

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

**TIBBİ BİR BİTKİ EKSTRESİ OLAN ANKAFERD BLOOD STOPPER  
UYGULAMASININ SEKONDER YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Dt. GÜLİN SEYMEN**

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. AYŞEN BODUR

ANKARA  
Mart 2013

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

**TIBBİ BİR BİTKİ EKSTRESİ OLAN ANKAFERD BLOOD STOPPER  
UYGULAMASININ SEKONDER YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Dt. GÜLİN SEYMEN**

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. AYŞEN BODUR

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
03/2011-25 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA  
Mart 2013

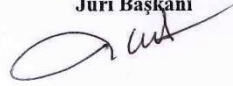
**KABUL ve ONAY**

TC.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

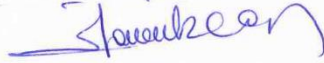
Periodontoloji Ana bilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde  
yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından doktora tezi olarak  
kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/03/2013

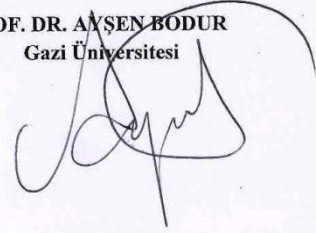
PROF. DR. İ. LEVENT TANER  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı



PROF. DR. GÖNEN ÖZCAN  
Gazi Üniversitesi



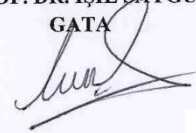
PROF. DR. AYŞEN BODUR  
Gazi Üniversitesi



PROF. DR. GÖKHAN ALPASLAN  
Gazi Üniversitesi



PROF. DR. İŞİL SAYGUN  
GATA



## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY</b> .....	I
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	II
<b>ŞEKİLLER</b> .....	IV
<b>RESİMLER</b> .....	V
<b>GRAFİKLER</b> .....	VII
<b>TABLolar</b> .....	VIII
<b>SEMBOLLER ve KISALTMALAR</b> .....	IX
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Dişetinin Yapısı.....	4
2.2. Yara İyileşmesi .....	8
2.3. Ankaferd Blood Stopper® (ABS) .....	31
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	36
3.1. Deneysel Model.....	36
3.2. Kullanılan Malzemeler .....	36
3.3. Deney Grupları .....	38
3.4. Cerrahi Protokol.....	38
3.5. Deney ve Kontrol Gruplarından Biyopsi Alınması.....	39
3.6. Histolojik Yöntem.....	42
3.7. Biyokimyasal Analiz.....	42
3.8. İstatistiksel Değerlendirme .....	44
<b>4. BULGULAR</b> .....	46
4.1. Histolojik Bulgular .....	46

4.2. Biyokimyasal Bulgular .....	59
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>66</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>83</b>
<b>7. ÖZET .....</b>	<b>85</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>89</b>
<b>10. EKLER .....</b>	<b>115</b>
10.1. Etik Kurul Raporu .....	115
10.2. Teşekkür.....	116
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>118</b>

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1:</b> Sert damak histolojik yapısı.....	4
<b>Şekil 2:</b> Çok katlı yassı epitel .....	5
<b>Şekil 3:</b> Yara iyileşme fazları .....	9
<b>Şekil 4:</b> Proliferatif evre boyunca lokal mikrodolaşımın sağlanması, ESM ve matür olmayan kollajenin yapımı .....	14
<b>Şekil 5:</b> VEGF'nin yara iyileşmesindeki rolü .....	22
<b>Şekil 6:</b> VEGF ve yara iyileşmesinin hücresel temeli .....	23
<b>Şekil 7:</b> Ankaferd'in etki mekanizması.....	34
<b>Şekil 8:</b> Western band görüntüleri .....	61

## RESİMLER

<b>Resim 1:</b> Ankaferd Blood Stopper.....	37
<b>Resim 2:</b> Çalışmada kullanılan 'punch' biyopsi aleti.....	37
<b>Resim 3:</b> Rat palatinal mukozasında oluşturulan eksizyonel yara .....	39
<b>Resim 4:</b> 7. günde elde edilen rat üst çene örnekleri .....	40
<b>Resim 5:</b> 14. günde elde edilen rat üst çene örnekleri .....	41
<b>Resim 6:</b> 21. günde elde edilen rat üst çene örnekleri .....	41
<b>Resim 7:</b> 7. gün kontrol grubunda yapılan incelemede; epitel (➔), yara dudağı (⇨) ve granülasyon dokusu (➤) (H-Ex40) izlenmektedir.....	47
<b>Resim 8:</b> 7. gün kontrol grubunda yapılan incelemede; epitel (➔), skar dokusu (★), kollajen lifler (⇨) ve granülasyon dokusu (➤) (H-E x100) gözlemlenmektedir.....	47
<b>Resim 9:</b> 7. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (➔), yara dudakları (⇨) ve granülasyon dokusu (➤) (H-E x40) izlenmektedir. 48	
<b>Resim 10:</b> 7. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (➔), yara dudakları (⇨) ve kollajen lifler (⇨) (H-E x100) dikkat çekmektedir. ....	49
<b>Resim 11:</b> 14. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (➔), yara dudağı (⇨) ve granülasyon dokusu (➤) (H-E x40) izlenmektedir.....	50
<b>Resim 12:</b> 14. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (➔), granülasyon dokusu (➤), kollajen lifler (⇨) ve damarlar (+) (H-E x100) gözlemlenmektedir.....	50
<b>Resim 13:</b> 14. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (➔), yara dudakları (⇨) ve granülasyon dokusu (➤) (H-E x40) izlenmektedir. ....	51

- Resim 14:** 14. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (➔), yara dudakları (⇔), granülasyon dokusu (➤), kollajen lifler (⇔) ve damarlar (⊕) (H-E x100) görülmektedir. .... 52
- Resim 15:** 21. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (➔), granülasyon dokusu (➤) ve kollajen lifler (⇔) (H-E x40) gözlemlenmektedir. .... 53
- Resim 16:** 21. gün kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (➔), granülasyon dokusu (➤) ve kollajen lifler (⇔) (H-E x100) görülmektedir... .... 53
- Resim 17:** 21. gün ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (➔) ve bağ doku (➤) (H-E x40) izlenmektedir..... 55
- Resim 18:** 21. gün ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (➔), bağ doku (➤) ve kollajen lifler (⇔) (H-E x100) dikkat çekmektedir..... 55



## GRAFİKLER

<b>Grafik 1:</b> Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt derinliği.....	57
<b>Grafik 2:</b> Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt genişliği .....	59
<b>Grafik 3:</b> Gruplara göre 7, 14 ve 21. günlere ait VEGF protein düzeyleri.....	61
<b>Grafik 4:</b> Gruplara göre 7, 14 ve 21. günlere ait FGF-2 protein düzeyleri .....	.63
<b>Grafik 5:</b> Gruplara göre 7, 14 ve 21. günlere ait iNOS protein düzeyleri .....	.65

## TABLULAR

<b>Tablo 1:</b> Deney hayvanlarının gruplandırılması .....	38
<b>Tablo 2:</b> Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt derinliği ortalama değerleri.....	57
<b>Tablo 3:</b> Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt genişliği ortalama değerleri.....	58
<b>Tablo 4:</b> Rat palatal mukozalarında 7, 14 ve 21. günlere ait VEGF protein düzeyleri .....	60
<b>Tablo 5:</b> Rat palatal mukozalarında 7, 14 ve 21. günlere ait FGF-2 protein düzeyleri .....	63
<b>Tablo 6:</b> Rat palatinal mukozalarında 7, 14 ve 21. günlere ait iNOS protein düzeyleri .....	65

## **SEMBOLLER ve KISALTMALAR**

<b>ABS</b>	Ankaferd Blood Stopper
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>TGF</b>	Transforme edici büyüme faktörü
<b>FGF</b>	Fibroblast büyüme faktörü
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>PDGF</b>	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>IGF</b>	İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>TNF</b>	Tümör nekroz faktör
<b>FGF-2</b>	Bazik fibroblast büyüme faktörü
<b>ESM</b>	Ekstraselüler matriks
<b>MMP</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>TIMP</b>	Doku inhibitör metalloproteinaz
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>PLGF</b>	Plasental büyüme faktörü
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>eNOS</b>	Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalsiyum
<b>IFN</b>	İnterferon
<b>%</b>	Yüzde
<b>cm<sup>2</sup></b>	Santimetrekare
<b>mg/kg</b>	Miligram/kilogram
<b>HCl</b>	Hidroklorür
<b>H-E</b>	Hematoksilen-Eozin
<b>Tris-HCl</b>	Tris Hidroklorid Tampon
<b>NP-40</b>	Nonil Fenoksi polietoksiletanol
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik Asit

<b>SDS</b>	Sodyum Dedosil Sülfat
<b>APS</b>	Amonyum Persülfat
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamid
<b>mAmp</b>	Miliamper
<b>PVDF</b>	Poliviniliden Diflorür
<b>TBST</b>	Tris-Tween Tamponu
<b>HRP</b>	Yabanturpu Peroksidazı (horseradish peroksidaz)
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence
<b>° C</b>	Santigrat Derece
$\bar{x}$	Ortalama
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>MRSA</b>	Methicilin'e dirençli staphylococcus aureus
<b>IGF-1</b>	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

## 1. GİRİŞ

Yara, dokuların anatomik yapı ve fonksiyonlarındaki devamlılığının fiziksel, kimyasal ya da travma sonrası bozulmasıdır.<sup>1</sup> Yara iyileşmesi ise bütünlüğünü kaybetmiş dokunun anatomik, fizyolojik ve fonksiyonel yapısını yeniden kazanması ile sonuçlanan karmaşık bir süreçtir. Yara iyileşmesi, ayrı ancak birbirleriyle iç içe geçen 3 farklı evreden oluşmaktadır. Bu aşamalar sırasıyla; inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme evreleridir.<sup>2</sup>

Yara iyileşmesi onarım türüne göre primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere üçe ayrılır. Yara onarımının en komplikasyonsuz şekli; dikiş materyali ile kenarları birbirine yaklaştırılan temiz, enfekte olmayan cerrahi kesinin iyileşmesidir. Bu tarz iyileşmeye primer iyileşme adı verilmektedir. Yara kenarları dikiş materyali ile bir araya getirilmemiş veya getirilemeyen ve doku kaybıyla seyreden yaralanmalar ya da spontan iyileşmeye bırakılmış yaralar sekonder iyileşirler ve bu iyileşme primer yara iyileşmesinden daha yavaş seyreder. Tersiyer yara iyileşmesi ise gecikmiş primer kapama olarak da adlandırılır. Birkaç gün açık bırakıldıktan sonra yara kenarları yaklaştırılır.<sup>3</sup>

Periodontal cerrahide oldukça sık uygulanan operasyon türlerinden olan serbest dişeti grefti, laterale kaydırılan flep, frenektomi ve gingivektomi/gingivoplasti operasyonlarından sonra ayrıca biyopsi bölgesinde ve ağızda oluşabilecek ülser ve travmalar sonucunda oral dokularda sekonder yara iyileşme süreci başlamaktadır.

Periodontal cerrahi uygulamalar sonrasında hızlı ve komplikasyonsuz bir yara iyileşmesi önde gelen beklentilerimiz arasında yer almaktadır. Doku kaybının görüldüğü yaraların, oldukça fazla miktarda ve tipte mikroorganizma popülasyonuna sahip oral kavite ile geniş temas halinde olduğu ortadadır. Bu cerrahi uygulamalardan sonra postoperatif dönemde görülen kanama, ağrı, şişlik ve kemiğin açığa çıkması gibi komplikasyonlar sonucunda hastaların yaşam kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir.<sup>4</sup>

Periodontal cerrahi sonrası, bakteriyel kontaminasyonu önlemek ve plak kontrolünü sağlamak operasyon başarısını etkileyen faktörlerdir. Periodontal cerrahi sonrası bakteriyel plak akümülyasyonunu, postoperatif ağrıyı ve doku ödemi azaltmak ve yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla terapötik ajanların kullanımı söz konusudur.<sup>5</sup> Son yıllarda, terapötik ajanlara alternatif olarak kullanılacak bitkisel preparatların antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve yara iyileşmesi üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma mevcuttur.<sup>6-9</sup>

Ankaferd Blood Stopper (ABS); Glycrrhiza Glabra (Meyan), Vitis Vinifera (Koruk), Alphina Officinarum'un (Havlıcan) kurutulmuş yaprak ekstraktları, Urtica Dioica'nın (Isırgan) kurutulmuş kök ekstresi, Thymus Vulgaris'in (Kekik) ise kurutulmuş ot ekstraktlarını içeren, Türk tıbbında hemostatik ajan olarak kullanılan ilk bitki ekstratıdır.<sup>10</sup> Kanama kontrolündeki etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmış olan ABS'nin aynı zamanda güçlü antimikrobiyal özellikleri olduğu gösterilmiştir.<sup>11</sup> ABS'nin dental tedaviler sırasında uygulanışının hemostatik etkinliği ve güvenilirliğini konu alan çalışmada, ABS'nin yara iyileşmesi için faydalı olabileceği de ileri sürülmüştür.<sup>12</sup>

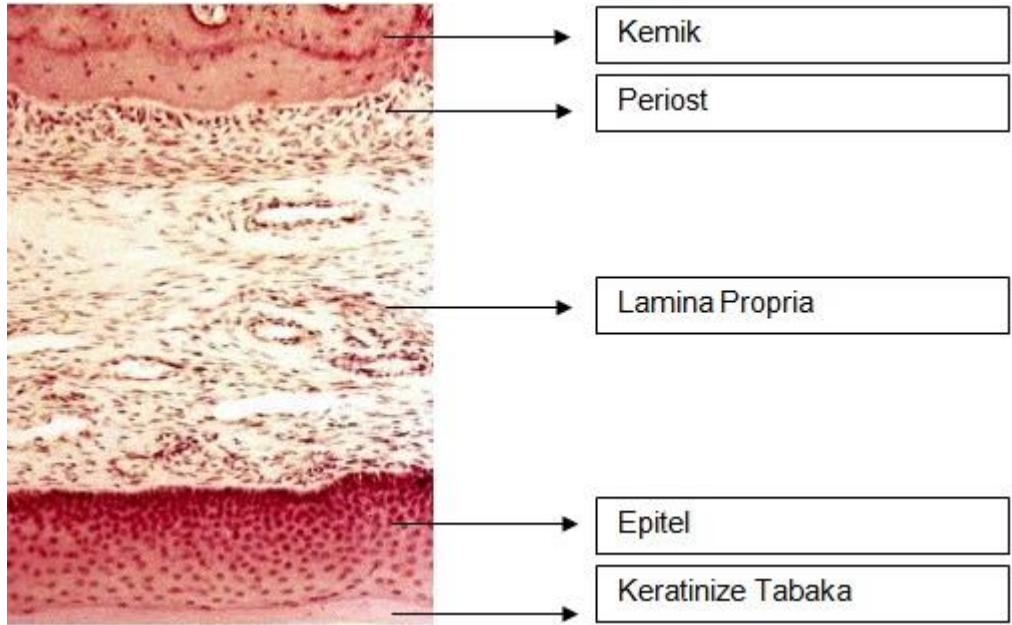
ABS'nin bildirilen etkileri göz önüne alındığında, mukozal yara iyileşme sürecini hızlandırabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, literatür dahilinde ABS'nin oral mukozal dokularda yara iyileşme sürecine olan etkisini moleküler düzeyde inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan hareketle, ratların palatal mukoperiosteumunda deneysel olarak eksizyonel yara bölgeleri oluşturulmuş ve topikal ABS uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada, ABS'nin sekonder iyileşmeye bırakılan yara yüzeylerinin iyileşme sürecine etkilerinin histolojik ve biyokimyasal yöntemler ile incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dişetin Yapısı

Ağız boşluğunu döşeyen müköz membranın alveoler kemiği ve dişlerin servikal kısımlarını çevreleyen doku bölümüne dişeti adı verilir. Histolojik açıdan dişeti 2 bölümden oluşmaktadır:

- a. Dişeti Epiteli
- b. Dişeti Bağ Dokusu<sup>13</sup>



Şekil 1: Sert damak histolojik yapısı

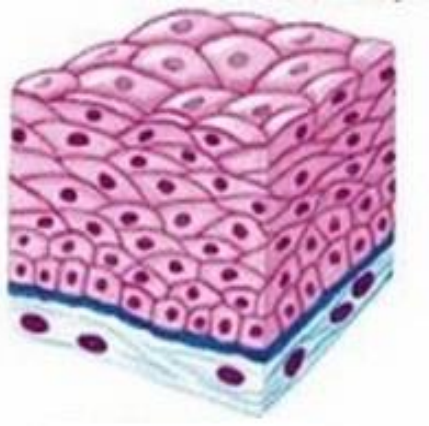
#### 2.1.1. Epitel

Oral müköz membran epiteli konumuna göre keratinize, parakeratinize veya nonkeratinize olabilmektedir. Dişeti ve sert damak



epiteli (çiğneyici mukoza) keratinizedir. Keratinize oral epitel; stratum bazale, stratum spinozum, stratum granulosum ve stratum corneum olmak üzere 4 tabakadan oluşmaktadır.<sup>14</sup>

Epitelin en alt tabakasını oluşturan 'stratum bazale' tek sıra halinde dizilmiş kübik hücrelerden meydana gelmiştir. Mitotik aktivitenin en çok olduğu tabakadır. Bazal tabakada mitotik aktivite ile çoğalan hücreler yüzeye doğru hareket ederken giderek yassılaşır ve keratinizasyon özellikleri göstermeye başlar. Desmozomlar bu tabakanın hücrelerini yan ve üst yüzeylerden bağlar. Bazal hücre zarında bulunan hemidesmozomlar bu hücrelerin bazal laminaya bağlanmasına yardım eder.



**Şekil 2: Çok katlı yassı epitel**

'Stratum spinosumda', genel olarak hücre organellerinde azalma görülmesine rağmen serbest ribozom sayısı artmıştır. Bu da hücrelerin kullanımı için protein yapısı işlevinin arttığını göstermektedir. Bu tabakada üretilen protein keratindir. Bu tabakadaki hücreler birbirleriyle içi

filaman dolu dikensi sitoplazmik çıkıntılar ve desmozomlar ile sıkıca bağlanmıştır. Işık mikroskop altında görülebilen bu keratin filaman demetlerine tonofilamanlar denir.<sup>15</sup>

'Stratum granulosumda' hücreler dişeti yüzeyine paralel bir düzlemde yassılaşımiş olup, karakteristik olarak keratohiyalin granülleri içermektedir. Bu granüller keratin yapımını sağlarlar.

En üst tabaka; birbirlerine yakın olarak dizilmiş ve iyice yassılaşımiş, çekirdeklerini ve diğere birçok organellerini kaybetmiş hücrelerden oluşun 'stratum corneum'dur.<sup>16</sup>

### 2.1.2. Epitel – Bağ Doku Yüzleşmesi

Yapılan elektron mikroskop çalışmalarında bazal laminanın lamina lusida ve lamina densa adı verilen iki kısımdan oluştuğu görülmüştür. Epitelin bazal tabakası ile komşu olan kısım lamina lusida, bağ dokusu ile komşu olan kısım ise lamina densa'dır. Lamina lusida glikoprotein yapıdaki lamininden, lamina densa ise tip IV kollajenden oluşur.<sup>17</sup>

### 2.1.3. Dişeti Bağ Dokusu (Lamina Propria)

Dişeti epiteli altındaki gevşek veya tıkız bağ dokusudur. Mezodermal kökenli olan bu doku amorf bir ana madde içinde yer alan hücreler, lifler, kan damarları ve sinir liflerinden meydana gelmiştir. Dişeti bağ dokusunu; hücreler (fibroblastlar, mast hücreleri, nötrofiller ve

monosit/makrofajlar) ve hücre dışı bileşenler (matriks ve lifler) meydana getirir.<sup>18,19</sup>

#### 2.1.3.1. Dişeti Bağ Dokusunun Hücresel Bileşenleri

Fibroblastlar: Bu hücreler dişeti bağ dokusunun temel hücreleridir ve bağ dokusunun fibröz bileşenlerini (kollajen, retikülin ve elastin) ve mukopolisakkaritleri (glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar) salgırlar. Fibroblastlar kollajen sentezi yanında kollajen yıkımını da düzenlerler.

Mast Hücreleri: Bu hücrelerin sitoplazmaları iri granüller içerir. Granüllerin içi her türlü doku iritasyonunda serbest kalan vazoaktif maddeler ile doludur.

Nötrofiller: Lökosit ailesinin hücreleridir. Esas fonksiyonları fagositoz ve mikroorganizmaların öldürülmesidir.

Monosit/Makrofajlar: Kemik iliği kökenli olan kan monositleri damar dışına çıkıp dokuya geçtiklerinde makrofaj adını alırlar ve bu hücrelerin kan içindeyken yuvarlak olan şekli doku içine geçince çok sayıda sitoplazmik çıkıntı kazanır. Doku içerisine giren mikroorganizmaları fagosite edebilme yeteneğine sahip olduklarından savunma sisteminin önemli hücreleridir.<sup>19</sup>

#### 2.1.3.2. Dişeti Bağ Dokusunun Hücre Dışı Bileşenleri

İnterselüler Matriks: Hücrelerin ve liflerin içinde gömülü oldukları, proteoglikanlar (hyalüronik asit ve kondroidin sülfat) ve glikoproteinlerden (esas olarak fibronektin) oluşmuş bir yapıdır.

Lifler: Temel bağ dokusu lifleri kollajen ve elastik liflerdir. Bağ dokusundaki kollajen lifler esas olarak tip I kollajenden oluşur ve dişeti dokusuna gerilme kuvveti kazandırır.<sup>18</sup>

## 2.2. Yara İyileşmesi

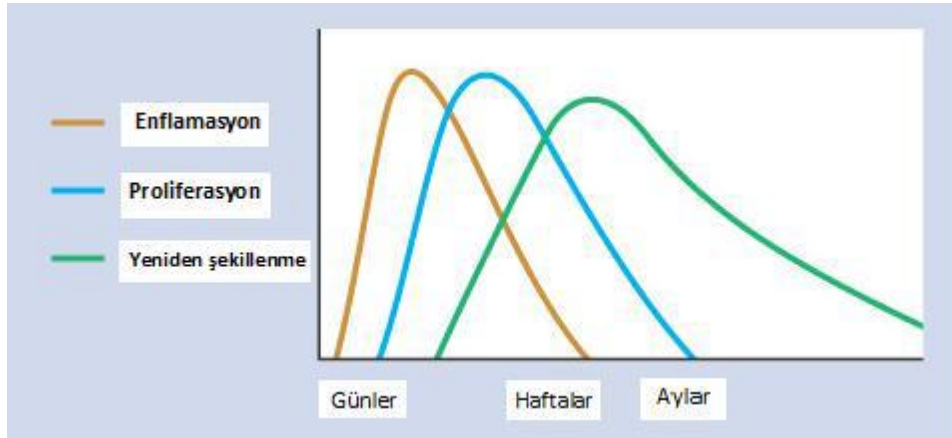
Günümüzde yara iyileşmesi erken ve geç dönem komplikasyonları olan zorlu bir klinik problem olmaya devam etmektedir.<sup>20</sup> Yara iyileşmesinde esas amaç, yara yerinin kapatılması ve takip eden süreçte hastanın fonksiyonel ve estetik beklentileri karşılanarak hasta konforunun sağlanmasıdır. Bu süreçte kanama kontrolü, enfeksiyondan korunma ve yara iyileşmesi için uygun koşulların sağlanması gerekmektedir.<sup>1</sup> Her geçen gün, yara iyileşme süreci ve yara tedavisine olan yaklaşımlara ilişkin bilgilerimiz hücresel ve moleküler düzeydeki gelişmeler ışığında artmaktadır.<sup>21</sup> Etkili ve uygun tedavi ile sorunsuz yara iyileşmesini sağlamak için yara iyileşme fizyolojisinin tam olarak anlaşılması gerekmektedir.

### 2.2.1. Yara İyileşmesinin Fizyolojisi

Yara iyileşmesi; yapısal ve fonksiyonel doku bütünlüğünü geri kazanmaya yönelik karmaşık bir hücresel ve biyokimyasal olaylar zinciridir.<sup>22</sup> Doku 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 yapımı gerçekleşir ve sonuçta yara iyileşmesi meydana gelir. Bu süreçte rol alan büyüme faktörleri, sitokin ve kemokinlerden en önemlileri; epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), interlökin ailesi (IL), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve tümör nekroz faktör (TNF)'dür.<sup>23</sup> Bu biyokimyasal mediatörler, konak savunması,

zararlı maddelerin uzaklaştırılması ve iyileşmenin gerçekleşmesi için gerekli olan hücresel faaliyetleri stimüle veya inhibe ederler.<sup>24</sup>

Yaralanma sonrası yer alan olaylar, birbiri ardına süreklilik taşıyan, başlangıç ve sonları kesin sınırlarla ayrılamayan üç evreden oluşmaktadır (Şekil 3).<sup>25</sup> Bu evreler; inflamatuvar, proliferatif ve yeniden şekillenme evresi olarak sıralanabilir.<sup>26</sup> İnflamatuvar evrede, yara oluşumu ile başlayan uyarıya karşı vasküler ve hücre sel yanıt oluşur.<sup>27</sup> Proliferasyon evresi, ekstraselüler matriks depozisyonu ve yara bölgesine fibroblast göçü ile karakterizedir.<sup>1</sup> Yeniden şekillenme evresi ise oluşan tamir dokusunun yapısal dayanıklılık ve fonksiyonel yeterliliğini şekillendiren bir evredir.<sup>21</sup>



**Şekil 3: Yara iyileşme fazları**

### 2.2.1.1. İnflamatuvar Evre

İnflamasyon, ölü veya ölmekte olan doku ürünlerini yok etmeyi ve vücudu yabancı maddelere karşı savunmayı sağlayan vasküler ve hücre sel yanıttır.<sup>28</sup> İnflamatuvar evre, hasarlı dokunun yapısal ve fonksiyonel

bütünlüğünün tamiri için önemlidir; yaralanmadan hemen sonra başlayan, ilk 72 saatlik periodu kapsayan ve inflamasyonun belirtilerinin kaybolması ile sona eren evredir.<sup>29</sup>

Vasküler Yanıt: Yaralanma sonrası damar ve doku bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak kanama meydana gelir.<sup>30</sup> Doku travmasının sonucunda gözlenen kanama sonrası gerçekleşen ilk vasküler yanıt 5-10 dakika süren geçici vazokonstriksiyondur. Yaralanma ile birlikte derhal kan kaybını durdurmaya yönelik koagülasyon basamakları devreye girer. Hageman faktörü; kompleman, plazminojen ve kinin sistemlerini uyarır.<sup>22</sup>

Kan damarlarında meydana gelen hasar, kan bileşenlerinin dokular arası boşluğa sızmasına neden olur. Damarın endotelial bütünlüğünün bozulması sonucu subendotelial yapı ve bağ doku bileşenleri açığa çıkar. Vasküler subendotelial kollajenin açığa çıkması dolaşımdaki trombositlerin hızla yaralanma alanında kümelenmesini (agregasyon) ve yapısal proteinlere bağlanmalarını (adezyon) sağlayarak pıhtılaşma sürecini başlatır. Trombositler, açığa çıkan subendotelial kollajene bağlanarak yapışırlar. Takiben, trombositler granül içeriklerini salgılayarak yeni trombositlerin aktif hale gelmesini sağlarlar. Aktive olmuş trombositler kümeleşerek geçici bir pıhtı oluştururlar. Trombositlerin salgıladığı trombin fibrinojenin fibrine proteolizisini başlatır.<sup>22</sup> Fibrin ağı stabil hemostatik tıkaçı oluşturmak üzere trombosit kümelenmesini güçlendirir.<sup>31</sup> Meydana gelen bu hemostatik tıkaç hemostazı sağlar ve buraya gelecek olan hücreler için bir yapı iskeleti görevi görür.<sup>32</sup> Trombositler son olarak trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)

gibi büyüme faktörlerini salgırlarlar.<sup>3,33</sup> Bu moleküller; nötrofilleri, makrofajları, endotelyal hücreleri ve fibroblastları aktive ederek yara iyileşme evrelerini desteklerler.<sup>28,29, 34</sup>

Hücreyel Yanıt: Hemostaz sağlandıktan sonra yaranmanın erken döneminde gelişen vazokonstrüksiyonun yerini histamin, serotonin, prostoglandin E<sub>1</sub> ve prostoglandin E<sub>2</sub> aracılığı ile şekillenen vazodilatasyon dönemi alır.<sup>20,30</sup> Bu aşamada, hasarlı dokunun ve patojenlerin uzaklaştırılması için gerekli birçok farklı hücre tipinin infiltrasyonu gerçekleşir. Damar geçirgenliğinin artışı ile birlikte plazma ve nötrofillerin damar dışına çıkışı meydana gelir. Trombosit ve bakteriler tarafından salgılanan TGF- $\beta$  ve kompleman bileşenleri gibi kemoatraktan ajanlar nötrofillerin yara bölgesinde toplanmasını sağlarlar. Nötrofiller yara bölgesine gelen ilk hücrelerdir ve yaranmayı takiben 6 saat sonra yarada görülürler. Maksimum sayıya 1-2 günde ulaşan nötrofillerin rolü fagositoz, enfeksiyonun önlenmesi ve proteaz salınımı ile ölü dokuların eritilmesidir.<sup>35</sup> Nötrofiller yara bölgesindeki bakterileri, ölü dokuları ve yabancı cisimleri fagosite ederler.<sup>1,30</sup> Nötrofil aktivitesi, yaranmadan sonraki birkaç gün içinde bakteri ve ürünlerinin uzaklaştırılmasının ardından sonlanır. Yaranmadan sonraki 48-72 saat içinde nötrofillerin yerini monosit/makrofajlar alırlar.<sup>36</sup>

İnflamatuar evrenin kritik hücresi makrofajdır. Makrofajlar kandaki monositlerin dokuya geçmesiyle oluşurlar. Yaranmanın 3. gününde yarada baskın hücre haline gelirler. Makrofajlar, ölü doku ve bakterileri fagosite etmenin yanı sıra proinflamatuar sitokin (IL-1 ve IL-6) ve büyüme faktörü (FGF, EGF, TGF- $\beta$  ve PDGF) salgılayarak inflammatuar yanıtı güçlendirir ve granülasyon dokusunun yapımını başlatırlar<sup>33,37;</sup>

proteolitik enzimlerle (matriks metalloproteinaz ve kollajenaz) lokal dokunun yeniden oluşumunu düzenlerler. Keratinositleri, fibroblastları ve anjiogenezisi uyararak doku rejenerasyonuna ve yara iyileşmesinin proliferatif evresine geçişte destek sağlarlar.<sup>35</sup> Makrofajların sayısı ve aktivitesi yaralanmadan sonraki beşinci güne kadar azalsa da makrofajlar onarım tamamlanana kadar yara iyileşmesini düzenlemeye devam ederler.<sup>22</sup>

#### 2.2.1.2. Proliferatif Evre

İnflamatuar evre sırasında salınan sitokinler ve büyüme faktörleri yara iyileşmesinin ikinci evresi olan proliferasyon evresini stimüle ederler.<sup>22</sup> Proliferatif evre, yaralanmadan sonraki 4. günde başlayıp yaranın büyüklüğüne göre üçüncü haftaya kadar devam edebilir. Bu evre; anjiogenezis, granülasyon dokusunun oluşumu, yara kontraksiyonu ve reepitelizasyon ile karakterizedir.<sup>38</sup>

Proliferatif evrede ilk basamak, rejenere olan dokuların artan metabolik ihtiyaçlarını karşılamak üzere oksijen ve besin sağlamak amacıyla lokal bir mikrodolaşımın sağlanmasıdır. Bu amaçla, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) gibi büyüme faktörlerinin etkisi altında endotelial hücreler yara kenarlarından yaranın merkezine doğru göç ederler. Böylece birçok yeni kapiller damar içeren mikrovasküler ağ oluşur.<sup>1,39</sup> Mevcut damarların kapiller tomurcuklanması ile yeni kapiller damarların oluştuğu bu olaya anjiogenezis denilmektedir (Şekil 4). Anjiogenezis sonrası yara bölgesinde kan akımı artar. Bu sayede, inflamatuvar hücrelerin birbirleri ile etkileşimi ve kan damarı endotelial bazal membranından yara bölgesine geçişleri



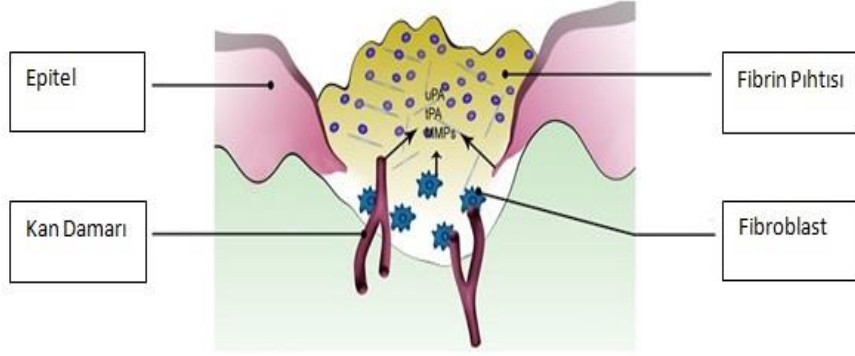
mümkün olur. Anjiogenezis, yeni ekstraselüler matriksin (ESM) sentezi ve depozisyonu için de gereklidir.<sup>37,40</sup>

Ekstraselüler matriks; fibröz proteinler, proteoglikanlar ve değişik glikoproteinler içeren karmaşık bir yapısal ağdır. Bağ dokusu ESM'nin organik bileşenleri; kollajenler, kollajenöz olmayan proteinler ve proteoglikanlardır. Kollajenler temel yapı elemanını oluşturur. ESM içeriğindeki kollajen ve elastinler gibi çeşitli fibröz yapısal proteinler çekme ve gerilme kuvvetlerine direnci sağlar. Yapısındaki adeziv glikoproteinler ise matriks elementlerini birbirine ve hücrelere bağlar. Proteoglikanlar ve hyalüronanlar ise direncin oluşmasını ve yağlama işlemini sağlar.<sup>41</sup>

Proliferatif evrede gözlenen diğer önemli bir olay ise; granülasyon dokusunun yapımıdır. Granülasyon dokusunun yapımına yaralanmadan sonra yaklaşık 4. günde başlanır. Granülasyon dokusu; fibronektin, hyalüronik asit ve kollajenden oluşan geçici bir matriks içindeki kan damarları, makrofajlar ve fibroblastlardan zengin dokudur.<sup>42</sup> Granülasyon dokusu; kemoatraktif, mitojenik ve diğer düzenleyici aktivitelere sahip sitokinler için bir rezervuar görevi görür.

Yara dokusundan ve inflamatuvar hücrelerden (makrofaj ve nötrofil) köken alan sitokin ve büyüme faktörlerine (PDGF, FGF) yanıt olarak fibroblastlar yara bölgesine göç ederler.<sup>37</sup> Fibroblastlar, yara iyileşmesinde görev alan en önemli mezenkimal hücrelerdir. Hem 'üretim' hem de 'mekanik' görevleri vardır. Fibroblastlar, geçici matriksin yerini alacak olan kollajen bazlı matriksin üretiminden sorumludur. Tek bir fibroblastın tüm ekstraselüler matriks komponentlerini ard arda ya da aynı anda sentezleme

kapasitesi vardır. Mekanik görevleri ise; kontraktil özellikleri sayesinde yara kontraksiyonunu sağlamalarıdır.<sup>43</sup>



**Şekil 4: Proliferatif evre boyunca lokal mikrodolaşımın sağlanması, ESM ve matür olmayan kollajenin yapımı** <sup>22</sup>

Fibroblastlar yaralanmadan sonraki 3-4. günlerde görülürler ve 7. günde pik seviyeye ulaşarak 15-21. güne kadar yarada aktif olarak kalırlar. Yara bölgesine gelen fibroblastlar yeni ekstraselüler matriks ve matür olmayan kollajenin (tip III) sentezine başlarlar.<sup>22, 38</sup> Kollajen içeriği, kollajenaz tarafından kontrol edilen kollajen turnover'ı ile belirlenir.<sup>38</sup> Kollajen depozisyonu yaranın gerilme direncinin artmasını sağlar.<sup>22</sup>

Yara kontraksiyonu yaralanmadan sonraki 1.ve 2. haftalarda gerçekleşir.<sup>44</sup> Yara kontraksiyonu, yara kapamasının gerçekleşmesi amacıyla yara kenarlarının yara merkezine doğru hareketi olarak tanımlanmıştır.<sup>28</sup> Fibroblastlar, PDGF ve TGF- $\beta_1$ 'nin kontrolü altında fenotipik olarak miyofibroblastlara dönüşürler.<sup>20,43,45</sup> Miyofibroblastlar, fibroblastlardan köken alan, sitoplazmasında düz kas benzeri

mikrofilamanlar içeren bir hücredir.<sup>46</sup> Yara kontraksiyonunda miyofibroblastların düz kas hücreleri gibi davrandıkları düşünülmektedir.<sup>47</sup> Miyofibroblastlar, yara kapamasını kolaylaştırmak için kontraksiyon meydana getirmek üzere ESM'nin kenarları boyunca sıralanırlar.<sup>37</sup> Aktinden zengin miyofibroblastlar yara kenarlarını bir araya çeker ve defektin boyutlarını azaltırlar. Elektron mikroskop çalışmaları, bu tip yaralanmalarda özellikle granülasyon dokusunda miyofibroblastların sayısının yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Yara kontraksiyonunun boyutları, yaranın derinliğine ve yerine bağlıdır. Kısmi kat yaralarda kontraksiyon daha az iken tam kat yaralarda daha çok izlenir.<sup>22</sup>

EGF, TGF- $\alpha$  ve FGF salınımı, epitelyal hücre migrasyonu ve proliferasyonunu stimüle ederek reepitelizasyonu başlatır.<sup>37</sup> Yara kenarlarından köken alan epitelyal hücreler bazal membran üzerinde yaranın yüzeyini yeniden döşemeye başlarlar. Reepitelizasyon süreci, derinin aksine oral mukozada daha hızlı gerçekleşir.<sup>43</sup>

### 2.2.1.3. Yeniden Şekillenme Evresi

Maturasyon ve yeniden şekillenme evresi yara iyileşmesinin en uzun süren evresidir. Bu evre, yaralanmadan sonraki bir hafta civarında başlayıp aylar hatta yıllar boyunca devam eder.<sup>48</sup> Bu evrede, hücresel yoğunluğu ve damarlanması fazla olan granülasyon dokusunun yerini daha az hücre ve damardan oluşan skar dokusu alır. İyileşen yaranın metabolik ihtiyacı azaldıkça yoğun kapiller ağı gerilemeye başlar. Kollajen matriksi; sitokin ve büyüme faktörlerinin etkisi altında sürekli parçalanır, yeniden sentezlenir, düzenlenir ve moleküler çapraz bağlarla skar dokusunun içine sabitleşir.<sup>22</sup> Biriken Tip III kollajen'in yerini yavaş yavaş daha güçlü Tip I

kollajen alır. Böylece yara dokusunun gerginlik gücü giderek artar ve en sonunda orijinal gücünün %80'ine ulaşır.<sup>21</sup>

Yara iyileşmesinde yapım kadar yıkım olayları da önemlidir. Yeniden şekillenme evresi boyunca devam eden kollajen yıkımı büyük ölçüde matriks metalloproteinazlar (MMPs) tarafından düzenlenir.<sup>49</sup> MMP aktivitesi doku inhibitörü metalloproteinazların (TIMP) tarafından düzenlenir. TIMP'lar, MMP'lere karşı doğal bir karşı denge oluşturur ve skar içindeki proteolitik aktivitenin sıkı kontrolünü sağlar.<sup>50</sup> Bu dengenin herhangi bir şekilde bozulması, aşırı ya da yetersiz matriks oluşumu ya da yaranın açık kalması ile sonuçlanır.<sup>22</sup>

### 2.2.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara iyileşmesi lokal ve sistemik kaynaklı birçok faktörün etkisi altındadır.

#### 2.2.2.1. Lokal Faktörler

Enfeksiyon: Yara iyileşmesini geciktiren en önemli lokal faktördür. Yara yerinde klinik olarak enfeksiyon varlığı inflamatuvar evrenin uzaması ve inflamasyon şiddetinin artması ile yara iyileşmesinde gecikmeye neden olmaktadır.<sup>32,34</sup>

Doku Perfüzyonu: Doku iskemisi, doku onarımını engelleyen en önemli faktörlerden birisidir. Yeterince kan akımı olmayan bir yarada, nötrofillerin ve diğer inflamasyon mediatörlerinin yara yerine gelişinin gecikmesi

fagositik savunma sistemini zayıflatır ve bakteri proliferasyonuna neden olur. Bunun sonucunda enfeksiyon riski artar. Yara iyileşmesi için gerekli olan oksijen ve besleyici maddeler yara alanına yeterli miktarda ulaşamayacağı için doku nekroze olabilir.<sup>51,52</sup>

Yabancı Cisimler: Yabancı cisimler inflamatuvar evrenin uzamasına, enfeksiyona ve yara iyileşmesinde gecikmeye neden olurlar.<sup>53</sup>

Ödem: Yara çevresindeki ödem dolaşımı etkileyebilir, ayrıca granülasyon dokusunun proliferasyonunu bozar.<sup>54</sup>

Yaranın Lokalizasyonu: Kanlanması zengin bölgelerde oluşan yaralar, kanlanması daha az olan bölgelerdeki yaralardan daha hızlı iyileşir.<sup>55</sup>

Radyasyon: Radyasyon, yara iyileşme sürecinin tüm basamaklarını etkiler. İnflamasyonu, fibroblast proliferasyonunu, ESM üretimini, angiogenezis ve büyüme faktörü sentezini inhibe eder.<sup>56</sup>

#### 2.2.2.2. Sistemik Faktörler

Yaş, Cinsiyet, Irk: Hücrelerin rejenerasyon kapasitesindeki azalmaya bağlı olarak, yaşlı bireylerdeki yara iyileşmesi genç bireylere oranla daha geç tamamlanmaktadır. Cinsler arasında belirgin bir fark yoktur. Irklar arasında ise, keloid oluşumu bakımından farklılıklar vardır. Keloid oluşumu siyah ırkta diğer ırklara göre daha yüksek orandadır.<sup>57</sup>

Malnütrisyon: Yara iyileşmesi hafif ve orta derecede beslenme eksikliklerinden etkilenmezken, ileri derecedeki beslenme eksikliklerinde iyileşme hızının yavaşladığı kabul edilmektedir.

Protein eksikliği; kapiller formasyonu, fibroblast proliferasyonunu, proteoglikan ve kollajen sentezini etkiler.<sup>35</sup> Protein eksikliği, kollajen ve diğer proteinlerin sentezi için gerekli olan aminoasitlerin kullanımını kısıtlayarak immün sistemin zayıflamasına sebep olur. Methionin, sistein ve arjinin gibi aminoasitler yara iyileşmesinde hayati önem taşırlar.<sup>58</sup>

Karbonhidratlar ve yağlar, hücrenin enerji kaynağı olarak yara iyileşmesinde rol alırlar. Ayrıca hücre sentezinde; özellikle hücre membranı sentezinde yağların rolü büyüktür. Eksiklikleri yara iyileşmesini olumsuz yönde etkiler.<sup>59</sup>

Eser elementlerin eksikliği; yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen faktörlerden biridir. İleri derecede demir eksikliği hidroksiprolin sentezini azaltarak yeterli miktarda kollajen sentezlenmesini önler. Çinko eksikliğinde ise epitelizasyon hızı ve yara gerilme kuvveti azalır. Kollajenin sentezlenmesi ve fiziksel özellikleri olumsuz yönde etkilenir.<sup>60,61</sup>

Vitaminler; vücudun bütün metabolik fonksiyonlarında kofaktör prekürsörleri olarak rol oynarlar:

A vitamini; epitelizasyon, hücrel differansiyasyon ve immün sistem fonksiyonları için gereklidir. A vitamini yara bölgesindeki monosit/makrofaj sayısını artırır, kollajenaz aktivitesini düzenler, epitelyal hücre differansiyasyonunu uyarır.<sup>25,62</sup>

C vitamini eksikliğinde, kollajen sentezinde ve inflamasyon sürecinde aksaklıklar oluşur. Kollajen sentezinin hidrosilasyon basamağında yer alan C vitamininin eksikliği kollajenin zayıf bir karakter kazanmasına neden olur, böylece yara gerilme kuvveti azalır.<sup>59</sup>

E vitamini'nin antioksidan ve lizozomal membran stabilizasyonuna etkileri vardır.<sup>63</sup>

Diabet: Diabetik hastalarda yara iyileşmesinin bazı evrelerinde aksama meydana gelmektedir. Bu hastalarda nötrofil ve makrofaj fonksiyonlarında meydana gelen defekt ve bakteri miktarındaki artış ile beraber enfeksiyon riski artar. Fibroblast aktivitesi ve buna bağlı olarak kollajen sentezinde azalma olur.<sup>64</sup>

#### İlaçlar:

Glukokortikosteroidler: Kortikosteroidler; inflamasyonu, reepitelizasyonu, anjiogenezisi, fibroblast proliferasyonu, kollajen sentezi ve yıkımını, yara kontraksiyonunu olumsuz yönde etkileyerek yara iyileşmesinin gecikmesine neden olur.<sup>65</sup>

Bunun dışında, antineoplastik ve antikoagülan ilaçların da yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir.<sup>35</sup>

### 2.2.3. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Bazı Mediatörler

Yara iyileşmesi için gerekli olan hücresel faaliyetleri stimüle veya inhibe eden mediatörlerden olan fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor-FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor-VEGF) ve nitrik oksit (NO) doku bütünlüğünün sağlanmasında anlamlı etkiye sahiptirler.

#### 2.2.3.1. Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesi

FGF ailesi 23 üyeden oluşmaktadır. Keratinositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, kondroisitler ve mast hücreleri tarafından

üretirler.<sup>33</sup> FGF ailesi sinyallerini, farklı FGF'lere farklı afinite ile bağlanan FGF reseptörleri 1- 4 (FGFR1-4) aracılığıyla iletirler.<sup>66</sup>

Yara iyileşmesinin anjiogenezis, granülasyon dokusunun yapımı, reepitelizasyon ve dokunun yeniden şekillenmesi aşamalarında önemli role sahip olan FGF-2 <sup>33,67</sup> 18kDa, tek zincire sahip, glikolize olmayan, endotelial hücrelerde güçlü mitojenik etkiye sahip bir polipeptittir.<sup>40</sup>

FGF-2 veya bazik FGF (bFGF) seviyesi yaralanmadan sonraki 10-14. günde artar.<sup>68</sup> FGF-2; anjiogenezis sürecinde endotelial hücre migrasyonu, fibroblast proliferasyonu ve ESM sentezini arttırarak yara iyileşmesini hızlandırır.<sup>69, 70</sup> Ayrıca; kollajenaz ve plazminojen aktivatör üretimini uyararak hasar gören dokuların ve bazal membranın yıkımına yol açar.<sup>71</sup>

Yara iyileşme sürecinde farmasötik etkileri olduğu bilinen FGF-2 birçok çalışmaya konu olmuştur.<sup>72,73</sup> Damak yarıklarının tedavisi sonrası görülen skar dokusu oluşumu ve yara kontraksiyonunu önlemeye yönelik araştırmalarda FGF-2 içerikli yapı iskeletleri kullanılmış ve palatinal mukozanın rejenerasyonunda artış olduğu bildirilmiştir.<sup>73, 74</sup> Submukozal insan rekombinant bFGF enjeksiyonu ile bFGF'nin yara iyileşmesine olan katkısının incelendiği bir diğer çalışmada, reepitelizasyonda ve granülasyon dokusu yapımında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış olduğu gösterilmiştir.<sup>75</sup> Günümüzde, FGF-2'nin rekombinant formu kronik deri ülserlerinin tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır.<sup>76</sup>

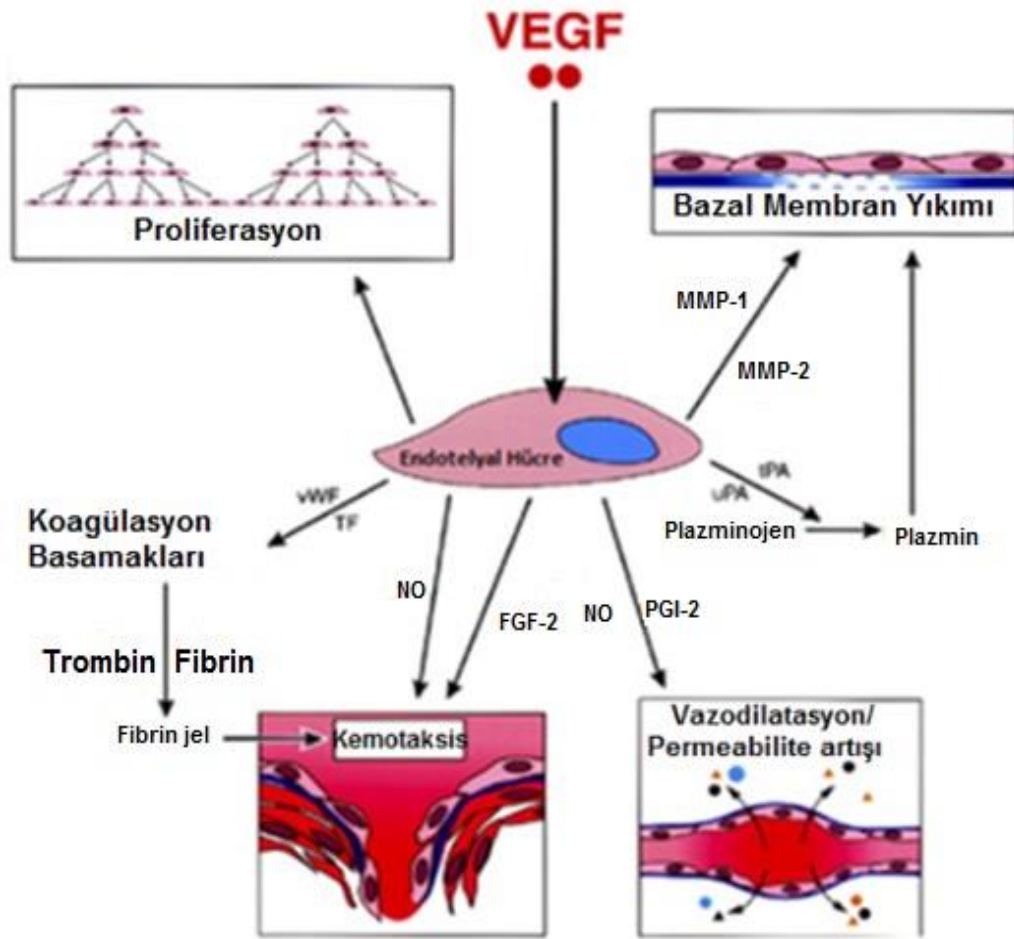


### 2.2.3.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, biyolojik aktivitesini ağırlıklı olarak endotelyal hücreler üzerinde gösteren anjiogenezisin anahtar mediatörüdür.<sup>77</sup> Mikrovasküler geçirgenliğin artmasına sebep olan bu faktör, aynı zamanda güçlü bir vazodilatördür.<sup>78, 79</sup>

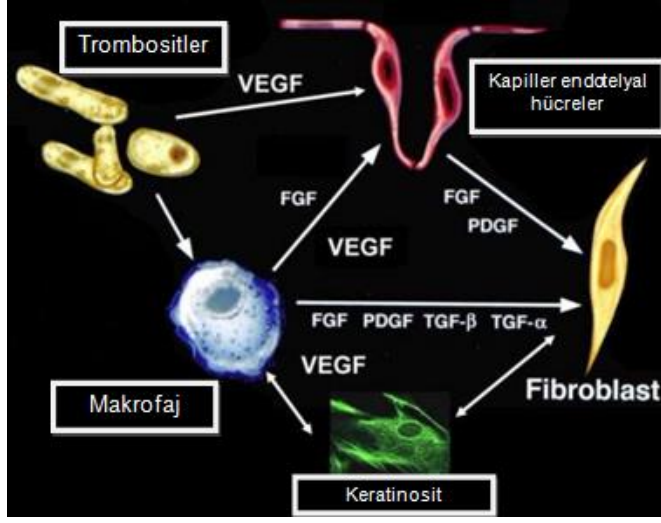
Damarsal düz kas hücreleri, epitelyal hücreler, trombosit, lökosit ve makrofajlar tarafından sentezlenir ve salgılanırlar.<sup>66,80</sup> VEGF, heparin bağlayıcı glikoprotein yapıda bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır.<sup>40</sup> VEGF-A, B, C, D ve plasental büyüme faktörünü (PLGF) içeren ailenin bir parçasıdır.<sup>81</sup> Endotel hücreleri üzerindeki VEGF-R1 ve VEGF-R2 ile lenf damarları üzerindeki VEGF-R3 olmak üzere 3 tip VEGF reseptörü vardır.<sup>82</sup>

Yara iyileşmesinin farklı evrelerinde görev alan VEGF reseptörlerinin aktivasyonu bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotelyal hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar, apoptozisi inhibe eder.<sup>83, 84</sup> Yara bölgesinin revaskülarizasyonunu ve permeabilitesini düzenleyen esas faktör olan VEGF, proliferasyon evresi boyunca granülasyon dokusunun yapımına da katılmaktadır.<sup>85, 86</sup> Günümüzde, VEGF'nin yara iyileşmesinde terapötik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmaktadır.<sup>87-90</sup> Bu çalışmalara göre; VEGF'nin aşırı üretimi sonucu granülasyon depozisyonu artmaktadır. Endotel hücreleri üzerindeki bu etkilerinin yanı sıra VEGF proteinleri ve reseptörleri ailesi, embriyonik vasküler gelişim ve erişkinlerde tümöral büyüme gibi patolojik neovasküler olaylarla da ilişkilidir.<sup>91</sup>



Şekil 5: VEGF'nin yara iyileşmesindeki rolü

VEGF, endotelial hücreleri stimüle ederek angiogenesis basamaklarını başlatır.



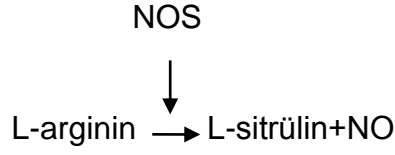
**Şekil 6: VEGF ve yara iyileşmesinin hücresel temeli**

VEGF sentezini ilk yapan hücre olan trombositler yaralanmadan hemen sonra yara bölgesine gelirler. Yaralanmanın 2. gününde makrofajların sayısı pik yapar. Endotelial hücrelerin proliferere ve migrasyona uğramasını sağlayan makrofajlar da VEGF salınımı yapmaktadır. Endotelial hücreler 2. gün migrasyona başlar ve 3-4. günde yeni kapiller endoteli görülmeye başlar. 5. günde fibroblastlar tarafından yeni kollajen üretimi başlar. VEGF keratinosit migrasyonunu ve fibroblastlar aracılığı ile kollajen üretimi stimüle eder.

### 2.2.3.3. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), kısa ömürlü, yüksek derecede reaktif (biyoaktif), hücrelerde çeşitli biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesinde rol oynayan serbest bir radikaldir.<sup>92,93</sup> NO, moleküler yapısının küçük olması nedeniyle ideal bir intersellüler ve transellüler aracı moleküldür.<sup>94</sup>

Nitrik oksit, L-argininden sitrulin oluşumu sırasında, L-argininin guanidin azot (nitrojen) grubunun hidroksilasyonu ile oluşan ara üründür. Bu tepkime bir dizi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalize edilir.<sup>95</sup>



İnsanlarda NOS'un üç izoformu tanımlanmıştır; bunlar, nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve makrofajlardaki indüklenebilir NOS (iNOS)'tur. nNOS ve eNOS izoformları yapısal NOS (constutive NOS, cNOS) olarak adlandırılmaktadır.<sup>96</sup>

NOS izoformları fonksiyonel olarak düzenlenme tarzları ile ayırt edilirler. NOS'un kalsiyum ( $\text{Ca}^{2+}$ ) bağımlı izoformları olan nNOS ve eNOS,  $\text{Ca}^{2+}$ 'nın hücre içinde artması ile uyarılarak aktiveleşir. Buna karşın  $\text{Ca}^{2+}$ 'dan bağımsız NOS (iNOS), hücre içinde  $\text{Ca}^{2+}$ 'nın düşük seviyelerinde bile yapısal olarak aktiftir.<sup>97,98</sup>

nNOS, başlıca santral sinir sistemindeki nöronlarda geniş dağılım gösterir. Bunun dışında; spinal kordda, adrenal bezlerde ve vasküler düz kas hücrelerinde de bulunur. nNOS aktivitesi  $\text{Ca}^{2+}$  ve kalmodulin ile düzenlenir. nNOS kaynaklı NO, santral kan basıncının kontrolü, nörotransmitter salınımı ve nörogenesis gibi önemli fizyolojik nöral fonksiyonlarda görev almaktadır.<sup>99</sup>

eNOS, başlıca endotelial hücrelerden sentezlenir. eNOS aracılığıyla üretilen NO, damar endoteline lökosit adhezyonunu engelleyerek antiaterosklerotik etki sergiler.<sup>100</sup> eNOS kaynaklı NO fizyolojik vazodilatördür.<sup>101</sup> Ayrıca; anjiyojenik faktörlerin düzenlenmesinde,

anjjiogeneziste<sup>102</sup>, kan basıncının kontrolü ve vasküler remodelingde rol oynar.<sup>99</sup>

iNOS, kardiyomiyositler, hepatositler, nöronlar, mikroglial hücreler, nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar, vasküler endotelyal ve düz kas hücrelerinde bulunur. iNOS salınımı bakteriyel lipopolisakkarit ve sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN-gama) ile uyarılır.<sup>103</sup> iNOS, yara iyileşmesi ve enflamasyonda ortama salınmaktadır. iNOS salınımının inhibe edildiği bir hayvan çalışmasında kollajen sentezinin ve yara dayanıklılığının azaldığı bildirilmiştir.<sup>104</sup> Ayrıca, eksizyonel yara modelinin oluşturulduğu iNOS'tan yoksun farelerde de yara iyileşmesinin geciktiği görülmüştür.<sup>105</sup> iNOS kaynaklı NO'nun bildirilen diğer etkileri arasında antimikrobiyal özelliği de yer almaktadır.<sup>106</sup>

NO farklı dokularda farklı etkilere sahip bir moleküldür. Vazodilatasyon, sitokin stimülasyonu ve trombosit agregasyonu gibi birçok olayda etkin rol oynayan NO'nun, patolojik koşullarda zararlı etkileri oluşmakta ve inflamatuvar reaksiyonlar sırasında miktarı artmaktadır.<sup>107</sup>

Anjiyogenez, yeni mikrodamarların oluşturulması işlemidir ve normal bir yara iyileşmesinin en önemli aşamalarındandır. VEGF, NO üretiminin düzenlenmesinden sorumlu potansiyel bir anjiyojenik faktördür. VEGF, e-NOS'u düzenleyerek NO üretimini artırır. Buna karşın, farelerde cilt yaralanması sonrasında NO üretiminin VEGF salınımını tetiklediği gösterilmiştir. Özetle, VEGF'nin anjiyojenik etkisi de NO'ya bağlıdır. VEGF ile stimule olan endotelyal hücre migrasyonu ve azalmış adhezyon da NO kaynaklıdır.<sup>108</sup>

NO, yara iyileşmesi sırasında görev alan birçok hücre tipinde gerçekleşen proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis üzerinde etkin bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda NO'nun; fibroblastların, endotelial ve epitelyal hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonunu teşvik ederek yara iyileşmesinin proliferatif fazında anahtar rol oynadığı, yeniden şekillenme evresinde ise kollajen depozisyonunda görev aldığı gösterilmiştir.<sup>109</sup>

#### 2.2.4. Yara Onarım Tipleri

Yara iyileşmesi primer, sekonder ve tersiyer yara iyileşmesi olmak üzere üçe ayrılır.

Primer yara iyileşmesi, cerrahi dikişle kenarları birbirine yaklaştırılan temiz, enfekte olmayan cerrahi insizyonun iyileşmesidir. İnsizyon epitelyal bazal membran bütünlüğünü yalnızca noktasal olarak bozmuştur ve nispeten az sayıda epitel ve bağ doku hücre kaybına yol açar. Bu tarz iyileşmede epitelyal rejenerasyon fibrozisten fazladır. Dar insizyon mesafesi hızla fibrinle pıhtılaşmış kanla dolar, hızla granülasyon dokusuyla invaze olur ve yeni epitel örtüsü ile örtülür.<sup>34</sup>

Sekonder yara iyileşmesi, suture konulmadan spontan iyileşmeye bırakılmış yaralardır. Doku kaybının fazla olduğu yaralarda onarım yara kenarlarının karşı karşıya getirildiği yaralardan daha yavaştır. Ayrıca daha çok doku ve hücre artığı olduğu için daha şiddetli bir inflamatuvar cevap oluşur. Bu yaraların iyileşme süreleri yaranın derinliğine ve kenarlarının birbirinden uzaklığına bağlıdır.<sup>34, 110</sup>

Tersiyer yara iyileşmesi, gecikmiş primer kapama olarak da adlandırılır. Bu iyileşme şekline kontamine dokudaki enfeksiyon riskini azaltmak için başvurulur. Kontamine yara debride edilir, granülasyon dokusunun oluşması beklenir ve 5-7 gün boyunca sekonder iyileşmeye bırakılır. Daha sonra yara kenarları yaklaştırılır. Bekleme sürecinde eksudanın drenajı ve ödem şiddetinde azalma gibi fizyolojik süreçlere olanak tanınmış olunur.<sup>22, 110</sup>

Sekonder iyileşme primer iyileşmeden çeşitli yönleri ile farklıdır:

1. Büyük doku defektleri ortamdaki uzaklaştırılması gereken daha büyük nekrotik doku, fibrin ve eksuda içerir. Sonuçta, iltihabi reaksiyon daha yoğundur.
2. Daha fazla granülasyon dokusu oluşur. Daha fazla granülasyon dokusu hacmi genellikle daha büyük skar doku kitlesi ile sonuçlanır.
3. Sekonder iyileşme yara kontraksiyonu durumunu açığa çıkarır. Bu olay fibroblastlardan farklılaşan, ultrastrüktürel ve fonksiyonel birçok niteliği düz kas hücresi ile eşdeğer miyofibroblastlar tarafından sağlanır.<sup>34</sup>

#### 2.2.5. Periodontal Cerrahide Sekonder Yara İyileşmesi

Periodontal tedavi uygulamalarından biri olan periodontal plastik cerrahi, dişleri çevreleyen dişeti ve alveol mukozası miktarındaki, konumundaki veya morfolojisindeki defektleri düzeltmek amacıyla uygulanan cerrahi işlemleri kapsar.<sup>111</sup> Periodontal plastik cerrahi uygulamaları ile yetersiz olan keratinize dişetini arttırarak oral mukozadan daha dirençli bir yapı oluşturmak, hastanın oral hijyen uygulamalarını

kolaylaştırmak, gingival kenara kadar uzanan frenilum ve kas ataşmanlarını ortadan kaldırarak çekilme hareketlerini kısıtlamak ve lokalize dişeti çekilmelerini tedavi ederek estetik ve fonksiyonel sorunları düzeltmek hedeflenir.<sup>112</sup>

#### 2.2.5.1. Serbest Dişeti Grefti

Keratinize dişeti; çiğneme sırasında oluşan sürtünme kuvvetlerinden kaynaklanacak yaralanmalardan periodonsiyumu ve komşu alveoler mukozanın sebep olduğu çekme hareketinden gingival marjini korur, plağa bağlı dişeti hastalıklarının apikale ilerlemesine karşı doku direnci sağlar.<sup>112</sup>

Lang ve Löe, periodontal sağlığın idamesi için diş çevresi keratinize dişeti genişliğinin  $\geq 2$  mm olması gerektiğini bildirmişlerdir.<sup>113</sup> Öte yandan son yıllarda geniş keratinize dişeti miktarının dar ya da olmayan keratinize dişetine göre plak birikimine karşı daha önleyici olduğu görüşü geçerliliğini yitirmektedir. Çünkü oral hijyen uygulamaları iyi olan bireylerin keratinize dişeti olmaksızın da dişeti sağlıklarını koruyabildikleri gözlenmiştir.<sup>114</sup> Bununla birlikte; oral hijyen uygulamalarının daha etkili hale getirilmesi, ağığa çıkmış kök yüzeylerinin direkt olarak kapatılması, birden fazla dişi içeren dişeti çekilmenin tedavisi, ortodontik tedaviler sonrası alveoler kemikte görülen dehisens sonrası keratinize dişeti genişliğinin arttırılması için augmentasyon prosedürleri yapılmaktadır.<sup>112</sup>



Keratinize dişeti genişliğini arttırmak için farklı birçok cerrahi teknik geliştirilmiştir. Yarım asır önce uygulanmaya başlayan serbest dişeti grefti yüksek başarı yüzdesi sebebiyle klinikte sıkça tercih edilmektedir.<sup>115,116</sup> Ancak; bu tekniğin alıcı bölgede görülen renk farkı ve verici bölgede oluşturulan yara yüzeyinin sekonder iyileşmeye bırakılması sebebiyle hastalarda postoperatif ağrının meydana gelmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.<sup>117,118</sup>

#### 2.2.5.2. Frenektomi

Frenilum; bir müköz membran katlantısıdır. Genellikle kas lifleriyle sarılmış olan frenilum, dudak ve yanak mukozasına ve/veya dişeti ve periosteuma bağlanan anatomik bir yapıdır.<sup>119,120</sup>

Frenilum bağlantılarının serbest dişetine kadar uzandığı durumlarda, dudak-yanak hareketleri serbest dişeti kenarının dişten ayrılmasına sebep olur. Bu durum periodontal hastalık için bir risk faktörüdür. Sulkus ya da cep ağzında meydana gelen bu çekme hareketi plak akümülyasyonuna, diş fırçasının etkili kullanımının zorlaşmasına ve serbest dişetin apikale göçüne sebep olmaktadır.<sup>121</sup> Dişeti çekilmesiyle birlikte de dentin hassasiyeti, estetik problemler ve kök çürüğü riski artmaktadır. Ayrıca, kalın bir frenilum ortodontik kuvvetlere direnir. Tedaviyi takiben maksiller kesici dişler arasında diastemaya sebep olabilir.<sup>122</sup>

Frenektomi, frenilumun alttaki kemiğe kadar olan bağlantısıyla birlikte çıkarılmasıdır. Farklı çok sayıda frenektomi tekniği geliştirilmiştir.

Ancak birçoğunda yara yüzeyinin iyileşmesi sekonder iyileşme şeklindedir.<sup>119,123</sup>

#### 2.2.5.3. Laterale Kaydırılan Flep

Dişeti çekilmesi, gingival marjinin mine sement sınırının daha apikalinde konumlanmasıdır. Dişeti çekilmelerinin etiolojisinde; hatalı diş fırçalama, yetersiz oral hijyen, frenilum ve kas ataşmanları, kemik dehisensleri, uyumsuz restorasyonlar, diş malpozisyonu, dişetin viral enfeksiyonları, ortodontik hareketler, oklüzal travma ve periodontal hastalık yer almaktadır.<sup>124</sup> Dişeti çekilmeleri; kozmetik problemlere, hipersensitiviteye ve servikal kök çürüğüne neden olmaktadır.<sup>125</sup> Dişeti çekilmelerinin tedavisinde uygulanan laterale kaydırılan flep<sup>126</sup> tek yöre operasyonu olması, estetik açıdan başarılı sonuçların elde edilmesi, kan desteğinin iyi olması ve açık kök yüzeyini kaplayabilmesi gibi avantajlara sahiptir.<sup>127</sup> Öte yandan, laterale kaydırılan flep sonrası verici sahada oluşan yara yüzeyinin iyileşmesi sekonder iyileşme şeklindedir.

#### 2.2.5.4. Gingivektomi/Gingivoplasti

Dişeti büyümeleri, kemik üstü ceplerin eliminasyonu, kron boyu uzatma, depigmentasyon ve nekrotizan ülseratif gingivitis sonrası bozulan gingival mimarinin düzeltilmesi amacıyla uygulanan gingivektomi ve gingivoplasti operasyonları sonrası açık bağ dokusu yarası oluşturulur. Operasyon sonrası meydana gelen geniş yara yüzeyinin postoperatif dönemde yara iyileşmesi sekonder iyileşme şeklindedir. Bu nedenle,

postoperatif iyileşme primer iyileşmenin beklendiği yara yüzeylerinden daha uzun sürede tamamlanır.<sup>128</sup>

Herhangi bir cerrahi işlemin başarısı, oluşturulan yaranın iyileşme durumuna bağlıdır. Ne kadar hızlı ve kaliteli bir yara iyileşmesi gerçekleşecek olursa, o denli başarılı bir tedavi sağlanmış demektir. Yara iyileşmesini iyi yönde hızlandırmak amacıyla kullanılan tedavi yöntemlerindeki ana hedef; yara iyileşmesinde rol alan faktörleri (inflamatuvar hücreler, trombositler, mediatörler, hücre dışı matriks v.b.) etkileyerek, yara iyileşmesinin evrelerine ait süreyi kısaltmak ve ideal bir yara iyileşmesini sağlamaktır. Bunun için, pek çok topikal ve sistemik ajan kullanılmış ve yara iyileşmesindeki gecikme ve düzensizliklerin önüne geçilmeye çalışılmıştır. Periodontal cerrahi sonrası da bakteriyel kontaminasyonu önlemek, plak kontrolünü sağlamak ve yara iyileşmesini desteklemek amacıyla antimikrobiyal ajanların kullanıldığı görülmektedir.

### **2.3. Ankaferd Blood Stopper® (ABS)**

Ankaferd Blood Stopper (ABS); Türk tıbbında hemostatik ajan olarak kullanılan ilk tıbbi bitki ekstratıdır. ABS, bitkilerden alınan ekstraktların standardize karışımından oluşur: 100 ml'lik ekstraktta 5 g *Thymus vulgaris* (Kekik), 7 g *Glycyrrhiza glabra* (Meyan), 8 g *Vitis vinifera* (Asma), 7 g *Alpinia officinarum* (Havlıcan) ve 6 g *Urtica dioica* (Isırgan) içerir. Bu bitkisel karışım içeriğindeki her bir bitkinin damar endotel, kan hücreleri, anjiogenezis, hücre proliferasyonu ve çeşitli mediatörler üzerine etkisi olduğu kanıtlanmıştır.<sup>10</sup>

Bitkilerin araştırılmış etkileri aşağıda sıralanmaktadır:

*Thymus vulgaris* (Kekik), antioksidan özelliği ile oksidatif hasarı, lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı ateroskleroz oluşumunu önler.<sup>129</sup>

*Glycyrrhiza glabra*'nın (Meyan) köklerinden elde edilen ekstraktın *in vitro* antiangiogenik etki gösterdiği ve VEGF oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda, bu bitkinin antiinflamatuvar, antitrombotik, antioksidan, antiaterosklerotik etkileri olduğu belirlenmiştir.<sup>130</sup>

*Vitis vinifera* (Asma) antiaterosklerotik ve antitümöral etkilere sahiptir.<sup>131</sup>

*Alpinia officinarum*'un (Havlıcan) lipopolisakkarit ile aktive edilmiş fare peritoneal makrofajında NO üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bitkinin antispazmotik ve antibakteriyel özellikleri bulunmaktadır.<sup>132</sup>

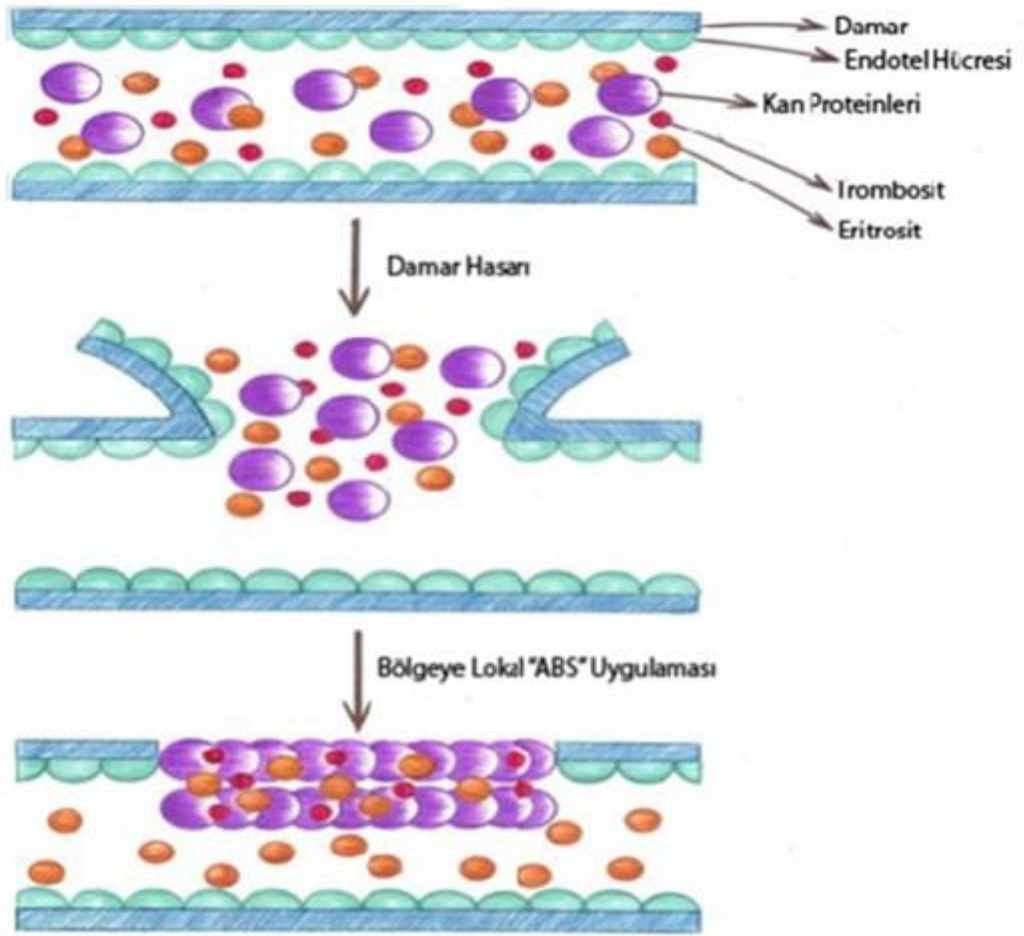
*Urtica dioica* (Isırgan) sıçanda endotel kaynaklı hipotansif yanıt oluşturduğu, bunun da endotelden NO salınması ve potasyum kanallarının açılması sonrası gelişen vazodilatasyona bağlı olabileceği düşünülmüştür.<sup>133</sup>

ABS içeriğindeki bu bitkiler, doku oksijenasyonunu ve fizyolojik hemostatik süreci hiçbir pıhtılaşma faktörünün etkisini bozmadan sağlamaktadır.<sup>10</sup>

### 2.3.1. ABS'nin Etki Mekanizması

ABS'nin hemostatik etkisini; fibrinojen başta olmak üzere kan proteinleri ve eritrositlerin plazma ve serumda 'protein ağı' meydana getirmesi neticesinde gösterdiği bildirilmektedir.<sup>10</sup>

ABS indüklü protein ağ oluşumu, kan proteinleri (eritrosit ve plateletler) ve kırmızı kan hücrelerinin fonksiyonları ile bağlantılıdır ve tüm fizyolojik hemostatik süreci etkiler. Yapılan biyokimyasal ölçümlerde, pıhtılaşma faktörleri üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir. ABS uygulamasının hem normal hemostatik parametrelere sahip bireylerde hem de herhangi bir faktör eksikliği ve/veya hemostaz yetersizliğine sebep olan dissemine intravasküler koagülasyon ve hemofili hastalarında etkili bir yöntem olabileceği vurgulanmıştır.<sup>134</sup> Ankaferd kullanımını takiben plazma fibrinojen aktivitesinde ve fibrinojen miktarında azalma, buna bağlı olarak trombin zamanında da uzama olduğu bildirilmiştir.<sup>10</sup>



Şekil 7: Ankaferd'in etki mekanizması

ABS; Türk Sağlık Bakanlığı tarafından eksternal hemorajiler ve dental kanamalarda kullanılmak üzere onaylandıktan sonra, Türkiye'deki dental girişimlerde meydana gelebilecek aşırı kanama durumlarını engellemek ve tedavi etmek için kullanılacak protokollere eklenmiştir.<sup>135</sup>

Diş hekimlerinin karşılaştığı en ciddi sorunlardan biri hemostatik başarısızlıktır. Bazı hastalarda birçok nedenden ötürü dental cerrahi işlemler sırasında veya sonrasında ciddi kanamalarla karşılaşılabilir

ki bu durum oral cerrahi uygulamalarını bu hastalar için daha riskli hale getirmektedir. Hemostazı sağlama amacıyla üretilen ve kullanılan ABS'nin hemostaz özelliği dışında antimikrobiyal özelliği olduğu da *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ayrıca, diş tedavisi sırasında kanama kontrolü sağlamak amacıyla uygulanan ABS'nin yara iyileşmesinde de olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.<sup>134</sup> Bununla birlikte, literatür dahilinde ABS'nin oral mukozal yara iyileşme sürecindeki etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan hareketle, çalışmamızda rat palatinal mukozasında oluşturulan eksizyonel yara modelinde ABS'nin iyileşme sürecine etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 03/2011-23 kodlu bu çalışma, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM), Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce, 16.05.2011 tarih ve B.30.2.GÜN.0.05.06.00/110-9171 sayılı Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınmıştır.

#### **3.1. Deneysel Model**

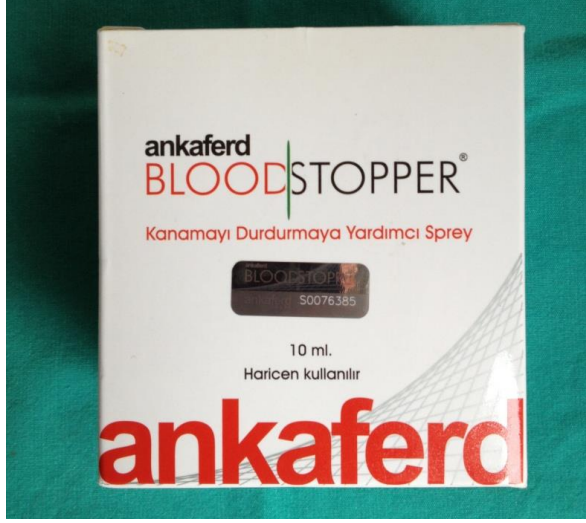
Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) sağlanan, ortalama ağırlıkları 300 gr olan 72 adet Wistar cinsi erkek albino rat (sıçan) kullanılmıştır. Deney hayvanlarına su ve yiyeceğe serbest erişim imkanı (Ad Libitum) sağlanmış ve oda ısısı  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Deneklerin 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu altında yaşamaları sağlanmıştır.

#### **3.2. Kullanılan Malzemeler**

##### **3.2.1. Ankaferd Blood Stopper**

Çalışmamızda deney hayvanlarının palatinal mukozasında açılan yumuşak doku defektlerine yara iyileşmesine olan etkilerini incelemek üzere ABS (Ankaferd İlaç Kozmetik A.Ş., İstanbul, Türkiye) uygulandı (Resim 1)





**Resim 1: Ankaferd Blood Stopper**

### **3.2.2. Biyopsi Aleti**

Yumuşak doku defektlerini oluşturmak üzere çapı 4 mm olan 'punch' biyopsi aleti (Astra Tech AB, Sweden) kullanıldı (Resim 2).



**Resim 2: Çalışmada kullanılan 'punch' biyopsi aleti**

### 3.3. Deney Grupları

Ankaferd Blood Stopper'ın (ABS) ağız içi mukozal dokularda yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı deney 21 günlük bir dönem için planlandı. 72 hayvan rastgele (I) topikal ABS uygulaması yapılan deney grubu (II) serum fizyolojik uygulaması yapılan kontrol grubu olarak 2 gruba ayrıldı. Bu iki grup da histolojik ve biyokimyasal analiz grubu olarak 2 alt gruba ayrıldı. Bu gruplar Tablo 1'de gösterilmektedir.

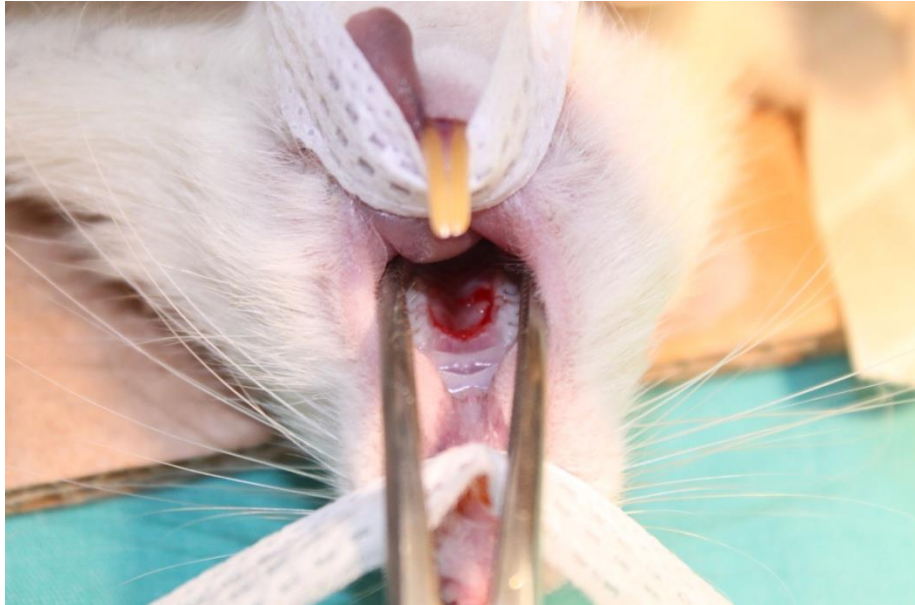
**Tablo 1: Deney hayvanlarının gruplandırılması**

	Günler	Gruplardaki Hayvan Sayısı	
		Kontrol Grubu	ABS Grubu
Histolojik Analiz Grubu	7	6	6
	14	6	6
	21	6	6
Biyokimyasal Analiz Grubu	7	6	6
	14	6	6
	21	6	6

### 3.4. Cerrahi Protokol

Deney öncesi yapılan ön çalışmada histolojik ve biyokimyasal analizler için en uygun defekt boyutu belirlendi. Hayvanlar, cerrahi işlemler uygulanmadan önce intramusküler Ketamin HCl (45 mg/kg; Alfamine %10, Alfasan, Woerden, Hollanda) ve Ksilazin HCl (2.5 mg/kg; Alfazyne %2, Alfasan, Woerden, Hollanda) ile sağlanan genel anesteziye alındı. Asepsi ve antisepsi kurallarına uyularak cerrahi işleme hazır hale getirilen ratların

steril cerrahi aletlerle dil ve yanağı ekarte edildikten sonra molar dişleri arasında kalan damak mukoperiosteumunda 4 mm'lik 'punch' biyopsi aleti kullanılarak tam kalınlık eksizyonel yara yerleri oluşturuldu (Resim 3). Deney grubunu oluşturan ratlara insülin enjektörü yardımıyla 0.10 ml ABS solüsyonu, kontrol grubunu oluşturan ratlara ise aynı şekilde serum fizyolojik damlatıldı. Gerekli durumda, kanama kontrolü sağlanana kadar steril tampon ile baskı yapıldı. Baskı sonrası herhangi bir işlem yapılmadı.



**Resim 3: Rat palatinal mukozasında oluşturulan eksizyonel yara**

### **3.5. Deney ve Kontrol Gruplarından Biyopsi Alınması**

Cerrahi işlemden sonraki 7, 14 ve 21. günlerde her gruptan eşit sayıda hayvan intrakardiyak yüksek doz ketamin HCl ile histolojik ve biyokimyasal analizler yapılmak üzere sakrifiye edildi. Ratların bir bütün halinde çıkartılan üst çeneleri histolojik değerlendirmeler için %10'luk

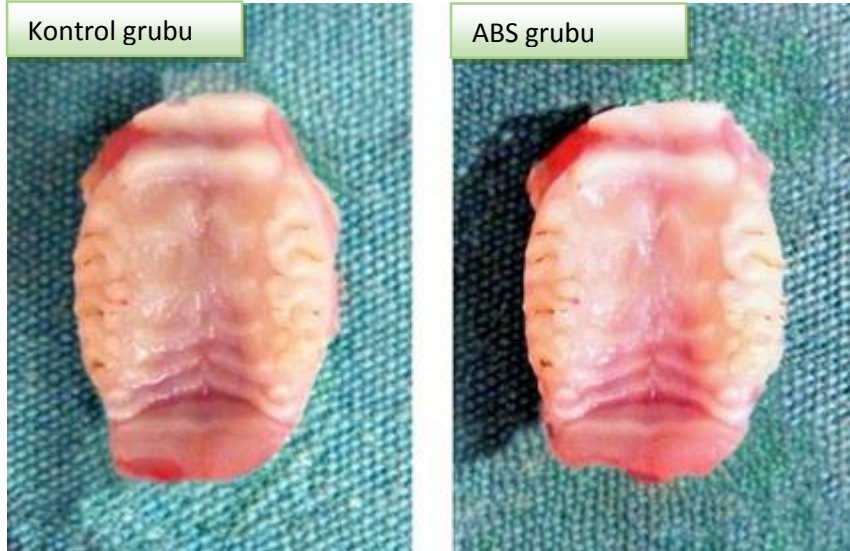
formaldehit içeren kaplara konuldu. Biyokimyasal analiz yapılacak gruptan ise 4 mm'lik punch biyopsi aleti kullanılarak elde edilen biyopsi materyalleri eppendorf tüplerine alınarak analizin yapılacağı güne kadar -80° C' de muhafaza edildi.



**Resim 4: 7. günde elde edilen rat üst çene önekleri**



**Resim 5: 14. günde elde edilen rat üst çene örnekleri**



**Resim 6: 21. günde elde edilen rat üst çene örnekleri**

### **3.6. Histolojik Yöntem**

%10'luk formaldehit içerisinde fikse edilmiş doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için EDTA'lı dekalsifikasyon solüsyonunda kemik dokusu takibe uygun yumuşaklığa ulaşıncaya dek tespit edildiler. Daha sonra rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica SM 2000R mikrotomla (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) polizinli lamlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler yapısal değişikliklerin değerlendirilebilmesi amacıyla hematoksilene-eozin boyanarak incelendi. Preparatlara ait histolojik değerlendirmeler Leica DM 4000B ışık mikroskopunda (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) yapıldı. Örneklerin Leica Q Win Version 3 görüntü analiz programı kullanılarak yara iyileşme düzeyleri değerlendirildi, dijital görüntüleri alındı ve yine Leica Q Win Version 3 (Leica Q Win V3 Plus Image) görüntü analiz programında istatistiksel analiz için yara bölgelerinin derinlik ve genişlik parametreleri ölçüldü. Defekt derinliği değerleri yara dokusunun oral yüzeyinden defektin enflamasyonun izlenebildiği en derin mesafesi ölçülerek belirlendi. Reepitelizasyon miktarını değerlendirmek üzere de yara bölgesinin matürasyonunu tamamlamamış epitel kenarları arasındaki mesafe ölçülerek defekt genişliği parametresine ulaşıldı.

### **3.7. Biyokimyasal Analiz**

Kontrol ve deney gruplarındaki ratların palatal mukozasında VEGF, FGF-2 ve iNOS protein düzeyi western blot yöntemi ile belirlenmiştir.

**Western Blot Prosedürü:** Öncelikle, rat palatinal mukozalarından elde edilen biyopsi örneklerinin lizis solüsyonu [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % (w/v) NP-40, 0.25 Na deoksikolat; pH: 7.4] ile 1:10 oranında dilüsyonu yapıldı. Çalışılacak proteinin izolasyonu amacıyla dokuların homojenizatör (T25-B Ultra Turrax, IKA, Labortechnik, Almanya) yardımıyla homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenizasyonu takiben dokunun proteinli kısmını ayırtmak amacıyla süspansiyon 14000 rpm'de, +4° C'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Çalışılan proteinin hemen hemen tamamının sıvı faza geçmesi sağlandıktan sonra çöktelinin üstünde kalan sıvı (süpernatant kısmı) mikropipetler yardımıyla alındı.

Elde edilen her bir numuneye ait süpernatantların Bradford yöntemi ile total protein tayini yapıldı. Her bir numunede 30 µg protein olacak şekilde kuyucuklara eklenecek örneklerin µL' si hesaplandı. Protein tanımlama amacıyla yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrılmaları temeline dayanan elektroforez tekniği uygulandı. % 5'lik paketleyici jel [Distile su, % 30 akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1 M Tris HCl; pH: 6.8, % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS), %10 amonyum persülfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED)], % 12 ayırıcı jel [Distile su, % 30 akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1.5 M Tris HCl; pH: 8.8, % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS), %10 amonyum persülfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED)] içeren poliakrilamid jele yüklenerek 200 voltta yaklaşık 60-75 dakika elektroforez edildi. Elektroforez ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler 90 dakika boyunca 200 mAmp sabit akıma tabi tutulup % 20 metanol içeren transfer tamponu içerisinde PVDF (0.22 µm poliviniliden florid) membrana transfer edildi.

Membran, bloklama solüsyonu ile 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Süt tozu ile bloklama işlemi tamamlanan membran, 3 kez 10 dakika boyunca tris buffered saline+Tween tamponu (TBST) ile yıkandıktan sonra 10 ml primer antikor ile gece boyu +4° C'de inkübasyona bırakıldı. VEGF, FGF-2 ve iNOS'a karşı primer antikorlar (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ile immün işaretlenen membranlar 3 kez TBST ile yıkandıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında 10 ml HRP (horse radish peroksidaz) işaretli sekonder antikorlar (anti-rabbit IgG HRP-linked antibody, Cell Signaling Technology, Boston, USA) ile inkübasyona bırakıldı. Sekonder işaretlemeden sonra membran 2 kez TBST ve 1 kez TBS (tris buffered saline) ile yıkandıktan sonra 10 ml ECL (enhanced kemiluminesans reaktif) içerisine atıldı. Böylece, hedef protein bandları görünür hale getirildi. Ardından, membrandan gelen sinyaller X-ray filme basıldı. Elde edilen analizler üzerinden piksel analizi ile kantitatif tayin yapıldı.

### 3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada histolojik değerlendirmede elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Rakamsal değerler, ortalama ( $\bar{x}$ ) ve standart sapma olarak ifade edildi. Veriler için tanımlayıcı istatistikler sayısal olarak ifade edildi. Deney düzenine uygun olacak şekilde model denklemi kurularak faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkileri araştırıldı. İkili gruplar arası karşılaştırmalar; grupların dağılımı normalse ve grup varyanslarının eşitliği söz konusuysa Student's t testi ile, parametrik test varsayımları sağlanmıyorsa Mann Whitney-U testi ile gerçekleştirildi. Tüm analizlerde p<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi. Western blot yöntemi ile ölçülen protein değerlerinin istatistiksel analizleri ise SigmaPlot 11.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Rakamsal değerler, ortalama ( $\bar{x}$ ) ve standart hata (SH) olarak ifade



edildi. Gruplar arası karşılaştırma Student's t testi kullanılarak gerçekleştirildi.  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi. Histolojik değerlendirmede elde edilen yara derinliği ve yara genişliği değerlerinin grafikleri ile western blot yöntemi ile ölçülen protein değerlerinin grafikleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak yapıldı.

## **4. BULGULAR**

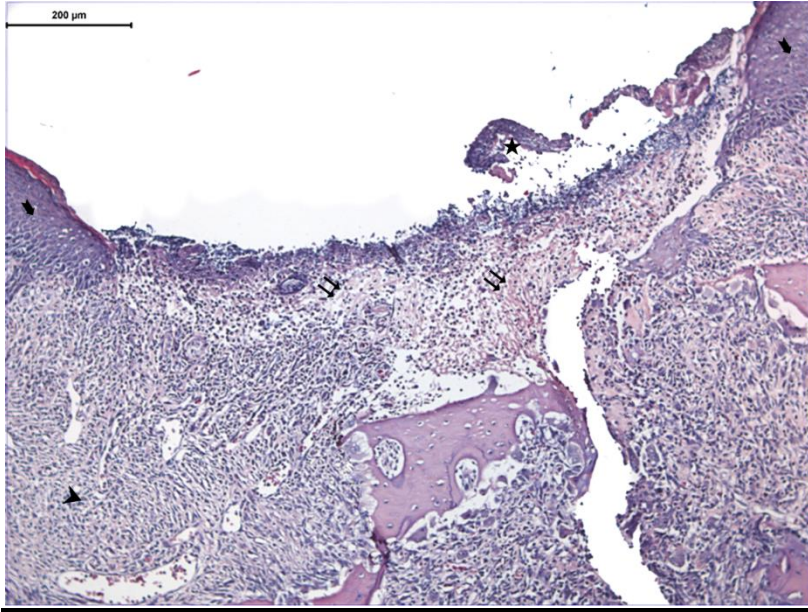
Hemostatik bir ajan olan ABS'nin rat palatinal mukozalarında oluşturulan yaralara topikal olarak uygulanmasından sonra elde edilen histolojik ve biyokimyasal bulgular şu şekildedir:

### **4.1. Histolojik Bulgular**

7. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel bölgesinde yara dudaklarının henüz birleşmediği ve epitelizasyonun yer yer bazal hücre tabakasından başladığı görülmüştür. Belirgin granülasyon dokusu derin bölgelerde de izlenmektedir. Yine derin bölgelere dek yara dudaklarının ayırık olduğu saptanmıştır (Resim 4). Daha büyük büyültmelerde yapılan incelemelerde ise epitel üzerinde skar dokusu belirlenmiştir. Granülasyon dokusundaki hücresel yoğunluk ve yara dudaklarına komşu bölgelerde yeni sentezlenen ince kollajen lifler dikkat çekmektedir (Resim 5).

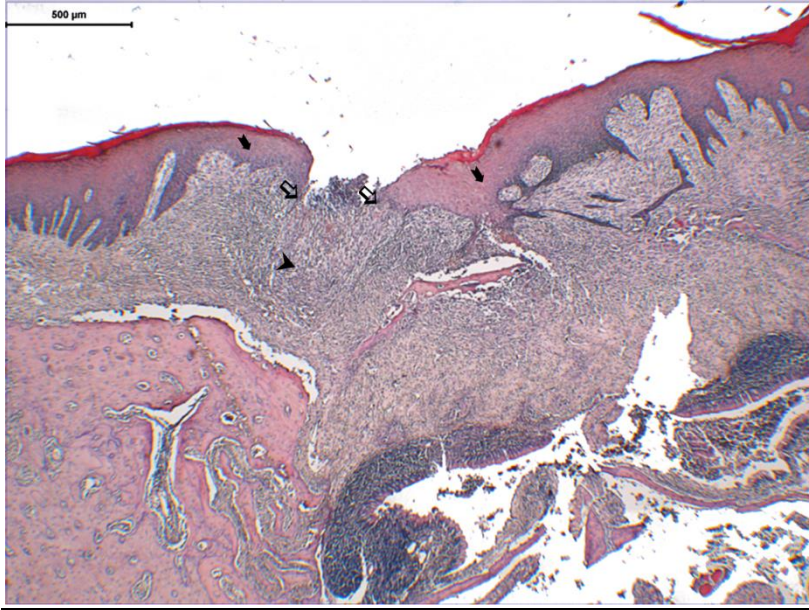


**Resim 7: 7. gün kontrol grubunda yapılan incelemede; epitel (→), yara dudağı (⇨) ve granülasyon dokusu (▸) (H-Ex40) izlenmektedir.**

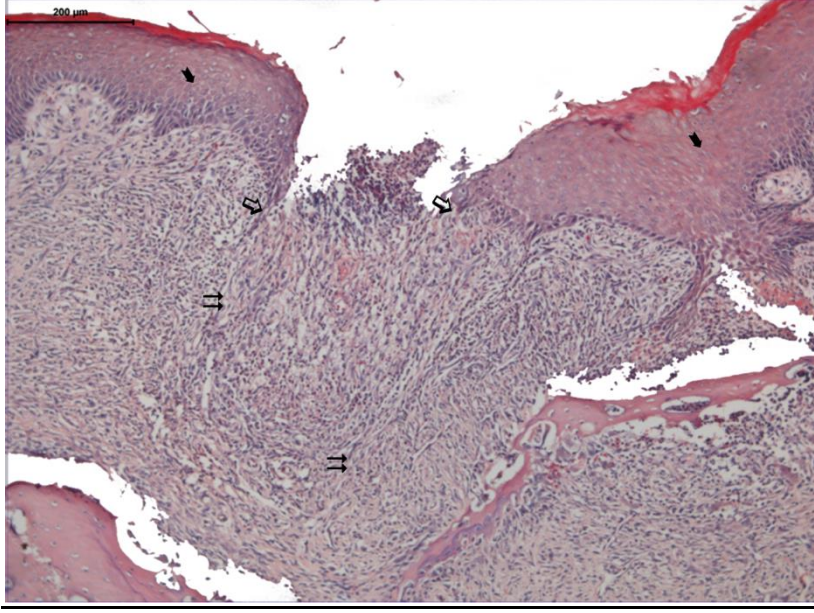


**Resim 8: 7. gün kontrol grubunda yapılan incelemede; epitel (→), skar dokusu (★), kollajen lifler (⇨) ve granülasyon dokusu (▸) (H-E x100) gözlemlenmektedir.**

7. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, kontrol grubuna göre yara dudaklarının birbirlerine daha fazla yaklaştığı, skar dokusunun yok olduğu belirlenmiştir. Derin bölgelerde de yara dudaklarının yer yer birleştiği saptanmıştır. Granülasyon dokusunun kontrol grubuna göre azaldığı ve yerini özellikle derin bölgelerde büyük oranda gevşek bağ dokusuna bıraktığı izlenmiştir (Resim 6). Büyük büyültmeli incelemelerde ise, artan hücresel yoğunluğa koşut kollajen liflerin de kontrol grubuna göre daha belirgin olması, bu bölgedeki hücrelerin aktif fibroblastlar olabileceği kanısını uyandırmıştır (Resim 7).

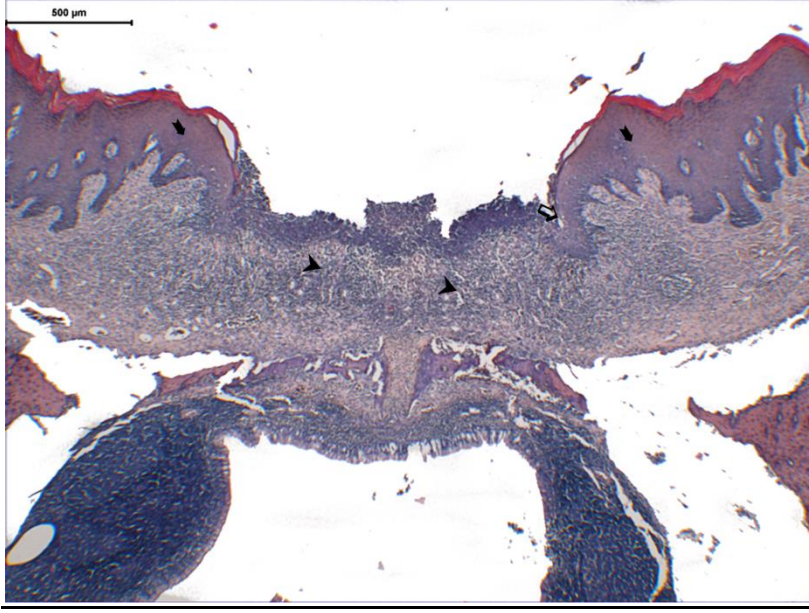


**Resim 9: 7. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (➔), yara dudakları (⇔) ve granülasyon dokusu (➤) (H-E x40) izlenmektedir.**

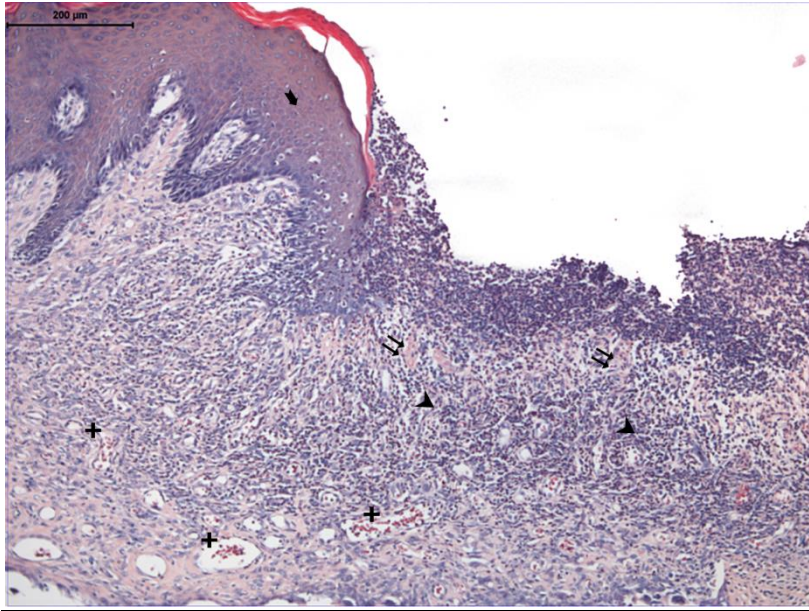


**Resim 10:** 7. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (↔), yara dudakları (⇨) ve kollajen lifler (⇩) (H-E x100) dikkat çekmektedir.

14. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, yara dudaklarının derin bölgelerde birleştiği ve dokunun bütünlük kazandığı görülürken, epitelizasyonun halen sürdüğü görülmüştür. Özellikle epiteli oluşturacak alanda granülasyon dokusu belirgindir (Resim 8). Büyük büyültmeli incelemeler de bu bulguyu desteklemektedir. Epitele yakın bölgelerde demetler halinde kollajen lifler görülmüştür. 14. günde 7. günden farklı olarak damarlardaki artış da dikkat çekmiştir (Resim 9).

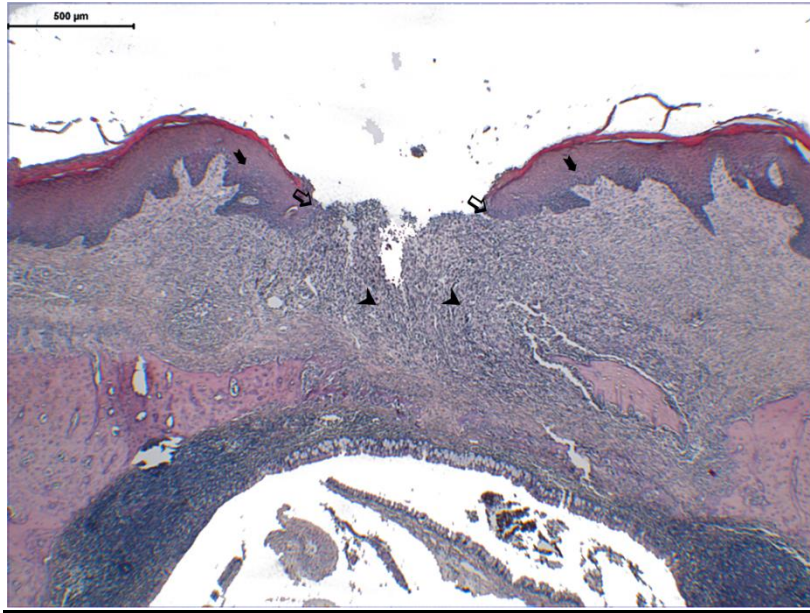


Resim 11: 14. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (→), yara duduğı (⇔) ve granülasyon dokusu (▶) (H-E x40) izlenmektedir.

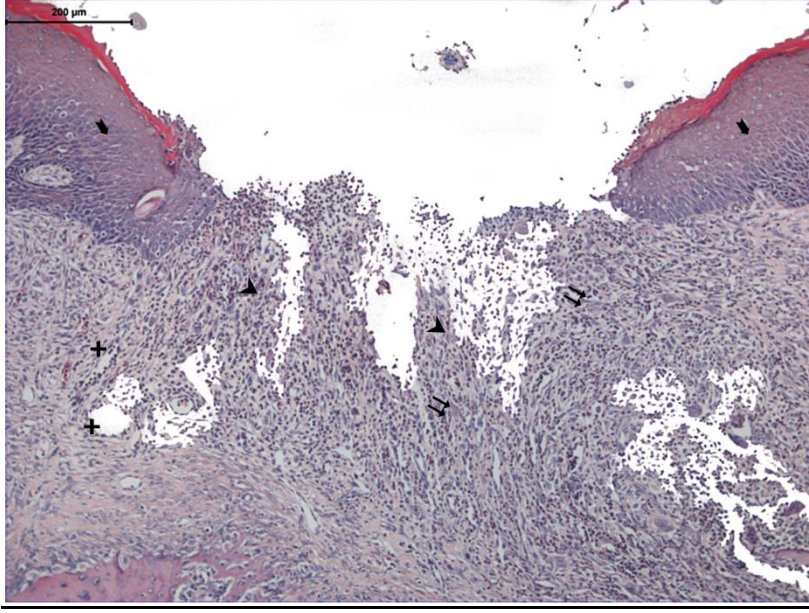


Resim 12: 14. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (→), granülasyon dokusu (▶), kollajen lifler (⇔) ve damarlar (+) (H-E x100) gözlemlenmektedir.

14. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, kontrol grubundan farklı olarak epitel dokunun birbirine daha çok yaklaştığı görülmüştür. Ancak bu grupta da epitelizasyonun tam anlamıyla gerçekleşmediği saptanmıştır (Resim 10). Büyük büyültmeli incelemelerde ise, kontrol grubuyla benzer olarak granülasyon dokusundaki damarlar belirgindir. Yer yer bazı alanlarda kollajen liflerdeki artış dikkat çekmiştir. (Resim 11).



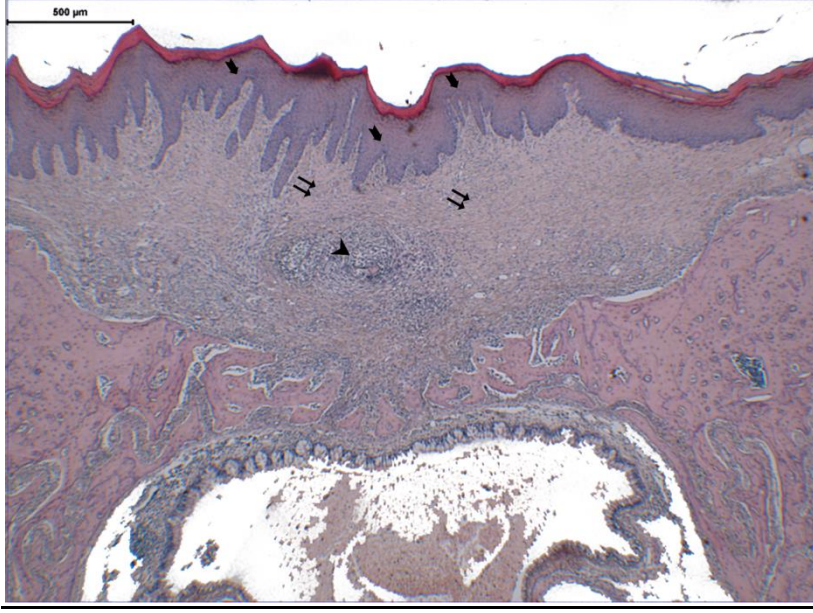
**Resim 13:** 14. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (→), yara dudakları (⇨) ve granülasyon dokusu (➤) (H-E x40) izlenmektedir.



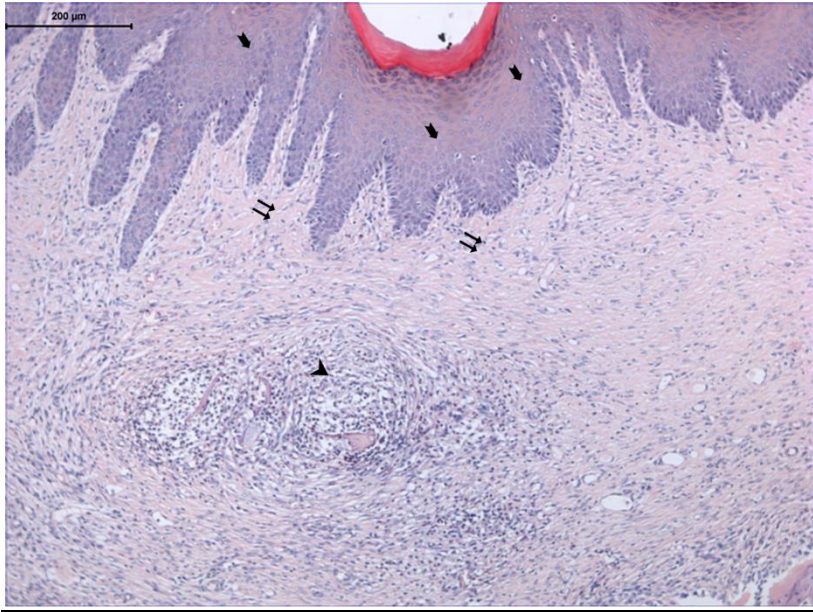
**Resim 14: 14. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (→), yara dudakları (⇨), granülasyon dokusu (➤), kollajen lifler (⇔) ve damarlar (+) (H-E x100) görülmektedir.**

21. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, yara bölgesinde epitelizasyonun tamamlandığı ve epitelin normal yapısını kazandığı görülmüştür. Yine yara bölgesindeki granülasyon dokusunun azaldığı izlenirken, kollajen liflerdeki artış belirgindir (Resim 12). Büyük büyültmeli incelemelerde de epitel tabaka, bazal katmanından itibaren normal yapıda izlenmiştir. Yara bölgesinde hücrelerin azalmasına koşut, hücresel aktivasyonun azaldığı belirlenmekle birlikte, yer yer bazı bölgelerde granülasyon dokusunun sebat ettiği dikkat çekmiştir. Kollajen liflerin ise normal gevşek bağ doku organizasyonunda ince demetler oluşturdukları izlenmiştir (Resim 13).





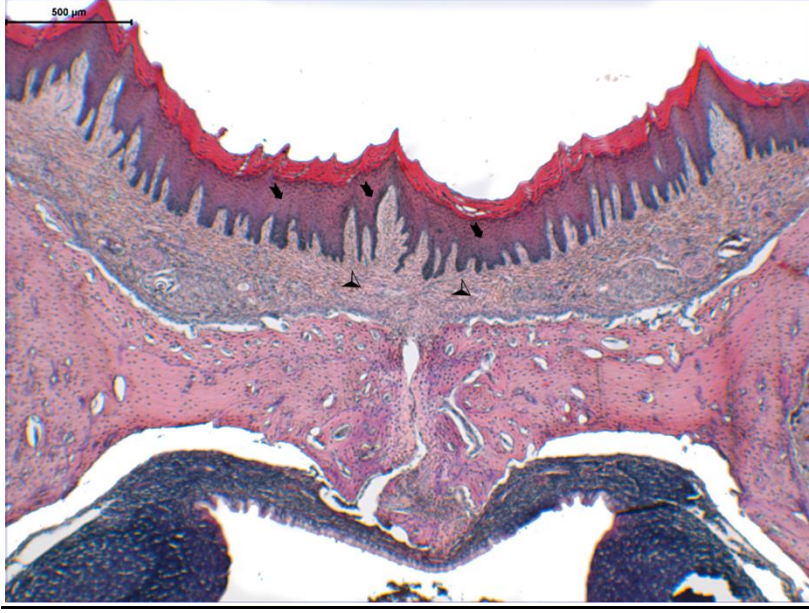
Resim 15: 21. günde kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (➔), granülasyon dokusu (➤) ve kollajen lifler (⇔) (H-E x40) gözlemlenmektedir.



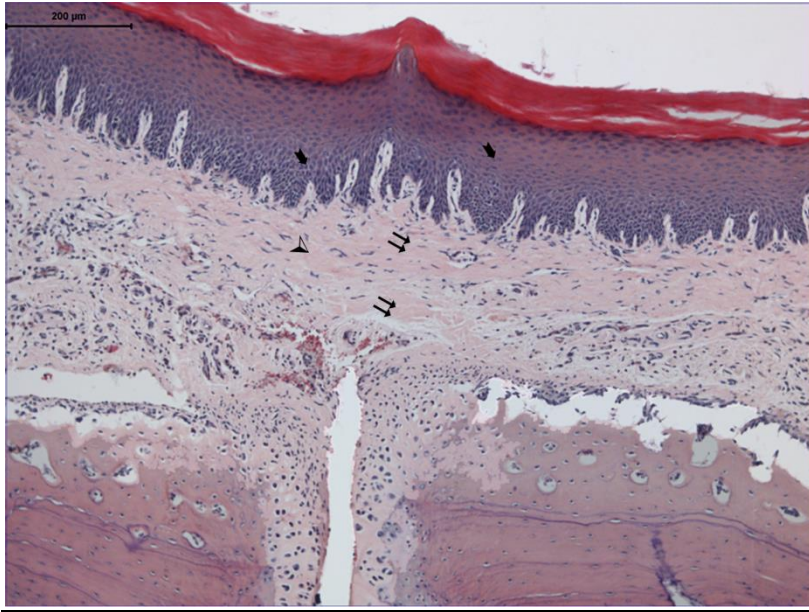
Resim 16: 21. gün kontrol grubunda yapılan incelemelerde, epitel (➔), granülasyon dokusu (➤) ve kollajen lifler (⇔) (H-E x100) görülmektedir.

21. günde ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, kontrol grubuna benzer olarak yara bölgesinde epitelizasyonun tamamlandığı görülmüştür. Yara dudaklarının birleşme yerleri ayırt edilememiştir. Epitel ve bağ dokunun bütünleştiği dikkat çekmiştir (Resim 14). Bu grupta granülasyon dokusunun yerini tamamen olgun gevşek bağ dokuya bıraktığı, kollajen liflerin büyük oranda organize demetler halinde olduğu saptanmıştır. Bu grupta tüm katmanların normal doku görünümünde olduğu belirlenmiştir (Resim 15).

Sonuç olarak 7, 14 ve 21. günlere ait yapılan ışık mikroskobik incelemelerde, hem kontrol hem de ABS gruplarında iyileşmenin bağ dokusundan başladığı belirlenmiştir. Normal doku organizasyonuna dönüşümün ise 21. günde ancak tamamlandığı görülmüştür. ABS uygulamasının etkisi değerlendirildiğinde ise, özellikle 7. günde kontrol grubuna karşı etkin olarak iyileşme sürecini hızlandırdığı belirlenirken, bunu da olasılıkla bağ doku hücrelerinin aktivitesini arttırmak suretiyle, kollajen lif sentezini indükleyerek gerçekleştirmiş olabileceği kanısına varılmıştır.



Resim 17: 21. gün ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (→) ve bağ doku (➤) (H-E x40) izlenmektedir.



Resim 18: 21. gün ABS uygulanan grupta yapılan incelemelerde, epitel (→), bağ doku (➤) ve kollajen lifler (⇔) (H-E x100) dikkat çekmektedir.

#### 4.1.1. Defekt Derinliğinin Değerlendirilmesi

7. ve 14. gün sonunda alınan rat üst çene rneklarine ait histolojik kesitlerin ışık mikroskobunda görüntü analiz programı ile yapılan değerlendirmelerinde defekt derinliği ve defekt genişliği ölçümleri yapılmıştır. 21. günde yara iyileşmesi tamamlandığı için defekt derinliği ve genişliği '0' kabul edilmiş ve istatistiksel analiz için değerlendirmeye dahil edilmemiştir.

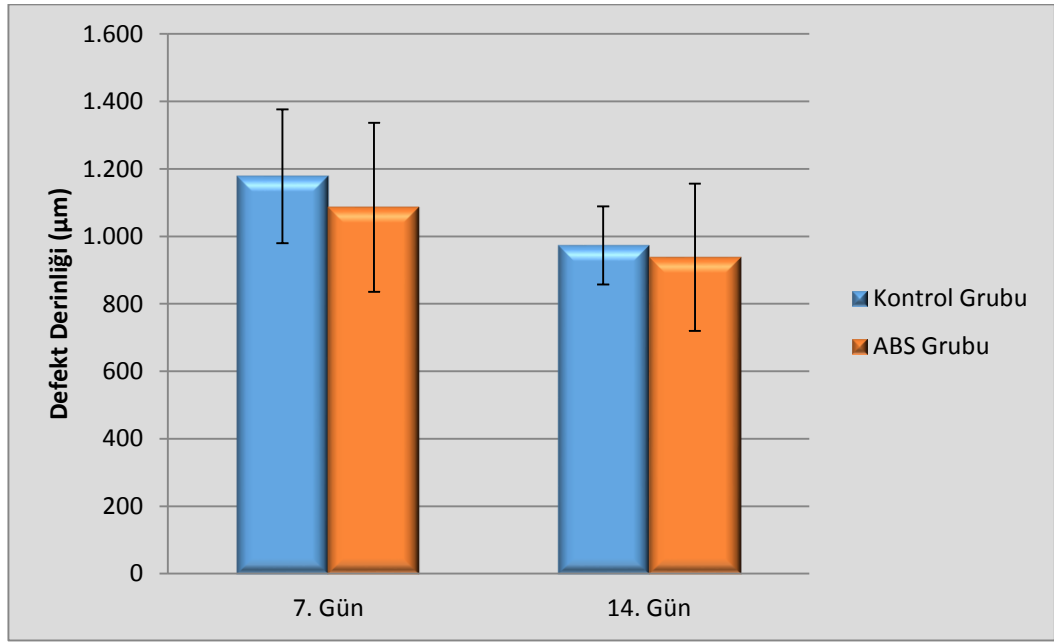
Gruplara ait defekt derinliği değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Defekt derinliği miktarları zamana göre incelendiğinde her iki grupta da 7. günden 14. güne azalma olduğu grlmştir.

Defekt derinliğindeki azalma miktarları değerlendirildiğinde ABS grubunda kontrol grubuna göre daha fazla azalma olduğu izlenmiştir ancak gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı değerdir ( $p>0.05$ ).

Gruplar kendi içinde kıyaslandığında kontrol grubunda günler arasında defekt derinliğinde meydana gelen farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ). ABS grubunda ise 7. günden 14. güne defekt derinliğinde görülen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ) (Grafik 1).

Tablo 2: Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt derinliği ortalama değerleri

Defekt Derinliği		
Günler	Kontrol Grubu ( $\mu\text{m}$ )	ABS Grubu ( $\mu\text{m}$ )
7. gün	1177.70 $\pm$ 198.55	1086.04 $\pm$ 250.81
14. gün	973.25 $\pm$ 115.91	937.58 $\pm$ 218.38
21. gün	0	0



Grafik 1: Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt derinliği

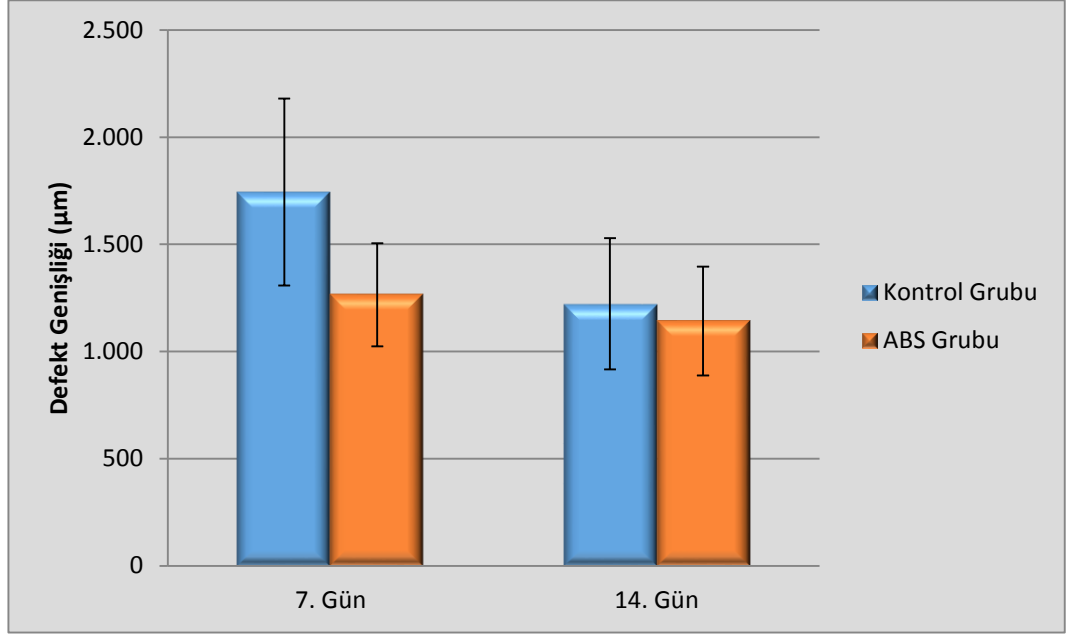
#### 4.1.2. Defekt Genişliğinin Değerlendirilmesi

Gruplara ait defekt genişliği ortalama değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, kontrol grubunda günler arasında defekt genişliği açısından anlamlı bir farklılık söz konusudur ( $p<0.05$ ). ABS grubunda ise 7. ve 14. günlerde defekt genişliği değerleri arasında görülen farkın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ( $p>0.05$ ).

7. gün ortalama defekt genişliği değerleri bakımından yapılan karşılaştırmada gruplar arası farkın ABS grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Buna karşın, ABS grubunda elde edilen 14. gün defekt genişliği değerleri kontrol grubuna göre daha az bulunmasına rağmen bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 3: Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt genişliği ortalama değerleri**

Defekt Genişliği		
Günler	Kontrol Grubu ( $\mu\text{m}$ )	ABS Grubu ( $\mu\text{m}$ )
7. gün	1744.45 $\pm$ 436.27	1264.20 $\pm$ 240.23
14. gün	1222.09 $\pm$ 306.19	1142.36 $\pm$ 254.05
21. gün	0	0



**Grafik 2: Gruplara göre 7. ve 14. günlere ait defekt genişliği**

## **4.2. Biyokimyasal Bulgular**

### 4.2.1. VEGF Protein Düzeyleri

Kontrol ve ABS gruplarına ait VEGF protein düzeyleri Tablo 4' te gösterilmiştir.

Kontrol grubunda 7. ve 14. gün VEGF protein düzeyleri karşılaştırıldığında, VEGF protein düzeyinin 14. günde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Öte yandan, 21. gün VEGF düzeyi 14. güne göre artış gösterirken bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Kontrol grubunda 7. ve 21. güne ait VEGF düzeyleri arasında yapılan kıyaslamada da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

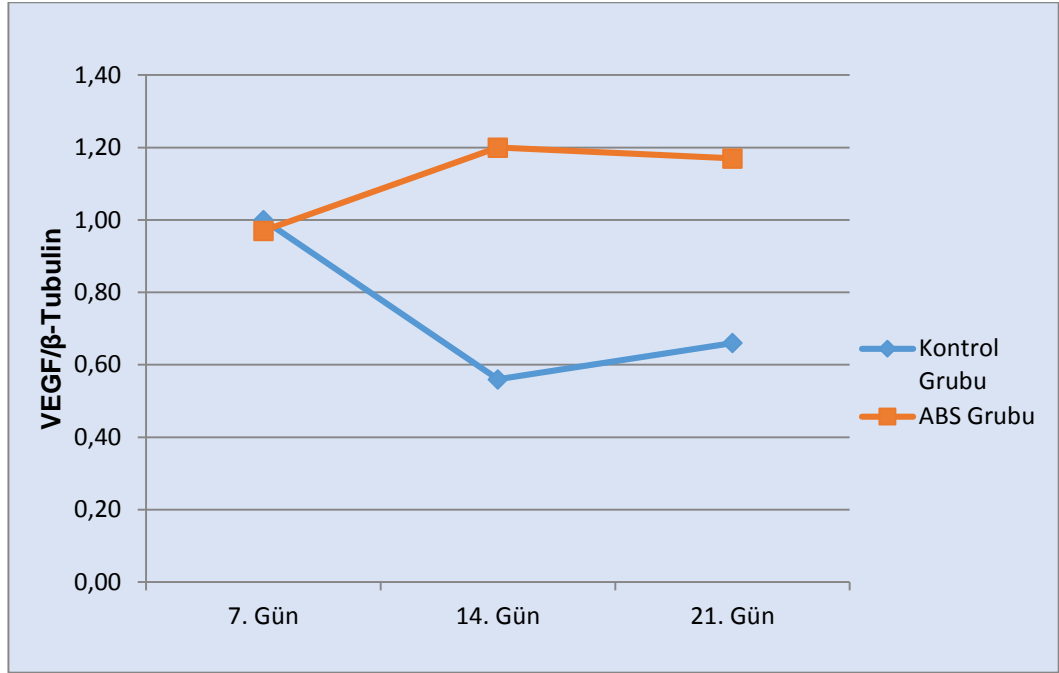
ABS grubunda 7. ve 14. gün VEGF protein düzeyleri karşılaştırıldığında 14. günde artış olduğu görülmüştür, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). VEGF protein düzeyinin 21. günde 14. güne göre azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ). ABS grubunda 7. ve 21. gün VEGF düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ( $p>0.05$ ).

ABS grubunda 7. gün VEGF protein düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Buna karşın; gruplar arasında 14. gün VEGF protein seviyeleri kıyaslandığında, ABS grubuna ait dokularda VEGF protein seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazladır ( $p<0.05$ ). Bununla birlikte, 21. gün VEGF düzeyleri yönünden yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ) (Grafik 3).

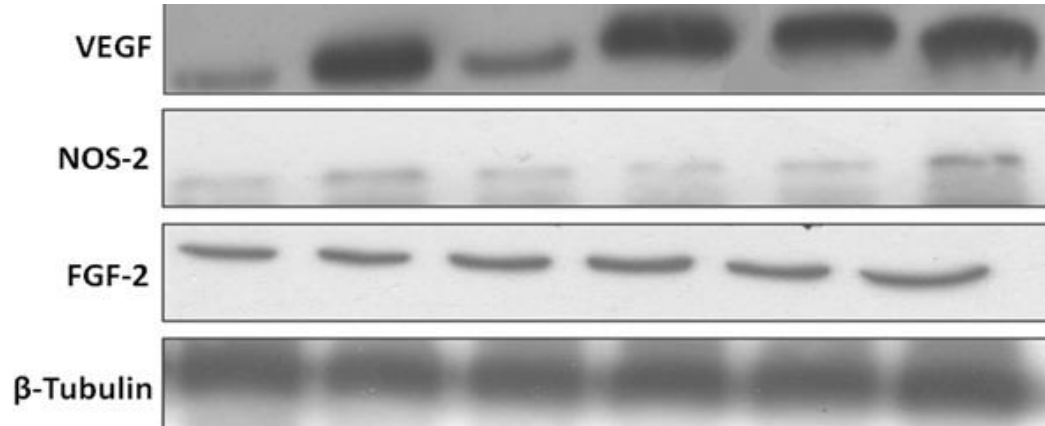
**Tablo 4: Rat palatal mukozalarında 7, 14 ve 21. günlere ait VEGF protein düzeyleri**

VEGF/ $\beta$ -Tubulin		
Günler	Kontrol Grubu	ABS Grubu
7. gün	1.00 $\pm$ 0.17	0.97 $\pm$ 0.09
14. gün	0.56 $\pm$ 0.09	1.20 $\pm$ 0.19
21. gün	0.66 $\pm$ 0.12	1.17 $\pm$ 0.15





**Grafik 3: Gruplara göre 7, 14 ve 21. günlere ait VEGF protein düzeyleri**



**Şekil 8: Western band görüntüleri**

#### 4.2.2. FGF-2 Protein Düzeyleri

Kontrol ve ABS gruplarına ait FGF-2 protein değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

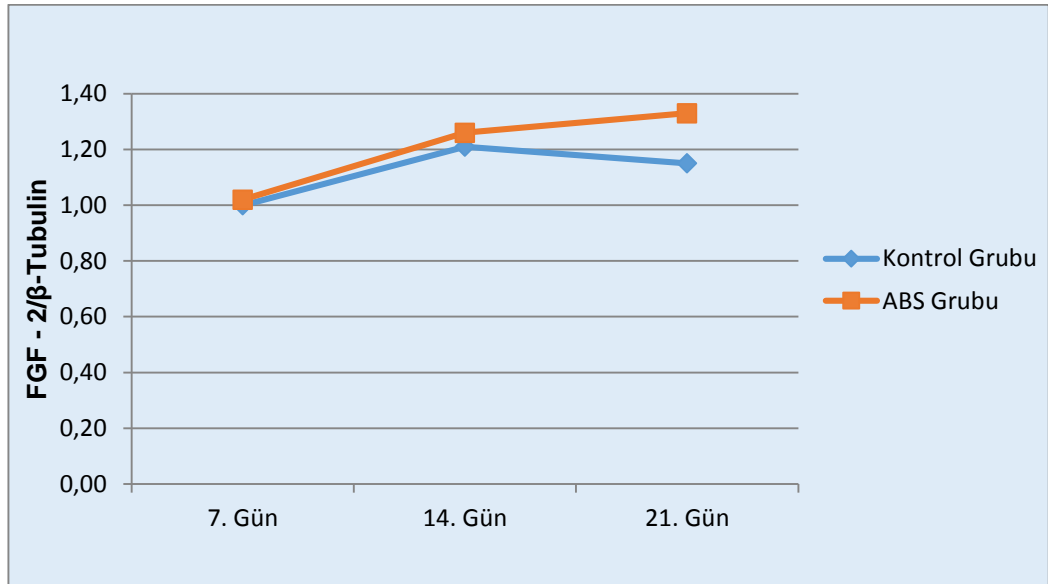
Grafik 4'te, kontrol grubunda 14. gün FGF-2 düzeyinin 7. gün seviyelerine göre yükseldiği fakat 21. günde az da olsa düştüğü görülmektedir. 14. günde FGF-2 düzeyinde görülen artış ve 21. günde görülen FGF-2 düzeyindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ). Kontrol grubunda 7. ve 21. gün FGF-2 protein seviyeleri arasında da istatistiksel olarak farklılık yoktur ( $p>0.05$ ).

ABS grubunda yara iyileşme süreci boyunca FGF-2 protein düzeyinde artış gözlenmektedir. Ancak, 7 ile 14. gün arasında ve 14 ile 21. gün arasında meydana gelen FGF-2 protein ekspresyon düzeyindeki artış istatistiksel olarak önemli değildir ( $p>0.05$ ). Aynı şekilde, 7. ve 21. gün FGF-2 protein seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

Gruplar arası karşılaştırmada ise, 7. günde ABS ve kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlenmiştir ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde, 14. gün ve 21. günde FGF-2 protein ekspresyon seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Tablo 5: Rat palatal mukozalarında 7, 14 ve 21. günlere ait FGF-2 protein düzeyleri

FGF-2/ $\beta$ -Tubulin		
Günler	Kontrol Grubu	ABS Grubu
7. gün	1.00 $\pm$ 0.16	1.02 $\pm$ 0.18
14. gün	1.21 $\pm$ 0.17	1.26 $\pm$ 0.18
21. gün	1.15 $\pm$ 0.17	1.33 $\pm$ 0.16



Grafik 4: Gruplara göre 7, 14 ve 21. günlere ait FGF-2 protein düzeyleri

### 4.2.3. iNOS Protein Düzeyleri

Kontrol ve ABS gruplarına ait iNOS protein düzeyleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

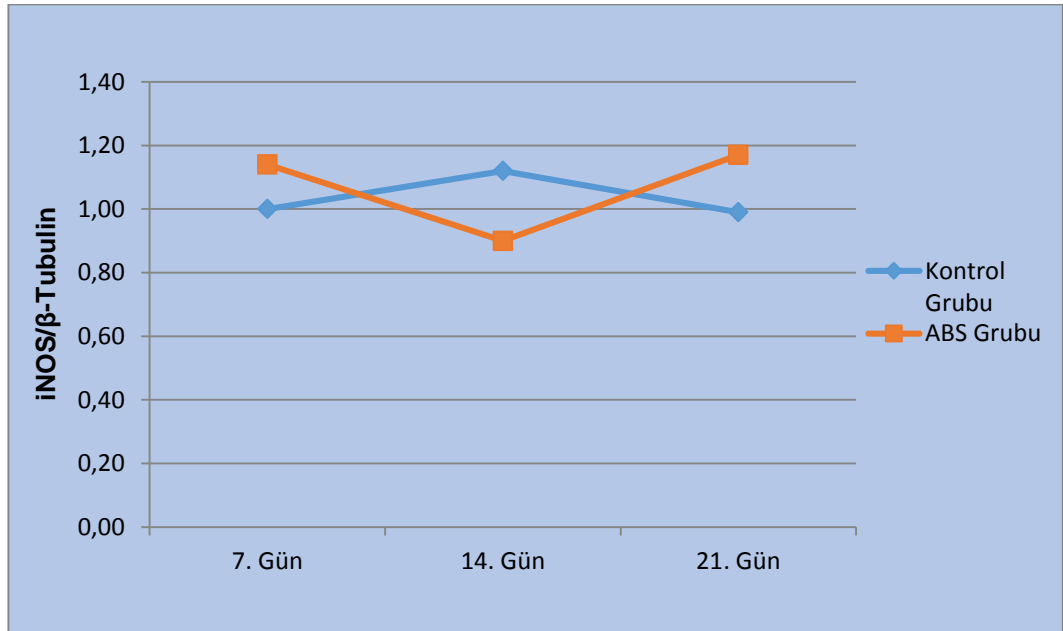
Kontrol grubunda 7. ve 14. gün iNOS protein düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde, 14. ve 21. gün iNOS protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p=0.405$ ).

ABS grubunda 7. günden 14. güne iNOS protein düzeyinde görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ). iNOS protein düzeyinde 14. günden 21. güne görülen artışta da istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Aynı şekilde, 7. ve 21. gün iNOS protein seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Gruplar arası karşılaştırmada, 7., 14. ve 21. günlerde kontrol ve ABS grupları arasında iNOS protein düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmemiştir ( $p>0.05$ ) (Grafik 5).

Tablo 6: Rat palatinal mukozalarında 7, 14 ve 21. günlere ait iNOS protein düzeyleri

iNOS/ $\beta$ -Tubulin		
Günler	Kontrol Grubu	ABS Grubu
7. gün	1.00 $\pm$ 0.18	1.14 $\pm$ 0.18
14. gün	1.12 $\pm$ 0.19	0.90 $\pm$ 0.16
21. gün	0.99 $\pm$ 0.15	1.17 $\pm$ 0.20



Grafik 5: Gruplara göre 7, 14 ve 21. günlere ait iNOS protein düzeyleri

## 5. TARTIŞMA

Yara iyileşmesi farklı moleküler ve hücrel mekanizmaları kapsayan bir süreçtir. Bu süreç dokunun hasarlanması sonucu pıhtı oluşumu, enflamatuar hücrelerin birikimi, granülasyon dokusunun yapımı, anjiogenezis, yara kontraksiyonu ve oluşan destek dokunun yeniden şekillenmesi basamaklarını içerir.<sup>136,137</sup>

Ağız boşluğu, periodontal cerrahi sonrası iyileşmeye bırakılmış yaraların iyileşme sürecini etkileyecek birçok çevresel faktörü bir arada barındırır. Normal iyileşme sürecini bozabilen bu çevresel faktörler; çiğneme sırasında yiyeceklerin meydana getirdiği travma, kompleks ve heterojen ağız florası ile beraber operasyon sonrası mekanik temizliğin zorlaşmasına bağlı olarak artan dental plak seviyesidir.<sup>138</sup>

Bakteri ve yara iyileşmesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren önceki çalışmalarda; bakterilerin normal yara iyileşme süreci boyunca inflammatuar yanıtın başlamasında, granülasyon dokusunun yapımında<sup>139,140</sup> ve doku tamirinin gerçekleşmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir.<sup>141</sup> Öte yandan, yara yüzeyindeki bakteri türü ve bakteri miktarının artışı yara iyileşmesinin gecikmesine neden olmaktadır.<sup>142,143</sup>

Bakterilerin yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkisi yıkıcı enzim ve toksinlerin üretimi yoluyla gerçekleşir.<sup>144</sup> Bakterilerden proteinaz salınımı; hücrelerin proliferasyonu olmasını sağlayan büyüme faktörlerinin yıkımına yol açar<sup>145</sup>, sitotoksik enzim ve serbest radikallerin üretimini arttırarak oluşmakta olan epitelin hasarına neden olur. Bakteri ürünleri epitelyal hücre migrasyonunu engelleyerek epitelizasyonu etkiler. Yarada

bakteri kolonizasyonunun inflamatuvar evrenin uzamasına neden olduğu görülmüştür.<sup>146</sup>

Periodontal plastik cerrahi, dişetin ve alveoler mukozanın anatomik, gelişimsel ya da travmatik deformitelerini düzeltmek amacıyla uygulanan cerrahi işlemlerdir.<sup>147</sup> Bu cerrahi işlemleri takiben oluşturulan yaraların suture materyali ile kapatılamayacak kadar geniş olduğu durumlarda iyileşme sekonder iyileşme ile olmaktadır. Doku kaybının fazla olduğu yaralarda onarım, yara kenarlarının karşı karşıya getirildiği yaralardan daha yavaştır. Bilhassa, bu tarz yaraların bakteriyel kontaminasyon riski daha fazladır.<sup>34</sup> Bu açıdan, periodontal yara iyileşmesinde klinik sonuçları geliştirmek, hasta konforunu artırmak ve iyileşme sürecini kısaltıp sağlıklı bir doku oluşmasını sağlamak için bazı terapötik ajanlardan faydalanılmaktadır.

Periodontal plastik cerrahi sonrası meydana gelen yaraların antimikrobiyal kontrolünde en yaygın kullanılan antiplak ajan olan klorheksidin günümüzde 'altın standart' olmaya devam etmektedir.<sup>148</sup> Buna karşın, oldukça aktif bir antiseptik olan klorheksidin'in bazı yan etkileri olduğu da bilinmektedir. Bassetti ve Kallenberger'in<sup>149</sup> ratlarda yaptığı bir çalışmada, ağız içi mukozal yaraların klorheksidin solüsyonu ile yıkanmasının ardından yara iyileşmesinde gecikme olduğu bildirilmiştir. Klorheksidin'in birçok hücre fonksiyonunu engellediği<sup>150-153</sup> ve kollajen yapımında azalmaya sebep olduğu rapor edilen yan etkileri arasındadır.<sup>154,155</sup> Son yıllarda, cerrahi uygulamalardan sonra meydana gelen yaraların antimikrobiyal kontrolü amacıyla kullanılan terapötik ajanlara alternatif olabilecek ya da bunlarla birlikte uygulanabilecek bazı bitkisel ürünlerin kullanımı gündeme gelmiştir.<sup>4,156,157</sup> Yapılan çalışmalarda

cerrahi sonrası bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi ile beraber hızlı bir yara iyileşme sürecini elde edebilmek için farklı yara tiplerinde farklı kimyasal ajanların etkileri denenmiştir. Çok sayıda hücre tipi, sitokin ve mediatörün rol aldığı yara iyileşmesi ile ilgili yapılan araştırmalar sayesinde, yara iyileşmesinde rol oynayan faktörleri (inflamatuvar hücreler, trombositler, sitokin ve mediatörler) etkileyerek iyileşmeye olumlu katkılar sağlayacak yeni tedavi hedefleri için ipuçları elde edilmektedir.<sup>158</sup>

Tarih boyunca bitkisel ekstraların hemostatik amaçla ve yara bakımında geleneksel olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ankaferd Blood Stopper (ABS), Türk hekimlik tarihinde hemostatik ajan olarak kullanılan ilk tescilli tıbbi bitki ekstratıdır.<sup>10</sup> ABS; thymus vulgaris (Kekik), glycyrrhiza glabra (Meyan), vitis vinifera (Asma), alpinia officinarum (Havlıcan) ve urtica dioica (Isırgan) bitkilerinin kök ve yapraklarından elde edilmiş bir karışımdır. Bu karışım; diş operasyonları, travmatik kesiler, spontan ya da cerrahi girişimler sonrası oluşan kanamaların kontrolünde kullanılmaktadır.<sup>159</sup>

ABS ile indüklenen protein ağı oluşumu, bilinen fizyolojik hemostatik yollardan bağımsız gerçekleşmektedir. Hem normal hemostatik parametrelere sahip bireylerde hem de primer veya sekonder hemostaz bozukluğu olan hastalarda etkili bir ajan olan ABS, tek bir pıhtılaşma faktörünü değil tüm fizyolojik hemostatik süreci etkilemektedir.<sup>10</sup>

Göker ve arkadaşları yaptığı çalışmada<sup>10</sup> ABS'nin hemostatik parametreler üzerinde *in vitro* etkilerini incelemiştir. ABS'nin plazma veya seruma eklendiğinde çok hızlı bir protein ağı ve eritrosit agregasyonu oluşumunu başlattığı ve pıhtılaşma faktörleri II, V, VII, VIII, IX, X, XI ve XIII



düzeylerini etkilemediği görülmüştür. Bulgular, ABS'nin total kan protein miktarını azalttığını ve eritrosit agregasyonu için odak oluşturan enkapsüle protein ağı oluşumunu uyardığını göstermiştir.

ABS'nin hematoloji, gastroenteroloji, kulak burun boğaz ve oral cerrahi dallarındaki kullanımı sonrasında elde edilen çeşitli olgu raporlarında, ABS'nin etkin bir hemostatik ajan olduğu vurgulanmıştır.<sup>12,160-162</sup> Turgut ve arkadaşları<sup>160</sup> hemorajik diyatezli hastalarda topikal ABS uygulamasının etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, ABS'nin bu hasta gruplarında kanama durdurucu ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Kurt ve arkadaşlarının<sup>161</sup> gastrointestinal kanaması bulunan 10 hastaya topikal ABS uygulaması yaptıkları çalışmada, ABS'nin tüm hastalarda kanamayı durdurduğunu ve hiçbir hastada komplikasyon gelişmediğini belirtmişlerdir. İynen ve arkadaşları<sup>162</sup> yaptıkları çalışmada 90 hastaya adenoidektomi işlemi sırasında ABS uygulamışlardır. ABS uygulanan hastalarda kanama zamanının ve kan kaybı miktarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır. Ayrıca ABS uygulanan grupta operasyon süresinin kıaldığını belirtmişlerdir. Erçetin ve arkadaşları<sup>12</sup> yaptıkları bir çalışmada, çeşitli dental uygulamalar sonrasında topikal olarak uyguladıkları ABS'nin hemostatik etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmişlerdir. 25 hastaya, diş çekimleri ve periodontal tedaviler sırasında topikal ABS uygulaması yapılmıştır. Bu retrospektif değerlendirmenin verilerine göre; tüm bu uygulamalar sonrasında, hiçbir hastada yara enfeksiyonu görülmemiş ve yara iyileşme süreci normal izlenmiştir. Klinik gözlemlerine dayanarak, ABS'nin etkin bir hemostatik ajan olmasının yanında, periodontal cerrahiler ve diş çekimlerinden sonra yara iyileşmesinin hızlanmasında ve enfeksiyonların önlenmesinde faydalı olabileceğini rapor etmişlerdir.

ABS'nin toksisitesini test etmek amacıyla yapılan bir hayvan çalışmasında oral yoldan ABS verilen tavşanlar üzerinde 7 günlük yapılan gözlem sonucunda herhangi bir sistemik toksisite gözlenmediği bildirilmiştir.<sup>163</sup>

ABS'nin içeriğindeki bitkilerin damar endoteli, kan hücreleri, anjiogenezis, hücrel proliferasyon, vasküler dinamikler ve hücrel mediatörler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu etkileri göz önüne alınarak, ABS'nin olası diğer etkilerini araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaya devam etmektedir.<sup>164,165</sup>

Arslan ve arkadaşları<sup>166</sup> 80 yaşındaki kadın hastada travmaya bağlı gelişen ve primer kapama ile onarım şansı olmayan yumuşak doku laserasyonu üzerine ABS uygulamışlardır. 24 saat sonra yapılan kontrolde yara ağzının kapanmaya başladığı tespit edilmiş, ABS'nin yüzeysel yara iyileşmesinde etkin olduğu kanısına varılmıştır.

ABS'nin antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, antibiyotiğe dirençli hastane enfeksiyonlarının etkenleri olan ve aralarında methicilin'e dirençli staphylococcus aureus (MRSA) ile E.coli'nin de bulunduğu 102 mikroorganizma üzerinde çalışılmış ve ABS'nin birden çok ilaca direnci olan farklı bakteri gruplarına karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu rapor edilmiştir.<sup>11</sup> Akkoç ve arkadaşları<sup>167</sup> ABS'nin *in vitro* antibakteriyel aktivitesini test ettikleri çalışmada, ABS'nin aralarında insan patojeni ve gıda bozulma etmeni bakterilerin de bulunduğu gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Araştırmacılar, yara iyileşme sürecinde ABS'nin hemostatik

etkisine ek olarak antimikrobiyal özelliğinin de yararlı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Aktop ve arkadaşları<sup>168</sup> varfarin verilen deney hayvanlarında iki yeni nesil farklı lokal hemostatik ajanın kısa dönemde yumuşak doku iyileşmesi üzerine olan etkilerini karşılaştırmışlardır. 24 adet ratın sistemik varfarin verilen 12 tanesini deney grubu, kalan 12 tanesini de kontrol grubu olarak 2 alt gruba ayırdıkları çalışmalarında, ratların sırt derisine birbirlerinden 2 cm aralıklarla 2 cm uzunluğunda 3 adet bistüri insizyonu yapılmıştır. Yaralardan birine Celox®, diğerine ABS uygulanırken diğer yaraya hiçbir hemostatik ajan uygulanmamıştır. Sonuç olarak her iki ajanın da kanama kontrolünde etkili olduğunu, Celox®'un kaliteli bir iyileşme yaratırken ABS'nin hızlı bir iyileşmeye sebep olduğunu tespit edilmiştir.

Akalın ve arkadaşları<sup>169</sup> ratların sırtlarında tam kalınlık deri defekti oluşturdukları çalışmalarında, ABS'nin sekonder yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini histolojik ve fotoğrafik olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, yara yüzeyine ABS uygulanan deney grubunda fibroblast proliferasyon derecesi, damarlanma derecesi, yara kontraksiyon oranı ve tip I/tip III kollajen oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Benzer bir deneysel hayvan çalışmasında, ratların sırt bölgelerinde Er:YAG ile kısmi kat yaralar oluşturulmuş ve yara yüzeyine topikal olarak uygulanan ABS'nin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmadan çıkan sonuçlara göre, kollajen yoğunluğu ve fibrozis açısından kontrol grubuna göre üstünlük sağlayan ABS'nin yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.<sup>170</sup>

İşler ve arkadaşlarının<sup>171</sup> ratların tibialarında kemik defekti oluşturdukları çalışmalarında ABS'nin erken kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Dokuların 7. gün histopatolojik değerlendirmesinde ABS uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha az enflamasyon ve nekroz görüldüğü, erken kemik iyileşmesi sürecinde yeni kemik oluşumunun daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Arpacı'nın doktora çalışmasında <sup>172</sup> ratlarda diş çekimi sonrasında uygulanan ABS'nin doku iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Histolojik olarak yapılan değerlendirmelerin neticesinde ABS uygulanan çekim soketlerinde yeni kemik oluşumunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna göre, ABS'nin doku iyileşmesini olumlu yönde hızlandıran bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır.

ABS'nin farklı dokulardaki sayısız olumlu etkisinden bahseden birçok çalışma ve olgu raporundan elde edilen bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, ABS'nin ağız içi mukozal dokularda yara iyileşmesi üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Literatürde, ABS'nin ağız içi mukozal yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamız, ABS'nin deneysel hayvan modelinde sekonder iyileşmeye bırakılan eksizyonel bir yaranın iyileşmesi üzerine etkilerine histolojik ve biyokimyasal analizler ile açıklık getirmek üzere planlanmış ilk çalışma olma niteliğindedir.

Araştırmamızda, çalışma modeli seçiminde deneysel hayvan çalışmalarının uzun yıllardır yara iyileşmesi ile ilgili araştırmalarda en çok tercih edilen ve çok iyi bilinen bir model olması dikkate alınmıştır.<sup>38,173</sup> Yara

iyileşmesinin ağız içi dokularda değerlendirildiği deneysel hayvan çalışmaları yöntem açısından irdelendiğinde, eksizyonel yara modelinin sıklıkla palatinal mukozada oluşturulduğu görülmüştür. Kozlovsky ve arkadaşları<sup>138</sup> yaptıkları deneysel çalışmada, ratların palatinal mukozasında 5 mm çapında yumuşak doku defekti oluşturarak çeşitli antimikrobiyal ajanların yara iyileşmesi üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Yamashita ve arkadaşları<sup>174</sup> yaptıkları çalışmada, azot içerikli bifosfonat olan zoledronate'ın çene kemiği ve mukozanın yara iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere deneysel yara modeli için rat palatinalini kullanmıştır. Benzer şekilde, Jansen ve arkadaşlarının<sup>175</sup> çalışmasında kollajen yapı iskelesinin yara iyileşmesi sırasında meydana getirdiği doku reaksiyonunu değerlendirmek üzere rat palatinali tercih edilmiştir.

Mevcut çalışmamızda da sekonder iyileşmeye bırakılan eksizyonel yara modeli oluşturmak için rat palatinal mukozası kullanılmıştır. Araştırmamız esnasında, ABS'nin ağız içi mukozal dokuda yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla ratların ağız içi mukozal iyileşme hızı ve literatürdeki benzer çalışmalar<sup>138,156,176</sup> göz önüne alınarak doku örnekleri 7, 14 ve 21. günlerde alınmıştır. Çalışma öncesinde, histolojik ve biyokimyasal incelemelerin yapılabileceği en uygun defekt genişliğini belirlemek amacıyla ön çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak, çalışmada eksizyonel yara modeli için sirküler 4 mm çapında defektler oluşturulmuştur.

Yara iyileşme süreci farklı birçok hücre tipi, büyüme faktörü ve ekstraselüler matriksin (ESM) birbirleriyle etkileşime girerek ilerlediği karmaşık olaylar zinciridir.<sup>177</sup> Çalışmamızda, bu sürecin gelişimi ile birlikte dokuda görülen değişimlerin gözlemlenmesi amacıyla defekt bölgeleri

histolojik olarak incelenmiştir. Ayrıca, defektlerin iyileşme sürecini etkileyen faktörlerin de ortaya konması amacıyla biyokimyasal olarak defekte ait VEGF, FGF-2 ve iNOS protein düzeyi değerlendirilmiştir. Protein miktarı; az miktarda reaktif gerektiren, kolay, hızlı ve nispeten ekonomik olan western blot yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Western blot yönteminin en büyük üstünlüğü çok sayıda protein içinde sadece hedeflenen proteinleri özgün ve duyarlı bir şekilde saptamaya olanak vermesidir.<sup>178</sup>

Cornelissen ve arkadaşları<sup>179</sup> çalışmalarında ratların normal ve yara oluşturulmuş palatinal mukoperiosteumunda  $\alpha$ -düz kas aktin, elastin, tip I ve tip III kollajen dağılımını değerlendirmişlerdir. Yaptıkları histolojik incelemede yaralanmadan sonraki 4. günde zayıf olan tip I kollajen boyamasının 8. günde artmaya başladığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da cerrahi işlem sonrası 7. günde alınan doku örneklerinde gerçekleştirilen histolojik değerlendirmede gruplar arası kollajen yoğunluğu kıyaslaması yapılmış ve ABS grubuna ait defektlerde kollajen liflerin kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu görülmüştür.

Cornelissen ve arkadaşlarının<sup>180</sup> rat palatinal mukozasında defekt oluşturdukları bir diğer çalışmada, palatinal granülasyon dokusunda bulunan fibroblastların, yara bölgesi dışında yer alan normal fibroblastlardan daha fazla kollajen ürettiği saptanmıştır. Bu doğrultuda, 7. günde ABS grubundan alınan doku örneklerinde kollajen liflerin mevcut olduğu alanlardaki hücrelerin kollajen liflerin sentezinden sorumlu aktif fibroblastlar olabileceği düşünülebilir. Kollajen liflerin 7. günde ABS grubunda kontrol grubuna göre daha belirgin olması ABS'nin erken dönemde fibroblastların sentez yeteneği üzerinde etkili olmasından kaynaklanmış olabilir.

Doku hasarı sonrası meydana gelen kanama ve pıhtı oluşumu aynı zamanda anjiogenezisin de başlamasına neden olur. Pıhtı oluşumunda rol oynayan trombin, VEGF'ye ait reseptörleri ve endotelial hücreleri uyararak anjiogenezisin ilk basamaklarını başlatır.<sup>181,182</sup> ABS grubunda 14. günde alınan doku örneklerine ait defektlerde, granülasyon dokusundaki kan damarlarının kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu saptanmıştır. Bu durum, ABS'nin lokal hemostatik etkisi ile gerçekleşen hızlı pıhtı oluşumunun bir sonucu olarak düşünülebilir.

Ünlü'nün<sup>183</sup> ABS'nin çeşitli konsantrasyonlarının gingival fibroblastlar üzerindeki etkilerini incelediği doktora çalışmasında, ABS'nin gingival fibroblastlar üzerinde herhangi bir toksik etki yaratmadığı aksine hücre canlılığında anlamlı bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ABS ile etkileşen gingival fibroblastların daha fazla tip I kollajen eksprese ettiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızda, 21. günde ABS grubunda granülasyon dokusunun yerini tamamen gevşek bağ dokusu almıştır. Kollajen liflerin büyük oranda organize demetler halinde olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda ise yer yer granülasyon dokusunun varlığı söz konusudur. Ayrıca, kollajen lifler de ince demetler halinde gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar, ABS'nin gingival fibroblastlar üzerinde olumlu etkileri olduğunu vurgulayan Ünlü'nün doktora çalışması<sup>183</sup> ile uyumluluk göstermektedir. Nitekim, bağ dokusunun temel bileşenleri arasında yer alan kollajen lifler gingival fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir.

Proliferatif evre boyunca gerçekleşen önemli olaylardan biri reepitelizasyondur. Reepitelizasyon, trombositler ve makrofajlar tarafından sentezlenen ve salınan büyüme faktörlerinin (EGF, TGF- $\beta$  ve FGF) uyarısı sonucu gerçekleşen bir süreçtir.<sup>184</sup> Yara kenarlarından köken alan epitelyal hücrelerin yaranın merkezine doğru bazal membran üzerinde migrasyona uğraması ile başlayan reepitelizasyon süreci yara iyileşmesinin ana unsurlarından biridir.<sup>185</sup>

Shim ve arkadaşları<sup>157</sup> birçok farmakolojik etkiye sahip aucubin isimli bir bitki ekstresinin ağız içi yara iyileşmesindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, %0.1'lik aucubin çözeltisinin oral mukozal yara iyileşmesinde antienflamatuar etkili olduğunu, reepitelizasyon ve kollajen matriks yapımını teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Aloe vera jel ekstresi olan acemannan'ın ağız içi yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan deneysel bir çalışmada, acemannan uygulanan ratlarda serum uygulaması yapılanlara göre epitelizasyonun artmış olduğu görülmüştür.<sup>186</sup>

Yara iyileşme sürecini değerlendirmede reepitelizasyon düzeyini ölçüt alan bu çalışmalara benzer olarak çalışmamızda, histolojik değerlendirmenin yapıldığı grupların defekt genişliği ölçülerek reepitelizasyon miktarları karşılaştırılmıştır. ABS uygulaması yapılan gruba ait histolojik kesitlerin mikroskopik değerlendirmesi, 7. günde yaranın reepitelizasyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha fazla olduğunu ortaya koymuştur ( $p < 0.05$ ). Epitelizasyon ile ilgili ABS grubu lehinde elde edilen bu sonuç, ABS'nin defekt genişliğindeki azalmayı hızlandırarak yara iyileşmesine katkı sağladığını düşündürmüştür. Ayrıca, çalışmamızda defekt derinliği açısından da gruplar arasında karşılaştırma



yapılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı izlenmiştir (p>0.05).

Proliferatif evrenin reepitelizasyon dışında önemli bir diğer aşaması anjiogenezdir. VEGF, anjiogenez sürecinde rol oynayan en önemli mediatördür.<sup>86</sup> VEGF, özellikle endotel hücrelerine özgül, yedi üyeden oluşan büyüme faktörü ailesidir. VEGF üyeleri değişik fiziksel ve biyolojik özellikleri olan VEGFR-1, -2 ve -3 olarak bilinen üç reseptöre sahiptir.<sup>83</sup> VEGF üyeleri ve reseptörleri ailesi, embriyonik vasküler gelişim ve anjiogenez gibi fizyolojik olaylarda rol oynadıkları gibi kanser ve neovasküler hastalıklar gibi patolojik olaylarda da karşımıza çıkmaktadırlar.<sup>91</sup>

Favia ve arkadaşları<sup>187</sup> sodyum hyalüronat'ın (Aminogam®) anjiogenez sürecindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, Aminogam'ın® fibroblastlardan VEGF salınımını ve anjiogenezini teşvik ederek yara iyileşmesini hızlandığını saptamışlardır. Nakanishi ve arkadaşlarının<sup>188</sup> oral keratinositleri Alloderm® üzerinde kültüre ederek VEGF protein ekspresyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında, VEGF'nin greftleme işleminden sonra başlayan vaskülarizasyonun erken evrelerine katkı sağladığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmalara benzer olarak çalışmamızda, yara iyileşmesinin farklı evrelerinde rol oynayan güçlü bir anjiogenez faktörü olan VEGF'nin yara ortamındaki miktarı incelenmiştir.

Brown ve arkadaşları<sup>189</sup> VEGF'nin normal yara iyileşmesinde salınımını incelemek üzere yaptıkları çalışmalarında, VEGF ekspresyonunun 3. günde en yüksek seviyeye ulaştığını ve 3 haftadan sonra normal düzeylere döndüğünü göstermişlerdir. Ünlü'ye<sup>183</sup> ait *in vitro* araştırmada, ABS'nin 7. günde VEGF ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir. Benzer olarak, çalışmamızda ABS uygulanan dokularda 7. günde VEGF protein düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Öte yandan; 14. gün VEGF protein seviyesi deney grubunda artış, kontrol grubunda düşüş göstermiştir ve her iki grup arasında 14. gün VEGF seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). ABS grubunda VEGF protein düzeyinin en yüksek değeri 14. günde izlenmiştir. Yara iyileşme sürecindeki VEGF protein düzeylerinin günlere göre değişiklik göstermesi çalışmalardaki deneysel farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Yan ve arkadaşları<sup>85</sup>, yara bölgesindeki VEGF miktarının daha iyi bir iyileşme oranının elde edilmesi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre ABS'nin sekonder iyileşmeye bırakılan dokularda VEGF protein düzeyini arttırarak yara iyileşmesine fayda sağladığı kanaatindeyiz.

FGF, birçok fizyolojik ve patolojik olayı kontrol eden geniş bir büyüme faktörü ailesidir.<sup>66</sup> Bu ailenin bir üyesi olan bazik FGF (bFGF) olarak da bilinen FGF-2, yara iyileşme sürecinde yer alan inflamatuvar hücreler, vasküler endotelyal hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. FGF-2, endotelyal hücrelerin proliferasyonunu, diferansiyasyonunu ve VEGF ekspresyonunu uyararak anjiogenezisi teşvik etmektedir.<sup>190</sup>

Granülasyon dokusunun yapımı ve reepitelizasyonu hızlandırarak yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır.<sup>33</sup>

Saygun ve arkadaşları<sup>191</sup> lazer uygulamasının *in vitro* koşullarda insan gingival bağ dokusundan elde ettikleri fibroblastik hücrelere ve bu hücrelerden salınan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), IGF-1 reseptörü ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) miktarına etkilerini araştırmışlardır. İlk grupta hücreler tek doz lazer ışımaya maruz kalırken, ikinci grupta 24 saat aralıklar ile iki kez ışımaya maruz kalmıştır. Kontrol grubuna ise lazer uygulaması yapılmamıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre tek doz lazer uygulamasında bFGF ve IGF-1 miktarında, çift doz lazer uygulamasında ise her üç parametrede anlamlı artış olduğu görülmüştür. Buna göre, lazerin büyüme faktörlerinin üretimini artırarak periodontal yara iyileşmesi ve rejenerasyonda önemli rol oynayacağı düşünülmüştür.

Lee ve arkadaşları<sup>192</sup> yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında, bir anestezi ajanı olan sevofluran'ın yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Sırtlarında eksizyonel yaralar oluşturulan ratlar daha sonra 1, 4 ve 8 saat boyunca sevofluran'a ve oksijene maruz bırakılmıştır. Yapılan western blot analizinin sonuçlarına göre, anestezi ajana maruz kalma süresi arttıkça TGF- $\beta$ 1 ve bFGF ekspresyon seviyelerinde ve kollajen sentezinde azalma görülmüştür. Bu bulgulara göre, cerrahinin süresi uzadıkça anestezi ajana bağlı olarak yara iyileşme sürecinin olumsuz yönde etkileneceği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da mukozal yara iyileşme sürecinin karmaşık işleyişinde rol alması sebebiyle yara ortamındaki miktarı değerlendirilen bir diğer mediatör FGF-2'dir. ABS grubundan alınan doku örneklerinde FGF-2 protein düzeyinde 7. günden 21. güne değin artış izlenirken, kontrol grubunda FGF-2 protein düzeyinin 21. günde azaldığı görülmüştür. Ancak; 7, 14 ve 21. günlerde FGF-2 protein düzeyleri açısından yapılan karşılaştırmada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

NO; birçok hücrel fonksiyonda rol oynayan, oldukça diffüz, hücreler arası sinyal molekülüdür.<sup>193</sup> NO; vazodilatasyon, damar geçirgenliğinin uyarılması gibi etkilere sahiptir; antimikrobiyal ve antitrombosit etki gösterir. İnflamasyonu başlatan kemoatraktan sitokinlerin salınımını düzenler. NO; yara iyileşme sürecine katılan çok sayıda hücre tipinin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozisini; anjiogenezisi ve kollajen sentezini etkiler.<sup>94</sup>

Dokuda NO tayini, NO'nun *in vivo* olarak düşük miktarlarda oluşması, oluştuktan sonra hızla moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi ve yarılanma ömrünün kısa olması sebebiyle güçleşmektedir. Bu nedenle, NO tayini için L- arjininden L- sitriline dönüşümünde etkili olan NOS izoenzimlerinin değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir. Çalışmamızda ABS'nin mukozal yara iyileşme sürecindeki etkilerine açıklık getirmek üzere değerlendirilen NOS izoenzimi iNOS'tur.

Mahoney ve arkadaşlarının<sup>194</sup> farelerde yaptığı çalışmada, inflamatuvar hücrelerden iNOS ekspresyonunun yaradaki bakteriyel

kolonizasyona cevap olarak gerçekleştiği belirtilmiştir. Park ve Lim<sup>195</sup> alışmalarında, azalan iNOS ve COX-2 ekspresyon seviyelerinin inflamatuvar yanıtın uzamasına engel olabileceğini bildirmişlerdir.

D'Arcangelo ve arkadaşları<sup>196</sup> alışmalarında, rat oral mukozasında diod lazer ve bistüri ile gerçekleştirilen insizyonlar sonrası iyileşmeyi değerlendirmişlerdir. Yaralanmadan sonraki 7. ve 14. günlerde, dokularda meydana gelen inflamatuvar yanıtı değerlendirmek üzere biyokimyasal analiz kullanılarak iNOS ve eNOS ekspresyonu incelenmiştir. Western blot analizinden elde edilen sonuçlarda, lazer ve bistüri gruplarında 7. günde elde edilen iNOS ve eNOS ekspresyon değerlerinin 14. güne göre daha fazla olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, 7. ve 14. günde lazer gruplarında bistüri grubuna göre iNOS ve eNOS ekspresyon düzeylerinde görülen bu fazlalığı lazer gruplarında inflamatuvar yanıtın daha fazla olması ile ilişkilendirmiştir.

Çalışmamızda; 7, 14 ve 21. günlerde alınan doku örneklerindeki iNOS protein düzeylerinin ABS grubunda 7. günden 14. güne azaldığı görülmüştür. Kontrol grubundan farklı olarak ABS grubunda iNOS protein düzeyinin 14. günde azalması, ABS'nin inflamatuvar yanıtın süresini kısalttığı şeklinde yorumlanabilir. Öte yandan, her iki grup arasında 7, 14 ve 21. günlerde iNOS protein ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı farklılık görülmemiştir ( $p>0.05$ ).

Çalışmamızda ABS'nin yara iyileşme sürecindeki etkilerine açıklık getirmek üzere, ABS uygulanan yara dokularındaki histolojik değerlikler ve VEGF, FGF-2 ve iNOS protein seviyeleri incelenmiştir. Bu

çalışmanın sonuçları, sekonder iyileşmeye bırakılmış yara yüzeyine topikal olarak uygulanan ABS'nin defekt bölgesindeki iyileşme sürecini olumsuz yönde etkilemediğini göstermiştir. Elde edilen verilere göre ABS uygulanan grupta 7. gündeki reepitelizasyon miktarının ve 14. gündeki VEGF protein düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Buna göre, ABS'nin periodontal cerrahi uygulamaları sonrasında sekonder iyileşmeye bırakılan yara yüzeylerinde kullanımının yararlı olabileceği düşünülmüştür. Hemostatik etkinliği kanıtlanmış olan ABS'nin yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğuna dair ipuçları veren araştırmamıza ilave olarak etki mekanizmasının tam olarak ortaya konulabilmesi için moleküler düzeyde daha ileri araştırmaların faydalı olacağı kanaatindeyiz.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Ankaferd Blood Stopper'ın ratların palatinal mukozasında deneysel olarak oluşturulan eksizyonel yaraların sekonder iyileşme sürecindeki etkileri histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Her iki gruba ait defektlerin histolojik analizinde;

- ABS grubunda 7. günde kollajen liflerin, 14. günde ise granülasyon dokusundaki kan damarlarının kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu,
- ABS grubunda 7. günde reepitelizasyon miktarının anlamlı derecede arttığı ( $p<0.05$ ),
- Defekt derinliği açısından ise gruplar arasında farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ),
- ABS grubunda 21. günde inflamatuvar hücreler ile karakterli granülasyon dokusunun yerini gevşek bağ dokusunun aldığı,
- Kontrol grubunda ise 21. günde yer yer granülasyon dokusunun var olduğu gözlenmiştir.

Yapılan biyokimyasal analizin sonuçlarına göre;

- ABS'nin 14. günde VEGF protein düzeyini anlamlı derecede arttırdığı ( $p<0.05$ ),
- ABS ve kontrol grupları arasında FGF-2 ve iNOS protein düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ).

Bu alışma ABS'nin ağız içi mukozal dokularda sekonder iyileşme üzerine etkilerini konu alan literatürdeki ilk çalışmadır. Lokal hemostatik ajan olarak başarıyla kullanılan ABS'nin oral mukozal dokulara biyouyumlu bir ajan olduğu görölmüştür. ABS'nin kısa dönemde reepitelizasyon sürecine olumlu etkisinin bulunması ve yara bölgesindeki VEGF miktarındaki artışı sağlaması sebebiyle periodontal cerrahi uygulamalarında yara iyileşmesine fayda sağlayacağı düşünölmüştür. ABS'nin mukozal dokuda yara iyileşmesi üzerindeki klinik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, postoperatif ve uzun dönem sonuçların ortaya konduğu çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı düşünöncesindeyiz.



## 7. ÖZET

### TIBBİ BİR BİTKİ EKSTRESİ OLAN ANKAFERD BLOOD STOPPER UYGULAMASININ SEKONDER YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda, hemostatik etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmış olan Ankaferd Blood Stopper'ın (ABS) ağız içi mukozal yara iyileşme sürecindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada ağırlıkları ortalama 300 gram civarında olan Wistar cinsi 72 adet erkek rat kullanılmıştır. Tüm ratların palatinal mukozasında 4 mm'lik punch biyopsi aleti kullanılarak sirküler yaralar oluşturulmuştur. Ratlar rastgele ABS grubu ve kontrol grubu olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Eksizyonel yara bölgelerine ABS grubunda topikal olarak 0.1 ml ABS, kontrol grubunda ise serum fizyolojik uygulanmıştır. Her iki grup da histolojik ve biyokimyasal analiz grubu olarak alt gruplara ayrılmıştır. Her gruptan eşit sayıda hayvan 7, 14 ve 21. günlerde sakrifiye edilmiştir. Histolojik analizin yapıldığı gruplara ait yara dokularının hematoksilen eozin ile boyanmalarından sonra mikroskopik olarak defekt derinliği ve defekt genişliği ölçümleri yapılmıştır. Biyokimyasal analizin yapıldığı gruplara ait yara dokularında ise western blot yöntemi ile VEGF, FGF-2 ve iNOS protein düzeyleri belirlenmiştir.

Yapılan histolojik değerlendirme sonucunda 7. günde ABS uygulanan grupta reepitelizasyon miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ( $p < 0.05$ ). Defekt derinliği açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür ( $p > 0.05$ ). Yapılan

biyokimyasal analizde 14. günde ABS uygulanan grupta VEGF protein düzeyinin kontrol grubuna göre artmış olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Gruplar arasında FGF-2 ve iNOS protein düzeyleri açısından istatistiksel olarak farklılık yoktur ( $p>0.05$ ).

Çalışmamızda, ABS'nin yara iyileşmesi sürecindeki etkileri histolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, ABS'nin yara iyileşme sürecinde olumlu etkileri olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ankaferd Blood Stopper, yara iyileşmesi, vasküler endotelyal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü-2, indüklenebilir nitrik oksit sentaz.

## **8. SUMMARY**

### **Histologic and Biochemical Evaluation of the Effect of Medical Plant Extract Ankaferd Blood Stopper on Mucosal Wound Healing**

The purpose of this study is to investigate the effect of Ankaferd Blood Stopper on oral mucosal wound healing.

A total of 72 male Wistar rats, weighing 300 g in average, were used in the study. Excisional wounds, 4 mm in diameter, were made in the centre of the palatal mucosa, using a punch out biopsy tool. Rats were randomly divided into an experimental group to which topical ABS application was applied and a control group to which saline application was applied. Each group were divided into subgroups as a histologic and a biochemical analyze group. Six animals from each group were sacrificed at 7, 14 and 21 days. The palatal specimens were stained with hemotoxylin and eosin to measure the mean wound depth and width. VEGF, FGF-2 and iNOS protein expression were determined by western blot method.

The results of the statistical analysis determined the reepithelization to be significantly higher in the ABS group than the control group at 7 day ( $p < 0.05$ ). When the VEGF protein levels were compared statistically, a significant difference was found between the groups ( $p < 0.05$ ). The VEGF protein levels were higher in the study group than the control group at 14 day. There were no difference statistically between the groups in terms of FGF-2 and iNOS protein levels ( $p > 0.05$ ).

In the present study, the effect of ABS on wound healing process were tested using histological and biochemical methods. Within the results of obtained data, it is concluded that ABS has positive effect on wound healing process.

**Key Words:** Ankaferd Blood Stopper, wound healing, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2, inducible nitric oxide synthase.

## 9. KAYNAKLAR

1. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009; 37:1528-1542.
2. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 9-18.
3. Glat PM, Longaker MT. Wound Healing. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHW, editors. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.p.3-12.
4. Duarte CM, Quirino MR, Patrocinio MC, Anbinder AL. Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16: 716-721.
5. Zambon JJ, Ciancio SG, Mather ML, Charles CH. The effect of an antimicrobial mouthrinse on early healing of gingival flap surgery wounds. *J Periodontol* 1989; 60:31-34.
6. Hassan KA, Deogratius O, Nyafuono JF, Francis O, Engeu OP. Wound Healing Potential of the Ethanolic Extracts of *Biden Pilosa* and *Ocimum Suave*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; 5:132-136.
7. Davis RH, Leitner MG, Russo JM, Byrne ME. Wound healing. Oral and topical activity of *Aloe vera*. *J Am Podiatr Med Assoc* 1989; 79:559-562.

8. Shim KM, Choi SH, Jeong MJ, Kang SS. Effects of Aucubin on the Healing of Oral Wounds. *In Vivo* 2007; 21:1037-1042.
9. Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A. Evaluation of the Wound Healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. *eCAM* 2007; 2009:351-356.
10. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazlı S, Akman U, Ozturk Y, et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res* 2008; 36:163-170.
11. Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, Ozatlı D, Tanyel E, Durupınar B, et al. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia* 2009; 80:48-50.
12. Ercetin S, Haznedaroglu IC, Kurt M, Onal IK, Aktas A, Kurt OK, et al. Safety and Efficacy of Ankaferd Blood Stopper in Dental Surgery. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi* 2010; 20:1-5.
13. Squier CA. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2:13-32.
14. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol* 2000; 18:499-511.
15. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000 2000; 24:28-55.
16. Orban BJ. Orban's histology and embryology. London: The C. V Mosby Company; 1980.

17. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S, editors. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2006:69-70.
18. Itoiz ME, Carranza FA. The Gingiva. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA, editors. Carranza's Clinical Periodontology. 9th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2002.p.16-35.
19. Lindhe J, Karring T, Araitjo M. Anatomy of the Periodontium. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 4th ed. Blackwell Publishing Company; 2003.p.6-8.
20. Irvin TT. Wound Healing. Archives of Emergency Medicine 1985; 2:3-10.
21. Shah JM, Omar E, Pai DR, Sood S. Cellular events and biomarkers of wound healing. Indian J Plast Surg 2012; 45:220-228.
22. Shetty V, Bertolami CN. Wound healing. In: Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD, editors. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd ed. London: BC Decker Inc; 2004:3-15.
23. Hantash BM, Zhao L, Knowles JA, Lorenz HP. Adult and fetal wound healing. Front Biosci 2008; 13:51-61.
24. Childress BB, Stechmiller JK. Role of nitric oxide in wound healing. Biol Res Nurs 2002; 4:5-15.
25. MacKay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. Altern Med Rev 2003; 8:359-377.

26. Clark RA. Basics of cutaneous wound repair. *J Dermatol Surg Oncol* 1993; 19:693-706.
27. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127:514-525.
28. Peacock EE. *Wound Repair*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1984.
29. Wahl LM, Wahl SM. Inflammation. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, editors. *Wound Healing: Biochemical & Clinical Aspects*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1992.p.40-62.
30. Karasu A, Bakır B. Yara ve Yara İyileşmesi. *Veteriner Cerrahi Dergisi* 2008; 14:36-43.
31. Lorenz HP, Longaker MT. Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment. In: Mathes SJ, editors. *Mathes Plastic Surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.p.209-234.
32. Karukonda SR, Flynn TC, Boh EE, McBurney EI, Russo GG, Millikan LE. The effects of drugs on wound healing: part 1. *Int J Dermatol* 2000; 39:250-257.
33. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16:585-601.



34. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Temel Patoloji. Çevikbaş U (çev). 6. Baskı, İstanbul, Nobel-Yüce, 2000.
35. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. Journal of Dental Research 2010; 89:219-229.
36. Brancato SK, Albina JE. Wound Macrophages as Key Regulators of Repair. Origin, Phenotype, and Function. The American Journal of Pathology 2011; 178:19-25.
37. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. Forensic Sci Int 2010; 203:93-98.
38. Beurden HV. Characterization of fibroblast phenotypes in intra-oral wound healing. Department of Orthodontics and Oral Biology. The Netherlands: Radboud University Nijmegen Medical Centre; 2005.
39. Erdem F, Gündoğdu M. Anjiogenezis ve Anti-Anjiogenik Tedavi. AÜTD 2005; 37:1-6.
40. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in Wound Repair: Angiogenic Growth Factors and the Extracellular Matrix. Microscopy Research and Technique 2003; 60:107-114.
41. Buduneli N. Dişetin Ekstraselüler Matriksi. EÜ Dişhek Fak Derg 2001; 22:1-12.
42. Bayındır Y. Yara Bakımı: Yaraya Genel Yaklaşım. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2007; 11:13-18.

43. Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology* 2000 2000; 24:127-152.
44. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994; 124:401-404.
45. Nauta A, Gurtner GC, Longaker MT. Wound healing and regenerative strategies. *Oral Diseases* 2011; 17:541-549.
46. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277:1-9.
47. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Journal of Pathology* 2003; 200:500-503.
48. Horch RE, Bleiziffer O, Kneser U. Physiology and Wound Healing. *Plast Reconstr Surg* 2010:3-10.
49. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing. *Clin Plastic Surgery* 2003; 30:1-12.
50. Schultz GS, Mast BA. Molecular Analysis of the Environments of Healing and Chronic Wounds: Cytokines, Proteases and Growth Factors. *Primary Intention* 1999:7-14.
51. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care* 2008; 17: 399-402.

52. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* 2008; 34: 1159- 69.
53. Canda MŞ, Canda T. *Temel Patoloji*. Bornova: Ege Üniversitesi Basımevi; 1982.
54. Şenol M. Yara İyileşmesi. *T Klin J* 1995; 5: 49-53.
55. Deodhar AK, Rana RE. Surgical physiology of wound healing: a review. *J Postgrad Med* 1997; 43: 52-6.
56. Ozbek N, Guneren E, Yildiz L, Meydan D, Cakir S, Coskun M. The effect of pre-operative conventional and hyperfractionated radiotherapy schedules on wound healing and tensile strength in rats: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 185-92.
57. Tahsinoğlu M, Çöloğlu AS, Erseven G. *Genel Patoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Yayınları; 1984.
58. Thompson C, Fuhrman MP. Nutrients and wound healing: still searching for the magic bullet. *Nutr Clin Pract* 2005; 20:331-47.
59. Stechmiller JK. Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutr Clin Pract* 2010; 25: 61-8.
60. Lansdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 2-16.

61. Langemo D, Anderson J, Hanson D, Hunter S, Thompson P, Posthauer ME. Nutritional considerations in wound care. *Adv Skin Wound Care* 2006; 19: 297-303.
62. Campos AC, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 281-8.
63. Kim JE, Shklar G. The effect of vitamin E on the healing of gingival wounds in rats. *J Periodontol* 1983; 54: 305-8.
64. Sharp A, Clark J. Diabetes and its effects on wound healing. *Nurs Stand* 2011; 25: 41-7.
65. Anstead GM. Steroids, retinoids, and wound healing. *Adv Wound Care* 1998; 11:277- 85.
66. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835-70.
67. Hata Y, Kawanabe H, Hisanaga Y, Taniguchi K, Ishikawa H. Effects of Basic Fibroblast Growth Factor Administration on Vascular Changes in Wound Healing of Rat Palates. *Cleft Palate Craniofac J* 2008; 45: 63-72.
68. Kanda T, Funato N, Baba Y, Kuroda T. Evidence for fibroblast growth factor receptors in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. *Arch Oral Biol* 2003; 48: 213-21.

69. Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 263-7.
70. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989; 109: 1-6.
71. Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 115-20.
72. Choi W, Kawanabe H, Sawa Y, Taniguchi K, Ishikawa H. Effects of bFGF on suppression of collagen type I accumulation and scar tissue formation during wound healing after mucoperiosteal denudation of rat palate. *Acta Odontologica Scandinavica* 2008; 66: 31-7.
73. Ayvazyan A, Morimoto N, Kanda N, Takemoto S, Kawai K, Sakamoto Y, et al. Collagen-Gelatin Scaffold Impregnated with bFGF Accelerates Palatal Wound Healing of Palatal Mucosa in Dogs. *Journal of Surgical Research* 2011; 171: 247-57.
74. Jansen RG, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. FGF-2-loaded collagen scaffolds attract cells and blood vessels in rat oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 630-8.
75. Oda Y, Kagami H, Ueda M. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 73-80.
76. Yao C, Yao P, Wu H, Zha Z. Acceleration of wound healing in traumatic ulcers by absorbable collagen sponge containing

recombinant basic fibroblast growth factor. *Biomed Mater* 2006; 1: 33-7.

77. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
78. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
79. Gyurkovics M, Lohinai Z, Gyorfi A, Ivanyi I, Süveges I, Konya M, et al. Venodilatory effect of vascular endothelial growth factor on rat gingiva. *J Periodontol* 2009; 80:1518-23.
80. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 2009; 153: 347-58.
81. Olson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling- in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 359-71.
82. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007; 15: 1358-67.
83. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.

84. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: 1358-66.
85. Yan X, Chen B, Lin Y, Li Y, Xiao Z, Hou X, et al. Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model. *Diabetes Research And Clinical Practice* 2010; 90: 66-72.
86. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 152: 1445-52.
87. Loyd CM, Diaconu D, Fu W, Adams GN, Brandt E, Knutsen DA, et al. Transgenic overexpression of keratinocyte-specific VEGF and Ang1 in combination promotes wound healing under nondiabetic but not diabetic conditions. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5: 1-11.
88. Mack JA, Maytin EV. Persistent inflammation and angiogenesis during wound healing in K14-directed Hoxb13 transgenic mice. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 856-65.
89. Dickens S, Vermeulen P, Hendrickx B, Van den Berge S, Vranckx JJ. Regulable vascular endothelial growth factor165 overexpression by ex vivo expanded keratinocyte cultures promotes matrix formation, angiogenesis, and healing in porcine full-thickness wounds. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 19-27.

90. Mould AW, Greco SA, Cahill MM, Tonks ID, Bellomo D, Patterson C, et al. Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth *in vivo* and *in vitro*. *Circ Res* 2005; 97: 60-70.
91. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 2005; 128: 303-9.
92. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg* 2002; 183: 406-12.
93. Isenberg JS, Ridnour LA, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Nitric oxide in wound-healing. *Microsurgery* 2005; 25: 442-51.
94. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 259-64.
95. Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 366: 90-100.
96. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* 2002; 7: 1-10.
97. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
98. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-64.



99. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33: 829-37.
100. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
101. Mees B, Wagner S, Ninci E, Tribulova S, Martin S, van Haparen R, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity Is Essential for Vasodilation During Blood Flow Recovery but not for Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1926-33.
102. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994; 94: 2036-44.
103. Ganster RW, Geller DA. Molecular regulation of inducible nitric oxide synthase. In: Ignarro LJ, editors. *Nitric oxide Biology and Pathobiology*. USA: Academic Press, 2000.p.129-57.
104. Schaffer MR, Tantry U, Gross SS, Wasserburg HL, Barbul A. Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res* 1996; 63: 237-40.
105. Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovesdi I, et al. Reversal of Impaired Wound Repair in iNOS-deficient Mice by Topical Adenoviral-mediated iNOS Gene Transfer. *J Clin Invest* 1998; 101: 967-71.

106. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2: 907-16.
107. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001; 7: 2-10.
108. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 3131-9.
109. Chen AF, O'Brien T, Katusic ZS. Functional Influence of Gene Transfer of Recombinant Nitric Oxide Synthase to Cardiovascular System. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. California: Academic Press, 2000.p.525-45.
110. Arslan MK. Yara iyileşmesi ve iyileşmeyi engelleyen faktörler. Akut ve kronik yara bakımı. 1. Baskı. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri; 2003.p.9-33.
111. Dym H, Tagliareni JM. Surgical management of cosmetic mucogingival defects. *Dent Clin North Am* 2012; 56: 267-79.
112. Wennstrom JL. Mucogingival therapy. *Ann Periodontol* 1996; 1: 671-701.
113. Lang NP, Löe H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. *J Periodontol* 1972; 43: 623-7.

114. Miyasato M, Crigger M, Egelberg J. Gingival condition in areas of minimal and appreciable width of keratinized gingiva. *J Clin Periodontol* 1977; 4: 200-9.
115. Hall WB. The Current Status of Mucogingival Problems and Their Therapy *J Periodontol* 1981; 52:569-75.
116. Hangorsky U, Bissada NF. Clinical assessment of free gingival graft effectiveness on the maintenance of periodontal health. *J Periodontol* 1980; 51: 274-8.
117. Harris RJ. Clinical Evaluation of 3 Techniques to Augment Keratinized Tissue Without Root Coverage. *J Periodontol* 2001; 72: 932-8.
118. Orsini M, Orsini G, Benlloch D, Aranda JJ, Lazaro P, Sanz M. Esthetic and dimensional evaluation of free connective tissue grafts in prosthetically treated patients: a 1-year clinical study. *J Periodontol* 2004; 75: 470-7.
119. Takei HH, Azzi RA. Periodontal plastic and esthetic surgery. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA, editors. *Carranza's Clinical Periodontology*. 9th ed. London: W.B. Saunders; 2002.p.870-1.
120. Chaubey KK, Arora VK, Thakur R, Narula IS. Perio-esthetic surgery: Using LPF with frenectomy for prevention of scar. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2011; 15: 265-9.

121. Toker H, Ozdemir H. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a university dental hospital in Turkey. *Int J Dent Hyg* 2009; 7: 115-20.
122. Miller PD, Jr. The frenectomy combined with a laterally positioned pedicle graft. Functional and esthetic considerations. *J Periodontol* 1985; 56: 102-6.
123. Morselli P, Vecchiet F, Marini I. Frenuloplasty by means of a triangular flap. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87: 142-4.
124. Tugnait A, Clerehugh V. Gingival recession-its significance and management. *J Dent* 2001; 29: 381-94.
125. Harris RJ. Treatment of a previously placed autogenous masticatory mucosa graft (free gingival graft). A case report. *J Periodontol* 1998; 69: 717-23.
126. Pollack RP. Bilateral Creeping Attachment Using Free Mucosal Grafts. A Case Report with 4-Year Follow-Up. *J Periodontol* 1984; 55: 670-2.
127. Smukler H, Goldman HM. Laterally repositioned "stimulated" osteoperiosteal pedicle grafts in the treatment of denuded roots. A preliminary report. *J Periodontol* 1979; 50: 379-83.
128. Carranza FA. The gingivectomy technique. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA, editors. *Carranza's Clinical Periodontology*. 9th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2002.p.749-53.

129. Lee SJ, Umano K, Shibamoto T. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem Toxicol* 2007; 91: 131-7.
130. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 494-8.
131. Barka EA, Belarbi A, Hachet C, Nowak J, Audran JC. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 186: 91-5.
132. Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 138-42.
133. Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I, et al. Cardiovascular effects of *Urtica Dioica*. (*Urticaceae*) roots extracts: *in vitro* and *in vivo* pharmacological studies. *J Ethnopharmacol* 2002; 8: 105-9.
134. Haznedaroglu BZ, Haznedaroglu IC, Walker SL, Bilgili H, Goker H, Kosar A, et al. Ultrastructural and morphological analyses of the *in*

*vitro* and *in vivo* hemostatic effects of Ankaferd Blood Stopper. Clin Appl Thromb Hemost 2010; 16: 446-53.

135. Kosar A, Cipil HS, Kaya A, Uz B, Haznedaroglu IC, Goker H, et al. The efficacy of Ankaferd Blood Stopper in antithrombotic drug-induced primary and secondary hemostatic abnormalities of a rat-bleeding model. Blood Coagul Fibrinolysis 2009; 20: 185-190.
136. Myers BA. Wound Management. 1st ed. New Jersey: Pearson Education Inc; 2004.
137. Cohn IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ. Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992.
138. Kozlovsky A, Artzi Z, Hirshberg A, Israeli-Tobias C, Reich L. Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. J Clin Periodontol 2007; 34: 164-71.
139. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. Current Opinion in Infectious Diseases 2004; 17: 91-6.
140. Bucknall TE. The effect of local infection upon wound healing: an experimental study. Br J Surg 1980; 67: 851-5.
141. Kilcullen JK, Ly QP, Chang TH, Levenson SM, Steinberg JJ. Nonviable Staphylococcus aureus and its peptidoglycan stimulate macrophage recruitment, angiogenesis, fibroplasia, and collagen accumulation in wounded rats. Wound Repair Regen 1998; 6: 149-56.

142. Butcher M. Bacterial management: In Modern Wound Care. Wound Essentials 2010; 5:119-26.
143. Newman MG, Sanz M, Nachnani S, Saltini C, Anderson L. Effect of 0.12% chlorhexidine on bacterial recolonization following periodontal surgery. J Periodontol 1989; 60: 577-81.
144. Sanz M, Newman MG, Anderson L, Matoska W, Otomo-Corgel J, Saltini C. Clinical enhancement of post-periodontal surgical therapy by a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse. J Periodontol 1989; 60: 570-6.
145. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. Clin Dermatol 2007; 25: 19-25.
146. Jones SG, Edwards R, Thomas DW. Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immuno-regulation of wound healing. Int J Low Extrem Wounds 2004; 3: 201-8.
147. Wennstrom JL, Prato GP. Mucogingival Therapy -Periodontal Plastic Surgery. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 4th ed. Blackwell Publishing Company; 2003.p.576.
148. Paraskevas S, Rosema NA, Versteeg P, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Chlorine dioxide and chlorhexidine mouthrinses compared in a 3-day plaque accumulation model. J Periodontol 2008; 79: 1395-400.

149. Bassetti C, Kallenberger A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 443-456.
150. Kenney EB, Saxe SR, Bowles RD. Effect of chlorhexidine on human polymorphonuclear leucocytes. *Arch Oral Biol* 1972; 17: 1633-6.
151. Knuuttli M, Soederling E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta Odontol Scand* 1981; 39: 285-9.
152. Helgeland K, Heyden G, Rolla G. Effect of chlorhexidine on animal cells *in vitro*. *Scand J Dent Res* 1971; 79: 209-15.
153. Pulcher JJ, Daniel JC. The effect of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts *in vitro*. *J Periodontol* 1992; 63: 526-32.
154. Shahan MH, Chuang AH, Brennan WA, Dirksen TR, Van Dyke TE, McPherson JC. The effect of chlorhexidine irrigation on tensile wound strength. *J Periodontol* 1993; 64: 719-22.
155. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999; 70: 1443-8.
156. Kosger HH, Ozturk M, Sokmen A, Bulut E, Ay S. Wound healing effects of *Arnebia densiflora* root extracts on rat palatal mucosa. *Eur J Dent* 2009; 3: 96-9.



157. Shim KM, Choi SH, Jeong MJ, Kang SS. Effects of aucubin on the healing of oral wounds. *In Vivo* 2007; 21: 1037-1041.
158. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. A brief history of wound care. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 6-11.
159. Turgut M, Tutkun F, Celebi N, Muglali M, Haznedaroglu İC, Goker H. Topical Ankaferd Bloodstopper in the Management of Critical Bleedings due to Hemorrhagic Diathesis. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi* 2011; 21: 160-5.
160. Turgut M, Tutkun F, Celebi N, Muglali M, Haznedaroglu İC, Goker H. Topical Ankaferd Bloodstopper in the Management of Critical Bleedings due to Hemorrhagic Diathesis. *International Journal of Hematology and Oncology* 2011; 21: 160-5.
161. Kurt M, Akdogan M, Onal İK, Kekilli M, Arhan M, Shorbagi A, et al. Endoscopic topical application of Ankaferd Blood Stopper for neoplastic gastrointestinal bleeding: A retrospective analysis. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 196-9.
162. İynen İ, Bozkus F, San İ, Alatas N. The hemostatic efficacy of Ankaferd Blood Stopper in adenoidectomy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2011: 1-4.
163. Bilgili H, Captug O, Kosar A, Kurt M, Kekilli M, Shorbagi A, et al. Oral Systemic Administration of Ankaferd Blood Stopper Has No Short-Term Toxicity in an *In Vivo* Rabbit Experimental Model. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010; 16: 533-6.

164. Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Ustun H, Germiyanoglu C. Hemostatic role of a folkloric medicinal plant extract in a rat partial nephrectomy model: controlled experimental trial. J Urol 2009; 181: 2349-54.
165. Haznedaroglu IC. Molecular basis of the pleiotropic effects of Ankaferd Blood Stopper. IUBMB Life 2009; 61:290.
166. Arslan S, Yeşil Y, Ülger Z, Cankurtaran M, Göker H, Haznedaroğlu İC. Yaşlı Bir Hastada Yumuşak Doku Travmasına Bağlı Gelişen Yara İyileşmesinde Ankaferd. Akad Geriatri 2010; 2: 58-60.
167. Akkoç N, Akçelik M, Haznedaroğlu İC, Göker H, Turgut M, Aksu S, et al. *In Vitro* Anti-Bacterial Activities of Ankaferd Medicinal Plant Extract. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009; 29: 410-5.
168. Aktop S, Alturfan EE, Özer C. Ankaferd Blood Stopper ve Celox'un Varfarin Verilmiş Sıçan Derisinde Glutasyon ve Lipid Peroksidasyon Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Müsbed 2012; 2: 32-42.
169. Akalin C, Kuru S, Barlas AM, Kısmet K, Kaplanoğlu B, Demir A, et al. Beneficial effects of Ankaferd Blood Stopper on dermal wound healing: an experimental study. Int Wound J 2012; doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01063. (Article in Press)
170. Türker GE. Sıçanlarda Er:YAG ile oluşturulmuş yarada bitki ekstralarının karışımı topikal hemostatik bir ajanın yara iyileşmesine etkisi. Uzmanlık Tezi. Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği. İstanbul: İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2009.

171. Isler SC, Demircan S, Cakarer S, Cebi Z, Keskin M, Soluk C, et al. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper on early bone healing. *J Appl Oral Sci* 2010; 18: 409-14.
172. Arpacı SE. Sıçanlarda diş çekimi sonrasında uygulanan lokal hemostatik ajan Ankaferd'in doku iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. İstanbul Marmara Üniversitesi, 2010.
173. Cornelissen AM, Maltha JC, Von den Hoff HW, Kuijpers-Jagtman AM. Palatal mucoperiosteal wound healing in the rat. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 344-51.
174. Yamashita J, Koi K, Yang D, McCauley LK. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res* 2011; 15: 1-17.
175. Jansen RG, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Tissue reactions to collagen scaffolds in the oral mucosa and skin of rats: environmental and mechanical factors. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 376-87.
176. Hammad HM, Hammad MM, Abdelhadi IN, Khalifeh MS. Effects of topically applied agents on intra-oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study. *Int J Dent Hyg* 2011; 9: 9-16.
177. Clark RA. Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin* 1993; 11: 647-66.

178. Arda N, Ertan H. Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması. In: Temizkan G, Arda N, editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 3 Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008.p.199.
179. Cornelissen AM, Stoop R, Von den Hoff HW, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. J Oral Pathol Med 2000; 29: 1-7.
180. Cornelissen AM, Von den Hoff JW, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Effects of interferons on proliferation and collagen synthesis of rat palatal wound fibroblasts. Arch Oral Biol 1999; 44: 541-7.
181. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes. Eur Cytokine Netw 2009; 20: 171-9.
182. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Biochem Soc Trans 2002; 30: 173-7.
183. Ünlü L. Gingival Fibroblastların Ankaferd ile *in vitro* Koşullarda Etkileşimi. Doktora Tezi. Çene Cerrahisi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2010.
184. Rumalla VK, Borah GL. Cytokines, growth factors, and plastic surgery. Plast Reconstr Surg 2001; 108: 719-33.
185. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing an overview. Clin Plast Surg 2003; 30: 1-12.

186. Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpibal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J Pharmacol Sci* 2009; 109: 525-31.
187. Favia G, Mariggio MA, Maiorano F, Cassano A, Capodiferro S, Ribatti D. Accelerated wound healing of oral soft tissues and angiogenic effect induced by a pool of aminoacids combined to sodium hyaluronate (AMINOGAM). *J Biol Regul Homeost Agents* 2008; 22: 109-16.
188. Nakanishi Y, Izumi K, Yoshizawa M, Saito C, Kawano Y, Maeda T. The expression and production of vascular endothelial growth factor in oral mucosa equivalents. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 928-33.
189. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HV, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176: 1375-9.
190. Leahy PJ, Lawrence WT. Biologic enhancement of wound healing. *Clin Plast Surg* 2007; 34: 659-71.
191. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of

IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2008; 23: 211-5.

192. Lee HJ, Kwon JY, Shin SW, Baek SH, Choi KU, Jeon YH, et al. Effects of sevoflurane on collagen production and growth factor expression in rats with an excision wound. *Acta Anaesthesiol Scand* 2010; 54: 885-93.
193. Schulz G, Stechmiller J. Wound healing and nitric oxide production: too little or too much may impair healing and cause chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 2006; 5: 6-8.
194. Mahoney E, Reichner J, Bostom LR, Mastrofrancesco B, Henry W, Albina J. Bacterial colonization and the expression of inducible nitric oxide synthase in murine wounds. *Am J Pathol* 2002; 161: 2143-52.
195. Park NY, Lim Y. Short term supplementation of dietary antioxidants selectively regulates the inflammatory responses during early cutaneous wound healing in diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8: 80.
196. D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Prosperi GD, Conte E, Baldi M, Caputi S. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103:764-773.

## 10. EKLER

### 10.1. Etik Kurul Raporu



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

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/110-9171  
KONU :

16/05/2011

Sayın

Prof.Dr.Ayşen BODUR  
Gazi Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi  
Periodontoloji Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Ayşen BODUR, Gülin SEYMEN, Z.Levent HALLAÇ, Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Gülce Naz SARAÇ, Ahmet CUMAOĞLU ve Aysel ARICIOĞLU'ndan oluşan, G.Ü.ET-11.047 kod numaralı ve "*Tıbbi Bir Bitki Ekstresi Olan Ankaferd Blood Stopper Uygulamasının Sekonder Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Histopatolojik ve Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.047 and entitled "*Histopathological and Biochemical Evaluation of the Effect of Medical Plant Extract Ankaferd Blood Stopper Application on Wound Healing in Healthy or Diabetic Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

  
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN  
Gazi Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

## 10.2. Teşekkür

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan, ilgisi, bilgisi, deneyimi ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen tez danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşen BODUR'a;

Tüm doktora eğitimim boyunca desteklerini hissettiğim Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İ. Levent TANER'e, periodontolojide özeni ve sabırla çalışmayı öğreten Sayın Prof. Dr. Gönen ÖZCAN'a, Prof. Dr. F. Berrin ÜNSAL'a ve Prof. Dr. F. Deniz ÇETİNER'e,

Doktora eğitimim boyunca engin deneyim, manevi destek ve iyi niyetlerini esirgemeyen, bilgi ve becerilerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Mehmet YALIM'a ve Sayın Prof. Dr. Nurdan ÖZMERİÇ'e,

Bu çalışmayı oluştururken benden desteğini, görüş ve önerilerini esirgemeyen Dr. Emre BARIŞ'a, Dr. Başak KURDOĞLU'na ve Dr. Akın ÖZTEMEL'e, tez çalışmamın deney hayvanlarının hazırlanması kısmında emeği geçen Dr. Z. Levent HALLAÇ'a,

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım Dr. Zeynep TURGUT ÇANKAYA, Dr. Mustafa ÖZCAN ve Dr. Serap KARAKIŞ başta olmak üzere tüm bölüm arkadaşlarıma,

Bu meslekte aldığım kararlarda ve geldiğim bu noktada çok büyük payı olan sevgili amcam Dr. Osman GAZİOĞLU'na,

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan dostlarım Dr. Başak KURDOĞLU'na, Dr. Çağrı GAZİOĞLU'na, Dr. Seniha ÖZTOPRAK'a, Dr.



Merve BANKOĞLU'na, Dr. Melek KAVASOĞLU'na ve Dr. Akın ÖZTEMEL'e,

Sonsuz emek ve sevgisiyle beni bugünlere getiren, mesleki gelişimim için her konudaki desteği ve sevgisiyle hep yanımda olduğunu bildiğim sevgili annem Şengül SEYMEN ve babam Bilgin SEYMEN'e,

Her zaman yanımda olmasını dilediğim, sahip olduğum en değerli varlık canım kardeşim Fatih SEYMEN'e,

Son olarak benden sabrını, sonsuz desteğini ve sevgisini esirgemeyen Mehmet SARI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 11. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Gülin SEYMEN

**Doğum Yeri - Tarihi:** BURSA - 15.01.1985

**İlkokul:** Dörtçelik İlköğretim Okulu (1990-1995)

**Ortaöğretim:** Nilüfer Milli Piyango Anadolu Lisesi (1995-2002)

**Üniversite:** Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2003-2008)

**Doktora:** Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD (2009-2013)

**e-posta adresi:** gulinseymen@gmail.com

**Yabancı Dil:** İngilizce

### **Projeler:**

- Steriolithografik cerrahi kılavuz sistemleri kullanılarak Er,Cr:YSGG Lazer ve geleneksel yöntem ile hazırlanan implant yuvalarının bilgisayar destekli implant planlaması ile karşılaştırılması, BAP projesi (03/2011-11)
- Tıbbi bir bitki ekstresi olan ankaferd blood stopper uygulamasının sekonder yara iyileşmesi üzerine etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi, BAP projesi (03/2011-23)

### **Bildiri ve Yayınlar:**

- Implant Bed Preparation with an Er,Cr:YSGG Laser Using Stereolithographic Surgical Guide, 42. Türk Periodontoloji Derneği Kongresi, 2012, Poster Sunumu.
- Implant Bed Preparation with an Er,Cr:YSGG Laser Using Stereolithographic Surgical Guide, J Lasers Med Sci 2013; 4(1):25-32.