

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAVŞANIN AĞIZ MUKOZA KESİ YARA İYİLEŞMESİNDE  
ANTİOKSİDAN MEKANİZMA VE NİTRAT DÜZEYLERİ**

DOKTORA TEZİ

**Fehmi Karataş**

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. K. Gonca Akbulut

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAVŞANIN AĞIZ MUKOZA KESİ YARA İYİLEŞMESİNDE  
ANTİOKSİDAN MEKANİZMA VE NİTRAT DÜZEYLERİ**

DOKTORA TEZİ

**Fehmi KARATAŞ**

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. K. Gonca AKBULUT

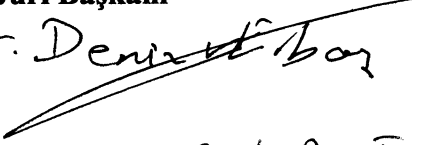
ANKARA  
Mart 2009

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

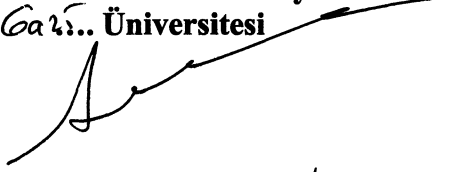
Tez Savunma Tarihi : .././2009

İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
Gaz... Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Deniz 

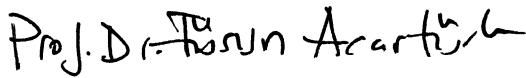
Prof. Dr. Aydan Babil  
İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı  
Gaz... Üniversitesi



İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı  
Gaz... Üniversitesi

Prof. Dr. 

Prof. Dr. Emine Koç  
İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı  
Ankara Üniversitesi



Dr. K. Gonca Akbulut

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı  
Gaz... Üniversitesi



## **iÇİNDEKİLER**

<b>Kabul ve Onay</b>	<b>I</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>II</b>
<b>Şekiller, Grafikler, Resimler</b>	<b>VI</b>
<b>Tablolar</b>	<b>VIII</b>
<b>Semboller ve Kısaltmalar</b>	<b>IX</b>
<b>Önsöz</b>	<b>XII</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Yara İyileşme Süreci</b>	<b>3</b>
2.1.1. Yara İyileşmesinde Hücre Tipleri	3
2.1.2. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Hücrelerin Fonksiyonları	6
2.1.2.1. Hemostazis	7
2.1.2.2. İnflamasyon	7
2.1.2.3. Yaralanma Karşısındaki Damar Cevabı	8
2.1.2.4. Angiogenesisiz ve Matriks Deposizyonu (Çökmesi)	10
2.1.2.5. Yaralanma Karşısındaki Hücre Cevabı	10
2.1.2.6. Tamir ve Yenilenme Fazı (Proliferasyon)	11
2.1.2.7. Kollajen Sentezi ve Olgunlaşması	13
2.1.2.8. Remodeling (Yeniden Şekillenme)	15
2.1.3. Yara Fizyolojisi	17
2.1.3.1. Hücre Aktivasyonu Sitokinler ve Hücre Adezyonu	18
2.1.3.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	21
2.1.4. Yara İyileşmesi Tipleri	21

2.1.4.1 Primer Yara İyileşmesi	21
2.1.4.2. Gecikmiş Primer Yara İyileşmesi	22
2.1.4.3. Sekonder Yara İyileşmesi	22
2.1.4.4. Yüzeysel Yara İyileşmesi	23
2.1.5. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	23
2.1.5.1. Lokal Faktörler	23
2.1.5.2 Sistemik Faktörler	24
<b>2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem</b>	<b>26</b>
2.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu	26
2.2.2. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri	27
<b>2.3. Antioksidan Savunma Sistemi</b>	<b>28</b>
2.3.1. Yara İyileşmesi Tedavisinde Antioksidanlar	29
2.3.2. Yara İyileşmesi, Reaktif Oksijen Ürünleri ve Antioksidanlar	30
2.3.3 Oksidatif Stres İle İlgili Sitokinler, Büyüme Faktörleri ve İyileşme	31
<b>2.4. Nitrik Oksit(NO)</b>	<b>32</b>
2.4.1. NO Yapımı, NOS İzoenzimleri ve Fonksiyonları	33
2.4.1.1.Nitrik Oksitin Fonksiyonları	33
2.4.1.2. NO Sentezi Yapılabilen Hücreler	34
2.4.1.3 NOS Enzimleri	35
2.4.1.4. NOS İnhibitörleri	37
2.4.2. Yara İyileşmesi ve NO	37
2.4.2.1. Yara İyileşmesinde Nitrik Oksit Mekanizması	38
2.4.2.2. NO ve Angiogenesis	41
2.4.2.3 NO ve İnflamasyon	41
2.4.3. Ağızda NO	42
<b>2.5. Aminoguanidine(AMG)</b>	<b>43</b>
2.5.1 Kimyasal Yapısı	43
2.5.2. Aminoguanidin-İnflamasyon Çalışmaları	43

2.5.3. Yara İyileşmesi ve Aminoguanidine	44
2.5.4 Ağız da AMG	45
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler</b>	<b>46</b>
3.1.1. Deney Hayvanları	46
3.1.2. Kullanılan Gereçler ve Kimyasallar	46
<b>3.2. Uygulanan Yöntemler</b>	<b>48</b>
3.2.1. Araştırma Planı	48
<b>3.3. Tayin Yöntemleri</b>	<b>51</b>
3.3.1. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi	51
3.3.2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi	51
3.3.3. Doku ve Plazmada Nitrik Oksit Tayin Yöntemi	52
3.3.4. Plazma da TBARS Tayin Yöntemi	54
3.3.5. Plazmada Sülfidril Bileşkesi Yöntemi	54
<b>3.4. Kullanılan İstatistiksel Yöntem</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Histolojik İnceleme</b>	<b>54</b>
3.5.1. Işık Mikroskopik İnceleme	55
3.5.2. Elektron Mikroskopik İnceleme	55
<b>4. BULGULAR</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Doku ve Plazma MDA Düzeyleri</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Doku Glutasyon ve Plazma Sülfidril Düzeyleri</b>	<b>56</b>
<b>4.3. Doku ve Plazma NOx Düzeyleri</b>	<b>57</b>
<b>4.5. Histolojik Bulgular</b>	<b>64</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>71</b>
<b>6. SONUÇ</b>	<b>79</b>

<b>7. ÖZET</b>	<b>80</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>83</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>86</b>
<b>10. EKLER</b>	<b>98</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>99</b>
<b>12. TEŞEKKÜR</b>	<b>100</b>

## ŞEKİLLER ,GRAFİKLER VE RESİMLER

<b>Şekil 1.</b> Yara İyileşmesi ve Hücre Tipleri	5
<b>Şekil 2.</b> Fibrin Tıkaç Formasyonu, Yara İyileşmesinin Enflamatuvar Fazı ve Tamir Fazı	9
<b>Şekil 3.</b> Normal Yara İyileşme Cevabı	12
<b>Şekil 4.</b> Yara İyileşmesi Safhalarında NO'nun Değişimi ve Hücrelerin Faaliyetleri	40
<b>Grafik 1.</b> NOx miktarı için hazırlanan standart	53
<b>Grafik 2.</b> Kesi Yarasında (GI) Lokal AMG (G II) ve SC AMG (G III) Uygulamasının Yara GSH Düzeyleri	58
<b>Grafik 3.</b> Kesi Yarasında (GI) Lokal AMG (G II) ve SC AMG (GIII) Uygulamasının Yara MDA Düzeyleri	59
<b>Grafik 4.</b> Kesi Yarasında (GI) Lokal AMG (GII) ve SC AMG (GIII) Uygulamasının Yara NOx Düzeyleri	59
<b>Grafik 5.</b> Kesi Yarasında (GI) Lokal AMG (GII) ve SC AMG (GIII) Uygulanmış Grupların Sağlam ve Yara GSH Düzeyleri	60
<b>Grafik 6.</b> Kesi Yarasında(GI) Lokal AMG (GII) ve SC AMG (GIII) Uygulanmış Grupların Sağlam ve Yara MDA Düzeyleri	60
<b>Grafik 7.</b> Kesi Yarasında Lokal AMG ve SC AMG Uygulanmış Grupların Sağlam ve Yara NOx Düzeyleri	61
<b>Grafik 8.</b> Kesi Yarasında Lokal AMG ve SC AMG Uygulamasının Plazma RSH Düzeyleri	62
<b>Grafik 9.</b> Kesi Yarasında Lokal AMG ve SC AMG Uygulamasının Plazma MDA Düzeyleri	62
<b>Grafik 10.</b> Kesi Yarasında Lokal AMG ve SC AMG Uygulamasının Plazma NOx Düzeyleri	63

<b>Resim -</b>	Operasyona hazırlanmış tavşan	50
<b>Resim 1-1a:</b>	Sağlam Oral Mukoza Grubu.	65
<b>Resim 2 -1b:</b>	Sağlam Oral Mukoza Grubu.	65
<b>Resim 3-1c :</b>	Sağlam Oral Mukoza Grubu	66
<b>Resim 4-2a :</b>	Yara Oluşturulmuş Oral Mukoza Grubu	66
<b>Resim 5-2b :</b>	Yara Oluşturulmuş Oral Mukoza Grubu	67
<b>Resim 6-3a :</b>	Lokal AMG Uygulanan Grubu	67
<b>Resim 7-3b :</b>	Lokal AMG Uygulanan Grup	68
<b>Resim 8-4a :</b>	sc AMG Uygulama Grubu	68
<b>Resim 9-4b:</b>	sc AMG Uygulama Grubu	69
<b>Resim 10- 4c:</b>	sc AMG Uygulama Grubu	69

## TABLÖLAR:

<b>Tablo 1.</b> Enflamasyon ve Bağlantılı Hücre Büyüme Faktörleri	20
<b>Tablo 2.</b> Yara İyileşmesini Geciktiren Lokal ve Sistemik Faktörler	25
<b>Tablo 3.</b> Çalışma Grupları ve Özellikleri	50
<b>Tablo 4.</b> Lokal ve SC AMG Uygulamasının Tavşan Yara Dokusu ve Kontrolü Üzerindeki Oksidan Stres Değerleri	58
<b>Tablo 5.</b> Lokal ve SC AMG Uygulamasının Tavşan Plazma Oksidan Stres Değerleri	61

## VI. SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AMG	Aminoguanidine
BH4	Tetrahidrobiopterin
CAT	Katalaz
cGMP	Sıklık guanizin monofosfat
cNOS	Yapısal nitrik okside sentaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktör
eNOS	endotelyal NOS
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FGF2	Fibroblast büyüme faktörü 2
FMN	Flavin Mononükleotid
GF	Büyüme faktörleri
GSH	Glutasyon
GSH- Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
ICAM-1	İnterselüler adezyon molekül-1
IGF	İnsülin bağımlı büyüme faktörü
IFN- $\gamma$	İnterferon- $\gamma$
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
IL-1	interlökin-1
İP	İntraperioteneal

L-NAME	N(G)-nitro-L-arginine methyl ester
L-NIO	İminoetil L-ornitine
L-NMMA	NG-monometil- L-arjin
L-NNA	NG-nitro-L-arjinin
LPS	lipopolisakkarit
MAP	Mitojen aktive eden protein
MDA	Malondialdehit
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
MMPs	Matriks Metalloproteinazlar
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
nNOS	nöral NOS
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NSAI	Nonsteroid antiinflamatuvar
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit Radikali
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit Anyonu
PARS	Poli ADP riboz sentazı
PBS	Fosfat ile Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
RSH	Sülfidril bileşikleri
SC	Subkütan
SNAP	S-nitroso-N-asetil-penisilamin
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiobarbitürik Asit Reaktifi

TGF $\beta$	Dönüştürücü büyüme faktör beta (TGF- $\beta$ / Transforming Growth Factor)
TNF- $\alpha$	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekül-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

## ÖNSÖZ

Selektif olarak indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzim aktivitesini inhibe eden aminoguanidin (AMG) antioksidan özellikte bir maddedir. AMG lokal ve sistemik inflamasyonların azaltılmasında kullanılabilir. AMG uygulaması, yanık yarasında, kemik iyileşmesinde, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlara bağlı ülser yaralarında iyileşme üzerinde kolaylaştırıcı etki yapmıştır. AMG yara iyileşmesinde; büyüme faktör TGF-  $\beta$  1'in ekspresyonunu ve kollajenin ultra yapısını korumuş ve yaranın histamin içeriğini de artırmıştır

Ligatür ile oluşturulan periodontitiste, gingivomukozal dokularda anlamlı bir inflamasyon oluşmuş ve AMG bu inflamasyonu dolayısı ile doku hasarını azaltmıştır.

Biz de çalışmamızda AMG'nin ağız kesi yarasında iyileşme üzerine olan etkisini oksidatif stres parametreleri yönü ile inceledik.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Diş hekimliği uygulamalarında diş çekimi, mukozada kesi yarası ve diş implantı için alveol kemiğine yuva yapılması gibi işlemler sırasında dokuda travma meydana gelmektedir. Ayrıca da bu bölgede ki patolojilere bağlı doku hasarı oluşmaktadır. Yara iyileşmesinin sağlanabilmesi, kollajen sentezinde artış, epitel oluşumu, yara dokularının birleşmesi gibi olaylar sonunda mümkün olmaktadır<sup>1</sup>.

Yara iyileşmesi ile ilgili araştırmalarda genellikle yaranın hızla normal dokuya dönüşümünü sağlayan şartların ve faktörlerin saptanması amaçlanmaktadır.

Yara iyileşmesi; hemostazis, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden modellenme gibi fazların yanı sıra biyokimyasal ve hücresele birçok mekanizmayı da içeren bir süreçtir<sup>2</sup>.

Reaktif oksijen ürünleri (ROS) yara iyileşme sürecinin tüm basamakları ile ilgilidir. ROS normal yara iyileşmesi sürecinde inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulur ve bu süreçte bütünleyici rol oynar. Ancak ROS yapımının artması iyileşmeyen yaralar ile sonuçlanır. Nötrofiller ve makrofajlar ROS 'un kaynağının çoğunu oluşturur<sup>3</sup>. Oksidatif yaralanmanın derecesi antioksidan-oksidan sistem dengesine bağlıdır. Antioksidanların uygulanması yara iyileşmesinde yararlıdır<sup>4,5,6</sup>. Aminoguanidine (AMG) selektif olarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesini inhibe eder ve antioksidan özellikte bir maddedir<sup>7</sup>.

AMG uygulaması, nonsteroid antiinflamatuvar (NSAI) ilaçlara bağlı ülser yaralarında iyileşme üzerinde kolaylaştırıcı etki yapmaktadır<sup>8,9</sup>.

Lipit peroksidasyonun göstergesi olarak malondealdehit (MDA), antioksidan olarak glutatyon (GSH) parametresi kullanılabilir. Total

nitrik oksit (NOx) düzeye bağlı olarak farklı etkilere sahiptir. Lokal formülasyon uygulamaları kontrollü ilaç salınımı ile son zamanlarda önem kazanmaktadır. Bu çalışmada selektif iNOS inhibitörü ve antioksidan özelliği ile AMG'nin lokal formülasyonu ve subkütan (sc) uygulamasının tavşan ağız yara dokusu ve kanda NOx, MDA, GSH düzeylerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Yara İyileşme Süreci**

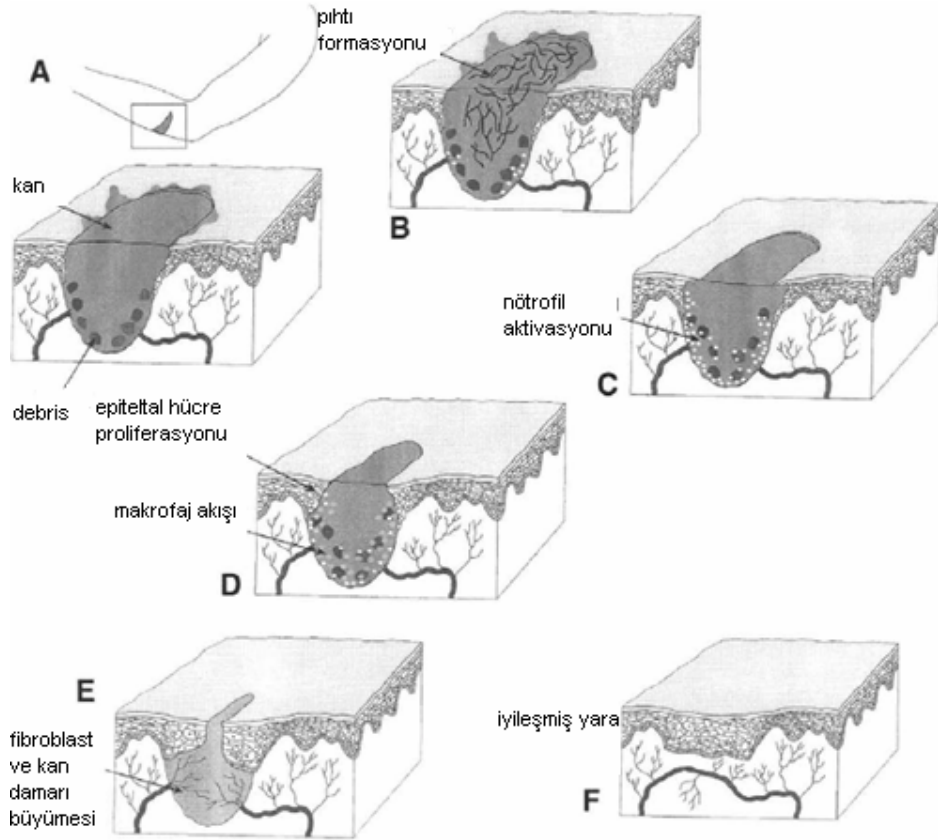
Yaranın kaynağı, travma, fazla sıcak ya da soğuk, inflamasyon, enfeksiyon, metabolik ya da beslenme bozukluğu olabilir.

Yara iyileşmesi; hemostazis, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden modellenme gibi fazların yanı sıra biyokimyasal ve hücresele birçok mekanizmayı da içeren bir süreçtir. Yara iyileşmesi inflamasyon ve angiogeneze bağlıdır. Ayrıca sitokinler ile sıkıca kontrol edilir<sup>2</sup>. Yara iyileşmesi epitelyal, endotelyal, inflamatuvar hücrelerin, trombositlerin ve fibroblastların bir araya gelerek belli bir sıra ve düzen içerisinde fonksiyonlarını yapmalarıyla gerçekleşir<sup>3</sup>.

#### **2.1.1. Yara İyileşmesinde Hücre Tipleri**

Yara iyileşmesi bir dizi safha içerir ve her safhada değişik hücreler vardır. İnflamatuvar cevapta trombositlerin pıhtı oluşturmak için aktive olmasıyla pıhtı formasyonu vazokonstriksiyonu, trombositlerin agregasyonu ve büyüme faktörlerinin savunmasıyla karakterizedir. İnflamatuvar infiltrasyonun erken dönemlerinde, pıhtı formasyonunu ve sıvı kaybını takip eden vazodilatasyon safhası oluşur. İnflamatuvar cevabın sonraki safhası monositlerin infiltrasyonudur. Monositler, makrofajlara differansiye olduktan sonra makrofajlarda, debrisin uzaklaştırılmasına yardımcı olurlar. Böylece infeksiyöz mikroorganizmaları zararsız hale getirirler. Yara çevresinde fibroblastlar kollajeni bölmek, kollajeni ve yaranın tamiri için gerekli diğer yapısal komponentleri oluşturmak için aktive olurlar. Fibroblast proliferasyonu ve migrasyonu ile birlikte yara bölgesine yeni kan ulaşımı da sağlanmalıdır. Bu süreç angiogenesizdir. Endotelyal hücreler hücre sinyali olarak nitrik oksitin bulunuşunda önemlidir. Çünkü bunlar nit-

rik oksit (NO)' e duyarlı reseptöre sahiptir. NO endotelial hücrelerde ve nöronlarda hücre sinyali molekülü olduğu gibi aynı zamanda lökositlerde ki mikrobisidal aktivitede de başlıca rol oynar<sup>10,11</sup>. Şekil 1



Şekil 1 : Yara iyileşmesi ve hücre tipleri. A) Evre: Yaralanma. Hüresel: yara alanında hücrelerin fiziksel olarak ayrılması, yaranın debris ve mikroorganizmalarla kontaminasyonu. Sinyaller: Trombositlerin aktivasyonu, primer immün cevap. B) Evre: Pıhtılaşmaya bağlı olarak kan kaybında durma. Hüresel: Kan yara alanını doldurur, kan pıhtısı oluşturur ve ileri kan kaybını hafifletmek için çevre kan damarlarında vazokonstriksiyon meydana gelir. Sinyal: Sinyaller spesifik bir yerde yaralanma olduğunu belirterek çevre endotelyuma gönderilir. Nötrofiller hızla sirkülasyonu terk ederler ve yaralanma alanına geçerler. C) Evre: Nötrofil aktivasyonu. Hüresel: Nötrofiller hızla yara alanına hareket ederler, mikrobisidal aktiviteye ve debrisin uzaklaştırılmasına olanak tanımak için selüler mekanizmalarını başlatırlar. Sinyaller: Primer kan kaybı kontrol altına alındığında vazokonstriksiyon zayıflar. Nötrofiller görevlerini tamamladıklarında dolaşımdaki monositler yara alanına ulaşır ve makrofajlara dönüşmek için diferansiye olurlar ve immün cevabın sonraki evresine başlarlar. D) Evre: Makrofaj infiltrasyonu. Hüresel: makrofajlar nötrofillerden sayıca fazla hale gelmeye başlarlar, fibroblastlar yara alanına hareket ederler ve epitelyal hücreler kan pıhtısının üzerinde fakat yara kabuğunu altında yüzeyi direkt olarak kapatmak için hızla büyürler. Sinyal : Fibroblastlar tamir için gerekli yapısal komponentleri üretirler. Endotelyum hücreleri yaralanma alanında yeni kan desteğine izin vermek için angiogenezi başlatırlar. Epitelyum ve keratinositler dış derideki yeni yüzeyi oluştururlar. E) Evre: Fibroblast proliferasyonu: Hüresel: Fibroblastlar yara alanına doğru hareket ederler, epitelyal hücreler yaranın dış tabakaşını kaplarlar ve angiogenezisle yeni kan damarlarının oluşur. Sinyaller: Fibroblast büyüme faktörü, vasküler doku aktivitesi gelişir ve epitelyal hücreler yüzeyin üzerine doğru büyür. F) Evre: İsinin sona ermesi: hüresel: Alan oksijenlenir, lökositler artık yoktur, kollajenin polimerizasyonu tamamlanırken alanın uzunluğu artar. Sinyaller: Hücre-hücre sinyalleri artık komşu bölgelerle aynıdır<sup>10</sup>.

### **2.1.2. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Hücrelerin Fonksiyonları:**

1. Fagositoz: Fagositozda görev alan polimorf nüveli lökositler ve makrofajlar primer fagositik hücrelerdir.

2. Kemotaksis: Hücrelerin kimyasal maddeye doğru göçüdür. İnflamatuvar hücreleri, fibroblastları ve angiogenezde rol oynayan hücreleri etkileyen kemotaktik ajanlar iyileşme olayına katkıda bulunurlar.

3. Mitogenez: Mitogenezi uyaran ajanlar yara iyileşmesi için gerekli hücre bölünmesini sağlar.

4. Kollajen sentezi: Esas olarak fibroblastlarca sentezlenen protein ve glikoproteinler; kollajen ve ara maddeyi oluşturarak yara iyileşmesinde kritik bir noktanın tamamlanmasını sağlar.

5. Diğer matriks komponentlerinin sentezi: Yara kontraksiyonu, skar formasyonu ve remodelling yara iyileşmesinin son basamaklarını oluştururlar.

Bu hücresel aktiviteler gelişmiş güzel değil düzenli ve uyumlu bir şekilde sürerler<sup>12,13</sup>.

İyileşen bir yara her zaman için doğal bir olay olarak değerlendirilir. Bir takım filojenetik sıralamalarda alt sıralarda yer alan hayvanların kaybolan uzuvlarını tamamen rejenerasyonla yerine koydukları bilinmesine karşın, insanlarda uzuv rejenerasyonu yoktur. Ancak çeşitli dokuların iyileşmesiyle gerçekleşen rejenerasyon söz konusudur. Epidermis, sindirim sistemi epiteli, trakeobronşial epitel, karaciğer ve kemik bu tipte rejenerasyon gösteren dokulara örnek gösterilebilir<sup>14</sup>.

Kısmi deri kesi yaralarının iyileşmesi; yarayı onarmak için epitelyal hücrelerin migrasyonu ve mitoz yolu ile epitelyal hücre yüzeyinin rejenerasyonu sayesinde olmaktadır. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda, yara epitelizasyonunun epidermal büyüme faktörü ile arttırıldığı gösterilmiştir<sup>1, 15-17</sup>.

#### 2.1.2.1.Hemostazis

Yaralanmada organizmanın birinci önceliği kanamanın kontrolüdür. Bu amaçla öncelikle fibrin oluşturulur. Zarar görmüş dokunun onarımı yani yara iyileşmesi hayatta kalmada kritik olan biyolojik bir cevaptır. Ağız mukozasının iyileşmesi; diğer dokulardaki yara büzülmesi ve doku yenilenmesine ait hemostazis, pıhtı teşekkülü ve iltihaplanmadan önce aşılan safhalarla aynı genel kalıbı izler. Bununla birlikte, ağız mukozasındaki yaralarının iyileşmesi deri yaralarının iyileştirilmesinden daha hızlıdır<sup>18</sup>.

Çağdaş'ın ifadesine göre yara iyileşmesinde farklı bağ dokusu birikimi, epitelizasyon ve kontraksiyon vardır. Bu süreçlerden her birinin katkısı yaranın tipine ve doku hasarına göre değişir. İyileşme süreci karışık hücresel ve ekstraselüler matriks bileşenleri ile birlikte doku hasarına karşı gelişen organize bir cevaptır<sup>14</sup>.

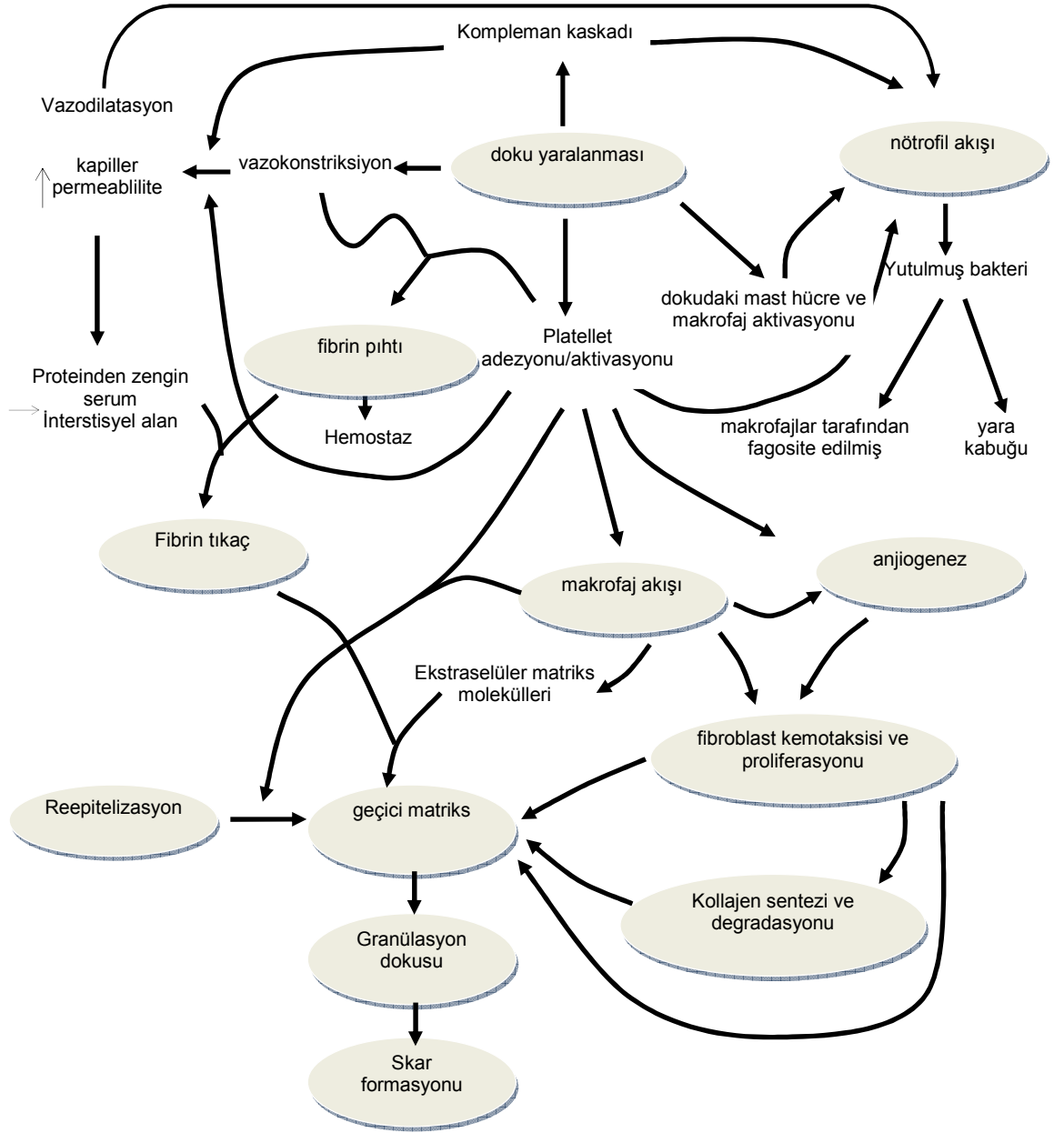
#### 2.1.2.2. İnflamasyon

İnflamasyon ve özellikle makrofajlar yara iyileşmesinde kritik bir rol oynarlar. Vazoaktif, kemotaktik, proliferatif ve diğer faktörler değişik inflamatuvar yollardan (örneğin kininler ve kompleman kaskadı) ve aktive hücrelerden (örneğin trombositler ve makrofajlar) üretilirler. Bu faktörler kemotaksisin uyarılmasında ve fibroblastların endotelial ve diğer hücrelerin proliferasyonunda aktiftirler<sup>19</sup>.

### 2.1.2.3. Yaralanma karşısındaki damar cevabı:

Normal koşullarda kesi yapılan yerde lokal mikro-dolaşımda vazokonstriksiyon meydana gelir. Trombositler hasarlı kollajen ve diğer debris dokusuyla temas edince bir araya gelerek degranüle olurlar. Salınan alfa granüller hem pıhtılaşmayı etkileyen faktörleri hem de güçlü polipeptid büyüme faktörlerini içerirler<sup>20</sup>. Pıhtılaşma olayını meydana getirmek için trombositler açığa çıkan kollajene bağlanırlar ve trombinle işbirliği yaparlar. Sonuçta meydana gelen kan pıhtısı doku yapıştırıcısı olarak etki gösterir ve sonraki olaylar için adeta bir kalıp ya da çerçeve ödevini görür<sup>21</sup>. Fibrinin depolanması ve polimerizasyonu gerçekleşirken bir yandan da trombositlerin agregasyonu devam eder; böylece pıhtı oluşur. Bu trombus yara iyileşmesi için bir omurga teşkil eder. Ayrıca enflamatuvar hücrelerin yapışması ve yara alanına göç etmesi için bir substrat görevi yapar<sup>22</sup>. Şekil 2 de Fibrin oluşumunun yara iyileşmesinin enflamatuvar ve tamir fazındaki rolü şematize edilmiştir<sup>23</sup>.

30. dakikadaki mast hücrelerinden açığa çıkan histaminin etkisiyle aktif damar genişlemesine bağlı geçirgenlik artar. Endotel hücreleri histaminin ve damarlar üzerinde etkili diğer maddelerin muhtemel etkisiyle yuvarlaklaşarak birbirlerinden ayrılırlar. Endotel hücrelerinin bazal membranları açıkta kalır ve plazma sızmaya başlar. İltihabi reaksiyonda granüositlerin damar dışına çıktığı daha geç dönemde kallikrein sistemi ve prostaglandinler mikrodamarlardaki genişleme ve geçirgenlik üzerinde devamlı kendini gösteren bir etkiye sahiplerdir. Proteolitik enzimlerin açığa çıkması küçük damarların bütünlüğünü daha da bozar. Lenf damarları kan damarlarına oranla daha kolay zedelenebilirler. Fibrin lenf damarlarını tıkayarak yaralanma bölgesinden olan lenf boşalımını engeller ve iltihabi olayın yerel kalmasına yol açar. Fibrini yıkan enzimler tıkalı lenf damarlarını tekrar açacaklardır<sup>12,22</sup>.



**Şekil 2. Fibrin tıkaç formasyonu, yara iyileşmesinin enflamatuar ve tamir fazı<sup>23</sup>**

#### 2.1.2.4. Angiogenesisiz ve matriks deposizyonu (çökmesi)

Zedelenmeden 4 gün sonra anlamlı angiogenesisiz ve matriks ve matriks deposizyonu (çökmesi) gözlenir. Angiogenesisiz dokuda granüler görünüşlü yeni kapiller mevcuttur. Fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF<sub>2</sub>) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ilerleyen angiogenesisizin yara bölgesinde salınmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri (ROS), FGF<sub>2</sub>'nin reseptöre karşı affinitesini artırır ve ekspresyonuna neden olur. Sen ve arkadaşları keratonosit ve kutanöz yara iyileşmesi sırasında Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'nin mikromolar konsantrasyonun VEGF ekspresyonuna neden olduğunu bulmuşlardır<sup>24</sup>.

Fibroblastlar tarafından üretilen yapı moleküllerinin üretildiği geçici matriks granülasyon dokusunun oluşumu için destek sağlar. Geçici matriks yerine fibroblast aktivasyonu ile çapraz bağlı kollejen matriks gelmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kollajen I, II, III ve IV formasyonu ve sonradan oluşacak çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır. Fibroblast sentezi ve kollejenden zengin matriks değişimi kadar bu fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümü de yara küçülmesine neden olmaktadır. ROS, fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü sağlayarak yara kontraksiyonuna yardım etmektedir. Bu yara kontraksiyonu yara kenarlarının küçülmesi ile daha hızlı reepitelizasyonu sağlanmaktadır<sup>24</sup>. Yara iyileşme süreci şekil 3'te şematize edilmiştir.

#### 2.1.2.5. Yaralanma karşısındaki hücre cevabı:

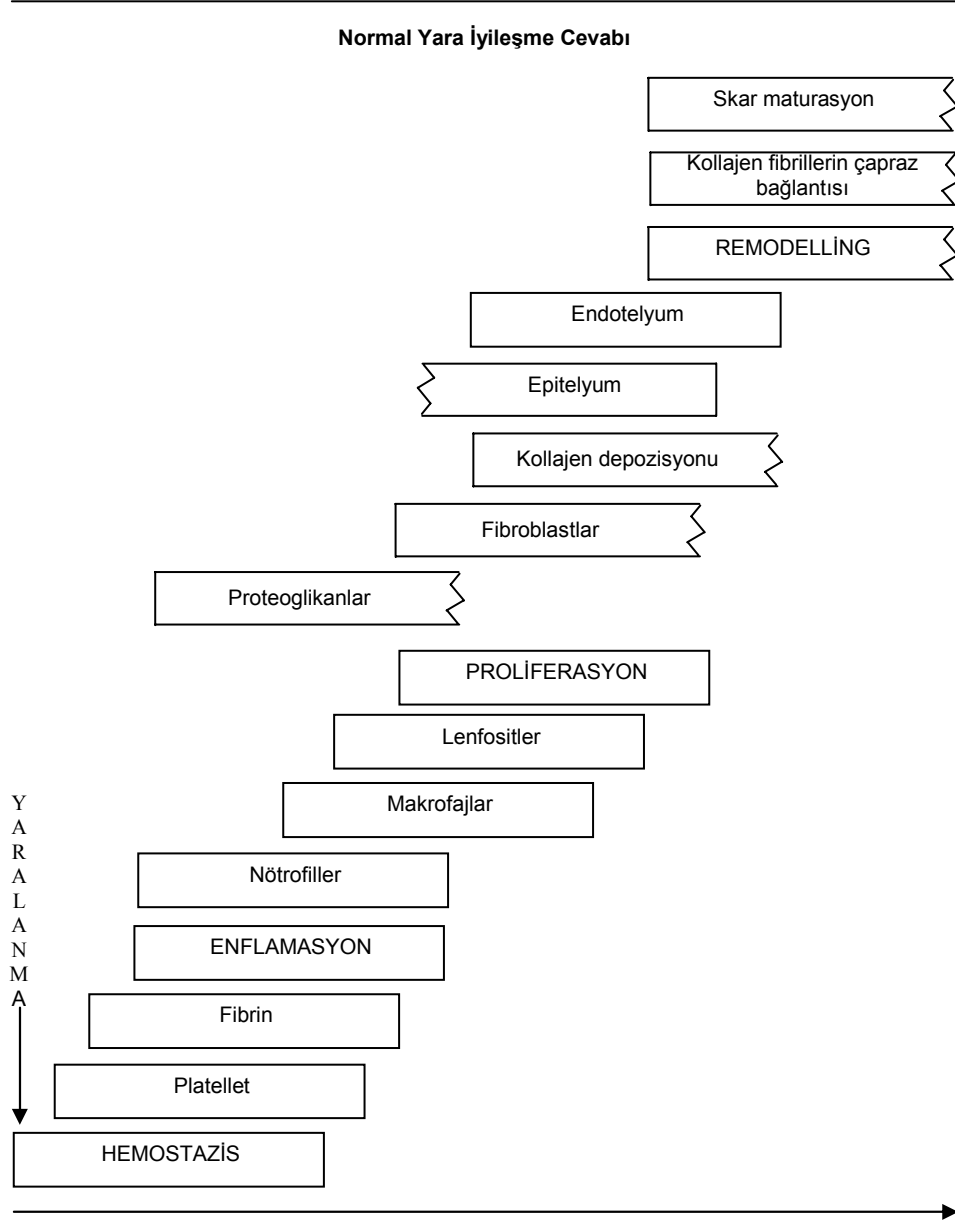
Çağdaş'a göre pıhtı oluşumunu takiben, sekonder vazodilatasyon ve kapiller permeabilitede artış başlar, böylece akut enflamasyon başlayarak nötrofiller yara bölgesine girer<sup>14</sup>. Bu hücreleri yaraya çeken faktörlerden C5a, prostaglandin E1 ve E2 ile fibrin başlıcalarıdır. Nötrofil infiltrasyonu yaralanmadan sonra, takriben 24 saatte

pik yapar ve monositler yaraya ulaşırken n6trofiller de yavaşça geri çekilir. Dolaşımdaki monositler, makrofajlara d6n6şür<sup>25</sup>. Wind'e g6re makrofajların 6mrü polimorf n6velilerden daha uzun olduğu için 6üncü günden sonra yarada ortama hakim olan makrofajlar, nekrotik dokuları ve yabancı maddeleri ortadan kaldırırlar. Ayrıca fibroblastları o bölgeye ekerler. Fibroblastlar yaralanmadan sonraki ilk 24 saatte görölürler ve muhtemelen fibronektin aracılığı ile fibrine veya kollajene bağlanırlar. Endotel hücreleri yaralanma bölgesine fibroblastlardan hemen sonra göç ederler. Yaygın kılcal damar alanı meydana gelir. İlerleyen kılcal damarlar oksijen basıncının düşük olduğu bölgelere doğru giderler<sup>12</sup>.

#### 2.1.2.6. Tamir ve yenilenme fazı (proliferasyon)

İmmün sistem hücreleri ve onların ürünleri (sitokin ve büyüme faktörleri) yara iyileşmesinin özellikle angiogenezis ve proliferatif fazında etkilidir. Fibroblastlar endotel hücrelerin kaynağı olarak angiogenezis sürecinde neovaskülarizasyonu oluştururlar.

Fibroblastlar granölasyon dokusunun oluşumunda kritik hücrelerdir. Fibroblastlar sadece kollajeni değil aynı zamanda yara remodelinginde önemli olan elastini, fibronektini, sülfatlanmış yada sülfatlanmamışları ve kollejenaz gibi proteazları üretirler<sup>19</sup>.



**Şekil 3. Normal yara iyileşme cevabı<sup>26</sup>**

Yaralanmadan hemen sonra fibroblastlar ve perivasküler mezenşimal hücreler fenotip olarak farklı olan myofibroblastlara perivasküler olarak differansiye olurlar. Bu hücrenin migrasyonu ve proliferasyonu büyük oranda konağın kemotaktik ve büyüme faktörleri (GF) tarafından yönlendirilir. Fibronektin sadece kemoatraktan olarak değil, aynı zaman da fibrinle çapraz bağlandığında miyofibroblastın üzerine göç edebileceği ve daha sonra kollajeni sentezleyebileceği adheziv bir iskele olarak rol alır<sup>19</sup>.

Çağdaş'a göre yaranın derinliklerine göç eden fibroblastlar başta kollajen olmak üzere bağ dokusu sentezine başlar. Nedbe dokusu oluşumunun bu devri fibroplazi olarak bilinir<sup>14</sup>.

Janquira'ya göre nekrotik doku ve debris temizlendikçe fibroblastların çoğalması ve göç etmesi de kolaylaşır. Göç eden epitel hücreleri ve fibroblastlar debrisyle temasa geçtiğinde kollajeni yıkan bir enzim olan kollajenazı meydana getirirler. Yaralanma sonrası yaklaşık 3-4 günde başlayan fibroblast infiltrasyonu ve proliferasyonu barizdir. İyileşme olayında yaraya fibroblastların girişi çok önemlidir, çünkü bu hücreler tamir dokusunun primer yapısal bileşeni olan kollajeni sentezlerler<sup>18</sup>.

Wind'e göre bundan sonraki iki-dört hafta boyunca kollajen oluşumu hızla artar. Bu dönemde oluşan fazla kollajen bir çeşit iyileşme köprüsüdür. Bu dönemin sonunda fibroblast sayısı azalmaya başlar. Buna paralel olarak kollajen sentez hızı da düşer. Kılcal damar ağı da az sayıda ancak belirgin bir sistem halini almış damarlara dönüşür. Dördüncü haftada yapım ve yıkım olayları arasında bir denge kurulmuş durumdadır<sup>12</sup>.

#### 2.1.2.7. Kollajen sentezi ve olgunlaşması

Çağdaş'a göre fibroblastların farklılaşmasına ve kollajen sentezinin başlamasına yol açan uyarının ne olduğu bilinmemektedir. Kollajen

moleküllerin mekanik özellikleri nedbe dokusunun kuvvet ve sertliğinden sorumlu olan karmaşık bir heliks yapısına sahiptir<sup>14</sup>.

Halkerston'a göre kollajendeki amino asitlerin dizilimi benzeri olmayan, kendine özgü bir şekildedir; %33'ünü glisin, %10'unu prolin, %10'unu hidroksprolin ve %1'ini de hidrosilizin oluşturur. Kollajen yapısındaki esas birim tropokollajendir<sup>27</sup>.

Orten'e göre tropokollajenin prolinden zengin zincirleri helikal bir yapı oluştururlar, bu yapı alfa heliksten oldukça farklıdır, örneğin; helikal yapı daha açıktır, ayrıca zincir içi peptid hidrojen bağları olmadığı gibi, heliks saat yönünün tersinedir<sup>28</sup>.

Halkerston'a göre tropokollajenin üç alfa zinciri birbiri etrafında saat yönünde, yaklaşık olarak her üç amino asitte bir kıvrım yapar. Tropokollajendeki üç helikal zincirin birbirine yakınlığını yüksek glisin içeriği sağlar. Bu bölgedeki iplikçiklerin her biri başlangıçta hem N terminal ucunda hem de C terminal ucunda non-helikal bölgelere sahiptir. Bu bölgeler helikal iplikçiklerin hücreden salgılanmasından sonra matür kollajen formasyonu sırasında hidrolize olurlar<sup>27</sup>.

Çağdaş'a göre yaranın gerilme kuvveti fibroplazi devrinde hızla artar ve bu artış kollajen senteziyle orantılı bir şekilde yükselir. Yeterli miktarda kollajen üretildiğinde yaradaki fibroblast sayısı azalır. Fibroblastların kaybolması; fibroblastik fazın sona erdiğini ve olgunlaşma fazının başladığını gösterir<sup>14</sup>.

Halkerston'a göre tropokollajen heliksleri arasındaki intermoleküler çapraz bağlar kollajenin yavaş olgunlaşması sırasında kayda değer bir sürede oluşur. Kollajenin gerilme direncinin bir kısmını disülfid bağı olmayan bu çapraz bağlar sağlar. Çeşitli tiplerde çapraz bağlar oluşur. Fakat bir tek enzimatik reaksiyon söz konusudur. Bu reaksiyon lizil ve hidrosilizil residüllerinin aldehit oluşturmak üzere oksidatif

deaminasyonudur. Enzim lizil oksidazdır. Reaksiyonun oksijen ve bakıra ihtiyacı vardır<sup>27</sup>.

#### 2.1.2.8. Remodeling (Yeniden Şekillenme)

Hücre ile ekstrasellülerin matriksin (ECM) ilişkide olması organizmada normal gelişim ve fonksiyonun sürdürülmesi için gereklidir. Matriks Metalloproteinazlar (MMPs) hücre-matriks yapısını düzenleyen başlıca enzim grubudur. ECM yapısının bileşimi ve ilişkisini düzenleyen bu enzim sistemleri matriks moleküllerinin hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve hücre ölümünün düzenlenmesinde başlıca rolü oynarlar. MMPs çinko bağımlı endopeptidazlar olarak bilinen ECM yapılarının birini yada bir çoğunu hatta matriks proteini olmayanlarını bile ayırma özelliğine sahiptir. MMPs embriyogenez, yara iyileşmesi enflamasyon, artrit, kardiyovasküler, pulmoner hastalıklar ve kanser gibi normal ve anormal süreçlerde rol alırlar<sup>29</sup>.

Remodeling evrede gerçekleşen temel olay kollajenin dinamik “yeniden modellenmesi” ve “matür skar” oluşmasıdır. Aslında yaralar da dahil tüm dokularda kollajenin birikimi kollajenolitik aktivite ile kollajen sentezi arasındaki dengeye bağlıdır. Yapım ve yıkım birlikte giden birbirine zıt olaylardır. Yaralanmadan 20 yıl sonra bile yaralar da kollajenolitik aktivite de artış tespit edilmiştir<sup>28</sup>.

Bu arada unutulmaması gereken konu, yara iyileşmesinin fazlarının, biri bitip biri başlar tarzda; kesin sınırlarla ayrılmış olarak gelişmeyip olayların hep içiçe geçmiş şekilde seyretmesidir. Yara iyileşmesinin bazı evrelerinde değişken faktörlerin her birine faydalı girişimle müdahale edilebilir. Örneğin enflamatuvar cevabı uzatabilecek enfeksiyon ve debrisle mücadele etmek, debridmana yönelmek, fibroplazi fazını kısaltmak amacıyla açık yarayı kapatmak, kontraktürleri önlemek için iyileşme-

nin bir an önce gelişebilmesini sağlamak açısından yapılabilecek en yararlı işlemlerdir<sup>14</sup>.

Yeniden modelleme safhası, ECM' nin modellenmesi ve gelişmesi haftalar ve aylar sürer. ECM' nin yapısı değişikçe Tip 3 kollejen ile fibronektin Tip 1 kollejen ile yer değiştirir. Böylece dokunun yara gerimi artar. ECM' nin yeniden modellenmesi ve birinci safhasının tamamlanması, metalloproteinlerin doku inhibitörleri, matriks metalloproteinler ve kollajenler tarafından sıkı şekilde kontrol edilir. Sonunda yaralı bölge yaranmadan önceki direncine yaklaşır<sup>29</sup>.

### 2.1.3. Yara Fizyolojisi

Yaşayan dokunun temel fonksiyonu çoğalma ve kendini tamir etmedir. Çoğalma süreci (embriyogenezis) iyi tanımlanmış homeostatik ortamda oluşur. Organizmanın çoğalabilmesi için bir zamana ihtiyacı vardır. Yara iyileşmesi embriyogenezisi yansıtır. Yara çevresi devamlı olarak değişir. Yabancı madde ile kontamine olur. Mikro organizmalarla enfekte olabilir. Yaralanmada sıvı kaybı yetersiz beslenme ve fiziksel çevrede bulunan diğer faktörleri içeren stresler mevcuttur. Yara çevresi aneorobik hale gelir. Anaerobik alan daha sonra aerobik olursa kollajen sentezi ve yeni kan damarlarının formasyonu hızlanır. Kronik yara iyileşmesi aslında ortamdaki oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Hiperbarik oksijen tedavisi iyileşmeyen yaralarda yardımcı olabilir. Yara kenarındaki epitelyal hücreler neredeyse yaralanmadan hemen sonra proliferasyona başlarlar. Proliferasyonu 4-6 saat içinde epitelyal mitoz, glikojen birikimi ve hücre migrasyonu takip eder. Dermise doğru epitelyal hücrelerin migrasyonu gerçekleşir. Dermisi epidermisten ayıran yeni bazal membran sentezi uyarılır. Bu hücreler granülasyon dokusunu oluştururken, yeni oluşan bazal membrana penetre olmaz. Granülasyon dokusu makrofajların, fibroblastların ve endotelyal hücrelerin karışımını içerir. Bu doku yüksek derecede damarlanmaya sahiptir. Enfeksiyona dirençlidir ve frajildir. Granülasyon dokusu makrofajlarla yer değiştirmiş aktif mikrobisidal nötrofilleri içerir. Uzun bir zaman periyodundan sonra granülasyon dokusu yara kenarlarını bir arada tutan fibroskar dokusuna doğru değişiklik gösterir. Kronik irritasyon ve enfeksiyonda granülasyon dokusu aylarca ya da yıllarca kalabilir<sup>10</sup>.

Fibronektinler hücreleri bir arada tutan adezyonu uyaran en önemli glikoprotein sınıfıdır ve kollajenin uygun deposusyonuna yardımcı olur. Bu da yara iyileşmesini sağlar. ECM 'de fibronektinlere ek olarak, kollajenler, lamininler ve proteoglikanlar, mukopolisakkaritler ve

glikoproteinler aktiftir. Bunların hepsi yara iyileşmesinde rol alırlar. Yara iyileşmesinde asıl dayanıklılık veren kollajendir<sup>10</sup>.

#### 2.1.3.1. Hücre aktivasyonu sitokinler ve hücre adezyonu

Yara iyileşmesi için, öncelikli olarak sitokinler tarafından oluşan ve hücre aktivasyonu ve hücre adezyonu gerektiği görülmüştür. Sinyaller tarafından oluşturulan hücre aktivasyonu sonucunda hücre adezyonunda değişiklik meydana gelmektedir. Sinyallerin bazıları hücrelerle birlikte gelirken, sitokinler olarak adlandırılan hücre farklılaşması ve aktivasyonunda önemli görevi olan küçük peptit araçları da bulunmaktadır.

Hücre aktivasyonu terimi yara iyileşmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Programlı hücre ölümü olan apoptozis, normal fiziksel hücre çoğalması veya hücre farklılaşmasından daha değişiktir. Yara iyileşmesindeki hücre aktivasyonu, hücrenin normal çoğalması yada normal çoğalmasından önce yara bölgesine doğru hareket etmesidir. Bu hücre aktivasyonu ile artık madde veya mikroorganizmaların yara bölgesinden uzaklaştırılması için lifler ve materyal oluşturulması sağlanmaktadır. Bu aktivasyon süreci hücreler arası mesajları içerir. Bu mesajların tamamı bilinmese de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> gibi küçük moleküllerin rol oynadığı bilinmektedir. Sitokinler ve reseptörleri yara iyileşmesi için ideal hücresel iletişim sağlamaktadırlar. Tablo 1’de yara iyileşmesinde büyüme ve sinyal faktörlerini ve rollerini göstermektedir. Büyüme faktörü reseptörleri uzaktaki hücrelerin büyüme faktörü görevini yerine getirmesi için önemlidir. İnsülin bağımlı büyüme faktörünün (IGF) serumda çözülebildiği bilinmektedir. Büyüme faktörlerinin reseptörleri, büyüme faktörlerinin kendileri kadar bu görevleri yerine getirmekte önemlidir<sup>10</sup>.

Daha önce tavşan ağız yara dokusunda yaptığımız bir çalışmada, epidermal büyüme faktör (EGF)’nin titanyum uygulanmış kesi yara-

sındaki etkisini araştırdık. Alınan doku örneklerinde, EGF'nin lokal uygulamasının yara iyileşmesini hızlandırdığı tesbit edildi<sup>1</sup>.

Hücrelerin, yara iyileşmesinde adezyon sistemleri geçmişte bir çok araştırmada incelenmiştir. Endotel hücrelerin, sitokinler, tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), interk $\alpha$ kin-1 (IL-1), bakteriyel lipopolisakkaritler ile uyarılması, lökosit adhezyon ve migrasyonu yolu ile sonuçlanır. Endotel hücreler yüzey proteinlerin ekspresyonu ile adezyonu uyarır. Bunlar selektinler (E ve P selektinler), interselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1) olarak isimlendirilirler. Stimüle adezyon moleküllerinin salınımı E selektin, ICAM-1, VCAM-1 tarafından değiştirilir. Kronik enflamasyonlarda daha uzun süre salınır. Adezyon molekülleri hücreler arasında direk temas sağlayacak ekstrasellüler yapı komponentleri ile desteklenmiştir. Adezyon moleküllerine iyileşme bölgesine önemli hücrelerin gelmeleri için ihtiyaç duyulmaktadır<sup>10</sup>.

**Tablo 1: Enflamasyon ve bağlantılı hücre büyüme faktörleri<sup>10</sup>**

Büyüme faktörleri	Kaynaklar	Hedefler
IGF İnsulin bağımlı büyüme faktörleri	Plazma, fibroblast, makrofajlar, keratinositler	Bir çok hücre tipi için mitojenik
TGF- $\alpha$ Transforming büyüme faktör alfa	makrofajlar, keratinositler, trombositler ve fibroblastlar	Keratinositler mitojenik
TNF- $\alpha$ Tümör nekroz faktör	Makrofajlar, lenfositler	Kemotaktik ve angiogenik
EGF Epidermal büyüme faktörü	Epitelyal hücreler	Mitojenik
VEGF Vasküler endothelial büyüme faktörü	Makrofajlar, keratinositler	Anjiogenezisin uyarılması
IL İnterlökinler	Makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler	Çoklu hedef
IF İnterferonlar	Lökositler, fibroblastlar	Virüslere karşı savunmayı uyarır

### 2.1.3.2. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Büyüme faktörleri, hücresel fonksiyonları endokrin, parakrin, otokrin veya introkrin mekanizmalarla sağlar. Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olmasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki çoğunlukla trozin kinaz uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörü bulunur. Büyüme faktörlerinin o bölgedeki konsantrasyonu ve reseptöre bağlanan miktarı, elde edilecek sonucu belirler. Matriks de, büyüme faktörlerinin çözünebilirliğini değiştirerek, hücresel aktiviteleri düzenleyecek faktör konsantrasyonunun değişmesini sağlayabilir. Ayrıca matriks, büyüme faktörlerinin bağlanıp çözülmesini ayarlayarak, ortamdaki faktörler için rezervuar görevi görür. Yine matriks, herhangi bir hücrenin herhangi bir büyüme faktörüne vereceği yanıtı belirleyebilir<sup>13</sup>.

### **2.1.4. Yara İyileşmesi Tipleri**

- Primer yara iyileşmesi
- Gecikmiş primer yara iyileşmesi
- Sekonder yara iyileşmesi
- Yüzeyel yara iyileşmesi olarak sınıflandırabiliriz.

#### 2.1.4.1 Primer yara iyileşmesi:

Oluşan yara 12-24 saat içinde kapandığı zaman meydana gelir (örneğin, temiz cerrahi kesi, temiz yara) yara kenarları, direkt sütür atılarak, doku tutkalı, bantları veya mekanik bir alet kullanılarak yaklaştırılır. İnsizyon, epitelial bazal membranın devamlılığının sadece fokal olarak

bozulmasına ve göreceli olarak daha az epitel ve altındaki konnektif doku hücrelerinin ölümüne neden olur. Sonuç olarak epitel rejenarasyonu, fibrozisi baskılar. Ayrıca iyileşme sürecinin tüm basamakları arasında uygun bir denge olduğundan (hücresel çoğalma, kollajen metabolizması, matiks metalloproteinaz aktivitesi, ekstraselüler matriksin yıkımı dahil), yaralar iyi iyileşir ve tam kapanmaya doğru hızla ilerler<sup>30</sup>.

#### 2.1.4.2. Gecikmiş primer yara iyileşmesi

Kontamine olmuş veya açık bırakılan ancak daha sonra enfeksiyonu engellemek için kapatılan kötü biçimlenmiş yaralarda meydana gelir (örneğin ısırıklar, peritoneal bulaş). Deri ve subkütanöz dokular yapılmadan bırakılmıştır (sütürlar yerleştirilmiş, ancak bağlanmamış olabilir) ve kapanma konak savunmasının (savunma sisteminin) yarayı uzaklaştırmaya yardım etmesinden sonra gerçekleşir.

3-4 gün sonra, fagositler lokal olarak yara bölgesine gelir ve inflamatuvar hücreler, kontaminasyona neden olan bakterileri tahrip ederler. Yara kenarları, birkaç gün gecikmeden sonra bile birbirine yaklaştırılabilir. Kollajen metabolizması, genellikle etkilenmez dolayısıyla yara kapanma sanki hemen olmuş gibi gerim kuvvetini korur<sup>30</sup>.

#### 2.1.4.3. Sekonder yara iyileşmesi

Büyük travmalarda, ağır yanıklarda ve bazı cerrahi işlemlerde (örneğin laporostomi) olduğu gibi, fazla miktarlarda yumuşak doku kayıplarıyla oluşan yaralarda görülür.

Epitel hücrelerin rejenerasyonu yalnız başına orijinal yapıyı tamir edemez. Kollajenle döşenmiş ekstraselüler matriksin birikimini takiben yara kenarlarında içeriye doğru granülasyon dokusu büyür. Böylece açık full-thickness yaralar, yara kasılmasını ve epitelizasyonunu takiben

kapanırlar. Örneğin büyük deri hasarları, altı hafta içerisinde büyük oranda kasılma ile orijinal boyutlarının %5-10 oranında küçülür. Fibroblast ile düz kas hücresi arasında yapısal özelliklere sahip miyofibroblastlar bu tip bir iyileşmede anahtar rol oynadıkları düşünülmektedir. Yaralanmadan yaklaşık üç gün sonra yara içinde görünürler ve onuncu- yirminci günler arasında sayıları maksimum düzeye çıkar. Sekonder yara iyileşmesi yavaştır; istemsiz kasılmalara (özellikle eklemlerde) ve fonksiyonel kısıtlamalara neden olabilir<sup>30</sup>.

#### 2.1.4.4. Yüzeysel yara iyileşmesi

Yüzeysel yanıklarda, split-thickness donör graft bölgelerinde, epitel ve dermisin yüzeysel (papillar) kısmını içeren abrazyonlarda görülür. Hücrelerin bazal tabakası hasarlanmamıştır ve dermal çıkıntılar içerisindeki epitel hücreleri, kıl folikülleri ve sebasöz bezler açıkta kalan dermisin yeniden yapılanmasını sağlarlar. Hücreler, yarayı çevrelemek için bazal tabakadan birbirlerine doğru hareket ederler. İyileşme tamamen epitelizasyonla olur. Anatomik ve fizyolojik restorasyon hemen hemen tamamlanmıştır<sup>30</sup>.

#### **2.1.5. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

Bir çok faktör yara iyileşmesini etkilemektedir. Bunlar lokal ve sistemik faktörler olarak sınıflandırılabilir. Tablo 2 de bu faktörler gösterilmiştir.

##### 2.1.5.1. Lokal faktörler

İskemi, enfeksiyon, cerrahi teknikler, ödem ve yüksek doku basıncı gibi birçok faktör yara iyileşmesini etkilemektedir.

### 2.1.5.2 Sistemik faktörler

Diyabet, vitamin eksikliği, hipotroidizm, Ehler-Danlos sendromu, koagülasyon bozukluğu, yaş, genel travma, ateş, sepsis, karaciğer böbrek hastalıkları, sigara, kortikoid kullanımı, kemoterapi, radyoterapi, siklosporin A, malnürişyon, beslenme bozuklukları yara iyileşmesini etkileyebilecek çeşitli faktörlerdir.

Sistemik faktörlerin immün fonksiyonları ve kollejen üzerinde endojen etkileri olduğu gibi lokal faktörler üzerinde de etkileri vardır. Bunlar yara iyileşmesini geciktirirler<sup>31</sup>.

**Tablo 2: Yara iyileşmesini geciktiren lokal ve sistemik faktörler<sup>30</sup>**

**Yara iyileşmesini engelleyen lokal ve sistemik faktörler**

<b>Lokal</b>	<b>Sistemik</b>
- yetersiz kan miktarı	- ilerlemiş yaş ve genel hareketsizlik
- artmış deri gerilimi	- obezite
- zayıf venöz drenaj	- malnütrisyon
- yabancı cisim ve yabancı cisim reaksiyonları	- protein ve vitamin yetersizliği, (özellikle A ve C) ve/veya eser elementler (örn; Zn)
- deri dökülmesinin varlığı ve/veya yaşayacak durumda olmayan doku	- sistemik malignansi ve ölümcül hastalıklar
- devamlı mikroorganizma varlığı	- herhangi bir sebeple şok (örn; hemoraji, sepsis)
- fazla lokal mobilite	- kemoterapi ve radyoterapi
- alta yatan osteomyelit	- immüsupresan ilaçlar, kortikosteroidler, antikoagülanlar
- enfeksiyon	- periferik vasküler hastalıklar ve vaskülitler
- malign transformasyon (Marjolin's ülser)	- venöz ödem ve lenfödem
	- sistemik hastalıklar(örn; diabetes mellitus, bağ doku hastalıkları, romatid artrit, metabolik hastalıklar)
	- konjenital ya da kazanılmış spinal kord patolojilerine sekonder olarak nöropati, lepra
	- kalıtsal nötrofil bozuklukları (örn; lökosit adezyon yetmezliği)
	- bozulmuş makrofaj aktivitesi (malokoplaki)

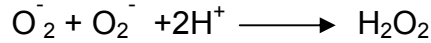
## 2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem

### 2.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Aerobik canlılarda önemli derişim ve çeşitlilikte radikal üretimi ve yüksek derişimde nitrik oksid sentezi vardır. Nitrik Oksit (NO), oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı “oksidan stres” diye adlandırılır. Oksidatif hasar süperoksitten kaynaklanan radikaller ile NO'in reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır<sup>32</sup>.

#### Süperoksitler

Aerobik canlılarda süper oksitlerin hidrojen peroksiter ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süper oksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir<sup>32</sup>.

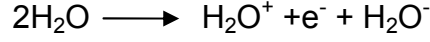


#### Hidrojen Peroksit

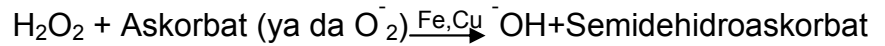
Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektrona indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'in pKsı 10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz. Biyolojik zarları kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, bakır, demir gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin ( <sup>-</sup>OH ) öncülü olarak davranmasıdır<sup>32</sup>.

<sup>-</sup>OH radikali organizmada iki şekilde oluşur.

1-İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması,



2-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'in eksik indirgenmesi ile gerçekleşir.



Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile ne kadar  $\text{OH}^-$  oluşacağı, vücutta üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır.

Radikalik tepkimeler zincirleme tepkimelerdir. Bir tek  $\text{OH}^-$  ile başlatılan tepkime, her seferinde katlanarak yayılma yeteneğine sahiptir. Hücre zarında gerçekleşebilen bu tür tepkimelere lipit peroksidasyonu denir.

Nükleik asitler, proteinler ve lipitlerde başlatılan radikale bağlı tepkimelerde binlerce farklı ara ürün oluşabilir. DNA tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecede ki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olduğundan, proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hücre zarı su içermediğinden  $\text{OH}^-$ 'in başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir<sup>32</sup>.

### 2.2.2. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri

Serbest radikaller, özellikle antioksidanlarla dengelenmediği bazı durumlarda organizma için zararlı olabilmektedir. Oksijen toksisitesinin kimyasal mekanizmasında en popüler teori hücre içinde

oluşmuş  $O_2$  radikalleri ve kimyasal olarak aktif diğer oksijen metabolitlerinin oluşturduğu hücre hasarıdır. Serbest radikaller sayılan reaksiyonların ya hepsini ya da bir kısmını kapsarlar:

1. Diğer molekülleri ayırt etmeksizin atake eder.
2. Oksijen tüketimi zincir reaksiyonunu başlatır. Örneğin; tek serbest radikalın çok sayıda diğer molekülleri hasarlandırması gibi.
3. Yapısal proteinler, enzim ve DNA benzeri moleküllerde rastgele çapraz bağ ve fragmentasyona neden olur<sup>33</sup>.

Reaktif oksijen türleri (ROS) en önemli hasarı lipidler üzerinde yapar. Poliansatüre yağ asitleri serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır. Yağ asitlerinin oksitlenmeye başlamasıyla birlikte bir dizi reaksiyon sonucunda lipid peroksidasyon ürünleri meydana gelir. Lipid peoksidasyonun son ürünü ise malondialdehittir (MDA)<sup>34</sup>.

### **2.3. Antioksidan Savunma Sistemi**

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen süpürerek lipit peroksidasyonu inhibe ederler<sup>31</sup>.

Oksidanların zararlı etkileri antioksidanlar tarafından azaltılır. Antioksidanlar; oksidanları engellemeden önce canlı biyolojik hedefler ile reaksiyona girerler, zincir reaksiyonlarını ve oksijenin yüksek reaktif ürünler oluşturmasını önlerler<sup>33</sup>.

Hücreler oksidatif harabiyeti önleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalara sahiptirler. Antioksidan savunmanın önemli bir kesimini süperoksit ve  $H_2O_2$  temizleyen spesifik enzimler

oluşturur. Bunlar SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peoksidaz (GSH-Px) enzimleridir<sup>35 - 37</sup>

Canlıların yaşamı için glutatyonun redükte olan şeklinin (GSH) yüksek ve okside olan şeklinin (GSSG) ise düşük konsantrasyonda olması gerekir. GSH serbest radikaller için proteinlerin sülfidril gruplarına göre daha fazla serbestlenen bir substrattır. Böylece proteinlerin sülfidril gruplarının oksidasyonu önlenir<sup>38,39</sup>.

Glutatyon, glutatyon peroksidaz için redükte formunu oluşumunda bir substrat gibi kullanılır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipid peroksitleri inaktive eder ve radikal zincir reaksiyonların oluşumunu önler<sup>9,40</sup>.

### 2.3.1. Yara İyileşmesi Tedavisinde Antioksidanlar

Çeşitli düşük molekül ağırlıklı moleküllerin derideki yara iyileşmesinin düzenlenmesinde etkili olduğu belirtilmiştir. Bunlar, endojen molekülleri, glutatyon, ubiquinon, ürik asid ve lipoik asidi içerir. Bunun yanında E ve C vitaminleri karotinoidler fenolik bileşimler de bulunmaktadır. Yara içerisinde bu antioksidanların görev olarak önemi derideki yara iyileşmesinde düzeylerinin azalmasıdır. Örneğin normal doku ile karşılaştığında yara dokusunda vitamin E, askorbit ve glutatyon düzeyinin %60-70 azaldığı görülmüştür. Normal düzeylerine dönüş ise glutatyon için 14 günü bulmuştur. İlginç olarak genç farelerle kıyaslandığında yaşlı farelerde vitamin E ve glutatyon seviyeleri daha fazla düşmüştür. Bu yaşlı farelerde yaranın iyileşmesinin gecikmesi ile uyumludur. Diyabetik farelerde ise glutatyon düşük seviyededir<sup>24</sup>.

Yüksek oksidatif stres nonenzimatik antioksidanların azalmasına yol açar. Bu etki daha çok akut durumlarda gözlenir. Antioksidanların yaraya eklenmesi hücrelerin oksidatif hasarını önler ve iyileşmeyi arttırır. Cilt iskemisi lökositler tarafından aktive edilen oksidatif stres için uygun bir

modeldir. E vitamini ve taurin yara iyileşmesinde etkilidir. Benzer olarak taurin, kitosan jel oluşumu olup antioksidan olarak kullanılır ve reepitelizasyonu germe kuvvetini ve kollajen üretimini yara içinde uyarır<sup>24</sup>.

Diyabetik yaralarda antioksidanların eklenmesi yara hücrelerini oksidatif stres karşısında korur. Fibroblastlar yüksek glukoz altında büyüdüğünde düşük kontraksiyon kabiliyeti ve büyüme faktörüne karşı direnç oluşturur. Bu da keratinosit artışına ve bu sayede apoptozise uygun bir durum oluşumuna neden olur. Glutasyon fibroblastları yeniden düzenler ve keratinositleri apoptozisten korur. Askorbik asit, selenyum, vitamin E, karotenoid ve Q10 fibroblastlar üzerinde etkilidir<sup>24</sup>.

### 2.3.2. Yara İyileşmesi, Reaktif Oksijen Ürünleri ve Antioksidanlar

ROS olarak adlandırılan, organizmada sürekli olarak fizyolojik ve patolojik süreçte rol alan bu ürünler özellikle antioksidanlarla dengelenmediği bazı durumlarda organizma için zararlı olabilmektedir. ROS yara iyileşme sürecinin tüm basamakları ile ilgilidir. Migrasyon, adhezyon, proliferasyon, neovaskülarizasyon, yeniden modellenme ve apoptozis yara iyileşme sürecinde ROS tarafından modüle edilir. ROS normal yara iyileşmesi sürecinde inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulur ve bu süreçte bütünleyici rol oynar. Ancak ROS yapımının artması iyileşmeyen yaralar ile sonuçlanır. Nötrofiller ve makrofajlar ROS' un kaynağının çoğunu oluşturur<sup>41</sup>. Vasküler bozulma, inflamatuvar yanıt ve anjiojenez süresince reperfüzyon ROS yapımına bağlanabilir. Oksidatif yaralanmanın derecesi antioksidan-oksidan sistem dengesine bağlıdır. Antioksidanların uygulanması yara iyileşmesinde yararlıdır<sup>5,6</sup>.

İskemi ve inflamasyona bağlı doku yaralanmalarında ROS'un aşırı salınımı iyileşme süreci için yıkıcı ve zararlı bir olgudur. Bu yüzden ROS'un temizlenmesi normal yara tamirinde temel adımlardan biridir. Ya-

pılan bir çalışmada periodental yara iyileşmesi boyunca antioksidan enzim aktiviteleri çalışılmıştır. Doku örnekleri, köpeğin birinci küçük azı ile birinci büyük azı dişleri arasından flap kaldırılarak alınmıştır. 3,12,21 ve 30 ncu günde biopsi yapılan bölgelerden diş eti örnekleri ile GSH-Px, CAT ve SOD düzeyleri ölçülmüştür. Bütün enzim aktiviteleri 3.günde normal değerlerin yüzde yüzünden daha fazla artmıştır. 30 günün sonunda SOD aktivitesi normal değerinin altına düşmüş; CAT aktivitesindeki artış ise 21 günden itibaren azalmıştır. GSH-Px da ise 3ncü günden sonra azalmış ve 30 ncu günde normal değerinden de aşağı düşmüştür<sup>38</sup>.

Serbest radikaller de yara iyileşmesinde varlığı gösterilen faktörler arasındadır. SOD anyonu NO ile birleşerek peroksinitriti (ONOO<sup>-</sup>) oluşturmakta bu da lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Tek başına NO lipofilik peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu önlemektedir. SOD bu çerçevede protektif bir etkiye sahiptir<sup>42</sup>.

Vasküler bozulma, inflamatuvar yanıt ve anjiogenez süresince reperfüzyon ROS yapımına bağlanabilir. Oksidatif yaralanmanın derecesi antioksidan-oksidan sistem dengesine bağlıdır. Antioksidanların uygulanması yara iyileşmesinde yararlıdır<sup>6</sup>. Redükte glutatyonu azaltıcı maddelerle muamele edilen gingival fibroblastlar NO ya bağlı olarak hasara uğramaktadırlar. Bu hasar askorbik asit L-sistein gibi antioksidanların verilmesi durumunda azalmaktadır<sup>43</sup>.

### 2.3.3 Oksidatif Stres İle İlgili Sitokinler, Büyüme Faktörleri Ve İyileşme

Büyüme faktörleri ve sitokinler yara iyileşmesi sırasında diferansiyasyon ve hücre çoğalması fazında yer alırlar. Örneğin Dönüştürücü büyüme faktör alfa (TGF-  $\alpha$ / Transforming Growth Factor) membrana bağlı peptid olarak sentez edilir ve büyüme faktörleri olarak rol

alır. Sitokinlerin sentezi ve salınımı büyüme faktör F aktivitesinde etkilidir. Her sitokin bir reseptöre sahip olmalıdır. Ayrıca hem growth faktör de hem de reseptörü aktif olmalıdır. TGF- $\beta$  serine/threonin üzerinden sinyal mekanizmasında rol oynar. VEGF, kapiller yatağın rejenerasyonu için endotel hücreler proliferasyon için kritik rol oynar. TNF- $\alpha$  hücre ölümü, apoptozis, DNA fragmentasyonu, lipid peroksidasyonu ve mitokondrial elektron transportunun inhibisyonunu etkiler. IGF endogen asetil kolin regülasyonunda da görevlidir. EGF differansiyasyon ve hücre proliferasyonunda da rol oynar. Kültürde EGF eklenmesi apoptosiz başlangıcını önler.

IL-1 hücre proliferasyonu ve yara iyileşmesinde protein kinaz C (PKC) üzerinden etkilidir. T hücre aktivasyonunda rol alır.

İnterferonlar viral ve parazitik enfeksiyonlara karşı defansta rol alan polipeptit grubudur. Bunlar viral enfeksiyonlara karşı konağın immün sistemini uyarır. İnterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) uyarılabilir iNOS üretimini aktive eder<sup>8</sup>.

#### **2.4. Nitrik Oksit**

NO, 1987'deki biyolojik tanımlanışından sonra yoğun ilgi konusu olmuştur. NO birçok biyolojik sistemde kritik bir mediatör olarak tanınmaktadır. Bir "Hizmetçi" rolü vardır<sup>44,45</sup>.

NO küçük, difüze olabilen ve NOS olarak adlandırılan enzimler aracılığı ile L-argininden sentezlenen serbest radikaldir. Makrofaj, lenfosit, nötrofil ve monositlerde iNOS fonksiyonuna bağlı olarak yoğun miktarda yapılmaktadır<sup>46</sup>.

Yapılan çalışmalarda, organizmada bir çok fizyolojik ve fizyopatolojik olayların regülasyonunda NO'un önemli rolleri üstlendiği görülmüştür. Moleküler yapısının küçük olması nedeniyle NO ideal bir intersellüler ve transellüler aracı moleküldür<sup>44,45</sup>.

## 2.4.1. NO yapımı, NOS izoenzimleri ve Fonksiyonları

### 2.4.1.1.Nitrik oksitin fonksiyonları:

Damar düz kas tonusunu düzenler. Trombosit kümelenmesini inhibe eder. Bir nörotransmitterdir. Enfeksiyonla savaşta yararlı olabilecek sitotoksik rolleri vardır. İmmunomodülatördür. Lenfosit fonksiyonu regülasyonun da görevlidir<sup>44,45</sup>.

NO molekülü pikomolar düzeylerde yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS) ile fizyolojik ve koruyucu etki gösterir.

NO, fizyolojik şartlarda mukus salgısını ve epitelyal hücrelerde sıvı sekresyonunu artırarak bakterilere, toksinlere ve safra tuzları gibi irriyan maddelere karşı koruyucu etki gösterir.

Endotel kaynaklı NO farklı organlarda kan basıncı, kan akımı ve vasküler tonusun fizyolojik olarak düzenlenmesinde rol oynar.

NO nanomolar düzeylerde iNOS üzerinden proinflatuar ve hasar oluşturunca etkiler gösterir.

Oksidatif stres altında NO'nun apoptozisi, sitotoksisiteyi, mutagenezisi ve DNA hasarını arttırıcı etkisi vardır.

Ayrıca NO demir sülfür içeren enzimlerin fonksiyonunu değiştirir, mitokondrial solunumu bozucu zararlı etkiler gösterir.

NO'nun süperoksit reaksiyonu peroksinitrit üzerinden hidroksil ve nitrojen dioksit radikallerini oluşturur.

Oluşan peroksinitrit hücrede nükleer bir enzim olan poli ADP riboz sentazı (PARS) aktive eder. PARS enzimi nikotinamid adenin

dinukleotidi substrat olarak kullanır. Sonuçta bu olay ATP tüketimine ve hücrenin ölümüne yol açabilir.

NO, kararsız bir molekül olması nedeniyle daha kararlı ancak inaktif yapıdaki nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitratlara ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüşür<sup>47</sup>. Bunlar sıvı fazda olup serum ve idrarda NO yapımının göstergesi olarak kısmen kullanılabilirler<sup>44,48</sup>. Hemoglobinin olmayan doku kültüründe esas stabil biyoreaksiyon ürünü nitrittir<sup>47</sup>.

Yapılan çalışmalar organizmada bir çok fizyolojik ve fizyopatolojik olayların regülasyonunda NO'un önemli roller üstlendiği yönündedir.

#### 2.4.1.2. NO Sentezi Yapılabilen Hücreler

Makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri, noradrenarjik kolinerjik inhibitör nöronlar, fibroblastlar, düz kas hücreleri, endotel ve epitel hücreleri NO sentezi yapabilirler.

NO izoformları

NO'nun 3 izoformu vardır.

- Neutral NO
- Nitrosonium katyonu
- Nitrosonium anyonu<sup>44,45</sup>

NO *invivo* koşullarda NOS enzimi aracılığı ile sentez edilir. Değişik izoformları olan NOS enzimi yarı esansiyel bir amino asit olan L-arginin'in 1 veya 2 terminal guanido gruplarının oksidasyonu ile L-citruline katalize edilirken NO sentezlenir. Bu reaksiyonda  $\text{O}_2$  ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADPH) kosubstrat, Tetrahidrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) ve

Flavinoidler (FAD, FMN) ise koenzim olarak rol alırlar. NO unstable bir moleküldür ve kısa sürede daha stable ancak inaktif yapıdaki nitrit ve nitratlara dönüşürler. Bunlar sıvı fazda olup serum ve idrarda NO yapımının göstergesi olarak kısmen kullanılabilirler<sup>44,48</sup>.

Son yıllarda oksijen radikalleri ile özellikle de superoksit anyonu ( $O_2^-$ ) ile olan karşılıklı etkileşimler önemli bir hale gelmiştir. NO ve  $O_2^-$  çok sitotoksik olan  $ONOO^-$  oluşturmak üzere birleşirler. Bu da lipit peroksidasyonuna neden olur; oysa ki NO tek başına, lipofilik peroksil radikalleri ile lipit peroksidasyonunu önlemek için reaksiyona girer. NO ve  $O_2$  nin bire bir olduğu konsantrasyonlar da lipit peroksidasyonu meydana gelirken NO fazlalığı olan durumlarda ise bunun tam tersi bir etki meydana gelir. NO ve  $O_2$  arasındaki reaksiyon çok hızlı bir şekilde meydana gelir. Super oksid anyon yakalayıcısı olan SOD, endotelial hücrelerin ekstrasellüler yüzeyine bağlanır ve böylece endotelial NO oluşumunun kaynağını kapatır, bu da koruyucu mekanizmanın bir örneği olabilir<sup>48</sup>.

#### 2.4.1.3 NOS Enzimleri

nöral NOS (nNOS),

endotelial NOS (eNOS),

indüklenebilir NOS (iNOS) 'dur.

nNOS ve eNOS'a birlikte cNOS denir. iNOS ise uyarılarla indüklenme özelliğine sahiptir. cNOS aktivitesi glukokortikoidlerden etkilenmezken, iNOS indüksiyonu glukokortikoidlerce inhibe edilir. Bununla birlikte iNOS eksprese edildiyse aktivitesi glukokortikoidlerden etkilenmemektedir. Endotoksin ve proinflamatuvar sitokinlerin (bazı interleokinler, TNF ve interferon) iNOS'u indükleyerek NO üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Lipopolisakkaritler ile uyarılan makrofajlarda 2 saat sonra mRNA ve 4 saat sonra iNOS proteini meydana gelmektedir<sup>47</sup>.

Kalsiyum bağımlı olan cNOS, piko molar düzeylerde NO üretir ve daha sonra nNOS ve eNOS tiplerine farklılaşır. nNOS insan beyinde iskelet kasında ve periferik sinir sisteminde geniş olarak dağılım gösterir. Ayrıca fare epidermisinde ve kıl kök kılıfının dışında da bulunur. eNOS ise başlıca dermal endotelial hücrelerde ve bazal keratinositlerin stoplazmasında bulunmaktadır. iNOS ilk olarak kemirgenlerin makrofajlarında bulunmuş, fakat daha sonra bir grup iNOS enziminin, keratinositler ve Langerhans hücrelerinde de bulunduğu gösterilmiştir. iNOS enzimi,  $Ca^{+2}$  bağımsızdır. Buna rağmen kalmodulinin bağlanması çok güçlü bir şekilde gerçekleşir ve  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundan bağımsız gibi görünmektedir. iNOS'un ekspresyonu; dokuya özel bir uyarı ile genellikle inflamatuvar sitokinlerle veya bakteriyel lipopolisakkaritlerle (LPS) başlatılır. Bu cNOS'tan çok daha fazla miktarlarda (nano molar düzeylerde) NO salınımına neden olur ve birçok parazit, bakteri ve tümör hücreleri üzerinde daha güçlü bir sitotoksik etkisi vardır.

Aynı molekülün fizyolojik, homeostatik regülatör ve aynı zamanda potansiyel biosid oluşu ilginçtir. Bu fark NO 'nun değişik konsantrasyonlar da değişik etkileri olması ve NO gibi davranan diğer moleküller yüzündendir.

NO'nun en iyi bilinen biyolojik fonksiyonu hem'e bağlı yolda Guanilat Siklazın aktivasyonuna neden bir sinyal molekülü olarak rol almasıdır. Böylece cGMP seviyesi yükselir ve Ribonukleotid Redüktazın inhibisyonu ile veya akanitoz ve mitokondrial demir içeren sitokromların inhibisyonu ile sitostatik /sitotoksik molekül olarak rol alır<sup>44,48</sup>.

İnsan dermal papiller hücreleri, endotoksin ile inkübe edilir ise NO açığa çıkarır ve cGMP bağımlı fosforilasyon yolu ile  $K^{+1}$  - $Ca^{+2}$  kanallarını modüle eder<sup>48</sup>.

Polimorf nüveli lökositler nekroze olmuş dokuları ortadan kaldırarak yaralanan bölgeden bakteri ve yabancı cisimleri uzaklaştırırlar.

Böylece enfeksiyon gelişimini engellerler<sup>49</sup>. Bölgedeki makrofajlar fagositoz yanında büyüme faktörleri içerirler ve aktive olarak NO sentezlerler<sup>50</sup>.

Aynı anda farklı hücre türlerinden sentezlenen, otokrin veya parakrin mediatör fonksiyonu gören NO, NOS enzimi ile sentezlenmektedir. NOS stereospesifik olarak yarı esansiyel aminoasit olan L-arjinini substrat olarak kullanmakta ve sonuçta NO ve L-citrulline oluşmaktadır<sup>47</sup>.

#### 2.4.1.4. NOS inhibitörleri

L-arginin analogu olanlar:

Bu enzimlerden NG-monometil- L-arjinin (L-NMMA), N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) veya NG-nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi guanidin ucundaki değişiklik gösterenler,

L-arginin analogu olmayanlar:

7-NI(7-nitroindazol bu madde daha çok nöronal NOS'u inhibe eder), 1400W, iminoetil L-ornitine (L-NIO), N-(1-iminoetil)-L-lizin, merkaptoetilguanidine, aminoguanidine (AMG) ve L-canavanin (daha ziyade iNOS'u inhibe eder)<sup>47</sup>.

#### 2.4.2. Yara İyileşmesi ve NO

Yarada da arginin, NO ve sitrulline NOS aracılığı ile metabolize edilebilmektedir. Burada ki oluşum süreci uzun dönemde meydana gelmekte ve makrofajlar oluşan NO dan sorumlu tutulmaktadır<sup>48</sup>. NO yapımı uyarıldığında keratinosit gelişimi inhibe olmaktadır. EGF, NO yapımını azaltarak iyileşmeyi hızlandırıcı etki gösterir. Bu nedenle yara iyileşmesinde iki faz öngörülmektedir. Birinci fazda NO yapımı artışı ve enfeksiyonun önlenişi, 2 nci fazda ise EGF yapımının artışına bağlı olarak keratinosit gelişiminin hızlanması esastır. NO, major histokompatibilite komp-

leksisi (MHC) moleküllerini makrofajlarda azaltarak T hücrelerine antijen sunuluşunu inhibe etmektedir<sup>51</sup>.

#### 2.4.2.1. Yara iyileşmesinde nitrik oksit mekanizması

L-argininin biyolojik efektör molekül NO 'nun yapımı için tek substrat olduğu gösterilmiştir. Arginin yara dokusunda NO sentaz ile sitruline ve NO'ya veya arginaz ile üre ve ornitine metabolize olmaktadır. Arginin seviyesi yara dokusu sıvısında ölçülemeyecek kadar düşük seviyededir ve NO sentezi ve ornitin için kullanılarak bu sentezleri desteklemektedir. Yara dokusunun NO 'u sentezleyebildiği gösterilmiştir. NO 'nun iyileşmedeki rolü konusundaki çalışmalar çelişkilidir. Yara iyileşmesinde rol oynayan inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların invitro inflamatuvar stimülasyon sonrasında uyarılabilir NOS formunu oluşturabildikleri gösterilmiştir. İnsan dermal fibroblastlarının hem iNOS hem cNOS izoformlarını serbestleyebildikleri gösterilmiştir.

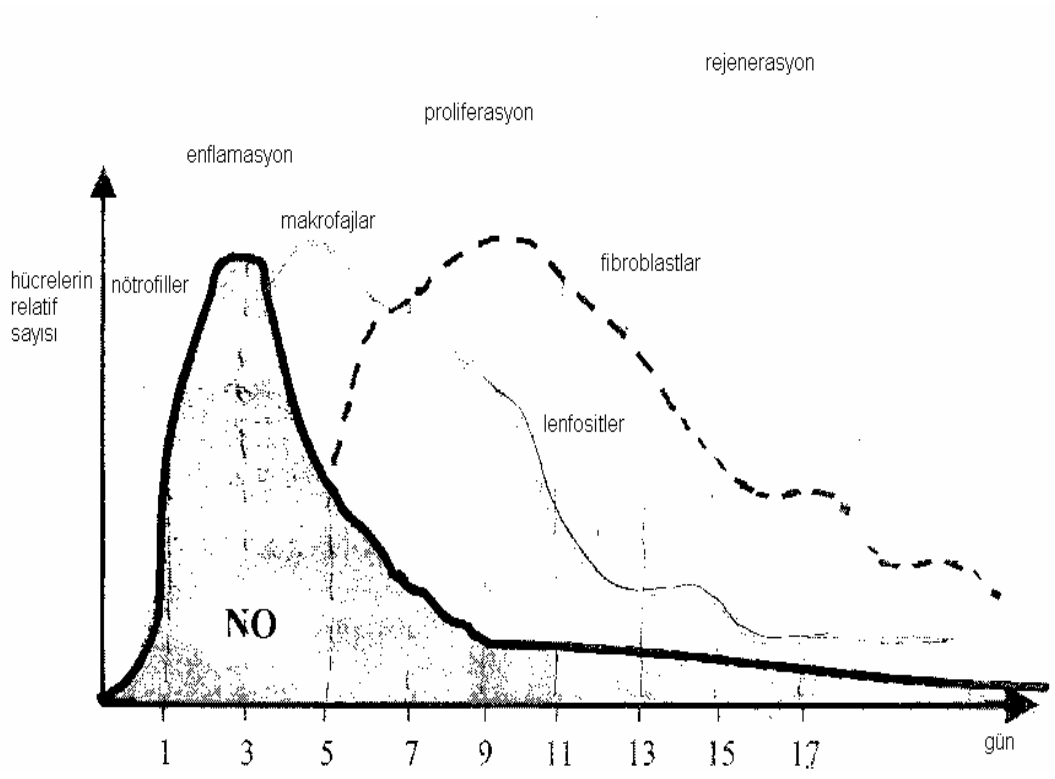
İmmüno blotting yöntemiyle yara makrofajlarında iNOS yapımının arttığı gösterilmiştir. LPS ve IFN- $\gamma$  ile yara makrofajlarının stimüle edilmesi iNOS yapımının daha fazla artırmamaktadır. Bu da yara makrofajlarının NO sentezi için maksimal olarak stimüle olduklarını göstermektedir.

Yara içeren deri kesilerinde iNOS immunoreaktif makrofajlar tesbit edilmiştir. İmmunoreaktif inflamatuvar yanıt tesbit edilmemiştir. Yaranın üçüncü gününde çok az yara hücresi, fakat yaranın 7. ve 10. günlerinde yara makrofajlarının büyük bir kısmı iNOS ile pozitif olarak boyanmıştır. Diğer hücrelerden endotelial hücreler ve fibroblastlar da iNOS yönünden pozitif olarak boyanmıştır. Yani bu hücrelerde de iNOS aktivitesi gözlenmiştir<sup>48</sup>. Yara iyileşme sürecinde NO düzeyleri Şekil 4 te gösterilmiştir.

NO sentezinin yara oluşumundan önce inhibe edilişi yara iyileşmesinde gecikmeye neden olmaktadır<sup>38</sup>. Tendon iyileşmesi sürecinde

normalde çok düşük düzeylerde bulunan NO 6.ve 24. saatlerde artış göstermekte, 3. gün en üst düzeye ulaşmakta 3-7 gün arasında ise anlamlı olarak yüksek kalmaktadır<sup>52</sup>. Deri yaralanmasını takip eden 24 saat içerisinde yara dokusunda iNOS ekspresyonu artar, maksimal ekspresyon 1. ve 5. günler arasında gerçekleşir<sup>53</sup>. Şekil 4 de yara iyileşmesi safhalarında NO'nun değişimi ve hücrelerin faaliyetleri gösterilmiştir<sup>8</sup>.

iNOS' un, eksizyonel yaranın iyileşmesinde önemli bir etkisi olduğu halde; insizyonel yara iyileşmesinde hiçbir etkisi yoktur<sup>24,54</sup>.



**Şekil 4: Yara iyileşmesi safhalarında NO'nun değişimi ve hücrelerin faaliyetleri<sup>8</sup>.**

#### 2.4.2.2. NO ve Angiogenesis

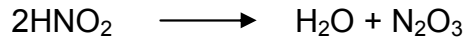
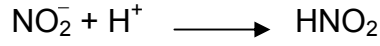
Yeni mikro damar oluşturmanın süreci olan angiogenesis normal yara tamirinin önemli bir komponentidir. NO, iskemik sıçan dokuların da ki angiogenesisi artırdığı için bu süreçte esas bir rol oynar. Tersine, NOS inhibitörleri gastrik ülser iyileşmesinde granlasyon dokusunda ki angiogenesislerini bozar ve canlıda ki kapiller organizasyonu baskı altında tutar. NO aynı zamanda angiogenesis öncesi sitokinlerin aktivitesi için çok önemlidir. VEGF, NO generasyon modülasyonunu içeren güçlü bir angiogenik faktördür. VEGF, eNOS upregülasyonu ile NO üretimini artırır. Tersine, NOS'un farmakolojik blokajı endotel hücre proliferasyonu indirgendiğinde hem VEGF, hem de aktive edilmiş protein kinaz (MAP) mitojeni önlediğinden VEGF'nin angiogenik etkisi aynı zaman da NO ya bağlıdır. VEGF, adhezyon azaldığında endotel hücre migrasyonu stimüle olur ve bu organizasyon aynı zaman da NO'ya bağlıdır. Keratonositlerde, sitokin uyarısı VEGF ekspresyonunu artırır. iNOS inhibitörleri ise bloke eder. İlginç olarak, NO angiogenesis mekanizmasından bağımsız olarak VEGF yi de içerir<sup>55</sup>.

#### 2.4.2.3 NO ve İnflamasyon

IL-8, TGF-  $\beta$  1, monosit ve yara kemoatraksiyonuna katkıda bulunan nötrofiller dahil olmak üzere yara iyileşmesini başlatan kemoatraktan sitokinleri module etmek için NO gözlemlenmiştir. Monositler ve notrofiller bir yaranın alanına geldiğinde bunlar da aktive olur ve yara iyileşmesine karışan TNF- $\alpha$  ve IL-1 keratonositler için güçlü bir kemoatraktandır, NO tarafından IL-1 'in modülasyonu keratonositlerin yeniden oluşumunu, proliferasyonunu ve differasyonunu başlatabilir. Bunlar birlikte değerlendirildiğinde sitokinlerin eşlik ettiği inflamasyonun NO modülasyonunu, yara iyileşmesinin inflamatuvar safhasını etkileyebilir<sup>55</sup>.

### 2.4.3. Ağızda NO

Ağızda da NO'nun varlığı pek çok fonksiyona etki yapmaktadır. Son zamanlarda NO oluşumunda enzimatik olmayan bir yol tanımlanmıştır. Tükrük bezlerinde aktif transport bir sistem sayesinde plazma nitratı on katına kadar konsantre edilebilmektedir. Dilin arka kısmının yüzeyinde bulunan oral bakteriler, nitratı nitrite indirgeyen nitrat redüktazları içerirler. Nitrit yutulduktan sonra, midenin asidik ortamında nitröz aside indirgenir, daha sonra da NO içeren nitrojen oksitlere indirgenir.



NO yapımı uyarıldığında keratinosit gelişimi inhibe olmaktadır. EGF NO yapımını azaltarak iyileşmeyi hızlandırıcı etki göstermektedir<sup>51</sup>.

Bu çerçevede tükrükteki NO antibakteriyal fonksiyonda ve oral karsinojenlerin detoksifikasyonunda etkili gibi görünmektedir<sup>56</sup>.

NO ürünleri olarak meydana gelen nitrit ölçümleri ile yapılan bir çalışmada, liken planus ve aftöz ülserli hastaların tükrük nitrit düzeyleri yüksek bulunmuştur<sup>57</sup>.

Periodontitis olgularında anlamlı bir NO artışı vardır<sup>58</sup>. Periodontitiste artan NO yapımı iNOS inhibitörü ve peroksinitrit süpürücüsü merkaptotetil guanidin ile inhibe edildiğinde; kemik dekstrüksiyonunu ve ekstravazasyonunu azalttığı gözlenmiştir<sup>59</sup>. NO sentezinin yara oluşumundan önce inhibe edilişi yara iyileşmesinde gecikmeye neden olmaktadır. Köpekte oluşturulan periodontal mukoperiosteal yarada antioksidan enzim düzeyleri anlamlı bir şekilde artmıştır<sup>38</sup>.

Antioksidan olarak görev yapan redükte glutasyon S-nitroso-N-asetil-penisilamin (SNAP)'e maruziyeti sonucu azalır. Bu da SNAP'ın gingival fibroblastlar üzerindeki hasarlayıcı etkisini artırır. Bu hasar askorbik asit, L-sistein gibi antioksidanların verilmesi durumunda azalmaktadır<sup>43</sup>.

Bir başka çalışmada, tavşan ağızındaki yumuşak dokuda ke-si yarası yapılarak 5 nci günde denekler feda edilmiştir. Çalışmada nonspesifik NOS inhibitörü olan L-NAME'i kullanılmıştır i.p. uygulanan L-NAME'li grup ile kontrolü karşılaştırıldığında plazma NOx ve thiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) düzeyleri istatistiksel bakımdan anlamlı olarak düşük bulunmuştur<sup>60</sup>.

## **2.5. Aminoguanidine**

### **2.5.1 Kimyasal Yapısı**

Aminoguanidine hemisülfatın formülü  $CH_6N_4.O.5H_2SO_4$  olup NO yolağında üretilir. Üretim familyası NOS inhibitörüdür. Molekül ağırlığı 74.1.49.0 dır. Beyaz renkte olup katı halde bulunur ve suda çözünür. Uzun dönem oda sıcaklığında saklanır.

### **2.5.2. Aminoguanidin-İnflamasyon Çalışmaları**

Aminoguanidine(AMG) değişik deneklerde günlük kullanım dozları ve uygulanma şekilleri ile çalışılmıştır. Farelerde 5-20, yine başka bir çalışmada fareler de 300 mg/kg İntraperioteneal (ip), sıçanlarda ise 20 mg/kg ve 120 mg /kg sc günlük verilerek yedi gün boyunca uygulanmıştır. Ayrıca sıçanlarda 30, 50, 60, 100, 200, mg/kg ip olarak değişik çalışmalarda da uygulanmıştır<sup>61 - 63</sup>. Tavşanlarda da AMG-HCl 300 mg/kg olarak kalpte, ayrıca AMG hydrogen carbonate 1 g/L içme suyunda verilmiştir.

AMG lokal ve sistemik inflamasyonların azaltılmasında kullanılabilir<sup>64</sup>. AMG'nin lokal ve sistemik uygulamalarında da yara iyileşmesinde faydalı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur.

Örneğin periodontitisi azalttığına dair çalışmalar yapılmıştır<sup>65</sup>. Yine kolesistit de<sup>66</sup>, akut akciğer zedelenmelerinde<sup>67</sup>, diyabete bağlı komplikasyonların tedavisinde<sup>68</sup>, kokain hepatoksisitesinde<sup>69</sup>, spinal kord zedelenmelerinde yararlı olabilir. Yine travmatik şoklarda önemli rol oynar<sup>70</sup>. Soğuğa bağlı zedelenmenin tedavisinde rol oynar<sup>71</sup>. Overleri hasarlanmadan korur<sup>72</sup>. Karaciğer hasarında iyileşmeye neden olan<sup>73</sup> AMG, diabetik komplikasyonları da antioksidan olarak yapılan bir çalışmada minimize etmiştir<sup>74</sup>.

### 2.5.3. Yara İyileşmesi ve Aminoguanidine

Selektif olarak iNOS aktivitesini inhibe eden AMG antioksidan özellikte bir maddedir<sup>7</sup>. AMG yara iyileşmesinde; growth faktör TGF- $\beta$ 1'in ekspresyonunu ve kollajenin ultra yapısını korumuş ve yaranın histamin içeriğini de artırmıştır<sup>75,76</sup>. Deneysel sistemik inflamatuvar yanıt sendromunda (Systemic inflammatory response; SIRS) çeşitli organlarda oluşan histopatolojik hasar, AMG uygulaması ile azalmıştır<sup>47</sup>.

AMG uygulaması, yanık yarasında, kemik iyileşmesinde, nonsteroid antienflamatuvar (NSAI) ilaçlara bağlı ülser yaralarında iyileşme üzerinde kolaylaştırıcı etki yapmaktadır<sup>62,77,78</sup>

Deneysel otoimmün ön üveit yapılan sıçanlarda 100 mg/kg sc AMG uygulaması klinik ve histolojik olarak üveyitte düzelmeye yol açmıştır<sup>79</sup>.

İndomethazine bağlı ince barsak ülseri gelişen sıçanlarda 20 mg/kg sc AMG uygulamasında 6 günde barsak mukozasında nitrit, nitrat düzeyleri azalmıştır<sup>9,78</sup>.

#### 2.5.4 Ağız da AMG

Sıçanların ağızında yapılan yara çalışmasında da 1nci büyük azı dişinin etrafına ligatür yerleştirilmiş ve denekler 8 nci günde hayvan feda edilmiştir. Farelere 8 gün süreyle AMG (100mg/kg i.p.) uygulanmıştır. AMG uygulaması, ekstrasvazasyon ve kemik yıkımı üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Ligatür ile oluşturulan periodontitiste, gingivomukozal dokularda anlamlı bir inflamasyon oluşmuş ve AMG bu inflamasyonu, dolayısı ile doku hasarını azaltmıştır<sup>65</sup>.

AMG uygulaması iNOS enzim aktivitesini azaltarak; lokal ya da sistemik inflamasyonların azaltılması için yararlı bir durum sağlamıştır. iNOS aktivitesi daha çok L-arjinin analogu olmayan L-canavanin ve AMG tarafından inhibe edilmektedir<sup>47</sup>.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda AMG'nun lokal ve subkutan. uygulamasındaki etkilerinin kan ve yumuşak dokuda NOx, MDA, GSH düzeylerine olan etkisinin araştırılmasını amaçladık.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

Bu çalışma 27.12.2007 tarih ve G.Ü. ET-07.068 kodlu etik kurul kararı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler**

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Tavşanlar Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden sağlanmış ve G.Ü. Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmaları merkezi (GUDAM) da bakılmıştır.

Deneylerde 5 aylık, 18 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanılmıştır.

Deney öncesi ve deney süresince tavşanlar serbest yem ve su ile beslenmiştir (Pelet yem). Deney süresince tek tek kafeslerde, özel aydınlanan ortamda bakılmıştır<sup>80</sup>.

##### 3.1.2. Kullanılan Araçlar ve Kimyasallar

Aminoguanidine hemisulphate (Sigma Chemical Co. (St. Lois, MO),

AMG 1 denek için, bir boncuk içinde 12.7 mg olacak şekilde doze edilmiştir.

Subkütan uygulamada 100 mg/kg günde 2 kez verilmiştir<sup>75,81,82</sup>

Polietilen glikol (PEG 6000, ort. 0.02 gr),

- Santrifüj: MPW-350 (soğutma sistemli)
- Homojenizatör: HEIDOLPH - DIAX 900
- ELISA Okuyucu: BLOKİT EL x 800 Bioelisa Reader
- Elektronik tartı: SARTORIUS Basic

Araştırmada kullanılan AMG, MDA, GSH ve NOx tayinlerinde kullanılan kimyasal maddelerdir.

Polietilen Glikol ve Aminoguanidin Formülasyonu :

Polietilen Glikol (PEG 6000) polimerleri etkin madde taşıyıcısıdır ve doku adezyonu için kullanılmaktadır. Bu polimerler uygulanan maddelerin lokal dağıtıcıları olarak kullanılmaktadır. PEG'ün toksisitesi düşüktür ve hayvan yemleriyle içme sularına katılmasına izin verilmiştir. PEG, L-NAME'in salınımı ve taşınması için bir vektör olarak kullanılabilir<sup>83</sup>.

Aminoguanidine hemisulphate(Sigma Chemical Co. (St. Lois, MO), 1 denek için polietilen glikol (PEG 6000, ort 0.02 gr) boncuk içinde 12.7 mg olacak kadar doze edilebilmiştir.

PEG boncuklar G.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır. Hazırlama yöntemi; PEG eritilmiştir. İçine 12.7 mg AMG ilave edilmiştir. Homojen şekilde karıştırılmıştır. İnsülin enjektörüne alınmış ve bir kalıp içinde şekillendirilmiştir<sup>84,85</sup>. Kontrollü ilaç salımı amacı ile kullanılan PEG formasyonuna ait daha önce yaptığımız çalışmalar mevcuttur<sup>1,31,60</sup>.

## 3.2. Uygulanan Yöntemler

### 3.2.1. Araştırma Planı

Tüm tavşanların ağızlarının sol üst çenelerinin mukozasında standart kesi yarası yapıldı. Kesilerde 15 numara bistüri ucu, 5-0 ipek iplik ve sütür iğneleri kullanıldı. Deneklerde kesici dişleri ile azı dişleri arasındaki diastema bölgesinin en derin iç bükey yeri hizası merkez olacak şekilde sol çenede kretin tepesine yaklaşık 2,5 cm uzunluğunda postero-anterior yönde bistürü ucu ile kesi kemikle temas olacak şekilde tek işlemde gerçekleştirildi<sup>86,87</sup>. Kesiden sonra mukozanın yara dudakları vestibul ve lingual yönde periost elevatörü ile kemik üzerine AMG'lu PEG boncuk yerleşecek şekilde ekarte edildi (Resim -1).

PEG boncuklar, yara dudakları adapte olacak şekilde yerleştirildi ve kanama kontrolü yapıldı. Bu işlem sırasında 4 adet sütür atıldı.

Aynı tavşanların sağ üst çenesi ise kesi yapılan tarafın kontrolü olarak incelendi. Tavşanlar Tablo 1 de gösterildiği şekilde 3 gruba ayrıldı.

Deney grubundaki tavşanlara ya toplam 100 mg/kg/gün AMG günlük 2 eşit doza bölünerek 3 gün süreyle subkütan (9.30- 16:30) ya da lokal PEG içinde AMG uygulandı. PEG boncuklar G.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasotik Teknoloji A.B.D.'da hazırlandı<sup>84,85</sup>.

Hazırlanan PEG boncuklar plastik tüplere yerleştirilip ağız kapatılarak deneylerimizin gerçekleştirileceği GUDAM'a getirildi<sup>1,31,60,88</sup>.

- I. Grupta sadece kesi yarası yapıp sutür atıldı.
- II. Grupta ise kesi yarası yapıp, yarada AMG (12.7 mg ) (lokal) içeren PEG'li boncuklar kullanıldı.

III. Gruptakilere kesi yarası yapıp AMG subkütan 100 mg/kg/gün' lük dozu 3 gün süresince sabah ve akşam olmak üzere 2 eşit doz uygulandı<sup>81</sup>. Bu gruptakilere subkutan uygulama her gün 9.30 -16.30 saatleri arasında yapıldı.

Kontrol grubundaki tavşanlara kesi yapıp 3 gün beklendi. Tavşanlar GÜDAM'da barınmaları için 3 gün süre ile bırakıldı ve deney süresince serbest yem ve su ile beslenerek ve periyodik kontrolleri yapıldı.

Üçüncü günün sonunda deneklerin sabah saat 10.00'da ağırlıkları ölçüldü. Tavşanların kalbinden anestezi altında kan alınmasını takiben feda edildi. Doku numuneleri sol kesi bölgesinden, aynı çenenin sağ bölgesinden de alındı. Etilendiamin tetraasetikasit (ETDA)'li tıplara alınan kanlar 3000 g de 5 dakika santrifüj edilerek plazma ayrıldı.

Alınan doku numuneleri, sıvı azotda dondurularak, çalışmaya kadar -86 °C de derin dondurucuda saklandı.

Alınan örneklerde aşağıdaki parametreler çalışıldı: Radikal hasarının göstergesi olarak kabul edilebilecek ve lipid peroksidasyonu ile paralel değişim gösteren doku ve plazma MDA düzeyi TBARS madde oluşumu yöntemi ile çalışıldı. Radikal hasarına neden olabilecek doku ve plazma NOx düzeyi Griess yöntemi ile çalışıldı. Antioksidan kapasitenin göstergesi olarak kabul edilen; plazma ve doku RSH/GSH tayini modifiye Ellman yöntemi ile çalışıldı.

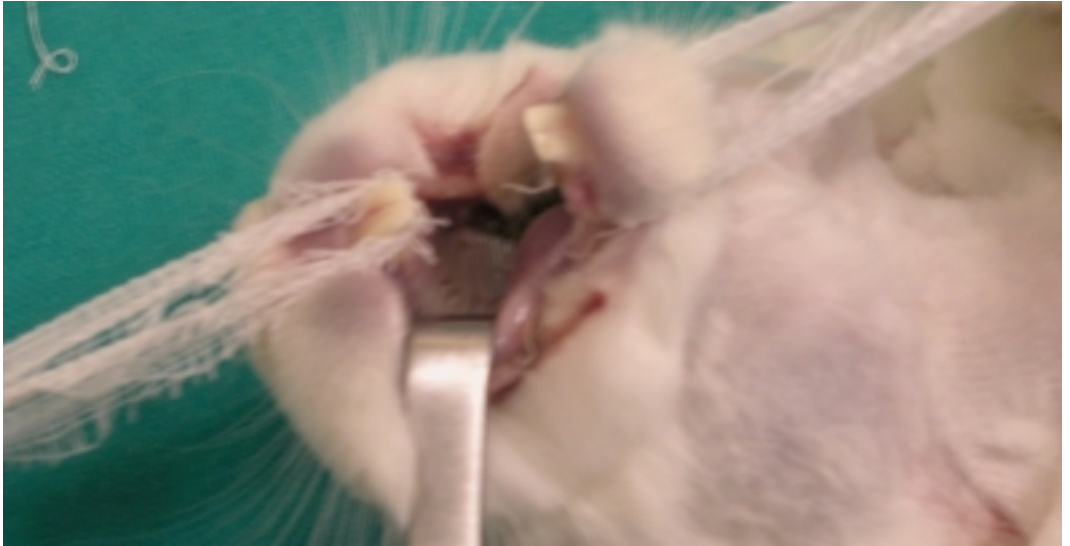
Histolojik inceleme için dokular formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

**Tablo 3. Çalışma grupları ve özellikleri**

<b>Gruplar</b>	<b>Uygulamalar</b>	<b>Denek Sayısı</b>	<b>Ağırlığı (gr)</b>
I. grup (kontrol)	Kesi yarası SHAM OPERE	6	2278,00± 97,99
II. grup	Kesi yarası+Lokal AMG	6	2205,00±63,84
III. grup	Kesi yarası +sc AMG	6	2311,00± 78,98

**ortalama ± SS**

**SS: Standart Sapma**



**Resim - . Ağız operasyona hazırlanmış tavşan**

### 3.3. Tayin Yöntemleri

#### 3.3.1. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi

Ağız yumuşak dokusunda lipid peroksidasyon düzeyi tiobarbitirik asit reaktif madde oluşumu yöntemi ile çalışıldı. Doku örnekleri homojenizatör ile soğuk trikloroasetik asit (TCA) (1 g doku + 9 ml % 10'luk TCA) içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra 15 dakika süreyle 4000 rpm de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm de 8 dakika tekrar santrifüj edildi. Örnekten 750 mikrolitre alınarak üzerine 750 mikrolitre % 0.67'lik tiobarbitrik asit (TBA) eklendi. Daha sonra örnekler 100°C de kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra soğutularak 4000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her bir örneğin absorbansı 532 nm de tayin edildi. Ağız yumuşak dokusu lipid peroksidasyon düzeyi  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  katsayısı kullanılarak MDA eşdeğeri olarak ifade edildi<sup>89</sup>.

#### 3.3.2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi

Ağız yumuşak dokusunda GSH tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı. Lipid peroksidasyonunda anlatıldığı şekilde ağız yumuşak dokuları homojenize edilip santrifüj edildikten sonra, 2 hacim supernatant, 8 hacim 0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 1 hacim ditiyobisnitrobenzoat (0.4 mg/ml % 1'lik sodyum sitrat) çözeltisi ile karıştırıldı. Örnekler oda ısısında 5-10 dk inkube edildi. Daha sonra spektrofotometrede karışımın 412 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü ve glutasyon düzeyleri  $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  katsayısı kullanılarak hesaplandı<sup>87,92</sup>.

### 3.3.3. Doku ve Plazmada Nitrik Oksit Tayin Yöntemi

Doku ve plazma NO'un göstergesi olarak nitrit+nitrat (NOx) düzeyleri tayininde modifiye Griess yöntemi kullanıldı<sup>90,91</sup>.

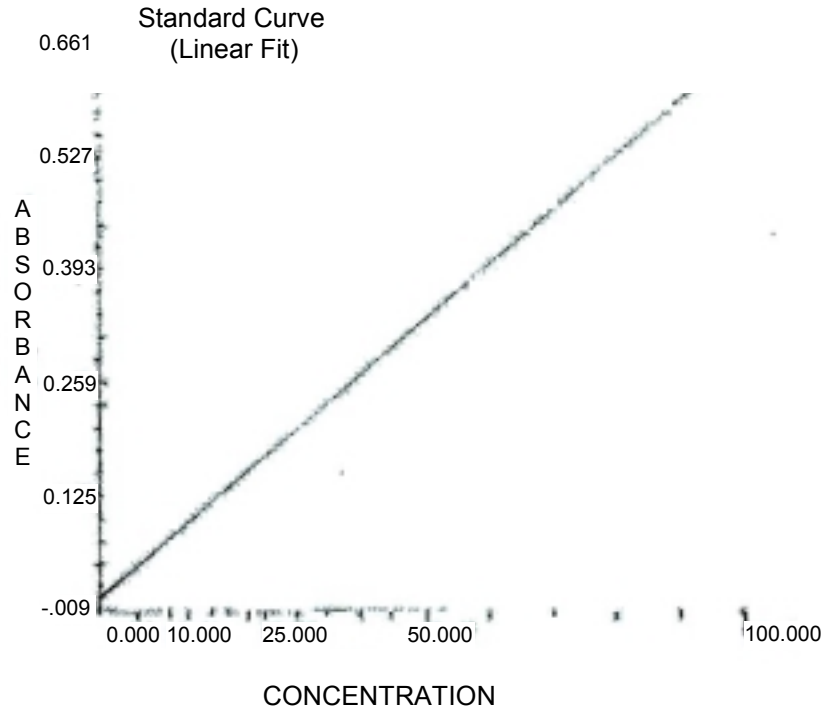
Plazmaların Hazırlanması: Plazma örneklerini deproteinize edilmek üzere; 0.25 ml plazma üzerine 0.25 ml 0.3 M NaOH eklenerek oda ısısında 5 dk inkübe edildi. Üzerine 0.25 ml % 10'luk ZnSO<sub>4</sub> konularak vorteksle ile karıştırıldı. Karışım +4°C 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Alınan süpernatantlar tekrar +4°C 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

Yumuşak dokuda NOx miktarı Griess metodu ile çalışıldı. Bunun için alınan doku beş katı hacimde PBS eklenerek homojenize edildi. Fosfat ile Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (PBS) Çözeltisi için; 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,92 gr (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 lt suda çözüldü, pH=7,4 olacak şekilde ayarlandı). 2000 RCF de +4°C'da 5 dakika santrifüj edildi. Sonra üzerine 250 µl 0,3 N NaOH ilave edilerek oda ısısında beş dakika inkübasyona bırakıldı. 250 µl % 10'luk ZnSO<sub>4</sub> ilave edilip, vortekslendi. 3000 RCF de +4°C'da 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın 500 mikrolitresi 14000 rpm de +4°C'da 5 dk santrifüj edildi. NOx miktarını belirlemek için, 1 birim VaCl 3 (400 mg VaCl<sub>3</sub> tartılır, 1 M HCl çözeltisi ile 50 ml'ye tamamlanarak karıştırılır). 0,5 birim sülfanilamid (2 gr Sülfanilamid tartılır, 100 ml olacak şekilde % 5 lik HCl çözeltisinde çözülür) 0,5 birim N-(1-Naphthyl) Ethyl-Enediamine (NEED) karışımı (100 mg NEED tartıldı, 100 ml olacak şekilde deiyonize su içerisinde çözüldü.). 37°C'da 30 dk inkübe edildi. Hazırlanan karışım Elisa okuyucu da 540 nm dalga boyunda okundu. NOx miktarı hazırlanan standart çözeltiye göre hesaplandı. Grafik-1

BIOELISA READER EL x 800

Assay : Nitrat  
Wavelength : 540

COMMENTS



Curve :  $Y = Ax + B$   
Coefficients :  $A = 0.007$   $B = 0.009$   
R-Sqr : 0.9984

Grafik-1. NOx miktarı için hazırlanan standart .

#### 3.3.4. Plazmada TBARS Tayin Yöntemi

0.4 cc UA sitratlı tüp içine 1,3 ml kan alındı. Bundan 500 µlt plazma alındı. 1 ml TBA /TCA /HCL karışımı eklendi ve vortekslendi. Mikrosantrifüj tüplere yerleştirilen tüpler 3 dk 10.000 g de santrifüj edildi. Cam tüplere süpernatant alındı. 10 µlt BHT eklendi. 15 dk kaynatıldı. Tüplerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Çeşme suyunda soğutuldu. Presipitasyon varsa tekrar 5 dk 10.000 g de santrifüj edildi. 532 nm de okundu. 500 µlt H<sub>2</sub>O konarak kör yapıldı. Sonuç, absorbans x 19.2 = nmol / MDA / ml plazma formülü ile hesaplandı<sup>87</sup>.

#### 3.3.5. Plazmada Sülfidril Bileşikleri Yöntemi

500 µlt plazma alındı. 1000 µlt Tris/Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) / NaDS (Na dedusülfat) eklenip vorteks ile karıştırıldı. 3 dk oda ısısında bekletildikten sonra 3 dk 10000 g de santrifüj edildi. Süpernatant alındı. 40 µlt ditiyonitrobenzoik asit (DTNB) eklendi. 20 dakika 37°C tutuldu. 412 nm de okundu<sup>87</sup>.

### **3.4. Kullanılan İstatistiksel Yöntem**

Tüm istatistikler yapılırken normallik varsayımı sağlandığından dolayı One-way ANOVA (Tek yönlü varyans analizi) yapılmıştır. Gruplar arasında fark çıkanlar için çoklu karşılaştırmalar yapılmıştır. Varyansların eşitliği sağlandığı durumda Scheffe, Duncan; varyans eşitliği varsayımı sağlanmadığı durumlarda Tamhane's T2 veya Dunnett's T3 istatistiklerinden yararlanıldı.

### **3.5 Histolojik İnceleme**

Alınan örnekler ışık ve elektron mikroskopik olarak değerlendirildi.

### 3.5.1. Işık Mikroskopik İnceleme

Sağlam, yara ve AMG'li gruplardan alınan oral mukoza örnekleri, % 10 luk nötral formalinde tespit edilmek üzere 72 saat süre ile bekletildiler. Tespit işleminde sonra alışılagelmiş histolojik işlemlerden geğirilen doku örneklerinden elde edilen parafin bloklardan, 4-5 µm kalınlığında alınan kesitlere Masson trikrom boyama yöntemi uygulandı. Sağlam, yara ve deney gruplarındaki yara iyileşmesi karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Kesitler, Leica DM 4000B, Germany mikroskopunda görüntüldü.

### 3.5.2. Elektron Mikroskopik İnceleme

Sağlam, yara ve AMG'lu gruplardan alınan oral mukoza doku örnekleri, % 2,5 luk fosfat tamponlu glüteraldehit solüsyonunda tesbit edildikten sonra doku örnekleri, 1x1x1 mm<sup>3</sup> lük parçalara ayrılarak osmium tetroxide solüsyonunda postfiksasyon işlemine bırakıldı. Değişik derecede ki alkollerde dehidratasyon işlemini takiben dokular Araldit CY212, DDSA karışımında bekletilerek gömme işlemini takiben elde edilen bloklardan alınan yarı-ince kesitler Toluidin blue ile boyanarak , (Leica DM 4000B, Germany) mikroskop altında incelendi. Alınan ince kesitler ise kurşun sitrat, uranil asetat ile boyanarak, Leo 906 E elektron mikroskopunda görüntüldü.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Doku ve Plazma MDA Düzeyleri

Grup I yara doku MDA düzeyleri, yara yapılmamış sağlam (I-sağlam) doku ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $7.5\pm 3.37$  nmol/g doku,  $2.90\pm 0.25$  nmol/g doku,  $p<0.05$ ). Çalışmamızda grup II ve III yara doku MDA düzeyleri grup I yara ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı ( $2.13\pm 0.21$  nmol/g doku  $2.20\pm 0.56$  nmol/g doku,  $7.50\pm 3.37$  nmol/g doku,  $p<0.05$ ).

Grup II ve III plazma MDA düzeyi grup I ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış bulundu ( $0.31\pm 0.2$  nmol/ml,  $0.36\pm 0.15$  nmol/ml,  $0.98\pm 0.18$  nmol/ml  $p< 0.05$ ). (Tablo 4,5) , (Grafik 2, 5, 8).

### 4.2. Doku Glutasyon ve Plazma Sülfidril Düzeyleri

Grup I yara doku GSH düzeyleri yara yapılmamış sağlam (I-sağlam) doku ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $0.76\pm 0.01$   $\mu$ mol/g doku,  $0.57\pm 0.05$   $\mu$ mol/g doku,  $p<0.05$ ). Grup II yara doku GSH düzeyleri yara yapılmamış sağlam (II-sağlam) doku ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $0.87\pm 0.18$   $\mu$ mol/g doku,  $0.46\pm 0.76$   $\mu$ mol/g doku,  $p<0.05$ ). Grup II ve III yara doku GSH düzeyleri grup I ile karşılaştırıldığında GSH düzeyi artmış olmakla beraber bu artış anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Ancak grup III plazma sülfidril bileşikleri (RSH) grup I ve II ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $476.4\pm 67.2$  nmol/ml,  $278.1\pm 117.8$ , nmol/ml,  $359.3\pm 51.1$  nmol/ml,  $p<0.05$ ) (Tablo 4,5), (Grafik 1,4,7).

### 4.3. Doku ve Plazma NO<sub>x</sub> Düzeyleri

Çalışmamızda yara NO düzeyi gruplar arasında farksızdı. Ancak grupların sağlam taraflarında grup III gerek grup I gerekse grup II ile karşılaştırıldığında yara NO düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu (39.24±12.0 µmol/g doku, 181.96±83 µmol/g doku, 107.49±46.NO<sub>x</sub> µmol/g doku p<0.05).

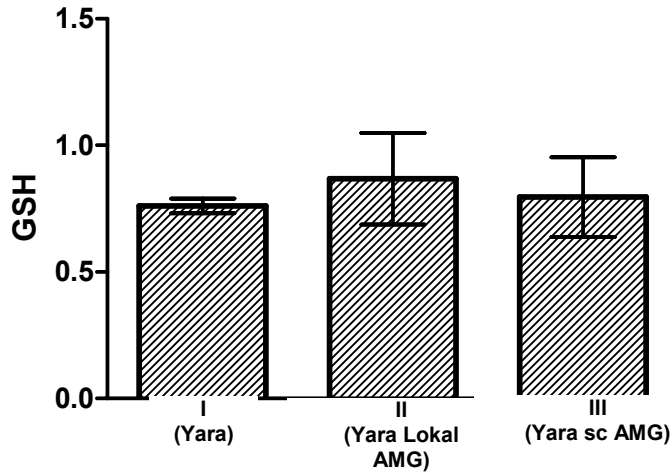
Grup II ve III Plazma NO<sub>x</sub> düzeyi grup I ile karşılaştırıldığın da anlamlı olarak azalmış bulundu (29.02± 8.15 µM, 24± 11.35 µM, 50.62± 14.78 µM p<0.05). (Tablo 4,5) ), (Grafik 3, 6, 9).

**Tablo 4: Lokal ve sc AMG uygulamasının tavşan yara dokusu ve kontrol grubu üzerindeki MDA, GSH, NOx değerleri (ortalama ± SS)**

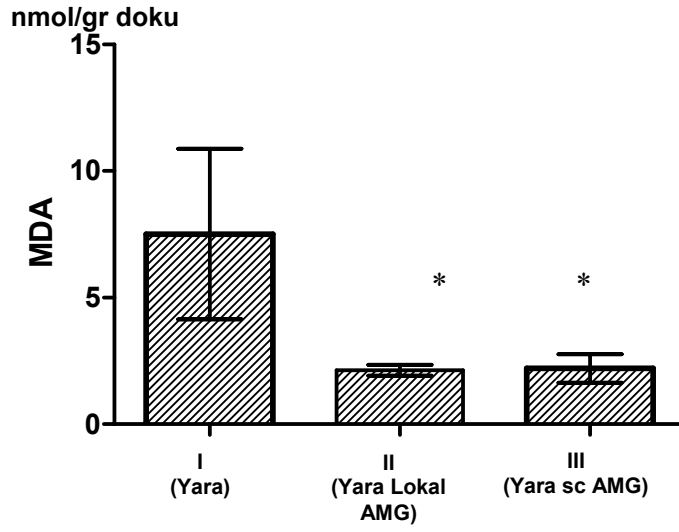
		Kontrol (I)	AMG		p değeri (post hoc testleri = Tukey HSD)		
			(II) Lokal AMG	(III) SC AMG	I-II	I-III	II-III
		ortalama ± SD	ortalama ± SD	ortalama ± SD			
MDA nmol/grdoku	Yara	7,51±3,37	2,13±,21	2,21±,56	<b>0,0330*</b>	<b>0,0340*</b>	0,998
	Sağlam	2,90±,63	3,35±3,12	3,86±2,35	0,939	0,752	0,921
GSH µmol/g doku	Yara	0,76±,29	0,87±,18	0,80±,16	0,402	0,904	0,649
	Sağlam	0,57±,12	0,46±,076	0,64±,21	0,427	0,724	0,133
NOx µmol/g doku	Yara	10,04±,3,03	4,75±1,76	8,84±5,07	<b>0,052</b>	0,830	0,149
	Sağlam	181,99±,83,50	107,49±46,81	39,24±12,07	0,084	<b>0,024*</b>	<b>0,044*</b>

\*: p<0,05

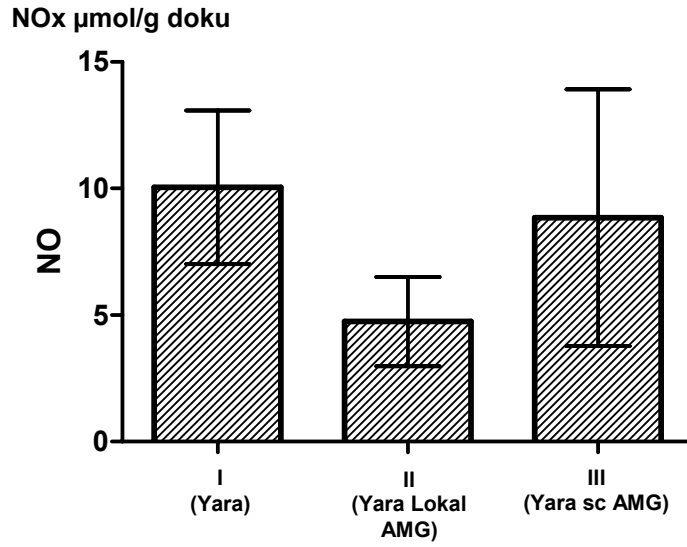
µmol/gr doku



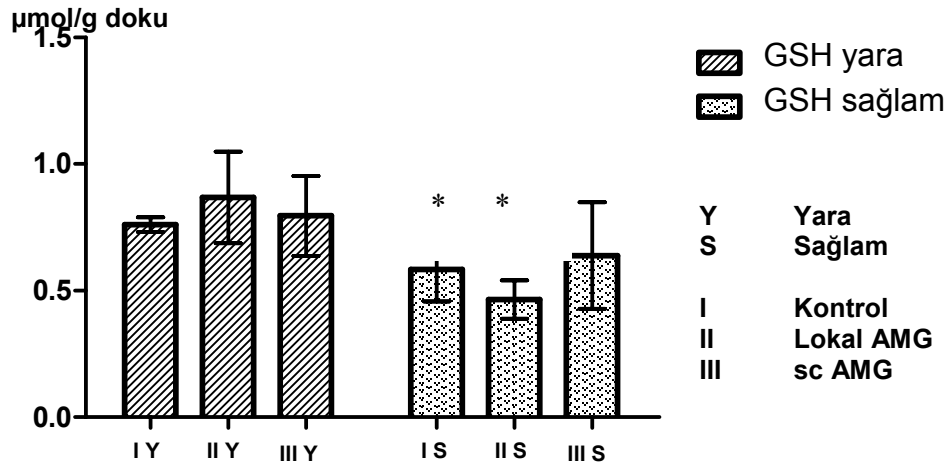
**Grafik 2. Kesi yarasında (G I) lokal AMG (G II) ve sc AMG (G III) uygulamasının yara GSH düzeyleri µmol/gr doku \*: p<0,05**



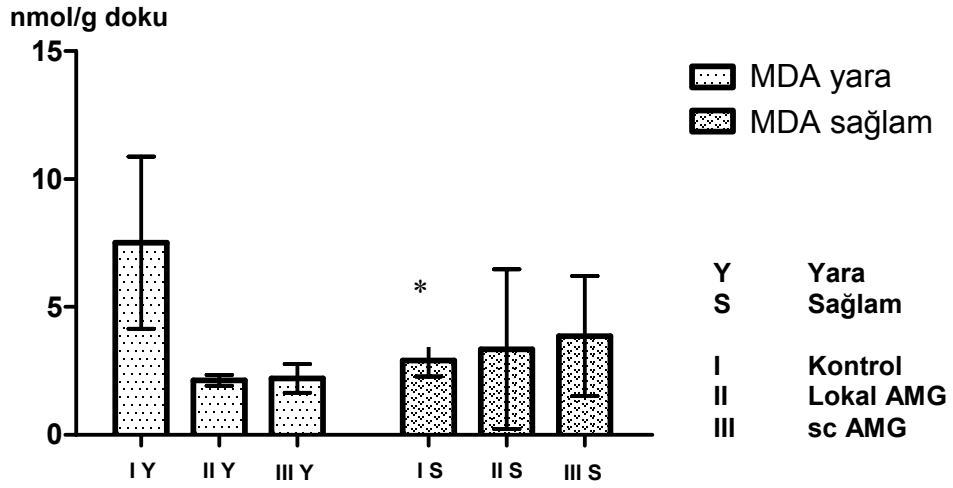
Grafik 3. Kesi yarasında (GI) lokal AMG (G II) ve sc AMG (GIII) uygulamasının yara MDA düzeyleri nmol/gr doku \*:  $p < 0,05$



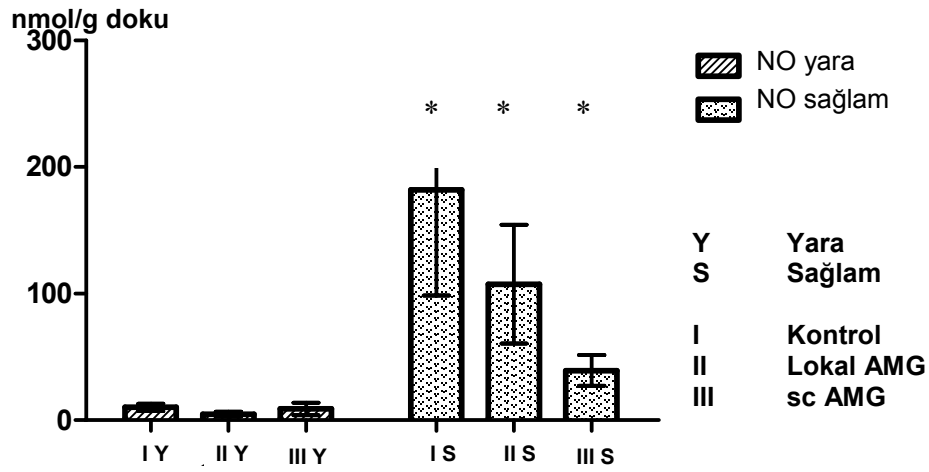
Grafik 4. Kesi yarasında (GI) lokal AMG (GII) ve sc AMG (GIII) uygulamasının yara NOx düzeyleri NOx µmol/gr doku \*:  $p < 0,05$



**Grafik 5. Kesi yarasında (GI) lokal AMG (GII) ve sc AMG (GIII) uygulanmış grupların sağlam ve yara GSH düzeyleri µmol/gr doku \*: p<0,05**



**Grafik 6. Kesi yarasında(GI) lokal AMG (GII) ve sc AMG (GIII) uygulanmış grupların sağlam ve yara MDA düzeyleri nmol/gr doku \*: p<0,05**

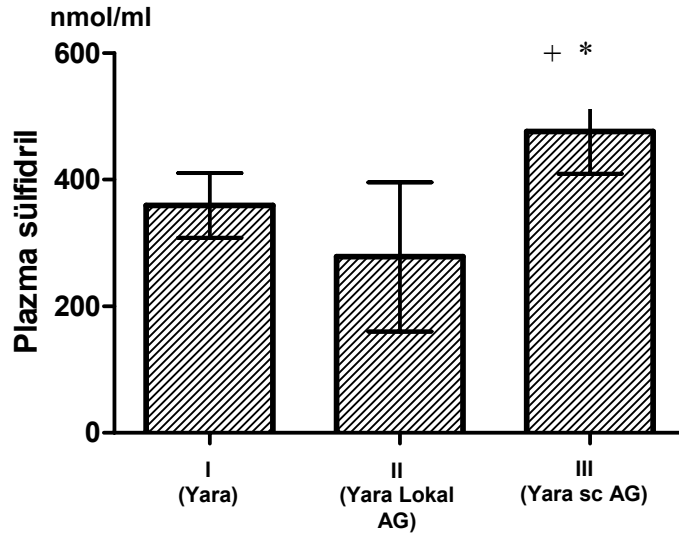


**Grafik 7. Kesi yarasında lokal AMG ve sc AMG uygulanmış grupların sağlam ve yara NOx düzeyleri nmol/gr doku \*: p<0,05**

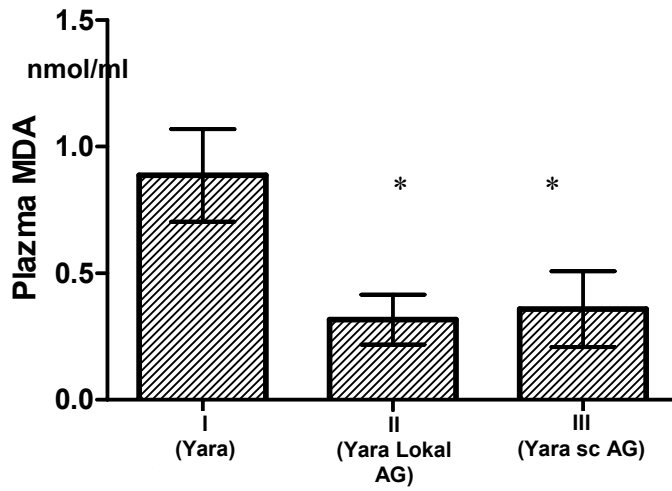
**Tablo 5. Lokal ve sc AMG Uygulamasının tavşan plazma grubu üzerindeki MDA, GSH, NOx değerleri (ortalama ± SS)**

		Kontrol (I)	AMG		p değeri		
			(II) Lokal AMG	(III) SC AMG	I-II	I-III	II-III
MDA nmol/ml	-- X	,89±0,18	,32±0,01	,36±0,15	,000*	,000*	,879
Sülfidril bileşikleri nmol/ml	-- X	359,28±51,11	278,11±117,82	476,43± 67,20	,245	,069	,003
NOx µM	-- X	50,62±14,78	29,0 2±8,15	24,01±11,35	016*	0,04*	,745

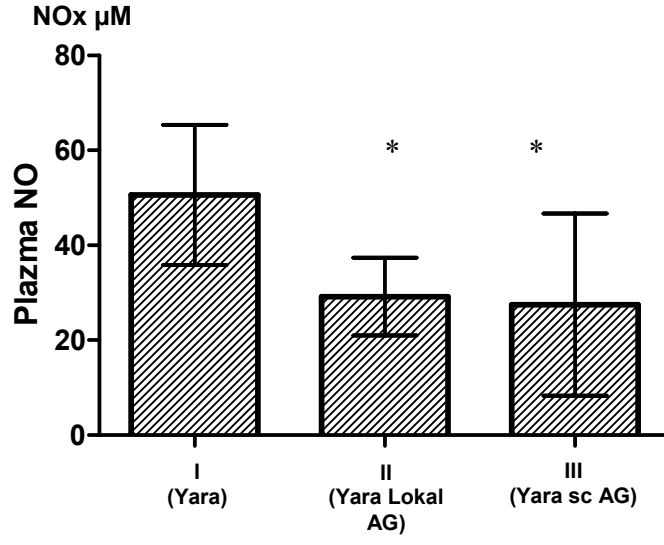
\*: p<0,05



Grafik 8. Kesi yarasında lokal AMG ve sc AMG uygulamasının plazma RSH düzeyleri (nmol/ml) \*\*: p<0,05



Grafik 9. Kesi yarasında lokal AMG ve sc AMG uygulamasının plazma MDA düzeyleri (nmol/ml) \*: p<0,05



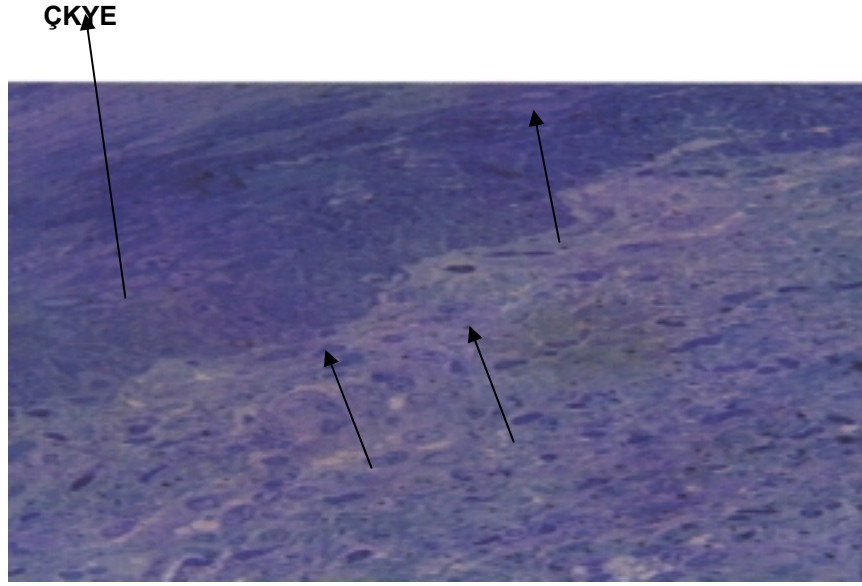
Grafik 10. Kesi yarasında lokal AMG ve sc AMG uygulamasının plazma NOx düzeyleri (NOx µM) \*: p<0,05

#### 4.5. Histolojik Bulgular

Sağlam oral mukoza ile değişik uygulamalar yapılmış deney gruplarına ait karşı taraf kontrol mukozalarının; Masson trikrom ile boyanmış kesitlerinde üstte çok katlı yassı epitel ile altta subepitelyal bağ dokudan oluşan normal yapıda oldukları dikkati çaktı. Subepitelyal bağ dokusunun sirküler, longitudinal ve oblik yönde seyreden kollajen lif demetleri, bağ dokusu hücre çekirdekleri, vasküler yapılar içerdiği görülmekteydi (Resim2-1b). Aynı grubun Toluidin-blue ile boyanmış yarı-ince kesitinde en altta prizmatik şekilli bazal hücreler ile üzerinde poligonal hücrelerin bulunduğu çokkatlı yassı epitel ve alttaki dokuda bağ dokusu hücre çekirdekleri ve kollajen lifler seçilmekteydi(Resim 1-1a). Aynı grubun elektron mikroskopik resminde de altta bazal hücreler, üstte poligonal hücrelerden oluşan çok katlı yassı epitel (ÇKYE) ile altında kollajen liflerden oluşan bağ doku görüldü (Resim 3-1c).

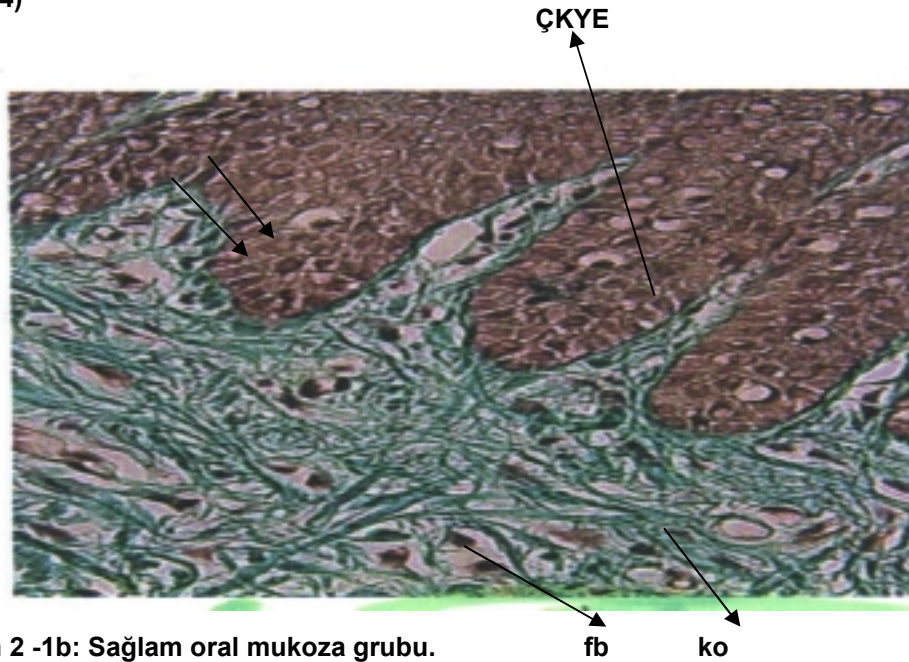
Yara oluşturulmuş oral mukozada; hem ışık mikroskop hem elektron mikroskopik kesitlerde epitel doku bütünlüğünün bozulduğu yara uçları arasında ileri derecede, hemorajik infiltrasyonun bulunduğu görüldü(Resim 4-2a, 5-2b).

Lokal AMG uygulanan grupta,epitel kaybı ile birlikte minimal düzeyde reepitelizasyonun başladığı saptandı(Resim 6-3a, 7-3b). sc AMG uygulanan grupta,diğer gruplara göre belirgin olarak subepitelyal dokuda fibroblast miktarı ve aktivasyonu ile buna paralel olarak kollajen lif yapımındaki artış dikkati çaktı (Resim 8-4a, 9-4b,10-4c).



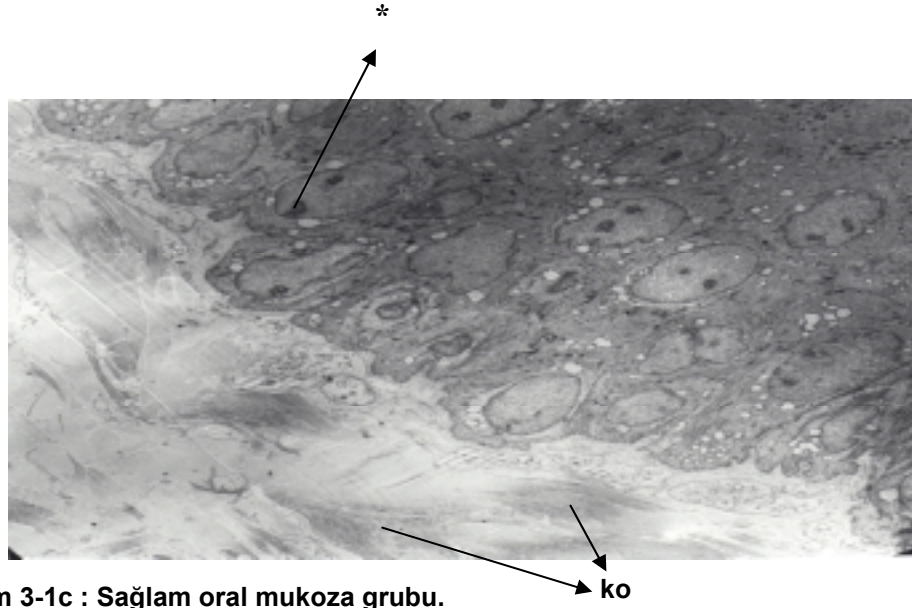
Resim 1-1a: Sağlam oral mukoza grubu.

Üstte çok katlı yassı epitel ile (yukarı ok) altta subepitelyal bağ dokusu. (Toluidin blue x4)



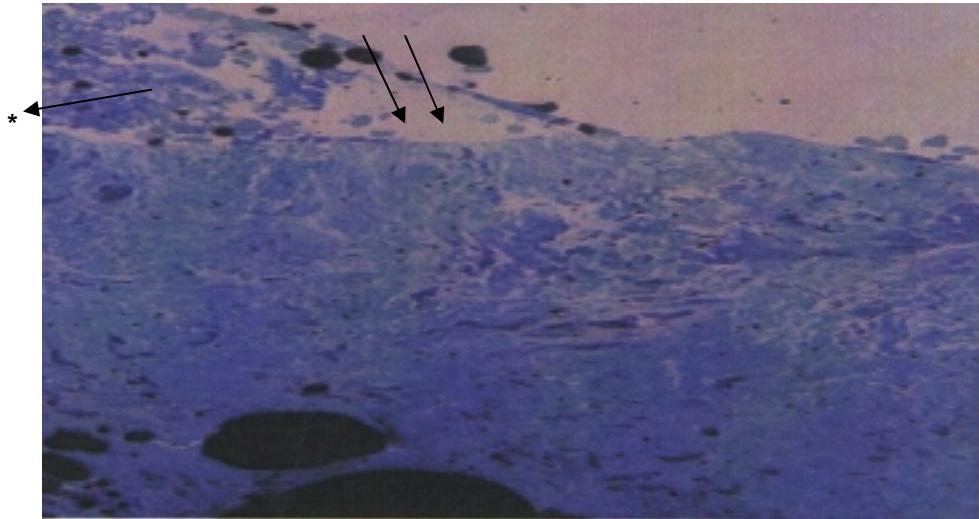
Resim 2 -1b: Sağlam oral mukoza grubu.

Üstte tüm katları ayırt edilebilen çok katlı yassı epitel ile altında farklı yönlerde düzenlenim gösteren kollajen lifler (ko) ve bağ dokusu hücre çekirdekleri, fibroblast ( fb) ayırt edilmekte. (Masson trikrom,x40)



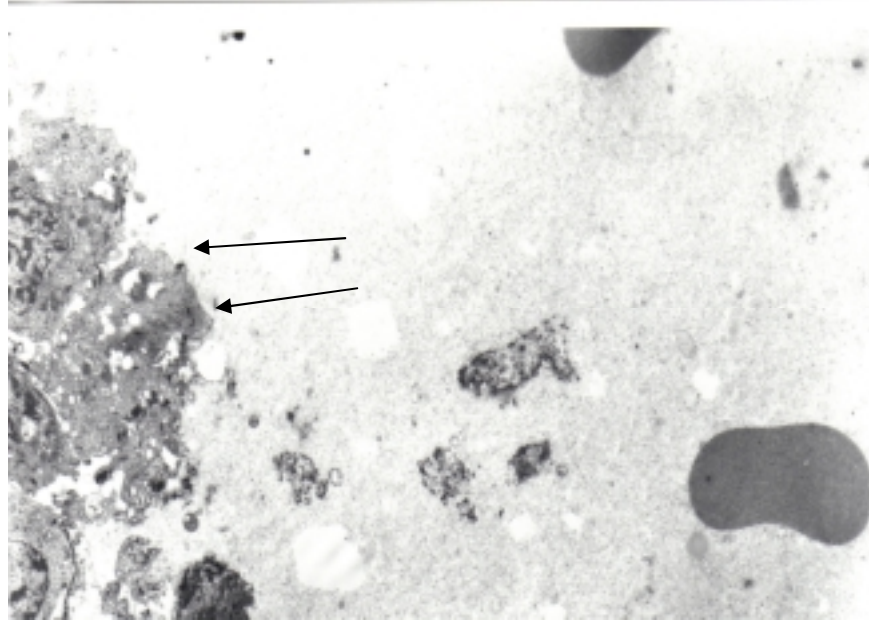
**Resim 3-1c : Sağlam oral mukoza grubu.**

**Altta prizmatik şekilli bazal hücreler(\*) ile üstte giderek poligonal şekle dönüşen epitel hücreleri, altta ince kollagen lifler(ko) bulunduğu subepitelyal doku. (Kurşun sitrat,Uranil asetat x1293)**



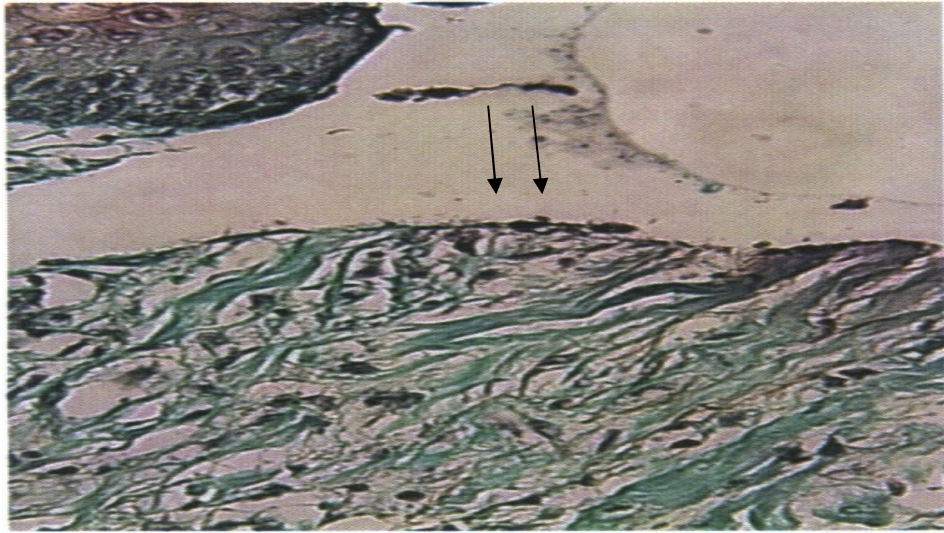
**Resim 4-2a : Yara oluşturulmuş oral mukoza grubu.**

**Epitelyal doku kaybının olduğu (↑↑) ve yara dudakları arasında hemorajik infiltrasyonun (\*)olduğu görülmekte. (Toluidin blue, x4)**



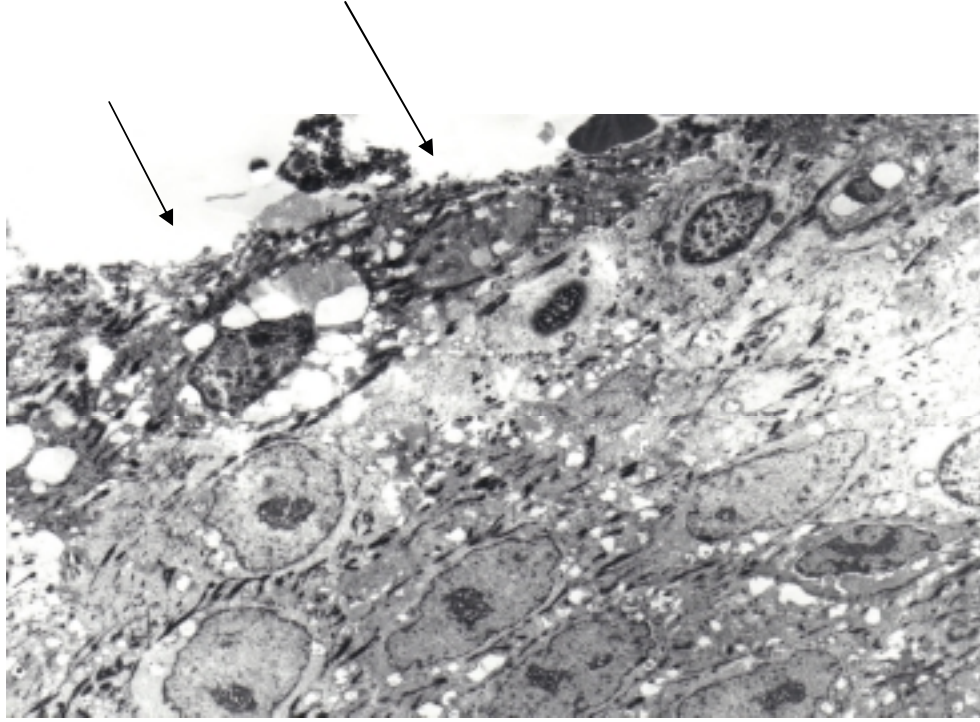
**Resim 5-2b: Yara oluşturulmuş oral mukoza grubu.**

**Aynı grubun ince kesitinde, epitelyal doku kaybı (↑↑) , bütünlüğün bozulduğu ve hemorojik infiltrasyonu olduğu görülmekte. (Kurşun sitrat,Uranil asetat, x2784)**



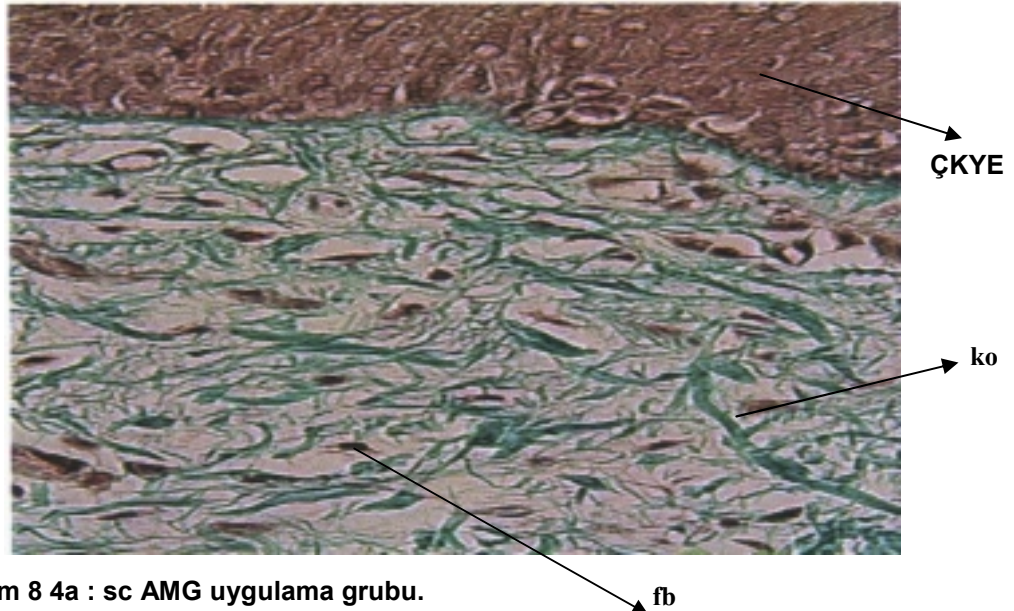
**Resim 6-3a: : Lokal AMG uygulanan grubu.**

**Epitel doku kaybı ile birlikte minimal reepitelizasyon (↑↑) ayırt edilmekte. (Masson trikrom,x10).**



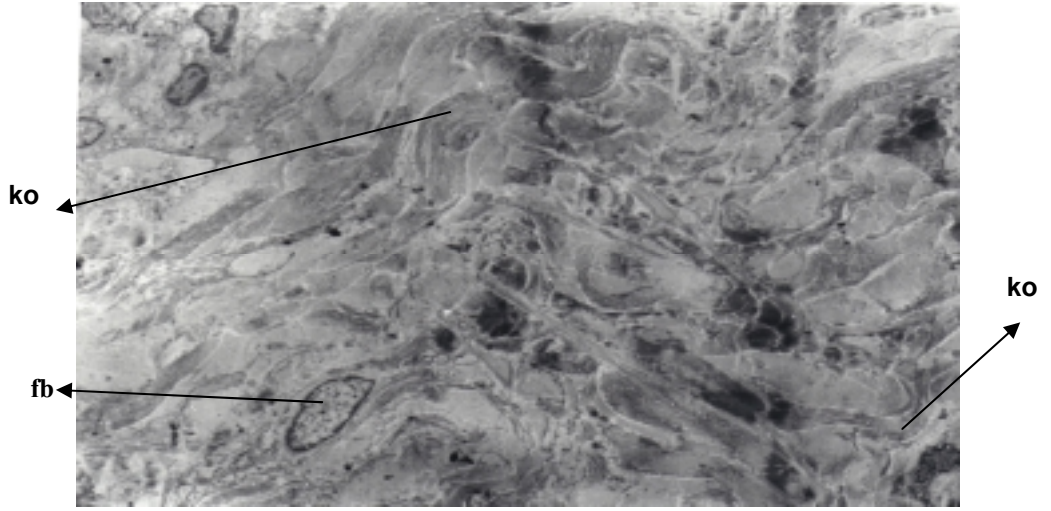
**Resim 7-3b : Lokal AMG uygulanan grup.**

Lokal AMG uygulamasına ait kesitte çok katlı yassı epitelin üst katmanındaki hücrelerde reepitalizasyonun başladığı dikkati çekmekte. (Kurşun sitrat,Uranil asetat x1670).



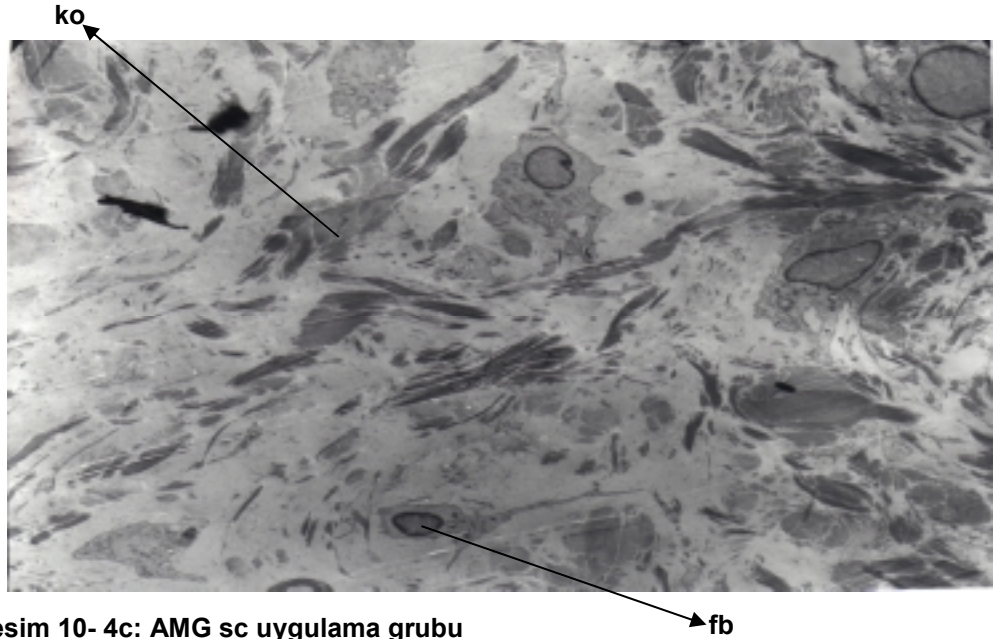
**Resim 8 4a : sc AMG uygulama grubu.**

Epitel ve subepitelyal bağ doku görülmekte, subepitelyal dokudaki fibroblast (fb) proliferasyonu ve artmış kollagen(ko) lif yapımı. (Masson trikrom ,x10). (ÇKYE: Çok katlı yassı epitel)



**Resim 9- 4b : sc AMG uygulama grubu**

sc AMG uygulama grubu aktive fibroblast(fb) kollagen(ko) yapımında artış. (Kurşun sitrat, Uranil asetat x1670).



**Resim 10- 4c: AMG sc uygulama grubu**

Aminoguanidin sc uygulama grubu. Artmış fibroblast aktivitesi (fb) ve kollagen (ko) lif yapımı. (Kurşun sitrat,Uranil asetat,x1670).

Histolojik olarak grupları değerlendirdiğimizde; lokal AMG uygulanan grupta minimal düzeyde reepitalizasyon söz konusu iken, subkütan AMG uygulanan grupta fibroblast aktivasyonunda ve kollajen lif yapımında belirgin artış dikkati çekti.

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda hücresel ve moleküler biyoloji tekniklerinde gerçekleşen hızlı gelişmeler yara iyileşmesinin mekanizmasını daha iyi anlamamızı sağlamaktadır<sup>53</sup>.

İmplantoloji bilim dalı son yıllarda diş hekimliği alanında büyük önem kazanmış olup günümüzde bu konudaki gelişmeler iki yönde ilerlemektedir. Bunlardan birisi implant materyalinin özelliği diğeri de implantın yerleştirilmesinde oluşan doku hasarının çabuk giderilmesidir<sup>1</sup>.

Diş hekimliği uygulamalarında diş çekimi, mukozada kesi yarası ve diş implantı için alveol kemiğine yuva yapılması gibi işlemler sırasında dokuda travma meydana gelmektedir. Ayrıca bu bölgedeki patolojilere bağlı doku hasarı oluşmaktadır. Yara iyileşmesinin sağlanabilmesi kollajen sentezinde artış, epitel oluşumu, yara dokularının birleşmesi gibi olaylar sonunda mümkün olmaktadır<sup>1</sup>.

Yara iyileşmesi ile ilgili araştırmalarda genellikle yaranın hızla normal dokuya dönüşümünü sağlayan şartların ve faktörlerin saptanması amaçlanmaktadır.

Yara iyileşme süreci farklı büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar tarafından düzenlenir. Bu sürecin düzenlenmesinde ROS kadar NO da rol oynar. ROS konakçı savunmasında sürekli olduğu kadar hücre içi sinyalinin de zorunlu mediatörüdür<sup>8</sup>.

Bu çalışmada sc ve PEG'le kombine edilmiş AMG yerleştirildikten sonra yumuşak dokuda oluşturulan kesi yarasının normal iyileşme sürecine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Organizmada sürekli olarak fizyolojik ve patolojik süreçte rol alan ROS özellikle antioksidanlarla dengelenmediği bazı durumlarda or-

ganizma için zararlı olabilmektedir. ROS yara iyileşme sürecinin tüm basamakları ile ilgilidir. Migrasyon, adhezyon, proliferasyon, neovaskülarizasyon, yeniden modellenme ve apoptozis yara iyileşme sürecinde ROS tarafından modüle edilir. Yara iyileşmesi sürecinde inflamatuvar hücreler ROS yapımını artırır ve artmış serbest radikaller lipid peroksidasyona neden olur. Oksidan hasar da lipid peroksidasyon başlıca role sahiptir ve TBARS oluşumuna yol açar<sup>24</sup>.

Yara iyileşme sürecinde ROS un düşük dozda yapımı gereklidir<sup>8</sup>.

Bizim çalışmamızda da kesi yarası (I-yara) grubunun doku MDA düzeyleri, yara yapılmamış (I-sağlam) tarafla karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır. Demling LL ve arkadaşları, sigara inhalasyonuna bağlı plazma lipid peroksidasyonunda artışı göstermişlerdir. Plazma peroksidasyonundaki bu artış akciğer ve karaciğer MDA düzeyi artışı ile koreledir. Doku MDA sı plazma MDA' sı ile paralel seyredir<sup>93</sup>.

Yüksek konsantrasyonlarda bulunan GSH, reaktif oksijen ürünlerine ve toksinlere karşı koruyucudur. Hücrelerin redoks durumu glutatyonun redükte halde korunmasına bağlıdır. Çeşitli stres cevaplarından sorumlu olan GSH aynı zamanda toksinlere karşı savunmada hayati bir role sahiptir<sup>94</sup>.

Oksidatif yaralanmanın derecesi antioksidan-oksidan sistem dengesine bağlıdır. Antioksidanların uygulanması yara iyileşmesinde yararlıdır<sup>5,6</sup>. Kronik yaralarda olduğu gibi akut yaralarda da enzimatik antioksidanların salınımı ile yüksek oksidatif strese bağlı olarak aktiviteleri yükselir. Akut yaralarda artmış oksidatif stres, nonenzimatik antioksidanların azalmasına yol açar. Antioksidanların yaraya eklenmesi hücrelerin oksidatif hasarını önler ve iyileşmeyi arttırır<sup>24</sup>.

Çalışmamızda kesi yarası (I-yara) grubunun doku GSH düzeyleri yara yapılmamış sağlam kontrol (I-sağlam) doku ile karşılaştırıldığında artış anlamlı bulundu.

Sakallıoğlu ve ark.'nın çalışmalarında, periodental yara iyileşmesi boyunca antioksidan enzim aktivitesinin profili sunulmuştur. Doku örnekleri, köpeğin birinci küçük azı ile birinci büyük azı dişleri arasından flap kaldırılarak alınmıştır. 3,12,21 ve 30 ncu günde biopsi yapılan bölgelerden diş eti örnekleri ile GPx, CAT ve SOD belirlenmiştir. Bütün enzim aktivitelerinde üçüncü günde normal değerlerin %100'nden daha fazla artış saptanmıştır<sup>38</sup>.

Serbest radikallerin en önemli sonucu lipid peroksidasyonudur. MDA, lipid peroksidasyonunun nisbeten değişmeyen son ürünüdür. NO demir ve bakır gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit radikalleri ile hızla reaksiyona girmektedir. Bu nedenle oksidatif ve nitrozatif serbest radikal oluşumundan söz edilmekte ve NO varlığında lipid peroksidasyonunun arttığı ileri sürülmektedir<sup>95</sup>.

Yara iyileşmesi sürecinde NO'nun en yüksek düzeylerde olduğu dönem yaklaşık ilk bir haftayı kapsayan inflamatuvar dönemdir. Bu dönemde yara bölgesindeki yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu NO artışından sorumlu tutulmaktadır. Yaralanmayı takip eden ilk beş günde nötrofil ve makrofajların bol miktarda iNOS ekspresyonu gösterdikleri bilinmektedir. Artan NO düzeyleri fibroblastların ve keratinositlerin farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlayarak iyileşmenin proliferatif fazına geçişte önemli bir rol oynar. Proliferatif fazda görev alan hücreler tarafından da NO sentezlenmekle birlikte iNOS ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak yara NO düzeyleri giderek azalır<sup>53</sup>.

Serbest oksijen radikallerindeki artış, doku nekrozları ve hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olur<sup>96</sup>. NO ve O<sub>2</sub> oldukça sitotoksik

peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) radikalini oluştururlar<sup>97</sup>. Bu da lipid peroksidasyonuna neden olur<sup>51</sup>.

NO yara iyileşmesi için gereklidir<sup>54</sup>.

Hiperbarik oksijen tedavisi yara iyileşmesinde ki etkisini NO üzerinden gerçekleştirir<sup>98</sup>.

Ağızda da NO'nun varlığı pek çok fonksiyona etki yapmaktadır. NO oluşumunda non enzimatik olan bir yola son zamanlarda tanınlanmıştır. Tükrük bezlerinde aktif transport bir sistem sayesinde plazma nitratı on katına kadar konsantre edilebilmektedir<sup>45</sup>.

İnsan tkrğinde NO nun taze olarak sekrete edildiği bildirilmiştir<sup>57</sup>.

NOS aktivitesi immünohistokimyasal olarak kemiricilerde, insan diş pulpasında ve periodental dokularında saptanmıştır. NO pulpanın kan dolaşımının düzenlenmesinde önemli rol oynar<sup>99</sup>. Periodontitis olgularında anlamlı bir NO artışı vardır<sup>58</sup>.

Periodontitiste artan NO yapımı iNOS inhibitörü ve peroksinitrit süpürücüsü merkaptoetil guanidin ile inhibe edildiğinde; kemik dekstrksiyonunu ve ekstrevasyonunu azalttığı gözlenmiştir<sup>59</sup>.

NO ve serbest radikaller şitli stres ülserlerinde artar ve NO hücre hasarına yol açar. Liken planus ve aftöz lserasyonunun patogeneğinde NO ve serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır<sup>58</sup>. Yarada ki erken dönem NO kaynağı iNOS dur. Yarada bir gün sonra iNOS gen ekspresyonu northern analizi ile gösterilmiştir<sup>100</sup>. Deri yaralanmasını takip eden 24 saat içerisinde yara dokusunda iNOS ekspresyonu artar, maksimal ekspresyon 1. ve 5. günler arasında gerçekleşir<sup>53</sup>.

Trombosit agregasyonu, sinyal iletimi, oksidatif aktivite gibi bilinen fizyolojik fonksiyonların yanı sıra NO septik şok, hipertansiyon, iskemi / reperfüzyon hasarı ve karsinogenesiz gibi patolojik olaylarla da ilişkilidir. NO permeabilityyi artırır ve yeni damar oluşumunu uyarır. Bu rolü ile tümör gelişiminde de etkilidir. İNOS premalign ve malign mide, kolon, akciğer, özafagusda, prostat ve oral kavite lezyonlarda saptanmıştır. İNOS ekspresyonu periodental hastalıkların gelişimi sırasında lökositlerde gözlenmiştir. Temporomandibular eklem sinoviyal sıvısının da iNOS ekspresyonu gözlenmiştir<sup>101</sup>.

LPS bağlı hasarın önlenmesinde iNOS inhibitörleri tedavi amaçlı kullanılabilir. Özellikle ağız kanser ağrısının ve tümör gelişiminde tedavi yaklaşımı olarak düşünülebilir. NO nun fazla yapımı periodental hastalıkların oluşumunda etkili olmakta ve iNOS inhibitörlerinin kullanılması bu hastalıkların ilerlemesini önlemede etkili olmaktadır<sup>101</sup>.

Aynı zamanda AMG antioksidan ve özelliklede peroksinitrit serbest radikal üretiminin süpürücüsüdür. İntraperioteneal adhezyon modelinde AMG uygulamasının oksidatif stres üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir<sup>64</sup>. Ara ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları bu çalışmada, AMG tedavisi sonrası peritonda MDA, NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşerken, GSH düzeyleri anlamlı olarak artmıştır<sup>66</sup>.

AMG uygulaması, NSAİ ilaçlara bağlı ülser yaralarında iyileşme üzerinde kolaylaştırıcı etki yapmaktadır<sup>78</sup>.

Çalışmamızda Lokal ve subkütan AMG uygulaması yara do-ku MDA düzeyini kesi yarası ile karşılaştırıldığında (Grup I) anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.05$ ).

Bu AMG'nun koruyucu etkisi radikal süpürücü özelliğine bağlanabilir. Bizimle aynı düşüncedeki benzer çalışmalarda göstermiştir ki do-ku yaralanmalarında AMG uygulaması oksidatif stres ve lipit

peroksidasyonunu azaltmaktadır<sup>66, 102 - 104</sup>. Mustafa ve arkadaşları yaptıkları çalışmada farelerde oksidatif stresi indükleyen Paraquat toksitesine karşı AMG'nin etkisini incelemişlerdir. Paraquatla oluşturulan akciğer toksitesinde artan MDA oral AMG tedavisinden (50 mg/kg, içme suyu ile verilmiştir) sonra anlamlı olarak azalmıştır. Yine paraquatla beraber akciğer dokusunda azalan total sülfidril, AMG verilmesinden sonra anlamlı olarak artmıştır<sup>104</sup>.

Yılmaz ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmada kronik safra kesesi tıkanması ile indüklenen karaciğer hasarında AMG'nin koruyucu rolü incelenmiştir. AMG tedavisi (200 mg /kg i.p 14 gün) karaciğer MDA düzeyini düşürmüş GSH düzeyini artırmıştır<sup>66</sup>.

Polat ve arkadaşları sıçanlarda Gentamisine (GEN) bağımlı akut böbrek yetmezliğinde böbrekde oksidatif stresin etkilerini araştırmışlardır. GEN tarafından indüklenen MDA, NO değerlerinde ki artma AMG uygulaması sonucunda azalmıştır. Azalmış GSH-PX, SOD, CAT, GSH değerleri ise AMG tedavi(100 mg/kg i.p.) sonucu artmıştır<sup>103</sup>.

Literatürde AMG uygulaması sonrasında birçok dokuda ve plazmada ölçülen GSH düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır<sup>66,103,104</sup>.

Çalışmamızda lokal ve sc AMG uygulaması yara doku GSH düzeyi artırmakla beraber bu artış anlamlı bulunmamıştır. Ancak sc AMG uygulaması plazma RSH düzeyini Grup I ve Grup II'ye göre anlamlı olarak artırmıştır.

Ara ve ark ise sıçanlarda intraperitoneal adhezyon modelinde peritoneumda artmış NO düzeyini AMG tedavisi sonrasında azalttığını saptamışlardır<sup>64</sup>.

Coşkun ve arkadaşlarının çalışmasında EGF nin yara iyileşmesi üzerine etkisinin TBARS ve NOx değerlerini azaltarak gerçekleştirdiğini ileri sürmektedirler. Bizim de çalışmamızda kullanılan AMG hem TBARS hemde NOx değerleri üzerinde aynı etkiyi göstermiştir<sup>105</sup>.

Cutando ve ark.'nın yaptığı çalışmada diş çekimi sonrasında yara iyileşmesine melatonin etkisi plazmada ve eritrositte araştırılmıştır. Çalışmada yalancı deney grubu plazma lipit peroksidasyon (LPO) ve NO düzeyleri ile eritrosit GPx ve glutatyon redüktaz (GRd) aktiviteleri kontrol grubuna göre artarken eritrosit GSH düzeyleri azalmıştır. Melatonin uygulaması sonrasında plazma LPO ve NO düzeyleri ile eritrosit GPx aktivitesi azalırken eritrosit glutatyon düzeyleri ve GRd aktivitesi artmıştır<sup>106</sup>.

Aminoguanidine lokal ve sistemik inflamasyonların azaltılmasında kullanılabilir. Örneğin periodontitisi azalttığına dair çalışmalar yapılmıştır<sup>65</sup>. Birinci büyük azı dişinin etrafına ligatür yerleştirilmiş farelerde periodontitist oluşturulmuştur. 8 günlük AMG tedavisi oluşan enflamasyonu ve dolayısı ile doku hasarını azaltmıştır. Ligatür ile artmış MDA ve NO yanıtı AMG uygulaması(100 mg/kg,i.p. 8 gün) ile azalmıştır<sup>38</sup>.

Çalışmamızda AMG'nun subkütan ve lokal uygulaması yara dokusundaki NO düzeyinde farklılık yaratmamıştır. Tüm gruplarda sağlam bölgenin NOx düzeyi yara oluşturulmuş taraf ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Plazmada ise hem subkütan hemde lokal AMG uygulaması NOx düzeyini azaltmıştır. Lokal ve subkütan uygulama dozu farklı görülmele beraber lokal uygulamanın yaklaşık 0,3 g'lık bir doku üzerinde etkili olduğu oysa ki subkütan uygulamanın tüm vücuda dağılarak ve metabolize olarak etkili olduğu dikkate alınmalıdır.

Yavuz ve arkadaşları, diabetik ratlardaki yara iyileşmesinde AMG uygulaması ile kollajen yapısını ve TGF-  $\beta$  1 tutulumunu göstermeyi amaçladıkları çalışmalarında; AMG uygulanan gruptaki granülasyon dokusu ve hasarlanmış deride TGF-  $\beta$  1 tutulumunun çok kuvvetli olduğunu,

kollajen liflerinin daha düzenli ve tip-IV kollajen ile boyanmanın kontrol grubu ile benzer olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma da bizim çalışmamızda olduğu gibi, AMG'in yara iyileşmesindeki rolünün, kollajen yapılıması ve organizasyonu üzerinden olduğu ortaya konulmuştur<sup>107</sup>.

Schaffer ve arkadaşları NO'un normal yara iyileşmesinde önemli bir mediatör olduğunu, NO sentezi ile yaradaki kollajen birikimi ve depolanmasının birbirlerine paralel olgular olduğunu ortaya koymuşlardır. Böylece selektif iNOS inhibitörü olan AMG'nin, NO üretimi üzerinden de kollajen sentezi ve depolanmasında rol oynadığı düşünülebilir<sup>75</sup>.

Di Paola ve arkadaşları alveolar kemiği, çevre destek dokuları ve hücreleri etkileyen ve dış kayıplarına yol açan, inflamatuvar reaksiyonla karakterize periodontistin AMG ile tedavisinde gingivomukozal kesitlerde, ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azalttığını göstermişlerdir<sup>65</sup>.

Biz de çalışmamızda AMG grubunda da oral mukozadaki hücre infiltrasyonu ve hemorajinin azaldığını gözlemledik.

Daha önce yaptığımız tavşan ağız kesi yarası çalışmasında PEG uygulamasının kontrolüne göre yara iyileşmesi üzerinde histolojik olarak anlamlı bir fark yaratmadığını gösterdik<sup>1</sup>.

Çalışmamızda histolojik incelemelerde lokal AMG uygulanan grupta minimal düzeyde reepitalizasyon söz konusu iken, sc AMG uygulanan grupta fibroblast aktivasyonunda ve kollajen lif yapımında belirgin artış dikkati çekti.

## 6. SONUÇ

Sonuç olarak; bu çalışmadan elde edilen bulgularla sc AMG uygulamasının kesi yarasına, lokal AMG uygulamasına göre yara iyileşmesinde daha etkili olduğunu saptadık. Bunda uygulanan dozun da etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü lokal ve subkütan uygulama dozları farklıdır. Önemli olan bu uygulamalardan 3 gün sonra biyokimyasal ve histolojik parametreler yönünde farkların oluşmasıdır. AMG dozunun artması iyileşme sürecini olumlu etkilemektedir. Aminoguanidine lokal ve sistemik inflamasyonların azaltılmasında kullanılabilir. Tüm veriler göz önüne alınarak; kesi yarasında sc ve lokal AMG uygulamasının yara iyileşmesinde hem lipid peroksidasyonu hem de NOx düzeyi üzerinden etkili olabileceğini söylemek mümkündür.

Bu çalışmalar, AMG'nin yumuşak doku, kemik, diş ve dental implantlarda yararlı olabileceğini göstermektedir. Fakat etkili kullanımı için ileri çalışmalara gereksinim olduğu, örneğin bir sonraki aşamada yara iyileşmesinin değişik fazlarında yaptığı etkilerin gözlenmesinin uygun olabileceği düşüncesindeyiz.

## 7. ÖZET

### TAVŞANIN AĞIZ MUKOZA KESİ YARA İYİLEŞMESİNDE ANTİOKSİDAN MEKANİZMA VE NİTRAT DÜZEYLERİ

Yara iyileşmesi epitelyal, endotelyal, inflamatuvar hücrelerin, trombositlerin ve fibroblastların bir araya gelerek belli bir sıra ve düzen içerisinde fonksiyonlarını yapmalarıyla gerçekleşir . Reaktif oksijen ürünleri (ROS) olarak adlandırılan, organizmada sürekli olarak fizyolojik ve patolojik süreçte rol alan bu ürünler özellikle antioksidanlarla dengelenmediği bazı durumlarda organizma için zararlı olabilmektedir. ROS yara iyileşme sürecinin tüm basamakları ile ilgilidir. Aminoguanidine (AMG), selektif olarak iNOS aktivitesini inhibe eden antioksidan özellikte, lokal ve sistemik inflamasyonların azaltılmasında kullanılabilen bir maddedir. Bu çalışmada tavşan ağız kesi yarasının iyileşme sürecinde AMG uygulamasının (100 mg/kg/3gün) yumuşak dokuda ve plazma da malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), nitrik oksit (NO) üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

AMG lokal formülasyon ve subkütan (sc) uygulama olarak 2 farklı yoldan verilmiştir. Çalışmada üç grup bulunmaktadır. Grup I ( n=6 ) sağda kesi yarası, Grup II (n=6 )sağda kesi yarası. Lokal AMG (12.7 mg içeren PEG'li boncuklar) Grup III (n=6) sc AMG 100 mg/kg/ 3 gün. Lokal uygulanan polietilen glikol (PEG)'li boncukların kullanılmasında ki amaç kontrollü salımı sağlamaktır.

Tavşanlarda aynı çenenin sol tarafına hiçbir cerrahi işlem yapılmamış ancak kesi yarasının kontrolü olarak doku numuneleri alınmıştır.

Grup I yara doku MDA düzeyleri, yara yapılmamış sağlam (I-sağlam) doku ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $7.50 \pm 3.37$  nmol/gr doku,  $2.90 \pm 0.25$  nmol/gr doku,  $p < 0.05$ ). Çalışmamızda grup II ve III yara doku MDA düzeyleri grup I yara ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı ( $2.13 \pm 0.21$  nmol/gr doku  $2.20 \pm 0.56$  nmol/gr doku,  $7.50 \pm 3.37$  nmol/gr doku,  $p < 0.05$ ).

Grup II ve III plazma MDA düzeyi grup I ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış bulundu ( $0.31 \pm 0.12$  nmol/ml,  $0.36 \pm 0.15$  nmol/ml,  $0.98 \pm 0.18$  nmol/ml  $p < 0.05$ ).

Grup I yara doku GSH düzeyleri yara yapılmamış sağlam (I-sağlam) doku ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $0.76 \pm 0.01$   $\mu$ mol/gr doku,  $0.57 \pm 0.05$   $\mu$ mol/gr doku,  $p < 0.05$ ). Grup II ve III yara doku GSH düzeyleri grup I ile karşılaştırıldığında GSH düzeyi artmış olmakla beraber bu artış anlamlı bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Ancak grup III plazma sülfidril bileşikleri (RSH) grup I ve II ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $476.4 \pm 67.2$  nmol/ml,  $278.1 \pm 117.8$ , nmol/ml,  $359.3 \pm 51.1$  nmol/ml,  $p < 0.05$ ).

Çalışmamızda yara NOx düzeyi gruplar arasında farklılık göstermedi. Ancak grupların sağlam taraflarında grup III gerek grup I gerekse grup II ile karşılaştırıldığında doku anlamlı olarak azalmış bulundu ( $39.24 \pm 12.0$   $\mu$ mol/gr doku,  $181.96 \pm 83$   $\mu$ mol/gr doku,  $107.49 \pm 46$   $\mu$ mol/gr doku  $p < 0.05$ ).

Grup II ve III Plazma NOx düzeyi grup I ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış bulundu ( $29.02 \pm 8.15$   $\mu$ M,  $24 \pm 11.35$   $\mu$ M,  $50.62 \pm 14.78$ ,  $\mu$ M  $p < 0.05$ ).

Histolojik incelemelerde grup II yara dokusunda minimal düzeyde reepitalizasyon söz konusu iken, grup III yarada fibroblast aktivasyonun da ve kollajen lif yapımında belirgin artış dikkati çekti.

Sonuç olarak; bu çalışmadan elde edilen bulgularla sc AMG uygulamasının kesi yarasında lokal AMG uygulamasına göre yara iyileşmesinde daha etkili olduğunu saptadık. Tüm veriler göz önüne alınarak; kesi yarasında sc ve lokal AMG uygulamasının yara iyileşmesinde lipit peroksidasyonu azaltarak yararlı olabileceğini söylemek olasıdır. AMG ile oral mukoza, kemik ve dental implantlar da bu konuda daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Tavşan, kesi yarası, yara iyileşmesi, nitrik oksit, aminoguanidin, oksidatif stres, antioksidan savunma

## **SUMMARY**

### **THE INTERACTION OF ANTIOXIDANT MECHANISM AND NO<sub>x</sub> IN INCISIONAL ORAL MUCOSAL WOUND HEALING OF THE RABBIT**

Wound healing occurs when epithelial, endothelial, inflammatory cells, thrombocytes and fibroblasts come together and act in a predetermined and in an orderly manner to perform their functions. Reactive oxygen substances (ROS), which continually take roles in physical and pathological processes, may become harmful to the organisms in cases where they are not balanced by anti-oxidants. ROS are related to all steps of the wound healing process. Aminoguanidine (AMG), an antioxidant which especially inhibits iNOS activities selectively, is a substance especially used to decrease local and systematic inflammations.

In this study, the goal was to find out effect of AMG application (100 mg/kg 3 days) on malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and nitric oxide (NO<sub>x</sub>) which are found in soft tissue and plasma in the process of cut wound healing located rabbit mouth.

The substance AMG was given in two different manner namely local formulation and subcutan (sc) application. The usage purpose of locally applied (PEG) drops which are containing polyethilen glycol is to make controlled release. There are 3 groups in this study .The first Group I (n=6) with cut-wound at the right-side of the mouth, Group II with cut wound at the right side of the mouth and the group was applied AMG PEG bead containing 12,7 mg and finally third-group Group III , n=6 , with cut-wound at the right side, which was applied PEG with sc AMG 100mg/kg 3 days locally.

No surgical action was performed at the upper-left part of the rabbit jaw however, in order to check and compare the cut-wound in the right-side of the jaw, some tissue sampling procedures were performed at the upper-left part of the jaw.

In our study, MDA levels of wounded-tissues of Group-II and Group-III were lower, when compared to Group-I respectively  $2.13 \pm 0.21$  nmol/g tissue  $2.2 \pm 0.56$  nmol/g tissue,  $7.5 \pm 3.37$  nmol/g tissue,  $p < 0.05$ ).

When group plasma MDA levels were compared, levels of Group-II and Group-III were found to be lower than level of Group-I ( $0.31 \pm 0.12$  nmol/ml;  $0.36 \pm 0.15$  nmol/ml;  $0.98 \pm 0.18$  nmol/ml;  $p < 0.05$ ).

Wounded tissue GSH levels of Group-I, when they were compared to Group-I healthy tissue GSH levels, were increased ( $0.76 \pm 0.01$   $\mu$ mol/g tissue,  $0.57 \pm 0.05$   $\mu$ mol/g tissue,  $p < 0.05$ ).

When compared to Group-I, GSH levels of Group-II and Group-III were found to be slightly increased however this increment was not found to be meaningful ( $p > 0.05$ )

However, when compared Group-I and Group-II results, level of plasma sulfidril compounds (RSH) of Group-III were found to be increased meaningfully( Group-III value  $476.4 \pm 67.2$  nmol/ml; Group-II value  $278.1 \pm 117.8$  nmol/ml ; Group-I value  $359.3 \pm 51.1$  nmol/ml;  $p < 0.05$ )

In our study, NO levels were the same in all groups. However, for the healthy sides of groups, when findings of Group-III were compared to the findings Group-I and Group-II; for the Group-II, NO levels of wounds were found to be decreased meaningfully. Group-III-healthy NOx values,  $39,24 \pm 12,0$  mikromol/gr mikro mol/gr tissue, Group-I-healthy NO vales,  $181,96 \pm 83$  mikromol/gr tissue, Group-II NO values,  $107,49 \pm 46$  tissue;  $p < 0$ , When plasma NOx levels of Group-II and Group-III were

compared to the findings of Group-I, it was found that levels of NO<sub>x</sub> of Group-II and Group-III were in decline meaningfully.( Group-II plasma value 29.02±8.15 mikromolar, Group-III plasma value 24±11.35 mikromolar; Group-I plasma value 50.62±14.78 mikromolar, p<0,05 respectively).

In our study, in histological analysis, minimum level of reepitelisation were observed in the wounded tissue of Group-II, in addition to this finding, it was found that there were important increase in fibroblasts activation and in production of collagen fibrens in Group-III wound.

As result, it was determined that for cut wounds healing process, sc AMG application was more effective than local AMG application.

Based on all results, for cut-wounds, it is possible to state that sc and local AMG applications are very powerful in healing of wounds by reducing lipid peroxidation level. In the areas of oral mucose, bone and dental implants, there is need for more studies related to AMG applications.

**Key words:** Rabbit, incision, wound healing, Nitric oxide, Aminoguanidine, oxidative stres, antioxidant status

## 9. KAYNAKLAR

1. Karataş, F. Epidermal büyüme faktörünün dental implant materyali üzerindeki kesi yara iyileşmesine etkisi. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 1994.
2. Galvez B, Mattias-Roman S, Albar JS et al. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5; 276 (40): 37491-500.
3. Dinçer S. Taurinin yara iyileşmesine etkisi. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 1993.
4. Wlaschek M, Kochanek KS. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Rep Reg* 13; 452-461, 2005.
5. Başak PY, Ağalar F, Gültekin F et al. The effect of thermal injury and melatonin on incisional wound healing. *Ulus Travma Derg.* 9(2); 96-101, 2003.
6. Moseley R, Hilton J, Waddington RJ. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Rep Reg* 12; 419-29, 2004.
7. Özkan F. Deneysel diyabetik sıçanlarda beyin korteksi ve hipotalamusta PSA-NCAM proteininin ekspresyonu ve buna aspirin ve aminoguanidinin etkisi. Yüksek lisans. Elazığ: Fırat Üniversitesi; 2003.
8. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res.* 2008; 58 (2): 165-71.
9. Ohno R, Yokota A, Tanaka A, Takeuchi K. Induction of Small Intestinal Damage in Rats Following Combined Treatment with

Cyclooxygenase-2 and Nitric-Oxide Synthase Inhibitors. J Pharmacol Exp Ther. 2004 ; 310 (2): 821-7.

10. Maguire JJ. Regulation of inflammation and wound healing. Part XI • Chapter 34, 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved. QQ^ Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Medical Scientist, Environmental Energy Technologies Division, Lawrence Berkeley National Laboratory University of California.
11. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2007; 87: 315–424.
12. Wind GG, Rich NM. Cerrahi Tekniğin Temel ilkeleri, Sermet Matbası, S.29,İzmir,1984
13. Erdem C, Çelebi CR. Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi, Ayrıntı Matbaacılık ltd. şti. S. 20-33, Ankara.1996.
14. Çağdaş A, Akın Y, Songür E. Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi, 1. Baskı, 21-61, İzmir, (1988).
15. Gönül B, Erdoğan D, Özoğul C, Koz M, Babül A, Çelebi N. Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice, *Burns*, 21(1), 7-10, (1995)
16. Cohen JK, Crossland MC, Garret RN.A. Diegelman R.F.: Topical application of epidermal growt factor onto partial-thickness wounds in human volunteers does a not enhance reepithelialization, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 96 (2), 251-2544, (1995).
17. Cohen S, Elliot G.A. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isoloted from the submaxillary gland of the mouse, *J. Invest. Derm*, 40, 1-5, (1963).
18. Janquira L.C, Carneiro J, Kelley R.O. Temel Histoloji, seventh edition, 338-339; Barış Kitabevi, İstanbul, (1993).

19. Deodher AK, Raana RE. Surgical physiology of wound healing a review. *Postgrad med*1997; 43(2):52-561, India
20. Pessa, ME, Bland K.I, Copeland EM. Growth factors and detterminants of wound repair, *J. Surg. Res*, 42, 207, 1987.
21. Schilling JA. Wound healing, *Surg. Clin, North Am.* 56, 859-874, (1976).
22. Weigel PH, Fuller G.M, Le Boeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing, *J. Theor. Biol.*, 119, 219-234, (1986).
23. Williamson D. Harding K. Wound healing. *Basic Science*. 2004
24. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. 2005, 57,108-119.
25. Diegelman R.F, Cohen JK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: A review, *Plastic Reconstructive Surgery*, 68, 107-113, (1981).
26. Strodbeck F. Physiology of Wound healing. *Newborn and infant nursing reviews*, Vol1, No 1 (March), 2001:pp 43-52.
27. Halkerston IDK. *Biochemistry*. Williams and Wilkins, Maryland; 1988.
28. Orten J.M, Neuhaus O.W. *Human Biochemistry*. CV. Mosby, Missouri, 1982.
29. Zaragoza C, Balbin M, Lopez–Otin C et al. Nitric oxide regulates matrix metalloprotease. *Kidney Int.* 2002 Mar;61(3): 804-8.
30. Enoch S. Leaper D.J. Basic science of wound healing. *Surgery* 23:2 2005; p37-42.

31. Güleç E G. Epidermal büyüme faktörünün oral submukozal implantla uygulanmasının yara dokusu oksidan olaylarına etkileri. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2006
32. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp dergisi, 2002; 33(2): 110-118.
33. Akbulut KG. "Yaşlanma sürecinde mide mukozasında kaspaz-3 enzim aktivitesi ve melatoninin etkisi", Doktora tezi, G.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-73. TARİH
34. Esterbauer H. Lipid peoxidation products: Formation, chemical properties and biological activities in: Poli G, cheeseman KH, Diamai MV, Slatte TP. Free radicals in liver injury IRL pres limited, Oxford 29-47, 1985
35. Weiss S.J.I. Oxygen, ischemia and inflammation Acta physiol, Acta Physiol Scand Suppl. 1986; 548: 9-37
36. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest. 1990 Jun; 62(6): 670-9.
37. Amstad P, Cerutti P. Genetic modulation of the cellular antioxidant defense capacity. Environ Health Perspect. 1990 Aug; 88: 77-82.
38. Sakallıoğlu U, Aliyev E, Eren Z. Et al. Reactive oxygen species scavenging activity during periodontal mucoperiosteal healing: An experimental study in dogs. Arch Oral Biol. 2005; 50(12):1040-
39. Deneke SM, Fanburg BL. Normobaric oxygen toxicity of the lung N.Engl. J. Med 303:76-87 1980
40. Michiels C, Raes M, Toussaint T, Remodex J. Importance of se-glutathione peoxidase, catalase and Cu/Zn – SOD for cell survival against oxidative stress Free Radical Biol Med 1994;17:235-248.

41. Wlaschek M, Kochanek KS. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Rep Reg* 13; 452-461,2005.
42. Abrahamsson T, Brandt U, Marklund SL. et al. Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium –dependent arterial relaxation, *Circ. Res.* 1992; 70: 264-271.
43. Babich H, Zuckerbraun HL, Hirsch S.T.Blau L. In vitro cytotoxicity of the nitric oxide donor, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine,towards cells from human oral tissue, *Pharmacol Toxicol* 1999; 84(5):218-25.
44. Türктаş H. Astma Patogenezi, Bozkır Matbaacılık, S. ,1996.
45. Erbaş D. Nitric Okside, *Gazi Medical Journal*, 9 (Suppl 1) 1998; S.1-11),.
46. Salvemini D, Masini E, Anggard E, Mannaioni PF, Vane J. Synthesis of a nitric oxide factor from L-arginine by rat serosal mast cells :stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation, *Biochem. Biophys. Commun* 1990; 169: 596-601.
47. İskit AB. Nitrik oksit ve inflamasyon. *Turk Farmakoloji Derneği Serner özetleri.* Mersin; 25 Mayıs 2005, 25.
48. Michael RS, Tantry U, Wesp RAV, Barbul A. Nitric Oxide Metabolism in Wounds, *Journal Of Surgical Reserch*, 1997;71; 25-31.
49. Güven O. Ağız Hastalıkları ve Çene Cerrahisi İmmunolojisi,Feryal Matbaası, S.15-21,Ankara,1994
50. Gülmezoğlu E, Ergüven S. İmmunoloji, Feryal Matbası, Ankara 1994.s.114-170.
51. Weller R. Nitric oxide – a newly discovered chemical transmitter in human skin, *British Journal of Dermatology*, 1997; 137: 665-672.

52. Murrel G.AC. Modulation of tendon healing by nitric oxide, *Inflamm. res.* 1997; 46, 19-27
53. Gülen Ş. "Streptozosin ile diyabet yapılmış sıçanlarda leptin uygulamasının eksizyonel cilt yara dokuları ve plazma nitrik oksit düzeylerine etkisi", Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara. 2003; 1-84.
54. Amadeu TP, Costa AM. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Pathol* 2006; 33: 465–473.
55. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005;26(3): 259-264
56. Bodis S, Hargewoin A. Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva, Joint Center For Radiation Therapy, Harvard Medical School, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts.
57. Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases, *J Oral Pathol Med.* 1999; 28 (8): 355-9
58. Chen S, Wu J, Wang S. An investigation of immunoreactive substances in normal gingival tissue and periodontitis tissue *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 1996 Dec;25(6): 340-2.
59. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature – induced periodontitis in the rat, *Br J Pharmacol* 1998;123(8): 741.
60. Coskun S, Karatas F, Acarturk F, Olmus H, Selvi M, Erbas D. The effect of L-NAME administrations after oral mucosal incision on

wound NO level in rabbit. *Moleküler and Celluler Biocemistry* 2005; 278: 65-69.

61. Sugiyama Y, Kato S, Mitsufuji S, Okanoue T, Takeuchi K. Pathogenic role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS/NOS-III) in cerulein-induced rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2006 Aug; 51(8): 1396-403.
62. Xia W, Wang Y, Appleyard RC, Smythe GA, Murrell GA. Spontaneous recovery of injured Achilles tendon in inducible nitric oxide synthase gene knockout mice. *Inflamm Res.* 2006; 55(1): 40-5.
63. Díez-Fernández C, Sanz N, Alvarez AM, Zaragoza A, Cascales M. Influence of aminoguanidine on parameters of liver injury and regeneration induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol.* 1998 Sep; 125(1): 102-8.
64. Ara C, Karabulut AB, Kirimlioglu H, Yilmaz M, Kirimliglu V, Yilmaz S. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress in an experimental peritoneal adhesion model in rats. *Cell Biochem Funct.* 2006 Sep-Oct;24(5): 443-8.
65. Di Paola R, Marzocco S. , Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S. Effect of Aminoguanidine in Ligature-induced Periodontitis in Rats. *J Dent Res* 2004; 83(4): 343-348.
66. Yilmaz M, Ara C, Isik B, Karadag N, Yilmaz S, Polat A, Coban S, Duzova H. The effect of aminoguanidine against cholestatic liver injury in rats. *Cell Biochem Funct.* 2007 Nov-Dec;25(6): 625-32
67. Yang XH, Zhang LY, Sun SX, Dong SY, Men XL, Jing YL, Zhang YB. The effect of nitric oxide on acute lung injury following ischemia/reperfusion of hind limbs in the rat. *Sheng Li Xue Bao.* 2002 Jun 25;54(3): 234-8.

68. Chen AS, Taguchi T, Aoyama S, Sugiura M, Haruna M, Wang MW, Miwa I. Antioxidant activity of a Schiff base of pyridoxal and aminoguanidine. *Free Radic Biol Med.* 2003 ;35(11): 1392-403
69. Aoki K, Ohmori M, Takimoto M, Ota H, Yoshida T. Cocaine-induced liver injury in mice is mediated by nitric oxide and reactive oxygen species. 1: *Eur J Pharmacol.* 1997;336(1): 43-9.
70. Sun GB, Huang ZH, Sun YG, Yang WY. Intervention with nitric oxide synthase inhibitors for traumatic shock in rats *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2003;23(4): 306-9
71. Görlach C, Hortobágyi T, Benyó Z, Wahl M. Aminoguanidine reduces brain lesion volume after cold injury in the rat. *Pflugers Arch.* 2000;440(2): 309-14
72. Haşçalık S, Çelik Ö, Türköz Y, Cıgremiş Y, Mızrak B, Yoloğlu S. Aminoguanidine ile tedavi edilen rat adneksial torsion 7detorsion modelinde ovarian lipit peroksidasyon ürünleri ve NO düzeyleri. *Turkiye Klinikleri j gynecol Obst* 2004;14: 321-3
73. Doğru-Abbasoğlu S, Balkan J. Kanbağlı Ö. Çevikbaş U. Aykaç-Toker G. Uysal M. Aminoguanidine ve n-Asetilsisteinin Endotoksemik oksidatif sirozlu sıçanlarda karaciğer hasarı, oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi*2004; cilt 5, Ek sayı 1.
74. Ünlüçerçi Y, Bekpınar S, Koçak H. Testis Glutathione Peroxidase and Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activities in Aminoguanidine-Treated Diabetic Rats. *Arch Biochem Biophys.* 2000;379(2): 217-20.
75. Schäffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barbul A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg.* 1999;165(3): 262-7.

76. Dabrowski R, Marczyński A, Styczyński P. The effects of the stimulation of histamine-forming capacity (HFC) and the inhibition of histamine catabolism on tensile strength and collagen content of skin wounds in the rats. *Acta Physiol Pol.* 1983 Jan-Feb;34(1): 91-7.
77. Inoue H, Ando K, Wakisaka N, Matsuzaki K, Aihara M, Kumagai N. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on vascular hyperpermeability with thermal injury in mice. *Nitric Oxide.* 2001 Aug;5(4): 334-42
78. Takeuchi K, Hatazawa R, Tanigami M, Tanaka A, Ohno R, Yokota A. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sci.* 2007 Jan 2; 80(4): 329-36.
79. Bora NS, Sohn JH, Bora PS, Kaplan HJ, Kulkarni P. Anti-Inflammatory Effects of Specific Cyclooxygenase 2,5-Lipoxygenase, and Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Experimental Autoimmune Anterior Uveitis (EAAU). *Ocul Immunol Inflamm.* 2005; 13(2-3): 183–189.
80. Oğul F. Tavşan Yetiştiriciliği ve Hastalıkları, Ankara: 1972;1-38.
81. Louin G, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, Plotkine M, Jafarian-Tehrani M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury: *Neuropharmacology.* 2006; Feb;50(2): 182-90.
82. Soy, Aslan O, Uzun H, Barut S, Igdem A, Belce A, Colak A. Time-level relationship for nitric oxide and the protective effects of aminoguanidine in experimental spinal cord injury.: *Acta Neurochir(Wien).* 2004; Dec;146(12):1329-35.
83. Reece, T.B, Maxey, T.C, Kron, I.L. "A prospectus on tissue adhesives", *Am. J. Surg* 2001; 182 (Suppl 1): 40-44.

84. Boylan JC, Cooper J, Chawhan ZT, Land W, Wade A, Weir RF, Yates BJ. Polyethylene Glycol in Handbook of pharmaceutical Excipients, 209-214, The pharmaceutical press USA, Washington; 1983.
85. Swinyar E.A, Lowenthal W. Pharmaceutical necessities Remington Pharmaceutical Sciences, 1305-1306, Mack printing company, pennsylvania USA;1985.
86. Barone R, Pavaux C, Blin P.C. CuQp. Osteology of The Rabbit, Masson et cie, Paris:1973; 9-162.
87. Kurtel H, Granger D, Tso A, Grisham MB. Vulnerability of intestinal fluid the oxidant stres. Am j Physiol 1992; 263: G573-G578.
88. Selvi M, Karataş F, Coşkun Ş, Erbaş D. Effect of L-NAME Administration on Plasma, HeartTissue NO and MDA.:Turkish Journal of Biochemistry. 2007; 32 (4) ; 160–164.
89. Casini, A., Ferrali M., Pompella A, et al. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice. Am J Pathol 1986; 123: 520 - 531.
90. Taşkıran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pogun S. Sex difference in nitrite/nitrate levels and antioxidant defense in rat brain. Neuro Report 1997; 8: 881-4.
91. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide. 2001 Feb; 5(1): 62-71.
92. Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A and Öz H. The effects of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. Toxicology 1985; 36: 71-76.

93. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*. 2003 Jul 15; 189(1-2): 75-88.
94. Penninckx MA. Short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb Technol*. 2000 1; 26(9-10):737-742.
95. Stamler, JS, Singel, DJ, Loscalzo J. "Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258: 1898-1902.
96. Grace P.A. Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg*, 1994; 81: 637-647.
97. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. "Nitric oxide and oxygen radicals. A question of balance [review]", *FEBS Letters*, 1995; 369: 131-135 .
98. Chandan KS, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780 2008;1348-1361.
99. Silva LP, Issa JP, Del Bel EA. Action of nitric oxide on healthy and inflamed human dental pulp tissue. *Micron*. 2008 Oct;39(7): 797-801
100. Lee RH, Efron D, Tantry U, Barbul A. Nitric oxide in the Healing Wound: A time-Course study. *J Surg Res*. 2001 Nov;101(1): 104-8.
101. Keklikoglu N, Koray M, Kocaeli H, Akinci S. iNOS Expression in Oral and Gastrointestinal Tract Mucosa. *Dig Dis Sci* 2008 53: 1437–1442
102. Ihm SH, Yoo HJ, Park SW, Ihm J. Effect of aminoguanidine on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*. 1999 Sep;48(9): 1141-5.

103. Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S, Colak C, Vardi N, Ucar M, Emre MH. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem.* 2006;108(5): 365-71
104. Mustafa A, Gado AM, Al-Shabanah OA, Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine against paraquat-induced oxidative stress in the lung of mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002 Jul;132(3): 391-7.
105. Coskun S, Gulec EG, Balabanli B, Acarturk F. Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing: a time-course study. *Surg. Today* 2007; 37: 570-574.
106. Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3): 576-83.
107. Yavuz D, Tuğtepe H, Cetinel S, Uyar S, Kaya H, Haklar G, Civelek S, Deyneli O, San T, Burçak G, Akalin S. Collagen ultrastructure and TGF-beta1 expression preserved with aminoguanidine during wound healing in diabetic rats *Endocr Res.* 2005;31(3): 229-43.

## 10.EKLER



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
REKTÖRLÜĞÜ  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

27/12/2007

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/45-2024  
KONU:

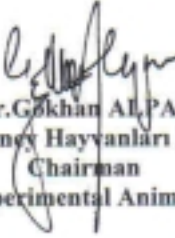
Sayın  
Doç.Dr.K.Gonca AKBULUT  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.068 kod numaralı ve "Tavşan ağız mukoza kesi yara iyileşmesinde antioksidan mekanizma ve NO ilişkisi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

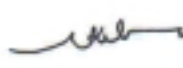
Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.068 and entitled "The interaction of antioxidant mechanism and NO in incisional oral mucosal wound healing of the rabbit" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

  
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN  
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı  
Chairman  
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

  
Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

  
Prof.Dr.Nedret KILIÇ

  
Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

  
Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

  
Uzman Dr.Şeyda DİKER

## 11.ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** : Fehmi

**Soyadı:** : Karataş

**Doğum Yeri ve Tarihi** : Bafra, 13.10.1962

**Eğitimi:**

**Bilim Uzmanlığı:**1998, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fiziyo-  
ji A.D. Ankara

**Lisans:** 1994, Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Eskişehir

**Lisans:** 1987, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ankara

**Yabancı Dili** : İngilizce

**Çalışmaları :**

1- Gönül B,Karataş F, Özoğul C, Gelir E, Acartürk F. Effect of epidermal growth factor on titanium implanted oral mucosal wound healing in the rabbit. Gazi Medical Journal 2003;14:97-102

2- Coşkun Ş, Karataş F, Acartürk F, Olmuş H, Selvi M, Erbaş D. The effect of L-NAME administrations after oral mucosal incision on wound NO level in rabbit. Mol Cell Biochem. 2005 Oct; 278(1-2):65-9.

3- Selvi M, Karataş F, Coşkun Ş, Erbaş D. Effect of L-NAME Administration on Plasma, Heart Tissue NO and MDA Levels in Rabbit [Tavşanda L-NAME Uygulamasının Plazma, Kalp Dokusu NO ve MDA Seviyelerine Etkisi] Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2007; 32 (4); 160–164.

## 12.TEŞEKKÜR

Fizyoloji eğitimim süresince bana her konuda göstermiş oldukları desteklerden ötürü başta danışmanım Doç. Dr. Gonca Akbulut olmak üzere, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Deniz Erbaş ve değerli hocalarım Prof. Dr. Bilge Gönül, Prof. Dr. Aydan Babül, Prof.Dr. Lamia Pınar, Prof. Dr. Sibel Dinçer, Prof.Dr. Eser Öz Oyar ve Doç. Dr. Çiğdem Özer'e şükranlarımı sunarım. Yine dış hekimliğinde öğrenciliğim sırasında derslerimize giren ve bizlere fizyolojiyi sevdiren Ankara Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr Emine Koç'a teşekkür ederim. Ayrıca Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Bölümü öğretim Üyesi Prof.Dr. Suna Ömeroğlu, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Füsün Acartürk, Hacettepe Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Ethem Gelir, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İstatistik bölümünden Prof.Dr. Semra Erbaş ve Araş. Gör. Hülya Olmuş'a verdikleri destekten dolayı da teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca yanımda olan ve beraber çalıştığım değerli arkadaşlarım Dr. Şevin Güney, Araş. Gör. A. Şebnem İlhan, Dr. Zuhâl Yıldırım ve benden desteklerini esirgemeyen aileme de teşekkür ederim.