

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BIYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**KOBAYLARDA VİTAMİN C VE VİTAMİN E
UYGULAMALARININ YARA İYİLEŞMESİ VE DOKU MİNERAL
MADDE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Saliha Filiz Pekcici

Danışman

Doç.Dr. Seyfullah Haliloğlu

KONYA- 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1- GİRİŞ	6
2- LİTERATÜR BİLGİ	7
2.1. Yara Teriminin Tanımı	7
2.2. Yara İyileşmesinin Mekanizması	7
2.2.1. Primer İyileşme	7
2.2.2. Sekonder İyileşme	7
2.2.3. Gecikmiş Primer İyileşme	8
2.3. Yara İyileşmesinin Evreleri	8
2.3.1. Hemostaz Ve İnflamasyon (Yangı)	8
2.3.2. Proliferatif Faz	10
2.3.3. Maturasyon ve Remodelling Fazı	10
2.4. Vitamin E	13
2.4.1. Vitamin E'nin Metabolizması	14
2.4.2. Vitamin E'nin Fonksiyonları	15
2.5. Vitamin C	17
2.5.1. Vitamin C'nin Metabolizması	18
2.5.2. Vitamin C'nin Fonksiyonları	19
2.6. Çinko	21
2.7. Demir	24
2.8. Bakır	25
2.9. Kollajen	28
2.9.1. Kollajen biyosentezi	29
3. MATERYAL VE METOT	32
3.1. Hayvan Materyali ve Çalışma Düzeni	32
3.2. Doku Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi	35
3.3. Hidroksiprolin düzeylerinin belirlenmesi	36
3.4. Histopatolojik inceleme	36
4. BULGULAR	37

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6. ÖZET	46
7. SUMMARY	48
8. LİTERATÜR LİSTESİ	50
9. ÖZGEÇMİŞ	60
10. TEŞEKKÜR	61

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Çalışmada oluşturulan gruplarda vitamin enjeksiyonu ve doku alım günleri	33
Tablo 2. Tüm grupların 4., 7. ve 10. günlerdeki Fe, Cu, Zn ($\mu\text{g/g}$) ve hidroksiprolin ($\mu\text{g} / \text{mg}$ yaş doku) düzeyleri ($x \pm \text{sd}$)	37
Tablo 3. Çalışmada tüm gruplarda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	37
Tablo 4. Kontrol grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	37
Tablo 5. Vitamin E grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	38
Tablo 6. Vitamin C grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	38
Tablo 7. Vitamin E+C grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	38
Tablo 8. Çalışmada tüm gruplarda 4. gün ($n= 26$) incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	38
Tablo 9. Çalışmada tüm gruplarda 7. gün ($n= 26$) incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	38
Tablo 10. Çalışmada tüm gruplarda 10. gün ($n= 17$) incelenen parametreler arasındaki ilişkiler	38
Tablo 11. Yara iyileşmesinin 4., 7. ve 10. günlerinde Kontrol, E Vitamini, E+C Vitamini ve C vitamini verilen gruplara ait histopatolojik bulgular	39

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Vitamin E'nin açık formülü (α - tokoferol)	14
Şekil 2. Antioksidan mekanizmada vitamin E ve vitamin C arasındaki ilişki	15
Şekil 3. Askorbik asit'in kimyasal yapısı	17

RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. Kobaylara uygulanan enjeksiyon şekli	32
Resim 2. Kobayların yara oluşturulmasına ön hazırlık aşamaları	33
Resim 3. Kobaylarda yara oluşturulması ve dikiş işlemleri	34

1- GİRİŞ

Son yıllarda yara iyileşmesinde mikroskobik bulguların yanında iyileşme üzerine etkili diğer biyolojik moleküllerin de belirlenmesinin gerekliliği ve bu değerlerin, yara iyileşmesinin düzeyinin saptanmasında etkili olduğunun anlaşılmasıyla iyileşme için gerekli optimal koşullar yavaş yavaş berraklaşmaya başlamıştır.

Yara iyileşmesi tarih boyunca insanların ilgisini çekmiştir. Konuya olan ilgi yüzyıllar boyunca hiç azalmadan devam etmiştir. Bütün çabalarda amaçlanan yara iyileşmesini daha “hızlı” ve daha “mükemmel” bir hale getirmektir. Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel devamlılığının bozulmasıdır. Yara iyileşmesi ise travma ile başlatılan muntazam, sıralı hücrel ve biyokimyasal olayların yeni doku oluşumu ile sonuçlanmasıdır.

Yaranın düzenli ve zamanında iyileşmesi için beslenmenin etkili olduğu yıllardan beri bilinen bir gerçektir. Besin maddeleri içerisinde özellikle kollojen biyosentezi üzerine etkili olan moleküllerin önemi bir adım daha öne çıkmaktadır. Bu konuda vitamin ve mineral maddeler üzerinde yapılan çalışmaların büyük bir kısmını deney hayvanlarının rasyonlarında oluşturulan eksiklik ve fazlalıkların iyileşmeye etkileri oluşturmaktadır. İyileşme sürecinde doku mineral madde düzeylerinin araştırıldığı ya da vitaminlerin bu süreçteki birbirleri ile olan etkileşimlerinin incelendiği çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

İnsanlar gibi, organizmalarında vitamin C sentezi yapamayan ve eksojen vitamin C'ye gereksinim duyan kobaylar (guinea pig) bu vitaminin etkilerinin gözlenmesinde ve insan hekimliğine ışık tutması açısından ideal bir deney hayvanıdır. Bu çalışma da, kozmetik alanında sıkça kullanım alanı bulan vitamin E'nin açık yaraların tedavisindeki etkilerinin ve bu etkiler üzerine vitamin C'nin fonksiyonunun incelenmesi ile doku çinko, demir, bakır ve hidroksprolin düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2- LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Yara Teriminin Tanımı

Yara herhangi bir ajanın fiziksel bir hasar yaratmasıyla vücuttaki normal doku bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara deyiminin karşılığı olarak erozyon, ülser ve fissür deyimleri de kullanılır. Erozyon, iz bırakmayan, kronik olmayan ve dermise geçmeyen fokal epidermis kayıplarını tanımlarken, fissür, çatlak şeklindeki dikey yaraları belirleyen doku kayıplarıdır ve epidermis ve/veya dermisi tutabilir. Ülser ise dermis ve epidermiste doku kayıpları ile seyreden fokal yaralardır ve kronikleşerek zaman zaman tedavisi zor durumlar yaratabilirler (Arnold ve ark 1990, Marks ve ark 1993). Yaralanma organize ve karmaşık bir olaylar zincirini tetikler. Sonuçta iyileşmiş bir yara hedeflenir.

2.2. Yara İyileşmesinin Mekanizması:

Yara iyileşmesi mekanizmasına göre 3 gruba ayrılır:

2.2.1. Primer İyileşme: Kesilmiş olan temiz bir yaranın, cerrahi olarak kapatılması ve komplikasyonsuz iyileşmesidir. Birincil yara iyileşmesi ya da primer kapama da denir. Yaranın kapatılması ve yara dudaklarının tam olarak karşı karşıya gelmesi ile onarım süreci başlar. Yarada tüm tabaka yaklaştırılır ve arada kalan sınırlı boşluk fibrin ile dolar. Fibrinöz yapışma yaklaşık 24 saat alır ve 48. saate gelindiğinde epitel hücreleri altta oluşan skar dokusunu örter. Bu 48 saatlik dönem içerisinde yeni bağ dokusu oluşumu görülmemektedir. Mikroskopisinde yara ve dikiş materyali hattı boyunca dermis içine doğru epitelial ilerleme olduğu görülür (Kirsner ve Eaglstein 1993, Carlson 1997).

2.2.2. Sekonder İyileşme: Açık yaralarda, granülasyon dokusu oluşması, retraksiyon ve yüzeyin epitelizasyonu ile karakterizedir.

Yaralanmadan, 4–5 gün sonra yara yeri fibroblastlarca istila edilir. Başlangıçta bu açık yara, pıhtı ve eksuda ile doldurulur, oluşan bu kabuk, yara yüzeyini örterek derindeki dokuların nemli tutulmasını sağlar. Nemli bölgelerde kollajenolizis ve hasarlı dokuların

fagositik lökositlerce sindirilmesi olayı gerçekleşir.

Özel olarak diferansiye olmuş, aktin ve myozin içeren fibroblastlar (myofibroblastlar) “yara kontraksiyonu” adı verilen iyileşme sürecine yardım ederler. Sırasıyla kollajen tip1 ve tip 3 oluşur ve bunların arasında çapraz bağlanmalar gelişerek, skarın temel formu oluşur. Epitel yara kenarlarından harekete geçerek bu dokunun üzerini örter. İlerleyen dönemde skardaki kollajen matür hale geçer, tip 1 kollajen kaybolur, skar incelik, damarlar hacim ve sayıca azalarak hiperemik ve damardan zengin skar dokusu sınırlanır (Kirsner ve Eaglstein 1993).

Sekonder iyileşme süreci daha uzun süre alır (30–40 gün) ve büyük skarlar oluşabilir. Enfekte yaraların çoğu ve yanıklar bu şekilde iyileşir.

2.2.3. Gecikmiş Primer İyileşme: 4–5 gün açık bırakılarak drene edilen bir yaranın primer olarak kapanmasıdır (Kirsner ve Eaglstein 1993).

2.3. Yara İyileşmesinin Evreleri

Yara iyileşme süreci üç farklı faza ayrılır :

2.3.1. Hemostaz Ve İnflamasyon (Yangı) : Yangı iyileşme için gerekli, travma ve yabancı cisimlerle doku harabiyetine karşı vücudun oluşturduğu immun bir yanıttır. Vasküler permeabilite, dolaşımdan yara ortamına hücrelerin kemotaksisi, sitokin ve büyüme faktörlerinin lokal salınımı, migratör hücrelerin aktivasyonu ile karakterizedir (Regan ve Barbul 1994).

Travmaya organizmanın fiziksel cevabı, travmanın tipi ve kaynağına bakılmaksızın yangı ile başlar. Yangı aşamasının da, yangısel hücre erken migrasyon dönemi ve yangısel hücre proliferasyon dönemi olmak üzere iki fazı vardır. Bu cevabın erken dönemde en önemli elemanı kan damarlarıdır. Vazokonstriksiyon ve hemostazı takiben plazma ve doku kaynaklı yangı medyatörleri ile lokal vazodilatasyon ve vasküler permeabilitede artma meydana gelir. Yangı medyatörlerinden doku imidazol dipeptidleri, stres periyodunda histamine dönüşür.

Histamin, arteriol, kapiller ve venüllerde albumin, globülin ve fibrinojene geçirgenliği artırır. Kapillar sistemde histamine nazaran 200 defa daha etkin rol oynayan serotonin ise hepatik ve pulmonal endotel hücrelerden açığa çıkarak trombositler ve mast hücreleri tarafından depolanır, travmada serbestleştirilir. Histamin ve serotonin aynı zamanda ortamdaki norepinefrini parçalayarak vazodilatasyonda etkin rol oynarlar (Engin 1996).

Nötrofiller, yaraya ilk göç eden hücrelerdir. Hücrelerin yara ortamına kemotaksisinden sonra fonksiyonel aktivasyonları başlar. Bu durum bütün hücreler için geçerlidir. Makrofaj ve lenfositler kritik roller oynarken özellikle bakteriyel kontaminasyon yok ise nötrofiller gerekli değildir. Çünkü bu hücrelerin rolü fagositozdur ve antimikrobiyal savunma makrofajlarca da yapılabilmektedir (Thornton ve Barbul 1997)

Makrofajların aktivasyonu yara iyileşmesi açısından temel oluşturur ve matriks sentezi ve anjiogenez açısından bu durum önemlidir. Makrofaj aktivasyonu sitokinlerin salınımına yol açar ve bunlar da fibroplazi ve anjiogenezisi düzenler. Aktive makrofajlar ayrıca lenfositler ve trombositler gibi diğer hücreleri de sitokinler yolu ile aktive ederler (Regan ve Barbul 1994, Thornton ve Barbul 1997). Böylece çok çeşitli faktörler salınmaya başlar. Bunlar arasında trombositlerden salınan büyüme faktörleri (PDGF), tumor growth factor (TGF)- β , epithelial growth factor (EGF), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6, fibronectin, b-fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), interferon (IFN)- γ , kollajenaz, arginaz, prostaglandin E₂ (PGE₂) bulunmaktadır (Regan ve Barbul 1994, Thornton ve Barbul 1997).

Hemostaz, yangı oluşumunu izler. Lokal olarak oluşan fibrin pıhtısı nötrofil, monosit, fibroblast ve endotelial hücreler için bir tutamak teşkil eder. Yetersiz pıhtı oluşumu, bozulmuş yara iyileşmesi ile beraberdir. Bu durum ya azalmış kemotaksis ya da hücrelerin iltihaplı alana azalmış adezyonu sebebiyle olur (Thornton ve Barbul 1997).

Trombositlerin damar endoteline yapışması, bir membran enzimi olan fosfolipaz A2'yi aktive ederek hücreler arası araşidonik asitin serbest bırakılmasına yol açar. Burada meydana gelen endoperoksitler, prostaglandin G2 ve H2 biyolojik olarak daha aktif olan tromboksan A2, prostaglandin D2, E2, F2 alfa ve prostasikline çevrilir. Yangıda özellikle prostaglandin E1 ve E2 konsantrasyonu artar. Tromboksan A2 ve prostasiklinin stabil yıkım ürünlerinden 6-oxo- prostaglandin F1 alfa yangının ana belirtilerinin oluşmasında önemlidir. Prostaglandin E2 monositlerin, prostaglandin E2 ile birlikte tromboksan B2 ise polimorf nükleer lökositlerin kemotaksisinde önemli rol oynarlar. Ayrıca prostaglandin F2-alfa DNA ve hyaluronik asit sentezini stimüle eder (Engin 1996).

2.3.2. Proliferatif Faz: Yarada granülasyon dokusu oluşumu ile karakterizedir. Bu fazda fibroblastlar ve endotel hücreleri esas hücrelerdir. Fibroblastlar, çevre dokulardan yara bölgesine doğru göç ederler. Endotel hücreler ise yaranın kenarındaki sağlam venüllerden proliferer olur ve anjiogenez yolu ile yeni kapillerler oluştururlar. Özellikle trombositlerden ve aktive makrofajlardan salınan büyüme faktörleri ve sitokinler bu hücre tiplerinin proliferasyonundan sorumludur (Regan ve Barbul 1994).

Prolifere olan fibroblastlar 4–6. günden itibaren kollagen üretmeye başlarlar. Kollagen yapım ve yıkımı denge halindedir. Daha sonra ayrıntılı olarak yapısının açıklanacağı gibi, triple helix formunda bir molekül olan kollajen oluştuktan sonra intramoleküler bağlarla stabilize olur, dayanıklı bir yapı kazanır ve doku yaşlandıkça kollagen bağlar daha stabil hale geçer.

2.3.3. Maturasyon ve Remodelling Fazı: Bu fazın esas özelliği yarada kollajen depolanmasıdır. Klinik açıdan bakıldığında bu durum yara iyileşmesinin en önemli fazıdır. Çünkü matriks depolanmasının oranı, kalitesi ve toplam miktarı skar dokusunun dayanıklılığını belirler. Zayıf kollajen depolanmasının sonucu olarak pek çok iyileşme

bozukluğu, klinik olarak belirgin hale gelebilir. Söz gelimi diabetteki depolanma bozukluğu, azalmış yangının bir sonucudur (Regan ve Barbul 1994, Thornton ve Barbul 1997).

Yara iyileşmesinin temel özellikleri bütün dokularda aynı olmasına rağmen her dokuda farklı iyileşme özellikleri görülebilir (Engin 1996). Bunun yanında yara iyileşmesine etki eden pek çok faktör tanımlanmıştır. Bunlar arasında; insizyonun tipi, kapamanın şekli, kullanılan dikiş materyalleri, cinsiyet, yaş, ameliyatın acil şartlarda yapılıp yapılmadığı, cerrahın deneyimi, şişmanlık, kronik sistemik hastalıklar (diabet, böbrek yetmezliği, sarılık) olup olmaması, anemi, malnutrisyon, yara enfeksiyonu, kullanılan ilaçlar (özellikle kortikosteroidler ve antineoplastikler), radyasyon tedavisi sayılabilir (Carlson 1997).

Yara iyileşmesinde beslenmenin önemi Hipokrat zamanından beri bilinen bir gerçektir. Beslenme eksikliği içerisinde bulunan hastalarda yara iyileşmesi tam olmaz, gecikir ve bu kimselerin enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmaları yeterli olmadığından yara enfeksiyonu gelişmesi riski yüksektir (Ruberg 1984, MacKay ve Miller 2003). Deney hayvanlarında normal beslenmenin %60 oranında kısıtlandığı durumlarda bir hafta içinde kollajen çapraz bağlarında bozulma, 4 ay içinde de kollajen sentezinde azalma tespit edilmiştir (Reiser 1993).

Protein eksikliği (malnutrisyon veya Kwashiorkor), yara iyileşmesinin gecikmesinde önemli bir rol oynar (Barbul ve Purtill 1994). Yetersiz proteinle beslenmelerde yangısal fazda uzamalarla; fibroplazinin, kollajen ve proteoglikan sentezinin ve neoangiogenezin inhibisyonu ve yara iyileşmesinin remodelling fazının inhibisyonu yara iyileşmesinin tüm boyutlarında aksamalar gözlenir (Ruberg 1984, Haydock ve ark 1988). Normal protein sentezi ve hücre proliferasyonu uygun amino asitler olmayınca sağlanamaz. (Barbul ve Purtill 1994). Protein eksikliğinde konakçının hücresel ve humoral bağışıklık sistemleri de bozulur. Ayrıca Hipoalbuminemiye bağlı olarak gelişen ödem, normal yara çevresinde de blokajlar

yaratır. Hayvansal çalışmalarda deneysel olarak yetersiz proteinle beslenmelerde yarada gerilim kuvvetinde düşüşler gözlenmiş ve yara bütünlüğünde bozulmalar belirlenmiştir ve cerrahi ve travmatik yaralı hastalarda morbidite ve mortalite oranında da artışlar gözlenebildiği bildirilmiştir (MacKay ve Miller 2003).

Karbonhidrat ve yağ metabolizmasındaki anormallikler ise, yara iyileşmesini direk veya indirek mekanizmalarla bozar. Endojen olarak sentezlenmeyen, bazı doymamış yağ asitleri, yeni hücre membranının oluşumunda ve prostaglandinlerin sentezindeki temel yapı taşlarıdır (Barbul ve Purtill 1994).

Karbonhidrat ve yağ gereksinimleri yeterli olmadığı durumlarda enerji kaynağı olarak aminoasitler oksitlenir ve zamanla amino asitlerin tüketimi sekonder protein eksikliğine neden olur. Genelde tek başına protein eksikliği (malnutrisyonu) nadir görülür. Hastaların çoğunluğu kombine enerji ve protein malnutrisyonu olarak karşımıza çıkar (Barbul ve Purtill 1994).

Hyaluronik asit ekstraselüler matriksin önemli bir elemanıdır ve doku onarımı sırasında salınan glikozaminoglikanlardan biridir. Yara iyileşmesinin proliferasyon fazında fibroblastlar tarafından hyaluronik asit üretimi fibroblastların ve epitel hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını stimüle eder. Glikozamin hyaluronik asit sentezi için gerekli bir substrattır (McCarty 1996) ve yara iyileşmesi üzerine yapılmış in vitro çalışmalar glikozaminin glikozaminoglikan ve kollajen sentezini arttırdığını göstermiştir (Zupanets ve ark 2002). Hayvanlar üzerinde yapılmış çalışmalarda parsiel kas yırtılmalarında travmanın ilk 5 gününe glikozaminoglikanların maksimum düzeylerde olduğunu ve daha sonra düştüğünü göstermiştir (Lehto ve Jarvinen 1985).

Vitamin, iz elementler ve mineral eksiklikleri de yara iyileşmesinin spesifik boyutlarını bozabilir. Keratinizasyon ve fibroblast maturasyonuna olan etkilerinden dolayı, A-vitamini epitelizasyonu, kollajen sentezini ve stabilitesini uyarır. Ayrıca makrofajların

çoğalma ve aktivasyonunu da sağlar. A- vitamini eksikliğinde yara epitelizeasyonu ve kontraktürü gecikir. Enfeksiyon riski artar (Demetriou ve ark 1984, Levenson ve ark 1984). A-vitamini takviyesinin kortikosteroidler, siklofosfamid, radyasyon tedavisi, diabetes, ve tümör gibi uygulamalara bağlı istenmeyen etkileri baskıladığı bildirilmektedir (Waldorf ve Fewkes 1995). Vitamin A'nın özellikle erken yangısal fazda yara bölgesinde monosit ve makrofajların miktarını artırarak, epitelial hücre farklılaşmasını artırarak ve kollajenaz aktivitesini düzenleyerek yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerini gösterdiği bildirilmektedir (Levenson ve ark 1984).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar vitamin A'nın hem kollajenin kros bağlarını hem de yaranın kopma direncini artırdığını göstermiştir. Greenwald ve ark (1990) 150.000 IU vit.A/kg diyet içeren rasyonla beslenen tavuklarda yaranın kopma direncinin kontrol grubuna göre 2 kat daha arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca dorsal deri ensizyonu ve femoral kırık bulunan ratlarda da benzer sonuçlar gözlenmiş ve vitamin A ilavesi yapılmayan ratlarda iyileşmenin geciktiği gözlenmiştir ve araştırmacılar yara iyileşmesindeki düzelmenin kollajen kros bağlarının oranındaki artışlara bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Seifter ve ark 1975).

2.4. Vitamin E

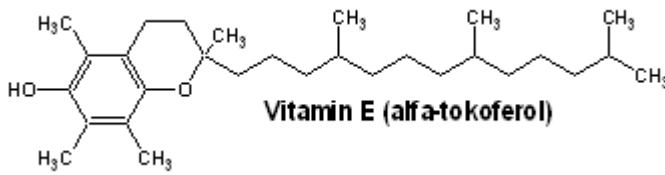
E vitamini, optimal hücre fonksiyonunu sağlamaya yardım eden, yaşam için gerekli, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni ve diğer radikalleri indirgeyen ve hücreleri serbest radikallerin meydana getireceği hasardan koruyan, tüm hücre membranları üzerinde stabilize edici ve düzenleyici bir etkiye sahip, doğadaki en etkili lipidde eriyen antioksidandır (Kappus ve Diplock 1992, Dündar ve Aslan 1999).

Vitamin E terimi, sekiz adet, yağda çözünen doğal esansiyel bileşik için kullanılan ortak bir terimdir. Dört bileşikten oluşan seri, doymuş düz zinciri taşıyan tokol yapısıdır (α , β , γ , δ tokoferol) ve diğer dört bileşik düz zincirinde 3 çift bağ içeren tokotrienol yapısıdır (α , β , γ , δ tokotrienol) (Bjorneboe ve ark 1990).

Tokoferoller, kroman halkası ve düz zincirden oluşmaktadır ve sadece metil gruplarının sayısına göre farklılık göstermektedirler. En yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan d- α -tokoferol halka yapısında üç metil grubu içermektedir (Şekil 1) (Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

Vitamin E, tahıl tanelerinde, mısır yağı, pamuk yağı, soya yağı ve diğer bitkisel sıvı yağlarda ve bunlardan yapılan margarinlerde, et, hayvansal yağ, karaciğer, balık eti, tavuk eti ve yumurtada bulunmaktadır (Machlin 1991).

Vitamin E'nin en belirgin özelliği olan antioksidan aktivitesi 6. Karbon atomundaki fenolik hidroksil grubundan ileri gelmektedir. Moleküldeki alifatik yan zincir non-polar olduğu için tokoferoller suda çözünmezler (Robertson ve ark 1989).



Şekil 1. Vitamin E'nin açık formülü (α -tokoferol)

2.4.1. Vitamin E'nin Metabolizması

Lipidlerin ve yağda çözünen vitaminlerin emilimi pankreatik fonksiyona, safra salgısına, misel oluşumuna ve bağırsak membranına geçişe bağlıdır. Safra asitleri, vitamin E emilimi için kesinlikle gereklidir (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

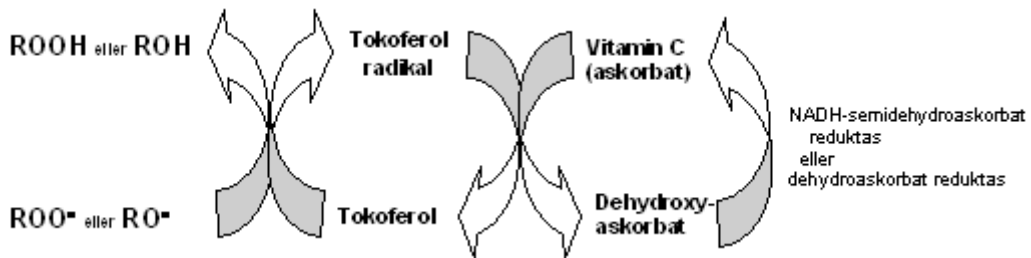
Vitamin E emilimi, yağların sindirim ve emilimi ile yakından ilişkilidir. Vitamin E epitelyum hücre membranına geçmeden önce safra tuzları ve pankreas özsuğu aracılığı ile besinlerden lipidlerle birlikte ince bağırsaktan emilmektedir (Kohlschütter ve ark 1988, Fukui ve ark 1989).

Plazmada vitamin E'nin taşınması için özel bir taşıyıcı protein bulunmamaktadır. Bu yüzden vitamin E'nin dokulara dağılması için geçerli olan esas mekanizma lipidlerin dokulara dağılımı için geçerli olan mekanizmadır. Vitamin E bağırsaklardan dolaşıma şilomikronlar içinde lenfatik sistem aracılığıyla geçer. Şilomikron katabolizmasında lipoprotein lipaz önemli bir enzimdir ve vitamin E için taşıyıcı protein olarak rol oynar (Traber ve Sies 1996). Vitamin A ve kolesterolün aksine vitamin E emilim sırasında tekrar esterifiye olmamakta, memelilerde ince bağırsaklarda lenf sistemi aracılığı ile karaciğere taşınmaktadır (Robertson ve ark 1989, Dündar ve Aslan 1999).

Vitamin E'nin başlıca atılımı dışkı aracılığı ile dir. İdrarla %1 oranında atılır (Robertson ve ark 1989).

2.4.2. Vitamin E'nin Fonksiyonları

Vitamin E'nin ilk ve en önemli fonksiyonu oldukça yüksek reaktiviteye sahip olan serbest radikallerin nötralizasyonu, yani antioksidan etkidir (Havlik 1997). Hücre membran fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitleri spontan olarak ya da oksidan metabolitlerin etkisiyle kolayca oksitlenebilirler ve peroksit türevlerine dönüşebilirler (lipid peroksidasyonu ya da otooksidasyon). Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan vitamin E'dir (Şekil 2) (Meydani 1995, Kayaalp 2000).



Şekil 2. Antioksidan mekanizmada vitamin E ve vitamin C arasındaki ilişki.

Aterosklerotik lezyonların önlenmesinde de vitamin E etkili bir maddedir. Serum vitamin E düzeyi ile kalp-damar hastalıkları oluşum riskini inceleyen birçok araştırma yapılmıştır (Clarke ve Armitage 2002, Lassnigg ve ark 2003).

Bunlar dışında diabetli hastalarda artan platelet agregasyonunun vitamin E desteği ile normal düzeylere döndüğü, kanserli hastalarda kanser hücrelerinde DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ettiği ve immun sistemi stimüle ettiği için kanserin gelişim safhasında etkili olabileceği bildirilmektedir (Traber ve Sies 1996).

Vitamin E, cilt bakımı ve skar oluşumunun önlenmesinde oldukça popüler bir vitamin olmasına karşın yara iyileşmesi konusunda bilgiler oldukça çelişkilidir.

Sistemik vitamin E ve glikokortikoidler yangısel yanıtı ve kollajen sentezini inhibe eder ve iyileşmeyi geciktirir. Ancak farklı yara tiplerinde farklı etkilerinin olabileceği gibi kullanılan preparatın lipofilik ya da hidrofilik oluşunun da yara iyileşmesi üzerine etkisinde farklılıklar oluşturabileceği bildirilmiştir (MacKay ve Miller 2003). Nitekim Greenwald ve ark (1990) tavuklarda flexor tendo yaralarının iyileşmesinde vit E verilen hayvanlarda iyileşmenin kontrollere göre %50 daha az olduğunu, Ehrlich ve ark (1972) da ratlarda yarada kollajen sentezini zayıflattığını bildirmektedirler. Araştırmacılar vitamin E'nin negatif etkisinin glikokortikoid benzeri etki göstermesinden kaynaklandığını ve bu etkinin vitamin A tarafından hafifletilebileceğini işaret etmektedirler (Ehrlich ve ark 1973).

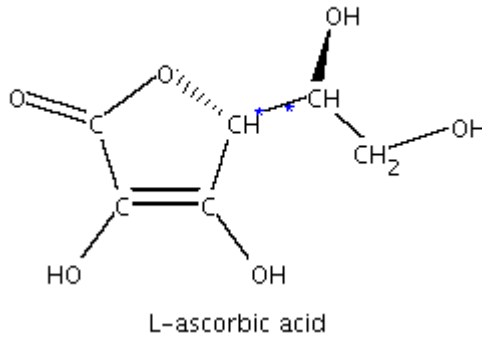
Bu bilgilerin aksine Galeano ve ark (2001) hidrofilik vitamin E preparatlarının diabetik ratlarda yara iyileşmesini hızlandığını ve vitamin E uygulanan grupta yara dokusu kollajen miktarındaki artışların yanında yara dudaklarındaki kopma direncinin de arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu olumlu etkileri lipid peroksidasyonunun inhibisyonuyla ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca profilaktik vitamin E uygulamalarının preoperatif irradyasyona maruz bırakılan yaralarda normal iyileşmeyi ve yara dudaklarında kopma direncini arttırdığı (Taren ve ark 1987), hayvanlarda intraperitoneal adhezyonların oluşum oranını düşürdüğü

(Kagoma 1985) bildirilmektedir. Vitamin E özellikle ciltteki yanık ve benzeri yaralarda yara iyileşmesini hızlandırdığı için kozmetik amaçlı olarak geniş kullanım alanı bulmuştur ancak bu konuda da çelişkili bulgular mevcuttur (Mackay ve Miller 2003).

2.5. Vitamin C

Vitamin C (L-askorbik asit) 1921 yılında izole edilmiş, 1933 yılında da tanımlanmış ve sentez edilmiştir. Vitamin C'nin araştırılmaya başlamasına skorbüt hastalığı önderlik etmiştir. Kobaylarında insanlar gibi skorbüte hassasiyetlerinin olduğu ve hastalığın deneysel olarak oluşturulabileceği gösterilmiştir (Jacob 1999).

Askorbik asit (L-askorbik asit, L-ksilo askorbik asit, L-treo-heks-2-enoik asit-γ-lakton) vitamin C'nin biyokimyasal isimlendirilmesidir (Şekil 3). L-askorbik asit bitkilerde ve hayvanlarda geniş dağılım göstermektedir (Yenson 1984).



Şekil 3. Askorbik asit'in kimyasal yapısı

İnsanlar, diğer primatlar, kobaylar, yarasalar, bazı kuşlar, som balığı, alabalık ve sazan gibi balıkların karaciğerinde askorbik asit sentezinde kullanılan L-gulono-γ-lakton oksidaz enzimi yoktur ve bu nedenle sözü edilen canlılar C vitamini sentezleyemezler. Bu canlıların diyetlerinde C vitamini olmadığı zaman eksikliğe bağlı bozuklukların ortaya çıktığı gözlenir. L-askorbik asit insan ve kobayların dışındaki bazı memelilerin karaciğerinde ve bazı

vertebrallıların böbreklerinde, glukronik asit yolu ile sentezlenir (Bates 1981, Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

L-askorbik asitin en önemli kimyasal özelliği dehidro-L-askorbik asite oksitlenmesidir. L-askorbik asit ışığa karşı hassastır. Oksijen ve ısı varlığında sıcaklık artışı ile orantılı olarak okside olur. Dehidro-L-askorbik asit, 2,3-diokso-L-gulonik aside hidrolize olur ve sonra okzalik asite ve L-treonik asite dönüşür (Levine 1986, McDowel 1989).

L-askorbik asitin sulu solüsyondaki bozunumu, pH, sıcaklık, oksijen ile metallerin varlığı veya yokluğu gibi faktörlerle etkilenir. pH 4-6'da stabildir. Birçok metal arasında özellikle bakır L-askorbik asit oksidasyonunu hızlandırır (Yenson 1984, Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

2.5.1. Vitamin C'nin Metabolizması

Askorbik asit metabolizması, alım yoluna, alınan miktara ve beslenme gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

İnsanda askorbik asit gastrointestinal sistemde enerji gerektiren sodyum bağımlı aktif transport mekanizması ile absorbe edilir. Aktif transport sistemi insanda ve kobaylarda doygunluğa ulaşabilir ve alımı arttıkça absorbsiyon azalabilir. Hamster ve sıçanlarda ise askorbik asit konsantrasyona bağımlı olarak bağırsak duvarından pasif difüzyon ile geçebilmektedir. Yaklaşık aynı Km değerine sahip, insan ve kobay bağırsağındaki vitamin C transportu, iki türde de benzer transport mekanizması olduğunu göstermektedir. İnsanlarda bu transport sisteminin aktivitesi en yüksek jejunumda, kobaylarda ise ileumdadır. Ayrıca ince bağırsak duodenal ve proksimal duvarı da kobaylarda absorbsiyon bölgesi olarak bildirilmiştir (Horio ve ark 1986, Moser 1990).

Askorbat iyonu küçüktür ve renal glomerular filtrelerin porlarından rahatlıkla geçer. Serum konsantrasyonu 1.6 mg/dl'ye ulaşıncı tubuler reabsorbsiyon doyuma ulaşır ve bu değır bireysel farklılıklar göstermekle birlikte 2.5 mg/dl'ye ulaştığında askorbik asit idrarla atılmaya başlar. Lökosit ve dokulardaki vitamin C konsantrasyonu serum konsantrasyonuna bağılı olarak artış gösterir (McDowel 1989).

Askorbik asit, vücudun spesifik dokularında yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Örneğın adrenal bezler, hipofiz, timus, korpus luteum ve retina konsantrasyonları plazmadan 100 defa daha yüksek, beyin testis, troid, ince barsak mukozası, lenf bezleri, akciğer, karaciğer, dalak, akyuvarlar, pankreas ve tükruk bezleri ise 10–100 kat daha yüksek olduğı birçok araştırmayla belirlenmiştir (Jacob 1999).

2.5.2. Vitamin C'nin Fonksiyonları

Diyette L-askorbik asit eksikliğinde, insan, kobay gibi vücutlarında askorbik asiti sentezleyemeyen canlılarda skorbüt belirtileri ortaya çıkmaktadır. Bunlar dışında kollajen oluşumunda, yağ asidi metabolizmasında, beyin fonksiyonlarında bazı bozukluklar, enfeksiyona duyarlılık ve yorgunluk hissi gibi etkiler de gözlenmektedir (Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

Askorbik asit moleküler oksijen gerektiren karışık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonlarında önemli rol oynar. Hidroksilasyon yapan enzimlerin aktif bölgelerinde klasik kofaktör benzeri rol oynar. Metal iyonlarının geçişi ile ilişkisi, indirgeyici özelliğı ve oksijenin serbest radikal türevleri ile reaksiyonu, biyolojik fonksiyonlarının temelini oluşturur (Englard and Seifter 1986).

L-askorbik asit uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasında gerekli olan karnitinin lizinden sentezlenmesinde veya γ -butiro betainin hidroksilasyonu sonucu oluşumunda etkili bir vitamindir. L-askorbik asit eksikliği ile karnitin sentezi azalır ve kanda

trigliserid birikimi, fiziksel yorgunluk, halsizlik ve skorbüt belirtilerinin gözlenmesi bu yüzdendir (Johnston and Corte 1999).

Ketakolamin biyosentezinde, dopaminin norepinefrine maksimum hidroksilasyonunun sağlanmasında ve tirozin metabolizmasında askorbik asite gereksinim vardır. Ayrıca askorbik asit ve kolesterol metabolizması arasında da ilişki olduğu, kobaylarda kronik askorbik asit yetersizliğinin kolesterolün safra asitlerine katabolizmasında azalmaya neden olduğu ve kolesterolün hidroksilasyonu ile safra asitlerine dönüşümü arasında askorbik asite gereksinim olduğu belirlenmiştir (Jacob 1999). Ayrıca yapılan araştırmalar kolesterolden steroid hormonların biyosentezinde de vitamin C varlığının etkili olduğu gösterilmiştir (Jacob 1999, Serpek ve ark 2001, Haliloğlu ve ark 2002).

Askorbik asit, iyonların vücut içinde geçişlerini azaltır. L-askorbik asit eksikliği dalaktan demirin mobilizasyonuna zarar verir ve demir yükleme tedavisinde ilave L-askorbik asit demirin vücut depolarından mobilizasyonunu artırır. Bu nedenle askorbik asit aneminin tedavisinde de önemli bir vitamindir (Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

Lökositlerdeki yüksek askorbat konsantrasyonu ve bunun enfeksiyon ve fagositoz sırasında hızla harcanması, vitaminin immun sistemde de etkili olduğunu göstermektedir. Soğuk algınlığı belirtilerinde lökosit ve plazma askorbik asit düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı ileri sürülmektedir. Askorbik asitin düşük dozlarda soğuk algınlığını önleme özelliği vardır ancak yüksek miktarlarda önemi büyüktür. Alınan askorbik asitin miktarı arttıkça koruma özelliği de artar (Goetzel ve ark 1974, Başpınar ve ark 1998).

Askorbik asit kollajen, proteoglikanlar ve kemik, deri, kapillar duvar ve diğer bağ dokuların hücre içi matriksinin organik bileşenlerinin sentezinde önemli rol oynar. Vitamin-C, demir ve oksijenle beraber kollajen sentezi sırasında, lizin ve prolinin hidrolizasyonu için gereklidir (Orgill ve Demling 1988, Scholl ve Langkamp-Henken 2001). C-vitamini eksikliğinde anormal kollajen ipliklerinin oluşumuna neden olur ve kollajen demetler anstabl

ve kolay degrade olduklarından derinin gerginliği ve kapiller frajilite azalır (Porto da Rocha ve ark 2002). Klinik olarak dişeti kanamaları, immun yetmezlik ve kırık ve yaralarda iyileşmede gecikmeler gözlenir (Peterkofsky 1991, Fauci ve ark 1998). A vitamini gibi, C-vitamini de yangısel cevabı uyarır ve eksikliğinde konakçının infeksiyonlara direnci düşer. Ayrıca kollajen üretiminde askorbik asit nötrofillerin fonksiyonunu (Goetzl ve ark 1974), anjiogenezisi arttırmasının (Nicosia ve ark 1991) yanında güçlü bir antioksidan olarak görev yapar. Vitamin eksikliği olmayan hastalarda bu vitaminin ek olarak verilmesi yara iyileşmesinde hızlanmaya neden olmaz (Waldorf ve Fewkes 1995), ancak özellikle ağır yanık yaralarında günde 1-2gr. C-vitamini verilmesi yaygın bir pratik uygulamadır (Barbul ve Purtill 1994).

L-askorbik asitin önemli biyolojik fonksiyonlarından biri de oksijen türevi olan hidroksil, singlet oksijen, süperoksit gibi serbest radikallerin harabiyetinde rol oynamasıdır. Askorbik asit fizyolojik strese karşı yanıtta da etkili olduğundan operasyon anında ve postoperatif olarak gereksinim vardır (Pugliese 1998). Travma ve cerrahi yaralarda düşük plazma askorbik asit düzeylerinin dahi fizyolojik anti-stresör olarak etkili olduğu gözlenmiştir (MacKay and Miller 2003). Yapılan araştırmalar aşırı ekzersiz sonucu oluşan fizyolojik stresin antioksidan savunma sistemini harekete geçirdiğini ve benzer sonuçların yaralarda da gözlendiğini, bu nedenle yara iyileşmesinde doku antioksidan miktarındaki artışların faydalı olabileceğini göstermiştir (Şenel ve ark 1997, Gupta ve ark 2002, Şen ve ark 2002).

2.6. Çinko

Canlılarda hücrelerin proliferasyon, replikasyon ve farklılaşması için aminoasitler, glukoz, yağ asitleri ve vitaminler yanında minerallere de ihtiyaç vardır. Çinko, organizma için esansiyel bir mineraldir. Optimal sağlık için her gün belirli bir miktar alınması gereken biyolojik bir eser elementtir. Tüm organlar, dokular ve vücut sıvılarında yer alan çinko toplam vücut ağırlığının % 0,0033'ünü kapsamaktadır (Prasad 1995).

Çinko, solüsyonlarda metalik iyon olarak serbest bulunmaktan çok, organik moleküllerde kompleks oluşturmuş bir durumda bulunur. Plazma çinkosunun %50'si albumine, %7'si amino asitlere ve geri kalan kısmı ise makroglobulinlere ve diğer serum proteinlerine bağlı olarak taşınır. Çinko, protein yapıları ve metalloenzim aktivitelerinin önemli belirleyicileri olan sülfidril gruplarına yüksek affinite gösterir (Prasad 1995).

Besinlerle alınan çinkonun %15-30'u duodenumdan ve ince bağırsağın proksimalinden emilir. Bu emilime aktif transport da katkıda bulunur. Çinkonun %70'i dışkı ile atılır. İdrar ve ter yoluyla da bir miktar kayıp vardır. Metabolizmasında başlıca rol oynayan organ karaciğerdir. En yüksek konsantrasyonda retinada bulunan çinko karaciğerde, böbreklerde ve kaslarda da önemli miktarlarda bulunur (Vallae ve Falchuk 1993).

Yaşayan organizmalar için çinkonun önemi hakkındaki bilgiler, 1869 yılında Pastör'ün öğrencisi Raulin tarafından *Aspergillus Niger*'in büyümesi çinkonun faydalı olduğunun bulunmasıyla başlamıştır. Çinko üzerine yapılan çalışmaların yoğunlaşması 1940 yılında karbonik anhidraz enziminin çinko içerdiğinin belirlenmesiyledir. Daha sonra çinkonun birçok metalloenzimin kofaktörü olduğu belirlenmiş ve çalışmalar bu yönde büyük hız kazanmıştır (Berg ve Shi 1996).

Çinkonun klinik kullanımı eski mısırlarda yanık ve yara tedavisinde çinko uygulamasıyla başlamıştır. Fakat çinkonun destekleyici faydasını gösteren bilimsel veriler 1953 yılına kadar elde mevcut değildir. O yıllarda deneysel hayvan çalışmaları ve cerrahi hastalarda diyetle çinko ilavesiyle yara iyileşmesinin hızlandığı gösterilmiştir (Lansdown ve ark 2007).

Çinko derinin normal fonksiyonunu devam ettirebilmesinde önemli rol oynayan bir elementtir. Deride en fazla epidermiste olmak üzere 10 µg/gr çinko bulunur. Nötron aktivasyon analizi yöntemiyle çinko düzeyinin epidermiste dermisten 6 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Lansdown 1996).

Yaklaşık 300 kadar enzim aktivite için çinkoya gereksinim duyar. Bu enzimler içerisinde serbest oksijen radikallerini parçalayan superoksit dismutaz ve protein sentezi ile hücre bölünmesini sağlayan DNA ve RNA polimerazları sayılabilir. Çinko ayrıca hücre membranını stabilize eder ve retinol taşıyan proteinlerle A-vitaminin transportunu kolaylaştırır (Vallae ve Auld 1990, Lansdown ve ark 2007).

Diyetle alım azlığı, intestinal, mukozal ve sistemik faktörler çinko eksikliğinin ekzojen nedenleridir. Bazı besinler, vitaminler ve mineraller çinko Emilimini etkileyerek çinko eksikliği veya fazlalığına neden olabilirler. Fitatlar, fosfatlar, lifli besinler, kalsiyum, oksalat, bakır, kadmiyum, inorganik demir, kalay ve toprak çinko Emilimini azaltırken; proteinler, şarap, metiyonin, D vitamini, B6 vitamini ve D-penisilamin Emilimini artırır. Çinko eksikliği, büyümenin hızlı olduğu dönemler, hamilelik ve yaşlılık gibi fizyolojik nedenlerle olabildiği gibi karaciğer hastalıkları, malabsorbsiyon sendromları ve uzun süre parenteral beslenme gibi patolojik nedenlerle de olabilir. Çinko eksikliğinde, fagositoz ve hücre sel humoral bağışıklık inhibe olur. Eksiklikle birlikte zayıf yara iyileşmesi, yara dudaklarında kopma direncinde azalmalar gözlenir (Agren ve Franzen 1990, Berg and Shi 1996).

İz elementler ve mineraller iyileşmede etkili enzimler için kofaktörlerdir. Çinko ihtiyacı en fazla yaranın erken yangı sel fazında gözlenir. Ratlarda deri ensizyonu yapılan bir çalışmada (Lansdown ve ark 1999) yüksek yangı, granülasyon dokusu oluşumu ve epidermal hücre proliferasyonunun olduğu dönemi kapsayan yaralanmanın 5. gününde çinko düzeylerinin pik yaptığı, yangının regrese olmasıyla 7. günde normal düzeylere düştüğü gözlenmiş ve cerrahi operasyonlar sonrası ve yaralanmalarda özellikle çinko eksikliği bulunan bireylerde yara iyileşmesi açısından Zn takviyelerinin yapılması gerektiği bildirilmektedir. Ayrıca çinko eksikliği görülmeyen bireylerde de Zn uygulamalarının yara iyileşmesini

hızlandırdığı görülmüştür (MacKay ve Miller 2003). Ehrlich ve ark (1972) operasyon sonrası oluşabilecek stres, fistül ve diyarenin de çinko kayıplarında önemli olduğunu bildirmektedirler.

2.7. Demir

Kimyasal olarak Fe simgesiyle gösterilen demir yeryüzünde çok bulunan bir elementtir. Demir, kaya ve toprakta ferrik formda bulunur ve bu formu, çoğu biyolojik sistemler için kullanışlı değildir. Kimyasal olarak 2 değerlikli olan demirin, okside olmaya çok elverişli oluşu, vücutta oksijen tutmasına yol açmaktadır. Besinlerle alınan demirin büyük bir bölümü üç değerli ferri demir bileşikleri şeklindedir. Fakat bu üç değerli demir bileşikleri kolayca emilmez, ancak iki değerli ferro demir bileşiklerine dönüşünce kolayca emilir (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Organizmada demir, başlıca hemoglobin, miyoglobine, sitokromlar olmak üzere çeşitli dokulara dağılmış halde bulunur. Vücuttaki demirin %69'u hemoglobine, %15'i ferritin ve hemosiderine, %9'u miyoglobine ve %1'i çeşitli hem bileşiklerine bağlıdır (Stryer 1988, Bayşu Sözbilir ve Bayşu 2007) .

Midede demir emilimi çok az düzeydedir. Mide salgısının düşük pH'sı, C vitamini, sülfidril grupları ve diğer indirgeyici maddeler besinlerdeki 3 değerli demiri 2 değerli demire indirger. Demirin büyük bir bölümü ince bağırsağın üst kısımlarında emilir. Pankreastan salınan sodyum bikarbonat duodenumda asit pH'yı nötrleştirerek 2 değerli demiri 3 değerli demire dönüştürür. Bu üç değerli demir bağırsak epitel hücrelerinde 2 değerli demire indirgenir. Bağırsak epitel hücrelerinde, bir hücre içi demir taşıyıcı bulunur. Demirin bir bölümü, taşıyıcıdan mitokondrilere gider. Geri kalan bölümü de bağırsak epitel hücrelerindeki apoferritin ile kanda demir taşıyan bir polipeptit olan transferrine bağlanır. Fakat plazmadaki iki değerli demirin, üç değerli demire oksitlenmesi, başka bir deyişle demirin transferrin ile birleşebilmesi için ferrokinaz ve seruloplazmin gereklidir. Apoferritin demirle birleşerek ferritini oluşturur. Bağırsak epitel hücrelerinde, ferritin artışı, demir emilimini yavaşlatır,

depolar da yeterli demirin bulunduğunu açıklar ve vücuda aşırı demir alınmasını engeller. Bu durum hücreleri toksik etkiden korur (Aisen ve ark 1999, Frazer ve Anderson 2006).

Tahıllarda bulunan fitik asit, demir ile reaksiyona girerek ince bağırsakta suda kolay çözünmeyen bileşiklerin oluşumuna neden olur. Fosfat ve oksalatlar da aynı şekilde demirle birleşip suda kolay çözünmeyen bileşikler oluşturarak emilimi engeller (Cook 1999, Provan 1999).

Dışarı atılması oldukça sınırlı olduğundan, demir yetersizliği yavaş yavaş gelişir. Besinlerle alınan, ince bağırsaktan emilen demir yetersiz olduğunda, ya da gebelik, kronik enfeksiyonlar ve kanama gibi durumlarda, demir yetersizliği oluşur ve demir gereksinimi artar. Demir başlıca bağırsaklardan atılır ve insanda her gün dışkı ile çıkarılan **demir** miktarı 1 mg kadardır. İnce bağırsak hücrelerinde, ferritine bağlı demir, bu hücrelerin yaşamları sona erdiğinde bağırsağa dökülmesi ile birlikte yitirilir ve dışkı ile atılır (Andrews 1999, Beard 2001).

Demirin yara iyileşmesi üzerine etkisi özellikle enzim kofaktörü olmasından kaynaklanır. Demir vitamin C ve oksijenle birlikte kollajen sentezi sırasında, lizin ve prolinin hidrolizasyonu için gerekli bir elementtir (Scholl ve Langkamp-Henken 2001). Bu nedenle Fe eksikliğinde kollojen üretiminde bozukluklarla karşılaşılabilir. Ayrıca demirin oksijen taşıyıcı fonksiyonu da yara iyileşmesinde etkinliğini artırır (Yeoh-Ellerton ve Stacey 2003).

2.8. Bakır

Biyolojik sistemlerde +2 ve +1 değerlikli olarak bulunan bakır oksido-redüksiyon olaylarında rol oynar. Bakır, serüloplazmin, sitokrom C oksidaz, süper oksit dismutaz, dopamin- β -hidroksilaz, askorbat oksidaz, lizil oksidaz ve tirozinaz dahil çoğu metallo enzimlerin integral bir komponentidir (Galhardi ve ark 2004, Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Endokrin bezler (prostat, hipofiz, tiroid ve timus) bakır yönünden fakir dokulardır. Dalak, pankreas, kas dokusu, deri ve kemikler orta düzeyde Cu içerirken, karaciğer, beyin, böbrekler ve kalp yüksek bakır konsantrasyonuna sahiptir (Turnlund 1998).

Bakır çoğunlukla duodenumdan aktif ve pasif transportla absorbe edilir. Ratlarda en fazla emilim yeri duodenum ve jejunumun ilk kısımları diğer bir ifade ile bağırsağın en asit bölgeleridir (Dunn ve ark 1991). Bağırsak mukoza hücrelerinde, bakır metallothioneinin sülfidril grubu ile bağlanır. Çinko ve kadmiyum, sülfidril gruplarına bağlanmak için bakır ile yarışır. Bu nedenle çinko ve kadmiyum bakır absorpsiyonuna karşı antagonisttir. Molibdatın, sülfatın, fitatın, askorbik asidin, çinkonun ve kadmiyumun fazlası, diyetik bakırın biyo değerliliğini azaltır. Ayrıca sülfatlar, çeşitli aminoasitler, lifler, fitatlar, Cu emilimini azaltırlar. Bakır emilimi diyetteki Cu'n kimyasal formundan da önemli oranda etkilenir (Goode ve ark 1989).

Gastrointestinal kanaldan emilen bakır öncelikle albumine bağlanarak ve küçük bir kısmı da histidinle kompleks yaparak hızla karaciğere taşınır, orada çoğu metallothionein benzeri kupro proteinler olarak depolanır. Bakır karaciğerde serüloplazmin yapısına girerek, kana salınır. Plazmadaki total bakırın %95'den fazlası serüloplazmin yapısındadır ve bu şekilde diğer dokulara taşınır (Linder ve ark 2002). Molekül ağırlığı 160.000 kadar olan ve her molekülünde 8 bakır atomu bulunduran serüloplazmin, oksidaz aktivitesine sahiptir. Bakır serüloplazmin, transkuprein, Cu-albumin ve Cu-aminoasit kompleksleri halinde kanda taşınır. Bakırın hücre içine girişi ise glutasyon ve metallothionein'in her ikisi tarafından da regüle edilir. Barsaklardan bakırın portal dolaşıma transferi hücre içi metallothionein konsantrasyonları tarafından regüle edilebilir. Metallothionein düşük molekül ağırlıklı (6.500), sisteince zengin, divalent metaller için yüksek bağlanma affinitesine sahip bir proteindir (Linder ve Hazegh-Azam 1996, Araya ve ark 2003).

Bakır, vücuttan atılımı büyük oranda dışkı yoluyla atılır. Safra, idrar ve terle atılım oldukça düşüktür. Menstrual Cu kayıpları azdır, insanlarda her bir periyodda yaklaşık 0.1-0.8 mg atılır.

Bakır, demir metabolizmasında önemli rol oynar. Bakır noksanlığı demir absorpsiyonunu bozar (azaltır), anemi şiddetli bakır noksanlığına eşlik eder. Ferroksidaz aktivitesine sahip olan bakır içeren enzim serüloplazmin, demir transferrine bağlanmadan önce ferro demiri (Fe^{++}) ferrik demire (Fe^{+++}) oksitler. Bu yüzden demirin hemoglobin yapısına katılabilmesi için gereklidir (Garrick ve ark 2003). Bakır stokrom oksidazın katalitik aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. Enzimin prostetik grubunda bakır ve demir vardır. Stokrom oksidazın yapısında yer alan bakır periyodik olarak Cu^{++} ve Cu^{+} değerlikli hale dönüşerek elektronu oksijene taşımaktadır (Arrendondo ve Nunez 2005).

Bakır Lizil oksidaz enziminin aktif grubunda da yer alarak kollajen ve elastin polipeptidleri arasında çapraz bağlanmalar yapmasına katkı yapmaktadır. Bu enzim lizinin ϵ -karbonundaki amininin oksidasyonunu gerçekleştirir ve aldehid gruplarının şekillenmesini sağlar. Bunlar kohezyondan ve destek doku proteinlerinin (kollajen, elastin) çözünmez özelliklerinden sorumlu bağların kuruluşuna katılır. Eksikliğinde kollajen ve elastin proteinleri arasındaki çapraz bağlanmalar yapılamadığından, arter damarları zayıflar, damarda kopma ve çatlama görür. Ayrıca sığırlarda miyokard enfarktüsüne bağlı ani ölümlere, koyunlarda kemik kollajeninin ve konnektif dokusunun bakıra bağlı çapraz bağlanmaları (Lizil oksidaz) yapılamadığından osteoporozis ve çeşitli kemik ve eklem bozukluklarına sebep olur. Tirozinaz yapısına katılarak melanin sentezine katkısından dolayı eksikliğinde derinin pigmentasyonu bozulur, genel solgunluk görülür, yapağının rengi bozulur (Goode ve ark 1989).

2.9. Kollajen

Kollajen, tendonlarda, kıkırdakta, kemiklerin organik matriksinde ve gözün korneasında önemli miktarlarda bulunan basit, fibriler skleroproteindir. Kollajen, memeli hayvanların vücut ağırlığının %6'sını, tüm vücut proteinlerinin %30'unu oluşturur. Kollajen, soğuk suda çözünmez, sıcak suda ve sulu asit ve alkalilerle kaynatmakla jelatin oluşturur; jelatin de suda kolaylıkla çözünerek kolloidal jel çözeltileri oluşturur (Hawley ve ark 1970, Steed 1997).

Kollajen moleküllerinin en belirleyici özelliği, üç polipeptit alt biriminden oluşan bükümlemiş kangal olan üçlü sarmaldır. Polipeptit alt birimler olan α -zincirler, bir ortak eksen etrafında dönerek $3000 \text{ \AA}$ uzunluğunda ve $15 \text{ \AA}$ çapında katı bir çubuk benzeri bir molekül yapar; bunlar fibrilleri oluştururlar; fibriller de agrege olarak fiberleri oluştururlar (Engin 1996).

Kollajenin yapısını oluşturan fibriller ve fiberler, deride ve tendonlarda birbirine paralel demetler halinde, akciğerlerde düzensiz bir şekilde, korneada ortogonal tabakalar halinde, kıkırdakta gevşek ağ yapısında, kemik ve dişlerde kalsiyum fosfat kristalleri için matriks oluşturacak şekilde yerleşirler (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Kollajen moleküllerinin ikinci çarpıcı özelliği, amino asit dizisinin tekrarlayan tripeptit olmasıdır. Bu tekrarlayan tripeptit, (Glisin-X-Prolin) veya (Glisin-X-Hidroksiprolin) şeklinde gösterilebilir ki burada X, herhangi bir amino asit olabilir. Yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %35'i glisin, %21'i prolin ve hidroksiprolin, %11'i alanindir ve triptofan içermez. Kollajenin yapısındaki prolin ve hidroksiprolin, polipeptit omurganın rotasyonunu sınırlar ve böylelikle üçlü sarmalın stabilitesini artırır. Kollajen üçlü sarmalı, lizil ve hidroksilizil kalıntıları arasında birden çok zincirler arası çapraz bağlantılar tarafından da stabilize edilir (Engin 1996, Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Bulunduğu dokulara dayanıklılık veren, doku şeklini koruyan ve dokuya gerilme direnci sağlayan kollajen, kanın pıhtılaşmasında da etkili bir maddedir. Kan pıhtısı ile etkileşerek yara deliğini kapatır, kan pıhtısı zamanla büzüldüğu halde kollajen lifleri ağı zedelenme yeri üzerinde yeni bir hücre tabakası gelişinceye kadar yarayı örter (MacKay ve Miller 2003).

Kollajen, kondroitin sülfatla 1:1 oranında birleşerek kıkırdağı, 9:1 oranında elastin olarak tendonları, kendinin 4 katından çok hidrate kalsiyum fosfat olarak kemikleri oluşturur; deride ise kendi kadar dermatan sülfat ve 9:1 oranında elastinle birlikte (Engin 1996).

2.9.1. Kollajen biyosentezi

Kollajen, bir ekstrasellüler protein olmakla birlikte, olgun bir kollajen lifi haline gelmeden önce bağ doku fibroblastlarında, intrasellüler prekürsör molekül halinde sentezlenir.

Fibroblastlarda en önce ortaya çıkan kollajen prekürsörü, N-terminalinde yaklaşık 100 amino asitlik bir sinyal dizisi içeren preprokollajendir. Preprokollajen, endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlar tarafından meydana getirilir. Preprokollajenin N-terminali endoplazmik retikulumun veziküler aralığına girdikçe sinyal sıralaması ayrılır ve molekül ağırlığı 150000 kadar olan prokollajen oluşur (Church 1971). Prokollajen, endoplazmik retikulumun veziküler aralığında modifiye edilir. Bu modifikasyon, polipeptit yapısı içindeki prolin ve lizin kalıntılarının hidrosillenerek hidroksiprolin ve hidroksilizin haline dönüşmesini, hidroksilizin kalıntılarının galaktozillenmesini, disülfid bağlarının ve üçlü sarmalın oluşması işlemlerini kapsar.

Prolin kalıntılarının hidroksiprolin kalıntısına dönüşümü, prolil-4-hidroksilaz veya prolil-3-hidroksilaz enzimleri tarafından katalizlenir. Prolil-4-hidroksilaz, $(\text{Gly-X-Y})_n$ polipeptidinde Y konumunda olan prolin kalıntıları üzerine etki ederek bunları 4-hidroksiprolin kalıntıları haline dönüştürür ki bunun için α -ketoglutarat, O_2 , Fe^{2+} ve askorbat

gerekmektedir. Prolil-3-hidroksilaz, Y konumundaki bir 4-hidroksiprolinin hemen öncesindeki X konumundaki prolin kalıntıları üzerine etki eder. Lizin kalıntılarının hidroksilasyonu lizil hidroksilaz etkisiyle olur. Daha sonra hidroksilizin kalıntıları, UDP'nin galaktozil veya glukozil taşıyıcısı olarak kullanıldığı reaksiyonlarda, galaktozil transferaz ve glukozil transferaz etkisiyle galaktozillenir ve glukozillenirler (Gür 1996, Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Prokollajen, N-terminalinde 20 bin molekül ağırlıklı ve C-terminalinde 30-35 bin molekül ağırlıklı iki peptit içerir. Prokollajen molekülünün iki ucunda bulunan peptitlerdeki sistein kalıntıları, N-terminalde zincir içi, C-terminalde ise hem zincir içi hem zincirler arası disülfid bağları oluştururlar ve prokollajen molekülleri üçlü sarmal halinde biraraya gelirler. İntrasellüler modifikasyondan sonra, hidroksillenmiş ve glikozillenmiş prokollajen molekülü, Golgi kompleksi yoluyla hücre dışına salgılanır. Hücre dışına salgılanan prokollajenin N-terminal ve C-terminal peptitleri, sırasıyla prokollajen aminoproteaz ve prokollajen karboksiproteaz enzimleri tarafından ortadan kaldırılır ve tropokollajen oluşur (Gür 1996).

Tropokollajen molekülleri, her zincirde yaklaşık 1000 amino aside sahiptirler ve dokularda bulunan olgun kollajen fibrilleri gibi lifler halinde spontan toplanırlar. Bununla birlikte bazı fibriller bir dizi kovalent bağ vasıtasıyla çapraz bağlanmadıkça olgun kollajen fibrillerinin gerilme gücüne sahip değildirler (Stryer 1988).

Kollajende çapraz bağların oluşumu için önce ekstrasellüler bir enzim olan ve bakır içeren lizil oksidaz, kollajenin belirli lizil ve hidroksilizil kalıntılarının ϵ amino gruplarını oksidatif olarak deamine ederek allizin ve hidroksiallizin gibi reaktif aldehytleri oluşturur. Daha sonra bu aldehytler, başka liziller veya hidroksiliziller ve hatta glikozillenmiş hidroksilizillerin ϵ amino grupları ile Schiff bağı ($-N=CH-$) yaparlar. Bu Schiff bağları da kimyasal olarak yeniden düzenlenirler ve yeni peptit bağları veya sekonder amino köprüleri gibi kovalent bağlarla çapraz köprüler kurarlar. Keza aldol köprülerinin de bu çapraz bağlar

uluşumuna katılımıyla kollajen çok güç çözünür hale gelir ve kollajen lifleri halinde çöker. Kollajen salgılayan hücrelerden salgılanan fibronektin de çökmekte olan kollajen fibrillerine bağlanarak perisellüler matrikste fiber oluşumunun kinetiğini değiştirir (Stryer 1988).

Normal vücut ısısı, pH ve iyon konsantrasyonlarında proteolitik enzimlere çok dayanıklı olan olgunlaşmış kollajen yıkımını kollajenaz enzimi gerçekleştirir (Chowcat ve ark 1988, Steed 1997). Makrofajlar, fibroblastlar, epitelyal hücreler ve lökositlerden salgılanan kollajenaz, kollajenin üçlü heliks yapısını yıkar ve kollajen yıkımı sırasında açığa çıkan hidroksiprolin içeren peptitler ve serbest hidroksiprolin tekrar kullanılamadığından, karaciğerde de yıkımlanamadığından kan yoluyla böbreklere ulaşır ve idrarla atılır. İdrardaki serbest ya da peptitlere bağlı hidroksiprolin düzeyleri kollajen yıkılımının ölçüsü olarak değerlendirilebilir (Engin 1996).

Bu çalışma ile kobaylarda vitamin E ve vitamin C'nin ayrı ve birlikte kullanımının yara dokusu hidroksiprolin, Zn, Fe, Cu düzeyleri ve histopatolojik bulgular üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvan Materyali ve Çalışma Düzeni

Vitamin C ve vitamin E'nin kobaylarda yara iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla tasarlanan bu çalışmada T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Serum Çiftliği'nden elde edilen aynı yaş ve ağırlıklarda, 84 adet yetişkin erkek kobaylar kullanılmıştır. Kobaylar özel hazırlanmış kobay yemi (% 24 protein ve 2650 KCal/Kg metabolik enerji) ile beslenirken, su ihtiyaçları lahana verilerek karşılanmıştır.

Kobaylar çalışmanın gerçekleştirilmesi amacıyla aşağıdaki şekilde dört gruba ayrılmışlardır:

Grup I: Kontrol Grubu: Deri altı serum fizyolojik (1 ml) uygulanan grup

Grup II: Vitamin C Grubu: Deri altı vitamin C (150 mg/kg) uygulanan grup

Grup III: Vitamin E Grubu: Deri altı vitamin E (150 mg/kg) uygulanan grup

Grup IV: Vitamin E+C Grubu: Deri altı vitamin E (150 mg/kg) + vitamin C (150 mg/kg) uygulanan grup



Resim 1. Kobaylara uygulanan enjeksiyon şekli

Çalışmaya başlamadan 10 gün önce S.Ü. Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'ne getirilerek çalışma ortamına adaptasyonları sağlanan hayvanlara yara

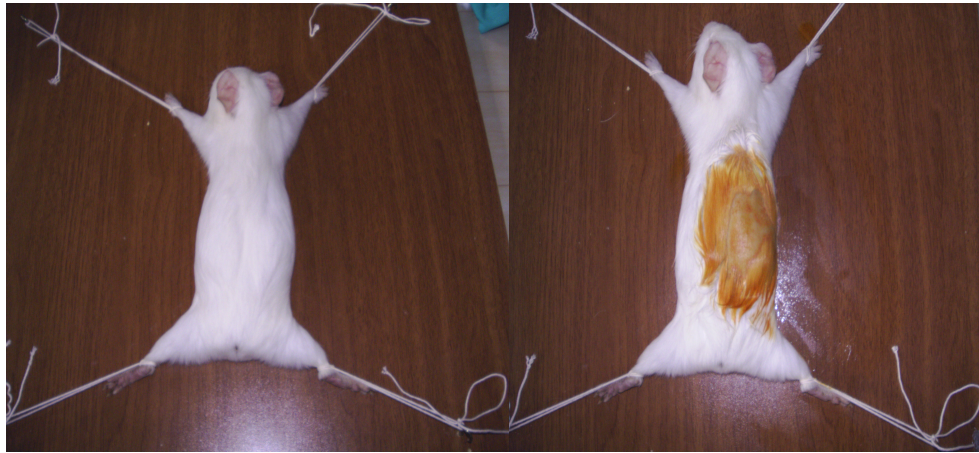
oluşturulmadan 4 gün önce, yukarıdaki gruplarda bildirilen dozlarda vitamin enjeksiyonları yapılarak 10. günün sonunda anestezide alınan kobayların lumbal omurlarının lateralinde 4 cm uzunluğunda derinin tüm katlarını içerecek şekilde bir ensizyon yarası oluşturulmuştur. Daha sonra yara bölgesi basit ayrı dikiş tekniği ile dikilmiş (3/0 ipekle) ancak yara bölgesinin üstü açık bırakılmıştır. Kobayların anestezisinde kas içi ketamin (Ketalar, Parke Davis and Co Inc, USA, 30 mg/kg) ve ksilazin (Rompun, Bayer Ag, Leverkusen, Germany, 5 mg/kg) kullanılmıştır.

Araştırmada gruplara uygulanan işlemler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1. Çalışmada oluşturulan gruplarda vitamin enjeksiyonu ve doku alım günleri

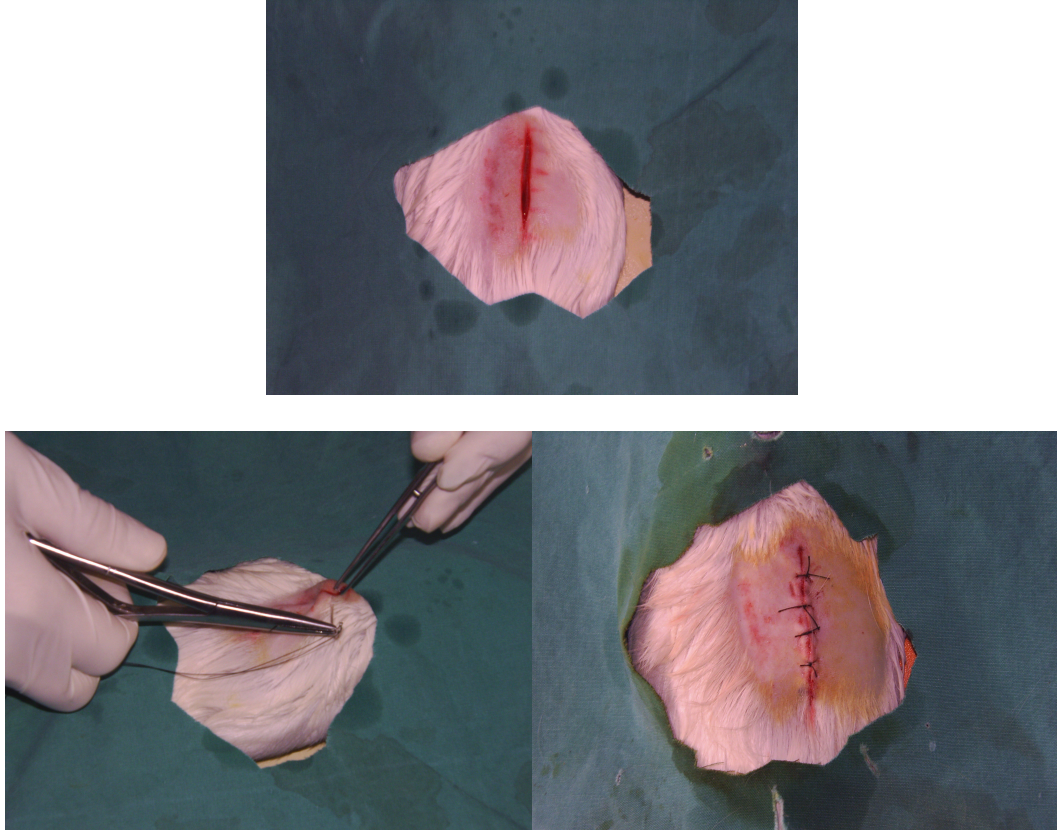
Tarih	Kontrol Grubu	Vitamin C Grubu	Vitamin E Grubu	Vitamin E + C Grubu
1.gün	Yara oluşturulması + Ser. fiz. Enj.	Yara oluşturulması + VitC Enj.(150 mg/kg)	Yara oluşturulması + Vit E Enj.(150 mg/kg)	Yara oluşturulması + Vit E-C Enj.(150-150 mg/kg)
4.gün	Doku alımı Serum fizy. Enj.	Doku alımı VitC Enj.(150 mg/kg)	Doku alımı VitE Enj.(150 mg/kg)	Doku alımı Vit E-C Enj.(150-150 mg/kg)
7.gün	Doku alımı Serum fizy. Enj.	Doku alımı VitC Enj.(150 mg/kg)	Doku alımı VitE Enj.(150 mg/kg)	Doku alımı Vit E-C Enj.(150-150 mg/kg)
10.gün	Doku alımı	Doku alımı	Doku alımı	Doku alımı

Çalışmada yaranın oluşturulduğu gün 1. gün olarak kabul edilmiş, çalışmanın 4-7 ve 10. günlerinde her bir gruptan 7'şer kobay uygun şekilde yüksek dozda sodyum pentotal anestezisiyle öldürüldükten sonra yara bölgesi dokusu ensizyonla alınmıştır.



Resim 2. Kobayların yara oluşturulmasına ön hazırlık aşamaları

Dikiş hattının ayrılması işleminde, ensizyon yeri ortaya gelecek biçimde deri ile beraber 6 x 3 cm ebadında çıkartılmış, faysa, üzerindeki deri tabakasından dikkatli bir diseksiyon ile ayrılmış ve doku ensizyon hattının kenarlarından geçecek biçimde küçültülüp 4 x 2 cm' e indirilmiştir.



Resim 3. Kobaylarda yara oluşturulması ve dikiş işlemleri

Dikişler alındıktan sonra, ensizyon hattının orta bölgesinden alınan doku örneğinde histo-patolojik incelemeler yapılırken, dikey olarak ortadan ikiye bölünen insizyon hattının bir yarısı doku Fe, Cu ve Zn düzeylerinin, diğer yarısı ise hidroksi prolin düzeylerinin belirlenmesi amacıyla alüminyum folyolar içinde kodlanıp – 85⁰ C'de derin dondurucuda saklanmışlardır.

Hidroksi prolin düzeyleri spektrofotometrik yöntemle (Woessner JF 1961) H.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında, Fe, Cu ve Zn düzeyleri S.Ü. Ziraat Fakültesi'nde, Histopatolojik incelemeler ise S.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.2. Hidroksiprolin düzeylerinin belirlenmesi: Kollajen yapısında yer alan her üç amino asitten birini oluşturan hidroksiprolin düzeyleri kollojen metabolizmasının dolaylı bir göstergesidir ve hidroksiprolinin oksidasyonu sonucu oluşan pirol bileşiğinin p-dimetilaminobenzaldehit ile verdiği renkli kompleksin 560 nm de verdiği absorbansın okunması temeline dayanır (Woessner 1961).

Derin dondurucuda saklanan doku örnekleri, soğuk ortamda PBS çözeltisi ile yıkanıp nemi alındıktan sonra hassas terazide 50–60 mg.lık porsiyonlar halinde tartılarak teflon kapaklı pyrex tüplere alınmış, üzerlerine 1 ml 50 mM potasyum-fosfat tamponu (pH 7,0) ve yoğun 1 ml HCl (Merck 101514) eklenerek 105 °C’de 16 saat süreyle inkube edilmişlerdir. İnkubasyon sonunda asidik hidrolizatların pH’ları, % 0,5’ lik fenolftalein indikatörü eşliğinde 8,5’e indirilmiş ve her bir örnekten alınan 100 µl’lik çözeltiler temiz test tüplerine aktararak üzerlerine 200 µl % 58’ lik izopropil alkol (Merck 109624) ve 0,2 ml % 7’ lik kloramin T (Merck 102424) çözeltisi eklenmiş ve vorteks miksede karıştırılan tüpler oda ısısında 5 dakika bekletilmişlerdir. İnkubasyon sona erince üzerlerine birer ml Ehrlich’s reaktifi (10 gr paradiaminobenzaldehit, 11 ml % 60’lık perklorik asit ile karıştırılır ve 3 kısım karışıma 8 kısım isopropil alkol eklenerek taze olarak hazırlanır) eklenen tüpler 60 °C’lik su banyosunda 25 dakika inkubasyona bırakılmışlardır. İnkubasyon sonrası soğutulan tüplerin pembe renkli içeriklerinin absorbansları 560 nm’de Shimadzu UV-120-02 modeli cihazda ölçülmüş ve değerler µg / mg yaş doku cinsinden verilmiştir.

3.3. Doku Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi: Doku mineral madde analizlerinde kullanılan bütün cam malzemeler, mineral madde yönünden temizlenmesi amacıyla nitrik asitte bekletilmiş ve daha sonra distile sudan geçirilerek kurutulması sağlanmıştır. Yaklaşık 0,30-0,40 g civarında tartılan dokular üzerine 10 ml % 65’lik Nitrik Asit (Merck 101518) eklenmiş ve mikrodalga fırınında (CEM Mars-5) 175 PSI ve 180 °C ‘de 50 dakika süreyle yakılmıştır. Yakma işleminin ardından örneklerin sıcaklığı 50⁰C’nin altına düştüğünde

mikrodalga fırınından çıkarılmış ve 10 ml 'lik balon jojelere aktarılmıştır. Balon jojeler distile su ile 10 ml'ye tamamlanıp karıştırılarak, süzgeç kağıdından deney tüplerine süzölmüşlerdir. Daha sonra örneklerdeki Fe (238.204 nm), Zn (213.857 nm) ve Cu (324.754nm) düzeyleri ICP-AES (Varian-Vista Model)(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spektrometer) cihazında okunarak sulandırma katsayıları da dikkate alınarak konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.4. Histopatolojik inceleme: S.Ü. Veteriner Faköltesi Patoloji Anabilim Dalı' nda histopatolojik incelemeler için ayrılan doku örnekleri, reepitelizasyon düzeyi, püstöl oluşumu, subepiteliyal yangı ve kanama, dermiste yangı ve kanama, fibroblast ve kollajen oluşumu yönünden incelenmişlerdir.

Elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde kullanılan varians analizleri, Duncan's multiple range testi ve korelasyonlar için SPSS 10.0 paket programından yararlanılmıştır (SPSS 10.0 for Windows).

4. BULGULAR

Çalışmanın sonucunda; grupların çalışma süresince ve 4., 7. ve 10. günlerdeki Fe, Cu, Zn ($\mu\text{g/g}$) ve hidroksiprolin ($\mu\text{g / mg}$ yaş doku) düzeyleri Tablo 2’de verilmiştir

Tablo 2. Tüm grupların 4., 7. ve 10. günlerdeki Fe, Cu, Zn ($\mu\text{g/g}$) ve hidroksiprolin ($\mu\text{g / mg}$ yaş doku) düzeyleri ($\bar{x} \pm \text{sd}$)

GRUPLAR	GUNLER	FE	CU	ZN	HP
Kontrol Grubu	4. gün (n=7)	38,01 $\pm$ 4,17a	3,56 $\pm$ 1,18b	16,14 $\pm$ 2,46ab	1,95 $\pm$ 0,21a
	7.gün(n=7)	43,51 $\pm$ 8,13b	1,95 $\pm$ 0,45ab	13,34 $\pm$ 1,36a	3,03 $\pm$ 0,60b
	10.gün(n=7)	43,19 $\pm$ 9,53b	0,82 $\pm$ 0,25a	15,13 $\pm$ 4,27ab	2,85 $\pm$ 0,35ab
	Total(n=21)	41,57 $\pm$ 7,30	2,11 $\pm$ 1,35	14,87 $\pm$ 3,04	2,61 $\pm$ 0,62
Vitamin E Grubu	4. gün (n=6)	37,92 $\pm$ 3,21b	3,98 $\pm$ 2,62b	15,88 $\pm$ 3,64b	2,13 $\pm$ 0,44a
	7.gün(n=6)	42,59 $\pm$ 4,09bc	0,91 $\pm$ 0,20a	11,52 $\pm$ 0,61a	3,35 $\pm$ 0,75b
	10.gün(n=7)	22,89 $\pm$ 3,79a	1,86 $\pm$ 1,09ab	12,73 $\pm$ 1,37ab	2,90 $\pm$ 0,62ab
	Total(n=19)	34,47 $\pm$ 3,72	2,44 $\pm$ 2,39	13,70 $\pm$ 3,37	2,74 $\pm$ 0,86
Vitamin C Grubu	4. gün (n=7)	40,98 $\pm$ 5,69a	3,07 $\pm$ 1,24b	12,00 $\pm$ 1,96	2,84 $\pm$ 0,38a
	7.gün (n=7)	50,58 $\pm$ 8,70b	0,74 $\pm$ 0,12a	15,26 $\pm$ 1,66	3,51 $\pm$ 0,31b
	10.gün (n=7)	45,97 $\pm$ 7,45ab	0,62 $\pm$ 0,27a	12,10 $\pm$ 3,76	3,01 $\pm$ 0,52ab
	Total (n=21)	45,78 $\pm$ 7,45	1,48 $\pm$ 1,35	13,12 $\pm$ 2,94	3,12 $\pm$ 0,49
Vitamin E+C Grubu	4. gün (n=6)	36,54 $\pm$ 5,07b	3,39 $\pm$ 1,72b	14,66 $\pm$ 6,03	2,61 $\pm$ 0,56
	7.gün (n=6)	38,05 $\pm$ 3,02b	0,66 $\pm$ 0,17a	12,27 $\pm$ 1,66	3,28 $\pm$ 0,70
	10.gün (n=7)	26,84 $\pm$ 4,92a	0,59 $\pm$ 0,11a	14,26 $\pm$ 3,63	3,13 $\pm$ 0,58
	Total (n=19)	35,21 $\pm$ 4,05	1,74 $\pm$ 1,73	13,62 $\pm$ 4,15	2,98 $\pm$ 0,66
Genel	4. gün	38,33 $\pm$ 4,35	3,48 $\pm$ 1,67b	14,62 $\pm$ 3,90	2,39 $\pm$ 0,53a
	7.gün	43,63 $\pm$ 6,45	1,09 $\pm$ 0,60a	13,19 $\pm$ 1,95	3,29 $\pm$ 0,59b
	10.gün	34,82 $\pm$ 6,53	0,83 $\pm$ 0,20a	13,08 $\pm$ 3,16	3,05 $\pm$ 0,55ab
	Total	39,30 $\pm$ 6,23	1,80 $\pm$ 0,82	13,53 $\pm$ 2,89	2,91 $\pm$ 0,61

* Grup içerisinde incelenen parametrelerde farklı harfler istatistiki açıdan birbirinden farklıdır ($p < 0.05$).

Araştırmada incelenen parametreler arasındaki ilişkiler gerek genel (Tablo 3) ve gruplar halinde (Tablo 4, 5, 6, 7), gerekse günlere göre (Tablo 8, 9, 10) ayrı ayrı incelenmiş ve aşağıdaki şekilde tablolştırılmıştır.

Tablo 3. Çalışmada tüm gruplarda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	0,143	1,000		
ZN	0,278*	0,473**	1,000	
HP	0,075	-0,446**	-0,223	1,000

* $p \leq 0.05$

** $p \leq 0.01$

Tablo 4. Kontrol grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	-0,127	1,000		
ZN	0,131	0,349	1,000	
HP	0,343	-0,530*	-0,147	1,000

* $p \leq 0.05$

Tablo 5. Vitamin E grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	-0,004	1,000		
ZN	-0,019	0,969**	1,000	
HP	0,024	-0,325	-0,335	1,000

** p ≤ 0.01

Tablo 6. Vitamin C grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	0,257	1,000		
ZN	0,634**	-0,058	1,000	
HP	0,206	-0,221	0,288	1,000

** p ≤ 0.01

Tablo 7. Vitamin E+C grubunda incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	0,366	1,000		
ZN	0,344	0,570*	1,000	
HP	0,132	-0,600*	-0,417	1,000

* p ≤ 0.05

Tablo 8. Çalışmada tüm gruplarda 4. gün incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	0,411*	1,000		
ZN	0,571**	,713**	1,000	
HP	0,067	,041	-,276	1,000

* p ≤ 0.05

** p ≤ 0.01

Tablo 9. Çalışmada tüm gruplarda 7. gün incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	0,106	1,000		
ZN	-0,049	0,145	1,000	
HP	-0,123	-0,313	0,019	1,000

Tablo. 10. Çalışmada tüm gruplarda 10. gün incelenen parametreler arasındaki ilişkiler

	FE	CU	ZN	HP
FE	1,000			
CU	0,352	1,000		
ZN	0,434	0,578	1,000	
HP	0,112	-0,410	-0,094	1,000

* p ≤ 0.05

Reepitelizasyon düzeyi, püstül oluşumu, subepitelial yangı ve kanama, dermiste yangı ve kanama, fibroblast ve kollajen oluşumu yönünden incelenen dokulardaki histopatolojik bulgular Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Yara iyileşmesinin 4., 7. ve 10. günlerinde Kontrol, E Vitamini, E+C Vitamini ve C vitamini verilen gruplara ait histopatolojik bulgular *.

		4. gün				7. gün				10. gün			
		Kontrol (n=7)	E vit (n=6)	CE vit (n=6)	C vit (n=7)	Kontrol (n=7)	E vit (n=6)	CE vit (n=6)	C vit (n=7)	Kontrol (n=7)	E vit (n=7)	CE vit (n=7)	C vit (n=7)
Reepitelizasyon	+	3	5	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	++	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+++	1	-	1	3	-	2	-	1	-	2	-	-
	Tam	2	1	1	3	6	4	6	6	7	5	7	7
Püstül	+	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
	++	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	+++	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Subepitelyal yangı	+	2	2	1	3	2	4	2	2	-	-	1	-
	++	-	1	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-
	+++	-	-	-	1	-	-	1	-	1	1	-	1
Dermiste yangı	+	3	2	2	2	5	5	2	3	5	3	1	2
	++	1	2	1	3	-	-	-	1	-	-	-	1
	+++	1	-	-	2	1	1	1	1	-	-	-	1
Dikiş materyali		2	-	-	1	2	3	2	6	5	3	3	4
Kollagen	+	-	-	-	-	3	4	1	1	-	-	-	-
	++	-	-	-	-	1	2	1	5	-	3	2	-
	+++	-	-	-	-	2	-	4	1	7	4	5	7
Fibroblast	+	4	5	4	6	-	-	3	1	-	-	-	-
	++	1	-	1	1	2	3	3	4	-	2	1	-
	+++	-	-	-	-	5	3	-	2	7	5	6	7
Subepitelyal kanama	+	5	5	5	7	6	3	2	6	3	2	-	1
	++	2	1	1	-	-	3	1	1	1	2	1	-
Dermiste kanama	+	2	3	2	6	4	3	3	1	1	1	1	-
	++	2	3	3	1	2	2	-	2	2	-	-	-

* : Reepitelizasyon için (+: Hafif, ++: Orta, +++: İyi), Diğer bulgular için (+: Hafif, ++: Orta, +++: Şiddetli)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Güney Amerika kemirgenlerinden olan ve İspanyollar tarafından 16. yüzyılda pet hayvanı olarak Avrupa'ya getirilen kobaylar (guinea pig) insanlarda olduğu gibi L-glulonolakton oksidaz enzimi bulunmadığından vücutlarında vitamin C sentezi yapamazlar (Bates 1981, Başpınar ve Kurtoğlu 2003). Bu nedenle özellikle vitamin C üzerinde yapılan araştırmalarda insan hekimliğine örnek oluşturması açısından sıklıkla tercih edilen bir deney hayvanıdır (Poyraz 2000).

Vitamin C'nin canlı organizmadaki en önemli fonksiyonlarından birisi kollajen biyosentezi üzerine etkisidir. Skorbüt hastalığının en önemli belirtilerinden biri olan dişeti kanamaları da vitaminin adı geçen etkisinden kaynaklanır. Vitamin C, kollajen biyosentezinde lizin ve prolin örneklerinin hidroksilasyonlarında demir ve oksijenle birlikte ko-faktör olarak hizmet eder ve eksikliğinde kollajen ipliklerinin oluşumunda aksamalara neden olur (Pinnel ve ark 1987). Vitamin C'nin bu etkisi özellikle yara dokusunun iyileştirilmesinin hızlandırılmasında deneysel ve klinik olarak kullanılmaktadır. Novikova ve ark (1988) ratlar üzerine yaptıkları bir araştırmada granülasyon dokusu vitamin C düzeyleri ile doku hidroksiprolin düzeyleri arasında pozitif ilişki olduğunu belirlemişler ve vitaminin kollajen biyosentezi üzerindeki etkisine işaret etmişlerdir. Kaplan ve ark (2004) da tavşanlarda vitamin C düzeyleri ile hidroksiprolin düzeylerinin yara oluşumundan sonra 5. güne kadar paralellik gösterdiğini, bu durumun da vitamin C'nin kollojen sentezi üzerine özellikle iyileşmenin ilk günlerindeki etkilerinden dolayı pozitif etkili olduğunu bildirmektedirler.

Yapılan araştırmada, yara dokusu hidroksiprolin düzeylerinin bütün gruplarda iyileşmenin 7. gününde maksimum düzeylerde olduğu (Tablo 3), 4 ve 7. günler arasındaki farklılığın vitamin E+C grubu dışındaki grupların tümünde anlamlı ($p<0.05$) olduğu, ayrıca gruplar içerisinde en yüksek hidroksiprolin düzeyinin de vitamin C grubunda belirlendiği görülmüş (Tablo 3) ve sonuçlar Kaplan ve ark (2004) ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca çalışma

süresince hidroksiprolin düzeylerine vitamin C grubundan sonra en yüksek vitamin E+C, vitamin E ve kontrol gruplarında rastlanmış ve bu durumun vitamin C'nin kollojen biyosentezinde etkili olduğunun (Peterkofsky 1991) bir göstergesi olabileceği kanısına varılmıştır.

Vitamin E'nin en iyi bilinen fonksiyonlarından birisi organizmada metabolik reaksiyonlar sırasında meydana gelen ve oldukça zararlı olan serbest radikallerin nötralizasyonu toksik etkilerinin önlenmesidir. Vitamin E'nin bu işlevini yerine getirmesinde vitamin C, Se ve glutasyon da büyük önem taşır. Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamininin tokoferol radikali haline gelmiş formu vitamin C tarafından sürekli rejenere edilebilir. Tokoferol radikali en son vitamin C ile reaksiyona girerek vitamin C radikale dönüşür. Meydana gelen vitamin C radikali tokoferol radikali gibi reaktif değildir ve radikal reaksiyonlarının durdurulmasında büyük önem taşır (Niki 1987). Yukarıda sözü edilen mekanizmadan dolayı vitamin E'nin yara iyileşmesi üzerine etkileri ile ilgili sonuçlar oldukça çelişkilidir. Bir kısım araştırmacılar vitamin E'nin yara iyileşmesi ve kollojen biyosentezi üzerine inhibe edici etkisinden söz ederlerken (Ehrlich ve ark 1972, MacKay ve Miller 2003), bir kısmı kollojen biyosentezini artırıcı etkilerinden ve yara iyileşmesi üzerine pozitif etkilerini (Galeano ve ark 2001) dile getirmektedirler. Vitamin E'nin yara iyileşmesi sürecinde olası olumsuz etkilerinin kendisinin radikale dönüşmesinden kaynaklanabileceği ve bu etkinin vitamin C tarafından ortadan kaldırılabilmesi düşüncesiyle planlanan çalışmamızda vitamin E gruplarındaki hidroksiprolin düzeylerinin vitamin C ve vitamin E+C gruplarından daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum vitamin C'nin kollajen biyosentezinde vitamin E'den daha etkili olduğunun ve aynı zamanda vitamin E'nin etkisini artırdığının bir göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yara iyileşmesi üzerine Zn, Fe, Cu gibi mineral maddelerin etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların büyük bir kısmında deneklerin rasyonlarına

mineral madde eklenerek yara iyileşmesi üzerine olan etkileri amaçlanmıştır. Vitaminlerin yara dokusu mineral madde düzeyleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Zn, Cu, Fe, Ca ve Mg gibi metal iyonları ve metalloenzimlerin eksikliklerinin yara iyileşmesinde gecikmelere yol açtığı klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Moynahan 1974, Lansdown 1995, Lansdown 1996). Ancak bu metal iyonlarının yara dokusu düzeylerindeki değişimlerinin incelendiği çalışma sayısı da oldukça sınırlıdır.

Yara iyileşmesinde metal iyonları içerisinde Zn merkezi bir rol oynar. Çinko, yara iyileşmesi ile ilişkilendirilebilecek birçok enzim için kofaktör görevi görür. Bununla birlikte fazla çinkonun iyileşmeyi geciktirdiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Lansdown ve ark 1999). Bu etkinin Zn, Cu, Ca gibi metallerin taşıyıcı proteinlerine bağlanmada birbirlerini etkilemelerinde bir iyonun fazlalığının diğerinin bağlanmasını inhibe etmesinden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Klevay 1975, Heng ve ark 1993). Lansdown ve ark (1999) ratların derilerinde oluşturulan ensizyon yaralarında yara dokusu çinko düzeylerinin ilk günlerde %15–20 daha yüksek olduğunu, epidermal proliferasyon ve granülasyon dokusu olduğu günlerde (yaklaşık 5. gün) düzeyinin daha da arttığını bildirmektedirler. Daha sonra düşen düzeylerin 10. günde normale döndüğünü gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar yara dokusu bakır düzeylerinin de ilk 4 gün içerisinde yüksek seyrettiğini, daha sonra düşüşe geçerek 10. günde normal düzeylerine ulaştığını bildirmektedirler. Yapılan araştırmada da yara dokusu Zn düzeylerinin vitamin C grubu dışındaki tüm gruplarda 4. günde diğer günlere oranla yüksek olduğu saptanmış, 7. günde düşen düzeylerin 10. günde tekrar yükselme eğiliminde olduğu görülmüştür. Bakır düzeyleri ise yine Lansdown ve ark (1999)'nın bulgularına benzer bir seyir göstererek, grupların tamamında 4. günde yüksek olduğu, daha sonraki günlerde düşüşe geçtiği belirlenmiştir. Bütün gruplarda hidroksiprolin düzeyleri ile Cu ve Zn düzeyleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde her iki mineralin de hidroksiprolin düzeyleri ile negatif

ilişki içerisinde olduğu görülmüş ve bakır ile hidrokisprolin düzeyleri arasındaki ilişki anlamlı ($p < 0.01$) bulunmuştur. Bu ilişki kollojen biyosentezinde enzim kofaktörü olarak etki eden bu iki metalin sentez süresince tüketildiğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Vitamin C'nin mineral metabolizması üzerine etkilerinde birisi de demir emilimi üzerine olan etkisidir. Vitamin C demir emilimini inhibe edici maddelerin etkilerini azaltarak, aynı zamanda duodenumun alkali pH'sında demiri çözünür formda tutarak, ferrik demiri ferro demire indirgeyerek emilimi kolaylaştırır. Emilim sonrası ise vitamin C demir-transferrin kompleksinden ferik demirin serbest kalmasını ve demirin hemoglobin ve diğer demir içeren porfirinlerin yapısına katılmasını sağlar (Cook ve Monsen 1977, Başpınar ve Kurtoğlu 2003). Yapılan araştırmada da yukarıdaki bilgilere paralel olarak en yüksek doku demir düzeylerinin vitamin C grubunda olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda doku mineral madde düzeylerinin günlere göre ilişkileri de araştırılmış, 4. gün mineral madde düzeyleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde Zn, Fe ve Cu düzeylerinin birbirleri ile pozitif ilişkili olduğu ancak bu ilişkinin yara iyileşmesinin takip eden günlerinde rastlanmadığı görülmüştür. Bu durumun kollajen biyosentezinin başlatılmasında ve devamında bu metallerin etkili olduğunun bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür.

Yara iyileşmesinin düzeyinin belirlenmesinde en önemli ölçütlerden birisi de yara dokusu üzerinde yapılan histopatolojik araştırmalardır. Gruplardaki olguların yapılan histopatolojik değerlendirmeleri sonucunda, 4 günde en iyi reepitelizasyonun ve fibroblast aktivitesinin vitamin C grubunda olduğu ve diğer gruplarla kıyaslandığında, E vitamini grubunda reepitelizasyonun en az olduğu dikkati çekti. Subepitelyal ve dermiste yangısal reaksiyonun, C vitamini grubunda daha fazla ve gelişen yangının çoğunlukla purulent olduğu, sekonder enfeksiyon ve kontamine dikiş materyali ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmanın 7. gününde ise reepitelizasyon kalitesi açısından en iyi grubun CE vitamini verilen grup olduğu, bunu C vitamini grubu, kontrol grubu ve E vitamini grubunun izlediği

gözlendi. Ayrıca yedinci günde, Kontrol ve E vitamini grubunda yangının daha belirgin olduğu dikkati çekmiştir. Epidermiste CE ve C vitamini gruplarında 1'er olguda püstül şekillendiği, ancak bu olgularda reepitelizasyonun tam olduğu görüldü. Kontrol ve C vitamini grubunda reepitelizasyonun, ensizyon hattı boyunca dermise doğru aşırı bir üreme gösterdiği belirlendi. Ayrıca dermiste dikiş materyali tespit edilen olgularda yabancı cisim dev hücrelerinin bulunduğu granülasyon dokusu tespit edildi. Fibroblast aktivitesinin kontrol grubunda diğerlerine göre daha belirgin olmasına rağmen, kollegen oluşumunun CE vitamini grubunda daha iyi olduğu görüldü.

Çalışmanın 10. gününde E vitamini grubu dışındaki diğer 3 grupta reepitelizasyonun tam olarak şekillendiği dikkat çekti. Fibroblast aktivitesi ve kollagen oluşumu açısından C vitamini grubu ile kontrol grubunun benzerlik gösterdiği, CE vitamini grubuyla kıyaslandığında bu iki grubun da daha iyi olduğu belirlendi. Dikiş materyali tespit edilen olgularda da yabancı cisim dev hücrelerinin de belirgin olduğu yabancı cisim reaksiyonu dikkati çekti.

Yapılan araştırmanın 4. ve 7. gününde elde edilen histopatolojik bulgular ile yaranın tedavisinde E vitamininin tek başına kullanımının uygun olmayacağı, C vitamini takviyelerinin iyileşmeyi hızlandırabileceğini gösterdiği kanısına varıldı. Çalışmanın 10. günüyle birlikte tüm histopatolojik verilerin değerlendirilmesi sonucu ise E vitamininin tek başına kullanımının yara iyileşmesi üzerine herhangi bir olumlu etkisinin yeterli olmayacağı, C vitamininin tek başına ya da E vitamini ile birlikte kullanımının iyileşmeyi hızlandırıcı etkisinden söz edilebileceği düşünüldü. Bu bulgular etkili bir antioksidan olan E vitamininin iyileşme sürecinde oluşan serbest radikallerin nötralizasyonunda kendisinin bir radikal haline gelebileceği ve vitamin C gibi bu etkiyi nötralize edecek bir antioksidanın yetersizliği durumunda vitamin E'nin yararından çok zararından söz edilebileceği bilgilerine paraleldir. Nitekim çalışmamızda da vitamin C uygulamalarıyla E vitamininin olası zararlı etkilerinin

önüne geçilmiştir. Ayrıca çalışmada C vitamininin de kollojen biyosentezi üzerine olumlu etkilerinden dolayı tek başına kullanımının da olumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak kozmetik sanayinde geniş kullanım alanı bulan vitamin E'nin cerrahi yaraların tedavisi amacıyla kullanımında vitamin C ile birlikte uygulanmasının yara iyileşmesi açısından tavsiye edilebileceği, ayrıca bu konuda uygun dozların belirlenebilmesi için farklı dozlarda benzer çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Vet) Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi-KONYA 2007

Saliha Filiz Pekcici

Danışman

Doç.Dr. Seyfullah Haliloğlu

Kobaylarda Vitamin C ve Vitamin E Uygulamalarının Yara İyileşmesi ve Doku Mineral Madde Düzeyleri Üzerine Etkileri

Bu çalışma; E ve C vitaminlerinin kobaylarda yara iyileşmesi ve yara dokusu hidroksiprolin, Fe, Cu ve Zn düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla, aynı yaş ve ağırlıklarda, 84 adet yetişkin erkek kobaylar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Kobaylar çalışmanın gerçekleştirilmesi amacıyla kontrol (Deri altı serum fizyolojik enj), vitamin C (Deri altı vitamin C enj., 150 mg/kg), Vitamin E (Deri altı vitamin E enj., 150 mg/kg) ve vitamin E+C grupları (Deri altı vitamin E, 150 mg/kg + vitamin C, 150 mg/kg) olmak üzere dört gruba ayrıldılar. Yara oluşturulmadan 4 gün önce ve yara oluşturulduktan sonra 1, 4 ve 7. günler aynı vitamin enjeksiyonları yapıldı.

Çalışmada, anesteziye alınan (kas içi ketamin-ksilazin) kobayların lumbal omurlarının lateralinde 4 cm uzunluğunda derinin tüm katlarını içerecek şekilde ensizyon yarası oluşturuldu ve basit ayrı dikiş tekniği ile dikilerek yara bölgesi açık havaya bırakıldı.

Gruplara enjeksiyonların yapıldığı 4. ve 7. günler ile 10. gün her bir gruptan 7'şer kobay ötenazi edilerek, yara bölgesi ensizyonla alındı. Alınan dokular üzerinde histo-patolojik muayeneler, doku Fe, Cu ve Zn analizleri ve hidroksiprolin analizleri gerçekleştirildi.

Yapılan araştırmada yara dokusu hidroksiprolin düzeylerinin bütün gruplarda iyileşmenin 7. gününde maksimum düzeylerde olduğu, gruplar içerisinde en yüksek

hidroksiprolin düzeyine de sırasıyla vitamin C, vitamin E+C, vitamin E ve kontrol gruplarında belirlendiği görüldü.

Bütün gruplarda hidroksiprolin düzeyleri ile Cu ve Zn düzeyleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, her iki mineralin de hidroksiprolin düzeyleri ile negatif ilişki içerisinde olduğu görüldü, Fe düzeyleri arasında bir ilişkiye rastlanmadı.

Gruplardaki olguların yapılan histopatolojik değerlendirmeleri sonucunda, 4. günde, E vitamini grubunda reepitelizasyonun en az olduğu, C vitamini grubunda reepitelizasyonun ve fibroblast aktivitesinin tüm gruplardan daha iyi olduğu görüldü. Çalışmanın 7. gününde ise reepitelizasyon kalitesi açısından en iyi grubun CE, C, kontrol ve E vitamini gruplarında olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak E vitamininin tek başına kullanımının ensizyon yaralarının iyileşmesi üzerine herhangi bir olumlu etkisinin olmayacağı, C vitamininin tek başına ya da C ve E vitaminlerinin birlikte kullanımının iyileşmeyi hızlandırıcı etkisinden söz edilebileceği kanısına varıldı.

7.SUMMARY

Selçuk University, Institute of Health Sciences

Department of Biochemistry (Veterinary)

Master of License Thesis, Konya, 2007

Saliha Filiz PEKÇİCİ

Consultant

Seyfullah HALILOĞLU, M.D, Associate Professor

Effects of vitamin C and vitamin E applications on wound healing and tissue mineral levels on rats

This study was performed for investigating the effects of vitamin E (vit E) and vitamin C (vit C) on rat wound healing and tissue hydroxi-proline (OH-pro), iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn) levels. The study was carried out on the male, adult 84 rats which were on the same weight and age.

The rats were divided into four groups; the control group (saline), vit C group, vit E group, vit C+E group. Each vitamin and saline were applied subcutaneously. Vit C and Vit E were applied on the dose of 150 mg/kg for each rat. Vitamin and saline injections were applied 4 days before an one, 4 and 7 days after the wound incision.

In the study, ketamin and xysilasine anesthesia was applied by intramuscular way. A four cantimeters full thickness skin incision wound was created on the lateral lumbar area. The wound area closed with basic seperate sutures and leaved open to air.

Seven rats from each group were sacrificed on the days of 4, 7 and 10 after the incision. Wound areas were excised and tissue OH-pro, Fe, Cu and Zn levels were measured, tissue histopathologic investigations were done.

Investigations and measurements showed that tissue OH-pro levels were maximum on 7th day of the incision in all groups. The OH-pro levels were highest on Vit C group than Vit E+C gruop than Vit E group and the lowest one was the control group.

Investigations of tissue OH-pro and mineral material level relations showed negative correlation with Cu and Zn, and no correlation with Fe.

On histopathologic examination, reepithelisation and fibroblast activity were observed lowest on Vit E group, on Vit C group, on the 4th day of incision. Reepithelisation was highest on Vit C+E group, than Vit C group, than control group, than Vit E group on the 7th day of the incision.

In conclusion, Vit E alone was not positively effective on incision wound healing but Vit C alone or in combination with Vit E may be positively effective on the healing of incisions.

8- LİTERATÜR LİSTESİ

1. Agren MS, Franzen L (1990). Influence of zinc deficiency on breaking strength of 3-week-old skin incisions in the rat, *Acta Chir Scand*, 156, 667-670.
2. Aisen P, Wessling-Resnick M, Leibold EA (1999). Iron metabolism, *Curr Opin Chem Biol*, 3, 200-206.
3. Andrews NC (1999). Disorders of iron metabolism, *The New England Journal of Medicine*, 341, 26, 1986-1995.
4. Araya M, Olivares M, Pizarro F, Gonz'alez M, Speisky H, Uauy R (2003). Copper exposure and potential biomarkers of copper metabolism, *BioMetals*, 16, 199–204.
5. Arnold HL, Odom RB, James WD (1990). *Andrews' Diseases of the Skin, Clinical Dermatology*, 8th ed. WB Saunders Company, Philadelphia.
6. Arredondo M ve Nunez MT (2005). Iron and Copper metabolism, *Mol Asp Of Med*, 26, 313-327.
7. Barbul A, Purtill WA (1994). Nutrition in wound healing *Clinics in Dermatology*. 12, 133-140.
8. Bates CJ, (1981). The function and metabolism of vitamin C in man. In *Vitamin C (Ascorbic Acid)*, 1st ed., Counsell JN and Hornig DH, Eds., Applied Science, London, 1-22.
9. Başıpınar N ve Kurtoğlu F (2003). *Vitaminler*, S.Ü. Veteriner Fak. Yayın Ünitesi, Konya.
10. Başıpınar N, Baş AL, Haliloğlu S, Elmas M, Yazar E (1998). The Effects Of Intracellular Vitamin C Concentrations On Bovine Neutrophils Functions In Vitro, *Revue Med Vet*, 149, 10, 931 – 938.
11. Bayşu Sözbilir N ve Bayşu N (2007). *Biyokimya, Güneş Tıp Kitabevleri*, Ankara.

12. Beard JL (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr*, 131, 568S-579S.
13. Berg JM and Shi Y (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc, *Science*, 271, 1081–1085.
14. Bjorneboe A, Bjorneboe GE, Drevon CA (1990). Absorption, transport and distribution of vitamin E, *J Nutr*, 120, 3, 233-242.
15. Carlson MA (1997). Acute wound healing. *Surg Clin North Am*, 77, 3, 607-636.
16. Chowcat NL, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB (1988). Role of collagenase in colonic anastomoses: A reappraisal, *Br J Surg*, 75, 330-334.
17. Church RL, Pfeiffer SE, Tanzer ML (1971). Collagen Biosynthesis: Synthesis and Secretion of a High Molecular Weight Collagen Precursor (Procollagen), *Proc Nat Acad Sci, USA* Vol. 68, No. 11, pp. 2638-2642.
18. Clarke R, Armitage J (2002). Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large-scale randomised trials, *Cardiovasc Drugs Ther*, 16, 5, 411-415.
19. Cook JD (1999). The nutritional assessment of iron status, *Arch Latinoam Nutr*, 49, (3 suppl), 11S-14S.
20. Cook JD and Monsen ER (1977). Vitamin C: the common cold, and iron metabolism, *Am J Clin Nutr*, 30, 235-241.
21. Demetriou AA, Franco I, Bark S, Rettura G, Seifter E, Levenson SM (1984). Effects of vitamin A and beta carotene on intraabdominal sepsis, *Arch Surg*, 119, 161- 165.
22. Dunn MA, Green MH, Leach RM Jr. (1991). Kinetics of copper metabolism in rats: a compartmental model, *Am J Physiol*, 261, 115–125.
23. Dündar Y ve Aslan R (1999). Bir antioksidan olarak vitamin E, *Genel Tıp Derg*, 9, 3, 109-116.

24. Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK (1972). Inhibitory effects of vitamin E on collagen synthesis and wound repair, *Ann Surg*, 175, 235-240.
25. Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK (1973). Effects of vitamin A and glucocorticoids upon inflammation and collagen synthesis, *Ann Surg*, 177, 222-227.
26. Engin A (1996). Yara iyileşmesi, In “Temel Cerrahi” İ Sayek (eds). 2nd ed, vol: 1. Ankara, Güneş Kitabevi.
27. Englard S, Seifter S (1986). The biochemical functions of ascorbic acid, *Annu Rev Nutr*, 6, 365-406
28. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ (1998). *Harrison’s Principles of Internal Medicine*, 14th ed, McGraw-Hill, New York.
29. Frazer DM, Anderson GJ (2006). Iron imports I. Intestinal iron absorbtion anr its regulation, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, 631-635.
30. Fukui E, Tabuchi H, Kurosaki Y, Nakayama T, Kimura T (1989). Further investigations of enhancing effect of medium-chain triglycerides on d-alpha-tocopherol acetate absorption from lecithin-dispersed preparations in rat small intestine, *J Pharmacobiodyn*, 12, 12, 754-761.
31. Galeano M, Torre V, Deodato B, Campo GM, Colonna M, Sturiale A, Squadrito F, Cavallari V, Cucinotta D, Buemi M, Altavilla D (2001). Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice, *Surgery*, 129, 467-477.
32. Galhardi CM, Diniz YS, FAine LA, Rodriguez HG, Burneiko RC, Ribas BO, Novelli EL (2004). Toxicity of copper intake: lipid profil oxidative stres and susceptibility of renal dysfunction, *Food Chem Toxicol*, 42, 2053-2060.
33. Garrick MD, N´uñez MT, Olivares M, Haris ED (2003). Parallels and contrasts between iron and copper metabolism, *BioMetals* 16, 1–8.

34. Goetzl EJ, Wasserman SI, Gigli I, Austen KF. (1974). Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid, *J Clin Invest*, 53, 813-818.
35. Goode CA, Dinh CT, Linder MC (1989). Mechanism of copper transport and delivery in mammals: review and recent findings, *Adv Exp Med Biol*, 258, 131–144.
36. Greenwald DP, Sharzer LA, Padawer J, Levenson SM, Seifter E (1990). Zone II flexor tendon repair: effects of vitamins A, E, beta-carotene, *J Surg Res*, 49, 98-102.
37. Gupta A, Singh RL, Raghubir R (2002). Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats, *Mol Cell Biochem*, 241, 1-7.
38. Gür E (1996). Globuler ve fibröz proteinler In: *Biyokimya*, 25-46., Champie PC, RA Harvey, Çeviri Eds: Tokullugil A, M. Dirican, E. Ulukaya, Nobel Tıp Kitabevi, 2. baskı, İstanbul.
39. Haliloğlu S, Başpınar N, Serpek B, Erdem H, Bulut Z (2002). Vitamin A And B-Carotene Levels In Plasma, Corpus Luteum And Follicular Fluid Of Cyclic And Pregnant Cattle, *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 2, 96 – 99.
40. Havlik RJ (1997). Vitamin E and wound healing. *Plastic Surgery Educational Foundation DATA Committee*, *Plast Reconstr Surg*, 100, 1901-1902.
41. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, Dunphy JE (1970). Collagenase activity in the gastrointestinal tract, *Br J Surg*, 57, 896-902.
42. Haydock DA, Flint MH, Hyde KF, Reilly HC, Poole CA, Hill GL (1988). The efficacy of subcutaneous goretex implants in monitoring wound healing response in experimental protein deficiency, *Connect Tissue Res*, 17, 159-169.
43. Heng MK, Song MK, Heng MC (1993). Reciprocity between tissue calmodulin and cAMP levels: modulation by excess zinc, *Br J Dermatol*, 129, 3, 280-285.

44. Horio F, Ozaki K, Kohmura M, Yoshida A, Makino S, Hayashi Y (1986). Ascorbic acid requirement for the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid, *J Nutr*, 116, 11, 2278-2289.
45. Jacob RA (1999). Vitamin C In: Shils ME Olson JA, Shike M, Ross AC, Eds. *Modern Nutrition in Health and Diseases*, 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins.
46. Johnston CS, Corte C (1999). Tissue carnitine fluxes in vitamin C depleted-repleted guinea pigs, *J Nutr Biochem*, 10, 12, 696-699.
47. Kagoma P, Burger SN, Seifter E, Levenson SM, Demetriou AA (1985). The effect of vitamin E on experimentally induced peritoneal adhesions in mice, *Arch Surg*, 120, 949-951.
48. Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N, Tiftik AM (2006). *Biyokimya. Nobel Yay. Dağ. 3. Baskı, Ankara.*
49. Kaplan B, Gönül B, Dinçer S, Kaya ND and Babül A (2004). Relationships Between Tensile Strength, Ascorbic Acid, Hydroxyproline, and Zinc Levels of Rabbit Full-Thickness Incision Wound Healing, *Surg Today*, 34, 747-751.
50. Kappus H ve Diplock AT (1992). Tolerance and safety of Vitamin E: A toxicological position report. *Free Radic Biol Med* 13, 55–74.
51. Kayaalp O (2000). *Tıbbi Farmakoloji. Vitaminler. Cilt 2, 9. Baskı, Hacettepe Taş Kitabevi, 1541-1575.*
52. Kirsner RS, Eaglstein WH (1993). The wound healing process, *Dermatol Clin*, 11, 4, 629-640.
53. Klevay LM (1975). Coronary heart disease: the zinc/copper hypothesis, *American Journal of Clinical Nutrition*, 28, 764-774.

54. Kohlschütter A, Hubner C, Jansen W, Lindner SG (1988). A treatable familial neuromyopathy with vitamin E deficiency, normal absorption, and evidence of increased consumption of vitamin E, *J Inherit Metab Dis*, 11, 149-152.
55. Lansdown AB (1995). Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions, *Critical Reviews in Toxicology*, 25, 397-462.
56. Lansdown AB (1996). Zinc in the healing wound, *Lancet*, 347, 706-707.
57. Lansdown AB, Path FRC, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS (2007). Zinc in wound healing: Theroetical, experimental, and clinical aspects, *Wound Rep Reg*, 14, 2-16.
58. Lansdown AB, Sampson B, Rowe A (1999). Sequential changes in trace metal metallothionein and calmodulin concentrations in healing skin wounds, *J Anat*, 195, 375-386.
59. Lassnigg A, Punz AR, Barker RP, Keznickl PN, Manhart NE, Roth E, Hiesmayr E (2003). Influence of intravenous vitamin E supplementation in cardiac surgery on oxidative stress: a double-blinded, randomized, controlled study, *British Journal of Anaesthesia*, Vol. 90, No. 2, 148-154.
60. Lehto M, Jarvinen M (1985). Collagen and glycosaminoglycan synthesis of injured gastrocnemius muscle in rat, *Eur Surg Res*, 17, 179-185.
61. Levenson SM, Gruber CA, Rettura G, Gruber DK, Demetriou AA, Seifter E (1984). Supplemental vitamin A prevents the acute radiation-induced defect in wound healing, *Ann Surg*, 200, 494-512.
62. Levine M (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid, *New Engl J Med*, 314, 892-902.

63. Linder MC, Hazegh-Azam M (1996). Copper biochemistry and molecular biology, *Am J Clin Nutr*, 63(suppl), 797S–811S.
64. Linder MC, Zerounian NR, Moriya M, Malpe R (2002). Iron and copper homeostasis and intestinal absorption, *BioMetals*, 15, 12-16.
65. MacKay DJ and Miller AL (2003). Nutritional support for wound healing, *Altern Med Rev*, 8, 4, 359-377.
66. Machlin LJ (1991). *Handbook of Vitamins*, 2nd Edition. Dekker (Marcel), New York.
67. Marks R, Dykes P, Motley R (1993). *Clinical Signs and Procedures in Dermatology*. 1 st ed. London.
68. McCarty MF (1996). Glucosamine for wound healing. *Med Hypotheses*. 47, 273 275.
69. McDowell LR (1989). Vitamin C. In: *Vitamins in Animal Nutrition*, Academic Press, Inc, San Diego, CA.
70. Meydani M (1995). Vitamin E, *Lancet*, 345, 170-175.
71. Moser UK (1990). Physiology and metabolism of ascorbic acid (review), Pages 3–16 in *Proc. 2nd Symp. Ascorbic Acid in Domes. Anim. C. Wenk, R. Fenster, and L. Völker*, ed. Kartause Ittingen, Switzerland.
72. Moynahan EJ (1974). Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc deficiency disorder, *Lancet*, 1, 399-400.
73. Nicosia RF, Belser P, Bonanno E, Diven J (1991). Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism, *In Vitro Cell Dev Biol*, 27A, 12, 961-966.
74. Niki E (1987). Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol, *Third Conference on Vitamin C*, 498, 187-198.
75. Novikova AN, Mamedov LA, Egorova ND, Shekhter AB, Nikolaev AV. (1988). Ascorbic acid and hydroxyproline levels in the serum and granulation tissue of rats with aseptic and infected wounds, *Biull Eksp Biol Med*, 106, 9, 355-358.

76. Orgill D, Demling RH (1988). Current concepts and approaches to wound healing, Crit Care Med, 16, 9, 899-908.
77. Peterkofsky B (1991). Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy, Am J Clin Nutr, 54, (6 Suppl), 1135S-1140S.
78. Pinnel SR, Murad S, Darr D (1987). Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism, Arch Dermatol, 123, 12, 1684-1686.
79. Porto da Rocha, Lucio DP, Suoza Tde L (2002). Effects of a vitamin pool (vitamins A, E, and C) on the tissue necrosis process: experimental study on rats, Aesthetic Plast Surg, 26, 197-202.
80. Poyraz Ö (2000). Laboratuvar Hayvanları Bilimi, Kardelen Ofset, Ankara.
81. Prasad AS (1995). Zinc: an overview, Nutrition, 11:93-99.
82. Provan D (1999). Mechanisms and management of iron deficiency anaemia. Br J Haematol, 105, Suppl 1, 19-26.
83. Pugliese PT (1998). The skin's antioxidant systems, Dermatol Nurs, 10, 401-416.
84. Regan MC, Barbul A (1994). The cellular biology of wound healing. In Schlag G, Redl H (eds): Wound Healing. Berlin, Springer-Verlag.
85. Reiser KM (1993). Nonezymatic glycation and enzymatic crosslinking in a model of wound healing: The effects of aging, diet and modulating agents, J Ger Dermatol, 1, 90-99.
86. Robertson JM, Donner AP, Trevithick JR (1989). Vitamin E: Biochemistry and health implications, vol. 570. New York, Ann NY Acad Sci, 372-382.
87. Ruberg RL (1984). Role of nutrition in wound healing, Surg Clin North Am, 64, 705-714.

88. Scholl D, Langkamp-Henken B (2001). Nutrient recommendations for wound healing, *J Intraven Nurs*, 24, 124-132.
89. Seifter E, Crowley LV, Rettura G, Nakao K, Gruber C, Kan D, Levenson SM (1975). Influence of vitamin A on wound healing in rats with femoral fracture, *Ann Surg*, 181, 836-841.
90. Şen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S (2002). Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm, *Ann N Y Acad Sci*, 957, 239-249.
91. Şenel O, Cetinkale O, Ozbay G, Ahcioglu F, Bulan R (1997). Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin, *Ann Plast Surg*, 39, 516-523.
92. Serpek B, Başpınar N, Haliloğlu S, Erdem H (2001). The Relationship Between Ascorbic Acid, Oestradiol 17 β And Progesterone In Plasma And In Ovaries During The Sexual Cycle In Cattle, *Revue Med Vet*, 152, 3, 253 – 260.
93. SPSS 10.0 for Windows. Statistical Package for the Social Sciences. Superior Performines Software System Inc. Chicago, IL,USA.
94. Steed DL (1997). The rate of Growth Factors in wound healing, *Surg Clin N Am*, 77, 3, 575-586.
95. Stryer L (1988). Oxygen-transporting Proteins: Myoglobin and Hemoglobin, In: *Biochemistry*, 143-171. 3rd Ed, WH Frreman And Company, New York.
96. Taren DL, Chvapil M, Weber CW (1987). Increasing the breaking strength of wounds exposed to preoperative irradiation using vitamin E supplementation, *Int J Vitam Nutr Res*, 57, 133-137.
97. Thornton FJ, Barbul A (1997). Healing in the gastrointestinal tract, *Surg Clin North Am*, 77, 3, 549- 573.

98. Traber MG, Sies H (1996). Vitamin E in humans: demand and delivery, *Annu Rev Nutr*, 16, 321-347.
99. Turnlund JR (1998). Human whole body copper metabolism, *Am J Clin Nutr*, 67 (suppl), 960S-964S.
100. Vallee BL and Falchuk KH (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73, 79-118
101. Vallee BL and Auld DS (1990). Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins, *Biochemistry*, 29, 5647-5659
102. Waldorf H, Fewkes J (1995). Wound Healing, *Adv Dermatol*, 10, 77-96.
103. Woessner JF (1961). The determination of hyroxyproline in tissue and protein samples. *Arch Biochem Biophys*, 93, 440-444.
104. Yenson (1984). İnsan Biokimyası Sermet Matbaası, Kırklareli, 1984.
105. Yeoh-Ellerton S and Stacey MC (2003). Iron and isoprostane levels in acute and chronic Wounds, *J. Invest. Dermatol*, 121,4, 918-925.
106. Zupanets IA, Bezdetko NV, Dedukh NV, Otrishko IA (2002). Experimental study of the effect of glucosamine hydrochloride on metabolic and repair processes in connective tissue structures, *Eksp Clin Farmakol*, 65, 67-69.

9. ÖZGEÇMİŞ

Konya’da 1974 yılında doğdu. Mümtaz Kuru İlkokulu, Kız Ortaokulu ve Atatürk Kız Lisesi’ni bitirdi ve 1994 yılında S.Ü. Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünü kazanarak 1998’de mezun oldu. 2002 yılında Mardin iline öğretmen olarak atanarak, burada 3 yıl görev yaptı. Daha sonra Konya’nın Kulu ilçesi Tavşançalı kasabasında kısa süre görev yaptı. Halen Konya İsmil Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda sınıf öğretmeni olarak görev yapmaktadır.

10. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim elemanlarına ve tezimin ortaya çıkmasında düşünce ve önerileriyle bana yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Seyfullah Haliloğlu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nurten Renda, S.Ü. Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr. Fatih Hatipoğlu ve Dr. Özgür Özdemir'e, ayrıca ağabeyim Opr. Dr. Recep Pekcici'ye, annem Mualla Pekcici ve babam Mak. Müh. Ahmet Pekcici'ye sonsuz teşekkürlerimle...