



**ASTAKSANTİN'İN ERKEN YARA İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİSİNİN
RAT PALATAL MUKOZASINDA İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yeşim DURGUT

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Yeşim Durgut

23/06/2025

ASTAKSANTİN'İN ERKEN YARA İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİSİNİN RAT PALATAL MUKOZASINDA İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Yeşim DURGUT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2025

ÖZET

Yara iyileşmesi, doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yönelik çok aşamalı biyolojik bir süreçtir. Periodontal cerrahi sonrası sekonder yara alanları sıklıkla oluşmakta; mevcut terapötik ajanların klinik kullanımı, spesifik uygulama protokollerinin gerekliliği, potansiyel sitotoksiteleri ve yüksek maliyet gibi çeşitli kısıtlamalar nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bu deneysel çalışmada, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinen astaksantin, rat palatal mukozasında oluşturulan sekonder yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, topikal ve sistemik uygulama formları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Toplam 45 Wistar albino rat rastgele üç gruba ayrıldı; kontrol, sistemik astaksantin (SA) ve topikal astaksantin (TA). Her denekte palatal mukozada 4 mm çapında standart yara alanı oluşturuldu. TA grubuna topikal, SA grubuna gavaj yoluyla 5 mg/kg/gün uygulandı. Yara dokuları, sakrifikasyon günleri olan 3., 5. ve 7. günlerde makroskopik, histopatolojik ve immünohistokimyasal (MMP-9 ve S100A4) yöntemlerle analiz edildi. Birincil çıktı, epitelizasyon, granülasyon ve anjiyogenez parametreleri üzerinden histopatolojik olarak değerlendirilen yara iyileşmesi düzeyidir. İkincil çıktı, MMP-9 ve S100A4 ekspresyonlarının immünohistokimyasal analizi, kolajen birikimi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonudur. İstatistiksel analizlerde parametrik (ANOVA, Bonferroni) ve nonparametrik (Kruskal-Wallis) testler kullanılarak, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Bulgulara göre 7. günde, TA grubunda yara kapanmasının oranı, SA ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p < 0.05$). En yüksek iyileşme yüzdesi TA grubunda (%45,39), en düşük ise kontrol grubunda (%31,43) tespit edildi. Özellikle TA grubunda fibrozis ve inflamasyon belirgin düzeyde azalma, epitelizasyon, anjiyogenez ve kolajen organizasyonunda artış gözlemlendi. 7. gün itibarıyla TA grubunda epitel bütünlüğünün sağlandığı ve bağ dokunun yeniden yapılandığı tespit edildi. İmmünohistokimyasal analizlerde MMP-9 ve S100A4 ekspresyon düzeyleri TA grubunda anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p < 0.01$). Astaksantin uygulaması, inflamatuvar yanıtı modüle ederek, neovaskülarizasyonu artırarak ve doku rejenerasyonunu destekleyerek sekonder yara iyileşmesini anlamlı ölçüde hızlandırmıştır (özellikle TA grubunda). Elde edilen bulgular, astaksantin periodontal yara iyileşmesinde tamamlayıcı bir tedavi ajanı olarak kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır.

Bilim Kodu : 10101,06
Anahtar Kelimeler : Astaksantin, Yara iyileşmesi, Reepitelizasyon, S100A4, MMP9
Sayfa Adedi : 197
Danışman : Doç. Dr. Zeynep TURGUT ÇANKAYA

EARLY WOUND HEALING OF ASTAXANTHIN ON THE RAT PALATAL MUCOSA OF IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION

(Ph. D. Thesis)

Yeşim DURGUT

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2025

ABSTRACT

Wound healing is a complex, multi-stage biological process aimed at restoring tissue integrity. Secondary wound areas frequently occur following periodontal surgery, and the currently available therapeutic agents are limited by factors such as specific application protocols, potential cytotoxic effects, and high costs. In this experimental study, the effects of astaxanthin, a compound with potent antioxidant and anti-inflammatory properties on secondary wound healing in rat palatal mucosa were evaluated. Forty-five Wistar albino rats were randomly divided into three groups: control, systemic astaxanthin (SA), and topical astaxanthin (TA). A 4 mm diameter wound was created in the palatal mucosa of each animal. The TA group received 5 mg/kg/day of astaxanthin topically, while the SA group received the same dose via oral gavage. Wound tissues were analyzed on days 3, 5, and 7 postoperatively using macroscopic, histopathological, and immunohistochemical methods, including the evaluation of MMP-9 and S100A4 expression. The primary outcome was wound healing progression, assessed via histopathological evaluation of epithelialization, granulation, and angiogenesis. Secondary outcomes included immunohistochemical analysis of MMP-9 and S100A4, collagen deposition, and inflammatory cell infiltration. Statistical analyses were performed using both parametric (ANOVA, Bonferroni) and non-parametric (Kruskal–Wallis) tests, with the significance level set at $p < 0.05$. According to the results, on day 7, the wound closure rate in the TA group was significantly greater compared to the SA and control groups ($p < 0.05$). The highest healing percentage was observed in the TA group (45.39%), while the lowest was recorded in the control group (31.43%). Notably, the TA group indicating reduction in fibrosis and inflammation, along with increased epithelialization, angiogenesis, and collagen organization. By day 7, complete epithelialization and connective tissue remodeling were observed in the TA group. Immunohistochemical analyses revealed significantly lower expression levels of MMP-9 and S100A4 in the TA group ($p < 0.01$). Astaxanthin, particularly when administered topically, significantly accelerated secondary wound healing by modulating the inflammatory response, promoting neovascularization, and supporting tissue regeneration. These findings highlight the potential of astaxanthin as a complementary therapeutic agent in the management of periodontal wound healing.

Science Code : 10101,06

Key Words : Astaxanthin, Wound healing, Reepithelialization, S100A4, MMP9

Page Number : 197

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Zeynep TURGUT ÇANKAYA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her daim yanımda olan; bilgi ve deneyimlerini içtenlikle paylaşan, sabrı, özverisi ve çalışkanlığıyla bana ilham kaynağı olan, akademik gelişimime olduğu kadar kişisel yolculuğuma da rehberlik eden, fikirlerime değer vererek her koşulda desteğini hissettiren kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Zeynep TURGUT ÇANKAYA'ya,

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle vizyonunu örnek aldığım, akademik ve kişisel gelişimime büyük emeği olan Prof. Dr. M. Bülent KURTİŞ'e,

Değerli bilgi ve birikimleriyle yol gösteren Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Altan DOĞAN, Prof. Dr. Ayşen BODUR, Doç. Dr. Sühan GÜRBÜZ'e ve Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Ana Bilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Tezimin laboratuvar aşamalarını titizlikle yürüten, bilgi ve deneyimleriyle çalışmama önemli katkılarda bulunan Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a ve tezimin gerçekleşmesindeki değerli katkı ve desteği için Dr. Gökçe Nur ARIK EROL'a,

Dostluğuyla bu yolu güzelleştiren Dr. Dt. Işıl KARAPINAR'a, sürecin her aşamasında yanımda olan, birlikte öğrenip tecrübe kazandığım, değerli arkadaşım Uzm. Dt. Gülenay ÇOLAK'a, birlikte emek verdiğimiz Dt. Eylül TEKEROĞLU ve Dt. Ayşenur TAMER'e, bu süreci benim için anlamlı ve özel kılan Uzm. Dt. Melis AYÇİÇEK, Dr. Dt. Habibe AKKALE, Dr. Dt. Ata BIÇAKÇIOĞLU, Uzm. Dt. Tuğba ÇAVUŞ, Uzm. Dt. Hande KARAMAN, Dr. Dt. Gülşah HAZAR, Uzm. Dt. Mukaddes YEREBAKAN ve adını sayamadığım tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında yanımda duran, desteği ve inancını her daim hissettiren, en zor anlarda bile yüzümdeki tebessümün kaynağı olan yol arkadaşım Emre Can KURTCU'ya,

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, doğruyu ve dürüstlüğü örnek alarak değerlerimi şekillendiren; bana güven aşılayan ve koşulsuz desteğini her zaman hissettiren canım aileme; ablam Beril HEPGÜZEL, babam İbrahim DURGUT, kardeşim İbrahim Ata DURGUT ve en kıymetlimiz, bugün ben olmamı sağlayan sevgili annem Ayşe DURGUT'a,

En içten sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Oral Mukoza	7
2.2. Oral Epitel.....	7
2.3. Yara İyileşmesi	8
2.3.1. Hemostaz evresi.....	11
2.3.2. İnflamasyon evresi.....	12
2.3.3. Proliferasyon evresi	13
2.3.4. Yeniden şekillenme evresi	15
2.4. Yara İyileşmesinde Hücre Tipleri.....	16
2.5. Yara iyileşmesi Türleri	18
2.5.1. Primer yara iyileşmesi	18
2.5.2. Sekonder yara iyileşmesi	18
2.6. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	19
2.6.1. Lokal faktörler	19
2.6.2. Sistemik faktörler.....	22

	Sayfa
2.6.3. Cerrahi faktörler.....	25
2.7. Periodontal Yara İyileşmesi.....	26
2.7.1. MMP-9 ve S100A4'ün doku iyileşmesindeki rolleri	27
2.8. Sekonder Yara İyileşmesinde Kullanılan Ajanlar	29
2.8.1. Yara iyileşmesinde kullanılan malzemelerin zamansal değişimi	34
2.8.2. Yara iyileşmesinde kullanılan malzemelerin zamansal değişimi	34
2.9. Yara İyileşmesini Değerlendirmede Hayvan Modeli	35
2.10. Serbest Radikaller ve Oksidatif stres	37
2.10.1. Oksidatif stresin yara iyileşmesindeki önemi	38
2.10.2. Serbest radikallerin biyolojik mekanizmaya etkileri	39
2.10.3. Serbest radikallerin yara iyileşmesindeki rolü.....	40
2.11. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Aktivite.....	42
2.11.1. Reaktif oksijen ürünlerinin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri	43
2.11.2. Reaktif oksijen türlerinin periodontal dokudaki varlığı ve rolü	44
2.12. Antioksidanlar.....	45
2.12.1. Antioksidanları sınıflandırması ve etki mekanizması.....	45
2.12.2. Antioksidanların yara iyileşmesindeki rolleri.....	48
2.13. Astaksantin.....	51
2.13.1. Astaksantin kaynakları.....	51
2.13.2. Kimyasal yapısı ve biyokimyası	53
2.13.3. Astaksantin metabolizması ve biyoyararlanım özellikleri.....	55
2.13.4. Astaksantin güvenlik profili ve doz aralıkları.....	56
2.13.5. Astaksantin biyolojik etkileri.....	57
2.13.6. Astaksantin antioksidan mekanizması	59
2.13.7. Hücrel savunma mekanizmaları	60
2.13.8. Diş hekimliğinde astaksantin potansiyeli	61

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	63
3.1. Etik Kurul	63
3.2. Deney Protokolü	63
3.2.1. Deney hayvanları	63
3.2.2. Hayvan bakımı ve çevresel koşullar	64
3.2.3. Deney grupları	64
3.2.4. Çalışma akışı.....	66
3.2.5. Referans madde.....	67
3.2.6. Astaksantin solüsyonlarının hazırlanması ve uygulama protokolü	67
3.2.7. Çalışmada kullanılan ekipmanlar.....	68
3.3. Cerrahi Protokol.....	70
3.3.1. Yara modelinin hazırlanması ve astaksantin uygulanması	70
3.3.2. Sakrifikasyon	73
3.3.3. Biyopsi alınması	73
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	75
3.5. Makroskopik Yara İyileşmesi Değerlendirilmesi	75
3.5.1. Histopatolojik değerlendirme	77
3.5.2. İmmünohistokimyasal değerlendirme.....	79
4. BULGULAR	83
4.1. Makroskopik Bulgular	83
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	90
4.2.1. Kontrol grubu.....	91
4.2.2. Sistemik astaksantin uygulama grubu.....	95
4.2.3. Topikal astaksantin uygulanama grubu	100
4.3. Masson's Trikrom Değerlendirmeleri	105
4.4. MMP-9 İmmünohistokimya Değerlendirmesi.....	115

	Sayfa
4.5. S100A4 İmmunohistokimya Değerlendirmesi	125
4.6. Histopatolojik Parametrelerin İstatiksel Analizi.....	135
4.6.1. S100A4 H skorları	135
4.6.2. MMP-9 H skorları.....	136
4.6.3. İnflamasyon	137
4.6.4. Anjiyogenez.....	138
4.6.5. Fibrozis	140
5. TARTIŞMA.....	143
6. SONUÇ.....	161
KAYNAKLAR	163
EKLER.....	193
EK-1. Etik Kurul İzni.....	194
ÖZGEÇMİŞ	196

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörleri.....	17
Çizelge 2.2. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler	19
Çizelge 2.3. Yara iyileşmesini destekleyen biyolojik ve teknolojik gelişmelerin dönemsel dağılımı	35
Çizelge 2.4. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri örnekleri	43
Çizelge 2.5. Serbest radikallerden kaynaklanan bazı hastalıklar.....	44
Çizelge 2.6. Yapılarına göre antioksidanların sınıflandırılması	46
Çizelge 2.7. Organizmada antioksidan sistem elemanları	48
Çizelge 2.8. Doğal astaksantin kaynakları.....	52
Çizelge 2.9. Sentetik ve doğal astaksantin karşılaştırması	52
Çizelge 2.10. Mikroorganizmaların astaksantin içerikleri	53
Çizelge 3.1. Deney grupları ve uygulanan işlemler.....	65
Çizelge 3.2. Semi-kantitatif değerlendirme için histolojik skorlamalar	79
Çizelge 4.1. Grupların yara alanı ölçümlerinin dağılımı ve sonuçları.....	85
Çizelge 4.2. Grupların iyileşme hızı sonuçları	89
Çizelge 4.3. Yara ağız açıklığının 3. ve 7. gün gruplara göre karşılaştırılması.....	90
Çizelge 4.4. Yara iyileşme sürecinde 3 grup için karşılaştırmalı histopatolojik bulgular.....	115
Çizelge 4.5. Detaylı iyileşme parametreleri, S100A4 skorlarının gruplar arası 3. ve 7. gün karşılaştırılması	135
Çizelge 4.6. MMP-9 H-skorlarının grup karşılaştırması - 3. ve 7. gün karşılaştırılması	137
Çizelge 4.7. Tüm zaman noktalarında damar sayılarındaki değişimin grup karşılaştırmaları	139
Çizelge 4.8. Zaman içinde damar sayısındaki değişim (3. günden 7. güne)	140
Çizelge 4.9. Walker anjiyogenez iyileşme oranları 5. gün ve 7. gün karşılaştırılması...	140

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. Fibrosiz miktarının Friedman test sonuçlarının gruplar arası karşılaştırması.....	141
Çizelge 4.11. Wilcoxon işaretli sıralar testine göre fibrozis skoru değişiminin 5. ve 7.günlerde karşılaştırması.....	142



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşmesi fazları.....	10
Şekil 2.2. Periodontal yara iyileşmesinde kullanılan ajan ve materyallerin tarihsel gelişimi	35
Şekil 2.3. Hücre zarında astaksantin pozisyonu	54
Şekil 2.4. Karotenoidlerin kimyasal yapıları	55
Şekil 2.5. Astaksantin anti-inflamatuar etkinliği ve inflamasyonla ilişkili rolü.....	61
Şekil 3.1. Grafik özet.....	66
Şekil 3.2. Yara alanın görsel ifadesi	71
Şekil 4.1. Yara alanı değişiminin 3. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması	83
Şekil 4.2. Yara iyileşmesi yüzdesinin 3. ve 5. günlerde gruplar arası karşılaştırılması .	86
Şekil 4.3. Yara iyileşmesi yüzdesinin 3. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması .	87
Şekil 4.4. Yara iyileşmesi yüzdesinin 5. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması .	87
Şekil 4.5. Yara iyileşmesi yüzdesinin ve iyileşme hızlarının gruplar arası ve grup içi karşılaştırılması	88
Şekil 4.6. Yara iyileşmesi yüzdesinin 3. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması .	88
Şekil 4.7. Zamana ve tedavi grubuna göre makroskopik yara görüntüleri.....	89
Şekil 4.8. S100A4 skorlarının gruplar arası 3. ve 7. gün karşılaştırılma grafiği	136
Şekil 4.9. MMP-9 H-skorlarının gruplar arası 3. ve 7. gün karşılaştırılması	137
Şekil 4.10. İnflamasyon şiddetlerinin 3., 5. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırması	138
Şekil 4.11. Fibrozis skorunun 5. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırması	141

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Astaksantin çözeltisinin hazırlık aşamaları	68
Resim 3.2. Cerrahi operasyon öncesi hazırlık	71
Resim 3.3. Tam kalınlık eksizyonel yara alanının oluşturulması.....	72
Resim 3.4. Cerrahi olarak çıkarılan dokular.....	72
Resim 3.5. Hazırlanan çözeltinin oluşturulan yara yüzeyine topikal uygulaması.....	73
Resim 3.6. Yara bölgelerinin gösterimi.....	74
Resim 3.7. Doku örneklerinin alınması	74
Resim 3.8. Fotoğrafların ImageJ programında perodontal sonda göre ölçeklendirilmesi	77
Resim 3.9. Yara kenarları işaretlenerek yara alanının ölçülmesi	77
Resim 3.10. Doku örneklerinin analize hazır hale getirilmesi	81
Resim 4.1. Negatif kontrol (Hematoksilen Eozin, x20)	91
Resim 4.2. 3. gün kontrol grubu	92
Resim 4.3. 3. gün kontrol grubu	92
Resim 4.4. 5. gün kontrol grubu	93
Resim 4.5. 5. gün kontrol grubu	93
Resim 4.6. 7. gün kontrol grubu	94
Resim 4.7. 7. gün kontrol grubu	95
Resim 4.8. 3. gün SA grubu	96
Resim 4.9. 3. gün SA grubu	97
Resim 4.10. 5. gün SA grubu	98
Resim 4.11. 5. gün SA grubu	98
Resim 4.12. 7. gün SA grubu	99
Resim 4.13. 7. gün SA grubu	100
Resim 4.14. 3. gün TA grubu	101

Resim	Sayfa
Resim 4.15. 3. gün TA grubu	101
Resim 4.16. 5. gün TA grubu	102
Resim 4.17. 5. gün TA grubu	103
Resim 4.18. 7. gün TA grubu	104
Resim 4.19. 7. gün TA grubu	104
Resim 4.20. Negatif kontrol grubu, Masson's Trikrom	105
Resim 4.21. 3. gün kontrol grubu.....	106
Resim 4.22. 5. gün kontrol grubu.....	107
Resim 4.23. 7. gün kontrol grubu.....	108
Resim 4.24. 3. gün SA grubu	109
Resim 4.25. 5. gün SA grubu	110
Resim 4.26. 7. gün SA grubu	111
Resim 4.27. 3. gün TA grubu	112
Resim 4.28. 5. gün TA grubu	113
Resim 4.29. 7. gün TA grubu	114
Resim 4.30. 3. gün kontrol grubu (MMP-9 tutulumu)	116
Resim 4.31. 5. gün kontrol grubu (MMP-9 tutulumu)	117
Resim 4.32. 7. gün kontrol grubu (MMP-9 tutulumu)	118
Resim 4.33. 3. gün SA grubu (MMP-9 tutulumu).....	119
Resim 4.34. 5. gün SA grubu (MMP-9 tutulumu).....	120
Resim 4.35. 7. gün SA grubu (MMP-9 tutulumu).....	121
Resim 4.36. 3. gün TA grubu (MMP-9 tutulumu)	122
Resim 4.37. 5. gün TA grubu (MMP-9 tutulumu)	123
Resim 4.38. 7. gün TA grubu (MMP-9 tutulumu)	124
Resim 4.39. 3. gün kontrol grubu (S100A4 tutulumu).....	126
Resim 4.40. 5. gün kontrol grubu (S100A4 tutulumu).....	127

Resim	Sayfa
Resim 4.41. 7. gün kontrol grubu (S100A4 tutulumu).....	128
Resim 4.42. 3. gün SA grubu (S100A4 tutulumu)	129
Resim 4.43. 5. gün SA grubu (S100A4 tutulumu)	130
Resim 4.44. 7. gün SA grubu (S100A4 tutulumu)	131
Resim 4.45. 3. gün TA grubu (S100A4 tutulumu).....	132
Resim 4.46. 5. gün TA grubu (S100A4 tutulumu).....	133
Resim 4.47. 7. gün TA grubu (S100A4 tutulumu).....	134



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
mg	Miligram
kg	Kilogram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µm	Mikron

Kısaltmalar Açıklamalar

ECM	Ekstraselüler matris
F	Varyans analizi ANOVA test istatistiği
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
JAK/STAT	Janus Kinaz/ Sinyal Transduseri Transkripsiyon Aktivatörü
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MMP	Matriks metalloproteinaz
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PMNL	Polimorfonükleer lökosit

Kısaltmalar	Açıklamalar
PRF	Trombositten Zengin Fibrin
RANK	Nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü
RANKL	Nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü ligandı
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SS	Standart sapma
t	Bağımsız örneklem t testi
TGF-α	Transforme Büyüme Faktörü Alfa
TGF-β	Transforme Büyüme Faktörü Beta
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Yara, cilt veya mukozanın travmatik, kimyasal ya da fiziksel etkenlerle bütünlüğünün bozulması sonucunda ortaya çıkan; anatomik ve fonksiyonel kayıplarla karakterize edilen patolojik bir durumdur. Yara iyileşmesi, birbirine bağlı dört aşamadan oluşan kompleks ve dinamik bir süreçtir: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodelasyon [1,2].

İyileşmenin etkinliği ve kalitesi; kan akımı, oksijenlenme, sitokinler, büyüme faktörleri, enfeksiyon, travma, yara nem dengesi gibi lokal faktörler ile diyabet, genetik bozukluklar, immün yetmezlik, radyoterapi, sigara kullanımı gibi sistemik faktörlerden etkilenmektedir. Başarılı bir iyileşme süreci için yeterli perfüzyon ve oksijenizasyonun sağlanması, uygun nem dengesinin korunması ve yeterli düzeyde beslenmenin temin edilmesi gerekmektedir [1,3]. Bu noktada, özellikle oksijenin yara iyileşmesindeki rolü dikkat çekmektedir. Oksijen, yalnızca enerji üretimi için değil, aynı zamanda bağışıklık yanıtı, kolajen sentezi ve yeni damar oluşumu gibi iyileşmenin temel süreçleri için de gereklidir. Ancak oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak oluşan reaktif oksijen türleri (ROT), bu sürecin destekleyicisi ve potansiyel bir engelleyicisi olabilmektedir [4].

ROT ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin korunması, sürecin sağlıklı ilerleyebilmesi açısından kritik önem taşımaktadır. Nötrofiller, yaranın erken evresinde bölgeye ulaşarak patojenleri ve hücrel artıkları temizlerken aynı zamanda yoğun miktarda ROT üretir [5]. Fizyolojik düzeydeki ROT; hücre proliferasyonu, migrasyonu, anjiyogenez ve apoptoz gibi yara iyileşmesiyle ilişkili süreçleri düzenlerken, bu türlerin aşırı birikimi oksidatif stres oluşturarak doku hasarına yol açabilir ve iyileşmeyi geciktirebilir. Bu nedenle, antioksidan savunma sistemlerinin ROT üretimiyle olan etkileşimi, yara iyileşme sürecinde dengeleyici bir unsur olarak önem kazanmakta ve çeşitli tedavi stratejilerinde hedef olarak değerlendirilmektedir [6,7].

ROT artışı, diyabet ve periodontitis gibi kronik hastalıkların patogenezinde yer almakta ve konak dokuda kalıcı hasara neden olabilmektedir. Bu zararlı etkileri azaltmak amacıyla organizma endojen ya da eksojen antioksidan mekanizmaları devreye sokar. Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek lipid peroksidasyonunu engeller ve iyileşme sürecini desteklemektedir [8]. Literatür, antioksidanların oksidatif hasarı sınırlandırdığını, kolajen sentezini uyardığı, inflamasyonu modüle ettiği ve rejeneratif süreçleri hızlandırdığını

göstermiştir [9]. Antioksidanlar, biyolojik etkileri doğrultusunda diş hekimliği uygulamalarında, periodontal hastalıkların yönetimi ve cerrahi müdahalelerin desteklenmesinde tamamlayıcı ajanlar olarak değerlendirilmektedir [10]. Antioksidanlar, periodontal yara iyileşmesinde oksidatif stresin kontrolü ve antioksidan savunma sistemlerinin etkinliği ile doğrudan ilişkili bulunmaktadır [11].

Antioksidan bileşiklerin periodontal iyileşme üzerindeki olumlu etkilerinin bilimsel olarak ortaya konmasıyla birlikte [10], bu ajanların cerrahi sonrası iyileşmeyi hızlandırmak ve komplikasyonları en aza indirmek amacıyla klinik uygulamalarda kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Ağız boşluğunun kendine özgü biyolojik özellikleri ve bu ortamda gerçekleşen yara iyileşmesi süreçleri dikkate alındığında, antioksidan destekli tedavi stratejilerinin potansiyel katkıları belirgin hale gelmektedir.

Oral yara iyileşmesi; zengin oral mikrobiyom, tükürüğe sürekli maruz kalma ve mekanik travmalara maruziyet gibi özgün çevresel koşullar nedeniyle, deri üzerindeki yara iyileşmesinden biyolojik ve klinik olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir [12]. Periodontal cerrahiyi takiben gelişen postoperatif iyileşme süreci, mikrobiyal kontaminasyon, mekanik irritasyon ve yeterli ağız hijyeninin sağlanmasındaki zorluklar nedeniyle karmaşık bir hal almaktadır [13]. Bu durum, oral yara iyileşmesinin bilimsel açıdan incelenmesini güçleştirirken, aynı zamanda özellikle yüksek riskli klinik koşullarda doku rejenerasyonunu destekleyecek tamamlayıcı tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyacı açıkça ortaya koymaktadır.

Periodontal cerrahi uygulamalar, primer veya sekonder yara oluşumuna yol açmakta olup, bu yaralar mikrobiyal kontaminasyona ve inflamatuvar komplikasyonlara karşı yüksek hassasiyet göstermektedir [1]. Açık yara yüzeyleri; ağrı, yumuşak doku morbiditesi, kanama ve enfeksiyon riskinde artış gibi klinik komplikasyonlara neden olabilmektedir [12,14]. Bu tür olumsuz etkiler, periodontal dokuların anatomik bütünlüğünü ve rejeneratif potansiyelini tehdit ederek tedavi başarısını olumsuz yönde etkileyebilir. İnflamatuvar yanıtı modüle eden, doku bütünlüğü koruyan ve erken iyileşme sürecini destekleyen biyolojik ajanların kullanımı, daha başarılı klinik sonuçların elde edilmesinde büyük önem taşımaktadır.

Periodontal cerrahi sonrası iyileşmeyi hızlandırmak, ağrıyı azaltmak ve enfeksiyonları önlemek amacıyla deneysel ve klinik çalışmalarda lazerler [15], hidrojel [16],

klorheksidin gargaralar [17], trombosit zengin fibrin [18], doğal antioksidanlar [19-21], hyalüronik asitler [22,23], glukokortikoidler [24], ozon tedavisi [25], doku yapıştırıcıları [26] ve diğer biyoaktif ajanların damak yara iyileşmesindeki etkileri incelenmiştir [11]. Bununla birlikte bu ajanların etkinliği, uzun süreli kullanımı ve güvenliği konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Söz konusu yaklaşımlar, epitelizasyon sürecini artırmak ve erken dönemdeki komplikasyonları azaltmakla birlikte, ilk hafta içerisinde epitel bütünlüğünü tutarlı biçimde tam sağlayamamaktadır. Mevcut terapötik ajanların klinik kullanımı, spesifik uygulama protokolleri, potansiyel sitotoksik etkileri ve yüksek maliyet kısıtlamaları nedeniyle sınırlıdır [20]. Bu doğrultuda astaksantin, güçlü antioksidan etkisi, immünomodülatör özellikleri ve düşük toksisite profili ile yara iyileşmesini destekleyen biyolojik ajanlar arasında dikkat çekici bir doğal karotenoid olarak yer almaktadır [27].

Ksantofil ailesine ait doğal bir bileşik olan astaksantin, mikroalgler ve kırmızı renkli su organizmalarında bulunur. Astaksantin göz ve cilt sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, UV koruyucu özellikleri ve yaşlanmayı geciktirici fonksiyonları nedeniyle kozmetik ve dermatoloji alanında yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır [28-30]. Kardiyovasküler ve sinir sistemi sağlığı, antidiyabetik ve antitümöral etkiler gibi geniş bir terapötik potansiyele sahiptir [31-33].

Astaksantin, lutein, likopen, α -karoten ve β -karoten gibi karotenoidlerle karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir [27]. Bu yüksek etkinlik, her iki iyonon halkasında bulunan hidroksil ve keto gruplarının varlığı ile desteklenmektedir [34]. Antioksidan aktivitesinin E vitamininden 500 kat, β -karotenden ise 10 kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir [35]. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), astaksantin hayvan ve balık yemlerinde renklendirici olarak kullanımını onaylamıştır. Günümüzde astaksantin, *Phaffia* mayası, *Haematococcus pluvialis* ve kimyasal sentez kaynaklı olarak temin edilebilmekle birlikte doğal kaynaklardan elde edilen astaksantin toksik etkilerinin bulunmadığı literatürde bildirilmiştir [36,37].

Astaksantin, TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IFN gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki göstermekle birlikte nitrik oksit sentaz aktivitesini baskılayarak ROT ve NO üretimini sınırlamakta, COX ve TNF- α düzeylerini azaltarak inflamatuvar yanıtın şiddetini düşürmektedir [38].

Astaksantin ratlarda vokal kord yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, 100 mg/kg oral dozda uygulamanın erken dönemde oksidatif stresi azaltarak iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir [39]. Diyabetik ülser modelinde astaksantin ve zeaksantin kombinasyonunun jel formülasyonunun iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir [40]. Astaksantin, Nükleer faktör kappa (NF- κ B) ve Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yollarını inhibe ederek inflamatuvar süreci baskıladığı, anjiyogenezi teşvik ettiği, fibroblast proliferasyonu ve kolajen sentezini artırdığı raporlanmıştır [41-44].

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden yapılandırılmasında görev alan enzimlerden olup yara iyileşmesi sürecinde doku yeniden şekillenme, hücre göçü ve anjiyogeneze gibi temel biyolojik olayları düzenlemektedir [45]. Bu enzim ailesinin önemli üyelerinden olan MMP-9, özellikle iyileşmenin inflamatuvar evresinde aktifleşerek tip IV kolajeni parçalayarak inflamatuvar hücrelerin dokuya göçünü, anjiyogenezi ve onarım sürecini kolaylaştırmaktadır. MMP-9'un aşırı veya uzun süreli aktivitesi, ECM'in gereğinden fazla parçalanmasına, doku bütünlüğünün bozulmasına ve rejenerasyonun gecikmesine yol açarak kronik yara oluşumuna neden olabilmektedir [46,47].

Astaksantin MMP-9 ekspresyonunu baskıladığı ve inflamatuvar yanıtı azaltarak doku yıkımını sınırladığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [48-51]. Bu etkiler doğrultusunda astaksantin, yara iyileşmesi sürecinde doku korunumu ve rejeneratif kapasitenin artırılmasına yönelik terapötik potansiyel taşımaktadır.

S100A4, S100 protein ailesine ait kalsiyuma bağlanabilen bir protein olup hücre proliferasyonu, hareketliliği, farklılaşması ve hücre dışı sinyal iletimi gibi pek çok biyolojik süreci düzenlemektedir [52]. Yara iyileşmesi sürecinde ise anjiyogeneze, hücre göçü, myofibroblast dönüşümü ve ECM'in yeniden şekillenmesi gibi kritik mekanizmalarda rol oynamaktadır. Hücre dışına salındığında, proinflamatuvar özellik kazanarak bağışıklık hücrelerinin migrasyonunu uyarmakta, MMP ekspresyonunu ve NF- κ B aktivasyonu artırmaktadır [53-55]. Mevcut kanıtlar, S100A4'ün MMP-9 ekspresyonu üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olduğunu ve bu iki molekül arasında sinerjik bir ilişki bulunduğunu göstermektedir [54].

Literatürde astaksantin antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerini gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte, periodontal dokulardaki yara iyileşmesi üzerine etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı olup ağırlıklı olarak hayvan modelleriyle gerçekleştirilmiştir [56-59]. Astaksantin diş eti fibroblastları üzerinde etkilerinin in vitro olarak incelendiği çalışmada, oksidatif stresi düzenleyerek yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir [58]. Astaksantin insan diş eti üzerindeki anti-inflamatuar etkilerinin incelendiği çalışmada, oral liken planus gibi kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceği bildirilmiştir [60]. Preklinik hayvan çalışmalarında, astaksantin osteoblastik aktiviteyi arttırarak alveolar kemik kaybını önlediği [61,62] ve periodontitis modellerinde periodontal inflamasyonu azalttığı [56] tespit edilmiştir. Astaksantin mezenkimal kök hücreleri üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışmada, osteojenik süreci hızlandırarak osteoblastlara farklılaşmalarını sağladığı bildirilmiştir [63].

Çalışmamızın temel amacı, astaksantin anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklerinin yara iyileşmesi sürecindeki rolünü multidisipliner bir yaklaşımla değerlendirmek ve bu süreçte rol oynayan moleküler mekanizmaları aydınlatmaktır.

Bu doğrultuda planlanan çalışmada, ratlarda oluşturulan tam kalınlıkta palatal mukoza yara modeli ile astaksantin topikal ve sistemik uygulama yollarının terapötik etkinlik farkları ile erken dönem yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla aşağıdaki araştırma hedefleri belirlenmiştir:

- Astaksantin palatal mukozada yara iyileşmesi dinamikleri üzerindeki etkinliğinin makroskopik, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesi
- Kolajen sentezi, granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez, inflamasyon, epitelizasyon ve yara kontraksiyonunu semi-kantitatif analizi ile değerlendirmek
- İmmünohistokimyasal analizler ile MMP-9 ve S100A4 ekspresyon düzeylerini değerlendirmek
- Topikal ve sistemik uygulama yöntemlerinin farmakodinamik etkinliklerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirmek

Bu çalışma, standart bir rat modelinde sistemik ve topikal astaksantin palatal mukoza yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini karşılaştıran ilk araştırma olma özelliği taşımakta olup astaksantin potansiyel faydaları ve tedavi etkinliğini bilimsel olarak ortaya koymayı

hedeflemektedir. Çalışmamızın temel hipotezi, astaksantin, palatal mukozada oluşturulan sekonder yara modeli üzerinde iyileşme sürecini anlamlı düzeyde arttıracığı yönündedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Mukoza

Oral mukoza; dudaklar, yanaklar, dil, alveoler kemik, yumuşak damak ve farenks gibi ağız içi yapıları kaplayan müköz bir örtü tabakasıdır [64]. Dudakların vermilyon kenarından palatofaringeal kıvrımlara kadar uzanır[64]. Histolojik olarak üç katmandan oluşur: yüzeyde yer alan çok katlı yassı epitel, altında yer alan lamina propria ve bazı bölgelerde gözlenen en derin tabaka olan submukoza. Submukoza, genellikle lamina proprianın doğrudan kemiğe veya kasa bağlandığı alanlarda bulunmaz. Oral mukoza, histolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre üç tipe ayrılır [65]:

1. Çiğneyici mukoza: Sert damak ve yapışık diş eti gibi mekanik travmaya maruz kalan bölgeleri kaplar. Keratinize çok katlı yassı epitel ile örtülüdür ve lamina propria tarafından altındaki kemiğe doğrudan bağlıdır.
2. Örtücü mukoza: Yanak, dudak, ağız tabanı, yumuşak damak ve alveoler mukozayı kaplar. Bu bölgeler keratinize olmayan çok katlı yassı epitel ile örtülüdür ve esneklik gerektiren fonksiyonlara sahiptir [66].
3. Özelleşmiş mukoza: Dilin dorsumunda yer alır. Tat tomurcukları içeren bu bölge hem keratinize hem de non-keratinize epitel barındırabilir.

Oral mukoza, fiziksel bir bariyer oluşturmakla kalmaz; mekanik, kimyasal ve biyolojik etkilere karşı koruma sağlayarak duyuşsal algı (tat, dokunma, ağrı ve sıcaklık) görevlerini yerine getirir [65].

2.2. Oral Epitel

Oral mukozayı örten epitel dokusu, çok katlı yassı epitel yapısındadır ve bulunduğu bölgeye göre keratinize ya da keratinize olmayan formda olabilir. Epitel, avasküler bir doku olup, alttaki lamina propria ile bazal membran aracılığıyla bağlantılıdır. Epitel ve bağ dokusu arasındaki geçiş bölgesinde, rete peg olarak adlandırılan epitel çıkıntıları ve bağ dokusunun papiller uzantıları karşılıklı olarak iç içe geçer. Bu yapı, epitelin mekanik dayanıklılığını ve beslenmesini destekler [64,65]. Keratinize bölgelerdeki epitel, dört tabakadan meydana gelir. Bu tabakalar, bazal membrandan yüzeye doğru [65]:

- Stratum bazale: Hücre proliferasyonunun başladığı bazal hücre tabakası
- Stratum spinozum: Hücreler arası bağlantıların bulunduğu dikensi hücre katmanı
- Stratum granulozum: Keratohiyalin granüllerin yer aldığı granüler hücre katmanı
- Stratum korneum: Yüzeyde bulunan, keratinize olmuş hücrelerden oluşan katman

Keratinize olmayan epitelde, stratum basalenin üzerinde stratum filamentosum ve stratum distendum adlı katmanlar bulunur. Bu yapısal farklılıklar, mukozanın fonksiyonel özelliklerini ve bulunduğu bölgeye özgü dayanıklılığını belirler. Örneğin; diş etleri ve sert damakta yer alan epitel, çiğneme kuvvetlerine karşı dayanıklı olması için keratinizedir. Buna karşılık, yanaklar ve dudaklar gibi daha esnek yapıların örtüsü keratinize olmayan epiteldir [67].

Oral epitel, hızlı yenilenme kapasitesine sahip olup hücre döngüsü ortalama 14–21 gün sürmektedir. Yenilenme süreci, stratum basalede mitozla başlar; ardından hücreler farklılaşarak üst katmanlara göç eder ve yüzeyden deskuamasyonla uzaklaştırılır [68]. Epitelin homeostazı, hücre proliferasyonu ile yüzeydeki hücre kaybı arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bozulması, hiperplazi veya atrofi gibi patolojik değişimlere neden olabilir. Ayrıca, hareketli mukozada yenilenme hızının çiğneme mukozasına göre daha fazla olduğu bilinmektedir. [65,66,69].

2.3. Yara İyileşmesi

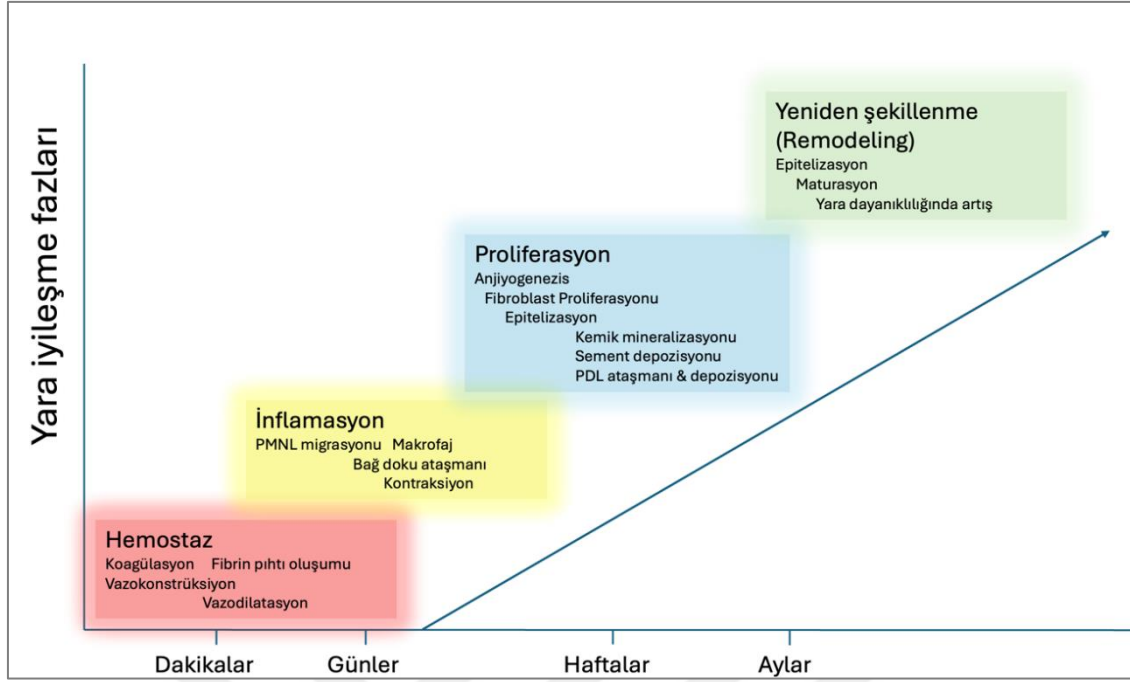
Dokunun normal fonksiyonunu yerine getirmesini engelleyecek şekilde, doku bütünlüğünün bozulması ile ortaya çıkan kayıplar “yara” olarak tanımlanır. Yara, dokuların dayanabileceği kuvvetin üstünde bir kuvvet ile karşı karşıya kaldıklarında mevcut fizyolojik özelliklerinin tamamen ya da geçici olarak kaybolmasıdır [70].

Yara iyileşmesi, yara oluşumu sonrası doku bütünlüğünün ve fonksiyonlarının yeniden kazanılması için gerçekleşen bir süreçtir. Hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olayların bütünleşmesi sonucu meydana gelmektedir. Yara iyileşmesinin temel prensibi; doku hasarını minimuma indirmek, dokunun yeteri kadar perfüzyon ve oksijenlenmesini, düzgün beslenmesini ve nemlenmesini sağlamaktır [3].

Ağız boşluğundaki yara iyileşmesi ciltte ve diğer vücut bölgelerinde meydana gelen yara iyileşmesinden bazı yönlerden farklılıklar göstermektedir. Bu farklar oral ortamın kendine özgü biyolojik ve fizyolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Oral mikrobiyom, tükürük, konuşma ve çiğneme hareketleri gibi mekanik travmalar, yara iyileşmesi mekanizması oral yara iyileşmesini etkileyen faktörlerdendir [12]. Oral mikrobiyom üzerine yapılan çalışmaların verilerine dayanarak, 775 mikrobiyal türün varlığını ortaya konmuştur (Expanded Human Oral Microbiome Database) [71]. Ağız mukozası, kompleks oral mikrobiyom nedeniyle bakteriyeminin neden olduğu enfeksiyonlara karşı hassastır. Sağlıklı insanlarda ağız mukozası ve cilt arasındaki moleküler, mikroskobik ve makroskobik yara iyileşme süreçlerinin incelenmesi sonucunda, oral yaraların cilt yaralarına kıyasla yara kapanmasının ve reepitelizasyonunun daha hızlı olduğu gösterilmiştir [72]. Çalışma, ağız mukozası ve cildin farklı transkripsiyonel profillere sahip olduğunu göstermiştir. Oral yaralarda gen ifadesinin daha erken aşamalarda bazal seviyelere döndüğü, keratinosit aktivasyonunun arttığı ve antimikrobiyal savunma belirteçlerinin yükseldiği belirlenmiştir [72]. Ağız boşluğunun damak ve diş eti bölgeleri, gün içinde yoğun mekanik kuvvetlere ve çiğneme ile besin tüketimi sırasında oluşan fiziksel travmalara maruz kalır. Bu nedenle, bu bölgelerde keratinize epitel oranı daha yüksektir ve dokular daha dayanıklı bir yapıya sahiptir [73].

Travmatik yaralanma, kapiller hasara ve kanamaya yol açarak kan pıhtısı oluşumuna neden olur. Herhangi bir travmaya karşı gelişen ilk fizyolojik yanıt pıhtı oluşumudur ve oluşan pıhtı açığa çıkan dokuları geçici olarak korumakta, hücre migrasyonu için geçici bir matriks görevi yapmaktadır [67]. Oral yara iyileşmesi, klasik yara iyileşme süreciyle benzer olarak dört temel evreden oluşur (Şekil : 2.1) [74,75]:

- Hemostaz evresi
- İnflamasyon evresi
- Proliferasyon evresi
- Yeniden şekillenme evresi



Şekil 2.1. Yara iyileşmesi fazları (Lindhe's Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 7. Baskıdan alınmıştır.) [74,75]

Akut yaralar, düzenli ve zamanında ilerleyen bir iyileşme süreciyle anatomik ve fonksiyonel bütünlüğü yeniden kazanmış yaralar olarak tanımlanır. Akut yaralar, normal inflamasyon, doku proliferasyonu ve yeniden şekillenme evrelerinden geçerek gerçekleşir. Genellikle iyileşme süreci 5, 10 veya 30 gün içinde tamamlanır. Bu tür yaralar cerrahi işlemler veya doku kaybına yol açan travmatik olaylar sonucunda meydana gelebilir [1]. İyileşme sürecinin başlangıcından itibaren 12 hafta geçmesine rağmen kapanmayan yaralar, uzamış inflamatuvar yanıt nedeniyle kronik yara olarak tanımlanır [76]. İyileşme sürecinin bir veya birden fazla evresinde meydana gelen bozulmalar, tam iyileşmenin gerçekleşmesini engelleyebilir. Bu durum, dokuda nekroz, hipoksi, enfeksiyon, eksuda artışı veya inflamatuvar sitokin seviyelerinin yükselmesi gibi komplikasyonlara yol açabilir. Kronik yaralarda sürekli inflamasyonun varlığı, doku iyileşme yanıtının uzun süreli ve düzensiz olmasına sebep olarak yara iyileşmesini geciktirir [1]. Kronik yaraların en yaygın nedenleri arasında diabetes mellitus gibi kronik hastalıklar, otoimmün bozukluklar, oksijen eksikliği, travma ve yaranın başlangıç evresinde yetersiz bakımı yer alır [77].

2.3.1. Hemostaz evresi

Yara iyileşmesinin ilk aşaması olan pıhtılaşma ve hemostaz evresi, dokunun hasar görmesiyle birlikte başlayan, kanamanın durdurulmasını ve yara iyileşmesinin temelini oluşturan kritik bir süreçtir. Bu evre, yara iyileşmesinin sonraki aşamalarının sağlıklı ve düzenli ilerleyebilmesi açısından büyük önem taşır. Hemostaz evresinin temel amacı kanamayı önlemek, ardından iyileşmenin ilerleyen evrelerinde ihtiyaç duyulan hücrelerin migrasyonu için uzun vadede geçici bir matriks oluşturmaktır [74].

Yara meydana geldiğinde, kan damarlarının bütünlüğü bozulur ve hasar alan damar üzerinde dokunun spontan bir reaksiyonu olarak geçici vazokonstriksiyon oluşur. Bu, kan kaybını azaltmaya yönelik ilk tepki olup endotelin, serotonin ve tromboksan A2 gibi vazokonstriktör moleküller tarafından düzenlenir [78]. Bu aşamada sitokinler salınarak iyileşme sürecini başlatır. Hasar gören bölgeye inflamatuvar hücreler göç ederek, hasar görmüş hücrelerin ve mikroorganizmaların uzaklaştırılmasına katkıda bulunur [79].

Kanama başlamasından itibaren dakikalar içinde trombositler, endotelial hasara yanıt olarak yara bölgesine göç eder. Bu süreç üç temel aşamadan oluşur [80]:

- Adezyon: Trombositler, von Willebrand faktörü aracılığıyla hasarlı endotel hücrelerine bağlanır.
- Aktivasyon: Trombositler, tromboksan A2 ve adenosin difosfat salgılayarak daha fazla trombositin bölgeye çekilmesini sağlar.
- Agregasyon: Trombositler, fibrinojen köprüleri aracılığıyla birbirine bağlanır ve geçici bir tıkaç oluşturur.

Trombosit tıkaçının stabil hale gelmesi için koagülasyon kaskadı aktive olur. Bu sekonder hemostaz süreci, intrinsek ve ekstrinsek yolların birleşmesiyle fibrin pıhtısının oluşumunu içerir. Fibrin polimerleri dayanıklı bir ağ yapısı oluşturarak kanamanın durdurulmasına katkı sağlar [81]. Kanamanın tamamen durdurulmasıyla birlikte, iyileşmenin bir sonraki evresine geçişi sağlanır.

Pıhtı oluşumu, dengenin korunması için fibrinoliz süreciyle kontrol edilir. Trombositler hemostaz mekanizmasında önemli rol üstlenirken, aynı zamanda inflamasyon,

reepitelizasyon, fibroplazi ve anjiyogenezis gibi yara iyileşmesinin diğer aşamalarına da katkıda bulunur. Ayrıca trombositler, kemotaktik faktörleri salgılayarak lökosit infiltrasyonuna neden olarak yara iyileşme sürecini etkiler [82]. Plazmin, fibrin ağını parçalayarak pıhtının çözülmesini sağlar ve doku iyileşmesini destekler. Doku plazminojen aktivatörü ve plazminojen, bu süreçte kritik rol oynar [83].

2.3.2. İnflamasyon evresi

İnflamatuvar yaralanmadan hemen sonra başlayan inflamasyon evresi, iyileşme sürecinin temel aşamalarından biridir. Yaralanma bölgesindeki kemokinler, inflamatuvar yanıtın başlamasına yol açar. Yaranın hemen ardından inflamatuvar hücrelerin göçüyle devam eder. Yaralanmadan 24 ila 48 saat sonra inflamasyon pik seviyeye ulaşır ve yaklaşık 3-5 gün sürer [84]. Doku hasarından hemen sonra başlayan geçici vazokonstriksiyon, hemostazın sağlanmasıyla sona erer. Ardından, histaminin etkisiyle kininler, lökotrienler ve prostaglandinlerin medyatörlüğünde vazodilatasyon süreci başlar. Meydana gelen bu vazodilatasyon, kan ve vücut sıvılarının ekstraselüler alana geçişine ve lenfatik drenajın engellenmesi gibi sebepler, inflamasyonun temel klinik belirtileri olan kızarıklık, şişlik ve sıcaklık artışı ile sonuçlanmasına neden olur [85].

İnflamasyon evresinin erken aşamasında, sitokinlerin salınımı ve kan damarlarının daralması gibi fizyolojik değişiklikler gözlenirken, fibroblastlar hızla çoğalmaya başlar ve yerleşik sitokinler, bağışıklık hücrelerinin yaraya göçünü teşvik eder. Bu evrede inflamasyonun temel amacı, hasarlı doku ve patojenlerin uzaklaştırılmasıdır [86].

Nötrofiller, inflamatuvar cevabın ilk hücreleri olarak yara bölgesine göç eder [87]. Nötrofillerin görevi; yabancı partikülleri, hasar görmüş dokuyu ve bakterileri fagositoz aracılığıyla parçalayarak ortamdan uzaklaşmasını sağlamaktır. Bu aşamanın ana amacı enfeksiyonun önüne geçmek, hasarlı ekstraselüler matris bileşenlerini debride etmek ve kompleman kaskadını tetikleyerek moleküler süreçleri başlatmaktır.

Nötrofiller, MMP gibi proteazları salgılayarak dokunun debride edilmesini sağlar [88], reepitelizasyonu başlatan sitokinleri salgılar ve diğer bağışıklık hücrelerinin göçünü teşvik eder. Nötrofil infiltrasyonu çoğunlukla birkaç gün devam eder, yaranın kontamine olduğu durumda, yara bölgesindeki nötrofillerin varlığı iyileşmeyi geciktirebilir [89]. Nötrofillerin

ardından monositler, yaralanmadan sonraki 48 ila 72 saat içerisinde yara bölgesine göç eder ve makrofajlara dönüşerek geç inflamatuvar evrede rol alır [90].

Makrofajlar, inflamasyon evresi sırasında proinflamatuvar M1 makrofaj polarizasyonunu teşvik eder. M1 makrofajları yarayı bakterilerden, yabancı partiküllerden ve ölü hücrelerden temizlemek için yaralanmadan sonra infiltre olur. Koagülasyon sürecinde ortaya çıkan kallikrein, fibrinopeptidler ile mast hücrelerinden salınan TNF, histamin, proteazlar, lökotrienler ve interleukinler, lökosit migrasyonunu yönlendiren kemotaktik sinyaller üretir [76].

Geç inflamatuvar evrede, M2 makrofajlar baskın hâle gelir. Bu hücreler, antiinflamatuvar sitokinler salgılayarak proinflamatuvar yanıtı baskılar ve iyileşmenin proliferatif faza geçişini kolaylaştırır. Hipoksik ortamda anjiyogenezi tetikleyen faktörler üretirler. M2 makrofajlar; FGF, VEGF, TGF- α ve TGF- β gibi büyüme faktörleri salarak hücre göçü, proliferasyonu ve matriks sentezi süreçlerini destekler. Bu yönüyle makrofajlar, inflamasyon ve iyileşme arasındaki geçişte merkezi rol üstlenir [86,91]. Makrofajlar yara bölgesinde yaklaşık 7 gün kalır ve inflamasyondaki zararlı uyarılar ortadan kalktıkça sayıları kademeli olarak azalır [3].

Sonuç olarak, inflamasyon evresi, mikropların ve ölü dokuların temizlenmesi, yeni doku oluşumunun başlaması ve iyileşmenin ilerlemesi için gereklidir. Ancak uzun süren inflamasyon dönemi, geniş çapta doku hasarına, gecikmiş proliferasyona yol açarak kronik bir yaranın oluşmasına neden olabilir.

2.3.3. Proliferasyon evresi

İnflamasyon evresini takiben başlayan bu faz genellikle üçüncü günde başlar ve birkaç hafta sürer. Proliferatif evre, granülasyon dokusu oluşumu, fibroblastların göçü, yara matürasyonunu desteklemek için neovaskülarizasyonun gerçekleştiği, anjiyogeneze, ECM birikimi, kolajen birikimi, epitelizasyonu ve yara retraksiyonunun yer aldığı bir süreçtir [92].

İnflamatuvar hücrelerin miktarı azalırken, keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerin sayısı artmaya başlar. Granülasyon dokusu, yoğun makrofajlar ve fibroblastların bulunduğu, temel olarak fibronektin, hyalüronik asit ve kolajenden oluşan gevşek bir matriks

yapısındadır. Yeni damarların oluşumu, dokuya makroskopik olarak granüler bir görünüm kazandırır [93]. Bu evrede rol alan başlıca hücreler fibroblastlar, endotel hücreleri ve keratinositlerdir.

Yara iyileşmesinin her aşamasında önemli bir rol oynayan kolajenler, fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. Fibroblastlar, kolajen, elastin ve proteoglikanlar gibi diğer matriks proteinlerini sentezleyerek yara bölgesinin güçlenmesini sağlar.

Tip III kolajen, erken dönemde sentezlenmeye başlar ve daha sonra tip I kolajen ile yer değiştirerek yara dokusunun dayanıklılığını artırır. Kolajen sentezi 5-7. günlerde en üst düzeye ulaşarak yara direncini önemli ölçüde artırır. Fibroblastların bu aktiviteleri, yara bölgesinin mekanik gücünü ve esnekliğini yeniden kazandırmada kritik öneme sahiptir [93]. Kolajenler, yara bölgesindeki hücre içi matriksin sentezinde de kritik bir rol oynar. Yara bölgesinin granülasyon dokusunda %40 oranında tip III kolajen bulunurken, sağlıklı dermiste %80 tip I ve %25 tip 3 kolajen bulunmaktadır [1].

Proliferasyon evresinin diğer önemli bileşeni, yara iyileşme fazlarının tüm aşamalarında gerçekleşen anjiyogenez olarak bilinen yeni damarların oluşumudur. Bu süreç yaralanma anında kan akışının kesilmesiyle ortaya çıkan düşük oksijen basıncı ve makrofaj aktivitesi ile uyarılmaktadır [94]. Bu evre, yara bölgesine oksijen ve besin maddelerinin taşınmasını sağlayarak metabolik ihtiyaçları karşılar. Anjiyogenez, trombositlerin, TGF- β , PDGF ve FGF salgılamasıyla birlikte, hemostatik tıkaç oluştuğu andan itibaren başlar. Hipoksiye yanıt olarak, diğer sitokinlerle birlikte VEGF sentezlenir, endotel hücrelerini neovaskülarizasyon sürecini başlatmaya ve hasarlı kan damarlarını onarmaya yönlendirir [76]. Yaranın merkezi başlangıçta damarsız bir yapıya sahiptir ve beslenmesi, çevredeki vasküler yapılardan difüzyon yoluyla sağlanır. Yara çevresindeki kapiller damarların oluşturduğu mikrovasküler ağ, iyileşmenin ilk günlerinde hızla gelişmeye başlar [95].

Endotelyal hücreler, mevcut damarlardan yeni kapiller ağlar oluşturur. VEGF, PDGF, anjiyogenin, TGF- α , TGF- β 'nın olduğu bir dizi yanıt oluşturur. Proteaz üretimi, kemotaksis, çoğalma ve yeniden şekillenme ve farklılaşma içeren dört aşamada gerçekleşir [74]. Bu yeni damarlar, granülasyon dokusunun canlılığını ve fonksiyonelliğini destekler [96].

Proliferasyon evresinin son aşaması granülasyon dokusu oluşumudur. Granülasyon dokusu, yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra yara bölgesini doldurmaya başlar ve yara bölgesinde keratinositlerin diferansiyasyonu ile reepitelizasyon başlar [97]. Epidermal hücrelerin yara yüzeyini kaplama süreci olan reepitelizasyon, keratinositler, yara kenarından göç ederek ve çoğalarak yeni bir epitel tabakası oluşturur. Reepitelizasyon süreci, cilt bütünlüğünün yeniden sağlanması ve enfeksiyon riskinin azaltılması için uygun nem dengesi ve beslenme ile desteklenebilir. Fibroblastların bir bölümünün miyofibroblastlara dönüşmesiyle yara kontraksiyonu başlar, yaranın derinliği ile konumuna bağlı olarak gerçekleşir. Yara kontraksiyonu döneminde keratinositlerin yara kenarından göç ederek reepitelizasyon sürecini başlatması, cilt bütünlüğünün yeniden kazandırılmasıyla enfeksiyon riskinin azaltılmasını sağlar [98].

2.3.4. Yeniden şekillenme evresi

Yeniden şekillenme ve maturasyon evresi, yara iyileşmesinin son aşamasıdır ve inflamasyon ile proliferasyon evrelerinde oluşan geçici dokuların, kalıcı ve fonksiyonel dokuya dönüşmesini içerir. Proliferasyon evresini takiben yaklaşık 3. haftada başlayan bu evrede, yara bölgesindeki fibroblast sayısı azalırken, kolajen üretiminin dengeye ulaşmasıyla epitelizasyon tamamlanır. Yeniden şekillenme evresinde, kolajen fibrillerinin yeniden düzenlenmesi, ECM olgunlaşması ve vasküler yapının stabilizasyonu gerçekleşir. Bu süreçler, yaranın mekanik dayanımını arttırarak fonksiyonel entegrasyonu sağlar [97]. Yeniden şekillenme evresinde iyileşme; başta PDGF, TGF- β ve FGF gibi büyüme faktörlerinin düzenleyici etkisi altında gerçekleşir [99].

Kolajen bu aşamada önemli bir rol oynar ve yaralanmadan sonra en az 4-5 hafta süresince sentezi devam eder. Tip III kolajenin tip I kolajene dönüşmesi, dokunun mekanik dayanımını arttırır. Kolajen liflerinin yeniden düzenlenmesi ve kalınlaşması, dokuya elastikiyet ve direnç kazandırarak uzun vadeli iyileşme sağlar [100].

Kolajenin üretimi ve yıkımı arasındaki denge MMP'ler tarafından sağlanmaktadır. İyileşme sürecinin pek çok aşamasında görev alan bu enzimler yeniden şekillenme sürecinde aktif olarak sentezlenen kolajenin parçalanmasından sorumludur. MMP'ler nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar gibi çeşitli hücre tipleri tarafından üretilme ve MMP aktivitesi matris metalloproteinazların doku inhibitörleri tarafından kontrol edilmektedir [3].

Altı haftalık bir sürenin sonunda yara dokusu, başlangıçtaki mekanik dayanımının yaklaşık %80'ine ulaşabilir. Nihai kazanılan direnç düzeyi; yaranın anatomik konumu ve iyileşme sürecinin niteliği gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte, doku genellikle orijinal gücünü tam olarak kazanamaz. Yeniden şekillenme evresi, yara alanının renginin soluklaştığı, tensil kuvvete karşı direncin arttığı ve skar dokusunun yapısal olarak stabilizasyon kazandığı bir dönemdir. Bu süre genellikle 6 ila 12 ay devam etmekle birlikte, bazı olgularda 24 aya kadar uzayabilir [101]. Akut yaralarda, iyileşme sürecinin normal seyri boyunca, sentez ile yıkım arasındaki dengeyi sağlamak için yeniden şekillenme aşaması, düzenleyici mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde yönetilir. Hücre içi matriksin olgunlaşmasıyla birlikte, kolajen demetlerinin çapı artarken hyalüronik asit ve fibronektin parçalanır. Yaranın gerilme direnci de kademeli olarak artar [102]. Yara olgunlaştıkça damarlanma seviyesi azalır ve skar dokusu düz, soluk ve pembe-gri renk alır [3].

Palatal yara iyileşmesinin, ağız içindeki diğer bölgelerdeki iyileşmeden en belirgin farkı, maturasyon aşamasında gözlemlenir. Palatal iyileşmenin son aşamalarında, hücre sayısı ve kolajen miktarı normal mukoperiost dokusundan daha yüksek seviyededir. Tip I kolajen lifleri, yatay bir şekilde dizilirken, damar miktarı azalmış olarak görülür. Klinik olarak bu süreç skar dokusunun oluşmasıyla belirginleşir [103]. Epitelizasyonun tamamlanması genellikle 3-5 hafta sürebilir. Epitelizasyon sürecinin değerlendirilmesinde sıklıkla, hidrojen peroksit kullanılmaktadır. Dokuda kabarcık oluşumunun olmaması, hidrojen peroksitin bağ dokusuna nüfuz edemediğini ve oksijen salınımını yapmadığını, böylece tam epitelizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir [104]. Bu dönemde, hücrelerin sayısı ve vasküler yoğunlukta azalması gözlemlenirken, artmış mekanik stabiliteye sahip skar dokusu formasyonu karakterize olur. Bu sürecin moleküler ve hücresel düzeyde anlaşılması, iyileşme sürecini kısaltmak için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

2.4. Yara İyileşmesinde Hücre Tipleri

Yara iyileşmesi süreci çeşitli aşamalardan oluşmakta olup her aşamada farklı hücreler rol almaktadır. İnflamatuvar yanıtın başlangıç evresi, trombositlerin aktive olarak pıhtı oluşturması, damar vazokonstriksiyonu, trombositlerin agregasyonu ve büyüme faktörlerinin salınımı ile karakterize edilir. İnflamatuvar infiltrasyonun erken evrelerinde, pıhtı formasyonunu ve sıvı kaybını takiben vazodilatasyon safhası oluşur. Kısa bir süre içerisinde lökositler, çevredeki kan damarlarının endotel hücrelerine marjine olarak ve

damar duvarını geçerek yara bölgesine doğru hareket etmeye başlar. Lökositlerin bu bölgeye yönelmesini sağlayan temel etken, hasar gören doku, bakteriler ve inflamatuvar yanıt sonucu oluşan kemotaktik sinyallerdir. Lökositlerin temel işlevi, yaralanan bölgedeki bakterileri ve yabancı maddeleri uzaklaştırarak enfeksiyon gelişimini önlemektir [105]. Bu süreç devam ederken, epitelial hücreler pıhtının altına doğru hareket ederek ve çoğalarak epitel yüzeyinin yeniden oluşumunu başlatır.

Doku iyileşmesinin bir sonraki aşaması, makrofajların aktif hale gelmesiyle öne çıkar. Makrofajlar, yalnızca bakterileri, hücre kalıntıları ve hasarlı dokuları temizlemekle kalmaz, aynı zamanda, iyileşme sürecini destekleyen büyüme faktörleri açısından zengin bir kaynaktır. Yara iyileşmesi sürecinde makrofajlar; hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve matriks bileşenlerinin uyumlu bir şekilde çalışmasını sağlayan düzenleyici bir rol üstlenir. İyileşme sürecinin bir sonraki aşamasında, epitelial köprülerin tamamlanmasıyla birlikte epitel hücreleri tarafından enzimler salgılanarak oluşan kabuğun hareketlenmesi sağlanır. Epitel hücreleri çoğalmaya devam ederek epitel katmanlarını yeniden oluşturur ve doku bütünlüğünün sağlanmasına katkıda bulunur [105]. Yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörleri Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörleri [106,107]

Büyüme Faktörleri	Kaynaklar	Hedefler
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)	Plazma, fibroblast, makrofajlar, keratinositler	Birçok hücre tipi için mitojenik Endotel ve fibroblast proliferasyonu
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Makrofaj, endotel hücreleri	Fibroblast proliferasyonu Anjiyogenez
Transforme büyüme faktör alfa (TGF- α)	makrofajlar, keratinositler trombositler ve fibroblastlar	Reepitelizasyon
Transforme büyüme faktör beta (TGF- β)	Trombosit, makrofaj	Fibroblast ve makrofaj kemotaksisi, Ekstraselüler matriks sentezi, proteaz inhibitör sekresyonu
Tümör nekroz faktör (TNF- α)	Makrofajlar, lenfositler	Kemotaktik ve anjiyojenik
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Trombosit	Reepitelizasyon
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	Makrofajlar, keratinositler	Anjiogenezin uyarılması
Trombosit Türevi büyüme faktörü (TGF- β)	Trombosit, makrofaj, keratinosit	Fibroblast ve makrofaj kemotaksisi, fibroblast proliferasyonu, ESM sentezi
Keratinosit büyüme faktörü	Dermal fibroblast	Keratinosit proliferasyonu
İnterlökinler (IL)	Makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler	Çoklu hedef
İnterferonlar (IF)	Lökositler, fibroblastlar	Virüslere karşı savunmayı uyarır

2.5. Yara iyileşmesi Türleri

2.5.1. Primer yara iyileşmesi

Primer yara iyileşmesi, doğrudan yara kenarlarının birleştirilmesi ve bu şekilde iyileşmesiyle gerçekleşen bir iyileşme sürecidir. Bu tür yaralar genellikle temiz, düzgün kenarlı ve cerrahi olarak kapatılabilen yaralardır. Primer iyileşme, yara uçlarının birbirine çok yakın olduğu ve enfeksiyon riskinin düşük olduğu durumlarda görülmektedir. Cerrahi müdahaleyle, yaranın kenarları dikilerek ya da farklı yöntemlerle kapatılır, böylece iyileşme süreci hızlandırmaktadır. Primer yara iyileşmesi genellikle daha hızlı iyileşme ve minimal yara iziyle sonuçlanırken, sekonder yara iyileşmesi daha belirgin inflamasyon, büzülme ve kolajen birikimini içermektedir [108].

Primer yara iyileşmesinde, bazal membranda az miktarda kayıp olmaktadır ve az sayıda epitel hücresi hasar almaktadır. Kesi hattı pıhtı ile dolduktan sonra granülasyon dokusu oluşmakta ve yara yüzeyi yaklaşık 24-48 saatte epitel ile örtülmektedir [3].

2.5.2. Sekonder yara iyileşmesi

Sekonder yara iyileşmesi, yara kenarlarının yan yana getirilemediği, yumuşak doku kaybının bulunduğu ve dolayısıyla cerrahi müdahale ile kapatılamayıp yara bölgesinin doğal iyileşmeye bırakıldığı iyileşme şeklidir. Bu yaralarda sütur kullanılamamaktadır. Epitelyal hücrelerin tek başına olan rejenerasyonu dokunun orijinal yapısını yeniden kazandıramaz. Bu iyileşmede yoğun inflamatuvar yanıtla birlikte, hücre dışı matris birikimi ve granülasyon dokusu oluşumu oldukça fazladır [67].

İyileşme süresi yaranın boyutu ve derinliğine bağlı olarak değişir. Yara yüzeyinin geniş olduğu sekonder yara iyileşmesinde, daha fazla pıhtı oluşumu görülür ve ortadan kaldırılması gereken daha fazla debris olduğundan, primer yara iyileşmesine kıyasla daha yoğun inflamatuvar yanıt gözlemlenir. Sekonder yara iyileşmesinde yara kontraksiyonu daha fazladır [3].

Periodontal tedavi uygulamalarından olan serbest diş eti grefti, laterale kaydırılan flep, frenektomi, gingivektomi ve gingivoplasti operasyonları sonrası ameliyat yaraları sekonder iyileşmeye bırakılır [109]. Sekonder iyileşme süreci, primer iyileşmeye kıyasla daha yavaş

ilerlemekte ve çevresel kontaminasyon nedeniyle enfeksiyon riski taşımaktadır [110]. Ağız içi sekonder yaralarda; kanama, mikroorganizmalara bağlı enfeksiyon ve fonksiyonel yapının anatomik bütünlüğünün bozulması gibi dezavantajlar bulunmaktadır.

2.6. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Etkili bir yara iyileşmesinin sağlanabilmesi için, hasarlı bölgeye yeterli kan akışı ve besin maddelerinin ulaşması gereklidir. Bu süreç, hastanın genel sağlık durumu ve beslenme alışkanlıklarından doğrudan etkilenmektedir. Yara iyileşmesinin geciktiği durumlarda, özellikle ağız içindeki lezyonlarda enfeksiyon riski artar ve hastanın besin alımı zorlaşabilir. Yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebilecek çeşitli faktörler bulunmaktadır. Periodonsiyumdaki iyileşme potansiyeli, vücudun diğer bölgelerindeki yara iyileşmesinde olduğu gibi lokal, sistemik faktörler ve cerrahi prosedürler tarafından etkilenmektedir [111]. (Çizelge 2.2)

Çizelge 2.2. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler [111]

Lokal	Sistemik	Cerrahi prosedürler
Oksijenizasyon Enfeksiyon Yara kanlanması ve lokalizasyonu Yabancı cisim ile kontaminasyon Vasküler bozukluklar Yara hidrasyonu	Beslenme Yaş ve Cinsiyet İrk Stres İlaçlar Büyüme faktörleri Sistemik hastalıklar Kalıtsal hastalıklar Diyabet Dolaşım bozuklukları Bağışıklık sistemi Sigara Radyasyona maruziyet	Flep tasarımı Isı Kemik yapısı Lokal anestezi Sütür tekniği Postoperatif kanama Ödem

2.6.1. Lokal faktörler

Yara iyileşmesi süreci, enfeksiyon, nekrotik doku varlığı, yetersiz kan akımı, yabancı cisimler, hipoksi ve devam eden kanama gibi birçok lokal faktör tarafından olumsuz yönde etkilenebilmektedir.

Oksijenizasyon

Tüm yara iyileşme aşamalarında kritik bir öneme sahiptir. Oksijen, yaraların enfeksiyondan korunmasına yardımcı olur, anjiyogenezi tetikler, keratinositlerin farklılaşmasını, göçünü ve yeniden epitelizeasyon sürecini hızlandırmaktadır. Fibroblastların proliferasyonunu ve kolajen sentezini artırarak yara kontraksiyonunu desteklemektedir. Polimorfonükleer lökositler tarafından üretilen süperoksit miktarı oksijen seviyeleriyle doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir [112]. Yara iyileşmesinin en iyi şekilde gerçekleşebilmesi için, yara yüzeyindeki dokunun yeterli oksijen seviyesine sahip olması önem taşımaktadır. Doku hipoksisi, kolajen sentezini bozarak yara iyileşmesi sürecini aksatır, bakteriyel enfeksiyonlara karşı direnci azalmakta ve hücresel yenilenmeyi olumsuz yönde etkilemektedir [112].

Yara iyileşmesi sürecinde, hidrojen peroksit ve süperoksit gibi ROT, hücresel haberci olarak işlev görerek hücre hareketliliğini, PDGF sinyal yolları aracılığıyla sitokin aktivitesini ve anjiyogenezi teşvik etmektedir. Hipoksik ve hiperoksik koşullar ROT üretimini artırsa da, ROT birikiminin fazla olması doku hasarına ve iyileşme sürecinin bozulmasına yol açabilmektedir [113].

Doku kanlanması

Vasküler yapının bozulması ve metabolik olarak aktif hücrelerin yüksek düzeyde oksijen tüketimi sonucunda, yara mikroçevresi erken dönemde oksijen açısından yetersiz hale gelmekte ve belirgin bir hipoksi oluşmaktadır. Yaşlanma ve diyabet gibi çeşitli sistemik hastalıklar, vasküler dolaşımı olumsuz etkileyerek yetersiz doku oksijenasyonuna neden olabilmektedir. İyileşme sürecinde perfüzyonun gereken düzeyde devam etmemesi, hipoksik bir yara ortamının oluşmasına yol açabilmektedir [113].

Enfeksiyonlar

Ağız boşluğu, karmaşık oral mikrobiyoma sahip olması ve sürekli tükürükle temas halinde bulunması nedeniyle, yara iyileşmesi açısından dinamik ve zorlu bir bölge olarak kabul edilmektedir. Oral yaraların iyileşme sürecinde enfeksiyon riski daha yüksek olabilir ve iyileşmenin aksama ihtimali artabilir [114]. Yara bölgesinden mikroorganizmalar tamamen uzaklaşana kadar inflamatuvar yanıt devam etmektedir. Yaranın yetersiz bir şekilde

dekontamine edilmesi, uzun süreli inflamasyona yol açarak iyileşme sürecini olumsuz etkileyerek, kronikleşen yaralar meydana gelmesine sebep olabilir. Kronik inflamasyon nedeniyle yaranın kapanamaması ve sürekli bakteri girişinin aracılık etmesi, bir kısır döngü yaratır. Üstelik, kolonize olan bakteriler, sistemik antibiyotiklerin ulaşamayacağı biyofilm yapılarına dönüşerek enfeksiyonun dirençli hale gelmesine neden olabilir. Bu biyofilm, konakçı bağışıklık yanıtına karşı korunaklı olup, tedaviyi daha da zorlaştıran bir faktör haline gelir [115]. Uygun antiseptik uygulamaları ve sterilizasyon yöntemleri, başarılı bir iyileşme süreci için kritik öneme sahiptir [116].

Yabancı cisim reaksiyonu

Vücut bütünlüğünün bozulduğu durumlarda yara bölgesindeki biyolojik olmayan materyaller (sütur materyali, nekrotik doku kalıntıları, enfekte partiküller, fark edilmeksizin operasyon bölgesinde kalan yabancı cisimler, gazlı bez parçaları, biyomateryaller) bağışıklık sistemi tarafından tanınarak inflamatuvar bir yanıt başlatılması, yabancı cisim reaksiyonu olarak tanımlanır [117]. Yabancı cisimlerin inflamatuvar süreci doğrudan uyarması yara iyileşmesinin gecikmesine, enfeksiyon riskinin artmasına ve granülasyon dokusu oluşumunun olumsuz etkilenmesine yol açabilir. İmplant cerrahisinde sıklıkla kullanılan greft materyalleri, yara yatağında yabancı cisim reaksiyonlarını indükleyebilmektedir. Söz konusu materyaller, yalnızca iyileşme sürecini olumsuz etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda çevre dokularda renk değişiklikleri gibi istenmeyen estetik sonuçlara da neden olabilmektedir. Yara alanında biriken partikül kontaminasyonları, doku bütünlüğünü bozarak rejeneratif sürecin aksamasına neden olmaktadır. Bu tür kontaminasyonların eşlik ettiği olgularda, yabancı cisimlerin ortamdan uzaklaştırılması, bakteriyel yükün azaltılmasına ve yara ortamının iyileşmeye daha elverişli hale getirilmesine katkı sağlamaktadır [118-120].

Yara hidrasyonu

Yara örtücü materyaller, yara üzerinde nemli bir mikroçevre oluşturarak ve bu nemin sürekliliğini sağlayarak iyileşme sürecine olumlu katkı sağlar. Bu nemli ortamın varlığı, epitel hücrelerinin migrasyonunu hızlandırmakta ve genel iyileşme sürecini desteklemektedir [121].

2.6.2. Sistemik faktörler

Beslenme

Yara iyileşmesi süreci, enerji metabolizması ve anabolik reaksiyonların etkin biçimde gerçekleşmesini gerektirir. Beslenme bozukluğu bulunan bireylerde bu süreç optimal işleyiştten sapmakta, iyileşme gecikmekte ve enfeksiyon insidansında artış gözlenmektedir. Yetersiz beslenme, immünolojik savunma mekanizmalarını baskılayarak enfeksiyonlara karşı direncin azalmasına neden olmakta, yara bölgesinde enfeksiyon gelişim riskini artırmakta ve iyileşmeyi kesintiye uğratabilmektedir.

Protein, yara onarım sürecini doğrudan modüle eden temel besin öğelerindendir. Yetersiz protein alımı; kapiller formasyonu, fibroblast proliferasyonu, proteoglikan ve kolajen sentezi ile doku rejenerasyonunu olumsuz etkileyebilir [120]. Protein eksikliği lökosit fagositoz kapasitesinin azalmasına ve enfeksiyon riskinin yükselmesine yol açarak immün fonksiyonları bozabilir.

Metiyonin, arjinin ve sistein gibi spesifik amino asitler, yara iyileşmesinin moleküler mekanizmalarında kritik roller üstlenir. Arjinin, yüksek katabolik stres ve travma durumlarında gerekli olan yarı-esansiyel bir amino asittir. İmmün regülasyon, yara rejenerasyonu, hormon sekresyonu, vasküler tonus ve endotel fonksiyonları gibi çoklu biyolojik süreçlerde etkilidir [122]. Prolinin öncüsü olan arjinin için kolajen sentezi, anjiyogenez ve yara kontraksiyonunda önemli bir yere sahiptir. Kolajen sentezi, anjiyogenez ve yara kontraksiyonunda prolin öncülü olarak işlev gören arjinin, sağlıklı ve komorbiditeyi bireylerde immün yanıtı destekleyerek iyileşmeyi hızlandırır [123].

Kolajen, bağ dokusunun ana protein bileşeni olup temel olarak glisin, prolin ve hidroksiprolinden oluşur. Kolajen üretimi için lizin ve prolinin hidroksilasyonu gerekir ve bu süreç, feröz demir ve C vitamini gibi yardımcı faktörlerin varlığına bağlıdır. Bu faktörlerden herhangi birinin eksikliği yara iyileşmesinin aksamasına yol açabilir [122].

Vitaminler

A vitamini, hücresel farklılaşma, epitelizasyon ve immün sistemde kofaktör olarak görev almaktadır. Yara iyileşmesinde monosit-makrofaj migrasyonunu arttırarak inflamatuvar

yanıtı güçlendirir, kolajen sentezini modüle eder ve epitel farklılaşmasını indükler. C vitamini eksikliği ise epitelizasyon süresinin uzamasına ve doku mekanik direncinin azalmasına neden olur, kolajen biyosentezinde zorunlu olan amino asit hidroksilasyonunu inhibe eder, yapısal bütünlüğü düşük kolajen üretimine yol açar, inflamatuvar cevabı bozar ve gerilme direncini düşürür [122,124]. Protein, C vitamini, çinko ve demir gibi mikro-makro besin öğelerindeki eksiklikler, kolajen sentezini ve doku onarımını olumsuz etkileyerek iyileşmeyi olumsuz etkiler [124].

Yaş

Genç bireylerde hormonal profillerin uygunluğu, artmış doku rejenerasyon kapasitesi ve optimal hücrel fonksiyonlar nedeniyle skar formasyonu genellikle hızlı ve düzenli gerçekleşirken, ileri yaşlarda hücrel rejenerasyon kapasitesindeki düşüşe ve mikro çevresel değişiklikler, yara iyileşmesi dinamiklerinde belirgin farklılıklara yol açabilmektedir.

Sigara

Tütün kullanımının yara iyileşmesini olumsuz etkilediği, randomize kontrollü çalışmalarla doğrulanmış; postoperatif enfeksiyon, yara açılması, doku nekrozu, epidermolizis ve yara gerilme direncinde azalma insidansı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [125,126].

Yara iyileşmesi mekanizması, sigaranın içerdiği nikotin, karbon monoksit ve hidrojen siyanür gibi maddelerin etkileriyle bozulur. Nikotin, sempatik sinir sistemini uyarak epinefrin salınımını tetikler, periferik vazokonstriksiyon ve doku kan perfüzyonunun azalmasına yol açar [126]. Vazokonstriksiyon etkisiyle iskemiye yol açarak dokulara oksijen tedarikini engeller. Fibrinolitik aktiviteyi azaltarak ve trombosit adezivliğini arttırarak kan viskozitesini arttırır. Karbon monoksit, hemoglobine oksijenden 200 kat yüksek afinite ile bağlanarak oksihemoglobin satürasyonunu düşürür [127]. Diğer bir bileşen olan hidrojen siyanür ise mitokondriyal sitokrom oksidazı inhibe ederek hücrel oksijen metabolizmasını bozar [128]. Sigara, ateroskleroz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi durumları arttırarak doku oksijen seviyelerinin düşmesine yol açabilir.

Sigara, inflamatuvar evrede lökosit kemotaksisini inhibe ederek yara bölgesinde monosit ve makrofaj birikimini azaltır, nötrofil bakterisidal aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır.

Fibroblast migrasyonu, proliferasyonu ve ECM sentezini bozar [126], böylece yara iyileşmesinde gecikmeye ve fırsatçı enfeksiyon riskinin artmasına yol açar [129].

Sigaranın bırakılması yara iyileşmesini iyileştirdiği ve enfeksiyon riskini azalttığı net bir şekilde ifade edilmiştir. Sigaranın genel olumsuz etkilerine rağmen, düşük dozda nikotinin anjiyogenezisi artırarak iyileşmeyi hızlandırabileceği araştırmalar tarafından öne sürülmüştür [130,131].

Ameliyat öncesinde dört hafta boyunca sigara içmemenin inflamatuvar fazı iyileştirdiği ancak proliferatif fazı kesintiye uğrattığı ileri sürülmüştür. Sigaranın neden olduğu hasarın, C ve E vitamini takviyesiyle, özellikle kolajen oluşumu alanlarında hafifletilebileceği öne sürülmektedir [132]. Yapılan bir inceleme, sigarayı bırakmanın ameliyat sonrası komplikasyonlarda azalma ile ilişkili olduğunu belirtmiştir [133].

Diyabet

Diyabet hastaları, hipoksi, fibroblast ve epidermal hücre disfonksiyonu, zayıf anjiyogenez ve neovaskülarizasyon, artmış metalloproteaz aktivitesi, azalmış konak immün yanıtı ve nöropati gibi nedenlerle yara iyileşmesinin bozulması açısından yüksek bulundurulur [120]. Diyabetli bireylerde artan kan viskozitesi, atardamar tıkanıklığı ve toplardamar sklerozu gibi vasküler komplikasyonlara yol açarak kan akışını azaltır. Bu durum, yara bölgesine oksijen ve besin maddelerinin taşınmasını güçleştirerek iyileşme sürecinin gecikmesine neden olur. İnflamatuvar evrenin uzaması ve bağışıklık yanıtının yetersizliği, yara iyileşmesini engelleyerek kronik yara oluşumuna zemin hazırlar [134] .

İlaçlar

Steroidler, aspirin, antikoagülanlar, antineoplastik ilaçlar, penisilamin ve fenilbutazon gibi çeşitli ilaçlar, yara iyileşmesini etkileyebilir. Pıhtılaşma, trombosit fonksiyonu, inflamatuvar reaksiyonlar ve hücre çoğalmasını etkileyen ilaçlar bu süreci önemli ölçüde değiştirir. Kortikosteroidler, yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyerek, yara gerilme kuvvetini ve iyileşme kalitesini azaltabilir. Topikal steroidler benzer olarak yara iyileşmesinin yavaşlamasına ve bağışıklık sisteminin zayıflamasına yol açabilir [135]. Yaralar, genellikle daha uzun sürede iyileşir ve iyileşme sürecinde komplikasyonlar meydana gelebilir.

Kemoterapi

Kemoterapötik ajanlar, hücresel aktiviteleri, replikasyonu ve anjiyogenezi engelleyerek neoplazmlar üzerinde tedavi edici etkiler gösterir [7]. Bu ilaçlar yara iyileşmesi süreçlerini olumsuz yönde etkileyebilir. Kemoterapi alımı sonucu yara bölgesindeki T hücre infiltrasyonu gecikir, kolajen üretimi düşer, fibroblast proliferasyonu inhibe olur ve bağışıklık yanıtının zayıflamasına sebep olur. Nötropeni ve trombositopeni gibi yan etkiler nedeniyle, yaraların enfeksiyon riski ve uzun süreli kanama olasılığının artmasına neden olabilir.

Radyasyona maruz kalma

Yüksek dozda uygulanan radyasyon, yara bölgesindeki hücresel aktiviteleri bozarak, iyileşme sürecini geciktirebilir ve bağışıklık fonksiyonlarını zayıflatabilir. Özellikle baş-boyun bölgesine yönelik radyoterapi alan hastalarda bu etkiler daha belirgin hale gelir. Ağız kanseri tedavisi gören ve 50Gy üzeri radyasyon dozu uygulanan bireyler, diş çekimi gibi invaziv işlemler sonrasında osteoradyonekroz ve gecikmiş yara iyileşmesi gibi komplikasyonlara daha yatkın hale gelir. Bu nedenle radyoterapi öyküsü bulunan hastaların postoperatif iyileşme süreci dikkatle izlenerek koruyucu önlemler uygulanmalıdır [136].

2.6.3. Cerrahi faktörler

İyileşme sürecine uygun destekleyici yapı sağlamak amacıyla cerrahi kesilerin sağlam ve iyi vaskülarize kemik dokusu üzerinde gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Termal hasarın en aza indirilmesi önem taşırken, yetersiz irrigasyon veya aşırı elektrokoter kullanımı, lokal doku nekrozu veya sekestrasyon gelişimine neden olabilir. Süturlama aşamasında, yara kenarlarında meydana gelen aşırı gerilim flep nekrozu riskini arttırabilir. İpek süturların bakteriyel adezyon potansiyelleri nedeniyle yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebileceği, rapor edilmiştir [137]. Teflon, naylon ve poliglikonat gibi materyaller, biyouyumlulukları ve düşük doku reaksiyonları sayesinde daha avantajlı seçenekler olarak değerlendirilmektedir. Bu suture materyalleri, minimal inflamatuvar yanıt oluşturarak enfeksiyon riskini azaltmakta ve iyileşme sürecini desteklemektedir [137].

Ameliyat sonrası stabil bir kan pıhtısının oluşumu, granülasyon dokusu gelişimini teşvik ederek yara iyileşmesini desteklemektedir [114]. Kanama bozuklukları, antikoagülan veya

antiplatelet ilaç kullanımı gibi faktörler, postoperatif kanama riski taşıyan hastaların tespit edilmesi için ayrıntılı tıbbi öykü alınması önem taşır. Bu tür lokal risklerin azaltılması amacıyla, okside selüloz, kemik mumu, traneksamik asit gibi hemostatik ajanların kullanımı ile suture uygulanması tercih edilen yöntemler arasındadır [116].

2.7. Periodontal Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, bir dizi hücresel ve biyokimyasal olayları içeren, çeşitli hücre tiplerinden gelen sinyaller tarafından düzenlenen ve birbirleriyle ilişkili çeşitli aşamalarla gerçekleşen dinamik ve karmaşık bir süreçtir. Periodontal yara iyileşmesi, diş eti ve çevre dokuların çeşitli faktörlerin etki mekanizmaları nedeniyle hasar görmesi sonucu bu dokuların yeniden sağlıklı hale gelme sürecini ifade etmektedir. Periodontal yara iyileşmesinde; mikrobiyal dental plak gibi çevresel faktörler, avasküler sert diş yüzeyi, çok sayıda özelleşmiş hücre tipi ve ataşman bağlantıları bulunmaktadır.

Yara iyileşmesi süreci, karmaşık hücresel ve biyokimyasal mekanizmalar içerir [138]. Temel iyileşme mekanizmaları tüm periodontal tedavilerde benzer şekilde ilerlemektedir. Bu mekanizmaların işleyişi; hasar görmüş doku artıklarının uzaklaştırılması ve hastalık nedeniyle kaybedilen dokuların yeniden oluşması şeklinde gerçekleşmektedir. Periodontal yara iyileşmesi, periodontal dokuların rejenerasyonunu ve onarımını ifade etmesine rağmen her zaman ataşman kazancının sağlanacağı anlamına gelmemektedir [139]. Bununla birlikte, periodontal yara iyileşmesi ile ilgili araştırmalar, geleneksel periodontal tedavinin rejenerasyon yerine çoğunlukla onarımla sonuçlandığını göstermektedir [140]. Kayıp periodontal yapıların yeniden oluşturulmasında, geleneksel mekanik tedavi yöntemlerinin tamir mekanizması ile sınırlı kaldığı gözlemlenirken; greft materyallerinin ve bariyer membranlarının kullanıldığı yönlendirilmiş doku rejenerasyonu gibi çeşitli rejeneratif prosedürlerin (farklı başarı oranlarıyla) sınırlı rejenerasyon sağladığı gösterilmektedir [141,142].

Periodonsiyumun rejenerasyonu, fizyolojik olarak sürekli devam eden bir süreçtir. Normal şartlar altında, kaybolan veya yaşlanan hücrelerin yerini yenilerinin alabilmesi için sürekli yapım-yıkım mekanizmalarının dinamik bir şekilde sürekliliği gerekmektedir. Bu dinamik süreç, periodontal dokuların bütünlüğünün ve fonksiyonunun korumasına olanak sağlamaktadır. Periodontal bağ dokusunda gerçekleşen mitotik aktivite, yeni hücre

oluşumunu destekleyerek dokunun yenilenmesini sağlamaktadır. Periodontal tedavi, bakteriyel plağın elimine edilmesi sonucu ve doku iyileşmesini destekleyen uygun biyolojik koşulların oluşumunu sağlayarak rejenerasyon sürecinin önündeki engelleri ortadan kaldırır. Periodontal dokuların rejeneratif kapasitesinin etkin bir şekilde kullanımının sağlanması sonucu yeni ataşman oluşumu teşvik edilmektedir. İnflamasyonun kontrol altına alınması ve doku stabilitesinin sağlanması, periodontal tedavinin rejenerasyon üzerindeki olumlu etkilerini artıran temel unsurlardandır [139].

Literatür, oral mukoza yaralanmalarının cilt yaralanmalarına kıyasla daha hızlı ve daha az skar dokusu ile iyileştiğini göstermektedir [143,144]. İnflamatuvar süreçte kritik bir sitokin olarak bilinen IL-1, oral dokulardaki yara iyileşmesinde önemli bir rol oynarken dermal yara iyileşmesinde böyle bir rolünün bulunmadığı belirtilmiştir. IL-1'in ağız boşluğundaki kommensal bakterilere karşı savunma mekanizmalarını düzenlemesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir [145].

Periodontal cerrahi işlemler; periodontal dokuları yeniden yapılandırmak, estetiği sağlamak, diş etlerinin fonksiyonel durumunu düzenlemek, hastanın oral hijyenini kolaylaştırmak, yüksek konumlanmış frenilum ve kas ataşmanlarının uzaklaştırmak amacıyla gerçekleştirilmektedir. Periodontal cerrahi sonrası iyileşme, kullanılan cerrahi tekniklere bağlı olarak değişebilmektedir. Diş eti grefti uygulamaları ve gingivektomi gibi prosedürler, farklı iyileşme süresi ve hızlı ile sonuçlanır. Greft uygulamaları sonrası doku iyileşmesi, greftin kabulü ve yeni doku oluşumu ile doğrudan ilişkilidir. Periodontal cerrahi sonrası iyileşmenin hızını ve kalitesini lokal ve sistemik faktörlerin etkilediği bildirilmiştir [109].

2.7.1. MMP-9 ve S100A4'ün doku iyileşmesindeki rolleri

MMP'ler, ECM'nin yeniden şekillenmesini sağlayan çinko bağımlı endopeptidazlardır. MMP-9, jelatin ve tip IV kolajen gibi ECM bileşenlerinin yıkımında görev almaktadır ve fizyolojik süreçlerde olduğu kadar patolojik süreçlerde de önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir [47]. MMP-9, embriyonik gelişim, doku şekillenmesi, anjiyogenez ve yara iyileşmesi gibi biyolojik olaylarda aktif olarak görev yapmakta olup [45,146], inflamatuvar hücrelerden salınarak yara bölgesindeki iyileşme sürecine katkı sağlamaktadır[47].

Periodontal ligament, sement ve alveolar kemik gibi periodontal dokular üzerinde MMP-9 yıkıcı etkiler gösterebilmektedir. Diyabetik bireylerde, gingival dokularda artmış MMP-8 ve MMP-9 düzeyleri, kolajen yıkımını arttırarak periodontal yıkımı da hızlandırmaktadır [147]. *Porphyromonas gingivalis* gibi periodontal patojenlerin lipopolisakkaritlerine karşı gelişen inflamatuvar yanıt sonucunda MMP-9 ekspresyonu artmakta ve periodontal bağ dokusunun ilerleyici yıkımı gözlenmektedir [148]. MMP-9'un yara iyileşmesindeki rolü doku yıkımıyla sınırlı olmayıp anjiyogenezi indükleyen önemli mekanizmalardan kabul edilir. Tip IV kolajen gibi bazal membran bileşenlerini yıkarak, endotel hücrelerinin migrasyonu ve yeni damar oluşumu için uygun bir mikro çevre yaratır [148]. MMP-9'un akut ve kronik yara iyileşmesi süreçlerinde kritik bir modülatör olduğu düşünülmektedir [149,150].

S100A4 proteini, kalsiyum bağlayıcı S100 protein ailesine ait olup anjiyogenez, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve hareketliliği gibi çeşitli biyolojik olaylarda görev almaktadır [151]. S100A4 hücre içi (çekirdek ve sitoplazma) ve hücre dışı bölgelerde lokalize olmasıyla çok işlevli bir protein olarak tanımlanır [152]. Anjiyogenezin düzenlenmesi, inflamatuvar yanıtın kontrolü ve tümör progresyonu ile ilişkilendirilen S100A4, NF- κ B ve ERK1/2 gibi sinyal yollarını aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve immün hücrelerin göçünü indüklemektedir [55,153,154].

Periodontal hastalıkların patogeneğinde S100A4 proteininin inflamatuvar sitokin ekspresyonunu arttırdığı ve osteoklast aktivitesini tetikleyerek kemik rezorpsiyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [155]. Yapılan bir çalışmada; yanıkla indüklenen korneal yaralanmalarda S100A4'ün baskılanması sonucu iyileşmenin hızlandığı ve doku bütünlüğünün daha hızlı sağlandığı gösterilmiştir [156].

S100A4 ile MMP-9 arasında yakın bir biyolojik ilişki olduğu bilinmektedir. Özellikle tümör hücrelerinde yapılan çalışmalarda, S100A4 proteininin MMP-9 ekspresyonunu arttırarak hücre invazyonunu, anjiyogenezi ve metastazı desteklediği gösterilmiştir [154]. Periodontal dokularda, bu iki molekülün birlikte ekspresyon göstermesi; kronik inflamasyon, doku hasarı ve rejeneratif yanıtların anlaşılması açısından önemli bilgiler sunmaktadır. S100A4 proteininin aktive fibroblastlar ve miyofibroblastlardaki ekspresyon artışı, yara bölgesinde yeniden şekillenme sürecine katkı sağladığını göstermektedir. S100A4'ün MMP-9 aracılığıyla ECM yıkımını modüle etme potansiyeli, bu proteinin doku yeniden şekillenme sürecindeki işlevsel rolünü desteklemektedir [152,157]

2.8. Sekonder Yara İyileşmesinde Kullanılan Ajanlar

Periodontal cerrahi sonrası sekonder iyileşmeye bırakılan yara dokusu, kontaminasyona karşı duyarlı olup, iyileşme süreci lokal ve sistemik faktörden etkilenmektedir. Diş hekimliği pratiğinde enfeksiyon riskini azaltmak ve iyileşme sürecini desteklemek amacıyla tarihsel süreç içerisinde çeşitli farmakolojik ve biyolojik ajanlar geliştirilerek klinik kullanıma sunulmuştur.

İlk dönemlerde, yara iyileşmesini desteklemek amacıyla antiseptik solüsyonlar ve lokal antibiyotikler yaygın olarak tercih edilmiştir. Bu ajanlar arasında en sık kullanılanlardan biri olan klorheksidin glukonat içeren ağız gargaraları, yara bölgesinde gösterdiği antimikrobiyal etki sayesinde enfeksiyon riskinin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır. Klorheksidin, uzun süredir “altın standart” olarak değerlendirilmiş olsa da, çeşitli çalışmalarla bu ajanın iyileşme süreci üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceği, kolajen sentezini baskılayarak doku onarımını geciktirebileceği ortaya konmuştur [158]. Klorheksidin kullanımına bağlı olarak gelişen kserostomi, oral mukozada deskuamasyon [159] ve antimikrobiyal direnç gibi advers etkiler uzun süreli kullanımını kısıtlayan başlıca faktörler arasında yer almaktadır [160].

Antimikrobiyal ve yara örtücü özelliklere sahip hidrojel, klorheksidin ve simvastatin içeren jel formların kullanımı, yara iyileşmesini destekleyerek postoperatif morbiditenin azaltılmasına katkı sağlamaktadır [161]. Jel formundaki bu ürünlerin, yara bölgesini dış etkenlerden izole ederek koruyucu bir bariyer görevi görür; böylece yara iyileşmesi sürecinin daha fizyolojik bir ortamda ilerlemesine olanak tanımaktadır [162].

1990’lı yıllardan itibaren biyolojik ajanların yara iyileşmesinde kullanımı giderek önem kazanmış, bu doğrultuda trombosit zengin plazma ve trombosit zengin fibrin (PRF) gibi trombosit konsantreleri, içerdiği büyüme faktörleri aracılığıyla fibroblast proliferasyonu, kolajen üretimini ve anjiyogenezi uyatarak sekonder yara iyileşmesini anlamlı şekilde desteklemektedir [163]. PRF, içerdiği büyüme faktörlerinin yavaş salınımı sayesinde uzun süreli biyolojik aktivite göstererek doku rejenerasyonunu desteklemektedir. Bu ürünlerin, kemik içi defektlerin tedavisinde greft, membran ile kombinasyonunun ek bir yarar sağlamadığı ve klinik sonuçlarının tartışmalı olduğu bildirilmektedir [164-166]. Özel santrifüj cihazlarına, taşıyıcı materyallere ve deneyime gereksinim duyulması, bazı

formlarında antikoagülan içermesi nedeniyle bazı olgularda iyileşmeyi sınırlayabilmesi başlıca kısıtlılıklarındandır.

Rekombinant insan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (rhPDGF- $\beta\beta$), hücrel proliferasyon, kemotaksis ve anjiyogenez gibi yara iyileşmesini hızlandırıcı ve rejeneratif süreçleri destekleyici özellikleriyle etkin bir büyüme faktörüdür. Özellikle periodontal rejenerasyonda kemik, periodontal ligament ve sement gibi dokuların yeniden oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiş olan bu ajan [18,167], beta-trikalsiyum fosfat ile kombinasyon halinde 2005 yılında FDA onayı almıştır [167]. Rejeneratif tedavilerde kullanılan rhPDGF, TGF- β ve FGF gibi büyüme faktörleri, taşıyıcı materyaller aracılığıyla kontrollü salınım sağlayacak şekilde uygulanmakta olup; kolajen membranlar ve biyobozunur hidrojel sistemler bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Doku iyileşmesini ve rejenerasyonunu destekleyen biyolojik ajanlardan olan mine matriks türevleri, gingival dokularda yara iyileşmesini hızlandırdığı; inflamatuvar reaksiyonlar ve ağrı gibi komplikasyonları azalttığı bildirilmiştir [168]. In vitro ve in vivo çalışmalarda, bu ajanların kemotaksis, anjiyogenez, inflamasyon ve fibroplazi ile ilişkili kemokin ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığını; buna karşın büyüme faktörlerini ve proteinaz seviyelerini arttırdığı gösterilmektedir [169,170]. Etkili ve güvenli bir biyolojik ajan olmasına rağmen, her olguya uygun olmaması ve yüksek maliyetleri, doz ve süre ile ilgili evrensel kabul görmüş standart bir protokol bulunmaması bu ürünleri sınırlamaktadır.

Biyoaktif yara örtücüler; fiziksel bir bariyer işlevi görmekle kalmayıp, içerdiği biyolojik olarak aktif bileşenler aracılığıyla hücrel düzeyde yara iyileşme süreçlerini doğrudan modüle edebilmektedir. Biyoaktif yara örtücüler genellikle hyalüronik asit, kolajen, elastin, aljinat ve kitosan gibi doğal polimerleri bir araya getirerek toksik olmayan yapıları sayesinde güvenli kullanım sunar ve hücrel düzeyde rejeneratif süreci destekleyerek yeni doku oluşumunu teşvik eder [171].

Yaygın olarak kullanılan hyalüronik asit, biyoyumlu ve biyobozunur yapısıyla doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilen çok yönlü bir biyomateriyaldir. Hücre proliferasyonu, migrasyonu ve anjiyogenez gibi temel biyolojik süreçleri desteklemesinin yanı sıra; polimorfonükleer lökositlerin göçünü ve fonksiyonlarını uyararak inflamatuvar yanıtın erken fazını başlatan proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesine aracılık etmektedir

[172,173]. Fibroblastların çoğalma ve migrasyon kapasitelerini arttırarak granülasyon dokusunun oluşumunu ve matris yeniden şekillenmesini desteklemektedir [174]. Erken dönemde yara dokusunda vaskülarizasyonu arttırması, iyileşme sürecinde destekleyici bir matriks görevi üstlenmesine olanak tanımakta; bu özelliği sayesinde doku gerilimlerine karşı fiziksel bir bariyer işlevi göstermektedir [175]. Yüksek su tutma kapasitesi, dolgu ve viskoelastik özellikleri, doku ile olan yüksek biyouyumluluğu, hyalüronik asidin plastik ve rekonstrüktif cerrahi, estetik tıp uygulamaları ve periodontal tedaviler gibi çeşitli alanlarda giderek yaygınlaşmaktadır [176]. Hyalüronik asitlerin doğal yapısı; enzimatik yıkıma duyarlılığı nedeniyle, uygulama sonrası etkisinin kısa sürede azalmasına ve dokuda kalıcılığının sınırlı olmasına yol açmakla birlikte yüksek maliyeti, geniş ölçekli klinik uygulamalarda kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır.

Kolajenler vücutta doğal olarak bulunan ve yara iyileşmesinin her evresinde görev alan bileşenlerdir. Kemotaktik karakteri ile fibroblast migrasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını uyarak; trombosit aktivasyonu ve anjiyogenez dahil olmak üzere yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır [177]. Kolajen bazlı materyallerin kolay manipüle edilebilir olması avantaj sağlasa da, hidrofilik yapısı nedeniyle hızlı enzimatik bozunmaya ve şişmeye yol açabilmesi gibi sınırlılıkları bulunmaktadır.

Eritropoetin, geleneksel olarak eritropoezdeki rolüyle tanınan bir glikoprotein hormonu olmasına karşın, son yıllarda diş hekimliği ve doku mühendisliği alanlarında yara iyileşmesini destekleyici etkileriyle dikkat çekmektedir [178]. Yara iyileşmesine olan katkısı; anjiyogenezin uyarılması, ECM ve kolajen sentezinin desteklenmesi, inflamatuvar mediyatörlerin baskılanması ve apoptozisin düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir [179,180]. Sistemik olarak uygulanan eritropoetinin deri yaralarının onarımında terapötik potansiyel taşıdığı bildirilmiştir [181].

Doku yapıştırıcıları, diş hekimliğinde cerrahi işlemlerin desteklenmesinde ve sekonder yara iyileşmesi gerektiren palatal donör bölgelerinde morbiditenin azaltılmasında etkili bir seçenek olarak kullanılmaktadır [182]. Siyanoakrilat bazlı yapıştırıcılar, akrilik reçinelerden türetilmekte ve etki mekanizmaları, oluşabilecek travmatik etkilere karşı cerrahi bölgeyi izole eden bir tabaka oluşturarak monomerlerin hızlı polimerizasyonuna dayanmaktadır [183]. Güncel çalışmalarda, uygulamaların postoperatif ağrı, kanama ve iyileşme süresini olumlu yönde etkileyebileceği rapor edilmiştir [184]. Doku uyumluluğu yüksek olan bu

biyomateryaller, uygulandıktan sonra biyolojik yollarla yıkılarak elimine edilir. Sekonder yara iyileşmesi gerektiren palatal donör alanlarda, doku yapıştırıcılarının tek başına veya yara örtücü ajanlarla kombine olarak kullanımı, greft sonrası morbiditenin azaltılmasında önemli katkılar sağlamaktadır [182]. Hareketli mukozada stabil kalamaması, yüksek gerilimli bölgelerde tek başına yeterli olamaması, nadiren de olsa lokal irritasyon veya hipersensitivite yol açabilmeleribu materyallerin sınırlılıkları arasındadır.

Periodontal yara iyileşmesinde dokuya uygun biyomalzemelerin kullanımı son dönemde artan bir ilgi görmektedir [185]. Hidrojeller, filmler, mikro/nanofiberler ve partiküller gibi gelişmiş biyomalzemeler, hücre ve ilaç taşıyıcıları olarak işlev görmektedir. Gelecekte rejeneratif tedavilerde biyomimetik yapı iskeleleri olarak kullanım potansiyeli taşımaktadır. Hidrojeller, suyla şişebilen ve üç boyutlu polimer ağlarla yapılandırılmış, hücre dışı matrise benzer mimariye sahip biyomalzemelerdir [186]. Mekanik özelliklerinin ayarlanabilmesi, biyoyumlulukları ve ilaç taşıma kapasiteleri sayesinde akıllı biyomateryaller olarak tanımlanan hidrojeller; ağız içi gibi zorlu, nemli, oral mikrobiyom açısından zengin ortamında etkili biyolojik çözümler sunabilmektedir [187]. Gözenekli yapıları hücre göçü, anjiyogenez ve rejenerasyon süreçlerini kolaylaştırırsa da, bu materyallerin maliyet ve klinik uygulama kolaylığı yönünden değerlendirilmesi gerekmektedir [188].

Düşük doz lazer tedavisi ve fotodinamik terapi gibi non-invaziv biyofiziksel ajanlar da periodontal cerrahi sonrası sekonder iyileşmesini destekleyen alternatif terapiler arasında yer almaktadır. Düşük doz lazer tedavisi, fibroblast aktivitesini artırdığı, kolajen sentezini uyardığı ve inflamatuvar mediyatörlerin düzeyini azalttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmektedir [189,190]. Yöntemin uygulanabilmesi için özel teknolojik donanım, yüksek cihaz maliyeti ve bu cihazların etkin ve güvenli kullanımına yönelik eğitim almış personel gerekliliği gibi sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır. Tedavi etkinliği kullanılan lazerin dalga boyu, doz ve uygulama süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Düşük doz lazer tedavisinin yara iyileşmesindeki etkileri, ozon tedavisi ile karşılaştırıldığında her iki tedavi yönteminin de iyileşme sürecine olumlu katkı sağladığı, ancak birbirine karşı belirgin üstünlüklerinin bulunmadığı bildirilmiştir [25,191].

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarın önlenmesinde rol oynayan antioksidan sistemler, yara iyileşmesinin tüm evrelerinde görev almaktadır. Antioksidanlar, ROT'un oluşumunu baskılayarak oksidatif stresi azaltmakta ve yara

iyileşmesini olumlu yönde etkilemektedir. Oksijen; bölgeyi enfeksiyondan korur, anjiyogenezi indükler, keratinosit farklılaşmasını, göçünü ve yeniden epitelizasyonu artırır, fibroblast proliferasyonunu ve kolajen sentezini artırır ve yara kontraksiyonunu destekler [192,193].

Son yıllarda antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle doğal kaynaklı ajanlara olan ilgi artış göstermektedir. Astaksantin, kurkumin, propolis ve aloe vera gibi maddelerin topikal uygulamaları; oksidatif stresin azaltılması, sitokin salınımının modülasyonu ve epitel hücre proliferasyonunun uyarılması yoluyla yara iyileşmesini olumlu yönde etkilemektedir [194-196]. Astaksantin, süperoksit anyonlarını ve serbest radikalleri etkisiz hale getirerek lipid peroksidasyonunu önlemekte ve doku bütünlüğünü korumaktadır. Kurkumin, NF- κ B sinyal yollarını inhibe ederek inflamatuvar yanıtı baskılamakta ve yeni damar oluşumunu teşvik etmektedir [197,198]. Propolisin biyolojik aktivitesi, büyük ölçüde yapısında bulunan fenolik bileşiklere bağlı olup, bu etkiler antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, doku rejenerasyonunu destekleyici mekanizmalarla açıklanmaktadır [194,199]. Formülasyonların optimize edilmesi ve etkinliklerini değerlendirmek amacıyla daha geniş ölçekli, uzun vadeli klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Güncel yaklaşımlar doku rejenerasyonunu desteklemeye yönelik biyomühendislik temelli yaklaşımlar (kişiye özgü tedavi protokolleri, üç boyutlu baskılı biyomateriyaller, nanopartikül taşıyıcı sistemler, kök hücre tedavileri) giderek daha fazla benimsenmektedir [200]. Üç boyutlu baskı teknikleri, hastaya özgü biçimlendirilebilen biyomateriyalleri üreterek mekanik ve biyolojik olarak hedef dokuya uygun yapılar oluşturur. Nanopartikül sistemler, kontrollü salım özellikleri sayesinde ilaçların lokal ve hedefe yönelik uygulanmasını kolaylaştırarak mikrobiyal kontrol ve inflamasyonun yönetimi açısından avantaj sunmaktadır [201]. Kök hücre uygulamaları ise rejeneratif kapasitenin artırılmasında umut verici stratejiler arasında yer almaktadır [202]. Bu yaklaşımlar geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlamalarını aşmayı hedeflerken, klinik verilerin yetersizliği, üretim süreçlerinde standardizasyon eksikliği, biyoyumlu ve biyobozunur yapıların geliştirilmesindeki zorluklar ile yüksek maliyet gibi faktörler, bu yenilikçi yöntemlerin potansiyelini sınırlayan başlıca faktörlerdir.

Sonuç olarak, sekonder yara iyileşmesinde kullanılan ajanlar, enfeksiyon kontrolünden başlayıp doku rejenerasyonuna uzanan geniş bir yelpazeye evrilmiştir. Güncel uygulamalar,

biyomühendislik ve kişiselleştirilmiş tedavilerle desteklenmektedir. Bununla birlikte maliyet, standardizasyon eksikliği ve uzun vadeli klinik veri yetersizliği gibi kısıtlılıkların giderilmesi, bu yenilikçi stratejilerin rutin uygulamaya entegrasyonu için kritik önem taşımaktadır. Periodontal yara iyileşmesinde, biyouyumlu ve rejeneratif kapasitesi yüksek materyallerin seçimi, tedavi başarısını doğrudan etkileyen unsurlar arasında yer almaktadır. Bu kapsamda geliştirilen yeni nesil biyomateriyaller, yara iyileşmesinin her evresinde hücresel aktiviteyi desteklemeyi hedeflemektedir. Yara iyileşmesini modüle eden çeşitli ajanlara ilişkin örnekler Çizelge 2.3'te sunulmuştur.

2.8.1. Yara iyileşmesinde kullanılan malzemelerin zamansal değişimi

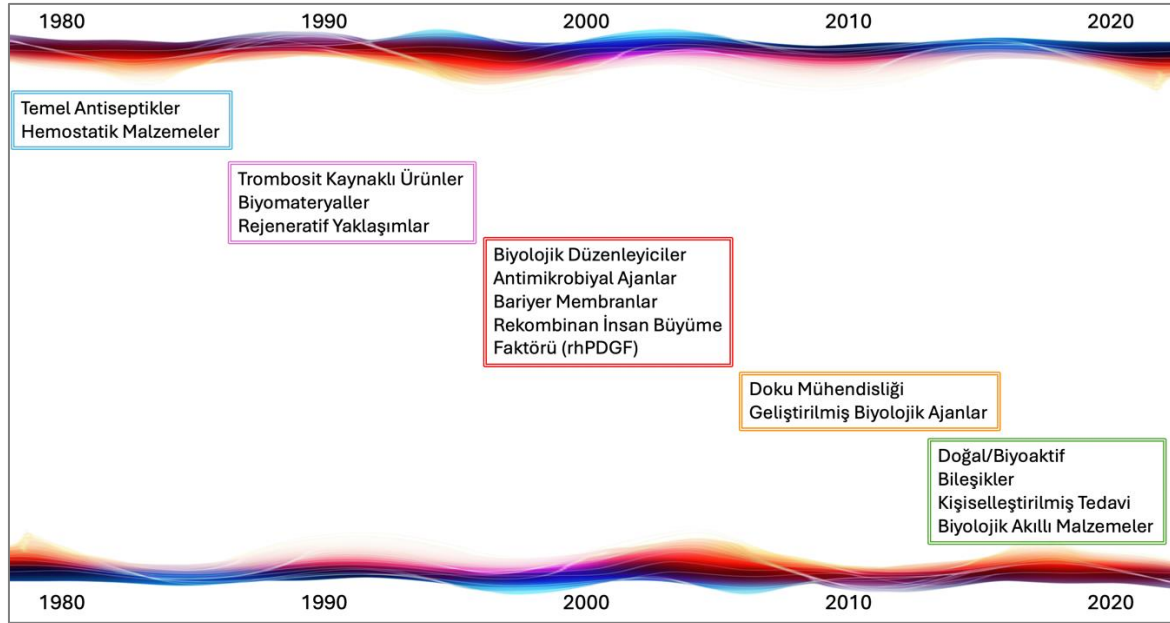
Periodontal tedavi yaklaşımlarında zamanla içerisinde gözlenen temel değişimlerden biri, kullanılan ajanların etki mekanizmalarında meydana gelmiştir. Başlangıçta pasif etkiye sahip ajanlar tercih edilirken, zamanla yerlerini biyoaktif olarak aktif bileşiklere bırakmış; günümüzde ise bu eğilim, hücresel ve moleküler düzeyde iyileşme süreçlerini doğrudan aktive eden rejeneratif ajanlara doğru yönelmiştir.

Tedavi ajanlarının hedef dokuya iletilmesinde kullanılan taşıyıcı sistemler, teknolojik gelişmelerle birlikte önemli bir dönüşüm geçirmiştir. Geleneksel gargaralar ile başlayan bu süreç, lokalize ilaç salımını mümkün kılan fiber sistemlere, biyoadeziv jellere, bariyer işlevi gören membranlara ve kontrollü salım özelliklerine sahip nanopartikül tabanlı sistemlere doğru geçiş sağlanmıştır.

Periodontal tedavi anlayışı da benzer şekilde değişim göstermiştir İlk olarak enfeksiyonun kontrol altına alınması hedeflenmişken, zaman içinde bu yaklaşım yerini dokuların biyolojik olarak modülasyonuna bırakmıştır. Günümüzde ise tedavi stratejilerinin odağı, hücresel sinyal yollarının uyarılması ve biyolojik iyileşme mekanizmalarının moleküler düzeyde desteklenmesi yer almaktadır. (Şekil 2.2)

2.8.2. Yara iyileşmesinde kullanılan malzemelerin zamansal değişimi

1. Mekanizma değişimi: Pasif → Biyoaktif → Rejeneratif
2. Dağıtım yöntemleri: Gargaralar → Fiberler → Jeller → Membranlar → Nanopartiküller
3. Tedavi odağındaki değişim: Enfeksiyon kontrolü → Doku modülasyonu → Hücresel sinyalizasyon



Şekil 2.2. Periodontal yara iyileşmesinde kullanılan ajan ve materyallerin tarihsel gelişimi

Çizelge 2.3. Yara iyileşmesini destekleyen biyolojik ve teknolojik gelişmelerin dönemsel dağılımı

	KATEGORİ	ÖRNEKLER
1980-1990	Temel Antiseptikler Temel Yara Örtücüler	Antiseptik Solüsyonlar Hemostatik Malzemeler
1990-2000	Biyomateryaller (1. Nesil) Rejeneratif Yaklaşımlar Antimikrobiyal Ajanlar	Kolajen Membranlar Hidrokolloidler Klorheksidin Diglukonat (%0.12)
2000-2010	Biyolojik Düzenleyiciler Bariyer Membranlar (2. Nesil)	Trombositten Zengin Plazma (PRP) Rekombinanat İnsan Büyüme Faktörü (rhPDGF) Mine Matriks Türevleri (EMD) Hidrojeller
2010-2020	Doku Mühendisliği Geliştirilmiş Biyolojik Ajanlar Fotobiyomodülasyon	Ekstraselüler Matriks Ürünleri Antimikrobiyal Nanofiberler
2020-günümüz	Doğal/Biyoaktif Bileşikler Kişiselleştirilmiş Tedavi Biyolojik Akıllı Malzemeler	Hyalüronik Asit Jeller Astaksantin Formülasyonlar Probiyotikler 3D- Baskılı Biyomateryaller İlaç Salımlı Hidrojeller

2.9. Yara İyileşmesini Değerlendirmede Hayvan Modeli

Deney hayvanları, kalıtsal, doğal ya da patolojik süreçlerin incelenmesinde kullanılan; biyolojik ve fizyolojik işleyiş açısından insan veya diğer canlı türleriyle belirli benzerlikler gösteren organizmalardır [203]. Bu modeller aracılığıyla normal veya bozulmuş biyolojik mekanizmalar modellenabilir, çeşitli tedavi yöntemlerinin etkinliği değerlendirilebilir ve

elde edilen sonuçlar insan biyolojisine yönelik çıkarımlarda bulunulabilir. Deneysel çalışmalarda kullanılacak hayvan modelinin seçiminde, ilgili modelin insanlardaki yara iyileşmesi sürecini biyolojik düzeyde ne ölçüde temsil ettiğinin dikkatle değerlendirilmelidir [204]. Fizyolojik, hücresel ve moleküler düzeyde insan dokularındaki iyileşme mekanizmalarıyla benzerlik gösteren modellerin tercih edilmesi, elde edilen verilerin klinik uygulamalara aktarılabilirliğini artırmaktadır.

Hayvan modelleri, rejeneratif süreçlerin insanlara kıyasla daha kısa sürede gerçekleşmesi nedeniyle önemli avantajlar sunmaktadır. İnsanlarda haftalar sürebilecek biyolojik olaylar, deney hayvanlarında birkaç gün içinde gözlenebilmesi, araştırmaların hızlandırılmasını mümkün kılmaktadır [205]. Etik ve pratik sınırlamalar nedeniyle insanlarda elde edilmesi mümkün olmayan miktarda doku örneğinin hayvan modelleriyle sağlanabiliyor olması, bu modellerin deneysel çalışmalarda tercih edilmesinin nedenlerindendir [204].

Biyomateriyaller, rejeneratif ajanlar ve biyostimülatörlerin biyouyumluluğu ile etkinliği genellikle deney hayvanları üzerinde yapılan prelinik çalışmalarla değerlendirilmektedir. Bu çalışmalar, yeni tedavi yaklaşımlarının insanlar üzerinde uygulanabilirliğine dair ilk verilerin elde edilmesini sağlamaktadır[206].

Periodontal hastalıkların tedavisinde ve doku rejenerasyonunun değerlendirilmesinde hayvan modelleri sıklıkla tercih edilmektedir [142]. Bu amaçla, en yaygın kullanılan türler arasında ratlar, tavşanlar ve köpekler yer almaktadır. Ratların deneysel çalışmalarda yaygın olarak tercih edilme nedenleri arasında; kolay temin edilebilir olmaları, ekonomik olmaları, genetik homojen bir popülasyon sunmaları ve laboratuvar koşullarına yüksek adaptasyon yetenekleridir [203]. Ağız içi yara iyileşmesini modellemek açısından ise ratlarda diş eti defektlerinin kolaylıkla oluşturulabilmesi, iyileşme sürecinin kısa sürede izlenebilmesi ve histolojik değişimlerin detaylı olarak gözlemlenebilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır [142,207,208].

Morfolojik ve fizyolojik farklılıklar nedeniyle ratlardaki iyileşme süreci insanlarla birebir örtüşmese de, bu modeller tedavi protokollerinin geliştirilmesi, histolojik ve biyokimyasal değişimlerin izlenmesi açısından değerli bilgiler sunmaktadır. Ratlarda yara iyileşmesi daha hızlı kontraksiyon ile seyrederken, insanlarda bu süreç daha çok epitelizasyon ağırlıklı ilerlemektedir [206]. Bu temel farklılıklara rağmen, rat modelleri periodontal iyileşme

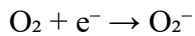
süreçlerinin erken dönem biyolojik mekanizmalarının anlaşılması açısından etkili bir araç olarak değerlendirilmektedir.

2.10. Serbest Radikaller ve Oksidatif stres

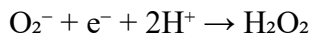
Kararlı bileşiklerde genellikle elektronlar eşleşmiş halde bulunurken, eşleşmemiş elektrona sahip atom veya moleküller, yapısal kararlılıklarını kaybederek daha yüksek reaktivite göstermektedir. Bu tür yapılar, bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip olduklarında "serbest radikal" olarak adlandırılır. Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran atom, molekül veya atom gruplarıdır. Kararlı duruma geçmek için eksik olan elektronlarını tamamlamak amacıyla diğer moleküllerle kolayca reaksiyona girmeleri, onları oldukça biyolojik sistemlerde oldukça reaktif kılar [8,209]. Serbest radikaller tarafından başlatılan zincirleme reaksiyonlar, antioksidan sistemler tarafından kontrol altına alınmazsa, hücresel yapılarla etkileşime girerek biyolojik hasara yol açabilir.

Oksijen, mitokondride gerçekleşen elektron taşıma zinciri tepkimeleri sırasında genellikle suya indirgenir. Ancak elektronların tamamının etkin biçimde transfer edilememesi durumunda, oksijenin kademeli indirgenmesiyle çeşitli ROT oluşturur. Bu süreçte sırasıyla şu bileşikler meydana gelir [210-213]:

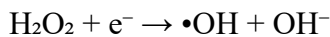
- Süperoksit Anyonu (O_2^-): Oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle oluşur.



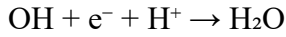
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2): Süperoksit anyonuna bir elektron ve iki proton eklenmesiyle meydana gelir.



- Hidroksil Radikali ($OH^\bullet$): Hidrojen peroksit, bir elektron daha aldığında parçalanarak hidroksil radikali ve hidroksit iyonuna dönüşür.



- Su (H₂O): Hidroksil radikali, bir elektron ve bir proton olarak suya indirgenir.



Serbest radikaller, biyolojik sistemlerde farklı reaktif türler halinde bulunur. Bunlar arasında ROT, reaktif sülfür türleri ve reaktif nitrojen türleri yer almaktadır [209]. Bu gruplar içinde, oksijen kökenli serbest radikaller en önemli reaktif bileşenleri oluşturur. Başlıca ROT arasında süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve tekli oksijen yer almaktadır. Hidrojen peroksit, eşleşmemiş elektronu olmamasına rağmen, kolaylıkla diğer ROT'lara dönüşebildiği için bu sınıfta değerlendirilir [214].

ROT, hücrel metabolizma ve fizyolojik işlevler sırasında üretilir ve hücre sinyalizasyonunda, apoptozda, gen ifadesinde ve iyon taşınmasında önemli roller üstlenir. ROT üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki hassas dengenin sağlanması ile hücrel yapı sürdürülmesini sağlar ve mikroorganizmalar zarar görmez. Bu tür radikallerin aşırı üretimi ise çok küçük boyutlu ve oldukça reaktif olduklarından dolayı hücre hasarına ve çeşitli hastalıkların gelişimine yol açabilir [215]. ROT, nükleik asitlerdeki bazlara, proteinlerdeki amino asit yan zincirlerine ve doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara saldırarak oksidatif strese yol açar [216]. Oksidatif hasar, süperoksit kökenli radikaller ile nitrik oksit türevlerinin oluşturduğu zararların birleşimi olarak tanımlanabilir. Oksidatif stres ise ROT'un hücrel hasara neden olması durumudur. Hücreler bu tür reaktif bileşiklerle karşı çıkmak için bir dizi antioksidan mekanizmaya sahip olsa da, aşırı ROT üretimi bu savunma sistemlerinin yetersiz kalmasına neden olabilir [215].

2.10.1. Oksidatif stresin yara iyileşmesindeki önemi

Yara iyileşmesi, deri veya yumuşak dokuda meydana gelen hasarı takiben, birbirini izleyen ardışık şekilde ve çeşitli biyokimyasal ve hücrel faktörler tarafından düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Bu süreci etkileyen önemli moleküler bileşenlerden biri olan ROT, moleküller fizyolojik süreçler sırasında, özellikle nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz enzimi aracılığıyla üretilmektedir [214]. ROT, bağışıklık sisteminin bir bileşeni olarak yara bölgesinde patojen mikroorganizmalara karşı savunma mekanizması oluşturur. Nötrofiller ve makrofajlar, fagositik aktivite sırasında yüksek miktarda ROT üretmekte olup, bu moleküller enfeksiyonla mücadelede önemli bir rol oynamaktadır [217].

Düşük ve kontrollü düzeyde ROT üretimi, yara iyileşmesi sürecinin farklı aşamalarında olumlu etkiler gösterirken, aşırı ROT üretimi süreci olumsuz yönde etkilemektedir. Aşırı ROT üretimi yalnızca patojenleri elimine etmekle kalmaz, aynı zamanda çevre dokulara hasar vererek iyileşmenin gecikmesine ve sekonder doku hasarına yol açabilmektedir [217]. Fibroblastların adezyon, proliferasyon ve canlılığını bozarak iyileşme mekanizmalarını etkiler. Kronik yaralarda gözlenen yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve artmış ROT düzeyleri, odakta belirgin oksidatif stres varlığını göstermektedir [1].

Diyabetik bireylerde rejeneratif süreç fizyolojik koşullardan farklı seyretmekte olup, komplikasyonlar üzerinde oksidatif stresin belirgin etkileri bulunmaktadır. Diyabetik bireylerde DNA, protein ve lipid peroksidasyon ürünlerinin artışı, oksidatif stresin yükseldiğini gözlenmektedir [218]. Lokal yanık alanının tetiklediği yaygın inflamatuvar yanıt ve iskemi/reperfüzyon süreçlerinin ardından ortaya çıkan ROT, hücrelere zarar vermekte ve doku bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır [219,220]. Yanık lezyonlarında nötrofillerin intravasküler göçü, serbest radikal üretimini artırmakta ve ortaya çıkan ROT, vasküler permeabilitenin yükselmesine ve ödem gelişimine neden olmaktadır [221,222]. Lipid peroksidasyonu başta olmak üzere çeşitli oksidatif hasar mekanizmalarından sorumlu tutulan ROT, nötrofiller tarafından üretilen inflamatuvar mediyatörler ve yanık bölgesinde artış gösteren ksantin oksidazın aktivitesi ile daha fazla üretilmekte ve hasarın şiddetlenmesine sebep olmaktadır [222,223].

2.10.2. Serbest radikallerin biyolojik mekanizmaya etkileri

Serbest radikaller, kararsız yapıları nedeniyle hücresel bileşenlerle etkileşime girerek oksidatif hasara yol açabilir, endojen (mitokondriyal solunum, enzimatik reaksiyonlar, inflamasyon) ve eksojen (çevresel kirlilik, radyasyon, sigara dumanı, pestisitler) kaynaklardan oluşabilir [10,217]. Serbest radikallerin hücresel düzeyde yarattığı etki, biyomoleküllerin oksidatif modifikasyonuna, hücresel sinyal yollarının bozulmasına ve çeşitli hastalıkların tetiklenmesine neden olabilir. Hücrelerin temel bileşenleri olan protein, karbonhidrat, lipid, DNA ve enzimlerle reaksiyona girerek, bu yapıların fonksiyonlarının bozulmasına yol açabilir; kapiller geçirgenliği arttırarak ve mitokondriyal aerobik solunumun aksamasına ve hücresel hasara neden olabilir [224].

Serbest radikaller hücredeki bir çok biyomolekülü etkileyebilir. Hücre zarını oluşturan lipidler, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu adı verilen, hücre için son derece zararlı olan sürece neden olur [209,225]. Kendiliğinden devam eden bir zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu, membran bütünlüğünü doğrudan bozarken, aldehit gibi toksik yan ürünler üreterek diğer hücresel bileşenlere de zarar verebilir [226]. Çoklu çift bağlara sahip lipidleri hedef alan ROT, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını başlatır. Hücre membranında meydana gelen lipid peroksidasyonu, membran bütünlüğünü bozarak hücresel transport sistemini olumsuz etkiler, hücre içi ve hücre dışı iyon dengelerinin bozulmasına yol açarak homeostazın sürdürülmesini zorlaştırır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda meydana gelen artış, proteazların aktivasyonunu tetikler ve bu durum hücresel bileşenlerin parçalanmasına neden olur. Bu noktada antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyerek lipid peroksidasyonunu engelleyebilir ve çeşitli sağlık koşullarının önlenmesi veya tedavisinde kullanılabilir [227].

Proteinler, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasara karşı lipidlere kıyasla daha dirençlidir. Yapısında doymamış bağlar ve sülfür içeren protein molekülleri, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girme eğilimindedir [226]. Bu tür proteinler, oksidatif modifikasyonlara daha duyarlı olup hücresel fonksiyonların bozulmasına yol açabilir. Serbest radikaller proteinlerde peptit bağlarının kopmasına, amino asit yan zincirlerinde mutasyonlara, proteinazların bozulmasına, farklı peptit zincirlerinin çapraz bağlanmasına ve proteinlerin agregasyonuna, yol açabilir [228]. Yapısal değişiklikler, proteinlerin biyolojik aktivitelerinin azalmasına veya tamamen kaybolmasına neden olabilir.

Serbest radikallerin hücre üzerindeki en önemli etkilerinden biri, DNA yapısına zarar vermeleridir. DNA'ya doğrudan etki ederek mutasyon oluşumuna ve hücre ölümüne neden olabilir [8]. Özellikle hidroksil radikali, DNA bazlarıyla hızlı ve kolay bir şekilde reaksiyona girebilirken, hidrojen peroksit membranları geçebilen bir molekül olarak nükleus içine ulaşabilir ve DNA'ya üzerinde dolaylı yıkıcı etkiler oluşturabilir. Bu durum hücresel fonksiyon bozukluklarına ve ileri safhalarda hücre ölümüne yol açabilir [226].

2.10.3. Serbest radikallerin yara iyileşmesindeki rolü

Yara iyileşmesi, birçok biyolojik süreçten oluşan karmaşık bir mekanizmadır ve bu süreçlerin başlatılabilmesi, sürdürülebilmesi ve yaranın enfeksiyonlardan korunabilmesi için

oksijen önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, yara iyileşmesinin başlaması, ve devamlılığı açısından oksijenin yararlı etkilerini ortaya koyarken, oksijen sonucu oluşan metabolik ürünlerin doku hasarına yol açabileceğini göstermektedir [229]. Oksijenin iyileşmedeki olumlu etkileri, serbest radikaller aracılığıyla hücresel ve moleküler düzeyde çeşitli biyolojik etkileşimler oluşturması ile açıklanabilir.

ROT varlığı, yara iyileşmesinin farklı aşamalarında etkili rol oynamaktadır. ROT üretimi özellikle inflamatuvar hücreler olan nötrofiller ve makrofajlar tarafından gerçekleştirilir. Nötrofiller, ilk savunma hattı olarak yaranın enfeksiyona karşı savunmasına yardımcı olurken, makrofajlar iyileşme sürecinde daha sonraki aşamalarda yer alır ve bu hücreler ROT üretiminde önemli bir kaynaktır. Hücre migrasyonu, adezyon, proliferasyon, neovaskülarizasyon, remodelasyon ve apoptozis gibi süreçlerde ROT önemli bir rol oynamakta ve bu aşamaların düzenlenmesinde etkili olmaktadır. Örneğin, neovaskülarizasyon ve doku onarımında ROT'un rolü, oksijen taşınımını arttırarak iyileşme sürecini hızlandıran bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır. ROT üretimi, inflamatuvar hücreler tarafından gerçekleştirilir ve özellikle nötrofiller ve makrofajlar ROT'un ana kaynağını oluşturur. Ancak ROT üretimindeki kontrolsüz artış, iyileşme sürecinde sorunlara yol açabilmektedir. Aşırı ROT üretimi, hücre zarlarını, proteinler ve DNA üzerinde oksidatif strese neden olur, bu durum iyileşme sürecini olumsuz yönde etkileyebilir. ROT'un bu tür zararlı etkileri, inflamasyonun uzaması, doku hasarının artması ve anormal iyileşme gibi problemlere neden olabilir [230].

ROT'un artışı vasküler bozulmalara, anjiyogenez reperfüzyonunun bozulmasına ve uzun süreli inflamatuvar yanıtların gelişmesine yol açabilir [214].

Serbest radikallerin yara iyileşmesindeki dengeleyici rolü, iyileşme sürecinin hem başlangıç hem de son aşamalarında kritik bir öneme sahiptir. ROT üretimi dikkatle kontrol edilmeli, aşırı üretimin engellenmesi için çeşitli moleküler mekanizmalar aktive edilmelidir. Aksi takdirde, aşırı ROT üretimi yara iyileşmesinin sağlıklı bir şekilde tamamlanmasını engelleyebilir ve doku iyileşmesini zorlaştırabilir [230].

2.11. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Aktivite

ROT, moleküler oksijenden türeyen kimyasal olarak yüksek derecede reaktif moleküller grubudur. Üretilen ROT'lar, hücre sinyalizasyonu, apoptoz, gen ekspresyonu ve iyon transportu gibi temel süreçlerde kritik roller üstlenmektedir. Aşırı miktarda ROT üretimi, küçük moleküler yapıları ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle proteinler, lipidler, RNA ve DNA dahil birçok molekül üzerinde zararlı etkiler oluşturabilir. ROT; nükleik asit bazlarına, proteinlerdeki amino asit yan zincirlerine ve doymamış yağ asitlerindeki çift bağlar üzerinde zararlı etkilere neden olarak oksidatif stresin oluşumuna yol açabilir [231].

Serbest radikaller, genellikle ROT kapsamında değerlendirilir ve aşırı üretimleri hücre hasarı ile ilişkili hastalıkların gelişiminde rol oynar. Aerobik organizmalarda oksijen varlığı ROT'ların çeşitli endojen ve eksojen kaynaklardan oluşmasına olanak tanır. ROT oluşumunda endojen ve eksojen metabolik faktörler etkilidir. Eksojen kaynaklar arasında sıcaklık değişimi, travma, ultrason, ultraviyole ışınları, ozon, sigara kullanımı, iyonize radyasyon, enfeksiyonlar, aşırı fiziksel aktivite ve farmakolojik ajanlar yer almaktadır [213,232,233]. Endojen kaynaklar, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde meydana gelen süperoksit üretimi ile osteoklastlar ve fibroblastlar gibi bağ dokusu hücrelerinin metabolik faaliyetlerini kapsamaktadır [213]. İnflamatuar süreçte aktive olan polimorfonükleer lökositler (PMNL) başlıca ROT kaynakları arasında yer alır. Buna ek olarak monositler, eozinofiller, lenfositler, trombositler ve fibroblastlar da ROT üretebilir.

Serbest radikaller, yalnızca oksijen kökenli olmayıp; nitrojen ve klor kaynaklı reaktif türleri de kapsar. ROT, oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi bileşikler içerir. Reaktif nitrojen türleri arasında yer alan nitrik oksit ve peroksinitrit gibi bileşikler, hücreler arası sinyal iletimi ve immün regülasyonda önemli roller üstlenmektedir (Çizelge 2.4) [234]. Reaktif klor türleri, kapsamındaki hipokloröz asit gibi bileşikler ise nötrofiller tarafından üretilerek doğal antimikrobiyal savunmada rol oynamaktadır.

Reaktif türlerin yara iyileşmesindeki rolü dinamik ve çift yönlüdür. ROT, reaktif nitrojen türleri ve reaktif karbon türleri kontrollü düzeyde üretildiğinde hücreler arası sinyal yollarının düzenlenmesine, inflammatuar yanıtın modülasyonuna ve doku onarım süreçlerine katkı

sağlar. Bu reaktif moleküllerin aşırı üretimi oksidatif stresin gelişmesine, hücresel hasara ve iyileşme sürecinin bozulmasına neden olmaktadır.

Çizelge 2.4. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri örnekleri

Reaktif oksijen türleri	Reaktif nitrojen türleri
Süperoksit (O_2^-) Hidroksil (OH^-) Peroksil (RO_2) Alkoksil (RO) Hidrojen peroksit (H_2O_2) Singlet oksijen (O_2) Ozon (O_3)	Nitrik oksit (NO) Nitrojen dioksit (NO_2) Peroksinitrit ($ONOO^-$) Peroksinitrik asit ($ONOOH$)

2.11.1. Reaktif oksijen ürünlerinin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri

ROT, hücresel metabolizma sürecinde doğal olarak üretilen reaktif moleküllerdir olup, fizyolojik koşullarda düşük düzeylerde hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadır. Serbest radikallerin etkileri antioksidan savunma sistemleri tarafından yeterince nötralize edilmediğinde; karbonhidrat, lipid, protein, DNA ve RNA gibi temel biyomoleküllerle etkileşime girerek yapısal ve işlevsel bozulmalara yol açar. [8].

ROT, çeşitli hastalıkların patogeneğinde aktif bir rol üstlenmektedir. Bu bağlamda, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresle ilişkili hastalıklar geniş bir spektruma yayılmaktadır. İskemi, inflamasyon, reperfüzyon hasarı, yaşlanma, kanser, diyabet ve diyabete bağlı komplikasyonlar, parkinson, ateroskleroz ve periodontal hastalıklar gibi çok sayıda hastalığın gelişiminde serbest radikaller ilişkilendirilmiştir. Bu hastalıklara ilişkin özet bilgiler Çizelge 2.5'te sunulmuştur [235,236].

İlgili hastalıkların incelenmesi, genellikle ROT üretimindeki artışın ya da antioksidan savunma mekanizmalarındaki yetersizliklerin birlikteliğinden kaynaklanmaktadır. Yüksek oksidatif stres koşullarında, ROT seviyelerinin kontrol edilememesi hücresel hasarı arttırarak patolojik süreçlerin ilerlemesine neden olmaktadır. Yetersiz ROT üretimi, immün yanıtın ve hücresel sinyal iletiminin bozulmasına yol açarak homeostazın sürdürülmesini zorlaştırmaktadır. ROT ve antioksidan sistemleri arasındaki dengesinin korunması, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kritik bir faktör olarak değerlendirilmektedir [235].

Serbest radikaller, hücrelerin çeşitli yapısal bileşenlerinde kalıcı veya geçici hasarlara neden olarak hücresel bütünlüğü bozmakta ve hücrelerde malign transformasyonu tetikleyerek çeşitli hastalıkların patogenezinde rol almaktadır.

Çizelge 2.5. Serbest radikallerden kaynaklanan bazı hastalıklar [235,236]

Kalp hastalıkları	Romatizmal hastalıklar
Akciğer hastalıkları	İltihabi durumlar
Mide-mukoza ülserleri	İlaç ve toksin kullanımı
Yanıklar, iyileşmeyen yaralar	Bulaşıcı hastalıklar (sıtma, aids, vb.)
İskemi, reperfüzyon hasarı	Kanser
Alzheimer hastalığı	Böbrek bozuklukları
Beslenme yetersizlikleri	Şeker hastalığı
Cilt bozuklukları	Talasemi
Merkez sinir sistemi hastalıkları	Şok
Yaşlanma	Otoimmün hastalıklar

2.11.2. Reaktif oksijen türlerinin periodontal dokudaki varlığı ve rolü

Periodontal hastalıklar, dişleri çevreleyen destek dokuların kronik inflamasyon sonucu yıkımı ile karakterize yaygın enfeksiyöz hastalıklardır. Bu hastalıkların etiyopatogenezinde, mikrobiyal dental plak ve konak yanıtı arasındaki etkileşimler temel belirleyicilerdendir. İnflamasyon evresinde, bağışıklık sistemi hücreleri, mikrobiyal savunma amacıyla ROT üretir. Aşırı ROT üretimi, periodontal dokularda oksidatif strese oluşturarak hücresel bileşenlere zarar verir ve doku yıkımını tetikler [237]. ROT ve oksidatif stresin periodontal doku yıkımındaki rollerine yönelik çalışmalar, bu moleküllerin hastalığın ilerlemesinde kritik rollere sahip olduğunu göstermiştir [10,238].

ROT'lar osteoklastik aktivitenin temel düzenleyicilerinden biri olan RANKL/osteoprotegerin dengesinin bozulmasına yol açar, kolajen sentezini azaltır ve bağ dokusunu parçalayan metalloproteinazların üretimini artırır. Bu zincirleme etkiler, periodontal dokularda kalıcı kayıplara yol açar.

Periodontal hastalığı bulunan bireylerin tükürük, diş eti oluğu sıvısı ve kan örneklerinde oksidatif stres belirteçlerinin anlamlı düzeyde yükseldiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [237,239]. Bulgular, ROT'ların hastalığın ilerlemesinde merkezi bir role sahip olduğunu ve periodontal yıkım ile oksidatif stres arasında karşılıklı bir etkileşim olduğunu göstermektedir [240].

2.12. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikalleri elektron transferi yoluyla nötralize ederek, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önleyen veya azaltan biyolojik veya kimyasal bileşiklerdir. Bu moleküller, reaktif radikallerle doğrudan etkileşime girerek hücresel yapıların zarar görmesini önleyebilir ve oksidatif dengenin korunmasına katkıda bulunabilir.

Serbest radikaller, vücutta normal metabolik süreçler sırasında veya çevresel faktörlere maruz kalma sonucunda oluşan, yüksek reaktiviteye sahip moleküllerdir. Bu radikaller, hücrelerin DNA'sına, proteinlerine ve lipidlerine zarar vererek çeşitli kronik hastalıklara ve yaşlanma sürecini hızlandırmaya zemin hazırlayabilir [241,242].

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek onları daha az reaktif ve biyolojik açıdan daha az zararlı moleküllere dönüştürür; böylece hücresel fonksiyonların korunmasında kritik bir rol üstlenir. Bununla birlikte, nötralize edilen radikallerin oluşturduğu daha az aktif türevler, diğer antioksidan mekanizmalar veya enzimatik sistemler tarafından metabolize edilerek biyolojik sistemin dengesinin korunmasına katkıda bulunur [1,210].

2.12.1. Antioksidanları sınıflandırması ve etki mekanizması

Antioksidanlar, biyolojik sistemlerde etkilerini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla göstermektedir. Bu mekanizmalar arasında lokal oksijen konsantrasyonlarının azaltılması, hidroksil radikali gibi reaktif türlerin ortamdan uzaklaştırılması ve lipid peroksidasyonunun başlamasının önlenmesi yer almaktadır. Peroksit üretiminde doğrudan rol oynayabilen membran lipidleri ile reaksiyona girebilen tekli oksijen konsantrasyonunun düşürülmesi, geçiş metal iyonlarının bağlanarak reaktif türlerin oluşumunun önlenmesi ve lipid peroksitlerinin peroksil ve alkoksil radikallerine ayrışmasının inhibe edilmesi gibi süreçler antioksidan savunma mekanizmaları kapsamında değerlendirilmektedir [243].

Antioksidanlar, işlevsel özelliklerine göre enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.6). Enzimatik antioksidanlar, hücresel düzeyde spesifik enzimler aracılığıyla etki gösterirken; enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikallerle doğrudan etkileşerek hücresel bileşenleri oksidatif hasardan korumaktadır. Katalaz, glutatyon peroksidaz ve SOD enzimatik antioksidanlar arasında yer alırken; seruloplazmin,

glutasyon, melatonin, E ve C vitamini, laktoferrin, transferrin, albümin, bilirubin, ürik asit, sistein, β -karoten, haptoglobin, ubikinon ve flavonoidler enzimatik olmayan antioksidanlara arasında yer almaktadır [244-246].

Çizelge 2.6. Yapılarına göre antioksidanların sınıflandırılması

Yapı	
Enzimatik antioksidanlar	Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, glutasyon S-transferaz
Enzimatik olmayan antioksidanlar	Seruloplazmin, karotenoidler, glutasyon, melatonin, askorbat (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), laktoferrin, transferrin, albümin, bilirubin, ürik asit, sistein, haptoglobin, ubikinon ve flavonoidler

Antioksidanların etki çeşitleri [247-249]:

Süpürme etkisi

Antioksidanlar, serbest radikalleri daha zayıf ve az zararlı moleküle dönüştürerek biyolojik hasarı azaltmaktadır. Bu etki, özellikle enzimatik antioksidanlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

- Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit anyonlarını, hidrojen peroksit'e dönüştürerek etkisiz hale getirmektedir.
- Katalaz: Hidrojen peroksiti, su ve oksijene ayrıştırarak biyolojik açıdan zararsız bileşenlere dönüştürmektedir.
- Glutasyon peroksidaz: Hidrojen peroksit ve organik peroksitleri glutasyon kullanarak detoksifiye etmektedir.
- Mikromoleküller : Serbest radikalleri doğrudan süpürerek hücrel hasarı önlemektedir.

Söndürme etkisi

Antioksidanlar, serbest radikallere bir hidrojen atomu aktararak onları stabilize eder:

- Vitaminler: C vitamini (askorbik asit) ve E vitamini (tokoferol), serbest radikallere hidrojen atomu transfer ederek onları nötralize etmekte ve reaktivitelerini azaltmaktadır.
- Flavonoidler: Bitkisel kaynaklı polifenolik bileşikler olup, serbest radikallerle doğrudan etkileşime girerek oksidatif stresin azaltılmasında rol oynamaktadır.

- Mannitol ve trimetazidin: Hücresel düzeyde serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önleyerek, doku bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır.

Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi

Oksidatif stresin ilerleyişi genellikle serbest radikallerin zincirleme reaksiyonları ile gerçekleştirmektedir. Bu zincir reaksiyonların kırılması, belirli antioksidan moleküller tarafından oksidan bileşiklerin bağlanması ve nötralize edilmesi ile sağlamaktadır:

- Hemoglobin: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek oksidatif hasarı önlenmesine yardımcı olmaktadır.
- Serüloplazmin: Bakır içeren bir plazma proteini olup, demir iyonlarını bağlayarak oksidatif reaksiyonları sınırlamaktadır.
- Ağır mineraller (örneğin, çinko ve selenyum): Oksidatif stresi düzenleyen enzimlerin aktivitesini artırarak dolaylı antioksidan etki göstermektedir.

Geçiş metal iyonlarını bağlama mekanizması

Demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fenton tipi reaksiyonlarla hidroksil radikali gibi son derece reaktif türlerin oluşumuna neden olabilmektedir. Bu nedenle bazı antioksidanlar bu metalleri bağlayarak oksidatif stresin oluşumunu önlemektedir:

- Transferrin ve laktoferrin: Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonlarını engeller.
- Ferritin: Hücre içinde demir depolayarak reaktif türlerin üretimini sınırlar.
- Albümin: Metal iyonlarını bağlayarak oksidatif stresin etkisini azaltır.

Hedef moleküllerin hasar sonrası onarımı veya uzaklaştırılması

Antioksidan savunma sisteminin temel bileşenlerini, başta süperoksit ve hidrojen peroksit olmak üzere ROT'u nötralize eden spesifik enzimler oluşturmaktadır [250,251]. Organizmada yer alan başlıca antioksidan sistem bileşenleri Çizelge 2.7'de özetlenmiştir. Bu sistemin etkinliği, antioksidan moleküller arasındaki sinerjik veya antagonistik etkileşimler, çevresel faktörler (örneğin pH, oksijen parsiyel basıncı) ve hücresel lokalizasyon

(intraselüler, ekstraselüler veya membrana bağlı) gibi parametrelerden etkilenmektedir. [210].

Çizelge 2.7. Organizmada antioksidan sistem elemanları [242,252]

Enzimler	Suda çözünen radikal tutucuları	Yağda çözünen radikal tutucuları	Metal iyonlarını bağlayan proteinler
Superoksit dismutaz	Glutasyon	E vitamini	Ferritin
Katalaz	C vitamini	β -karoten	Transferrin
Glutasyon peroksidaz	Ürik asit	Bilirubin	Haptogloblin
Glutasyon redüktaz		Ubikinol	Seruloplazmin
Glutasyon transferaz		Flavonoidler	Albumin

2.12.2. Antioksidanların yara iyileşmesindeki rolleri

Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu baskılayarak ve/veya ROT'u nötralize ederek peroksidatif zincir reaksiyonlarını inhibe etmekte; böylece hücresel düzeyde oluşabilecek oksidatif hasara karşı koruyucu bir bariyer oluşturmaktadır. Başlıca endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere ayrılan bu bileşikler [8], hücrelerde sitoplazma ve membran yapılarında lokalize olarak oksidatif stresin kontrol altında tutulmasına katkı sağlamaktadır.

Literatür, antioksidanların oksidatif hasarı önleyerek veya sınırlandırarak yara iyileşmesi sürecine olumlu katkı sağladığını bildirmektedir [253]. Söz konusu bileşikler, inflamatuvar yanıtı modüle ederek ve hücresel rejenerasyonu destekleyerek, yara iyileşmesi sürecinin hızlanmasına yardımcı olmaktadır. Antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliği, doku onarımının sağlıklı bir şekilde ilerlemesi açısından değerlendirilmektedir.

Günümüzde yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla; minimal invaziv cerrahi teknikler, büyüme faktörleri, elektriksel stimülasyon, hiperbarik oksijen tedavisi [254], lazer uygulamaları, bitkisel ekstraktlar, biyomalzemeler, trombosit zengin fibrin, hyalüronik asit, hemostatik ve antimikrobiyal ajanlar gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır [255].

Süperoksit dismutaz

SOD enzimleri, bakterilerden insanlara kadar çok sayıda organizmada yaygın bulunan ve doğada en fazla araştırılmış enzim ailelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Hücresel savunma mekanizmalarının temel bileşeni olan SOD, süperoksit radikallerini daha az zararlı bileşiklere dönüştürerek oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağlamaktadır [256].

Oksijen varlığında yaşayan tüm organizmalarda evrensel olarak bulunan bu antioksidan enzimler, dismutasyon reaksiyonunu katalize ederek süperoksit anyonlarını detoksifiye eder [257]. Süperoksit anyonları, belirli sinyal iletim enzimleri tarafından hedeflenen bir ürün olarak üretilmekte olup, mitokondriyal solunum başta olmak üzere çeşitli metabolik süreçlerin yan ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. SOD enzimleri, ROT ve reaktif nitrojen türlerinin seviyelerini düzenleyerek bu moleküllerin toksik etkilerini sınırlar ve sinyal iletim mekanizmaları aracılığıyla birçok hücresel sürecin modülasyonuna katkı sağlamaktadır.

SOD aktivitesi, hücresel redoks dengesinin korunmasında ve oksidatif stresin önlenmesinde kritik rol oynamaktadır [258]. SOD enzimleri, farklı metal kofaktörlerine bağlı olarak çeşitli hücresel lokalizasyonlarda bulunmakta ve süperoksit radikalının detoksifikasyonuna aracılık ederek oksidatif hasarın önlenmesine katkıda bulunmaktadır [259]. Bu izoformlar, oksidatif stres kaynaklı hücresel hasarın engellenmesinde önemli bir biyokimyasal savunma mekanizması olarak görev yapmaktadır [258].



Süperoksit dismutaz türleri ve metal bağımlılığı

Aktif bölgelerinde bulunan metal iyonlarına göre sınıflandırılan başlıca SOD türleri şunlardır:

- **Cu-Zn SOD:** Bakır ve çinko iyonları içerir ve hücre sitoplazmasında bulunur. Sitoplazmik bir izoform olmasına rağmen, çekirdek, lizozom, peroksizom ve mitokondriyal zarlar arası boşluk gibi hücresel bölümlerde bulunabilir. Hücresel antioksidan savunmanın temel intraselüler bileşenlerinden biri olarak kabul edilen Cu-Zn SOD, süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek hücresel bileşenlerin oksidatif hasarını önlemektedir [246].
- **MnSOD:** Yalnızca manganez iyonu ile aktif hale gelen bu izoform, başlıca mitokondri ve peroksizomların matriksinde lokalizedir [260]. Mitokondride ROT birikimi, mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırarak yapısal bütünlüğünü bozabilmektedir. Bu durum, mitokondri dış zarının yapısal hasar görmesine yol açarak pro-apoptotik faktörlerin salınımını tetiklemekte ve dolayısıyla kaspaz aktivasyonunu indükleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır [261]. Bu sürece karşı koruyucu önlem olarak,

mitokondriler yüksek düzeyde MnSOD eksprese ederek hücrel redoks dengesinin korunmasına katkıda bulunmaktadır [261].

- FeSOD: Demir iyonuna ihtiyaç duyan bu izoform, prokaryotlarda, ilkel ökaryotlarda, bitkilerin plastidlerinde ve bakterilerde gözlenmektedir [260]. FeSOD, süperoksit radikallerini detoksifiye ederek oksidatif hasarını sınırlar ve hücrel antioksidan savunmanın temel bileşenlerinden biri olarak işlev görmektedir [262].

Glutasyon peroksidaz

Glutasyon peroksidazlar, çoklu izozimlerden oluşan bir enzim ailesidir ve özellikle lipid peroksidlerinin detoksifikasyonda, antioksidan savunmanın sürdürülmesinde ve hücrel bütünlüğün korunmasında önemli rol üstlenmektedir. Bu enzimler, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitleri suya ve ilgili alkollere indirgerken, glutasyonu oksitlenmiş glutasyon disülfide dönüştürerek hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır [258].

Bitkilerde üç ana glutasyon peroksidaz grubu bulunurken, memelilerde beş farklı izoenzim formu mevcuttur. İzoenzimlerin dokulara özgü dağılımı ve işlevsel farklılıkları, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller üstlenmeye elverişli hâle getirmektedir. Bu enzimler, selenyum bağımlılığı ve katalitik mekanizmalar açısından farklılık göstermektedir [224].

Glutasyon peroksidaz, katalaz enzimi ile birlikte oksidatif stresin düşük düzeylerde kontrol altına alınmasında görev yapmaktadır. Glutasyon peroksidaz genellikle sitozolde ve mitokondride lokalize olup, düşük konsantrasyonlardaki hidrojen peroksidin eliminasyonunda katalaz ile rekabet etmektedir [263]. Reaksiyon sırasında glutasyon, okside glutasyon formuna dönüşmekte ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat aracılığıyla tekrar indirgenmiş glutasyon formuna geri çevrilmektedir [263].

Yara iyileşmesi sürecinde glutasyon peroksidaz düzeyleri yükselir ve inflamatuvar evrede aktif rol oynamaktadır. Oksidatif stresin arttığı durumlarda, reaktif oksijen türlerine karşı hücrel direnci arttırarak keratinosit proliferasyonunu desteklenmektedir. Yapılan çalışmalar, antioksidan enzimlerin ekspresyon düzeylerindeki artışın, hücrelerin oksidatif strese karşı adaptasyon geliştirdiğini ortaya koymaktadır [264].

2.13. Astaksantin

Astaksantin, ilk olarak 1938 yılında Alman biyokimyacı Richard Kuhn tarafından ıstakozdan izole edilerek tanımlanmış ve isimlendirilmiştir [265]. Karotenoidler sınıfına ait lipofilik bir pigment olan astaksantin; çeşitli deniz canlıları, mikroalgler ve bazı maya türleri tarafından sentezlenebilmektedir [266]. Karotenoidler, güçlü antioksidan aktiviteleri ile öne çıkmakta olup bu etkilerini tekli oksijenin baskılanması ve serbest radikallerin nötralize edilmesi yoluyla gerçekleştirmektedir [267].

Astaksantin, diğer birçok karotenoidle kıyasla ısıya karşı daha yüksek direnç gösteren bir yapıya sahiptir [268]. Bu dayanıklılık, kimyasal yapısında bulunan uzun konjuge çift bağları ve moleküler stabilitesi ile ilişkilidir. Bu özellik sayesinde astaksantin, yüksek sıcaklıklarda dahi oksidatif bozulmaya karşı direnç gösterebilmekte ve bu yönüyle gıda ile farmasötik endüstriler açısından değerli bir bileşik olarak kabul edilmektedir [268].

Karotenoidlerin yapısında yer alan konjuge çift bağlar, serbest radikaller ve ROT ile etkileşime girerek oksidatif hasarı sınırlandırmaktadır. Elektronların serbestçe hareket etmesine olanak tanıyan bu yapı, karotenoidlerin reaktif oksijen türlerini nötralize etmesini sağlayarak antioksidan savunma mekanizmasına katkı sağlamaktadır [269]. Yapısal ve işlevsel olarak β -karoten, zeaksantin ve lutein gibi karotenoidlere benzeyen astaksantin, onlarla ortak metabolik ve fizyolojik işlevlere sahiptir [266].

2.13.1. Astaksantin kaynakları

Doğal olarak en zengin astaksantin kaynağı, tatlı su mikroalglerinden biri olan *H. pluvialis*'tir [35]. Bu mikroalg, çevresel stres koşulları altında yüksek miktarda astaksantin sentezleyerek kendisini ultraviyole ışınlar ve oksidatif strese karşı korumaktadır [270,271]. Diğer bir doğal kaynak ise kırmızı maya olarak bilinen *Phaffia rhodozyma* olup, özellikle fermantasyon süreçlerinde astaksantin üretimi için kullanılmaktadır. Somon, karides, ıstakoz, kerevit ve balık yumurtası gibi deniz ürünleri ise bu pigmenti doğrudan sentezleyememesine rağmen beslenme yoluyla aldıklarından dolayı dolaylı kaynaklar arasında yer almaktadır [266]. Çeşitli mikroorganizma kaynaklarından izole edilen astaksantin, Çizelge 2.8 ve Çizelge 2.10'da sunulmuştur.

Astaksantin, endüstriyel ölçekte hem doğal hem de sentetik yöntemlerle üretilmektedir. Biyoyararlanım ve güvenlik açısından doğal kaynaklardan elde edilen astaksantin daha çok tercih edilmektedir. Doğal astaksantin genellikle (3S,3'S) stereoizomer formunda ve esterleşmiş yapıda bulunmaktadır. Oksidatif stabilite açısından bu form daha avantajlı ve biyoyararlanımı daha yüksektir [35,272]. Doğal kaynaklardan elde edilen astaksantin antiinflatuar, antioksidan ve immünmodulator etkilerinin sentetik forma göre daha güçlü olduğu bildirilmektedir [266].

Çizelge 2.8. Doğal astaksantin kaynakları [32]

Astaksantin doğal kaynakları	Astaksantin konsantrasyonu (milyon başına)
Somon	5
Plankton	60
Krill	120
Kutup Karidesi (<i>Pandalus borealis</i>)	1200
<i>Phaffia rhodozyma</i>	10000
<i>Haematococcus pluvialis</i>	40000

Sentetik astaksantin, genellikle petrol türevlerinden kimyasal sentez yoluyla üretilir. Özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde ve hayvan yemlerine katkı maddesi olarak yaygın şekilde kullanılmakta olup ekonomik açıdan daha avantajlıdır [271]. Üretim süreçlerinde Wittig reaksiyonu, Grignard sentezi ve polimerizasyon öncüllerinden zincir uzatma yöntemleri kullanılır. Sentetik astaksantin karışık stereoizomerler içerir: (3R,3'R), (3S,3'S) ve mezomer (3R,3'S). Bu stereoizomerik çeşitlilik, biyolojik etkiler açısından heterojenliğe yol açabilir. Sentetik astaksantin genellikle serbest formda ve esterleşmemiş halde bulunduğundan, oksidatif stabilitesi düşer ve biyoyararlanımı azalır [35,271,273]. Doğal ve sentetik astaksantin karşılaştırmalı özellikleri Çizelge 2.9'da sunulmuştur.

Çizelge 2.9. Sentetik ve doğal astaksantin karşılaştırması

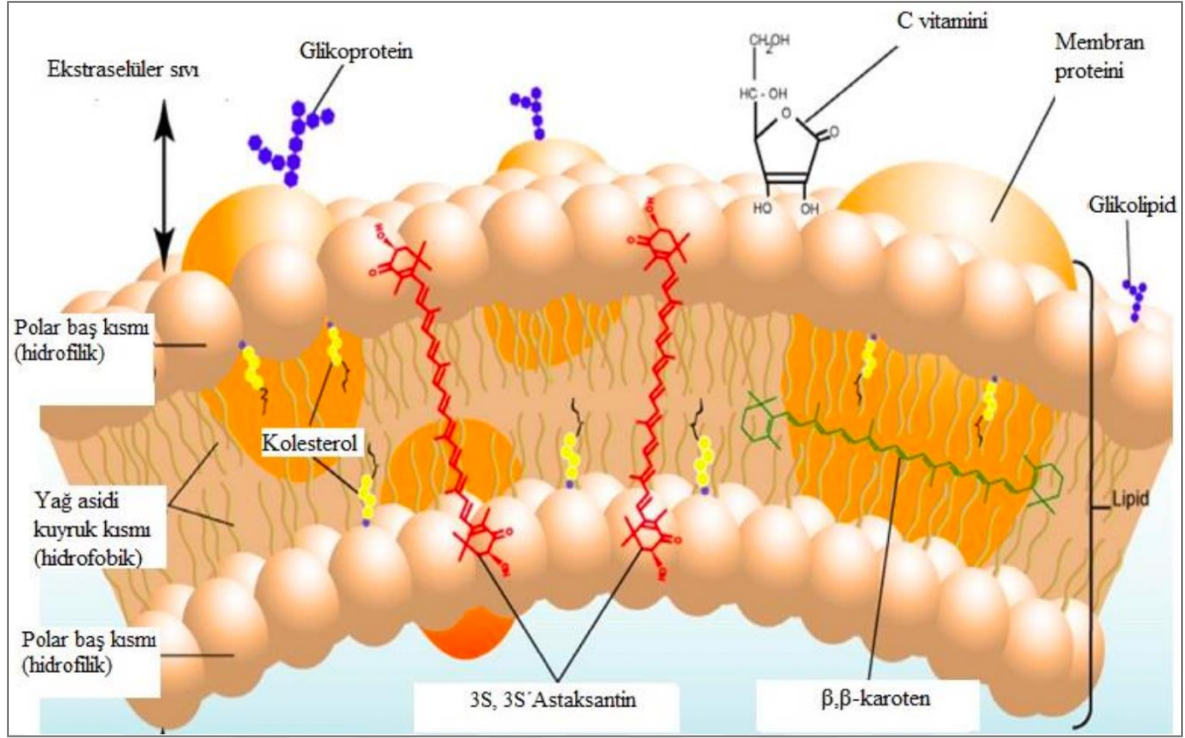
Özellik	Doğal Astaksantin	Sentetik Astaksantin
Kaynak	Mikroalg, maya, deniz canlıları	Kimyasal sentez (petrol türevleri)
Biyoyararlanım	Yüksek (esterleşmiş formda)	Düşük (serbest formda, estersiz)
Antioksidan Etki	Güçlü antioksidan etki, oksidasyona karşı direnç	Orta düzeyde antioksidan etki
Kullanım Alanı	Takviyeler, kozmetik, farmasötikler	Hayvan yemi, gıda katkı maddesi
Maliyet	Yüksek, ancak biyolojik faydaları daha yüksek	Düşük maliyet, ancak biyolojik etkiler sınırlı
Sağlık Riskleri	Genellikle güvenli Uzun dönemde olumlu etkiler	Sınırlı güvenlik verisi Uzun dönemde etkiler belirsiz
Biyolojik Etkiler	Yüksek biyolojik etki Yüksek stabilite	Düşük biyolojik etki Daha düşük stabilite

Çizelge 2.10. Mikroorganizmaların astaksantin içerikleri [35]

Astaksantin kaynakları	Kuru ağırlıkta Astaksantin (%)
<i>Chlorophyceae</i>	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3,8
<i>Chlorococcum</i>	0,2
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0,001
<i>Neochloris wimmeri</i>	0,6
<i>Ulvophyceae</i>	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0,02
<i>Ulva lactuca</i>	0,01
<i>Florideophyceae</i>	
<i>Catenella repens</i>	0,02
<i>Alphaproteobacteria</i>	
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	0,01
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	2,2
<i>Tremellomycetes</i>	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhou</i>	0,5
<i>Labyrinthulomycetes</i>	
<i>Thraustochytrium sp</i>	0,2
<i>Malacostraca</i>	
<i>Pandalus borealis</i>	0,12
<i>Pandalus clarkia</i>	0,015

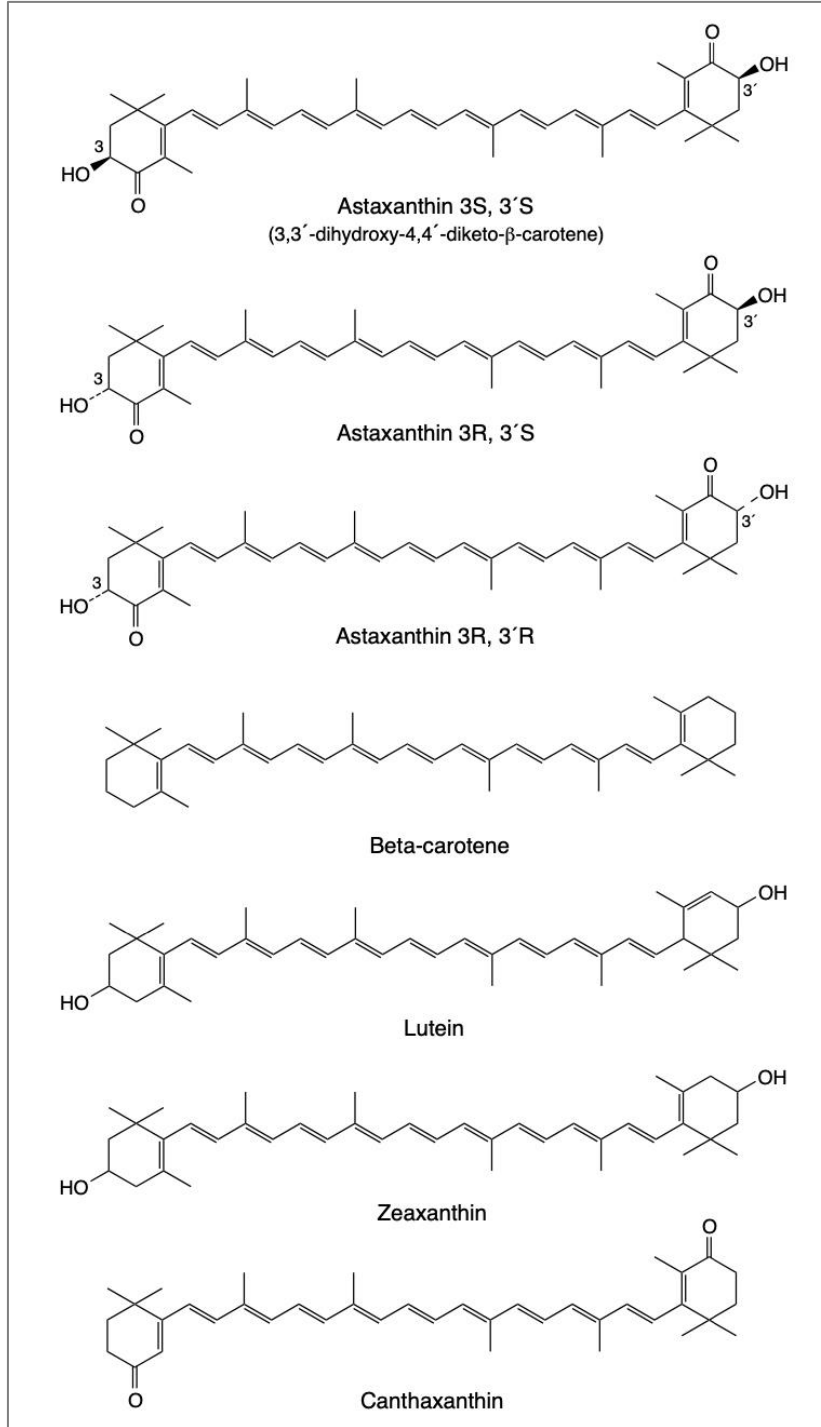
2.13.2. Kimyasal yapısı ve biyokimyası

Astaksantin (3,3'-dihidroksi- β,β -karoten-4,4'-dion), moleküler formülü $C_{40}H_{52}O_4$ ve mol kütlesi 596,84 g/mol olan bir ksantofil karotenoiddir. Molekül yapısında bulunan hidroksil ve keton grupları, astaksantine hem lipofilik hem de hafif hidrofilik özellik kazandırır. Bu çift karakter sayesinde astaksantin, hücre zarlarına entegre olabilir (Şekil 2.3) [274] ve kan-beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemi üzerinde koruyucu etki gösterebilir [35,275].



Şekil 2.3. Hücre zarında astaksantin pozisyonu

Yapısında bulunan konjuge çift bağlardan oluşan polien zinciri, astaksantine serbest radikal tutucu özellik kazandırarak güçlü bir antioksidan kapasite sağlar [276,277]. Dolayısıyla bu kimyasal yapı, astaksantin biyolojik aktivitesinde ve terapötik potansiyelinde belirleyici rol oynar. Oksijen atomları, molekülün halka sisteminde hidroksil ve keton grubu olarak yer alırken; β -iyonon halkalarında bulunan 3 ve 3' pozisyonlarındaki iki stereojenik karbon atomu nedeniyle astaksantin üç farklı stereoizomerik formda bulunabilir: iki kiral [(3S,3'S) ve (3R,3'R)] ve bir mezo (3R,3'S) izomer [278] (Şekil 2.4). Astaksantine özgü turuncu-kırmızı renk, yapısında bulunan konjuge çift bağlardan kaynaklanmaktadır [279].



Şekil 2.4. Karotenoidlerin kimyasal yapıları

2.13.3. Astaksantin metabolizması ve biyoyararlanım özellikleri

Astaksantin metabolizması, oral alımı takiben ince bağırsakta gerçekleşen emilimle başlar. Lipofilik yapısı nedeniyle, diyetle alınan yağlar emilimini artırır ve emilim sonrası şilomikronlara bağlanarak lenfatik sistem yoluyla sistemik dolaşıma katılır. Karaciğerde

metabolize edilen astaksantin, esterleşmemiş formda lipoproteinlere bağlanarak hedef dokulara taşınır [280]. Astaksantin vücutta başlıca karaciğer, böbrek, dalak ve deri gibi dokularda birikir. Vücutta çeşitli metabolitlere dönüştürülmesine rağmen, ana bileşen olarak antioksidan etkisini korur. Karaciğerde sitokrom P450 enzimleri aracılığıyla metabolize edilen astaksantin, glukuronid ve sülfat konjugatları halinde safra veya idrar yoluyla atılır [281].

Astaksantinin terapötik etkinliği, biyoyararlanımı ve yarı ömrü dahil olmak üzere farmakokinetik özellikleri ile yakından ilişkilidir. Lipofilik yapısı, gastrointestinal emilimin diyet yağları varlığında arttığını göstermektedir [280,282]. Bu nedenle, oral formülasyonlarda biyoyararlanımı optimize etmek amacıyla lipid bazlı taşıyıcı sistemler ve mikrokapsülleme teknolojileri yaygın olarak kullanılmaktadır [280,283].

Astaksantinin farmakokinetik profili, uygulanan doza bağlı değişkenlik göstermekle birlikte, oral alımı takiben maksimum plazma konsantrasyonuna genellikle 6 ila 12 saat içinde ulaşır. 40 mg'lık bir doz sonrası maksimum konsantrasyon yaklaşık 8–10 saat içinde gözlenirken, 100 mg'lık dozlarda bu süre 6,7 ila 11,5 saat arasında değişmektedir [284]. Eliminasyon yarı ömrü uygulanan doza bağlı olarak farklılık gösterir: 40 mg'lık dozlarda ortalama 15,9 saat, 100 mg'lık dozlarda ise 21 ila 52 saat arasında değiştiği bildirilmiştir [283,284].

2.13.4. Astaksantin güvenlik profili ve doz aralıkları

Astaksantin, deniz kökenli bir ksantofil karotenoid olup ilk kez Kuhn ve Soerensen tarafından ıstakozdan izole edilmiştir. FDA, astaksantin kabuklu deniz ürünleri ve alabalık yemlerinde renklendirici olarak (1987) ve gıda takviyesi olarak (1999) kullanımını onaylamıştır [266].

Haematococcus pluviialis kaynaklı astaksantin ürünleri, FDA tarafından "Genel Olarak Güvenli (GRAS)" statüsü almıştır [285]. Klinik çalışmalar, günlük 2-12 mg aralığının güvenli olduğunu göstermekte olup, ticari takviyelerde genellikle 4-8 mg dozlar kullanılmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) Beslenme, Yeni Gıdalar ve Gıda Alerjileri Paneli (NDA), tüm kaynaklardan gelen kümülatif alım dikkate alındığında, takviyeler yoluyla günde maksimum 8 mg astaksantin alımının yetişkinler için güvenli olduğunu bildirmiştir [286].

Astaksantinin güvenlik profili hayvan ve insan çalışmaları kapsamında, akut ve subkronik toksisite testleri ile değerlendirilmiştir. Akut toksisite çalışmalarında, *Haematococcus* alglerinden elde edilen astaksantin farklı kemirgen modellerine yüksek dozlarda uygulanması sonucunda belirlenen LD₅₀ değerlerinin oldukça yüksek olduğu, bu nedenle astaksantin akut toksisite riskinin çok düşük olduğu rapor edilmiştir [287]. Hayvan deneylerinde aşırı tüketimin ciltte sarı-kırmızımsı pigmentasyona yol açtığı gözlemlenmiştir. Ancak hayvan ve insan çalışmalarında bugüne kadar ciddi bir yan etki bildirilmemiştir [35,287]. Örneğin:

- Sprague-Dawley ratlarına 12.000 mg/kg vücut ağırlığı dozunda uygulanan astaksantin bu dozun üzerinde LD₅₀ değerine sahip olduğu bildirilmiştir.
- CR farelerinde 20.000 mg/kg-v.a. dozuna kadar ölüm veya toksisite gözlenmemiştir [288].
- Füllinsdorf albino ratlarında 125–2000 mg/kg-v.a. doz aralığında vücut ağırlığı değişimi, semptom veya mortalite görülmemiştir [287].

İnsan çalışmaları da astaksantin güvenli doz aralığını desteklenmektedir. *H. pluvialis* türevi astaksantin oleoresini ile yapılan klinik çalışmalarda, günde 45 mg gibi yüksek dozlarda 4 haftaya kadar süren uygulamalarda dahi advers etki bildirilmemiştir. Sağlıklı bireylerde yürütülen çalışmalar (12 haftaya kadar günde 24 mg; 6 ay ve üzeri günde 12 mg) hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde anlamlı bir olumsuzluk saptamamıştır. Kısa süreli çalışmalar genotoksik veya mutajenik etkiye dair kanıt sunmamıştır [289-293].

2.13.5. Astaksantin biyolojik etkileri

Astaksantin, güçlü antioksidan kapasitesi ile hücre zarını lipid peroksidasyonu ve oksidatif strese karşı koruyarak hücresel hasarın önlenmesine katkı sağlar. Antioksidan kapasitesi; E vitamininden 500 kat, α - tokoferolden 100 kat, zeaksantin, lutein, kantaksantin ve β -karotenden 10 kat fazladır [294]. Bu özellik, astaksantin serbest radikalleri etkili bir şekilde nötralize etmesine ve oksidatif hasarı azaltarak, çeşitli sağlık faydaları sağlamasına olanak tanır [35].

Serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı önleyerek oksidatif stresin yol açtığı patolojik sürecin baskılanmasına yardımcı olur. Güçlü antiinflamatuvar özellikleri sayesinde

inflamasyon yanıtını baskılayarak bağışıklık sisteminin etkinliğini artırmasına olanak tanır [295].

Astaksantin antiinflamatuvar etkilerinden biri, NF- κ B yolağının inhibisyonu ile proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN) ekspresyonunun baskılanmasıdır. Bu yolla, inflamatuvar yanıtın şiddetini azaltarak doku hasarının ilerlemesini engeller. Hasarlı dokularda yükselen ROT ve nitrik oksit düzeylerini sınırlandırmak amacıyla, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini inhibe eder. Hücresel inflamasyonu sınırlandırıcı bir rol üstlenir. Siklooksijenaz enzim sisteminin ve TNF- α 'nın düzeylerini düşürerek inflamatuvar sürecin düzenlenmesine katkı sağlar [38].

Araştırmalar, astaksantin osteoartrit, romatoid artrit ve osteoporoz gibi hastalıklarda, MMP-1, MMP-3 ve MMP-13 enzimlerinin ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu baskıladığını bildirmektedir [296]. Astaksantin IL-1 β ile uyarılmış kondrositlerde artrit biyobelirteçlerini hafiflettiği, böylece inflamasyonu azalttığı, osteojenik hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını arttırarak kemik gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir [297]. PI3K, p-MEK, p-ERK ve p-Stat3 yolları aracılığıyla nöral kök hücrelerde osteojenik süreçleri uyarır, osteogenez ve adipogenezle ilişkili gen ekspresyonunu modüle eder [298].

Astaksantin, antikor üretimini teşvik ederek immün yanıtı güçlendirirken, kan basıncının düzenlenmesinde rol oynayarak kardiyovasküler sağlığın korunmasına katkı sağlar [299]. Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde etkili bir bileşik olan astaksantin, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek ateroskleroz riskini azaltır [32,296].

Astaksantin, Hücre döngüsünü düzenleyerek ve apoptozu indükleyerek kanser hücre proliferasyonunu inhibe edebilir [273]. Kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği sayesinde, beyin hücrelerini oksidatif strese karşı korur. Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir [277,300]. Cilt hücrelerini ultraviyole ışınlarının zararlı etkilerinden koruyarak fotoyaşlanmayı azaltmada etkili bir ajan olarak değerlendirilmiştir [266].

Astaksantin yüksek antioksidan kapasitesinin yanı sıra göz sağlığını destekleme [301], yaşlanma sürecini geciktirme, antidiyabetik etkiler [302] ve immunomodülasyon gibi çok

yönlü biyolojik etkinlikleri de bilinmektedir [303,304]. Biyolojik aktiviteler sergiler. Bu özellikler, astaksantin fonksiyonel gıda ve takviye olarak kullanımını desteklemektedir.

2.13.6. Astaksantin antioksidan mekanizması

Astaksantin, yapısal özellikleri nedeniyle güçlü bir karotenoid antioksidandır. Singlet oksijen, hidroksil radikali ve süperoksit anyonu gibi ROT'ları doğrudan nötralize ederek hücreleri oksidatif strese karşı korur [35,305-307]. Bu etkisiyle, hücre zarında meydana gelen lipid peroksidasyonunu önlemekte ve hücresel bütünlüğün korunmasına katkı sağlamaktadır [307]. Koruyucu etkinin sağlanabilmesi için hedef dokularda, oksidatif yük ve korunacak biyomolekül yoğunluğuyla uyumlu terapötik konsantrasyona ulaşması gereklidir [308].

Astaksantin antioksidan kapasitesinin, diğer fotokimyasal ajanlara kıyasla 100 ila 1000 kat daha yüksek etki gösterdiği bildirilmiştir [294,309-311]. Astaksantin sahip olduğu yüksek biyolojik etkinlik, yalnızca serbest radikalleri doğrudan etkisiz hale getirme yeteneğinden değil, aynı zamanda enerji transfer mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirdiği dolaylı etkilerden de kaynaklanmaktadır. Singlet oksijen moleküllerini enerji transferi yoluyla sönmüleyerek bu molekülleri temel duruma geri döndürmekte böylece hücresel düzeydeki oksidatif stresin azalmasına katkı sağlamaktadır [276] Bu mekanizma kapsamında, çevredeki çözücü moleküllerle etkileşime giren astaksantin, fazla enerjiyi ortamdan uzaklaştırarak yapısal stabilitesini korur [276,312].

Astaksantin peroksil radikallerini rezonans stabilizasyonu yoluyla etkisizleştirir [276,313], özellikle lipid bakımından zengin hücresel yapılarda meydana gelebilecek oksidatif bozulmaları önleme konusunda koruyucu rol üstlenir [294,309,314].

Hücre membranları, içerdiği çoklu doymamış yağ asitleri ve yüksek düzeyde metabolik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle oksidatif hasara duyarlıdır. Astaksantin, hücre zarını baştan sona kat edebilen yapısal özelliği sayesinde, membran düzeyinde çok yönlü bir koruma sağlamaktadır. Bu koruyucu mekanizmalar aşağıdaki şekilde özetlenebilir [27,30,307,314]:

- Serbest radikallerin eşleşmemiş elektronlarını bağlayarak nötralize etmesi
- Radikal moleküllerle etkileşerek inaktif bileşikler oluşturma
- Elektron veya enerji transferi yoluyla reaktif türleri membran dışına taşıması
- Oksijenin yanı sıra azot, kükürt ve karbon temelli radikalleri de nötralize edebilme
- Düşük moleküler enerji seviyesine sahip olması nedeniyle pro-oksidan forma dönüşüm göstermemesi

Bu özellikleri sayesinde astaksantin, yalnızca kısa vadeli radikal temizleyici etki sunmakla kalmaz; aynı zamanda hücre membran bütünlüğünü uzun vadeli olarak destekleyen ve sistemik oksidatif yükü azaltan biyolojik açıdan değerli bir molekül olarak değerlendirilmektedir [307].

2.13.7. Hücresel savunma mekanizmaları

Astaksantin, doğrudan antioksidan etkilerin yanı sıra hücresel savunma yollarını modüle ederek oksidatif stresle mücadele eder. Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) yolunu aktive ederek, hücre içi antioksidan yanıtı yöneten genlerin ekspresyonunu artırır. Nrf2'nin aktive olmasıyla birlikte süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidan enzimlerin üretimini artırır; böylece hücresel savunmayı uzun vadeli güçlendirir [315,316].

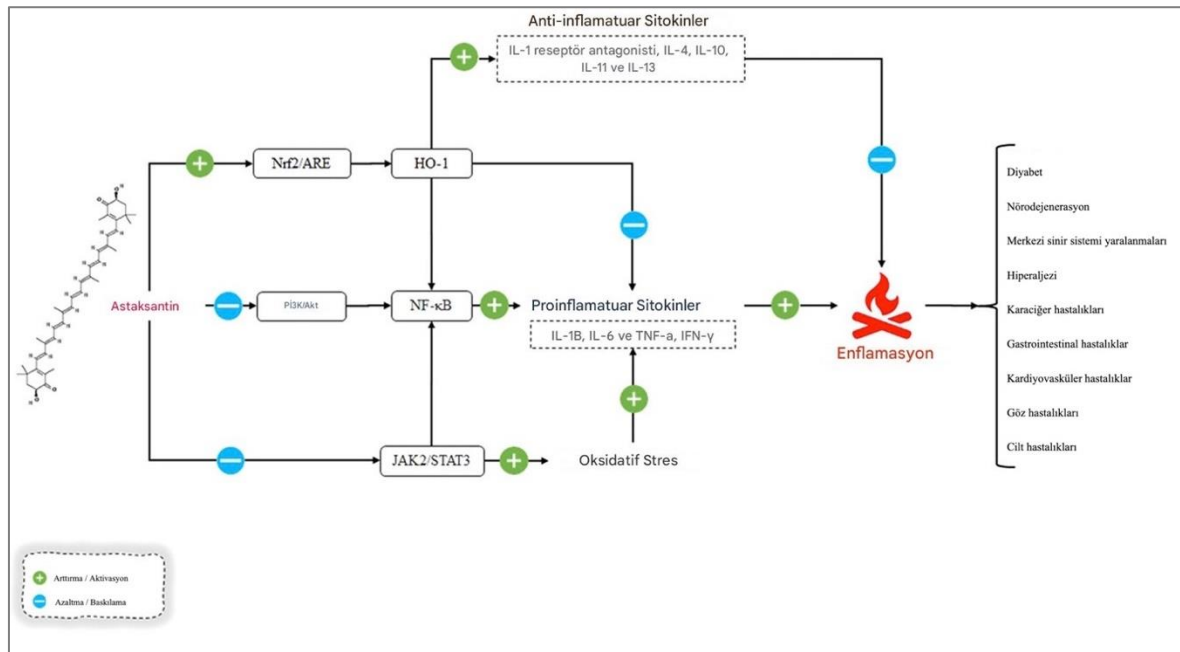
Aşırı oksidatif moleküller, protein ve lipid oksidasyonu ile DNA hasarını indükleyen bir zincirleme reaksiyon ile etkileşime girerken, astaksantin ROT'u ve azot türlerini etkisiz hale getirerek DNA, protein ve lipid oksidasyonunu önler, hücresel bütünlüğü korur. Mitokondri düzeyinde gösterdiği koruyucu etkiler, enerji üretim süreçlerini optimize eder ve apoptozu baskılar [317,318].

Astaksantin, ERK1/2, JNK ve p38-MAPK yollarını düzenleyerek inflamasyon, hücre proliferasyonu ve apoptozu üzerinde düzenleyici etki gösterir. İnflamatuvar yanıt dengelenirken, doku onarımı ve rejenerasyonu destekleyici etki oluşturur [319].

Astaksantin, PI3K/Akt sinyalini aktive ederek hücre sağkalımını, proliferasyonu ve anti-apoptotik sinyalleri artırır. Bu sayede hücre koruyucu ve antiinflamatuvar etki sağlar. Janus Kinaz/ Sinyal Transduseri Transkripsiyon Aktivatörü (JAK/STAT) yolağı, inflamatuvar genlerin ekspresyonunda görev alan önemli bir sinyal sistemidir. Astaksantin bu yolağı

inhibe ederek, IL-6 ve benzeri proinflamatuvar mediyatörlerin üretimini sınırlar ve immün yanıtı dengeler [319].

Astaksantin doğrudan antioksidan savunma ve genetik düzeyde hücresel yanıtların düzenlenmesi yoluyla çift yönlü bir koruyucu mekanizma sergiler, astaksantini farmasötik ve nutrasötik uygulamalarda değerli kılan çok katmanlı bir koruyucu profil sunar [266,315]. Astaksantin etkilediği mekanizmalar Şekil 2.5'te gösterilmiştir [31].



Şekil 2.5. Astaksantin anti-inflamatuar etkinliği ve inflamasyonla ilişkili rolü

2.13.8. Diş hekimliğinde astaksantin potansiyeli

Oral ve periodontal yara iyileşmesi, oksidatif stres, inflamasyon ve rejeneratif süreçlerin dinamik etkileşimini içerir. Periodontal cerrahi, implantoloji ve mukozal lezyon tedavilerinde ROT aşırı üretimi, doku iyileşmesini geciktirir ve bu sürecin kontrol altına alınabilmesi, klinik başarıyı artırır.

Astaksantin, güçlü antioksidan kapasitesi sayesinde ROT'un neden olduğu hücresel hasarı sınırlar. Yapılan çalışmalar, astaksantin fibroblast proliferasyonunu artırdığını, kolajen sentezini desteklediğini ve epitel hücre göçünü kolaylaştırdığını ortaya çıkarmıştır [320]. Bu etkiler, yara iyileşmesinin temel biyolojik basamakları olan hücre çoğalması, matriks sentezi ve doku yeniden şekillenmesi üzerinde doğrudan katkı sağlamaktadır.

İnflamatuvar süreçler üzerinde modölatör bir rol üstlenen astaksantin, inflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılayarak lokal inflamasyonun şiddetini azaltmakta ve doku hasarını sınırlamaktadır. Gingival ve periodontal dokularda oluşan oksidatif dengesizliklerin giderilmesinde önemli bir avantaj sağlayarak rejeneratif tedavi yaklaşımlarında potansiyel oluşturmaktadır [321,322].

Preklinik çalışmalar astaksantin osteoblastik aktiviteyi uyararak kemik formasyonunu desteklediğini, osteoklastik aktiviteyi baskılayarak kemik rezorpsiyonunu sınırlandırdığını göstermiştir [59,63,323]. Bu bulgular, cerrahi sonrası tamamlayıcı ajan olarak kullanımını desteklemektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul

Bu çalışma, ARRIVE 2.0 kılavuzları ile etik araştırma standartlarına dayanan “Üç R” (Replacement, Reduction, Refinement) ilkeleri doğrultusunda planlandı [324]. Etik onay, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından G.Ü.ET-23.112 protokol numarasıyla verilmiş olup, 10.12.2023 tarihli ve E-66332047-604.01.02-822011 sayılı resmi izin doğrultusunda yürütüldü. Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, Uluslararası Uyumlandırma Konferansı (ICH) ve Sağlık Bakanlığının 6 Temmuz 2006 tarihli ve 26220 sayılı Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına İlişkin Yönetmelik hükümleri doğrultusunda “Deney Hayvanıyla Uğraşacak Personelin Eğitimi” isimli başlığı altındaki 15.maddeye uygun olarak, etik kurul başvurusu öncesinde “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” temin edildi. Deneysel uygulamalar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi’nde gerçekleştirildi; histolojik ve immünohistokimyasal analizler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütüldü.

3.2. Deney Protokolü

3.2.1. Deney hayvanları

Biyoistatistiksel ön değerlendirme, “Tekrarlanan Ölçümler Varyans Analizi” yöntemi için yapılan güç analizi sonucu örneklem genişliği her ana grupta en az 15 denek olmak üzere toplam 45 denek olarak belirlendi ($n=5$, $N=45$). Testin istatistiksel gücü %82,88 ve $\alpha=0.05$ olarak belirlendi.

Deneylerde kullanılmak üzere, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından temin edilen, 8 haftadan büyük, 230-260 gram ağırlığında 45 adet Wistar albino dişi rat kullanıldı. Çalışmaya, daha önce herhangi bir araştırmada kullanılmamış, sistemik hastalık veya gebelik durumu bulunmayan ratlar dahil edildi. Randomizasyon öncesinde, hastalık, yaralanma veya anormal davranış belirtileri gösteren hayvanlar protokol gereği çalışmaya dahil edilmedi.

3.2.2. Hayvan bakımı ve çevresel koşullar

Hayvanlara deney öncesinde 3 günlük adaptasyon süresi tanındı. Bu süre boyunca ratlar, 21-24°C'deki oda sıcaklığında, %30-45 nispi nem oranı ve 12 saat ışık ile 12 saat karanlık döngüsünün uygulandığı kontrollü bir ortamda tutuldu. Bulundukları odanın nispi nem oranı %30-45 arasında kontrol altında tutularak serbest su ve yem tüketebilecekleri bir ortam sağlandı. Oda havalandırması filtrelenerek olası kontaminasyon riski minimize edildi. Denekler, tabanlarında talaş altlık bulunan polikarbonat kafeslerde muhafaza edildi. Kafesler her gün temizlenip kuru altlıklarla yenilendi. Deney süresince tüm ratların bakımı sağlandı ve uzman veterinerler tarafından düzenli olarak kontrol edildi. Her grupta beşer denek olacak şekilde, deney süresi boyunca kafeslerde barındırıldı.

3.2.3. Deney grupları

Astaksantin oral dokularda sekonder palatal yara iyileşmesi üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçlayan bu deneysel çalışma, 7 günlük bir gözlem süresini kapsayacak şekilde tasarlandı. Toplam 45 adet Wistar albino dişi rat, her üst grupta 15 hayvan bulunan üç gruba rastgele seçim yöntemiyle ayrıldı. Her grup, sakrifikasyon zamanlarına göre üçer alt gruba (3., 5. ve 7. gün) ayrılarak toplamda dokuz deney grubu oluşturuldu (Çizelge 3.1). Alt gruplar sırasıyla belirlenen günlerde sakrifiye edildi. Tüm deneklerin başlangıçtaki ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Deneyin başlangıç gününde, yara oluşturma işlemi için ve sakrifikasyon öncesinde tüm gruplara anestezi uygulandı. Tüm gruplarda, Wistar albino ratların sert damak mukoperiosteumunda, molar dişler hizasında yer alan bölgeye 4 mm çapında punch biyopsi aleti ile tam kalınlıkta eksizyonel yara oluşturularak, doku künt diseksiyonla çıkarıldı.

- a) Grup I: Kontrol grubu (n = 15),
- b) Grup II: Sistemik uygulama grubu (5mg/kg/gün Astaksantin) (SA) (n = 15)
- c) Grup III: Topikal uygulama grubu (5mg/kg/gün Astaksantin) (TA) (n = 15)

Çizelge 3.1. Deney grupları ve uygulanan işlemler

Ana Gruplar	Sakrifikasyon Günleri	Deney Grupları	Gruplardaki Hayvan Sayısı	Yumuşak doku defekti	Tedavi
Kontrol	3. Gün	Kontrol - 3	5	+	-
	5. Gün	Kontrol - 5	5	+	-
	7. Gün	Kontrol - 7	5	+	-
Sistemik Astaksantin (SA)	3. Gün	SA3	5	+	+
	5. Gün	SA5	5	+	+
	7. Gün	SA7	5	+	+
Topikal Astaksantin (TA)	3. Gün	TA3	5	+	+
	5. Gün	TA5	5	+	+
	7. Gün	TA7	5	+	+
		Toplam	45		

Kontrol grubu (n=15)

Deney süresi boyunca hiçbir farmakolojik ajan uygulanmayarak, yara bölgesi sekonder iyileşmeye bırakıldı. Çalışma sonunda 3., 5. ve 7. gün olmak üzere 5'er hayvan, intrakardiyak kan alımı ile sakrifiye edildi.

Kontrol - 3 (n=5) : 3. günde sakrifiye edilen grup

Kontrol - 5 (n=5) : 5. günde sakrifiye edilen grup

Kontrol - 7 (n=5) : 7. günde sakrifiye edilen grup

Sistemik astaksantin uygulama grubu (AG)

Bu gruba dahil edilen hayvanlara, deney süresi boyunca 5 mg/kg dozunda astaksantin içeren ve taşıyıcı olarak zeytinyağında çözdürülmüş çözelti, günlük olarak mide gavajı ile sistemik yoldan uygulandı. Çalışma sonunda 3., 5. ve 7. gün olmak üzere 5'er hayvan, intrakardiyak kan alımı ile sakrifiye edildi.

SA3 (n=5) : 3. günde sakrifiye edilen grup

SA5 (n=5) : 5. günde sakrifiye edilen grup

SA7 (n=5) : 7. günde sakrifiye edilen grup

Topikal astaksantin uygulama grubu (TA)

Bu gruba dahil edilen hayvanlara, zeytinyağında çözdürülmüş 5mg/kg dozunda sıvı formulu astaksantin, ağız ekarte edilerek künt uçlu bir enjektör aracılığıyla günde bir kez topikal

olarak uygulandı. Çalışma sonunda 3., 5. ve 7. gün olmak üzere 5'er hayvan, intrakardiyak kan alımı ile sakrifiye edildi.

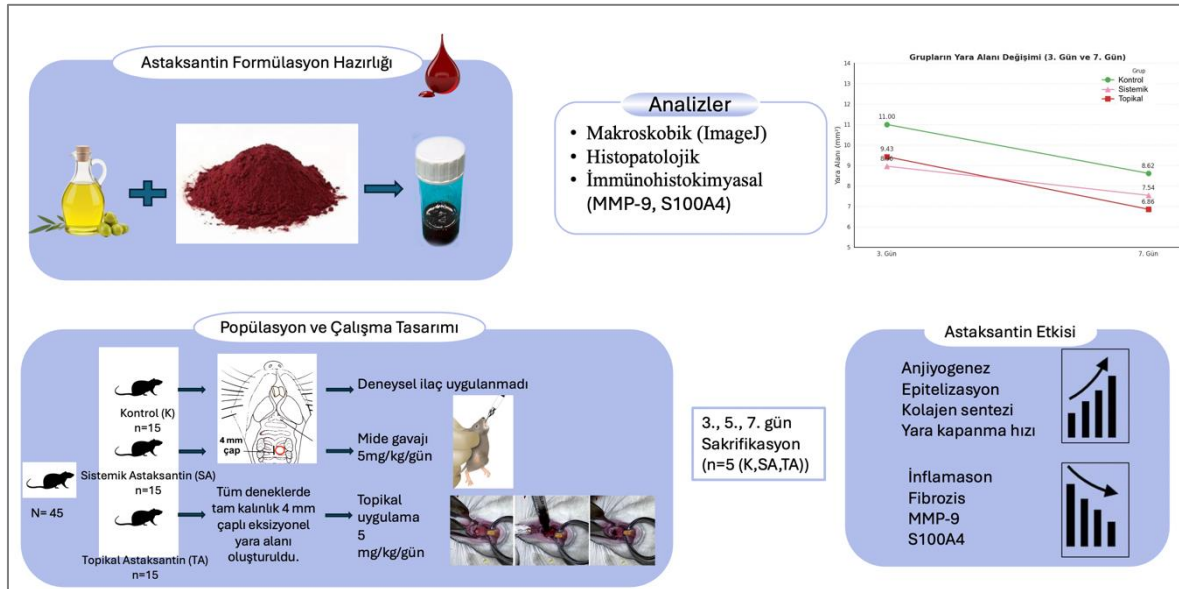
TA3 (n=5) : 3. günde sakrifiye edilen grup

TA5 (n=5) : 5. günde sakrifiye edilen grup

TA7 (n=5) : 7. günde sakrifiye edilen grup

3.2.4. Çalışma akışı

Denekler; kontrol (n=15), sistemik astaksantin (n=15), topikal astaksantin (n=15) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Her bir grup, sakrifikasyon zaman günleri olan 3., 5. ve 7. günlerde değerlendirilmek üzere 5'er denek olmak üzere alt gruplara ayrıldı. Tüm deneklerde sıfırıncı gün palatal damakta 4 mm çapında yara alanı oluşturuldu (Şekil 3.3). Deney süresi boyunca her gün TA ve SA gruplarına 5mg/kg astaksantin çözeltisi uygulandı. 0. gün başlangıç ve 3., 5. ve 7. günlerde sakrifiye edilen deneklerden, yara yüzeyi örnekleri alınarak ve dijital olarak fotoğraflanarak makroskopik değerlendirmeye dahil edildi. Alınan biyopsi örnekleri immünohistokimyasal değerlendirme ile incelendi. Çalışma akışının gösterildiği deney süreci ve bulguları grafik özeti Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Grafik özet

3.2.5. Referans madde

Referans madde olarak toz formunda astaksantin (Astavitin, Türkiye) maddesi kullanıldı (Resim 3.1: A). Temin edilen tozun 1 gramında 100 mg astaksantin bulunmaktadır. Toz, sistemik ve topikal uygulama formuna olanak sağlayacak şekilde sıvı forma dönüştürülmesi amacıyla çeşitli işlemlerden geçirildi. Deney süresi boyunca, deney gruplarına göre 5 mg/kg/gün astaksantin uygulandı.

3.2.6. Astaksantin solüsyonlarının hazırlanması ve uygulama protokolü

Astaksantin lipofilik yapısı nedeniyle uygun bir taşıyıcı belirlenmesi amacıyla yapılan literatür taramaları doğrultusunda çözücü olarak sızma zeytinyağı tercih edildi [325,326]. Sistemik ve topikal uygulamalar için iki farklı formülasyonda çözelti hazırlandı. Dozaj ayarlaması, ilgili literatür temel alınarak 5 mg/kg olarak belirlendi [59,62].

Hazırlık sürecinde, toz formdaki astaksantin, hassas terazi (ADAM Equipment AFA 210LC, Birleşik Krallık) kullanılarak 1,25 gram olarak tartıldı ve numune kabına aktarıldı (Şekil 3.1-B). Ardından, 10 ml sızma zeytinyağı numune kabına eklenerek, elde edilen karışım manyetik karıştırıcı (Wiggins WH220, Almanya) ile 1 dakika boyunca homojenize edildi. Bu çözelti, 0,1 ml'sinde 1,25 mg astaksantin içerecek şekilde hazırlanmış olup topikal uygulamalarda kullanıldı (Resim 3.1: C-D).

Sistemik uygulama amacıyla, benzer şekilde 1,25 gram astaksantin, 20 ml sızma zeytinyağı içerisinde çözülerek ikinci bir çözelti hazırlandı. Bu formülasyonda 0,2 ml çözelti, 1,25 mg astaksantin içerecek şekilde standardize edildi. Bu çözelti, deney süresince mide gavajı yöntemiyle deneklere uygulandı.

Tüm çözeltiler, her uygulama sonrası +4 °C'de buzdolabında uygun koşullarda muhafaza edildi. Uygulamalar, deney süresi boyunca her gün saat 09.00-10.00 arasında gerçekleştirildi. TA grubundaki deneklerde, uygulama öncesinde ağız bölgesi ekarte edilerek, hazırlanan çözelti künt uçlu enjektör yardımıyla doğrudan yara yüzeyine temas ettirilmeden yara alanına uygulandı. Uygulama sonrasında yara bölgesi yıkanmadı ve bölgenin dış etkenlerden korunması için herhangi bir fiziksel önlem alınmadı. Topikal uygulamada, çözeltinin yara bölgesinde en az on saniye kalması sağlanırken [327], uygulamadan sonraki 30. saniyede çözeltinin bölgede varlığı kontrol edildi [327,328]. SA

grubundaki deneklere, hazırlanan çözelti deney süresi boyunca günlük olarak mide gavaj aplikatörü ile intragastrik yolla verildi.



Resim 3.1. Astaksantin çözeltisinin hazırlık aşaması, A: Toz formu astaksantin, B: Astaksantin gramajının hassas terazide tartılması, C ve D: Astaksantin çözelti formülasyonu

3.2.7. Çalışmada kullanılan ekipmanlar

Kullanılan kimyasal maddeler

- Ksilazin (Alfazyne® %2, Alfasan, Hollanda)
- Ketamin HCl (Alfamine® 10%, Alfasan, Hollanda)

- İzotonik sodyum klorür çözeltisi
- %10'luk formaldehit solüsyon
- %10'luk povidon iyot çözeltisi
- Astaksantin (Astavitin, Türkiye)

Cerrahi malzemeler

- Cerrahi makas
- Doğrusal bisturi sapı
- 15 ve 21 numara bisturi ucu
- İnce periost elevatörü
- 4 mm çaplı punch biyopsi aleti (Disposafe Health&Life Care, India)
- Kemik pensi
- Ekartör
- Presel
- Periodontal sond (Hu Friedy PCPUNC156, USA)
- Steril gazlı bez
- Steril örtü
- Steril eldiven

Diğer gereçler

- Elektronik hassas terazi (ADAM Equipment AFA 210LC, Birleşik Krallık)
- Dijital fotoğraf makinesi (NIKON D5100 (Nikon Corp., Tokyo, Japonya)
- Manyetik homojenizatör (Wiggens WH220, Almanya)
- İnsülin enjektörleri
- Plastik biyopsi kabı

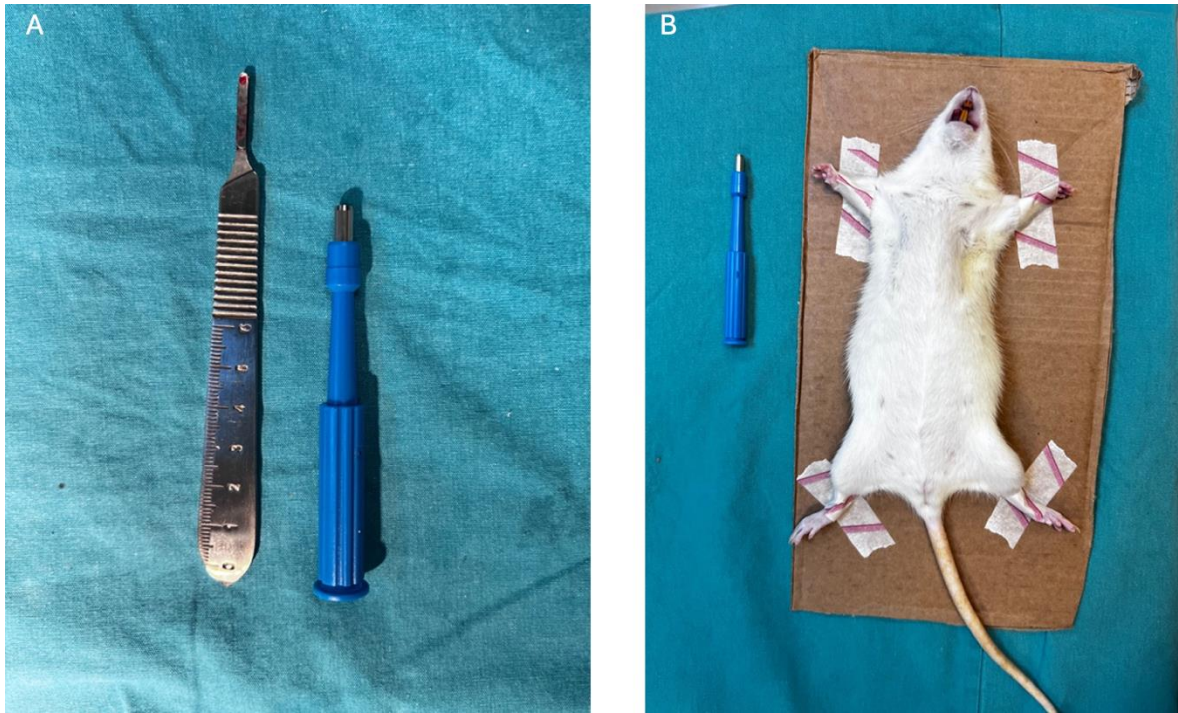
3.3. Cerrahi Protokol

3.3.1. Yara modelinin hazırlanması ve astaksantin uygulanması

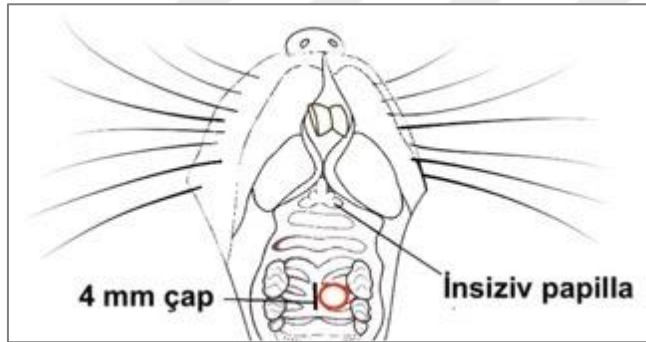
Tüm deney hayvanlarına cerrahi girişim öncesi 45 mg/kg Ketamin HCl (Alfamine 10%, Alfasan, Hollanda) ve 2.5 mg/kg Ksilazin hidroklorür (2.5 mg/kg; Alfazyne %2, Alfasan, Hollanda) intramüsküler enjeksiyon yoluyla uygulandı, denekler genel anestezi altına alındı.

Steril şartlar altında cerrahi işleme hazır hale getirilen ratlar, operasyon tahtası üstünde supine pozisyona getirilerek kan dolaşımını bozmayacak şekilde dört ekstremiteden bantlanarak sabitlendi. Dil ve yanak ekarte edildikten sonra, sert damağın ortasında, molar dişlerin hizasında yer alan damak mukoperiosteumunda 4 mm çapında punch biyopsi aleti kullanılarak sirküler, tam kalınlık eksizyonel yara alanları oluşturuldu. Cerrahi aşamalar Resim3.2’de görsel olarak sunulmuştur.

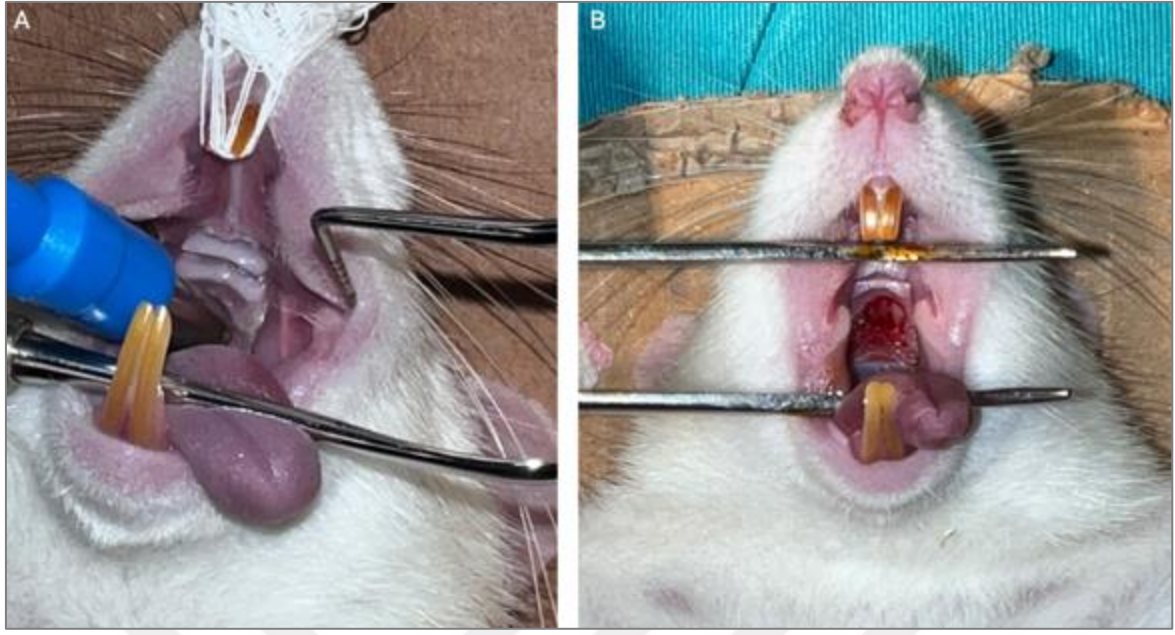
Eksize edilen doku periost elevatörü yardımıyla künt diseksiyon tekniği kullanılarak çıkarıldı (Resim 3.3 ve 3.4). Tüm deneklerde kanama kontrolü sağlandı, gerekli görülen olgularda, palatal bölgeye serum fizyolojik ile nemlendirilmiş steril spanç yerleştirilerek lokal bası uygulamasıyla desteklendi. Cerrahi sonrası yara alanı sütür uygulamadan ve herhangi bir kapatma işlemi yapılmaksızın sekonder iyileşmeye bırakıldı. Yaranın oluşturulduğu ilk gün, sıfırıncı gün olarak kayıt altına alındı. Astaksantin uygulamaları, "Astaksantin solüsyonlarının hazırlanması ve uygulama protokolü" başlığında detaylandırıldığı şekilde ilgili gruplara her gün, belirlenen yöntemle uygulandı (Resim 3.5).



Resim 3.2. Cerrahi operasyon öncesi hazırlık, A: Biyopsilerde kullanılan 4 mm çaplı steril punch aleti, B: Operasyon öncesi ratların supine pozisyona getirilmesi



Şekil 3.2. Yara alanının görsel ifadesi

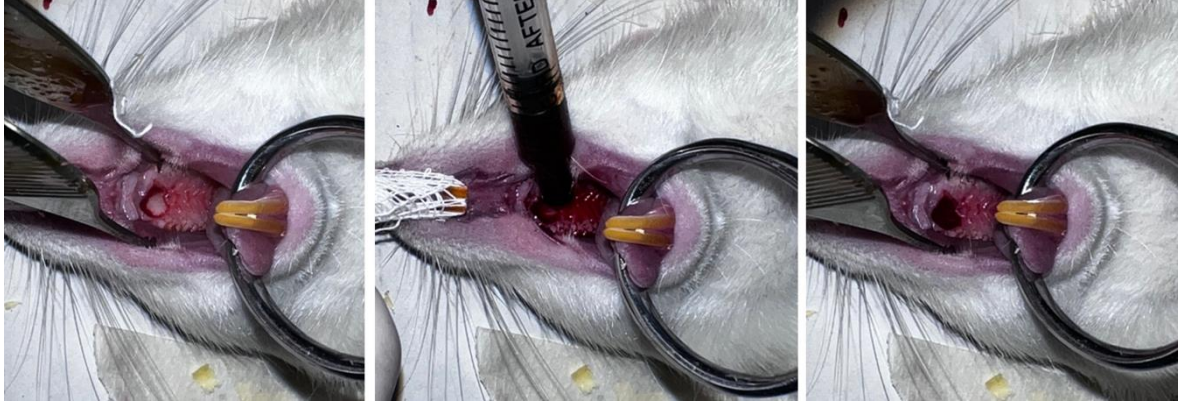


Resim 3.3. Tam kalınlık eksizyonel yara alanının oluşturulması

A: Palatal mukozada 4 mm'lik defekt oluşturulması, B: Oluşturulan yara dokusunun görüntüsü



Resim 3.4. Cerrahi olarak çıkarılan dokular



Resim 3.5. Hazırlanan çözeltinin oluşturulan yara yüzeyine topikal uygulaması

3.3.2. Sakrifikasyon

Çalışmanın 3., 5. ve 7. günlerinde, ilgili deney gruplarındaki ratlar derin anestezi altında (ketamin hidroklorür 90-150 mg/kg, ksilazin hidroklorür 7.5-16 mg/kg) intrakardiyak kan alımı yöntemiyle sakrifiye edildi. Çalışma süresince dışlama kriterlerinin uygulanmasını gerektiren durum oluşmadı; advers olay veya spontan mortalite gözlenmedi.

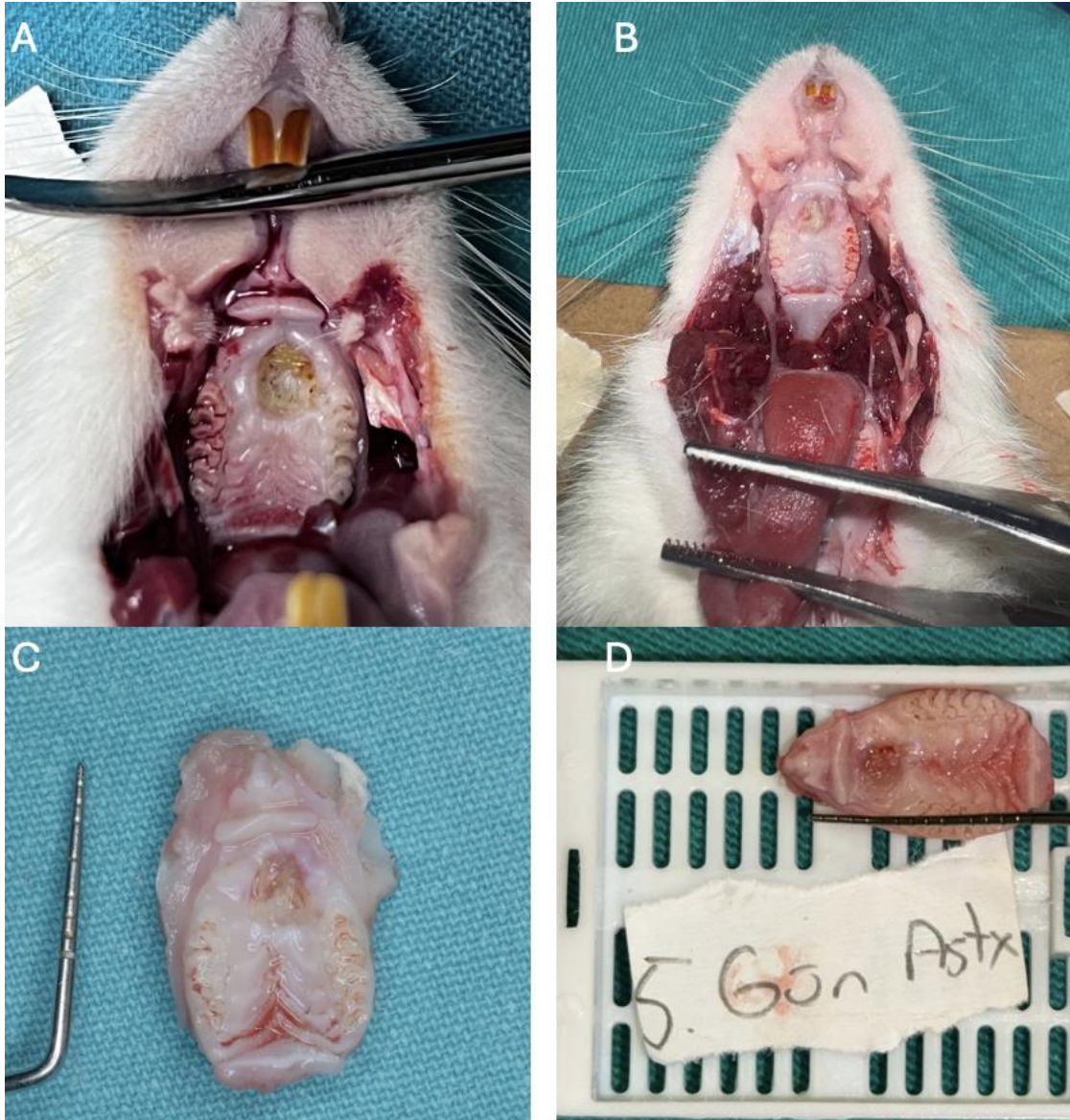
3.3.3. Biyopsi alınması

Sakrifikasyonun ardından, steril koşullar altında gerçekleştirilen biyopsi işlemi sırasında, dil ve yanak ekarte edildi; minimal travmatik yaklaşımla ratların maksilla bölgesi diseke edilerek ayrıldı. Yara alanının çevresindeki sağlıklı dokuları kapsayacak şekilde, palatinal kemik ve ilişkili yumuşak dokular tek parça halinde çıkarıldı. (Resim 3.6 ve Resim 3.7)

Elde edilen örnekler, histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlere uygun olarak %10'luk nötral tamponlanmış formaldehit solüsyonu içeren numune kaplarına, ilgili grup bilgisi ve etiket kod numaraları belirtilerek yerleştirildi. Tüm doku örnekleri analizler gerçekleştirilene kadar 20–22 °C sıcaklıkta muhafaza edildi, ardından değerlendirilmek üzere Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na teslim edildi.



Resim 3.6. Yara bölgelerinin gösterimi. A ve B: Biyopsi örnekleri alınmadan önce yara bölgelerinin gösterimi



Resim 3.7. Doku örneklerinin alınması

A ve B: Maksillanın çıkarılması için palatal bölgede insizyon hattının oluşturulması, C: Eksize edilen rat maksillası, D: Örneklerin doku kasetine yerleştirilmesi

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Gerekli örneklem büyüklüğünü belirlemek amacıyla ANOVA'ya dayalı güç analizini kullanılarak biyostatistiksel ön değerlendirme yapıldı. Çalışmada birincil çıktı, yara iyileşmesi süreci olarak tanımlanmış olup; bu süreç yara kapanma oranı ile epitelizasyon, granülasyon dokusu ve anjiyogenezin histopatolojik değerlendirmesine dayanmaktadır. İkincil çıktı, MMP-9 ve S100A4 proteinlerinin immünohistokimyasal ekspresyon düzeyleri ile kolajen birikimi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun histolojik incelemesini kapsamaktadır.

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin dağılım özellikleri Shapiro–Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin gruplar arası karşılaştırmaları için iki yönlü varyans analizi ve anlamlı fark saptanan durumlarda Bonferroni post-hoc testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler için gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal–Wallis testi ve ikili karşılaştırmalar yapıldı. Aynı grubun farklı zamanlardaki ölçümleri, normal dağılıma sahip verilerde eşleştirilmiş örneklem t-testi, normal dağılım göstermeyen verilerde Wilcoxon işaretli sıralar testi veya Friedman testi ile analiz edildi. Bulgular, dağılım özelliklerine göre ortalama $\pm$ standart sapma ya da medyan (minimum–maksimum) şeklinde sunuldu. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmada, tüm analizler farklı zaman aralıklarında, grup atamalarından habersiz tek bir gözlemci tarafından gerçekleştirildi ve elde edilen bulgular karşılaştırıldı. Değerlendirmeler arasındaki uyum düzeyi, istatistiksel güvenilirliği değerlendirmek amacıyla Cohen's Kappa testi ile analiz edildi. Elde edilen yüksek uyum oranı, değerlendirmelerin tutarlılığını doğruladı (>0.90).

3.5. Makroskopik Yara İyileşmesi Değerlendirilmesi

Yara bölgelerindeki iyileşme miktarını belirlemek amacıyla, sakrifikasyon günlerinde her deneğe ait yara bölgesi, dijital kamera NIKON D5100 (Nikon Corp., Tokyo, Japonya)

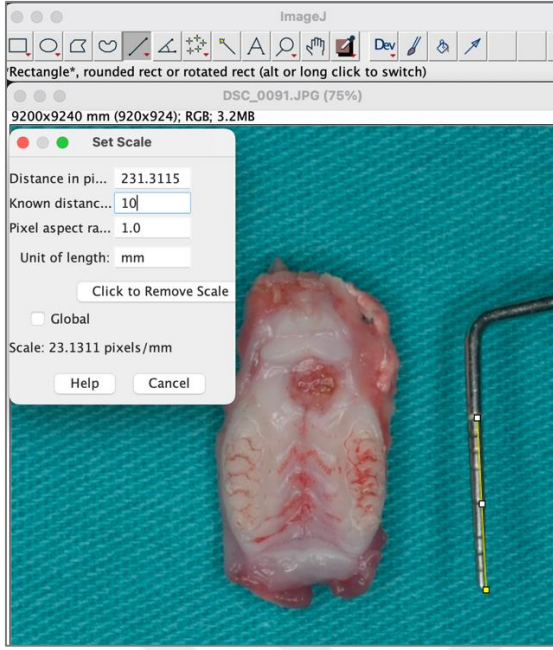
kullanılarak yara yüzeyine dik açıyla (90°) fotoğraflandı. Elde edilen dijital görüntüler, iyileşme sürecine bağlı olarak meydana gelen alan değişimlerinin değerlendirilmesi amacıyla ImageJ analiz programı (versiyon 1.54; Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA) ile analiz edildi. Kalibrasyon işlemi, 10 mm uzunluğundaki periodontal sond referans kabul edilerek gerçekleştirildi. ImageJ yazılımında referans uzunluğa karşılık gelen piksel sayısı ölçek ayarından hesaplandı ve piksel-boy oranı tanımlandı. Ölçekleme tamamlandıktan sonra, yara kenarındaki referans alana karşılık gelen piksel verileri ile yara alanı piksel sayısı karşılaştırılarak, yüzey alanı mm² cinsinden belirlendi [329-331]. Yara alanı ölçümlerinin doğruluğunu sağlamak amacıyla uygun kalibrasyon ayarları yapıldı. Ölçüm kriterleri doğrultusunda, her kesitteki epitelyal kenarlar yara sınırı olarak kabul edildi ve bu sınırlar baz alınarak yara alanı hesaplandı (Resim 3.8 ve Resim 3.9). Yara büzülmesi, önceki çalışmalarda tanımlandığı şekilde, standardize edilmiş fotografik dokümantasyona dayanarak palatal bölgede ölçüldü. Yara yüzey ölçümleri kaydedildikten sonra, iyileşme yüzdesi Walker formülü kullanılarak hesaplandı [329].

Walker Formülü:

$$\% \text{ Yara Alanı} = (X \text{ Gündeki Yara Alanı} : \text{İlk Gün Ölçülen Yara Alanı}) \times 10$$

$$\text{Yara İyileşme Oranı} = 100 - \% \text{ Yara Alanı}$$

Tüm klinik ölçümler, standart bir protokol çerçevesinde kalibre edilen tek bir araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. Araştırmacı, kabul edilebilir düzeyde tekrar üretilebilirliği sağlamak üzere %90 uyum seviyesine ulaşana kadar eğitilerek 0.90'dan yüksek sınıf içi korelasyon katsayısı ile doğrulandı. Araştırmacının tutarlılığı, iki farklı zamanda referans fotoğraflar kullanılarak yapılan ölçümlerin tekrarlanmasıyla değerlendirildi [332].



Resim 3.8. Fotoğrafların ImageJ programında perodontal sonda göre ölçeklendirilmesi



Resim 3.9. Yara kenarları işaretlenerek yara alanının ölçülmesi

3.5.1. Histopatolojik değerlendirme

Deparafinizasyon için 60°C'lik etüvde bekletilen parafin bloktan elde edilen doku kesitleri 2x10 dakika süreyle iki farklı ksilen serisinde bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirildi. Azalan alkol serilerinden sırasıyla; %100 alkolde 10 dakika, %96'lık alkolde 5 dakika, %90'lık alkolde 5 dakika, %70'lik alkolde 2 dakika ve %50'lik alkolde 2 dakika bekletilerek distile suya kadar getirildi. Doku kesitleri Bio Optica Masson's Trikrom 04-010802(lot/cat# 23180) hazır kit prosedürüne uygun olarak boyandı. Boyama işlemi

sırasında kesitlere sırasıyla; 6 damla A solüsyonu ve ardından 6 damla B solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildi. Kesitler, distile su ile hızlıca 3-4 saniye yıkandıktan sonra üzerine 10 damla D solüsyonu damlatılıp 4 dakika bekletildi. Kesitler distile su içerisinde yıkanarak üzerine 10 damla E solüsyonunda damlatılıp 10 dakika bekletildi. Son olarak yıkama yapılmadan 10 damla F solüsyonu damlatılarak 5 dakika bekletildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra kesitler yıkanarak artan alkol serilerinden geçirildi ve %100'lük absolü alkolde 1 dakika süreyle tutuldu. Doku kesitleri parlatma ve temizleme işlemleri için 2x10 dakika boyunca ksilol serilerinde tutulduktan sonra, boyanmış doku kesitlerinin üzerine Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı ve oda sıcaklığında kurutularak mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi. Yara bölgesindeki yara ağzı açıklığı, ImageJ analiz yazılımı kullanılarak en düşük büyütmede (x10) mikrometre cinsinden ölçüldü. İnflamasyon düzeyi, fibrozis, fibroblast olgunlaşma derecesi, anjiyogenez ve epidermal rejenerasyon düzeyleri, histolojik analizler sonucunda semi-kantitatif bir yöntemle değerlendirildi [178,333] (Çizelge 3.2).

Tüm histolojik değerlendirmeler körleme yöntemiyle tek bir araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. Anjiyogenez, hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerde, endotel tabakasının belirgin olduğu ve lümeninde eritrosit bulunan damarlar tanımlanarak semi-kantitatif olarak değerlendirildi [334]. Fibrozis değerlendirmesi, Massons's trikrom boyaması ile değerlendirildi. Bu yöntemi kolajen birikimini mavi renkle görselleştirerek, fibrotik ve fibrotik olmayan bölgelerin ayrımını sağlamakta ve doku yeniden şekillenmesinin kapsamı ile dağılımı hakkında bilgi vermektedir [335]. İnflamatuar hücre infiltrasyonu; yara çevresindeki bağ dokusunda yer alan mononükleer ve polimorfonükleer hücrelerin varlığı, dağılımı ve yoğunluğu temel alınarak hematoksilen-eozin boyası ile boyanmış kesitler ışık mikroskobu altında incelenmesiyle değerlendirildi. Tüm parametreler, standardize edilmiş bir puanlama sistemi kullanılarak semi-kantitatif olarak puanlandı [336].

Çizelge 3.2. Semi-kantitatif değerlendirme için histolojik skorlamalar [336]

	ANJİYOGENEZİS	İNFLAMASYON	FİBROZİS MİKTARI VE FİBROBLAST OLGUNLAŞMA DÜZEYLERİ	EPİDERMAL REJENERASYON
0	Yok			
1	Hafif (1 yüksek büyütme alanında 5 damardan az)	Çok hafif (3 yüksek büyütme alanında 0-25 hücre)	Hafif	Çok az epidermal organizasyon (dokunun %20'sinden fazlası)
2	Orta (1 yüksek büyütme alanında 6- 10 damar)	Hafif (3 yüksek büyütme alanında 25-50 hücre)	Orta	Az epidermal organizasyon (dokunun % 40'ından fazlası)
3	Belirgin (1 yüksek büyütme alanında 10 damardan fazla)	Orta (3 yüksek büyütme alanında 50-75 hücre) Belirgin	Belirgin	Orta epidermal proliferasyon (dokunun % 60'ından fazlası),
4		Şiddetli (3 yüksek büyütme alanında 75-100 hücre)		Tam epidermal yeniden şekillenme (remodeling) (dokunun %80'inden fazlası)

3.5.2. İmmünohistokimyasal değerlendirme

Doku kesitlerinde, hücre ve doku lokalizasyonunu göstermek amacı ile işaretlenmiş MMP-9 (E-AB-70059, Elabscience, USA) (1:500) ve S100A4 (E-AB-40459, Elabscience, USA) (1:200) antikorları kullanılarak Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama işlemi uygulandı.

Toplanan doku örnekleri, fiksasyon işlemi için %10 nötral tamponlanmış formalin solüsyonu içinde 48 saat boyunca bekletildi. Takiben yaklaşık 10–15 gün süreyle EDTA içeren dekalsifikasyon solüsyonunda yumuşayana dek bekletilen örnekler kalsiyumdan arındırıldı. Bu sürecin tamamlanmasını takiben, rutin doku takip işlemleri gerçekleştirilerek parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı. Alınan kesitler etüvde 58°C de 2 saat deparafinize edildikten sonra antijenik epitopların açığa çıkarılabilmesi amacıyla mikrodalga fırının orta güç ayarında 3x5 dk sitrat tamponu ile antijen geri kazandırma işlemi yapılarak oda ısısında soğutuldu. Fosfat tamponu ile 3x5 dk yıkanan kesitler, dokularda bulunan endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3'lük hidrojen peroksit çözeltisinde (O2Q46013, Thermo Scientific, USA) 15 dk inkübe edildi.

Fosfat tamponu ile 3x5 dk yıkanan kesitler, boyama haznesine dizildikten sonra, özgün olmayan bağlanmayı engellemek ve istenmeyen zemin boyanmasını önlemek üzere 5 dk

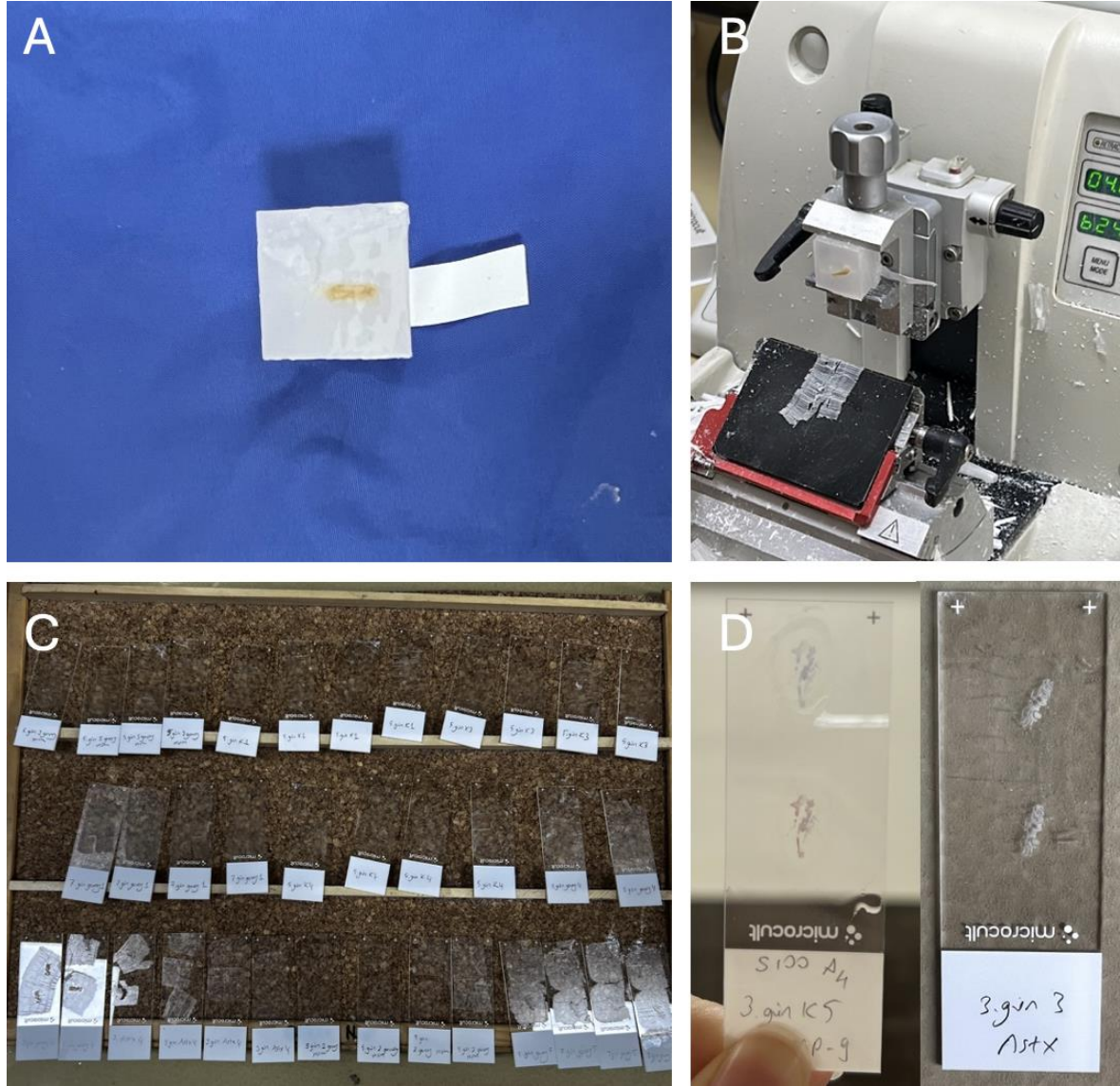
süreyle UV blokta (PHLV144, Thermo Scientific, USA) bekletildi. UV bloktan sonra yıkama yapılmadan uygun dilüsyon oranlarında hazırlanan primer antikor damlatıldı ve kesitler +4 °C’ de 1 gece bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda, kesitler 4 kez fosfat tamponu ile yıkandı, ardından fazla sıvı uzaklaştırıldı ve sekonder antikor (PHLV144, Thermo Scientific, USA) damlatılarak 10 dk süreyle beklendi. Sekonder antikor uygulamasını takiben, kesitler yeniden 4 kere fosfat tamponu ile yıkandı ve kurulandıktan sonra streptavidin-peroksidazda (PHLV144, Thermo scientific, USA) 10 dk bekletildi. Kesitler 4 kere fosfat tamponu ile yıkama işleminin ardından fazla sıvılar kurulandı ve AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) (HDX69417, Thermo Scientific, USA) kromojen damlatılarak mikroskop altında antiijen-antikor reaksiyonu renkli görsel olarak oluşana kadar takip edildi. Reaksiyon oluşturan kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Nukleus yapıların görünür hale getirmek için 10 sn Harris hematoksilin; bağ doku hücrelerini ve ilişkili olarak dokuda fibrozisi değerlendirmek için Masson’s trikrom ile boyama yapıldı. Distile sudan geçirilen kesitler dehidratasyon işlemi için sırasıyla 2x5 dk %96 alkol, 2x5 dk %100 alkol, ardından 30 dk ksilolde bekletildikten sonra mounting medium (Sigma-Aldrich, US) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal incelemeler kapsamında, parafin bloklardan elde edilen 4-5 µm kalınlığındaki doku kesitlerine MMP-9 ve S100A4 primer antikorları uygulandı (Resim 3.10). Her bir kesitten rastgele seçilen beş farklı alanda, x10 ve x20 büyütmede, kamera ataçmanlı Leica Qwin LAS9 programı yardımıyla mikroskopik görüntüler alınarak dijital ortama aktarıldı ve boyanma yoğunlukları değerlendirildi.

MMP-9 ve S100A4 ekspresyon düzeyleri, boyanma şiddeti ile pozitif boyanmış hücre oranını birleştiren semi-kantitatif bir yöntem olan H-skoru yöntemi kullanılarak, seçilen yüksek büyütme alanlarında değerlendirildi. H-skoru ile hesaplanan boyama şiddeti; 0 = yok, 1 = zayıf, 2 = orta, 3 = güçlü olacak şekilde skorlandı ve pozitif boyanmış hücre yüzdesi ile birlikte değerlendirildi [337-339]. H-skoru, aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{H-skoru} = [1 \times (\% \text{ zayıf boyanma gösteren hücre})] + [2 \times (\% \text{ orta şiddette boyanma gösteren hücre})] + [3 \times (\% \text{ güçlü boyanma gösteren hücre})]$$

Bu yöntemle elde edilen skor 0-300 aralığında olup, gruplar arası karşılaştırmada kullanıldı [340]. Boyanma yoğunluğunun objektif biçimde değerlendirilmesi amacıyla, Leica Qwin LAS9 yazılımı ile her hücrenin boyanma yoğunluğu ölçüldü.



Resim 3.10. Doku örneklerinin analize hazır hale getirilmesi, A: Doku örneklerinin parafin bloklara gömülmesi, B: Parafin bloklardan doku kesitlerinin elde edilmesi, C: Örneklerin lamel üzerine alınması, D: Örneklerin çeşitli solüsyonlardan geçirilerek immünohistokimyasal incelemeye hazır hale getirilmesi

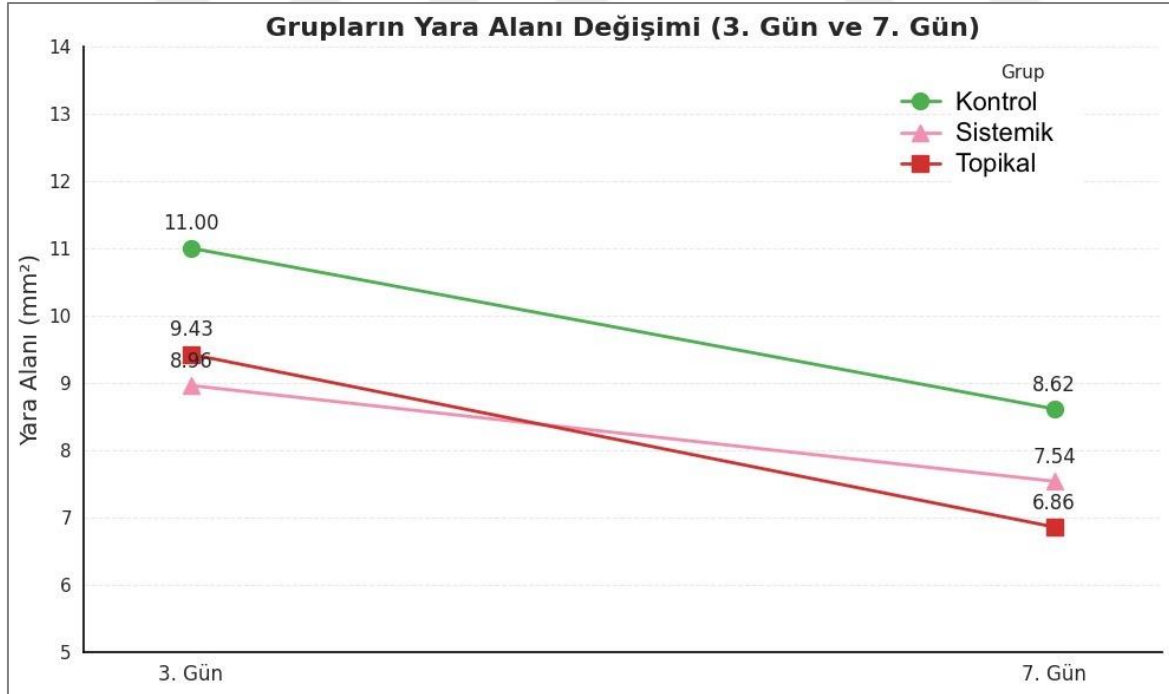


4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Yara alanı boyutları postoperatif 3., 5. ve 7. günlerde yapılan gözlemler doğrultusunda değerlendirildiğinde, tüm gruplarda zamanla belirgin bir iyileşme eğilimi izlendi. En geniş yara alanları postoperatif 3. günde ölçülürken, en küçük alanlar ise 7. günde kaydedildi (Şekil 4.1). 7. gün sonunda en düşük yara alanı TA grubunda, ardından SA grubunda ve en yüksek kontrol grubunda tespit edildi.

- Kontrol grubunda 3. gün 11.00 mm² olan ortalama yara alanı, 5. gün 10.27 mm², 7. gün sonunda 8.62 mm² olarak ölçüldü.
- SA grubunda yara alanı 3. günde ortalama 8.96 mm², 5. günde 8.24 mm² ve 7. günde 7.54 mm² olarak ölçüldü.
- TA uygulanan grubunda 3. gün ölçümü 9.43 mm² iken, bu değer 5. günde 7.35 mm² ve 7. günde 6.86 mm² olarak ölçüldü.



Şekil 4.1. Yara alanı değişiminin 3. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması

Yara iyileşmesi sürecine ait makroskopik ölçümler üzerinden yapılan iki yönlü ANOVA, uygulama yöntemi (kontrol, SA, TA) ve zamanın (3., 5. ve 7. gün) yara alanı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğunu gösterdi (Çizelge 4.2) .

İki yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları

- Grup Etkisi: İstatistiksel olarak anlamlı ($F=4.22$, $p=0.0225$)
- Gün Etkisi: İstatistiksel olarak anlamlı ($F=3.97$, $p=0.0277$)
- Grup×Gün Etkileşimi: İstatistiksel olarak anlamlı değil ($F=0.29$, $p=0.8844$)

Gruplar arası günlük karşılaştırmalarda, 3., 5. ve 7. günlerde gruplar arası fark anlamlı bulunmadı. Astaksantin ile tedavi edilen gruplarda, kontrol grubuna kıyasla daha hızlı bir iyileşme sağlandığı görüldü. (Çizelge 4.1: Yara alanı (mm^2))

Her günde gruplar arası karşılaştırma

- 3. gün: Gruplar arasında anlamlı farklılık yok ($p=0.2051$)
- 5. gün: Gruplar arasında anlamlı farklılık yok ($p=0.1729$)
- 7. gün: Gruplar arasında anlamlı farklılık yok ($p=0.4312$)

Zamana bağlı grup içi analizler sonucunda, sadece topikal uygulama grubunda günler arası istatistiksel olarak anlamlı iyileşme saptandı ($p=0.0293$). (Çizelge 4.1 : Zamana göre grup içi farklılıklar)

Her grupta günler arası karşılaştırma

- Kontrol: Günler arasında anlamlı farklılık yok ($p=0.4190$)
- SA: Günler arasında anlamlı farklılık yok ($p=0.4285$)
- TA: Günler arasında anlamlı farklılık var ($p=0.0293$)

Zamana bağlı grup içi analizler sonucunda, sadece topikal uygulama grubunda günler arası istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme saptandı ($p=0.0293$). (Çizelge 4.1 : Zamana göre grup içi farklılıklar)

Çizelge 4.1. Grupların yara alanı ölçümlerinin dağılımı ve sonuçları

Yara Alanı (mm ²)	Kontrol	Sistemik Astaksantin	Topikal Astaksantin	F (p)
3. gün				
Ortalama $\pm$ SS	11.00 $\pm$ 1.91 ^a	8.96 $\pm$ 1.75 ^{ab}	9.43 $\pm$ 0.92 ^{ab}	1.813 (0.205)
Minimum	9.12	5.95	8.23	
Maksimum	13.84	11.00	10.80	
5. gün				
Ortalama $\pm$ SS	10.27 $\pm$ 2.96 ^a	8.49 $\pm$ 1.67 ^{ab}	7.35 $\pm$ 1.10 ^b	2.038 (0.173)
Minimum	7.08	6.79	5.77	
Maksimum	14.93	10.77	8.94	
7. gün				
Ortalama $\pm$ SS	8.62 $\pm$ 2.60 ^a	7.54 $\pm$ 1.02 ^a	6.86 $\pm$ 1.61 ^a	0.903 (0.431)
Minimum	3.97	6.12	4.94	
Maksimum	12.02	8.43	9.20	

İyileşme Yüzdesi (%)

	Kontrol	Sistemik Astaksantin	Topikal Astaksantin	F (p)
3. gün				
Ortalama $\pm$ SS	12.44 $\pm$ 15.19 ^a	28.67 $\pm$ 13.96 ^b	24.98 $\pm$ 7.31 ^{ab}	2.013 (0.175)
5. gün				
Ortalama $\pm$ SS	18.30 $\pm$ 23.53 ^a	32.40 $\pm$ 13.30 ^{ab}	41.54 $\pm$ 8.75 ^b	2.417 (0.131)
7. gün				
Ortalama $\pm$ SS	31.43 $\pm$ 20.69 ^a	39.98 $\pm$ 8.14 ^a	45.39 $\pm$ 12.78 ^a	1.105 (0.359)

Zamana Göre Grup İçi Farklılıklar

	F değeri	p değeri
Kontrol	0.936	0.419
Sistemik Astaksantin	0.910	0.429
Topikal Astaksantin	4.808	0.029*

*p<0.05 istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir, Aynı satırdaki üst simgeler (^a, ^b, ^{ab}) gruplar arası farklılıkları belirtmektedir, SS: Standart Sapma, Ort.: Ortalama, F: ANOVA test istatistiği

Postoperatif 3., 5. ve 7. günlerde yapılan makroskopik değerlendirmelerde; yara alanı, iyileşme yüzdesi ve iyileşme hızı parametreleri dikkate alınarak yapılan analizler sonucunda, 5. günde yara alanı ve iyileşme yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi (p<0.05). Analiz sonucuna göre bu farklılığın topikal gruptan kaynaklandığı saptandı.

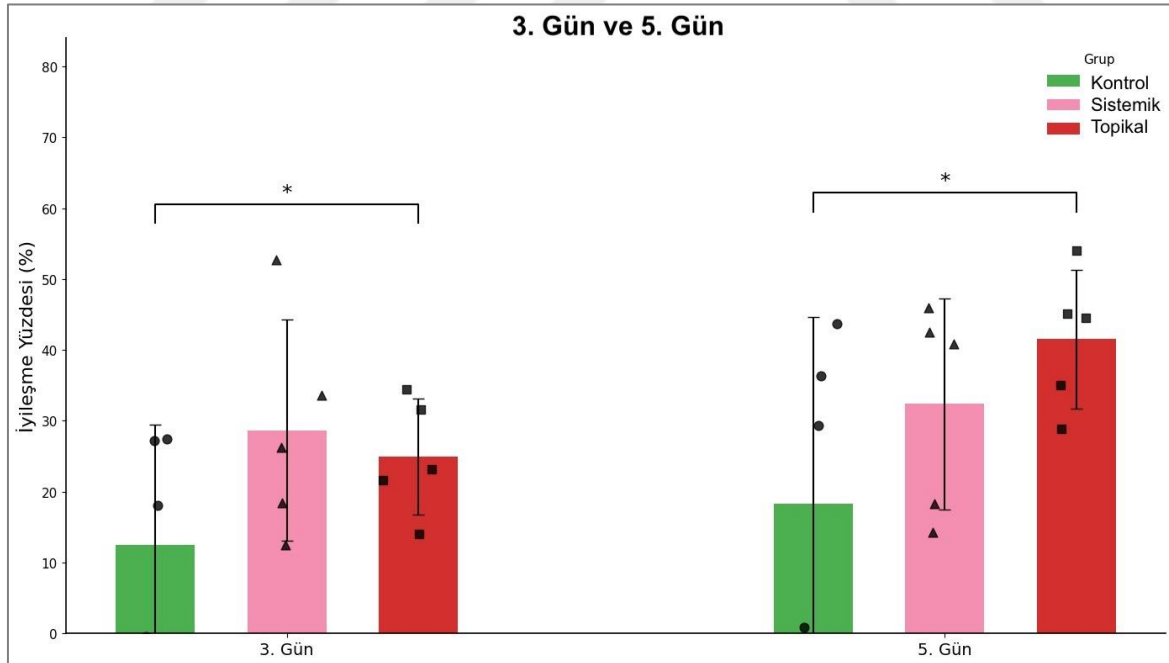
Walker formülüne göre iyileşme yüzdeleri

Tüm gruplarda zamanla iyileşme gözlenmesiyle birlikte iyileşme yüzdesi açısından en yüksek değer TA grubunda kaydedilmiş olup, 7. gün sonundaki yara alanı başlangıça oranla %45.39 azaldı. SA grubunda bu oran %39.98, kontrol grubunda %31.43 olarak hesaplandı (Şekil 4.6, Çizelge 4.1 : İyileşme yüzdesi (%)).

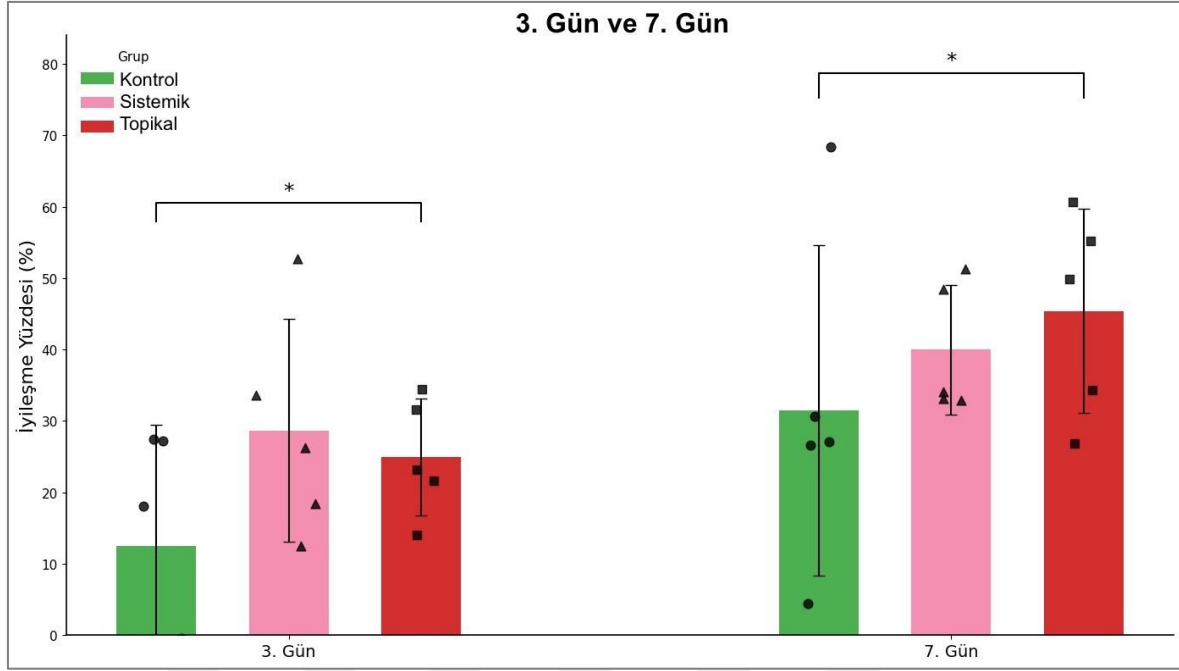
İyileşme hızları

- 3-5. günler arasında: En hızlı iyileşme TA grubunda ölçüldü ($1.04 \text{ mm}^2/\text{gün}$).
- 5-7. günler arasında: En hızlı iyileşme Kontrol grubunda ölçüldü ($0.83 \text{ mm}^2/\text{gün}$).
- Ortalama (3-7. günler): En yüksek ortalama iyileşme hızı TA grubunda ölçüldü ($0.64 \text{ mm}^2/\text{gün}$)

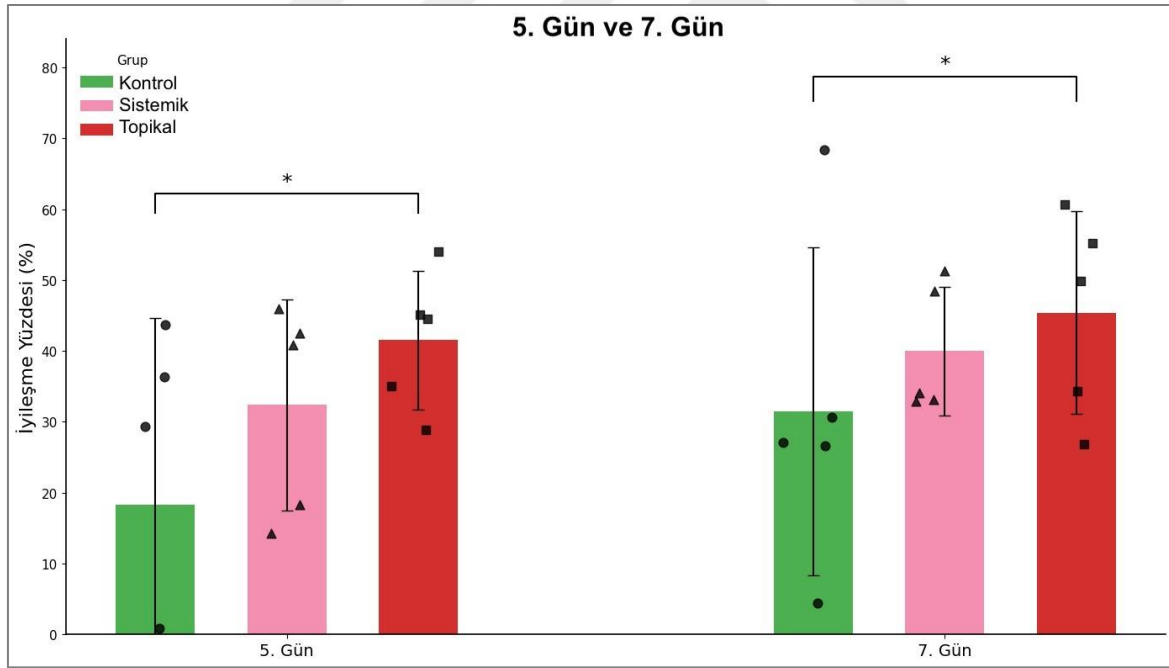
İyileşme hızı açısından yapılan değerlendirmede, Yara alanı ölçümlerine göre tüm gruplarda 3. ile 7. gün arasında anlamlı bir azalma gözlemlendi (her grup için $p < 0.001$). Bu azalma en belirgin topikal grupta gözlemlendi (Şekil 4.3) ve 3-5. günler arasında TA grubunda en yüksek iyileşme hızı olan $1.04 \text{ mm}^2/\text{gün}$ değeri kaydedildi (Şekil 4.2). Bu iyileşme hızı, 5–7. günler arasında 0.24 mm^2 olarak ölçüldü (Şekil 4.4). Sistemik grupta iyileşme hızları $0.36 \text{ mm}^2/\text{gün}$ (3-5. gün) ve $0.35 \text{ mm}^2/\text{gün}$ (5-7. gün) olarak hesaplanırken, kontrol grubunda bu değerler $0.05 \text{ mm}^2/\text{gün}$ (3-5. gün) ve $0.83 \text{ mm}^2/\text{gün}$ (5-7. gün) olarak belirlendi. Topikal grubun 3–7. günler arasında en yüksek günlük iyileşme hızına sahip olduğu tespit edildi ($0.64 \text{ mm}^2/\text{gün}$). (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5)



Şekil 4.2. Yara iyileşmesi yüzdesinin 3. ve 5. günlerde gruplar arası karşılaştırılması

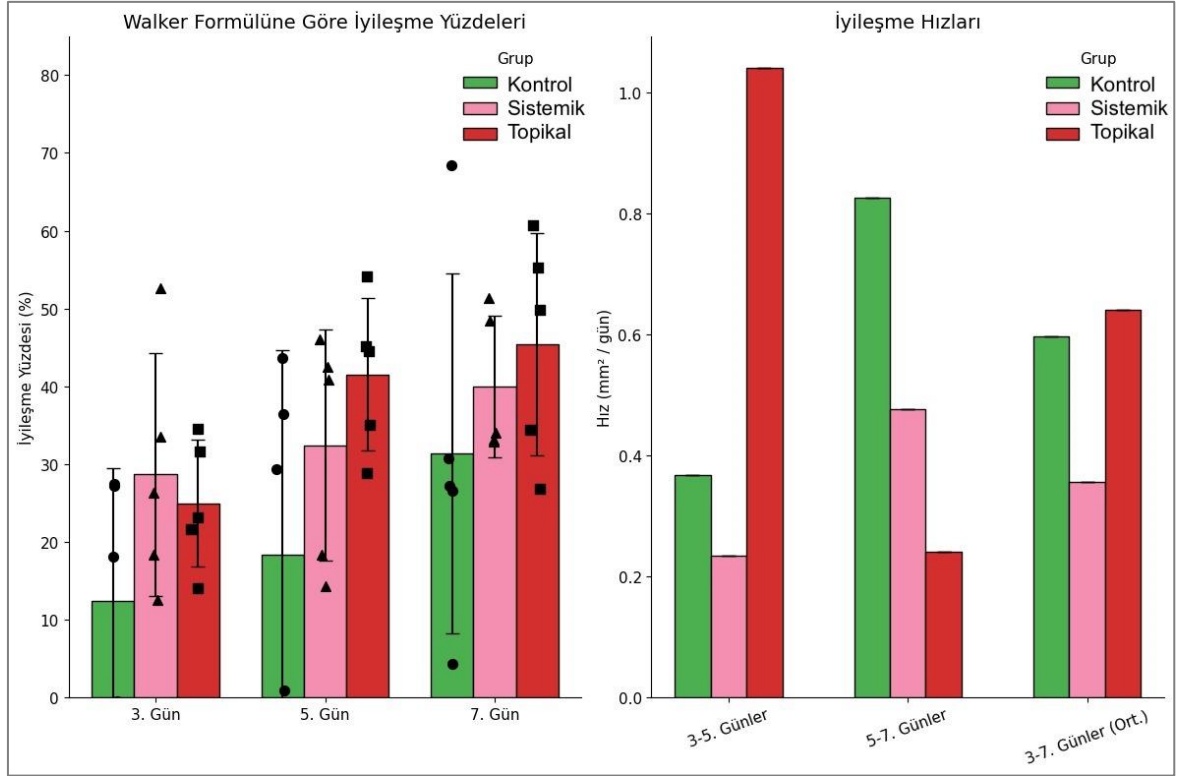


Şekil 4.3. Yara iyileşmesi yüzdesinin 3. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması

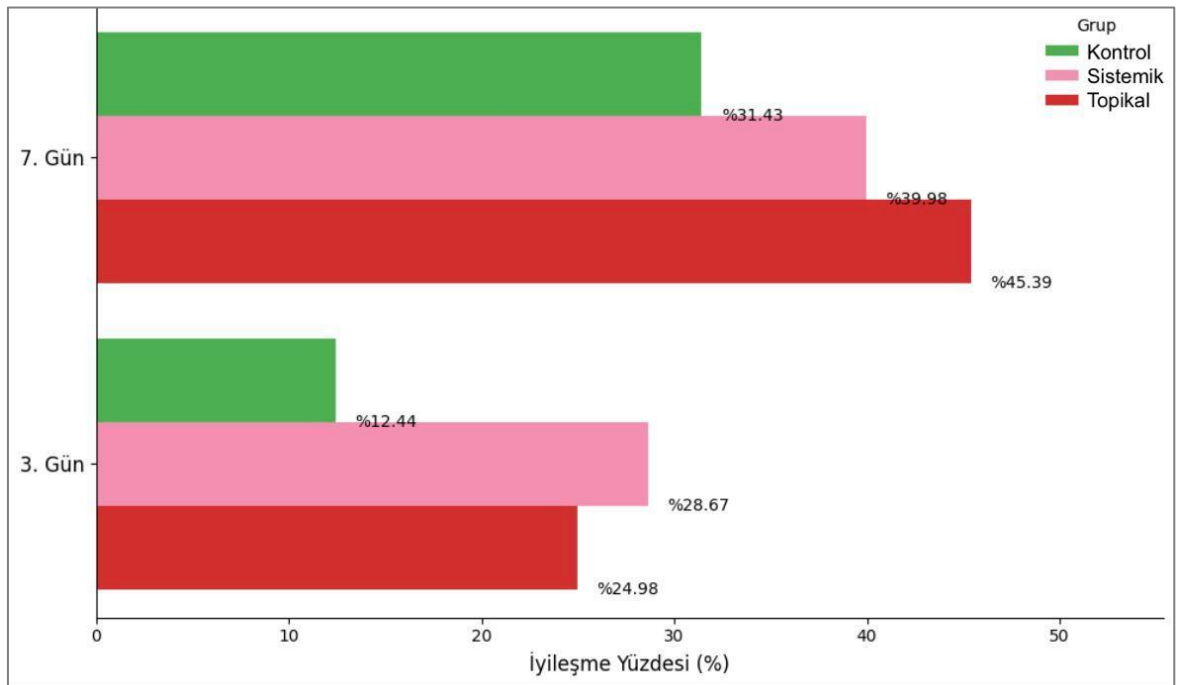


Şekil 4.4. Yara iyileşmesi yüzdesinin 5. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması

Postoperatif 3., 5. ve 7. günlerde yapılan incelemede yara alanı, iyileşme yüzdesi ve iyileşme hızı değerlerine bakıldığında; 5. günde yara alanı ve iyileşme yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.5. Yara iyileşmesi yüzdesinin ve iyileşme hızlarının gruplar arası ve grup içi karşılaştırılması



Şekil 4.6. Yara iyileşmesi yüzdesinin 3. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırılması

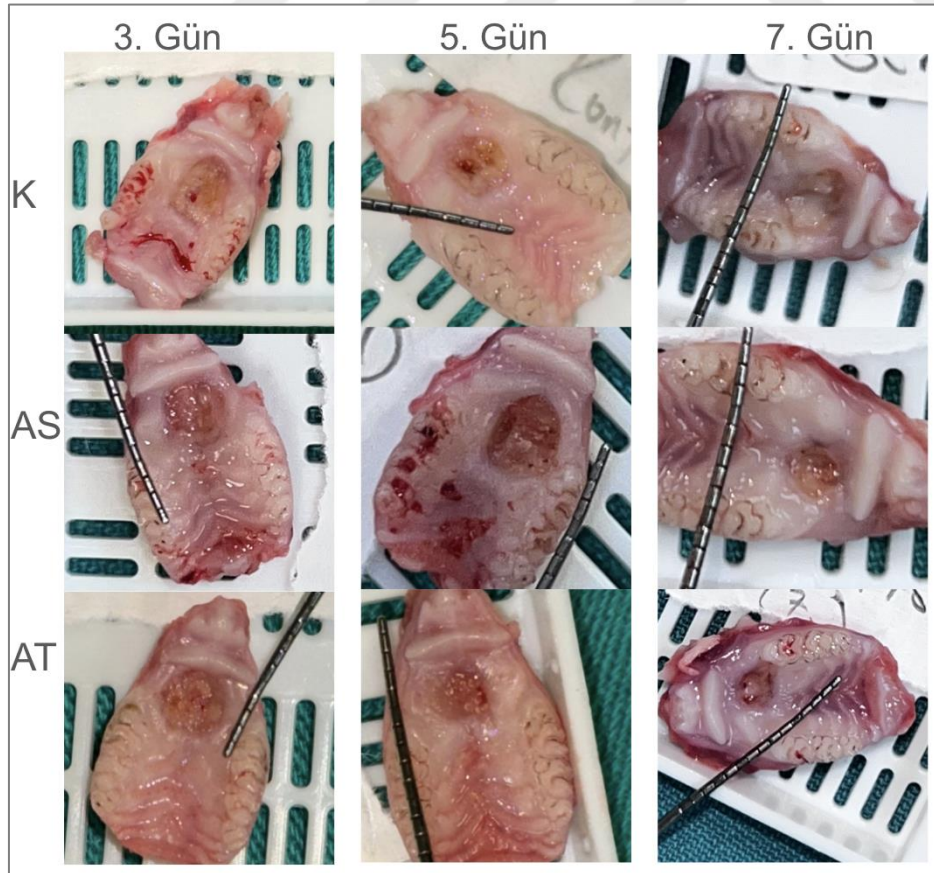
Çizelge 4.2. Grupların iyileşme hızı sonuçları

Vasyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	F değeri	P Değeri
Grup	36.00	2	4.22	0.023*
Gün	33.85	2	3.97	0.028*
Grup x Gün	4.90	4	0.29	0.884
Hata	153.49	36	-	-

İyileşme Hızları (mm ² /gün)	Grup		
Dönem	Kontrol	Sistemik Astaksantin	Topikal Astaksantin
3-5. günler	0.37	0.23	1.04
5-7. günler	0.83	0.48	0.24
3-7. günler (Ort.)	0.60	0.36	0.64

*p<0.05, istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir, F: ANOVA test istatistiği, f: F test istatistiği (ANOVA)

Tüm gruplara ait yara alanı ölçümlerinin 3., 5. ve 7. günlerdeki karşılaştırmaları sonucunda, sadece TA grubunda zamanla anlamlı bir iyileşme olduğu gözlemlendi (p=0.029). İki yönlü ANOVA analizin sonuçlarına göre, tedavi grubunun (p=0.023) ve ölçüm zamanının (p=0.028) yara iyileşmesi üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğu tespit edildi (Çizelge 4.2).



Şekil 4.7. Zamana ve tedavi grubuna göre makroskopik yara görüntüleri

Yara ağzı

Yara ağzı ölçümlerine ilişkin grup içi karşılaştırmalarda tüm gruplarda 3. günden 7. güne kadar yara alanı ölçüm değerlerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.001$). Gruplar arası karşılaştırmada 3. günde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($F=0.800$, $p=0.479$), 7. gün verileri için yapılan Bonferroni düzeltmesi ile yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, sistemik astaksantin grubunun yara alanı ölçümlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük olduğu tespit edildi ($F=15.200$, $p<0.05$). TA grup değerlerinin bu karşılaştırmada anlamlı bir fark oluşturup oluşturmadığına ilişkin bilgi Çizelge 4.3'te verilmemiştir. Topikal gruptaki t-istatistiğinin tüm deneklerde “-sonsuz” olarak hesaplanmasının sebebi, 3. ve 7. günlerdeki yara ağzı açıklığı ölçümleri arasındaki farkın tüm örneklerde aynı olup (tüm deneklerde fark 38), sabit kalmasından kaynaklanmaktadır. Bu durum, varyasyonun olmadığı göstermekte, dolayısıyla standart sapmanın sıfır olmasından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.3. Yara ağız açıklığının 3. ve 7. gün gruplara göre karşılaştırılması

	3. Gün Ort. $\pm$ S.s.	7. Gün Ort. $\pm$ S.s.	Test istatistiği (p)
Kontrol¹	26.50 $\pm$ 1.29	68.50 $\pm$ 1.29	$t=-32.53$ (0.000*)
Sistemik Astaksantin²	26.50 $\pm$ 1.29	63.50 $\pm$ 1.29	$t=-34.26$ (0.000*)
Topikal Astaksantin³	27.50 $\pm$ 1.29	65.50 $\pm$ 1.29	$t=-inf$ (0.000*)
Test istatistiği (p)	$F=0.800$ (0.479)	$F=15.20$ (0.001*)	
Bonferroni	—	$2<1$	

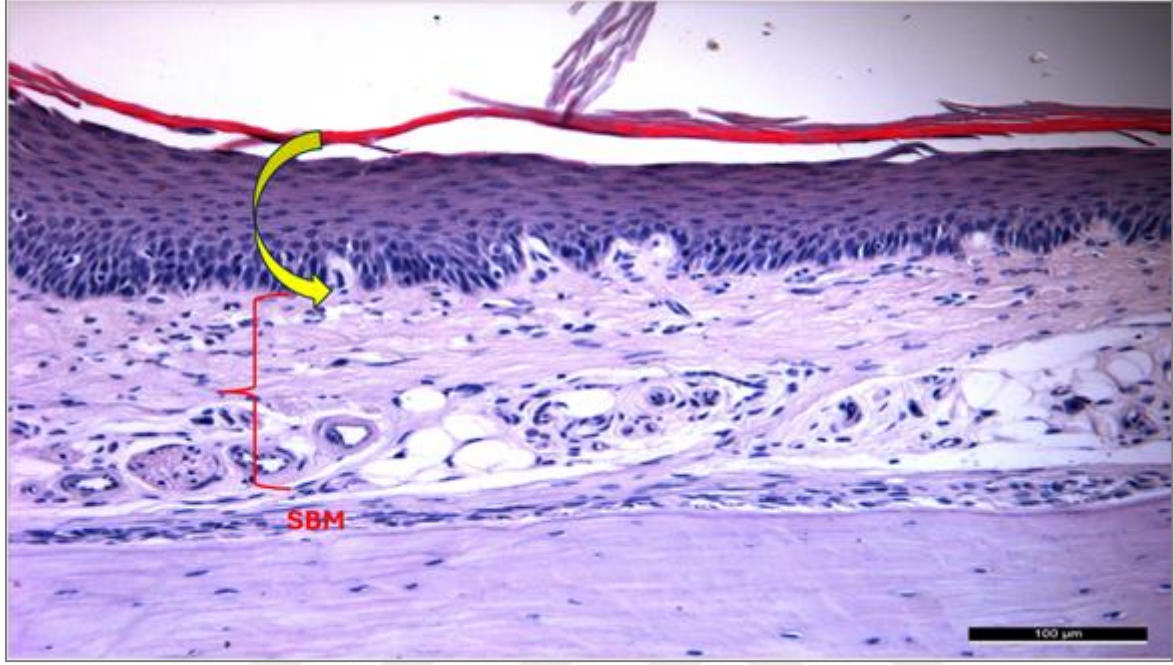
$p<0.05$, t: Bağımlı örneklem t testi, F: Varyans analizi ANOVA testi. Bonferroni satırında sayılar arasındaki "<" ibaresi istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ($p<0.05$).

4.2. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik değerlendirmeler, rat palatal mukozasında sekonder yara iyileşmesi üzerine astaksantin sistematik ve topikal uygulanmasının 3., 5. ve 7. günlerdeki etkileri hematoksil-eozin boyaması ile ışık mikroskopu altında gerçekleştirildi. Gruplar arasında inflamasyon, fibrozis, fibroblast olgunlaşması, anjiyogenez ve epidermal rejenerasyon düzeyleri karşılaştırılarak değerlendirildi.

Herhangi bir yara oluşturulmadan negatif kontrol olarak değerlendirilen hematoksil-eozin boyalı kesitlerde; yumuşak damağın normal histolojik yapısı ile uyumlu olarak, en üstte keratinizasyon gösteren çok katlı yassı epitel ile çevrili bir yüzeyin bulunduğu, epitelin

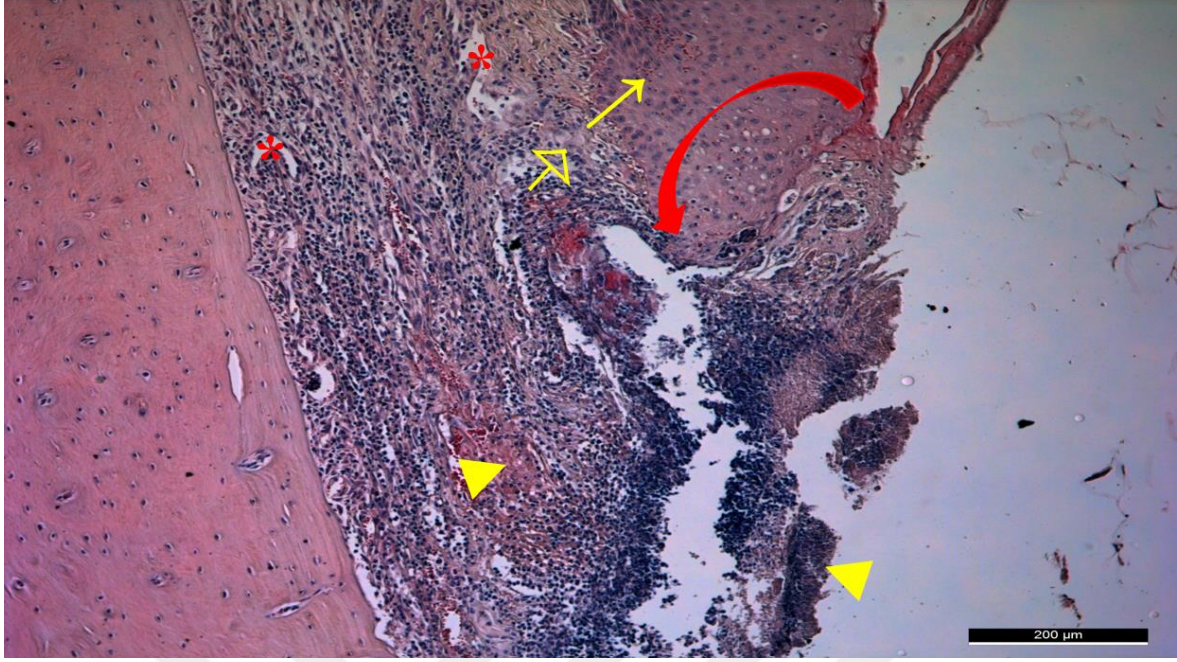
hemen altında lamina propria tabakasının yer aldığı ve bu tabakanın altında periosteum ile devamlılık gösteren submukoza yapısının ayırt edilebildiği gözlemlendi (Resim 4.1).



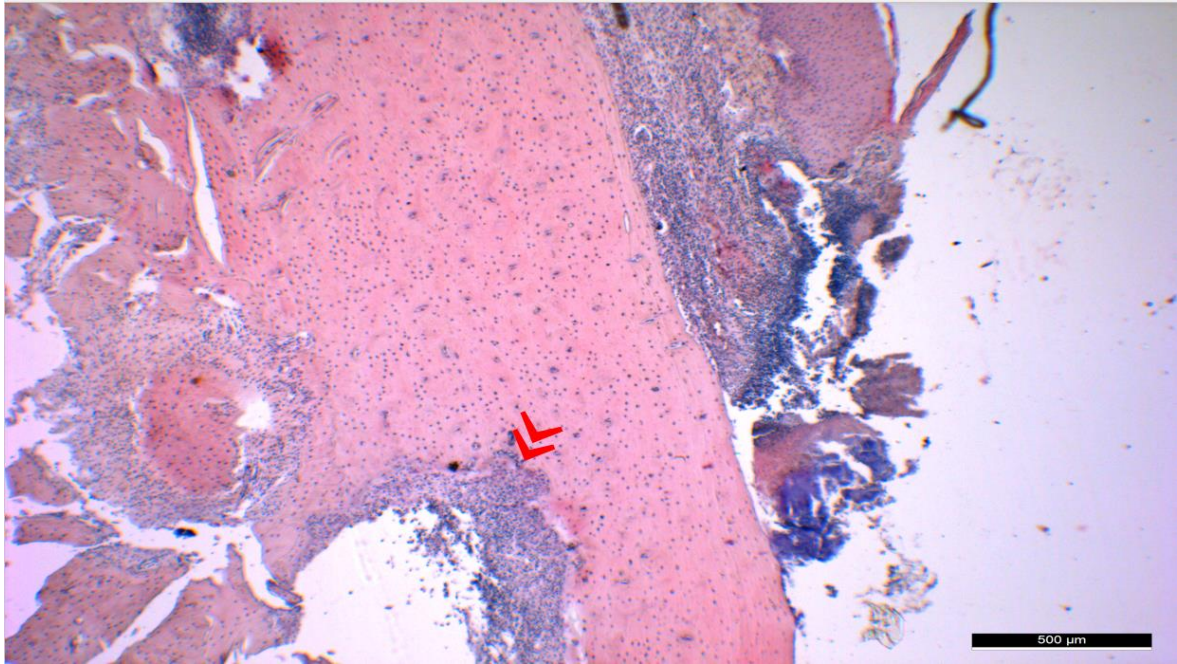
Resim 4.1. Negatif kontrol (Hematoksilen Eozin, x20). Epitel ;(↓), {; lamina propria, submukoza; BM. 20x büyütme

4.2.1. Kontrol grubu

3. gün kontrol grubunda yara iyileşmesinin değerlendirildiği deneklerde, inflamatuvar evreyi yasayan bulgular saptandı. Epitel hücrelerinin arasında eritrositlerin var olduğu, epitelin çok katlı yassı epitel yapısının yara ağzında bozulduğu ve tabakalarının ayırt edilemediği, yara bölgesinde şiddetli bir inflamatuvar reaksiyonun olduğu görüldü. Bağ dokuda deorganizasyon ve yüzeye yakın bölgelerde ödem ile bazı damarlarda vasküler dilatasyonun varlığı izlenirken, lamina propria tabakasında yoğun bağ doku hücresi infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 4.2). x10 büyütme ile incelemelerde, kemik dokuda inflamatuvar evreye işaret eden bağ doku hücresi infiltrasyonunun mevcut olduğu gözlemlendi (Resim 4.3).



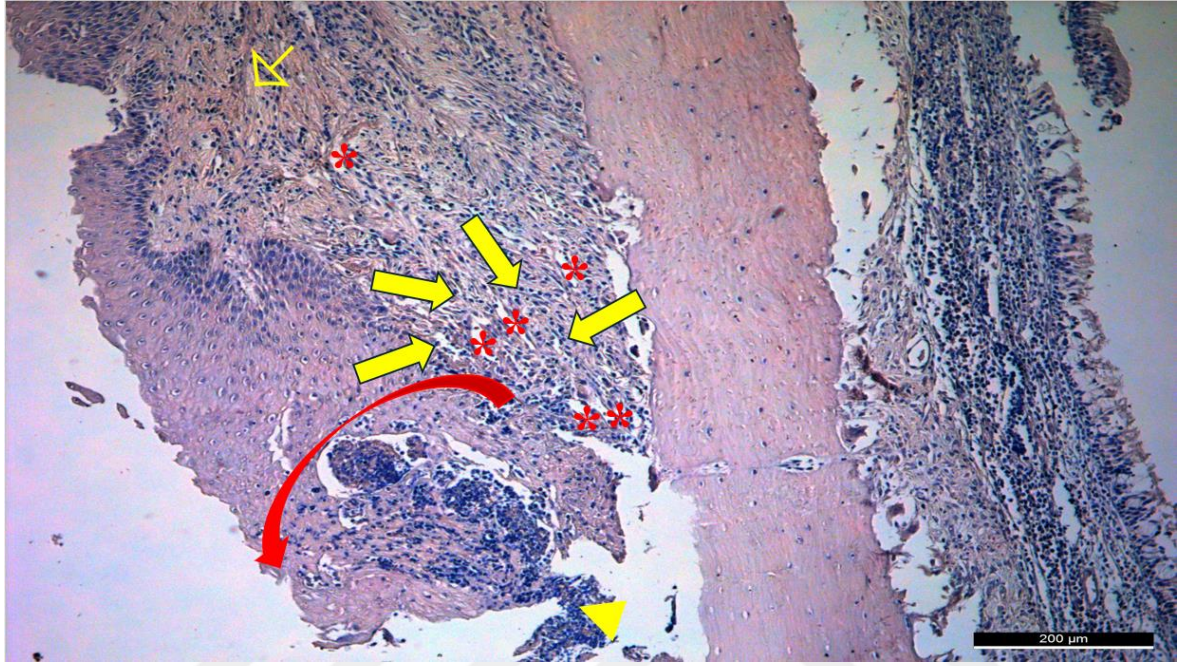
Resim 4.2. 3. gün kontrol grubu. Epitel; (*), epitelde eritrositler (→), inflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), bağ dokuda deorganizasyon ve ödem; (↗), vasküler dilatasyon; (*), Hematoksilen-eozin. 10X büyütme



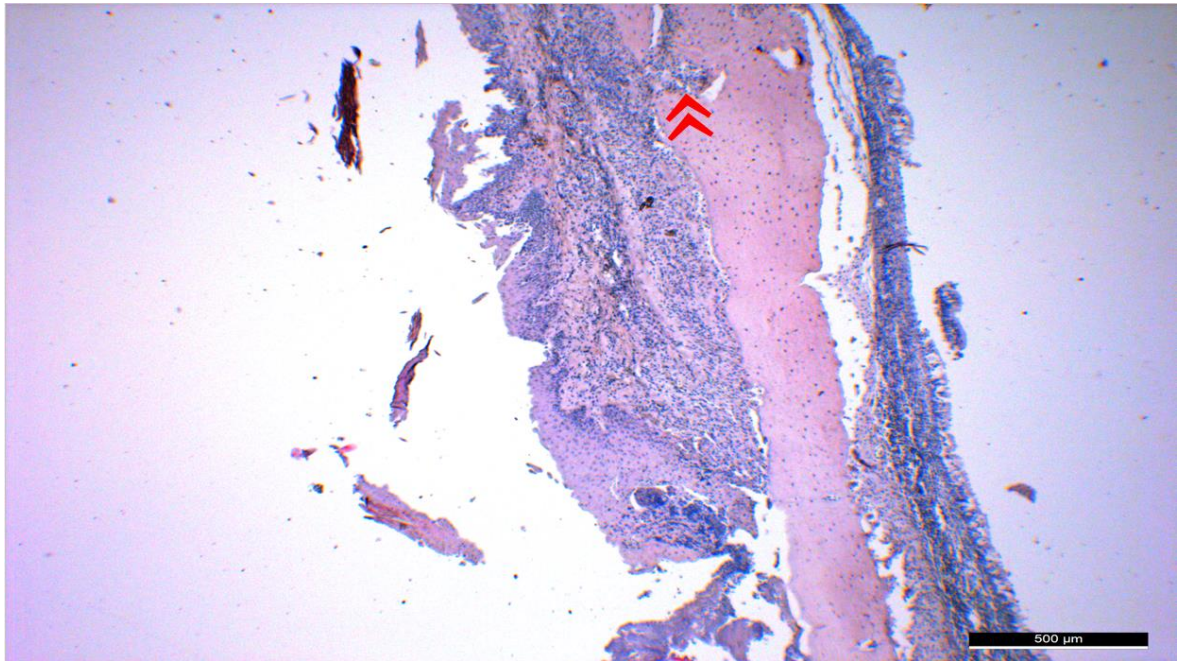
Resim 4.3. 3. gün kontrol grubu. Kemik dokuda inflamasyon (») 4X, Hematoksilen-eozin

5. gün kontrol grubunda yara iyileşmesinin değerlendirildiği deneklerde, yara bölgesinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve granülasyon dokusu gözlemlendi. Yara ağzı bölgesinde 3. gün bulgularına benzer şekilde epitel tabakaları net bir şekilde ayırt edilmedi. Dilate damar

sayısının 3. güne kıyasla daha fazla olduğu görüldü. Lamina propriadaki ECM’te deorganize yapı izlendi (Resim 4.4). Kemik dokuda inflamatuvar hücre sayısında artış gözlenmekle birlikte, bu artışın 3. güne göre daha düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Resim 4.5).

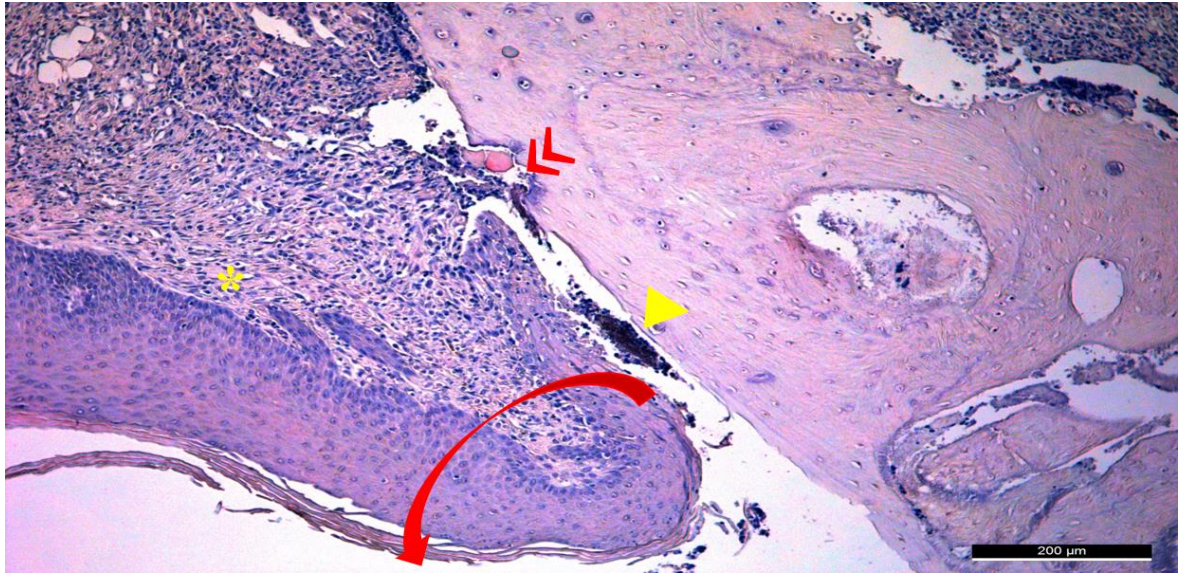


Resim 4.4. 5. gün kontrol grubu. Epitel ; (↘), inflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), bağ dokuda deorganizasyon ve ödem; (↗), vasküler dilatasyon; (*), granülasyon dokusu ;(⇒) Hematoksilen-eozin. 10X büyütme

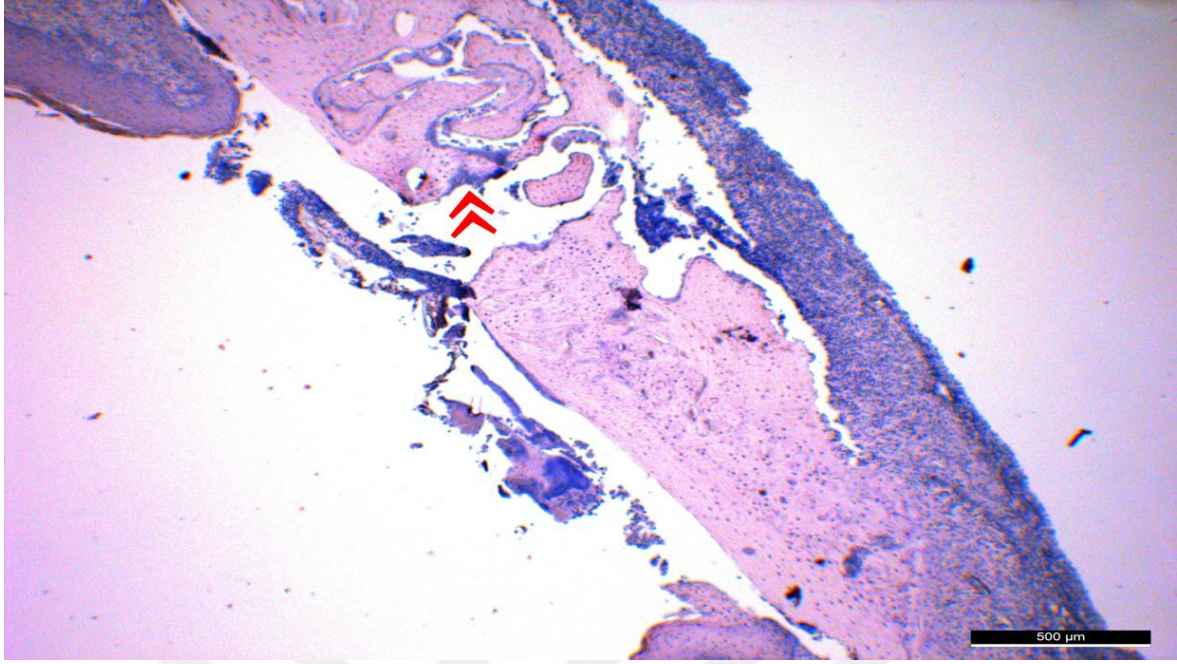


Resim 4.5. 5. gün kontrol grubu. Kemik dokuda inflamasyon (») 4X, Hematoksilen-eozin.

7. gün kontrol grubunda yara iyileşmesinin değerlendirildiği deneklerde, epitelizasyonun yara ağzında tamamlanmaya yakın olduğu ancak; stratum corneumun yara ağzında henüz oluşmadığı ve epitel yapının tam organize olmadığı tespit edildi. Vasküler dilatasyonun ve ödemin, önceki günlere kıyasla azalma eğiliminde olduğu gösterildi. Makrofaj ve lenfositlerin infiltrasyonunun belirgin şekilde azaldığı izlendi (Resim 4.6). x10 büyütmeli incelemelerde kemik dokuda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun diğer günlere göre azaldığı, yara bölgesinde hâlâ olduğu belirlendi (Resim 4.7).



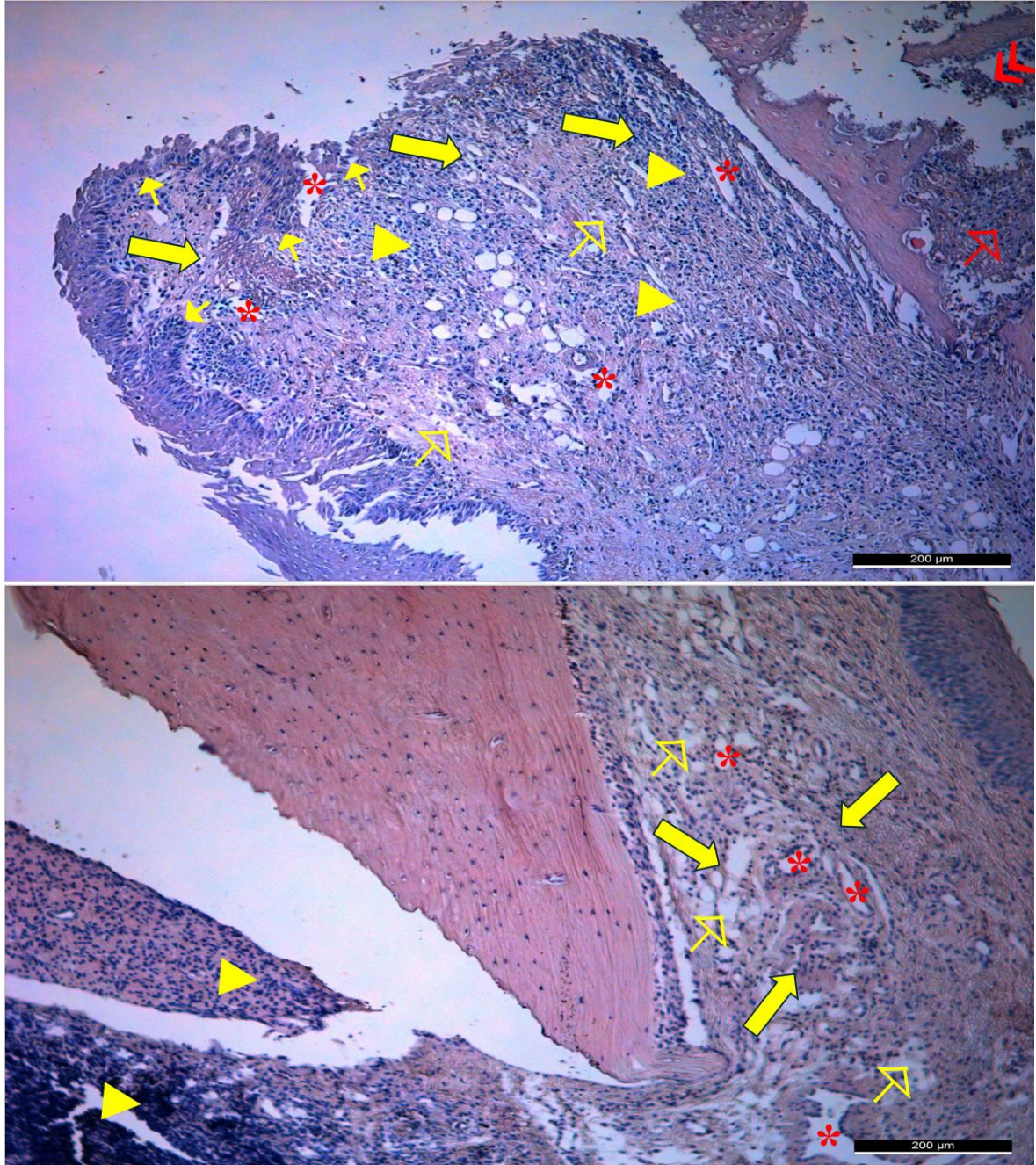
Resim 4.6. 7. gün kontrol grubu. Epitel ; (↘), inflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), damar; ;(*, sarı), Hematoksilen-eozin.10X



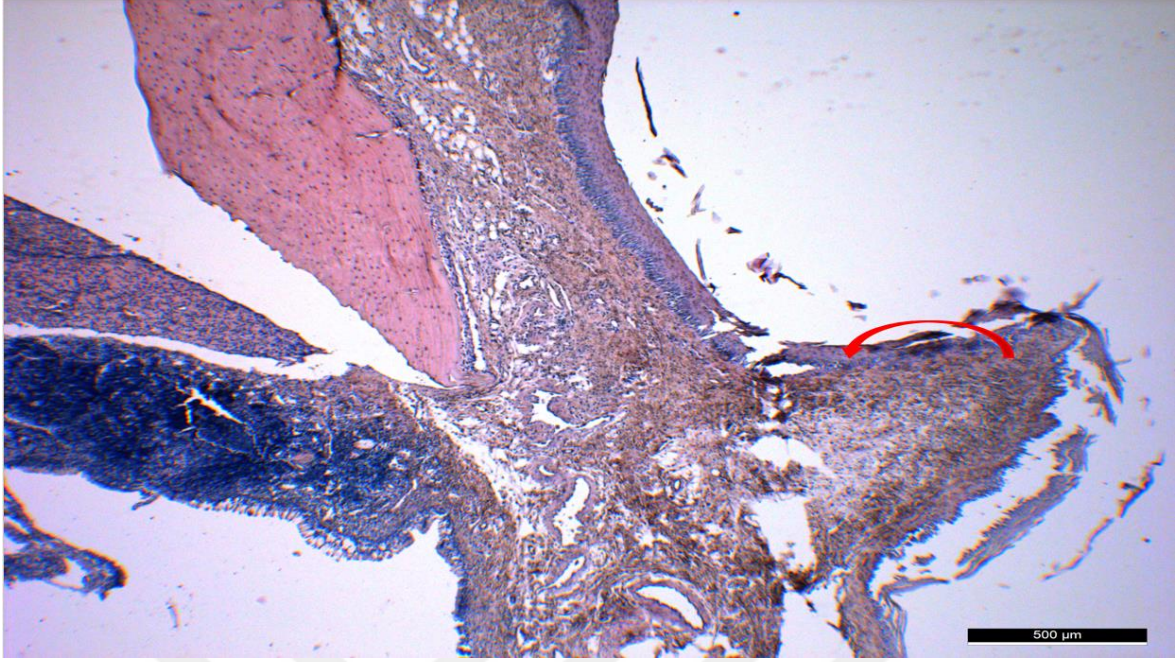
Resim 4.7. 7. gün kontrol grubu. Kemik dokuda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (»,kırmızı) 4X, Hematoksilen-eozin.

4.2.2. Sistemik astaksantin uygulama grubu

3. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, epitelin deorganize olduğu (Resim 4.9), 3. gün kontrol grubuna kıyasla dilate damar sayısında artış olduğu görüldü. Bağ dokudaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun kontrol grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi. Bağ dokuda ödemin, submukozaya yakın bölgelerde yüzeysel bölgelere kıyasla daha yoğun olduğu görüldü (Resim 4.8).

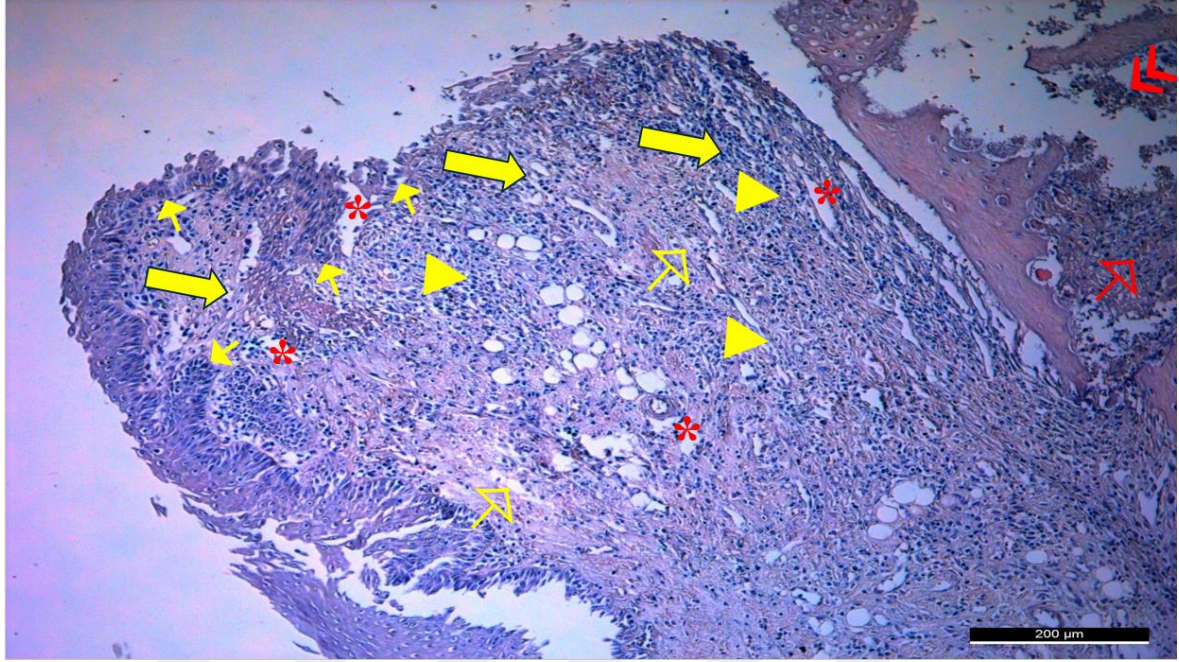


Resim 4.8. 3. gün SA grubu. İnflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), bağ dokuda deorganizasyon ve ödem; (↑), vasküler dilatasyon; (*), granülasyon dokusu; (⇒) . Hematoksilen-eozin. 10X büyütme

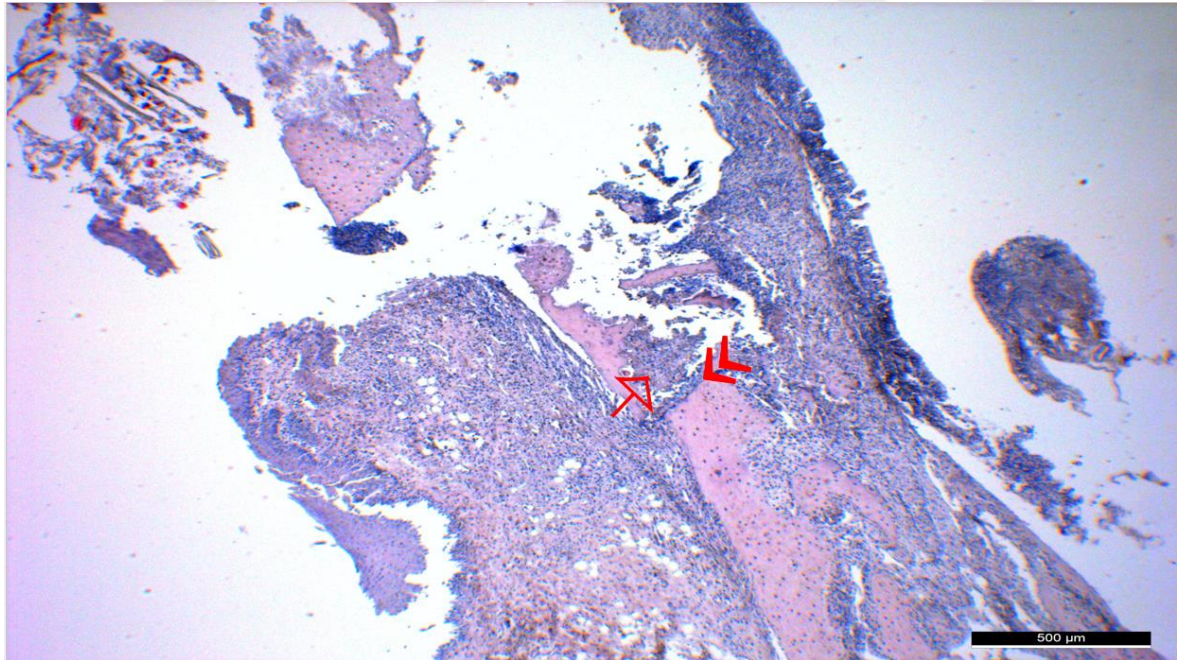


Resim 4.9. 3. gün SA grubu. Epitel; (↷), Hematoksilen-eozin. 4X

5. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, epitel yapısı diğer gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubunun 7. gün yara iyileşmesi bulgusuyla uyumlu olarak epitel tabakanın rejenerasyonundan sorumlu bazal hücrelerin proliferasyonunda artış olduğu ve bu tabakanın yara bölgesinin ağzına doğru ilerlediği, lenfosit infiltrasyonun yara ağzında daha homojen dağıldığı görüldü. Granülasyon dokusu belirginlik gösterdi (Resim 4.10). Diğer gruplardan farklı olarak kemik dokuda yara bölgesindeki kolajen liflerin ve bağ dokunun olduğu görüldü (Resim 4.11). Vasküler dilatasyon ve ödem izlendi.



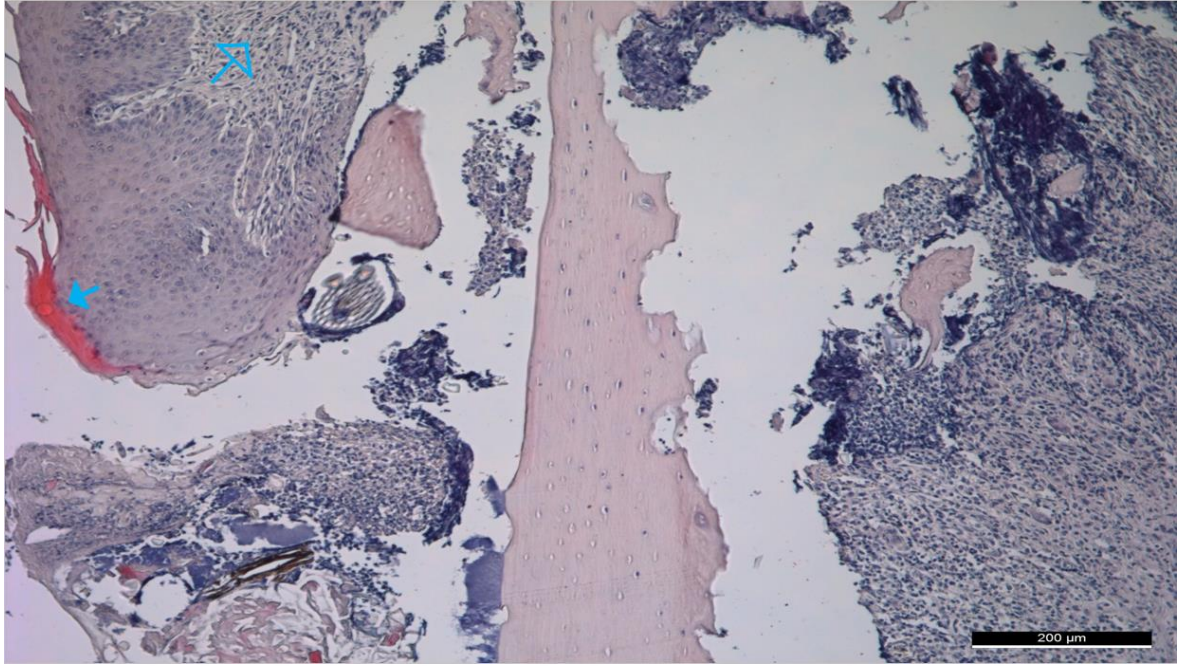
Resim 4.10. 5. gün SA grubu. Epitel bazal hücreleri ;(↑, sarı ok), granülasyon dokusu ;(⇒, sarı), bağ dokuda deorganizasyon ve ödem; (↑, sarı), inflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), vasküler dilatasyon; (*, kırmızı), kemik dokuda bağ doku ve kolajen ; (↑, kırmızı). Hematoksilen-eozin. 10X büyütme



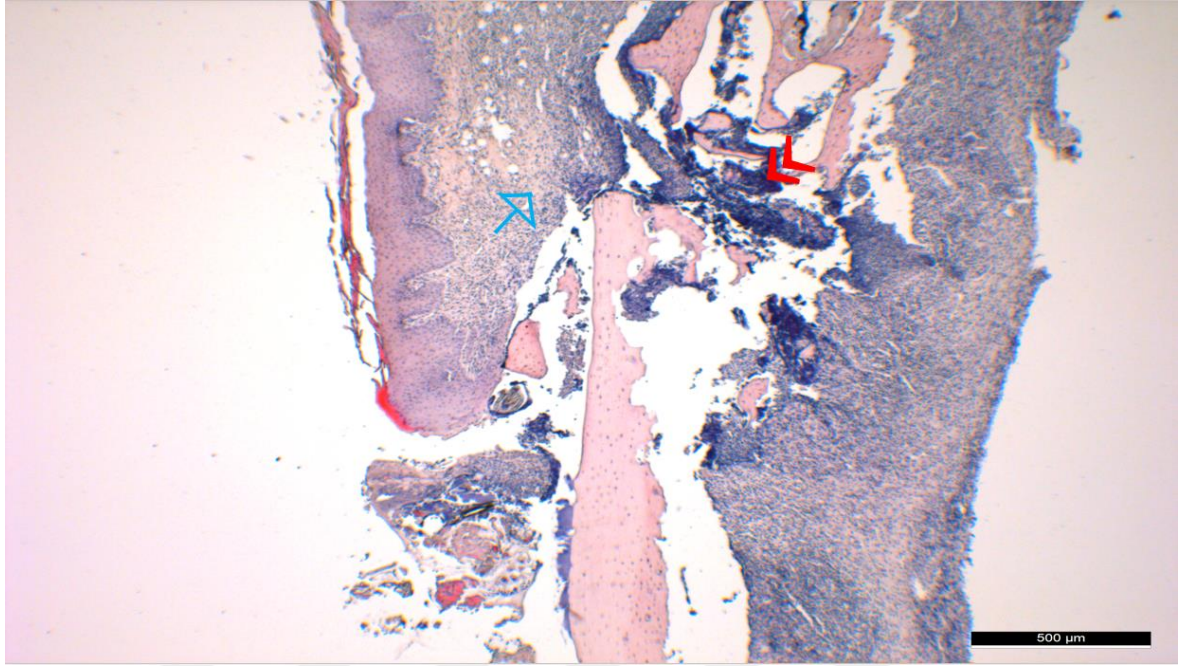
Resim 4.11. 5. gün SA grubu. Kemik dokuda bağ doku ve yeni sentezlenen kolajen lifler; (↑, kırmızı), lenfosit infiltrasyonu; (», kırmızı) Hematoksilen-eozin. 4X

7. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, yara bölgesindeki epitelizasyon, diğer gruplardan farklı olarak en üst tabakada belirgin keratinizasyon gösterdi. Lamina propriada

lenfosit yoğunluğu gözlenmekle birlikte bağ dokunun homojen bir yapı sergilediği belirlendi. Vasküler dilatasyon en az bu grupta olup granülasyon dokusu izlenmedi (Resim 4.12). Kemik dokuda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun belirgin olduğu gözlemlendi (Resim 4.13).



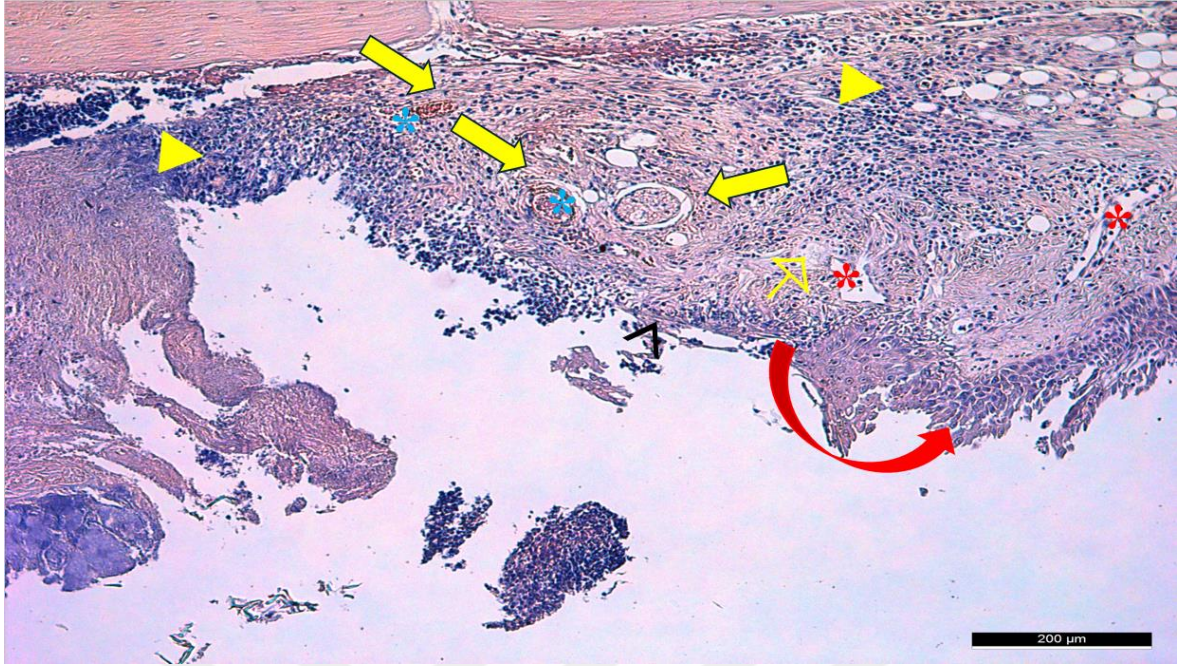
Resim 4.12. 7. gün SA grubu. Keratinize tabaka ;(↑, mavi ok), homojen bağ doku ;(↑, mavi). Hematoksilen-eozin 10X



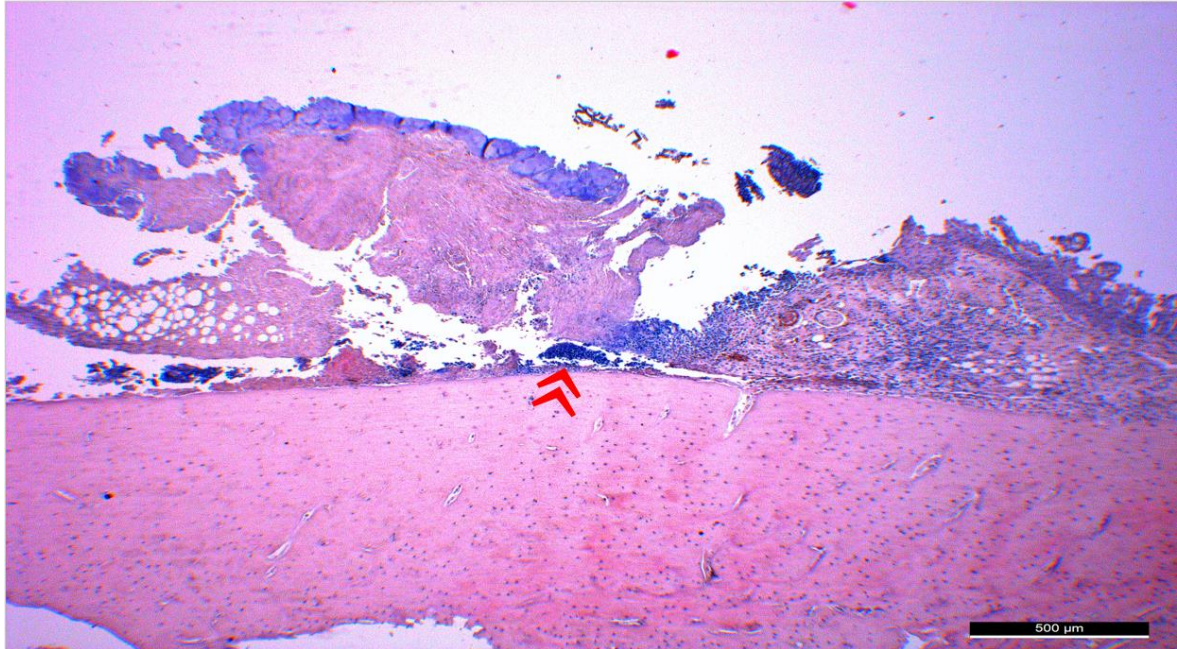
Resim 4.13. 7. gün SA grubu. Lenfosit infiltrasyonu;(»), homojen bağ doku ;(↑, mavi). Hematoksilen-eozin.4X

4.2.3. Topikal astaksantin uygulanama grubu

3. gün topikal astaksantin uygulanan grupta, epitel tabakaları yara ağzında fark edilerek bazal membranın net bir şekilde ayırt edildiği görüldü. Kontrol grubunun aynı gün yara iyileşmesi grubuna benzer şekilde yara bölgesinde lenfosit ve bağ dokusu hücrelerinin infiltrasyonunun diğer gruplara kıyasla daha az olmakla birlikte epitelin hemen altında olmadığı, lamina proprianın ortasında ve submukozaya yakın yerlerde olduğu görüldü. Yara bölgesinin yakınında anjiyogenezi destekleyen eritrositlerin olduğu kan damarlarının ve vasküler dilatasyonun bulunduğu görüldü. Yara ağzına yakın yerlerde ödem (Resim 4.14.) ve periosteumda lenfosit infiltrasyonu izlendi (Resim 4.15).



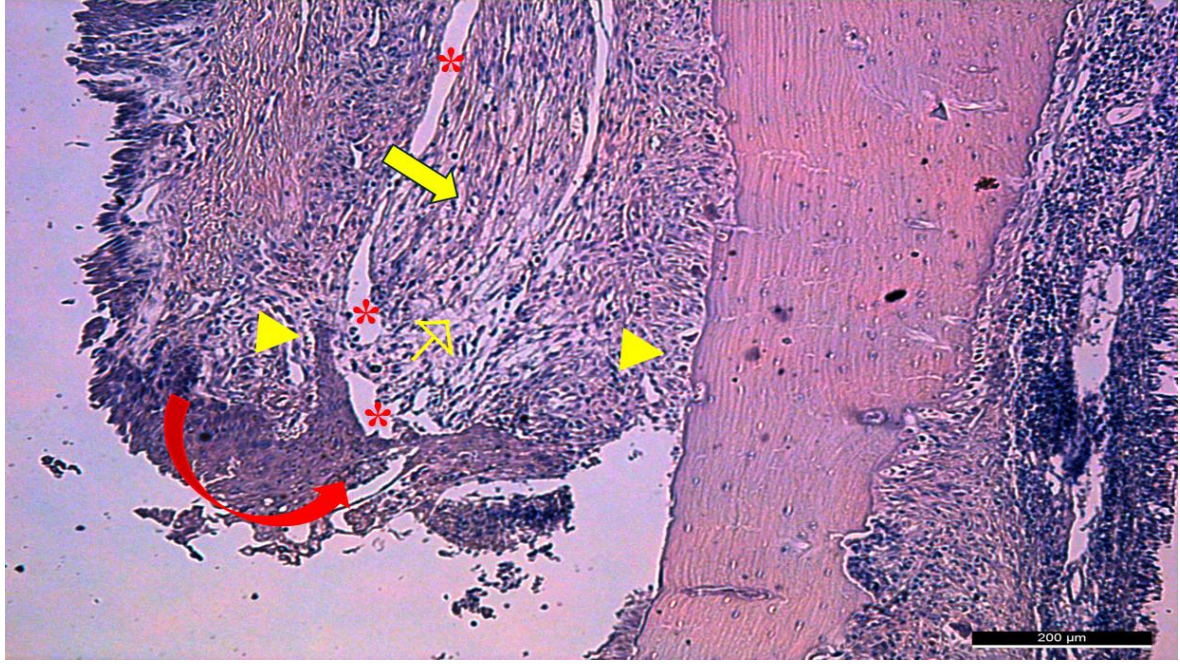
Resim 4.14. 3. gün TA grubu. Epitel; (↘), inflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), bağ dokuda deorganizasyon ve ödem; (↑), vasküler dilatasyon; (*, kırmızı), anjiyogenez; (*, mavi), granülasyon dokusu; (⇔); bazal membran(>), Hematoksilen-eozin. 10X büyütme



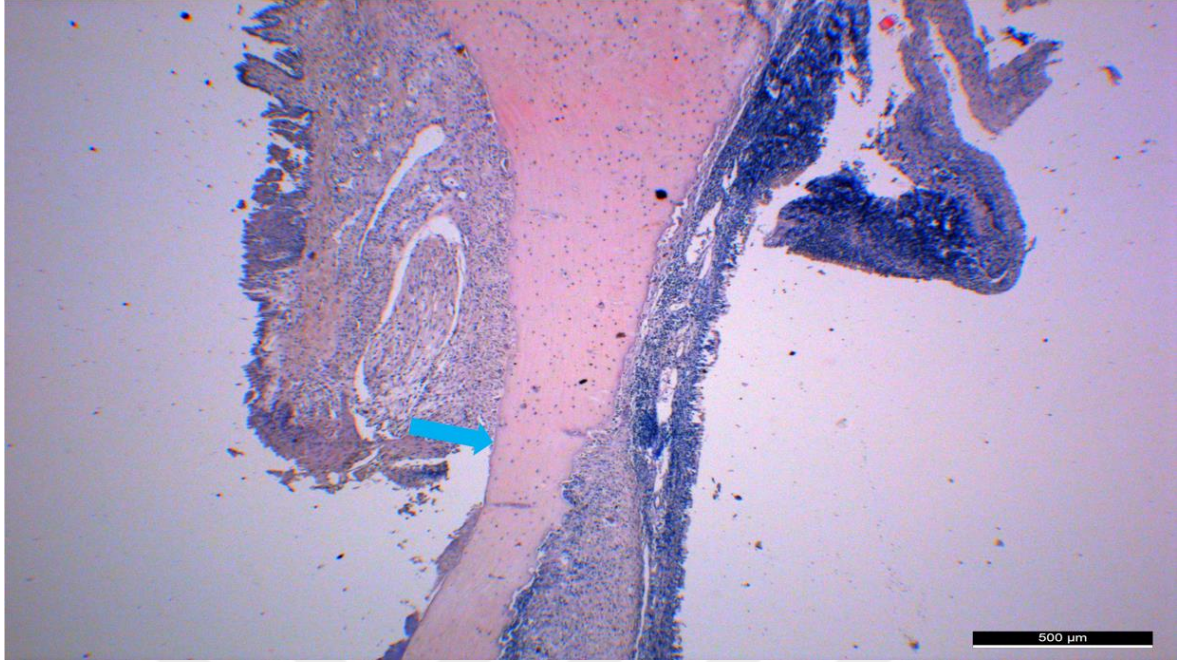
Resim 4.15. 3. gün TA grubu. Periosteumda lenfosit infiltrasyonu; (»,kırmızı), Hematoksilen-eozin, 4X büyütme

5. gün topikal astaksantin uygulanan grupta, keratinize tabaka izlenmemesine karşın, epitel tabakaları net bir şekilde birbirinden ayırt ediliyor olmakla birlikte yara ağzı bölgesinin

büyük oranda epitelle kapanmış olduğu görüldü. Bağ dokusu homojen görünümdeydi. Hafif vasküler dilatasyon ve ödem bu grupta da izlendi. Hafif derecede granülasyon dokusu ve lenfosit infiltrasyonu görüldü. Submukoza periosteumla devamlılık gösterir şekildeydi (Resim 4.16). Kemik dokuda yara bölgesine ait bir değişiklik veya lenfosit infiltrasyonu izlenmedi (Resim 4.17).

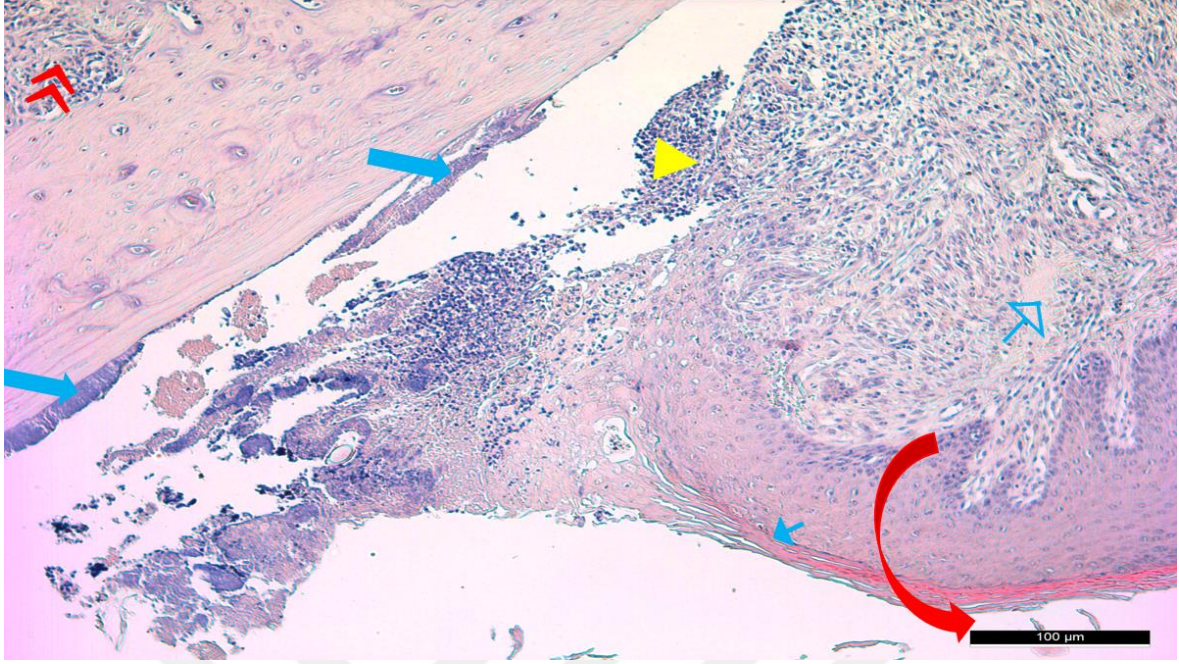


Resim 4.16. 5. gün TA grubu. Epitel; (↘), inflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), bağ dokuda deorganizasyon ve ödem; (↗), vasküler dilatasyon; (*, kırmızı), granülasyon dokusu ;(⇒) Hematoksilen-eozin. 10X büyütme

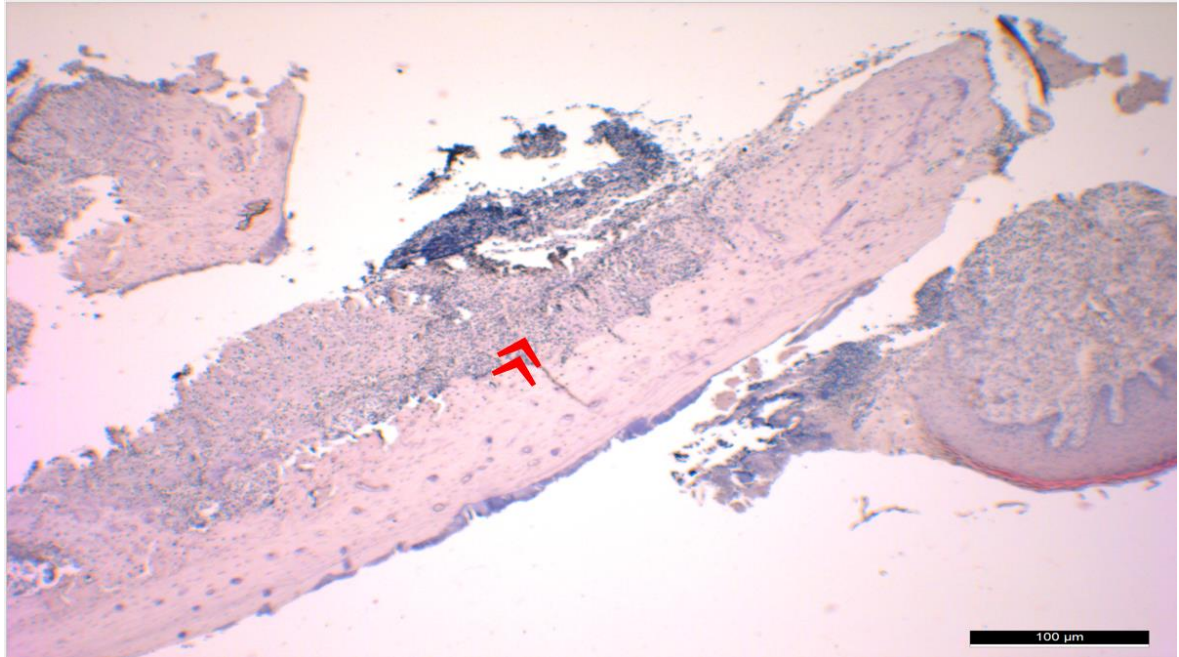


Resim 4.17. 5. gün TA grubu. Submukoza ve periosteum; (,mavi) Hematoksilen-eozin.4X büyütme

7. gün topikal astaksantin uygulanan grupta, epitel tabakada keratinizasyonun belirgin olduğu ve keratin tabakanın yara ağzına doğru ilerlediği görüldü. Lamina propriada ödem, granülasyon dokusu ve vasküler dilatasyon gözlenmezken yara ağzının epitelle kapandığı (Resim 4.18), periosteumda hücrel proliferasyon alanlarının, kemik dokuda yer yer lenfosit infiltrasyonunun görüldüğü bununla birlikte epitelizasyonun olduğu belirlendi (Resim 4.19).



Resim 4.18. 7. gün TA grubu. Epitel; (↗), inflamatuvar bağ doku hücreleri (▲), homojen bağ doku; (↗), periosteumda proliferasyon; (⇒), kemik dokuda lenfosit infiltrasyonu (;(»)) Hematoksilen-eozin. 10X büyütme



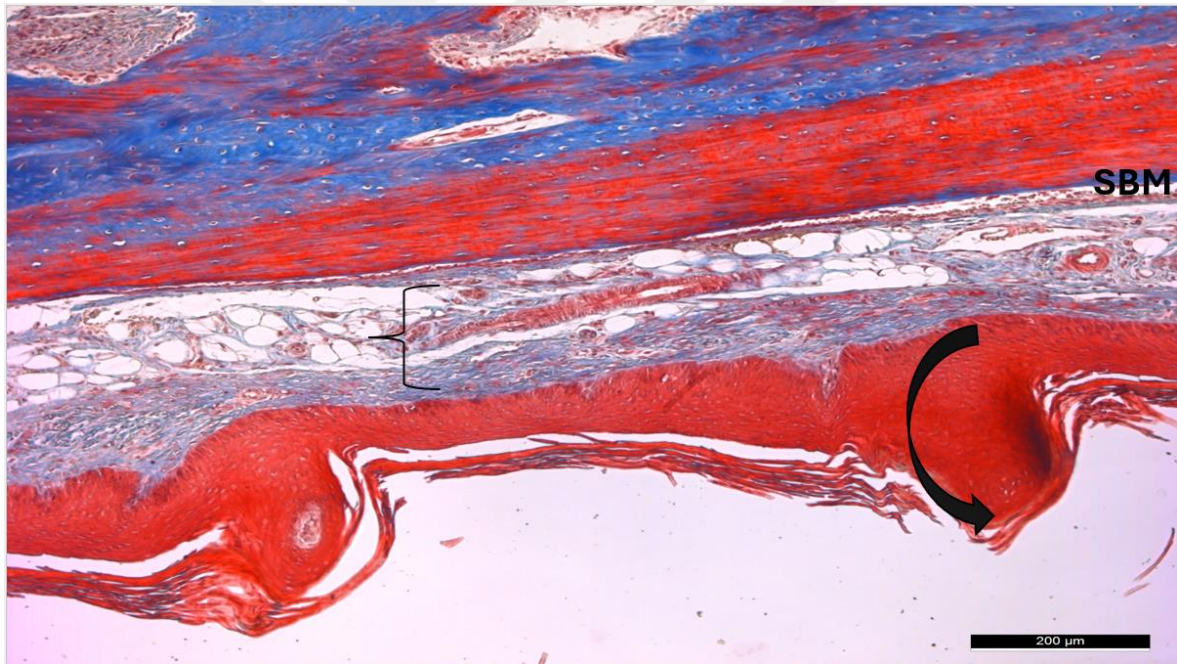
Resim 4.19. 7. gün TA grubu. Periosteumda proliferasyon; (⇒), kemik dokuda lenfosit infiltrasyonu (;(»)) Hematoksilen-eozin. 4X büyütme

Sistemik ve topikal olarak uygulanan astaksantin, hematoksil-eozin metoduyla elde edilen histopatolojik bulguları özetlendiğinde;

- 3. günde TA grubunda inflamasyon düzeyinin daha düşük olduğu ve epitelizasyon sürecinin daha erken başladığı,
- 5. günde her iki uygulama metodunun inflamasyonu azalttığı ancak topikal uygulamanın daha etkili olduğu,
- 7. günde topikal uygulamayla epitelizasyonun yüksek oranda tamamlandığı görüldü.

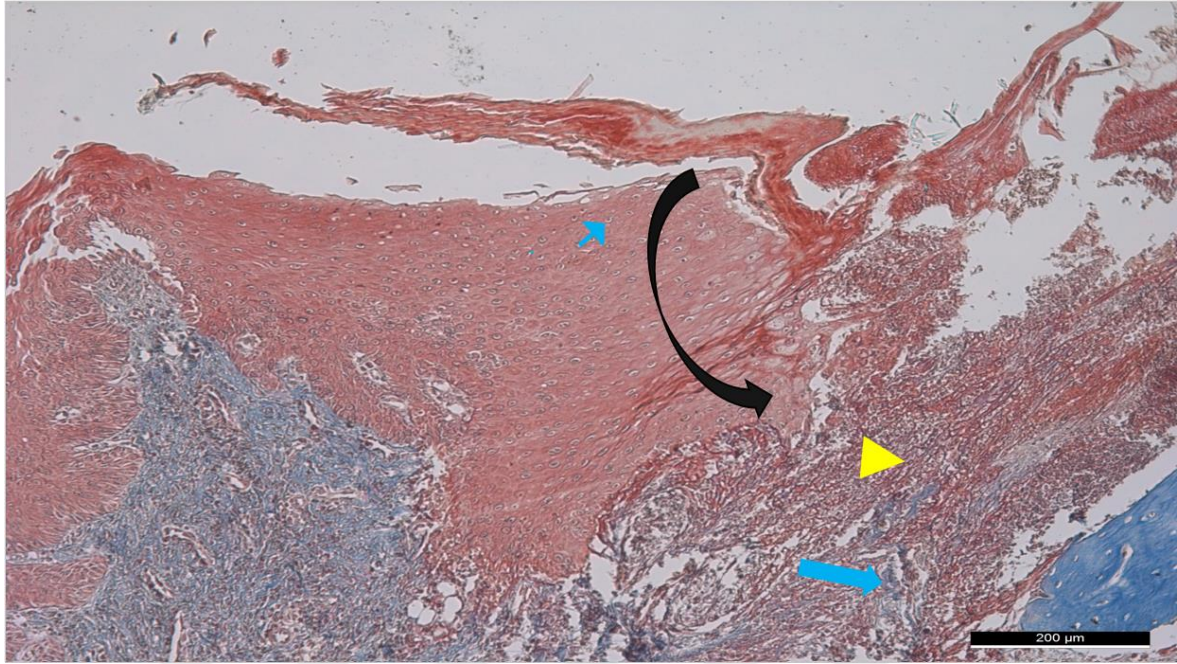
4.3. Masson's Trikrom Değerlendirmeleri

Fibrozis ve bağ doku komponentlerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan Masson's Trikrom boyaması sonucunda, negatif kontrol grubuna ait histolojik kesitlerin, hematoxilen-eozin boyama ile elde edilen bulgularla histopatolojik açıdan uyumlu olduğu saptandı (Resim 4.20).



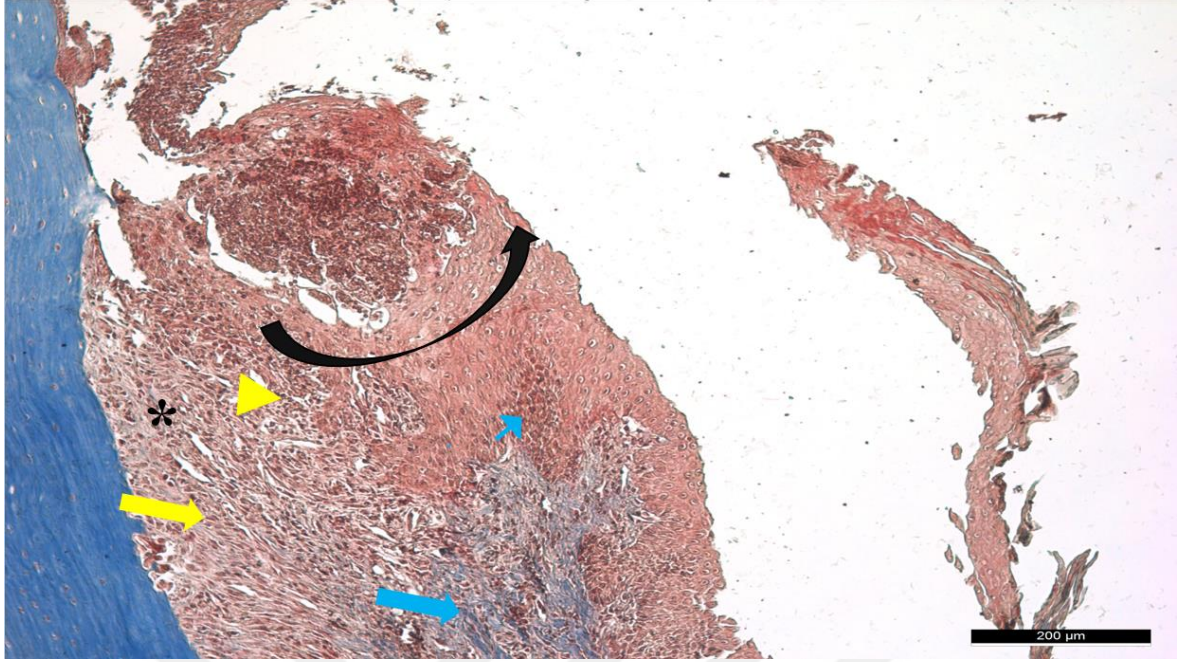
Resim 4.20. Negatif kontrol grubu, Masson's Trikrom. Epitel; (2), {; lapina propria, submukoza; BM. 10x büyütme

3. gün kontrol grubunda, epitel bütünlüğünün bozulmuş olduğu, yara bölgesinin tam kapanmadığı ve yara kenarlarındaki epitel hücrelerinde sınırlı proliferasyon olduğu gözlemlendi. Yara ağzındaki bazal membran yapısı belirsiz görünümde izlendi. Lamina propriada ödem ve gevşek bağ dokusu izlenirken, damar yapılarında dilatasyon ve konjesyon saptandı. Submukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonunun belirgin olduğu, kolajen liflerin zayıf mavi boyanma göstererek düzensiz ve dağınık şekilde yerleştiği izlendi. (Resim 4.21).



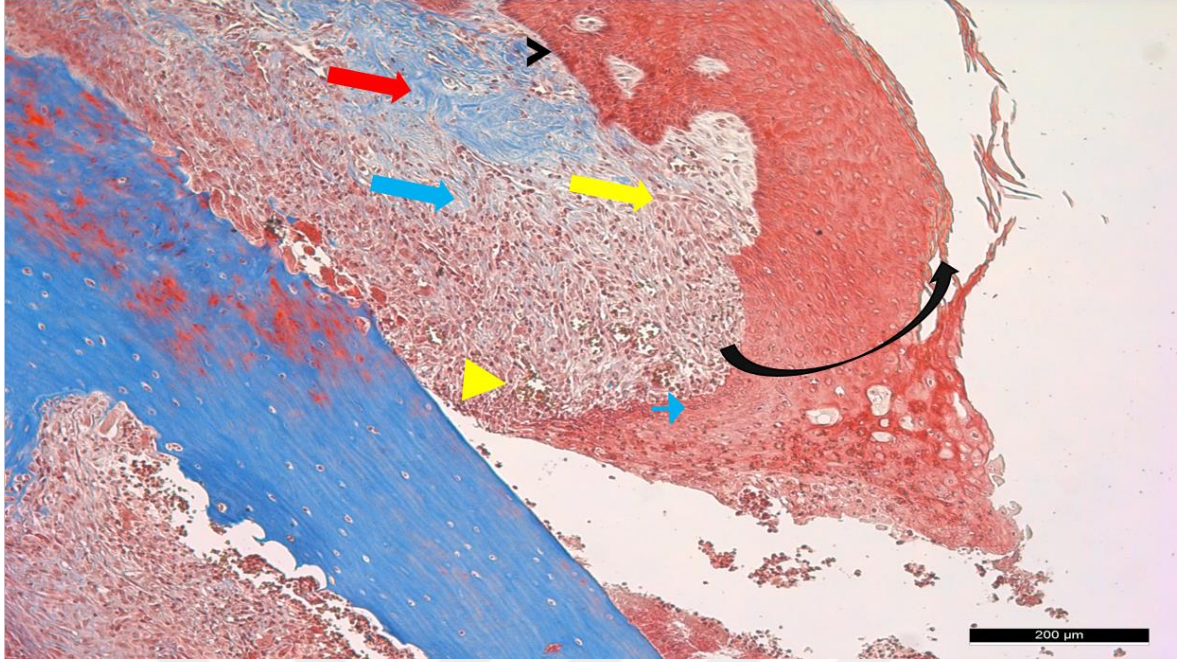
Resim 4.21. 3. gün kontrol grubu. Epitel; (↓), (▲); inflamatuvar hücre infiltrasyonu, (↑,mavi) ;prolifere keratinositler . zayıf kolajen lif;(⇨,mavi) Masson'S trikom 10x büyütme

5. gün kontrol grubunda, yara ağzında epitelizasyonun tamamlanmadığı, keratinizasyonun başlamadığı, stratum tabakalarının net olmadığı görüldü. Hafif hücresel proliferasyon gözlemlendi. Kolajen lifler seyrek ve düzensiz şekilde yer aldı. İnflamasyon hafif azalırken fibroblast aktivitesinde artış gözlemlendi. Anjiyogenez belirginlik kazandı. Yara ağzına yakın lamina propriada kolajen sentezinin artmasına bağlı olarak mavi renk yoğunluğunun artış gösterdiği, proliferen epitel hücrelerinin kırmızı görünümde olduğu izlendi (Resim 4.22.).



Resim 4.22. 5. gün kontrol grubu. Epitel; (↓), inflamatuvar hücre infiltrasyonu; (▲), yeni oluşan damarlar;(*) . zayıf kolajen lif;(⇒,mavi), fibroblast; (⇒,sarı), (↑ ,mavi) ;prolifere keratinositler. Masson'S trikom 10x büyütme

7. gün kontrol grubunda, bazal membran yapısının belirginleştiği izlendi. Bağ dokusunda daha yoğun ve düzenli mavi boyanma gözlenmesine ek olarak epitel ile bağ dokusu arasındaki geçiş bölgesinde yer yer fibrotik alanların olduğu görüldü. Fibroblastların aktivitesinde artış saptandı. İnflamasyonun azaldığı, ancak tamamen çözülmediği gözlemlendi. Kolajen boyanmasının orta yoğunlukta olduğu, bağ doku organizasyonunun henüz tam olarak sağlanmadığı gözlemlendi (Resim 4.23).

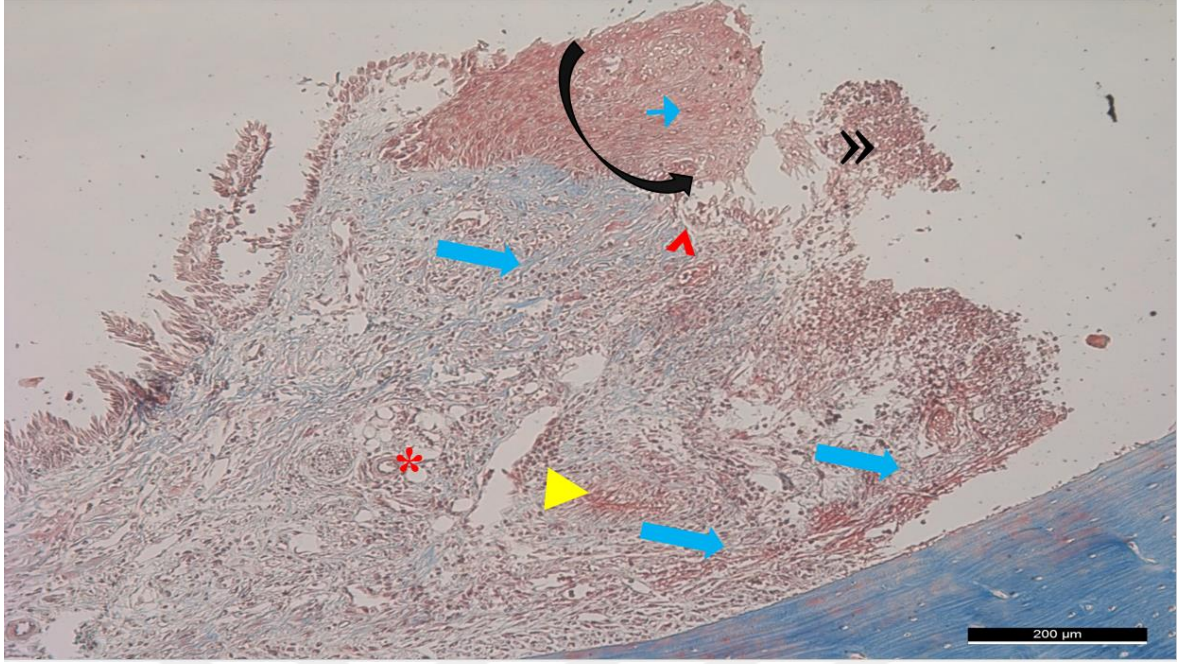


Resim 4.23. 7. gün kontrol grubu. Epitel; ($\blacktriangleright$), inflammatuar hücre infiltrasyonu; ($\blacktriangle$, sarı), kolajen lif;($\Rightarrow$,mavi), prolifer keratinositler;($\uparrow$,mavi), fibroblast; ($\Rightarrow$,sarı), bazal membran; ($>$), fibrotik bölge ;($\Rightarrow$, kırmızı) Masson’S trikom, 10x

Astaksantin uygulanmayan kontrol grubunun Masson’s trikrom boyanması ile elde edilen histopatolojik bulguları özetlendiğinde;

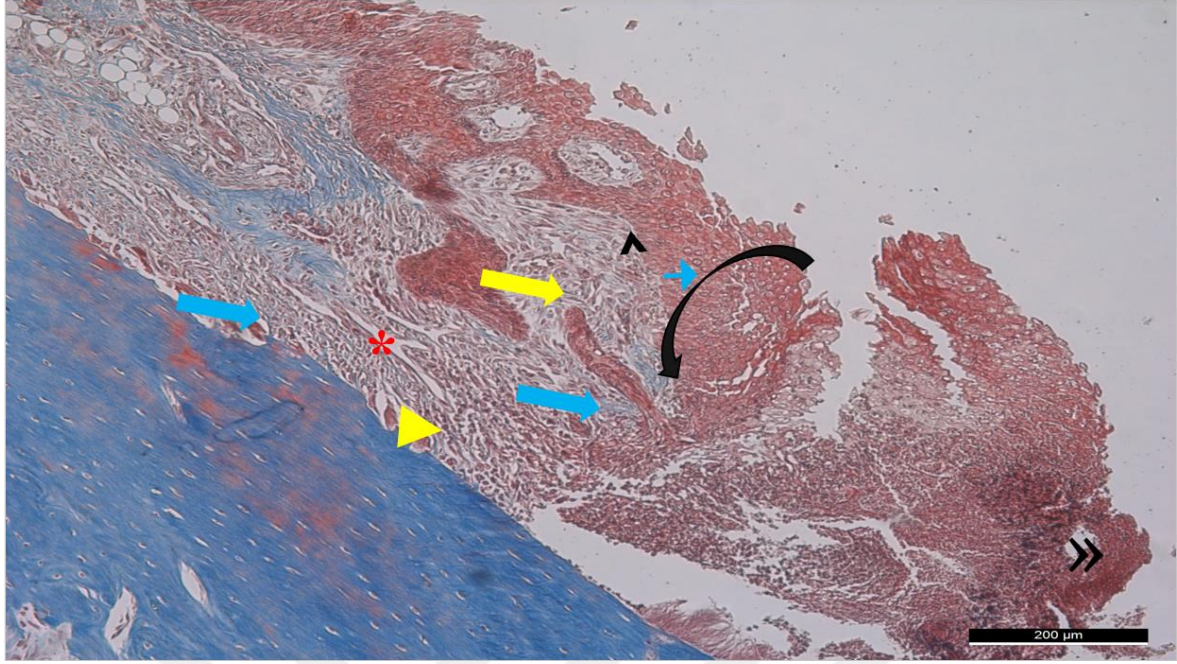
- Yara iyileşmesinin daha yavaş ilerlediği ve inflammatuar sürecin daha uzun sürdüğü gözlemlendi.
- Epitelizasyonun geç başladığı tespit edildi.
- Kolajen liflerin düzensiz, seyrek ve geç organize olduğu belirlendi.
- Yara kenarına yakın bölgelerde yer yer fibrozis alanları görüldü.

3. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, yara kenarlarında gözlenen epitel hücre proliferasyonunun TA grubuna göre belirginliğin daha az olduğu saptandı. Bazal membranın kısmen bozulduğu ve onarım sürecinin başladığı gözlemlendi. Yüzeyde minimal düzeyde hücresel debris varlığı tespit edildi. Lamina propriada belirgin inflammatuar hücre infiltrasyonu (nötrofiller ve makrofajlar) izlendi; anjiyogenezisin ve vasküler dilatasyonun mevcut olduğu görüldü. Kontrol grubundan farklı olarak, kolajen liflerin düzensiz dağılım gösterdiği velamina propria tabakasının derinlerinde yer aldığı tespit edildi (Resim 4.24.).



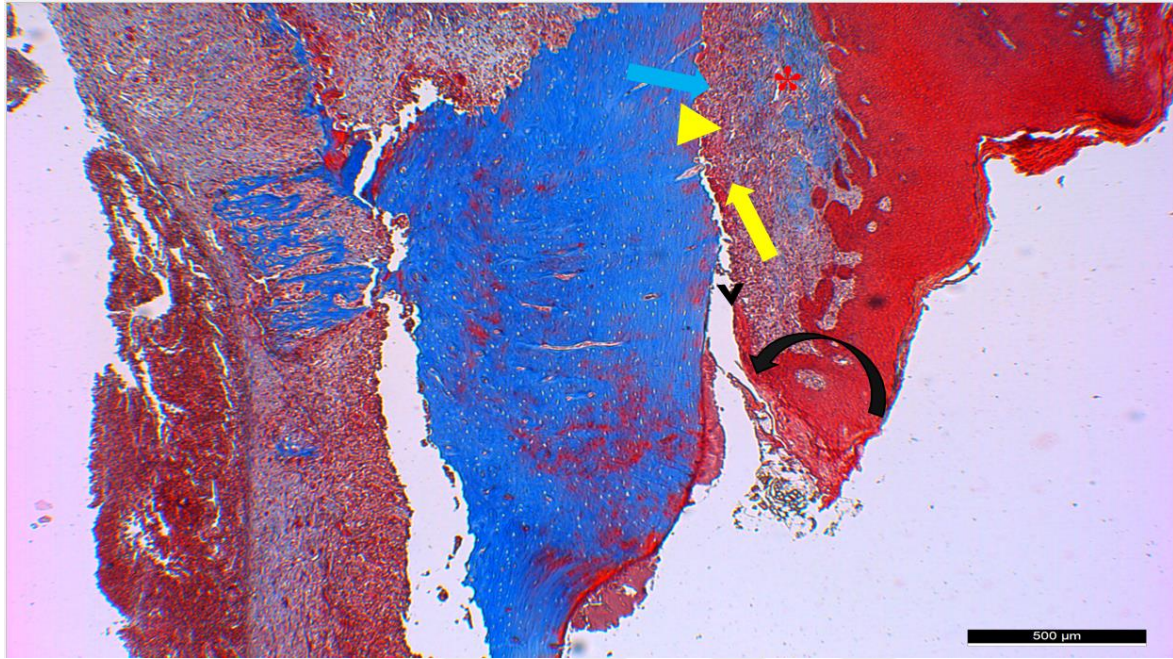
Resim 4.24. 3. gün SA grubu. Epitel; (↘), inflamatuvar hücre infiltrasyonu; (▲, sarı), kolajen lif; (⇒, mavi), proliferen keratinositler; (↑, mavi), bazal membranda bozulmalar; (>, kırmızı), hücresel debris; (»), Masson's trikom, 10X

5. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, epitelizasyon sürecinin başladığı ancak yaranın tamamen kapanmadığı gözlemlendi. Bazal membranın belirginleştiği, keratinositlerin aktif proliferasyon gösterdiği tespit edildi. Stratum basale ve stratum spinosum tabakalarının oluşum sürecine girdiği değerlendirildi. Lamina propriada akut inflamasyonun azaldığı ve keratinositlerin yerini makrofaj ile lenfosit ağırlıklı kronik inflamatuvar yanıtı bıraktığı saptandı. Fibroblast aktivitesinin artışına bağlı olarak kolajen sentezinin başladığı gözlemlendi. Kolajen liflerinin henüz tam olarak organize olmamakla birlikte kontrol grubuna kıyasla lamina propriada daha derin tabakalarda, daha belirgin (orta mavi boyanma) olarak yer aldığı tespit edildi. Yeni damar oluşumlarının varlığı kaydedildi (Resim 4.25).



Resim 4.25. 5. gün SA grubu. Epitel;(↯), inflamatuvar hücre infiltrasyonu; (▲, sarı), kolajen lif;(⇒,mavi), aktive fibroblastlar ;(⇒,sarı), proliferen keratinositler;(↑,mavi), bazal membran; (>,kırmızı), hücresel debris ;(»),Masson'S trikom, 10X

7. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, epitelizasyonun tamamlanmaya yakın olduğu bununla birlikte keratinizasyonun başlamadığı gözlemlendi. Bazal membran yapısı daha düzenli ve belirgin bir görünüm sergilerken, stratum tabakalarının tam olgunlaşmasını henüz tamamlamadığı izlendi. Lamina propriada, inflamasyon büyük ölçüde azalmış, fibroblast aktivitesi belirginleşmişti. Kolajen lifler daha yoğun ve organize bir yapı göstermesinden dolayı güçlü mavi boyanma ile izlendi. Anjiyogenez sürecinin ise tamamlanma aşamasına geldiği gözlemlendi (Resim 4.26).



Resim 4.26. 7. gün SA grubu. Epitel; (↘), inflamatuvar hücre infiltrasyonu; (▲, sarı), kolajen lif; (⇒, mavi), aktive fibroblastlar; (⇒, sarı), proliferen keratinositler; (↑, mavi), yeni oluşan bazal membran; (>, siyah), Masson's trikrom, 4X

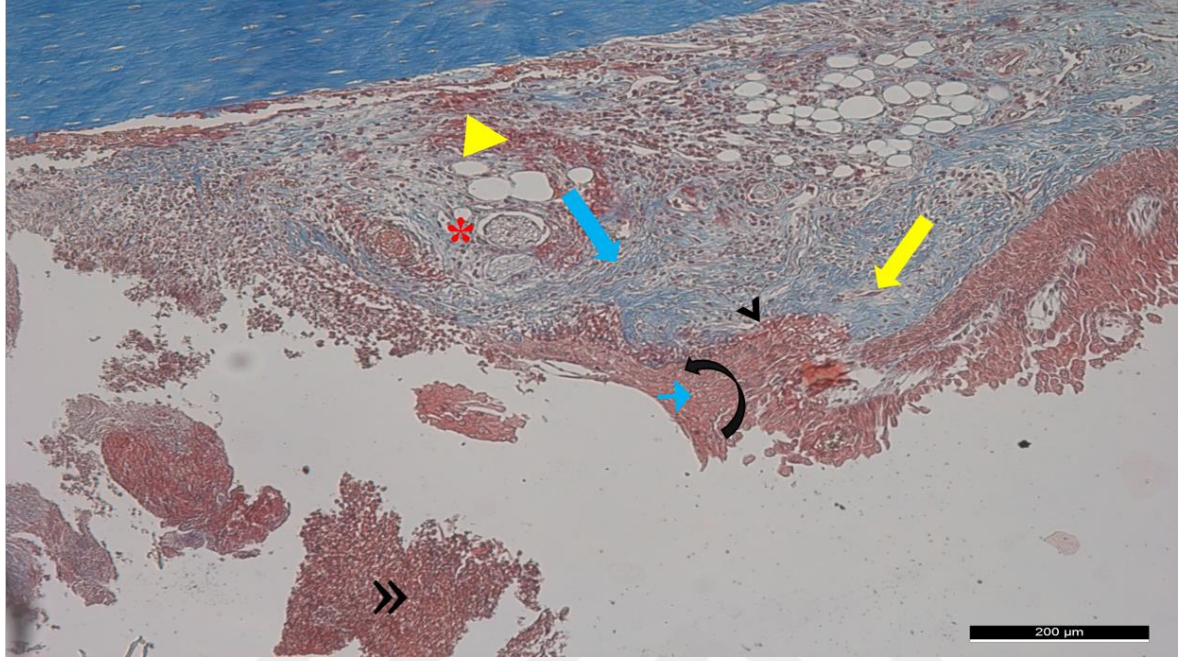
Sistemik astaksantin uygulanan grubun Masson's trikrom boyanması ile elde edilen histopatolojik bulguları özetlendiğinde;

- Epitelizasyon sürecinin hızlandığı, ancak TA grubuna kıyasla daha geç tamamlandığı,
- İnflamasyonun kontrol grubuna göre daha erken çözüldüğü, ancak TA grubuna göre daha uzun sürdüğü,
- Kolajen sentezi ve organizasyonun arttığı, ancak tam matür hale gelmediği,
- Yeni damar oluşumunun başladığı, ancak topikal uygulamaya kıyasla geciktiği görüldü.

Sonuçlar, sistemik astaksantin uygulamasının sistemik antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri nedeniyle yara iyileşmesini desteklediğini ortaya koymaktadır.

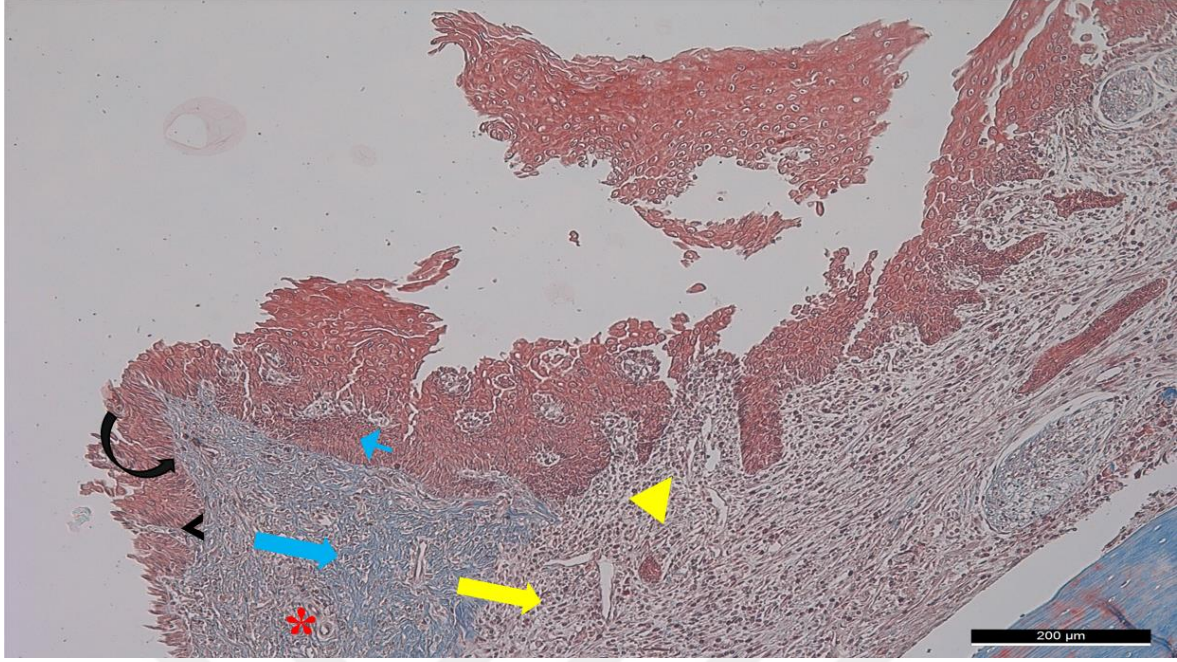
Üçüncü gün topikal astaksantin uygulanan grupta epitel bütünlüğünde bozulma olmakla birlikte, reepitelizasyon sürecinin başladığı görüldü. Epitelde hücre proliferasyonu belirginleşmiş; yara kenarlarında bazal hücrelerde mitotik aktivitede artış saptandı. Yara ağzında bazal membranın yeni yeni belirginleşmeye başladığı izlendi. Hücresel debrisler bu grupta da görüldü. Lamina propriada inflamatuvar yanıt hafif düzeyde ve kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalma gösterdi. Fibroblast aktivitesinin başlayarak kolajen liflerin daha

yoğun ve organize bir görünüm kazandığı gözlemlendi. Masson's Trikrom boyamasında mavi renkli kolajen liflerinin yoğunluğu önceki iki gruba kıyasla artış gösterdi (Resim 4.27).



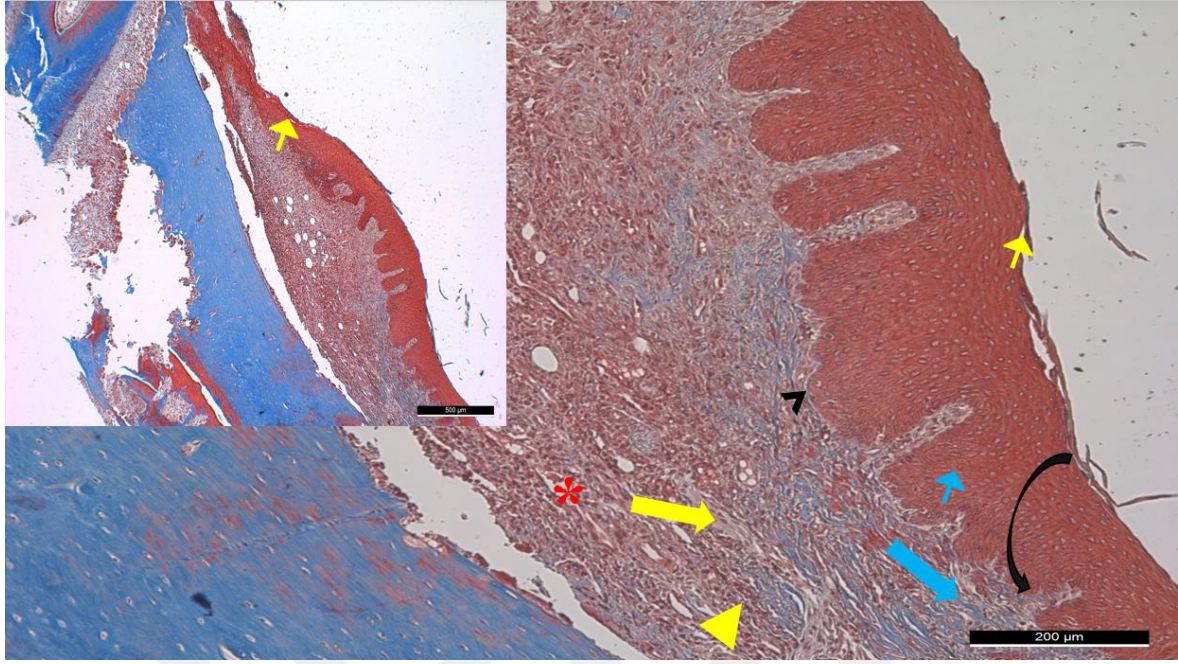
Resim 4.27. 3. gün TA grubu. Epitel; (↘), inflamatuvar hücre infiltrasyonu; (▲, sarı), kolajen lif; (⇨, mavi), aktive fibroblastlar; (⇨, sarı), prolifer keratinositler; (↑, mavi), yeni oluşan bazal membran; (>, kırmızı), hücresel debris; (»), Masson's trikom, 10X

5. gün topikal astaksantin uygulanan grupta, epitel dokunun yara ağzına doğru ilerlemeye başladığı gözlemlendi ve bazal hücrelerde aktif proliferasyonun sürdüğü tespit edildi. Bazal membran düzenli ve belirgin bir yapı sergilerken, özellikle stratum basale tabakasındaki hücresel organizasyonun sıkı olduğu ve stratum granulozum tabakasının belirginleşmeye başladığı izlendi. Keratinizasyon sürecinin başlamadığı ancak hücresel düzenin arttığı görüldü. Lamina propriada inflamasyonun belirgin şekilde azalmasıyla mononükleer hücre infiltrasyonunda azalma gözlemlendi. Özellikle yara ağzında fibroblast aktivitesinin yüksek seviyeye ulaştığı ve yeni sentezlenen kolajen liflerin en homojen dağılım gösteren gruplardan biri olduğu görüldü. Yara ağzında yeni damar yapılarının oluştuğu, anjiyogenezin belirginleştiği ve hücresel debrisin bulunmadığı gözlemlendi (Resim 4.28).



Resim 4.28. 5. gün TA grubu. Epitel; (↘), inflamatuvar hücre infiltrasyonu; (▲, sarı), kolajen lif; (⇒, mavi), aktive fibroblastlar; (⇒, sarı), proliferen keratinositler; (↑, mavi), yeni oluşan bazal membran; (>, siyah), anjiyogenez; (*, kırmızı), Masson's trikom, 10X

7. gün topikal astaksantin uygulanan grupta epitelizasyonun tamamlandığı, bazal membranın belirginleştiği, epitel tabakalarının tam olgunlaştığı, keratinizasyonun başladığı, stratum corneumun oluşmaya başladığı izlendi. Lamina propriada inflamasyonun tamamen çözüldüğü, kronik inflamatuvar hücrelerin minimal seviyeye düştüğü gözlemlendi. Kolajen liflerinin tam organize olduğu ve yara ağzı boyunca fibroblast aktivitesinin en homojen bu grupta görüldüğü belirlendi. Bağ dokusunun stabil hale geldiği, damar yapılarının olgunlaştığı ve normal düzeye döndüğü tespit edildi. Hücresel debris izlenmedi (Resim 4.29).



Resim 4.29. 7. gün TA grubu. Epitel; (↘), inflamatuvar hücre infiltrasyonu; (▲, sarı), kolajen lif; (⇒, mavi), aktive fibroblastlar; (⇒, sarı), proliferen keratinositler; (↑, mavi), yeni oluşan bazal membran; (> siyah), anjiyogenez; (*, kırmızı), Masson's trikom, 10X. Stratum corneum; (↑, sarı) 4X, 10X

Topikal astaksantin uygulanan grubun Masson's trikom boyanması ile elde edilen histopatolojik bulguları özetlendiğinde;

- Azaldığı gözlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonunun (nötrofil, makrofaj), topikal astaksantin lokal antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileriyle ilişkili olarak geliştiği,
- Yara ağzında artış gösterdiği belirlenen fibroblast sayısının, granülasyon dokusunun oluşumunda aktif hale geldiği,
- Kolajen liflerin erken dönemde organize şekilde birikmeye başladığı (3.gün),
- Anjiyogenezin erken başladığı ve kapiller damar oluşumunun arttığı,
- Daha düzenli bir doku mimarisinin geliştiği, inflamasyon-kolajen-epitel geçişlerinin tanımlı hale geldiği,
- Stratum corneum'un en net şekilde gözlemlendiği epitelizasyon sürecinin, bu grupta belirginleştiği görüldü.

Histopatolojik bulguların gruplara ve günlere göre değişimi Çizelge 4.4'te verilmiştir.

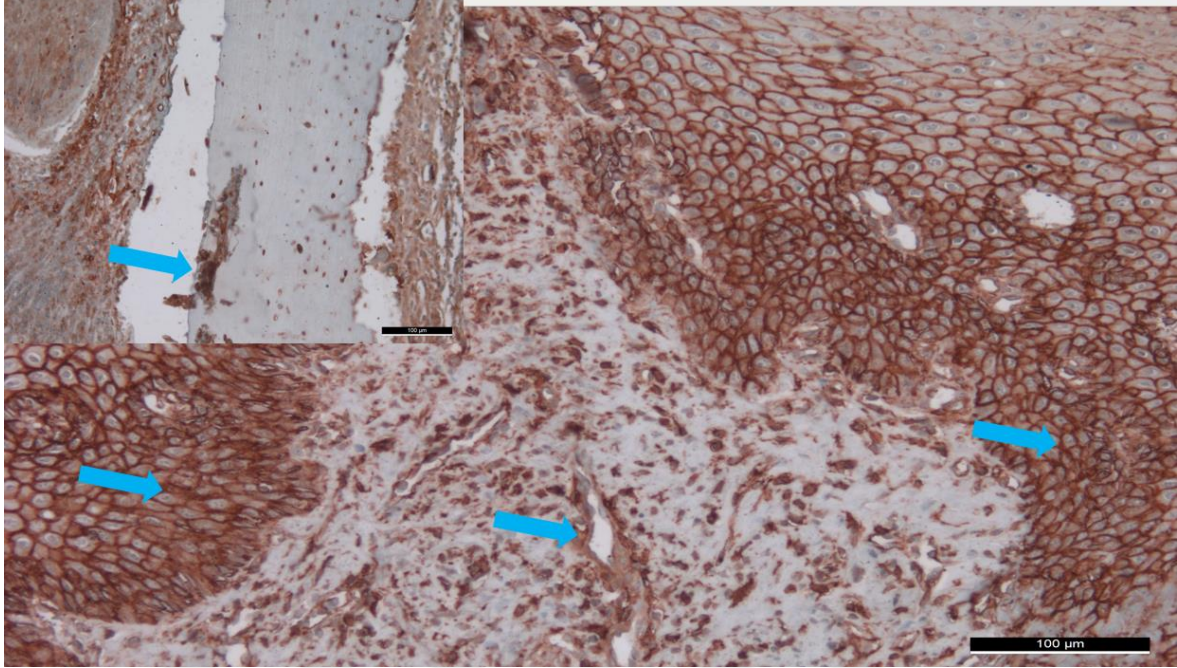
Çizelge 4.4. Yara iyileşme sürecinde 3 grup için karşılaştırmalı histopatolojik bulgular

Gün	Grup	Epitelizasyon	Lamina Propria (Bağ Doku)
3. Gün	Kontrol	Açık yara varlığı Minimal epitel proliferasyonu Belirsiz bazal membran	Yoğun inflamasyon Belirgin ödem Düzensiz kolajen
	Sistemik Astaksantin	Orta düzey epitel proliferasyonu Bazal membran korunumu	Orta düzey inflamasyon Azalmış ödem Düzensiz kolajen
	Topikal Astaksantin	Belirgin epitel proliferasyonu Bazal membran korunumu	Hafif inflamasyon Başlamış kolajen sentezi
5. Gün	Kontrol	Başlamamış epitel kapanması Belirsiz bazal membran	Devam eden inflamasyon Düşük fibroblast aktivitesi Minimal kolajen sentezi
	Sistemik Astaksantin	Başlamış epitelizasyon Bazal membranda netleşme	Hafif inflamasyon Orta düzey kolajen sentezi Artmış anjiyogenez
	Topikal Astaksantin	Başlamamış epitel kapanması Net bazal membran	Belirgin azalmış inflamasyon Organize olmaya başlayan kolajen lifler
7. Gün	Kontrol	Tamamlanmış epitel kapanması Keratinizasyon yok	Devam eden inflamasyon Düzensiz kolajen Tam gelişmemiş anjiyogenez
	Sistemik Astaksantin	Tamamlanmış epitel kapanması Başlamamış keratinizasyon	İyi kolajen organizasyonu Tamamlanmak üzere anjiyogenez
	Topikal Astaksantin	Tamamlanmış epitelizasyon Başlamış keratinizasyon	Biten inflamasyon Organize kolajen lifler Tamamen yenilenmiş bağ dokusu

4.4. MMP-9 İmmünohistokimya Değerlendirmesi

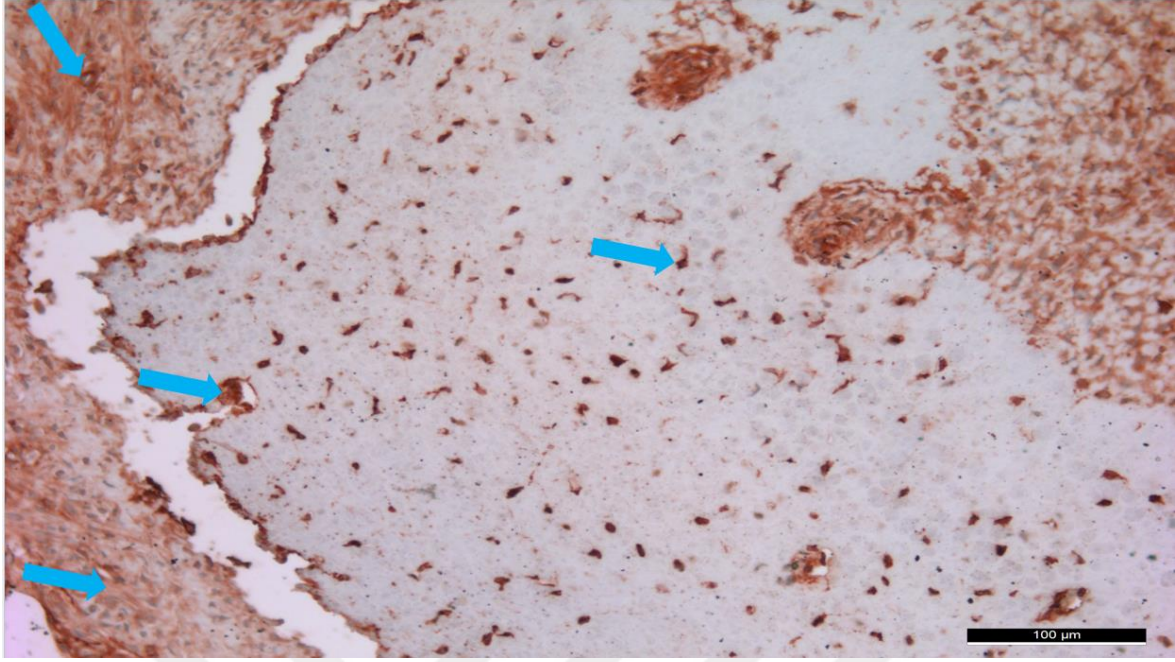
MMP-9, yara iyileşmesinin erken evresinde ECM yıkımı ve doku yeniden şekillenmesinde görev alan bir proteaz enzimidir. ECM bileşenlerini parçalayan bu enzim, aynı zamanda sekretuar bir protein olup hücre içinde sentezlendikten sonra golgi aygıtı ve endoplazmik retikulumda işlenir ve veziküller aracılığıyla dış ortama salgılanır. Bu nedenle, immünohistokimyasal boyama ile en yoğun tutulum sitoplazmada gözlenir.

3. gün kontrol grubunda, akut inflamasyonun belirgin olduğu, MMP-9'un tüm tabakalarda aktif rol oynadığı evre olduğu görüldü. MMP-9 ekspresyonunun en yoğun şekilde lamina propriada (yoğun bağ dokusu yıkımı) ve kemik dokuda (osteoklast kaynaklı rezorpsiyon) lokalize olduğu izlendi. Epitel dokuda iyileşme süreci henüz başlamamış olup, MMP-9 aktivitesi epitel bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak yüksek düzeyde izlendi (Resim 4.30).



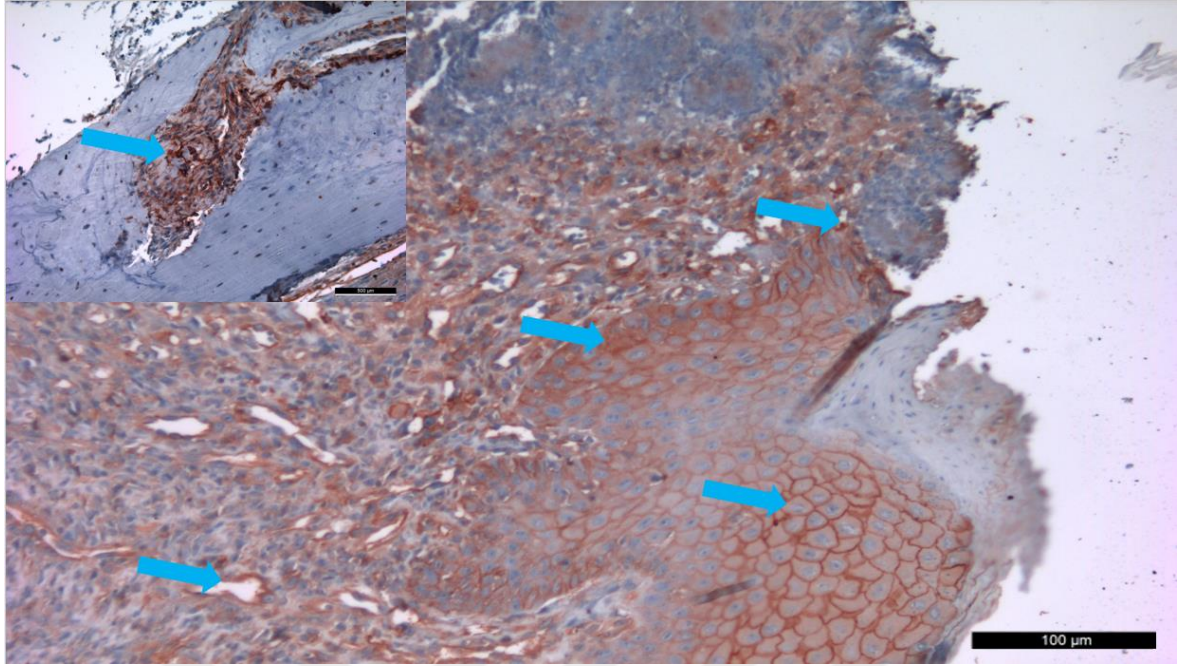
Resim 4.30. 3. gün kontrol grubu (MMP-9 tutulumu). İmmunohistokimya Değerlendirme. Epitelde, ekstraselüler matrikste, yeni oluşan damarlarda ve yara bölgesindeki kemik dokunun osteoklastlarında ve osteoblastlarında MMP-9 tutulumu; (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

5. gün kontrol grubunda yara iyileşmesinin granülasyon ve proliferasyon evreleri arasında geçiş döneminde olduğu gözlemlendi. MMP-9 ekspresyon düzeyinin hâlâ yüksek seyretmesi inflamatuvar hücre infiltrasyonunun devam etmesiyle ilişkilendirildi. Fibroblast aktivitesinin belirgin olduğu saptanmakla birlikte, doku matürasyonunun henüz tamamlanmadığı gözlemlendi. Kemik dokusunda, osteoklastlarda ve osteoblastlarda pozitif MMP-9 tutulumu izlendi. ECM'deki belirgin MMP-9 tutulumu, doku yıkımının sürdüğünü ve iyileşme sürecinin kontrolsüz bir şekilde ilerlediğini gösterdi (Resim 4.31).



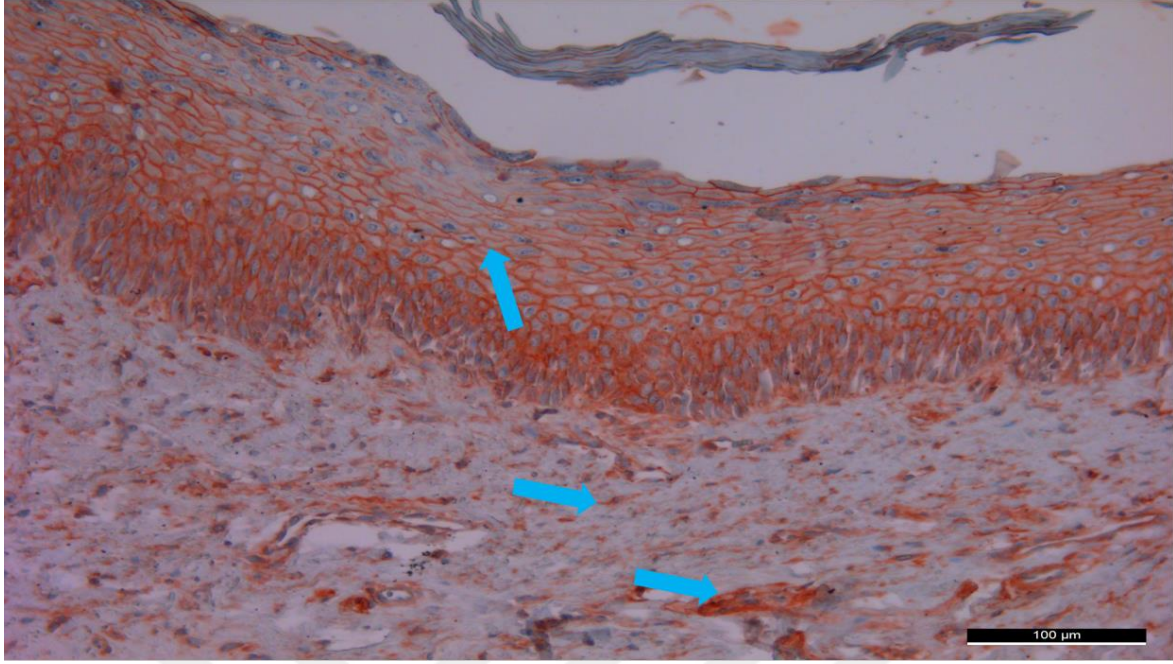
Resim 4.31. 5. gün kontrol grubu (MMP-9 tutulumu). Ekstraselüler matrikste, yeni oluşan damarlarda ve yara bölgesindeki kemik dokunun osteoklastlarında ve osteoblastlarında MMP-9 tutulumu; (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

7. gün kontrol grubunda; inflamasyonun tamamen çözülmemiş olması nedeniyle MMP-9 ekspresyonunun orta-yüksek düzeyde seyrettiği ve inflamatuvar hücre aktivitesinin devam ettiği görüldü. Geniş bir alanda diffüz MMP-9 pozitiflik, özellikle yara kenarında ve granülasyon dokusunda izlendi. Kolajen sentezinin başlamış olmasına rağmen, ECM yıkımının devam ettiği gözlemlendi. Epitelizasyonun sürecinin henüz tamamlanmamış ve epitel dokunun düzensiz bir yapıda olduğu tespit edildi. Yoğun ECM yıkımına bağlı olarak çevresel kolajen dokuda düzensizlik ile birlikte MMP-9 yoğunluğunun arttığı görüldü. Kemik dokusunda da yara bölgesine komşu osteoblastlar ve osteoklastlarda pozitif reaksiyon saptandı. (Resim 4.32).



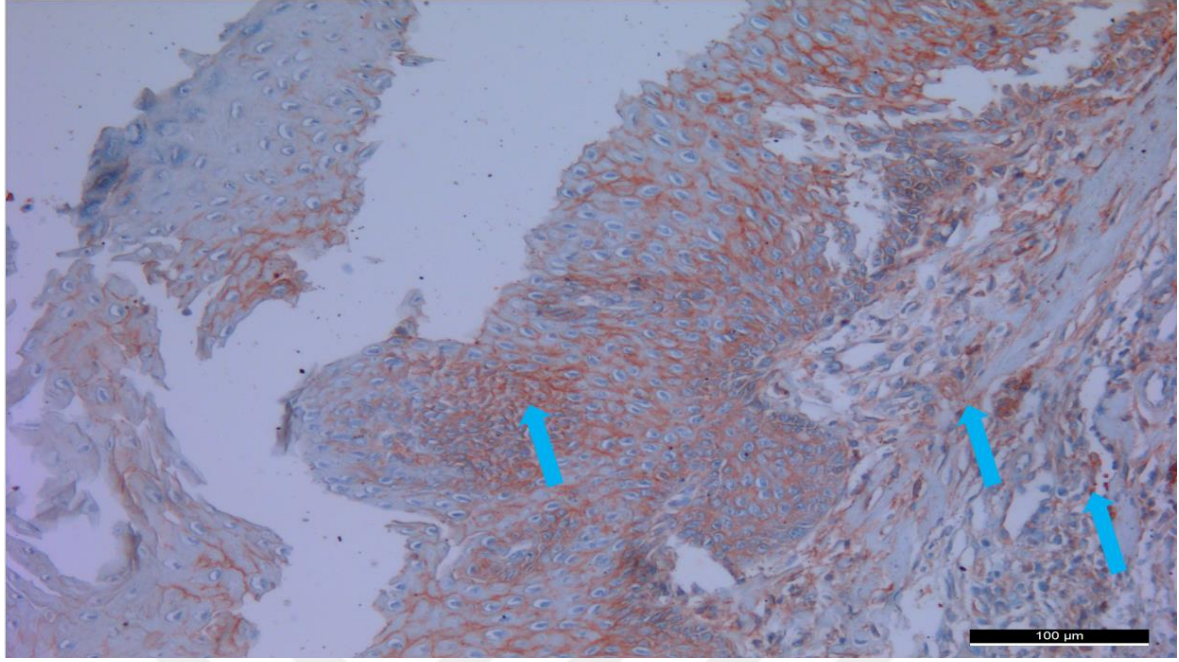
Resim 4.32. 7. gün kontrol grubu (MMP-9 tutulumu). Epitelde, yeni oluşan damarlarda ve ekstraselüler matrikste ve kemik dokuda MMP-9 tutulumu; (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

3. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, yara iyileşmesi, kontrol grubuyla kıyaslandığında daha düşük-orta seviyede, düzenli bir epitelyal tutulumun olduğu görüldü. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, lamina propriada astaksantin proteolitik aktiviteyi kontrol altına alarak azalttığı, MMP-9 ekspresyonunu orta seviyede sınırladığı izlendi. 3. gün kontrol grubunda yüksek MMP-9 ekspresyon seviyesi yoğun inflamasyon ve aktif yıkımı gösterirken; SA uygulanan bu grupta daha dengeli ve kontrollü bir doku yanıtı gözlemlendi (Resim 4.33).



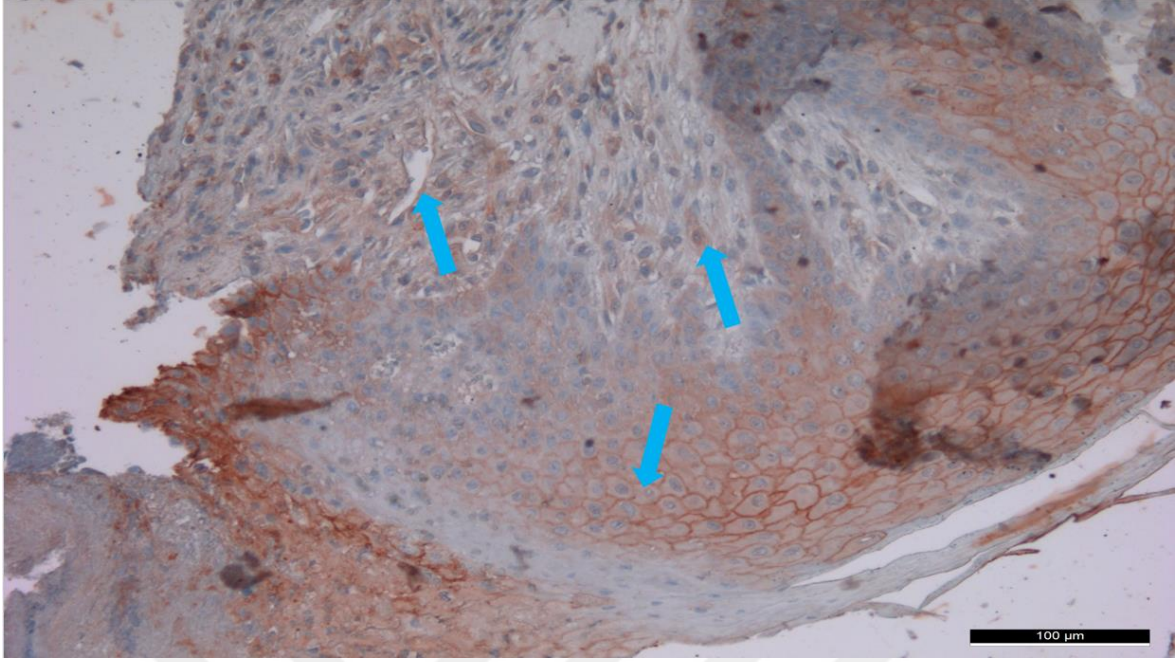
Resim 4.33. 3. gün SA grubu (MMP-9 tutulumu). Epitelde, yeni oluşan damarlarda ve ekstraselüler matrikste MMP-9 tutulumu; ($\Rightarrow$,mavi ok), 2OX, AEC

5. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, MMP-9 ekspresyonu ile karşılaştırılması sonucu bu grupta MMP-9 ekspresyonunun daha kontrollü ve sınırlı düzeyde seyrettiği gözlemlendi. Epitelizasyonun, fibroblast aktivasyonunun ve kemik iyileşmesinin hızlandığı, anjiyogenez sürecinin düzenlendiği görüldü. Epitelde, yara kapanmasına yakın bölgelerde MMP-9 ekspresyonu yüksek seviyelerde izlenirken, diğer bölgelerde daha düşük ekspresyon seviyeleri tespit edildi. Lamina propriada artmış fibroblast aktivitesiyle ilişkili olarak daha düşük MMP-9 ekspresyon seviyeleri izlendi. Damarlarda orta seviyede tutulum MMP-9 tutulumu gözlemlendi (Resim 4.34).



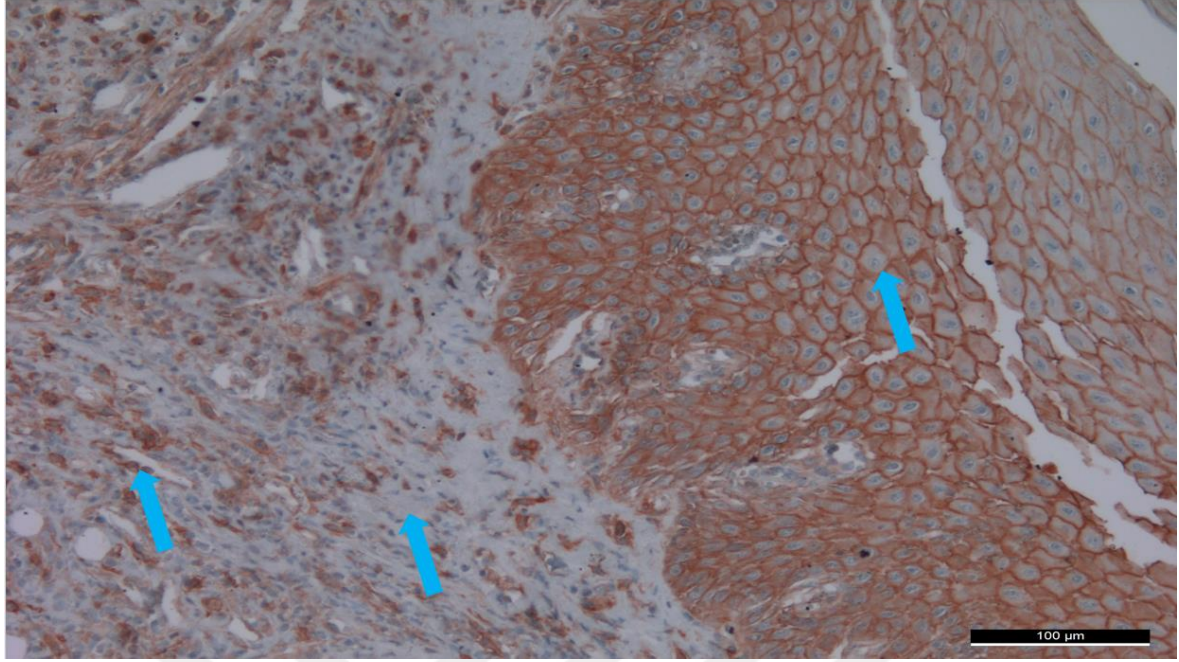
Resim 4.34. 5. gün SA grubu (MMP-9 tutulumu). Epitelde, yeni oluşan damarlarda ve ekstraselüler matrikste MMP-9 tutulumu; (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

7. gün sistemik astaksantin uygulanan grupta, kontrol grubunun 7. gün MMP-9 ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılması sonucu, bu grupta proteinin ekspresyonunun kontrol altında olduğu, epitelizasyonun neredeyse tamamlandığı ve lamina propriada inflamasyonun baskılanmış olmasıyla ilişkili olarak MMP-9 ekspresyonunun düştüğü, kolajen düzeninin arttığı ve inflamasyonun minimal seviyede seyrettiği görüldü (Resim 4.35).
- 8.



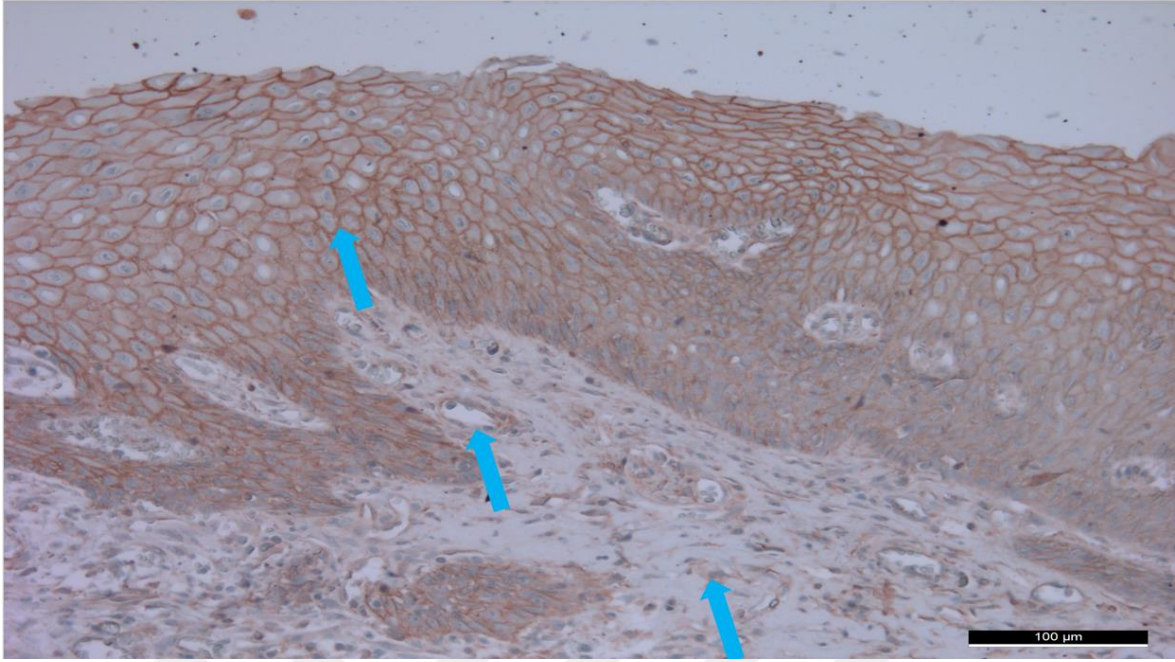
Resim 4.35. 7. gün SA grubu (MMP-9 tutulumu). Epitelde, yeni oluşan damarlarda ve ekstraselüler matrikste MMP-9 tutulumu; (⇔,mavi ok), 2OX, AEC

3. gün topikal astaksantin uygulanan grupta, SA grubuyla kıyaslandığında, yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu görüldü. Epitelde tutulumun diğer iki gruba kıyasla daha düşük olduğu görülse de orta seviyelerde tutulum izlendi. Lamina propriada ve damarlarda daha düşük-orta seviyede tutulumun gösterdiği, kolajenler liflerin daha düzenli olduğu, inflamasyonun azaldığı ancak doku iyileşmesinin devam ettiği izlendi. (Resim 4.36).



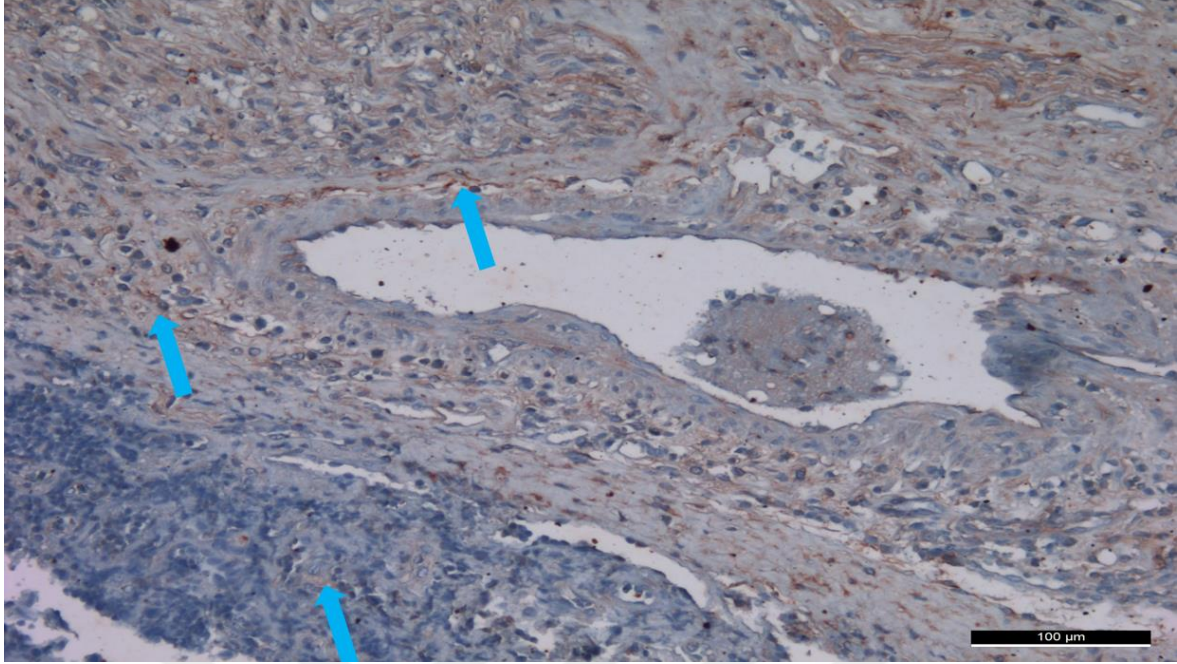
Resim 4.36. 3. gün TA grubu (MMP-9 tutulumu). Epitelde, yeni oluşan damarlarda ve ekstraselüler matrikste MMP-9 tutulumu; (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

5. gün topikal astaksantin uygulanan grupta, SA grubuyla kıyaslandığında, MMP-9 ekspresyonunun bu grupta daha düşük olduğu, topikal uygulamanın lokal antiinflamatuvar ve antioksidan etkisiyle belirgin şekilde baskılanmış olduğu görüldü. Lamina propriada organize kolajen yapısını varlığı, MMP-9 tutulumunun daha düşük düzeyde olduğu ve fibroblastik aktivitenin dengelendiği gözlemlendi. (Resim 4.37).



Resim 4.37. 5. gün TA grubu (MMP-9 tutulumu). Epitelde, yeni oluşan damarlarda ve ekstraselüler matrikste MMP-9 tutulumu; (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

7. gün topikal astaksantin uygulanan grupta, SA grubuyla kıyaslandığında MMP-9 ekspresyonunun epitel hücrelerinde minimal sitoplazmik düzeyde izlendiği görüldü. Bu durumun, epitelde inflamasyonun ve doku yıkımının sona ermesiyle MMP-9'un baskılandığını gösterdiği değerlendirildi. Tutulumun genellikle epitel-bazal membran geçiş arasındaki geçiş alanlarıyla sınırlı kaldığı tespit edildi. Lamina propriada kolajen liflerinin organize şekilde yerleştiği ve fibroblastların olgun dokuya geçtiği belirlendi. Anjiyogenezin azaldığı, damar yapılarının olgunlaştığı ve yeni damar oluşumunun durduğu izlendi (Resim 4.38).



Resim 4.38. 7. gün TA grubu (MMP-9 tutulumu). Epitelde, yeni oluşan damarlarda ve ekstraselüler matrikste MMP-9 tutulumu; (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

Grupların MMP-9 ekspresyonuna ait immünohistokimyasal analiz bulguları genel hatlarıyla özetlendiğinde;

Sadece yara oluşturulan kontrol grubunda, MMP-9 ekspresyonunun 3., 5. ve 7. günlerde yüksek düzeylerde seyrettiği; epitel, lamina propria ve vasküler alanlarda belirgin sitoplazmik tutulumu rastlandığı görüldü

Sistemik astaksantin uygulanan grupta, sistemik antioksidan ve antiinflamatuvar etki doğrultusunda MMP-9 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı ve 5. gün itibarıyla epitel ile bağ dokusunda iyileşmenin hızlandığı gözlemlendi. Ekspresyon düzeyleri orta seviyelerde seyretti.

Topikal astaksantin uygulanan grupta MMP-9 ekspresyonunun belirgin biçimde baskılandığı, özellikle 7. günde epitel dokunun tamamen olgunlaşmış olduğu ve lamina proprianın organize bağ dokusuna dönüştüğü tespit edildi. Vasküler yapılarda anjiyogenez aktivitesinin azaldığı ve MMP-9 tutulumunun minimum düzeye indiği gözlemlendi.

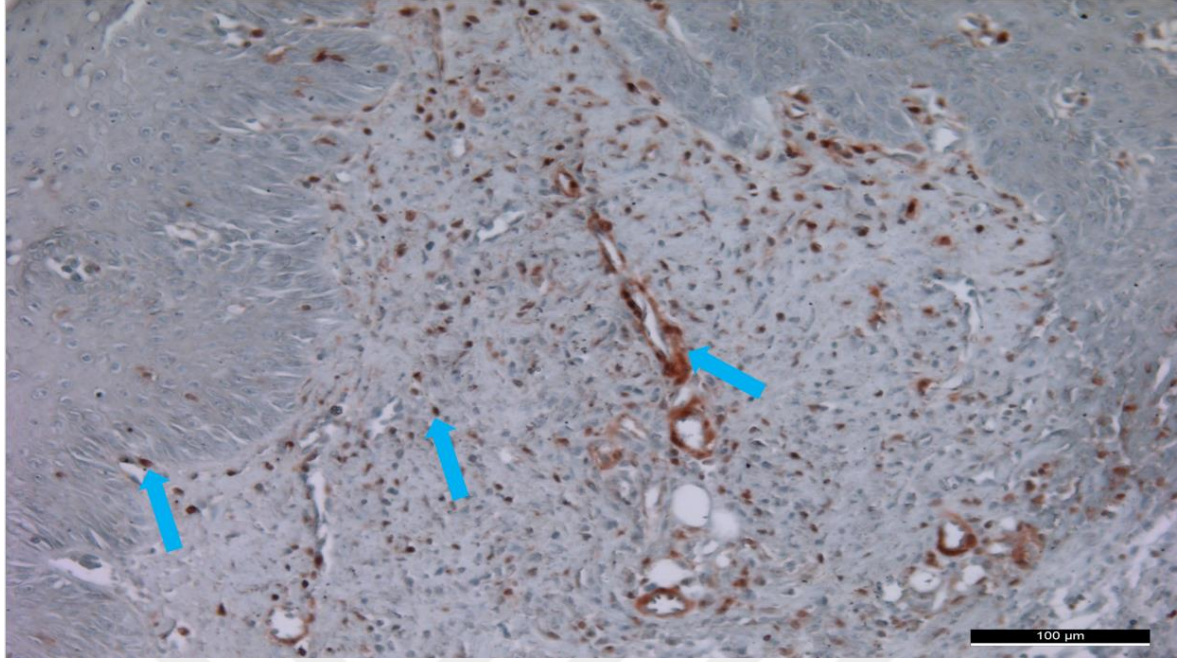
4.5. S100A4 İmmünohistokimya Değerlendirmesi

S100A protein ailesi, kalsiyuma bağlanabilen, düşük moleküler ağırlıklı proteinlerden oluşmakta olup, birçok hücresel süreçte rol alır. Sekonder yara iyileşmesinde özellikle bağışıklık yanıtı, inflamasyon, hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi mekanizmalarda görev alır [151]. S100A4 proteinleri, özellikle S100A8 (MRP8) ve S100A9 (MRP14) heterodimeri (aynı zamanda calprotectin olarak bilinir), yara iyileşmesinin inflamatuvar evresinde aktif rol oynar [151,341,342]. Bu proteinlerin başlıca özellikleri şunlardır:

- Nötrofil ve monositlerde yüksek düzeyde eksprese edilir.
- Kemotaktik etki göstererek nötrofillerin ve makrofajların yara bölgesine göçünü sağlar.
- Hasarla ilişkili moleküler yapılar (DAMPs) olarak görev yapar, toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) üzerinden immün yanıtı aktive eder.
- Antimikrobiyal etkiler göstererek enfeksiyon riskini azaltır.
- Matriks yeniden şekillenmesinde ve epitel hücrelerinin proliferasyonunda rol oynar.

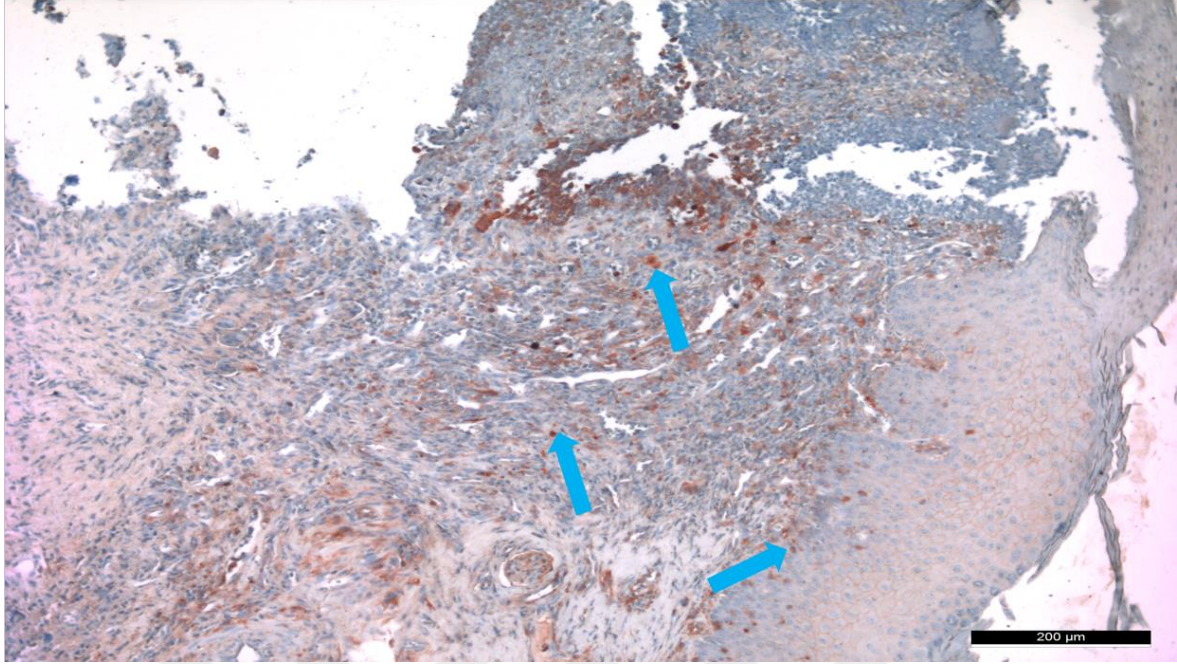
S100A4 proteinleri normalde sitoplazmada ve kısmen nükleus içinde lokalize olur. Hücre içi sinyal yollarını modüle ederken aynı zamanda sekretuar veziküller yoluyla da ekstraselüler alana salınabilirler. Bu salınım sonrası parakrin etkiler göstererek çevredeki hücreleri etkiler [151]. Mukozal epitelde ve submukozal immün hücrelerde sitoplazmik yoğunlukta bulunur. İmmünohistokimyasal boyamalarda, sitoplazmik pozitiflik genellikle daha yoğun inflamasyon bölgelerinde gözlenir.

3. gün kontrol grubunda, S100A4 immünohistokimyasal boyama sonucunda epitel tabakasında belirgin bir pozitiflik izlenmedi. Yara kenarındaki bazal epitel hücrelerinde yer yer zayıf düzeyde sitoplazmik boyanma izlendi. Lamina propria tabakasında, özellikle yara kenarına komşu alanlarda yoğunlaşan nötrofiller ve monosit-makrofaj benzeri hücrelerde orta düzeyde sitoplazmik pozitiflik gözlemlendi. Submukozal tabakada sınırlı sayıda fagositik hücrede zayıf düzeyde S100A4 pozitifliği saptanmış olup, bu ekspresyonun daha çok damar çevresinde yer alan immün hücrelerle sınırlı kaldığı gözlemlendi. (Resim 4.39).



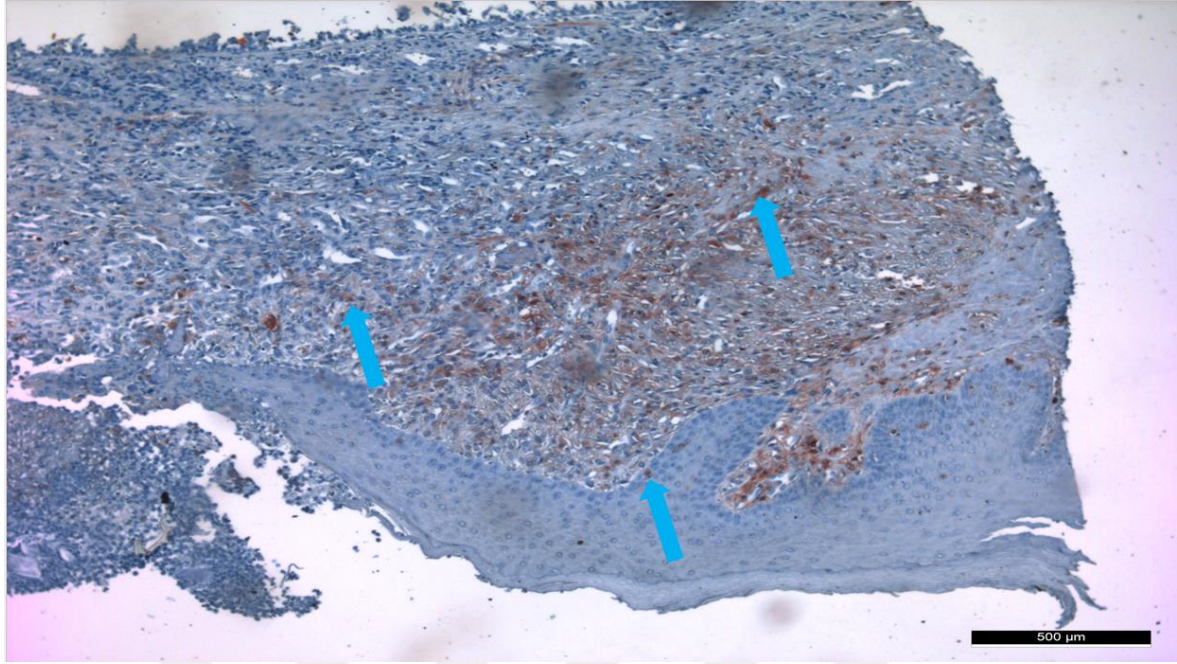
Resim 4.39. 3. gün kontrol grubu (S100A4 tutulumu). Epitel bazal hücrelerinde, mikrovasküler yapılarda ve fagositik hücrelerde S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 20X, AEC

5. gün kontrol grubunun değerlendirmesinde, bazal hücre tabakasına sınırlı olmak üzere sitoplazmik düzeyde hafif-orta şiddette S100A4 pozitifliği tespit edildi. Boyanma, epitel hücre proliferasyonunun devam ettiği bölgelerde daha belirgindi. Lamina propria tabakasında ise önceki güne kıyasla artmış sayıda immün hücrede (özellikle makrofaj ve bazı nötrofillerde) orta-yüksek düzeyde sitoplazmik boyanma gözlemlendi. Bu pozitif hücreler özellikle yara yatağını çevreleyen bağ doku içinde ve damar çevresinde kümelenmiş şekilde izlendi. İnflamatuar hücre infiltrasyonunun devam ettiği alanlarda sınırlı sayıda pozitif fagositik hücreye rastlandı (Resim 4.40).



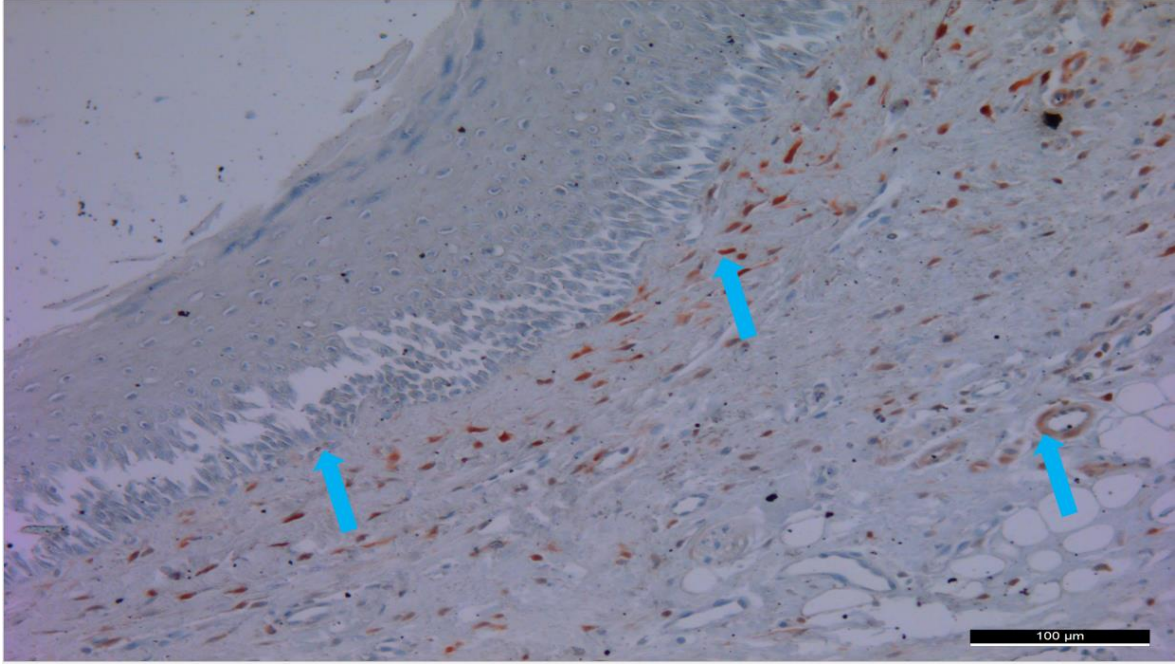
Resim 4.40. 5. gün kontrol grubu (S100A4 tutulumu). Epitel bazal hücrelerinde, mikrovasküler yapılarda ve fagositik hücrelerde S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 10X, AEC

7. gün kontrol grubunun değerlendirmesinde epitel tabakasında bazal katmanla sınırlı olmak üzere bazı hücrelerde zayıf düzeyde sitoplazmik S100A4 pozitifliği gözlemlendi; yüzeysel epitel hücrelerinde pozitifliğin tespit edilemediği görüldü. Lamina propriada inflamatuvar hücre sayısında kısmi bir azalma olmasına rağmen makrofajlarda ve bazı mononükleer hücrelerde orta düzeyde pozitifliğin devam ettiği belirlendi. Pozitif hücreler genellikle yara bölgesine komşu damar çevresinde ve subepitelyal bağ doku içinde dağılmış olarak yer aldı. Submukoza tabakasında önceki günlere kıyasla daha az sayıda pozitif hücre izlendiği; boyanmanın, yalnızca yara hattına yakın damar çevresindeki sınırlı fagositik hücrelerle sınırlı kaldığı görüldü (Resim 4.41).



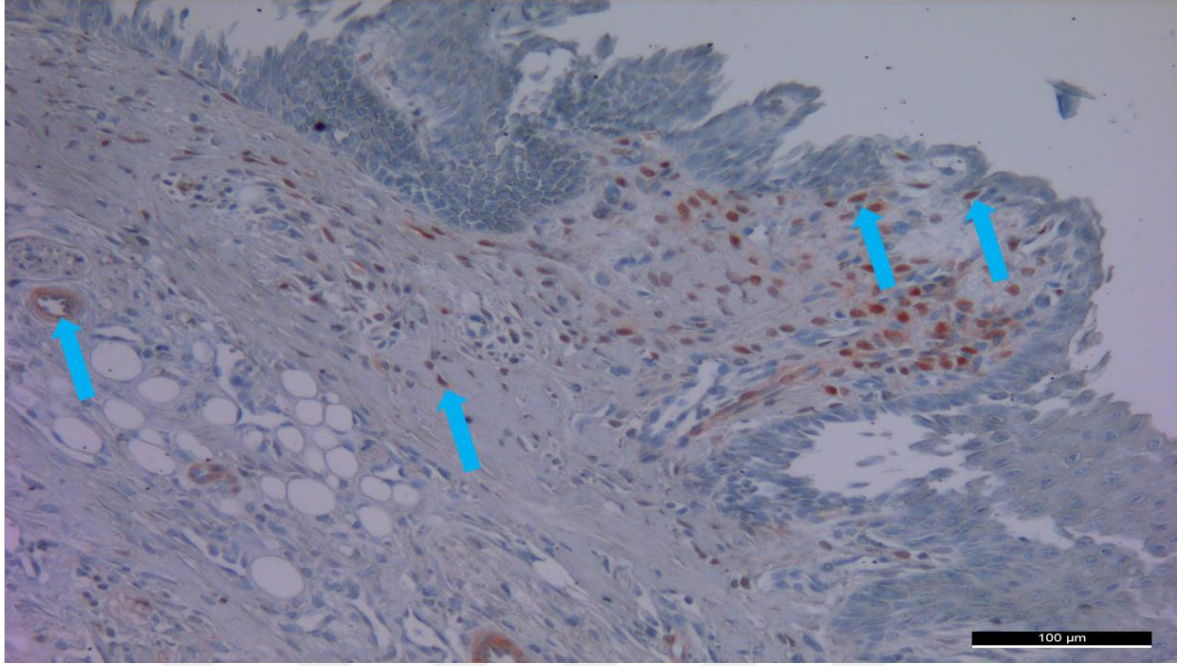
Resim 4.41. 7. gün kontrol grubu (S100A4 tutulumu). Epitel bazal hücrelerinde, mikrovasküler yapılarda ve fagositik hücrelerde S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 4X, AEC

Sistemik astaksantin uygulanan grubun 3. gününde kontrol grubuna kıyasla epitel tabakasında belirgin bir S100A4 pozitifliği gözlenmediği, ancak yara kenarına yakın olan subepitelyal bölgede pozitif tutulum izlendi. Bu bulgunun kontrol grubuna benzerlik gösterdiği, ancak bazı kesitlerde epitel bütünlüğünün daha iyi korunduğu tespit edildi. Lamina propria tabakasında ise, kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda nötrofil ve makrofaj benzeri hücrede S100A4 pozitifliği saptandı. Pozitiflik, mikrovasküler yapıların çevresinde, fakat daha dağınık ve zayıf düzeyde izlendi. (Resim 4.42).



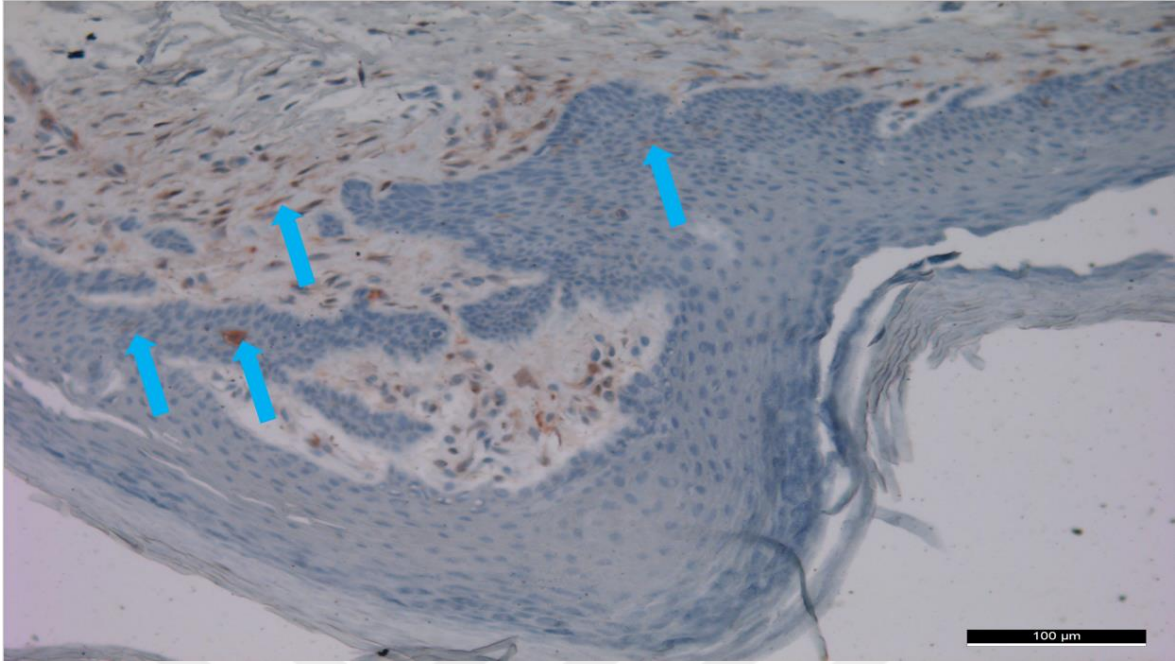
Resim 4.42. 3. gün SA grubu (S100A4 tutulumu). Epitel bazal hücrelerinde, mikrovasküler yapılarda ve fagositik hücrelerde S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 20X, AEC

Sistemik astaksantin uygulanan grubun 7. gününde epitel tabakasında özellikle bazal epitel hücrelerinde, S100A4 ekspresyonu daha yaygın ve orta düzeyde sitoplazmik pozitiflik gözlemlendi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, epitel tabakasında gözlenen pozitiflik daha belirgin ve yaygın olduğu, epitel bütünlüğünün daha ileri seviyede korunduğu görüldü. Lamina propriada, kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda inflamatuvar hücre ve pozitif hücrelerdeki S100A4 boyanmanın daha sınırlı kaldığı görüldü (Resim 4.43).



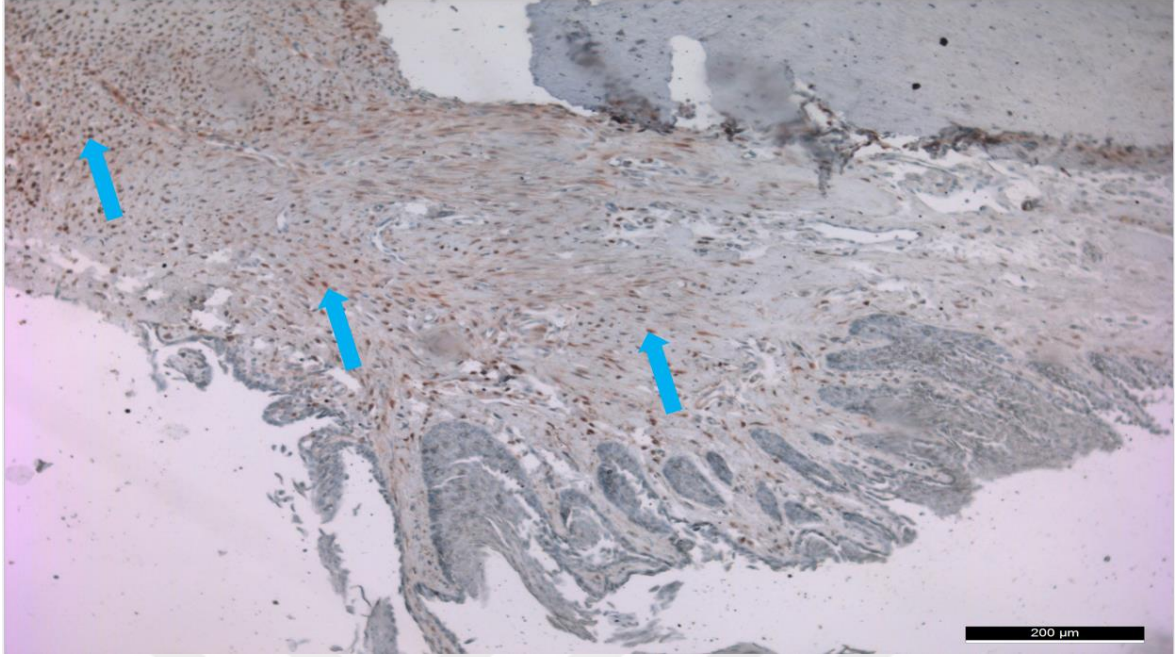
Resim 4.43. 5. gün SA grubu (S100A4 tutulumu). Epitel bazal hücrelerinde, mikrovasküler yapılarda ve fagositik hücrelerde S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 20X, AEC

Sistemik astaksantin uygulanan grubun 7. gününde epitel tabakasında bazal hücrelerde hafif düzeyde sitoplazmik S100A4 pozitifliği devam ettiği görüldü. Kontrol grubuna kıyasla, epitel yeniden şekillenmesi daha homojen ve tabaka bütünlüğü daha net izlendi. Lamina propriada S100A4 pozitifliğinin belirgin azaldığı, yalnızca bazı makrofaj benzeri hücrelerde hafif düzeyde boyanma ile izlendiği gözlemlendi (Resim 4.44).



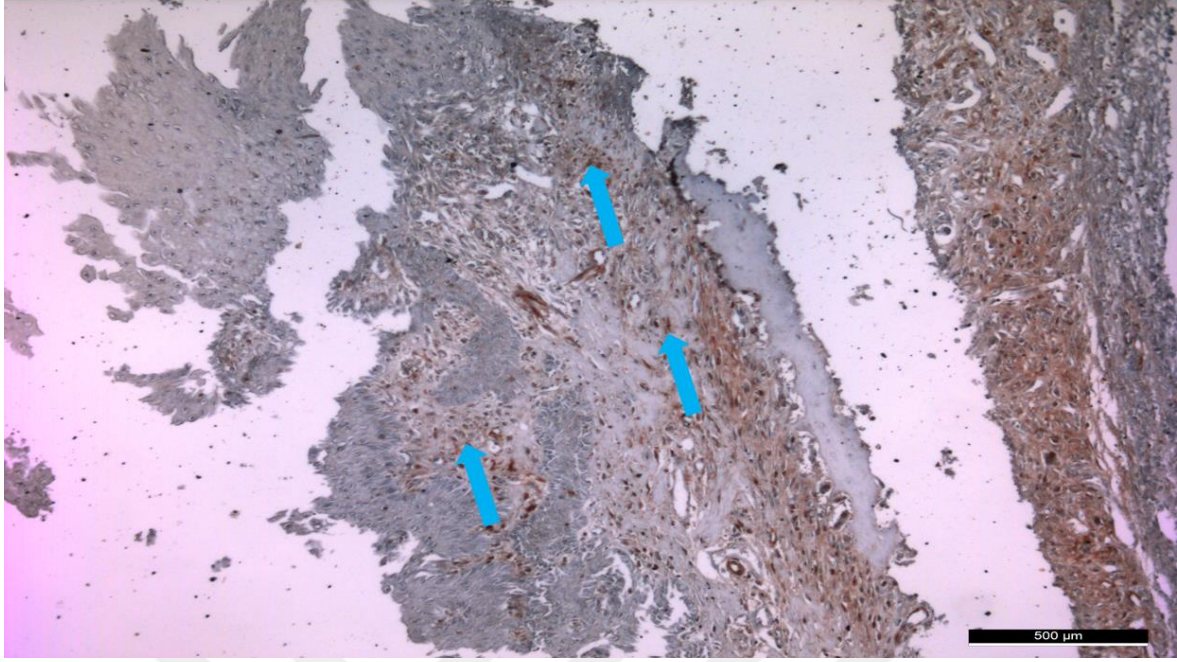
Resim 4.44. 7. gün SA grubu (S100A4 tutulumu). Epitel bazal hücrelerinde ve lamina propriada S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

Topikal astaksantin uygulanan grubun 3. gününde, epitel tabakasında belirgin bir S100A4 ekspresyonu gözlenmediği, yalnızca yara kenarına yakın bazal epitel hücrelerinde sınırlı sayıda hücrede zayıf düzeyde sitoplazmik boyanma tespit edildiği izlendi. Bu yönüyle epiteldeki ekspresyonun kontrol ve SA grubuyla benzerlik gösterdiği izlendi. Lamina propria düzeyinde ise TA grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek yoğunlukta S100A4 pozitifliği izlendi. Özellikle nötrofil ve makrofaj benzeri inflamatuvar hücrelerdeki orta-yüksek şiddette sitoplazmik boyanma tespit edildi. SA grubunda bu hücreler arası pozitifliğin daha sınırlı kaldığı ve düşük düzeyde seyrettiği görüldü (Resim 4.45).



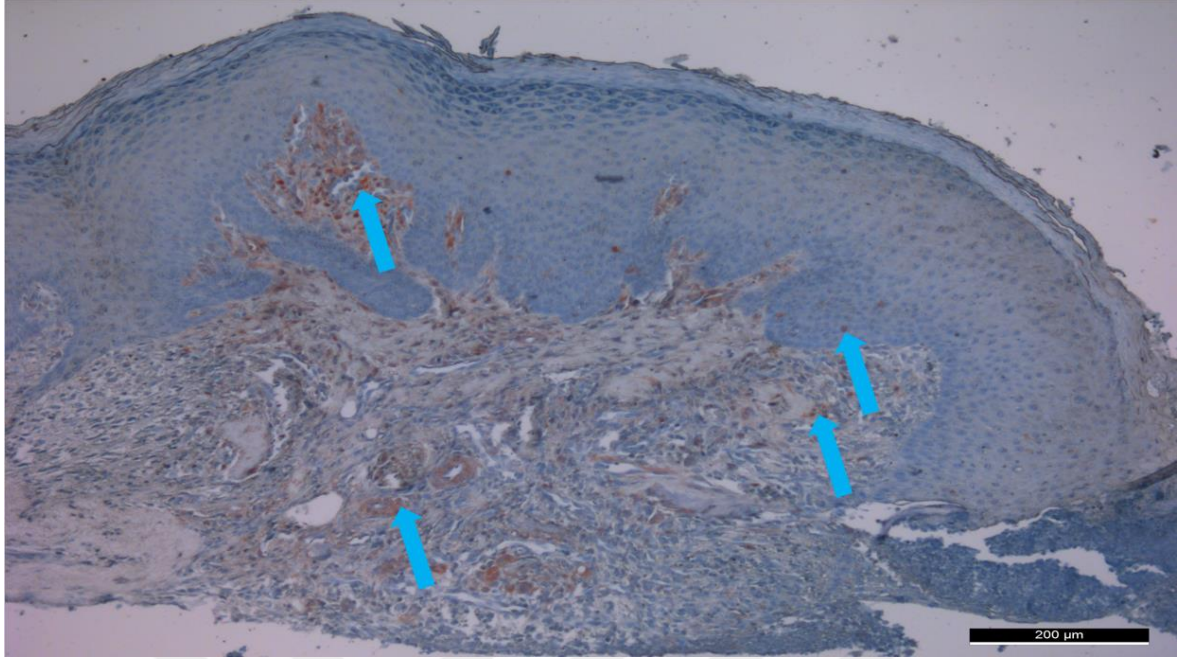
Resim 4.45. 3. gün TA grubu (S100A4 tutulumu). Lamina propriada S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

Topikal astaksantin uygulanan grubun 5. gününde, özellikle yara bölgesini örten yeniden organize olmuş alanlarda bazal ve parabazal hücrelerde S100A4 pozitifliği orta şiddette ve daha yaygın şekilde saptandı. Bu pozitiflik, kontrol grubuna kıyasla daha homojen ve belirgin, SA grubuyla benzer düzeyde ancak lokalizasyon açısından daha sınırlı (sadece yara örtüsü ile ilişkili epitelde) izlendi. Lamina propria tabakasında ise önceki güne kıyasla inflamatuvar hücre sayısında azalma gözlemlendi, S100A4 ekspresyonu daha çok makrofaj benzeri hücrelerle sınırlı kaldı. Kontrol gruplarına kıyasla pozitif hücre sayısının azaldığı, sistemik grubun ise bir miktar üzerinde seyrettiği görüldü. Bu tablo, topikal uygulamanın lokal inflamatuvar yanıtı erken aktive ettiğini ancak 5. günde bu yanıtı kontrol altına alarak proliferatif faza geçişi desteklediğini gösterdi (Resim 4.46).



Resim 4.46. 5. gün TA grubu (S100A4 tutulumu). Bazal ve parabazal hücrelerde ve lamina propriada pozitiflik (⇒,mavi ok), 2OX, AEC

Topikal astaksantin uygulanan grubun 7. gününde, TA grubunda epitel tabakasında bazal hücrelerde hafif düzeyde S100A4 pozitifliği izlenmeye devam etti. Epitel tabakası genel olarak düzenli ve bütünlüğü sağlanmış görünümde olup, S100A4 ekspresyonunun sistemik grubun düzeyiyle benzerlik gösterdiği tespit edildi. Kontrol grubuna kıyasla epiteldeki pozitifliğin daha hafif ve sınırlı olduğu, buna karşın yara örtüsünün tamamlanma düzeyinin daha ileri seviyede olduğu gözlemlendi. Lamina propria tabakasında ise inflamatuvar hücre sayısında bariz bir azalma görüldü; yalnızca sınırlı sayıda makrofaj benzeri hücrede zayıf düzeyde S100A4 pozitifliği saptandı. Bu durum, kontrol grubuna göre belirgin bir düşüşü gösterirken, SA grubuyla benzer bir inflamasyon çözülme profili sergilediği belirlendi (Resim 4.47).



Resim 4.47. 7. gün TA grubu (S100A4 tutulumu). Epitel bazal hücrelerinde ve lamina propriada S100A4 tutulumu (⇒,mavi ok), 1OX, AEC

Gruplarda S100A4 ekspresyonuna yönelik immünohistokimyasal analiz bulguları genel hatlarıyla değerlendirildiğinde;

Astaksantin uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla epitel proliferasyonu ve inflamasyon çözülmesinde belirgin iyileştirici etkiler sağlandığı gözlemlendi.

TA grubunda, özellikle erken dönemde inflamatuvar hücre sayısında artış gözlemlendi, ancak geç dönemde inflamasyon baskılanarak epitel iyileşmesinin hızlandığı izlendi. 5. ve 7. günlerde, topikal astaksantin etkisiyle lamina propria düzeyinde inflamasyonun belirgin şekilde azaldığı ve epitel tabakasında daha düzenli bir yeniden şekillenme gözlemlendi. Buna karşılık, SA grubu inflamasyonu daha erken ve etkili bir şekilde modüle ederek epitel hücrelerinin proliferasyonunu destekledi ve geç dönemde daha hızlı bir iyileşme sağladı.

Sistemik astaksantin uygulaması daha dengeli ve sistematik bir iyileşme süreci sağlarken, topikal astaksantin uygulaması lokal inflamasyonun hızlı çözülmesi ve epitel yenilenmesinde etkili oldu. Her iki astaksantin uygulaması da yara iyileşmesinde S100A4 ekspresyonunu olumlu yönde modüle etti ve iyileşme sürecine katkıda bulundu.

4.6. Histopatolojik Parametrelerin İstatistiksel Analizi

4.6.1. S100A4 H skorları

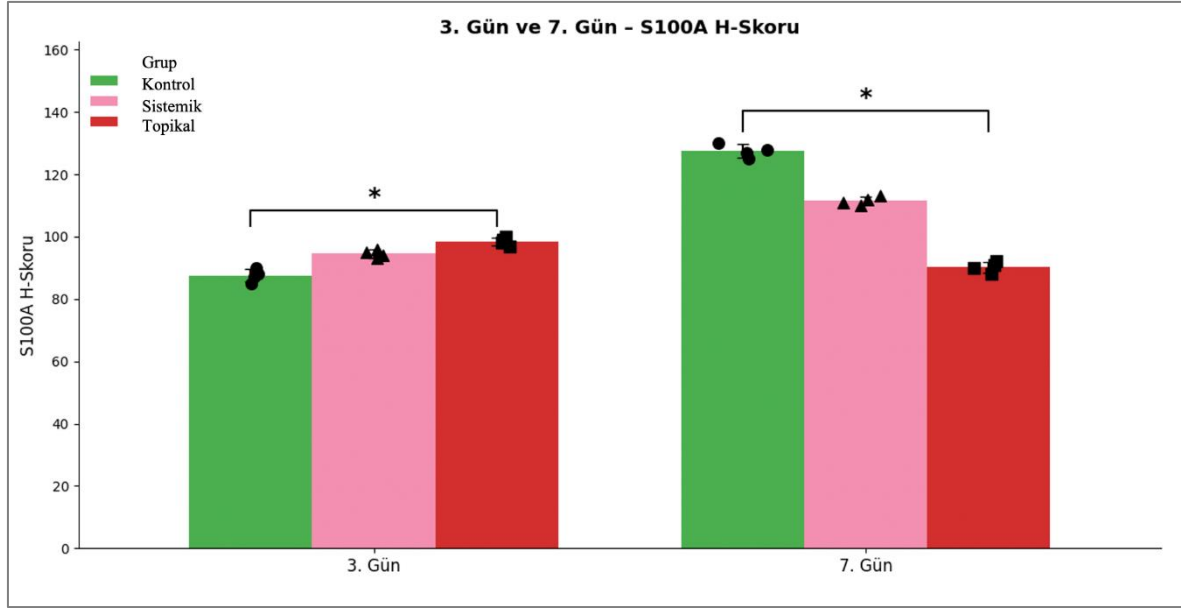
S100A4 H-skorlarına göre, tüm gruplarda 3. ve 7. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler saptandı. Kontrol grubunda S100A4 skoru 87.50 ± 2.08 'den 127.50 ± 2.08 'e çıkarak istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p=0.000$). SA grubunda skor 94.50 ± 1.29 'dan 111.50 ± 1.29 'a yükselmiş olup bu artış anlamlı bulundu ($p=0.001$). TA grubunda skor 98.50 ± 1.29 'dan 90.25 ± 1.71 'e düşerek anlamlı azalma gösterdi ($p=0.004$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.8).

ANOVA analizleri, her iki zaman noktasında gruplar arasında anlamlı fark bulunduğunu ortaya çıkardı (3. gün $F=48.522$; 7. gün $F=469.935$; $p=0.000$). Bonferroni karşılaştırmaları sonucunda, 3. günde en yüksek skor topikal grupta tespit edilirken, 7. günde en yüksek skor kontrol grubunda, en düşük skor ise topikal grupta belirlendi.

Çizelge 4.5. Detaylı iyileşme parametreleri, S100A4 skorlarının gruplar arası 3. ve 7. gün karşılaştırılması

	3. Gün Ort. $\pm$ S.s.	7. Gün Ort. $\pm$ S.s.	Test istatistiği (p)
Kontrol¹	87.50 ± 2.08	127.50 ± 2.08	$t = -\infty (0.000^*)$
Sistemik Astaksantin²	94.50 ± 1.29	111.50 ± 1.29	$t = -15.74 (0.001^*)$
Topikal Astaksantin³	98.50 ± 1.29	90.25 ± 1.71	$t = 8.00 (0.004^*)$
Test istatistiği (p)	$F=48.522 (0.000^*)$	$F=469.935 (0.000^*)$	
Bonferroni	$1 < 2 ; 1 < 3 ; 2 < 3$	$2 < 1 ; 3 < 2 ; 3 < 2$	

$p < 0.05$, t: Bağımlı örneklem t testi, F: Varyans analizi ANOVA testi. Bonferroni satırında sayılar arasındaki "<" ibaresi istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ($p < 0.05$).

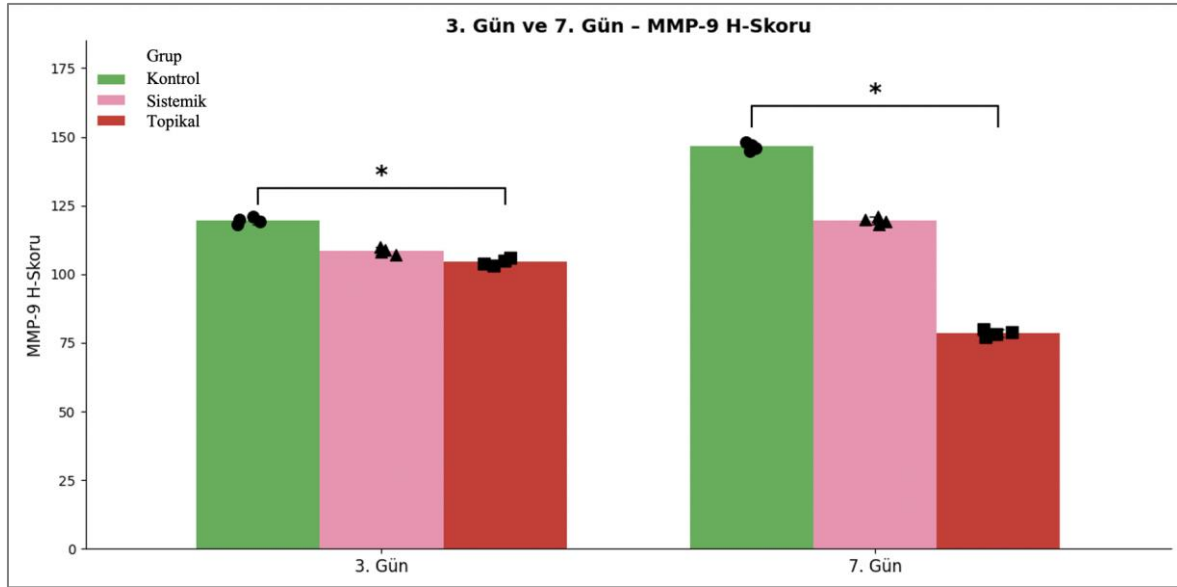


Şekil 4.8. S100A4 skorlarının gruplar arası 3. ve 7. gün karşılaştırılma grafiği

4.6.2. MMP-9 H skorları

MMP-9 H-skorlarına ilişkin değerlendirmede, tüm gruplarda 3. günden 7. güne anlamlı değişiklikler saptandı ($p < 0.001$). Kontrol ve SA gruplarında MMP-9 düzeyleri anlamlı şekilde artış gösterirken, TA grubunda belirgin bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.9).

ANOVA analizleri, 3. ve 7. gün verilerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu gösterdi ($p < 0.001$). Bonferroni çoklu karşılaştırmalarına göre her iki zaman noktasında da MMP-9 skorları sırasıyla Kontrol > SA > TA şeklinde sıralandı (Çizelge 4.6).



Şekil 4.9. MMP-9 H-skorlarının gruplar arası 3. ve 7. gün karşılaştırılması

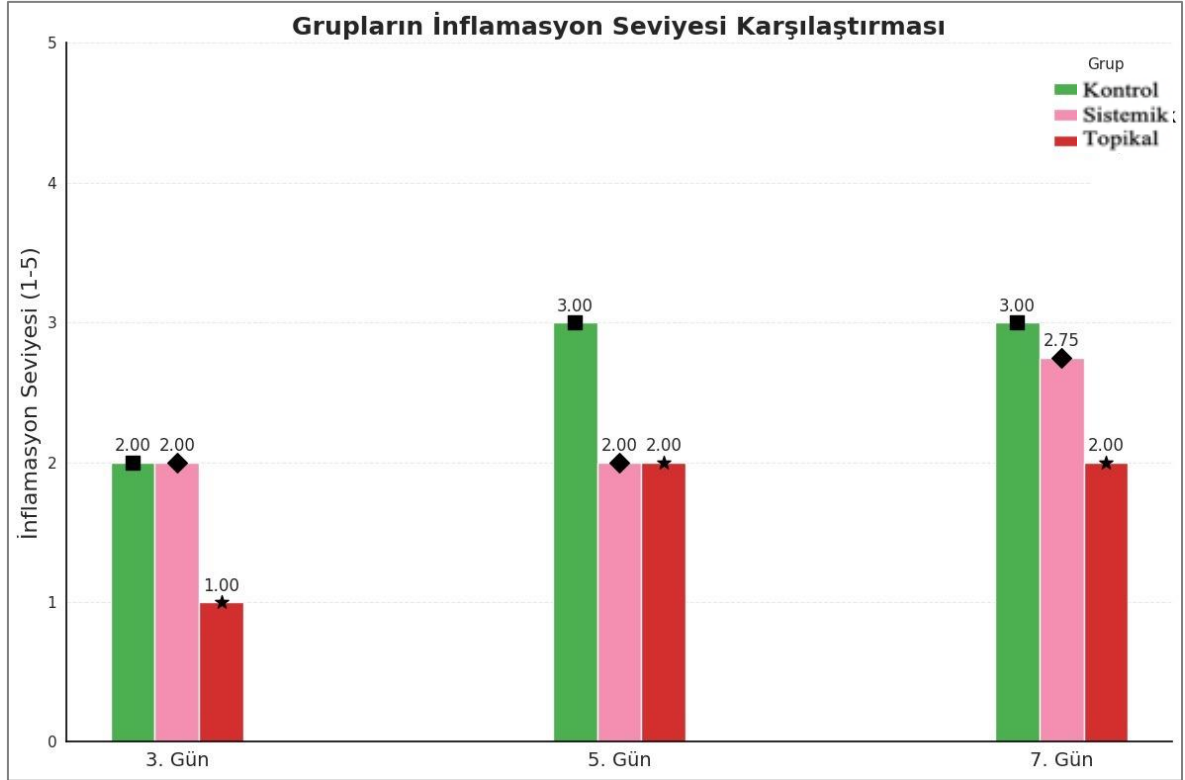
Çizelge 4.6. MMP-9 H-skorlarının grup karşılaştırması - 3. ve 7. gün karşılaştırılması

	3. Gün Ort. ± S.s.	7. Gün Ort. ± S.s.	Test istatistiği (p)
Kontrol¹	119.50 ± 1.29	146.50 ± 1.29	t = -22.01 (0.000*)
Sistemik Astaksantin²	108.50 ± 1.29	119.50 ± 1.29	t = -18.38 (0.000*)
Topikal Astaksantin³	104.50 ± 1.29	78.50 ± 1.29	t = 20.62 (0.000*)
Test istatistiği (p)	F = 100.00 (0.000*)	F = 1249.75 (0.000*)	—
Bonferroni	1<2; 1<3; 2<3	3<1; 3<2; 2<1	—

p<0.05, t: Bağımlı örneklem t testi, F: Varyans analizi ANOVA testi. Bonferroni satırında sayılar arasındaki "<" ibaresi istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0.05), SS: Standart Sapma, Ort.: Ortalama

4.6.3. İnflamasyon

Grafik analizlerine göre, 3. günde inflamasyon seviyesi kontrol ve sistemik gruplarında ortalama 2.00 iken, topikal grupta bu değer 1.00 ile en düşük seviyede tespit edildi. 5. günde kontrol grubunda inflamasyon düzeyi 3.00'e yükselirken, sistemik ve topikal gruplarda ise 2.00 seviyesinde sabit kaldı. 7. gün verilerine göre, kontrol grubundaki yüksek seviye (3.00) korunurken, sistemik grupta hafif bir artışla 2.75'e yükselirken, topikal grupta seviye 2.00'de sabit kaldı (Şekil 4.10). İstatistiksel analizler, topikal grubun inflamasyon kontrolü ve iyileşme hızında üstünlük sağladığını gösterdi.



Şekil 4.10. İnflamasyon şiddetlerinin 3., 5. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırması

4.6.4. Anjiyogenez

Bu çalışmada, üç farklı tedavi grubunda (Kontrol, SA ve TA) anjiyogenez süreci 3., 5. ve 7. günlerde değerlendirildi. Değerlendirme, bireysel damar sayıları temel alınarak hesaplanan Walker iyileşme oranları kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde, grup ve zaman faktörleri arasındaki etkileşimi değerlendirmek amacıyla ANOVA ve Post-Hoc Tukey testi uygulandı.

Grafiksel analizlerde, tüm gruplarda 5. günden 7. güne anlamlı bir artış gösteren damar sayıları tespit edildi ($p < 0.001$) (Çizelge 4.9). TA grubunda, 3. günde 61.25 olan ortalama damar sayısı, 5. günde 101.25'e (%65.3 artış), 7. günde ise 153.25'e (%150.2 artış) yükselerek en belirgin iyileşme oranını gösterdi ($t = 72.65$). SA grubunda benzer şekilde anlamlı bir artış gözlenirken (%147.7 artış; $t = 21.49$), bu artış topikal grubuna kıyasla daha sınırlı kaldığı görüldü. Kontrol grubunda 50.25'ten 123.25'e çıkan artış (%145.3) istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($t = 61.47$). (Çizelge 4.8)

Gruplara göre ortalama damar sayıları

3. Gün:

Kontrol: 50.25 ———

Sistemik: 55.50 | (+5.25 vs. Kontrol)

Topikal: 61.25 | (+11.00 vs. Kontrol, +5.75 vs. Sistemik)

5. Gün:

Kontrol: 81.25 ———

Sistemik: 91.25 | (+10.00 vs. Kontrol)

Topikal: 101.25 | (+20.00 vs. Kontrol, +10.00 vs. Sistemik)

7. Gün:

Kontrol: 123.25 ———

Sistemik: 137.50 | (+14.25 vs. Kontrol)

Topikal: 153.25 | (+30.00 vs. Kontrol, +15.75 vs. Sistemik)

Toplam artış hızları bakımından değerlendirildiğinde, 3. günden 7. güne kadar damar sayısındaki artış şu şekilde sıralanmıştır: TA (+92) > SA (+82) > Kontrol (+73).

Post-Hoc Testler (Tukey HSD)

Çizelge 4.7. Tüm zaman noktalarında damar sayılarındaki değişimin grup karşılaştırmaları

Zaman	Karşılaştırma	Ortalama Fark	p Değeri	Sonuç
3. Gün	Sistemik vs. Kontrol	+5.25	< 0.001*	Anlamlı
	Topikal vs. Kontrol	+11.00	< 0.001*	Anlamlı
	Topikal vs. Sistemik	+5.75	< 0.001*	Anlamlı
5. Gün	Sistemik vs. Kontrol	+10.00	< 0.001*	Anlamlı
	Topikal vs. Kontrol	+20.00	< 0.001*	Anlamlı
	Topikal vs. Sistemik	+10.00	< 0.001*	Anlamlı
7. Gün	Sistemik vs. Kontrol	+14.25	< 0.001*	Anlamlı
	Topikal vs. Kontrol	+30.00	< 0.001*	Anlamlı
	Topikal vs. Sistemik	+15.75	< 0.001*	Anlamlı

- Tüm zaman noktalarında TA > SA > Kontrol ($p < 0.001$) olarak bulundu.
- Anjiyogenez düzeyi en yüksek TA grubunda saptandı.

Çizelge 4.8. Zaman içinde damar sayısındaki değişim (3. günden 7. güne)

Grup	Karşılaştırma	Ortalama Fark	p Değeri	Sonuç
Kontrol	7. Gün ve 3. Gün	+73.00	< 0.001*	Anlamlı
Sistemik Astaksantin	7. Gün ve 3. Gün	+82.00	< 0.001*	Anlamlı
Topikal Astaksantin	7. Gün ve 3. Gün	+92.00	< 0.001*	Anlamlı

- Tüm gruplarda 3. günden 7. güne damar sayısı anlamlı artış gösterdi ($p < 0.001$).
- Zaman içinde en hızlı artış TA grubunda izlendi (3. → 7. gün: +92 birim).
- Gruplara göre artış hızı: TA > SA > Kontrol ($p < 0.001$) olarak saptandı.

Astaksantin uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek mikrodamar yoğunluğu gözlemlendi. 7. günde, kontrol grubu alan başına ortalama damar sayısında (≈ 130) en yüksek değeri göstererek SA ile TA gruplarının üzerinde yer aldı ($p < 0,001$). Topikal uygulama grubunda bu zaman noktasında mikrodamar yoğunluğu en düşük seviyede (≈ 90 damar/alan) bulundu.

Tedavi-zaman etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunarak ($p < 0.001$), tüm gruplarda anjiyogeneze karşı zamansal olarak dinamik bir yanıt geliştiğini ortaya konuldu. En belirgin ve hızlı iyileşme yanıtı, TA grubunda gözlenmiş olup, bunu SA ve kontrol grupları takip etti (TA > SA > Kontrol; $p < 0.001$).

Çizelge 4.9. Walker anjiyogenez iyileşme oranları 5. gün ve 7. gün karşılaştırılması

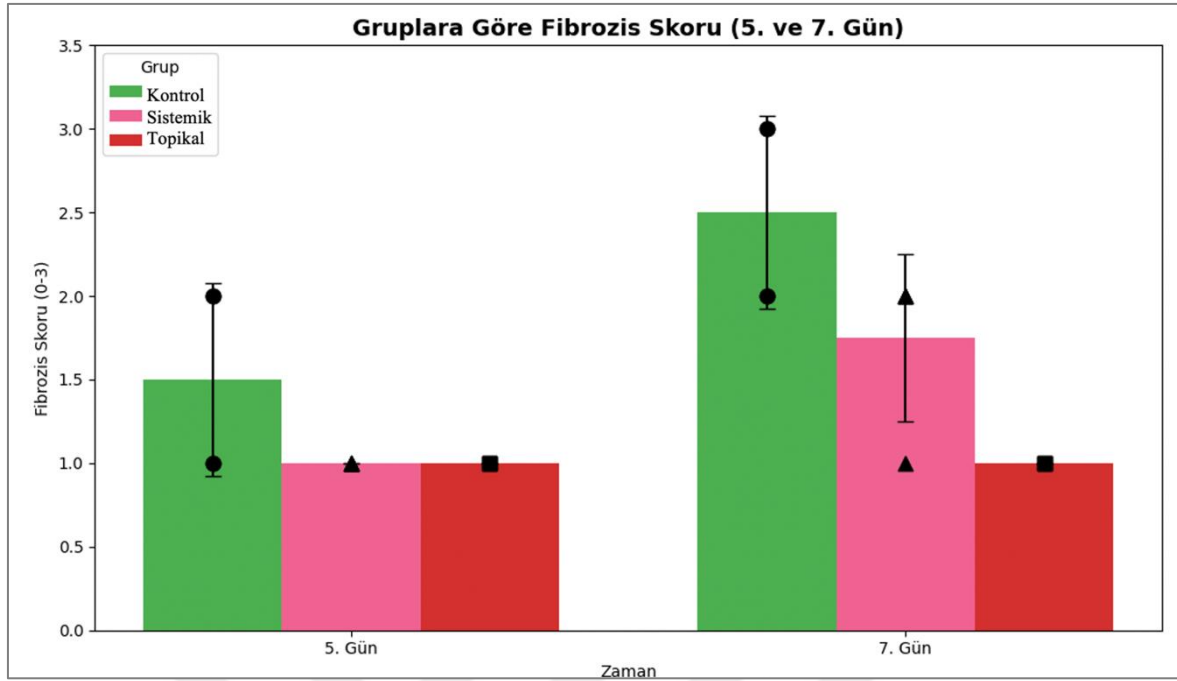
Grup	5. Gün Ort. $\pm$ S.S.	7. Gün Ort. $\pm$ S.S.	t (p) değeri
Kontrol	81.25 $\pm$ 5.06	123.25 $\pm$ 6.13	t = 61.47 ($p < 0.001$)*
Sistemik Astaksantin	91.25 $\pm$ 4.79	137.50 $\pm$ 6.31	t = 21.49 ($p < 0.001$)*
Topikal Astaksantin	101.25 $\pm$ 6.18	153.25 $\pm$ 5.92	t = 72.65 ($p < 0.001$)*

Tüm gruplarda 5. günden 7. güne anlamlı bir iyileşme artışı görülmektedir ($p < 0.001$).

* $p < 0.05$, t: Eşleştirilmiş t-testi

4.6.5. Fibrozis

Gruplara göre fibrozis skorlarının karşılaştırıldığı grafikte, 5. gün değerlerinin benzer seviyelerde olduğu gözlemlendi (Kontrol: ~ 1.5 ; Sistemik ve Topikal: ~ 1.0) (Şekil 4.11). 7. günde gruplar arasında belirgin farklılıklar ortaya çıktı (Çizelge 4.11).



Şekil 4.11. Fibrozis skorunun 5. ve 7. günlerde gruplar arası karşılaştırması

Çizelge 4.10. Fibrosiz miktarının Friedman test sonuçlarının gruplar arası karşılaştırması

	Grup	Test İstatistiği (χ^2)	p-değeri
1	Kontrol	8.0	0.018*
2	Sistemik Astaksantin	7.6	0.022*
3	Topikal Astaksantin	8.0	0.018*

$p < 0.05$, χ^2 : Friedman test istatistiği (ki-kare değeri). Friedman testi tekrarlı ölçümlerde parametrik olmayan varyans analizidir.

Friedman testi, üç grupta da zamanla fibrozis skorlarında anlamlı değişiklikler olduğunu gösterdi (tüm gruplarda $p < 0.05$) (Çizelge 4.10). Kontrol ve Topikal grupları aynı test istatistiğine sahip olmakla birlikte ($\chi^2=8.0$, $p=0.018$), önceki grafiklerde gösterildiği üzere değişim yönleri farklılık gösterdi; kontrol grubunda fibrozis artarken, topikal grupta sabit kaldı. Sistemik grupta daha düşük test istatistiği ($\chi^2=7.6$, $p=0.022$) gözlemlendi. Sonuç olarak Friedman testi, tüm gruplarda zaman içinde anlamlı değişimler olduğunu doğrulamakla birlikte; yalnızca değişimin yönünü dair bilgi vermekte olup, değişimin yönü hakkında bilgi sunmamaktadır. Bu nedenle, değişimin yönünü belirlemek amacıyla Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi uygulandı.

Çizelge 4.11. Wilcoxon işaretli sıralar testine göre fibrozis skoru değişiminin 5. ve 7.günlerde karşılaştırması

Grup	5. Gün Medyan (ÇAG)	7. Gün Medyan (ÇAG)	Değişim Yönü	Z değeri	P değeri	Etki Büyükliği (r)
Kontrol	1.5 (0.5)	2.3 (0.5)	↑ Artış	-2.828	0.005*	0.632
Sistemik Astaksantin	1.0 (0.3)	1.7 (0.5)	↑ Artış	-2.646	0.008 *	0.591
Topikal Astaksantin	1.0 (0.2)	1.0 (0.2)	→ Değişim Yok	-0.378	0.705	0.084

p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı ÇAG: Çeyrekler arası genişlik Z: Wilcoxon test istatistiği r: Etki büyüklüğü (r = Z/√N), r > 0.5 büyük etki

Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi sonuçları, fibrozis skorundaki değişimin yönünü ve büyüklüğünü net olarak gösterdi. Sonuçlara göre, kontrol grubunda 5. günden 7. güne istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (Z=-2.828, p=0.005, r=0.632), medyan değer 1.5'ten 2.5'e yükseldi. Sistemik grubunda 1.0'dan 1.7'ye doğru daha yavaş artış (Z=-2.646, p=0.008, r=0.591) gözlenirken topikal grupta 1.0 değerinde sabit kalma durumu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Z=-0.378, p=0.705, r=0.084) (Çizelge 4.11).

5. TARTIŞMA

Literatürde, astaksantin topikal ve sistemik uygulama yollarıyla oral dokulardaki yara iyileşmesi üzerine etkilerini karşılaştırmalı olarak değerlendiren bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olup, bu yönüyle mevcut çalışmamız astaksantin rat palatal mukoza yaraları üzerindeki etkilerini inceleyen öncü bir çalışma niteliği taşımaktadır. Yara iyileşmesinde rol oynayan MMP-9 ve S100A4'ün ekspresyon düzeyleri immünohistokimyasal değerlendirilerek astaksantin moleküler düzeydeki etkileri ortaya çıkarılmıştır. Bulgular, astaksantin inflammatuar süreci azaltırken, doku rejenerasyonunu destekleyerek çift yönlü etki mekanizması gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Histolojik analizler, astaksantin inflammatuar hücre infiltrasyonunu anlamlı düzeyde azalttığını, anjiyogenezi modüle ettiğini, düzenli ve vaskülarize granülasyon dokusu oluşumunu teşvik ettiğini ve fibrotik yanıtı kontrollü biçimde modüle ettiğini göstermiştir. Astaksantin özellikle topikal olarak uygulanması, yara alanında belirgin küçülme, inflammatuar ve fibrotik yanıtlarda azalma, anjiyogeneze artma ve MMP-9 ile S100A4 ekspresyonunda baskılanma gibi olumlu iyileşme göstergeleriyle dikkat çekmiştir. Sonuçlar, astaksantin bilinen antioksidan ve antiinflammatuar özellikleri ile uyumlu olup, farklı uygulama yollarıyla oral ortamda terapötik potansiyelini destekleyebilmektedir [35,321,343] Mevcut veriler, periodontal cerrahi sonrası yara iyileşmesinin hızlandırılması ve komplikasyonların azaltılması amacıyla astaksantin kullanımı için bilimsel bir temel oluşturabilmektedir.

Astaksantin antioksidan ve antiinflammatuar etkileri literatürde çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarla ortaya konmuştur [40,58,59,62,321,344]. Bununla birlikte, bu bileşiğin periodontal ya da oral mukoza dokularında yara iyileşmesi üzerine etkilerini doğrudan inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mevcut veriler ağırlıklı olarak deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Periodontal dokular üzerinde yürütülmüş bir insan çalışmasına ise literatürde rastlanmamıştır. Diş hekimliği alanında, astaksantin içeren jel formülasyonu ile yürütülmüş yalnızca bir insan çalışması bulunmaktadır [345]. Bu çalışmada, parsiyel dişsizlik yaşayan bireylerde hareketli protezlere adaptasyon süreci üzerine değerlendirmeler yapılmıştır. Astaksantin, vitamin E (%2.2) ve Koenzim Q (%1.5) içeren antioksidan jel kullanımının, proteze adaptasyon süresini 1.7 ila 2 kat azalttığı ve proteze bağlı stomatit gelişme riskini düşürdüğü rapor edilse de çalışmanın ayırt edici sınırlılığı, kullanılan jel içerisinde yalnızca astaksantin değil, aynı zamanda diğer antioksidan bileşenlerin de yer alması çalışmanın limitasyonlarıdır. Bu durum, elde edilen

etkinin yalnızca astaksantine mi yoksa bileşik etkiye mi bağlı olduğunun net bir şekilde belirlenmesini güçleştirmektedir.

Çalışmamızın deneysel tasarımı ve elde edilen bulgular Meephansan ve diğerleri (2017) [321] tarafından gerçekleştirilen astaksantin kutanöz yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışma ile en yakın oranda benzerlik düzeyine sahiptir. Mevcut çalışmamızda ve Meephansan ve diğerleri (2017) tarafından astaksantin doku iyileşmesini desteklediği, inflamasyon yanıtını modüle ettiği ve rejeneratif süreçleri hızlandırdığı rapor edilmiştir. Mevcut çalışmamız oral mukozada uygulanmış olması, farklı histolojik özellikler taşıyan bir doku modelinde gerçekleştirilmesi, topikal ve sistemik uygulamaların karşılaştırmalı olarak ele alınması açısından literatürdeki çalışmalardan farklılık göstermektedir. Çalışmamız bu yönüyle, sekonder yara iyileşmesinde astaksantin kullanım potansiyeline dair yeni ve özgün veriler sunmaktadır.

Ağız mukozasında meydana gelen açık yaraların iyileşme sürecinde gözlenen gecikme, yara yüzeyinin ağız ortamına maruz kaldığı sekonder iyileşme durumlarında, oral mikrobiyomun oluşturduğu kontaminasyon ile yakından ilişkilidir. Mikroorganizmalardan salgılanan proteolitik enzimler ve toksinler, hücresel proliferasyon ve doku rejenerasyonu için gerekli büyüme faktörlerinin aktivitesini bozarak iyileşme sürecini olumsuz yönde etkileyebilmektedir [346]. ROT ve sitotoksik maddelerin artan üretimi, epitel hücrelerine zarar vererek epitelizasyon sürecini olumsuz etkileyebilmekte veya bu sürecin ilerlemesini yavaşlatabilmektedir [346,347]. Oral mikrobiyomun bakteriyel ürünleri epitel hücre göçünü inhibe ederek epitelizasyonu engelleyebilir ve kronik inflamasyonun gelişmesine ve yara kapanmasının gecikmesine neden olabilmektedir [347].

Periodontal cerrahi sonrası iyileşmenin hızlandırılması ve enfeksiyon riskinin yönetilmesi, tedavi başarısını doğrudan etkileyen faktörler arasında yer almakta, biyolojik ve farmakolojik ajanlar destekleyici olarak tercih edilmektedir. Literatürde, periodontal cerrahi sonrası yara iyileşmesini desteklemek, postoperatif ağrıyı azaltmak ve enfeksiyon riskini en aza indirmek amacıyla lazer uygulamaları [332], hidrojeller [161], hyalüronik asit [175], klorheksidin içeren gargaralar [17], PRF [163] ve doğal antioksidanlar [348], ozon uygulamaları [191], doku yapıştırıcıları [182], jelatin süngerler, eritropoetin [178] ve diğer biyolojik aktif ajanlar, palatal yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla değerlendirilmiştir [11,19,20]. Bu yaklaşımların, reepitelizasyonu destekleyerek erken dönem komplikasyonları

azaltsa da tam ve sürekli epitel kapanmasını sağlamada yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Yüksek maliyet, sitotoksikite ve zorlayıcı uygulama protokolleri gibi sınırlayıcı faktörler, biyoyumlu, uygulanabilirliği kolay ve yenilikçi alternatif tedavi modalitelerinin geliştirilmesine olan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır [20].

Geleneksel antiseptiklerin sitotoksik etkileri ve yara iyileşmesi sürecindeki olumsuz hücresel etkileri, yara bakımında daha güvenli ve doğal kaynaklı ajanların kullanımına yönelik ihtiyacı arttırmıştır [185,349]. Bu doğrultuda, çalışmamızın çıkış noktası; sitotoksik veya zararlı sistemik etkileri olmayan, sekonder iyileşme için güvenli ve etkili bir ajan belirlemeye odaklanmaktır. Doğal antioksidanlar, periodontal hastalıkların tedavisinde destekleyici rolleri ve yara iyileşmesini teşvik edici etkileri ile öne çıkmaktadır. Bunlar arasında, antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özellikleriyle güçlü bir karotenoid olan astaksantin, umut verici bir terapötik profil sunmaktadır [27]. Astaksantin biyoyumluluğu, doku rejenerasyonunu teşvik etme potansiyeli ve inflamatuvar yanıtları modüle edebilme yeteneği, mevcut çalışmada sekonder yara iyileşme modelinde destekleyici ajan olarak değerlendirilmesinin temel gerekçesini oluşturmuştur. Astaksantin sistemik ve topikal uygulamalarının karşılaştırılması, farklı kullanım formlarının iyileşme sürecine olan etkisine dair veri sağlamıştır.

Astaksantin periodontal hastalıklarda, kronik periodontitis olgularında kemik kaybını azaltma, inflamasyonu baskılama ve epitelizasyonu hızlandırma gibi çeşitli olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir [60,62,350-352]. Periodontal dokular, inflamasyon ve mekanik travmaya karşı oldukça duyarlıdır ve bu dokuların iyileşmesi, kompleks bir hücresel ve moleküler etkileşim sürecini içerir. Astaksantin güçlü antioksidan etkisi, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı azaltarak periodontal ligament hücrelerinin ve fibroblastların hayatta kalımını destekleyebilmektedir [56]. Astaksantin antiinflamatuvar özellikleri, periodontal dokularda inflamatuvar yanıtı kontrol altında tutarak ileri doku yıkımını engellemek ve böylece düzenli bir iyileşme süreci sağlamaktır [56,59,62]. Astaksantin periodontal dokulardaki oksidatif hasarı azalttığı ve cerrahi iyileşmeyi desteklediği rapor edilmiştir [353]. Astaksantin anjiyogenezi destekleyici etkisi, yara bölgesinde yeterli vaskülarizasyonun sağlanmasına katkıda bulunarak yeni dokuların beslenmesini ve oksijenlenmesini arttırabilmektedir.

Tip-I diyabetik fare modelinde astaksantin periodontal yara ve hiperglisemiye bağlı sistemik komplikasyonlar üzerindeki etkilerini 60 günlük sürede değerlendiren bir çalışmada, 12.5 mg/kg/gün astaksantin uygulamasının diyabetik farelerde periodontal dokulardaki yıkımı ve sistemik inflamasyona bağlı yıkımı anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir [344]. Bu alışma, astaksantin tip-I diyabetik hastalarda periodontal yıkımı ve oksidatif sistemik komplikasyonları nleme ve/veya iyileştirme potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Astaksantin periodontal doku üzerindeki etkilerini ratlarda *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel periodontitis modeli kullanılarak araştıran bir çalışmada, astaksantin uygulamasının kolajen liflerin organizasyonunu desteklediği ve lenfosit infiltrasyonunu anlamlı şekilde azalttığı bildirilmiştir [57]. Bu alışma, astaksantin periodontal hastalık sürecinde inflamasyonu baskılayıcı ve doku rejenerasyonunu artırıcı özelliğini ortaya çıkarmaktadır. Astaksantin antibakteriyel etkisi ile *Streptococcus mutans*'ın büyümesini inhibe edebileceği de bir başka çalışma ile gösterilmiştir [354]. Astaksantin etkisinin araştırıldığı in vitro çalışmada, liken planus ile ilişkili kronik inflamasyonun azaldığı rapor edilmiştir [60].

Wistar albino ratlar, oral doku yapılarıyla insan dokuları arasında histolojik ve immünolojik benzerlikler göstermesi, düşük maliyetli ve kolay temin edilebilir olması, genetik homojenite sunması ve laboratuvar koşullarına yüksek uyum yeteneği nedeniyle çalışmamızda tercih edilmiştir [204,207].

Çalışmada değerlendirilen zaman noktaları, yara iyileşmesinin erken evrelerinde granülasyon dokusu oluşumu ve anjiyogenez sürecinin dinamikleri ile uyumlu olacak şekilde belirlenmiştir. Literatür doğrultusunda: granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez ve kolajen sentezinin başladığı, inflamatuvar fazın sona erdiği ve proliferasyon fazının başladığı 3. günde [93]; granülasyon dokusu ve anjiyogenezin en yüksek seviyeye ulaştığı 5. günde [355] ve fibroblast aktivitesinin pik yaptığı 7. günde değerlendirilmiştir [93,355-357].

Çalışmamızda kullanılan tam kalınlık palatal yara modeli, 4 mm çapında punch biyopsi aletiyle oluşturulmuş olup, sekonder yara iyileşmesini taklit eden bir yöntemdir [358]. Bu model, belirli büyüklükte ve derinlikte lezyon oluşturarak standardizasyonu mümkün

kılmakta, yara iyileşmesinin evrelerinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır [359-361]. Palatal mukozada defekt oluşturulmasının temel avantajı, bölgenin ince olması, keratinize yapısı sayesinde yara iyileşmesinin histolojik olarak kolay takip edilebilmesi ve iyileşme mekanizmalarının insanlarda görülen süreçlere benzer özellik göstermesidir [362,363]. Deneysel tasarımda kullanılan Wistar albino rat modeli, iyileşme sürecinin histopatolojik ve moleküler düzeyde güvenilir şekilde değerlendirilmesine olanak tanımıştır.

Astaksantin dozu ve uygulama yolları, literatürdeki toksikolojik ve farmakolojik verilere dayanarak seçilmiştir. FDA, astaksantini genel olarak güvenli kabul edilen” bir madde olarak sınıflandırmakta; önerilen günlük kullanım 2–12 mg olmakla birlikte, EFSA günlük diyetle alınan kaynakları dikkate alarak 8 mg’a kadar takviye astaksantin kullanamını “tolere edilebilir” olarak belirtmektedir [286]. İnsanlarda 8 ila 45 mg’a kadar astaksantin alımını 3 hafta ila 1 yıl süre ile inceleyen çalışmalarda kullanıma bağlı yan etki gözlenmediği bildirilmiştir [364]. Gebe farelere bir kez uygulanan 100–500 mg/kg dozlarının toksisite açısından güvenli olduğu, farelerde her gün astaksantin uygulandığında LD₅₀ değerinin 20 mg/kg’dan yüksek olduğu [288], diğer hayvan modellerinde ise 1000 mg/kg/gün’lere kadar uygulandığında toksisite gözlenmediği bildirilmiştir [287,365,366].

Yapılan son in vivo çalışmalar, sistemik olarak 5 mg/kg astaksantin uygulamasının anlamlı düzeyde antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler gösterebildiği ifade edilmektedir. Wistar ratlarda ligatürle indüklenen periodontitis modelinde astaksantin etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, 5 mg/kg astaksantin dozunun alveolar kemik kaybını azalttığı ve periodontal inflamasyonu düşürdüğü bildirilmiştir [62]. Aynı araştırmacıların diyabetik ratlarda ligatürle indüklenen periodontitis modelinde yaptıkları çalışmada, 5 mg/kg dozun astaksantin alveolar kemik kaybını azalttığı ve RANKL aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir [61]. Li ve arkadaşları (2020), ratlarda astaksantin 5 mg/kg dozda oral gavaj ile sistemik olarak verilmesinin yara bölgesindeki oksidatif stresi anlamlı düzeyde azalttığını ve kolajen sentezini arttırdığını bildirmişlerdir [367]. Bhattarai ve diğerleri (2021), 5 mg/kg/gün astaksantin dozunun diyabet kaynaklı periodontal hasar ve oksidatif stres üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini rapor etmişlerdir [344]. Yukarıda anılan çalışmalar, 5 mg/kg dozundaki astaksantin güvenli bir konsantrasyonda biyolojik etkinliğe sahip olduğunu [283] ve inflamatuvar süreçleri modüle edebildiğini göstermektedir [368]. Mevcut çalışmamızda literatürle uyumlu olarak 5 mg/kg astaksantin dozu tercih edilmiştir.

Astaksantin lipofilik özellik göstermesi ve literatürde zeytinyağı ile kullanımının biyoyararlanımı, stabilite ve antioksidan aktiviteyi arttırdığına ilişkin bulgular [280,282], mevcut çalışmada zeytinyağının çözücü olarak tercih edilmesinde belirleyici olmuştur [283,325]. Astaksantin yarılanma ömrünün intravenöz uygulamada yaklaşık 7.8-9.5 saat, oral uygulamada 16-24 saat olduğu [369]; maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresinin 6-8 saat arasında başladığı bildirilmiştir [369,370]. Lu Yang ve diğerleri (2021), farklı yağ matrislerinde astaksantin stabilitesini, antioksidan aktivitesini ve biyoyararlanımını incelemişler; zeytinyağının bu parametreler üzerinde anlamlı düzeyde olumlu etkiler sağladığını bildirmişlerdir [325]. Bu bulguları destekler nitelikte, Kısaoğlu ve diğerleri (2024), 7 gün süreyle ratlara zeytinyağında çözülmüş astaksantini 5, 10 ve 25 mg/kg dozlarında oral gavaj yoluyla uygulamış ve bileşiğin oksidatif hasarı azalttığını, böbrek fonksiyonlarını koruduğunu bildirmişlerdir [326]. Benzer şekilde, Arslan ve diğerleri (382), böbrek iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan rat modelinde, zeytinyağında çözündürülmüş astaksantin oral uygulamasının antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler gösterdiğini doğrulamışlar, astaksantin böbrek hasarını belirgin düzeyde önlediğini ve oksidatif stres parametrelerini iyileştirdiğini ortaya koymuşlardır [371].

Laboratuvar hayvanları için önerilen maksimum uygulama hacmi 10 ml/kg olup, çalışmamızda kullanılan ratların ortalama ağırlığı 250 gramdır. Dokumacıoğlu ve diğerleri (2018) [372], yüksek fruktoz tüketen ratlarda astaksantin olası oksidatif hasarı önleyici etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, ratlara oral yolla 1 mg/kg/gün astaksantin içeren ve 0.2 ml zeytinyağında çözülmüş preparatlar uygulamışlardır. Bulgular, astaksantin uygulamasının dokulardaki iNOS düzeylerini azalttığını ve oksidatif hasarı azaltabileceğini, zeytinyağının astaksantin biyoyararlanımını arttırarak antioksidan etkilerini desteklediği göstermiştir. Mevcut çalışmada kusma, boğulma riskini önlemek amacıyla çözelti hacmi minimum düzeyde tutulmuş, literatürle uyumlu olarak 0.2 ml zeytinyağı çözücü olarak tercih edilmiştir. Anestezi uygulanmaksızın ratlarda uzun süreli ağız açıklığının sağlanması, davranışsal direnç nedeniyle teknik açıdan güçlük oluşturmaktadır. Bu nedenle astaksantin çözeltisinin topikal uygulaması, ağız açıklığı sağlandıktan sonra dil ekarte edilerek gerçekleştirilmiş ve solüsyonun en az 10 saniye süreyle yara bölgesinde lokalize teması sağlanmıştır [373]. Uygulama, insülin enjektörü aracılığıyla doğrudan yara yüzeyine temas ettirilmeden, solüsyonun doku üzerinde homojen yayılmasına olanak tanıyacak biçimde, ağrı oluşturmaktan ve sabit hızda kontrollü piston hareketiyle, yaklaşık 2–3 saniye içinde tamamlanmıştır. Uygulama sırasında enjeksiyon basıncı doğrudan ölçülmemiş

olmakla birlikte, solüsyonun doku üzerinde dengeli dağılması esas alınarak manuel enjeksiyon hızı kontrol altında tutulmuş ve düşük basınçlı uygulama tercih edilmiştir. Uygulamayı takiben 30. saniyede yara bölgesinde astaksantin varlığı görsel olarak doğrulanmıştır [327,328,373]. Visköz yapıdaki solüsyonun yara bölgesinde kalıcılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte çalışmamızın takip eden günlerdeki uygulamalarında, bazı hayvanların palatal bölgesinde astaksantin karakteristlik kırmızı-turuncu pigmentasyonunun gözlenmesi, molekülün dermal retansiyon kapasitesine işaret etmektedir. Lipofilik bileşiklerin yara dokusunda etkili olabilmesi için genellikle 30 saniye ile 5 dakika arasında yara yüzeyinde kalması gerektiği belirtilmesine rağmen bu süreler standardize edilmemiştir. Astaksantine özgü minimum etkili temas süresi literatürde net olarak tanımlanmadığından, bu durum belirsizliğini korumaktadır [374,375].

Çalışmamıza dair değerlendirmeler, ölçüm güvenilirliğini artırmak amacıyla standardize edilmiş bir protokol çerçevesinde, tek bir araştırmacı tarafından yürütülmüş, ölçümler arası uyumun yüksek düzeyde sağlanması amacıyla kapsamlı eğitim sürecinden geçirilmiş ve %90 uyum eşiğine ulaşana kadar kalibrasyonu yapılmıştır. Ölçüm tekrarlanabilirliğini değerlendirmek üzere, araştırmacı aynı referans görüntüler üzerinde 7 gün arayla iki farklı zaman diliminde gerçekleştirilen tekrar ölçümlerle gözlemci içi tutarlılık test edilmiştir [332]. Ölçümler arasında 7 günlük bir süre bırakılması, araştırmacının önceki ölçümleri hatırlama olasılığını azaltarak gözlemci kaynaklı yanlışlık riskini azaltarak, tekrarlanabilirliğin daha objektif şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır [376].

Astaksantin, mitokondri tarafından üretilen endojen ROT'u azaltarak oksidatif stres altında mitokondriyal membran fonksiyonlarında meydana gelen bozulmaları önleyebildiği bildirilmiştir [377,378]. Mizuta ve diğerleri (2014), astaksantin oksidatif stres ve skar oluşumu üzerindeki etkilerini ses teli yaralanması modelinde incelemişlerdir. Gavaj yoluyla 100 mg/kg/gün dozunda astaksantin uygulanmış, bulgular astaksantin takviyesinin sesin aşırı kullanımı sonucu gelişen inflamatuvar yanıtı ve yara bölgesindeki skar oluşumunu azalttığını; iyileşmenin erken evresinde oksidatif stresi düzenleyerek doku onarım sürecini anlamlı düzeyde desteklediğini göstermiştir [39]. Ses tellerinin aşırı kullanımıyla ilişkili yaralanmalarda ROT üretiminin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Bu bağlamda, insanlarda üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, 10 erkek gönüllüye günlük 24 mg dozunda astaksantin uygulanmış ve ses yüklenmesine bağlı gelişen inflamasyon ve fonksiyonel ses kaybı değerlendirilmiştir. Bulgular, astaksantin ses kullanımına bağlı

gelişen fonksiyonel kapasite kaybını önleyerek ses teli bütünlüğünü koruyabildiğini ortaya koymuştur [320]. Bu bulgular, astaksantin aşırı ses kullanımına bağlı inflamasyon ve doku hasarını azaltarak potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Astaksantin yara kapanma süresindeki etkisini rat modelinde inceleyen bir çalışmada [379], astaksantin ile tedavi edilen grupta 3. günde yara kapanma oranı %48, kontrol grubunda %12; 6. günde astaksantin grubunda %61, kontrol grubunda %20 olarak bulunmuştur. Çalışmamızın yara açıklığı oranı açısından, 3. gün verilerinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmazken ($F = 0.800$, $p = 0.479$), 5. ve 7. gün itibarıyla gruplar arasında yara açıklığı açısından anlamlı fark bulunması ($F = 15.20$, $p = 0.0013$) ($p < 0.01$), astaksantin uygulamasının yara iyileşmesini hızlandırdığını ve bu etkinin literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir. 3. ile 7. günler arasında %45.39 ile en yüksek iyileşme hızı topikal astaksantin grubunda kaydedilmiş olup, bu değer kontrol grubuna göre %14 oranında daha yüksek bulunması astaksantin topikal uygulanmasının lokal biyoyararlanımının klinik etkisini göstermektedir. Bu bulgu topikal astaksantin periodontal cerrahi sonrası postoperatif dönemde uygulandığında ortaya çıkan biyolojik etkisini açıklayabilir.

İkinci derece yanık oluşturulan hayvan modeli çalışmasında, yara alanına 5% astaksantin jel uygulamasının; fibroblast aktivitesini ve kolajen depozisyonunu arttırdığı, makroskopik düzeyde yara yüzeyi küçülmesini hızlandırdığı, epitelizasyonu erken başlattığı ve yara kapanmasının kontrol gruplarına göre daha önce tamamlandığı bildirilmiştir. Sonuçlara göre yara alanında %50 daralma yaklaşık 4. ve 5. günlerde gözlenmiş, %90'dan fazla kapanmanın 10. günde tamamlandığı rapor edilmiştir [380]. Mevcut çalışmamızda 7. gün sonunda iyileşme yüzdeleri topikal, sistemik ve kontrol gruplarında sırasıyla %45.39, %39.98, %31.43 olarak tespit edilmiş olup iyileşme yüzdesinin en yüksek değeri topikal astaksantin grubuna ait bulunmuştur.

Mevcut çalışmanın birincil çıktısı olan makroskopik bulgulara ilişkin istatistiksel analizler, tedavi grubunun (kontrol, sistemik astaksantin, topikal astaksantin) ($p=0.023$) ve iyileşme döneminin (3., 5. ve 7. gün) ($p=0.028$) yara boyutu üzerinde anlamlı bir etkisi olduğunu, ancak grup ve zaman arasındaki etkileşiminin anlamlı olmadığını ($p=0.884$) ortaya çıkarmıştır. Bu durum, tüm grupların benzer bir zamansal iyileşme paterni gösterebildiği, ancak iyileşme düzeylerinin tedaviye bağlı olarak farklılaştığı anlamına gelmektedir.

Zaman dilimlerine göre yapılan grup içi analizlerde, yalnızca topikal astaksantin grubunda zamanla anlamlı bir yara kapanması elde edilmiştir ($p=0.0293$). Bu bulgu, topikal uygulamanın özellikle erken dönemde yara iyileşmesini hızlandığını düşündürmektedir. 7. gün sonunda yapılan karşılaştırmalarda, sistemik astaksantin grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha küçük yara alanına sahip olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Meephansan ve diğerleri (2017) kutanöz yara iyileşmesi üzerine yürüttükleri çalışmada, astaksantin uygulanan grupta 7. gün yara dokularında tam reepitelizasyon ve epidermiste belirgin keratinizasyon gözlemlenmiştir [321]. Mevcut çalışmamızın bulguları literatürle paralellik göstermekte olup, topikal astaksantin grubunun 7. gün histopatolojik değerlendirmesinde epitelizasyonun tamamlandığı, keratinizasyonun başladığı ve bağ dokusunun tamamen yenilenmiş olduğu tespit edilmiştir.

Hashimoto ve diğerleri (2016), oküler hastalıklarda astaksantin anjiyogenez üzerindeki etkilerinin uygulama yoluna, astaksantin dozuna ve stres, inflamasyon, hipoksi gibi fizyolojik durumlara bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini bildirmişlerdir [381]. Astaksantin antioksidan etkisiyle oksidatif stresi azaltarak VEGF düzeylerini modüle ettiği ve kapiller gerilemeyi önleyebildiği bildirilmiştir. Bu bulgular astaksantin anjiyogenez üzerinde çift yönlü etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Başka bir çalışmada, astaksantin hamster ağız kanseri modelinde, oral skuamöz hücreli karsinom oluşumuna karşı JAK-2/STAT-3 sinyal yolunu inhibe ederek hücre proliferasyonu, invazyon ve anjiyogenezi azalttığı gösterilmiştir [382]. Bu etkiler, astaksantin STAT-3'ün fosforilasyonunu ve nükleer translokasyonunu engellemesiyle ilişkilendirilmiştir. VEGF gibi anjiyogeneze ilişkili genlerin ekspresyonu aşağı regüle edilmiş, tümörün damar oluşturma yeteneğine etki ederek mikrovasküler yoğunluk azalmış ve HIF-1 α 'nın nükleer translokasyonunun baskılanarak mikrodamar yoğunluğunun azaldığı bildirilmiştir.

Xu Yangyang ve diğerleri (2015), astaksantin anjiyogenezi indüklemeye potansiyelini ve bu süreçte rol oynayan mekanizmaları incelemişlerdir [383]. Astaksantin, insan beyin mikrovasküler endotel hücreleri ile rat aort düz kas hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve tüp oluşumunu arttırdığı; bu etkilerin ise Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sinyal yolunun inhibitörü olan IWR-1-endo ile söz konusu etkilerin baskılanabildiği rapor edilmiştir. Veeruraj ve diğerleri (2019) tarafından

rat modellerinde gerçekleştirilen bir yara iyileşmesi çalışmasında, astaksantin kontrol gruplarına kıyasla anjiyogenezi belirgin biçimde arttırdığı rapor edilmiştir [379]. Çalışmamızda topikal astaksantin grubunda gözlenen ortalama damar sayısındaki %150.2 artış bu literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızın bulguları, astaksantin topikal ve sistemik uygulamalarının yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. Astaksantini topikal uygulamanın inflamasyonun azaltılması ve anjiyogenezin desteklenmesi açısından belirgin etkiler sağladığı gözlemlenmiştir. 5. gün itibarıyla granülasyon dokusu oluşumu hızlanmış ve anjiyogenez süreci aktif hale gelmiştir. Topikal astaksantin grubunda gözlenen 3. gündeki damar sayısının ortalama 61.25 bulunması, 5. gündeki damar sayısının 101.25'e yükselerek %65.3 oranında artması, erken dönemde yeni damar yapılarını belirgin şekilde artırdığını ve yoğun damar oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir. 3. günde, astaksantin gruplarında kontrol grubuna kıyasla artmış mikrovasküler yoğunluğun gözlenmesi, astaksantin VEGF ekspresyonunu artırdığı önceki çalışmalarıyla uyumlu olmakla birlikte [384], çalışmamızda VEGF değerlendirilmemiştir. Geç dönemde ise oluşan mikrodamar sayısının kontrol grubuna kıyasla daha düşük gözlenmesi (sırasıyla 3., 5. ve 7. gün değerler; TA: +150.2% (61.25 → 101.25 → 153.25), SA: +147.7% (55.50 → 91.25 → 137.50), Kontrol: +145.3% (50.25 → 81.25 → 123.25)), anjiyogenezin daha erken tamamlandığına ve dokuların daha hızlı olgunlaştığına işaret etmektedir. Sonuçlar, astaksantin anjiyogenezi destekleyici rolünü doğrulamaktadır.

Mevcut çalışmamızda, hematoksilen-eozin ile elde edilen bulgular, literatürle uyumlu şekilde astaksantin inflamasyonu baskılayıcı ve epitelizasyonu hızlandırıcı etkilerinin özellikle erken dönemde belirginleştiğini göstermektedir. Çalışmamızın 3. gününde inflamasyon, yara iyileşmesinin erken fazına ait başlıca bulgu olarak saptanmış; bu dönemde topikal astaksantin grubunda inflamasyon düzeyinin en düşük seviyede olduğu ve epitelizasyonun daha erken başladığı gözlemlenmiştir. Bu durum, astaksantin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Sistemik uygulama yöntemi de inflamasyonu azaltmış olmakla birlikte, topikal uygulamaya kıyasla daha sınırlı bir etki göstermiştir. Bu farklılık, astaksantin lokal olarak uygulandığında yara bölgesinde daha etkin bir farmakolojik yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir. 5. günde her iki uygulama yöntemi de inflamasyonu belirgin şekilde azaltmıştır; ancak topikal uygulama grubunda bu etkinin daha baskın olduğu gözlenmiştir. 7. gün itibarıyla topikal uygulama grubunda

epitelizasyonun ve doku bütünlüğünün büyük ölçüde sağlandığı izlenmiştir. Bu bulgular, astaksantin iyileşmenin erken fazına olan olumlu etkisinin zamanla klinik olarak belirgin hale geldiğini ortaya koymaktadır. Kontrol grubunda ise iyileşme sürecinin daha geç dönemde (5-7. günler arasında) hız kazandığı gözlemlenmiştir.

Astaksantin yara iyileşmesini hızlandırıcı etkilerinin özellikle inflamatuvar evrenin erken dönemlerinde belirginleştiği literatürde gösterilmiştir [321]. Bu olumlu etkinin, inflamatuvar yanıtın baskılanması ya da inflamasyon evresinin daha kısa sürede tamamlanması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [321]. Minimal inflamatuvar yanıtın yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkilediği bilinmekte olup, astaksantin bu etkiyi birden fazla mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği öne sürülmektedir. Astaksantin, NF- κ B, MAPK ve JAK-STAT gibi sinyal yollarını inhibe ederek inflamatuvar sitokin üretimini baskılamakta ve oksidatif stresle ilişkili hücrel yanıtları azaltabilmektedir [299]. Astaksantin antioksidan enzim aktivitesini artırarak hücrel savunma sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir [353].

Meephansan ve diğerleri (2017), astaksantin kutanöz yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla dermal yara oluşturulan 36 sağlıklı dişi fareye 15 gün boyunca 1x2, 78.9 μ M konsantrasyonda topikal astaksantin uygulamış; iyileşme sürecinin anlamlı düzeyde hızlandığını ve iNOS düzeylerinde belirgin bir azalma olduğunu bildirmişlerdir [321]. Bu bulgular doğrultusunda, astaksantin yara iyileşmesini destekleyici potansiyele sahip etkili bir biyoaktif ajan olduğu ifade edilmiştir [321].

Benzer şekilde Fang ve diğerleri (2017) tarafından derin yanık oluşturulan rat modellerinde yapılan histolojik incelemelerde, astaksantin erken dönem yara bölgesindeki hücrel hasarı anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir [343]. Bu etkinin oksidatif stres kaynaklı inflamasyonun baskılanması ve mitokondriye bağlı apoptotik süreçlerin inhibisyonu aracılığıyla sağlandığı; dolayısıyla astaksantin doku onarımı süreçlerinde terapötik potansiyele sahip olabileceği vurgulanmıştır [343].

Çalışmamızda elde edilen bulgular, literatürde raporlanan verilerle uyumlu olup, astaksantin inflamasyon ve fibrozis üzerindeki baskılayıcı etkileri aracılığıyla yara iyileşmesini optimize ettiğini göstermektedir. İstatistiksel analizlerde, topikal astaksantin grubunda inflamasyon kontrolü ve iyileşme hızında anlamlı bir üstünlük saptanmış, inflamasyon düzeyi başlangıçtan itibaren düşük seyretmiş ve bu seviyeyi korumuştur.

Özellikle 3. günde gözlenen sınırlı inflamatuvar yanıt, astaksantin erken dönem yara iyileşmesine katkı sağlayan güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. 7. gün sonunda ise inflamatuvar hücre sayısı ve inflamasyon skoru, astaksantin uygulanan gruplarda belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur. Sistemik uygulama inflamasyonu kısmen sınırlamış olsa da topikal uygulamaya kıyasla daha az etkili olmuştur. Elde edilen bulgular, çalışmamızın ikincil sonuç değişkenlerini destekler nitelikte olup, astaksantin yara bölgesinde reaktif oksijen türlerini doğrudan nötralize edebilme kapasitesine sahip olduğunu, nötrofil infiltrasyonunu azaltarak hücresel stabiliteyi desteklemiş olabileceğini düşündürmektedir. Antiinflamatuvar etkinin özellikle lokal uygulama ile erken dönemde daha belirgin hale geldiği ve lezyon bölgesine doğrudan uygulandığında terapötik etkinliğinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Aras-Tosun ve diğerleri (2022) tarafından yürütülen in vitro bir çalışmada, yüksek glikoz konsantrasyonlarına bağlı olarak gelişen oksidatif stres koşullarında, astaksantin insan gingival fibroblastlar üzerindeki etkileri incelenmiştir [58]. Bulgular, astaksantin uygulamasının hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırarak gecikmiş yara iyileşmesini hızlandırabildiğini göstermektedir. Araştırmacılar, astaksantin antioksidan özelliklerinin gingival yara iyileşmesini desteklediğini ve diyabetik hastalarda görülen kronik oral yaraların tedavisinde umut vadeden bir ajan olabileceğini belirtmişlerdir [58].

Veeruraj ve diğerleri (2019), astaksantin kolajen film aracılığıyla uygulanmasının yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini rat modellerinde değerlendirmişlerdir [379]. Astaksantin uygulanan grupta yara kapanma oranları 3., 6. ve 15. günlerde sırasıyla %48, %61 ve %99 olarak saptanırken, kontrol grubunda %12, %20 ve %71 olarak belirtilmiştir. Epitelizasyon belirtilerinin erken dönemde ortaya çıkması, yara kontraksiyonunun hızla artması ve 7. günde fibroblast sayısı ile granülasyon dokusunun anlamlı şekilde artması, astaksantin iyileşme sürecindeki etkinliğini ortaya koymuştur. Kolajen birikiminde gözlenen artış, astaksantin hücresel yeniden şekillenmeyi destekleyebildiğini göstermektedir.

Fang ve diğerleri (2017), derin yanık yara modelinde astaksantin oksidatif stres ve inflamatuvar mediatörler üzerindeki etkilerini incelemiş ve doza bağlı olarak olumlu sonuçlar elde etmişlerdir [343]. Mevcut çalışmamızda, topikal astaksantin uygulanan grupta 3 ile 5. günler arasında en yüksek iyileşme hızı ($1.04 \text{ mm}^2/\text{gün}$) ve yara alanında küçülmenin elde edilmesi, literatürle uyumlu olarak astaksantin erken dönemde inflamatuvar yanıtı

baskılayarak yara iyileşmesi sürecini olumlu yönde etkilediğini desteklemektedir. Erken dönemde astaksantini topikal uygulamanın belirgin fayda sağlaması, lokal etkinliğinin güçlü olduğunu göstermektedir. Sistemik uygulamanın da zaman içinde etkili sonuçlar verdiği dikkate alındığında, her iki uygulama şeklinin de yara iyileşmesini destekleme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmaktadır.

Astaksantin, fibroblastların proliferasyonunu ve migrasyonunu teşvik ederek granülasyon dokusunun oluşumunu desteklemektedir. Fibroblast büyüme faktörü ve tip I kolajen gibi yara iyileşmesiyle ilişkili biyobelirteçlerin ekspresyonunu arttırarak iyileşme sürecini hızlandırmaktadır. Meephansan ve diğerleri (2017), astaksantin uygulanan farelerde fibroblast sayısında artış olduğunu, buna bağlı olarak kolajen sentezinin arttığını ve granülasyon dokusunun daha hızlı ve etkin bir şekilde oluştuğunu bildirmişlerdir [321]. Çalışmamızın histolojik bulguları bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Topikal astaksantin grubunda kalın granülasyon dokusu, artmış fibroblast aktivitesi, iyi organize olmuş yeni bağ dokusu ve belirgin epitel oluşumu gözlenmiştir. Bu bulgular, astaksantin kolajen sentezini ve fibroblast proliferasyonunu destekleyerek doku onarımını hızlandırabileceğini düşündürmektedir. Sistemik uygulama grubunda da iyileşme belirtileri izlenmiş olmakla birlikte, topikal uygulamayla elde edilen iyileşme düzeyine ulaşamamıştır.

Karaciğer, böbrek ve akciğer üzerine yapılan çalışmalarda, astaksantin fibrotik süreçleri inhibe ettiği ve bu etkisini moleküler yollar aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Astaksantin TGF- β 1 sinyallemesini bloke ederek hepatik yıldız hücrelerinde Smad3 yolunun aktivasyonunu baskıladığı ve antifibrojenik etki gösterdiği bildirilmiştir [385].

Bu literatür bulguları, çalışmamızın 7. gününde elde edilen histolojik verilerle uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda, topikal astaksantin grubunda fibrozisin en düşük düzeyde seyrettiği, iyi organize ve vaskülarize bir granülasyon dokusu geliştiği ve skar oluşumunun minimal düzeyde kaldığı gözlenmiştir. Wilcoxon işaretli sıralar testi sonuçlarına göre, topikal astaksantin grubunda fibrosis skorlarının sabit kalması (5. gün: 1.0 ve 7. gün: 1.0; $p=0.705$) sonucunda değişim yönü ve büyüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r=0.084$). Kontrol grubunda fibrosis skorlarının anlamlı ve şiddetli bir artış gösterdiği (5. günden 7. güne 1.5 $\rightarrow$ 2.3 (%66.7 artış); $p=0.005$, $r=0.632$), sistemik astaksantin grubunda ise 5. günden 7. güne daha hafif ancak anlamlı bir artış olduğu izlenmiştir (1.0 $\rightarrow$ 1.7;

$p=0.008$, $r=0.591$). Topikal astaksantin uygulanan tüm deneklerde, 5. ve 7. gün değerlendirmelerinde fibrozis skorlarının sabit kalarak 1 olarak ölçülmesi, bu uygulamanın fibrotik doku gelişimini etkin biçimde engelleyebildiğine dair güçlü bir kanıt oluşturmaktadır. Elde edilen bulgular, topikal uygulamanın diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük sağladığını göstermektedir. Topikal astaksantin ECM yeniden şekillenmesini düzenleyerek fibrotik yanıtı baskıladığını ve yara iyileşmesini fizyolojik sınırlar içinde yönlendirerek patolojik skar oluşumunu önleyici etki gösterdiğini düşündürmektedir.

MMP-9 ve S100A4, hücre dışı matriksin yeniden düzenlenmesi, inflamasyon, anjiyogenez ve yara iyileşmesinin kritik aşamalarında merkezi rol oynayan moleküllerdir [317,386]. Her iki protein de anjiyogenez ve doku yeniden şekillenmesi süreçlerinde benzer fonksiyonel yolları paylaşmakta olup; bu durum sinerjik etkilerinin potansiyelini ortaya koymaktadır. Periodontal yara iyileşmesi modellerinde S100A4 ve MMP-9'un koordineli rollerini ve etkileşimlerini doğrudan değerlendiren çalışmaların eksikliği dikkat çekicidir.

MMP-9, ECM yıkımı, inflamatuvar hücre göçü ve anjiyogenez süreçlerini düzenleyen bir metalloproteinaz olup, bu yönüyle rejeneratif ve patolojik olaylarda çift yönlü etki göstermektedir [387,388]. İnflamasyon ve yara iyileşmesi süreçlerinde aktif olan MMP-9; başta makrofajlar, nötrofiller, keratinositler ve fibroblastlar olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından sentezlenmektedir [147,389]. Paula-Silva ve diğerleri (2009) [390], diyabetik yaralarda MMP-9 ekspresyonundaki azalmanın kolajen sentezinin bozulması ve iyileşme gecikmesiyle ilişkili olduğunu ancak kronik periodontitis ve periapikal lezyonlarda artmış MMP-9 aktivitesinin doku yıkımı ve atışman kaybını tetiklediğini bildirmişlerdir [147,390]. MMP-9 ekspresyonunun zamansal ve mikroçevresel faktörlerden etkilendiğini göstermektedir. Sıçanlarda kronik yara modelinde yapılan bir çalışmada, eksojen MMP-9 uygulamasının yara iyileşmesini doğrudan bozduğu; yüksek düzeyde aktif MMP-9 düzeylerinin epitel hücre göçünü engelleyerek epitel dilin ön kenarında tip IV kolajen birikimini azalttığı gösterilmiştir [391]. Korneal yara modellerinde MMP-9'un akut fazda reepitelizasyonu desteklerken, kronik fazdaki aşırı ekspresyonunun ülserasyona yol açabildiği gösterilmiştir [149]. Çalışmamızdaki bulgular, kontrol grubunda 3., 5. ve 7. günlerde devam eden yüksek MMP-9 ekspresyonu, inflamasyonun çözülemediğini ve bunun gecikmiş iyileşme ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Astaksantin uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla azalmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu, artmış

granülasyon dokusu oluşumu ve artmış kolajen birikimi olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, astaksantin oksidatif stresi modüle etme ve ECM remodelasyonunu teşvik etme etkileriyle uyumludur.

S100A4, epitelyal-mezenkimal geçiş, fibroblast aktivasyonu ve kronik inflamasyonla ilişkili multifonksiyonel bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Literatürde, S100A4'ün MMP-9 ile sinerjik etkileşim gösterdiği görülmektedir: Tiroid karsinomunda S100A4 inhibisyonunun MMP-9 ve VEGF ekspresyonunu baskılayarak invazyonu azalttığı [154], transgenik fare modellerinde, S100A4'ün MMP-9 ekspresyonunu uyararak endotel hücre migrasyonunu kolaylaştırdığı ve tümör anjiyogenezini arttırdığı bildirilmiştir [55].

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, mevcut literatür ile uyumlu olarak, periodontal S100A4 ile MMP-9 ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Topikal astaksantin uygulanan grupta, S100A4 protein düzeyinin 3. günden 7. güne anlamlı düzeyde %8.4 oranında azaldığı gözlemlenmiştir ($98.50 \pm 1.29 \rightarrow 90.25 \pm 1.71$; $p=0.004$). Buna karşılık, kontrol grubunda aynı dönemde S100A4 ekspresyonu %45.7 oranında belirgin bir artış kaydedilmiştir ($87.50 \pm 2.08 \rightarrow 127.50 \pm 2.08$; $p=0.000$).

MMP-9 ekspresyon düzeyleri S100A4 ile benzer bir seyir izlemiştir. Topikal astaksantin grubunda MMP-9 düzeylerinde %24.9 oranında anlamlı bir azalma gözlenirken ($104.50 \pm 1.29 \rightarrow 78.50 \pm 1.29$; $p=0.000$), kontrol grubunda aynı süre zarfında MMP-9 düzeylerinde %22.6'lık bir artış gözlenmiştir ($119.50 \pm 1.29 \rightarrow 146.50 \pm 1.29$; $p=0.000$). Bu bulgular, topikal astaksantin S100A4 ve MMP-9 ekspresyonlarını baskılayarak inflamatuvar yanıtı ve doku yıkım süreçlerini modüle edebileceğini düşündürmektedir.

Astaksantin uygulama yolunun, MMP-9 ve S100A4 ekspresyon düzeyleri üzerinde farklı etkiler oluşturması, çalışmamızın dikkat çekici bulgularından biridir. Astaksantin topikal uygulanması, MMP-9 ekspresyonunu sistemik uygulamaya kıyasla anlamlı düzeyde baskılamış ve bu azalma histolojik olarak hızlı epitelizasyon, düzenli bağ dokusu organizasyonu ve azalmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile korelasyon göstermiştir. Bu sonuçlar, topikal uygulamanın yara mikroçevresinde yüksek lokal astaksantin konsantrasyonu oluşturarak ROT'u doğrudan nötralize etmesiyle açıklanabilir. Böylece, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etki aracılığıyla MMP-9 salınımı ve aktivitesinin inhibe edildiği, dolayısıyla doku yıkımının sınırlandığı düşünülmektedir. Sistemik uygulamanın ise

bu etkileri daha yavaş ve sınırlı ölçüde göstermesi, dolaşım yoluyla hedef dokuya ulaşan etkin madde miktarının sınırlı olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Topikal astaksantin uygulamasının, yara iyileşmesi süreci boyunca S100A4 ve MMP-9 ekspresyon düzeylerini anlamlı ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bu düşük ekspresyon profili, histolojik olarak daha kontrollü fibroblast aktivitesi, daha organize granülasyon dokusu gelişimi ve artmış kolajen birikimi ile ilişkilendirilmiş; bu bulgular Masson's trikrom boyama ve H-skor analizleri ile de desteklenmiştir. Astaksantin bu etkisi, fibroblastların doğrudan modülasyonu yoluyla pro-rejeneratif süreçleri desteklerken, aynı zamanda inflamasyonu, matriks yıkımını ve fibrozis riskini azaltan çift yönlü bir mekanizmaya işaret etmektedir [339,343].

Topikal astaksantin grubunda MMP-9 ekspresyonunun 3. günden itibaren belirgin şekilde azaldığı, özellikle 7. günde minimal düzeye gerileyerek epitelizasyonun tamamlandığı ve bağ dokusunun organize hale geldiği gösterilmiştir. Topikal astaksantin doğrudan uygulama alanında yüksek antiinflamatuvar ve antioksidan etki gösterdiği, bu sayede fibroblast migrasyonu, kolajen sentezi ve anjiyogenezin fizyolojik sınırlar içinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Topikal astaksantin grubundaki S100A4 pozitif inflamatuvar hücrelerin belirgin olarak azalması, inflamasyon fazının çözüldüğü ve remodeling fazına geçişin hızlandığı şeklinde yorumlanabilir. Çalışmamızda, yara iyileşmesinin erken döneminde karakteristik olarak artış gösteren MMP-9 ekspresyonunun, astaksantin uygulanan gruplarda anlamlı düzeyde düşük bulunması; astaksantin inflamatuvar süreci kontrol altına alarak proliferatif evreye geçişi desteklediğini göstermektedir.

Melanoma hücrelerinde astaksantin MMP regülasyon yeteneği; MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu baskılayarak migrasyonu inhibe etmesi ve apoptozu indüklemesiyle desteklenmektedir [296]. Çalışmamız, bu inhibitör etkinin periodontal yara iyileşmesinde de geçerli olduğunu, özellikle topikal uygulamada MMP-9 aşırı ekspresyonunu baskılayarak doku yıkımını sınırladığını ve iyileşmeyi optimize ettiğini göstermektedir. S100A4 ekspresyonundaki belirgin azalma (özellikle topikal grubunda) benzer şekilde, astaksantin inflamatuvar hücre migrasyonunu ve göçünü modüle ederek kronik inflamasyon riskinin azaltıldığını düşündürmektedir.

Mevcut bulgular, S100A4 ve MMP-9 arasındaki moleküler etkileşimin periodontal yara iyileşmesinin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Topikal astaksantin bu etkileşimi modüle ederek her iki molekülün ekspresyonunu baskılaması, inflamatuvar yanıtın kontrol altına alınması, matriks yıkımının sınırlandırılması ve fibrozisin önlenmesi açısından anlamlı bir potansiyel taşımaktadır. Bu bulgular doğrultusunda astaksantin periodontal doku rejenerasyonu için umut vadeden bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilebilir. MMP-9 ve S100A4 arasındaki karşılıklı düzenlemenin ve bu etkileşimin periodontal rejeneratif tedavilerde hedeflenmesine yönelik ileri çalışmalar, rejeneratif diş hekimliği alanında yenilikçi terapötik yaklaşımların geliştirilmesine önemli katkı sağlayabilir.

Astaksantin lokal ve sistemik uygulamaları süresince, deneysel süreç boyunca herhangi bir sistemik toksisite, lokal irritasyon, ödem veya alerjik reaksiyon gibi advers etkilere rastlanmamıştır. Özellikle lokal uygulama sonrası elde edilen bulgular, astaksantin yara bölgesinde güvenli, hedefe yönelik ve etkili bir ajan olabileceğini göstermektedir. Lokal uygulamanın yabancı cisim reaksiyonuna yol açmaması, iskemi, nekroz, ülserasyon veya epitel bütünlüğünü bozacak düzeyde doku hasarına neden olmaması, biyouyumluluğu açısından önemli bir avantaj sağlayabileceğini göstermektedir.

Ağız ortamındaki yaranın sürekli tükürük varlığına ve gıda alımına bağlı olarak mekanik travmalara açık olması, topikal olarak uygulanan astaksantin yara bölgesinde kalış süresini değerlendirmeyi güçleştirmiştir. Bu durumun, istatistiksel analizlerde grup içi farklılıkların anlamlı düzeyde ortaya konulamamasında etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada tek bir astaksantin dozu kullanılarak etkinliğin değerlendirilmiş olması, farklı dozlara bağlı etkilerin incelenmesine olanak tanıyamamış olup yukarıdaki bilgiler çalışmanın sınırlılıklarını oluşturmaktadır.

Gelecek Çalışmalar için Öneriler

- Astaksantin farklı dozlarının karşılaştırıldığı ve minimum etkili dozun belirlendiği randomize ve kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Astaksantin topikal biyoyararlanım düzeylerini arttırmaya yönelik olarak, hidrojel veya nanopartikül bazlı taşıyıcı sistemlerle yapılan farmasötik formülasyonların çalışılması önerilmektedir.

- Diyabetik yara modelleri veya kemik defektleri gibi rejeneratif kapasitesi bozulmuş klinik durumların dahil edildiği çalışmalar, astaksantin risk faktörleri varlığındaki terapötik potansiyelini daha kapsamlı ortaya çıkarabilir.
- IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 ve VEGF gibi yara iyileşmesi sürecinde rol alan temel mediatörler üzerine astaksantin etkilerini aydınlatmak amacıyla, moleküler düzeydeki mekanizma çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır..
- Klinik uygulamaya geçişi desteklemek için, özellikle periodontal cerrahide lokal astaksantin uygulamalarını değerlendiren pilot klinik çalışmalar planlanmalıdır.



6. SONUÇ

Bu deneysel çalışma ile astaksantin sistematik ve topikal uygulama yolları ile ratlarda oluşturulan sekonder palatal yara modelinde iyileşmeyi artırdığı ilk kez ortaya konmuştur. Topikal uygulamanın, sistematik uygulamaya kıyasla daha belirgin olumlu etkiler sağladığı gözlenmiştir; astaksantin yara iyileşmesine katkısı makroskopik, histolojik ve moleküler düzeyde değerlendirilmiştir. Histolojik incelemeler, astaksantin uygulanan gruplarda inflamasyonun anlamlı düzeyde azaldığını, epitelizasyonun hızlandığını, granülasyon dokusunun daha organize ve vaskülerize olduğunu ve fibrotik yanıtın ise kontrollü seyrettiğini ortaya koymuştur. Çalışmamızda birincil ve ikincil çıktıları açısından astaksantin uygulanan gruplarda iyileşmenin olumlu yönde seyretmiş olması, araştırma hipotezimizi ve çalışma amacımızı destekler niteliktedir. Bu tez çalışması, antioksidan özellikleriyle bilinen astaksantin oral mukozada yara iyileşmesini destekleyici potansiyele sahip olduğunu doğrulamaktadır.

Temel Bulgular:

- Astaksantin, özellikle topikal uygulama ile epitel kapanmasını hızlandırarak, erken dönemde (3. ile 5. gün) yara yüzeyinde belirgin küçülme sağlamıştır.
- Astaksantin her iki uygulama yolu da inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve doku hasarını anlamlı derecede azaltmış, bu etki topikal grupta daha belirgin olarak gözlenmiştir.
- Anjiyogenez dinamikleri, astaksantin gruplarında erken fazda artan mikrodamar yoğunluğunun geç dönemde hızla olgunlaşan bir doku yapısına evrildiğini göstermiştir.
- Fibrozis skorları, topikal astaksantin grubunda 7. günde kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu durum, daha hızlı ve ileri düzeyde bir yeniden şekillenme sürecine işaret etmektedir.
- Astaksantin MMP-9 ekspresyonunu baskılayarak inflamatuvar süreci sınırlandırdığı, bununla birlikte S100A4 ekspresyonu ile fibroblast aktivitesi ve anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir. Astaksantin topikal olarak uygulanması, sistematik uygulamaya kıyasla, periodontal yara iyileşmesini MMP-9 ve S100A4 ekspresyonunu daha etkili bir şekilde baskılayarak ve histolojik iyileşme parametrelerini belirgin şekilde iyileştirerek hızlandırmaktadır. Bu veriler, astaksantin yara iyileşmesinde hem

inflamasyonu azaltıcı hem de rejeneratif süreci destekleyici çift yönlü bir etki mekanizmasına sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Histolojik, makroskopik ve moleküler düzeyde elde edilen bulgular, astaksantin periodontal cerrahi sonrası iyileşme sürecinde yardımcı bir ajan olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir. Antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra, fibrozis ve anjiyogenez üzerindeki modölatör rolü, bu bileşiğin klinik protokollere entegrasyonunu destekleyecek niteliktedir.

Astaksantin ile ilgili mevcut çalışmaların sayısı, kapsamı ve çeşitliliği henüz sınırlı olmakla birlikte, güvenilir bir toksikolojik profile sahip, yara iyileşmesinde umut vadeden alternatif bir tedavi ajanı olduğu söylenebilir. Astaksantin özellikleri ve etkileri üzerine yapılacak araştırmaların önümüzdeki yıllarda artacağı öngörülmekte olup, bu çalışmadan elde edilen bulguların, geniş ölçekli ve ileri düzey çalışmalara ışık tutacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Robson, M. C. (2001). Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38(2), 61-140.
2. Schultz, G. (1999). *Molecular regulation of wound healing* (Second edition). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 413-429
3. Monaco, J. L., and Lawrence, W. T. (2003). Acute wound healing an overview. *Clinics in Plastic Surgery*, 30(1), 1-12.
4. Gordillo, G. M., and Sen, C. K. (2003). Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *The American Journal of Surgery*, 186(3), 259-263.
5. Wlaschek, M., and Scharffetter-Kochanek, K. (2005). Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 13(5), 452-461.
6. Williamson, D., and Harding, K. (2004). Wound healing. *Medicine*, 32, 4-7.
7. Chhabra, S., Chhabra, N., Kaur, A., and Gupta, N. (2017). Wound healing concepts in clinical practice of omfs. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 16(4), 403-423.
8. Rock, C. L., Jacob, R. A., and Bowen, P. E. (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(7), 693-702.
9. Soneja, A., Drews, M., and Malinski, T. (2005). Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, 57, 108-119.
10. Chapple, I. L., and Matthews, J. B. (2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 43(1), 397-408.
11. Cho, Y. D., Kim, K. H., Lee, Y. M., Ku, Y., and Seol, Y. J. (2021). Periodontal wound healing and tissue regeneration: a narrative review. *Pharmaceuticals*, 14(5), 456.
12. Brand, H. S., Ligtenberg, A., and Veerman, E. (2014). Saliva and wound healing. *Monographs in Oral Science*, 24(1), 52-60.
13. Sheiham, A., and Watt, R. G. (2000). The common risk factor approach: a rational basis for promoting oral health. *Community Dentistry and Oral Epidemiology: Commentary*, 28(6), 399-406.
14. López, A., Nart, J., Santos, A., Alcázar, J., and Freixa, O. (2011). Assessment of morbidity after periodontal resective surgery. *Journal of Periodontology*, 82(11), 1563-1569.
15. Taha, N., Daoud, H., Malik, T., Shettysowkoor, J., and Rahman, S. (2024). The effects of low-level laser therapy on wound healing and pain management in skin wounds: a systematic review and meta-analysis. *Cureus*, 16(10), e72542.

16. Huang, C., Dong, L., Zhao, B., Lu, Y., Huang, S., Yuan, Z., and Qian, W. (2022). Anti-inflammatory hydrogel dressings and skin wound healing. *Clinical and Translational Medicine*, 12(11), e1094.
17. Graziani, F., Izzetti, R., Perić, M., Marhl, U., Nisi, M., and Gennai, S. (2024). Early periodontal wound healing after chlorhexidine rinsing: a randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 28(6), 354.
18. Tavelli, L., Ravidà, A., Barootchi, S., Chambrone, L., and Giannobile, W. V. (2021). Recombinant human platelet-derived growth factor: A systematic review of clinical findings in oral regenerative procedures. *Journal of Dental Research Clinical and Translational Research*, 6(2), 161-173.
19. Mutlu, S., ve Yılmaz, E. (2019). Yara yönetiminde yenilikçi yaklaşımlar. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8(4), 481-494.
20. Tavelli, L., Barootchi, S., Stefanini, M., Zucchelli, G., Giannobile, W. V., and Wang, H. L. (2023). Wound healing dynamics, morbidity, and complications of palatal soft-tissue harvesting. *Periodontology 2000*, 92(1), 90-119.
21. Hammad, H., Hammad, M., Abdelhadi, I., and Khalifeh, M. (2011). Effects of topically applied agents on intra-oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study. *International Journal of Dental Hygiene*, 9(1), 9-16.
22. Bhati, A., Fageeh, H., Ibraheem, W., Fageeh, H., Chopra, H., and Panda, S. (2022). Role of hyaluronic acid in periodontal therapy (review). *Biomedical Reports*, 17(5), 91.
23. Malcangi, G., Inchingolo, A. D., Trilli, I., Ferrante, L., Casamassima, L., Nardelli, P., and Dipalma, G. (2025). Recent use of hyaluronic acid in dental medicine. *Materials (Basel)*, 18(8), 1863.
24. Matsuura, Y., Noda, K., Suzuki, S., and Kawai, K. (2019). Glucocorticoids suppress fibroblast apoptosis in an in vitro thermal injury model. *Burns*, 45(1), 173-179.
25. Özalp, Ö., Sindel, A., Altay, M. A., Özbudak İ, H., Bilgin, B., Kocabalkan, B., and Kader, D. (2022). Comparative evaluation of the efficacy of ozone therapy and low level laser therapy on oral mucosal wound healing in rat experimental model. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 123(6), e670-e674.
26. Borie, E., Rosas, E., Kuramochi, G., Etcheberry, S., Olate, S., and Weber, B. (2019). Oral applications of cyanoacrylate adhesives: a literature review. *BioMed Research International*, 2019(1), 8217602.
27. Naguib, Y. M. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150-1154.
28. Alugoju, P., Krishna Swamy, V. K. D., Anthikapalli, N. V. A., and Tencomnao, T. (2023). Health benefits of astaxanthin against age-related diseases of multiple organs: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(31), 10709-10774.

29. Suganuma, K., Nakajima, H., Ohtsuki, M., and Imokawa, G. (2010). Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 58(2), 136-142.
30. Kidd, P. (2011). Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Alternative Medicine Review*, 16(4), 355-364.
31. Kohandel, Z., Farkhondeh, T., Aschner, M., Pourbagher-Shahri, A. M., and Samarghandian, S. (2022). Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 145, 112179.
32. Fassett, R. G., and Coombes, J. S. (2009). Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease. *Future Cardiology*, 5(4), 333-342.
33. Si, P., and Zhu, C. (2022). Biological and neurological activities of astaxanthin (review). *Molecular Medicine Reports*, 26(4), 1-12.
34. Liu, X., and Osawa, T. (2007). Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1), 187-193.
35. Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., and Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. *Marine Drugs*, 12(1), 128-152.
36. Choi, H. D., Kang, H. E., Yang, S. H., Lee, M. G., and Shin, W. G. (2011). Pharmacokinetics and first-pass metabolism of astaxanthin in rats. *British Journal of Nutrition*, 105(2), 220-227.
37. Lin, Y. J., Lin, J. Y., Wang, D. S., Chen, C. H., and Chiou, M. H. (2017). Safety assessment of astaxanthin derived from engineered escherichia coli K-12 using a 13-week repeated dose oral toxicity study and a prenatal developmental toxicity study in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 87, 95-105.
38. Li, J., Xia, Y., Liu, T., Wang, J., Dai, W., Wang, F., and Guo, C. (2015). Protective effects of astaxanthin on conA-induced autoimmune hepatitis by the JNK/p-JNK pathway-mediated inhibition of autophagy and apoptosis. *Public Library of Science One*, 10(3), e0120440.
39. Mizuta, M., Hirano, S., Hiwatashi, N., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., and Ito, J. (2014). Effect of astaxanthin on vocal fold wound healing. *Laryngoscope*, 124(1), e1-7.
40. Nurdianti, L., Rosyidi, R. E. M., Idacahyati, K., and Setiawan, F. (2022). The effect of astaxanthin gel and zeaxanthin combination on wound healing in diabetic rats. *IAI Special Edition, Pharmacy Education*, 22(2), 169-173.
41. Suzuki, Y., Ohgami, K., Shiratori, K., Jin, X.-H., Ilieva, I., Koyama, Y., and Ohno, S. (2006). Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Experimental Eye Research*, 82(2), 275-281.

42. Kowshik, J., Nivetha, R., Ranjani, S., Venkatesan, P., Selvamuthukumar, S., Veeravarmal, V., and Nagini, S. (2019). Astaxanthin inhibits hallmarks of cancer by targeting the PI3K/NF- κ B/STAT3 signalling axis in oral squamous cell carcinoma models. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 71(10), 1595-1610.
43. Ngeow, W. C., Tan, C. C., Goh, Y. C., Deliberador, T. M., and Cheah, C. W. (2022). A narrative review on means to promote oxygenation and angiogenesis in oral wound healing. *Bioengineering (Basel)*, 9(11), 636.
44. Xu, Y., Zhang, J., Jiang, W., and Zhang, S. (2015). Astaxanthin induces angiogenesis through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Phytomedicine*, 22(7), 744-751.
45. Hannas, A. R., Pereira, J. C., Granjeiro, J. M., and Tjäderhane, L. (2007). The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica*, 65(1), 1-13.
46. Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., and Maskos, K. (1999). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(4), 639-652.
47. Aparecida Da Silva, A., Leal-Junior, E. C. P., Alves, A. C. A., Rambo, C. S., Dos Santos, S. A., Vieira, R. P., and De Carvalho, P. D. T. C. (2013). Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 15(4), 210-216.
48. Davies, K. J. (2014). The complex interaction of matrix metalloproteinases in the migration of cancer cells through breast tissue stroma. *International Journal of Breast Cancer*, 2014, 839094.
49. Lee, J., Kim, H., and Lim, J. W. (2022). Astaxanthin inhibits helicobacter pylori-induced MMPs expression and cell invasion by suppressing PI3K-AKT-mTOR pathways in AGS cells. *Current Developments in Nutrition*, 6, 989.
50. Kishimoto, Y., Tani, M., Iizuka, M., Saita, E., Suzuki, K., Toyozaki, M., and Kondo, K. (2009). Astaxanthin suppresses matrix metalloproteinases (mmps) activity and scavenger receptors expression in macrophages. *European Journal of Nutrition*, 49(2), 119-126.
51. Lee, J., Bae, S., Lim, J. W., and Kim, H. (2021). Inhibitory effect of astaxanthin on Helicobacter pylori-Induced matrixmetalloproteinase expression in gastric epithelial AGS cells. *Current Developments in Nutrition*, 5, 1132.
52. Schäfer, B. W., and Heizmann, C. W. (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(4), 134-140.
53. Takenaga, K., Nakamura, Y., and Sakiyama, S. (1997). Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic lewis lung carcinoma cells. *Oncogene*, 14(3), 331-337.

54. Zhang, G., Li, M., Jin, J., Bai, Y., and Yang, C. (2011). Knockdown of S100A4 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma cells by repression of matrix metalloproteinase-9. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12(8), 2075-2080.
55. Ambartsumian, N., Klingelhöfer, J., Grigorian, M., Christensen, C., Kriaievska, M., Tulchinsky, E., and Lukanidin, E. (2001). The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*, 20(34), 4685-4695.
56. Xie, C., Lin, M., Tian, H., Zhang, L., and Ren, A. (2021). Astaxanthin inhibits inflammation of human periodontal ligament cells induced by lipopolysaccharide. *Journal of Central South University. Medical Sciences*, 46(3), 227-233.
57. Susanti, W., Purwanto, B., Cilmiaty, R., and Prayitno, A. (2020). Investigation of astaxanthin effect on the formation of collagen fibers for periodontal tissue repair in bacteria infected periodontitis. *Bali Medical Journal*, 9(2), 493-495.
58. Aras Tosun, D., Önder, C., Akdoğan, N., Kurgan, Ş., Aktay, İ., Tuncay, E., and Orhan, K. (2022). Astaxanthin enhances gingival wound healing following high glucose-induced oxidative stress. *BioMed Research International*, 2022, 4043105.
59. Balci Yuce, H., Lektemur Alpan, A., Gevrek, F., and Toker, H. (2018). Investigation of the effect of astaxanthin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 53(1), 131-138.
60. Miyachi, M., Matsuno, T., Asano, K., and Mataga, I. (2015). Anti-inflammatory effects of astaxanthin in the human gingival keratinocyte line NDUSD-1. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 56(3), 171-178.
61. Toker, H., Balci Yuce, H., Lektemur Alpan, A., Gevrek, F., and Elmastas, M. (2018). Morphometric and histopathological evaluation of the effect of grape seed proanthocyanidin on alveolar bone loss in experimental diabetes and periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 53(3), 478-486.
62. Lektemur Alpan, A., and Çalışır, M. (2022). The effect of two different doses of astaxanthin on alveolar bone loss in an experimental model of periodontitis in diabetic rats. *Journal of Veterinary Dentistry*, 39(3), 224-233.
63. Zhao, G., Zhong, H., Rao, T., and Pan, Z. (2020). Metabolomic analysis reveals that the mechanism of astaxanthin improves the osteogenic differentiation potential in bone marrow mesenchymal stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 3427430.
64. Gartner, L. P. (1994). Oral anatomy and tissue types. *Seminars in Dermatology*, 13(2), 68-73.
65. Groeger, S., and Meyle, J. (2019). Oral mucosal epithelial cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 208.
66. Squier, C. A., and Kremer, M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001(29), 7-15.

67. Lang, N. P., Berglundh, T., Giannobile, W. V., and Sanz, M. (2021). *Lindhe's clinical periodontology and implant dentistry* (Sixth edition). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 5-11
68. Wang, S. S., Tang, Y. L., Pang, X., Zheng, M., Tang, Y. J., and Liang, X. H. (2019). The maintenance of an oral epithelial barrier. *Life Sciences*, 227, 129-136.
69. Squier, C. A., and Kremer, M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 2001(29), 7-15.
70. Miloro, M., Ghali, G., Larsen, P., and Waite, P. (2004). Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery, wound healing. *Hamilton, Ont*(2), 3-4.
71. Li, X., Liu, Y., Yang, X., Li, C., and Song, Z. (2022). The oral microbiota: community composition, influencing factors, pathogenesis, and interventions. *Frontiers in Microbiology*, 13, 895537.
72. Iglesias-Bartolome, R., Uchiyama, A., Molinolo, A. A., Abusleme, L., Brooks, S. R., Callejas-Valera, J. L., and Onaitis, M. W. (2018). Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Science Translational Medicine*, 10(451), eaap8798.
73. Squier, C. A., Kremer, M. J., and Wertz, P. W. (2003). Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 32(10), 595-599.
74. Velnar, T., Bailey, T., and Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
75. Lang, N. P., and Lindhe, J. (2021). *Lindhe's clinical periodontology and implant dentistry* (Sixth edition). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 525
76. Singh, S., Young, A., and McNaught, C. E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 35(9), 473-477.
77. Suvarna, K., and Munira, M. (2013). Wound healing process and wound care dressing: a detailed review. *Journal of Pharma Research*, 2(11), 6-12.
78. Hoffman, M., and Monroe III, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(06), 958-965.
79. Coşkun, Ö., Uzun, G., Dal D, Y. Ş., Sönmez, Y., Yurttaş, Y., Güler, A., ve Şahin, M. (2016). Kronik yarada tedavi yaklaşımları. *Gülhane Tıp Dergisi*, 58(2), 207-228.
80. Ruggeri, Z. M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nature Medicine*, 8(11), 1227-1234.
81. Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914-918.

82. Grinnell, F., Billingham, R. E., and Burgess, L. (1981). Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 76(3), 181-189.
83. Kirsner, R. S., and Eaglstein, W. H (1993). The wound healing process. *Dermatologic Clinics*, 11, 629-640.
84. desJardins-Park, H. E., Mascharak, S., Chinta, M. S., Wan, D. C., and Longaker, M. T. (2019). The spectrum of scarring in craniofacial wound repair. *Frontiers in Physiology*, 10, 322.
85. Noli, C., and Miolo, A. (2001). The mast cell in wound healing. *Veterinary Dermatology*, 12(6), 303-313.
86. Krzyszczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., and Berthiaume, F. (2018). The role of macrophages in acute and chronic wound healing and Interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in Physiology*, 9, 419.
87. George Broughton, I., Janis, J. E., and Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 12-34.
88. Junjappa, R. P., Patil, P., Bhattarai, K. R., Kim, H. R., and Chae, H. J. (2018). IRE1 α implications in endoplasmic reticulum stress-mediated development and pathogenesis of autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, 1289.
89. Simpson, D. M., and Ross, R. (1972). The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(8), 2009-2023.
90. Hart, J. (2002). Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*, 11(6), 205-209.
91. Hansson, C. (1994). Optimal treatment of venous (stasis) ulcers in elderly patients. *Drugs and Aging*, 5, 323-334.
92. Diegelmann, R. F., and Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9(1), 283-289.
93. Lang, N. P., Berglundh, T., Giannobile, W. V., and Sanz, M. (2015). *Lindhe's clinical periodontology and implant dentistry* (Sixth edition). United Kingdom: John Wiley & Sons, 523-525
94. Flanagan, M. (2000). The physiology of wound healing. *Journal of Wound Care*, 9(6), 299-300.
95. Takeshita, S., Zheng, L., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L., Bunting, S., and Isner, J. (1994). Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(2), 662-670.
96. Reinke, J. M., and Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43.

97. Singer, A. J., and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 341(10), 738-746.
98. Ding, J. Y., Chen, M. J., Wu, L. F., Shu, G. F., Fang, S. J., Li, Z. Y., and Ji, J. S. (2023). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: roles, opportunities and challenges. *Military Medical Research*, 10(1), 36.
99. Clark, R. A. (1993). Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *The American Journal of the Medical Sciences*, 306(1), 42-48.
100. Kimura, S., and Tsuji, T. (2021). Mechanical and immunological regulation in wound healing and skin reconstruction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5474.
101. Shih, B., Garside, E., McGrouther, D. A., and Bayat, A. (2010). Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair and Regeneration*, 18(2), 139-153.
102. Baum, C. L., and Arpey, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery*, 31(6), 674-686.
103. Szpaderska, A., Walsh, C., Steinberg, M., and DiPietro, L. (2005). Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. *Journal of Dental Research*, 84(4), 309-314.
104. Silva, C. O., Ribeiro, E. D. P., Sallum, A. W., and Tatakis, D. N. (2010). Free gingival grafts: graft shrinkage and donor-site healing in smokers and non-smokers. *Journal of Periodontology*, 81(5), 692-701.
105. Keast, D. (2000). The basic principles of wound healing. *Ostomy Wound Management*, 46, 11-16.
106. Maguire, J. J. (2000). *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier Science, 995-1020
107. Aukhil, I. (2000). Biology of wound healing. *Periodontology 2000*, 22(1), 44-50.
108. Kim, Y. H., and Kim, S. (1998). Light microscopic and electron microscopic study in rat skin wound healing. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, 30(3), 224-232.
109. Polimeni, G., Xiropaidis, A. V., and Wikesjö, U. M. (2006). Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*, 41, 30-47.
110. Lindhe, J., Lang, N. P., and Karring, T. (2003). *Mucogingival therapy-periodontal plastic surgery* (Forth edition). Copenhagen: Blackwell Publishing, 588-592
111. Alzahrani, F., Alabeedi, F., La Terra, S., and Alshirah, A. (2024). What factors can have an impact on the wound healing process from an oral surgery perspective? A review. *ScienceVolks Open Access*, 5(1), 33-45.

112. Rodriguez, P. G., Felix, F. N., Woodley, D. T., and Shim, E. K. (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic Surgery*, 34(9), 1159-1169.
113. Tandara, A. A., and Mustoe, T. A. (2004). Oxygen in wound healing-more than a nutrient. *World Journal of Surgery*, 28, 294-300.
114. Politis, C., Schoenaers, J., Jacobs, R., and Agbaje, J. O. (2016). Wound healing problems in the mouth. *Frontiers in Physiology*, 7, 507.
115. Edwards, R., and Harding, K. G. (2004). Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17(2), 91-96.
116. Shah, R., Domah, F., Shah, N., and Domah, J. (2020). Surgical wound healing in the oral cavity: a review. *Dental Update*, 47(2), 135-143.
117. Anderson, J. M., Rodriguez, A., and Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars Immunology*, 20(2), 86-100.
118. Guo, S. A., and DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
119. Çankal, D. A. U. (2013). Yara iyileşmesini etkileyen faktörler içerisinde beslenmenin yeri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 23(7), 135-141.
120. Guo, S. A., and DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
121. Jones, V., Grey, J. E., and Harding, K. G. (2006). Wound dressings. *British Medical Journal*, 332(7544), 777-780.
122. Campos, A. C., Groth, A. K., and Branco, A. B. (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(3), 281-288.
123. Tong, B. C., and Barbul, A. (2004). Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 4(8), 823-832.
124. Stechmiller, J. K. (2010). Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutrition in Clinical Practice*, 25(1), 61-68.
125. Chan, L. K., Withey, S., and Butler, P. E. (2006). Smoking and wound healing problems in reduction mammoplasty: is the introduction of urine nicotine testing justified?. *Annals of Plastic Surgery*, 56(2), 111-115.
126. Ahn, C., and Mulligan, P. (2008). Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Advances in Skin and Wound Care*, 21(5), 227-236.
127. Jensen, J. A., Goodson, W. H., Hopf, H. W., and Hunt, T. K. (1991). Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Archives of Surgery*, 126(9), 1131-1134.

128. Sørensen, L. T., Jørgensen, S., Petersen, L. J., Hemmingsen, U., Bülow, J., Loft, S., and Gottrup, F. (2009). Acute effects of nicotine and smoking on blood flow, tissue oxygen, and aerobic metabolism of the skin and subcutis. *Journal of Surgical Research*, 152(2), 224-230.
129. McMaster, S., Paul-Clark, M., Walters, M., Fleet, M., Anandarajah, J., Sriskandan, S., and Mitchell, J. (2008). Cigarette smoke inhibits macrophage sensing of Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide: relative roles of nicotine and oxidant stress. *British Journal of Pharmacology*, 153(3), 536-543.
130. Morimoto, N., Takemoto, S., Kawazoe, T., and Suzuki, S. (2008). Nicotine at a low concentration promotes wound healing. *Journal of Surgical Research*, 145(2), 199-204.
131. Jacobi, J., Jang, J. J., Sundram, U., Dayoub, H., Fajardo, L. F., and Cooke, J. P. (2002). Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *The American Journal of Pathology*, 161(1), 97-104.
132. Sørensen, L. T. (2012). Wound healing and infection in surgery. The clinical impact of smoking and smoking cessation: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Surgery*, 147(4), 373-383.
133. Mills, E., Eyawo, O., Lockhart, I., Kelly, S., Wu, P., and Ebbert, J. O. (2011). Smoking cessation reduces postoperative complications: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 124(2), 144-154.
134. Morain, W. D., and Colen, L. B. (1990). Wound healing in diabetes mellitus. *Clinics in Plastic Surgery*, 17(3), 493-501.
135. Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R., and Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(2), 103-113.
136. Lajolo, C., Rupe, C., Gioco, G., Troiano, G., Patini, R., Petruzzi, M., and Giuliani, M. (2021). Osteoradionecrosis of the jaws due to teeth extractions during and after radiotherapy: a systematic review. *Cancers (Basel)*, 13(22), 5798.
137. Javed, F., Al Askar, M., Almas, K., Romanos, G. E., and Al Hezaimi, K. (2012). Tissue reactions to various suture materials used in oral surgical interventions. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 762095.
138. McCulloch, C. A. (1993). Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol 2000*, 1(1), 1625.
139. Newman, M. G., Takwi, H. H., Klokkevold, P. R., and Carranza, F. A. (2016). *Newman and Carranza's Clinical Periodontology, Periodontal Regeneration and Reconstructive Surgery* (Thirteenth edition). Missouri: Elsevier Saunders, 3494-3506.
140. Listgarten, M. A. (1979). Histological study of repair following new attachment procedure in human periodontal lesion. *Journal of Periodontology*, 50, 333-344.

141. Bosshardt, D. D. (2008). Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 87-105.
142. Sculean, A., Nikolidakis, D., Nikou, G., Ivanovic, A., Chapple, I. L., and Stavropoulos, A. (2015). Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontol 2000*, 68(1), 182-216.
143. Wong, J. W., Gallant-Behm, C., Wiebe, C., Mak, K., Hart, D. A., Larjava, H., and Häkkinen, L. (2009). Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: evidence from the red Duroc pig model and humans. *Wound Repair and Regeneration*, 17(5), 717-729.
144. Szpaderska, A., Zuckerman, J., and DiPietro, L. (2003). Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *Journal of Dental Research*, 82(8), 621-626.
145. Graves, D. T., Nooh, N., Gillen, T., Davey, M., Patel, S., Cottrell, D., and Amar, S. (2001). IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing. *The Journal of Immunology*, 167(9), 5316-5320.
146. Birkedal-Hansen, H., Moore, W., Bodden, M., Windsor, L., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(2), 197-250.
147. Kumar, M. S., Vamsi, G., Sripriya, R., and Sehgal, P. K. (2006). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *Journal of Periodontology*, 77(11), 1803-1808.
148. Moehler, T., Ho, A., Goldschmidt, H., and Barlogie, B. (2003). Angiogenesis in hematologic malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 45(3), 227-244.
149. Fini, M. E., Parks, W. C., Rinehart, W. B., Girard, M. T., Matsubara, M., Cook, J. R., and Jeffrey, J. J. (1996). Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. *The American Journal of Pathology*, 149(4), 1287.
150. Vandooren, J., Van den Steen, P. E., and Opdenakker, G. (2013). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(3), 222-272.
151. Donato, R., R Cannon, B., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., J Weber, D., and L Geczy, C. (2013). Functions of S100 proteins. *Current Molecular Medicine*, 13(1), 24-57.
152. Schneider, M., Hansen, J. L., and Sheikh, S. P. (2008). S100A4: a common mediator of epithelial–mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases?. *Journal of Molecular Medicine*, 86, 507-522.
153. Šenolt, L., Grigorian, M., Lukanidin, E., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S., and Neidhart, M. (2006). S100A4 (Mts1): is there any relation to the pathogenesis of rheumatoid arthritis?. *Autoimmunity Reviews*, 5(2), 129-131.
154. Jia, W., Gao, X. J., Zhang, Z. D., Yang, Z. X., and Zhang, G. (2013). S100A4 silencing suppresses proliferation, angiogenesis and invasion of thyroid cancer cells through

- downregulation of MMP-9 and VEGF. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(11), 1495–1508.
155. Zhou, M., Li, Z. Q., and Wang, Z. L. (2015). S100A4 upregulation suppresses tissue ossification and enhances matrix degradation in experimental periodontitis models. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(11), 1388-1394.
 156. Wang, Y., Gao, G., Wu, Y., Wang, Y., Wu, X., and Zhou, Q. (2020). S100A4 silencing facilitates corneal wound healing after alkali burns by promoting autophagy via blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 61(11), 19-19.
 157. Ryan, D. G., Taliana, L., Sun, L., Wei, Z. G., Masur, S. K., and Lavker, R. M. (2003). Involvement of S100A4 in stromal fibroblasts of the regenerating cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(10), 4255-4262.
 158. Mariotti, A. J., and Rumpf, D. A. (1999). Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *Journal of Periodontology*, 70(12), 1443-1448.
 159. Tartaglia, G. M., Tadakamadla, S. K., Connelly, S. T., Sforza, C., and Martín, C. (2019). Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 10, 2042098619854881.
 160. Brookes, Z. L. S., Bescos, R., Belfield, L. A., Ali, K., and Roberts, A. (2020). Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *Journal of Dentistry*, 103, 103497.
 161. Madi, M., and Kassem, A. (2018). Topical simvastatin gel as a novel therapeutic modality for palatal donor site wound healing following free gingival graft procedure. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(3), 212-219.
 162. Khoshneviszadeh, M., Ashkani-Esfahani, S., Namazi, M. R., Noorafshan, A., Geramizadeh, B., and Miri, R. (2014). Topical simvastatin enhances tissue regeneration in full-thickness skin wounds in rat models. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 263-269.
 163. Giannobile, W. V. (1996). Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone*, 19(1), 23-37.
 164. Gentile, P., and Garcovich, S. (2020). Systematic review-the potential implications of different platelet-rich plasma (prp) concentrations in regenerative medicine for tissue repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5702.
 165. Miron, R. J., Zucchelli, G., Pikos, M. A., Salama, M., Lee, S., Guillemette, V., and Wang, H.L. (2017). Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, 21, 1913-1927.
 166. Tavelli, L., Chen, C. Y., Barootchi, S., and Kim, D. M. (2022). Efficacy of biologics for the treatment of periodontal infrabony defects: an American Academy of Periodontology best evidence systematic review and network meta-analysis. *Journal of Periodontology*, 93(12), 1803-1826.

167. Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K., and Lynch, S. E. (2003). Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *Journal of Periodontology*, 74(9), 1282-1292.
168. Villa, O., Wohlfahrt, J. C., Mdla, I., Petzold, C., Reseland, J. E., Snead, M. L., and Lyngstadaas, S. P. (2015). Proline-rich peptide mimics effects of enamel matrix derivative on rat oral mucosa incisional wound healing. *Journal of Periodontology*, 86(12), 1386-1395.
169. Miron, R. J., Sculean, A., Cochran, D. L., Froum, S., Zucchelli, G., Nemcovsky, C., and Dard, M. (2016). Twenty years of enamel matrix derivative: the past, the present and the future. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(8), 668-683.
170. Villa, O., Wohlfahrt, J. C., Koldslund, O. C., Brookes, S. J., Lyngstadaas, S. P., Aass, A. M., and Reseland, J. E. (2016). EMD in periodontal regenerative surgery modulates cytokine profiles: a randomised controlled clinical trial. *Scientific Reports*, 6(1), 23060.
171. Mendez-Eastman, S. (2005). Wound dressing categories. *Plastic and Aesthetic Nursing*, 25(2), 95-99.
172. Pilloni, A., Marini, L., Gagliano, N., Canciani, E., Dellavia, C., Cornaghi, L. B., and Rojas, M. A. (2023). Clinical, histological, immunohistochemical, and biomolecular analysis of hyaluronic acid in early wound healing of human gingival tissues: a randomized, split-mouth trial. *Journal of Periodontology*, 94(7), 868-881.
173. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F., and Kumar, S. (1985). Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 228(4705), 1324-1326.
174. Asparuhova, M. B., Kiryak, D., Eliezer, M., Mihov, D., and Sculean, A. (2019). Activity of two hyaluronan preparations on primary human oral fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 54(1), 33-45.
175. Çankaya, Z. T., Gürbüz, S., Bakirarar, B., and Kurtiş, B. (2020). Evaluation of the effect of hyaluronic acid application on the vascularization of free gingival graft for both donor and recipient sites with laser doppler flowmetry: a randomized, examiner-blinded, controlled clinical trial. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 40(2), 233-243.
176. Antoszevska, M., Sokolewicz, E. M., and Barańska-Rybak, W. (2024). Wide use of hyaluronic acid in the process of wound healing-a rapid review. *Scientia Pharmaceutica*, 92(2), 23.
177. Lanka, M., Kurtzman, G. M., and Shukla, S. (2015). Regeneration in periodontics: Collagen-a review of its properties and applications in dentistry. *Compendium*, 36(5), 358-363.
178. Galeano, M., Altavilla, D., Bitto, A., Minutoli, L., Calò, M., Cascio, P. L., and Mioni, C. (2006). Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Critical Care Medicine*, 34(4), 1139-1146.

179. Pandya, M., Saxon, M., Bozanich, J., Tillberg, C., Luan, X., and Diekwisch, T. G. H. (2021). The glycoprotein/cytokine erythropoietin promotes rapid alveolar ridge regeneration in vivo by promoting new bone extracellular matrix deposition in conjunction with coupled angiogenesis/osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 123-135.
180. Haroon, Z. A., Amin, K., Jiang, X., and Arcasoy, M. O. (2003). A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *The American Journal of Pathology*, 163(3), 993-1000.
181. Galeano, M., Altavilla, D., Cucinotta, D., Russo, G. T., Calo, M., Bitto, A., and Seminara, P. (2004). Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*, 53(9), 2509-2517.
182. Stavropoulou, C., Atout, R. N., Brownlee, M., Schroth, R. J., and Kelekis-Cholakakis, A. (2019). A randomized clinical trial of cyanoacrylate tissue adhesives in donor site of connective tissue grafts. *Journal of Periodontology*, 90(6), 608-615.
183. Gümüş, P., and Buduneli, E. (2014). Graft stabilization with cyanoacrylate decreases shrinkage of free gingival grafts. *Australian Dental Journal*, 59(1), 57-64.
184. Castro-Gaspar, C., Olmedo-Gaya, M. V., Romero-Olid, M. N., Lisbona-Gonzalez, M. J., Vallecillo-Rivas, M., and Reyes-Botella, C. (2021). Comparison between tissue adhesive cyanoacrylate and suture for palatal fibromucosa healing: a randomized controlled study. *Materials (Basel)*, 14(22), 7009.
185. Nguyen, H. M., Ngoc Le, T. T., Nguyen, A. T., Thien Le, H. N., and Pham, T. T. (2023). Biomedical materials for wound dressing: recent advances and applications. *Recent Advances and Applications*, 13(8), 5509-5528.
186. Li, M., Lv, J., Yang, Y., Cheng, G., Guo, S., Liu, C., and Ding, Y. (2022). Advances of hydrogel therapy in periodontal regeneration-a materials perspective review. *Gels*, 8(10), 624.
187. Ji, Q. X., Deng, J., Xing, X. M., Yuan, C. Q., Yu, X. B., Xu, Q. C., and Yue, J. (2010). Biocompatibility of a chitosan-based injectable thermosensitive hydrogel and its effects on dog periodontal tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1153-1160.
188. Ni, J., Li, M., Li, C., Zhong, Z., Xi, H., and Wu, Y. (2023). Stem-cell based soft tissue substitutes: engineering of crosslinked polylysine-hyaluronic acid microspheres ladened with gingival mesenchymal stem cells for collagen tissue regeneration and angiogenesis. *Journal of Periodontology*, 94(12), 1436-1449.
189. Hilal, A., Güler, Ç., Yolcu, Ü., Koparal, M., Çakır, E., and Demir, P. (2018). Biostimulatory effects of diode laser and ozone on wound healing in rats. *Meandros Medical and Dental Journal*, 19(2), 160.
190. Gopal, L., Palwankar, P., and Dhalla, N. (2024). The efficacy of low-level laser therapy on the healing of oral wounds: a systematic review. *Cureus*, 16(10), e70832.

191. Gadde, P., and George, J. P. (2023). Comparative evaluation of the effects of low-level laser therapy and ozone application on wound healing after gingivectomy and gingivoplasty: a randomized control clinical trial. *International Journal of Dentistry Research*, 8, 4-11.
192. Morimoto, C., Takedachi, M., Kawasaki, K., Shimomura, J., Murata, M., Hirai, A., and Murakami, S. (2021). Hypoxia stimulates collagen hydroxylation in gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Journal of Periodontology*, 92(11), 1635-1645.
193. Bishop, A. (2008). Role of oxygen in wound healing. *Journal of Wound Care* 17(9), 399-402.
194. Oryan, A., Alemzadeh, E., and Moshiri, A. (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedecine and Pharmacotherapie*, 98, 469-483.
195. Yu, T., Dohl, J., Park, Y. M., Brown, L. L., Costello, R. B., Chen, Y., and Deuster, P. A. (2022). Protective effects of dietary curcumin and astaxanthin against heat-induced ROS production and skeletal muscle injury in male and female C57BL/6J mice. *Life Sciences*, 288, 120160.
196. Comino-Sanz, I. M., López-Franco, M. D., Castro, B., and Pancorbo-Hidalgo, P. L. (2021). The role of antioxidants on wound healing: a review of the current evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 10(16), 3558.
197. Blijlevens, N., Marteijs, J., Timal, S., Donnelly, J., de Witte, T., and M'Rabet, L. (2004). Role of curcumin and the inhibition of NF- κ B in the onset of chemotherapy-induced mucosal barrier injury. *Leukemia*, 18(2), 276-284.
198. Idrees, M., and Kujan, O. (2024). Curcumin is effective in managing oral inflammation: an in vitro study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 53(6), 376-385.
199. Geyik, F., Kaya, S., Yılmaz, D. E., Demirci, H., Akmayan, İ., Özbek, T., and Acar, S. (2024). Propolis-loaded poly(lactic-co-glycolic Acid) nanofibers: an in vitro study. *American Chemical Societ*, 9(12), 14054-14062.
200. Uchida, D. T., and Bruschi, M. L. (2023). 3D printing as a technological strategy for the personalized treatment of wound healing. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 24(1), 41.
201. Yayehrad, A. T., Siraj, E. A., Matsabisa, M., and Birhanu, G. (2023). 3D printed drug loaded nanomaterials for wound healing applications. *Regenerative Therapy*, 24, 361-376.
202. Jackson, W. M., Nesti, L. J., and Tuan, R. S. (2012). Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(1), 44-50.
203. Gottrup, F., Ågren, M. S., and Karlsmark, T. (2000). Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration*, 8(2), 83-96.

204. Lindblad, W. (2000). Animal models in wound healing research: do we need more?. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 8(2), 81-82.
205. Cross, S., Naylor, L., Coleman, R., and Teo, T. (1995). An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *British Journal of Plastic Surgery*, 48(4), 189-197.
206. Ramos, M. L. C., Gragnani, A., and Ferreira, L. M. (2008). Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring?. *Journal of Burn Care and Research*, 29(2), 363-368.
207. Dorsett-Martin, W. A. (2004). Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair and Regeneration*, 12(6), 591-599.
208. Rakhmatia, Y. D., Ayukawa, Y., Furuhashi, A., and Koyano, K. (2013). Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of Prosthodontic Research*, 57(1), 3-14.
209. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 44-88.
210. Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., and Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840-860.
211. Battino, M., Bullon, P., Wilson, M., and Newman, H. (1999). Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 10(4), 458-476.
212. Waddington, R. J., Moseley, R., and Embery, G. (2000). Periodontal disease dechanisms: Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Diseases*, 6(3), 138-151.
213. Canakci, C., Cicek, Y., and Canakci, V. (2005). Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Moscow)*, 70, 619-628.
214. Chapple, I. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(5), 287-296.
215. Vajragupta, O., Boonchoong, P., and Berliner, L. J. (2004). Manganese complexes of curcumin analogues: evaluation of hydroxyl radical scavenging ability, superoxide dismutase activity and stability towards hydrolysis. *Free Radical Research*, 38(3), 303-314.
216. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biological Interactions*, 160(1), 1-40.

217. Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., and Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1456-1462.
218. Kopal, C., Deveci, M., Öztürk, S., and Sengezer, M. (2007). Effects of topical glutathione treatment in rat ischemic wound model. *Annals of Plastic Surgery*, 58(4), 449-455.
219. Rajasekaran, N., Nithya, M., Rose, C., and Chandra, T. (2004). The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1689(3), 190-201.
220. Phan, T. T., Wang, L., See, P., Grayer, R. J., Chan, S. Y., and Lee, S. T. (2001). Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(12), 1373-1379.
221. Saez, J., Ward, P., Günther, B., and Vivaldi, E. (1984). Superoxide radical involvement in the pathogenesis of burn shock. *Circulatory Shock*, 12(4), 229-239.
222. Friedl, H. P., Till, G. O., Ryan, U. S., and Ward, P. A. (1989). Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 3(13), 2512-2518.
223. Demling, R., and LaLonde, C. (1990). Early postburn lipid peroxidation: effect of ibuprofen and allopurinol. *Surgery*, 107(1), 85-93.
224. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
225. Tonissen, K. F., and Di Trapani, G. (2009). Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(1), 87-103.
226. Gutteridge, J. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.
227. Fang, J. G., Lu, M., Chen, Z. H., Zhu, H. H., Li, Y., Yang, L., and Liu, Z. L. (2002). Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chemistry*, 8(18), 4191-4198.
228. Dean, R. T., FU, S., Stocker, R., and Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1), 1-18.
229. LaVan, F. B., and Hunt, T. K. (1990). Oxygen and wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*, 17(3), 463-472.
230. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.

231. Lang, N. P., Berglundh, T., Giannobile, W. V., and Sanz, M. (2003). *Lindhe's clinical periodontology and implant dentistry* (Forth edition). Oxford: Blackwell Munksgaard, 209-214
232. Su, H., Gornitsky, M., Velly, A. M., Yu, H., Benarroch, M., and Schipper, H. M. (2009). Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(7), 914-921.
233. Aoshiba, K., and Nagai, A. (2003). Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. *Tobacco Induced Diseases*, 1(3), 219.
234. Fang, Y. Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
235. Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., and Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107(4), 526-545.
236. Devasagayam, T., Tilak, J., Boloor, K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., and Lele, R. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794-804.
237. Sczepanik, F. S. C., Grossi, M. L., Casati, M., Goldberg, M., Glogauer, M., Fine, N., and Tenenbaum, H. C. (2020). Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontol 2000*, 84(1), 45-68.
238. Başer, Ü., ve Şahin, G. A. (2023). Oksidatif stresin periodontal hastalık patogenezindeki rolü. *Turkiye Klinikleri Periodontology-Special Topics*, 9(1), 50-56.
239. Kanzaki, H., Wada, S., Narimiya, T., Yamaguchi, Y., Katsumata, Y., Itohiya, K., and Nakamura, Y. (2017). Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their Role in defense against tissue destruction in periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8, 351.
240. Lee, N. K., Choi, Y. G., Baik, J. Y., Han, S. Y., Jeong, D. W., Bae, Y. S., and Lee, S. Y. (2005). A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*, 106(3), 852-859.
241. DeFeudis, F. V., Papadopoulos, V., and Drieu, K. (2003). Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 17(4), 405-417.
242. Young, I. S., and Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186
243. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 280(1), 1-8
244. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.

245. Chapple, I. L., and Matthews, J. B. (2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 43(1), 160-232
246. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915-1928.
247. Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., ve Durmaz, Y. (2006). Algal antioksidanlar. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 85-89.
248. Yalçın, A. S. (1998). *Antioksidanlar Klinik Gelişim* (Vol. 11), 342-346
249. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
250. Farber, J. L. (1994). Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environmental Health Perspectives*, 102(10), 17-24.
251. Amstad, P., and Cerutti, P. (1990). Genetic modulation of the cellular antioxidant defense capacity. *Environmental Health Perspectives*, 88, 77-82.
252. Benzie, I. F. (2003). Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 136(1), 113-126.
253. Soneja, A., Drews, M., and Malinski, T. (2005). Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, 57, 108-119.
254. İşçimen, A., and Küçüktaş, M. (2008). Wound healing and hyperbaric oxygen treatment. *Journal of the Turkish Academy of Dermatology*, 2(3) 82301.
255. Almadani, Y. H., Vorstenbosch, J., Davison, P. G., and Murphy, A. M. (2021). Wound healing: a comprehensive review. *Seminars in Plastic Surgery*, 35(3), 141-144.
256. Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 58, 61-97.
257. Miller, A. F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 586(5), 585-595.
258. Ma, X. J., and Zhu, D. H. (2003). Functional roles of the plant superoxide dismutase. *Yi Chuan*, 25(2), 225-231.
259. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
260. Smith, M. W., and Doolittle, R. F. (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Evolution*, 34, 175-184.

261. He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532-553.
262. Lynch, M., and Kuramitsu, H. (2000). Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 2(10), 1245-1255.
263. Munz, B., Frank, S., Hübner, G., Olsen, E., and Werner, S. (1997). A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. *Biochemical Journal*, 326(2), 579-585.
264. Steiling, H., Munz, B., Werner, S., and Brauchle, M. (1999). Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Experimental Cell Research*, 247(2), 484-494.
265. Kuhn R, S. N. (1938). Über das Astaxanthin. *Die Naturwissenschaften*, 26, 576.
266. Guerin, M., Huntley, M. E., and Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210-216.
267. Bosio, G. N., Breitenbach, T., Parisi, J., Reigosa, M., Blaikie, F. H., Pedersen, B. W., and Ogilby, P. R. (2013). Antioxidant β -carotene does not quench singlet oxygen in mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*, 135(1), 272-279.
268. O'Connor, I., and O'Brien, N. (1998). Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 16(3), 226-230.
269. Sachindra, N. M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., and Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8516-8522.
270. Tlustý, M. F., Metzler, A., Huckabone, S., Suanda, S., and Guerrier, S. (2009). Morphological colour change in the American lobster (*Homarus americanus*) in response to background colour and UV light. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 43(1), 247-255.
271. Lorenz, R. T., and Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 160-167.
272. Grung, M., D'Souza, F. M., Borowitzka, M., and Liaaen-Jensen, S. (1992). Algal carotenoids 51. secondary carotenoids 2. Haematococcus pluvialis aplanospores as a source of (3 S, 3' S)-astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology*, 4, 165-171.
273. Capelli, B., Bagchi, D., and Cysewski, G. R. (2013). Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*, 12, 145-152.

274. Yuan, J. P., Peng, J., Yin, K., and Wang, J. H. (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(1), 150-165.
275. Patel, A. K., Tambat, V. S., Chen, C.-W., Chauhan, A. S., Kumar, P., Vadrade, A. P., and Singhanian, R. R. (2022). Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: a review. *Bioresource Technology*, 364, 128030.
276. Visioli, F., and Artaria, C. (2017). Astaxanthin in cardiovascular health and disease: mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food and Function*, 8(1), 39-63.
277. Wang, X., Zhang, T., Chen, X., Xu, Y., Li, Z., Yang, Y., and Ni, H. (2022). Simultaneous inhibitory effects of all-trans astaxanthin on acetylcholinesterase and oxidative stress. *Marine Drugs*, 20(4), 247.
278. Moretti, V. M., Mentasti, T., Bellagamba, F., Luzzana, U., Caprino, F., Turchini, G. M., and Valfrè, F. (2006). Determination of astaxanthin stereoisomers and colour attributes in flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to distinguish the dietary pigmentation source. *Food Additives and Contaminants*, 23(11), 1056-1063.
279. Kim, J. H., Choi, S. K., Choi, S. Y., Kim, H. K., and Chang, H. L. (2005). Suppressive effect of astaxanthin isolated from the *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(7), 1300-1305.
280. Odeberg, J. M., Lignell, Å., Pettersson, A., and Höglund, P. (2003). Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 299-304.
281. Yang, Y., Seo, J. M., Nguyen, A., Pham, T. X., Park, H. J., Park, Y., and Lee, J. (2011). Astaxanthin-rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein e knockout mice¹². *The Journal of Nutrition*, 141(9), 1611-1617.
282. Coral-Hinostroza, G. N., Ytrestøyl, T., Ruyter, B., and Bjerkeng, B. (2004). Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3' R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 139(1-3), 99-110.
283. Mercke Odeberg, J., Lignell, Å., Pettersson, A., and Höglund, P. (2003). Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 299-304.
284. Østerlie, M., Bjerkeng, B., and Liaaen-Jensen, S. (2000). Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(10), 482-490.

285. Talukdar, J., Bhadra, B., Dattaroy, T., Nagle, V., and Dasgupta, S. (2020). Potential of natural astaxanthin in alleviating the risk of cytokine storm in COVID-19. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 132, 110886.
286. Turck, D., Castenmiller, J., de Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., Maciuk, A., and Knutsen, H. K. (2020). Safety of astaxanthin for its use as a novel food in food supplements. *European Food Safety Authority Journal*, 18(2), e05993.
287. Nishida, Y., Berg, P. C., Shakersain, B., Hecht, K., Takikawa, A., Tao, R., and Misawa, N. (2023). Astaxanthin: past, present, and future. *Marine Drugs*, 21(10), 514.
288. Niu, T., Zhou, J., Wang, F., Xuan, R., Chen, J., Wu, W., and Chen, H. (2020). Safety assessment of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: acute toxicity, genotoxicity, distribution and repeat-dose toxicity studies in gestation mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 115, 104695.
289. Tsukahara, H., Fukuhara, I., and Takehara, I. (2005). Evaluation of long-term safety study of natural astaxanthin in healthy volunteers. *Journal of Nutritional Food*, 8, 27-37.
290. Matsuyama, A., Takahashi, J., and Itakura, H. (2010). A safety study on the long-term consumption of astaxanthin in healthy human volunteers. *Japanese Journal of Complementary and Alternative Medicine*, 7(1), 43-50.
291. Ohgami, K., Shiratori, K., Nitta, T., Shinmei, Y., Chin, S., Yoshida, K., and Ohno, S. (2005). Study on the safety of high dose administration of astaxanthin. *Japonica de Ophthalmologica Clinica*, 21, 651-659.
292. Kajita, M., Kato, T., Yoshimoto, T., and Masuda, K. (2010). Study on the safety of high-dose administration of astaxanthin. *Folia Japonica de Ophthalmologica Clinica*, 3(4), 365-370.
293. Satoh, A., Tsuji, S., Okada, Y., Murakami, N., Urami, M., Nakagawa, K., and Shirasawa, T. (2009). Preliminary clinical evaluation of toxicity and efficacy of a new astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* extract. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44(3), 280-284.
294. Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1), 141-146.
295. Wang, C., Armstrong, D. W., and Chang, C. D. (2008). Rapid baseline separation of enantiomers and a mesoform of all-trans-astaxanthin, 13-cis-astaxanthin, adonirubin, and adonixanthin in standards and commercial supplements. *Journal of Chromatography*, 1194(2), 172-177.
296. Chen, W. P., Xiong, Y., Shi, Y. X., Hu, P. F., Bao, J. P., and Wu, L. D. (2014). Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase expression in human chondrocytes. *International Immunopharmacology*, 19(1), 174-177.
297. Kimble, L., Mathison, B. D., and Chew, B. (2013). Astaxanthin mediates inflammation biomarkers associated with arthritis in human chondrosarcoma cells induced with

- interleukin-1 β . *American Journal of Advanced Food Science and Technology*, 2, 37-51.
298. Kim, J. H., Nam, S. W., Kim, B. W., Kim, W. J., and Choi, Y. H. (2010). Astaxanthin improves the proliferative capacity as well as the osteogenic and adipogenic differentiation potential in neural stem cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1741-1745.
 299. Fassett, R. G., and Coombes, J. S. (2011). Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine Drugs*, 9(3), 447-465.
 300. Zheng, Y. F., Bae, S. H., Kwon, M. J., Park, J. B., Choi, H. D., Shin, W. G., and Bae, S. K. (2013). Inhibitory effects of astaxanthin, β -cryptoxanthin, canthaxanthin, lutein, and zeaxanthin on cytochrome P450 enzyme activities. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 78-85.
 301. Donoso, A., González-Durán, J., Muñoz, A. A., González, P. A., and Agurto-Muñoz, C. (2021). Therapeutic uses of natural astaxanthin: an evidence-based review focused on human clinical trials. *Pharmacological Research*, 166, 105479.
 302. Nakano, M., Onodera, A., Saito, E., Tanabe, M., Yajima, K., Takahashi, J., and Van Chuyen, N. (2008). Effect of astaxanthin in combination with α -tocopherol or ascorbic acid against oxidative damage in diabetic ODS rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 54(4), 329-334.
 303. Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L., and Chew, B. P. (2010). Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition and Metabolism*, 7(1), 18.
 304. Jyonouchi, H., Hill, R. J., Tomita, Y., and Good, R. A. (1991). Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. effects of β -carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in in vitro culture system. *Nutrition and Cancer*, 16(2), 93-105.
 305. Miyamoto, S., Martinez, G. R., Medeiros, M. H., and Di Mascio, P. (2014). Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 139, 24-33.
 306. Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. (2019). Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins. *Chemical Reviews*, 119(3), 2043-2086.
 307. McNulty, H. P., Byun, J., Lockwood, S. F., Jacob, R. F., and Mason, R. P. (2007). Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(1), 167-174.
 308. Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(15), 1551-1558.

309. Naguib, Y. M. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150-1154.
310. Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., and Liu, Y. (2014). Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 694305.
311. Seya, Y., Takahashi, J., and Imanaka, K. (2009). Relationship between visual and reaction times-effects of a repetition of a visual task and long-term intake of a supplement food including astaxanthin on reaction time-Japanese. *Journal of Physiological Anthropology*, 14(2), 17-24.
312. Shimidzu, N., Goto, M., and Miki, W. (1996). Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*, 62(1), 134-137.
313. Stahl, W., and Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.
314. Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama, K., Yamashita, E., and Terada, H. (2001). Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1512(2), 251-258.
315. Li, Z., Dong, X., Liu, H., Chen, X., Shi, H., Fan, Y., and Zhang, X. (2013). Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Molecular Vision*, 19, 1656-1666.
316. Farruggia, C., Kim, M. B., Bae, M., Lee, Y., Pham, T. X., Yang, Y., and Lee, J. Y. (2018). Astaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 62, 202-209.
317. Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L., and Jorjani, M. (2018). Astaxanthin: a mechanistic review on its biological activities and health benefits. *Pharmacological Research*, 136, 1-20.
318. Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L., and Chew, B. P. (2010). Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition and Metabolism*, 7, 1-10.
319. Kohandel, Z., Farkhondeh, T., Aschner, M., Pourbagher-Shahri, A. M., and Samarghandian, S. (2022). Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 145, 112179.
320. Kaneko, M., Kishimoto, Y., Suzuki, R., Kawai, Y., Tateya, I., and Hirano, S. (2017). Protective effect of astaxanthin on vocal fold injury and inflammation due to vocal loading: a clinical trial. *Journal of Voice*, 31(3), 352-358.
321. Meephansan, J., Rungjang, A., Yingmema, W., Deenonpoe, R., and Ponnikorn, S. (2017). Effect of astaxanthin on cutaneous wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 10, 259-265.

322. Davinelli, S., Nielsen, M. E., and Scapagnini, G. (2018). Astaxanthin in skin health, repair, and disease: a comprehensive review. *Nutrients*, 10(4), 522.
323. Hwang, Y. H., Kim, K. J., Kim, S. J., Mun, S. K., Hong, S. G., Son, Y. J., and Yee, S. T. (2018). Suppression effect of astaxanthin on osteoclast formation in vitro and bone loss in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 912.
324. Du Sert, N. P., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., and Emerson, M. (2020). Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *Public Library of Science Biology*, 18(7), 1-65.
325. Yang, L., Gu, J., Luan, T., Qiao, X., Cao, Y., Xue, C., and Xu, J. (2021). Influence of oil matrixes on stability, antioxidant activity, bioaccessibility and bioavailability of astaxanthin ester. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(4), 1609-1617.
326. Kisaoglu, A., Kose, E., Yilmaz, N., Tanbek, K., Yildiz, A., Yilmaz, U., and Ozbag, D. (2024). Investigation of the effect of astaxanthin on autophagy in renal ischemia-reperfusion modeled rats. *Medeniyet Medical Journal*, 39(2), 101-108.
327. Liu, Y. F., Xie, W. J., Xi, P., Zhang, Z. C., Chen, R., Fu, S. Q., and Gong, B. B. (2024). Astaxanthin alleviates chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome by increasing colonization of *Akkermansia muciniphila* in the intestine. *Phytomedicine*, 123, 155249.
328. Angspatt, A., Tanvatcharaphan, P., Channasanon, S., Tanodekaew, S., Chokrungvaranont, P., and Sirimaharaj, W. (2010). Comparative study between chitin/polyacrylic acid (PAA) dressing, lipido-colloid absorbent dressing and alginate wound dressing: a pilot study in the treatment of partial-thickness wound. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 93(6), 694-697.
329. Walker, H. L., and Mason Jr, A. D. (1968). A standard animal burn. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 8(6), 1049-1051.
330. Nunes, J. P. S., and Dias, A. A. M. (2017). ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays. *Biotechniques*, 62(4), 175-179.
331. Papazoglou, E. S., Zubkov, L., Mao, X., Neidrauer, M., Rannou, N., and Weingarten, M. S. (2010). Image analysis of chronic wounds for determining the surface area. *Wound Repair and Regeneration*, 18(4), 349-358.
332. Dias, S. B. F., Fonseca, M. V. A., Dos Santos, N. C. C., Mathias, I. F., Martinho, F. C., Junior, M. S., and Santamaria, M. P. (2015). Effect of GaAIs low-level laser therapy on the healing of human palate mucosa after connective tissue graft harvesting: randomized clinical trial. *Lasers in Medical Science*, 30, 1695-1702.
333. Gal, P., Kilik, R., Mokry, M., Vidinsky, B., Vasilenko, T., Mozes, S., and Lenhardt, L. (2008). Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Veterinarni Medicina*, 53(12), 652-659.
334. Mete, M., Hennings, L., Spencer, H. J., and Topaloglu, U. (2009). Automatic identification of angiogenesis in double stained images of liver tissue. *BMC Bioinformatics*, 10(11), 1-14.

335. Van De Vlekkert, D., Machado, E., and d'Azzo, A. (2020). Analysis of generalized fibrosis in mouse tissue sections with Masson's trichrome staining. *Bio-Protocol*, 10(10), e3629-e3629.
336. Kim, Y. W., Jan, K. M., Jung, D. H., Cho, M. Y., and Kim, N. K. (2013). Histological inflammatory cell infiltration is associated with the number of lymph nodes retrieved in colorectal cancer. *Anticancer Research*, 33(11), 5143-5150.
337. McCarty Jr, K., Miller, L., Cox, E., Konrath, J., and McCarty Sr, K. (1985). Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 109(8), 716-721.
338. Wen, Z., Luo, D., Wang, S., Rong, R., Evers, B. M., Jia, L., and Xiao, G. (2024). Deep learning-based H-score quantification of immunohistochemistry-stained images. *Modern Pathology*, 37(2), 100398.
339. Álvares, P. R., Arruda, J. A. A. d., Silva, L. P., Nascimento, G. J. F., Silveira, M. F., and Sobral, A. P. V. (2017). Immunohistochemical expression of TGF- β 1 and MMP-9 in periapical lesions. *Brazilian Oral Research*, 31, e51.
340. Rizzardi, A. E., Johnson, A. T., Vogel, R. I., Pambuccian, S. E., Henriksen, J., Skubitz, A. P., and Schmechel, S. C. (2012). Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagnostic Pathology*, 7, 1-10.
341. Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., and Ma, J. (2018). S100A8/A9 in inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9, 1298.
342. Ehrchen, J. M., Sunderkötter, C., Foell, D., Vogl, T., and Roth, J. (2009). The endogenous toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(3), 557-566.
343. Fang, Q., Guo, S., Zhou, H., Han, R., Wu, P., and Han, C. (2017). Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. *Scientific Reports*, 7(1), 41440.
344. Bhattarai, G., So, H. S., Kieu, T. T. T., Kook, S. H., Lee, J. C., and Jeon, Y. M. (2021). Astaxanthin inhibits diabetes-triggered periodontal destruction, ameliorates oxidative complications in stz-injected mice, and recovers nrf2-dependent antioxidant system. *Nutrients*, 13(10), 3575.
345. Kosyрева, T. F., Samoylova, M. B., Voeykova, O. V., Belfer, M. L., Zatevalov, A. M., Voropayeva, E. A., and Zhilenkova, O. G. (2022). The effect of astaxanthin on the adaptation of the oral mucosa to a removable denture. *Stomatologiya (Mosk)*, 101(1), 17-22.
346. Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., and Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 19-25.

347. Jones, S. G., Edwards, R., and Thomas, D. W. (2004). Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immuno-regulation of wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 3(4), 201-208.
348. Li, Y., Jiao, J., Qi, Y., Yu, W., Yang, S., Zhang, J., and Zhao, J. (2021). Curcumin: a review of experimental studies and mechanisms related to periodontitis treatment. *Journal of Periodontal Research*, 56(5), 837-847.
349. Ortega-Llamas, L., Quiñones-Vico, M. I, García-Valdivia, M., Fernández-González, A., Ubago-Rodríguez, A., Sanabria-de la Torre, R., and Arias-Santiago, S. (2022). Cytotoxicity and wound closure evaluation in skin cell lines after treatment with common antiseptics for clinical use. *Cells*, 11(9), 1395.
350. Utomo, N. P., Pinzon, R. T., Latumahina, P. K., and Damayanti, K. R. S. (2024). Astaxanthin and improvement of dementia: A systematic review of current clinical trials. *Cerebral Circulation - Cognition and Behavior*, 7, 100226.
351. Leite, M. F., De Lima, A., Massuyama, M. M., and Otton, R. (2010). In vivo astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxan-induced diabetic rats. *International Endodontic Journal*, 43(11), 959-967.
352. Li, P., Xu, T., Dang, X., Shao, L., Yan, L., Yang, X., and Song, R. (2024). Improving astaxanthin-loaded chitosan/polyvinyl alcohol/graphene oxide nanofiber membranes and their application in periodontitis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258(2), 128980.
353. Nakajima, Y., Inokuchi, Y., Shimazawa, M., Otsubo, K., Ishibashi, T., and Hara, H. (2008). Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress in-vitro and in mice in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(10), 1365-1374.
354. Shanmugapriya, K., Kim, H., Saravana, P. S., Chun, B. S., and Kang, H. W. (2018). Astaxanthin-alpha tocopherol nanoemulsion formulation by emulsification methods: Investigation on anticancer, wound healing, and antibacterial effects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 170-179.
355. Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., Volin, M. V., Gamelli, R. L., and DiPietro, L. A. (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American Journal of Pathology*, 152(6), 1445-1452.
356. Luthfi, M., Juliastuti, W. S., and Risky, Y. A. (2020). Angiogenesis of extracted tooth wound on wistar rats after application of okra (*Abelmoschus esculentus*) gel extract. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 20, e5087.
357. Robson, M. C., Steed, D. L., and Franz, M. G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38(2), A1-140.
358. Oda, Y., Kagami, H., and Ueda, M. (2004). Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62(1), 73-80.

359. Mariano, R. C., Oliveira, M. R., Silva, L. C., Ferreira, S., Garcia Júnior, I. R., and de Carvalho Silva, A. (2015). Effect of topical application of chlorhexidine and metronidazole on the tissue repair of palatal wounds of rats: a clinical and histomorphometric study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 119(5), 505-513.
360. Kovalik, A. C., Bisetto, P., Pochapski, M. T., Campagnoli, E. B., Pilatti, G. L., and Santos, F. A. (2014). Effects of an orabase formulation with ethanolic extract of *Malva sylvestris* L. in oral wound healing in rats. *Journal of Medicinal Food*, 17(5), 618-624.
361. Chaushu, L., Atzil, S., Vered, M., Chaushu, G., Matalon, S., and Weinberg, E. (2021). Age-related palatal wound healing: an experimental in vivo study. *Biology*, 10(3), 240.
362. Supachawaroj, N., Kerdmanee, K., and Limsitthichaikoon, S. (2024). Lidocaine-loaded thermoresponsive gel for accelerated wound healing in dry socket and oral wounds. *Gels*, 10(11), 739.
363. Liu, Y., Zhang, S., Sakran, K. A., Yin, J., Lan, M., Yang, C., and Shi, B. (2022). Observation of palatal wound healing process following various degrees of mucoperiosteal and bone trauma in a young rat model. *Biology*, 11(8), 1142.
364. Additives, E. Panel o., Feed, P. o. S. u. i. A., Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. d. L., Christensen, H., and Gropp, J. (2019). Safety and efficacy of astaxanthin-dimethyldisuccinate (Carophyll® Stay-Pink 10%-CWS) for salmonids, crustaceans and other fish. *Official Publication of the European Food Safety Authority*, 17(12), e05920.
365. K El-Baz, F., Aly, H. F., Ali, S. I., and Salama, A. (2022). Safety of astaxanthin-rich fraction of *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(3), 479-489.
366. Vega, K., Edwards, J., and Beilstein, P. (2015). Subchronic (13-week) toxicity and prenatal developmental toxicity studies of dietary astaxanthin in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 819-828.
367. Li, J., Guo, C., and Wu, J. (2020). Astaxanthin in liver health and disease: a potential therapeutic agent. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 2275-2285.
368. Fassett, R. G., and Coombes, J. S. (2012). Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules*, 17(2), 2030-2048.
369. Choi, H. D., Kang, H. E., Yang, S. H., Lee, M. G., and Shin, W. G. (2011). Pharmacokinetics and first-pass metabolism of astaxanthin in rats. *British Journal of Nutrition*, 105(2), 220-227.
370. Shikov, A. N., Flisyuk, E. V., Obluchinskaya, E. D., and Pozharitskaya, O. N. (2020). Pharmacokinetics of marine-derived drugs. *Marine Drugs*, 18(11), 557.
371. Arslan, E., Turk, H., Caglayan, M., Turkmenoglu, T. T., Gonel, A., and Tayman, C. (2021). Protective effects of astaxanthin on nephrotoxicity in rats with induced renovascular occlusion. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 24(8), 1236-1242.

372. Dokumacioglu, E., Iskender, H., Yenice, G., Kapakin, K. A. T., Sevim, C., Hayirli, A., and Comakli, S. (2018). Effects of astaxanthin on biochemical and histopathological parameters related to oxidative stress on testes of rats on high fructose regime. *Andrologia*, 50(7), e13042.
373. Kozlovsky, A., Artzi, Z., Hirshberg, A., Israeli-Tobias, C., and Reich, L. (2007). Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(2), 164-171.
374. Cleek, R. L., and Bunge, A. L. (1993). A new method for estimating dermal absorption from chemical exposure. 1. general approach. *Pharmaceutical Research*, 10(4), 497-506.
375. Raney, S. G., Ghosh, P., Ramezanli, T., Lehman, P. A., and Franz, T. J. (2022). Cutaneous pharmacokinetic approaches to compare bioavailability and/or bioequivalence for topical drug products. *Dermatologic Clinics*, 40(3), 319-332.
376. Dumitrescu, A. L. (2012). Measurement reliability in periodontal research. *Understanding Periodontal Research*, Berlin: Springer, 159-183
377. Wolf, A. M., Asoh, S., Hiranuma, H., Ohsawa, I., Iio, K., Satou, A., and Ohta, S. (2010). Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(5), 381-389.
378. Pashkow, F. J., Watumull, D. G., and Campbell, C. L. (2008). Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, 101(10), 58-68.
379. Veeruraj, A., Liu, L., Zheng, J., Wu, J., and Arumugam, M. (2019). Evaluation of astaxanthin incorporated collagen film developed from the outer skin waste of squid *Doryteuthis singhalensis* for wound healing and tissue regenerative applications. *Materials Science and Engineering*, 95, 29-42.
380. Rofiq, A., Yuniaswan, A. P., and Nugraha, R. H. (2023). Effects of 5% astaxanthin gel on angiogenesis and granulation tissue in second-degree burn animal model. *Journal of General-Procedural Dermatology and Venereology Indonesia*, 7(2), 4.
381. Hashimoto, H., Arai, K., Hayashi, S., Okamoto, H., Takahashi, J., and Chikuda, M. (2016). The effect of astaxanthin on vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and peroxidation reactions in the aqueous humor. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 59(1), 10-15.
382. Kowshik, J., Baba, A. B., Giri, H., Deepak Reddy, G., Dixit, M., and Nagini, S. (2014). Astaxanthin inhibits JAK/STAT-3 signaling to abrogate cell proliferation, invasion and angiogenesis in a hamster model of oral cancer. *Public Library of Science One*, 9(10), e109114.
383. Xu, Y., Zhang, J., Jiang, W., and Zhang, S. (2015). Astaxanthin induces angiogenesis through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Phytomedicine*, 22(7-8), 744-751.
384. Kim, J. H., Nam, S. W., Kim, B. W., Choi, W., Lee, J. H., Kim, W. J., and Choi, Y. H. (2010). Astaxanthin improves stem cell potency via an increase in the proliferation of

- neural progenitor cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5109-5119.
385. Yang, Y., Kim, B., Park, Y. K., Koo, S. I., and Lee, J. Y. (2015). Astaxanthin prevents TGF β 1-induced pro-fibrogenic gene expression by inhibiting Smad3 activation in hepatic stellate cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1850(1), 178-185.
 386. Li, Z., Li, Y., Liu, S., and Qin, Z. (2020). Extracellular S100A4 as a key player in fibrotic diseases. *Journal of cellular and Molecular Medicine*, 24(11), 5973-5983.
 387. Zhang, X. S., Zhang, X., Zhang, Q. R., Wu, Q., Li, W., Jiang, T. W., and Hang, C. H. (2015). Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase-9 expression and activity in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Tumor Research and Treatment*, 1624, 113-124.
 388. Salo, T., Mäkelä, M., Kylmäniemi, M., Autio-Harmainen, H., and Larjava, H. (1994). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 70(2), 176-182.
 389. Van den Steen, P. E., Wuyts, A., Husson, S. J., Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2003). Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *European Journal of Biochemistry*, 270(18), 3739-3749.
 390. de Paula-Silva, F. W. G., D'Silva, N. J., da Silva, L. A. B., and Kapila, Y. L. (2009). High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *Journal of Endodontics*, 35(9), 1234-1242.
 391. Reiss, M. J., Han, Y. P., Garcia, E., Goldberg, M., Yu, H., and Garner, W. L. (2010). Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery*, 147(2), 295-302.



EKLER

EK-1. Etik Kurul İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 10.12.2023-E.822011



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : E-66332047-604.01.02-822011
Konu : Değerlendirme ve Onay

10.12.2023

Sayın Doç. Dr. Zeynep TURGUT ÇANKAYA
Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Zeynep TURGUT ÇANKAYA, Yeşim DURGUT, Gülenay ÇOLAK, Çiğdem ELMAS, Deniz İrem BULUT, Beyza Belde DOĞAN ve Ayşen BODUR'dan oluşan, G.Ü.ET-23.112 kod numaralı ve "*Astaksantin'in Erken Yara İyileşmesine Olan Etkisinin Rat Palatal Mukozasında İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-23.112 and entitled "*Early Wound Healing of Astaxanthin on The Rat Palatal Mucosa of Immunohistochemical Evaluation*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 45

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSNHEYUNRZ

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



Belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 10.12.2023-**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 17/11/2023		TOPLANTI SAYISI : 11	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)			
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.İlker ŞEN			
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Prof.Dr.Serkan YAVUZ			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN			
Prof.Dr.Elvan ANADOL			
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ			
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN			
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ			
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ			
Dr.Öğr.Üyesi Sühan GÜRBÜZ			
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YİĞMAN			
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DURGUT, Yeşim
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Periodontoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Hacettepe Üniversitesi / Diş Hekimliği Fakültesi	2017
Lise	Eskişehir Gelişim Koleji	2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2025-devam ediyor	Özel Muayenehane	Diş Hekimi
2023-2024	Özel Muayenehane	Diş Hekimi
2022-2023	Özel Muayenehane	Diş Hekimi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

- Durgut Y., Turgut Çankaya Z., Gürbüz S., Koyuncu A.: Makine Öğrenmesinin Dişeti İnflamasyonuna Ait Termal Görüntülerde Kullanımı, Sözlü Sunum, Türk Periodontoloji Derneği 53. Bilimsel Kongresi ve 31. Bilimsel Sempozyumu, Antalya, 2024.
- Durgut Y., Turgut Çankaya Z., Gökalp Kalabay P.: Plasminogen Deficiency of a Patient Presenting with Ligneous Gingivitis and Conjunctival Lesions: Vaka Raporu: Europeriod11, Viyana, 2025

Sertifikalar

2017 - Türk Dişhekimleri Birliği 23. Uluslararası Diş Hekimliği Kongresi
2018 - Türk Dişhekimleri Birliği 24. Uluslararası Diş Hekimliği Kongresi

- 2018 - Tabakalı Anterior Kompozit Uygulaması
- 2019 - Medya Team Diş Hekimliği ve Diş Teknisyenliği Etkinliği
- 2019 - Türk Dişhekimleri Birliği 25. Uluslararası Diş Hekimliği Kongresi
- 2021 - Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ankara Üniversitesi
- 2022 - 51. Türk Periodontoloji Bilimsel Kongresi ve 29. Bilimsel Sempozyum
- 2022 - Swiss Dental Academy, SDA Eğitimci, İsviçre
- 2023 - Uluslararası Osteoloji Sempozyumu, Barselona
- 2023 - 9. Uluslararası Osseointegrasyon Kongresi, Türkiye
- 2024 - European Association for Osseointegration (EAO) Kongresi, Berlin
- 2024 - 53. Türk Periodontoloji Bilimsel Kongresi ve 31. Bilimsel Sempozyum
- 2025 - EuroPerio11, Avrupa Periodontoloji Federasyonu'nun 11. Kongresi, Viyana

Hobiler

Voleybol oynamak, yüzmek, resim yapmak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..