	En Yüksek	Bekletme (ortalama)	Standart Sapma	Ortanca
Whatman (dk)	25	1	10	5,24	2,07	5
PVDF (dk)	25	5	10	9,06	1,51	10
Swab (sn)	25	5	5	5	0	5

Hastaların yara sıvısı ağırlık ölçümlerinde hesaplanan negatif değerler (5 değer) çalışmadan çıkartıldı. Ayrıca, 2 hastaya ait yara sıvısı ağırlık ölçümleri yapılamamıştır. Biyokimyasal hesaplamalarda ise hesaplanan negatif değerler 0 olarak kabul edildi; total protein için 15 değer, albumin için ise 26 değerde bu değişiklikler yapıldı.

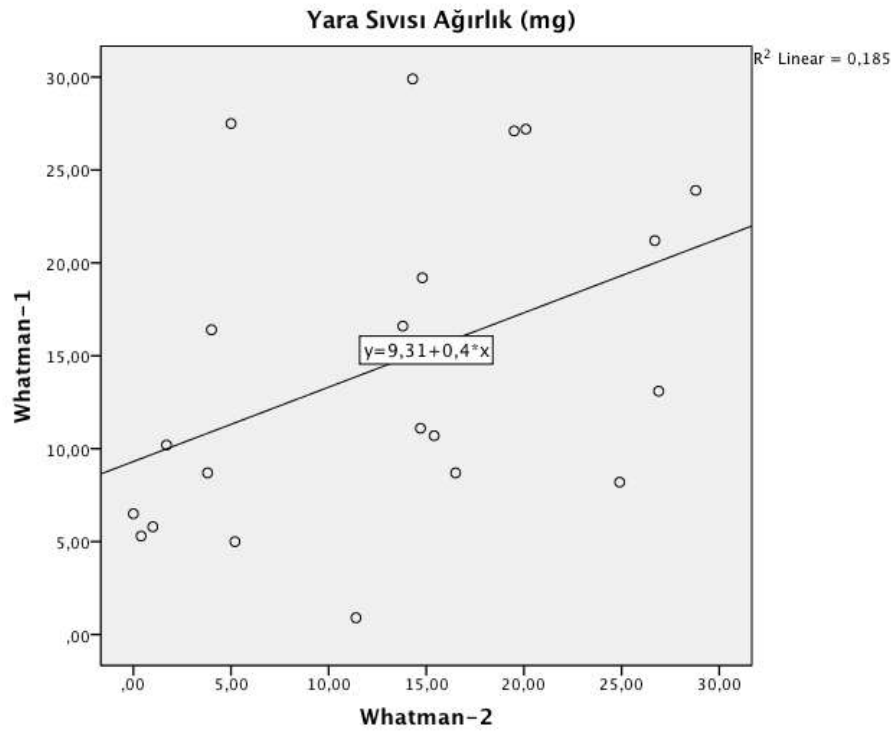
Her yöntem, test içi güvenilirlik karşılaştırmasını yapabilmek için her hastada ikişer defa uygulanmıştır. Test içi güvenilirlikleri test etmek amacıyla toplayabildikleri yara sıvısı ağırlıklarına göre korelasyon analizi yapıldığında, sadece swab yöntemi için pozitif yönde orta ($r=0,536$) ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,012$) (Tablo 4.4, Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Ayrıca, yara sıvısındaki biyokimyasal parametrelere (total protein, albumin) göre test içi güvenilirlikler tekrar karşılaştırıldı. Ancak test sonuçlarının güvenilirliğini arttırmak için, bu parametreler (g/dL), uygulanan testin o vizitte topladığı yara sıvısı ağırlığına (gr) bölündü ve yeni bir oran elde edildi (g/dL/g). Bu şekilde total proteine göre korelasyon analizleri yapıldığında, tüm yöntemler için pozitif yönde orta (Whatman yöntemi $r=0,505$, PVDF yöntemi $r=0,654$, swab yöntemi $r=0,580$) ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (Whatman yöntemi $p=0,023$, PVDF yöntemi $p=0,003$, swab yöntemi $p=0,006$) (Tablo 4.5.). Aynı şekilde albumine göre korelasyon analizleri tekrarlandığında, tüm yöntemler için pozitif yönde orta (Whatman yöntemi $r=0,666$, PVDF yöntemi $r=0,627$, Swab yöntemi $r=0,599$) ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (Whatman yöntemi $p=0,003$, PVDF yöntemi $p=0,002$, swab yöntemi $p=0,004$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.4. Her bir testin topladığı yara sıvısı ağırlık ortalamaları ve bu parametreye göre yapılan korelasyon analizi sonuçları.

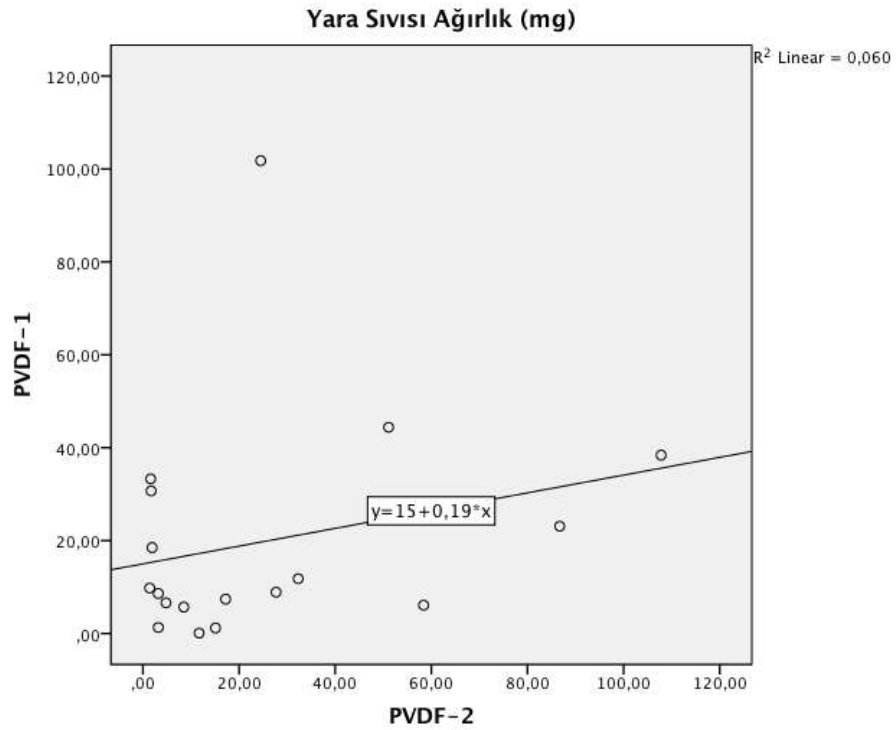
	Yara Sıvısı Ağırlık (ortalama) (mg)	Standart Sapma	P değeri	r değeri
Whatman-1	14,623	8,6139	0,051	0,430
Whatman-2	13,091	9,3115		
PVDF-1	18,614	23,0697	0,529	0,159
PVDF-2	24,211	30,9322		
Swab-1	3,168	3,9186	0,012*	0,536
Swab-2	7,095	8,4063		



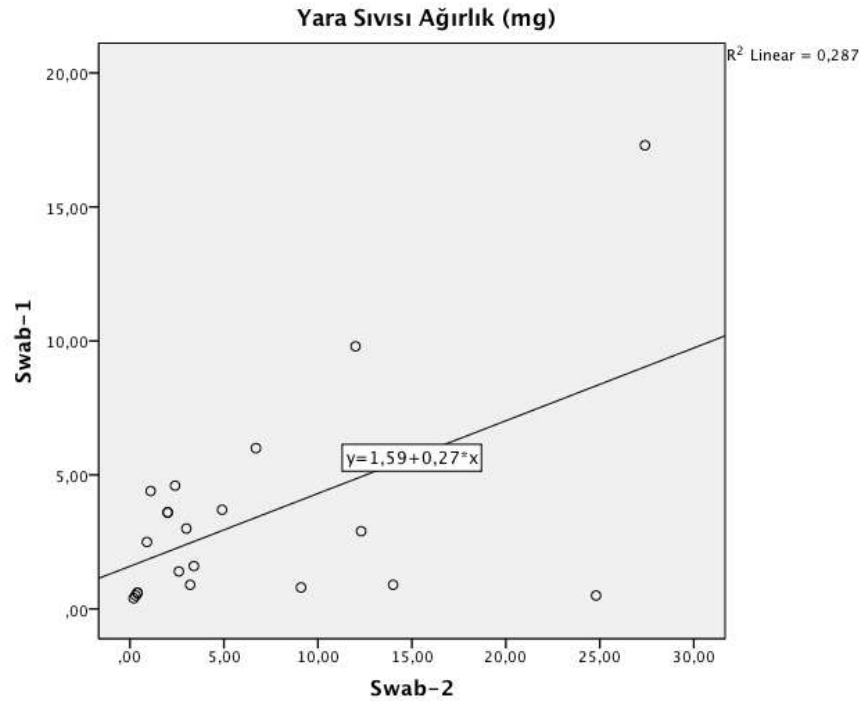
Şekil. 4.1 Tüm yöntemlerin topladığı yara sıvısı ağırlık (mg) ortalamaları.



Şekil 4.2. Whatman yöntemlerinin yara sıvısı ağırlık (mg) korelasyon grafiği



Şekil 4.3. PVDF yöntemlerinin yara sıvısı ağırlığı (mg) korelasyon grafiği



Şekil 4.4. Swab yöntemlerinin yara sıvısı ağırlığı (mg) korelasyon grafiği

Tablo 4.5. Her bir testin elde ettiği total protein değeri (g/dL) ilgili testin yara sıvısı ağırlığına (g) bölünerek elde edilen ortalama oranlar (g/dL/g) ve bu parametreye göre yapılan korelasyon analizi sonuçları.

	Total Protein/Yara Sıvısı Ağırlık Oranı (ortalama) (g/dL/g yara sıvısı)	Standart Sapma	P değeri	r değeri
Whatman-1	13,8003	16,49085	0,023*	0,505
Whatman-2	25,5675	55,17568		
PVDF-1	97,009	368,93763	0,003*	0,654
PVDF-2	19,541	32,41982		
Swab-1	130,7332	337,39208	0,006*	0,580
Swab-2	84,5205	130,32739		

Tablo 4.6. Her bir testin elde ettiği albumin değeri (g/dL) ilgili testin yara sıvısı ağırlığına (g) bölünerek elde edilen ortalama oranlar (g/dL/g yara sıvısı) ve bu parametreye göre yapılan korelasyon analizi sonuçları.

	Albumin/Yara Sıvısı Oranı (ortalama) (g/dL/g)	Standart Sapma	P değeri	r değeri
Whatman-1	6,3826	10,69939	0,003*	0,666
Whatman-2	9,6399	20,49871		
PVDF-1	76,1548	346,08053	0,002*	0,627
PVDF-2	10,1994	20,34265		
Swab-1	138,4198	499,87888	0,004*	0,599
Swab-2	33,3063	107,97932		

Ölçüm yöntemlerinin birbirleri ile karşılaştırılacağı analizlerde 1. ve 2. ölçümdeki değerler (yara sıvısı ağırlık ve biyokimyasal parametreler) ayrı örnekler olarak kabul edildi. Whatman yönteminin ortalama topladığı yara sıvısı ağırlığı $13,8 \pm 8,8$ mg, total protein $0,1190 \pm 0,09394$ g/dL, albumin $0,0530 \pm 0,07874$ g/dL olarak hesaplandı. PVDF yöntemi için ise ortalama yara sıvısı ağırlığı $21,2 \pm 26,8$ mg, total protein $0,1059 \pm 0,09090$ g/dL, albumin $0,0496 \pm 0,07101$ g/dL olarak hesaplandı. Swab yöntemi için ise ortalama yara sıvısı ağırlığı $5,13 \pm 6,7$ mg, total protein $0,0976 \pm 0,08783$ g/dL, albumin $0,0517 \pm 0,07929$ g/dL olarak hesaplandı. Yöntemlerin detaylı sonuçları Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. İkişer defa uygulanan yöntemlerin, her uygulaması ayrı örnek olarak değerlendirildi. Parametreler için ortalama sonuçlar hesaplandı.

	Yöntem	Sayı	En Düşük	En Yüksek	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca
Yara Sıvı Ağırlık (mg)	Whatman	44	0	29,9	13,8	8,8	14,0
	PVDF	40	0,1	107,8	21,2	26,8	9,3
	Swab	44	0,1	27,4	5,1	6,7	2,7
Total Protein (g/dL)	Whatman	50	0	0,35	0,119	0,09394	0,1
	PVDF	49	0	0,31	0,1059	0,09090	0,1
	Swab	49	0	0,32	0,0976	0,08783	0,08
Albumin (g/dL)	Whatman	46	0	0,31	0,0530	0,07874	0,01
	PVDF	48	0	0,28	0,0496	0,07101	0,01
	Swab	48	0	0,27	0,0517	0,07929	0
Üre (mg/dL)	Whatman	47	0	1	0,149	0,3599	0
	PVDF	46	0	2	0,1522	0,41991	0
	Swab	45	0	1	0,0667	0,25226	0
Kreatinin (mg/dL)	Whatman	38	0	0,02	0,0008	0,00359	0
	PVDF	38	0	0,03	0,0018	0,00609	0
	Swab	37	0	0,02	0,0011	0,00458	0
Ürik Asit (mg/dL)	Whatman	49	0	0,1	0,012	0,0331	0
	PVDF	47	0	0,1	0,0106	0,03117	0
	Swab	42	0	0,1	0,0095	0,02971	0
Glukoz (mg/dL)	Whatman	44	0	4	0,75	0,967	1
	PVDF	44	0	4	0,7955	0,95429	1
	Swab	44	0	4	0,6591	0,86113	0,5

Hastaların serum ve yara sıvısındaki biyokimyasal parametreleri (total protein, albumin, üre, kreatinin, ürik asit, glukoz) arasında da karşılaştırma yapılmıştır. Hastaların serum değerleri bir defa ölçüldüğü için bu karşılaştırmada kullanılan biyokimyasal parametreler ayrı örnekler olarak alınmamıştır. Her testin ikişer defa olan uygulama sonuçlarının ortalaması alınmıştır; bu nedenle 25 örnek üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Biyokimyasal parametreler için, ilgili testin topladığı yara sıvısı ağırlığına bölünerek elde edilen oranlar kullanılmıştır. Bu analizin sonucunda, hiçbir yara sıvısı elde etme yöntemi için serum değerleri ile aralarında anlamlı korelasyon görülmemiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Serum ve yara sıvısındaki biyokimyasal parametrelerin korelasyon analizi.

	Yöntem	P değeri	R değeri
Total Protein	Whatman	0,092	-0,593
	PVDF	0,166	-0,474
	Swab	0,273	-0,410
Albumin	Whatman	0,645	0,141
	PVDF	0,286	0,307
	Swab	0,985	-0,006
Üre	Whatman	0,105	0,395
	PVDF	0,148	0,345
	Swab	0,744	-0,083
Kreatinin	Whatman	0,18	0,353
	PVDF	0,088	0,440
	Swab	0,826	0,062
Ürik Asit	Whatman	0,319	0,351
	PVDF	0,319	0,351
	Swab	0,86	0,069
Glukoz	Whatman	0,429	0,230
	PVDF	0,48	0,215
	Swab	0,434	0,219

Her hasta için ayrı olarak testler arası yara sıvısı ağırlıkları Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p < 0,001$) (Tablo 4.9). Aradaki farkın bulunması için ikili olarak testler karşılaştırıldığında ise; Whatman ve swab yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0,001$) ve benzer şekilde PVDF ile swab yöntemi arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p = 0,002$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.9. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile yara sıvısı ağırlığına (mg) göre yöntemlerin her hasta için ayrı ayrı karşılaştırması.

	Sayı(n)	Ortalama (mg)	Standart Sapma	P değeri
Whatman	36	15,5	8,3	<0,001*
PVDF	36	21,4	27,7	
Swab	36	5,3	6,2	

Tablo 4.10. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile testlerin yara sıvısı ağırlığı için ikili karşılaştırması.

Yöntem 1	Yöntem 2	P Değeri	%95 Güven Aralığı	
			Üst Sınır	Alt Sınır
Whatman	PVDF	0,476	-0,016	0,004
	Swab	0,000*	0,007	0,013
PVDF	Whatman	0,476	-0,004	0,016
	Swab	0,002*	0,005	0,027
Swab	Whatman	0,000*	-0,013	-0,007
	PVDF	0,002*	-0,027	-0,005

Her hasta için ayrı olarak testler arası total protein oranları (g/dL/g yara sıvısı) Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p=0,035$) (Tablo 4.11). Aradaki farkın bulunması için ikili olarak testler karşılaştırıldığında ise; PVDF ile swab yöntemi arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p=0,048$) (Tablo 4.12). Aynı analiz albumin oranlarına (g/dL/g yara sıvısı) göre Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile tekrarlandığında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,205$).

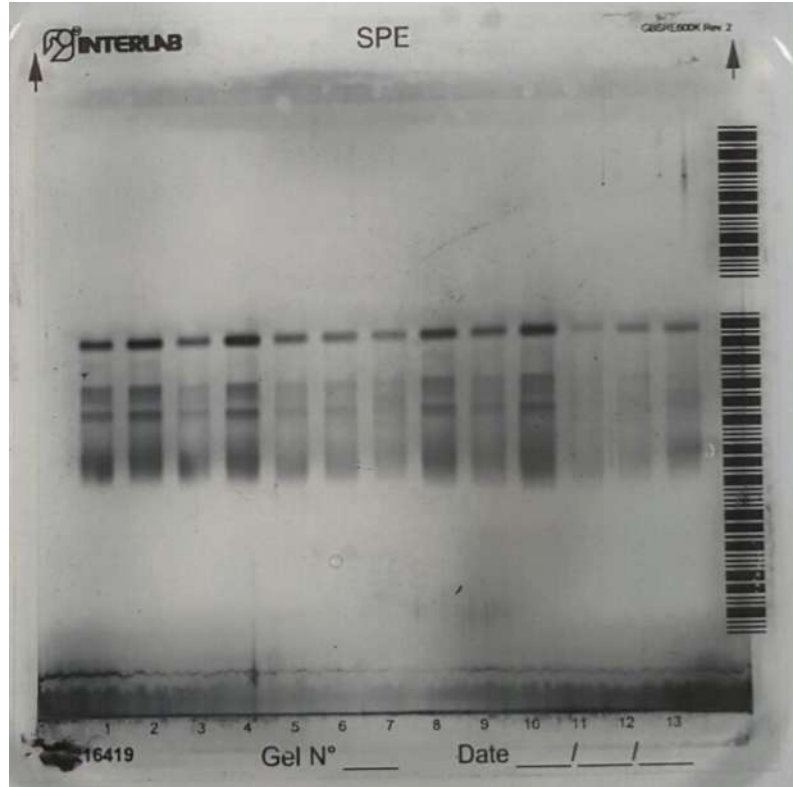
Tablo 4.11. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile total protein oranlarına (g/dL/g) göre yöntemlerin her hasta için ayrı ayrı karşılaştırması.

	Sayı(n)	Ortalama	Standart Sapma	P değeri
Whatman	38	20,8	43,5	0,035*
PVDF	38	62,9	274,9	
Swab	38	106,4	269,3	

Tablo 4.12. Tekrarlı Ölçümlerde ANOVA testi ile testlerin total protein oranı (g/dL/g) için ikili karşılaştırması.

Yöntem 1	Yöntem 2	P Değeri	%95 Güven Aralığı	
			Üst Sınır	Alt Sınır
Whatman	PVDF	1,000	-115,039	70,863
	Swab	0,176	-195,507	24,435
PVDF	Whatman	1,000	-70,863	155,039
	Swab	0,048*	-86,667	-0,229
Swab	Whatman	0,176	-24,435	195,507
	PVDF	0,048*	0,229	86,667

Örneklere ait elektroforez görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.5). Tüm jellerde görüntü elde edilebilmiştir.



Şekil 4.5. Elektroforez görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, klinik rutinimizde standart olarak kullanılabilen pratik ve güvenilir bir yöntem belirlenmesi amaçlanmıştır. Hasta popülasyonumuzun bir kısmının az eksüdalı yaralar olduğu göz önünde bulundurularak güvenilir ve pratik olduğu öngörülen 3 ayrı yöntem seçildi; Whatman GF/D filtre kağıdı, PVDF filtre kağıdı ve naylon uçlu swab. Bu üç yöntem de emici materyallere örnektir. Yara sıvısı örneği elde edildikten sonraki hazırlık sürecinde her yöntem için ortak olarak uygulanabilecek pratik ve güvenilir ekstraksiyon işlemleri tercih edildi. Tekniklerin birbiriyle karşılaştırmasında ise elde edilebilen yara sıvısı ağırlığı, total protein ve albumin miktarı kullanılmasına karar verildi. Ayrıca test içi güvenilirliklerin de test edilebilmesi için her yöntem için ikişer defa olmak üzere her hastada farklı sıralarda örnek toplandı. Yapılan literatür taramasında, çalışmamıza benzer şekilde sadece emici yöntemlerin etkinliğini karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmadı.

Yara sıvısı oldukça değişken bir örnektir (62). Bu nedenle kullanılan yöntemin güvenilir olması gereklidir. Yapılan çalışmalarda, test içi güvenilirlik karşılaştırmaları bulunamadı. Çalışmamızda yöntemleri karşılaştırırken öncelikle test içi güvenilirlik analizi yapıldı. Bunun için her bir test ikişer defa uygulandı. Sadece swab yöntemi tüm parametrelerde (yara sıvısı ağırlığı, total protein, albumin) istatistiksel olarak anlamlı korelasyon göstermiştir (sırasıyla $p=0,012$, $p=0,006$, $p=0,004$). Swab yönteminin tekrarlanabilirliği, diğer yöntemlere göre daha güvenilirdir.

Broadbent ve diğ. derlemesinde, yazarların laboratuvarlarında yara sıvısı konsantrasyon aralığının 0.05-50.5 mg/mL; yara sıvısı hacmi aralığının ise 0.02-2.5 mL; total protein miktarının ise örnek başına 0.07-47 mg olarak tanımlandığı bildirilmiştir. (62). Farklı tekniklerle aynı yaradan elde edilen yara sıvısı örneğinin analizinde bile aynı parametreler farklı sonuçlar verebilir (147). Ramsay ve diğ. derlemesinde, yazarların henüz yayınlanma aşamasında olan bir çalışmada Whatman kağıt disk (Kat. No: 2017-009) ile ortalama $89 \pm 6.5 \mu\text{l}$ yara sıvısı toplanabildiği belirtilmektedir (8). Moor ve diğ. ise, Whatman 54 kağıt filtreler ile tipik olarak 50-200 μL yara sıvısı elde

edilebildiğini bildirmiştir (119). Literatür taramasında, PVDF yöntemi kullanılan bir çalışmaya ulaşılmıştır; ancak elde edilen yara sıvısı miktarı bildirilmemiştir (165). Schmohl ve diğ. çalışmasında, naylon uçlu swab ile elde edilen ortanca yara sıvısı miktarının $40\mu\text{L}$ ($2-120\mu\text{L}$) olduğu bildirilmiştir (147). Löffler ve diğ. de aynı yöntem ile en az $10\mu\text{L}$ yara sıvısı elde edilebildiğini belirtmiştir (145). Bu sonuçlar, swab ile elde edilen yara sıvısı miktarının daha az olduğunu düşündürmektedir. Çalışmaların çoğunda yara sıvısı miktarı hacimsel olarak hesaplanmıştır; ancak bizim çalışmamızda elde edilen yara sıvısının ağırlığı (mg) hesaplanmıştır. Bu nedenle diğer çalışmalarla direk karşılaştırma yapılamamıştır. Bizim çalışmamızda, Whatman yönteminin ortalama topladığı yara sıvısı ağırlığı $13,8 \pm 8,8$ mg iken, PVDF yöntemi için $21,2 \pm 26,8$ mg ve swab yöntemi için ise $5,13 \pm 6,7$ mg olarak hesaplandı. Test içi güvenilirliği yüksek olan swab yöntemi, Whatman ve PVDF yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha az yara sıvısı toplamaktadır. Yara sıvısı miktarının daha az olmasının ana sebebi yara üzerinde bekletilme süresindeki farklılıklar olabilir. Çalışmamızda swab yöntemi kullanan birçok çalışmaya benzer şekilde swab uygulamasında Levine teknik kullanılmıştır; 1 cm^2 'lik alanda 5 saniye boyunca rotasyonel olarak çevrilerek bekletilmiştir (145,147,148). Ancak çalışmamızdaki diğer yöntemler 10 dakikayı aşmayacak şekilde satüre olana kadar yara üzerinde bekletilmiştir; whatman filtre kağıdı ortalama $5,24 \pm 2,07$ dakika, PVDF ortalama $9,06 \pm 1,51$ dakika.

Birçok çalışmada, yara sıvısında total protein ve albumin de çalışılmıştır. Moor ve diğ. çalışmasında, kronik venöz ülseri olan hastalarda Whatman 54 kağıt filtreler ile ortalama $50\mu\text{g}/\mu\text{L}$ total protein konsantrasyonu elde edilmiştir; ancak filtre kağıtlarının yara üzerinde bekletilme süresi belirtilmemiştir (119). Moseley ve diğ. çalışmasında ise satüre olana kadar yara üzerinde bekletilen Whatman 54 kağıt filtreler ile elde edilen örneklerde ortalama protein konsantrasyonunun 0.644 ± 0.153 mg/ml olduğu saptanmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen hasta grubu kronik venöz ülserli hastalardır (134). Schmidtchen'in çalışmasında ise, kronik venöz ülseri olan hastalarda Whatman GF/D filtreler yara üzerinde 4 saat bekletilmiştir; protein

konsantrasyonunun 10-32 g/l (ortalama 23 g/l) olduğu belirtilmiştir (154). PVDF yöntemi kullanılan bir çalışmada, hem akut (n=12) hem de kronik yaralarda (n=21) analizler yapılmıştır. Yirmi dakikayı aşmayacak şekilde satüre olana kadar yara üzerinde bekletilen PVDF ile elde edilen örneklerde NBYT uygulananlarda ortanca albumin değerinin 3.5 (1.0-6.1) g/L, konvansiyonel tedavi alanlarda ise 2.8 (0.8-5.4) g/L olduğu bildirilmiştir. Elde edilen yara sıvısı miktarı ya da total protein miktarı bildirilmemiştir (165). Edsberg ve diğ. çalışmasında ise polyester uçlu swablar yara üzerinde satüre olana kadar bekletilmiş ve yaranın merkezi-periferi arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda en az 4 haftadır iyileşmeyen bası yaraları mevcuttur. Yaradaki protein konsantrasyonunun iyileşen yaralarda merkezde 20.96 ± 1.3 mg/mL, periferde 10.28 ± 0.79 mg/mL olduğu; orta düzeyde kalan yaralarda merkezde 26.83 ± 2.1 mg/mL, periferde 15.99 ± 2.1 mg/mL; kronik kalan yaralarda ise merkezde 15.96 ± 0.89 mg/mL, periferde 10.22 ± 0.57 mg/mL olduğu görülmüştür (149). Swab yöntemi uygulanan diğer çalışmalarda, total protein yada albumin miktarı açıkça belirtilmemiştir (145,147,148). Çalışmamızda ise whatman yöntemi ile elde edilen ortalama total protein $1,190 \pm 0,9394$ g/L, albumin $0,530 \pm 0,7874$ g/L; PVDF yöntemi ile ortalama total protein $1,059 \pm 0,9090$ g/L, albumin $0,496 \pm 0,7101$ g/L; swab yönteminde ise ortalama total protein $0,976 \pm 0,8783$ g/L, albumin $0,517 \pm 0,7929$ g/L idi. Çalışmamızda elde edilen değerlerin diğer çalışmalara göre daha düşük olmasının sebeplerinden biri diğer çalışmalarda yöntemlerin yara üzerinde bekletilme sürelerinin daha uzun olması olabilir. Diğer bir neden ise; diğer çalışmalarda çoğunlukla hasta popülasyonunun bol eksüdalı olan venöz ülserli hastaları kapsamı olabilir. Bizim çalışmamızda (n=19) ise; kronik venöz ülseri olan sadece 4 hasta mevcuttu. Ayrıca, yara sıvısı örneği toplama işlemi esnasında ve sonrasında filtre kağıtları ve swabın ağırlıkları ölçülürken oda sıcaklığında beklemiş; ardından örnekler laboratuvara kadar geçen sürede $+4$ °C'de bekletilmiştir. Proteaz inhibitörü eklenmemiş olması nedeniyle, proteinlerin yıkımına bağlı olarak yara sıvısı protein düzeyleri daha düşük ölçülmüş olabilir.

Çalışmamızda, yara sıvısı ile satüre olan filtre kağıtları ve swab her defasında 5 mL PBS içerisinde ekstrakte edilmiştir; ancak elde edilen yara sıvısı ağırlıkları farklıdır. Her defasında daha az yara sıvısı elde eden swab yöntemi daha fazla sıvı elde eden diğer yöntemlerle eşit olarak 5 ml PBS içerisinde dilüe edilmektedir; yani diğer yöntemlere göre daha fazla dilüe olmaktadır. Bu nedenle, total protein ve albumin değerlerinin direk karşılaştırılması uygun değildir. Oluşan bu oransal dengesizliği ortadan kaldırmak için total protein (g/dL) ve albumin (g/dL) değerleri, uygulanan yara sıvısı elde etme yönteminin topladığı yara sıvısı ağırlığına (g) bölünerek yeni bir oran (g/dL/g yara sıvısı) elde edilmiştir. İstatistiksel analizlerde de bu oran kullanılmıştır. Bu oranlara göre whatman yöntemi ile elde edilen ortalama total protein $19,6 \pm 40,6$ g/dL/g yara sıvısı, ortalama albumin $8,0 \pm 16,4$ g/dL/g yara sıvısı; PVDF yöntemi ile elde edilen ortalama total protein $58,2 \pm 261,6$ g/dL/g yara sıvısı, ortalama albumin $45,3 \pm 252,7$ g/dL/g yara sıvısı; swab yöntemi ile elde edilen ortalama total protein $108,1 \pm 256,0$ g/dL/g yara sıvısı, ortalama albumin ise $90,4 \pm 375,8$ g/dL/g yara sıvısı idi. En az yara sıvısı toplayan yöntem olan swab yönteminin oransal olarak en fazla total protein ve albumini elde eden yöntem olduğu görülmektedir. Swab yöntemi, PVDF yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla total protein (g/dL/g yara sıvısı) elde etmiştir. Swab yöntemi ile elde edilen yara sıvısı, özellikle total protein konsantrasyonu açısından diğer yöntemlerden daha kalitelidir.

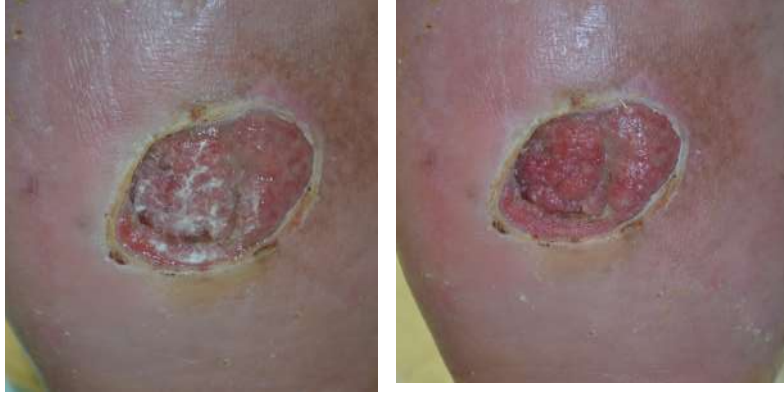
Yöntemlerin aynı hastalar/yaralar üzerinde karşılaştırıldığı çalışmalar az sayıdadır; bu çalışmalarda da karşılaştırılan yöntemler ve parametreler sıklıkla farklıdır. Broszczak ve diğ., hem swab yöntemi (Levine teknik) hem de aspirasyon yönteminde (30 dakika bekletilmiş) başarılı şekilde yara sıvısı protein profillerini analiz edebildiklerini bildirmiştir; ancak total protein değerleri detaylı şekilde verilmemiştir (148). Britland ve diğ. çalışmasında yara sıvısı örneği önce kapiller aspirasyon yöntemi ile toplanırken, klinik kullanımında hazır paketler halinde bulunan ve yeterli hacimde örnek toplayabildiği farkedilen Lasik swab yöntemine geçilmiştir (206). Schmohl ve diğ. çalışmasında, kronik yara sıvısı örneği naylon uçlu swab ve okluzif örtü

altında biriktirilen sıvının aspirasyonu ile elde edilmiştir. LDS-PAGE (lityum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez) analizinde swab tekniği ve aspirasyon yöntemi karşılaştırıldığında görülebilen protein kaybı olmadığı belirlenmiştir. Aksine swab yönteminde aspirasyon yöntemine göre daha fazla bant yoğunluğu olması nedeniyle swab yönteminin daha fazla protein elde ettiği görüşüne varılmıştır. Ayrıca yöntemler sitokin, kemokin ve MMP konsantrasyonlarına göre de karşılaştırılmış ve swab yönteminde analit kaybının olmadığı görülmüştür. Yazarlar, swab yöntemi ile hastaların %75'inde elde edilen 20 μ L yara sıvısının "*multipleks bead-based array*" analiz için yeterli bir hacim olduğunu göstermiştir. Sıklıkla az eksüdalı yaraya sahip olan diyabetik ayak ülseri olan hastalar için swab tekniğinin uygun olduğu görüşüne varılmıştır (147). Bu çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde swab yöntemiyle elde edilen örnekte daha fazla protein elde edildiği bildirilmektedir. Yazarlar, swab yöntemi uygulanırken daha etkin şekilde yara yüzeyinin silinmesi nedeniyle daha yüksek protein elde edilmiş olabileceğini öne sürmektedir (147). Levine teknik esnasında, minimal ve sabit bir basınç uygulanmaktadır. Ayrıca, 5 saniye boyunca devam edilen rotasyonel hareket esnasında swab çubuğunun fırça kısmının yara üzerinde oluşturduğu hafif irritasyon sebebiyle daha etkin konsantrasyonda sıvı elde edilmiş olabilir. Bunların yanısıra, kullandığımız swab çubuklarının kısa naylon (FLOQSwabs) fiberleri dikey olarak yerleştirilmiştir, elektrostatik bir alan oluşturur. Bu yapı, yüksek emiciliğe sahip açık yapıda ince bir katman meydana getirir. Bu yöntem, fiber iplikler arasındaki kapiller hareket ile güçlü hidrolük tutuş sağlamaktadır. Geleneksel fiber yara swab çubuklarının aksine, toplanan sıvıyı içeriye hapsedecek emici bir iç katman yoktur. Sıvı, fiber iplikler arasında yüzeye yakın şekilde tutulur. Bu da yara sıvısının ekstraksiyonunun daha kolay olmasını sağlar. Kullandığımız diğer yöntemlerde ise farklı por çaplarına sahip, protein bağlayıcılıkları farklı filtre kağıtları içerisine emdirilen yara sıvısı ekstrakte edilmektedir. Ayrıca çalışmamızda, tüm yöntemler için aynı ekstraksiyon işlemleri uygulanmıştır. Bir diğer sebep ise, filtre kağıtları ve swab yönteminin yara sıvısındaki hedef moleküllerle etkileşime girebilme olasılığı olabilir. Ancak, Schmohl ve diğ.

çalışmasında, daha fazla protein elde eden naylon uçlu swabların analitlerle olası etkileşiminin aspirasyon yöntemi sonuçlarıyla (LDS-PAGE) yapılan karşılaştırmalarında dışlandığı bildirilmiştir (147). Benzer şekilde Schmidtchen'in çalışmasında, Whatman GF/D filtre kağıdının plazma kaynaklı proteinler ile arasındaki etkileşim riskinin çoğu protein için düşük düzeyde olduğunu bildirilmiştir. Whatman GF/D filtre kağıdının major yara sıvısı komponentlerinin çalışılması için uygun bir metod olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak yazar, kontakt sistem proteinleri gibi moleküllerin negatif yüklü veya polar yüzeyler ile etkileşim sonucunda aktive olduklarına dikkat çekmiş ve bu özelliklerin ileride çalışılması gerektiğini belirtmiştir (154). PVDF ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

İdeal yara sıvısı elde etme yöntemi belirlenirken, biyokimyasal analiz sonuçlarının yanı sıra yöntemlerin uygulama pratiklikleri de önem kazanmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, Whatman filtre kağıtları yara üzerinde satüre olana kadar, 2 saat veya 4 saat bekletilmiştir (85,154,177). PVDF yöntemi kullanılan bir çalışmada ise 20 dakikayı aşmayacak şekilde satüre olana kadar yara üzerinde bekletilmiştir (165). Swab yöntemi kullanılan çalışmalarda ise daha çok 5 saniye süren Levine teknik kullanılmıştır (145,147,148). Edsberg ve diğ. ise swab çubuğunu satüre olana kadar yara üzerinde bekletmiştir (149). Bizim çalışmamızda da Whatman ve PVDF filtre kağıtları 10 dakikayı aşmayacak şekilde satüre olana kadar bekletilirken, swab yönteminde ise Levine teknik uygulanmıştır. Uygulaması oldukça kısa süren swab yöntemi, diğer yöntemlerden daha fazla miktarda total protein ve albumin elde etmiştir. Bunların yanında, çalışmamızda PVDF yöntemi uygulaması esnasında satüre olan filtre kağıdı bazı hastalarda yara üzerinden kaldırılırken, kağıdın küçük parçaları yara üzerine yapışmış ve çoğunlukla salin solüsyonuyla yıkadıktan sonra yara üzerinden kaldırılabilmıştır (Resim 5.1). Dolayısıyla, örnek kaybı olmuştur. Bu dezavantaj, yara sıvısı ağırlık hesaplamalarında da PVDF yönteminde daha düşük sonuçlara sebep olmuş olabilir. Whatman ve swab yöntemi bu açıdan daha pratiktir. Benzer şekilde PBS solüsyonu ile ekstraksiyon işlemi esnasında PVDF kağıdında ufak parçalanmalar olmuş ve solüsyon içerisine

dağılmıştır. Whatman ve swab için böyle bir durum söz konusu olmamıştır. Ayrıca, üç yöntemde de uygulama esnasında hastalar ağrı şikayeti dile getirmemiştir.



Resim 5.1. PVDF filtre kağıdı kaldırıldıktan sonra yara yüzeyine yapışmış olan parçalar ve salin solüsyonu ile yara temizlendikten sonraki hali

Diğer bir önemli konu ise, bazı yöntemlerin daha avantajlı olduğu özellikli uygulamalardır. Whatman ve PVDF filtre kağıtlarının boyutu değişken olduğu için klinik pratikte her zaman her yara boyutuna uygun paketlenmiş steril filtre kağıdı bulunamayabilir. Swab ise, standart olarak küçük boyuta sahip olduğu için, çok küçük alana sahip yaralarda da kolayca uygulanabilir. Ayrıca, uzun olması sebebiyle alanı küçük ancak derin olan yaralarda da kolaylıkla uygulanabilir. Diğer taraftan, swab yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, yara merkezi ve periferi arasında yara sıvısı analizlerinin farklılık gösterdiği saptanmıştır (149). Swab yöntemi küçük boyutu sayesinde daha spesifik bir bölgeden örnek elde ettiği için; yaranın çeşitli alanlarının farklılıklarını daha kolay ortaya koyabilir. Son olarak, Schmohl ve diğ. çalışmasında, swab çubuklarının örnek toplanmasından hemen sonra santrifüj yapılmadan dondurulması, santrifüj yapıldıktan sonra dondurulması ile karşılaştırılmıştır. Hızla dondurulan swab çubuğundan elde edilen örneklerin analizinde analit kaybı olmadığı gösterilmiştir. Ancak, yazarlar dondurma-çözdürme döngüsüne girecek olan analitlerin stabil olup olmadıklarının in vitro olarak kontrol edilmesi gerektiğini belirtmiştir (147). Bu

açından da günlük klinik rutinde hasta başında 5 saniyede swab yöntemi ile elde edilen örneğin, hiçbir işlem yapmadan hızla dondurularak analizlere kadar saklanabilmesi oldukça pratiktir.

Çalışmamızda bazı kısıtlılıklar mevcuttur. Hasta sayımızın az olması analiz sonuçlarımızın genellenebilirliğini azaltmaktadır. Çalışmanın başında her hasta için hedeflenen 3 ziyaret, ne yazık ki tamamlanamamıştır. Takipler esnasında 4 hasta diğer ziyaretlerine gelmedi; 3 hastada yara boyutu küçüldü ya da yara kapandı/kapatıldı; 3 hasta taburcu edildi; 2 hastada akıntı tamamen kesildi; 1 hastada ciddi enfeksiyon gelişti; 1 hastada ise uygulama yapılamadı. Bu sorunun 2 hafta olan ziyaret aralıklarının daha kısa tutulmasıyla düzeltilebileceği düşünülmektedir. Diğer kısıtlılık ise, yara sıvısı örnekleri toplanırken ve yara sıvısı ağırlıklarının ölçümü esnasında örneklerin oda sıcaklığında beklemesi ve proteaz inhibitörü eklenmemiş olmasıdır. Broszczak ve diğ. çalışmasında, kısa dönem (<24 saat) saklama sürecinde, örneklerin +24 °C 'de yada buz üzerinde saklanması için gros protein profillerinde görünür değişikliğe yol açmadığı gösterilmiş; ancak yazarlar, kısa süreli saklama sürecinde protein degradasyonunu önlemek için sıcaklığın +4 °C 'de veya buz üzerinde olmasını önermiştir. Ayrıca, uzun dönemde -80 °C 'de saklanan örneklerle proteaz inhibitör kokteyli eklenmesi tavsiye edilmemiştir (148).

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda hasta popülasyonumuz göz önünde bulundurularak pratik ve güvenilir olduğu öngörülen emici yöntemlerden Whatman GF/D filtre kağıdı, PVDF filtre kağıdı ve naylon uçlu swab yöntemi karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, swab yönteminin tekrarlanabilir olduğu ve dolayısı ile güvenilir sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bu yöntemin diğer yöntemlere göre daha az yara sıvısı elde ettiği görülmüştür. Buna rağmen swab yönteminin total protein ve albumin konsantrasyonları diğer yöntemlere göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca swab yönteminin diğer yöntemlere göre daha kısa sürede uygulanan pratik bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Cimşit M. Yara Tipleri ve Yara İyileşmesi. Cimşit M, editör. Hiperbarik Tıp. 1. basım. Ankara: Eflatun Yayınevi; 2009. p. 87–114.
2. Clark RAF. Wound Repair. Clark RAF, Henson PM, editörler. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. Boston, MA: Springer US; 1988. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1795-5>
3. Cullen B, Smith R, McCulloch E, Silcock D, Morrison I. Mechanism of action of Promogran, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen.*2002 Jan;10(1):16–25.
4. Schreml S, Meier RJ, Kirschbaum M, Kong SC, Gehmert S, Felthaus O, et al. Luminescent Dual Sensors Reveal Extracellular pH-Gradients and Hypoxia on Chronic Wounds That Disrupt Epidermal Repair. *Theranostics.* 2014;4(7):721–35.
5. James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP. Simple biochemical markers to assess chronic wounds. *Wound Repair Regen.*2000 Aug;8(4):264–9.
6. Fernandez M. A longitudinal assessment of chronic wound fluid to detect biochemical indicators of healing. Doktora tezi, Queensland Teknoloji Ünivrsitesi, 2010. <http://eprints.qut.edu.au/48703>
7. Fernandez ML, Broadbent JA, Shooter GK, Malda J, Upton Z. Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid. *Br J Dermatol* 2008;158(2):281–90.
8. Ramsay S, Cowan L, Davidson JM, Nanney L, Schultz G. Wound samples: moving towards a standardised method of collection and analysis. *Int Wound J* 2015;1-12. <http://doi.wiley.com/10.1111/iwj.12399>
9. Loffler MW, Schuster H, Buhler S, Beckert S. Wound Fluid in Diabetic Foot Ulceration: More Than Just an Undefined Soup? *Int J Low Extrem Wounds*2013;12(2):113–29.
10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Doku Onarımı: Rejenerasyon, İyileşme ve Fibrozis. ROBBINS Temel Patoloji. 8. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. sf. 59–80.

11. Heldin C-H, Westermark B. Role of Platelet-Derived Growth Factor in Vivo. Clark RAF, editör. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1988. sf. 249–73.
12. Björk J, Hugli TE, Smedegård G. Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol* 1985;134(2):1115–9.
13. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Akut ve Kronik İnflamasyon. *ROBBINS Temel Patoloji*. 8. Basım. İstanbul; 2008. sf. 31–58.
14. Brown EJ. Phagocytosis. *Bioessays*. 1995;17(2):109–17.
15. Hunt TK, Hopf HW. Wound healing and wound infection. What surgeons and anesthesiologists can do. *Surg Clin North Am*. 1997 Jun;77(3):587–606.
16. Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Christopher Ellison E, Roy S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem*. 2002;277(36):33284–90.
17. Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther*. 2006;13(1):211–20.
18. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401(6748):79–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485709>
19. Allen DB, Maguire JJ, Mahdavian M, Wicke C, Marcocci L, Scheuenstuhl H, et al. Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg* 1997;132(9):991–6.
20. Heppenstall RB, Littooy FN, Fuchs R, Sheldon GF, Hunt TK. Gas tensions in healing tissues of traumatized patients. *Surgery* 1974;75(6):874–80.
21. Zabel DD, Feng JJ, Scheuenstuhl H, Hunt TK, Hussain MZ. Lactate stimulation of macrophage-derived angiogenic activity is associated with inhibition of Poly(ADP-ribose) synthesis. *Lab Invest*. 1996;74(3):644–9.
22. Silver IA. Cellular microenvironment in healing and non-healing

- wounds. Hunt TK, Heppenstall RB, Pines E, editörler. *Soft and Hard Tissue Repair*. New York: Praeger; 1984. sf. 50–66.
23. Falcone PA, Caldwell MD. Wound metabolism. *Clin Plast Surg* 1990;17(3):443–56.
 24. Jonsson K, Jensen J a, Goodson WH, Scheuenstuhl H, West J, Hopf HW, et al. Tissue oxygenation, anemia, and perfusion in relation to wound healing in surgical patients. *Ann Surg*. 1991;214(5):605–13.
 25. Hopf HW, Hunt TK, West JM, Blomquist P, Goodson 3rd WH, Jensen JA, Johnson K, Paty PB, Rabkin JM, Upton RA, von Smitten K, Whitney JD. Wound tissue oxygen tension predicts the risk of wound infection in surgical patients. *Arch Surg* 1997;132(9):997–1004.
 26. Chang N, Mathes SJ. Comparison of the effect of bacterial inoculation in musculocutaneous and random-pattern flaps. *Plast Reconstr Surg* 1982;70(1):1–10.
 27. Caldwell MD, Shearer J, Morris A, Mastrofrancesco B, Henry W, Albina JE. Evidence for aerobic glycolysis in lambda-carrageenan-wounded skeletal muscle. *J Surg Res*. 1984;37(1):63–8.
 28. Trabold O, Wagner S, Wicke C, Scheuenstuhl H, Hussain MZ, Rosen N, Seremetiev A, Becker HD, Hunt TK. Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2003;11(6):504–9.
 29. Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;338(1):610–6.
 30. Hopf HW, Kelly M, Shapshak D. Oxygen and the Basic Mechanisms of Wound Healing. Neumann TS, Thom SR, editörler. *Physiology and Medicine of Hyperbaric Oxygen Therapy*. 1. edisyon. USA: Elsevier; 2008. sf. 203–28.
 31. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994;298:249–58.
 32. Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing.

- Am J Physiol 1997;272(2 Pt 1):E181–90.
33. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D., Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(16):7674–7.
 34. Schwentker A, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair. *Surg Clin North Am* 2003;83(3):521–30.
 35. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Feb 27;98(5):2604–9.
 36. Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, Theile DR, Romero R, Messina A, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *Br J Pharmacol* 2001;132(8):1631–8.
 37. Noiri, E, Peresleni T, Srivastava N, Weber P, Bahou W, Peunova N, Goligorsky MS. Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells. *Am J Physiol.* 2005;270(3Pt1):C794–802.
 38. Pollock JS, Webb W, Callaway D, O'Brien W, Howdieshell TR. Nitric oxide synthase isoform expression in a porcine model of granulation tissue formation. *Surgery* 2001;129(3):341–50.
 39. Shi H, Most D, Efron D, Witte M, Barbul A. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2003;11:198–203.
 40. Hunt TK, Aslam RS, Beckert S, Wagner S, Ghani QP, Hussain MZ, Roy S, Sen CK. Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(8):1115–24.
 41. Velazquez OC. Angiogenesis and vasculogenesis: Inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg.* 2007;45(6 SUPPL.):39–47.

42. Capla JM, Ceradini DJ, Tepper OM, Callaghan MJ, Bhatt K a, Galiano RD, et al. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(3):836–44.
43. Schultz GS, Grant MB. Neovascular growth factors. *Eye (Lond)* 1991;5 (Pt 2):170–80.
44. Li B, Wang JH-C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *J Tissue Viability* 2011 Nov;20(4):108–20.
45. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):C1–9.
46. De Jong L, Kemp A. Stoichiometry and kinetics of the prolyl 4-hydroxylase partial reaction. *Biochim Biophys Acta* 1984;787(1):105–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6326839>
47. Myllylä R, Tuderman L, Kivirikko KI. Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 2. Kinetic analysis of the reaction sequence. *Eur J Biochem* 1977;80(2):349–57.
48. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med* 1979;301(1):13–23.
49. Uitto J, Prockop DJ. Synthesis and secretion of under-hydroxylated procollagen at various temperatures by cells subject to temporary anoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;60(1):414–23.
50. Hopf HW, Gibson JJ, Angeles AP, Constant JS, Feng JJ, Rollins MD, et al. Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 2005;13(6):558–64.
51. Knighton DR, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Halliday BJ, Werb Z, Banda MJ. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science.*1983;221(4617):1283–5.
52. Constant JS, Feng JJ, Zabel DD, Yuan H, Suh DY, Scheuenstuhl H,

- Hunt TK, Zamirul HM. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: A possible alternative to hypoxia. *Wound Repair Regen.* 2000;8(5):353–60.
53. Laato M, Heino J, Gerdin B, Kähäri VM, Niinikoski J. Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro. *Ann Chir Gynaecol.* 2001;90 Suppl 2:19–23.
 54. Wagner S, Hussain MZ, Beckert S, Ghani QP, Weinreich J, Hunt TK, Becker HT, Königsrainer A. Lactate down-regulates cellular poly(ADP-ribose) formation in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(2):134–9.
 55. Ghani QP, Wagner S, Hussain MZ, Hunt TK. Role of ADP-ribosylation in wound repair. The contributions of Thomas K. Hunt, MD. *Wound Repair and Regeneration.* 2003;11(6):439–44.
 56. Semenza GL. Regulation of tissue perfusion in mammals by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol.* 2007;92(6):988–91.
 57. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5510–4.
 58. Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 2005;280(51):41928–39.
 59. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23111–5.
 60. Beckert S, Hierlemann H, Müschenborn N, Witte M, Ranke M, Coerper S. Experimental ischemic wounds: Correlation of cell proliferation and insulin-like growth factor I expression and its modification by different local IGF-I release systems. *Wound Repair Regen.* 2005;13(3):278–83.
 61. Doughty DB. Preventing and managing surgical wound dehiscence. *Adv Skin Wound Care.* 2005;18(6):319–22.
 62. Broadbent J, Walsh T, Upton Z. Proteomics in chronic wound research:

- Potentials in healing and health. *PROTEOMICS - Clin Appl.* 2010;4(2):204–14.
63. Walker N, Rodgers A, Birchall N, Norton R, MacMahon S. Leg ulcers in New Zealand: Age at onset, recurrence and provision of care in an urban population. *N Z Med J.* 2002;115(1156):286–9.
 64. Posnett J, Franks PJ. The burden of chronic wounds in the UK. *Nurs Times.* 2008;104(3):44–5.
 65. Gillespie DL, Kistner B, Glass C, Bailey B, Chopra A, Ennis B, Marston B, Masuda E, Moneta G, Nelzen O, Raffetto J, Raju S, Vedantham S, Wright D, Falanga V. Venous ulcer diagnosis, treatment, and prevention of recurrences. *J Vasc Surg.* 2010;52(5 Suppl):8S – 14S.
 66. Rice JB, Desai U, Cummings AKG, Birnbaum HG, Skornicki M, Parsons N. Burden of venous leg ulcers in the United States. *J Med Econ* 2014;17(5):347–56.
 67. Rice JB, Desai U, Cummings AKG, Birnbaum HG, Skornicki M, Parsons NB. Burden of diabetic foot ulcers for medicare and private insurers. *Diabetes Care.* 2014;37(3):651–8.
 68. Russo A, Steiner C, Spector W. Hospitalizations Related to Pressure Ulcers among Adults 18 Years and older, 2004. *Healthc Cost Util Proj.* 2008;64:1–9.
 69. Jawień A, Szewczyk MT, Kędziora-Kornatowska K, Mościcka P, Cierzniakowska K, Cwajda J, et al. Functional and biopsychosocial restrictions among patients with a venous ulcer. *Arch Med Sci.* 2006;2(1):36–41.
 70. Driscoll P. Incidence and prevalence of wounds by etiology. *MedMarket Diligence S249.* 2009.
 71. Rayner R, Carville K, Keaton J PJ& SN. Leg ulcers: atypical presentations and associated comorbidities. *Wound Pract Res.* 2009;17(4):168–85.
 72. Baker SR, Stacey MC. Epidemiology of chronic leg ulcers in Australia. *Aust N Z J Surg.* 1994;64(4):258–61.
 73. Welfare AI of H and. Older Australia at a glance. 2007;(November):Cat.

no. AGE 52.

<http://www.aihw.gov.au/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=644245420>

74. Sen CK, Roy S. 14 - Wound healing. 3. Edisyon. Plastic Surgery. Elsevier Inc.; 2013. 240-266.e5 p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-1733-4.00114-2>
75. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC. Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Arch Dermatol* 1994 Apr 1;130(4):489–93. 1994.01690040093015
76. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care*. 2000;13(2 Suppl):6–11.
77. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen*. 1999 Nov;7(6):442–52.
78. Mast B a, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1996;4(4):411–20.
79. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen*. 1996;4(3):321–5.
80. Yager DR, Nwomeh BC. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1999 Nov;7(6):433–41.
81. Wagner S, Coerper S, Fricke J, Hunt TK, Hussain Z, Elmlinger MW, Mueller JE, Becker HD. Comparison of inflammatory and systemic sources of growth factors in acute and chronic human wounds. *Wound Repair Regen*. 2003;11(4):253–60.
82. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):165–71.
83. Bucalo B, Eaglstein WH, Falanga V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Repair Regen*. 1993;1(3):181–6.
84. Katz MH, Alvarez AF, Kirsner RS, Eaglstein WH, Falanga V. Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial

- cell growth. *J Am Acad Dermatol.* 1991;25(6):1054–8.
85. Moseley R, Hilton JR, Waddington RJ, Harding KG, Stephens P, Thomas DW. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen.* 2004 Aug;12(4):419–29.
 86. Wenk J. Stable Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase in Mitochondria Identifies Hydrogen Peroxide as a Major Oxidant in the AP-1-mediated Induction of Matrix-degrading Metalloprotease-1. *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25869–76.
 87. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Impediments to wound healing. *Am J Surg.* 1998 Aug;176(2A Suppl):39S – 47S.
 88. Rayment EA, Upton Z. Finding the culprit: a review of the influences of proteases on the chronic wound environment. *Int J Low Extrem Wounds* 2009 Mar 3;8(1):19–27.
 89. Simon DA, Dix FP, McCollum CN. Management of venous leg ulcers. *BMJ Br Med J.* BMJ Publishing Group Ltd.; 2004;328(2):1358–62.
 90. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv Ther* 2014;31(8):817–36.
 91. Fahey TJ, Sadaty A, Jones WG, Barber A, Smoller B, Shires GT. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *J Surg Res.* 1991;50(4):308–13.
 92. Lecube A, Pachón G, Petriz J, Hernández C, Simó R. Phagocytic Activity Is Impaired in Type 2 Diabetes Mellitus and Increases after Metabolic Improvement. Sesti G, editor. *PLoS One* 2011;6(8):e23366.
 93. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 2006 Jun;23(6):594–608.
 94. Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. Altered Fibroblast Proliferation and Apoptosis in Diabetic Gingival Wounds. *J Dent Res.* 2010 Jun 1;89(6):609–14.
 95. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007 May 1;117(5):1219–22.

96. Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE. Keratinocyte Migration, Proliferation, and Differentiation in Chronic Ulcers From Patients With Diabetes and Normal Wounds. *J Histochem Cytochem* 2008;56(7):687–96.
97. Ochoa O, Torres FM, Shireman PK. Chemokines and Diabetic Wound Healing. *Vascular*.2007 Dec 1;15(6):350–5.
98. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJM, Ferguson MWJ. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 2002 Jun;19(6):440–7.
99. Cianfarani F, Toietta G, Di Rocco G, Cesareo E, Zambruno G, Odorisio T. Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013 Jul;21(4):545–53.
100. Saito H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Diabetes alters subsets of endothelial progenitor cells that reside in blood, bone marrow, and spleen. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(6):C892–901.
101. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(9):1449–57.
102. Desouza C V., Hamel FG, Bidasee K, O'Connell K. Role of inflammation and insulin resistance in endothelial progenitor cell dysfunction. *Diabetes*. 2011;60(4):1286–94.
103. Drela E, Stankowska K, Kulwas A, Rość D. Endothelial progenitor cells in diabetic foot syndrome. *Adv Clin Exp Med* 2012;21(2):249–54.
104. Pradhan L, Nabzdyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e2.
105. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care* 2012 Jul;25(7):304–14.

106. Drinkwater SL, Smith A, Burnand KG. What can wound fluids tell us about the venous ulcer microenvironment? *Int J Low Extrem Wounds* 2002;1(3):184–90.
107. Staiano-Coico L, Higgins PJ, Schwartz SB, Zimm AJ, Goncalves J. Wound fluids: a reflection of the state of healing. *Ostomy Wound Manage.*2000;46(1A Suppl):85S – 93S; quiz 94S – 95S.
108. Russell L. Understanding physiology of wound healing and how dressings help. *Br J Nurs.* 2000;9(1):10–2, 14, 16 passim.
109. Cutting KF. Wound exudate: composition and functions. *Br J Community Nurs* 2003;8(Sup3):S4–9.
110. Holzheimer RG, Steinmetz W. Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds. *Eur J Med Res.* 2000;5(8):347–55.
111. Widgerow AD. Chronic wound fluid-thinking outside the box. *Wound Repair Regen.*2011 May;19(3):287–91.
112. Loffler M, Schmohl M, Schneiderhan-Marra N, Beckert S. Wound Fluid Diagnostics in Diabetic Foot Ulcers.Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations *InTech*; 2011. <http://cdn.intechweb.org/pdfs/24688.pdf>
113. Eming SA, Koch M, Krieger A, Brachvogel B, Kreft S, Bruckner-Tuderman L, Krieg T Shannon JD, Fox JW.Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. *J Proteome Res.* 2010;9(9):4758–66.
114. Spear M. Wound Exudate—The Good, the Bad, and the Ugly. *Plast Surg Nurs* 2012;32(2):77–9.
115. Ratliff CR. Wound exudate: an influential factor in healing. *Adv Nurse Pract* 2008 Jul;16(7):32–5; quiz 36.
116. Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 1996;4(2):234–9.
117. World Union of Wound Healing Societies. Principles of best practice: wound exudate and the role of dressings. A consensus document.

London; 2007.

118. Liu Y, Min D, Bolton T, Nubé V, Twigg SM, Yue DK, et al. Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care*. 2009;32:117–9.
119. Moor AN, Vachon DJ, Gould LJ. Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2009;17(6):832–9.
120. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn ; M Ann, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. 2002; 10(1):26-37.
121. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen*. 2003;11(s1):S1–28.
122. Falanga V, Grinnell F, Gilchrest B, Maddox YT, Moshell A. Workshop on the Pathogenesis of Chronic Wounds. *J Invest Dermatol*. 1994;102(1):125–7.
123. Alper JC, Tibbetts LL, Sarazen AA. The In Vitro Response of Fibroblasts to the Fluid That Accumulates Under a Vapor-Permeable Membrane. *J Invest Dermatol*. 1985;84(6):513–5.
124. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound Fluid from Chronic Leg Ulcers Contains Elevated Levels of Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol*. 1993;101(1):64–8.
125. Ulrich D, Lichtenegger F, Unglaub F, Smeets R, Pallua N. Effect of Chronic Wound Exudates and MMP-2/-9 Inhibitor on Angiogenesis In Vitro. *Plast Reconstr Surg* 2005;116(2):539–45.
126. Tarlton JF, Bailey AJ, Crawford E, Jones D, Moore K, Harding KD. Prognostic value of markers of collagen remodeling in venous ulcers. *Wound Repair Regen* 1999;7(5):347–55.
127. Fette AM. A clinimetric analysis of wound measurement tools. 2006. <http://www.worldwidewounds.com/2006/january/Fette/Clinimetric-Analysis-Wound-measurement-tools.html>

128. Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF, Entero H, Lee B, Pastar I, Golinko M, Rosenberg H, Tomic-Canic M. Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement. *Mol Med.* 2007;13(1-2):30–9.
129. Deonaraine K, Panelli MC, Stashower ME, Jin P, Smith K, Slade HB, Noorwood C, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. Gene expression profiling of cutaneous wound healing. *J Transl Med.* 2007;5(1):11.
130. Bamberg R, Sullivan PK, Conner-Kerr T. Diagnosis of wound infections: Current culturing practices of US wound care professionals. *Wounds-a Compend Clin Res Pract.*2002;14:314–28.
131. Bonham PA. Swab cultures for diagnosing wound infections: a literature review and clinical guideline. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2009;36(4):389–95.
132. Hansson C, Hoborn J, Moller A, Swanbeck G. The microbial flora in venous leg ulcers without clinical signs of infection. Repeated culture using a validated standardised microbiological technique. *Acta Derm Venereol.*1995;75(1):24–30.
133. Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 2008;8(1):43.
134. Moseley R, Stewart JE, Stephens P, Waddington RJ, Thomas DW. Extracellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid: Lessons learned from other inflammatory diseases? *British Journal of Dermatology.* 2004. p. 401–13.
135. Dvonch VM, Murphey RJ, Matsuoka J, Grotendorst GR. Changes in growth factor levels in human wound fluid. *Surgery.* 1992;112(1):18–23.
136. Hoffman R, Starkey S, Coad J. Wound fluid from venous leg ulcers degrades plasminogen and reduces plasmin generation by keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1140–4.
137. Nissen NN, Polverini PJ, Koch a E, Volin M V, Gamelli RL, DiPietro L

- a. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol.* 1998;152(6):1445–52.
138. Iizaka S, Sanada H, Minematsu T, Oba M, Nakagami G, Koyanagi H, et al. Do nutritional markers in wound fluid reflect pressure ulcer status? *Wound Repair Regen* [Internet]. 2010 Jan;18(1):31–7.
139. Fernandez ML, Upton Z, Edwards H, Finlayson K, Shooter Fernandez ML GK. Elevated uric acid correlates with wound severity. *Int Wound J.* 2012;9:139–49.
140. Yeoh-Ellerton S, Stacey MC. Iron and 8-Isoprostane Levels in Acute and Chronic Wounds. *J Invest Dermatol.* 2003;121:918–25.
141. Minematsu T, Nakagami G, Yamamoto Y, Kanazawa T, Huang L, Koyanagi H, Sasaki S, Uchida G, Fujita H, Haga N, Yoshimura K, Nagase T, Sanada H. Wound blotting: A convenient biochemical assessment tool for protein components in exudate of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2013 Mar;21(2):329–34.
142. Gohel MS, Windhaber RAJ, Tarlton JF, Whyman MR, Poskitt KR. The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. *J Vasc Surg.* 2008;48(5):1272–7.
143. Ono I, Gunji H, Zhang J-Z, Maruyama K, Kaneko F. Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid. *J Dermatol Sci* 1995;10(3):241–5.
144. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* 2008;25(25):419–26.
145. Löffler M, Zieker D, Weinreich J, Löb S, Königsrainer I, Symons S, et al. Wound fluid lactate concentration: a helpful marker for diagnosing soft-tissue infection in diabetic foot ulcers? Preliminary findings. *Diabet Med* 2011;28(2):175–8.
146. Serena TE. Development of a Novel Technique to Collect Proteases from Chronic Wounds. *Adv Wound Care* 2014 Dec;3(12):729–32.

147. Schmohl M, Beckert S, Joos TO, Konigsrainer A, Schneiderhan-Marra N, Loffler MW. Superficial Wound Swabbing: A novel method of sampling and processing wound fluid for subsequent immunoassay analysis in diabetic foot ulcerations. *Diabetes Care* 2012;35(11):2113–20.
148. Broszczak D, Stupar D, Compay A, Sharma M, Parker T, Shooter G, et al. Biochemical profiling of proteins and metabolites in wound exudate from chronic wound environments. *Wound Pract Res.* 2012;20(2):62–72.
149. Edsberg LE, Wyffels JT, Brogan MS, Fries KM. Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 2012;20:378–401.
150. Cooper DM, Yu EZ, Hennessey P, Ko F, Robson MC. Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* 1994;219(6):688–91; discussion 691–2.
151. Weckroth M, Vaheiri A, Lauharanta J, Sorsa T, Kontinen YT. Matrix Metalloproteinases, Gelatinase and Collagenase, in Chronic Leg Ulcers. *J Invest Dermatol.*1996;106(5):1119–24.
152. Simonsen L, Holstein P, Larsen K, Bülow J. Glucose metabolism in chronic diabetic foot ulcers measured in vivo using microdialysis. *Clin Physiol* 1998;18(4):355–9.
153. Clough G, Noble M. Microdialysis—A Model for Studying Chronic Wounds. *Int J Low Extrem Wounds.* 2003 Dec 1;2(4):233–9.
154. Schmidtchen A. Chronic ulcers: a method for sampling and analysis of wound fluid. *Acta Derm Venereol* 1999 Jul 24;79(4):291–5.
155. Clough GF. Microdialysis of large molecules. *AAPS J* 2005 Sep;7(3):E686–92.
156. Stenken JA, Church MK, Gill CA, Clough GF. How minimally invasive is microdialysis sampling? A cautionary note for cytokine collection in human skin and other clinical studies. *AAPS J* 2010 Mar 1;12(1):73–8.
157. Mellergård P, Åneman O, Sjögren F, Pettersson P, Hillman J. Changes in extracellular concentrations of some cytokines, chemokines, and

- neurotrophic factors after insertion of intracerebral microdialysis catheters in neurosurgical patients. *Neurosurgery* 2008 Jan;62(1):151–7.
158. Ambrosch A, Lobmann R, Pott A, Preißler J. Interleukin-6 concentrations in wound fluids rather than serological markers are useful in assessing bacterial triggers of ulcer inflammation. *Int Wound J* 2008 Jan 3;5(1):99–106.
 159. Schilling JA, Favata BV, Radakovich M. Studies of fibroplasia in wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 1953;96(2):143–9.
 160. Hunt TK, Twomey P, Zederfeldt B, Dunphy JE. Respiratory gas tensions and pH in healing wounds. *Am J Surg*.1967;114(2):302–7.
 161. Schilling JA, Joel W, Shurley HM. Wound healing: a comparative study of the histochemical changes in granulation tissue contained in stainless steel wire mesh and polyvinyl sponge cylinders. *Surgery* 1959;46:702–10.
 162. Yager DR, Kulina RA, Gilman LA. Wound fluids: a window into the wound environment? *Int J Low Extrem Wounds*. 2007;6(4):262–72.
 163. Labler L, Rancan M, Mica L, Härter L, Mihic-Probst D, Keel M. Vacuum-assisted closure therapy increases local interleukin-8 and vascular endothelial growth factor levels in traumatic wounds. *J Trauma*.2009;66(3):749–57.
 164. Dealey C, Cameron J, Arrowsmith M. A study comparing two objective methods of quantifying the production of wound exudate. *J Wound Care* 2006 ;15(4):149–53.
 165. Mouës CM, van Toorenenbergen AW, Heule F, Hop WC, Hovius SER. The role of topical negative pressure in wound repair: expression of biochemical markers in wound fluid during wound healing. *Wound Repair Regen* 2008 Jul;16(4):488–94.
 166. Yager DR, Chen SM, Ward SI, Olutoye OO, Diegelmann RF, Kelman Cohen I. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair Regen*

- 1997;5(1):23–32.
167. Wysocki AB, Grinnell F. Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest.* 1990;63(6):825–31.
 168. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound repair Regen Off Publ Wound Heal Soc [and] Eur Tissue Repair Soc .* 2000;8(1):13–25.
 169. Drinkwater SL, Smith A, Sawyer BM, Burnand KG. Effect of venous ulcer exudates on angiogenesis in vitro. *Br J Surg.* 2002;89:709–13.
 170. Amano S, Akutsu N, Ogura Y, Nishiyama T. Increase of laminin 5 synthesis in human keratinocytes by acute wound fluid, inflammatory cytokines and growth factors, and lysophospholipids. *Br J Dermatol.* 2004;151(5):961–70.
 171. Wysocki a B. Wound fluids and the pathogenesis of chronic wounds. *WOCN.* 1996;23(6):283-90.
 172. Yager DR, Zhang L-Y, Liang H-X, Diegelmann RF, Cohen IK. Wound Fluids from Human Pressure Ulcers Contain Elevated Matrix Metalloproteinase Levels and Activity Compared to Surgical Wound Fluids. *J Invest Dermatol* 1996;107(5):743–8.
 173. Wallace HJ, Stacey MC. Levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF receptors in chronic venous leg ulcers--correlations to healing status. *J Invest Dermatol* 1998;110(3):292–6.
 174. Wysocki a B, Kusakabe a O, Chang S, Tuan TL. Temporal expression of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and gelatinase-B in chronic wound fluid switches from a chronic to acute wound profile with progression to healing. *Wound Repair Regen.* 1999;7(3):154–65.
 175. Ono I, Gunji H, Suda K, Iwatsuki K, Kaneko F. Evaluation of Cytokines in Donor Site Wound Fluids. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1994;28(4):269–73.
 176. Cao Y, Croll TI, Rizzi SC, Shooter GK, Edwards H, Finlayson K, et al. A peptidomimetic inhibitor of matrix metalloproteinases containing a

- tetherable linker group. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2011;96 A(4):663–72.
177. Schmidtchen A. Degradation of Antiproteinases, Complement and Fibronectin in Chronic Leg Ulcers: Investigative Report. *Acta Derm Venereol*. 2000 Aug 7;80(3):179–84.
 178. Oredsson SU, Gottrup F, Beckmann A, Hohn DC. Activation of chemotactic factors in serum and wound fluid by dextranomer. *Surgery* 1983;94(3):453–7.
 179. Fivenson DP, Faria DT, Nickoloff BJ, Poverini PJ, Kunkel S, Burdick M, et al. Chemokine and inflammatory cytokine changes during chronic wound healing. *Wound Repair Regen*. 1997 Oct;5(4):310–22.
 180. Seah CC, Phillips TJ, Howard CE, Panova IP, Hayes CM, Asandra AS, et al. Chronic wound fluid suppresses proliferation of dermal fibroblasts through a Ras-mediated signaling pathway. *J Invest Dermatol* 2005;124(2):466–74.
 181. Mizokami F, Murasawa Y, Furuta K, Isogai Z. Iodoform Gauze Removes Necrotic Tissue from Pressure Ulcer Wounds by Fibrinolytic Activity. *Biol Pharm Bull* 2012;35(7):1048–53.
 182. Hardwicke J, Moseley R, Stephens P, Harding K, Duncan R, Thomas DW. Bioresponsive Dextrin–rhEGF Conjugates: In Vitro Evaluation in Models Relevant to Its Proposed Use as a Treatment for Chronic Wounds. *Mol Pharm* 2010 Jun 7;7(3):699–707.
 183. Debats IBJG, Booi DI, Wehrens KME, Cleutjens J, Deutz NEP, van de Hogen E, et al. Oral Arginine Supplementation and the Effect on Skin Graft Donor Sites: A Randomized Clinical Pilot Study. *J Burn Care Res* 2009 May;30(3):417–26.
 184. Steinsträßer L, Jacobsen F, Hirsch T, Kesting M, Chojnacki C, Krisp C, et al. Immunodepletion of high-abundant proteins from acute and chronic wound fluids to elucidate low-abundant regulators in wound healing. *BMC Res Notes* 2010;3(1):335.
 185. Ciantar M, Caruana DJ. Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *J Periodontal Res* 1998;33(5):259–64.

186. Garnick JJ, Pearson R, Harrell D. The evaluation of the periotron. *J Periodontol.*1979;50(8):424–6.
187. van der Bijl P, Dreyer WP, Grobler SR. The periotron gingival crevicular fluid meter. An assessment of three different instruments. *J Periodontal Res.*1986 Jan;21(1):39–44.
188. Rakmanee T, Olsen I, Griffiths S, Donos N. Development and validation of a multiplex bead assay for measuring growth mediators in wound fluid. 2010;135(1):182–8.
189. Bank U, Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol* 2001;69(2):197–206.
190. Zillmer R, Trøstrup H. Duration of wound fluid secretion from chronic venous leg ulcers is critical for interleukin-1 a , interleukin-1 b , interleukin-8 levels and fibroblast activation. 2011;303(8):601–6.
191. Butterfield LH, Potter DM, Kirkwood JM. Multiplex serum biomarker assessments: technical and biostatistical issues. *J Transl Med* 2011;9(1):173.
192. Hayward RM, Kirk MJ, Sproull M, Scott T, Smith S, Cooley-Zgela T, et al. Post-collection, pre-measurement variables affecting VEGF levels in urine biospecimens. *J Cell Mol Med* 2008;12(1):343–50.
193. Kisand K, Kerna I, Kumm J, Jonsson H, Tamm A. Impact of cryopreservation on serum concentration of matrix metalloproteinases (MMP)-7, TIMP-1, vascular growth factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank samples. *Clin Chem Lab Med* 2011 Jan 1;49(2):229–35.
194. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: Towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics.* 2005; 5(13):3262-77.
195. Yang J, Dombrowski SM, Deshpande A, Krajcir N, El-Khoury S, Krishnan C, et al. Stability analysis of vascular endothelial growth factor in cerebrospinal fluid. *Neurochem Res.* 2011;36(11):1947–54.
196. De Bock M. Challenges for Biomarker Discovery in Body Fluids Using

SELDI-TOF-MS. *J Biomed Biotechnol.* 2010.

<http://dx.doi.org/10.1155/2010/906082>

197. Mitchell BL, Yutaka Y, Li CI, Fitzpatrick AL, Lampe PD. Impact of Freeze-thaw Cycles and Storage Time on Plasma Samples Used in Mass Spectrometry Based Biomarker Discovery Projects. *Cancer Inform.* 2005;1:98–104.
198. Goebel-Stengel M, Stengel A, Tache Y, Reeve JR. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem.* 2011;414(1):38–46.
199. de Jager W, Bourcier K, Rijkers GT, Prakken BJ, Seyfert-Margolis V. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunol.* 2009; 10 (1):52.
200. Smith E, Hoffman R. Multiple fragments related to angiostatin and endostatin in fluid from venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2005 Mar;13(2):148–57.
201. Wyffels JT, Fries KM, Randall JS, Ha DS, Ludwig CA, Brogan MS, et al. Analysis of pressure ulcer wound fluid using two-dimensional electrophoresis. *Int Wound J* 2010 May 18;7(4):236–48.
202. Valleala H, Hanemaaijer R, Mandelin J, Salminen A, Teronen O, Mönkkönen J, et al. Regulation of MMP-9 (gelatinase B) in activated human monocyte/macrophages by two different types of bisphosphonates. *Life Sci* 2003;73(19):2413–20.
203. Tate J, Ward G. Interferences in Immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004;25(2):105–20.
204. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2001 Mar;69(3):89–95.
205. Boykin J V. Wound nitric oxide bioactivity: a promising diagnostic indicator for diabetic foot ulcer management. *J Wound Ostomy Continence Nurs* [Internet]. 2010 Jan;37(1):25–32; quiz 33–4.
206. Britland S, Ross-Smith O, Jamil H, Smith AG, Vowden K, Vowden P. The lactate conundrum in wound healing: Clinical and experimental

findings indicate the requirement for a rapid point-of-care diagnostic.
Biotechnol Prog 2012 Jul;28(4):917–24.