

Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Ratlarda Kolon Anastomozu İyileşmesi Üzerine Etkisi

LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN EFFECT ON COLONIC ANASTOMOSIS HEALING IN RATS

Dr. Ergün ERDEM¹, Dr. Faruk Önder AYTEKİN¹, Dr. Koray TEKİN¹, Dr. İmdat KOÇBERBER¹,
Dr. Yıldız GÜNEY², Dr. Uğur SUNGURTEKİN¹, Dr. Akın ÖZDEN¹

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD, Denizli

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Ankara

ÖZET

Amaç: Derin ven trombozu (DVT) profilaksisi ve tedavisinde kullanılan düşük molekül ağırlıklı heparinin (DMAH) kolon anastomozunun iyileşmesi üzerine etkisinin olup olmadığını saptamaktır.

Durum Değerlendirmesi: Faktör Xa üzerinden yaptığı etkiyle yara iyileşmesinin bir fazı olan koagülasyonu engelleyen DMAH'nin yara iyileşmesini ve belki de daha önemli olarak, örneğin barsak anastomozu yapılan bir hasta-
da anastomoz güvenliğini olumsuz yönde etkileyip etkilemediği sorusunun literatürde net bir yanıtı bulunmamaktadır.

Yöntem: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nde her biri 10 rattan oluşan üç gruba ayrılan toplam 30 adet albino Wistar tipi ratta yapılan çalışmada, 1. gruba sadece kolon anastomozu, 2. gruba kolon anastomozu + tek doz DMAH, 3. gruba kolon anastomozu + 6 gün boyunca DMAH uygulandı. Ameliyat sonrası altıncı günde hayvanların anastomoz patlama basınçları ve doku hidroksiprolin düzeylerine bakıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA testi ile karşılaştırıldı.

Çıkarımlar: Gruplar arasında anastomoz patlama basınçları ve doku hidroksiprolin seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (P>0.05).

Sonuç: Gerek tek doz, gerekse altı gün boyunca uygulanan DMAH'nin kolon anastomoz iyileşmesini etkilemediği ve kolon anastomozu uygulanan hastalarda güvenle kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: düşük molekül ağırlıklı heparin, yara iyileşmesi, kolon anastomozu, patlama basıncı, hidroksiprolin

SUMMARY

The aim was to evaluate the effects of low molecular weight heparin (LMWH) on healing of colonic anastomosis in rats.

In the experimental animal model, thirty male Wistar-albino rats were randomized into three groups consisting of ten rats each. All were anesthetized with ketamin and xylazine, celiotomy and left colonic anastomosis were performed on each animal. In the first group, no medication was given pre or postoperatively. In the second group, single dose of LMWH was given preoperatively. In the third group, LMWH was administered subcutaneously on the operation and for 6 postoperative days.

In the sixth day, all rats were sacrificed and bursting pressure and the tissue hydroxyproline content of the anastomoses were assessed and compared. The results were compared statistically by using one way ANOVA test. There was no significant difference between the groups in anastomotic bursting pressure and tissue hydroxyproline levels (P>0.05).

In conclusion, both single or six day administrations of LMWH are not effective on healing of colonic anastomosis and can be safely used as medication in patients who have undergone colonic anastomosis.

Key words: low molecular weight heparin, wound healing, colonic anastomosis, bursting pressure, hydroxyproline

Özellikle büyük abdominal ameliyatlardan sonra ortaya çıkabilen derin ven trombozu (DVT) ve buna bağlı gelişen pulmoner emboli (PE), ciddi bir sağlık sorunudur. DVT sıklığı, yüksek riskli hastalarda %10'a kadar yükselmektedir.^[1] Pulmoner emboli gelişen hastaların %10'u bir saat içinde kaybedildiği için tanı konamaz ve tedaviye fırsat bulunamaz.^[2] Oysa profilaktik tedavi ile bu risk büyük ölçüde önlenebilir.

Düşük molekül ağırlıklı heparinin (DMAH) tromboembolik bozuklukların profilaksisinde kullanılmaya başlamasından sonra konu ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve günümüzde DMAH ile DVT profilaksisi güncel yaklaşım olmuştur.^[3,4,5,6]

Ancak DVT profilaksisi amacıyla kullanılan ajanların bazı istenmeyen etkileri de ortaya çıkabilir. Bunların en önemlisi ameliyatta ve sonrasında olabilecek kanamalardır. Antitrombin III ve faktör Xa üzerinden etki gösteren DMAH'nin kanamaya yol açıcı etkisinin daha az olduğu bilinmektedir.^[7] Ancak faktör Xa üzerinden yaptığı etkiyle yara iyileşmesinin bir fazı olan koagülasyonu engelleyen DMAH'nin yara iyileşmesini ve belki de daha önemli olarak, örneğin barsak anastomozu yapılan bir hastada anastomoz güvenliğini olumsuz yönde etkileyip etkilemediği sorusunun literatürde net bir yanıtı bulunmamaktadır.

Çalışmamızın amacı bu soruya yanıt aramak üzere, DMAH kullanımının kolon anastomozunun iyileşmesini olumsuz yönde etkileyip etkilemediğini tespit etmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nde ve ağırlıkları 180-250 gram arasında değişen 30 adet erkek albino Wistar tipi rat üzerinde yapıldı.

Çalışmada DMAH olarak; CY-216 nadroparin kalsiyum (Fraxiparine; Sanofi, Fransa) kullanıldı.

Tüm ratlar 24°C ortamda 12 saatlik gündüz-gece siklusunda standart yem ve su ile beslendiler. Cerrahi işlemden 24 saat önce yem kesilerek sadece su içmelerine izin verildi. Ameliyat sırasındaki anestezi ve postoperatif bakım işlemleri Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün laboratuvar hayvanları rehber kitabına uygun olarak yürütüldü.^[8]

Tüm ratlara intramüsküler 50 mg/kg ketamin (Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye)+8 mg/kg Xylazine (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulandı. Ameliyat sırasında

ratların spontan solumalarına izin verildi. Sıcak ped ve ışık yardımıyla vücut ısılarının 37°C'de sabit kalması sağlandı. Povidon iyodin ile cilt temizliğini takiben 3 cm'lik orta hat kesisi ile çöliotomi yapıldı. Barsaklar, kurumayı önlemek için steril gaz ile örtüldü ve sık sık izotonik ile ıslatıldı. İnen kolon bulundu ve peritoneal refleksiyonun 3-4 cm üstünden bistüri ile tam kat kesi yapıldıktan sonra polipropilen 6/0 (Prolene, Ethicon, Birleşik Krallık) sütür ile tam kat, tek tek uç uca kolon anastomozu yapıldı. Karın insizyonları 3/0 ipek sütür ile tam kat devamlı şekilde kapatıldı. Ratların dehidrate kalmalarını önlemek amacıyla 10 ml Ringer Laktat solüsyonü subkütan olarak verildi. Ameliyat sonrası dönemde pelet yem ve su ile besleme yapıldı.

Çalışmada yer alan 30 ratın hepsine kolon anastomozu yapıldıktan sonra her biri 10 rat içeren üç grup oluşturuldu:

1. gruptaki hayvanlara herhangi bir ilaç verilmedi (kontrol grubu).
2. gruptaki hayvanlara anestezi den hemen sonra, laparotomi öncesinde tek doz 150 ICU/kg DMAH subkütan uygulandı.
3. gruptaki hayvanlara anestezi den hemen sonra, laparotomi öncesinde 150 ICU/kg DMAH subkütan uygulandı. Postoperatif altı gün boyunca aynı dozda uygulamaya devam edildi.

Ameliyat sonrası beşinci günün gecesinden itibaren katı yem kesildi, sadece su almalarına izin verildi. Altıncı gün anestezi altında eski orta hat kesisinden girilerek kolon anastomozları ortaya kondu, anastomoz kaçağı, apse, fistül gibi komplikasyonlar açısından değerlendirildi. Anastomozdaki yapışıklıklar ayrılmaksızın, kurulan düzenek kullanılarak anastomoz patlama basınçları *in vivo* olarak ölçüldü. Bunun için anüsten içeri, 2-3 cm kadar ilerletilen kateterin ucu, anastomoz hattı civarına gelecek şekilde yerleştirildi. Kolon, anastomoz hattının yaklaşık 2 cm altından ve üstünden 2/0 ipekle bağlandı. İçine kateter yerleştirilmiş ve iki ucu bağlı olan kolon segmenti, infüzyon pompası kullanılarak 4 ml/dak hızında (Via medical-program 1, Beckton, Dickinson, Fransa), metilen mavisile renklendirilmiş izotonik ile şişirildi. Bu esnada basınç değerleri, basınç transdüseri (Abbott Monitoring Kit, Transpac II: Abbott, Ireland, Sligo, İrlanda Cumhuriyeti) yardımıyla monitörize (Hewlett Packard GmbH, 78354C, Almanya) edildi. Şişirilme işlemi sırasında basınç değerleri takip

edildi. Mavi renkli sıvının kaçtığı ve basıncın aniden düştüğü değer, patlama basıncı olarak kaydedildi.

Daha sonra, doku hidroksiprolin düzeyini tayin amacıyla anastomoz hattını içine alacak şekilde yaklaşık 1 cm'lik kolon segmenti rezeke edildi. Doku izotonik ile yıkanarak intestinal içerikten arındırıldı. Hidroksiprolin değerleri Bergman ve Loxley'in spektrofotometrik metodu kullanılarak tayin edildi.^[9] Sonuçlar yaş doku ağırlığı başına hidroksiprolin değeri (mikrogram-hidroksiprolin/gram-yaş doku ağırlığı) olarak kaydedildi.

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri anlamlı sayıldı.

BULGULAR

Tüm gruplarda kanama, enfeksiyon, anastomoz kaçağı, fistül, apse gibi bir komplikasyon ve mortalite görülmedi. Grupların altıncı günde elde edilen anastomoz patlama basınçları Tablo 1'de ve anastomoz hattı doku örneklerinden elde edilen hidroksiprolin değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Gruplar, anastomoz patlama basınçları açısından değerlendirildiğinde her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($P > 0.05$) (Tablo 3).

Her üç grup, doku hidroksiprolin düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($P > 0.05$) (Tablo 4).

TARTIŞMA

Anastomoz işlemi, gastrointestinal ve hepatobiliyer sistemde rezeksiyon sonrası devamlılığın sağlanması amacıyla gerçekleştirilen temel girişimdir. Anastomoz güvenliği hasta için yaşamsal önem taşımakta, iyileşmemesi halinde fistül, apse gelişimi gibi ciddi komplikasyonlara, hatta sepsis ve mortaliteye yol açabilmektedir.

DVT ve buna bağlı PE postoperatif dönemde yaşamı tehdit edici sorunlar olarak karşımıza çıkabilirler. Özellikle yüksek risk taşıyan hastalarda ameliyat öncesinde DVT profilaksisi yapılmaması, ciddi morbidite ve mortalite sebebi olabilir. Pelvik ve abdominal büyük cerrahi girişimlerin özellikle bu açıdan yüksek risk taşıdıkları bilinmektedir. Bu nedenle kolon anastomozu yapılması gereken hastalar çoğu kez DVT profilaksisi gerektirirler. Bu amaçla günümüzde DMAH yaygın olarak kullanılmaktadır.^[4,5,6]

Cerrah hastayı tromboembolik komplikasyonlara karşı korurken anastomozun güvenliğini de tehlikeye atmamalıdır. Bu amaçla klinikte sıklıkla kullanılan DMAH'lerin anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi olup olmadığını bilmek önemlidir. Ancak profilakside kullanılan DMAH'lerin anastomoz güvenliğini ne şekilde etkilediği konusunda literatürde yeterince yayın bulunmamaktadır.

Kolon anastomozu iyileşmesini mekanik ve biyokimyasal yöntemlerle tespit etmek mümkündür. Mekanik yöntemler arasında, patlama basıncı ve gerilme kuvveti ölçümleri sayılabilir. Kolon anasto-

Tablo 1: Tüm grupların anastomoz patlama basınçları (mm/Hg)

Denek no	GRUP 1 (Kontrol grubu)	GRUP 2 (Tek doz DMAH grubu)	GRUP 3 (6 gün DMAH grubu)
1	110	180	106
2	130	120	96
3	108	106	154
4	150	88	119
5	112	101	125
6	98	107	135
7	120	151	110
8	111	114	124
9	135	100	126
10	106	130	139
Ortalama±Standart Sapma	118.0±15.8	119.7±27.5	123.4±16.9

Tablo 2: Tüm grupların doku hidroksiprolin değerleri ($\mu\text{g/g-doku}$)

Denek no	GRUP 1 (Kontrol grubu)	GRUP 2 (Tek doz DMAH grubu)	GRUP 3 (6 gün DMAH grubu)
1	182	193	214
2	199	195	190
3	178	186	330
4	228	231	285
5	266	293	293
6	212	326	306
7	296	207	199
8	343	258	279
9	217	350	214
10	273	189	248
Ortalama \pm Standart Sapma	239.4 \pm 53.0	242.8 \pm 60.9	255. \pm 49.3

Tablo 3: Grupların anastomoz patlama basınçlarının istatistiksel analizi

Anastomoz patlama basınçları (mm/Hg)	GRUP 1* (Kontrol grubu)	GRUP 2 (Tek doz DMAH grubu)	GRUP 3 (6 gün DMAH grubu)
Ortalama \pm Standart Sapma	118.0 \pm 15.8	119.7 \pm 27.5	123.4 \pm 16.9

* Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (P=0.832).

Tablo 4: Grupların doku hidroksiprolin düzeylerinin istatistiksel analizi

Hidroksiprolin düzeyleri ($\mu\text{g/g-doku}$)	GRUP 1* (Kontrol grubu)	GRUP 2 (Tek doz DMAH grubu)	GRUP 3 (6 gün DMAH grubu)
Ortalama \pm Standart Sapma	239.4 \pm 53.0	242.8 \pm 60.9	255.8 \pm 49.3

* Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (P=0.784).

mozu iyileşmesinin göstergesi olarak patlama basınçları birçok çalışmada kullanılmıştır.^[10,11,12,13]

Biyokimyasal yöntemlerin başlıcaları ise anastomoz hattındaki kolajen veya hidroksiprolin seviyelerinin tespitidir.^[14] Kolajen yara iyileşmesinde tüm fazlarda çok önemlidir ve doku gerginliğini ve sağlamlığını sağlar.^[15] Günümüzde de hidroksiprolin değerleri anastomoz iyileşmesini takip parametresi olarak kullanılmaktadır.^[10,11,12] Çalışmamızda da anastomoz iyileşmesini değerlendirmek için hidroksiprolin düzeyleri ve *in vivo* patlama basınçları değerlendirilmiştir.

Ameliyattan sonra erken dönemde anastomoz bütünlüğünü sütür materyalleri sağlamaktadır. Beşinci ve yedinci günlerde kolajen sentezi pik yapar ve anastomoz sağlamlığı organize olmuş kolajen fibrilleriyle sağlanır.^[16] Bu nedenle çalışmamızda patlama basınçları ve hidroksiprolin düzeyleri postoperatif altıncı günde değerlendirilmiş ve patlama basınçları ile hidroksiprolin düzeyleri arasında DMAH kullanılan ve kullanılmayan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Cerrah hastada kullandığı her türlü ilacın anas-

tomoza zarar verip vermediğini bilmek zorundadır. Literatürde birçok ajanın anastomoz iyileşmesine etkisi araştırılmıştır. Matzch ve arkadaşları, kanama riskini artırmakla birlikte heparinin ve DMAH'nin abdominal yaraların ve kolon anastomozunun iyileşmesini bozmadığını rapor etmişlerdir.^[17] Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu literatürü destekler niteliktedir.

Yara iyileşmesi ve koagülasyon sistemi arasında bilinen bir ilişki vardır. Yara oluşumuyla birlikte koagülasyon sistemi aktive olmak ve fibrin oluşumu ile neticelenen olaylar zinciri başlamaktadır. Koagülasyon faktörlerinin aktivasyonunun engellenmesi, yaraya organizmanın verdiği ilk yanıtın bloke edilmesi anlamındadır. Buradan yola çıkarak DMAH'lerin yara iyileşmesine olumsuz etkilerinin olabileceği fikri oluşmaktadır. Ancak nadroparin kalsiyum DVT profilaksisinde kullanıldığı dozda, koagülasyon faktörlerini standart heparine göre daha az etkilemektedir.^[18] Trombositlerle de çok az ilişkiye girmektedir. Bu durum hem kanama olasılığını artırmamakta hem de trombosit kökenli mediyatörlerin salınımıyla gerçekleşen olayları etkilememektedir.^[19] Dolayısıyla DMAH'nin yara iyileşmesi üzerine olumsuz bir etkisi olmaktadır.

Yara iyileşmesinin sonraki safhalarında kolajen sentezi başlar. Bu yara iyileşmesinin temel mekanizmasıdır. Bu süreci değerlendirmek için hidrokspirolin düzeyleri takip edilebilir, ki çalışmamızda da yara iyileşmesinin bir göstergesi olarak ölçülmüş ve DMAH verilen ve verilmeyen gruplar arasında hidrokspirolin düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

DMAH'lerin günümüzde klinikte en sık kullanım alanı DVT profilaksisidir. Ayrıca DVT'nin tedavisinde de kullanılmaktadırlar.^[20,21] Çalışmamızda ameliyat sonrası dönemde DMAH kullanmaya devam ettiğimiz grupta da kolajen düzeyleri ve anastomoz patlama basınçları diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Dolayısıyla bu bize, DMAH'nin uzun süreli kullanımında da yara iyileşmesine olumsuz etki yapmadığını düşündürmektedir. Ayrıca hiçbir ratta kanama, fistül, enfeksiyon, apse gibi komplikasyonların görülmemiş olması ilacın güvenilirliğini desteklemektedir.

Sonuç olarak, DVT profilaksisi amacıyla kullanılan DMAH'nin kolon anastomozu iyileşmesi üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Anderson FA, Wheeler H B, Goldberg R J, Hosmer D W. The prevalence of risk factors for venous thromboembolism among hospital patients. *Arch Intern Med* 1992; 152:1660-1664.
2. Sandler DA, Martin JF. Autopsy proven pulmonary embolism in hospital patients: are we detecting enough deep vein thrombosis? *J R Soc Med* 1989; 82:203.
3. Fareed J, Walenga JM, Hoppenstead D. Comparative study on the in vitro and in vivo activities of seven low molecular weight heparins. *Haemostasis* 1988; 18:3.
4. Harenberg J, Reebuck P, Heene D. Subcutaneous Low-molecular-weight heparin standard heparin and the prevention of thromboembolism in medical inpatient. *Haemostasis* 1996; 26:127-139.
5. Kurtoğlu M, Dolay K, Güloğlu R, Ertekin C, Nəcəfli A. Düşük molekül ağırlıklı heparin (Enoksaparin) ile proksimal derin ven trombozu tedavisi (erken sonuçlarımız). *Ulusal Cerrahi Dergisi* 1998; 14: 346-352.
6. Anthonic W A, Martin H, Bruce L. Treatment of deep venous thrombosis with low-molecular-weight heparins. *Arch intern med* 1995; 155:601-607.
7. Kakkar V, Murray W J G. Efficacy and safety of low-molecular-weight heparin (CY 216) in preventing postoperative venous thromboembolism; a cooperative study. *Br J Surg* 1985; 72:786.
8. National Institute of Health's Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No:86-23, revised 1985, Bethesda, USA.
9. Bergman I, Lexley R. The determination of hydroxiprolin in urine hydrolysates. *Clin Chim Acta* 1970; 27:347-9.
10. Miller S K, Martindale R G, Gadacz T R. The effects of octreotide on healing of small bowel anastomosis. *Am Surg* 1996; 62:733-7.
11. Koloğlu M, Yorgancı K, Renda N, Sayek İ. Effect of local and remote ischemia-reperfusion injury on healing of colonic anastomoses. *Surgery* 2000; 128:99-104.
12. Koloğlu M, Sayek İ, Koloğlu LB, Eng C, Onat D. Effect of persistently elevated intraabdominal pressure on healing of colonic anastomoses. *Am J Surg* 1999; 178:293-297.
13. Koruda M J, Rolandelli R H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res* 1990; 48: 504-515.
14. Hendriks T, Mastboon W J. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum* 1990; 33:891-901.
15. Christensen H, Chemnitz J, Christensen BC. Collagen structural organization of healing colonic anastomoses on the effect of growth hormon. *Dis Colon Rectum* 1995; 38:1200-1205.
16. Cohen I K, Robert F, Diegelman, Dorme R, Wornum III IL, Graham M F, Crooland MC. Wound care and

- wound healing. In: Schwartz SI, Shires TG, Spencer CF, Daly JM, Fischer JE, Galloway CA eds. Principles of Surgery. New York: McGraw-Hill;1999:281.
17. Matzch T, Bergqvist D, Blomquist P, Jiborn H. Influence of standard heparin or low molecular weight heparin on healing of abdominal wounds and colonic anastomoses in rats. *Acta Chir Scand* 1987; 153:53-8.
 18. Boisseau M. R, Fryburger G, Dahary J. Effect of Cy 216 and standart heparin on hemorhological factors. In: Bounameaux H, Samama M, ten Cate JW, eds. Fraxiparine, Second International Symposium. New York, Stuttgart, Schattauer,1990.
 19. Salzman EW, Rozenberg RD, Smith MH. Effect of heparin and heparin fractions on platelets aggregation. *J Clin Invest* 1980; 65:64.
 20. Hull R D, Rascop G E, Rosenbloom D. Treatment of proximal vein thrombosis with subcutaneous low-molecular weight heparin versus intravenous heparin. *Arch intern med* 1997; 157:289.
 21. Keopman M M W, Prondoni P, Piovella. for the TASMAn Study Group. Treatment of venous thrombosis with intravenous unfractionated heparin administired in the hospital as compared with subcutaneous low-molecular-weight heparin at home. *N Eng J med* 1996; 334:682.

KATKIDA BULUNANLAR

Çalışmanın düşünülmesi ve planlaması:

Dr. Ergün Erdem, Dr. Faruk Aytekin, Dr. Koray Tekin

Verilerin elde edilmesi:

Dr. Faruk Aytekin, Dr. Koray Tekin,
Dr. İmdat Koçberber, Dr. Yıldız Güney

Verilerin analizi ve yorumlanması:

Dr. Ergün Erdem, Dr. Koray Tekin,
Dr. Faruk Aytekin, Dr. Uğur Sungurtekin

Yazının kaleme alınması:

Dr. Ergün Erdem, Dr. Akın Özden, Dr. İmdat Koçberber

İstatistik değerlendirme:

Dr. Akın Özden

YAZIŞMA ADRESİ

Doç. Dr. Ergün ERDEM

Ferahevler F Adası, 14. sokak, No: 37

Yenişehir, Denizli

Tel: 0 258 373 68 71 / 0 532 337 90 10

E-posta: ergune@pamukkale.edu.tr