

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KETAMİN VE TİYOPENTAL SODYUM ANESTEZİSİNİN
SIÇANLARDA YARA İYİLEŞMESİ İLE
İLİŞKİLENDİRİLMİŞ GENLERİN MRNA PROFİLLERİ
ÜZERİNDEKİ ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

MUHAMMED AKİF ALTUN

**DANIŞMAN
PROF.DR. İLHAN ONARAN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü TIBBİ Anabilim Dalı TIBBİ BİYOLOJİ Programında MUHAMMED AKİF ALTUN tarafından hazırlanan Ketamin ve Tiyopental Sodyum Anestezisinin Sıçanlarda Yara İyileşmesi İle İlişkilendirilmiş Genlerin mRNA Profilleri Üzerindeki Rolünün Değerlendirilmesi " başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

04 / 01 / 2016

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr.İlhan ONARAN Danışman	Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji A.D
2.Prof.Dr.Mehmet GÜVEN	Cerrahpaşa Tıp Fak.Tıbbi Biyoloji A.D
3.Y.Doç.Dr.Yasemin M.OLTULU	Biruni Ü.Sağ.Bil.F. Beslenme ve Diyet.Böl.
4.	
5.	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MÜHAMMED AKİF ALTUN

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve hoşgörülerini esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turgut ULUTİN ve değerli öğretim üyelerine,

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, eğitim sürecimde çok büyük emeği geçen, değerli danışman hocam Prof. Dr. İlhan ONARAN'a,

Moleküler deneylerim esnasında tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Onur BAYKARA'ya,

Hayvan deneyleri ve diğer süreçlerde bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Hülya ARKAN'a,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakar anne ve babama,

İsmini sayamadığım ve bugünlere gelmemde emeği geçen kardeşlerime, akrabalarım, arkadaşlarıma ve hocalarıma,

Desteğini hayatımın her anında arkamda hissettiğim sevgili eşim ve neşe kaynağımız biricik oğluma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 156.2015-YL-35/2709

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DERİ	3
2.1.1. Epidermis.....	4
2.1.2. Dermis	4
2.1.3. Hipodermis	5
2.2. YARA İYİLEŞMESİ.....	5
2.2.1. İnflamasyon fazı.....	6
2.2.2. Proliferasyon fazı	10
2.2.3. Olgunlaşma fazı	13
2.3. YARA İYİLEŞMESİ SÜRECİNDE GÖREVLİ GENLER	14
2.4. KULLANILAN ANESTEZİKLER.....	17
2.4.1. Ketamin	17
2.4.2. Tiyopental Sodyum.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Hayvan Deneyleri	22
3.2. Moleküler Çalışmalar	24
3.2.1. RNA izolasyonu.....	24
3.2.2. RNA Konsantrasyonunun Ölçümü	25
3.2.3. cDNA eldesi	25

3.2.4.RT ² Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
3.2.5.İstatistiksel Analizler.....	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. 3. Gün Yara İyileşmesine ait Bulgular.....	32
4.1.1. Ketamin Grubuna ait Bulgular.....	32
4.1.2. Tiyopental Sodyum Grubuna ait Bulgular	32
4.2. 7. Gün Yara İyileşmesine ait Bulgular.....	33
4.2.1. Ketamin Grubuna ait Bulgular.....	33
4.2.2. Tiyopental Sodyum Grubuna ait Bulgular	34
4.3. 14. Gün Yara İyileşmesine ait Bulgular.....	35
4.3.1. Ketamin Grubuna ait Bulgular.....	35
4.3.2. Tiyopental Sodyum Grubuna ait Bulgular	36
4.4. Tüm günlere ait Bulguların Venn şeması ile gösterilmesi.....	37
5.TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	45
ETİK KURUL KARARI.....	52
ÖZGEÇMİŞ	53

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Hemostatik faktörlerin ve trombositlerden salgılanan faktörlerin işlevleri.....	8
Tablo 3-1: Kullanılan Kitler	20
Tablo 3-2: Kullanılan Cihazlar	20
Tablo 3-3: cDNA sentezi PZR içeriği	25
Tablo 3-4: Çalışılan genlerin sembolleri ve açılımları.....	26
Tablo 3-5: RT ² -PZR içeriği	27
Tablo 3-6: RT ² -PZR koşulları.....	28
Tablo 3-7: Plate içerisinde genlerin yerleşimi	28
Tablo 4-1: Çalışılan tüm genlerin kat değişimi değerlerinin gösterilmesi	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Deri yapısı ve deri ekleri	3
Şekil 2-2: Epidermisin tabakaları.....	4
Şekil 2-3: Deride kısmi kat ve tam kat yara	5
Şekil 2-4: Yara iyileşme dönemleri.....	6
Şekil 2-5: Hemostaz	7
Şekil 2-6: İnflamasyon	9
Şekil 2-7: Proliferasyon.....	10
Şekil 2-8: Olgunlaşma	13
Şekil 2-9: Ketaminin kimyasal yapısı	18
Şekil 2-10: Tiyopental sodyumun kimyasal yapısı	19
Şekil 3-2: Sıçanların sırtına dairesel yaraların oluşturulması	23
Şekil 3-3: Sıçanlara pansuman yapılması.....	23
Şekil 3-4: Doku homojenizasyonu	25
Şekil 4-1: Amplifikasyon eğrilerinden bir örnek	30
Şekil 4-2: Ketamin grubu için 3. gün gen profillemeye çalışmasının saçılım eğrisi.....	32
Şekil 4-3: Tiyopental sodyum grubu için 3. gün gen profillemeye çalışmasının saçılım eğrisi	33
Şekil 4-4: Ketamin grubu için 7. gün gen profillemeye çalışmasının saçılım eğrisi.....	34
Şekil 4-5: Tiyopental sodyum grubu için 7. gün gen profillemeye çalışmasının saçılım eğrisi	35
Şekil 4-6: Ketamin grubu için 14. gün gen profillemeye çalışmasının saçılım eğrisi.....	36
Şekil 4-7: Tiyopental sodyum grubu için 14. gün gen profillemeye çalışmasının saçılım eğrisi	37
Şekil 4-8: Ketamin grubunun ekspresyon değişimlerinin tüm günler için venn şeması ile gösterilmesi.	37
Şekil 4-9: Tiyopental Sodyum grubunun ekspresyon değişimlerinin tüm günler için venn şeması ile gösterilmesi	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ECM	Ekstrasellüler Matriks
MMP	Matriks Metalloproteinaz
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktörü alfa
HCl	Hidroklorik Asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
Actc1	Kardiyak aktin alfa 1
AP-1	Aktivatör protein 1
Angpt1	Anjiyopoetin 1
Ccl7 (Ppbp)	Kemokin (C-C motif) ligand 7
Cd40lg	CD40 ligand
CD62L	L selektin
Col14a1	Kollajen, tip XIV, alfa 1
Col1a1	Kollajen, tip I, alfa 1
Col1a2	Kollajen, tip I, alfa 2
Col3a1	Kollajen, tip III, alfa 1
Col4a1	Kollajen, tip IV, alfa 1
Col4a3	Kollajen, tip IV, alfa 3
Col5a1	Kollajen, tip V, alfa 1
Col5a3	Kollajen, tip V, alfa 3
Csf3	Koloni uyarıcı faktör 3 (granülosit)
Ctsk	Katepsin K
Cxcl1	Kemokin (C-X-Cmotif) ligand 1(melanoma büyüme uyarıcı aktivitesi)
Cxcl3	Kemokin (C-X-C motif) ligand 3
Egf	Epidermal büyüme faktörü
Fgfr2	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2
Hbegf	Heparin-bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü
Hgf	Hepatosit büyüme faktörü
Ifng	Interferon gamma
Igf1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
Il1b	İnterlökin 1 beta

Il2	Interlökin 2
Il6	Interlökin 6
Itga3	Integrin, alfa 3
Itga5	Integrin, alfa 5 (fibronektin reseptör, alfa polipeptid)
Itgb5	Integrin, beta 5
Mapk3	Mitojen aktif protein kinaz 3
Mif	Makrofaj göç inhibisyon faktör
Mmp2	Matriks metalloproteinaz 2
Mmp7	Matriks metalloproteinaz 7
Mmp9	Matriks metalloproteinaz 9
Muc1	Müsin 1
NFk- β	Nükleer Faktör kappa beta
Pdgfa	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü alfa
Smad7	Smad protein ailesi üyesi 7
Stat3 (PIAS)	Sinyal taşıyıcı ve transkriptin 3 aktivatörü
Tgfbr1	Transforme edici büyüme faktörü, beta reseptör 1
Wnt5a	Kanatsız tip bütünleyici gen ailesi 5A
Hprt1	Hipoksantin fosforibozil transferaz
G6pd	Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
B2m	Beta 2 mikroglobulin
Act β	Aktin beta

ÖZET

Altun, M.A. Ketamin ve Tiyopental Sodyum anestezisinin sıçanlarda yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş genlerin mRNA profilleri üzerindeki rolünün değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2016.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda yara iyileşmesiyle ilişkili yaklaşık 100 adet gen tespit edilmiş olmakla birlikte bu süreçteki gen ve protein düzeyindeki düzenlemelerin nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Mekanizmayı çözmek amacıyla çoğunlukla hayvan çalışmaları yapılmakta ve bu çalışmalar anestezi altında gerçekleştirilmektedir. Kullanılan anestezikler arasında öne çıkan iki bileşik ketamin ve tiyopental sodyumdur. Son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalar bu anesteziklerin yara iyileşmesi sürecinde rolü olan bazı moleküllerin aktiviteleri üzerinde değişiklik yapabildiğini göstermektedir. Ancak literatürde bu bileşiklerin yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş genlerin ekspresyonları üzerinde etkisini irdeleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda ketamin ve tiyopental sodyum anesteziklerinin kullanılmasının, yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş öne çıkan bazı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmaktır. Bu amaç doğrultusunda Wistar Albino sıçanların sırt bölgesinde yara oluşturuldu. Tedavi gruplarına yaralanma esnasında ve yaralanma sonrası 3, 7 ve 14. günlerde belirlenen anestezikler uygulandı ve yara dokuları alındı. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak 43 farklı genin ekspresyon seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Gerçek zamanlı PZR sonuçlarımız, analizi yapılan 43 genden ketamin uygulanan gruptaki örneklerde 3. günde 3 farklı genin, 7. günde 3 farklı genin, 14. günde ise 11 farklı genin ekspresyon seviyelerinin 5 kat ve üzeri değiştiğini göstermiştir. Tiyopental sodyum uygulanan grupta ise 3 ve 7. günlerde 9 farklı genin, 14. günde ise 12 farklı genin ekspresyon seviyelerinin 5 kat ve üzeri değiştiği görülmüştür. Çalışmamızın sonuçları ışığında, hayvanlar üzerinde yapılan yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılan bu iki anestezi maddenin yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş bazı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi olduğunu ve bunun araştırmacılar tarafından göz önünde bulundurulmasının önemli olacağını söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Yara iyileşmesi, Anestezi, Gen ekspresyonu, Ketamin, Tiyopental sodyum

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 156.2015-YL-35/2709

ABSTRACT

Altun, M.A. Evaluation of the role of ketamine and thiopental sodium anesthesia on the mRNA profiles of genes related to wound healing in rats. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul. 2016.

There are approximately 100 genes related to wound healing in literature. It is unknown that how the regulation of genes and proteins occur during wound healing. To explain these regulations, researchers use anesthetised experimental animals. Ketamine and thiopental sodium are prominent anesthetics in these studies. Recent studies show that these anesthetics change the activity of some molecules which have a role in wound healing. However we do not see a study in literature about the effect of these anesthetics on the expression of genes related to wound healing. We aim to explain the effects of these anesthetics on expression of some genes related to wound healing in rats. For this purpose, full thickness wounds was created on Wistar Albino rats dorsum. Anesthesia was applied to the treatment group while wounding and 3, 7 and 14 days after wounding. Wound tissues were collected in these days. After RNA isolation and cDNA synthesis the expression rates were compared between control and treatment group for 43 genes by using RT²-PCR array. In ketamine group expression levels of 3 genes changed on 3rd day, 3 genes changed on 7th day and 11 genes changed on 14th day. In thiopental sodium group the number of genes were 9, 9 and 12, respectively. Change in expression was accepted in case of 5 or more fold changes. We can conclude that two anesthetics effect the expression of genes related to wound healing and researchers should take into consideration this factor while wound healing studies.

Key Words: Wound healing, Gene expression, Anesthesia, Ketamine, Thiopental Sodium

The present work was supported by the ÖYP of Istanbul University. Project No: 156.2015-YL-35/2709

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri bütünlüğünün travmatik sebeplerle bozulması ile vücutta yara oluşur. Bu dokuyu tekrar eski haline getirmek için oluşan doku cevabı ile yara iyileşmesi süreci başlar. Yara iyileşmesi, hücresel ve biyokimyasal olayların karşılıklı etkileşimini içeren patofizyolojik ve multifaktöriyel bir süreçtir. Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda; keratinosit, fibroblast, endotel, makrofaj ve trombositleri içeren birçok hücrenin rol aldığı bir süreç başlar. Bu hücrelerin migrasyon, infiltrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyonu ile yeni doku formasyonu oluşur ve sonuçta yara kapanır (6).

Yara iyileşmesi birbiriyle bağlantılı üç fazdan oluşan kompleks bir süreçtir. Bunlar; inflamasyon fazı, fibroplazi fazı ve olgunlaşma fazıdır. Bu fazların her biri; hücrelerin büyüme, farklılaşma ve metabolizmasını kontrol eden polipeptid yapıda büyüme faktörleri ile düzenlenir (12). Bunlar arasında sitokinler gibi sinyal proteinleri ve NF κ - β (Nükleer Faktör kappa beta) gibi, sitokinleri üreten genleri aktive eden hücre içi proteinler vardır (13, 70). Bu süreç içerisinde çok sayıda proteinin ekspresyonunda azalış ve artış olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda array analiziyle yara bölgesinde erken evre gen profili yapmak suretiyle yaklaşık 100 genin eksprese edildiği gösterilmiştir (46). Bununla birlikte yara iyileşme sürecindeki gen ve protein düzeyindeki düzenlemelerin nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle günümüzde bu konu üzerinde çalışan çok sayıda araştırma grubu bulunmaktadır.

Literatüre baktığımızda çoğunlukla deney hayvanları ve kültür çalışmaları ile konu açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmaların önemli ayaklarından birini de gen ekspresyon çalışmaları oluşturmaktadır. Gen ekspresyonu çok dinamik bir süreç olup, çok çeşitli faktörlere akut veya kronik maruz kalma ile değişebilen bir süreçtir. Yara iyileşmesi sürecinde çeşitli ilaçların ve iyileşmeyi kolaylaştıracak bileşiklerin ekspresyon profillerini değiştirdiğini gözlemleyen çalışmalar bulunmaktadır (46).

Hayvan deneyi çalışmalarında yara modeli uygulaması, anestezi altında yapılmaktadır. Kullanılan anestezikler arasında iki bileşik öne çıkmaktadır. Bunlar intraperitoneal (karın içi) olarak uygulanan ketamin ve tiyopental sodyum maddeleridir. Bu maddeler deneysel çalışmalarda yara iyileşmesi evrelerinin incelenebilmesi amacıyla yaradan biyopsi alınmadan önce kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmada kullanılan hayvanlar 3-5 kez bu anesteziklere maruz kalmaktadırlar.

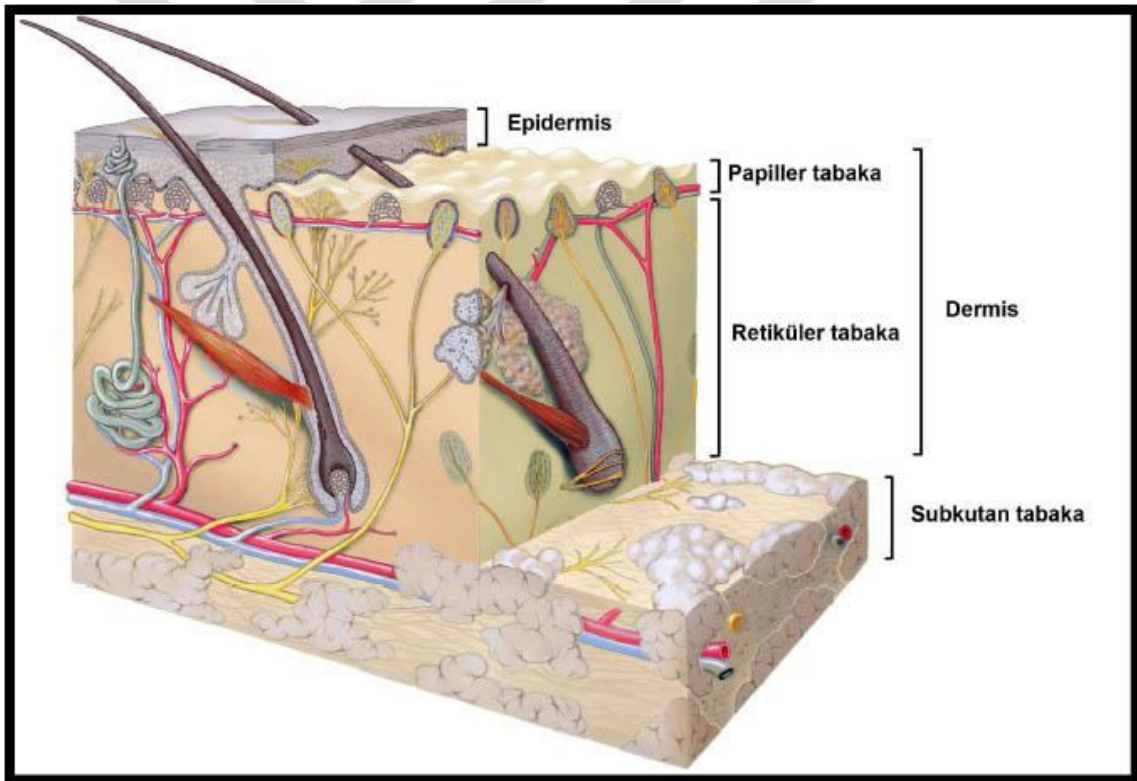
Öte yandan son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalar bu anesteziklerin yara iyileşmesi sürecinde rolü olan bazı moleküllerin aktiviteleri üzerinde değişiklik yapabildiğini göstermektedir. Bunlar arasında makrofajlar ve nötrofiller gibi hücreler ve sitokinler gibi yara iyileşmesinin çeşitli fazlarında etkinliği olan moleküller söylenebilir (46, 71-74). Bu bilgiyle birlikte, gen ekspresyonunun hücrelerde, dokularda ve hatta organizmada içsel ve dışsal faktörlerden etkilendiği bilgisi dikkate alınır, sözü edilen anesteziklerin uygulanmasının da yara ve mikroçevresinde kendilerinin bireysel olarak gen ekspresyonunu değiştirip değiştirmediği sorusu ortaya çıkmaktadır. Eğer bu anestezikler hücrenin gen ekspresyonu yanıtlarını etkiliyorsa, gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalarda bu bileşiklerin kullanılması interferans verici bir etken oluşturabilir. Ancak literatürde, her iki anestezik maddenin yara iyileşmesine etkisi olduğu bilinen genlerin ekspresyonları üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar göze çarpmamaktadır. Dolayısıyla sözü edilen soruyu yanıtlayacak bir çalışma, her iki anestezik maddenin kullanımından elde edilmiş, edilecek veya planlanan çalışmaların değerlendirilmesine farklı bir bakış açısı getirebilir.

Bu özet bilgiler doğrultusunda çalışmanın amacı, sıçanlarda ketamin ve tiyopental sodyum anesteziklerinin kullanılmasının yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş öne çıkan bazı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak suretiyle, bu bileşiklerin anestezi dışındaki olası etkilerini değerlendirmek, yara iyileşmesi sürecinde rol oynayan moleküller üzerinde etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DERİ

Deri, yetişkin bireyde yaklaşık 10 kg ağırlığında, vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını kapsayan büyük bir organdır. Yüzey alanı 1.5-2 m² civarındadır. Canlıdan canlıya derinin renk, esneklik, kalınlık ve doku yapısı farklılık göstermektedir. Derinin bu özellikleri kişinin yaşına, cinsiyetine ve bulunduğu anatomik bölgeye göre değişiklik göstermektedir. En önemli görevleri; vücut ısısının korunması, dış ortam ile su alışverişinin düzenlenmesi, solunum ve organizmayı dış etkenlerden korumaktır (1-3). Deri; epidermis, dermis ve hipodermis (subkutan tabaka) olmak üzere üç farklı doku tabakasından oluşmaktadır (Şekil 2-1).

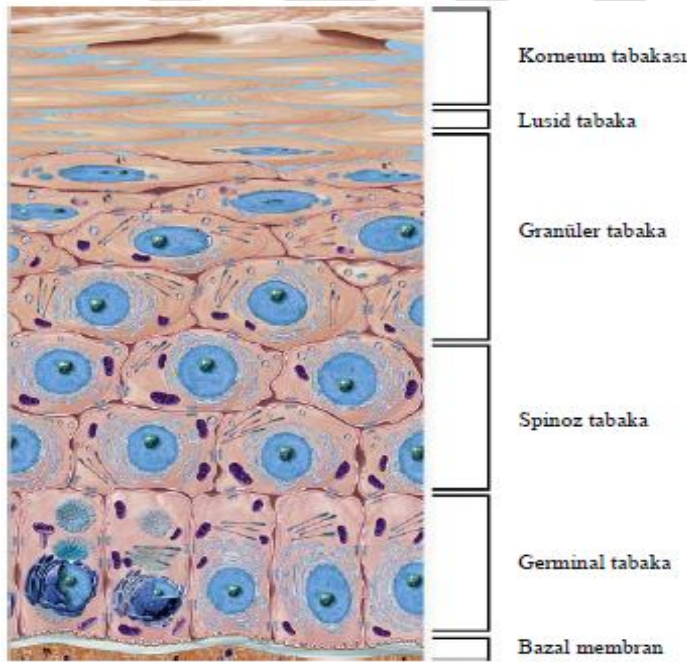


Şekil 2-1: Deri yapısı ve deri ekleri (4)

2.1.1. Epidermis

Çoğunluğu keratinositler olmak üzere langerhans hücreleri, melanositler ve merkel hücrelerinden oluşmaktadır. Yaralanma olayında keratinosit hücreleri göç ederek aşırı çoğalma gösterir ve büyüme faktörlerine cevap oluştururlar (5). Epidermis 5 tabakadan oluşmaktadır. Bunlar içten dışa germinal tabaka, spinoz tabaka, granüler tabaka, lusid tabaka ve korneum tabakadır (Şekil 2-2).

Germinal tabakada mitotik aktivitesi olan keratinositler yerleşiktir. Bu keratinositler holoklon, merokrin ve paraklon hücreler içermektedir (6). Spinoz tabaka 5-10 sıra yassı hücreden oluşmaktadır. Bariyer ve epidermal sağlamlık konusunda önemli görevleri olan bir tabakadır. Granüler tabaka ise nukleus ve diğer hücre organellerinin çözölmeye hazırlandığı bölgedir (6).



Şekil 2-2: Epiderminin tabakaları (6)

2.1.2. Dermis

Cilt için kan akımı ihtiyacının karşılandığı, epiderminin hemen altındaki katmandır. Apokrin bezler, erkin bezler ve kıl folikülleri gibi dermal uzantılar dermis tabakasında bulunmaktadır. Dermis; dolgu maddesi, hiyaluronik asit, kondroitin sülfat, dermatan

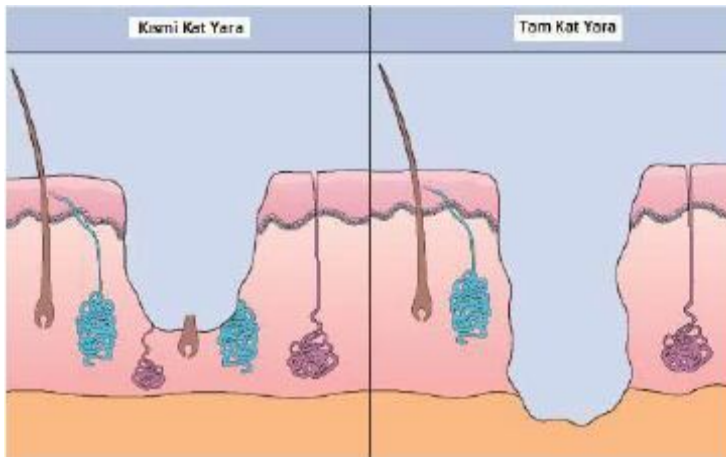
sülfat, fibronektin ve glikozaminoglikanlardan oluşmaktadır. Bu tabakada en fazla bulunan hücreler fibroblastlardır. Fibroblastlar kollajen, elastin ve mukopolisakkaritleri üretirler. Dermiste en çok Tip1 kollajen bulunur (%80-90) (6-9).

2.1.3. Hipodermis

Subkutis olarak da adlandırılır. Deri altı yağ dokusu ve fibröz trabeküllerden oluşur. Dermiste paralel seyreden bağ dokusu lifleri, bu tabakada deri yüzeyine dik olarak seyreder (septa), buna bağlı olarak bu tabaka, içerisinde yağ hücre topluluklarından zengin bölmelere (lobül) ayrılmıştır. Bu yağ topluluklarına ‘pannikulus adipozus’ denir. Bu tabaka damar ve sinir yönünden çok zengindir. Isı kaybını engelleme, travmalara karşı yastık göreviyle birlikte koruma ve yedek besin deposu görevini görür (8).

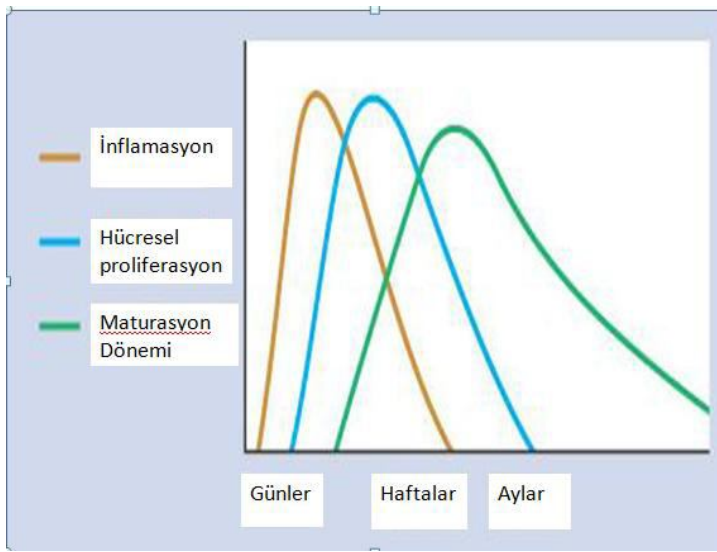
2.2. YARA İYİLEŞMESİ

Deri bütünlüğünün travmatik sebeplerle bozulması ile vücutta yara oluşur. Bu dokuyu tekrar eski haline getirmek için oluşan doku cevabı ile yara iyileşmesi süreci başlar (6). Yara iyileşmesi birbiri ile iç içe geçmiş hücresel ve biyokimyasal basamaklar içeren fizyolojik bir süreçtir (10). Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda birçok hücrenin rol aldığı bir süreç başlar ve çeşitli aşamalar sonucunda yara kapanır. Kısmi kat yara oluşumu sadece epidermisi kapsarken, tam kat yara oluşumu epidermis ve dermisi kapsar (Şekil 2-3). Epidermis damarsız bir yapıya sahiptir ve epitelizeasyon ile iyileşir. Ancak dermis granülasyon ve kollajen sentezi ile iyileşir (11).



Şekil 2-3: Deride kısmi kat ve tam kat yara (11)

Yara iyileşmesi birbiri ile bağlantılı ve eş zamanlı olmasına rağmen kolay anlaşılabilmesi için üç faza ayrılmıştır (Şekil 2-4) (12). Bunlar; inflamasyon fazı (5 gün), proliferasyon fazı (5-15 gün) ve olgunlaşma (matürasyon) fazıdır (15 gün-2 yıl). Bu fazlar hücrelerin büyüme, farklılaşma ve metabolizmasını kontrol eden büyüme faktörleri ile düzenlenir. Diğer taraftan yaralanmaya karşı cevapta ilk basamak hemostatik cevap olup, bu aşama bazı kaynaklarda ayrı bir faz olarak da gösterilmiştir (13).



Şekil 2-4: Yara iyileşme dönemleri (14)

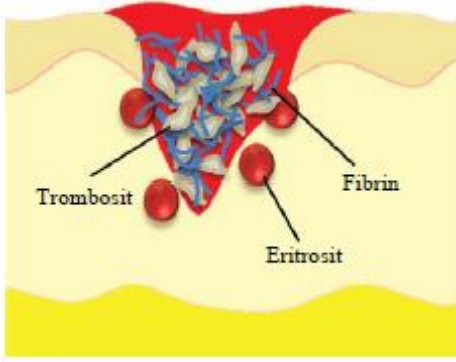
2.2.1. İnflamasyon fazı

Cerrahi müdahale veya travma sonucu oluşan yaralanma sonrası organizmanın cevabı inflamasyon fazı ile başlar. Bu evrede organizmanın kan kaybını önlemek, vücuda yabancı maddelerin girişini önlemek ve yarayı onarım için hazır hale getirmek amaçlanır.

Yaralanmadan sonra hemostaz ile başlar ve yaklaşık 3-5 gün sürer. Yaralanma sonrasında kan damarlarının bütünlüğü bozularak yaralı bölgede kanama oluşur. Kanama ile beraber hemostaz başlar (12).

Hemostaz

Hemostaz genel olarak zedelenen kan damarlarından kan akımının engellenmesidir (15). Çeşitli faktörlerin etkisi ile başlatılan bir süreçtir (Şekil 2-5). Yaralı deri hücreleri tarafından pıhtılaşma faktörleri salınır (Tablo 2-1). Tromboksan A2 gibi çeşitli vazoaaktif komponentler salgılanarak yaralı dokuda geçici olarak vazokonstriksiyon oluşturulur ve kan akım miktarı azaltılarak kan kaybı en aza indirilir. Protombin, karaciğerde sentezlenip kana verildikten sonra trombine dönüştürülür. Trombin, trombositleri yapışkan hale getirir ve trombosit agregasyonu meydana gelir. Bu agregasyon giderek büyür ve küçük damarlarda kan akışını engellemek için tıkaç görevi görür (12, 13, 15, 16).



Şekil 2-5: Hemostaz (17)

Trombin ayrıca fibrinojenin fibrine dönüştürülmesi aşamasında görev alır ve pıhtı oluşur. Fibrinojen eriyebilen bir plazma proteini iken fibrin erimeyen bir proteindir. Fibrin kan hücrelerine ve dokuya yapışan ince iplikler halinde bir ağ meydana getirir. Bu sayede pıhtılaşma sağlanır. Pıhtı; trombin, trombosit, fibrin, fibrinonektin ve trombozpondin gibi kan proteinleri ve lökosit ve eritrosit gibi şekilli kan elemanlarından oluşur. Pıhtılaşma sayesinde yara bölgesine mikroorganizma akışı da engellenmiş olur. Pıhtı su kaybederek daha sonra yara kabuğu halini alır (16, 18-20).

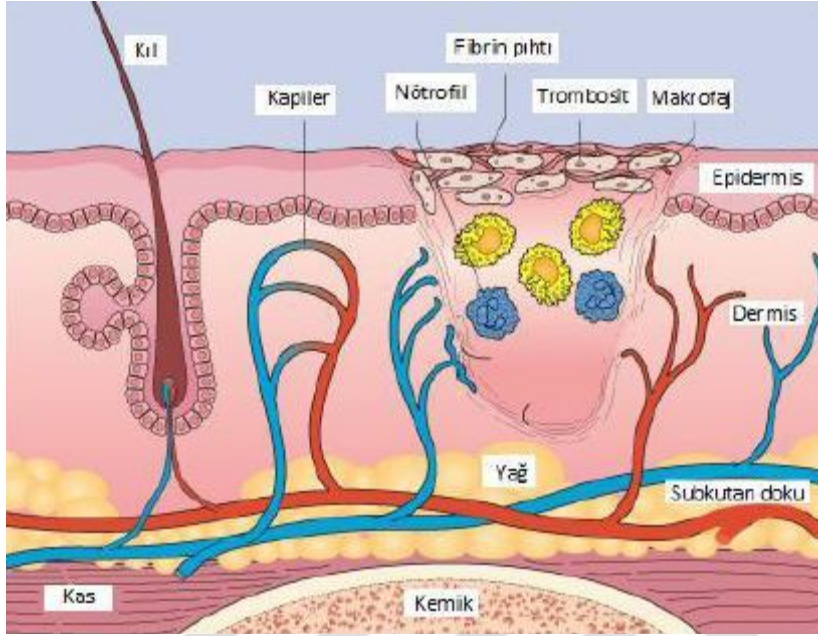
Tablo 2-1: Hemostatik faktörlerin ve trombositlerden salgılanan faktörlerin işlevleri (21).

FAKTÖRLER	İŞLEVLERİ
Hemostatik Faktörler	
Fibrin, Plazma Fibronektin	Koagülasyon, kemotaksis, yapışma, hücre göçü için temel yapı
Faktör 13 (Fibrin sabitleyici faktör)	Kemotaksis ve yapışmaya neden olmak
Dolaşım Büyüme Faktörleri	Kemotaksis, mitogenez ve fibroplazinin düzenlenmesi
Kompleman	Antimikrobiyal aktivite, kemotaksis
Trombosit Kaynaklı Faktörler	
Sitokinler, Büyüme Faktörleri	Kemotaksis, mitogenez ve fibroplazinin düzenlenmesi
Fibronektin	Matriks oluşumu, trombosit kümelenmesi
Trombosit Aktive Eden Faktör	Trombosit kümelenmesi
Tromboksan A2 (TXA2)	Vazokonstriksiyon, trombosit kümelenmesi, kemotaksis
Serotonin	Vasküler geçirgenlik artışı, nötrofil kemotaksisi
	Fibroblast ve monosit kemotaksisi, kollejenaz
Trombosit Faktör 4 (TF4)	inhibisyonu ve heparin aktivasyonunun etkisizleştirilmesi

Inflamasyon fazı, vazokonstriksiyonun ardından vazodilatasyon ve kılcal damar geçirgenliğinin artışıyla başlar. Inflamasyon fazında öncelikli hedef yara bölgesine inflamatuvar hücrelerin ulaşmasını sağlamaktır. Inflamatuvar cevap, yaralı doku hücreleri, aktive olmuş trombosit ve sitokinler ve kılcal damarlardan salınan bazı mediatörler tarafından başlatılır.

Yaralanmadan birkaç dakika sonra nötrofiller yara bölgesine toplanır. Nötrofiller yara bölgesindeki bakterileri, yabancı cisimleri ve ölü dokuyu fagosite ederler. Sahip oldukları proteazlar sayesinde yara bölgesinde var olan ekstrasellüler matriksi yıkarlar (20, 22, 23).

Yara bölgesindeki sağlam dokular matriks proteaz inhibitörleri tarafından korunmaktadır. Nötrofiller, lokal fibroblast ve epitel hücrelerini aktive ederek yara iyileşmesini tetikler (24). Ayrıca monositler, lenfositler ve plazma hücreleri gibi beyaz kan hücreleri de yara bölgesine göç eder (Şekil 2-6) (19).



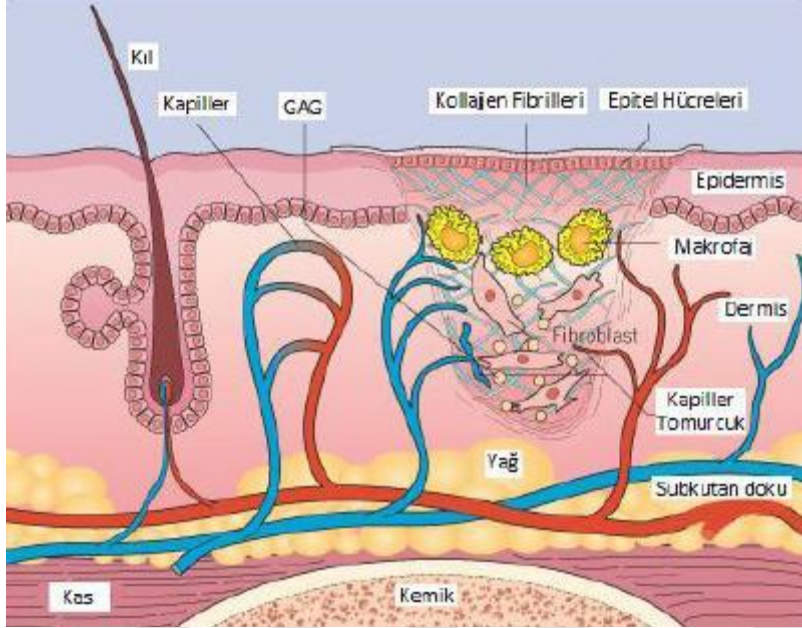
Şekil 2-6: İnflamasyon (14)

Yara bölgesindeki nötrofiller bilinmeyen bir uyarıcı sonucu ölürler. Ölen nötrofillerin yerini makrofajlar alır ve doku makrofajları ölü nötrofilleri fagosite ederler (22, 25). Makrofajlar yaralanmadan sonra yara bölgesine gelir ve inflamasyon fazının sonuna kadar kalırlar (12).

Makrofajlar işlevsel olmayan nötrofilleri ve doku artıklarını fagosite ederler (22, 26, 27, 28). Makrofajlar patojenleri de yok ederler. Ayrıca matriks metalloproteinazlar, inflamatuvar debrisini temizleyerek yara hücrelerini matrikse doğru hareket ettirirler (22). Makrofajlar, lenfosit ve trombosit gibi hücreleri de sitokinler yardımıyla aktive ederek $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6 gibi faktörlerin salınmasını sağlarlar (29). Makrofajların yara alanındaki varlığı yara iyileşmesi için kilit bir role sahiptir. Makrofajların baskılanması durumunda yara iyileşmesinin ciddi anlamda bozulduğu ve geciktiği gözlenir (28). Bunlara ek olarak, yapılan bazı çalışmalarda makrofajların granülasyon dokusunun oluşumu, sitokin üretimi ve yeniden epitelleşme için de anahtar rol oynadığı gösterilmiştir.

2.2.2. Proliferasyon fazı

Proliferasyon fazı yaralanmadan sonraki 3-5. günlerde kan pıhtısı, nekrotik doku, enfeksiyon ve yabancı cisimler kaldırıldıktan sonra başlar (Şekil 2-7) (28, 30-32). Bu evrede fibroblastlar aktiftir. Yaradaki granülasyon dokusunun oluşumu, epitelizasyon ve yara kontraksiyonu bu evrede gerçekleşir (30, 32, 33).



Şekil 2-7: Proliferasyon (14)

Kollajen ve diğer ECM komponentleri fibroblastlar tarafından salınır. Miyofibroblastlar yara kontraksiyonunu sağlar. Keratinositler yaranın yüzeyini re-epitelize eder (17).

Granülasyon dokusunun düzenli biçimde gelişmesi normal bir yara iyileşmesi süreci olduğunun en önemli göstergelerinden biridir (34). Yeni gelişen kapillerler nedeniyle granüler görünümdeki yeni stromaya granülasyon dokusu adı verilmektedir (35). Bu dokunun gelişmesi açık yaralarda daha belirgin gözlenmektedir (36). Granülasyon dokusu gelişimi 3-6. günlerde başlar (28, 37). Granülasyon dokusu; hyaluronik asit, fibronektin ve kollajenin hücre dışı matriks üzerine gömülmesi ve yeni kapiller tomurcuklanma ile fibroblast ve inflamasyon hücrelerinin birleşmesinden oluşur (11, 28, 31, 34). Yara iyileşmesinde enfeksiyonlara karşı bariyer görevi görür ve epitel hücrelerinin göç etmesi için zemin oluşturur (32, 38, 39). Bu dokunun oluşumu fibroblastların aktive olması ve yeni damar oluşumu ile karakterizedir.

Fibroplazi, fibroblastların yara kenarından yaraya göç etmeleri, burada çoğalarak kollajen üretmeleri ve kollajenin yara bölgesinde birikmesi süreci olarak tanımlanır. Fibroblastlar yaralanmadan sonraki 7. günde en yüksek seviyeye ulaşır ve 15-21. güne kadar yara bölgesinde aktif olarak yer alırlar. Bu hücreler farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden ve perivasküler adventisyadan köken alır ve yeni gelişen damarlar boyunca sitoplazmik uzantılar oluşturarak yara bölgesine doğru hareket ederler (12). Fibroblastlar, dokuların yeniden yapılanması sürecinde yapısal proteinlerin çoğunun üretiminden sorumludur. Elastin, fibronektin ve glikozaminoglikan gibi geçici matriksin yerini alacak şekilsiz elemanlar bu proteinlerden bazılarıdır.

Kollajenin yapısı genel itibarıyla hidroksiprolin ve hidroksilizin aminoasitlerinden oluşur. Kollajen yara iyileşmesi sürecinin 4-5.günlerinde tropokollajen moleküllerinin ekstrasellüler matrikse gelmesiyle şekillenmeye başlar. Olgunlaşmamış kollajen fibrilleri birbirleriyle çapraz bağlanarak olgun kollajenleri oluştururlar. Zamanla kollajen içeriği artarken temel madde azalır. Yaranın erken döneminde gerilim direncinin artması kollajen formasyonuna bağlıdır (32). Yara merkezinin asidik ortamı ve düşük oksijen seviyesi fibroblastların proliferasyonunu aktive ederken, yara bölgesinde yeni damar oluşumu yara merkezinde oksijen seviyesini artırır ve fibroblast proliferasyonu azaltır. Ayrıca oksijen, kollajenlerin çapraz bağlanması için gerekli bir kofaktördür. Gerekli protein sentezinin sona ermesiyle fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşürler (28).

Anjiogenez, yara bölgesindeki endotel hücrelerden yeni kan damarlarının oluşmasına denir (11, 28). Yara iyileşme sürecinde fibroblastların proliferasyonu ile eş zamanlı gelişir. Yara iyileşmesi sürecinde gerekli oksijen ve enerji, yeni oluşan kan damarları ile sağlanır (40). Doku ve çevresindeki azalmış pH ve düşük oksijen basıncı anjiogenezi uyarır. Ayrıca inflamasyon fazında üretilen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), TGF- β ve anjiyopoyetin gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler de anjiogenezi düzenler ve uyarır (41). Endotel hücrelerin yara içine hareket etmesi ve ardından dizilmesi ile kapillar tomurcuklanma sağlanır. Bu tomurcuklanmalar diğer yönlerden gelen tomurcuklarla birleşip kapillar ağı şekillendirir (11).

Epitelizasyon, deriye bariyer özelliğinin tekrar kazandırılması sürecidir. Epitel hücrelerinin ayrılmasını, göç etmesini, çoğalmasını, organize ve keratinize olmasını kapsar. (11). Bazal membranın hasar gördüğü yaralarda epitelizasyon sadece yara kenarındaki sağlam epitel hücrelerinden köken alırken, bazal membranın zarar

görmediği kısmi kalınlıktaki yaralarda ise epitelizasyon, yara periferindeki epitel kalıntıları, kıl folikülü ve ter bezi gibi epidermal oluşumlardan meydana gelmektedir (11, 22, 28). Yaralanmadan birkaç saat sonra epitelizasyon başlar (42). Keratinositler bazal epidermal hücreleri oluşturmak için yalnızca canlı yüzeyler üzerinde göç edebilirler. Bu yüzden yaralanmadan sonra oluşan pıhtı epitelizasyonu geçici olarak engeller. Kollajenaz ve diğer protezlar canlı yüzey ile pıhtı arasındaki bağlantıyı ayırarak keratinositlere göç için zemin hazırlar. Fibronektinler ise keratinositlerin yaranın tabanına göç etmesine yardımcı olur (12).

Yaranın iki tarafından göçe başlayan keratinositler birbirleriyle karşılaştıkça kontakt inhibisyon yaparak ilerlemeyi durdurur (12, 28). Bu yüzden dikiş ile karşı karşıya getirilen yaralarda epitelizasyon hemen başlar. Göç eden epitel hücreleri yassı görünümünü kaybeder ve sütunumsu şekil alır. Bu hücrelerin mitotik aktiviteleri normale göre 17 kat artar (28, 43). Bu tek katlı epitel örtü, diğer göç eden epitel hücreleri ile birlikte birbirinin üstüne binecek şekilde ikinci ve üçüncü tabakayı oluşturur (28). Bu tabakalaşma ile yüzeysel epitel yavaş yavaş keratinize olur ve sağlamlaşır. Yeni şekillenen epitelde deri eklentileri yoktur. Bu epitel ince ve kırılgan yapıya sahiptir (39).

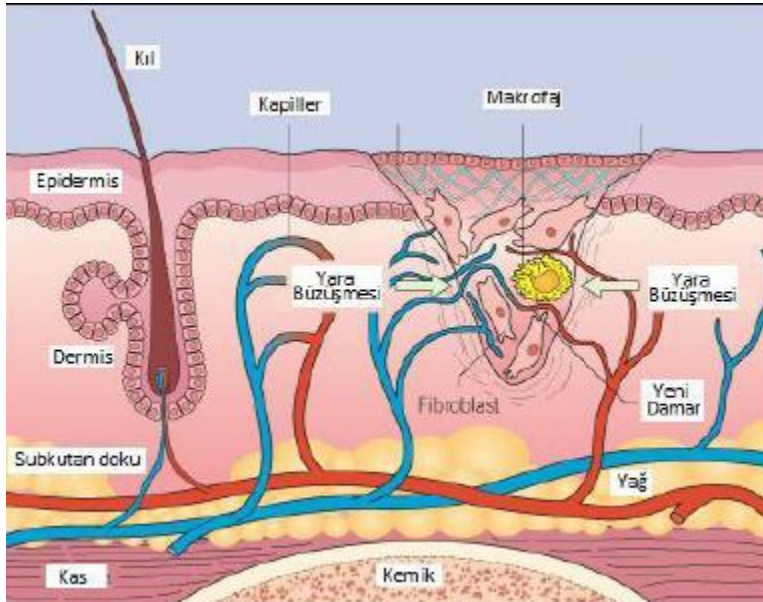
Yara kabuğunun oluşmadığı ve enfeksiyonun olmadığı yaralarda, nemli ortam ve yeterli oksijen sağlandığı koşullarda epitel hücrelerinin göçü ve proliferasyonu en yüksek seviyededir (12).

Yara kontraksiyonu, yara dudaklarının merkeze doğru hareket etmesiyle gelişen küçülmeye verilen isimdir (31, 32, 38). Yaralanmadan sonraki 5-15.günlerde kontraksiyon en yüksek seviyededir ve günlük yaklaşık olarak 0,6-0,7 mm ilerler. Yara iyileşmesi sırasında fibroblastlarda fenotipik değişiklikler meydana gelir ve fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşür (12). Miyofibroblastlar, hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantıları yaparak aktin içeren mikrofilamentleri yardımıyla kasılır. Yaranın kontraksiyonu bu şekilde gerçekleşir (35). Derinin gevşek olduğu durumlarda kontraksiyon en iyi şekilde gerçekleşir ancak deri alt dokuya sıkı bir şekilde bağlı ise kontraksiyon yavaştır (32). Yara kontraksiyonu yaranın şekline göre değişiklik göstermektedir. Dairesel yaralar, üçgen, dörtgen veya kare şeklindeki yaralara göre %30 daha yavaş büzülerek iyileşmektedir(12).

2.2.3. Olgunlaşma fazı

Yara iyileşmesinin epitelizasyon ile sona erdiği kabul edilmektedir. Buna rağmen daha pek çok olay devam etmektedir. Olgunlaşma fazı, oluşan granülasyon dokusunun skar dokusuna dönüşmesini ve ekstrasellüler matriksin olgunlaşmasını kapsayan, yıllarca sürebilen, yara iyileşmesinin en uzun evresidir (Şekil 2-8) (28). Bu evrede fibroblastların sayısı azalır ve kollajen sentezi dengeye ulaşır. Epitelizasyon tamamlandıktan sonra yara rengi soluklaşır, yara gerilim direnci artar, skar dokusunun hacmi azalır ve iyileşmiş skar dokusu oluşur (36, 37). Hücrelerin yara dışına göç etmesi ve apoptoz aracılığıyla granülasyon dokusu yavaş yavaş şekil ve yapı değiştirerek daha az hücre ve damara sahip olan skar dokusuna dönüşür (34). Fibroblast hücrelerinden sentezlenen kollajen molekülleri, hidroksilasyondan sonra prokollajen olarak isimlendirilir.

Daha sonra bu yapıdan amino ve karboksil terminal peptidler kaldırılır ve kollajen oluşur (37). Kollajen demetleri gelişerek deriye paralel bir şekilde yeniden düzenlenir. Granülasyon dokusundaki tip III kollajen, skar dokusunda tip I kollajen ile yer değiştirir (34, 43, 44).



Şekil 2-8: Olgunlaşma (45)

Olgunlaşma fazında en belirgin özellik kollajen birikimi ve düzenlenmesidir. Başlangıçta üretilen ince kollajen iplikleri zamanla absorbe edilir ve daha kalın ve

düzenli kollajen birikimi sağlanır. Bu sayede yaradaki gerilim kuvveti artar. Skar dokusu 3. ay ve sonrasında yaranın en son kazanacağı direncin %80'ine ulaşır (22).

2.3. YARA İYİLEŞMESİ SÜRECİNDE GÖREVLİ GENLER

Yara iyileşmesi uzun ve karmaşık bir süreçtir. Son yıllarda yapılan çalışmalar yaklaşık 100 civarında genin ve bunlarla ilişkili proteinlerin bu süreçte karmaşık bir düzenleme ile rol aldığını göstermiştir (46). Ancak bu genlerin ve ürünlerinin, bu süreçteki katkılarının mekanizmaları tam olarak açıklanmış değildir. Bu genlerden yaklaşık 43 kadarının çalışmamız ile ilişkili anesteziiklerden etkilenebileceği ön görülmüş olup, yazının ilerleyen bölümleri bu genlerle ilişkili olarak detaylandırılmıştır. Bu genlerin bir bölümü büyüme faktörlerinden (20 adet), bir bölümü ekstraselüler matriks bileşenlerinden (8 adet), bir bölümü proteaz aktiviteli proteinlerden (4 adet), bir bölümü de çeşitli hücre adezyon ve sitoskeleton molekülleri ve sinyal iletim moleküllerinden oluşmaktadır (11 adet).

Büyüme faktörleri, ağırlıkları 4.000-60.000 dalton arasında değişen proteinlerdir. Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi için o hücrenin, o etken için reseptöre sahip olması gerekir. Her hücrede bulunan reseptör sayısı farklıdır. Büyüme faktörlerinin bir bölgedeki yoğunluğu ve reseptöre bağlanan miktarına göre ortaya çıkan etki değişir (47). Bu çalışmada incelenen büyüme faktörleri genleri; *Angpt1*, *Csf3* (*GCSF*), *Egf*, *Fgfr2*, *Hbegf* (*Dtr*), *Hgf*, *Igf1*, *Mif*, *Pdgfa*, *Tnf* genleridir.

Sitokinler, immün sistemin düzenlenmesinde ve inflamatuvar olaylarda rol oynarlar. Lenfositlerin sentezlediği sitokinlere lenfokin, monositlerin sentezlediği sitokinlere monokin denir. T lenfositlerce üretilen sitokinlere interferon gama(*Ifng*), akyuvarlar tarafından üretilen sitokinlere interferon alfa(*Ifn α*) ismi verilmektedir. Sitokin sentezinin artışı veya azalışı, *NFk- β* (Nükleer Faktör kappa beta), *AP-1*(aktivatör protein-1) gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna da bağlıdır. Çalışmamızda *Ifng*, *NFk- β* ve *AP-1* genlerinin de ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Sitokinler bir yandan yabancı ajanlara karşı organizmanın reaksiyonlarını düzenlerken, bir yandan da hücreler arası ilişkileri düzenleyerek inflamatuvar cevapta önemli rol oynar. Peptid veya glikoprotein tabiatında olan sitokinlerin molekül ağırlıkları 6.000 ile 60.000 dalton arasında değişmektedir. Sitokinler genel olarak depolanamazlar ve bunları kodlayan

mRNAlar stabil değildir. İmmün sistemden salınan sitokinlerin büyük çoğunluğu interlökinlerdir.

Interlökin 1(IL-1), ikinci kromozom üzerinde iki ayrı gen tarafından meydana getirilen IL1- α ve IL1- β olmak üzere iki proteinden meydana gelir. Hemen hemen bütün hücreler tarafından sentezlenir ancak daha çok makrofajlar, keratinositler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve nötrofiller tarafından üretilmektedir. IL-1, hücreler üzerinde daha çok koruyucu etkiye sahiptir. Ayrıca hem T hücrelerinden IL-2 salgılanmasını sağlar hemde antijen sunan hücrelerin kapasitesini artırır. Bunlara ek olarak nötrofil infiltrasyonunu sağlar ve fibroplazi ve anjiogeneze oluşumuna yardımcı olur (47, 48).

Interlökin 2 (IL-2), 15.400 dalton ağırlığındadır. 133 aminoasitten oluşan bir proteindir. 4. kromozom üzerindeki bir gen tarafından üretilir. T ve B lenfositlerin proliferasyonunu ve sitokin oluşumunu artırmaktadır. IL-2 reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. IL-2, monositler hariç diğer hücrelerin S fazına geçmesini sağlar, makrofajların öldürücü kapasitelerini artırır ve anjiogeneze yardımcı olur (49).

Interlökin 6 (IL-6), 26.000 dalton ağırlığında olup 184 aminoasitten oluşmaktadır. Monositler, fibroblastlar, keratinositler, kemik iliği stromal hücreleri ve mezenkimal hücreler tarafından sentezlenmektedir (50, 51). B lenfositlerin antikor yapabilmeleri için gerekli olan temel faktörlerden biridir.

Kemokinler 8000-10000 dalton büyüklüğünde, aminoasit dizilimleri %20-%70 oranında benzerlik gösteren proteinlerdir (52, 53). İki amino sonlanımındaki sistin artıklarının komşu olması (c-c)(α) veya aralarında bir amino asit bulunması (c-x-c)(β) durumuna göre α ve β olmak üzere 2 alt gruba ayırırlar. Lökosit hareketini uyarmakla görevlidirler. İnflamatuar lezyonlarda kemokin üretimi belirgin seviyede artış göstermektedir. Ayrıca yedi transmembran α -heliks reseptör ailesine dahil olan birçok kemokin reseptörü mevcuttur. Bu çalışmada ekspresyon seviyeleri ölçülen genler *Ccl7*, *Cd40lg*, *Cxcl3*, *Cxcl1* genleridir (54).

Ekstraselüler matriks, dokuların ve organların bütünlüğünün sağlanmasını sağlar. Ayrıca hücreler arası iletişim ve hücre davranışı gibi konuları düzenler. Protein ve polisakkaritlerden oluşan karmaşık bir yapıdır. Ekstraselüler matriks; kollajenler, lamininler, fibronektin, vitronektin ve elastin gibi bileşenlerden oluşur. Kollajenler deri, kemik ve kıkırdak başta olmak üzere birçok dokuda bulunan, bağ dokunun en önemli yapısal proteinleridir (55). Dokuları deformasyona karşı korur ve dokuların şekil almasını sağlarlar (33). Kollajen molekülü (tropokollajen), α -zincir olarak

isimlendirilen, birbiri etrafına sarılı üç polipeptidden oluşan üçlü heliks yapıdadır (56, 57). %35 oranında glisin ve %11 oranında ise alanin bulunmaktadır. Ayrıca diğer proteinlerde nadir olarak rastlanan %12 oranında prolin ve %9 oranında hidroksiprolin içermektedir (40, 56). Üçlü heliks yapısındaki zincirlerin birbirine sarılmasıyla kendisiyle eşit boyuttaki bir çelik telden daha fazla gerilim kuvveti sağlar (58). Zincirlerin biyokimyasal yapılarına göre gruplandırılmış birçok çeşit kollajen tipi bulunmaktadır. Tip I kollajen, vücuttaki kollajenin %90'ını oluşturur ve deri, kemik ve tendon en yoğun bulunduğu bölgelerdir (11, 40, 55). Tip III kollajen ise deri ve organlarda bulunur ve dokulara esneklik sağlar (40). Bu çalışmada ekspresyon seviyeleri ölçülen genler *Coll4a1*, *Colla1*, *Colla2*, *Col3a1*, *Col4a1*, *Col4a3*, *Col5a1* ve *Col5a3* genleridir.

Bazı proteinlerin proteaz aktivitesi ile olgun dokularda doku hemostazı kontrol altında tutulur. Matriks metalloproteinazlar (MMP), insanlarda bilinen 23 tipi olan bir endopeptidaz enzim grubudur. Bu çeşitli tipler sinyal peptid ve çinko bağlayan alanlar gibi birçok ortak özelliğe sahiptir. Kollajenazlar, jelatinazlar, metalloelastazlar en çok bilinenleridir. Matriks metalloproteinazlar sitokinlerle etkileşerek hücre proliferasyonu ve göçü, farklılaşma, apoptoz ve anjiogenez gibi olaylarda rol oynar (59, 60). Çalışmamızda ekspresyon seviyeleri ölçülen genler *Ctsk*, *Mmp2*, *Mmp7* ve *Mmp9* genleridir.

Organizmada yapım yıkım dengesi sağlanarak, hasarlı doku ve hücreler yıkılarak dokular yeniden şekillendirilir. Hücreler arası sitoiskelet ve adezyon, çeşitli proteinlerin yardımıyla yeniden oluşturulur. Integrinler bütün hücre tipleri üzerinde mevcut α ve β zincirlerinden oluşan ve hücre-hücre ve hücre- ekstraselüler matriks arası bağlantıyı sağlayan heterodimerik adezyon molekülleridir (13). L-selektin, T hücre subsetleri ve monositler üzerinde bulunan bir hücre adezyon molekülüdür. Vasküler endotel, hücrelerin yüzeyindeki glikolize proteinlere bağlanır. Ayrıca tüm bu aşamalarda sinyal dönüştürmek ve iletmek ile görevli proteinleri üreten gen grupları da mevcuttur. Çalışmamızda ekspresyon seviyeleri ölçülen genler *Itga3*, *Itga5*, *Itgb5*, *Stat3*, *Tbrg1*, *Actc1*, *CD62L*, *Mapk3*, *Muc-1*, *Smad7* ve *Wnt5a* genleridir.

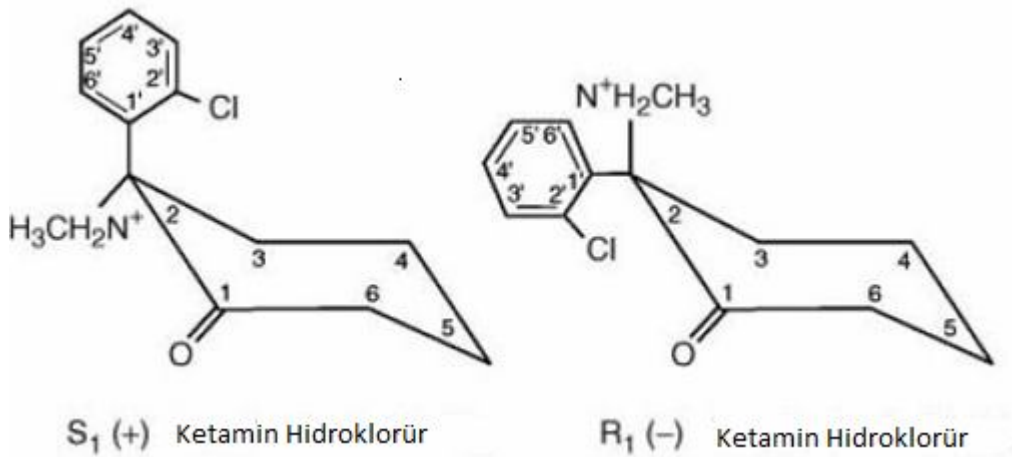
2.4. KULLANILAN ANESTEZİKLER

2.4.1. Ketamin

Fensiklidinler içerisinde hallusinojen potansiyeli en düşük olanıdır. 1962 yılında Stevens ve Mc Carthey tarafından sentezlenmiştir. Domino ve Corssen tarafından 1965 yılında klinikte ilk kez kullanılmıştır. 1970 yılında klinik kullanımı için serbest bırakılmıştır. 1997 yılında enantiyomeri S(+), ketamin klinik uygulamalarda kullanılmaya başlamıştır (61).

Ketamin bir disosiyatif anesteziği fensiklidin türevidir. Analjezik ve amnestik etkiye sahip tek intravenöz anesteziğdir ve diğer intravenöz anesteziğlerin aksine depresan etkisi yoktur. Alfa-1 asit glukoproteine bağlanıp intravenöz enjeksiyon sonunda kısa sürede kan beyin bariyerini aşar. Etki süresi doza bağlı olmakla birlikte beyin dokusundan hızlı bir şekilde diğer dokulara dağılması nedeniyle etkisi kısa süreli (62, 63). Bazı enzimler tarafından N-demetilasyona uğratılır ve norketamine dönüşür. Daha sonra norketamin hidroksinorketamine dönüşerek suda eriyebilen glukuronidlere bağlanarak idrarla atılır (64, 65).

Molekül ağırlığı 238000 daltondur. Kimyasal formülü $rs-2-(2\text{-klorofenil})-2\text{-(metilamino)-sikloheksano hidroklorid}$ 'dir. Kısmen suda eriyebilen, renksiz, zayıf asidik karakterli bir solüsyondur (64, 65). Lipid çözünürlüğü tiyopentale göre 5-10 kat daha yüksektir. Solüsyonlar mililitresinde 10-50-100 mgr'lık değişen oranlarda ketamin içerir. İçeriğinde koruyucu olarak benzetonyum klorür bulunan sodyum klorid solüsyonlarıdır. Farmosetik formülü, S (+) ve R (-) enantiyomerlerinin eşit oranda karışımından oluşur (Şekil 2-9) (66-68).



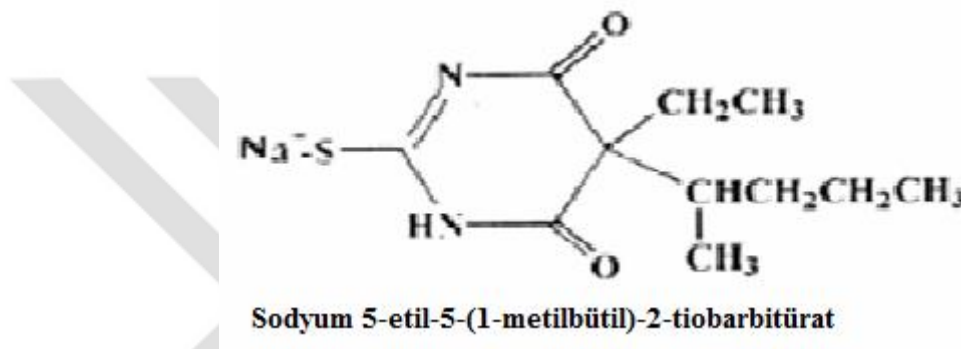
Şekil 2-9: Ketaminin kimyasal yapısı

Ketaminin anestezik etkisi, NMDA(N-Metil D-Aspartik Asit) glutamat reseptörlerinin nonkompetitif antagonizmasına bağlıdır. NMDA beyin ve omurilikteki sinir hücrelerinde bulunan bir iyon kanal proteini ve glutamat reseptörüdür. Ketamin glutamatın presinaptik salınımını da azaltır. Ayrıca ketamin muskarinik ve nikotinik asetilkolin reseptörlerini antagonize eder (68, 69). Ancak yine de ketaminin anestezik etkilerinin başka hangi hücresel ve moleküler mekanizmalarla oluştuğu konusunda kesin bilgiler yoktur.

Bunlarla birlikte yapılan güncel çalışmalarda ketamin anestezisinin bazı moleküllerin üzerinde etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ketamin, makrofajlarda $Tnf-\alpha$ ve IL-6 sitokinlerinin üretimini inhibe etmektedir. Başka bir çalışmada da immün sistemi uyarılmış sıçanlarda ketamin anestezisinin $Tnf-\alpha$ üretimini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca nötrofillerin fagosit aktiviteilerinin de ketamin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak serbest radikal üretimi, patojenlerin fagosit edilmesi ve sitokin üretimi inhibe edilmektedir. Sitokin üretimi üzerinde diğer bazı anesteziklerin de etkisi görülmekle birlikte en sert düşüş ketaminde görülmektedir (70). Sitokin üretimini indükleyen bir transkripsiyon faktörü olan $NF\kappa-\beta$ 'nın da ketamin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (71). İnterlökin-1b'nin de ketamin anestezisinde inhibe olduğu gösterilmiştir (72). Ketamin anestezisi $Nf\kappa-\beta$, $AP-1$, MAP kinaz (mitojen aktive protein kinaz) gibi faktörlerin ekspresyonunu baskılamaktadır (73). Bununla birlikte ketamin anestezisinin hücre adezyon molekülleri (CD62L vb.) üretimine etkisi de gösterilmiştir (74).

2.4.2. Tiyopental Sodyum

Tiyopental kısa süreli etkisi olan pentobarbitalin tiyo türevidir (75). Tiyopental sodyum ilk kez 1935 yılında Lundy tarafından kullanıma sokulmuştur. Barbitüratlardan klinik kullanımı en yaygın olanıdır. Tiyobarbitüratlarda 2. karbondaki oksijen (O) atomunun yerini bir sülfür (S) atomu almıştır ve bu değişiklik ile birlikte barbitüratın sentral sinir sistemindeki etkisinin çabuk başlaması ve kısa sürmesi sağlanır (Şekil 2-10) (76, 77).



Şekil 2-10: Tiyopental sodyumun kimyasal yapısı

Barbitüratların etkilerinin kısa sürmesi çabuk yıkılmalarından değil, kandan çok kısa sürede taşınmalarındandır. Tiyopental sodyum karaciğerde metabolize edilmektedir. Oksidasyon, N-dealkilasyon ile oluşan metabolitler suda eriyerek idrarla atılır (78).

Klor kanallarının uzun süre açık kalmasını ve kanalların içinin tıkanmasını sağlayarak etkisini göstermektedir. Ayrıca nörotransmitterlerin (asetilkolin, glutamik asit) sinaptik etkilerini inhibe eder (79). Yüksek dozlarda beynin oksijen tüketimini azaltarak metabolizmasını düşürür.

Tiyopental ile yapılan çalışmalarda da bazı moleküllerin, özellikle de sitokin üretiminin etkilendiği gösterilmiştir (70).

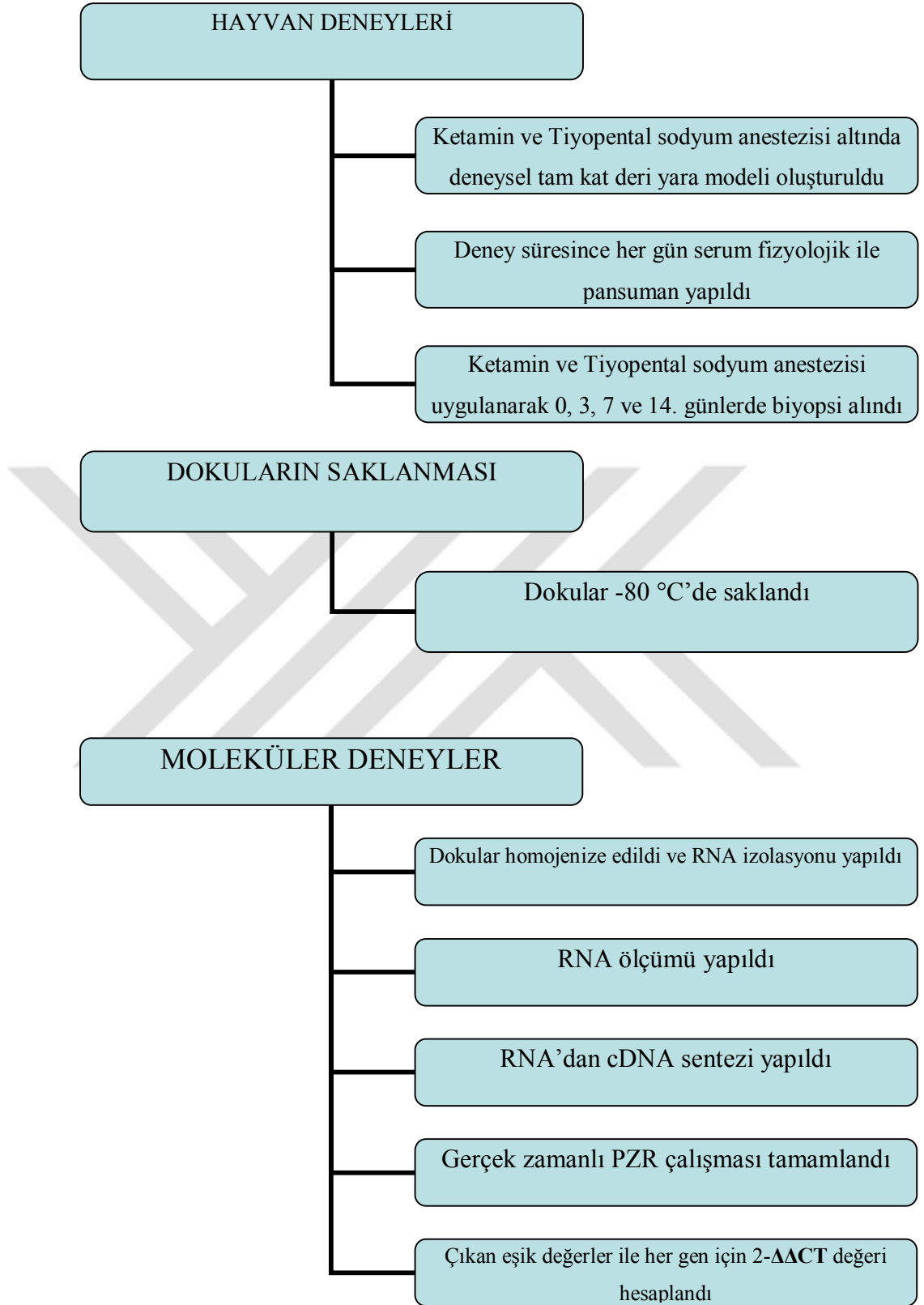
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tablo 3-1: Kullanılan Kitler

• High Pure RNA Tissue Kit , Roche, Cat.No. 12 033 674 001 • Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit Cat. No. 04 379 012 001 • LightCycler 480 Probes Master Cat. No. 04 707 494 0001
--

Tablo 3-2: Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı ve Derin Dondurucu	(+4°C ve -20°C Bosch , -80°C Forma Scientific)
Derin dondurucu -80 derece	(HeraeusSepatech)
Distile su cihazı	(Millipore)
Etüv	(Heraeus) (Nüve)
Hassas terazi	(Shimadzu)
LightCycler 480 RT- PZR cihazı	(LC480-II, Roche, Mannheim, Almanya)
Masaüstü mini santrifüj	(Eppendorf) (Hettich)
Otomatik pipetler	(Gilson) (Eppendorf)(Thermo)
PZR cihazı	(Biorad, T-100, Amerika)
Soğutmalı santrifüj	(Heraeus)
Spektrofotometre	(NanoDrop)



Şekil 3-1: Çalışma diyagramı

Kullanılan Diğer Malzemeler

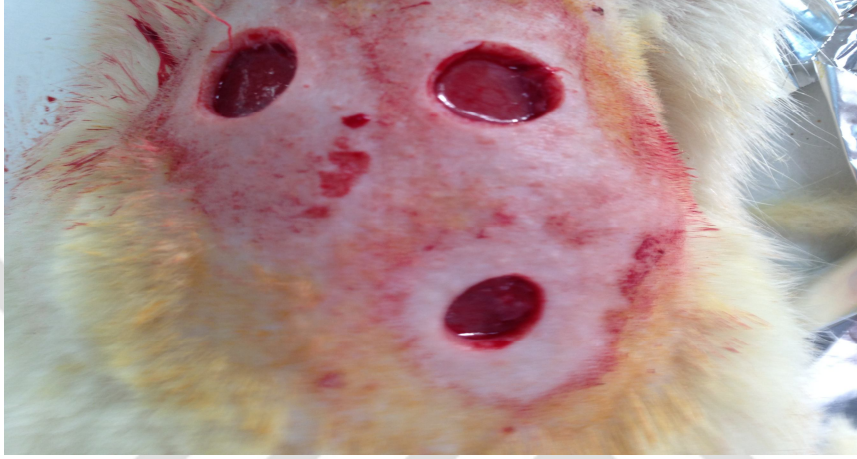
Kullanılan anestezi ve analjezikler (Ketamin HCl (Ketalar), Ksilazin HCl (Rompun), Tiopental Sodyum (Pental Sodyum), Tramadol), Cerrahi sünger (Spongostan 7cm x 5cm x 1cm), Serum şişe (Eczacıbaşı Baxter), cerrahi makas, pamuk, steril gazlı bez, petri kabı, biyopsi punch (1 cm), serum fizyolojik, traş bıçağı, bistüri, RealTime Ready Custom Panel 96-96 (ROCHE), filtreli pipet uçları.

3.1. Hayvan Deneyleri

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2014/116 no'lu kararla onaylanmıştır. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Üretim bölümünden 15 adet sağlıklı, Wistar Albino türü, yetişkin (6 aylık), erkek, 250-300 gr ağırlığında sıçanlar temin edildi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda bakımları yapıldı ve hayvan deneyleri 25 Mart 2015 – 10 Nisan 2015 tarihleri arasında yürütüldü. Sıçanlar 21-24 °C'de (oda sıcaklığında), 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık fotoperiyodunda, polikarbon yapılı sıçan kafeslerinde bireysel olarak, %18-20 protein içeren pelet sıçan yemi ve su ile ad-libitum olacak şekilde beslenerek muhafaza edildi.

Sıçanlar 3 gruba ayrıldı. 1. Grup: Ketamin anestezisine maruz olan grup, 2. Grup: Tiopental Sodyum anestezisine maruz olan grup, 3. Grup Tramadol anestezisine maruz olan kontrol grubu. Her biyopsi alımından 10 dk önce 1. grup sıçanlara 10 mg/kg (intraperitoneal) dozda ksilazin HCl ve 50 mg/kg (intraperitoneal) dozda ketamin HCl anestezisi uygulandı (71, 80, 81). Aynı şekilde her biyopsi alımından 10 dk önce 2. grup sıçanlara 50 mg/kg dozda (intraperitoneal) tiopental sodyum uygulandı (82). 3. grup sıçanlara ise 4 mg/kg dozda tramadol sadece 0. gün yara oluşturulması aşamasında lokal olarak uygulandı. Literatüre dayalı olarak anesteziğin etki süresi değerlendirilerek 1 ve 2. gruptaki sıçanlara her biyopsi alımından 10 dakika önce anestezi uygulanmıştır (83, 84). Etik değerler dikkate alınarak ve bilimsel literatür doğrultusunda lokal olarak uygulanan tramadol grubu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. %70 lik alkolle dezenfeksiyon işlemi sonrasında, hayvanın yaraya ulaşmasını engellemek amacıyla hayvanların sırt bölgesinin orta hattı tıraş edildi ve Şekil 3.2. de gösterildiği gibi steril punch aracılığıyla yaklaşık 1 cm çapında 3 adet dairesel yara oluşturuldu. Yara

oluşumu esnasında alınan doku örnekleri 0.gün dokuları olarak saklandı. Yaralara hergün serum fizyolojik ile pansuman yapıldı ve sıçanların yaralara yaklaşmasını önlemek için yara bandı ile bantlandı (Şekil 3.3). Daha sonra bu yaralardan her birinden farklı günlerde olmak üzere 3., 7. ve 14.günlerde 1 cm çapında steril punch aracılığıyla biyopsi örneği alınmıştır. Alınan biyopsi örnekleri moleküler çalışmalarda kullanılabilecek kadar -80 °C’de bekletilmiştir.



Şekil 3-2: Sıçanların sırtına dairesel yaraların oluşturulması



Şekil 3-3: Sıçanlara pansuman yapılması

3.2.Moleküler Çalışmalar

3.2.1. RNA izolasyonu

1. Dokular, -80°C 'den çıkarılıp, oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı.
2. Dokudan yaklaşık 30 mg alınarak dondurulmuş petri kabı üzerine konuldu.
3. 400 μl Lysis buffer eklenerek yaklaşık 5 dk boyunca çift bistüri yardımıyla homojenizasyon yapıldı (Şekil 3.5).
4. 2 dk 13000 rpm'de santrifüj yapılarak süpernatant yeni bir ependorfa alındı.
5. Süpernatana 200 μl etanol eklendi.
6. Karışım filtrelili tüpe aktarıldı.
7. 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra filtreden geçen kısım atıldı.
8. Filtreye 90 μl 'DNase incubation' buffer ile 10 μl 'DNase I working solution' karışımı eklendi.
9. 15 dk 25°C 'de inkübe edildi.
10. Karışıma 500 μl 'wash buffer I' eklendi ve 15 saniye 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Filtreden geçen sıvı atıldı.
11. Filtreye 500 μl 'wash buffer II' ve 15 saniye 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Filtreden geçen sıvı atıldı.
12. Filtreye 300 μl 'wash buffer II' ve 2 dk 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Filtreden geçen sıvı atıldı.
13. Filtre yeni bir tüpe (1,5ml) aktarıldı.
14. Filtre üzerine 50 μl 'elution buffer' eklenip 1 dk 8000 rpm'de santrifüj yapıldı.
15. Filtre üzerine tekrar 50 μl 'elution buffer' eklenip 1 dk 8000 rpm'de santrifüj yapıldı.
16. Filtre atıldı ve 100 μl RNA elde edildi.



Şekil 3-4: Doku homojenizasyonu

3.2.2. RNA Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop kullanılarak ölçüldü.

3.2.3.cDNA eldesi

cDNA eldesi için total RNA örnekleri eşit konsantrasyona getirildi, RNA'ların üzerine 1'er μ l Oligo DT (18) ve random hexamer eklenerek 65°C'de 10 dk inkübe edildi ve aşağıdaki karışım hazırlandı.

Tablo 3-3: cDNA sentezi PZR içeriği

	Miktar
5 X RT Buffer	4 μ l
dNTP mix (10 mM)	2 μ l
RNaz inhibitör	0,5 μ l
Reverse transkriptaz	0,5 μ l
Toplam	7 μl

Hazırlanan karışım, PZR(Polimeraz zincir reaksiyonu) tüplerinde inkübe edilmiş olan Oligo DT (18) ve random hexamer'li RNA'ların üzerine dağıtıldı. Daha sonra,

25°C’de 10 dk, 55°C’de 30 dk, 85°C’de 5 dk bekletildi. Elde edilen cDNA’lar -80°C’de saklandı.

3.2.4.RT² Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada incelenmek istenen 43 adet gen ve 4 adet referans gene özgü olarak tasarlanmış primerler ve hidroliz problemleri kullanılarak RT-PZR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Çalışma esnasında incelenen genler Tablo 3-4’te gösterilmiş olup, *Hprt1*(Hipoksantin fosforibozil transferaz), *G6pd* (Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz), *B2m* (Beta 2 mikroglobulin) ve *Actβ* (Aktin beta) genleri referans (housekeeping) genler olarak kullanılmıştır. RNA izolasyonu yapılan her bir dokudan 40 µl cDNA elde edildi ve aynı anestezi uygulanan sıçanlardan elde edilen cDNA’lar ile 50µl distile su karıştırılarak cDNA havuzu yapıldı (250µl). Daha sonra Tablo 3-5’te gösterilen PZR karışımı hazırlandı.

Tablo 3-4: Çalışılan genlerin sembolleri ve açılımları

GEN SEMBOL	GEN TAM İSİM
<i>Angpt1</i>	<i>Anjiyopoetin 1</i>
<i>AP-1</i>	<i>Aktivatör protein 1</i>
<i>Atct1</i>	<i>Kardiyak aktin alfa 1</i>
<i>Ccl7</i>	<i>Kemokin (C-C motif) ligand 7</i>
<i>Cd40lg</i>	<i>CD40 ligand</i>
<i>CD62L</i>	<i>L selektin</i>
<i>Col14a1</i>	<i>Kollajen, tip XIV, alfa 1</i>
<i>Col1a1</i>	<i>Kollajen, tip I, alfa 1</i>
<i>Col1a2</i>	<i>Kollajen, tip I, alfa 2</i>
<i>Col3a1</i>	<i>Kollajen, tip III, alfa 1</i>
<i>Col4a1</i>	<i>Kollajen, tip IV, alfa 1</i>
<i>Col4a3</i>	<i>Kollajen, tip IV, alfa 3</i>
<i>Col5a1</i>	<i>Kollajen, tip V, alfa 1</i>
<i>Col5a3</i>	<i>Kollajen, tip V, alfa 3</i>
<i>Csf3</i>	<i>Koloni uyarıcı faktör 3 (granülosit)</i>
<i>Ctsk</i>	<i>Katepsin K</i>
<i>Cxcl1</i>	<i>Kemokin (C-X-C motif) ligand 1(melanoma büyüme uyarıcı aktivitesi)</i>
<i>Cxcl3</i>	<i>Kemokin (C-X-C motif) ligand 3</i>
<i>Egf</i>	<i>Epidermal büyüme faktörü</i>
<i>Fgfr2</i>	<i>Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2</i>

<i>Hbegf</i>	<i>Heparin-bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü</i>
<i>Hgf</i>	<i>Hepatosit büyüme faktörü</i>
<i>Ifn-g</i>	<i>Interferon gamma</i>
<i>Igf1</i>	<i>İnsülin benzeri büyüme faktörü 1</i>
<i>IL-1 β</i>	<i>İnterlökin 1 beta</i>
<i>Il-2</i>	<i>İnterlökin 2</i>
<i>IL-6</i>	<i>İnterlökin 6</i>
<i>Itga3</i>	<i>Integrin, alfa 3</i>
<i>Itga5</i>	<i>Integrin, alfa 5 (fibronektin reseptör, alfa polipeptid)</i>
<i>Itgb5</i>	<i>Integrin, beta 5</i>
<i>Mapk3</i>	<i>Mitojen aktif protein kinaz 3</i>
<i>Mif</i>	<i>Makrofaj göç inhibisyon faktör</i>
<i>Mmp2</i>	<i>Matriks metalloproteinaz 2</i>
<i>Mmp7</i>	<i>Matriks metalloproteinaz 7</i>
<i>Mmp9</i>	<i>Matriks metalloproteinaz 9</i>
<i>Muc-1</i>	<i>Müsin 1</i>
<i>Nfk- β</i>	<i>Nükleer Faktör kappa beta</i>
<i>Pdgfa</i>	<i>Trombosit kaynaklı büyüme faktörü alfa</i>
<i>Smad-7</i>	<i>Smad protein ailesi üyesi 7</i>
<i>Stat-3</i>	<i>Sinyal taşıyıcı ve transkriptin 3 aktivatörü</i>
<i>Tgf-β1</i>	<i>Transforme edici büyüme faktörü, beta reseptör 1</i>
<i>Tnf-α</i>	<i>Tümör Nekrozis Faktörü alfa</i>
<i>Wnt5a</i>	<i>Kanatsız tip bütünleyici gen ailesi 5A</i>

Tablo 3-5: RT²-PZR içeriği

	Miktar
Master Mix	10 µl
cDNA	5 µl
Distile su	5 µl
Toplam	20 µl

Hazırlanan PZR karışımı Tablo 3-7’de genlerin yerleşimi verilmiş olan plate içerisine emdirilmiş halde bulunan primerlerin üzerine eşit miktarda dağıtıldı. Bir plate’te iki örnek aynı anda çalışıldı. Light Cycler 480 gerçek zamanlı PZR cihazı ile Tablo 3-6’da verilen koşullarda PZR çalışması yürütüldü.

Tablo 3-6: RT²-PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman	
Ön denatürasyon	95 °C	10 dk.	1 döngü
Amplifikasyon	95 °C	10 sn.	45 döngü
Amplifikasyon	60 °C	30 sn.	
Amplifikasyon	72 °C	01 sn.	
Soğutma	40 °C	30 sn.	1 döngü

Tablo 3-7: Plate içerisinde genlerin yerleşimi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Angptl1 <i>R. norvegicus</i>	RGD1307368 <i>R. norvegicus</i>	Acta1 <i>R. norvegicus</i>	Pbp <i>R. norvegicus</i>	Cd40lg <i>R. norvegicus</i>	Sell <i>R. norvegicus</i>	Angptl1 <i>R. norvegicus</i>	RGD1307368 <i>R. norvegicus</i>	Acta1 <i>R. norvegicus</i>	Pbp <i>R. norvegicus</i>	Cd40lg <i>R. norvegicus</i>	Sell <i>R. norvegicus</i>
B	Col1a1 <i>R. norvegicus</i>	Col1a2 <i>R. norvegicus</i>	Col1a1 <i>R. norvegicus</i>	Col5a3 <i>R. norvegicus</i>	Col3a1 <i>R. norvegicus</i>	Col4a1 <i>R. norvegicus</i>	Col14a1 <i>R. norvegicus</i>	Col1a2 <i>R. norvegicus</i>	Col1a1 <i>R. norvegicus</i>	Col5a3 <i>R. norvegicus</i>	Col3a1 <i>R. norvegicus</i>	Col4a1 <i>R. norvegicus</i>
C	Col5a1 <i>R. norvegicus</i>	Col4a3bp <i>R. norvegicus</i>	Csf3r <i>R. norvegicus</i>	Ctsk <i>R. norvegicus</i>	Cxcl3 <i>R. norvegicus</i>	Cxcl1 <i>R. norvegicus</i>	Col5a1 <i>R. norvegicus</i>	Col4a3bp <i>R. norvegicus</i>	Csf3r <i>R. norvegicus</i>	Ctsk <i>R. norvegicus</i>	Cxcl3 <i>R. norvegicus</i>	Cxcl1 <i>R. norvegicus</i>
D	Egf <i>R. norvegicus</i>	Fgfr2 <i>R. norvegicus</i>	Hbegf <i>R. norvegicus</i>	Hgf <i>R. norvegicus</i>	Ifng <i>R. norvegicus</i>	Igf1r <i>R. norvegicus</i>	Egf <i>R. norvegicus</i>	Fgfr2 <i>R. norvegicus</i>	Hbegf <i>R. norvegicus</i>	Hgf <i>R. norvegicus</i>	Ifng <i>R. norvegicus</i>	Igf1r <i>R. norvegicus</i>
E	Il1b <i>R. norvegicus</i>	Il2 <i>R. norvegicus</i>	Il6 <i>R. norvegicus</i>	Itga3 <i>R. norvegicus</i>	Itga5 <i>R. norvegicus</i>	Itgb5 <i>R. norvegicus</i>	Il1b <i>R. norvegicus</i>	Il2 <i>R. norvegicus</i>	Il6 <i>R. norvegicus</i>	Itga3 <i>R. norvegicus</i>	Itga5 <i>R. norvegicus</i>	Itgb5 <i>R. norvegicus</i>
F	Mapk3 <i>R. norvegicus</i>	Mif <i>R. norvegicus</i>	Q9JHC2_RAT <i>R. norvegicus</i>	Mmp7 <i>R. norvegicus</i>	Mmp9 <i>R. norvegicus</i>	Hprt1 <i>R. norvegicus</i>	Mapk3 <i>R. norvegicus</i>	Mif <i>R. norvegicus</i>	Q9JHC2_RAT <i>R. norvegicus</i>	Mmp7 <i>R. norvegicus</i>	Mmp9 <i>R. norvegicus</i>	Hprt1 <i>R. norvegicus</i>
G	B2GV31_RAT <i>R. norvegicus</i>	Nfkb1 <i>R. norvegicus</i>	Pdgfa <i>R. norvegicus</i>	Smad7 <i>R. norvegicus</i>	Pias3 <i>R. norvegicus</i>	G6pd <i>R. norvegicus</i>	B2GV31_RAT <i>R. norvegicus</i>	Nfkb1 <i>R. norvegicus</i>	Pdgfa <i>R. norvegicus</i>	Smad7 <i>R. norvegicus</i>	Pias3 <i>R. norvegicus</i>	G6pd <i>R. norvegicus</i>
H	Tbrg1 <i>R. norvegicus</i>	Tnf <i>R. norvegicus</i>	Wnt5a <i>R. norvegicus</i>	Actb <i>R. norvegicus</i>		B2m <i>R. norvegicus</i>	Tbrg1 <i>R. norvegicus</i>	Tnf <i>R. norvegicus</i>	Wnt5a <i>R. norvegicus</i>	Actb <i>R. norvegicus</i>		B2m <i>R. norvegicus</i>

Kalibratör genler plate üzerinde renkli olarak gösterilmiştir.

3.2.5.İstatistiksel Analizler

Gerçek zamanlı PZR çalışması sonuçları Livak ve Schmittgen'in tanımladığı ve formüle ettiği şekilde $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanılarak analiz edildi (85). Sonuçlar her bir gen için eşik değerde yoğunluğa ulaştığı döngü sayısı (Ct) değeri olarak elde edilmektedir. Bu değer, cihaz tarafından referans (house keeping) olarak tanıtılan genler referans alınarak hesaplanır. Her bir gen için elde edilen Ct değeri referans olarak kullanılan bir

veya daha çok referans genin Ct değeri ile karşılaştırılarak ΔCt değeri elde edilir. Birden fazla referans gen kullanılmışsa önce bu genlerin Ct değerlerinin ortalaması alınır daha sonra ΔCt hesaplanır. Bu çalışmada 4 adet referans gen kullanıldığı için *Hprt1* (Hipoksantin fosforibozil transferaz), *G6pd* (Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz), *B2m* (Beta 2 mikroglobulin) ve *Actβ* (Aktin beta) genlerinin Ct değerlerinin ortalaması alındı. Yapılan normalizasyon işlemlerinin ardından aşağıdaki denklemler yardımıyla $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri hesaplanmıştır.

K: kontrol grubu, T: tedavi grubu, R: housekeeping gen, X: ilgili gen olmak üzere;

$$\Delta Ct_{KX} = Ct_{KX} - Ct_R, \quad \Delta Ct_{TX} = Ct_{TX} - Ct_R$$

$$\Delta\Delta Ct_X = \Delta Ct_{TX} - \Delta Ct_{KX}$$

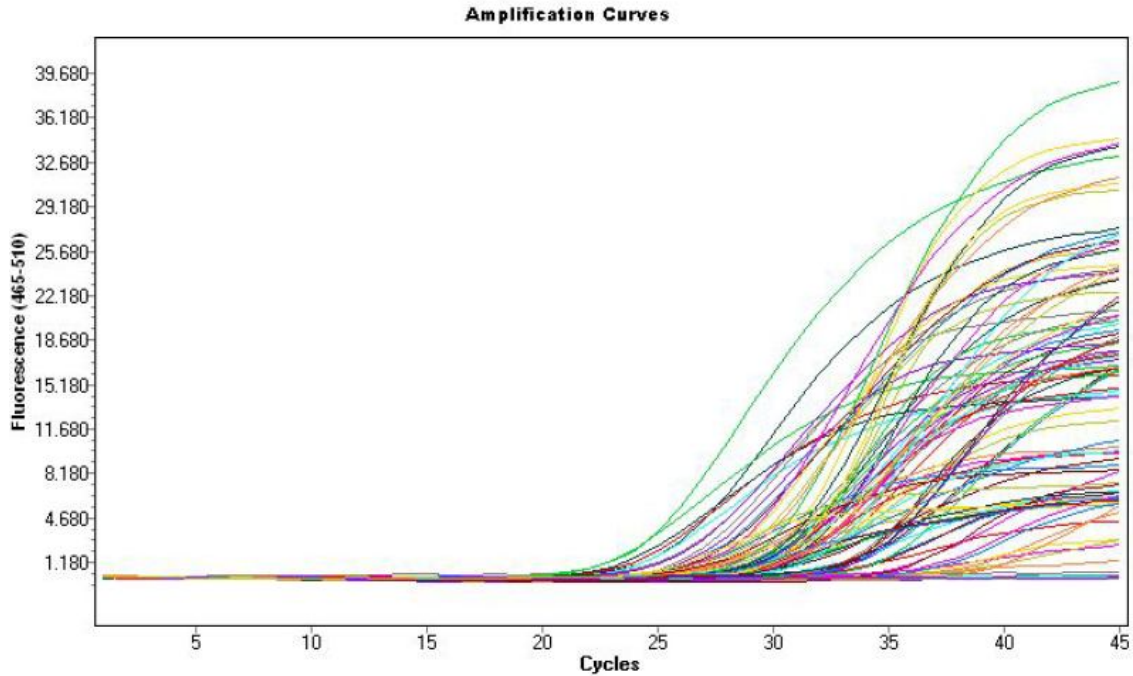
$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta C_{TX}}$$

Bu işlem sonrası çıkan değer 1'den büyükse gen ifadesi kontrole göre o kadar kat artmış demektir. Ancak işlem sonrası çıkan değer 1'den küçükse aşağıdaki işlem uygulanır;

1/Kat değişimi yani $1/2^{-\Delta\Delta C_{TX}}$ çıkan değer yine 1'den büyük olacaktır ancak bu defa gen ifadesinin arttığını değil, azaldığını gösterecektir. Değer kaç ise gen ifadesi kontrole göre o kadar kat azalmış demektir.

4. BULGULAR

Sıçanlarda ketamin ve tiyopental sodyum anesteziklerinin kullanılmasının yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş öne çıkan bazı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla gerçek zamanlı PZR çalışmasıyla Tablo 4-1’de gösterilen 43 adet gen ve 4 adet referans gen çalışılmıştır. Alınan doku örneklerinden RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA elde edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR çalışması sonrasında çalışılan 43 adet genin her biri ayrı ayrı değerlendirmeye tabi tutularak sonuçlar hesaplanmıştır.



Şekil 4-1: Amplifikasyon eğrilerinden bir örnek

Tüm genlerle ilgili kantitatif gerçek zamanlı PZR sonuçlarımızdan eşik değerde yoğunluğa ulaştığı döngü sayısı (Ct) değeri elde edildi. Her bir gen için elde edilen Ct değeri referans olarak kullanılan 4 adet housekeeping genin Ct değerinin ortalaması ile karşılaştırılarak ΔCt değeri elde edildi. Daha sonra kat değişimi değerleri hesaplanarak tabloda gösterilmiştir (Tablo 4-1). Bu değerler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanmıştır ve kontrol grubu ile tedavi grubu arasındaki gen ekspresyonu farklılıklarını gösteren kat değişim değerleridir. Yara iyileşmesinin 3., 7. ve 14. günlerinde alınan örneklerden elde edilen sonuçlarda kontrol grubuna göre up-regüle (fazla ifade edilen) ve down-regüle (az ifade edilen) genler bir arada gösterilmiştir.

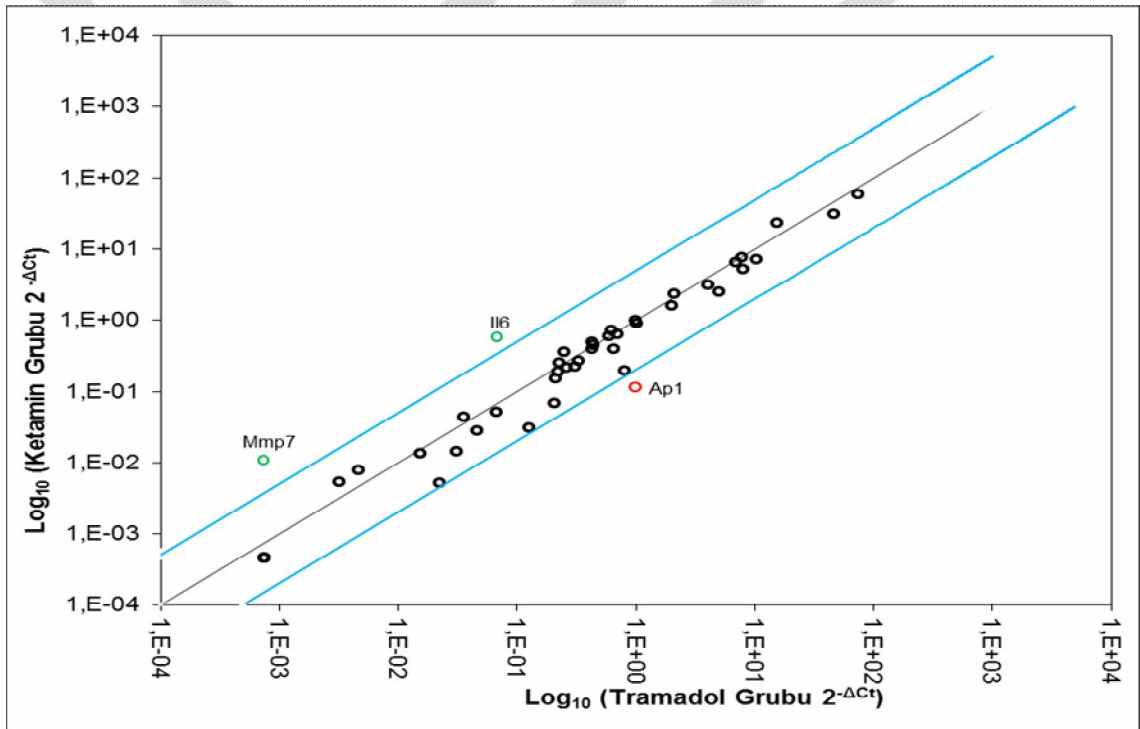
Tablo 4-1: Çalışılan tüm genlerin kat değişimi değerlerinin gösterilmesi

Gen sembölü	3.gün		7.gün		14.gün	
	Ketamin	Tiyopental	Ketamin	Tiyopental	Ketamin	Tiyopental
<i>Angptl1</i>	-1,60	5,07	-5,04	1,39	-6,50	-1,07
<i>AP-1</i>	-8,55	-2,01	1,81	-2,93	-1,02	-1,84
<i>Actc1</i>	1,53	4,94	-1,36	5,94	-1,95	-2,13
<i>Ppbp</i>	-1,11	-25,05	3,78	5,86	-5,31	2,84
<i>Cd40lg</i>	-1,62	-3,94	1,32	-2,69	19,70	34,46
<i>Cd62l</i>	-1,21	-3,94	1,63	-1,05	-1,65	3,26
<i>Col14a1</i>	-1,38	-1,89	-3,04	1,07	1,85	8,55
<i>Col1a2</i>	-1,46	-2,82	-2,93	-5,58	-1355130,16	-732938,86
<i>Col1a1</i>	-1,19	-2,61	-2,27	-3,92	1,43	2,54
<i>Col5a3</i>	-1,94	-4,62	-1,78	-3,51	1,04	8,21
<i>Col3a1</i>	-1,40	-2,36	-3,15	-2,38	1,41	5,02
<i>Col4a1</i>	1,00	-1,76	-2,76	-4,63	-1,78	2,05
<i>Col5a1</i>	-1,27	-2,82	-2,27	-3,18	1,73	5,23
<i>Col4a3</i>	1,20	-1,61	-1,88	-1,72	-1,59	1,23
<i>Csf3</i>	1,05	-2,58	2,12	-1,13	-3,66	-1,04
<i>Ctsk</i>	-1,11	-1,71	-2,43	-2,50	1,67	2,49
<i>Cxcl3</i>	-1,47	-9,23	-1,08	-6,36	-15,67	-2,91
<i>Cxcl1</i>	-1,21	-1,69	2,20	1,51	-38,59	-3,95
<i>Egf</i>	-1,29	-1,34	-3,17	-1,47	-3,84	-2,00
<i>Fgfr2</i>	-3,00	-3,57	-1,61	-5,90	-2,00	-2,26
<i>Hbegf</i>	1,50	-1,93	8,26	1,39	1,00	1,26
<i>Hgf</i>	1,70	1,18	-4,97	4,26	-2,43	-1,70
<i>Ifng</i>	-1,62	1,17	4,07	-1,06	-2,81	-6,74
<i>Igf1</i>	-1,36	-2,41	-1,50	-3,32	-1,79	-1,21
<i>Il1 β</i>	-1,01	-7,82	2,60	-3,14	-4,96	-1,30
<i>Il2</i>	-1,62	-3,94	7,40	9,58	16,34	2,84
<i>Il6</i>	8,77	4,04	1,81	3,94	-8,28	3,43
<i>Itga3</i>	1,12	-6,85	1,46	-3,94	-1,41	-2,82
<i>Itga5</i>	-1,08	-2,36	-1,86	-2,46	1,19	5,76
<i>Itgb5</i>	1,72	-2,46	1,25	-6,06	-4,56	-5,44
<i>Mapk3</i>	1,04	-1,64	-1,36	-3,46	-1,01	2,71
<i>Mif</i>	-1,64	2,08	1,25	-1,75	-2,81	-1,72
<i>Mmp2</i>	-1,06	-1,75	-2,10	-4,29	1,49	5,05
<i>Mmp7</i>	14,86	2,49	-1,65	-1,22	5,43	7,09
<i>Mmp9</i>	-4,10	-46,42	1,95	-4,92	-1,01	-1,19
<i>Muc1</i>	-4,19	-5,19	-2,38	-1,84	-1,43	-3,08
<i>NFk-β</i>	1,18	-1,67	1,41	-2,60	1,03	-1,28
<i>Pgfa</i>	-1,10	-1,38	-1,96	-9,58	-1,89	-1,70
<i>Smad7</i>	-1,20	-4,49	-1,07	-1,96	-1,60	-3,30
<i>Pias3</i>	1,23	14,55	-2,87	-2,53	36,76	66,10
<i>Tbrg1</i>	1,14	1,39	-3,06	-1,32	-2,10	1,03
<i>Tnf-α</i>	-4,07	1,01	1,61	-1,08	-30,91	-3,98
<i>Wnt5a</i>	-2,15	-5,02	2,42	5,86	-1,13	-1,57

4.1. 3. Gün Yara İyileşmesine ait Bulgular

4.1.1. Ketamin Grubuna ait Bulgular

3.günde alınan doku örneklerinden gerçek zamanlı PZR çalışması sonunda elde edilen kat değişimi bulgularına göre; anestezi olarak ketamin uygulanan grubun anestezi uygulanmayan kontrol gruba kıyaslanmasıyla, ekspresyon seviyeleri artan (5 kat ve üzeri/ -5 kat ve altı) genler *IL-6* (interlökin-6) ve *Mmp7* (matriks metalloproteinaz 7), ekspresyon seviyesi azalan gen ise *AP-1* (aktivatör protein-1) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-2).

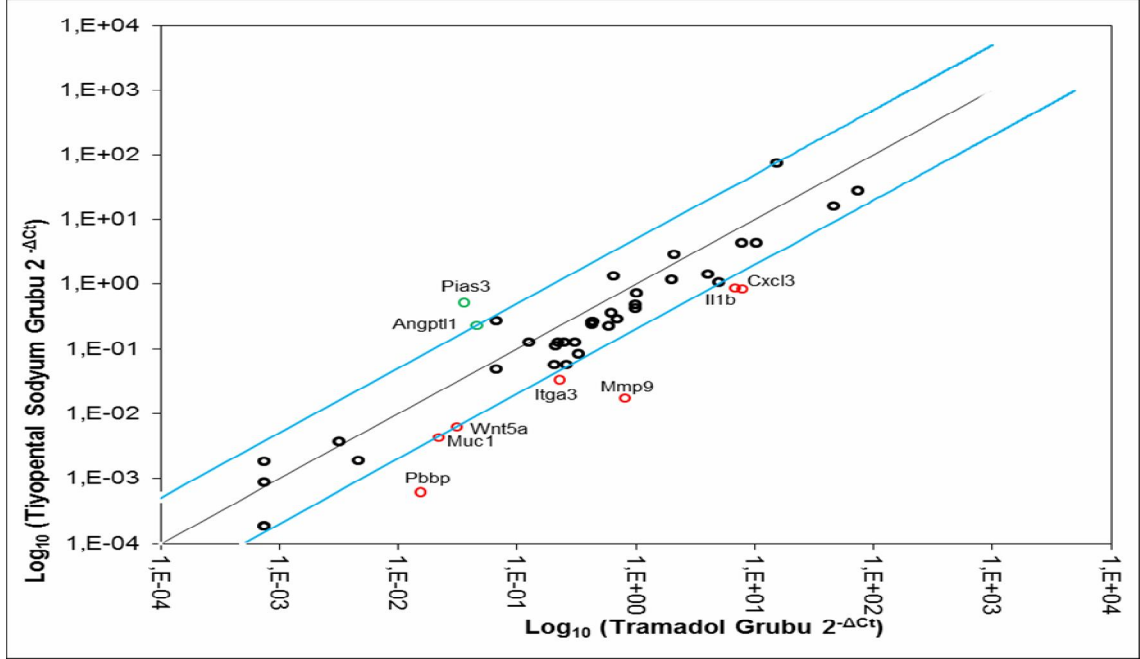


Şekil 4-2: Ketamin grubu için 3. gün gen profillemesi çalışmasının saçılım eğrisi

4.1.2. Tiyopental Sodyum Grubuna ait Bulgular

Tiyopental sodyum uygulanan grup ile anestezi uygulanmayan kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla 3.günde ekspresyon seviyeleri değişen (5 kat ve üzeri/ -5 kat ve altı) 9 adet gen tespit edilmiştir. Bu genlerden iki tanesinin (*Angpt1* (anjiyopoetin 1) ve *Pias 3* (Signal taşıyıcı ve transkriptin 3 aktivatörü)) ekspresyon seviyesi artmış, 7 tanesinin ise (*Cxcl3* (kemokin c-x-c motif ligand 3), *IL-1b* (interlökin-1 beta), *Mmp9* (matriks

metalloproteinaz 9), *Itga3* (integrin alfa 3), *Wnt5a* (Kanatlı tip bütünleyici gen ailesi 5A), *Muc-1* (müsin-1) ve *Pbbp* (kemokin c-c motif ligand 7)) ekspresyon seviyesi azalmıştır (Şekil 4-3).

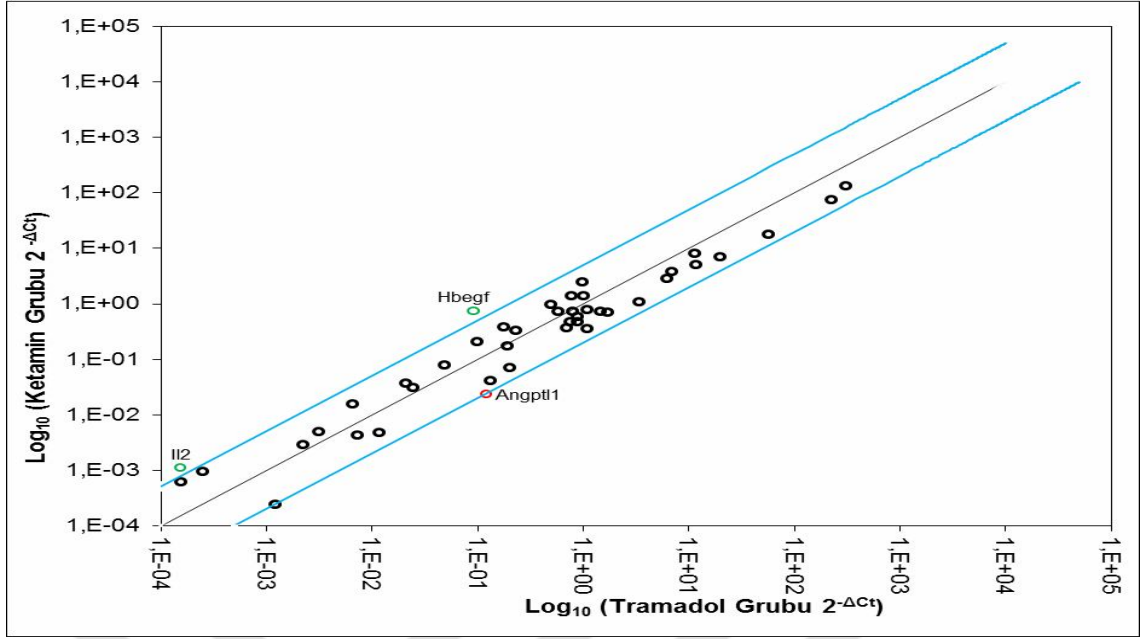


Şekil 4-3: Tiyopental sodyum grubu için 3. gün gen profillemesi çalışmasının saçılım eğrisi

4.2. 7. Gün Yara İyileşmesine ait Bulgular

4.2.1. Ketamin Grubuna ait Bulgular

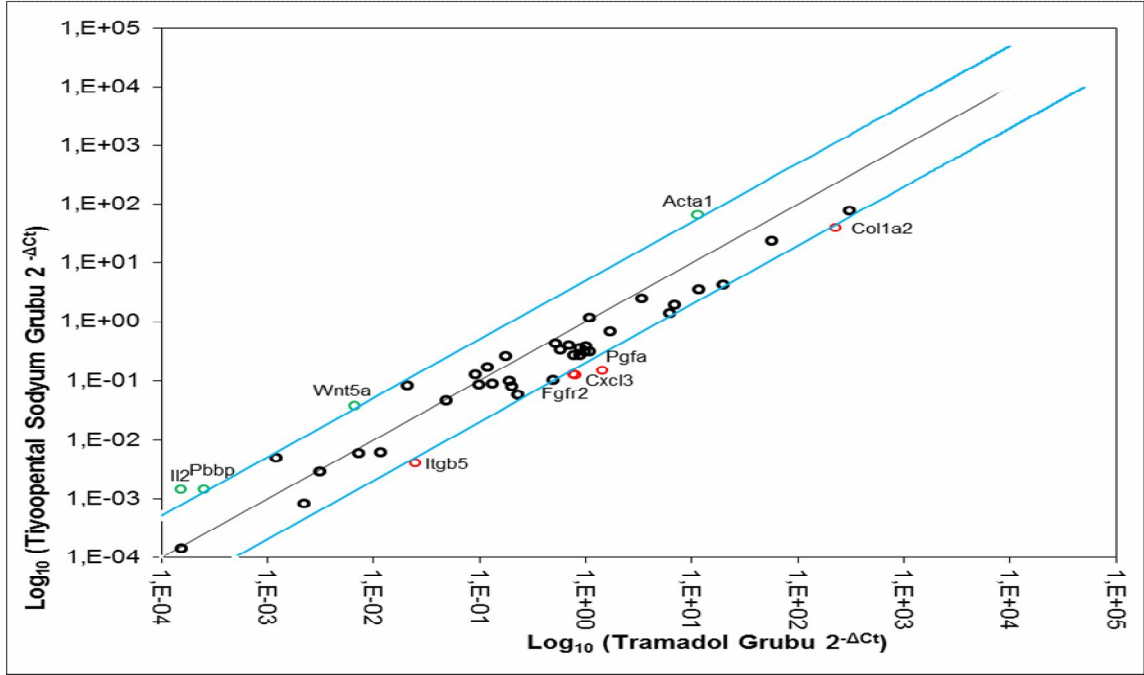
7. günde alınan doku örneklerinden elde edilen kat değişimi bulgularına göre anestezi olarak ketamin uygulanan grup ile anestezi uygulanmayan kontrol grubu arasındaki kıyaslamada *IL-2* (interlökin 2) ve *Hbepf* (heparin bağlı epidermal büyüme faktörü) genlerinin ekspresyonu artmış, *Angpt1* (anjiyopoetin 1) geninin ekspresyonu ise azalmıştır (5 kat ve üzeri/ -5 kat ve altı) (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Ketamin grubu için 7. gün gen profillemeye çalışmasının saçılım eğrisi

4.2.2. Tiyopental Sodyum Grubuna ait Bulgular

Tiyopental sodyum uygulanan grup ile anestezik uygulanmayan kontrol grubu arasında 7.günde alınan doku örneklerinden yapılan karşılaştırmaya göre ekspresyonu değişen (5 kat ve üzeri/ -5 kat ve altı) 9 adet gen tespit edilmiştir. *Actc1* (aktin alfa kalp kası 1/kardiyak aktin), *Wnt5a* (Kanatsız tip bütünleyici gen ailesi 5A), *IL-2* (interlökin-2) ve *Ppbb* (kemokin c-c motif ligand 7) genlerinin ekspresyon seviyeleri artmış, *Colla2* (kollajen tip 1 alfa 2), *Pdgfa* (trombositten türetilmiş büyüme faktörü alfa), *Cxcl3* (kemokin c-x-c motif ligand 3), *Fgfr2* (fibroblast büyüme faktörü 2) ve *Itgb5* (integrin beta 5) genlerinin ekspresyon seviyeleri azalmıştır (Şekil 4-5).

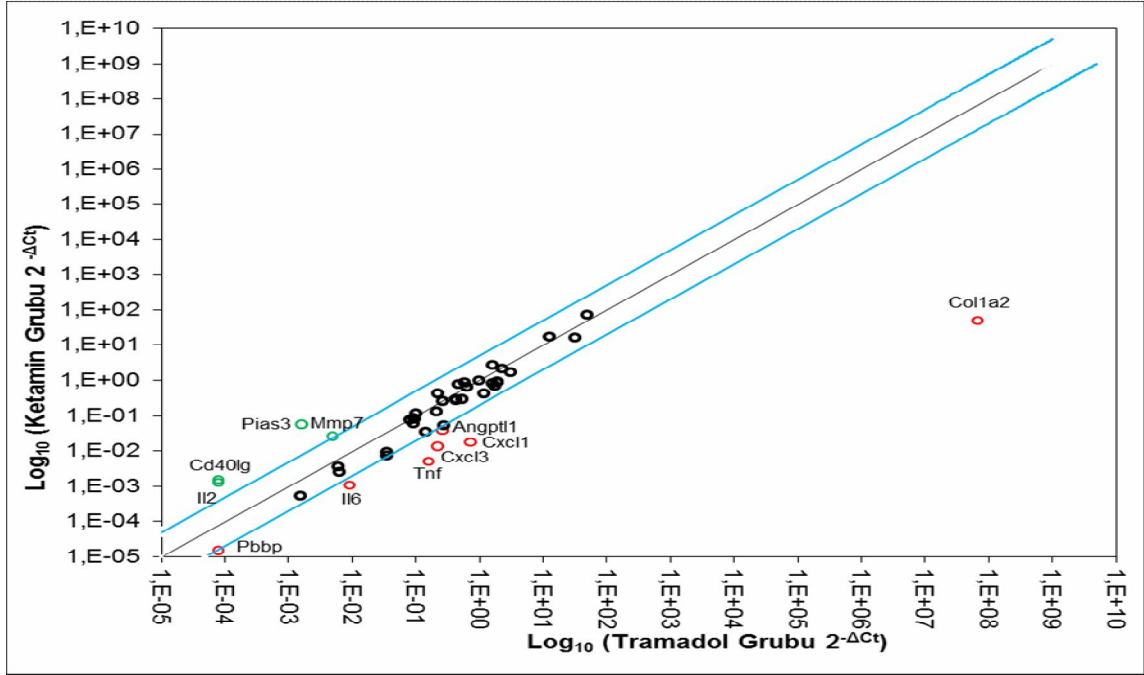


Şekil 4-5: Tiyopental sodyum grubu için 7. gün gen profillemesi çalışmasının saçılım eğrisi

4.3. 14. Gün Yara İyileşmesine ait Bulgular

4.3.1. Ketamin Grubuna ait Bulgular

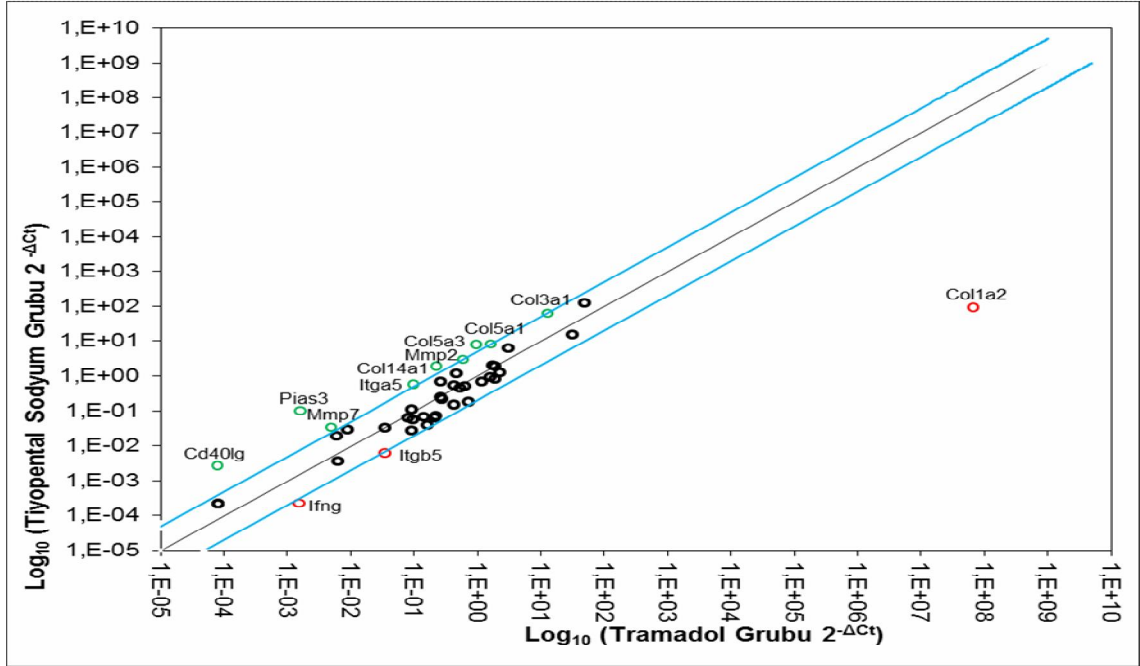
Ketamin uygulanan grup ile anestezik uygulanmayan kontrol grubu arasında 14.günde alınan doku örneklerine kıyasla ekspresyonu artan (5 kat ve üzeri) genler *Mmp7* (matriks metalloproteinaz 7), *Pias 3* (Sinyal taşıyıcı ve transkriptin 3 aktivatörü), *Cd40lg* (CD40 ligand), *IL-2* (interlökin-2) genleri olarak tespit edilmiştir. *Col1a2* (kollajen tip 1 alfa 2), *Cxcl1* (kemokin c-x-c motif ligand 1), *Angpt1* (anjiyopoetin 1), *Cxcl3* (kemokin c-x-c motif ligand 3), *Tnf* (Tümör nekroz faktör), *IL-6* (interlökin-6) ve *Pbbp* (kemokin c-c motif ligand 7) genlerinin ise ekspresyon seviyelerinin azaldığı (-5 kat ve altı) görülmüştür (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Ketamin grubu için 14. gün gen profileme çalışmasının saçılım eğrisi

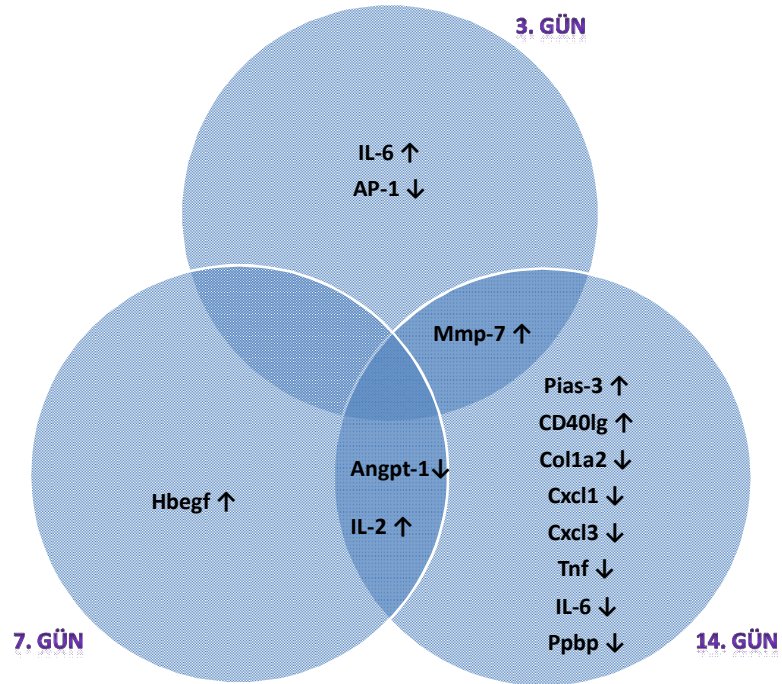
4.3.2. Tiyopental Sodyum Grubuna ait Bulgular

14.günde alınan doku örneklerinden elde edilen kat değişimi bulgularına göre anestezi olarak tiyopental sodyum uygulanan grup, anestezi uygulanmayan kontrol grubuna kıyaslandığında 12 adet ekspresyonu değişen (5 kat ve üzeri/ -5 kat ve altı) gen tespit edilmiştir. *Col3a1* (kollajen tip 3 alfa 1), *Col5a1* (kollajen tip 5 alfa 1), *Col5a3* (kollajen tip 5 alfa 3), *Mmp2* (matriks metalloproteinaz 2), *Col14a1* (kollajen tip 14 alfa 1), *Itga5* (integrin alfa 5), *Pias 3* (sinyal iletim ve aktivatör proteini 3), *Mmp7* (matriks metalloproteinaz 7) ve *Cd40lg* (CD40 ligand) genlerinin ekspresyon seviyesi artarken *Col1a2* (kollajen tip 1 alfa 2), *Itgb5* (integrin beta 5) ve *Ifng* (interferon gama) genlerinin azalmıştır (Şekil 4-7).

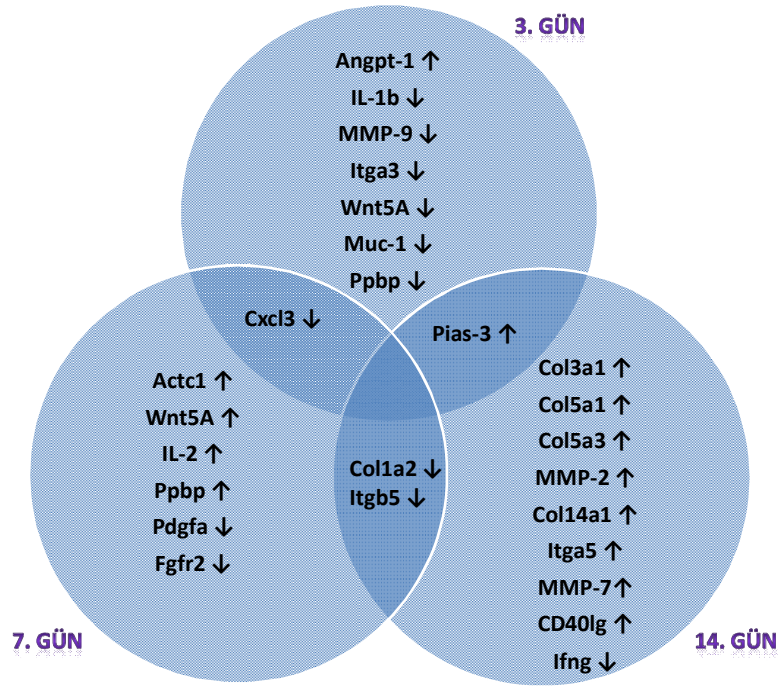


Şekil 4-7: Tiyopental sodyum grubu için 14. gün gen profillemesi çalışmasının saçılım eğrisi

4.4. Tüm günlere ait Bulguların Venn şeması ile gösterilmesi



Şekil 4-8: Ketamin grubunun ekspresyon değişimlerinin tüm günler için venn şeması ile gösterilmesi (↑↓ işaretleri ekspresyon artış ve azalışını göstermektedir).



Şekil 4-9: Tiopental Sodyum grubunun ekspresyon değişimlerinin tüm günler için venn şeması ile gösterilmesi (↑↓ işaretleri ekspresyon artış ve azalışını göstermektedir).

5. TARTIŞMA

Deneysel yara çalışmaları hayvanlar üzerinde anestezi altında yapılmaktadır. Anestezik maddeler, deneysel çalışmalarda yara iyileşmesi evrelerinin incelenebilmesi amacıyla yaradan biyopsi alımından önce kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmada kullanılan hayvanlar 3-5 kez bu anesteziklere maruz kalmaktadırlar. Bu anestezikler arasında ketamin ve tiyopental sodyum öne çıkanlar arasındadır.

Anestezikler bu çalışmalarda her ne kadar hayvanların acı çekmesini önlemek amacıyla kullanılsa da gen ekspresyonun hücrelerde, dokularda ve hatta organizmada içsel ve dışsal faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. Eğer bu anestezikler hücrenin gen ekspresyonu yanıtlarını etkiliyorsa, gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalarda bu bileşiklerin kullanılması interferans verici bir etken oluşturabilir. Literatürde her iki anestezik maddenin yara iyileşmesine etkisi olduğu bilinen genlerin ekspresyonları üzerine etkilerini aynı anda inceleyen çalışmalar göze çarpmamaktadır. Bu soruyu yanıtlayacak bir çalışma, her iki anestezik maddenin kullanımından elde edilmiş, edilecek veya planlanan gen ekspresyon çalışmalarının değerlendirilmesine farklı bir bakış açısı getirebilir.

Çalışmamızda sıçanlarda ketamin ve tiyopental sodyum anesteziklerinin kullanılmasının yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş öne çıkan bazı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak ve bu bileşiklerin anestezi dışındaki olası etkilerini değerlendirmek, yara iyileşmesi sürecinde rol oynayan moleküller üzerinde etkisinin olup olmadığını göstermek amaçlanmıştır.

Bu amaçla ketamin ve tiyopental sodyum anesteziklerinin kullanıldığı gruplar ile kontrol grubu arasındaki gen ekspresyon farklılıklarını wistar albino sıçanlarda tam kat yara oluşturmak suretiyle erken (3.gün), orta (7.gün) ve geç (14.gün) dönem olmak üzere 3 farklı zamanda inceledik. Bu üç farklı zamanı seçmemizin nedeni, bu üç ayrı gününde yara iyileşmesinin üç ayrı fazından biri içerisinde olmasıdır. Bunlar; inflamasyon fazı (3.gün), proliferasyon fazı (7.gün) ve olgunlaşma (matürasyon) fazıdır (14.gün). Bununla birlikte literatürde yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda yaygın olarak bu üç farklı zaman incelenmektedir (46, 86).

Ekspresyon seviyeleri incelenen genlerden bazıları yara iyileşmesinin erken evrelerinde (3. gün), bazıları orta evrelerinde (7. gün), bazıları son evrelerinde (14. gün), bazıları ise birden fazla evrede ekspresyon değişimi göstermiştir. Çeşitli genlerin yara iyileşmesinin fazları içerisinde karmaşık bir ekspresyon profili çizdiği literatürde belirtilmektedir (46, 86).

3. gün yara iyileşmesi inflamasyon fazı içerisinde. Bu evrede ilk olarak pıhtılaşma faktörleri ile yaradan kan kaybı önlenir. Yara bölgesine inflamatuvar hücrelerin ulaşması sağlanır (12). Nötrofiller yara bölgesine göç ederek bakterileri ve ölü dokuları fagosite eder ve proteazlar sayesinde ekstrasellüler matriksi yıkarlar (20, 22, 23). Bununla birlikte monositler, lenfositler ve plazma hücreleri gibi beyaz kan hücreleri de yara bölgesine göç eder (19). Daha sonra ölen nötrofillerin yerini makrofajlar alır ve TNF- α , IL-1, IL-6 gibi faktörlerin salınımını sağlarlar (29). Hemostatik faktörlerin ve trombositlerden salgılanan faktörlerin işlevleri Tablo 2-1’de gösterilmiştir. Ayrıca bu evrede matriks metalloproteinazlar, inflamatuvar debrisini temizleyerek yara hücrelerini matrikse doğru hareket ettirirler (22). Çalışmamızın 3. gün erken dönem sonuçlarını incelediğimizde ketamin anestezisine maruz olan grupta anestezi uygulanmayan gruba kıyasla *IL-6* ve *Mmp7*’nin ekspresyon seviyesinin arttığı, *AP-1* ekspresyon seviyesinin ise azaldığı dikkati çekmektedir. Literatürdeki çalışmalarda ketaminin IL-6 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (70). Ancak bizim çalışmamızdaki bulgulara göre *IL-6* ekspresyonu 3. günde artmış, 14.günde azalmıştır. Bu sonuçlar ketaminin *IL-6* gen ekspresyonunu azaltmadığını ancak proteini inhibe ettirdiğini düşündürebilir. Bununla birlikte literatürde ketaminin IL-6 üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar genellikle hücre kültürü çalışmalarıdır. Canlı organizmanın hücre kültürüne göre çok daha dinamik ve karmaşık bir süreç olması da sonuçlardaki farklılıkların nedeni olabilir. Kasım 2015 itibarıyla “Pubmed” veritabanına göre verdiğimiz anahtar kelimelerle ketaminin *MMP* grubu genler üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatüre göre ketamin anestezisi hücre kültürü çalışmalarında bir transkripsiyon faktörü olan *AP-1* geninin ekspresyonunu baskılamaktadır ve bizim çalışmamızda da bu genin ekspresyonunun düştüğü görülmüştür (74). *AP-1*’in içerisinde IL-6’nın da olduğu çeşitli sitokinlerin transkripsiyonunu kontrol etmede önemli bir faktör olduğu dikkate alınırsa, *AP-1* ekspresyonunun bizim çalışmamızda düşmekle birlikte *IL-6* seviyesinin yüksek olması çelişkili gibi gözükmektedir. Bizim sonuçlarımız ve literatür bilgimiz bu çelişkili yanıtın ana nedenini açıklamak için yeterli değildir.

Tiyopental sodyum grubunun 3. gün sonuçlarını değerlendirdiğimizde bu anestezi ile ketamine göre daha fazla genin anestezi uygulanması ile ekspresyon seviyelerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız tiyopental sodyum uygulanmasıyla *Angpt1* ve *Pias 3* genlerinin daha fazla, *Cxcl3*, *IL-1b*, *Mmp9*, *Itga3*, *Wnt5a*, *Muc-1* ve *Ppbp* genlerinin ise daha az eksprese olduğunu göstermiştir. Bu genlerden *Angpt1*'in gen ürünü yeni bir damar oluşturulması (neovaskülarizasyon) ve bu damarın stabilizasyonu açısından önemlidir. *Pias3* ise pek çok sitokine cevap olarak aktive edilen bir sinyal iletim molekülüdür. Bu genlerin ekspresyonunun artması yara iyileşmesi açısından hızlandırıcı bir etki olabilir. *Angpt1* geninin normal şartlarda anjiogenez safhasının olduğu 5. ile 15. günler arasında fazla eksprese olması beklenirken bizim çalışmamızda daha erken dönemde artmıştır. Ancak daha önce de belirtildiği gibi yara iyileşmesi fazları daha iyi anlaşılması için birbirinden ayrılmış olsa da aslında birbiri içerisine geçmiş eş zamanlı süreçlerdir. *IL-1b* erken evrede makrofajlar tarafından üretilen bir sitokindir ve tiyopental sodyum grubunda gen ifadesi azalmıştır. *Mmp-9* ifadesi erken dönemde azalsa da kollajenlerin fazlasının yıkılması ve yerini diğer ECM elemanlarının alabilmesi için özellikle tip 4 ve tip 5 kollajenleri parçalayan *Mmp-9* ifadesi orta evrede normal seviyededir. *Ppbp*'nin kollajen üretimini arttırdığı ve fibrozis ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda tiyopental anestezisi ile 3.günde ekspresyonu azalan *Ppbp*, bu anestezi ile 7.günde ekspresyonu artan genler arasında yer almaktadır.

Yedinci gün, yara iyileşmesinin proliferasyon fazının devam ettiği evredir. Bu faz nekrotik doku ve kan pıhtısı kaldırıldıktan sonra başlar (28, 31, 32). Bu evrede granülasyon dokusunun oluşumu, fibroplazi, anjiogenez, epitelizasyon ve yara kontraksiyonu gerçekleşmektedir (30, 32, 33). Fibroblastlar tarafından kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks komponentleri salgılır. Yara kontraksiyonu miyofibroblastlar tarafından sağlanır. Keratinositler ise yara yüzeyinin re-epitelizasyonunda görev alır (17). Çalışmamızın kurgusu içerisinde değerlendirmeye alınan 7. Gün sonuçları, ketaminin anestezisinin değerlendirilen genlerden *IL-2* ve *Hbegf* genlerinin ekspresyonunu arttırdığını, *Angpt1* geninin ekspresyonunu ise azalttığını göstermektedir. Ekspresyonu değişen genler içerisinde *IL-2*'nin makrofajların öldürücü kapasitesini artırdığı ve anjiogeneze yardımcı olduğu bilinmektedir (49). Cerrahi operasyon öncesinde ketamin anestezisi almış insanlardan 1., 2. ve 3. günlerde alınan kan örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada *IL-2* üretiminin ketamin öncesi ve

ketamin sonrası aynı seviyede kaldığı gösterilmiştir (87). Ancak sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine yapılan ve IL-2 ile ilgili olan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle diğer günlerde olduğu gibi bugüne ait değerlerimizi literatürle karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Ketamin anestezisi ile *Angpt1* gen ekspresyonunun 7. ve 14. günlerde azaldığının ortaya çıkartılması ve bu genin yeni damar oluşumundaki etkisi göz önüne alındığında, ketaminin yara iyileşmesine olumsuz etkisi olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Bununla birlikte, ketamin uygulanması ile çalışmamızda epidermal büyüme faktör ailesinin üyesi olan *Hbegf* gen ifadesi de bu dönemde artmış olduğu hesaplanmıştır. Fareler üzerinde yapılan bir yara iyileşmesi çalışmasında *Hbegf*'nin deri yara iyileşmesinde en önemli rolü oynayan büyüme faktörü olduğu gösterilmiştir (88). *Hbegf*'nin proliferasyondan ziyade keratinosit göçünü hızlandırmak suretiyle yara iyileşmesi epitelizeasyonunda önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir.

Tiyopental sodyum grubunda kontrol grubuna kıyasla 7.günde *Actc1*, *Wnt5a*, *IL-2* ve *Ppbp* genlerinin ekspresyon seviyeleri artmış, *Colla2*, *Pdgfa*, *Cxcl3*, *Fgfr2* ve *Itgb5* genlerinin ekspresyon seviyeleri azalmıştır. Büyüme faktörlerinden *Pdgfa*'nin ve büyüme faktörü reseptörü olan *Fgfr2* nin hücre büyümesi ve proliferasyonundan sorumlu ürünler oldukları ve her iki işlemin yara iyileşmesinin önemli basamaklarından olduğu dikkate alınırsa, bu anestezinin yara iyileşmesi üzerine olumsuz bir etkiye bulunabileceği yorumu yapılabilir.

Olgunlaşma fazı, genellikle yara iyileşmesinin 10. gününden sonra başlayan ve yıllarca sürebilen son evresidir. 14. gün, yara iyileşmesinin geç evresi olan olgunlaşma fazının içerisinde. Bu evrede granülasyon dokusu skar dokusuna dönüşür ve ekstrasellüler matriks olgunlaşır (28). Fibroblastların sayısı azalır, kollajen sentezi dengeye ulaşır, yara gerilim direnci artar, skar dokusunun hacmi azalır ve iyileşmiş skar dokusu oluşur (36, 37). Bu evrenin öne çıkan özelliği kollajen birikimi ve düzenlenmesidir (22). Bizim çalışmamızda ketamin grubunun 14. gün sonuçlarını anestezisi uygulanmayan gruba kıyasladığımızda ekspresyonu artan genler *Mmp7*, *Pias 3*, *Cd40lg*, *IL-2* genleri olarak tespit edilmiştir. *Colla2*, *Cxcl1*, *Angpt1*, *Cxcl3*, *Tnf*, *IL-6* ve *Ppbp* genlerinin ise ekspresyon seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Ketaminin MMP-7 üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamış olmasına rağmen MMP-7 çalışmamızda hem ketamin hemde tiyopental sodyum grubunda çeşitli günlerde ekspresyonu artan en dikkat çeken genlerden biridir. Kemokinlerin infalamatuar

lezyonlarda fazla bulunması göz önüne alındığında *Cxcl1*, *Cxcl3* ve *Ppbp* gibi kemokinlerin ekspresyonunun azalması ketamin uygulamasının inflamasyonu azaltabileceği yönünde bir beklentiye neden olabilir (54). Ancak çalışmamızın kurgusu ile bunu anlamak mümkün değildir. Ketamin anestezisi almış insanların operasyon sonrası 72. saate kadar sitokin değerlendirmeleri Tnf- α seviyelerinin düşmek suretiyle etkilenebileceğini göstermiştir. Başka bir hücre kültürü çalışmasında Tnf- α üretiminin düştüğü gösterilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçları, yara mikroçevresinde de 14. günde bu seviyelerin ketamin uygulanması ile etkilendiğini göstermiştir (70, 72, 73,87).

Tiyopental sodyum ile ilişkili olarak 14. gün sonuçlarımız tiyopental sodyum grubunda kontrol grubuna kıyasla *Col3a1*, *Col5a1*, *Col5a3*, *Mmp2*, *Coll4a1*, *Itga5*, *Pias 3*, *Mmp7* ve *Cd40lg* genlerinin ekspresyon seviyesinin arttığını, *Colla2*, *Itgb5* ve *Ifng* genlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığını göstermektedir. Değişen ekspresyon seviyeleri irdelendiğinde, tiyopental sodyum ile 14. günde kollajenle ilişkili genlerin ön plana çıktığı dikkati çekmektedir. Literatüre göre tip 3 kollajen granülasyon evresine işaret etmektedir. Bu evre bittikten sonra kollajen tip 3 büyük ölçüde yara ortamından uzaklaşarak yerini kollajen tip 1'e bırakır (10). Yara iyileşmesinin ilk birkaç günlük sürecinde, geçici olarak tip III kollajen artışı vardır. Daha sonraki yara iyileşme sürecinde tip I kollajen baskındır (12). Bizim çalışmamızda *Colla2* ekspresyonunun ketamin grubunun 14. gün (-1355130 kat), tiyopental sodyum grubunun 7. ve 14. günlerinde (-732938 kat) azalması bu anesteziklerin yara iyileşmesini yavaşlattığını düşündürmektedir. Bu görüşümüzün teyit edilebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda bazı sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi sıçanlara yara açılması esnasında etik nedenlerle kontrol grubunda tramadol kullanılmasıdır. Bu bileşiğin diğer gruplardan farklı olarak subkutan ve sadece tek sefer kullanılmasına rağmen, yara mikroçevresi içerisinde ilgilendiğimiz genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine bir etkisinin olup olmadığını bilmiyoruz. Bununla birlikte literatürde yara iyileşmesi ile ilişkili yüze yakın gen tanımlanmış durumdadır (46). Bu genlerden analiz etmediklerimizin de çalışmada kullandığımız anesteziklerin etkisi altında gen ekspresyon değişikliklerine maruz kalması ihtimali vardır.

Ayrıca yaptığımız gen ekspresyon çalışmalarına ek olarak protein analiz çalışmaları ve yolak analizi çalışmalarının da yapılması bu anesteziğin etkileri konusunda daha açıklayıcı bilgiler sunacaktır.

Sonuç olarak bulgularımız, yara iyileşmesi çalışmalarında etik değerler bakımından oldukça sık kullanılan anesteziğin maddelerden ketamin ve tiyopental sodyum anestesinin yara mikroçevresinde yaranın iyileşmesiyle ilişkilendirilmiş bazı genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi olduğunu göstermektedir. Bu bulgular doğrultusunda hayvanlar üzerinde yapılan yara iyileşmesi ile ilişkili gen ve protein ekspresyon çalışmalarında bunun bir sınırlandırıcı faktör olarak göz önünde bulundurulmasının önemli olacağını söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Erbeni, T. (1985). Özel Histoloji. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. İstanbul.
2. Junqueira, L.C., Carneiro, J. ve Kelley, R.O. (1998). *Temel Histoloji*. 8th Ed. Barış Kitapçılık.
3. Paker, Ş. (1990). Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa.
4. Arslan A. Diyabetik Sıçanlarda Karnitinin Yara İyileşmesi Ve Flep Yaşayabilirliğine Etkisi. Deneysel Çalışma (tez). Zonguldak:Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi;2010.
5. Freedberg, IM., Tomic-Canic, M., Komine, M. ve Blumenberg, M.. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 2001; **116**:633-40.
6. Sezgin S. Hemostatik ajan Ankaferd'in yara iyileşmesi üzerine etkileri. İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi. Uzmanlık tezi. 2010.
7. Gantwerker, E.A. ve Hom, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Clin Plastic Surg* 2012; **39**:85–97.
8. Yüksel E. Sistemik meperidin uygulamasının ratlarda kutanöz yara iyileşmesi üzerine etkileri. Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. 2009.
9. Bediz Ölçer A, Gönül N. Perkütan absorpsiyon ve perkütan absorpsiyonu etkileyen faktörler. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2002; **31**: 33-49.
10. Schultz GS. Molecular regulation of wound healing, içinde Bryant, RA. *Acute and Chronic Wounds: Nursing Management*. 2th ed.St Louis, MO, Mosby, 1999; pp 413–429
11. Calvin M. Cutaneous wound healing. *Wounds*, 1998; **1**: 12-32.
12. Karasu A, Bakır B. Yara ve yara iyileşmesi. *Veteriner Cerrahi Dergisi* 2008; **14(1)**: 36-43.
13. Baykal Y. Travmaya cevap (yara iyileşmesi inflamasyon). İçinde: Baykal Y, Yılmaz A T, Koçar İ H, Şen D, editör. *Damar hastalıkları ve embolik fenomenler*. GATA basımevi; 2002. pp. 51-64

14. Ak C. Leptin ve β -glukanın yara iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi. 2013.
15. Noyan, A. (2003). *Fizyoloji*. 13th Ed. Meteksan A.Ş.
16. Laurens, N., Koolwijk, P. ve Maat, M.P.M. Fibrin Structure and Wound Healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; **4**: 932– 9.
17. Bavan L, Midwood K, Nanchahal J. MicroRNA epigenetics: a new avenue for wound healing research. *BioDrugs* 2011; **25**: 27–41.
18. Cooper DM. Wound healing: New understandings. *Nurse Practitioner Forum* 1999; **10**: 74–86.
19. Mast BA, Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ (editör). *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects*. Philadelphia, PA, Saunders 1999; pp 344–355.
20. Martin P. Wound healing—Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; **276**: 75–81.
21. Witte, M.B, Barbul, A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North Am* 1997; **77(3)**: 509-28.
22. Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E. The basic science of wound healing. *Plast. Recons. Surg* 2006; **117(7)**: 12-34.
23. Waldrop J, Doughty D. Wound-healing physiology, in Bryant, RA: Acute and Chronic Wounds. *Nursing Management*. 2 ed. 1991; pp 17–39.
24. Hubner G, Brauchle M, Smola H. Differentiation of regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokines* 1996; **8**:548–556.
25. Bohling, M.W., Henderson, R.A., Swaim, S.F. Kincaid, S.A., Wright, J.C. Cutaneous wound healing in the cat: A macroscopic description and comparison with cutaneouswound healing in the dog. *Vet Surg* 2004; **33**: 579-587.
26. Aukhil, I. Biology of wound healing. *Periodontol* 2000; **22**: 44-50.
27. Rigler, D.J.. Inflammation and repair. İçinde Jones, T.C. Hunt, R.D. ve King, N.W. (Ed) *Veterinary Pathology*. 6th Ed. 1997; pp: 150-157.
28. Theoret, C.L.. Update on wound repair. *Clin. Tech. Equine Pract* 2004; **3**: 110-122.

29. Goldberg, S. R. ve Diegelmann, R. F.. Wound Healing Primer. *Surg Clin N Am* 2010; **90**:1133–1146.
30. Calvin, M. Cutaneous wound healing. *Wounds* 1998; **1**: 12-32.
31. Regan, M.C., Barbul, A. (1994). The cellular biology of wound healing. İçinde: *Wound Healing* . Edited by Schlag, G., Redl, H. Vol:1 pp: 3-17.
32. Stashak, T.S. (1991). Principles of wound healing. İçinde: *Equine Wound Management*, pp: 1-15.
33. Beanes, S.R., Dang. C., Soo, C., Ting, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . *Expert Rev Mol Med* 2003; 5, **21**: 1-11.
34. Kirsner, R.S., Eaglsterin, W.H.. The wound healing process, *Dermatol Clin* 1993; **4**: 629-640.
35. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* 1999; **341**: 738-46.
36. Heinze, C.D., Clem, M.F.. Wound healing and tissue repair. İçinde: *Textbook of Large Animal Surgery*. 2nd Ed. 1988; pp:141-153.
37. Deodhar, A.K., Rana, R.E.. Surgical physiology of wound healing: a review, *Postgrad Med* 1997; **2**: 52-56.
38. Swaim, S.F., Henderson, R.A.. Wound healing. İçinde: *Small Animal Wound Management* 1990; pp: 1-8.
39. Wilmink, J.M., Van Weeren, P.R.. Differences in wound healing between horses and ponies: application of research results to the clinical approach of equine wounds, *Clin Tech Equine Pract* 2004; **3**:123-133.
40. Stadelmann, W.K., Digenis, A.G. ve Tobin, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Surg* 1998; **176**: 26–38.
41. Baum CL, Arpey CJ. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. *Dermatol Surg* 2005; **31**: 674–686.
42. Clark RAF. Fibrin and Wound Healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Fibrinogen: XVIth International fibrinogen Workshop. June 2001; **936**: 355–367.
43. Deodhar, A.K. ve Rana, R.E. Surgical physiology of wound healing: a review. *Postgrad Med* 1997; **43(2)**: 52-56.

44. Mutsaers, S.E., Bishop, J.E., Mcgrouther, G., Laurent, G.J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis, *İçinde J Biochem Cell Biol* 1997; 29, 1: 5-17.
45. Kluwer, W. (2007). *İçinde Thorne, C.H. (Editor). Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 6th Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
46. Polat E, Aksöz İ, Arkan H, Coşkunpınar E, Akbaş F, Onaran İ. Gene expression profiling of *Lucilia sericata* larvae extraction/secretion-treated skin wounds. *Gene* 2014; **550**: 223–229.
47. Cığer, S. Yara İyileşmesi ve Büyüme Faktörleri. Erişim 20.09.2012, www.dermaneturk.com/yara_online/buyume_faktor.doc
48. O.Garra A. Interleukins and immune system. *Lancet* 1988; **8637**: 943-6.
49. Rubin AL, Nelson LD. The solubl interleukin-2 receptors. Biology function and clinical application. *Ann Int Med* 1990; **113**: 619-27.
50. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; **74**:1-10.
51. Zhang G, Klein B, Bataille R. Interleukin-6 is a potent myeloma cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 1989; **74**:11-3.
52. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; **9**: 617-48.
53. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000; **21**: 418-20.
54. Güner, İ., Özmen, D. ve Bayındır, O. (1997). Sitokinler. *T Klin J Med Sci*, 17.
55. Diegelmann, R.F. (2001). Collagen metabolism. *Wounds* **13**: 177-182.
56. Champe, P.C., Harvey, R.A. (2005). Globular and fibrous proteins. *İçinde: Lippincott's Lustrated Reviews: Biochemistry*. 2nd Edition. pp: 25-44.
57. Li, J., Chen, J., Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing, *Clin Dermatol*; **25**: 9-18
58. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). The threedimensional structure of protein. *İçinde: Principles of Biochemistry* 4nd Ed. pp: 116-156

59. Leong M, Phillips LG. Wound Healing. Townsend MC, *Sabiston Textbook of Surgery*. 17th Ed. Elsevier, USA 2004; 183-208.
60. Bellayr IH, Mu X, Li Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem*. 2009; **1(6)**: 1095–1111.
61. Corssen G, Domino EF. Dissociative anesthesia: Further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. *Anesth Analg* 1966; **45**:29-40.
62. Doenicke A, Kettler D, List WF, Radke J, Tornow J. *Anaesthesiologie* 7.Auflage.Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest.Springer Verlag 1995; 70-76.
63. Kress HG.Wirkmechanismen von Ketamin.*Der Anaesthetist* 1997; Supplement I. S8-S19.
64. Corssen G, Reves J, Stanley T: Dissociative anesthesia. In: Corssen G, Reves J, Stanley T, editor. *Intravenous Anesthesia and Analgesia*, Philadelphia: Lea & Febiger; 1988: **99**.
65. White PF, Way WL, Trevor AJ: Ketamine-its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 1982; **56**:119-136.
66. Reves JG, Glass PSA, Lubarsky DA. Nonbarbiturate intravenous anesthetics. İçinde: *Miller RD (editor) Anesthesia*, Philadelphia, Churchill Livingstone 2000; 228-73.
67. Aun CST. New iv agents. *Br J Anaesth* 1999; **83(1)**:29-42
68. Miller RD. *Miller's Anesthesia*. 6th Edition. Elsevier Inc. 2005; 345–350
69. Kohrs R, Durieux ME. Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesth Analg* 1998; **87**:1186-1193.
70. S. Loix, M. De Kock, P. Henin. The anti-inflammatory effects of ketamine: state of the art. *Acta Anaesth* 2011; **62**: 47-58
71. Yu M, Shao D, Liu J, Zhu J, Zhang Z, Xu J. Effects of ketamine on levels of cytokines, NF- κ B and TLRs in rat intestine during CLP-induced sepsis. *International Immunopharmacology* 2007; **7**: 1076–1082.
72. Chen Ta, Chang C, Lin Y, Ueng Y, Chen R. Signal-transducing mechanisms of ketamine-caused inhibition of interleukin-1 β gene expression in lipopolysaccharide-

stimulated murine macrophage-like Raw 264.7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; **240**: 15–25

73. Changa Y, Chen T, Sheu J, Chen R. Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; **204**: 27– 35.

74. Lin Liu F, Chen T, Chen R. Mechanisms of ketamine-induced immunosuppression. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 2012; **50**: 172-177.

75. Ellenhorn MJ. Ellenhorn's Medical Toxicology: *Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. 2 nd Ed. Pennsylvania.Williams & Wilkins 1997; 1166-1233.

76. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ. *Clinical Anesthesiology*.3rd Ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies, 2002; 151–177.

77. Hemmings HC. Pharmacology of nonopioid intravenous anesthetics. In: Weinberg GL. *Basic Science Review of Anesthesiology*.1th Ed. The McGraw-Hill Companies USA, 1997; 16–27.

78. De Hert SG. Study on The Effects of Six Intravenous Anesthetic Agents on Regional Ventricular Function in Dogs (Thiopental, Etomidate, Propofol, Fentanyl, Sulfentanil, Alfentanil). *Acta Anaesth Belg* 1991; **42**: 3-39.

79. Kushikata T, Hirota K, Yoshida H. Alpha-2 Adrenireceptor Activity Affects Propofol- Induced Sleep Time. *Anesth Analg*. 2002; 201-206.

80.Saydam İ, Yılmaz S, Seven E. (2005) Topikal olarak uygulanan Nitrofurazon ve Rifamisin'in tam kalınlıkta yara iyileşmesi üzerine etkileri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, **27(3)**: 113-120.

81.Stuart K, Paderi J, et al. (2011) Collagen-binding peptidoglycans inhibit MMP mediated collagen degradation and reduce dermal scarring. *Plos One*, **6(7)**: e22139.

82.Sumitra M, Manikandan P, Suguna L. (2005). Efficacy of Butea monosperma on dermal wound healing in rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **37**: 566-573

83.Zhang H , Zhao Y, Wang X, Zhang Q(2014) Bioavailability of tramadol hydrochloride after administration via different routes in rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*.DOI: 10.1002/bdd.1916

84.Fish R.E., Brown M.J., Danneman P.J., Karas A.Z., editors. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2nd Edition. New York: Academic Press; 2008.

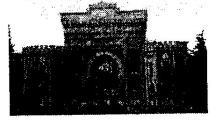
85. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protocols* **3(6)**: 1101-1108
86. Heise, R., Skazik, C., Marquardt, Y., Czaja, K., Sebastian, K., Kurschat, P. ve ark. (2012). Dexpanthenol modulates gene expression in skin wound healing in vivo. *Skin Pharmacol Physiol*, **25**:241–248.
87. Beilin, B., Rusabrov, Y., Shapira, Y., Roytblat, L., Greenberg, L., Yardeni, I. Z. ve Bessler, H. Low-dose ketamine affects immune responses in humans during the early postoperative period. *British Journal of Anaesthesia* 2007: **99 (4)**: 522–7
88. Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S. ve Morimoto, C. (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *Journal of Cell Science*, **118**:2363-2370.

ETİK KURUL KARARI



Sayı: 2014/ 116

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



05/12/2014

Sayın: Prof. Dr. İlhan ONARAN
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Karar No :2014/ 116

Başvuru :23.10.2014

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen Araştırma Görevlisi Muhammed Akif ALTUN'a ait "Ketamin Ve Tiopental Sodyum Anestezisinin Sıçanlarda Yara İyileşmesi İle İlişkilendirilmiş Genlerin mRNA Profilleri Üzerindeki Rolünün Değerlendirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	15
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	Aralık 2014/Haziran 2015	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYЕК Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İÜ HADYЕК Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGÜN
Mak. Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr