



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

**BUPIVAKAİN VE DEKSMEDETOMİDİN'İN YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN VE
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN IN VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yusuf Güvenç SERT

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TOKAT

2025



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

**BUPIVAKAİN VE DEKSMEDETOMİDİN'İN YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN VE
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN IN VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yusuf Güvenç SERT

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tuğba KARAMAN

TOKAT

2025

TEŞEKKÜR

İhtisas eğitimim süresince klinik ve teorik olarak yetişmemde emekleri olan saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Serkan KARAMAN'a, Sayın Prof. Dr. Tuğba KARAMAN'a, Prof. Dr. Hakan TAPAR'a, Dr. Öğr. Üyesi Mehtap GÜRLER BALTA'ya, Dr. Öğr. Üyesi Vildan KÖLÜKÇÜ'ye, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Tuğrul ŞAHİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Ali Genç'e kliniğimizden ayrılan fakat uzmanlık eğitimimde emeği olan hocam Prof. Dr. Mustafa SÜREN'e, saygı ve şükranlarımı sunar, teşekkür ederim.

Tez yazma sürecinde bilgi ve tecrübesinden faydalanma şansı bulduğum tez danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Tuğba KARAMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım esnasında tanışma şansı yakaladığım, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Seçil ERDEN TAYHAN'a, Almus MYO öğretim üyesi Dr. Yahya TAYHAN'a ve Tokat Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Dr. Nazan GÖKŞEN TOSUN'a teşekkür ederim.

Tez projemi 2023/50 numaralı proje ile destekleyen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca destekleriyle, sevgileriyle, her zaman yanımda olan çok değerli ailem; canım annem, babam, ağabeyim ve melek anneanneme tüm eğitim, öğretim ve meslek hayatım boyunca desteklerini esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Onu ilk tanıdığım andan beri hayatımı aydınlatan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşime ve varlığıyla hayatıma anlam katan biricik oğluma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
TABLolar DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Deri	3
2.1.2.Epidermis	4
2.1.3.Dermis	5
2.1.4.Hipodermis	5
2.2. Yara	5
2.2.1. Akut Yara	6
2.2.2. Kronik Yara.....	7
2.2.3. Yara İyileşmesi ve Evreleri	8
2.2.3.1. Hemostaz Evresi.....	13
2.2.3.2. İnflamasyon Evresi.....	16
2.2.3.3. Proliferasyon Evresi	19
2.2.3.4. Maturasyon ve Remodelling Evresi	21

2.2.4. Yara İyileşmesine Etki Eden Faktörler	23
2.2.4.1. Beslenme	24
2.2.4.2. Yaş, Cinsiyet ve Irk	24
2.2.4.3. Vitamin Eksiklikleri	25
2.2.4.4. Sigara ve Alkol kullanımı	26
2.2.4.5. Hipoksi ve Oksijenizasyon	27
2.2.4.6. Kemoterapi-Radyoterapi	27
2.2.4.7. Enfeksiyon	28
2.2.4.8. Kronik Hastalıklar	29
2.2.4.9. Fiziksel etmenler	29
2.2.5. Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri	30
2.2.6. Yaranın İyileşme Sürecinde Sitokin Aktivitesi ve Büyüme Faktörleri	30
2.2.6.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	33
2.2.6.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	33
2.2.6.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- B)	34
2.2.6.4. Epidermal büyüme faktörü (EGF)	34
2.2.6.5. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	34
2.3. Lokal Anestezi	38
2.3.1. Lokal Anestezikler	39
2.3.1.1. Lokal Anesteziklerin Tanımı ile Etki Mekanizmaları	39
2.3.1.2. Lokal Anesteziklerin Kimyasal Yapıları ve Farmakolojik Özellikleri	40
2.3.2. Araştırmada Kullanılan Farmakolojik Ajanlar	42
2.3.2.1. Bupivakain	42

2.3.2.2. Deksmetomidin.....	46
2.3.2.1. Farmakolojik Özellikleri	47
2.3.2.2. Santral Sinir Sistemine Etkileri	48
2.3.2.3. Sedasyon, Anksiyoliz, Hipnozis ile Amnezi.....	48
2.3.2.4. Analjezi	49
2.3.2.5. Solunum sistemi üstüne etkileri	49
2.3.2.6. Kardiyovasküler sistem üstüne etkileri	50
2.3.2.7. Metabolik etkiler	50
2.3.2.8. Organ Koruyucu Etkisi.....	50
2.3.2.9. Diğer Etkileri.....	51
2.3.2.10. Yan Etkileri	51
2.3.2.11. Kullanım Endikasyonları ve Doz	51
2.4. Antimikrobiyal Analiz	53
2.4.1. Disk Difüzyon Testi	53
2.4.2. Mikrodilüsyon Testi	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi	55
3.2. Hücre hatlarının pasajlanması	56
3.3. Hücre hatlarının stoklanması.....	57
3.4. Bupivakain ve Deksmetomidin'in deri fibroblast hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi	57
3.5. Hücre göçü analizi ile Bupivakain ve Deksmetomidin destekli yara iyileşmesi kapasitesinin belirlenmesi	59
3.6. Bupivakain ve Deksmetomidin destekli antiinflamatuvar etkinin belirlenmesi	60

3.6.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu	61
3.6.2. Total RNA'dan Revers Transkripsiyon ile Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	64
3.6.3. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-PCR, RT-qPCR)	65
3.6.4. mRNA Ekspresyon Düzeylerinin 2- $\Delta\Delta$ CT Analiz Yöntemine Göre Hesaplanması	68
3.6.5. Yara iyileşmesinde Hyp(Hydroxyproline) seviyelerinin ELISA yöntemi ile ölçülmesi	69
3.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	70
3.7.1.Mikrodilüsyon Testi	70
3.7.2. Disk Difüzyon Testi	70
3.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	71
4. BULGULAR	73
4.1.Hücre Canlılık Testi	73
4.2. Hücre Göçü (Rejenerasyon / Yara İyileşme Testi)	74
4.3. İmmunokimyasal bulgular.....	76
4.4. Elisa Sonuçları.....	81
4.5. Antimikrobiyal Çalışmalar	83
4.5.1.Mikrodilüsyon Yöntemi	83
4.5.2.Disk Difüzyon Yöntemi	87
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	100
7. KAYNAKLAR.....	101

ÖZET

BUPIVAKAİN VE DEKSMEDETOMİDİN'İN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN IN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Yara, vücudun herhangi bir dokusunda travmalar, kesikler, yanıklar veya diğer dış etkenler nedeniyle biyolojik dokunun bütünlüğünün bozulmasıdır. Anatmik, fizyolojik ve fonksiyonel işlevlerde bozulmalara yol açar. Yara iyileşmesi, yalnızca yara bölgesiyle sınırlı kalmayıp vücudun tüm sistemlerini etkileyen karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, hücresel ve fizyolojik değişiklikleri içerir ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Büyüme faktörleri, hücre proliferasyonunu ve kan hücreleri ile hücre dışı matriksin üretimini düzenler, böylece iyileşme sürecinde hücresel, fizyolojik ve kimyasal değişiklikler organize olur.

Bupivakain, uzun etkili bir lokal anesteziktir ve kaudal, epidural, spinal anestezi, periferik sinir blokları gibi çeşitli anestezi tekniklerinde yaygın olarak kullanılır. Hem cerrahi işlemler sırasında anestezi için hem de akut ve kronik ağrı yönetimi için etkili bir seçenektir. Bupivakainin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri ve antimikrobiyal özellikleri tartışmalı olup, bu konu üzerinde daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Alfa-2 adrenerjik reseptörlere yüksek selektiviteyle bağlanan güçlü bir agonist olan deksmedetomidin; sempatik inhibisyon, sedasyon, amnezi ve analjezik özelliklerine sahiptir. Lipofilik yapısı sayesinde merkezi sinir sistemine kolay geçer ve hastalarda bilinçli sedasyon sağlar. Son dönemde anestezi amaçlı lokal infiltrasyon ile kullanımı yaygınlaşan deksmedetomidinin; yara iyileşmesi üzerine etkileri, antinflamatuar ve antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan çalışmalar ise oldukça sınırlıdır.

Biz çalışmamızda bupivakain, deksmedetomidin ve bunların birlikte kullanımının yara iyileşmesi üzerine etkilerini ve antimikrobiyal özelliklerini in vitro olarak araştırmayı planladık. Bu çalışmada, insan fibroblast hücreleri olarak, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Hayvan Hücre ve Doku Kültürü

Laboratuvarı stoklarında bulunan, sünnet derisi hücre hatları (ATCC CRL2522; BJ Skin Fibroblast Human Lot: 70027151) kullanılmıştır. Öncelikli olarak ilgili ilaçların hücrelerin canlılıklarını hangi dozda nasıl etkiledikleri MTT ile belirlenmiş ve bulunan etkin bupivakain ve deksmedetomidin konsantrasyonları kullanılarak hücre göçü ve yara iyileşme analizi yapılmıştır. BJ hücreleri 6 gözlü kültür plakalara ekildikten sonra %80-90 konfluensiye hücrelerin üzerine steril P200 pipet ucu ile bir 'çizik' oluşturulmuş, ve hücreler belirlenen etkin dozlarda bupivakain ve deksmedetomidin içeren besi ortamları ile inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat kültüre edilmiş ve her 24 saatte bir inverted mikroskop altında foto raflanmıştır. Yara iyileşme oranları alansal olarak Image J yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Hücre kültürü pelletinden elde edilen nükleik asitlerin RT-PCR ile Tnf-alfa, interlokin 6 ve interlokin 10 ekspresyon düzeyleri, ELISA ile hidroksiprolin seviyeleri analiz edildi.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için disk difüzyon testi ve mikrodilüsyon testi kullanıldı. İlaçların antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenebilmesi için öncellikle *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *S. aureus* ve *E. faecalis* patojen bakteri suşları ve *C. albicans* ve *C. utilis* patojen fungus suşları kullanılmıştır. Inkübasyon sonrası her bir diskin zone çapı ölçülerek antimikrobiyal etkinlikleri kantitatif olarak değerlendirildi. Mikrodilüsyon yöntemi ile ilacın bakteri ve fungus hücrelerinin %50'sini inhibe eden doz miktarı; MIC50, GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA) yazılımı yardımı ile hesaplanıldı.

Çalışmamızda bupivakainin yara kapanma oranlarını d ş rd  , deksmedetomidinin ise yara kapanma oranını arttırdığı, her iki ilacın birlikte kullanıldığında ise yara kapanma oranının kontrole benzer olduğu bulundu. Bupivakain ve deksmedetomidin için hazırlanan her deney grubunda MIC değeri %50 altında olarak saptandı.

Sonuc olarak; bupivakain ve deksmedetomidinin lokal olarak uygulandığında bupivakainin yara yeri iyileşmesini geciktirdi ini, deksmedetomidinin ise genel olarak yara yeri iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu saptadık. Bu iki ilaç birlikte kullanıldığında, deksmedetomidinin bupivakainin olumsuz etkilerini

azaltabileceği kaanatindeyiz. İki ilacında uygulanan dozlarda çalışılan mikroorganizmalar üzerinde anlamlı antimikrobiyal etkinliğinin olmadığını saptadık. Ancak antimikrobiyal özellikleri açısından daha fazla alışmaya gerek olduğunu dşnmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Bupivakain, Deksmetomidin, Yara iyileşmesi, İnflamasyon, In vitro, izik testi, Antimikrobiyal



ABSTRACT

IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BUPIVACAINE AND DEXMEDETOMIDINE ON WOUND HEALING AND THEIR ANTIMICROBIAL PROPERTIES

A wound is the disruption of the integrity of biological tissue in any part of the body due to trauma, cuts, burns, or other external factors. It leads to disruptions in anatomical, physiological, and functional functions. Wound healing is a complex biological process that not only affects the wound area but also impacts all systems of the body. This process involves cellular and physiological changes and is regulated by growth factors. Growth factors regulate cell proliferation and the production of blood cells and extracellular matrix, thus organizing cellular, physiological, and chemical changes during the healing process.

Bupivacaine is a long-acting local anesthetic commonly used in various anesthesia techniques such as caudal, epidural, spinal anesthesia, and peripheral nerve blocks. It is an effective option for both anesthesia during surgical procedures and for acute and chronic pain management. The effects of bupivacaine on wound healing and its antimicrobial properties are controversial, and further research is needed on this topic.

Dexmedetomidine, a potent agonist with high selectivity for alpha-2 adrenergic receptors, has sympatholytic, sedative, amnesic, and analgesic properties. Due to its lipophilic structure, it easily crosses the central nervous system and provides conscious sedation in patients. Recently, the use of dexmedetomidine for local infiltration in anesthesia has become more common. However, studies on its effects on wound healing, as well as its anti-inflammatory and antimicrobial effects, are quite limited.

In our study, we planned to investigate the effects of bupivacaine, dexmedetomidine, and their combined use on wound healing and antimicrobial properties in vitro. In this study, human fibroblast cells from the stock of the Animal Cell and Tissue Culture Laboratory, Faculty of Pharmacy, Tokat Gaziosmanpaşa University, specifically foreskin cell lines (ATCC CRL2522; BJ Skin Fibroblast

Human Lot: 70027151), were used. Initially, the effects of the relevant drugs on cell viability at different doses were determined using MTT, and the identified effective concentrations of bupivacaine and dexmedetomidine were used to perform cell migration and wound healing analysis. After seeding BJ cells onto 6-well culture plates, a 'scratch' was made on the cells with a sterile P200 pipette tip once they reached 80-90% confluence, and the cells were incubated with growth media containing bupivacaine and dexmedetomidine at the identified effective doses. The cells were cultured for 48 hours and photographed every 24 hours under an inverted microscope. Wound healing rates were calculated spatially using Image J software. The expression levels of Tnf-alpha, interleukin 6, and interleukin 10 in nucleic acids obtained from the cell culture pellet were analyzed by RT-PCR, and hydroxyproline levels were assessed using ELISA.

Disk diffusion and microdilution tests were used to determine antimicrobial activity. To identify the antimicrobial activities of the drugs using the disk diffusion method, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, and *E. faecalis* pathogenic bacterial strains, as well as *C. albicans* and *C. utilis* pathogenic fungal strains, were initially used. After incubation, the zone diameter of each disk was measured, and antimicrobial activities were quantitatively assessed. The microdilution method was used to calculate the dose that inhibits 50% of bacterial and fungal cells, referred to as MIC50, using GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA) software.

In our study, it was found that bupivacaine reduced wound closure rates, while dexmedetomidine increased wound closure rates. When both drugs were used together, the wound closure rate was similar to the control. The MIC value for both bupivacaine and dexmedetomidine in each experimental group was determined to be below 50%.

As a result, we found that when applied locally, bupivacaine delayed wound healing, while dexmedetomidine generally had a positive effect on wound healing. When both drugs were used together, we believe that dexmedetomidine may reduce the negative effects of bupivacaine. We determined that neither drug showed significant antimicrobial activity against the microorganisms tested at the applied

doses. However, we believe that further studies are needed to explore their antimicrobial properties.

Keywords: Bupivacaine, Dexmedetomidine, Wound healing, Inflammation, In vitro, Scratch test, Antimicrobial



SİMGELER VE KISALTMALAR

TGF- α : Transforme Edici Büyüme Faktörü-Alfa

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta

MCP-1: Makrofaj Kemoatraktan Proteini

MMP-1,2,3 ve 9: Matriks Metalloproteinaz-1,2,3 ve 9

ECM: Ekstraselüler Matriks

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

VEGF: Vasküler Endotel Büyüme Faktör

VEGFR: Vasküler Endotel Büyüme Faktör reseptörleri

IFN- γ : İnterferon gama

PDGF: Platelet Kökenli Büyüme Faktör

G-CSF: Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör

GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

NK: Doğal öldürücü

HGF: Hepatosit Growth Faktör

bFGF: Bazik Fibroblast Büyüme Faktör

TNF: Tümör Nekroz Faktör

PMNL: Polimorfonükleer lökosit

vWF: Willebrand faktörü

ADP: adenzin difofat

ATP: Adenzin Trifofat

FGF: Fibroblast Büyüme Faktör

MMP: Metaloproteazlar

IL-1,2,6,8 ve 10: İnterlokın-1,2,6,8 ve 10

KGF: Keratinosit Büyüme Faktör

Na: Sodyum

VGSC: Voltaj Kapılı Sodyum Kanal

Ca: Kalsiyum

IV: İntervenöz

FDA: Food and Drug Administration

HCl: Hidroklorik Asit

mg: miligram

kg: kilogram

°C: Santigrat derece

SKA: Serebral Kan Akımı

GABA: Gama aminobütirik asit

PABA: p-aminobenzoik asit

NMDA: N-Metil-D-Aspartat

PRP: Platelet-zengin plazma

HBO: Hiperbarik oksijen

GAPDH: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz

EEG: Elektroensefalografi

RIVA: İntravenöz rejijyonel anestezi

ng: nanogram

mm: milimetre

ark. : arkadaşları

IL-1: interlokin 1 beta

µg: mikrogram

MAK: Minimum Alveolar Konsantrasyon

TOGÜ: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

gr: gram

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

İp: İntraperitoneal

Dk: Dakika

Cm: santimetre

cm²: santimetre kare

RT-PCR: Revers- Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

RNA: Ribonükleik asit

RL: Ringer Laktat

DNA: Deoksiribonükleik asit

RT: Revers transkripsiyon

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hyp: Hidroksiprolin

H&E: Hematoksilen Eozin

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

CT: cycle threshold

K: kontrol

B: Bupivakain

Bup: Bupivakain

Dex: Deksmetomidin

D: Deksmetomidin

B + D : Bupivakain + Deksmetomidin

min: minimum

max: maksimum

OD: optical density

μm^2 : mikrometre kare

μm : mikrometre

TIVA: Total intervenöz anestezi

MIC: Minimum inhibisyon konsantrasyonu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Derinin histolojik yapısı(17).....	4
Şekil 2. Yara iyileşme süreci(7).	11
Şekil 3. Yara iyileşme evrelerinin şeması(37).	11
Şekil 4. Deri yaralanmasının ardından inflamasyon basamağı; hemostaz ile inflamatuvar hücreler(49).....	18
Şekil 5.. Proliferatif Evre: Tıkaç organizasyonu, kollajen III sentezi, büyüme faktörlerinin salınımı ile anjiyogenezin başlaması(49).	21
Şekil 6. Maturasyon Evresi: Tamir süreci sona erer ve bağ dokusunun remodellingi ve yara kontraksiyonu(49).	23
Şekil 7. Bupivakain'in moleküler yapısı(89).	42
Şekil 8. Deksmetomidin'in moleküler şekli(95).	46
Şekil 9. Real Time Pcr Cihazı (Analytic Jena qTower).....	54
Şekil 10. Elisa sonuçlarını gösteren preparatlar.....	55
Şekil 11. BJ deri hücre hatlarının ters faz ışık mikroskobu görüntüleri (a. 4x büyütme, b. 10x büyütme)	56
Şekil 12. Altı gözlü hücre kültür pleytinde Yara modeli oluşturulması	60
Şekil 13. RNA eldesindeki yapılan işlemlerin adım adım şematize olarak gösterimi.....	61
Şekil 14. Real Time Pcr Cihazı çıktısı ve CT hesaplanması'nın şematik gösterimi(130).	67
Şekil 15. Disk difüzyon yönteminin grafiksel gösterimi	71
Şekil 16. Çizik yara alanı oluşturulan BJ hücreleri 4X büyütme ile mikroskop görüntüleri Olympus CKX42(Tokyo,Japan).....	74
Şekil 17. Gruplardaki TNF- α gen ekspresyonu kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) şematik gösterimi	78
Şekil 18. Gruplardaki IL-6 gen ekspresyonu kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) şematik gösterimi.....	79

Şekil 19. Gruplardaki IL-10 gen ekspresyonu kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) şematik gösterimi.....	80
Şekil 20. Human Hyp (Hidroksiprolin) ELISA (ELK Biotechnology, Wuhan, Hubei, China) Kit prosedürüne göre çizilen standart grafik	81
Şekil 21. Antibakteriyel analizde Mikrodilüsyon yöntemi aşamaları.....	83
Şekil 22. Bupivakainin bakteri ve fungus suşlarına karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin grafiksel gösterimi	84
Şekil 23. Deksmetomidinin bakteri ve fungus suşlarına karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin grafiksel gösterimi	85
Şekil 24. Bupivakain ve Deksmetomidin karışımının bakteri ve fungus suşlarına karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin grafiksel gösterimi	86
Şekil 25. Disk difüzyon yöntemi çalışmaları	87
Şekil 26. S.Aureus ile hazırlan agar plağının görüntüsü(A). P. aeruginosa ile hazırlan agar plağının görüntüsü(B). K. pneumonia ile hazırlan agar plağının görüntüsü(C).	88

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Yara İyileşmesinde Görevli Hücreler(38, 39).	12
Tablo 2. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin kaynakları ve görevleri(36).....	35
Tablo 3. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin kaynakları ve görevleri(36, 38, 39).....	36
Tablo 4. Revers transkripsiyonun yapıldığı reaksiyon koşulları	64
Tablo 5. Revers transkripsiyonun yapıldığı termal koşullar.....	64
Tablo 6. Real time PCR için kullanılan primer diziler(128, 129).	65
Tablo 7. PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler	66
Tablo 8. ELISA ve RT-PCR için kullanılan kimyasal malzemeler.....	69
Tablo 9. MTT testinde kullanılan ilaç dozları	73
Tablo 10. Hücre canlılık testi sonuçları	73
Tablo 11. 24 ve 48. Saatteki % kapanma oranları	75
Tablo 12. % kapanma oranlarının grafiksel gösterimi	75
Tablo 13. Real Time Pcr Cihazı ile edilen dokulardaki TNF- α , IL-6, ve IL-10 C_T değerleri.....	77
Tablo 14. TNF- α gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) verileri	77
Tablo 15. IL-6 gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) verileri	78
Tablo 16. IL-10 gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) verileri	79
Tablo 17. OD değerleri kullanılarak hesaplanan doku hidroksiprolin konsantrasyonları	82

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yara, vücudun herhangi bir dokusunda travmalar, kesikler, sıyrıklar, yanıklar, batmalar veya diğer dış etkenler sonucu meydana gelen, biyolojik dokunun bütünlüğünün zarar görmesi ve anatomik, fizyolojik ile fonksiyonel işlevlerin bozulması durumudur(1, 2). Yaralar, biçimleri, etiyolojileri ve iyileşme süreleri dikkate alınarak akut ve kronik olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır(3). Akut yaralar, fonksiyonel ve anatomik onarımlar sonucunda zamanında ve düzenli bir iyileşme süreci izleyerek kendiliğinden iyileşen ve normal seyrini sürdüren yaralar olarak tanımlanır. Genellikle kısa süreli ve ani travmalar ya da zararlar sonucu ortaya çıkarlar. Bu nedenle, akut yaraların iyileşme süresi genellikle daha kısa sürer(4). Kronik yaralar, iyileşme süreci bir ay veya daha uzun süren ve bazen hiç iyileşme göstermeyen yaralardır. Normal iyileşme sürecinden sapar ve genellikle uzun süreli bakım gerektirir(5). Yara iyileşmesi, yalnızca yara bölgesini değil, vücudun tüm sistemlerini etkileyen karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, hücresel ve fizyolojik değişiklikleri içerir ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Büyüme faktörleri, hücre proliferasyonunu kontrol eder, böylece kan hücrelerinin, hücre dışı matriksin üretiminin ve parankimal hücrelerin çoğalmasının sağlandığı bir dizi hücresel, fizyolojik ve kimyasal değişikliği organize eder(6). Yara iyileşmesi genellikle dört ana aşamaya ayrılır: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon (epitelizasyon) ve yeniden şekillenme (remodeling)(7).

Yara ve yara iyileşme süreci, tıp alanında önemli bir araştırma konusudur. Yara iyileşmesinin etkin bir şekilde yönetilmesi, komplikasyonları azaltarak, tedavi sürecinin hızlandırılmasını sağlar(8). Yara iyileşme sürecindeki aksaklıklar, hastaların iyileşme sürelerini uzatarak enfeksiyon gelişme riskini artırır. Bu durum, hastaların daha uzun süre hastanede kalmasına ve tedavi maliyetlerinin artmasına yol açar. Ayrıca, iyileşme sürecindeki bozulma, hasta konforunu olumsuz etkileyerek, tedavi sürecinin genel kalitesini düşürür(9). Tüm bu sebeplerden dolayı, yara ve yara iyileşme sürecini anlamak amacıyla birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Kimyasal güvenliği test etmek ve yeni ilaçlar keşfetmek amacıyla genellikle kültürlenmiş hücrelerle

yapılan in vitro hücre canlılığı ve sitotoksosite deneyleri, son yıllarda önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bu deneyler, bir bileşiğin toksik etkilerini değerlendirmek ve aynı zamanda tümör hücrelerinin büyümesini engelleme potansiyelini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı ve maliyet açısından etkili olmalarının yanı sıra, hayvan deneylerine gerek duymamaları, bu testlerin araştırma alanındaki uygulamalarını hızla arttırmaktadır(10).

Bupivakain, uzun süre etkili bir lokal anesteziiktir ve birçok farklı anestezi tekniğinde yaygın olarak kullanılır. Bunlar arasında kaudal, epidural, spinal anestezi ve periferik sinir blokları bulunur. Bupivakain, hem cerrahi işlemler sırasında anestezi sağlamak hem de akut ve kronik ağrı yönetimi için etkili bir seçenek olarak tercih edilir(11). Bupivakainin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri ve antimikrobiyal etkileri hakkında tartışmalı çalışmalar olmakla beraber daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Deksmedetomidin, güçlü ve yüksek selektiviteye sahip bir alfa-2 adrenerjik reseptör agonistidir. Bu ilaç, sempatik inhibisyon, sedasyon, amnezi ve analjezik özellikleriyle bilinir. Deksmedetomidin, medetomidinin S-enantiyomeridir ve lipofilik (yağda çözünebilen) bir bileşiktir. Bu özellik, ilaçların merkezi sinir sistemine geçişini kolaylaştırır ve hastalarda bilinçli sedasyon sağlar. Ayrıca, analjezik etki göstererek, ağrı yönetimine katkı sağlar. Deksmedetomidin, solunum depresyonuna yol açmadan etkisini gösterir, bu da onu anestezi uygulamalarında özellikle avantajlı kılar(12). Son yıllarda lokal infiltrasyon amacıyla kullanımı yaygınlaşan deksmedetomidinin yara iyileşmesi üzerine etkileri, antinflamatuar ve antimikrobiyal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır.

Bu çalışmamızda bupivakain, deksmedetomidin ve bunların birlikte kullanımının yara iyileşmesi üzerine etkilerini ve antimikrobiyal etkilerini in vitro olarak araştırmayı planladık.

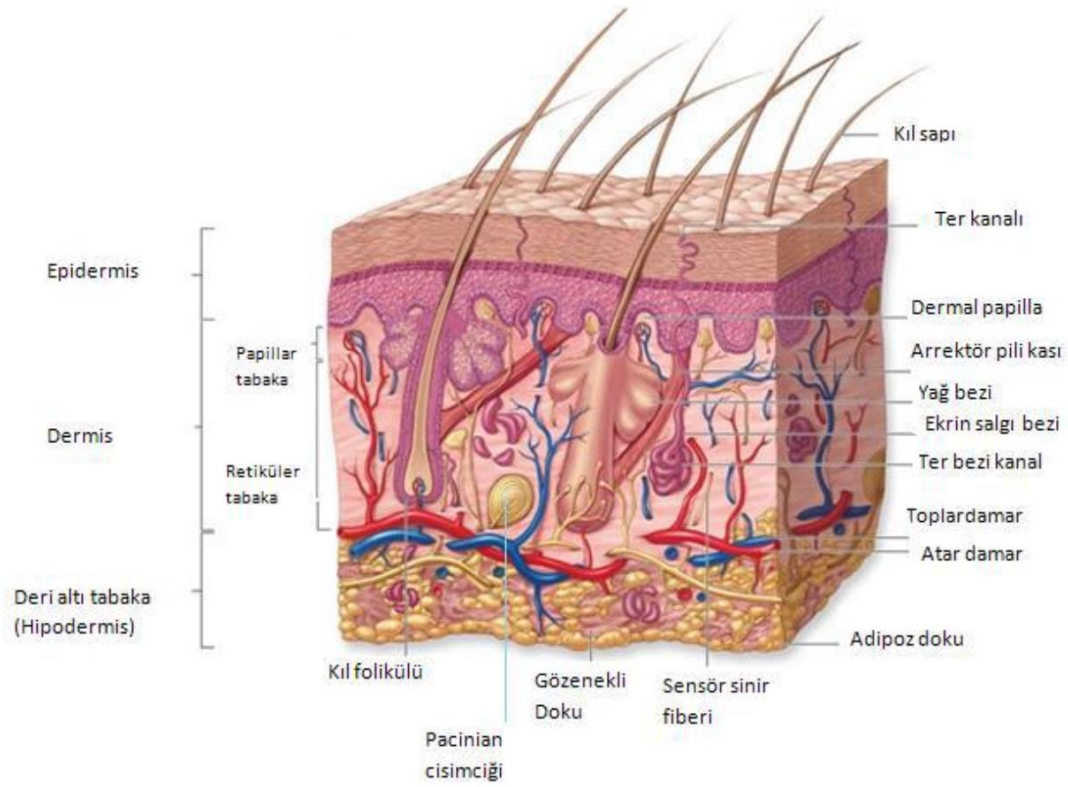
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Vücudumuzda en fazla yer kaplayan organımız, deridir. Cilt, yaklaşık 4 kg ağırlığa sahip olup, vücut ağırlığının %16'sını oluşturur. Ayrıca, ortalama bir insanın derisinin yüzey alanı 1.8 m²'dir(13).

Deri, iç organlarımızı dış etkenlerden koruyan bir savunma bariyeri görevi üstlenir. Vücudu ısı kaybından korur ve sıvı dengesini düzenler. Cildin dört temel işlevi vardır; duyu algılama, sıcaklık düzenlemesi, koruma ve metabolizma. Deri, aynı zamanda bir duyu organıdır; ağrı, sıcaklık, basınç ve dokunma gibi duyları algılayan farklı tipte reseptörler içerir ve enfeksiyonlara, kimyasal etkenlere, sıcaklık değişimlerine ve zararlı ışınlarla karşı bir bariyer işlevi görür. Derinin iç katmanında bulunan hipodermis ise yağ dokusu depolayarak D vitamini üretimi ve lipid depolanmasında önemli bir rol oynar(14).

Deri, üç ana doku katmanından oluşan bir organ sistemidir. Bu katmanlar, yüzeyden içeriye doğru sırasıyla epidermis, dermis ve hipodermis olarak adlandırılır(15). Epidermis, vücudun dış yüzeyini oluşturan deri katmanıdır ve ektodermal bir kökene sahiptir. Öte yandan, dermis ve hipodermis, mezoderminden köken alır. Bu üç katman, derinin yapısal bütünlüğünü sağlayarak vücuda önemli bir koruma ve işlevsel destek sunar(16).



Şekil 1. Derinin histolojik yapısı(17)

2.1.2.Epidermis

Epidermis, sürekli olarak yenilenen, keratinize olmuş ve çok katlı yassı bir epitel dokusudur. Ayrıca epidermis, kıl folikülleri, yağ bezleri, ekrin ve apokrin ter bezleri gibi epidermal uzantıların köken aldığı tabakadır(18).

Epidermis, sürekli olarak yenilenen bir epiteldir ve keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerini içerir. Keratinositler, epiderminin temel yapı taşıdır. Keratinositlerin farklılaşmasına göre epidermis dört ana katmandan oluşur. Bunlar içten dışa doğru; stratum basalis, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum korneum'dur(19-21).

2.1.3.Dermis

Dermis cilt dokusunu destekleme, esneklik sağlama ve koruma görevi üstlenen epidermis ile subkutanöz doku arasında yer alan bir tabakadır. Bileşiminde kan damarları, sinirler ve lenf damarlarını içerir ve bunlar termoregülasyon (vücut sıcaklığını düzenleme) ve duyuşsal algılama gibi işlevleri yerine getirir. Fibroblastlar, dermisin birincil hücreleri olarak öne çıkar(22). Dermis fibroblastlar, makrofajlar, ter bezleri, yağ bezleri, kıl folikülleri, mast hücreleri, vasküler damarlar, lenfatik damarlar ve sinir ağları ile entegre bir sistemdir(16). Dermis, kolajen ile elastik liflerin birleşiminden oluşan güçlü bir yapıdır. Dermis yüksek oranda Tip 1 ve Tip 3 kolajen içermekle birlikte, cildin esneklik ve sıkılığına katkı sağlar. Elastik lifler, elastin ve fibrillin mikrofibrillerinden oluşur ve dermiste, kolajenden farklı olarak, dokunun esnekliğini sağlayan temel yapısal bileşenlerden biridir. Elastinin özgün biyokimyasal konfigürasyonu, liflerin gerilmesine, kaymasına ve gevşemesine olanak tanıyarak cilde dinamik bir esneklik kazandırır(23).

2.1.4.Hipodermis

Hipodermis, deri altındaki en derin tabakadır ve bir çok önemli işlevi yerine getirir. Barındırdığı yağ hücreleri ile vücuda enerji kaynağı sağlar.Vücutta sıvı dengesini korumaya yardımcı olan bir rezerv görevi görür. Soğuk yalıtımı sağlayarak vücut ısısının korunmasında rol oynar, derin dokuları şiddetli travmalara karşı korur, kaldırma kuvvetiyle mekanik destek sağlar ve aynı zamanda metabolik açıdan aktif bir endokrin organ olarak çeşitli hormonların salınımını gerçekleştirir(13). Dermis ve hipodermis yapısal olarak kesin bir sınırla ayrılmaz; bu iki tabaka arasında geçişli bir ilişki bulunur. Ayrıca hipodermis, dermise uzanan kan damarlarının kaynağı olarak vasküler desteğin önemli bir bölümünü sağlar(24).

2.2. Yara

Yara, vücudun herhangi bir dokusunda meydana gelen travmalar, kesikler, sıyrıklar, yanıklar, batmalar veya diğer dış etkenler sonucu biyolojik dokunun bütünlüğünün zarar görmesi ve anatomik, fizyolojik ve fonksiyonel işlevinin bozulmasına denir(1, 2).

Yaralanmalar birçok farklı sebeple meydana gelebilir ve bu nedenler yaralanmanın etiyolojisini ve türünü belirler. Fiziksel, kimyasal, ısı, mikrobiyal ve immünolojik hasar, radyasyon ve cerrahi müdahaleler nedeniyle oluşabileceği gibi kendiliğinden de ortaya çıkabilir. Yaralanma, vücuttaki dokuya zarar verir ve bu zarar yalnızca ciltle sınırlı kalmaz; derin dokularda da hasar meydana gelebilir(2).

Yaralar; biçimlerine, etiyolojilerine ve iyileşme zamanlarına bakılarak akut veya kronik şeklinde 2 gruptan oluşmaktadır(3).

2.2.1. Akut Yara

Akut yaralar, fonksiyonel ve anatomik onarım süreçleri sonucunda zamanında ve düzenli bir şekilde iyileşen; normal yara iyileşme evrelerini takip ederek kendiliğinden kapanma eğilimi gösteren yara tipleridir. Genellikle kısa süreli ve ani bir travma veya zarar sonucu meydana gelirler. Bu sebeple akut yaraların iyileşme süresi daha az zaman alır.

İyileşme süresi genellikle yaklaşık 5 ile 10 gün arasında değişmektedir, fakat 30 güne kadar da sürebilmektedir(4). Akut yaralar genellikle düzenli ve tahmin edilebilir bir iyileşme sürecine sahiptir. Ancak bazı durumlarda iyileşme sürecinde komplikasyonlar ile karşılaşılabilir. Cerrahi yaralar farklı şekillerde iyileşebilir. Temiz, insize edilmiş ve sütürlerle kapatılmış bir yara, primer iyileşme (birincil kapanma) ile iyileşen bir yara olarak tanımlanır(9).

Primer iyileşme sürecinde, yara iyileşmesi beklenenden daha kısa sürede gerçekleşir; iyileşmeyi engelleyen faktörlerin sayısı azdır ve süreç kesintisiz olarak devam eder. Bu süreç belirli fazlardan geçer ve her faz iyileşmenin bir aşamasını temsil eder. İyileşme süreci hızlı, sürekli ve yapısal bütünlüğün yeniden kazanılmasıyla sonuçlanır. Akut yara iyileşmesinde, hemostaz (kanama durdurulması), inflamasyon (iltihaplanma), proliferasyon (doku yenilenmesi) ve yeniden yapılanma (matürasyon) olmak üzere dört temel evre sırasıyla gerçekleşir(25).

Akut yaraların iyileşme spektrumu geniştir. Yara iyileşmesi sürecinde, mekanik bütünlük ve kuvvet önemli bir rol oynar. İyileşme esnasında yaranın gücü

başta zayıf olsa da zamanla iyileşen doku, önceden zarar görmüş bölgenin eski dayanıklılığını kazanmak için sürekli bir artış gösterir. Bu süreç, genellikle belirli bir süre gerektiren, aşamalı bir iyileşme sürecidir ve iyileşen dokunun, yaranın büyüklüğüne ve ciddiyetine bağlı olarak belirli faktörlerden etkilenebilir. Geç iyileşen yaralar, normal süresinde iyileşen yaralara kıyasla daha fazla yıkım kuvveti kaybı ile karakterize olsalar da, sonunda her iki yara tipi de normal iyileşme sürecine ulaşarak aynı bütünlük ve kuvvet seviyesine erişir. Altta yatan patofizyolojik durumlar düzeltildiğinde iyileşmesi gecikmiş yaralar hızlıca iyileşirler. Bozulmuş iyileşme, normal iyileşen yaralarla aynı mekanik kuvvete erişmede yetersizliktir. Diyabet, kronik steroid kullanımı veya radyoterapi gibi faktörler, bağışıklık sistemini zayıflatarak doku iyileşmesini olumsuz etkiler. Bu hastalar, bozulmuş iyileşmeye daha yatkın olup, yüksek riskli yaralarda komplikasyonlar ortaya çıktığında, iyileşme süreci bozulabilir ve kronik, iyileşmeyen yaralar gelişebilir(9).

2.2.2. Kronik Yara

İyileşme süreci en az bir ay süren, hatta bazı durumlarda hiç iyileşmeyen yaralardır. Bu tür yaralar, genellikle normal iyileşme sürecinden sapar ve uzun süreli bakım gerektirir. Kronik yaralar, genellikle altta yatan sağlık problemleri veya dışsal faktörler nedeniyle iyileşme sürecinde aksaklıklar yaşar(5).

Kronik yaralarda anatomik ve fonksiyonel bütünlüğü sağlayan işlemler uygun bir şekilde ilerleyemez veya onarım işlemleri yeterli anatomik ve fonksiyonel sonuçları sağlayamaz. Yara iyileşme aşamalarının en az birinde bazı faktörler sebebiyle değişiklikler görülür. Üç ayda iyileşmeyen yaraların önemli bir kısmı kronik şeklinde kabul edilir. Kronik yaraların çoğunluğunu oluşturan deri ülserleri yapısal olarak kronik kabul edilirler(9).

Kronik yaralar, sürekli inflamasyon, bozulmuş anjiyogenez, zor iyileşen epitelizasyon, dengesiz sitokin seviyeleri, anormal büyüme faktörleri ve yüksek proteaz aktivitesi ile tanımlanır(26).

Kronik yaralar, normal yara iyileşme süreçlerinden saparak iyileşme sürecini bozan bir dizi patolojik durumla karakterize edilir. Bu süreçte, regülatör sinyallere

yanıtsızlık önemli bir rol oynar. Normalde yara iyileşmesinde, hücreler büyüme faktörleri ve çeşitli sinyaller aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarak iyileşme sürecini başlatır ve sürdürür. Ancak kronik yaralarda, bu sinyallere yeterli yanıt verilemez ve bu da iyileşmeyi engeller. Büyüme faktörlerinin yara etrafında aşırı yıkımı olur. Bu aşırı derecede proteolitikdir. Kronik yaralardaki fibroblastların çoğalma potansiyelleri azalmıştır. Büyüme reseptörlerinin uyuması veya azalmış sunumları buna sebep olur(9).

İyileşme süreci geciken yaralar kronik ülserlere neden olup Marjolin ülseri gibi malign seyredebilir. Uzun süre iyileşmeyen herhangi bir yara, malign dönüşüm riski taşıyan bir lezyon haline gelebilir. Malign yaralar, yara kenarlarında dışa dönme olup olmamasına göre malign olmayanlardan ayırt edilebilir. Kronik yaralar, skuamöz ve bazal hücreli kanserlerin gelişimine yol açabilir(9).

Kronik yaralarda yaradaki nekrotik dokuların debridmanı, yara pansumanlarının uygulanması, intravenöz ve lokal antimikrobiyal ajanların uygulanması gibi tedavi yöntemleri bulunur. Spesifik tedaviler yaraya neden olan mekanizmayı hedef alacak şekilde uygulanmalıdır. Yaşamı tehdit eden durumlarda, distal uzuvlar amputasyon gerektirebilir. Özenli bakıma rağmen kronik yaralarda enfeksiyonlar devam ettiğinde tedavi genellikle başarısız olur. Kronik yara enfeksiyonlarının tedavi başarısızlığının en önemli nedenlerinden biri biyofilm oluşumudur(27). Yara iyileşmesinin geciktiği ve debridman gereken kronik yaraların %60'ının biyofilmle ilişkili olduğu bulunmuştur. Akut yaraların sadece %6'sı kronik biyofilm içerir. Nekrotik artıklar, azalmış oksijen miktarı, nemli ortam ve düşük bağışıklık kronik yaralarda bakteri üremesini kolaylaştırır. Bir çalışmada, akut yaralardan farklı olarak, diyabetik ayak ülserleri, basınç ülserleri ve venöz bacak ülserlerinden alınan biyofilm örneklerinde en çok Staphylococcus, Enterococcus ve Pseudomonas türleri izole edilmiştir(28).

2.2.3. Yara İyileşmesi ve Evreleri

Yara iyileşmesi, yalnızca yara bölgesiyle sınırlı kalmayan, aynı zamanda vücudun tüm sistemlerini etkileyen karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, hem

hücresel hem de fizyolojik değişiklikleri içerir ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Büyüme faktörleri, hücrelerin çoğalmasını kontrol ederek kan hücrelerinin oluşumu, hücre dışı matriks üretimi ve parankimal hücrelerin çoğalması gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenler(6). Doku hasarı sonrası; keratinosit, fibroblast, endotel, makrofaj ve trombositlerin de yer aldığı hücresel bir süreç başlar. Hücreler hareket eder, çoğalır ve farklılaşarak yeni doku oluşturur; böylece yara iyileşir ve kapanır. Yara iyileşmesinin hızlanmasını sağlamak için bu biyolojik süreçler çok önemli bir rol oynar ve bu süreçte birçok biyomolekül etkileşimde bulunur. Büyüme hormonları, sitokinler ve kemokinler iyileşmenin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Hızlı ve etkili bir iyileşme sürecinin sağlanabilmesi için endojen iyileşme mekanizmaları, doku hasarının hemen ardından devreye girer(29).

Yara iyileşmesi, yaranın türüne ve iyileşme sürecinin nasıl gerçekleştiğine göre üç ana kategoriye ayrılır: primer iyileşme, sekonder iyileşme ve tersiyer iyileşme. Her bir iyileşme türü, yaranın özelliklerine, iyileşme sürecindeki engellere ve tedavi yaklaşımlarına göre farklılık gösterir.

Primer iyileşme; Minimal epitelizasyon ve yeni doku oluşumu gerektiren, yara kenarlarının doğrudan, düzgün bir şekilde yaklaştırılmasıyla kapatılan yaralarda meydana gelen iyileşme tipidir. Bu tip iyileşme, cerrahi kesi gibi düzgün kenarlı yaralarda sıkça görülür. Yara kenarları, dikiş, zımba, yapıştırıcı veya steristrip gibi yöntemlerle doğrudan kapatılır. Yara kenarları düzgün şekilde kapandığı için iyileşme süreci hızlı bir şekilde başlar(30). Kollajen ve matris proteinlerinin üretimi, birikimi ve lifler arası bağların dengeli şekilde oluşması sayesinde; iyileşme süreci az ödemle, minimum iz bırakarak ve enfeksiyonsuz bir şekilde gerçekleşir(31).

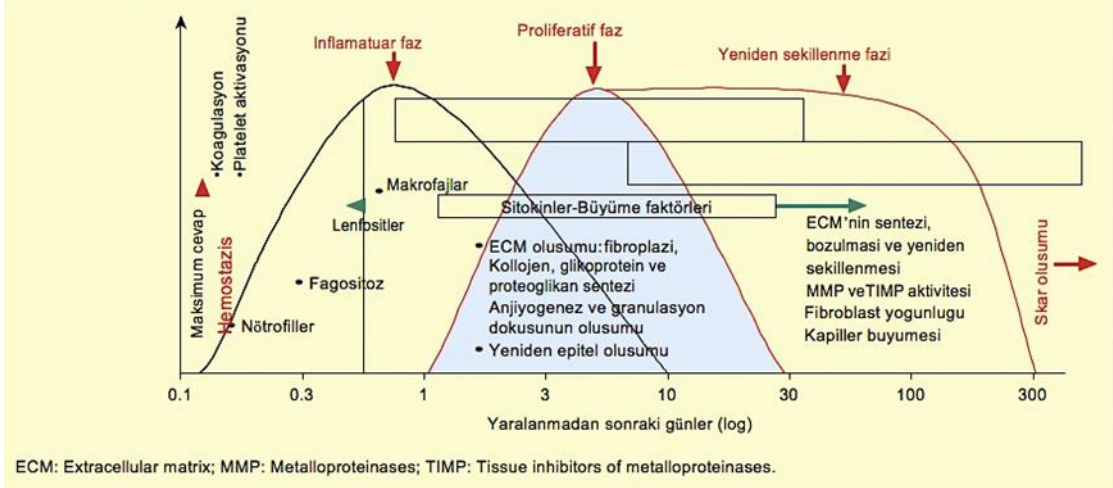
Sekonder iyileşme; Doku kaybı ile karakterize, enfekte, geniş, düzensiz kenarlı yaralarda meydana gelen iyileşme türüdür. Bu tür yaralar, doğrudan kapama ile iyileşemez ve iyileşme süreci, yara kenarlarının birbirine yaklaşmasıyla değil, granülasyon dokusu oluşarak gerçekleşir. Yaranın boşluk kısmı, granülasyon dokusu ile doldurulur ve yara zamanla kapanır(32). Yara cerrahi yöntemlerle kapatılmadığında doku kasılması ve yeniden epitel oluşumu sayesinde iyileşme sağlanır. Eğer deriye ait yapılar korunmuşsa epitel hücreleri bölünüp yüzeyi kaplar.

Ancak bu yapılar yoksa yara daha çok kasılarak ve kenarlardan gelen epitel hücreleriyle kapanır. Böylece yaranın yüzeyi epitel doku ile örtülmüş olur(30).

Tersiyer iyileşme; Sıklıkla enfektif veya tekrar açılmış cerrahi yaralarla ilişkili olan bir iyileşme türüdür. Bu tür yaralarda yara başlangıçta açık bırakılır. Böylece kontaminasyon veya enfeksiyonun tedavi edilmesi veya birincil kapatma öncesi dokunun büyümesi için dokuya zaman tanınır. Enfeksiyonun temizlenmesinden sonra veya yeni dokunun büyümesi sağlandıktan sonra birincil kapama ile yara kenarları yaklaştırılarak kapatılır(33). Yaranın birkaç gün açık bırakılması enfeksiyon ihtimalini azaltır. İyileşme tamamlandığında doku neredeyse primer kapamada olduğu kadar güçlü hale gelir(31).

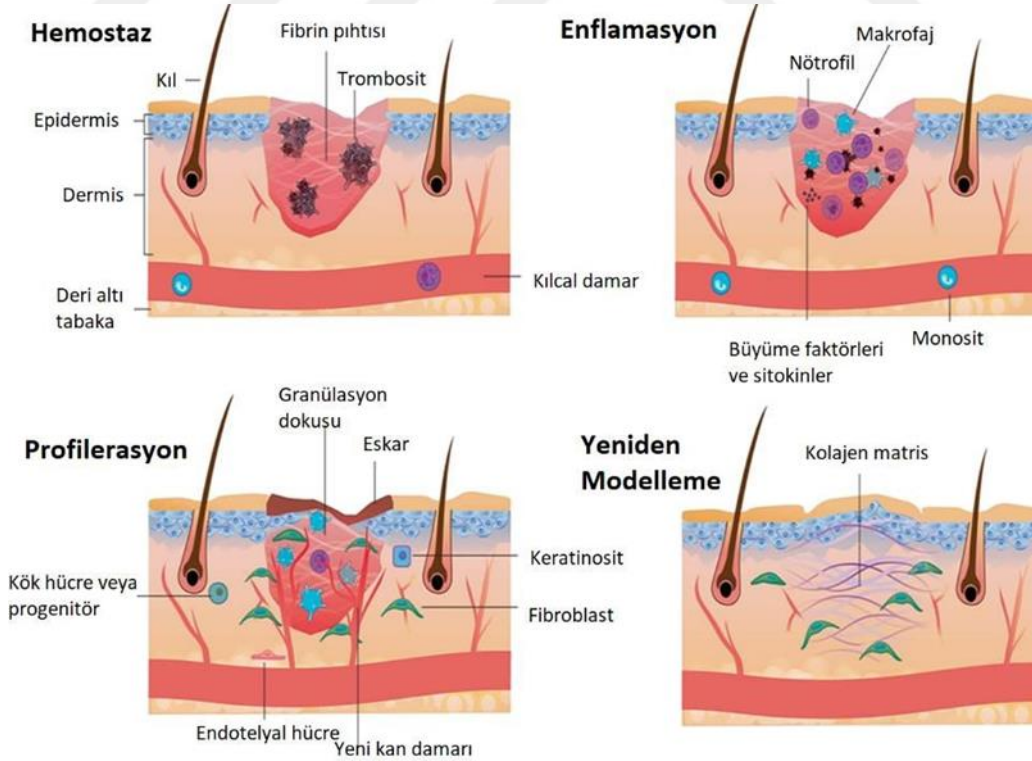
Yara oluştuğunda, trombositler hemen toplanır ve yaralı bölgeye gelir. Trombositler, yaralanan damarların etrafında bir pıhtı oluşturur. Bu pıhtı, fibrin ve trombositlerin birleşerek kanama durdurmasını sağlar. Bu sayede ortama salınan büyüme faktörleri ve hücrel mediatörler, nötrofiller ve monositler gibi enflamatuvar hücrelerin yara bölgesine göçünü sağlar. İnflamatuvar cevap yabancı cisimlerin, bakterilerin ve hasarlı endojen dokunun uzaklaştırılmasını sağlar(29). İnflamatuvar evrenin sonlarına doğru, makrofajlardan salınan büyüme faktörleri fibroblastlar ve epitel hücrelerinin çoğalmasını ve yara bölgesine göç etmesini sağlar. Proliferatif fazda yeni damarlar ve doku oluşur, kollajen üretimi başlar ve epitel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositlerden oluşan granülasyon dokusu gelişir(34). Yara iyileşmesinin tamamlanması birkaç hafta ile aylar arasında sürebilir. Yara kasılması sonrası granülasyon dokusu daha dayanıklı ve stabil bir hücre dışı matriks (ECM) yapısına dönüştürülür(35). Yara iyileşmesi genellikle dört ana aşamaya ayrılır: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon (epitelizasyon) ve yeniden şekillenme (remodeling)(Şekil 2)(7).

Yara iyileşme fazları



Şekil 2. Yara iyileşme süreci(7).

Yara iyileşmesinin herhangi bir aşamasındaki olumsuzluklar veya gecikmeler, yaranın kapanmamasına veya iyileşme sürecinin uzamasına yol açabilir(36).



Şekil 3. Yara iyileşme evrelerinin şeması(37).

Tablo 1. Yara İyileşmesinde Görevli Hücreler(38, 39).

HÜCRE TİPİ	FONKSİYONU
TROMBOSİTLER	Trombüs oluşumu Pıhtılaşma kaskadının aktivasyonu Enflamatuvar mediyatörleri (PDGF, TGF-β, FGF, EGF, histamin, serotonin, bradikinin, prostaglandinler, tromboksan) serbest bırakma
NÖTROFİLLER	Bakterilerin fagositozu Yara debridmanı Proteolitik enzimlerin salınımı Oksijensiz radikallerin üretimi Vasküler geçirgenliği arttırma
MONOSİTLER (MAKROFAJLAR)	Fagositoz ve istilacı bakterileri yok etme Kalıntıları ve nekrotik dokuyu temizleme Sitokinler dahil olmak üzere zengin inflamatuvar mediatör kaynağı Fibroblast bölünmesini, kollajen sentezini ve anjiyogenezi uyarma

LENFOSİTLER	Yara iyileşmesinin proliferatif fazını düzenleme kolajen biriktirme
KERATİNOSİTLER	Enflamatuar mediatörlerin salınması Komşu keratinositleri göç etmeleri için uyarma Neovaskülarizasyon
FİBROBLASTLAR	Granülasyon dokusu sentezi Enflamatuar mediatörlerin salınması, proteazların salınması Kollajen sentezi Hücre dışı matriks bileşenlerini üretme

2.2.3.1. Hemostaz Evresi

Hemostaz, damar zedelendiğinde kan kaybını durdurmak için çalışan bir süreçtir. Bu süreçte damar büzülür, pıhtı oluşur, fibrinle güçlenir ve sonra bu pıhtı çözülür(36).

Hasarlı arteriyel damarlar, kanama sırasında hızla daralır. Bu daralma, sitoplazma içindeki kalsiyum miktarının artmasının aracılık ettiği damar duvarındaki dairesel düz kasların kasılması yoluyla gerçekleşir(40). Çapı 5 mm den küçük olan damarlar kasıldığında tamamen kapanabilir ancak bu yalnızca enine düzlemde yaralanmalarda meydana gelir. Hasarlı damarlar birkaç dakika içinde daralır, bu da kan akışının azalmasına neden olur. Arteriyol daralması, dokuda oksijen eksikliği ve asidoza yol açar. Bu durum, arteriyel damarların genişlemesine neden olan bazı vazomotorik metabolitlerin üretimini tetikler. Bunlar arasında nitrik oksit, adenosin ve diğer metabolitler bulunur. Bu maddeler damarların gevşemesini sağlarken, aynı zamanda mast hücrelerinden histamin salınımını da tetikler. Histamin damarın genişlemesini sağlayıp vasküler geçirgenliği artırarak, yara bölgesindeki hücre dışı boşluğa enflamatuar hücrelerin geçişini kolaylaştırır. Bu süreç, yaraların yeni

oluştığında görülen tipik belirtiler olan sıcaklık artışı, kızarıklık ve şişlik gibi inflamasyon belirtilerini açıklar.(41).

Deri yaralandığında, vücudun verdiği ilk tepki, damar duvarlarının vazokonstriksiyon olayıdır. Bu daralma, kan kaybını hemen sınırlayarak başlangıçtaki kanama hızını azaltır. Ardından birincil hemostaz ve ikincil hemostaz aşamaları devreye girer. Bu aşamalar eşzamanlı olarak ve mekanik olarak birbirine bağlı iki farklı yol aracılığıyla gerçekleşir.(42).

Endotel hücreleri tarafından üretilen endotelin, damar hasar gördüğünde ortaya çıkar ve damarları güçlü bir şekilde daraltır. Bu etki, damar duvarlarının daralmasını sağlar ve kanamayı ilk etapta sınırlamaya yardımcı olur. Ancak bu başlangıçtaki refleks kasılma yalnızca geçici bir çözüm sunar çünkü yaranın çevresindeki artan hipoksi ve asidoz koşulları, damar duvarındaki düz kasların pasif olarak gevşemesine neden olur. Bu gevşeme, kanamanın yeniden başlamasına yol açar. Bu durumu dengelemek için, dolaşımdaki epinefrin, norepinefrin, hasarlı hücrelerden salınan prostaglandinler, koagülasyon ve trombosit aktivasyonu sonucu ortaya çıkan bradikinin, fibronektinler, serotonin ve tromboksan A₂ gibi maddeler, vazokonstriksiyonun daha fazla düzenlenmesine yardımcı olur. Bu moleküller, kanama bölgesindeki damarları daraltarak kanamayı kontrol altına alırken, aynı zamanda pıhtılaşma kaskadının aktivasyonuna da katkı sağlar. Sonuçta, bu süreçler kanamanın sonlanmasına ve yara bölgesinde kalıcı bir pıhtı oluşumuna yol açar(42, 43).

Trombositler, kanama durduktan sonra iyileşme sürecini yönlendiren önemli moleküller üretir. Bu moleküller arasında büyüme faktörleri ve sitokinler bulunur ve bu faktörler iyileşme kaskadını düzenleyerek yara iyileşmesini hızlandırır. Trombositler ayrıca, yaralanma sonrası hücre membranlarında meydana gelen değişikliklere yanıt olarak, araşidonik asit gibi önemli bir bileşiği serbest bırakır. Araşidonik asit, enflamatuvar yanıtı uyaran güçlü sinyal moleküllerine dönüşür. Bu moleküller arasında prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar yer alır(44).

Birincil hemostaz aşamasında, yara bölgesindeki hasarlı endotel hücreleri von Willebrand faktörü (vWF) ve doku tromboplastinini serbest bırakır. vWF, trombositlerin damar duvarının altındaki kollajene yapışmasını kolaylaştırarak, trombositlerin hasar bölgesine toplanmasına yardımcı olur. Bu süreç, trombositlerin birbirine yapışmasını sağlayan trombosit agregasyonunu başlatır. Ayrıca, adenosin difosfat (ADP) ve tromboksan A2 gibi moleküller de serbest bırakılır ve bunlar, trombositlerin daha fazla aktive olmasına ve birbirine yapışmasına yol açar(45).

Sekonder hemostaz, çözünür fibrinojenin çözünmez fibrin liflerine dönüşerek pıhtılaşma ağını oluşturduğu süreçtir(42). Trombositlerin, hasar görmüş damar duvarındaki endotel altı kollajenle teması sonucunda, Faktör 12 (Hageman faktörü) aktive olur. Bu aktivasyon, bir dizi pıhtılaşma faktörünün sırayla aktive olmasına neden olan proteolitik bölünme kaskadını başlatır. Faktör 12'nin aktive olması, Faktör 11 ve Faktör 9 gibi pıhtılaşma faktörlerinin aktif hale gelmesini sağlar. Sonrasında Faktör 10 aktive olur, bu da protrombini trombine dönüştürür. Trombin, aynı zamanda fibrinojenin çözünür formunu fibrinin çözünmez formuna dönüştürür. Fibrin, pıhtı oluşumunda kritik bir rol oynar çünkü fibrin, trombosit tıkaçının etrafında bir ağ yapısı oluşturur ve kalıcı bir pıhtı oluşmasına yardımcı olur(39). Trombosit tıkaçı ve fibrin ağı, birleşerek trombüs adı verilen kalıcı bir yapı oluşturur. Bu yapılar, kanamayı durdurarak yaralanan bölgedeki kan kaybını engeller. Aynı zamanda tamamlayıcıları ve büyüme faktörlerini serbest bırakarak, yara iyileşmesinde kritik olan hücrelerin bölgeye sızmasını sağlar. Trombüs, geçici bir yapı iskelesi işlevi görerek yara iyileşmesinin ilerleyen aşamalarında doku onarımını ve hücre yenilenmeyi destekler(42).

Pıhtı, bol miktarda trombosit içerirken, daha az miktarda fibronektin, vitonektin ve trombospodin gibi molekülleri de barındırır. Pıhtı aktifleşmiş ve degranüle olmuş trombositlerin salgıladığı sitokinler ve büyüme faktörlerinin toplandığı bir mikroçevre işlevi görür. Bu moleküller, hemostaz ve yara iyileşmesi için kritik öneme sahiptir. Özellikle Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) yara bölgesinde kemotaksis sağlarken, Transform edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ECM yapılanmasını düzenler. Ayrıca, Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ve Epidermal büyüme faktörü (EGF), epitelizasyon sürecini desteklerken, Vasküler endotel büyüme

faktörü (VEGF) anjiyogenez sürecinde rol oynar(43). Bu büyüme faktörleri bazı sitokinlerle birlikte, monositlerin ve nötrofillerin yara bölgesine yönlendirilmesinde hayati bir rol oynar(2).

2.2.3.2. İnflamasyon Evresi

İnflamasyon yara bölgesine doğru hücrelerin kemotaksisi ile göç etmesi, artmış vasküler geçirgenlik, sitokinler ve büyüme faktörlerinin salınmasıyla ve göç eden hücrelerin aktive olmasıyla oluşur (36). Bu hücrelerin aktive olması, hemostaz ve pıhtılaşma aşamalarında başlar(46). İnflamasyon evresinin temel amacı, yara bölgesindeki mikroorganizmaların temizlenmesi ve ölü hücrelerin uzaklaştırılmasıdır. Bu süreç, yaranın enfeksiyonlardan korunmasına ve iyileşmenin başlatılmasına yardımcı olur. İnflamasyon fazının fiziksel bulguları arasında ateş, ağrı, ödem ve kızarıklık yer alır. Bu aşama, inflamatuvar yanıt ve hâkim olan inflamatuvar hücre tipine göre erken ve geç inflamatuvar evreler olarak ikiye ayrılabilir. İlk olarak nötrofiller olmak üzere makrofajlar ve lenfositler sıra ile yara alanına girmeye başlar(43).

Yaralanma sonrası 24 saat içinde, yara alanına ilk olarak nötrofiller gelir. Nötrofil migrasyonu, Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β), Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler tarafından uyarılır. Yaralanma sonrası keratinositler, makrofaj kemoatraktan proteini (MCP-1) üretimini artırarak, monositler, makrofajlar, T lenfositleri ve mast hücreleri için güçlü bir kemotaktik uyarıcı oluşturur. Bu kemokinlerin ekspresyonu, özellikle kronik yaralarda devam eder ve polimorfonükleer hücrelerin (PMN) ve makrofajların uzun süreli mevcudiyetine yol açar. Sonuç olarak, bu durum uzun süreli inflamatuvar yanıtı neden olur, bu da iyileşme sürecini engelleyebilir ve yaraların iyileşmesinde gecikmelere yol açabilir(9, 36). Nötrofiller, yaralanmadan sonraki 24–36 saat içinde TGF- β , C3a, C5a ve formilmetionil peptitler gibi kemo-çekici ajanların etkisiyle yaralı dokuya göç eder(4). Kompleman kaskadının aktivasyonu ile birlikte, polimorfonükleer lökositler (nötrofiller), marjinasyon süreciyle damar çeperine doğru yönelir ve endotel hücrelerine yapışır. Bu yapışma, nötrofil adezyonu olarak bilinen aşamadır. Bunu takiben, interlökin-8 (IL-8)'in etkisiyle nötrofillerin 'diapedez' olarak adlandırılan damar endotelini geçme süreci başlar. Diapedez, nötrofillerin kan damarlarının endotel

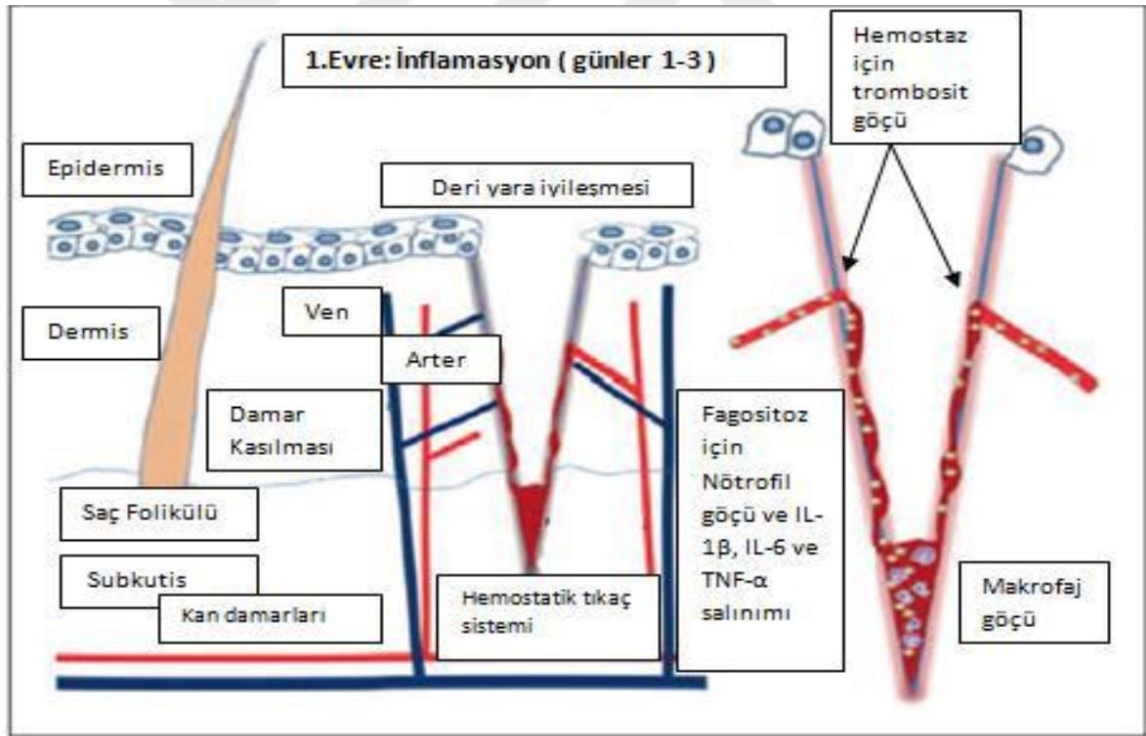
tabakasından geçerek, yaralı dokuya doğru hareket etmelerini sağlayan bir süreçtir(32, 45).

Yara bölgesine gelen nötrofillerin ilk görevi proteolitik enzimler ve oksijen türevli serbest radikalleri salarak yabancı maddeleri, bakterileri ve hasar görmüş dokuyu temizlemektir(47). Nötrofillerin ikinci görevi, sitokinler salgılayarak inflamasyonun erken evresini sürdürmektir. Bu süreçte, nötrofiller; enflamatuvar yanıtı güçlendiren ve yeterli bir onarım için gerekli olan VEGF ve IL-8'i uyaran TNF- α (tümör nekrozis faktörü- α), IL-1 β (interlökin-1 β) ve IL-6 (interlökin-6) gibi sitokinleri serbest bırakır. Bu sitokinler arasında en önemlisi TNF- α 'dır; çünkü TNF- α , nötrofil kemotaksisini arttırarak, anjiyogenez ve kollajen sentezi için gerekli olan makrofaj, fibroblast ve keratinositlerin büyüme faktörü ekspresyonunu uyarır(43, 46). Nötrofiller görevlerini tamamladıktan sonra apoptoza uğrarlar ve ardından ya yara yüzeyinden uzaklaştırılırlar ya da makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdan temizlenirler(39).

Makrofajlar yaralanmadan 48–72 saat sonra hasarlı bölgede toplanarak fagositoz sürecini sürdürürler. Pıhtılaşma faktörleri, kompleman bileşenleri, PDGF, TGF- β , Lökotrien B₄, Trombosit Faktörü IV gibi çeşitli sitokinler ile elastin ve kollajen yıkım ürünleri başta olmak üzere pek çok kemo-çekici ajan makrofajların yaralı dokuya göçünü teşvik eder(4). Makrofajlar, yara alanına gelerek Matriks Metalloproteinaz-1, 2, 3 ve 9 (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) proteazlarını salgılar ve ECM' i degrades ederler. Ayrıca, IL-1 salgılayarak hemostaz, vazodilatör salınımı ve koagülasyon süreçlerinde rol oynarlar. Kollajenaz üretimiyle ilişkili olarak adezyon moleküllerini düzenlerler. Makrofajlar, hücre proliferasyonu, matriks sentezi ve anjiyogenezi İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF), EGF, TGF- β ve VEGF gibi faktörler aracılığıyla sağlarlar(9, 36). Makrofajlar küçük damarların genişlemesini sağlayan ve geçirgenliğini artıran prostaglandin adlı maddeleri üretir. Bu prostaglandinler, endotel hücrelerinin aktivasyonunda önemli bir rol oynar(48). Makrofajların salgıladığı büyüme faktörleri, granülasyon dokusunun oluşumunu yönlendirir ve böylece yara iyileşmesinde proliferasyon evresine geçiş sağlar(32).

Yara alanında monosit ve makrofajların eksikliği, yetersiz hücre temizliği, fibroblast çoğalmasında gecikme ve anjiyogenezin yetersizliği gibi sorunlara yol açarak yara iyileşme sürecinde bozulmalara neden olur(43).

Enflamatuvar fazda, yara bölgesine giren son hücreler, IL-1, kompleman bileşenleri ve immünoglobulin G (IgG) parçalanma ürünlerinin etkisiyle, yaklaşık 72 saat sonra bölgeye çekilen lenfositlerdir. Yara iyileşmesinin 7. gününde lenfositler en yüksek seviyelerine ulaşır(Şekil 5). Lenfositler, interlökin-2 (IL-2) salgılayarak fibroblastları uyarırken, aynı zamanda TGF- β , TNF- α ve İnterferon gama (IFN- γ) da salgırlar. IL-1 kolajenin yeniden yapılandırılmasında, hücre dışı matris bileşenlerinin üretiminde ve bunları parçalayan kolajenazın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar(4, 36).



Şekil 4. Deri yaralanmasının ardından inflamasyon basamağı; hemostaz ile inflamatuvar hücreler(49).

2.2.3.3. Proliferasyon Evresi

Proliferatif faz, çoğunlukla enflamatuar fazı takip eder ve bazen onunla aynı anda gerçekleşir. Bu faz, epitel hücrelerinin çoğalması ve yara içindeki geçici matriks üzerinde migrasyon (yeniden epitelizasyon) ile tanınır(50). Yaraya neden olan etken ortadan kalktığında, hemostaz sağlandığında, inflammatuar yanıt dengeye ulaştığında ve yara artıkları temizlendiğinde, iyileşme sürecinin proliferatif aşaması devreye girer ve yara onarımına başlanır(39). Proliferatif faz yaralanmanın ardından üçüncü günde başlar ve genellikle 2 ila 4 hafta arasında sürer(38). Proliferatif faz yara yüzeyinin yeni epitel hücreleriyle kaplanması (yeniden epitelizasyon), anjiyogenez yoluyla bölgedeki kan damarlarının yeniden oluşumu ve granülasyon süreciyle doku kaybının yeni bağ dokusu ile onarılması aşamalarını kapsar. Bu dönemde yara kontraksiyonu da başlamaktadır(33). Endotel ve epitel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar, yapım aşamasında görev alan hücrelerdir(43). Bu süreçler, kılcak damarların gelişimini, kolajen sentezini ve yaralanan bölgede granülasyon dokusunun oluşumunu teşvik eder. Yara bölgesindeki fibroblastlar ECM'in ana bileşenleri olan glikozaminoglikanlar ve proteoglikanların yanı sıra kolajen de üretirler(50).

Granülasyon dokusu, fibroblastların göçü, kolajen üretimi ve yara kontraksiyonunun gerçekleşmesinin ardından ortaya çıkar(48). Fibroblastların göçünü ve proliferasyonunu başlatan ilk moleküller trombositler tarafından salınan PDGF, TGF- β ve IGF-1'dir. Ardından makrofajlar ve fibroblastlar tarafından salgılanan PDGF, FGF, VEGF-1, IGF-1, IL-1, IL-2, IL-8, TGF- α , TGF- β , ve TNF- α gibi çeşitli sitokin ve büyüme faktörleri, fibroblastların aktivasyonunu, göçünü ve çoğalmasını teşvik eder. Ancak PDGF bu faktörler arasında fibroblastları hem kemotaktik hem de mitojenik açıdan en güçlü şekilde etkileyen büyüme faktörüdür. Fibroblastlar yaralanmanın üçüncü gününde en fazla bulunan hücre türünü oluşturur ve 7 ile 14. günler arasında sayılarının en yüksek seviyeye ulaşır(43).

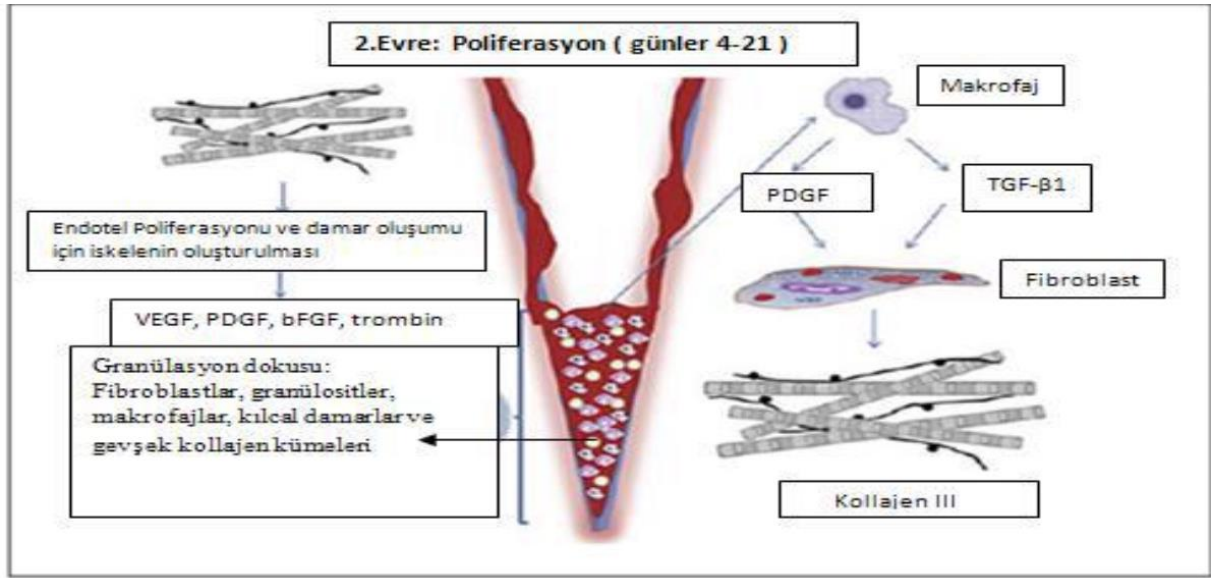
Yaralı bölgede çoğalan fibroblastlar ilk haftanın sonunda matriks proteinleri, fibronektin, proteoglikanlar ve tip 1 ile tip 3 prokollajen üretirler. Bu üretim hücre göçünü teşvik eder ve onarım sürecinde gereken hücre dışı matriks birikiminin sağlanmasına yardımcı olur(4). Fibroblastlar tarafından üretilen kolajenler vücutta en

yaygın bulunan protein grubudur. Hem dokulara güç ve yapı sağlarken yara iyileşmesinde de kritik bir rol oynarlar. PDGF, temel FGF, TGF- β , IL-1 ve TNF- α gibi faktörler, proliferatif ve yeniden şekillenme fazlarında kolajen üretimini tetikler(38). Yara bölgesindeki kolajen miktarı 6 hafta boyunca artar ve bu artış yaranın gerilim gücündeki yükselme ile paralel bir şekilde gerçekleşir(43). Fenotip değiştirip miyofibroblastlara farklılaşan fibroblastlar yaralı bölgeye göç ederler(32). Yoğun bir şekilde paketlenmiş gruplar halinde organize olarak yara kontraksiyonuna katkı sağlarlar. Bu kasılma yaranın boyutunun küçülmesiyle iyileşme sürecini hızlandırır(33).

Anjiyogenez, yeni damar oluşumunun gerçekleştiği ve yara iyileşmesi için gerekli koşulların sağlandığı bir süreçtir. Bu süreç, özellikle makrofajlar ve trombositlerden salınan sitokinlerle uyarılır ve düzenlenir(36). Hücre hasarı ve hipoksi, hasarlı bölgede anjiyogenik etki yaratan faktörlerdir(38). Anjiyogenez kan damarlarının iç yüzeyini örten mikrovasküler endotel hücrelerinin aktive olmasını içerir. Mikrovasküler endotel hücreleri yeni damarların oluşumunda görev alan ve damarların iç yüzeyini kaplayan ana hücre tipleridir. Hipoksik bir yara ortamında endotel hücreleri VEGF, FGF, PDGF- β , TGF- β ve anjiyopoietinler gibi hipoksiye duyarlı pro-anjiyogenik sinyallere tepki verir. Bu hücreler çoğalır ve göç ederek yeni damar oluşumunu başlatırlar(42). Anjiyogenezin son aşamasında, kapillerleri sağlamlaştıran bazal membran tabakasının oluşmasıyla damarların olgunlaşması tamamlanır(32).

Epitelizasyon, yara yüzeyinde dış etkenlere karşı koruma sağlayacak şekilde, keratinize olmuş ve düzenli bir şekilde sıralanan yassı hücrelerden oluşan bir epitel tabakasının meydana gelmesi sürecidir. Epitelizasyon yaralanmanın hemen ardından saatler içinde başlar ve proliferasyon fazı boyunca devam eder. Yara kenarındaki sağlıklı hücreler tüm yara yüzeyini kapatacak şekilde göç ederler(32). Yeniden epitelizasyon yara kenarındaki yerel keratinositler ile kıl foliküllerinden veya ter bezlerinden türetilen epitelyal kök hücreler tarafından gerçekleştirilir(46). Epitelizasyon, yara ortamının nemli olmasını, yeterli besleyici madde miktarını ve etkin bakteriyel kontrolün sağlanmasını gerektirir(43). Yara yerindeki IL-1, IL-6 ve TNF- α sitokinleri, keratinositlerin hareketlerini artırır(42). Yara kenarlarından göç

eden epitel hücreleri birbirlerine temas ettiğinde (kontakt inhibisyonu) yeni epitel tabakasının oluşumu sona erer(32). Epitel oluşumunun ardından keratinositler ve fibroblastlar laminin ve tip IV kollajen üreterek bazal lamina oluştururlar. Bazal lamina üzerinde çoğalan ve bölünen keratinositler çok katmanlı epidermal bariyerin yeniden yapılandırılmasını sağlarlar(43).



Şekil 5. Proliferatif Evre: Tıkaç organizasyonu, kollajen III sentezi, büyüme faktörlerinin salınımı ile anjiyogenezin başlaması(49).

2.2.3.4. Maturasyon ve Remodelling Evresi

Yara iyileşmesinin son aşaması yaralanmanın başlangıcından 2-3 hafta sonra başlayıp 1 yıl veya daha uzun sürebilen yeniden şekillenme sürecidir. Bu aşamanın ana amacı ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesi, bozulması ve sentezlenmesi yoluyla maksimum gerilme dayanımına ulaşmaktır(48).

Skar dokusunun yeniden yapılandırılması kollajen sentezi ve yıkımı arasındaki dengeye bağlıdır ve bu denge yaralanmadan yaklaşık 3 hafta sonra sabit bir hale gelir. Kollajen yıkımı granüositler, nötrofiller, makrofajlar, epidermal hücreler ve fibroblastlar tarafından salınan metalloproteazlar yani kollajenaz enzimleri tarafından

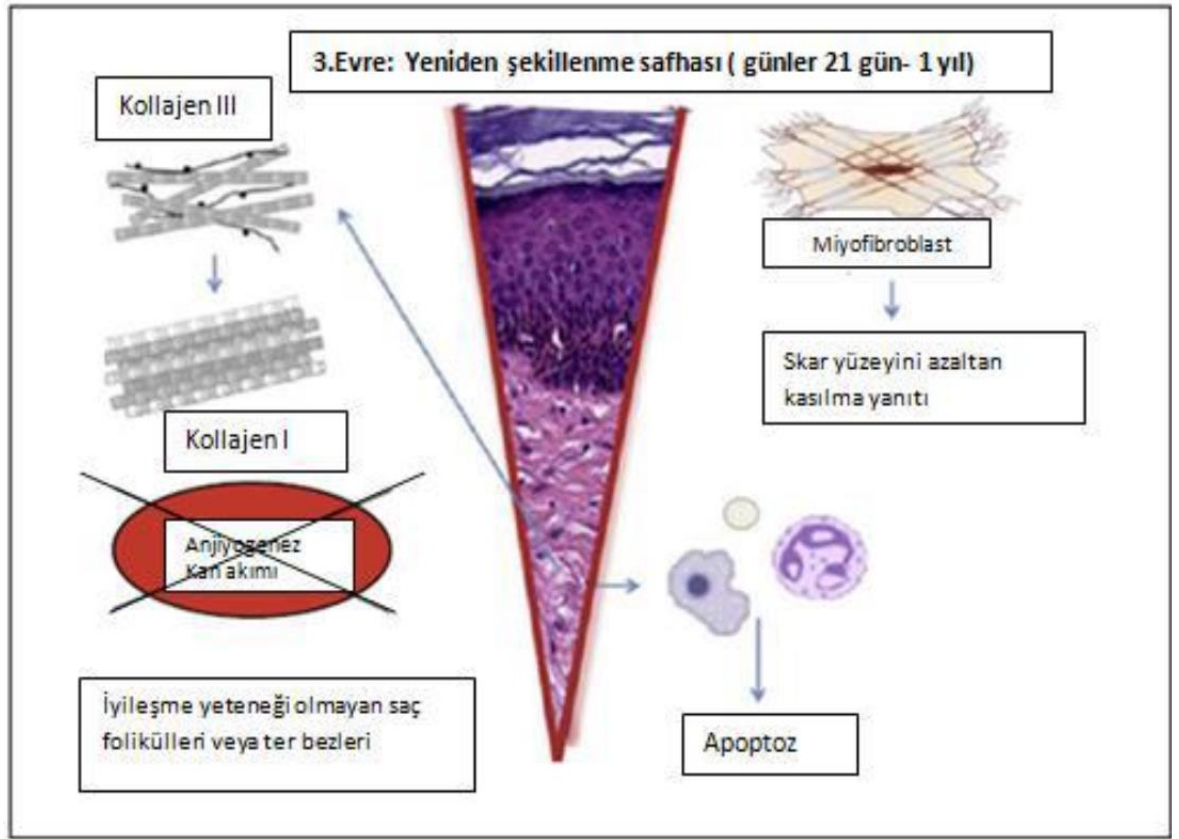
düzenlenir. Çinko iyonlarına bağımlı olan metalloproteinazların üretimini teşvik eden büyüme faktörleri arasında IL-1, PDGF ve IGF-1 yer alır(4, 32).

Bu aşamanın temel özelliği yara bölgesinde kollajen birikmesidir. Kollajen birikiminin miktarı, oranı ve kalitesi yara gerilme mukavemeti üzerinde önemli bir etki yaptığı için bu süreç klinik olarak büyük bir öneme sahiptir. Yara yatağında matriks birikimi belirli bir düzeni takip eder. İlk olarak tip 3 kollajen ve fibronektin, erken dönemdeki matriks iskeletini oluşturur. Daha sonra proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar matriksin diğer bileşenlerini oluşturur. Tip 1 kollajen yara bölgesinde maksimum gerilme kuvvetine 12. haftada ulaşır(51). Fibroblastlar tarafından salınan fibrillin bağ dokusunda elastik liflerin oluşumu için hayati öneme sahiptir(9).

Yara bölgesinde üretilen kollajen ince, glikolize olmuş ve paralel, örgüsüz bir yapıdadır. Kollajenin miktarı ve kalitesi yara gerilme gücünü belirleyen temel faktörlerden biridir. Proliferasyon fazında üretilen kollajen matriks metalloproteinazlar tarafından parçalanır; zamanla tip III kollajen düzeyi azalırken tip I kollajen düzeyi artar. Tip I kollajen daha güçlüdür ve çapraz bağlar içerir(33, 43, 45).

Yara kasılması, fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasıyla başlar ve çevredeki hücre dışı matriksle etkileşimler yoluyla gerçekleşir. TGF- β , PDGF ve temel FGF gibi bir dizi sitokin tarafından tetiklenen bu süreç, skar yüzeyinin küçülmesine yardım eder(38, 46).

Yara iyileşmesi sürecinde fibroblastlar ve makrofajların yoğunluğu apoptoz yoluyla giderek azalır. Zamanla kılcal damarların büyümesi durur, bölgedeki kan akışı azalır ve yara bölgesindeki metabolik aktivite düşer. Sonunda hücre ve kan damarı sayısının azalmasıyla yüksek gerilim gücüne sahip, daha düz, soluk ve pürüzsüz bir yara izi oluşur(4, 52). Yaralanmanın ardından skarın yeniden şekillenme süreci 6 ila 12 ay boyunca devam eder ve sonunda olgun, avasküler ve aselüler bir skar meydana gelir. Ancak bu skarın mekanik dayanıklılığı hiçbir zaman yaralanmamış dokunun gücüne ulaşamaz(36).



Şekil 6. Maturasyon Evresi: Tamir süreci sona erer ve bağ dokusunun remodellingi ve yara kontraksiyonu(49).

2.2.4. Yara İyileşmesine Etki Eden Faktörler

Yara iyileşmesi hem lokal hem de sistemik birçok değişkenin etkisi altında gelişen oldukça karmaşık bir biyolojik süreçtir. Lokal faktörler doğrudan yara bölgesini etkilerken sistemik etmenler bireyin genel sağlık durumu üzerinden iyileşme kapasitesine yön verir. Lokal düzeyde yara bölgesinin oksijenlenme durumu, enfeksiyon varlığı, yaranın yeri ve çevresindeki dokuların kanlanma düzeyi, hipoksi, nekrotik doku varlığı, tekrarlayan travmalar ve bölgenin hareketliliği iyileşme sürecini doğrudan etkileyebilir. Öte yandan sistemik faktörler arasında yetersiz beslenme, sigara ve alkol kullanımı, vitamin ve mineral eksiklikleri, diyabet, ileri yaş, obezite, kronik böbrek yetmezliği, bağışıklık sistemi durumu, kullanılan ilaçlar (özellikle kortikosteroidler), büyüme faktörlerinin seviyesi ile radyoterapi ve kemoterapi gibi tedaviler yer alır. Bu faktörlerin çoğu birbirini etkileyebilir ve sistemik değişkenler

genellikle lokal süreçler üzerinden yara iyileşmesi üzerinde belirleyici rol oynar(53-55).

2.2.4.1. Beslenme

Enerji, karbonhidrat, protein, yağ, vitamin ve mineral metabolizması, yara iyileşme sürecinde kritik rol oynar. Bu besin öğelerinin yeterli düzeyde alınması, iyileşmenin hızını ve kalitesini doğrudan etkiler.

Protein, yara iyileşmesinde en önemli besin öğelerinden biridir. Protein eksikliği, iyileşme sürecinde ciddi sorunlara yol açabilir. Kılcal damar oluşumu, fibroblast proliferasyonu, proteoglikan ve kollajen sentezi gibi temel iyileşme süreçlerinde aksamalara neden olur. Ayrıca yara bölgesinin yeniden şekillenmesinde de zorluklar yaşanabilir. Protein yetersizliği sadece doku onarım süreçlerini değil aynı zamanda bağışıklık sisteminin etkinliğini de olumsuz yönde etkileyerek enfeksiyonlara karşı direncin azalmasına neden olabilir. Lökositlerin fagositoz kapasitesinin azalması ve enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artması bağışıklık sisteminin zayıflamasına yol açar.

Yağlar ve karbonhidratlar, yara iyileşmesi sırasında enerji sağlamak için hayati öneme sahiptir. Besin bileşenleri, anjiyogenez ve doku rejenerasyonu süreçlerinde gerekli enerjiyi sağlayarak iyileşmenin sürdürülebilirliğini destekler. Yeterli enerji alımı, hücrelerin bölünmesi ve yenilenmesi için gereklidir, bu da iyileşme sürecinin etkinliğini artırır. Sonuç olarak yeterli ve dengeli bir beslenme, yara iyileşme sürecini hızlandırır ve komplikasyon risklerini azaltır(44).

2.2.4.2. Yaş, Cinsiyet ve Irk

Yara iyileşmesi, yetişkinlerde çocuklara kıyasla genellikle daha yavaş gerçekleşir. Yaşın artması ile birlikte vücuttaki protein, vitamin ve mineral eksikliklerinin artması buna yol açar. Bu eksiklikler, yaranın iyileşme sürecinde gecikmelere yol açabilir. Ayrıca, yaşlanmayla birlikte, iyileşme sürecinin inflamasyon aşamasında, makrofajlar ve lökositlerin yaranın bulunduğu bölgeye göçü yavaşlar. Bu durum, yaranın temizlenmesi ve enfeksiyon riskinin azaltılması için gerekli olan

inflatuar yanıtın da zayıflamasına neden olabilir. Ayrıca, fibroblast proliferasyonu, kollajen sentezi ve anjiyogenezdeki azalmalar, yaranın iyileşmesini zorlaştıran ve süreci uzatan diğer faktörlerdir(56).

İleri yaştaki bireylerde epidermis tabakası genç bireylere kıyasla daha incedir ve bu durum yara iyileşme sürecinde inflamasyon, hücre göçü ve proliferasyon aşamalarının daha yavaş ve etkisiz seyretmesine neden olabilir. Ayrıca yaşlı bireylerde kronik hastalıkların görülme sıklığı daha yüksek olduğundan bu durum yara iyileşmesini doğrudan veya dolaylı yollardan olumsuz etkileyebilir. Kronik hastalıklar yara iyileşmesini daha da zorlaştırabilir çünkü bu hastalıklar bağışıklık sistemini zayıflatabilir ve iyileşme sürecindeki hücresel yanıtları engelleyebilir. Sonuç olarak, yaşlı bireylerde yara iyileşmesinin yavaşlamasına ve yara ayrılması gibi komplikasyonların artmasına neden olabilir(39).

Yara iyileşmesinde cinsiyetler arasında genellikle belirgin bir fark gözlemlenmemektedir. Ancak bazı genetik ve etnik farklılıklar yara iyileşme sürecini etkileyebilir. Siyahi ırkta, diğer ırklara kıyasla daha fazla keloid oluşumu görülmektedir(31).

2.2.4.3. Vitamin Eksiklikleri

Vitaminler ve mineraller, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan besin öğeleridir. Özellikle A vitamini, keratinizasyon ve fibroblast olgunlaşması üzerindeki etkileri nedeniyle yara iyileşme sürecini hızlandıran bir bileşiktir. A vitamini, epitelizasyonu ve kollajen sentezini uyararak yaranın iyileşmesini destekler. A vitamini eksikliğinde ise yara iyileşmesi gecikir; özellikle epitelizasyon ve kontrakte olarak yaranın küçülme aşamaları yavaşlar, enfeksiyon riski artar. Kortikosteroidler, siklofosfamid, radyasyon tedavisi, diyabet ve bazı tümör tedavileri gibi durumlarda A vitamini takviyesi bu tedavilerin yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkilerini baskıladığı ve iyileşme sürecini hızlandırdığı bildirilmiştir. A, E ve C vitaminleri, antioksidan ve anti-inflatuar özellikleri sayesinde yara iyileşmesi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Özellikle C vitamini, yara iyileşme sürecinde kritik bir rol oynar. C vitamini eksikliği, kollajen sentezi, fibroblast proliferasyonu ve anjiyogenez gibi

önemli iyileşme süreçlerinin azalmasına yol açarken, kapiller kırılabilirlik de artar. Bu durum, yaranın iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebilir ve enfeksiyon riskini artırabilir. C vitamini takviyesi ile yara bölgesinde C vitamini seviyesi 7. gün itibarıyla artar ve bu artış iyileşme sürecini hızlandırır(57).

Vitaminlerin yanı sıra, magnezyum, bakır, çinko ve demir gibi mineraller de yara iyileşmesinde önemli biyokimyasal olayları destekleyen temel besin öğeleridir(43).

2.2.4.4. Sigara ve Alkol kullanımı

Nikotin alkaloid yapıda bir toksin olup yara iyileşme sürecinin tüm evrelerini olumsuz yönde etkileyerek doku onarımını geciktirir ve yara kapanmasını yavaşlatır(44). Nikotin, vazokonstriktör olarak sempatik sinir sistemini etkiler ve ayrıca trombosit yapışkanlığını artırarak bölgesel anemiye yol açar(58). Nikotin, fibroblastlar, eritrositler ve makrofajların çoğalmasını inhibe eder. Karbonmonoksit ise, oksijenden 200 kat daha yüksek bağlanma afinitesiyle hemoglobine bağlanarak methemoglobin üretir ve böylece yaraya oksijen iletimini azaltır(59).

Sigara kullanımı lökosit fonksiyonlarını olumsuz etkileyerek, özellikle makrofaj ve nötrofillerin bakterisidal (mikrop öldürücü) yanıtlarını zayıflatır ve enfeksiyon riskini artırır, fibroblast göçünü ve epitel doku rejenerasyonunu yavaşlatır, hücre dışı matris üretimini ve proteaz dengesini bozar ayrıca yara kontraksiyonunu geciktirir(44, 60).

Alkol tüketimi yara iyileşme sürecini çok yönlü mekanizmalarla olumsuz etkiler. Etanolün toksik etkisi enfeksiyonlara karşı savunmayı zayıflatarak vücut direncinin azalmasına ve erken inflamatuvar yanıtın bozulmasına yol açar. Bununla birlikte alkol anjiyogenez, yara kapanması ve kollajen sentezini baskılamakta ayrıca yara bölgesindeki proteaz aktivitesinin dengesini bozarak iyileşme sürecinin aksamasına neden olmaktadır(44).

2.2.4.5. Hipoksi ve Oksijenizasyon

Yeterli lokal kan akımı ve optimum düzeyde oksijenizasyon yara iyileşme sürecinin sağlıklı bir şekilde ilerleyebilmesi için temel gerekliliklerdendir. Buna karşılık arteriyel kandaki oksijen basıncının düşük olması dokuların oksijenlenmesini azaltarak iyileşme süreçlerini olumsuz yönde etkiler(43).

Tüm yaralar, yerel vasküler beslenme bozuklukları nedeniyle hipoksiye yatkındır. Yeniden epitelizasyonu kolaylaştırmak için belirli bir seviyede hipoksi gerekiyken, yara iyileşmesi için yeterli oksijen temel bir gerekliliktir. Hipoksi nötrofiller ve makrofajlar için kemotaktik bir sinyal görevi görebilse de bu hücrelerin etkili fagositoz yapabilmesi ve fonksiyonlarını tam olarak sürdürebilmesi için yeterli düzeyde oksijen varlığı gereklidir(39). Oksijen yalnızca hücresel metabolizma ve ATP aracılığıyla enerji üretimi açısından değil, aynı zamanda yara iyileşme sürecinin hemen her aşamasında temel bir rol üstlenmektedir. Yaraları enfeksiyondan korur, anjiyogenezi indükler, keratinositlerin farklılaşmasını, göçünü ve yeniden epitelizasyonu artırır, fibroblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini destekler, ayrıca yara kontraksiyonunu teşvik eder. Ayrıca, polimorfonükleer lökositler tarafından üretilen süperoksit seviyesi, oksidatif öldürme için önemli bir faktör olup, kritik olarak oksijen seviyelerine bağlıdır(44, 61).

Oksijen, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında gereklidir. İyileşen dokuların oksijen gereksinimi, diğer dokulardan daha fazladır(62). Travma sahasındaki kılcıl damarların hasar görmesi nedeniyle, yara bölgesi sağlam dokuya göre daha hipoksiktir(63).

Yara alanındaki kollajen sentezi, hipoksiye bağlı bozulur ve bu da skar dokusunun yetersiz gelişmesine yol açar. Hiperbarik oksijen tedavisi, yaranın oksijenizasyonunu artırarak yara iyileşmesine olumlu katkı sağlar(64).

2.2.4.6. Kemoterapi-Radyoterapi

Radyoterapi, uygulanan radyasyon düzeyine bağlı olarak hücre proliferasyonunu, kollajen sentezini, anjiyogenezi, granülasyon dokusunun

oluşumunu ve yeniden şekillenmesini yavaşlatır hatta durdurur, bu da yara iyileşme sürecinin gecikmesine yol açar. Kollajen sentezindeki azalma, iyileşme sürecinde uygulanan gerilme kuvvetinin de düşmesine neden olarak kronik yaraların oluşumuna yol açar(65). Bu etkiler, radyoterapiden sonra 3 haftaya kadar devam edebilir(66).

Kemoterapötik ajanlar yara bölgesine göç eden mononükleer fagositik hücrelerin sayısını azaltarak immün yanıtı zayıflatır ve enfeksiyon gelişimine zemin hazırlar, bu durum da yara iyileşme sürecini belirgin şekilde geciktirir. Ayrıca bu ajanlar yaranın yapısal bütünlüğünü de olumsuz etkileyebilir. Ancak bu etkilerin çoğu tedavinin kesilmesinden sonraki 2–3 hafta içinde gerileyerek ortadan kalkar(66).

2.2.4.7. Enfeksiyon

Yara bölgesindeki bakteri yükü gram doku başına 10^5 (100.000) koloniyi aştığında bu durum genellikle klinik olarak enfeksiyon varlığı şeklinde değerlendirilir(67). Patojen mikroorganizmalar inflamasyon evresinin uzamasına ve lökositlerin işlevlerinin bozulmasına yol açarak kollajen sentezini ve granülasyon dokusunun oluşumunu olumsuz yönde etkileyebilir(43, 44).

İnflamasyon fazı, yara iyileşmesinde ve mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar. Ancak bakteriler ve onların ürettiği endotoksinler, interlökin-1 (IL-1) ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırarak, inflamasyon fazının gereğinden uzun sürmesine neden olabilir(44). Bu durum yaranın kronikleşmesine ve uzun süreli bir iltihaplanma sürecinin başlamasına yol açabilir. Uzamış inflamatuvar süreçler ECM’i parçalayan MMP’lerin düzeylerinde artışa neden olur. Bu artışa paralel olarak proteaz inhibitörlerinin seviyesinde azalma meydana gelir. Proteaz dengesindeki bu bozulma özellikle kronik yaralarda büyüme faktörlerinin hızla parçalanmasına ve iyileşme sürecinin sekteye uğramasına yol açabilir(68).

Bakterilerden salınan metabolitler ve toksinler, epitelyum oluşumunu olumsuz yönde etkiler. Enfekte yaralarda oluşan granülasyon dokusu enfeksiyon bulunmayan yaralardakine kıyasla daha fazla ödem içeren, kolay kanayan ve yapısal

olarak daha kırılgan bir özellik gösterir. Ayrıca enfekte yaralarda kollajen yıkımında artış ve yara kontraksiyonunda azalma görülür(69).

2.2.4.8.Kronik Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve immün sistemi baskılayan kronik hastalıklar, vücudun doğal rejenerasyon süreçlerini sekteye uğratarak yara iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Bununla birlikte kanser, böbrek yetmezliği, hipertansiyon ve çeşitli metabolik bozukluklar gibi sistemik hastalıklar da doku onarım sürecini belirgin şekilde yavaşlatabilir(60).

Diyabetli bireylerde sıklıkla gözlemlenen bozulmuş yara iyileşmesi hipoksi, fibroblastlar ve epidermal hücrelerdeki işlev bozuklukları, bozulmuş anjiyogenez, yüksek metaloproteaz seviyeleri, zayıflamış immün yanıt ve nöropati gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır(44).

Steroid kullanımı inflamatuvar yanıtı baskılayarak enfeksiyon riskini artırır, reepitelizasyonu engeller ve kollajen sentezini inhibe ederek yara iyileşmesini geciktirir. Bu moleküler etkilere yanıt olarak cerrahi debridman uygulamaları iyileşme sürecinde gecikmelere yol açabilir(70).

Obezite yara iyileşmesi sırasında komplikasyon riskini artırır; bu durum doku ayrılmaları, hematomlar ve seromaların oluşumuna neden olabilir. Ayrıca obeziteye bağlı damar yetmezliği ve immün sistemdeki değişiklikler enfeksiyon riskini yükselterek iyileşme sürecini olumsuz etkiler(44).

2.2.4.9. Fiziksel etmenler

Yara iyileşme sürecinde yara bölgesinin nem seviyesi ve sıcaklık koşulları oldukça önemli bir rol oynar. Nemlendirme yetersiz olduğunda cilt kurur, elastikiyetini kaybeder ve kırılgan, bozulmaya daha hassas hale gelir. Yara iyileşmesi için ideal sıcaklık 30°C'dir; 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklar ise yaranın gerilim direncini azaltır.

Mekanik stresin belirli bir düzeyde olması yara iyileşmesine olumlu katkı sağlarken, aşırı yüksek düzeydeki mekanik stres iyileşme sürecini olumsuz yönde etkileyebilir.

Yara bakımında doğru teknik ve pansuman malzemesinin kullanılması, yara iyileşmesini olumlu yönde destekler. Pansumanın doğru şekilde yapılması ile yara yabancı maddelerden ve patojenlerden korunarak temiz tutulurken, aynı zamanda eksuda gibi yara salgıları da emilerek uzaklaştırılır, yaradan ısı ve sıvı kaybı engellenir. Ayrıca kabuk oluşumunu da destekleyerek bakterilerin çoğalmasını önler(9).

2.2.5. Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri

Yara tedavisinde yaranın özellikleri, lokasyonu, doku yapısı, hastanın sağlık durumu ve günlük yaşam alışkanlıkları gibi faktörler yanı sıra, tedaviye yönelik malzeme seçimleri de önemli rol oynar. Yara iyileşme sürecinde, negatif basınçlı tedavi, platelet zengin plazma (PRP) uygulamaları, hiperbarik oksijen tedavisi (HBO), kök hücre tedavileri, büyüme faktörleri, topikal ilaçlar, elektriksel uyarım, ozon terapisi, ultrason ve lazer tedavisi gibi ileri tedavi teknikleri önemli bir yer tutmaktadır(71).

2.2.6. Yaranın İyileşme Sürecinde Sitokin Aktivitesi ve Büyüme Faktörleri

Büyüme ve gelişme sürecinde hücrelerin hareketi, çoğalması, olgunlaşması ve farklı hücre tiplerine dönüşmesi gibi birçok hücresel olay organizmanın ihtiyaçlarına göre düzenlenir. Bu süreçlerde büyümeyi yönlendiren bazı kimyasal sinyal molekülleri devreye girer. Bu moleküller arasında yer alan ve polipeptit yapısında olan büyüme faktörleri hücrelerin bölünmesini teşvik edebilen ya da baskılayabilen ayrıca hücrelerin belirli görevleri üstlenmesi için farklılaşma süreçlerini başlatabilen proteinlerdir. Oldukça düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilen bu faktörler hücresel düzeyde kritik roller üstlenirler(38).

Sitokinler, hücreler arasında mediatör olarak görev yapan ve antikor olmayan çeşitli proteinlerden oluşan bir molekül grubudur. Sitokinler; inflamasyon, hücre

büyümesi, iyileşme ve yaralanmaya karşı sistemik yanıt gibi bağışıklık ve inflamatuvar olayları düzenler(72).

Yara iyileşmesinin etkinliği, hücresel süreçlerin koordinasyonunu sağlayan sinyal moleküllerinin özellikle büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerin birbiriyle olan karmaşık etkileşimlerine bağlı olarak değişiklik gösterebilir(29).

Yara iyileşme sürecinde proinflamatuvar sitokinler (örneğin TNF, IL-6, IL-1) kilit bir rol oynar. Bu moleküller hasar bölgesinde keratinositlerin aktivasyonu, fibroblastların çoğalması, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezi ve yıkımı, bağışıklık yanıtının düzenlenmesi ve fibroblastların hasar yerine yönelimi gibi çeşitli biyolojik işlevleri destekler. Genellikle PMNL ve makrofajlar tarafından üretilen bu sitokinler bazı yara bölgesinde yer alan hücreler tarafından da sentezlenebilir(36).

Yara iyileşmesinde anti-inflamatuvar sitokinler de en az proinflamatuvar olanlar kadar kritik bir rol üstlenir. Özellikle IL-10'un inflamatuvar süreçleri sınırlandırma kapasitesiyle öne çıktığı bilinmektedir. IL-10 bazı kemokinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin ifadesini artırsa da nötrofil ve makrofajların hasar bölgesine göçünü engelleyerek aşırı inflamasyonu baskılar. Bu etkileri sayesinde doku bölgesinde matriks birikimini azaltır ve yara iyileşmesinin skar dokusu oluşmadan gerçekleşmesine katkıda bulunur.

Yara iyileşmesinde sitokinler ve büyüme faktörleri temel düzenleyici unsurlar arasında yer alır. Büyüme faktörleri hücre farklılaşması, göçü, çoğalması ile protein ve enzim üretimi gibi birçok biyolojik süreci yönlendirir. Ayrıca yeni damar oluşumunu teşvik ederek ve hücresel proliferasyonu destekleyerek iyileşmeyi hızlandırıcı etkiler gösterir. Bu özellikleri sayesinde yara iyileşmesinin her aşamasında önemli roller üstlenirler. Sitokinlerin zamanlamaya duyarlı ve dengeli bir şekilde salınması ise iyileşme sürecinin sağlıklı ve kontrollü biçimde ilerlemesi açısından hayati öneme sahiptir(73).

Cildin yaralanması sonucu epidermal bariyer bozulur ve bu durum, hücresel yanıtların tetiklenmesine yol açar. Yaralanma ile birlikte keratinositler, önceden depoladıkları IL-1 moleküllerini serbest bırakır. IL-1, çevreleyen hücreleri bariyer

hasarına karşı uyararak bu bölgedeki inflamatuvar yanıtı başlatan ilk sinyaldir. Bunun yanı sıra kan bileşenleri pıhtılaşma kaskadını aktive ederek yaralı bölgeye salınır. Oluşan pıhtı, hemostazı sağlarken aynı zamanda inflamatuvar hücrelerin yara bölgesine göçü için uygun bir matris oluşturur. Trombositler, alfa granüllerini degranüle ederek EGF'ü , PDGF ve TGF- β gibi büyüme faktörlerini salgılar. Bu büyüme faktörleri, yara iyileşmesini desteklemek ve doku onarımını teşvik etmek için önemli rol oynar. PDGF, IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerle birlikte, yara bölgesine nötrofillerin çekilmesinde önemli bir rol oynar. Nötrofiller, yaralı bölgeye yönlendirilerek kontamine edici bakterileri temizler ve enfeksiyon riskini azaltır. Ayrıca, TGF- β etkisiyle monositler makrofajlara dönüşür. Bu dönüşüm, inflamatuvar yanıtı artırır ve doku debridmanını hızlandırır. Makrofajlar, yaralanma bölgesinde granülasyon dokusunun gelişimini başlatır. Granülasyon dokusu yeni kan damarları ve bağ dokusu içerir, bu da iyileşme sürecini destekler. Ayrıca makrofajlar çeşitli proinflamatuvar sitokinler (IL-1 ve IL-6) ve büyüme faktörleri (FGF, EGF, TGF- β ve PDGF) salgılar. Bu faktörler, hem inflamasyonun kontrol edilmesine hem de doku onarımının sağlanmasına yardımcı olur. Trombositlerden salınan VEGF ve FGF, endotel hücrelerinin çoğalmasını teşvik ederek anjiyogenez sürecini başlatır. Bu süreç yara bölgesinde yeni bir ECM'in sentezini, birikmesini ve organizasyonunu sağlar. Yeni damarlar, besin ve oksijen taşıyarak yara bölgesinin iyileşmesine katkıda bulunur. FGF, TGF- β ve PDGF, fibroblastların yara bölgesine infiltrasyonunu teşvik eder. Bu büyüme faktörleri ayrıca fibroblastlarda fenotipik değişikliklere yol açarak bu hücrelerin miyofibroblastlara dönüşmesini sağlar. Miyofibroblastlar, ECM'nin sınırları boyunca hizalanarak yara bölgesinde büzücü bir kuvvet oluşturur. Bu kuvvet, yara kapanmasını hızlandırır ve dokunun iyileşmesine katkıda bulunur.

Yaralanmadan saatler sonra yeniden epitelizasyon süreci başlar. Bu süreçte EGF, TGF- α ve FGF gibi büyüme faktörlerinin salınması, epitel hücrelerinin göçünü ve proliferasyonunu uyararak yara iyileşmesini hızlandırır. Yeniden epitelizasyon süreci, ilk olarak hücre-hücre arası ve hücre-alt tabaka arasındaki temasların çözülmesiyle başlar. Bu, keratinositlerin geçici ECM üzerinde polarize olmalarına ve göç etmelerine olanak tanır. Yara kapanması, yani %100 epitelizasyon sağlandığında, keratinositler, cilt bariyerini eski haline getirebilmek için tabakalaşma ve farklılaşma

süreçlerine girer. Bu aşama, iyileşme sürecinin sonrasında epidermin normal yapısının yeniden inşa edilmesi için önemlidir. Matriks oluşumu aşamasında, granülasyon dokusunun ortadan kaldırılması gereklidir. Granülasyon dokusunun yerini, iyileşme sürecinin ilerleyen aşamalarında kolajen ve elastin liflerinden oluşan sağlam bir çerçeve alır. Bu çerçeve, yara bölgesinin yapısal desteğini sağlamak için temel bir iskelet işlevi görür. Ardından, proteoglikanlar ve glikoproteinler bu çerçeveye eklenir, böylece yeni ECM daha da zenginleşir ve yara bölgesinin dayanıklılığı artar. Bundan sonra, TGF- β aracılığıyla yeni kollajen sentezi başlar. Aynı zamanda eski ve daha zayıf olan kollajen, PDGF tarafından parçalanarak yenilenme süreci tamamlanır. Bu doku yeniden şekillenmesi, yara dokusunun olgunlaşmasını ve daha sağlam, kalıcı bir yapıya dönüşmesini sağlar(29, 74).

2.2.6.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Travma sonrası endotel hücreleri, makrofajlar, monositler, düz kas hücreleri ve plateletlerin alfa granüllerinden PDGF salgılanır. PDGF yara iyileşmesinin başlatılması ve devam ettirilmesinde önemlidir. Aynı zamanda bağ dokusunun oluşumunda etkili olup doku onarımını ve rejenerasyonunu destekler. PDGF; polimorfnükleer lökositler (PMNL), makrofajlar ve fibroblastların mitotik aktivitelerini artırarak, bu hücreleri travma bölgesine çeker ve iyileşme sürecini hızlandırır. Ayrıca PDGF, glikozaminoglikan ve glikoprotein üretimini artırarak nonkollajen ekstraselüler matriksin oluşumunu destekler. PDGF, yara yerindeki kollajenaz düzeyini artırarak, remodelling aşamasına katkıda bulunur ve böylece iyileşme sürecinin son aşamasını kolaylaştırır. PDGF'nin temel işlevlerinden biri iyileşme kapasitesine sahip kök hücreler ile henüz tam olarak farklılaşmamış öncü hücrelerin mitoz öncesi çoğalmasını teşvik etmektir. PDGF aynı zamanda endotel hücrelerinin miktarını artırarak, VEGF ile benzer şekilde anjiogenezis sürecine katkıda bulunur(75).

2.2.6.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

VEGF damar geçirgenliğini artıran, endotel hücreleri üzerinde mitojenik ve anti-apoptotik etkiler gösteren, aynı zamanda hücre göçünü teşvik eden bir büyüme

faktörüdür. VEGF, bu etkileri sayesinde normal ve patolojik anjiyogenik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir yer alır. VEGF, tirozin kinaz hücre reseptörlerine (VEGFR) bağlanarak etkisini gösterir. VEGF ve VEGFR'ler yalnızca endotel hücrelerden değil, aynı zamanda endotel olmayan hücrelerden de salgılanabilir(76).

2.2.6.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- B)

Travma sonrası makrofajlar, T-lenfositler, trombositler ve PMNL gibi hücreler, yaralı bölgeye TGF- β salgılar. TGF- β endotel hücrelerin farklılaşmasını teşvik eder ve fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu artırarak yara iyileşmesinin ilk aşamalarında aktif bir rol oynar. Yara iyileşmesinin ilerleyen dönemlerinde TGF- β fibroblastların sayısının azaltılması sağlar. TGF- β kollajenin üretimi ve olgunlaşmasında önemli bir rol oynar. Ayrıca TGF- β diğer büyüme faktörlerinin neden olduğu mitotik aktivitedeki artışı düzenler. Bu düzenleme endotel hücrelerin göçünü teşvik eder ve anjiyogenezi artırır(77).

2.2.6.4. Epidermal büyüme faktörü (EGF)

EGF trombositler, makrofajlar ve monositler tarafından salgılanan bir büyüme faktörüdür. Yara kenarından reepitelizasyon aşamasında fazlaca üretilir. EGF epitel hücrelerinin çoğalmasını ve göç etmesini uyarak iyileşme sürecini destekler. Ayrıca anjiogenezi teşvik eder ve kollajen üretimini düzenler. EGF hücre farklılaşmasını da yöneten önemli bir büyüme faktörüdür(75).

2.2.6.5. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF trombositler, makrofajlar, fibroblastlar ve mekanik hasar görmüş endotel hücrelerinden salgılanan bir büyüme faktörüdür. FGF, anjiogenezi uyarak yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca damar geçirgenliğini artırır ve endotel hücrelerinin mitotik aktivitesini teşvik eder(78).

Tablo 2. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin kaynakları ve görevleri(36).

Sitokin Hücre Kaynağı		Biyolojik Aktivite
Anti-inflamatuvar Sitokinler		
Büyüme faktörü ve sitokinler	Hücre kaynağı	Yara iyileşmesi ile ilgili işlevi
IL-4	Mast hücreleri Bazofiller T lenfositler	IL-1, IL-6 ve TNF sentezinin, fibroblast sentezinin, kollajen üretiminin inhibisyonu
IL-10	Keratinositler Makrofajlar T lenfositler	IL-1, IL-6, TNF sentezinin, makrofaj ile PMNL aktivasyonunun inhibisyonu
Pro-inflamatuvar Sitokinler		
Büyüme faktörü ve sitokinler	Hücre kaynağı	Yara iyileşmesi ile ilgili işlevi
TNF- α	Makrofajlar	PMN marjinasyonu ve sitotoksosite ya da kollajen sentezi; metabolik substrat sağlar
IL-1	Keratinositler Makrofajlar	Keratinosit ve fibroblast kemotaksisi, kollajen üretimi
IL-2	T lenfositler	Fibroblast infiltrasyonu ile metabolizmayı artırır

IL-6	Fibroblastlar PMNL'ler Makrofajlar	Fibroblast proliferasyonu, hepatik akut faz protein üretimi
IL-8	Makrofajlar Fibroblastlar	Makrofaj ve PMNL kemotaksisi, keratinosit maturasyonu

Tablo 3. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin kaynakları ve görevleri(36, 38, 39).

Büyüme Faktörleri		
Büyüme faktörü ve sitokinler	Hücre kaynağı	Yara iyileşmesi ile ilgili işlevi
EGF	Plateletler, makrofajlar	Fibroblastlar ve Keratinosit açısından mitojeniktir. Keratinosit migrasyonu ve granülasyon dokusunu uyarır.
PDGF	Plateletler, makrofajlar, endotel hücreler, keratinositler	Fibroblastlar, makrofajlar, PMNL ve düz kas hücreleri açısından kemotaktiktir. PMNL, makrofaj ile fibroblastları aktive eder. Fibroblast, düz kas hücreleri ve endotel hücreleri açısından mitojeniktir. Matriks metalloproteinaz, fibronektin ve HA sentezini uyarır. Anjiogenez ile yara kontraksiyonunu uyarır. Remodelingde etkilidir. Trombosit agregasyonunu dir stimüle eder. Integrin ekspresyonunu düzenler.

TGF- β	Plateletler, T lenfositler, makrofajlar, endotelyal hücreler, Fibroblastlar	Fibroblast, makrofaj, lenfosit, PMNL ve düz kas hücreleri açısından kemotaktiktir. TIMP üretimini, keratinosit migrasyonunu, angiogenezi uyarır.
TGF- α	Makrofajlar, T Lenfositler, keratinositler	EGF benzeri etkir.
FGF 1-2	Makrofajlar, Mast hücreleri, T lenfositler, Endotelyal hücreler, Fibroblastlar	Fibroblastlar için kemotaktiktir. Keratinositler ve Fibroblastlar açısından mitojeniktir. Keratinosit migrasyonunu, yara kontraksiyonunu, matriks depolanmasını ve angiogenezi uyarır.
KGF (Keratinosit büyüme faktörü). FGF-7de denir	Fibroblastlar	Keratinosit proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasını uyarır.
IGF-1	Makrofajlar, Fibroblastlar	Sülfatlanmış protoeglikan, kollajen keratinosit göçü ve fibroblast proliferasyonunu uyarır; büyüme hormonuna benzer endokrin etkiler
VEGF	Plateletler, nötrofiller	Granülasyon dokusunda anjiyogenezi uyarır Periferik vasküler hastalıkta kollateral kan damarlarının oluşumunu uyarır.
G-CSF (Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör)	Monositler, fibroblastlar, lenfositler	Nötrofil üretimini uyarır Nötrofillerin ve monositlerin işlevini geliştirir

		Keratinositlerin çoğalmasını teşvik eder
GM-CSF (Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör)	Keratinositler, makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar	Epidermal hücrelerin çoğalmasına aracılık eder
HGF (Hepatosit Growth Faktör)	Fibroblastlar, keratinositler, endotel hücreleri, tümör hücreleri	Yeniden epitelizasyon Neovaskülarizasyon Granülasyon dokusu oluşumu
İnterferon	T-hücreleri, Doğal öldürücü (NK)	Makrofajlar olgunlaşması Nitrik oksit salınımı
Tromboksan A2	Trombositler	Trombosit agregasyonu Vazokonstriksiyon

2.3. Lokal Anestezi

Lokal anestezi farmakolojik ajanlar yardımıyla vücudun sınırlı bir bölgesinde sinir iletimini geçici olarak durdurmayı amaçlayan bir yöntemdir(79). Lokal anestezinin temelleri sinir iletimini bloke etme girişimlerinin erken dönemlerine dayanmaktadır. Bu alandaki öncülerden biri olarak kabul edilen Francis Rynd (1801–1861) 1845 yılında nöraljik ağrıyı hafifletmek amacıyla periferik sinirlere morfin çözeltisi uygulayarak sinir blokajı oluşturmaya yönelik ilk yöntemlerden birini geliştirmiştir(80). Lokal anesteziyle santral sinir sisteminde bilinç fonksiyonları etkilenmeden yalnızca uygulanan sinirlerde analjezi ve motor nöron aktivitesinin geçici olarak engellenmesi, önemli bir avantajdır(79).

2.3.1. Lokal Anestezikler

2.3.1.1. Lokal Anesteziklerin Tanımı ile Etki Mekanizmaları

Lokal anestezikler, sinir liflerinde uygun konsantrasyona ulaştıklarında bu liflerdeki impuls iletimini geri dönebilir şekilde bloke eden ilaçlardır. Ayrıca bu maddeler yalnızca sinir lifi zarlarını değil aynı zamanda doza bağlı olarak uyarılabilir diğer hücre zarlarını da etkiler(81).

Lokal anestezikler nöronal hücre zarındaki sodyum iyonlarının geçişini engelleyerek motor ve duyu blokaj oluşturur. Bu etki aksiyon potansiyelinin depolarizasyon aşamasında sodyum iyonlarının hücre içine hızla girmesini önler ve aksiyon potansiyelinin ilerlemesini durdurur. Lokal anestezide kullanılan ajanların etkileri, birkaç önemli parametreye bağlıdır. Bunlar; kullanılan ajanların proteine bağlanması, yağda çözünürlüğü, pH, enjeksiyon bölgesinin damar yapısı ve çözünürlük sabiti (pKa)'dır(82).

Lokal anestezikler, sinir hücrelerinin aksiyon potansiyelini başlatan voltaj kapalı sodyum kanallarını inaktive ederler ve sinir lifleri boyunca elektriksel impulsların yayılmasını engellerler. Lokal anesteziklerin konsantrasyonu arttıkça, önce otonomik ardından somatik duyu ve motor uyarıların iletimi baskılanır. Böylece kaslar gevşer ve hareket yeteneği kaybolur.

Her voltajla aktive olan sodyum kanalı, bir α alt birimi ve birden fazla yardımcı β alt biriminden oluşur(83). Voltaj kapalı sodyum kanalları, sinir hücrelerinin zarındaki elektriksel sinyalleri iletmek için önemli rol oynar. Lokal anestezikler, bu kanalların α alt biriminin belirli bir bölgesine bağlanarak, kanalın açılmasını engeller. Bu engelleme, membranın depolarizasyonu ile birlikte Na (sodyum) iyonlarının hücre içine girişini durdurur. Sonuç olarak sinir hücresinin uyarı iletimi yavaşlar, aksiyon potansiyelinin büyüklüğü ve hızı azalır, ve sinir hücresinin uyarılabilirlik eşiği yükselir, yani daha güçlü bir uyarı gerektirir. Yeterli miktarda lokal anestezik sodyum kanallarını engelleyerek aksiyon potansiyelinin oluşumunu önler ve sinir iletimini durdurur. Lokal anestezikler, voltaj kapalı sodyum kanallarının açık veya inaktif durumlarına, dinlenme halindeki kanallara göre daha yüksek bir affiniteye sahiptir. Bu

durum, anesteziğin özellikle açık veya inaktif kanallara bağlanmasını sağlar ve bu da sinir uyarımını kolaylaştırır. Bu olaya "kullanım-bağımlı blok" denir. Lokal anesteziğin inhibe edici etkisi hem voltaj hem de frekans bağımlıdır; hızlı uyarılan sinir lifleri, yavaş depolarize olanlara göre daha fazla etkilenir(84). Sinir liflerinin lokal anesteziğe karşı inhibisyon duyarlılığı akson çapı, miyelinlenme düzeyi ve diğer anatomik ve fizyolojik faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Küçük çaplı sinir lifleri, büyük çaplılara göre lokal anesteziğe daha duyarlıdır. Miyelinin etkisi de önemli bir faktördür; büyük miyelinsiz lifler, küçük miyelinsiz liflere göre daha az duyarlıdır. Ayrıca küçük miyelinsiz C lifleri, büyük miyelinsiz liflere kıyasla lokal anesteziğe karşı daha dirençlidir. Bu nedenle sinir liflerinin özelliklerine göre anesteziğin etkinliği değişebilir(85).

2.3.1.2. Lokal Anesteziğin Kimyasal Yapıları ve Farmakolojik Özellikleri

Bir lokal anesteziğin molekülü kimyasal olarak üç temel bileşenden oluşur: Lipofilik özellik taşıyan ve genellikle bir benzen halkası içeren bir grup, hidrofilik karakterli ve çoğunlukla tersiyer amin içeren bir grup ile bu iki yapıyı birbirine bağlayan, ester ya da amid yapısında bir ara zincir. Hidrofobik aromatik halka, lokal anesteziğin lipid çözünürlüğünü artıran önemli bir bileşendir. Bu özelliği, anesteziğin molekülün sinir liflerine daha kolay difüze olmasına yardımcı olur. Lipofilik yapının artışı, anesteziğin etki potansiyeli ve etki süresi üzerinde doğrudan etkili olur. Hidrofilik tersiyer amin grubu, lokal anesteziğin çözünürlüğünü etkileyen önemli bir bileşendir. Bu grup, molekülün suyla ve yağda çözünürlük özelliklerini belirler. Ara zincir ise, lokal anesteziğin molekülündeki ester veya amid gruplarını birbirine bağlayan yapıdır. Ara zincirin kimyasal yapısı, bu grupların hangi türde olacağını belirler(86).

Ester lokal anesteziğin şunlardır: Kokain, klorprokain, prokain, benzokain ve tetrakain. Bu ilaçlar, genellikle plazma kolinesterazları adı verilen enzimler tarafından metabolize edilirler. Özellikle prokain ve benzokain, p-aminobenzoik asit (PABA)'ya metabolize olabilir. PABA, alerjik reaksiyonlara neden olabilen bir bileşiktir.

Amid lokal anestezikler şunlardır: Bupivakain, etidokin, lidokain, mepivakain, prilokain ve ropivakain. Bu ilaçların metabolizması, karaciğerdeki mikrozomal enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Amid lokal anesteziklerin çok stabil çözeltileri vardır. Bu stabilite amid yapıların sterilizasyon ve pH değişiklikleri gibi çevresel faktörlere karşı daha dirençli hale gelmesini sağlar. Lokal anestezikler etki sürelerine göre de sınıflandırılabilir:

Kısa etkili lokal anestezikler: prokain, klorprokain

Orta etki süreli lokal anestezikler: prilokain, lidokain, mepivakain

Uzun etki süreli lokal anestezikler: bupivakain, levobupivakain, ropivakain, tetrakain(87).

Lokal anesteziklerin amino grupları, pKa'yı belirleyen ve bu sayede ilacın suda çözünürlük özelliklerini etkileyen önemli bir faktördür. Bu özellik lokal anesteziklerin sodyum kanallarına bağlanmasında kilit rol oynar. pKa, bir maddenin iyonize ve iyonize olmayan formlarının birbirine eşit olduğu pH seviyesini ifade eder. Lokal anesteziklerin çoğu, pKa değeri 8,0 ile 9,0 arasında olan maddelerdir. pKa Henderson-Hasselbach eşitliğinden elde edilir : $pH = pKa + \log \left(\frac{[aniyonize]}{[iyonize]} \right)$. Sinir boyunca difüzyon hızı, lokal anesteziğin iyonize olmayan formunun oranına doğrudan bağlıdır. pKa ne kadar düşükse, iyonize olmayan form oranı o kadar yüksek olur ve bu da etki başlangıcının daha hızlı olmasına yol açar. Enfekte dokular genellikle daha asidiktir. Bu da lokal anesteziklerin çoğunlukla iyonize formda bulunmasına neden olur. Çünkü asidik ortamda, lokal anesteziklerin iyonize formu daha baskındır. Ancak, iyonize form, sinir membranından geçemez ve bu nedenle anestezi etkisi sağlamak daha zor olur. Bikarbonat ekleyerek dokunun PH'ı değiştirilerek, özellikle enfekte dokularda, anestezi etkisinin daha hızlı başlamasını sağlamak mümkündür(87, 88).

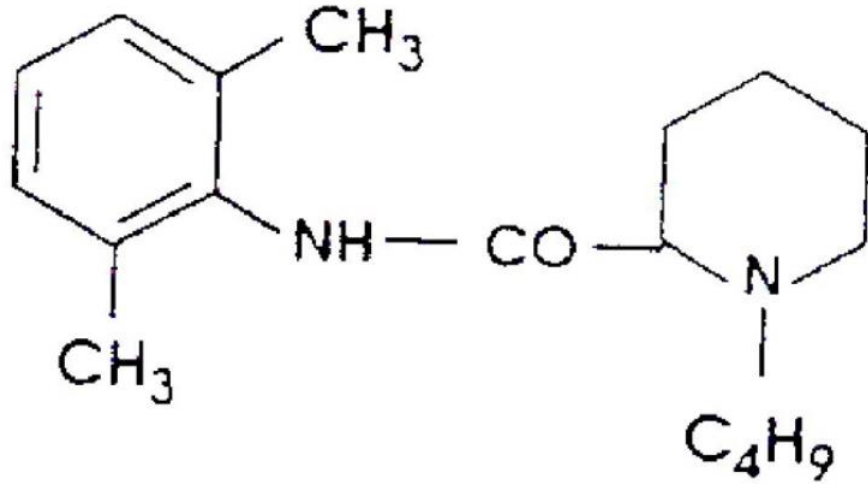
Lokal anesteziklerin etki süresi, birkaç önemli faktör tarafından belirlenir. Proteinlere yüksek afiniteyle bağlanan lokal anestezikler sodyum kanallarıyla daha uzun süre etkileşimde kalır ve bu durum anestezinin etki süresinin uzamasına neden olur. Lokal anesteziğin uygulandığı bölgede damarlar tarafından emilim hızı, ilacın etki süresini belirleyen bir diğer önemli faktördür. Moleküler ağırlığı yüksek olan lokal

anestezikler daha lipofilik olur. Bu, anesteziğin daha fazla proteine bağlanmasına ve daha uzun etki süresi göstermesine yol açar. Etki başlangıcı daha yavaştır. Bununla birlikte lipofiliklik aynı zamanda ilacın toksisitesini artırabilir(88).

2.3.2. Araştırmada Kullanılan Farmakolojik Ajanlar

2.3.2.1. Bupivakain

Bupivakain, amid yapısına sahip bir lokal anestezik olarak 1963 yılında AF Ekenstam ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bupivakain, piperidin halkası üzerinde butil grubu bulundurur ve bu yapısal özellikleri ona özgün fiziksel ve kimyasal özellikler kazandırır. pKa değeri 8.1'dir. Ticari preparatının pH değeri genellikle 4.5-5.5 aralığındadır. Kimyasal olarak “L-n Butyl-DL-Piperidin 2-Carbonsaure 2-6 dimethylanilid” şeklinde adlandırılır(Şekil 8) (89).



Şekil 7. Bupivakain'in moleküler yapısı(89).

Bupivakain, uzun süreli etki gösteren bir lokal anesteziktir ve sıklıkla kaudal, epidural, spinal anestezi ile periferik sinir blokları gibi farklı anestezi uygulamalarında tercih edilmektedir. Ayrıca akut ve kronik ağrı yönetiminde de yaygın olarak tercih edilen bir ilaçtır. Bupivakainin etkileri yalnızca Na kanallarıyla sınırlı değildir. Bupivakain, NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptörleri de dahil olmak üzere birçok farklı kanalın aktivitesini etkiler. Bupivakain, özellikle omuriliğin dorsal boynuzunda,

NMDA reseptör aracılı sinaptik iletimi inhibe ederek merkezi sensitizasyon sürecini engeller. Bu etki, bupivakainin ağrı yönetimi ve postoperatif ağrı kontrolü için etkili bir seçenek olmasını sağlar. Doz ve konsantrasyona bağlı olarak, bupivakain, sensöriyel ve motor liflerde diferansiyel blok yapar(11).

Bupivakain, yüksek protein bağlanma oranı ve yüksek pKa değeri sayesinde yavaş etki başlangıcı gösterir. Etki süresi 5-16 saat kadar sürebilir, bu da onu uzun süreli anestezi gerektiren prosedürler için ideal kılar. Ancak bu uzun etki süresi, bupivakainin yüksek toksisite potansiyeline yol açar. Toksik dozu yaklaşık olarak 3 mg/kg'dır. Plazma klirensi 0.58 litre/dakika olup, bu bupivakainin vücuttan atılma hızını gösterir. Eliminasyon yarılanma ömrü ise yaklaşık 2.7 saattir. Ancak yenidoğanlar gibi bazı özel hasta gruplarında bu etki süresi 8.1 saate kadar uzayabilmektedir. Bupivakain plazma proteinlerine özellikle alfa-1-asit glikoproteine yaklaşık %95 oranında bağlanır. Bupivakainin plasentayı geçişi kolaydır ve fetüste, anneye kıyasla protein bağlanma oranı daha düşüktür. Metabolizması, karaciğerde glukuronid konjugasyonu yoluyla gerçekleşir. Son olarak bupivakain idrarla atılır. Bupivakain, lidokain ve mepivakain ile karşılaştırıldığında 3-4 kat daha potent bir anesteziktir. Ayrıca prokain ile karşılaştırıldığında 8 kat daha potent olduğu belirtilmiştir(90). Bupivakain oda sıcaklığında bakterisit etki gösterir(91).

Bupivakain, farklı konsantrasyonlarda kullanılarak çeşitli anestezi tekniklerinde etkinlik sağlamak için uyarlanabilir. Farklı konsantrasyonların etkisi, hem analjezi hem de motor blokajı üzerinde farklı sonuçlar doğurur. %0.25'lik bupivakain konsantrasyonu, genellikle lokal infiltrasyon için kullanılır. %0.25 - %0.5'lik konsantrasyonlar, periferik sinir blokları için yaygın olarak kullanılır. Epidural anestezi için %0.25, %0.5 ve %0.75'lik konsantrasyonlar kullanılır. %0.25 konsantrasyonundaki bupivakain, kaudal blokaj için sıklıkla tercih edilen bir seçenektir. Konsantrasyon azaldıkça, analjezi sağlanabilirken motor fonksiyonlar daha fazla korunur. %0.1'in altındaki konsantrasyonlarda, motor blokaj neredeyse hiç görülmez. Spinal anestezi için %0.5 ila %0.75'lik izobarik (düşük yoğunluklu) ve hiperbarik (yüksek yoğunluklu) çözeltiler kullanılmaktadır. Bupivakain, topikal anestezi için genellikle kullanılmaz. Bupivakain, turnike kafi indirildikten sonra erken

dönemde görülen kardiovasküler kollaps riski nedeniyle intravenöz rejyonel anestezi (RIVA) için önerilmez(92).

Bupivakaine etkisini iyileştirmek ve özellikle etki başlangıcını hızlandırmak amacıyla bazı lokal anestetik ajanlar eklenebilir. Bu ajanlar genellikle bupivakainin etki süresini etkilemez. Ancak epinefrin bupivakain ile birlikte kullanıldığında plazma Emilimini azaltarak, bupivakainin sistemik etkilerini sınırlandırabilir. Bu, yanlış intravasküler enjeksiyon durumlarında riskin azalmasına yardımcı olabilir. Epinefrin, bupivakainin etki süresini uzatmaz, ancak Emilimini yavaşlatarak etkiyi lokalize eder. Deksmetomidin ve klonidin, alfa-2 adrenerjik reseptör agonistleri olarak bilinen ilaçlardır ve bupivakain ile kombinasyonları halinde, bu ilaçların blok süresini uzatma potansiyeli vardır(90).

Yetişkinlerde bupivakainin maksimum dozları epinefrin eklenilmeden 2 mg/kg (tek dozda 175 mg) veya 400 mg/gün şeklindedir. Bu dozlar, 3-4 saat arayla tekrarlanabilir. Bupivakain uygulandıktan 5-7 dakika sonra etkisini göstermeye başlar. Maksimum anestetik etki genellikle 15-25 dakika içinde sağlanır. Bupivakainin toksik plazma konsantrasyonları yaklaşık 4-5 µg/ml olarak kabul edilmektedir. Toksikite belirtileri; Erken dönemde, inhibitör yolların blokajı nedeniyle SSS stimülasyonu görülebilir. Bu durum, ajitasyon, titreme, konvülsiyonlar gibi nörolojik semptomlara yol açabilir. Bupivakainin merkezi etkileri depresyon şeklinde devam edebilir. Bu, solunum depresyonu ve kardiyovasküler çökmeye yol açabilir. Bupivakainin kardiyak etkileri, özellikle Na⁺ (sodyum) kanallarına bağlanma ile ilişkilidir. Bupivakain, lidokain gibi diğer lokal anestetiklere kıyasla, kardiyak Na⁺ kanallarına yüksek afiniteyle bağlanır ve bu bağlanma daha yavaş ayrılmasına neden olur. Bu da diyastol boyunca birikmesine, iletiminin uzamasına ve reentri kaynaklı aritmilere sebep olur(93).

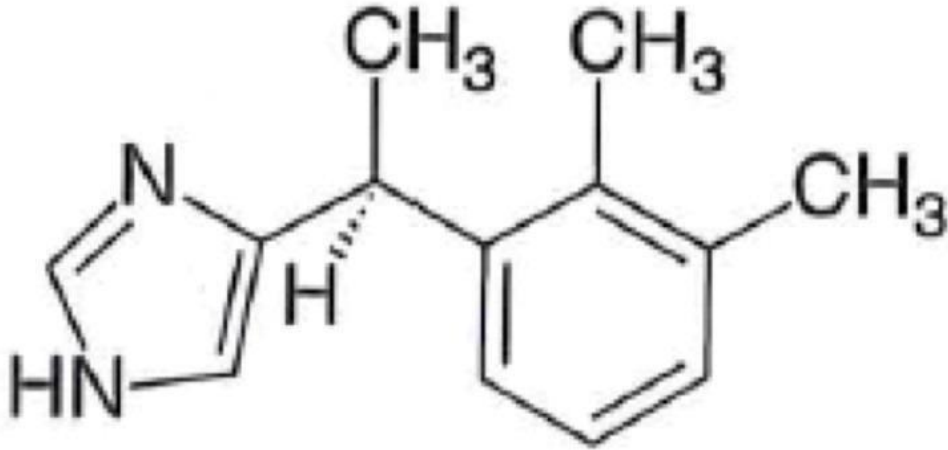
Bupivakain, yüksek lipofilik özellikleri nedeniyle miyelinli motor liflere kolayca penetre olur ve bu, güçlü bir anestetik etki sağlar. Ancak bu özellik, SSS toksisitesini artırabilir. Bupivakain, sodyum kanallarına yüksek afiniteyle bağlanır ve yavaş ayrılır, bu da miyokard (kalp kası) üzerinde kardiyotoksik etkiler yaratır. Kardiyak toksisite, ventriküler aritmiler, taşikardi ve ventriküler fibrilasyon gibi ciddi

kardiyak komplikasyonlara yol açabilir. Bu aritmiler, tedaviye çok dirençli olabilir. Bupivakainin miyotoksik etkisi, özellikle sarkoplazmik retikulum (SR) üzerinde yaptığı etkileşimle ilişkilidir. SR, kas hücrelerinde Ca^{++} (kalsiyum) depolayan yapıdır ve kas kasılmalarında kritik rol oynar. Bupivakain, sarkoplazmik retikuluma Ca^{++} geri alımını inhibe eder ve aynı zamanda Ca^{++} salınımını artırır. Bu durum, miyositlerde Ca^{++} 'un hücre içi konsantrasyonunun artmasına neden olur ve akut miyosit hasarı ve apoptozis (programlanmış hücre ölümü) ile sonuçlanır(94).

Bupivakain, yüksek oranda proteinlere bağlanma eğilimindedir ve plazma proteinlerine yaklaşık %95 oranında bağlanır. Bupivakain, asıl olarak karaciğerde metabolize edilir. Metabolizma, glukuronik asitle konjugasyon yoluyla gerçekleşir. Karaciğer hastalığı bulunan bireylerde, karaciğer fonksiyonlarının bozulması nedeniyle bupivakainin metabolizması yavaşlar ve toksisite riski artabilir. Bu nedenle, karaciğer hastalığı olan hastalarda bupivakain kullanımında dikkatli olunmalı ve dozlar buna göre ayarlanmalıdır. Bupivakainin ana metaboliti, pipekoloksilidindir. Bupivakainin metabolitleri böbrekler aracılığıyla atılır. %6'sı değişmeden idrarla atılır. Hamilelerde fetustaki ilaç konsantrasyon düzeyi genellikle fazla artmaz. Bu nedenle fetüs üzerindeki doğrudan toksik etkiler minimaldir. IV enjeksiyon yoluyla bupivakain uygulandığında toksisite genellikle 1-3 dakika içinde ortaya çıkabilir. Damar içine yapılmayan doz aşımalarında ise toksisite daha geç bir sürede gelişebilir. Bupivakain, Na^{+} kanallarına güçlü bir şekilde bağlanarak, hücre membranlarından Na^{+} iyonlarının geçişini engeller. Bu durum, sinir lifleri boyunca impuls iletimini engeller ve sinir hücrelerinin geri dönüşümlü bir şekilde inhibe olmasına neden olur. Na^{+} kanallarına bağlanma gücü, bupivakainin öteki lokal anesteziklerden daha güçlüdür. Bu, diğer lokal anesteziklerin aksine nöbetlere yol açmadan kardiyak toksisiteye neden olabilir. Diyastolde Na^{+} kanallarından yavaşça ayrılır, bu da iletiyi bloke eder. Bu yavaş ayrılma, Na^{+} kanallarının eski aktif durumlarına dönmelerini engeller, bu da ileti bozukluklarına yol açar. Kardiyak outputta düşüş, negatif inotropik etki, kalp kası kontraksiyonunda azalma ve ventriküler aritmiler ile ventriküler fibrilasyon gibi kardiyak sorunlar gelişebilir. Bupivakainle bağlantılı kardiyak arrest gibi acil durumlarda İntralipid %20'lik solüsyonu, hayati tehlikeyi ortadan kaldıracak bir

tedavi seçeneği sunar. Bupivakainin yan etkileri sıklıkla hipotansiyon, bradikardi, alerji, titreme ve konvülsiyondur(89).

2.3.2.2. Deksmedetomidin



Şekil 8. Deksmedetomidin'in moleküler şekli(95).

Deksmedetomidin, 1999 yılında FDA tarafından onaylanarak sedatif olarak kullanılan bir ilaçtır. İlk onayı ise kritik hastalığı bulunan erişkinlerde kısa süreli (<24 saat) infüzyon için verilmiştir(96).

Deksmedetomidin, güçlü ve yüksek selektiviteye sahip bir alfa-2 adrenerjik reseptör agonistidir. Sempatik, sedatif, amnestik ve analjezik özelliklere sahip olup, medetomidinin S-enantiyomeridir. Lipofilik özellik gösteren bu ilaç, hastalarda bilinçli sedasyon sağlar ve analjezik etki gösterir. Ayrıca solunum depresyonuna yol açmadan etki eder. Doz ile orantılı olarak, santral sinir sisteminin sempatik çıkışını inhibe eder(12).

Deksmedetomidin, sempatik aktivitenin inhibe edilmesi sayesinde hemodinamik yanıtları düşürerek minimal solunum depresyonu ile birlikte sedasyon, analjezi ve anksiyolizis sağlar. Ayrıca orta derecede antisialog etkisi de vardır, bu özellikleriyle dikkat çeker. Özellikleri nedeniyle, perioperatif dönemde analjezi ve

sedasyon sağlamak için ideal bir ajan olarak tercih edilir. A2-agonistleri, imidazol reseptörleri üzerinde etki gösterebilirken, deksmedetomidin, alfa-2 reseptörlerine klonidinden 8 kat daha yüksek afiniteye sahip olan son derece seçici bir alfa-2 agonistidir. Deksmetomidin'in alfa-2 agonist etkisi, alfa-1 agonist etkisine kıyasla 1620 kat daha güçlüdür. Ayrıca, klonidinden daha kısa süreli etki gösterir. Bu özellik, IV infüzyonlarının titrasyonuna olanak tanır, böylece tedavi süreci daha kontrollü ve hassas bir şekilde yönetilebilir(96).

2.3.2.1. Farmakolojik Özellikleri

Deksmetomidin, moleküler formülü $C_{13}H_{18}N_2 \cdot HCl$ olan, moleküler ağırlığı 236.7 g/mol, pKA değeri 7.1 ve pH değeri 4.5 ile 7 arasında değişen, renksiz, berrak ve izotonik özellik gösteren bir solüsyondur. Erişkinlerde hızlı bir dağılım fazına sahip olup, dağılım yarı ömrü yaklaşık 6 dakikadır. Eliminasyon yarı ömrü ise 2 ila 2,5 saat arasındadır. IV enjeksiyon sonrası ortalama 15 dakika içinde etkisini göstermeye başlar ve IV infüzyonun ardından tepe konsantrasyonuna yaklaşık 1 saat sonra ulaşır. İlacın %6'sı serbest fraksiyon olarak bulunurken, yüksek oranda plazma proteinine bağlanır ve ortalama sabit durum dağılım hacmi 118 L'dir. Karaciğer hastalığı bulunan bireylerde, sağlıklı kişilere kıyasla deksmedetomidin plazma proteinine bağlı fraksiyonunun önemli ölçüde düştüğü gözlemlenmiştir(97).

Deksmetomidin, karaciğerde yüksek düzeyde glukuronid konjugasyonu ve sitokrom P450 enzimleri aracılığıyla biyotransforme olur. Metabolitlerin %95'i idrar yoluyla, %4'ü ise feçesle atılmaktadır. İlacın eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2 saattir ve aktif ya da toksik herhangi bir metabolit tespit edilmemektedir. Şiddetli karaciğer hastalığı durumunda, karaciğer klirensi normalin yarısı kadar azalabilir. Şiddetli böbrek yetmezliği bulunan hastalarda ise eliminasyon belirgin şekilde değişmez ancak hastalarda sedatif etki daha uzun sürebilir. Bu durum, büyük olasılıkla üremik ensefalopatiye bağlı olarak farmakodinamik etkinin arttığını düşündürmektedir(98). Hepatik veya renal hastalık durumlarında, deksmedetomidin dozajlarının düşürülmesi gerektiği belirtilmektedir. Deksmetomidin, doza bağlı olarak kardiyak debiyi azaltabilir ancak bu etkinin, ilacın klirensine etkisi klinik açıdan anlamlı değildir(99). FDA tarafından onaylanan farmakodinamik doz rejimi, deksmedetomidin için 10

dakikalık bir süre zarfında 1 mg/kg yükleme dozu, ardından ise 0,2 ila 0,7 mg/kg/saat aralığında sürekli IV infüzyon dozudur. Ancak deksmedetomidinin yanlılıkla büyük dozda aşırı verilmesi ile ilgili raporlar bulunmaktadır. Bu aşırı dozların, tedavinin kesilmesinin ardından 1 saat içinde kaybolan aşırı sedasyon dışında önemli bir belirtiye yol açmadığı bildirilmiştir(100). FDA, 2008 yılının Ekim ayında deksmedetomidin dozunun cerrahi prosedürler için 1,5 mg/kg/saat'e kadar artırılmasına onay vermiştir(101).

2.3.2.2. Santral Sinir Sistemine Etkileri

$\alpha 2$ adreno reseptörlerinin aktivasyonu serebral vasküler yatakta belirgin bir vazokonstriktif etki yaratır. Kortikal kan damarlarındaki presinaptik $\alpha 2$ adreno reseptörlerin uyarılması norepinefrin salınımını baskımlarken, postsinaptik $\alpha 2$ adreno reseptörlerin etkinleşmesi vasküler düz kastaki tonusun artmasına yol açabilir. Bu mekanizma sayesinde, deksmedetomidin infüzyonu, doğrudan $\alpha 2$ -agonistlerle ilişkili olarak kalsiyum akışını artırarak vasküler düz kas kontraksiyonunu tetikler. Ayrıca santral sempatik aktivitedeki değişikliklerle dolaylı olarak serebral metabolizma hızını düşürerek serebral kan akımını etkileyebilir(101).

2.3.2.3. Sedasyon, Anksiyoliz, Hipnoz ile Amnezi

Sedasyon kalitesi, propofol veya midazolam gibi GABAerjik ajanlarla kıyaslandığında benzersizdir. Deksmetomidin ile yapılan sedasyon sırasında, kişiler uyanıklık testlerinde iyi bir performans sergiler. Bu durum hastaların nörolojik testlere yanıt verebilme yetisini koruması sayesinde uyanık fiberoptik entübasyon, tümör diseksiyonu ya da stereotaktik implantasyon gibi kraniyotomi sırasında gerçekleştirilen işlemlerde kooperatif sedasyon olarak tanımlanmaktadır(101).

Deksmetomidin yoğun bakımda tedavi alan hastalarda, spontan solunumun korunmasına yardımcı olur ve sakin bir ekstübasyon imkanı sunar.

Dexmedetomidin, spinal kord ile beyinde bulunan $\alpha 2$ adrenerjik reseptörleri üzerinde etkili olan bir ilaçtır ve özellikle beyindeki uyku merkezini kontrol eden locus coeruleus üzerinde etkisini gösterir. Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme

alışmaları deksmedetomidin ile oluşan sedasyonun, GABAerjik ajanlardan farklı olarak beyin kan akışını doğal uykuya benzer şekilde sürdürdüğünü; ayrıca doğal uykuya özgü solunum düzeni ve EEG paternlerini tetiklediğini göstermektedir(102, 103).

Deksmedetomidin, benzodiazepinlere kıyasla çok daha düşük oranda anterograd amneziye neden olur. Amnezi etkisi, retrograd amnezi oluşturmada yalnızca yüksek plazma seviyelerinde (>1.9 ng/mL) meydana gelir(104).

2.3.2.4. Analjezi

Deksmedetomidin, analjezik etkilerini supraspinal yapılar ve omurilik düzeyindeki α -2a reseptörlerini aktive ederek gösterir. Ayrıca, spinal olmayan mekanizmalarla da analjezi sağlanabilir. Özellikle diz cerrahisi sırasında eklem içi uygulandığında, IV yolla uygulandığında gözlemlenene kıyasla daha düşük düzeyde sedasyon oluşturur. Bu, α -2a reseptörlerinin aktivasyonu ile C ve A δ lifleri aracılığıyla sinir sinyallerinin iletimini inhibe etmesi ve ensefalin gibi endojen analjezik maddelerin lokal salınımını artırmasıyla, operasyon sonrasında analjezik etkinin güçlenmesine neden olur(105, 106).

2.3.2.5. Solunum sistemi üstüne etkileri

Deksmedetomidin'in solunum sistemi üzerindeki etkileri oldukça sınırlıdır. Sedasyon sağlamak için kullanılan dozlarda, dakikadaki solunum hızını düşürebilir ve bu durum karbondioksit seviyelerinin artmasına neden olabilir(102). Deksmedetomidin, opioidlerden farklı olarak, normal seviyesinden 15 kat fazla kullanılsa bile solunum depresyonuna yol açmadan hipnotik, analjezik ve sedatif etkiler gösterir(104). Sevofluran veya desfluran kullanılarak uygulanan spontan ventilasyon anestezisi sırasında deksmedetomidin, endtidal karbondioksit düzeylerinde herhangi bir değişikliğe yol açmamaktadır(107).

2.3.2.6. Kardiyovasküler sistem üstüne etkileri

Deksmetomidin, alfa-2 adrenerjik agonisti etkileri nedeniyle, bradikardi ve hipotansiyon gibi kardiyovasküler etkilerle ilişkilidir. Deksmetomidin, plasebo ile karşılaştırıldığında nabızda dakikada ortalama 1 ila 8 atım ve sistolik kan basıncında yaklaşık 7 mmHg'lık bir azalmaya neden olabilir(108). Perioperatif dönemde hipertansif ve taşikardik hastalarda hemodinamik stabiliteyi iyileştirmeye yardımcı olabilir. Bununla birlikte iletim kusuru bulunan konjestif kalp yetmezliği hastalarında ya da kalp debisinin kalp hızına bağlı olduğu durumlarda olumsuz etkilere neden olabilir. Yüksek doz boluslar, periferik alfa-2B vasküler reseptörlerinin ilk stimülasyonu sonucu hipertansiyon ve bradikardi ile başlayabilir, ardından merkezi sempatolizis nedeniyle kan basıncında düşüşle bifazik bir yanıt görülebilir(104).

2.3.2.7. Metabolik etkiler

Alfa-2 agonistlerinin muhtemelen hipotalamustaki termoregülasyon merkezinde bulunan alfa-2B reseptörlerini hedef alarak titremeyi azalttıkları düşünülmektedir(109). Deksmetomidin, postoperatif titremenin neden olduğu rahatsızlığı azaltmada faydalı olabilir. Aynı zamanda akut inme ya da hipoksik iskemik ensefalopati tedavisinde terapötik hipotermi geciktirilmesi yoluyla titremenin kontrol altına alınmasında da etkili bir rol oynayabilir. Çocuklarda terapötik hipotermi sırasında, deksetomidin ile birlikte remifentanil kullanıldığında kalp hızında bir azalma gözlemlenmiştir(110).

2.3.2.8. Organ Koruyucu Etkisi

Alfa-2 reseptörlerinin agonist etkisi, taşikardi ve hipertansiyonun önüne geçerek, miyokardın oksijen ihtiyacını azaltmaya yardımcı olur ve kardiyoprotektif etki gösterir. Ayrıca ventriküler aritmi riskini düşürür ve nöroprotektif etkiler sağlar(111).

2.3.2.9. Diğer Etkileri

Son yapılan çalışmalarda, sepsis gelişen hastalarda inflamatuvar cevabı baskılayarak mortaliteyi azalttığına dair veriler bulunmaktadır(112).

Deksmedetomidin, tükürük üretimini ve diğer sekresyonları azaltarak ağız kuruluşuna yol açabilir. Ayrıca bağırsak motilitesinde azalma, atriyal natriüretik faktör salınımının uyarılması, renin ve antidiüretik hormon salınımının inhibisyonu, glomerüler filtrasyonun artışı ve böbreklerden su ile tuz atılımının artması gibi etkiler de görülmektedir(113).

2.3.2.10. Yan Etkileri

Deksmedetomidin, çeşitli avantajlar sunmasına rağmen klinik kullanım sırasında bazı yan etkilere neden olabilir. Bu etkiler arasında derin bradikardi, hipotansiyon, hipertansiyon, aritmi ve ventriküler fonksiyon bozuklukları bulunur. Kardiyovasküler sistemde bifazik etki gösterir. Bolus enjeksiyon sonrası önce vazokonstriksiyon, ardından bradikardi ve hipertansiyon gelişebilir. Bu durum vasküler düz kaslardaki alfa-2b reseptör aktivasyonu ile ortaya çıkar. Sürekli infüzyon sırasında ise santral sempatolizis sonucu vasodilatasyon ve hipotansiyon görülebilir, bu etki presinaptik alfa-2a reseptörleri aracılığıyla norepinefrin salınımının azalmasıyla gerçekleşir. Deksmedetomidin eğer dikkatli kullanılmazsa derin bradikardi ve özellikle sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu %30'un altında olan hastalarda sinüs arresti riski oluşabilir. Ayrıca, aşırı sedasyon durumunda hipoksi (%4), Cheyne-Stokes solunumu (<%1) ve atrial fibrilasyon (%1) gibi komplikasyonlar da görülebilir(114). Deksmedetomidin, nöbet aktivitesini tetiklemez. Ancak bazı yan etkiler görülebilir. Bunlar arasında ateş, bulantı, kusma, baş ağrısı, hipoksi, ağız kuruluşu, paradoksik ajitasyon, oligüri ve anemi yer alır(95).

2.3.2.11. Kullanım Endikasyonları ve Doz

Deksmedetomidin, anestezi indüksiyonunda yalnızca tek başına kullanılmaz, genellikle diğer ajanlarla kombinasyon halinde uygulanır. Ancak anestezi idamesi ve postoperatif sedasyon sırasında adjuvan ajan olarak kullanılabilir(115).

Alfa-2 adrenerjik reseptör agonistleri analjezik, sedatif ve anksiyolitik özellikleri nedeniyle premedikasyon amacıyla kullanılmaktadır. Klonidin ve deksmedetomidin, bu özellikleri nedeniyle en sık tercih edilen alfa-2 adrenerjik agonistlerdir(116). Deksmetomidin amnezik etki de gösterir. Bu amnezik etki, hastaların cerrahi işlem sonrası olayları hatırlamamaları açısından avantaj sağlayabilir. Ayrıca deksmedetomidin, endotrakeal entübasyon sırasında ortaya çıkan hemodinamik dalgalanmaları azaltarak, intraoperatif dönemde hemodinamik stabiliteyi korur. Deksmetomidin ayrıca, anestezi ve analjezi ajanlarının kullanım miktarını azaltarak, bu ilaçların yan etkilerini minimize eder(117).

Deksmetomidin ve sevofluran kombinasyonu, sevofluranın minimum alveolar konsantrasyon (MAK) gereksinimini büyük oranda düşürür(118).

Operasyon öncesinde 15 dakika kadar önce 0,33 ile 0,67 µg/kg arasında deksmedetomidin IV olarak verildiğinde etkili bir sedasyon sağlar ve endotrakeal entübasyon sırasında oluşabilecek hemodinamik değişiklikleri minimize eder(119). Intraoperatif sedasyon için yükleme dozu olarak 1 µg/kg'ın 10-15 dakika içinde uygulanması uygundur. Yükleme dozu sonrasındaki süreçte 0,2-0,7 µg/kg/saat arasında idame dozu uygulanabilir(104). Ani gelişebilecek hemodinamik değişikliklerin önüne geçebilmek için IV bolus dozları verilmemelidir. IV yolla verildiğinde enjeksiyon en az 10-15 dakika süresince yapılmalı eğer infüzyon devam edecekse bu süre zarfında uygulanan yükleme dozunun ardından devam edilmelidir. Ayrıca infüzyonlar 24 saat ile sınırlandırılmalıdır. Pek çok çalışmada, postoperatif dönemde mekanik ventilasyona ihtiyaç duyan hastalarda sedasyon amacıyla propofol yerine deksmedetomidin tercih edilmiştir. Ayrıca deksmedetomidin kullanıldığında, ventilatörden ayrılma sürecinde hemodinamik parametrelerin daha stabil olduğu gözlemlenmiştir(119).

Deksmetomidin, sempatolitik ve kolinerjik ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, özellikle vagal uyarı sırasında derin bradikardi hatta sinüs arrestine neden olabileceği bildirilmiştir. Deksmetomidine bağlı bradikardinin tedavisinde

atropin veya glikopirolat gibi ilaçlar kullanılır(95). Deksmetomidin, insanlarda çeşitli rejyonel bloklara lokal anestezi ile eklendiğinde, postoperatif analjeziyi iyileştirdiği ve blok süresini uzattığı gösterilmiştir. Ayrıca, intratekal ve epidural anestezinin kalitesini artırdığı bildirilmiştir(120, 121).

2.4. Antimikrobiyal Analiz

2.4.1. Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyonu veya Kirby-Bauer testi, klasik mikrobiyoloji yöntemlerinden biridir ve antimikrobiyal direnç tespiti için yaygın olarak kullanılır. Bu yöntem, antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarına sahip disklerin agar yüzeyine yerleştirilmesiyle gerçekleştirilir. İnkübasyon sonrası, antibiyotiklerin çevresindeki büyüme inhibisyon bölgeleri ölçülür. Bu bölgeler, organizmanın antibiyotiğe duyarlılığını (S), orta derecede duyarlı (I) veya dirençli (R) olduğunu belirlemek için referans tablolarıyla karşılaştırılır. Testin doğru sonuçlar verebilmesi için ortam seçimi, agar derinliği, nem, kuluçka koşulları ve doğru aşı yoğunluğu gibi faktörler önemlidir. Disklerin agar yüzeyine düzgün yerleştirilmesi de önemlidir, çünkü bu, difüzyon hızını etkileyebilir. Disk difüzyon testinin avantajı, özel ekipman gerektirmeyen basit bir test olmasıdır(122).

2.4.2. Mikrodilüsyon Testi

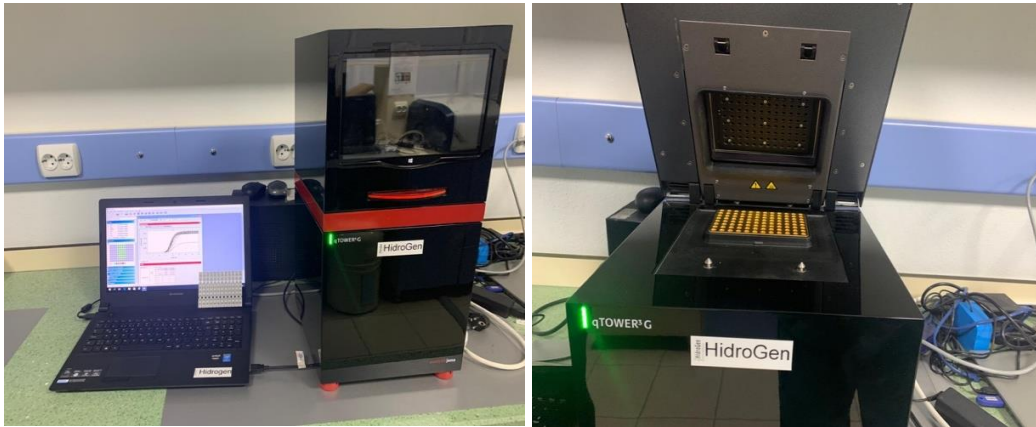
Broth seyreltme yöntemi, antibiyotiklerin farklı seviyelerdeki konsantrasyonlarını içeren bir broth ortamı kullanarak mikrobiyal aşılamaı test eder. Bu yöntem genellikle iki katına seyreltme kullanarak (örneğin 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/mL) yapılır. Kullanılan standart bakteriyel süspansiyonun yoğunluğu genellikle $1-5 \times 10^5$ CFU/mL arasındadır. 35°C'de inkübasyon sonrasında, büyüme görsel olarak veya otomatik bir okuyucu ile kaydedilir ve antibiyotiğin büyümeyi engellediği en düşük konsantrasyon olan Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) belirlenir(123).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

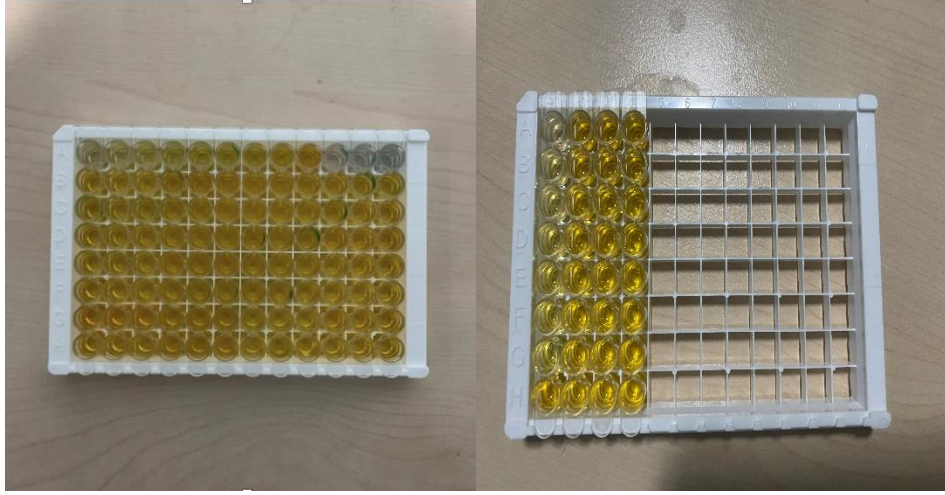
Bu çalışma, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda 12.11.2023 tarihinde gerçekleştirildi. Tez projesi, 2023/50 proje numarası ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonun'na desteklendi.

Tez çalışmasında, Bupivakain ve Deksmetomidin'in insan fibroblast hücreleri üzerindeki anti-inflamatuar özelliklerinin ve yara iyileşmesine etkilerinin in vitro koşullarda araştırılmasında, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı stoklarında bulunan, sünnet derisi hücre hatları (ATCC CRL2522; BJ Skin Fibroblast Human Lot: 70027151) kullanıldı.

Hücre kültürü pelletinden elde edilen nükleik asitlerdeki Tnf-alfa, interlokin 6 ve interlokin 10 ekspresyon düzeyleri q-Tower Real-time PCR cihazı (Analytik Jena, Jena, Germany) kullanılarak RT-PCR yöntemi ile çalışıldı. Ek olarak hücre kültürü materyali ile hidrokspirolin seviyesinin analizi için Elisa yöntemi ile Eliza Reader(Tecan, Switzerland) cihazı kullanılarak hesaplamalar yapıldı.



Şekil 9. Real Time Pcr Cihazı (Analytic Jena qTower)



Şekil 10. Elisa sonuçlarını gösteren preparatlar

3.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi

BJ deri fibroblast hücreleri, DMEM High Glucose (DMEM HG) besi ortamı içerisinde kültüre edildi.

DMEM-HG besi ortamı içeriği

- %10 (v/v) inaktif fötal sığır serumu (FBS)
- %1 (v/v) L-glutamin
- %0,1 (v/v) Gentamisin

1. Sıvı azot tankında saklanan kriyotüpler, çıkarıldıktan sonra içerdikleri hücreler 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda hızla çözdürüldü.

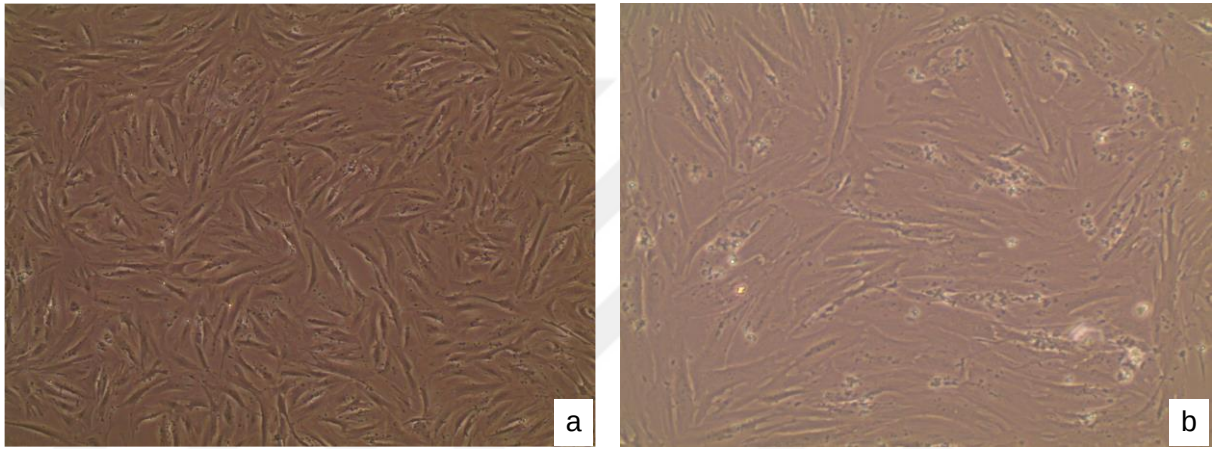
2. Çözdürülen kriyotüp, %70 etanol ile silinerek steril laminar akış kabinine alındı. Hazırlanan besi ortamı tüp içerisine yavaşça eklendikten sonra, içeriği dikkatlice toplanarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.

3. Hücre süspansiyonu, 800 rpm'de, 4 °C'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüjleme sonrası oluşan üst faz dikkatlice uzaklaştırıldı, dipte oluşan hücre pellet'i ise alındı.

4. Pellet üzerine uygun besiyeri ilave edilerek homojen bir süspansiyon elde edildi.

5. Homojenize edilen hücre süspansiyonu, 75 cm² yüzey alanına sahip kültür flasklarına aktarıldı.

6. Gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra, hücreler %5 CO₂ içeren atmosferde, 37 °C’de inkübasyona alındı.



Şekil 11. BJ deri hücre hatlarının ters faz ışık mikroskobu görüntüleri (a. 4x büyütme, b. 10x büyütme)

3.2. Hücre hatlarının pasajlanması

1. Hücre morfolojileri ters (inverted) mikroskop ile düzenli olarak gözlemlendi, besi ortamları ise iki günde bir yenilendi.

2. Hücreler %80–90 konfluens seviyesine ulaştığında pasajlama işlemine geçildi. Bu aşamada, flask içerisindeki eski besi ortamı uzaklaştırıldı ve ardından hücre yüzeyini yıkamak amacıyla DPBS eklendi.

3. Ardından, hücrelerin ayrılmasını sağlamak amacıyla yüzeylerine tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve flasklar %5 CO₂ içeren inkübatörde 4–5 dakika süreyle bekletildi. Bu işlemle hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı.

4. Mikroskop altında yapılan gözlemlerle tüm hücrelerin yüzeyden ayrıldığı doğrulandıktan sonra, üzerine uygun serum içeren besi ortamı eklendi ve hücreler yıkandıktan sonra toplandı. Toplanan hücreler, 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 800 rpm hızında, 4 °C'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırıldı ve dipteki pellet üzerine besi ortamı eklenerek hücreler homojenize edildi.

6. Hücre süspansiyonu, hücrelerin pasaj oranına göre seyreltilerek yeni hücre süspansiyonu oluşturuldu ve 75 cm² yüzey alanına sahip kültür flasklarına aktarıldı. Hücreler, 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

3.3. Hücre hatlarının stoklanması

Çalışmanın devamlılığının sağlanması için hücreler stoklandı.

1. %80–90 konfluens seviyesine ulaşan hücreler, tripsinizasyon yöntemi ile yüzeyden ayrıldı.

2. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pellet'inin üzerine, %90 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma ortamı eklenildi ve hücreler, her bir kriyotüpe 1 ml olarak paylaştırıldı.

3. Kriyotüpler, ilk olarak -80 °C'de bir gece bekletildikten sonra, daha uzun süreli saklama amacıyla -196 °C'deki sıvı azota transfer edildi.

3.4. Bupivakain ve Deksmetomidin'in deri fibroblast hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Yara iyileşmesi ve bu sürecin önemli bir parçası olan inflamatuvar sürecin analizinde kullanılacak bupivakain ve deksmedetominin hücrelerin canlılıklarını hangi dozda nasıl etkiledikleri ve etkin ilaç dozları belirlenmeye çalışıldı. Bu doğrultuda, MTT analizi gerçekleştirildi. İlgili işlem prosedürü aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Kùltür yüzeyinde %80-90 konfluens seviyesine ulaşan hücrelerin üzerindeki eski besi ortamı uzaklaştırıldı ve ardından hücre yüzeyleri DPBS ile yıkandı.

2. Ardından, hücrelerin yüzeyden ayrılması için üzerine tripsin-EDTA çözeltisi eklenildi ve hücrelerin ayrılması sağlandı.

3. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine besi ortamı eklenildi ve hücre süspansiyonu homojenize edilerek 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

4. Hücre sayısını belirlemek amacıyla, hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve Neubauer lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

$$\text{Hücre sayısı (h ml)} / \text{=canlı hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4 / \text{Sayılan kare sayısı}$$

5. Santrifüj tüpündeki hücre süspansiyonu, +4 °C'de 800 rpm hızla 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelletinin besi ortamı ile homojenizasyonu sağlandı.

6. Homojenize edilen BJ hücreleri, 5×10^4 hücre/mL konsantrasyona seyreltilerek üçlü deneme (n=3) ile 96 kuyucuklu kùltür plakalarına ekildi.

7. Hücreler, %5 CO₂ içeren 37 °C'deki nemli inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edildi.

8. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler üzerine sentezlenen bileşikler farklı konsantrasyonlarda eklendi. Bupivakain için % 0,5 Buvicaine(Polifarma,Türkiye)'den konsantrasyonlar: 1,25 mg/ml'den başlamak üzere yarıyarıya yapılan seyreltmelerle toplam 8 doz, Deksmetomidin için Dekstomid(Polifarma, Türkiye) 200mcg/2 ml'den kullanılan konsantrasyonlar: 25 µg/ml'den başlamak üzere yarıyarıya yapılan seyreltmelerle toplam 8 doz kullanıldı.

9. Hücreler ilgili bileşenler ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda MTT (3-(4,5- dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu) ile canlılık testi uygulandı. MTT analizi, hücre kùltürü çalışmalarında hücresel

sitotoksosite, canlılık ve proliferasyonun ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir(124). MTT testi, mitokondriyal suksinat dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenerek MTT'nin, MTT-formazan kristallerine dönüşmesini esas alır. Bu test, aslen mitokondriyal aktiviteyi ölçmeye yönelik olsa da, dolaylı olarak hücre canlılığını belirlemek için sıkça kullanılır(125). MTT testi için, pleytteki eski besi ortamı uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/mL konsantrasyonunda, PBS içerisinde hazırlanmış) içeren yeni besi ortamı eklenildi.

10. Hücreler, karanlık ortamda, 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 saat süreyle inkübe edildi.

11. 3 saatlik inkübasyonun ardından, MTT içeren ortam uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı.

12. Formazan kristalleri çözüldükten sonra, pleyt ELISA okuyucusunda 570 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans değerleri kaydedildi.

13. Elde edilen absorbans verileri kullanılarak, GraphPad Prism 9.0.0 yazılımı ile konsantrasyona dayalı hücre canlılıkları hesaplandı ve grafikler oluşturuldu.

3.5. Hücre göçü analizi ile Bupivakain ve Deksmetomidin destekli yara iyileşmesi kapasitesinin belirlenmesi

Önceki basamakta detaylı olarak açıklanan MTT analizinde elde edilen etkin Bupivakain ve Deksmetomidin konsantrasyonları kullanılarak hücre göçü ve yara iyileşme analizi yapıldı. Bu analiz, hücre göçünü ölçmek için kullanılan basit ve düşük maliyetli bir yöntemdir(126). Çizik veya migrasyon tahlili migrasyonun, anjiyogenezin, proliferasyonun ve iyileşme süreçlerinin incelenmesi amacıyla in vitro yapılan bir araştırma yöntemidir(127). Diğer yöntemlerle kıyaslandığında, in vitro çizik analizi, özellikle hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar için uygun bir yöntemdir. Bu bağlamda, in vitro çizik yara iyileştirme testi, hücrelerin şartlandırılmış ortamlarda mevcut metabolitlere maruz kalırken çoğalma ve göç süreçlerini değerlendirmek için yararlı bir araçtır. Bu yöntem, hücre göçünü taklit eden bir ortam sağladığı için, ilgili

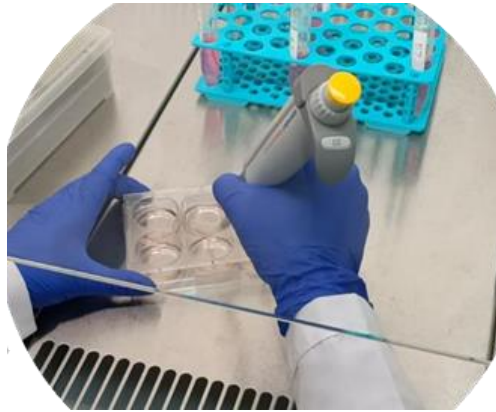
bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki anti-metastatik etkilerini ve kemik rejenerasyonunu modellemeye olanak tanır. Aşağıda bu testin ayrıntıları özetlenmiştir:

1. BJ hücreleri, 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekildikten sonra, hücrelerin %80-90 konfluens düzeyine ulaşması beklendi.

2. Belirtilen konfluens seviyesine ulaşan hücrelerin yüzeyine, steril P200 pipet ucu ile bir 'çizik' oluşturuldu ve ardından hücreler, belirlenen etkin dozlarda Bupivakain ve Deksmetomidin içeren besi ortamları ile inkübe edildi.

3. Hücreler, ilgili bileşenlerle 48 saat süreyle kültüre edildi ve her 24 saatte bir, inverted mikroskop ile fotoğraflandı.

4. Çekilen mikroskopi fotoğrafları kullanılarak Image J yazılımı aracılığıyla yara iyileşme oranları alansal olarak hesaplanıldı.

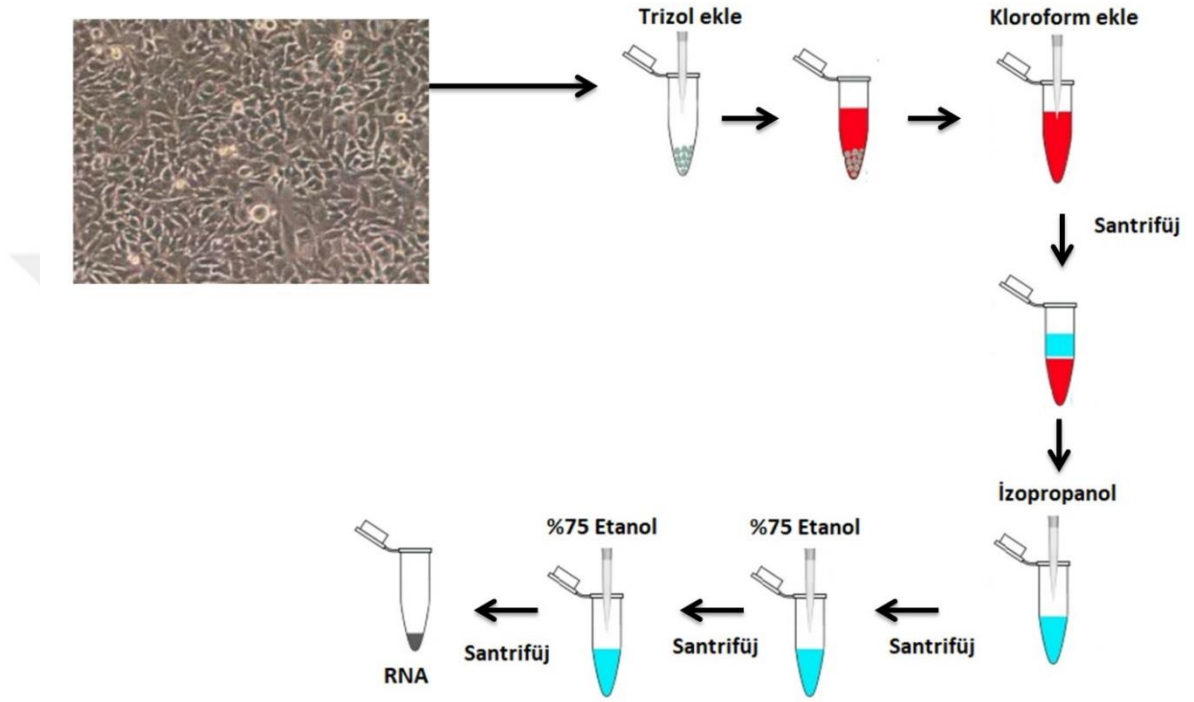


Şekil 12. Altı gözlü hücre kültür pleytinde Yara modeli oluşturulması

3.6. Bupivakain ve Deksmetomidin destekli antiinflamatuvar etkinin belirlenmesi

Yara iyileşmede önemli etkisi olan antiinflamatuvar sitokinler Tnf-alfa, interlokin 6 ve interlokin 10 'un ekspresyonel seviyelerini belirlemek amacıyla, çizik

analizinde 48 saat boyunca bupivakain ve deksmedetomidin ile muamele edilen hücrelerden RNA izole edildi ve RT-PCR analizi yapıldı. İlgili işlem basamakları aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 13. RNA eldesindeki yapılan işlemlerin adım adım şematize olarak gösterimi

3.6.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

BJ hücreleri, 75 cm²'lik kültür kaplarına ekildikten sonra, hücre yüzeylerinin %80-90 konfluens seviyesine ulaşması beklenildi. Ardından, hücreler tripsinizasyon yöntemiyle yüzeyden kaldırılarak her bir hücre hattı için üç farklı petri (20 cm²) içerisine yerleştirildi. Hücrelerin %80-90 konfluens seviyesine ulaşmasına kadar, besi ortamları her gün değiştirildi. İstenilen hücre yoğunluğu ve yüzey alanına

ulaşıldığında, hücrelerin üzerinde yara alanları oluşturuldu. Kontrol grubu, etken madde verilmeden bir petriye yerleştirildi; diğer petrilere ise bupivakain ve deksmedetomidin'in etkin konsantrasyonları eklenerek, bu bileşiklerin etkinlik gösterdiği süre boyunca muamele edildi. İnkübasyon sürecinin ardından, eski besi ortamı uzaklaştırıldı ve kültüre edilen hücrelerden toplam RNA, TRIzol reaktifi kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda izole edildi. Total RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu, DeNovix DS-11 Nanodrop spektrofotometresi (DeNovix, USA) kullanılarak ölçüldü. Elde edilen total RNA, -80°C'de saklandı.

Hücrelerin madde ile etkileşiminin ardından 48 saat sonra, hücreler DPBS ile yıkanarak tripsin ile muamele edildi. Hücreler, 37 °C'de %5 CO₂ ortamda 3-5 dakika süreyle tripsin ile işleme tabi tutuldu. Sonrasında, hücre kazıyıcıları kullanılarak hücreler petri yüzeyinden tamamen kaldırıldı. Kaldırılan hücreler, besi ortamı ile homojen şekilde süspanse edildikten sonra, eklenecek TRIzol miktarını belirlemek için hücre sayımı yapıldı. Sayım için hücre süspansiyonundan 200 µl mikrosantrifüj tüpüne alındı, kalan süspansiyon ise santrifüj tüplerine aktarıldı. Ardından, hücreler 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti, 1 ml besi ortamı ile toplanarak 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. RNA izolasyonu işlemine geçmeden önce, besi ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 4 °C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Son olarak, TRIzol (Sigma-Aldrich, USA) ile RNA izolasyonu protokolü uygulandı.

TRIzol protokolü;

- Başlangıç materyalimize göre örnekler trizol reaktifinde parçalandı ve homojenize edildi.

- Monolayer kültür için;

- a) Hücreler, büyüme ortamından çıkarıldı.

- b) 1×10^5 - 1×10^7 hücre için pellet üzerine 0.3-0.4 ml TRIzol çözeltisi ilave edildi.

c) Lizat, pipetaj ile homojenize edildi.

1. Nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrışabilmesi için 5 dakika inkübe edildi.

2. Lizis işlemi için kullanılan her 1 ml TRIzol reaktifi başına 0,2 ml kloroform eklendi ve tüp sıkıca kapatıldı.

3. 2-3 dakika süreyle santrifüj işlemi yapıldı.

4. Örnekler, 15 dakika boyunca +4 °C'de 12,000 x g'de santrifüj edildi. Karışım, alt kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz üst sulu faza ayrıldı.

5. RNA içeren sulu fazı yeni bir tüpe aktarıldı.

6. Sulu faza, her 1 ml TRIzol için 0.5 ml izopropanol eklendi..

7. 10 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Ardından, 15 dakika boyunca +4 °C'de 12,000 x g hızda santrifüj edildi. Total RNA çökeltisi, tüpün boğazında beyaz, jel benzeri bir yapı oluşturdu.

9. Mikropipet ile süpernatant atıldı.

10. Pellet, her 1 ml TRIzol için %75 etanol içinde tekrar süspanse edildi.

11. Numune kısa süreli olarak vorteks edildi, ardından 5 dakika süreyle 7500 x g hızda +4 °C'de santrifüj edildi.

12. Mikropipet ile süpernatant uzaklaştırıldı ve bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı.

13. RNA pelleti, tüpün kapağı açık şekilde 5-20 dakika süreyle hava ile kurutuldu.

Protokol uygulandıktan sonra izole edilen total RNA'nın konsantrasyonu ölçüldü. Total RNA'ya 20 µl DEPC'li su (RNase inhibitörü) eklenip, mikropipet ile homojenize edildi. Ardından, nanodrop cihazı ile ölçüm yapıldı.

3.6.2. Total RNA'dan Revers Transkripsiyon ile Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Her bir örnekten izole edilen total RNA'dan, iScript Reverse Transcriptase Supermix kullanılarak tek zincirli cDNA sentezlendi. Revers transkripsiyonun yapıldığı reaksiyon koşulları Tablo 4'te verildi.

Tablo 4. Revers transkripsiyonun yapıldığı reaksiyon koşulları

Reaksiyon bileşeni	Hacmi
Iscript RT Supermix	5 ul
RNA örneği	4 ul
Rnase-free su	19 ul

Revers transkripsiyonun yapıldığı termal koşullar Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Revers transkripsiyonun yapıldığı termal koşullar

İşlem adı	Sıcaklık	Süre
Priming	25° C	5 dakika
RT	46 ° C	20 dakika
İnaktivasyon	95 ° C	1 dakika

RNA'nın cDNA'ya dönüştürüldüğü bu işlem Biorad 100 T PCR cihazı yardımı ile yapıldı.

3.6.3. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time–PCR, RT-qPCR)

Bu çalışma, Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) yönteminin qTOWER3G Real-Time PCR Termosiklörü üzerinde gerçekleştirilmesini ele alıyor. RT-qPCR, gen ekspresyonu analizleri için hızlı ve hassas bir yöntem olarak kullanılır. Bu çalışmada, EvaGreen boyası kullanıldı. EvaGreen, çift sarmallı DNA bağlayıcı bir boyadır ve PCR reaksiyonları için daha az inhibe edici ve SYBR Green'e kıyasla daha az toksik olarak bilinir. Serbest halde sulu çözeltide zayıf floresan gösteren bu boya, çift sarmallı DNA ile bağlandığında daha belirgin bir floresans sergiler. Çalışmada, göreceli kantifikasyon (relative quantification) yöntemiyle gen ekspresyonu miktar tayini yapıldı. RT-qPCR, gen ekspresyon seviyelerini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir göreceli miktar tayini yöntemidir. Bu analizde, proinflamatuvar genler (TNF- α ve IL-6), antiinflamatuvar gen (IL10) ve referans gen (housekeeping gen) olarak GAPDH (Gliseralehid 3-Fosfat Dehidrogenaz) kullanıldı(128, 129).

Tablo 6. Real time PCR için kullanılan primer diziler(128, 129).

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-----3')
IL6-F	GGTACATCCTCGACGGCATC
IL6-R	GCCTCTTTGCTGCTTTCACAC
IL10-F	GTGATGCCCCAAGCTGAGA
IL10-R	CACGGCCTTGCTCTTGTTTT
TNF α -F	CCCCCAGAGGGAAGAGTTC
TNF α -R	CAGCTTGAGGGTTTGCTACA
GAPDH-F	GGATTTGGTCGTATTGGG
GAPDH-R	GGAAGATGG TGATGGGATT

PCR reaksiyonu için gerekli olan bileşenler, Tablo 6'da belirtildiği şekilde, kabarcık oluşmamasına özen gösterilerek Real-Time PCR cihazına uygun şeffaf ve

düz kapaklı PCR tüplerine aktarıldı ve homojen şekilde karıştırıldıktan sonra cihaza yerleştirildi.

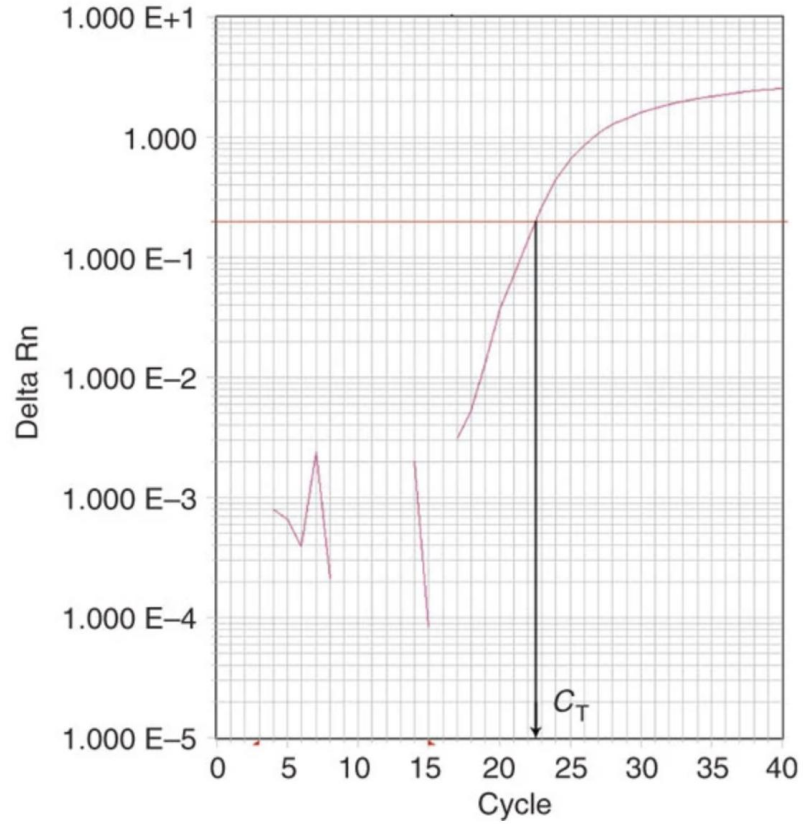
qTOWER3G Real-Time PCR cihazında uygulanan program şu şekilde oluşturuldu: Başlangıç denatürasyonu 94 °C’de 3 dakika, ardından 40 döngü boyunca; 94 °C’de 30 saniye denatürasyon, 56 °C’de 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C’de 1 dakika uzama adımları gerçekleştirildi.

Reaksiyon sonunda Ct (eşik döngü) değerleri, cihazın yazılımında tanımlı otomatik eşik değeri kullanılarak hesaplandı.

Tablo 7. PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler

Reaksiyon bileşeni	Hacmi
Primer F	2 ul
Primer R	2 ul
10X Taq DNA polimeraz tamponu	2 ul
dNTP	0,4 ul
25 mM MgCl ₂	1,6 ul
Evagreen(20 X)	1
Taq DNA polimeraz	0,25 ul
Su	4,75 ul
cDNA	6 ul
Toplam Hacim	20 ul

Real-time PCR (RT-PCR), gen ifadesini ölçmede etkili bir yöntemdir. Bu teknikte, kantitatif analiz için "eşik döngüsü" (CT, cycle threshold) kullanılır. CT, PCR sırasında floresan sinyalinin, önceden belirlenmiş eşik seviyesini geçtiği döngü sayısını ifade eder. Veriler CT değeriyle sunulduğunda, PCR'nin amplifikasyon aşamasının üstel olduğu kabul edilir. CT değeri, amplikon miktarıyla ters orantılıdır; yani CT değeri düşükse, amplikon miktarı daha yüksektir(Şekil 14) (130).



Veriler tipik bir gerçek zamanlı PCR çıkışından sunulur. PCR 40 döngü boyunca çalıştırıldı. Eğrinin eşiği (yatay kırmızı çizgi) kesiştiği nokta C_T 'dir. Bu örnekteki C_T 22.5'tir.

Şekil 14. Real Time Pcr Cihazı çıktısı ve C_T hesaplanması'nın şematik gösterimi(130).

Gerçek zamanlı PCR verilerinin analizinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de karşılaştırmalı C_t yöntemidir. Bu yaklaşım, PCR reaksiyonlarının verimliliğinin 1'e yakın olduğu ve hedef gen ile referans (iç kontrol) genin benzer amplifikasyon verimliliğine sahip olduğu varsayımlarına dayanır. Yöntemin başlıca avantajları arasında uygulama kolaylığı ve gen ekspresyon düzeylerini kat değişim şeklinde ifade edebilme özelliği bulunmaktadır. Bu analiz yöntemiyle elde edilen sonuçlar; "deney grubu örneğinde, negatif kontrol grubuna kıyasla, referans gene normalize edilmiş

şekilde hedef genin ekspresyon seviyesinde gözlenen değişim" şeklinde yorumlanabilir.

3.6.4. mRNA Ekspresyon Düzeylerinin 2-ΔΔCT Analiz Yöntemine Göre Hesaplanması

Real-time PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin kantifikasyonu için "Komperatif ΔΔCt" yöntemi kullanıldı. ΔΔCt değeri, PCR ürünlerinin miktarındaki anlamlı artışın başladığı ilk döngüyü temsil eder. Kalibratör olarak referans gen ve kontrol grubundan alınan veriler kullanıldı. Hedef genin ekspresyonu, GAPDH gibi bir iç kontrol genine göre değerlendirildi. Bu yaklaşım, düşük yoğunlukta sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmalarında özellikle uygundur. Verilerin hesaplanmasında aşağıdaki matematiksel denklemler kullanıldı:

$$\text{Kontrol } \Delta C_T = \text{Kontrol } C_T(\text{gen}) - \text{Kontrol } C_T(\text{Beta Actin})$$

$$\text{Örnek } \Delta C_T = \text{Örnek } C_T(\text{gen}) - \text{Örnek } C_T(\text{Beta Actin})$$

$$\Delta \Delta C_T = [(\text{Örnek } \Delta C_T)_{\text{ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta C_T)_{\text{ort.}}]$$

$$\text{Hedef gen mRNA miktarı} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) eksponansiyel bir süreç olduğu için gen ekspresyonu değişimi genellikle 2'nin üssel fonksiyonu olarak ifade edilir. Bu, genetik analizlerde gen ekspresyonunu belirlemek için yaygın bir yöntemdir. ΔΔCt (delta delta Ct) değeri, örnek grubundaki hedef genin ekspresyonunun kontrol grubuna göre ne kadar değiştiğini gösteren bir ölçüttür. ΔΔCt değeri sıfır olduğunda (ΔΔCt ≈ 0), 2^{-ΔΔCt} değeri yaklaşık 1 olur. Bu, hedef genin örnekteki ekspresyonunun kontrolle aynı olduğunu gösterir. ΔΔCt değeri pozitifse, örnekteki hedef genin ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış demektir; negatifse, ekspresyon azalmıştır. Sonuçlar, hedef genin kontrol grubuna göre relatif ekspresyon miktarını verir. Bu, bir orantı ifadesi olduğu için birim içermez ve sadece hedef genin ekspresyonunun kontrolle karşılaştırıldığında ne kadar arttığını veya azaldığını gösterir(130).

3.6.5. Yara iyileşmesinde Hyp(Hydroxyproline) seviyelerinin ELISA yöntemi ile ölçülmesi

ELISA analizi, kit üreticisi ticari firmanın (ELK Biotechnology, Wuhan, Hubei, China) önerileri doğrultusunda belirlenen prosedüre birebir uyularak yapıldı..

Tablo 8. ELISA ve RT-PCR için kullanılan kimyasal malzemeler

	Katalog No	Marka	Malzeme Adı
ELISA	ELK8687	ELK Biotechnology	Hidroksiprolin ELISA Kiti
	W09-01- 50	A.B.T. Laboratory Industry	BCA Protein Assay Kit
	HY- K0011	MCE- MedChemExpress	Protease İnhibitor Cocktail
RT- PCR	FABRK 001-2	Favorgen	Kandan RNA İzolasyon Kiti
	170-8840	Biorad- iScript	Reverse Transcription Supermix for RT- qPCR
	EP0401	Thermo	Taq DNA polymerase
	R0193	Sigma- ThermoFisher Scientific	dNTP mix
	31000	Biotum	EvaGreen Dye

3.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu çalışmada bupivakain ve deksmedetomidinin *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa), *Klebsiella pneumonia* (K. pneumonia), *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ve *Enterococcus faecalis* (E. faecalis) patojen bakteri suşları ve *Candida albicans* (C. albicans) ve *Candida utilis* (C. utilis) patojen fungus suşları üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) yöntemi kullanılarak belirlenildi.

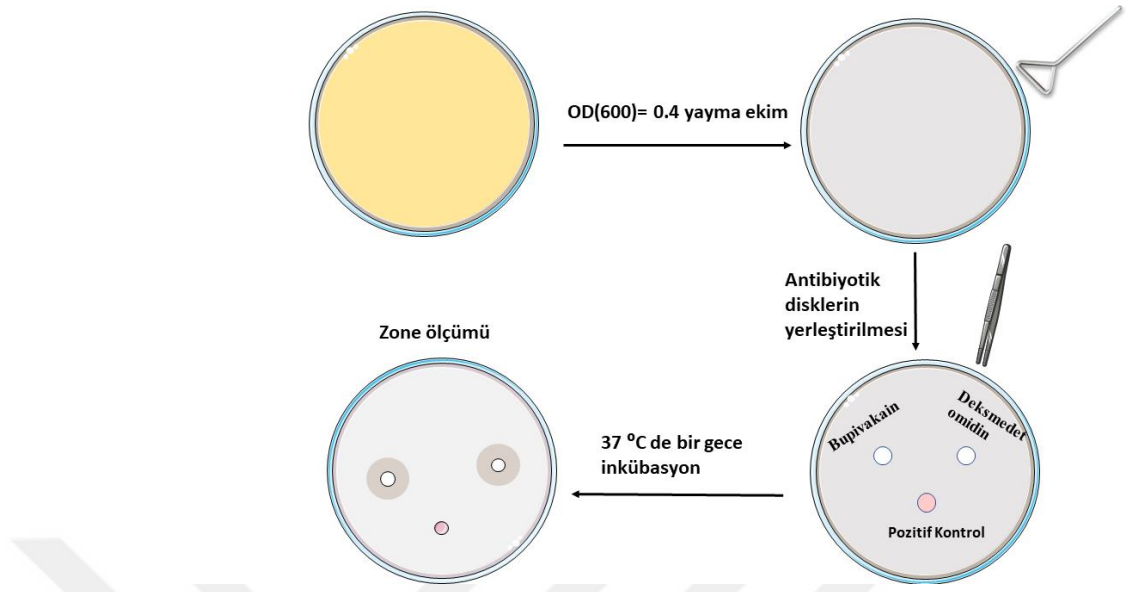
3.7.1. Mikrodilüsyon Testi

MIC yöntemi, etken maddenin antimikrobiyal etki gösterdiği minimum dozu belirlemek için uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem ile ilacın bakteri ve fungus hücrelerinin %50'sini inhibe eden doz miktarı (MIC50) deneysel çalışma sonucu elde edilen veriler kullanılarak GraphPad Prism 9.0.0 yazılımı yardımı ile hesaplanıldı.

Bu analizde, 96 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µL besiyeri ilave edilerek ardından ilk kuyucuklara sırasıyla Bupivakain (500µg/mL), Deksmetomidin (12500ng/mL) ve Bupivakain-Deksmetomidin karışımı (500µg/mL) konularak seri dilüsyon yapıldı. Mikroorganizmaların yoğunluğu, her bir konsantrasyon için 0,5 McFarland standardına (yaklaşık 5×10^7 mikroorganizma mL⁻¹) eşit olacak şekilde standartlaştırılarak ve bu kültür 96 kuyucuklu pleytlere inoküle edilerek 37 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, her kuyucuğun optik yoğunluğu bir mikropleyt okuyucu kullanılarak 600 nm'de kaydedildi. Elde edilen ham veriler GraphPad Prism 9.0.0 yazılımına işlenerek ilaç etken maddelerinin minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri hesaplanıldı.

3.7.2. Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyon yöntemi, yapay olarak sentezlenmiş veya doğal kaynaklardan elde edilen maddelerin bakteri veya fungus suşları üzerindeki toksik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Disk difüzyon yöntemine ait şema verilmiştir. Buna göre:



Şekil 15. Disk difüzyon yönteminin grafiksel gösterimi

İlaçların antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenebilmesi için öncelikle *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *S. aureus* ve *E. faecalis* patojen bakteri suşları ve *C. albicans* ve *C. utilis* patojen fungus suşları 4 mL Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri içeren deney tüplerine inoküle edilerek bir gece inkübasyona bırakıldı. Bu mikrobiyal kültürlerin OD (600 nm)'deki absorbansı 0.4 olacak şekilde ayarlanarak LB agar içeren petri kaplarına yayma ekimi yapıldı.

Bu yöntemde ticari olarak satın alınan boş, 6 mm çapındaki antibiyotik diskler kullanıldı. Yayma ekimini takiben, steril boş antibiyotik diskler bu petri kaplarına pens yardımı ile yerleştirildi. Mikrodilüsyon testinde kullanılan dozda ilaçlar sırasıyla 20 µL emdirildi. Pozitif kontrol olarak Ampisilin antibiyotik diski yerleştirilerek tüm petriler 37 °C de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir diskin zone çapı ölçülerek antimikrobiyal etkinlikleri kantitatif olarak değerlendirildi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. MTT test sonuçları, deney ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9.0 yazılımı aracılığıyla gerçekleştirildi. Verilerin analizinde iki

yönlü ANOVA testi uygulandı ve sonuçlar %95 güven aralığında yorumlandı. Tüm veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde sunuldu. $p \leq 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1.Hücre Canlılık Testi

Bupivakain(Bup) ve Deksmetominin(Dex) yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin in vitro koşullarda araştırılmasında analize dayanak olacak sonuçları elde edebilmek için BJ hücreleri üzerinde MTT testi bir önceki bölümde anlatıldığı gibi yapılmış ve ortaya çıkan sonuçlar Tablo-9 da verilmiştir.

Tablo 9. MTT testinde kullanılan ilaç dozları

	Bupivakain Konsantrasyonları (mg/ml)	Deksmetominin Konsantrasyonları (µg/ml)	Bup-Dex Konsantrasyonları (1:1 karışım)
1	1.25	25	1.25 : 6.25
2	0.625	12.5	0.625 : 12.5
3	0.3125	6.25	0.3125 : 6.25
4	0.15625	3.125	0.16 : 3.125
5	0.078125	1.5625	0.08 : 1.56
6	0.0390625	0.78125	0.04 : 0.78
7	0.01953125	0.390625	0.02: 0.39
8	0.009765625	0.1953125	0.1 : 0.2

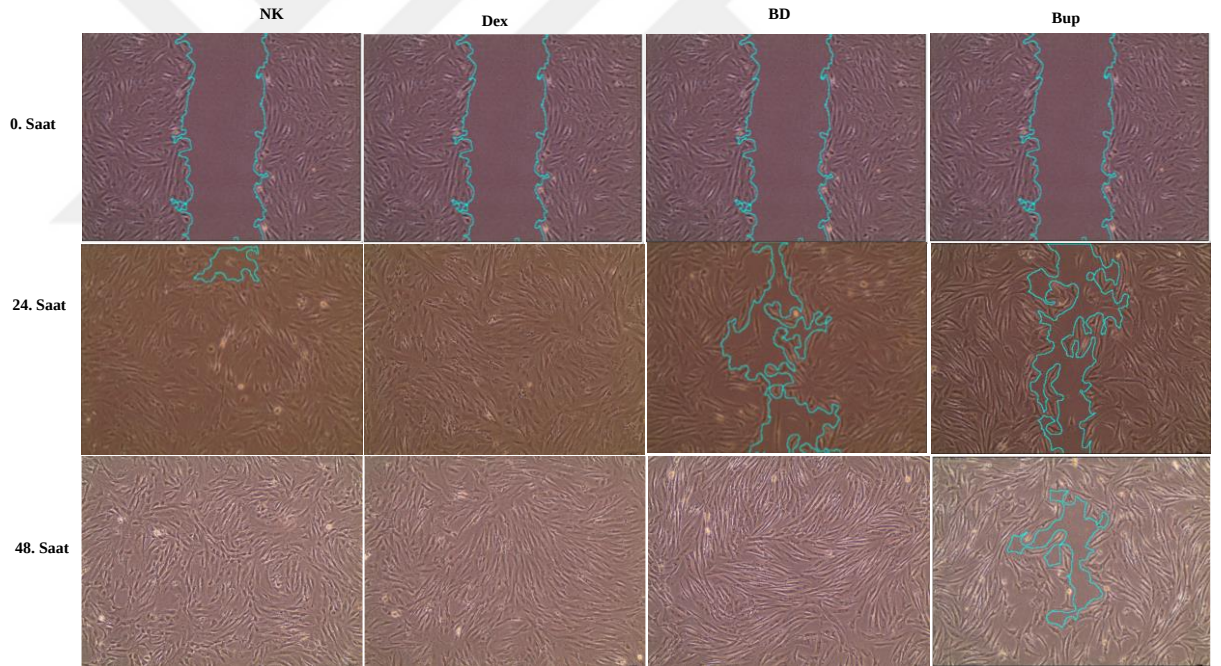
Tablo 10. Hücre canlılık testi sonuçları

	BUP-DEX	yüzde canlılık BD	DEX	yüzde canlılık D	BUP	yüzde canlılık B	NK
1	0,08	16,54	0,30	65,72	0,07	14,69	0,46
2	0,35	77,23	0,54	117,96	0,09	19,14	0,46
3	0,39	85,44	0,51	112,15	0,31	68,45	0,46
4	0,62	134,87	0,65	143,07	0,38	82,76	0,46
5	0,633767	138,70	0,676667	148,09	0,4719	103,28	0,46
6	0,571667	125,11	0,601967	131,74	0,454833	99,54	0,46
7	0,6539	143,11	0,692067	151,46	0,465967	101,98	0,46
8	0,4968	108,73	0,438467	95,96	0,5534	121,12	0,46

Çalışmalar sonucunda belirlenen yüzde canlılık oranlarına göre yara iyileşmesi testlerinde kullanılmak üzere; bupivakain için % 68,45 canlılık oranı olan 0.3125 (mg/ml) konsantrasyonu, deksmedetomidin için % 112,15 canlılık oranı olan 6,25 (mg/ml) konsantrasyonu belirlenildi.

4.2. Hücre Göçü (Rejenerasyon / Yara İyileşme Testi)

P200 pipet ucu ile bir 'çizik' oluşturulan hücreler MTT analizinde hesaplanan etkin dozlarda Bupivakain ve Deksmedetomidin içeren besi ortamları ile inkübasyona bırakıldı. Hücreler, belirtilen bileşenlerle 48 saat süreyle kültüre edildi ve her 24 saatte bir hücrelerin durumu inverted mikroskop altında görselleştirildi. 48 saat sonunda görüntüler, Image J yazılımı aracılığıyla analiz edildi ve % migrasyon oranları alansal olarak hesaplandı.

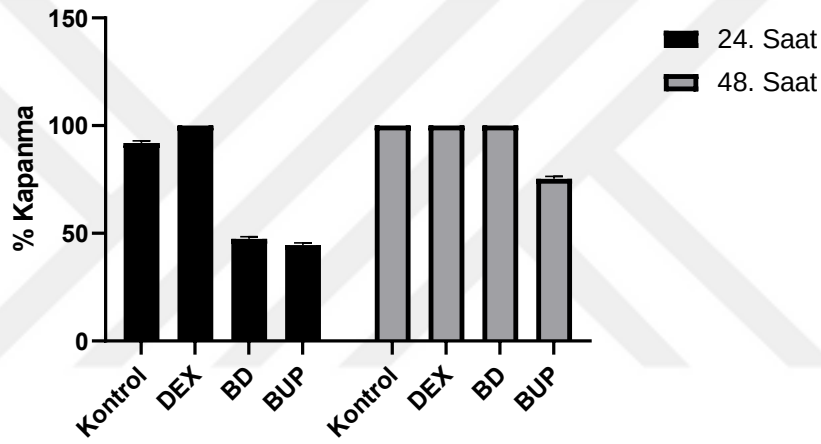


Şekil 16. Çizik yara alanı oluşturulan BJ hücreleri 4X büyütme ile mikroskop görüntüleri Olympus CKX42(Tokyo,Japan)

Tablo 11. 24 ve 48. Saatteki % kapanma oranları

%Kapanma	24. saat	48. saat
Negatif kontrol	91.91903557	100
DEKSMEDETOMİDİN	100	100
BUP-DEX	47.40851001	100
BUPİVAKAİN	44.59783778	75.9708

Tablo 12. % kapanma oranlarının grafiksel gösterimi



24 saat sonra GraphPad Prism 9.0.0 yazılımı kullanılarak elde edilen verilerin sonuçlarının iki yönlü ANOVA testi ile yapılan istatistiksel analizlerine göre 4 grubun da birbiriyle anlamlı bir fark oluşturduğu saptandı($p<0,01$). BJ hücrelerinin çizik olarak oluşturulan yüzeyde yara bölgesine göç ettiği gözlemlendi. Sadece deksmedetomidin kullanılan hücrelerde yara yeri alanının tamamen kapanmış olduğu görüldü. Sadece bupivakain kullanılan hücrelerde % kapanma oranı kontrol grubuna göre azalmış (44,5) olarak bulundu. Deksmetomidin ve bupivakainin beraber kullanıldığı hücrelerde % kapanma oranı kontrol grubuna göre azalmış ancak sadece bupivakain kullanılan hücrelerdekinden daha yüksek (47,4) olarak bulundu.

48 saat sonra elde edilen verilerin iki yönlü ANOVA testi ile yapılan istatistiksel analizlerine göre 4 grubun da birbiriyle anlamlı bir fark oluşturmadığı

saptandı($p<0,01$). Sadece deksmedetomidin kullanılan ve deksmedetomidin ile bupivakainin beraber kullanıldığı hücrelerde kontrol grubuyla aynı olarak yara yeri alanının tamamen kapanmış olduğu görüldü. Sadece bupivakain kullanılan hücrelerde % kapanma oranı kontrol grubuna göre azalmış (75.9) olarak bulundu.

4.3. İmmunokimyasal bulgular

Araştırmada sünnet derisi hücre hatları (ATCC CRL2522; BJ Skin Fibroblast Human Lot: 70027151) kullanılarak doku örneklerinden, q-Tower Real-time PCR cihazı (Analytik Jena, Jena, Germany) kullanılarak RT-PCR yöntemi ile belirlenen TNF- α ve IL-6 (proinflamatuvar genler), IL10 (antiinflamatuvar gen) ve referans gen (housekeeping gen olarak Gapdh) CT değerleri Tablo-13 de verildiği şekilde saptandı. CT değeri, amplikon miktarıyla ters orantılıdır; yani CT değeri düşükse, amplikon miktarı daha yüksektir. Buna göre; TNF- α için en yüksek amplikon miktarı yalnız deksmedetomidin(CT:15,34) verilen hücrelerde bulunurken, en düşük ise yalnız bupivakain(CT:28,74) verilen hücrelerde saptandı. İki ilacın beraber verildiği hücrelerde(CT:25) ise kontrol grubuna(CT:21,5) göre daha düşük ancak yalnız bupivakain verilen hücrelerden daha yüksek TNF- α amplifikasyonu olduğu saptandı.

CT değerlerine göre IL-6 amplifikasyonu yalnız bupivakain verilen hücrelerde en düşük(CT:27,23), yalnız deksmedetomidin verilen hücrelerde en yüksek(CT:12,33) olarak bulundu. Her iki ilacın beraber verildiği hücrelerde(CT:22,99) ise kontrol grubuna(CT:22,62) göre azalmış ancak yalnız bupivakain verilene göre artmış olarak saptandı.

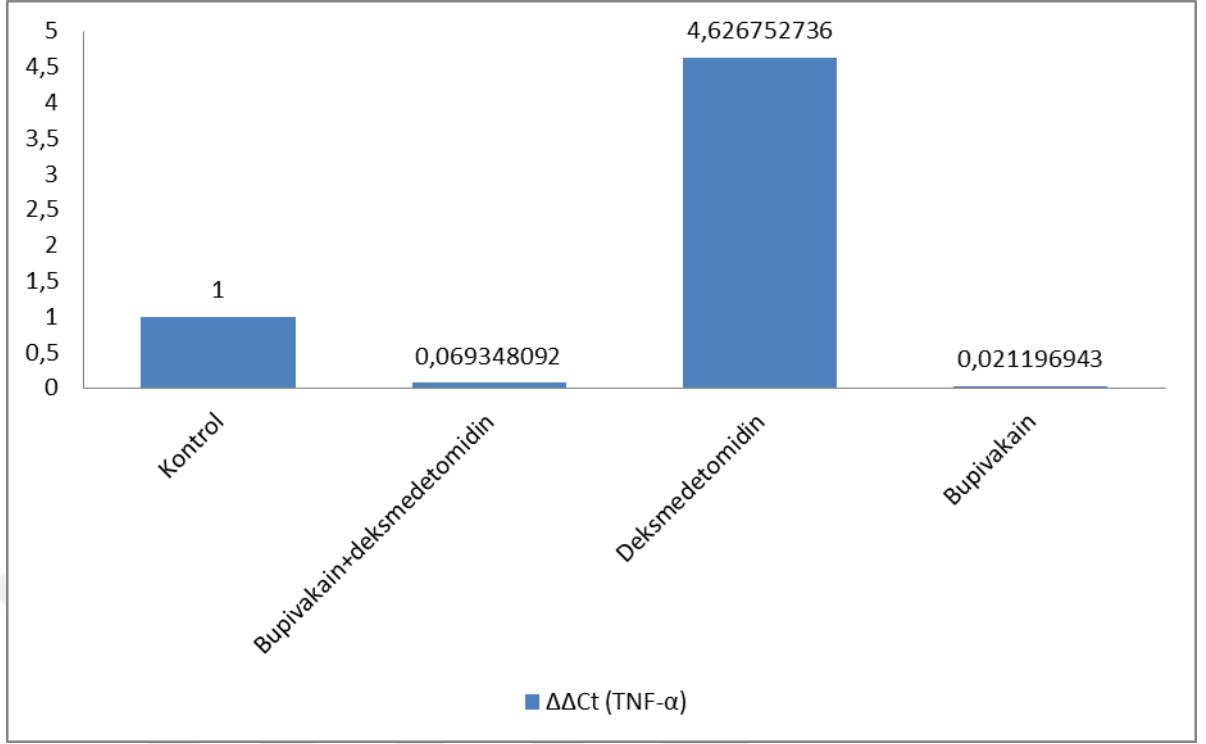
IL-10 için saptanan CT değerlerine göre IL-10 amplifikasyonunu ise; en yüksek yalnız deksmedetomidin verilen hücrelerde(CT:15.34) olduğu bulunurken, en düşük yalnız bupivakain verilen hücrelerde(CT:23,64) olduğu bulundu. Hücrelerin hepsinde IL-10 amplifikasyonunu kontrol grubundaki hücrelere(CT:26,67) göre artmış olarak bulundu.

Tablo 13. Real Time Pcr Cihazı ile edilen dokulardaki TNF- α , IL-6, ve IL-10 C_T değerleri

	TNF alfa	IL-6	IL-10	Gapdh
Kontrol	21,5	22,62	26,67	18,74
Bup-Dex	25	22,99	23,38	18,39
Deksmedetomidin	15,34	12,33	15,34	14,79
Bupivakain	28,74	27,23	23,64	20,42

Tablo 14. TNF- α gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta CT}$) verileri

	Bupivakain	Deksmedetomidin	Bup-Dex
TNF- α $2^{-\Delta\Delta CT}$ verileri	0,0211969426163699	4,62675273562115	0,0693480920042403

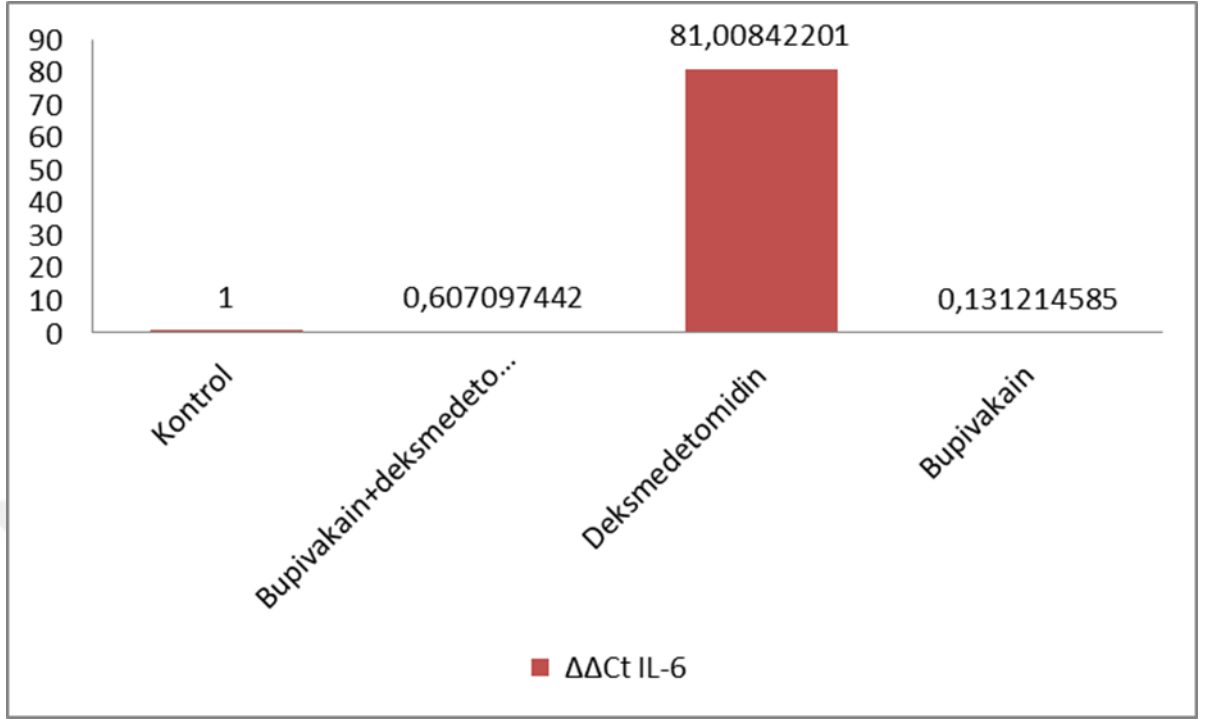


Şekil 17. Gruplardaki TNF- α gen ekspresyonu kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) şematik gösterimi

TNF- α gen ekspresyonu verileri Tablo-14, şekil-17 de sunulmuştur.. TNF- α gen ekspresyonu verileri; yalnız bupivakain verilen hücrelerde kontrol grubuna göre azalmış (0,0211) olarak bulundu. Yalnız deksmedetomidin verilen hücrelerde TNF- α gen ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış (4,6267) olarak bulundu. İki ilacın beraber verildiği hücrelerde TNF- α gen ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük ancak yalnız bupivakain verilen hücrelerin TNF- α gen ekspresyonundan daha yüksek (0,0693) olarak bulundu.

Tablo 15. IL-6 gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta CT}$) verileri

	Bupivakain	Deksmetomidin	Bup-Dex
IL-6 $2^{-\Delta\Delta CT}$ verileri	0,131214585452884	81,0084220140978	0,607097442197524

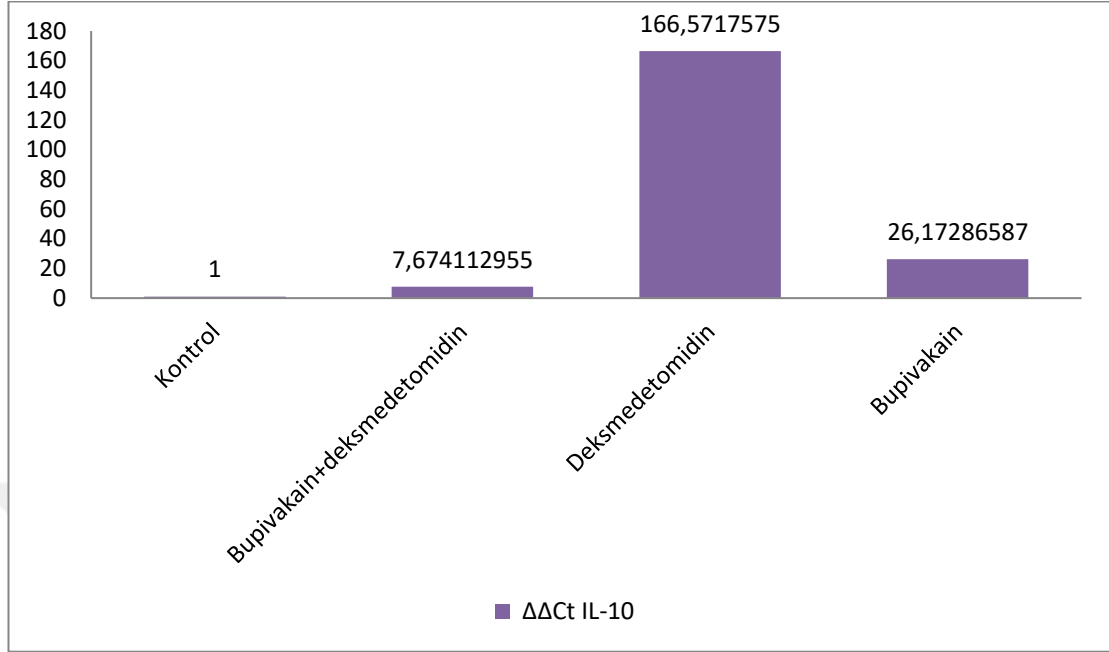


Şekil 18. Gruplardaki IL-6 gen ekspresyonu kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) şematik gösterimi

IL-6 gen ekspresyonu verileri Tablo-15, Şekil-18 de sunulmuştur. Yalnız bupivakain verilen hücrelerde IL-6 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmış (0,1312) olarak bulundu. Yalnız deksmedetomidin verilen hücrelerde IL-6 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış (81,0084) olarak bulundu. İki ilacın beraber verildiği hücrelerde IL-6 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük ancak yalnız bupivakain verilen hücrelerin IL-6 gen ekspresyonundan daha yüksek (0,6070) olarak bulundu.

Tablo 16. IL-10 gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) verileri

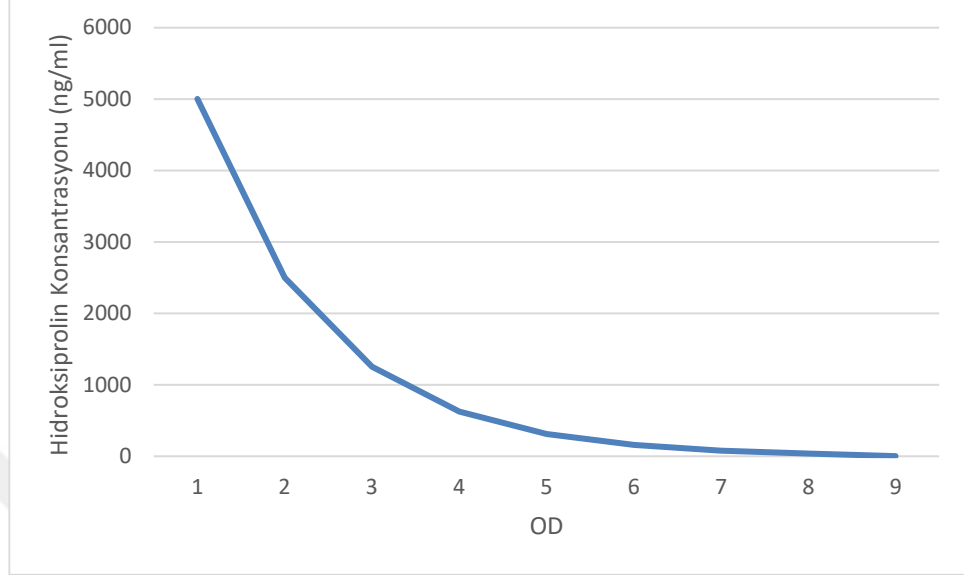
	Bupivakain	Deksmetomidin	Bup-Dex
IL-10 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ verileri	26,172865873849	166,571757496567	7,67411295460212



Şekil 19. Gruplardaki IL-10 gen ekspresyonu kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) şematik gösterimi

IL-10 gen ekspresyonu verileri Tablo-16, Şekil-19 da sunulmuştur. Tüm hücrelerde IL-10 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre daha artmış olarak bulundu. Yalnız deksmedetomidin verilen hücrelerde IL-10 gen ekspresyonu en yüksek (166,5717) iken, yalnız bupivakain verilen hücrelerde daha düşük (26,1728), İki ilacında beraber verildiği hücrelerde en düşük (7,6741) olarak bulundu.

4.4. Elisa Sonuçları



Şekil 20. Human Hyp (Hidroksiprolin) ELISA (ELK Biotechnology, Wuhan, Hubei, China) Kit prosedürüne göre çizilen standart grafik

Human Hyp (Hydroxyproline) ELISA (ELK Biotechnology, Wuhan, Hubei, China) Kit prosedürüne göre yukarıdaki standart grafik çizildi. Hücre kültürü örneklerinden yapılan ELISA testinde elde edilen OD değerleri kullanılarak bu standart grafiğe göre konsantrasyon hesaplamaları yapıldı. Veriler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

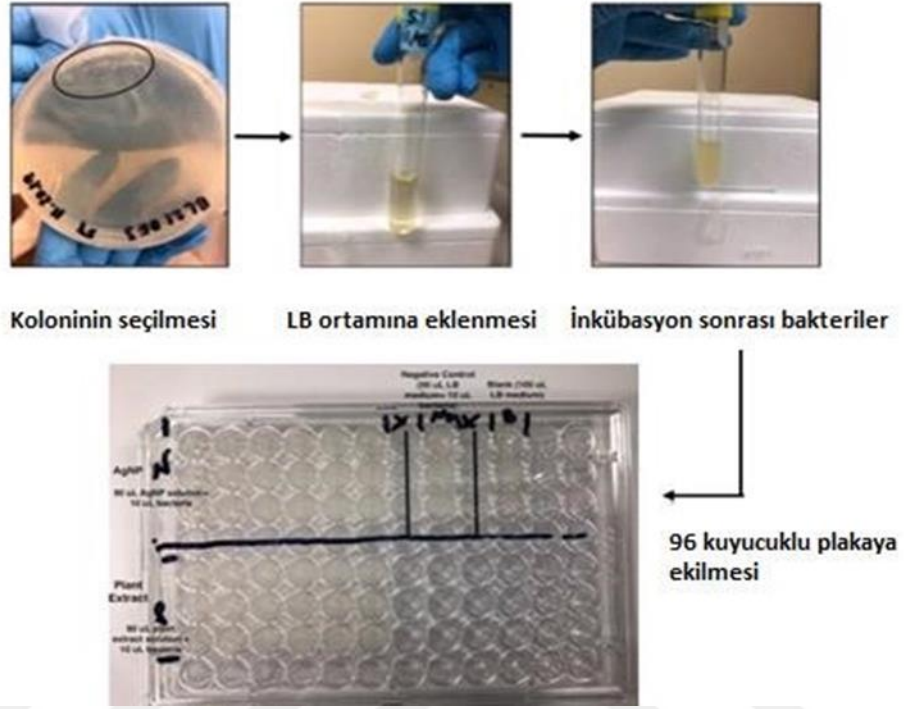
Tablo 17. OD değerleri kullanılarak hesaplanan doku hidroksiprolin konsantrasyonları

Gruplar	Dokulardaki Hidroksiprolin Konsantrasyonları (ng/ml)	Minimum (ng/ml)	Maximum(ng/ml)	Median(ng/ml)
Kontrol	0.236	0.162	0.319	0.259
Bupivakain	0.425	0.179	0.899	0.481
Deksmedetomidin	4.258	3.34	4.889	4.729
Bup-Dex	1.023	0.680	1.948	0.781

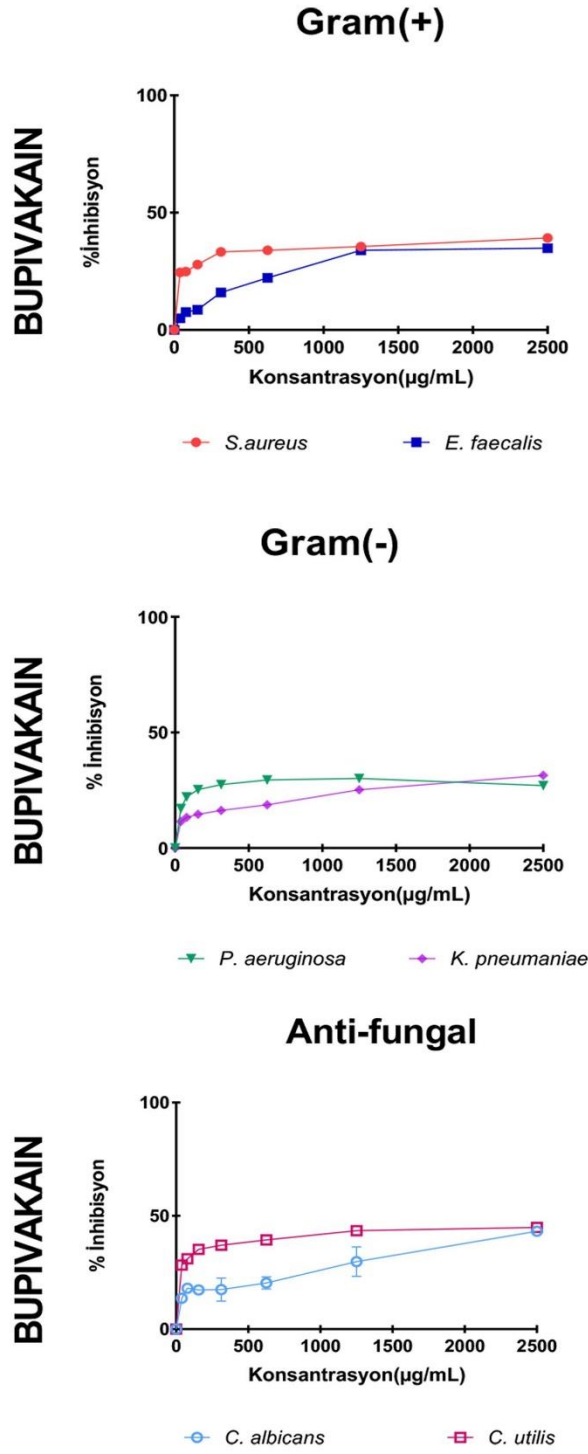
OD değerleri kullanılarak hesaplanan doku Hidroksiprolin konsantrasyonlarına göre; yalnız Deksmetomidin verilen hücrelerdeki hidroksiprolin miktarı (4,258) en yüksek, yalnız Bupivakain verilen hücrelerdeki hidroksiprolin miktarı (0,425) en düşük, iki ilacın beraber verildiği hücrelerdeki hidroksiprolin miktarı (1,023) yalnız Deksmetomidin verilen hcrelerdekinden düşük, yalnız Bupivakain verilen hcrelerdekinden fazla olarak bulundu.

4.5. Antimikrobiyal Çalışmalar

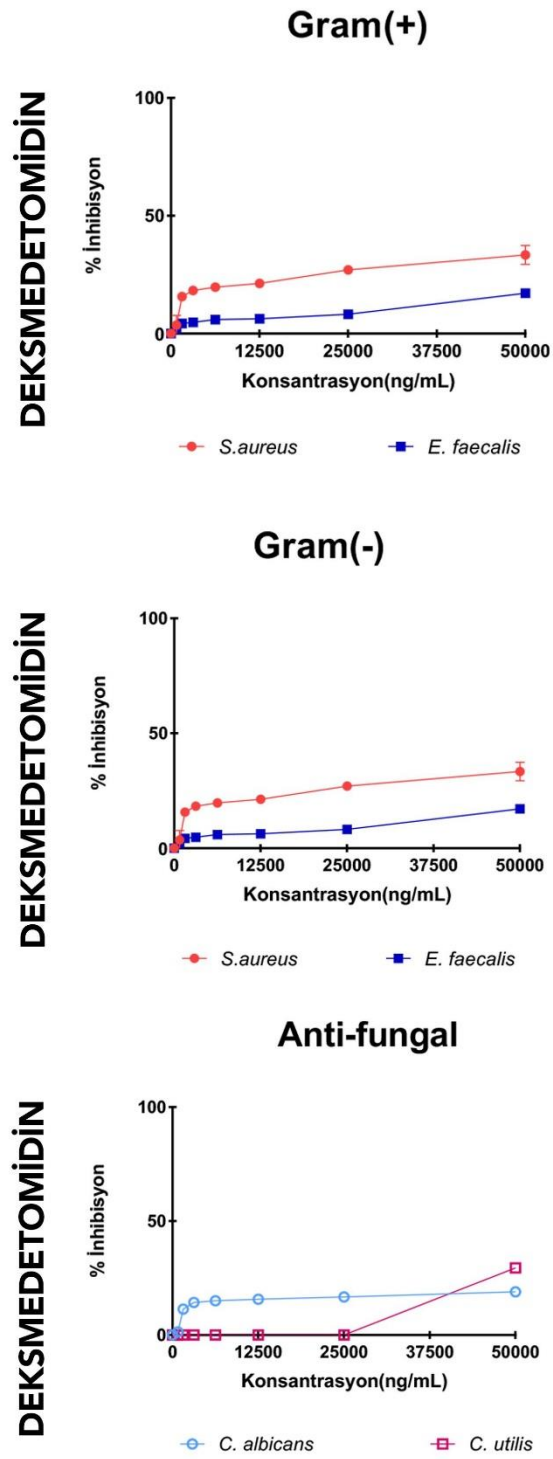
4.5.1. Mikrodilüsyon Yöntemi



Şekil 21. Antibakteriyel analizde Mikrodilüsyon yöntemi aşamaları



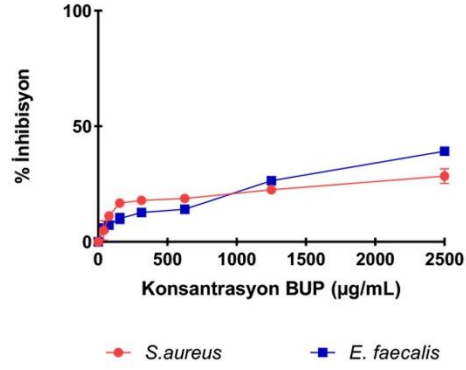
Şekil 22. Bupivakainin bakteri ve fungus suşlarına karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin grafiksel gösterimi



Şekil 23. Deksmedetomidinin bakteri ve fungus suşlarına karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin grafiksel gösterimi

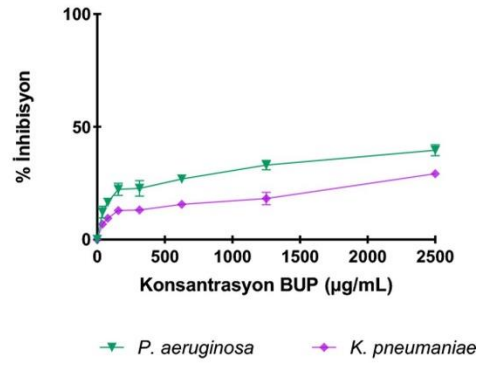
BUPIVAKAİN+ DEKSMEDETOMİDİN

Gram(+)



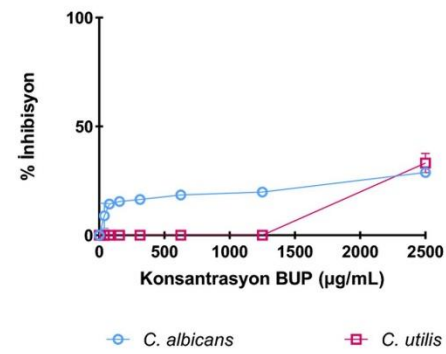
BUPIVAKAİN+ DEKSMEDETOMİDİN

Gram(-)



BUPIVAKAİN+ DEKSMEDETOMİDİN

Anti-fungal

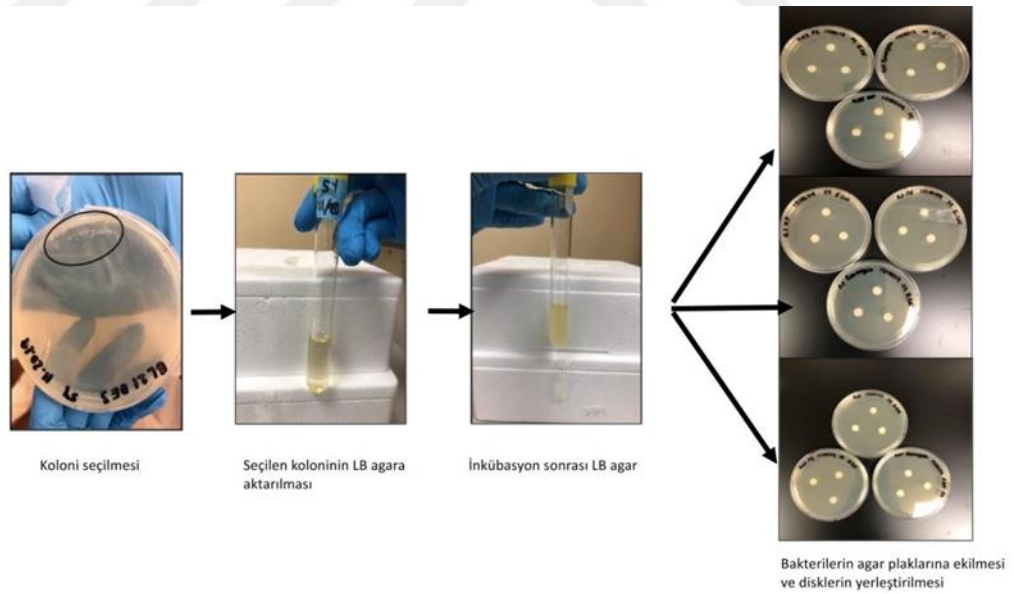


Şekil 24. Bupivakain ve Deksmetomidin karışımının bakteri ve fungus suşlarına karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin grafiksel gösterimi

Bupivakain, Deksmetomidin ve Bupivakain-Deksmetomidin karışımının antibakteriyel aktiviteleri *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. Aeruginosa* ve *K. pneumonia* bakteri suşlarına ve antifungal aktiviteler için *C. albicans* ve *C. utilis*'e karşı test edildi.

Antibakteriyel aktivitesinin belirlenilmesi için, minimum inhibisyon konsantrasyonu yöntemi kullanıldı. İnhibisyona karşı konsantrasyonlar ölçümleri yüzde olarak değerlendirildi. Sadece bupivakain kullanılarak hazırlanan deney grubunda hesaplanan MIC değerinin, sadece deksmedetomidin kullanılarak hazırlanan deney grubundaki MIC değerinden daha yüksek olduğu görüldü. İki ilacın beraber kullanılarak hazırlanan deney grubundaki MIC değerinin; sadece bupivakain kullanılarak hazırlanan deney grubundakinden daha düşük, sadece deksmedetomidin kullanılarak hazırlanan deney grubundaki MIC değerinden daha yüksek olduğu görüldü. Bupivakain ve deksmedetomidin için hazırlanan her deney grubunda MIC değeri %50 altında olarak ölçüldü.

4.5.2.Disk Difüzyon Yöntemi

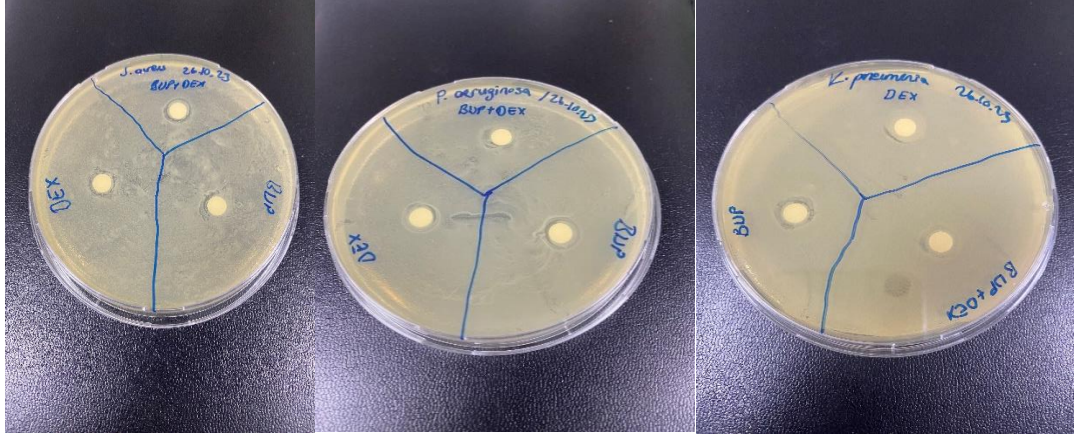


Şekil 25. Disk difüzyon yöntemi çalışmaları

A

B

C



Şekil 26. S.Aureus ile hazırlan agar plağının görüntüsü(A). P. aeruginosa ile hazırlan agar plağının görüntüsü(B). K. pneumonia ile hazırlan agar plağının görüntüsü(C).

Ölçüm yapılan disklerin görüntüsü yukarıdaki şekilde verilmiştir. Ekim yapılan disklerin etrafında zone oluşum etkinliği gözlenmiş, ancak belirgin bir antimikrobiyal etki gözlenmediğinden zone çapı ölçülememiştir. Yapılan kantitatif değerlendirmeler sonucunda bupivakain ve deksmedetomidinin ilgili mikroorganizmalara karşı anlamlı antimikrobiyal etkisi olmadığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Yara ve yara iyileşme süreci, tıp alanında önemli bir araştırma konusudur ve bu sürecin anlaşılması, tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır(8). Yara iyileşmesindeki gecikmeler enfeksiyon riskini artırarak hastaların hastanede daha uzun süre kalmalarına ve tedavi maliyetlerinin yükselmesine neden olabilir. Ayrıca azalmış hasta konforuna neden olur(9). Tüm bu sebeplerden yara ve yara iyileşme sürecini anlamak amacıyla birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Kimyasal güvenliği değerlendirmek ve yeni ilaçları keşfetmek amacıyla kültürlenmiş hücrelerle yapılan in vitro hücre canlılığı ve sitotoksikite testleri, son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. Bu deneyler, bir bileşiğin toksik etkilerini ve aynı zamanda tümör hücrelerinin büyümesini engelleme potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı ve maliyet açısından etkili olmalarının yanı sıra hayvan deneylerine ihtiyaç duymamaları, bu testlerin araştırma alanındaki uygulamalarını hızla arttırmaktadır(10). Biz de çalışmamızda, sünnet derisi hücre hatlarından elde edilen insan fibroblast hücrelerini kullanarak in vitro testler yardımı ile oluşturulan yara modeli kullanmayı tercih ettik.

Yara iyileşmesi, yalnızca yara bölgesiyle sınırlı kalmayan, vücudun tüm sistemlerini etkileyen karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, yara bölgesindeki hücresel ve fizyolojik değişikliklerin yanı sıra vücudun genel fonksiyonlarını da kapsar. Yara iyileşmesi, vücutta doku onarımını sağlayan bir dizi biyokimyasal olayın gerçekleştiği, çok aşamalı bir mekanizmadır. Bu mekanizma, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenir ve hücrelerin çoğalması, migrasyonu ve farklılaşması gibi temel biyolojik olayları içerir(6). Sürecin birçok aşamasının olması ve birden fazla düzenleyici faktöre bağlı olması yara iyileşmesinde bozulmaların görülmesini kolaylaştırır. Biz de çalışmamızda postoperatif hasta konforunu yakından ilgilendiren yara iyileşme sürecine, anestezi pratiğinde sık kullanılan bupivakain ve deksmedetomidinin etkilerini göstermeyi amaçladık.

Lokal anestezikler, sinir liflerinde yeterli konsantrasyona ulaştıklarında, bu liflerdeki impuls iletimini geri dönüşlü olarak bloke eden ilaçlardır(81). Lokal anestezikler, sinir hücresi membranından sodyum iyonlarının geçişini engelleyerek

motor ve duyuşal blokaj oluştururlar. Bu mekanizma sayesinde, cerrahi işlemlerin yapılabilmesi için anestezi ve analjezik etkiler sağladıkları bilinmektedir(82). Bupivakain uzun etkili bir lokal anestezi olup, akut ve kronik ağrı yönetiminde de yaygın olarak tercih edilen bir ajandır(11). Bupivakain, uzun etki süresi (5-16 saat) sebebi ile uzun süreli anestezi gerektiren prosedürlerde tercih edilir(90). Yapılan çalışmalarda bupivakainin kollajen üretimini, yara kopma mukavemetini azalttığı aynı zamanda ödem, vaskülarite ve inflamasyon skorlarında anlamlı derecede yükselmeye neden olduğu bulunmuştur(131). Bupivakainin hücre kültürü kullanılarak fibroblastlar ve keratinositler üzerindeki etkisi araştırılmış ve bupivakainin yüksek konsantrasyonda keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu tamamen inhibe ettiği ve önemli bir sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur(132). Yine başka bir çalışmada bupivakainin özellikle geç dönemde yara iyileşmesini olumsuz etkilediği bulunmuştur(133). Lokal anesteziklerin yara iyileşmesi üzerine etkisi araştırıldığında bupivakain ve salinin yara iyileşmesi üzerine benzer sonuçlara yol açtığı bulunmuştur(134). Bupivakainin bakterisidal etkisinin, içerdiği koruyuculardan ziyade bupivakainin kendisinden kaynaklandığı gösterilmiştir(91). Bizde çalışmamızda bupivakainin yara yeri iyileşmesi üzerindeki etkisini ve antimikrobiyal özelliğini ortaya koymayı amaçladık.

Deksmedetomidin yüksek selektiviteye sahip bir alfa-2 adrenerjik reseptör agonisti olup sempatik, sedatif, amnestik ve analjezik özelliklere sahip bir ajandır(96). Deksmedetomidin, lokal bir anestezi olmamakla beraber yakın zamanda lokal infiltrasyon anestezisinde de analjezi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır ancak yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırın çalışmalar oldukça sınırlıdır. Lokal inflamatuvar cevabı sınırlayan veya kontrol eden perioperatif stratejilerin, hastanın iyileşmesi üzerinde faydalı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan az sayıda çalışmada güçlü olan antiinflamatuvar etkisi ile deksmedetomidinin yara yeri iyileşmesi üzerinde olumlu etkiler sağlayabileceği gösterilmiştir. Ratlarda yanık modeli oluşturularak deksmedetomidinin inflamatuvar etkisi araştırılmış ve optimum doz ayarlamasıyla antiinflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir(135). Deksmedetomidin infüzyonunun sitokin gen ekspresyonuna etkisi in vitro testler ile araştırıldığı ve deksmedetomidinin proinflamatuvar sitokin gen ekspresyon seviyesi üzerine

baskılayıcı etkisi olduğu buna bağlıda antiinflamatuvar etkisi olduğu bulunmuştur(136). Bizde çalışmamızda deksmedetomidinin yara yeri iyileşmesi üzerindeki etkilerini ve antimikrobiyal özelliklerini ortaya koymayı ve bunları bupivakain ile karşılaştırmayı amaçladık.

Yara iyileşmesinde epitelizasyon, yara yüzeyinin yeni epitel hücreleriyle kaplanması sürecidir ve kritik bir rol oynar. Bu süreç tamamlanmadan, yara iyileşmiş kabul edilmez(137). Yara iyileşmesi sırasında hücreler, yaralı bölgeye göç eder ve çoğalır. Bu süreçte, göç fazı, iyileşmenin sınırlayıcı aşaması olarak öne çıkar. Yara iyileşmesini inceleyen analizler, genellikle hücre göçü üzerine yoğunlaşır. Bu analizlerde, birleşik bir hücre tabakası belirli koşullar altında yaranılır ve ardından hücrelerin, daha önce hücre dolu olan alana göçü gözlemlenir ve incelenir. Hücre kültürü yüzeyleri, hücre-matris etkileşimlerini stimüle etmek için genellikle hücre dışı matris bileşenleriyle kaplanır. Bu, yara iyileşme sürecini incelemeyi ve olası tıbbi tedavileri in vitro olarak test etmeyi mümkün kılar. Böylece, in vitro analizler, belirli bileşiklerin ve genetik değişikliklerin iyileşme süreci üzerindeki etkilerini değerlendirmek için etkili bir araç sağlar(126). In vitro çizik analizi; yara iyileşmesi sırasında gerçekleşen olayları iyi analiz etmek, yaranın zamanla ne kadar iyileştiğini ve kapanmaya başladığını gösteren önemli bir parametre olan yara kapanma oranını hesaplamak için tercih edilen bir metottur. İnflamatuvar ve antiinflamatuvar ortamların IL-6 ekspresyonundaki ve kornea yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin gösterildiği bir çalışmada; yara kapanması sırasında meydana gelen olayları daha iyi tanımlamak için in vitro çizik testi kullanılmış, çizik modeliyle yara kapanmasında yer alan ana mekanizma olarak görülen hücre göçünün ve hücre çoğalmasının etkileri gösterilmiştir(138). *Calendula officinalis* özütlerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkisini göstermek amacıyla keratinositler ve dermal fibroblastlar kullanılarak in vitro çizik testi ile yara modeli oluşturulmuş keratinositlerin göçü çizik analiziyle gösterilmiştir(139). Başka bir çalışmada da teukrosit'in yara iyileştirme potansiyeli, hücre migrasyonunu ölçmek için iyi geliştirilmiş ve kolay, ucuz bir yöntem olan in vitro çizik testi ile incelenmiştir. Bu araştırma kapsamında, hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar, yara iyileşmesinde etkin dozu belirlemek amacıyla kullanılmıştır(140). Gümüş nanopartiküllerin yara iyileşmesine etkilerinin

araştırıldığı, fibroblastlar ve keratinositlerin birincil hücre kültürleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada da in vitro çizik testi kullanılarak fibroblastların ve keratinosit çoğalması değerlendirilmiştir(141). Biz de çalışmamızda güvenilir bir yöntem olarak kabul edilen çizik testini kullanmayı tercih ettik. Hyaluronik asit ile yara iyileşmesi teşviki, moleküler ağırlığın gen ekspresyonu ve canlı yara kapanması üzerindeki etkisi in vitro çizik testi ve yara kapanma oranları ölçümü ile gösterilmiş olup, granülasyon dokusunun oluşumu için çok önemli bir özellik olan fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu desteklediği belirtilmiştir(142). Ropivakainin keratinositlerin çoğalmasını ve göçünü baskılayarak yara iyileşmesini engellediğini göstermek için çizik testi kullanılmış ve elde edilen görüntüler bir mikroskop altında incelenmiş, yara iyileşme alanının yüzdesi Image J yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır(143). Bupivakain ve levobupivakainin, in vitro olarak kolon kanseri hücrelerinin büyümesine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada çizik alanının anlık görüntüleri, aynı kare ve alanlarda 0, 24 ve 48 saatte dijital kamera destekli bir mikroskopla alınmış, görüntüler gruplar arasındaki ortalama kapanma alanı yüzdesini karşılaştırmak için Image J yazılımı ile analiz edilmiş ve hücre göç yeteneğinde önemli inhibisyona neden oldukları gösterilmiştir(144). Deksmetomidinin, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü azalttığını gösteren bir çalışmada; çizik testi kullanılmış ve görüntüler bir ışık mikroskobu ile yakalanmış, yara kapanma oranı Image J yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır(145). Literatürde bupivakain ve deksmedetomidinin doğrudan yara iyileşmesine etkilerini gösteren ve her iki ilacın beraber kullanılarak etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bizim çalışmamızda bupivakain ve deksmedetomidinin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri in vitro çizik testi ile elde ettiğimiz 24 ve 48. saatte ölçülen yara kapanma oranları ile gösterilmiştir. Sadece deksmedetomidin verilen grupta 24 ve 48. saatlerde yaranın tamamen kapandığı, sadece bupivakain verilen grupta her iki ölçümde de kontrol grubuna göre kapanma oranının düştüğü görülmüştür. Bupivakain ve deksmedetomidinin birlikte verildiği grupta 24. saatte kapanma oranı kontrol grubuna göre düşse de, 48. saatte yaranın tamamen kapandığı görülmüştür. Deksmetomidinin yara kapanması üzerindeki olumlu etkisi görülmekle beraber bupivakainin kapanma üzerindeki olumsuz etkisini tersine çevirmede yardımcı olduğunu düşünmekteyiz.

Antiinflamatuvar etkinin, yara iyileşmesinde önemi büyüktür. Aşırı inflamasyon hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve doku onarımını bozarak yara iyileşmesini geciktirebilir. Bupivakain'in, yara iyileşmesinin ilk günlerinde proinflamatuvar faktörlerin düzeylerini artırıp, antiinflamatuvar faktörlerin düzeylerini azalttığı ve bu durumun pro-inflamatuvar etkilere yol açarak yüksek ödem ve inflamasyona sebep olduğu pek çok klinik ve deneysel çalışmayla gösterilmiştir. Endotoksinle aktive edilen bir fare makrofaj modeli kullanarak bupivakainin sitokin üretimi üzerindeki etkilerini açıklamaya çalışan bir çalışmada hücre kültürü yapılarak elde edilen verilere göre; doz bağımlı bir şekilde, bupivakainin TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimini önemli ölçüde azalttığı ancak, IL-10 üretimi üzerinde önemli bir etki göstermediği saptanmıştır(146). Bedirli ve ark.'nın yaptığı; bupivakainin ratlarda mezenter iskemi ile oluşan inflamatuvar yanıtı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, %0,5 konsantrasyonda epidural olarak uygulanan 20 mcL/saat bupivakainin plazmada IL-6, IL-1 β ve TNF- α 'yı anlamlı düzeyde azalttığı ve bupivakainin güçlü antiinflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir(147). Levobupivakain, bupivakain ve ropivakainin apoptotik aktivite ve proinflamatuvar sitokinler üzerindeki akut etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada bupivakainin TNF- α , IL-1 ve IL-6 ekspresyon düzeylerini azalttığı gösterilmiştir(148). Bir çalışmada, abdominal histerektomi yapılan hastalarda farklı anestezi yöntemlerinin sevofluranlı genel anestezi, TIVA anestezisi (propofol), epidural anestezi (bupivakain) etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, IL-6 ve TNF- α düzeyleri, ameliyat öncesi, postoperatif 2. ve 24. saatlerde ölçülmüştür. Sonuçlar şu şekilde özetlenebilir; IL-6 düzeylerinin, tüm anestezi gruplarında ameliyat sonrası 2. ve 24. saatlerde anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. TNF- α düzeylerinin, ameliyat öncesiyle karşılaştırıldığında tüm gruplarda 2. saatte anlamlı şekilde arttığı, ancak 24. saatte TNF- α düzeyleri ameliyat öncesi seviyelere geri döndüğü görülmüştür(149). Üroonkolojik cerrahide rejyonel (bupivakain) ve genel anestezinin immün sistem üzerine olan etkilerinin serum sitokinleri (IL-2, IL-4, IL-6) aracılığı ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; bupivakain kullanılan grupta anlamlı derecede IL-6 oranında düşme olduğu görülmüştür(150). Abdominal histerektomi yapılan hastalarla yapılan bir çalışmada, bupivakain, deksmedetomidin ve ketaminin lokal yara yerine infiltre edilmesinin, postoperatif dönemde IL6, TNF- α ve IL10 plazma seviyelerinin, yara infiltrasyonundan önceki başlangıç değerlerine göre belirgin şekilde arttığını

göstermiştir. Ancak tek başına bupivakain kullanımına kıyasla ketamin veya deksmedetomidin eklenmesi, IL6 ve TNF- α artışlarını azaltırken, IL10 seviyelerini artırmıştır. Ayrıca, bupivakain kullanımı IL6'da anlamlı bir değişikliğe yol açmazken, IL10 değerini düşürmüştür(151).

Deksmedetomidinin, proinflatuar faktör düzeylerini düşürüp antiinflatuar faktör düzeylerini artırarak antiinflatuar etkiler gösterdiğini ortaya koyan birçok deneysel ve klinik çalışma bulunmaktadır. Sukegawa ve arkadaşları, lokal inflamasyon modelinde yaptıkları çalışmada, subkutanöz deksmedetomidin enjeksiyonunun doku ödeminde azalma, doku TNF- α ve COX-2 düzeylerinde düşüş sağladığını göstermiştir. Ayrıca, bu etkinin yohimbin ile antagonize olduğunu, yani yohimbin'in deksmedetomidinin antiinflatuar etkilerini engellediğini ortaya koymuşlardır(152). Brummett ve arkadaşları, siyatik sinir bloğu sonrasında sadece bupivakain kullanımına göre, bupivakain ile deksmedetomidin kombinasyonunun perinöral inflamasyonda anlamlı bir azalma sağladığını göstermişlerdir. Perinöral inflamasyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bupivakain grubunda daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular deksmedetomidinin, bupivakainin etkilerini güçlendirerek inflamasyonun azaltılmasına yardımcı olabileceğini işaret etmektedir(153). Shen ve arkadaşları, hayvan modelinde oluşturdukları deneysel reperfüzyona bağlı oluşan akciğer hasarında TNF- α ve IL-6 gibi iltihap belirteçlerinin düzeylerini araştırmışlardır. Sonuçlar, deksmedetomidin uygulamasının pulmoner dokuda bu sitokinlerin üretimini azalttığını göstermiştir(154). Taniguchi ve arkadaşları yine hayvan modeli kullanarak yaptıkları bir çalışmada endotoksin sebepli şoka bağlı ölüm oranı ve inflamatuvar yanıtlara deksmedetomidinin etkilerini araştırmışlar ve deksmedetomidinin TNF- α , IL-6 ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olup inflamatuvar yanıt üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu ve mortalite oranını azalttığını göstermişlerdir(155). Sepsis nedeniyle yoğun bakımda takip edilen hastalar da midazolam ve deksmetatomidinin antiinflatuar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada her iki ilacında TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğü ve deksmedetomidinin daha etkili düşmeye neden olduğu görülmüştür(156). Deksmedetomidinin inflamatuvar yanıtlar üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, cerrahi prosedürler sırasında genel anesteziye ek olarak deksmedetomidin ile tedavi edilen hastalarda inflamatuvar

belirteçleri inceleyen 15 kontrollü randomize çalışmanın olduğu bir meta-analiz çalışmasında; deksmedetomidin uygulamasının, ameliyattan sonra hastalardan alınan örneklerdeki IL-6 ve TNF- α düzeylerini önemli ölçüde azalttığı, IL-10 seviyelerini ise anlamlı derecede yükselttiği görülmüştür(157). Deksmetomidinin, proinflatuar mediatör üretimine etkileri insan tam kanında in vitro araştırılmış ve TNF- α , IL-6, IL-8 üretimini doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir(158). Karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarı üzerine N-asetil sistein, flumazenil ve deksmedetomidinin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada da deksmedetomidin kullanılan gruplarda TNF- α , IL-6 seviyelerinde anlamlı düşüş, IL-10 seviyelerinde anlamlı artış olduğu gösterilmiştir. İskemiye bağlı histopatolojik ve biyokimyasal hasarın anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir(159). İntraabdominal sepsiste deksmedetomidinin sekonder akciğer ve böbrek hasarları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı benzer bir çalışmada da deksmedetomidin tedavisi ile TNF- α , IL-6 ekspresyon seviyesinde azalma olduğu ve deksmedetomidinin anti-inflatuar etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir(160). Bizim çalışmamızda TNF- α , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonu tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde farklı saptanmıştır. Yalnız bupivakain verilen grupta TNF- α ve IL-6 gen ekspresyonu azalmış, IL-10 gen ekspresyonu ise artmıştır. Yalnız deksmedetomidin verilen grupta TNF- α , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bupivakain ve deksmedetomidin verilen grupta TNF- α ve IL-6 gen ekspresyonunda azalma görülmekle birlikte bu azalma yalnızca bupivakain verilen gruptaki kadar fazla olmamıştır. Bupivakain ve deksmedetomidin verilen gruptaki IL-10 gen ekspresyonunda ise artış görülmekle birlikte bu artış yalnız deksmedetomidin verilen gruptaki artıştan düşük, yalnız bupivakain verilen gruptakinden yüksek olmuştur. Bizim çalışmamızdaki bu veriler; bupivakain ve deksmedetomidin ile ilgili literatür bilgilerini desteklemektedir. Verilerimiz TNF- α ve IL-6 gen ekspresyonuna deksmedetomidin etkilerinde literatür ile çelişiyor gözükmeyle birlikte; Can ve ark.'nın ratlarda omurilik yaralanması oluşturdukları çalışmada deksmedetomidin verilen gruplarda 1. gün sonunda ölçülen TNF- α ve IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre farklılık göstermediği görülmüştür(161). Laparoskopik histerektomi yapılan hastalarda deksmedetomidinin antiinflatuar etkilerini göstermek için operasyon sonrası 24.saatte alınan kan örneklerinde TNF- α ve IL-6 düzeylerine bakılmış ve

anlamli bir değişikliğin olmadığı görülmüştür(162). Endotoksin kaynaklı şokta deksmedetomidinin etkilerini araştırıl başka bir çalışmada da, deksmedetomidinin doz bağımlı olarak TNF- α ve IL-6 düzeylerini değiştirdiği gösterilmiştir(163). Çalışmamızda deksmedetomidinin TNF- α ve IL-6  zerindeki etkilerini net bir şekilde ortaya koyamamış olmamızın, kullanılan dozdan kaynaklanıyor olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, insizyonun hemen sonrası dönemde bu interl kinlerin ekspresyonlarını incelememiş olmamız da bu sonuçları etkileyen bir diğer faktör olabilir.

Yara iyileşmesinin başarılı bir şekilde gerçekleşmesinde, dokunun güçlenmesine ve desteklenmesine yardımcı olan temel bileşen kollajendir. Kollajenin yapısında yer alan başlıca aminoasitler prolin ve hidroksiprolindir. Özellikle doku kollajeni içeriğindeki hidroksiprolin, yara iyileşmesinin izlenmesinde önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir(6, 164). Doku hidroksiprolin miktarı ve kalitesi, yara gerilim kuvvetini belirleyen önemli faktörlerdir. Yüksek hidroksiprolin seviyeleri, kollajen yapısının güçlenmesine ve yara iyileşmesinin sağlam bir şekilde devam etmesine yardımcı olur. Ancak yara gerilim kuvvetindeki bir azalma, yara iyileşmesinde bozulmalara yol açabilir ve dikişlerin geç alınmasına neden olabilir(165). Sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine serum fizyolojik, bupivakain, lidokain ve tramadol infiltrasyonunun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada kolajen üretimi ve kırılma mukavemetinin 8. günde alınan numuneler karşılaştırıldığında bupivakain ve lidokain verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür(131). L-prolin in kutanöz yara iyileşmesi sırasında erken yanıtlar üzerine etkileri araştırılmış ve sıçanlarda oluşturulan yaralara L-prolin verilmiş 4. ve 8. günlerde yara iyileşmesinin takibi yapılmıştır. L-prolin verilen gruplarda yaraların daha hızlı iyileştiği görülmüştür(166). İnsizyon  ncesi peritoneal lokal anestezi  infiltrasyonunun kolon anastomuzu ve yara iyileşmesine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise levobupivakain ve bupivakain kullanılmış olup yapılan hidroksiprolin ölçümlerinde kontrol grubuyla anlamlı fark saptanmadığı görülmüştür(167). Sıçan modelinde deksmedetomidinin epidermal ve dermal yara iyileşmesine etkileri değerlendirilirken, interlökin-1, interlökin-6, tümör nekroz faktörü- α , hidroksiprolin ve epidermal büyüme faktörü skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

görülmemiştir(168). Bizim çalışmamızda her grupta hidroksiprolin düzeyi kontrol grubuna göre artmış olarak bulundu. Sadece deksmedetomidin verilen grupta hidroksiprolin düzeyleri en yüksek iken, deksmedetomidinin bupivakain ile birlikte verildiği grupta daha azalmış, sadece bupivakain verilen grupta ise en düşük olduğu saptanmıştır. Deksmetomidinin hidroksiprolin üzerine etkilerinin doğrudan incelendiği çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte deksmedetomidinin kolajen sentezi üzerinde olumlu etkiler sağladığı, ayrıca bupivakain ile birlikte kullanıldığında bupivakainin olumsuz etkilerini geri döndürdüğünü düşünmekteyiz.

Mikroorganizmaların hastalık oluşturabilmesi için organizmaya giriş yapmaları gerekir. Bunun için başlıca giriş kapısı, cilt gibi koruyucu engellerdir. Cerrahi müdahalelerde bu engel ortadan kaldırıldığında, vücut enfeksiyona açık hale gelir. Bu süreçte enfeksiyonlar, hastanın cilt florasından, operasyon ortamındaki hava akımlarından, cerrahi aletlerden bulaşan patojenlerden veya anestezi sırasında anesteziğin kulak, burun ve boğaz florasından kaynaklanabilir(169). Bazı çalışmalarda anesteziklerin yalnızca ağrı kontrolü sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda bakteri hücreleri üzerinde antimikrobiyal etkiler gösterdiği bulunmuştur. Bu etkiler arasında üremenin durdurulması, hücrelerin yaşama yeteneğinin azalması, protoplastların lizisi, hücre zarındaki geçirgenlik değişiklikleri ve zara bağlı enzimatik aktivitelerin durdurulması yer almaktadır. Lokal anesteziklerin bakteriyel üremeyi durdurma etkisiyle ilgili ilk inceleme, 1909 yılında Jonnesco tarafından yapılmıştır. Jonesco, novokain gibi lokal anesteziklerin antiseptik özelliklere sahip olduklarını belirterek, bu maddelerin sterilize edilmesine gerek olmadığını vurgulamıştır. Bu çalışma, lokal anesteziklerin antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasına yönelik ilk adım olarak değerlendirilmiştir(169, 170). Bizde çalışmamızda, bupivakain ve deksmedetomidinin sık karşılaşılan çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. Aeruginosa*, *K. Pneumonia*, *C. albicans* ve *C. utilis* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkilerini göstermeyi amaçladık.

Ropivakain, bupivakain, lidokain ve prilokain gibi lokal anesteziklerin antimikrobiyal etkinliklerinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* suşları kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada bupivakainin zayıf antimikrobiyal etkinlik gösterdiği saptanmıştır(169). Bupivakainin

koruyucu madde ile insan deri florasındaki mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin karşılaştırılarak araştırıldığı bir çalışmada koruyucu maddenin bupivakain ile kombinasyonu, koruyucu maddelerin tek başına kullanılmasından daha fazla bakterisidal aktivite gösterdiği bulunmuştur(91). Epidural anestezi de kullanılan konsantrasyonlardaki bupivakainin, deride yaygın olarak kolonize olan farklı mikroorganizmaların büyümesini inhibe ettiğinin gösterildiği bir başka çalışmada bupivakainin kateter yoluyla tekrarlanan epidural enjeksiyondan sonra katater bölgesinde cilt enfeksiyonu oluşumunu azaltabileceği dşnlmştir(171). Bupivakain ile fentanil sitratın antimikrobiyal etkilerinin karşılaştırıldığı bir in vitro prospektif çalışmada bupivakainin antimikrobiyal etkinliği gösterilmiş ve fentanilin bu antimikrobiyal etkinliği antagonize ettiği saptanmıştır(172). Rejyonel anestezi uygulamalarında yaygın olarak kullanılan ropivakain, levobupivakain ve bupivakainin *S.aureus*, *S. epidermidis*, *E.coli* ve *Candida albicans* zerindeki antibakteriyel veya antifungal aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, bupivakainin en az olmakla birlikte lokal anesteziklerin antibakteriyel veya antifungal etkileri gösterilmiştir(173). Yine çeşitli lokal anesteziklerin *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus* zerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada ise bupivakainin herhangi bir inhibisyon zonu göstermeyip bu suşlar üzerinde antibakteriyel etkiliğinin olmadığı bulunmuştur(174). Yoğun bakım ünitelerinde uzun süreli sedasyon için kullanılan sedatif ajanlardan olan deksmedetomidin, infüzyon için hazırlanma ve seyreltme sırasında mikroorganizmalar tarafından kontaminasyona açık hale gelir. Klinik kullanımda sistemik antibakteriyel etki yaratması beklenilmese de infüzyon çözeltilerinin hazırlanması sırasında olabilecek mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi açısından konsantrasyona bağlı antimikrobiyal etkiliğinin gösterilmesi önemlidir(175, 176). Deksmetomidinin antimikrobiyal etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır. Yoğun bakım ünitelerinde sık kullanılan iki ajan olan deksmedetomidin ve midazolamın olası antimikrobiyal etkilerinin mikrodilüsyon yöntemi ile, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları kullanılarak araştırıldığı in vitro bir çalışmada; deksmedetomidinin sadece *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* zerinde inhibitör etkilerinin olduğu gösterilmiştir(177). Deksmetomidin, etomidat-lipuron,

midazolam ve propofolün; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve geniş spektrumlu beta-laktamaz *Escherichia coli* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve deksmedetomidinin test edilen mikroorganizmaların hiçbirini inhibe etmediği, mikroorganizmaların hiçbirinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı saptanmıştır(178). Deksmetomidin, midazolam ve bunların bikarbonat tamponlu solüsyonlarının antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve deksmedetomidinin yoğun bakım ortamında sıklıkla bulunan *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. Aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *C. albicans* ve *C. utilis*'e karşı inhibitör etki göstermediği bulunmuştur(179). Bizde çalışmamızda bupivakain ve deksmedetomidinin antibakteriyel ve antifungal özelliklerini göstermek için *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. Aeruginosa* ve *K. Pneumonia*, *C. albicans* ve *C. utilis* suşlarını kullandık. Minimum inhibisyon konsantrasyonu yöntemi kullanılarak hesaplanan MIC değerlerinin karşılaştırılması ile bupivakain ve deksmedetomidin için hazırlanan her deney grubunda MIC değeri %50 altında olarak ölçüldüğü için her iki ilacın da anlamlı antimikrobiyal olarak etkili olmadığını düşünmekteyiz. Disk difüzyon yöntemiyle hazırlanan agar plaklarında meydana gelen inhibisyon zonelerinin ölçümü sonucu yapılan kantitatif değerlendirmeler sonucunda bupivakain ve deksmedetomidinin anlamlı antimikrobiyal etkisi olmadığını gösterdik.

Çalışmamızda bir takım kısıtlayıcı faktörler bulunmaktadır. Öncelikle çalışmamız hücre kültürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve kontrol edilen yara alanı belirli bölge ile sınırlı olup insan fizyolojisini tam olarak yansıtmayabilir. Sadece erken dönem yara iyileşmesi ile ilgili bulguları, ilk 24 saat ve 48. saatteki verileri araştırdık. Kullanılan lokal anestezikleri belirli dozlarda çalıştık. Antimikrobiyal etki için kısıtlı sayıda patojen araştırıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; Her iki ilacında uygulanan dozlarda çalışılan mikroorganizmalar üzerinde anlamlı antimikrobiyal etkinliğinin olmadığı saptandı. Lokal olarak uygulanan bupivakainin yara yeri kapanmasını inflamatuvar etkiyi azaltarak bozduğunu, deksmedetomidinin tam tersi etkilerle yara yeri kapanmasını iyileştirdiğini bulduk. Birlikte kullanıldıklarında ise yara yeri kapanma oranı kontrol grubu ile benzerdir. Sonuç olarak; yara iyileşmesini bupivakainin tek başına kullanılması olumsuz etkilerken, deksmedetomidin olumlu yönde etkiler. Yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği için klinik uygulamalarda yara yerinde tek başına bupivakain yerine bupivakain ve deksmedetomidin kombinasyonunun göz önünde bulundurulması kaanatindeyiz. Bu etkilerin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Çalışmamızın, gelecekte yapılacak klinik araştırmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Herman TF, Bordoni B. Wound Classification. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Bruno Bordoni declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

2. Tyavambiza C, Dube P, Goboza M, Meyer S, Madiehe AM, Meyer M. Wound healing activities and potential of selected african medicinal plants and their synthesized biogenic nanoparticles. *Plants*. 2021;10(12):2635.

3. Ekizce E. Deneysel olarak tip II diyabet oluşturulmuş ratlardaki yara modelinde kudret narı (*Momordica charantia*) meyvesi yağının yara iyileşmesi üzerine etkileri. *MSc, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale*. 2019.

4. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical research*. 2009;37(5):1528-42.

5. Öztaş P. YARA İYİLEŞMESİ, BAKIMI VE TEDAVİSİ. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 2021;54(2):341-51.

6. Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2009;6(3):351-6.

7. Brown BN, Badylak SF. The role of the host immune response in tissue engineering and regenerative medicine. *Principles of tissue engineering*; Elsevier; 2014. p. 497-509.

8. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *European surgical research*. 2017;58(1-2):81-94.

9. Brunnicardi FC, Andersen D, Billiar T, Dunn D, Hunter J, Matthews J, et al. Schwartz cerrahinin ilkeleri. Çev Özmen M. 2008;10.

10. Alsareii SA, Manaa Alamri A, AlAsmari MY, Bawahab MA, Mahnashi MH, Shaikh IA, et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Rhizophora apiculata* and studies on their wound healing, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activity. *Molecules*. 2022;27(19):6306.

11. Paganelli MA, Popescu GK. Actions of bupivacaine, a widely used local anesthetic, on NMDA receptor responses. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(2):831-42.

12. Afonso J, Reis F. Dexmedetomidine: current role in anesthesia and intensive care. *Revista brasileira de anesthesiologia*. 2012;62:125-33.
13. Fenner J, Clark RA. Anatomy, physiology, histology, and immunohistochemistry of human skin. *Skin tissue engineering and regenerative medicine*. 2016;1.
14. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, skin (integument), epidermis. StatPearls. Preprint] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>(Accessed: 21 June 2023). 2022.
15. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology*. 2002;12(4):390-401.
16. Ita KB. *Anatomy of the human skin*. 2020.
17. Kiliç Ö. Deneysel diyabetik sıçan yara modelinde *Lucilia sericata* larva salgılarının yara iyileşme süreci ile ilişkilendirilmiş mikromaların ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi: Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
18. Bichakjian CK, Johnson TM. *Anatomy of the skin. Local flaps in facial reconstruction*: Elsevier; 2007. p. 3-13.
19. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in dermatology*. 2012;30(3):257-62.
20. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*. 2017;45(6):347-51.
21. Barbieri J, Wanat K, Seykora J. *Skin: basic structure and function*. 2014.
22. Brown T, Krishnamurthy K. Histology, Dermis.[Updated 2022 Nov 14]. StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023.
23. Uitto J, Li Q, Urban Z. The complexity of elastic fibre biogenesis in the skin—a perspective to the clinical heterogeneity of cutis laxa. *Experimental dermatology*. 2013;22(2):88-92.
24. Woo WM. Skin structure and biology. *Imaging Technologies and Transdermal Delivery in Skin Disorders*. 2019:1-14.
25. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Advances in wound care*. 2018;7(7):209-31.
26. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*. 2015;173(2):370-8.

27. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Apmis*. 2013;121:1-58.
28. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini Ed, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and regeneration*. 2008;16(1):37-44.
29. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2008;16(5):585-601.
30. Percival NJ. Classification of wounds and their management. *Surgery (Oxford)*. 2002;20(5):114-7.
31. Parsak CK, Sakman G, Çelik Ü. Yara iyileşmesi, yara bakımı ve komplikasyonları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2007;16(2):145-59.
32. Topalan M, Aktaş Ş. Güncel Yönleriyle Kronik Yara. 2010.
33. Strodbeck F. Physiology of wound healing. *Newborn and infant nursing reviews*. 2001;1(1):43-52.
34. Moura LI, Dias AM, Carvalho E, de Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta biomaterialia*. 2013;9(7):7093-114.
35. Morton LM, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2016;74(4):589-605.
36. Townsend C, Beauchamp R, Evers B, Mattox K. *Sabiston textbook of surgery* 19th edition. Philadelphia Pennsylvania: Elsevier. 2004;811:1116-7.
37. Lisovsky A, Chamberlain MD, Wells LA, Sefton MV. Cell interactions with vascular regenerative MAA-based materials in the context of wound healing. *Advanced healthcare materials*. 2015;4(16):2375-87.
38. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2008;26(2):31-7.
39. Singh S, Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2017;35(9):473-7.
40. Karwowski W, Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. The mechanism of vascular calcification—a systematic review. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2012;18(1):RA1.

41. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Reviews*. 2007;21(2):99-111.
 42. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*. 2019;99(1):665-706.
 43. KAYA B. Yara İyileşmesi ve Etkileyen Faktörler. *Türkiye Klinikleri General Surgery-Special Topics*. 2021;14(4):13-9.
 44. Guo Sa, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*. 2010;89(3):219-29.
 45. Nawaz Z, Bentley G. Surgical incisions and principles of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2011;29(2):59-62.
 46. Reinke J, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European surgical research*. 2012;49(1):35-43.
 47. Vitale S, Colanero S, Placidi M, Di Emidio G, Tatone C, Amicarelli F, et al. Phytochemistry and biological activity of medicinal plants in wound healing: an overview of current research. *Molecules*. 2022;27(11):3566.
 48. Gonzalez ACdO, Costa TF, Andrade ZdA, Medrado ARAP. Wound healing-A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2016;91(5):614-20.
 49. Kiliç Ö, ARKAN H, AKBAŞ F, POLAT E, TUNÇDEMİR M, ONARAN İ, et al. Deneysel Diyabetik Sıçan Yara Modelinde *Lucilia sericata* Larva Salgılarının Yara İyileşme Süreci ile İlişkilendirilmiş MikroRNA'ların Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi. 2020.
 50. Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. Wound Healing Phases. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Brandon Basehore declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Patrick Zito declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing
- Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
51. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*. 1999;341(10):738-46.
 52. Flanagan M. The physiology of wound healing. *Journal of wound care*. 2000;9(6):299-300.
 53. MC R. Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Problems Surg*. 2001;38:61-140.

54. Hanna JR, Giacomelli JA. A review of wound healing and wound dressing products. *The Journal of foot and ankle surgery*. 1997;36(1):2-14.
55. KURTOĞLU AH, Karataş A. YARA TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: MODERN YARA ÖRTÜLERİ. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2009;38(3):211-32.
56. Sherman RA. A new dressing design for use with maggot therapy. *Plastic and reconstructive surgery*. 1997;100(2):451-6.
57. Campos AC, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2008;11(3):281-8.
58. Sarin CL, Austin JC, Nickel WO. Effects of smoking on digital blood-flow velocity. *Jama*. 1974;229(10):1327-8.
59. Bartsch RH, Weiss G, Kästenbauer T, Patocka K, Deutinger M, Krapohl BD, et al. Crucial aspects of smoking in wound healing after breast reduction surgery. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. 2007;60(9):1045-9.
60. Kordestani S. Wound healing process. *Atlas of wound healing*. 2019:11-22.
61. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *Journal of wound care*. 2008;17(9):399-402.
62. Hodson M, Gajraj R, Scott N. A comparison of the antibacterial activity of levobupivacaine vs. bupivacaine: an in vitro study with bacteria implicated in epidural infection. *Anaesthesia*. 1999;54(7):699-702.
63. Guillier M, Boselli E, Bouvet L, Freney J, Renaud F, Chassard D, et al. Levobupivacaine hydrochloride and sufentanil have no antimicrobial effect at 25 C in vitro. *European journal of anaesthesiology*. 2007;24(7):634-9.
64. Zink W, Seif C, Bohl JR, Hacke N, Braun PM, Sinner B, et al. The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. *Anesthesia & Analgesia*. 2003;97(4):1173-9.
65. Kuranel E. *Plantago lanceolata* bitkisinin yara iyileştirici özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans, İnönü Üniversitesi, Malatya. 2012.
66. Rosenberg PH, Renkonen OV. Antimicrobial activity of bupivacaine and morphine. *Anesthesiology*. 1985;62(2):178-9.
67. Bisla K, Tanelian DL. Concentration-dependent effects of lidocaine on corneal epithelial wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1992;33(11):3029-33.

68. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Current opinion in infectious diseases*. 2004;17(2):91-6.
69. Gurbet A, Bekar A, Bilgin H, Korfali G, Yilmazlar S, Tercan M. Pre-emptive infiltration of levobupivacaine is superior to at-closure administration in lumbar laminectomy patients. *European Spine Journal*. 2008;17:1237-41.
70. Decker MR, Greenblatt DY, Havlena J, Wilke LG, Greenberg CC, Neuman HB. Impact of neoadjuvant chemotherapy on wound complications after breast surgery. *Surgery*. 2012;152(3):382-8.
71. Mutlu S, Yılmaz E. Yara yönetiminde yenilikçi yaklaşımlar. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2019;8(4):481-94.
72. GÜNER İ, ÖZMEN D, BAYINDIR O. Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 1997;17(2):65-74.
73. Ik C. Wound care and wound healing. *Principles of surgery*. 1994:279-303.
74. Zhang L, Chen J, Han C. A multicenter clinical trial of recombinant human GM-CSF hydrogel for the treatment of deep second-degree burns. *Wound repair and regeneration*. 2009;17(5):685-9.
75. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.
76. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-67.
77. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. *JBJS*. 2002;84(6):1032-44.
78. Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*. 1991;66(6):1095-104.
79. Tobe M, Suto T, Saito S. The history and progress of local anesthesia: multiple approaches to elongate the action. *Journal of anesthesia*. 2018;32:632-6.
80. Rynd F. Neuralgia--introduction of fluid to the nerve. *Dublin Med Press*. 1845;13(167):19.
81. Berde C, Strichartz G. *Local Anesthetics: Anesthesia* Miller RD (ed), 5. baskı Churchill Livingstone. Philadelphia; 2000.
82. ÖKTEN F, HASDOĞAN M, TARHAN A. Bupivakain kardiyotoksitesitesi ne derece önemlidir? *Anestezi Dergisi*. 2010;18(4):189-93.

83. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000;26(1):13-25.
84. Morgan GE, Mikhail MS. Morgan & Mikhail's clinical anesthesiology: McGraw-Hill Education; 2018.
85. Rosenberg P, Heinonen E. Differential sensitivity of A and C nerve fibres to long-acting amide local anaesthetics. *British journal of anaesthesia*. 1983;55(2):163-7.
86. Shah J, Votta-Velis EG, Borgeat A. New local anesthetics. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2018;32(2):179-85.
87. Kocamanoğlu İ, Sarihasan B. Lokal Anestezikler: Yeni Bir Lokal Anestezik Levobupivakain. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2007;24(1):27-36.
88. Hadzic A. Local Anesthetics: Clinical Pharmacology and Selection. Hadzic's Peripheral Nerve Blocks and Anatomy for Ultrasound-Guided Regional Anesthesia, 3e. New York, NY: McGraw-Hill; 2021.
89. Öz Gergin Ö, Yıldız K, Bayram A, Sencar L, Coşkun G, Yay A, et al. Comparison of the myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine, and ropivacaine: an electron microscopic study. *Ultrastructural Pathology*. 2015;39(3):169-76.
90. Horiguchi T, Shibata MA, Ito Y, Eid NA, Abe M, Otsuki Y. Macrophage apoptosis in rat skeletal muscle treated with bupivacaine hydrochloride: Possible role of MCP-1. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*. 2002;26(1):79-86.
91. Sakuragi T, Ishino H, Dan K. Bactericidal activity of 0.5% bupivacaine with preservatives on microorganisms in the human skin flora. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 1997;22(2):178-84.
92. Tetzlaff JE. Cousins and Bridenbaugh's Neural Blockade in Clinical Anesthesia and Pain Medicine: *Mayo Clin Proc*. 2010 Jul;85(7):e51. doi: 10.4065/mcp.2010.0230.
93. Taylor A, McLeod G. Basic pharmacology of local anaesthetics. *BJA education*. 2020;20(2):34-41.
94. Nouette-Gaulain K, Bernard N, Lopez S, Christophe Dadure M, Masson F, Jacques Mercier M, et al. Time course of mitochondrial metabolism alterations to repeated injections of bupivacaine in rat muscle. *Canadian Journal of Anesthesia*. 2010;57(9):836.
95. Chrysostomou C, Schmitt CG. Dexmedetomidine: sedation, analgesia and beyond. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2008;4(5):619-27.

96. Coursin DB, Coursin DB, Maccioli GA. Dexmedetomidine. *Current Opinion in Critical Care*. 2001;7(4):221-6.
97. Afonso J, Reis F. Dexmedetomidina: rol actual en anestesia y cuidados intensivos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2012;62:125-33.
98. Song J-C, Gao H, Qiu H-B, Chen Q-B, Cai M-H, Zhang M-Z, et al. The pharmacokinetics of dexmedetomidine in patients with obstructive jaundice: A clinical trial. *PLoS One*. 2018;13(11):e0207427.
99. Dutta S, Lal R, Karol MD, Cohen T, Ebert T. Influence of cardiac output on dexmedetomidine pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2000;89(4):519-27.
100. Jorden VS, Pousman RM, Sanford MM, Thorborg PA, Hutchens MP. Dexmedetomidine overdose in the perioperative setting. *Annals of Pharmacotherapy*. 2004;38(5):803-7.
101. Bekker A, Sturaitis MK. Dexmedetomidine for neurological surgery. *Operative Neurosurgery*. 2005;57(1):1-10.
102. Hsu Y-W, Cortinez LI, Robertson KM, Keifer JC, Sum-Ping ST, Moretti EW, et al. Dexmedetomidine pharmacodynamics: part I: crossover comparison of the respiratory effects of dexmedetomidine and remifentanyl in healthy volunteers. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2004;101(5):1066-76.
103. Coull JT, Jones ME, Egan TD, Frith CD, Maze M. Attentional effects of noradrenaline vary with arousal level: selective activation of thalamic pulvinar in humans. *Neuroimage*. 2004;22(1):315-22.
104. Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, Uhrich TD, Colinto MD. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2000;93(2):382-94.
105. Yoshitomi T, Kohjitani A, Maeda S, Higuchi H, Shimada M, Miyawaki T. Dexmedetomidine enhances the local anesthetic action of lidocaine via an α -2A adrenoceptor. *Anesthesia & Analgesia*. 2008;107(1):96-101.
106. Al-Metwalli R, Mowafi H, Ismail S, Siddiqui A, Al-Ghamdi A, Shafi M, et al. Effect of intra-articular dexmedetomidine on postoperative analgesia after arthroscopic knee surgery. *British journal of anaesthesia*. 2008;101(3):395-9.
107. Deutsch E, Tobias JD. Hemodynamic and respiratory changes following dexmedetomidine administration during general anesthesia: sevoflurane vs desflurane. *Pediatric Anesthesia*. 2007;17(5):438-44.

108. Hoy SM, Keating GM. Dexmedetomidine: a review of its use for sedation in mechanically ventilated patients in an intensive care setting and for procedural sedation. *Drugs*. 2011;71:1481-501.
109. Takada K, Clark DJ, Davies MF, Tonner PH, Krause TK, Bertaccini E, et al. Meperidine exerts agonist activity at the $\alpha 2B$ -adrenoceptor subtype. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2002;96(6):1420-6.
110. Elvan E, Öç B, Uzun Ş, Karabulut E, Coşkun F, Aypar Ü. Dexmedetomidine and postoperative shivering in patients undergoing elective abdominal hysterectomy. *European journal of anaesthesiology*. 2008;25(5):357-64.
111. Panzer O, Moitra V, Sladen RN. Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists. *Critical care clinics*. 2009;25(3):451-69.
112. Li Y, He R, Chen S, Qu Y. Effect of dexmedetomidine on early postoperative cognitive dysfunction and peri-operative inflammation in elderly patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;10(5):1635-42.
113. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, Zevallos HBV, Hernández JLG, Martínez MEA, et al. *Farmacología básica y clínica*: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
114. Gertler R, Brown HC, Mitchell DH, Silvius EN, editors. *Dexmedetomidine: a novel sedative-analgesic agent*. Baylor University Medical Center Proceedings; 2001: Taylor & Francis.
115. Li H, Zhang X, Chen M, Chen J, Gao T, Yao S. Dexmedetomidine inhibits inflammation in microglia cells under stimulation of LPS and ATP by c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascades. *EXCLI journal*. 2018;17:302.
116. Scholz J, Tonner PH. $\alpha 2$ -Adrenoceptor agonists in anaesthesia: a new paradigm. *Current Opinion in Anesthesiology*. 2000;13(4):437-42.
117. Hall JE, Uhrich TD, Barney JA, Arain SR, Ebert TJ. Sedative, amnestic, and analgesic properties of small-dose dexmedetomidine infusions. *Anesthesia & Analgesia*. 2000;90(3):699-705.
118. Fragen RJ, Fitzgerald PC. Effect of dexmedetomidine on the minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in adults age 55 to 70 years. *Journal of clinical anesthesia*. 1999;11(6):466-70.
119. Triltsch AE, Welte M, von Homeyer P, Groe J, Genähr A, Moshirzadeh M, et al. Bispectral index-guided sedation with dexmedetomidine in intensive care: a prospective, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study. *Critical care medicine*. 2002;30(5):1007-14.

120. Swami SS, Keniya VM, Ladi SD, Rao R. Comparison of dexmedetomidine and clonidine (α_2 agonist drugs) as an adjuvant to local anaesthesia in supraclavicular brachial plexus block: A randomised double-blind prospective study. *Indian journal of anaesthesia*. 2012;56(3):243-9.
121. Biswas S, Das RK, Mukherjee G, Ghose T. Dexmedetomidine an adjuvant to levobupivacaine in supraclavicular brachial plexus block: a randomized double blind prospective study. *Ethiopian Journal of health sciences*. 2014;24(3):203-8.
122. Sandle T. Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*. 2016:171-83.
123. López-Serrano A, Olivas RM, Landaluze JS, Cámara C. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Analytical Methods*. 2014;6(1):38-56.
124. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*. 2012;114(8):785-96.
125. Ispir E, Ikiz M, Inan A, Sünbül AB, Tayhan SE, Bilgin S, et al. Synthesis, structural characterization, electrochemical, photoluminescence, antiproliferative and antioxidant properties of Co(II), Cu(II) and Zn(II) complexes bearing the azo-azomethine ligands. *Journal of Molecular Structure*. 2019;1182:63-71.
126. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007;2(2):329-33.
127. Suarez-Arnedo A, Figueroa FT, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PloS one*. 2020;15(7):e0232565.
128. Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC immunology*. 2004;5:1-10.
129. Bai X, Xiong L-L, Fang C-L, Zhou H-L, Xue L-L, Hu Y, et al. Interleukin 10 plays an important role in neonatal rats with hypoxic-ischemia associated with B-cell lymphoma 2 and endoplasmic reticulum protein 29. *Analytical Cellular Pathology*. 2021;2021(1):6622713.
130. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
131. Hancı V, Hakimoğlu S, Özaçmak H, Bektaş S, Özaçmak HS, Özdamar ŞO, et al. Comparison of the effects of bupivacaine, lidocaine, and tramadol infiltration on wound healing in rats. *Revista brasileira de anesthesiologia*. 2012;62:804-10.

132. Harris KL, Bainbridge NJ, Jordan NR, Sharpe JR. The effect of topical analgesics on ex vivo skin growth and human keratinocyte and fibroblast behavior. *Wound Repair and Regeneration*. 2009;17(3):340-6.
133. Kesici S, Kesici U, Ulusoy H, Erturkuner P, Turkmen A, Arda O. Efeitos dos anestésicos locais na cicatrização de feridas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2018;68:375-82.
134. CALÇADO MS, Almeida É, SILVEIRA LA, OLIVEIRA GC, GONÇALVES A, MATTAR BJ, et al. Infiltration of local anesthetics into the surgical wound: effect on inflammation and fibrous scar in rats. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2022;36:431-6.
135. Aktan B. Deneysel yanık modeli oluşturulan ratlarda deksmedetomidinin antiinflamatuvar etkisinin araştırılması.
136. Göz R. Sıçanlarda intravenöz Deksmetomidin infüzyonunun Sitokin Gen Ekspresyonuna Etkisinin Invitro Araştırılması: Marmara Üniversitesi (Turkey); 2006.
137. Raja SK, Garcia MS, Isseroff RR. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci*. 2007;12(3):2849-68.
138. Arranz-Valsero I, Soriano-Romaní L, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay. *Experimental Eye Research*. 2014;125:183-92.
139. Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M, Merfort I. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 2017;196:94-103.
140. Tayhan SE, Bilgin S, Elmastaş M. Evaluation of the wound healing potential of Teucrioside. *International Journal of Chemistry and Technology*. 2018;2(1):16-9.
141. Franková J, Pivodová V, Vágnerová H, Juráňová J, Ulrichová J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *Journal of applied biomaterials & functional materials*. 2016;14(2):137-42.
142. Kawano Y, Patrulea V, Sublet E, Borchard G, Iyoda T, Kageyama R, et al. Wound Healing Promotion by Hyaluronic Acid: Effect of Molecular Weight on Gene Expression and In Vivo Wound Closure. *Pharmaceuticals*. 2021;14(4):301.
143. Wu X, Sun Q, He S, Wu Y, Du S, Gong L, et al. Ropivacaine inhibits wound healing by suppressing the proliferation and migration of keratinocytes via the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *BMC anesthesiology*. 2022;22(1):106.

144. Li T, Chen L, Zhao H, Wu L, Masters J, Han C, et al. Both Bupivacaine and Levobupivacaine inhibit colon cancer cell growth but not melanoma cells in vitro. *Journal of anesthesia*. 2019;33:17-25.
145. Dai M, Zhu X, Zeng S, Liu Q, Hu R, Huang L, et al. Dexmedetomidine protects cells from Angiotensin II-induced smooth muscle cell phenotype switch and endothelial cell dysfunction. *Cell Cycle*. 2023;22(4):450-63.
146. Huang Y, Tsai P-S, Huang C. Bupivacaine inhibits COX-2 expression, PGE₂, and cytokine production in endotoxin-activated macrophages. *Acta anaesthesiologica scandinavica*. 2008;52(4):530-5.
147. Bedirli N, Akyürek N, Kurtipek O, Kavutcu M, Kartal S, Bayraktar AC. Thoracic epidural bupivacaine attenuates inflammatory response, intestinal lipid peroxidation, oxidative injury, and mucosal apoptosis induced by mesenteric ischemia/reperfusion. *Anesthesia & Analgesia*. 2011;113(5):1226-32.
148. Oz Gergin O, Bayram A, Gergin I, Aksu R, Yay A, Balcioglu E, et al. Comparison of myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine: apoptotic activity and acute effect on pro-inflammatory cytokines. *Biotechnic & Histochemistry*. 2019;94(4):252-60.
149. Shabaan AA. A randomized trial comparing three different anesthetic techniques on immune response for patients undergoing abdominal hysterectomy operation. *Research and Opinion in Anesthesia & Intensive Care*. 2019;6(4):446-54.
150. Yildirim S. Üroonkolojik cerrahide rejyonel ve genel anestezinin immün sistem üzerine olan etkilerinin serum sitokinleri aracılığı ile karşılaştırılması.
151. Mohamed S, Sayed D, El Sherif F, Abd El-Rahman A. Effect of local wound infiltration with ketamine versus dexmedetomidine on postoperative pain and stress after abdominal hysterectomy, a randomized trial. *European Journal of Pain*. 2018;22(5):951-60.
152. Sukegawa S, Higuchi H, Inoue M, Nagatsuka H, Maeda S, Miyawaki T. Locally injected dexmedetomidine inhibits carrageenin-induced inflammatory responses in the injected region. *anesthesia & analgesia*. 2014;118(2):473-80.
153. Brummett CM, Norat MA, Palmisano JM, Lydic R. Perineural administration of dexmedetomidine in combination with bupivacaine enhances sensory and motor blockade in sciatic nerve block without inducing neurotoxicity in rat. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2008;109(3):502-11.
154. Shen J, Fu G, Jiang L, Xu J, Li L, Fu G. Effect of dexmedetomidine pretreatment on lung injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013;6(6):1359-64.

155. Taniguchi T, Kidani Y, Kanakura H, Takemoto Y, Yamamoto K. Effects of dexmedetomidine on mortality rate and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. *Critical care medicine*. 2004;32(6):1322-6.
156. Özkan F, Yüksek A, Demirel A, Kantekin Ç. Effects of Dexmetatomidine and Midazolam on Immunity in Sepsis-induced Rats. *Medical Journal of Bakirkoy*. 2023;19(2).
157. Li B, Li Y, Tian S, Wang H, Wu H, Zhang A, et al. Anti-inflammatory effects of perioperative dexmedetomidine administered as an adjunct to general anesthesia: a meta-analysis. *Scientific reports*. 2015;5(1):12342.
158. Kawasaki T, Kawasaki C, Ueki M, Hamada K, Habe K, Sata T. Dexmedetomidine suppresses proinflammatory mediator production in human whole blood in vitro. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2013;74(5):1370-5.
159. Sağlık A. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarı üzerine n-asetil sistein, flumazenil ve deksmedetomidinin etkilerinin karşılaştırılması.
160. Koca U, Olguner ÇG, Ergür BU, Altekin E, Taşdöğen A, Duru S, et al. The Effects of Dexmedetomidine on Secondary Acute Lung and Kidney Injuries in the Rat Model of Intra-Abdominal Sepsis. *The Scientific World Journal*. 2013;2013(1):292687.
161. Can M, Gul S, Bektas S, HANCI V, Acikgoz S. Effects of dexmedetomidine or methylprednisolone on inflammatory responses in spinal cord injury. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 2009;53(8):1068-72.
162. Lee J, Hwang HW, Jeong J-Y, Kim YM, Park C, Kim JY. The effect of low-dose dexmedetomidine on pain and inflammation in patients undergoing laparoscopic hysterectomy. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(10):2802.
163. Taniguchi T, Kurita A, Kobayashi K, Yamamoto K, Inaba H. Dose-and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. *Journal of anesthesia*. 2008;22:221-8.
164. Ünal A, Aydın H, Tüzün İ, Karşıdağ T. Deri iyileşmesinin mekanik olarak incelemesi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*. 2014;2(3):141-5.
165. Chithra P, Sajithlal G, Chandrakasan G. Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 1998;59(3):179-86.
166. Ponrasu T, Jamuna S, Mathew A, Madhukumar KN, Ganeshkumar M, Iyappan K, et al. Efficacy of L-proline administration on the early responses during cutaneous wound healing in rats. *Amino acids*. 2013;45:179-89.

167. Kesici U, Karatepe YK, Mazlum AF, Bozali K, Genç MS, Ercan LD, et al. Effect of pre-incisional and peritoneal local anesthetics administration on colon anastomosis and wound healing. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*. 2024;30(5):316.
168. Soylu S, Sarıtaş ZK, Sarıtaş TB, Görücü F, Bülbül A, Demirel HH, et al. Evaluation of Epidermal and Dermal Wound Healing of Dexmedetomidine in Rat Model. 2024.
169. Aydın O, Eyigor M, Aydın N. Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. *European journal of anaesthesiology*. 2001;18(10):687-94.
170. Wachowski I, Jolly DT, Hrazdil J, Galbraith JC, Greacen M, Clanachan AS. The growth of microorganisms in propofol and mixtures of propofol and lidocaine. *Anesthesia & Analgesia*. 1999;88(1):209-12.
171. Grimmond T, Brownridge P. Antimicrobial activity of bupivacaine and pethidine. *Anaesthesia and intensive care*. 1986;14(4):418-20.
172. Kesici S, Demirci M, Kesici U. Antimicrobial effects of fentanyl and bupivacaine: an in vitro study. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2020;70:357-63.
173. Erkent FD, Günaydın B, Erdoğan M, Kalkancı A. Antimicrobial effects of ropivacaine, levobupivacaine and bupivacaine at different temperatures. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*. 15(3):400-5.
174. Neuwersch S, Köstenberger M, Sorschag S, Ilias W, Likar R. Antimicrobial Activity of Lidocaine, Bupivacaine, Mepivacaine and Ropivacaine on and. *The Open Pain Journal*. 2017;10(1).
175. Sosis MB, Braverman B. Growth of *Staphylococcus aureus* in four intravenous anesthetics. *Anesthesia & Analgesia*. 1993;77(4):766-8.
176. Berry C, Gillespie T, Hood J, Scott N. Growth of micro-organisms in solutions of intravenous anaesthetic agents. *Anaesthesia*. 1993;48(1):30-2.
177. Ayoglu H, Kulah C, Turan I. Antimicrobial effects of two anaesthetic agents: dexmedetomidine and midazolam. *Anaesthesia and intensive care*. 2008;36(5):681-4.
178. Keleş G, Kurutepe S, Tok D, Gazi H, Dinç G. Comparison of antimicrobial effects of dexmedetomidine and etomidate-lipuro with those of propofol and midazolam. *European journal of anaesthesiology*. 2006;23(12):1037-40.
179. Kocatürk Ö, Özkan HD, Çoban EP, Bıyık H. Antimicrobial Effects of Dexmedetomidine and Midazolam in Bicarbonate Buffer: An in vitro Study.