



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL STOMATİTİS MODELİNDE *TARANTULA*
CUBENSİS EKSTRATININ İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİLERİNİN
HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ**

Ali ŞİMŞEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR-2021

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL STOMATİTİS MODELİNDE *TARANTULA*
CUBENSİS EKSTRATININ İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİLERİNİN
HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ**

Ali ŞİMŞEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0641-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2021

TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans ve tez çalışmam süresinceengin bilgileriyle ve tecrübeleriyle yol gösteren, tez konumun seçilmesinden uygulaması ve yazılmasına kadar her konuda destek olan, yetişmemde büyük emek sahibi Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN’e,

Araştırmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşarak yön veren hocam Sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK’e, laboratuvar işlemlerini öğrenmemde yardımcı olan Uzm. Biyolog Dilnur İLERİ, Öğr.Gör.Leyla Elif Özgü AYÖZGER ile tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, son olarak da her zaman beni destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
TÜRKÇE ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ağız Mukozası	3
2.2. Stomatitler	4
2.3. Yara İyileşmesi	5
2.4. Theranekron	6
3. GEREÇ ve YÖNTEM	7
3.1. Deneysel Prosedür	7
3.2. Histopatolojik Yöntem	8
3.3. Picro Sirius Red Yöntemi	9
3.4. İmmunohistokimya Yöntemi	10
3.5. İstatik Analizler	11
4. BULGULAR	12
4.1. Klinik Bulgular	12
4.2. Makroskobik Bulgular	12
4.3. Histopatolojik Bulgular	14
4.3.1. Çalışmanın 3 Günlük Periyodunun Histopatolojik Bulguları	14
4.3.2. Çalışmanın 6 Günlük Periyodunun Histopatolojik Bulguları	21
4.4. Picro-Sirius Red Bulguları	24
4.5. Sitokeratin İmmunohistokimyasal Bulguları	26
4.6. Kollagen İmmunohistokimyasal Bulguları	29
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	39

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 3.1. Theranekron'un subkutan uygulaması	8
Şekil 3.2. Sağ yanak içinde defektlerin oluşturulması ve oluşturulmuş defektin görünümü	8
Şekil 3.3. Histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için kesitlerin alınışı	11
Şekil 4.1. Çalışmanın 3. gününde kontrol grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskobik görüntüsü.	13
Şekil 4.2. Çalışmanın 3. gününde Theranekron grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskobik görüntüsü.	13
Şekil 4.3. Çalışmanın 6. gününde kontrol grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskobik görüntüsü.	13
Şekil 4.4. Çalışmanın 6. gününde Theranekron grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskobik görüntüsü.	14
Şekil 4.5. Grup 1'deki bir ratın defekt bölgesinin (ok başı) mikroskobik görünümü, propria mukozada belirgin kanama bölgesi (ince ok) ve şiddetli yangısal hücre infiltrasyonu (kalın ok), HE, Bar=200 µm.	15
Şekil 4.6. Şekil 4.5'in büyütülmüş görünümü, defekt bölgesine yakın normal epitel tabaka (kalın ok) ve defekt bölgesini kaplayan kabuk oluşumu (ince ok), HE, Bar=100 µm.	15
Şekil 4.7. Defekt bölgesinin daha yakından görünümü, defekt bölgesini kaplayan kabuk oluşumu (kalın ok) ve nötrofil lökosit infiltrasyonları (ince ok), HE, Bar=50 µm.	16
Şekil 4.8. Grup 1'deki bir başka ratın defekt bölgesi (ince oklar) ve defekt bölgesini kaplayan kabuk oluşumu (ok başı), HE, Bar=200 µm.	16
Şekil 4.9. Şekil 4.8'in büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (ince oklar) ve kanama bölgesi (kalın ok), HE, Bar=100 µm.	17
Şekil 4.10. Şekil 4.9'un daha büyük büyütmedeki görünümü, kanama (kalın ok) ve nötrofil lökosit infiltrasyonları (ince oklar), HE, Bar=50 µm.	17
Şekil 4.11. Grup 3'teki bir ratın defekt bölgesinin görünümü (ince oklar), defekt bölgesinin epitel dokusuyla kapanması (kalın ok) ve hiperemik damarlar (beyaz ok), HE, Bar=200 µm.	18
Şekil 4.12. Şekil 4.11'deki defekt alanının büyütülmüş görünümü, defekt alanı (ince ok) ve kanama alanı (kalın ok) HE, Bar=100 µm.	18
Şekil 4.13. Defekt alanının daha yakından görünümü, azalmış kanama alanları (ince oklar) ve fibroblast proliferasyonları (kalın oklar), HE, Bar=50 µm.	19
Şekil 4.14. Grup 3'teki bir başka ratın defekt bölgesinin görünümü (ince oklar), defekt bölgesinin epitel dokusuyla kapanması (beyaz ok) ve hiperemik damarlar (kalın ok), HE, Bar=200 µm.	19

Şekil 4.15.	Şekil 4.14'ün büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (ince ok), epitel tabakanın rekenerasyonu (kalın ok), HE, Bar=100 µm.	20
Şekil 4.16.	Şekil 4.15'in daha yakından görünümü, fibroblast proliferasyonları (ince oklar) ve azalmış nötrofil lökosit infiltrasyonları (kalın oklar) HE, Bar=20 µm.	20
Şekil 4.17.	Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinin mikroskopik görünümü, (ince ok), epitelizasyon (kalın ok), HE, Bar=200 µm	21
Şekil 4.18.	Şekil 4.17'deki defekt bölgesinin büyütülmüş görünümü (ince oklar), HE, Bar=200 µm.	22
Şekil 4.19.	Şekil 4.18'deki defekt bölgesinin büyütülmüş görünümü, fibroblast proliferasyonları (ince oklar), HE, Bar=100 µm.	22
Şekil 4.20.	Grup 2'deki bir ratın tamamen epitelizasyonu (kalın ok) ve bağ doku oluşumu şekillenmiş defekt bölgesinin (ince oklar) mikroskopik görünümü, HE, Bar=200 µm.	23
Şekil 4.21.	Şekil 4.20'nin oldukça küçülen ve yangısal reaksiyonun bulunmadığı defekt alanının büyütülmüş görünümü (oklar), HE, Bar=20 µm.	23
Şekil 4.22.	Grup 1'deki bir ratın defekt bölgesinde bağ doku gelişimi (oklar), Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.	24
Şekil 4.23.	Grup 3'deki bir ratın defekt bölgesinde bağ doku artışı (oklar), Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.	25
Şekil 4.24.	Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinde bağ doku artışı (oklar), Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.	25
Şekil 4.25.	Grup 4'deki bir ratın defekt bölgesinde olgunlaşmış bağ dokunun (oklar) görünümü, Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.	26
Şekil 4.26.	Grup 1'deki bir ratın defekt bölgesinde (oklar) sitokeratin için negatif alanlar, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	27
Şekil 4.27.	Grup 3'deki bir ratın defekt bölgesinde epitel hücrelerinde pozitif sitokeratin ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	27
Şekil 4.28.	Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinde epitel hücrelerinde pozitif sitokeratin ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	28
Şekil 4.29.	Grup 4'deki bir ratın defekt bölgesinde epitel hücrelerinde pozitif sitokeratin ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.	28
Şekil 4.30.	Grup 1'deki bir ratın defekt bölgesinde hafif kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.	29
Şekil 4.31.	Grup 3'deki bir ratın defekt bölgesinde belirgin kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.	30

- Şekil 4.32.** Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinde belirgin kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm. **30**
- Şekil 4.33.** Grup 4'deki bir ratın defekt bölgesinde belirgin kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm. **31**



TABLÖLAR

Tablo 4.1.	Çalışma başlangıcında ve sonunda ratların ağırlıklarının istatistik analiz sonuçları	12
Tablo 4.2.	İmmünohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları	31



SİMGELER ve KISALTMALAR

G	: Gram
HE	: Hematoksilen Eozin
IP	: İntraperitoneal
Kg	: Kilogram
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
/	: Oran
°C	: Santigrad Derece
RAS	: Rekürren Aftöz Stomatitis
TCAE	: <i>Tarantula cubensis</i> Alkolik Eksrakı
%	: Yüzde

ÖZET

Deneyisel Stomatitis Modelinde *Tarantula cubensis* Ekstratının İyileşme Üzerine Etkilerinin Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi

Ağız mukozası lezyonları hem insan hem de hayvanlarda sıklıkla şekillenmekte ve yaşam kalitesini önemli ölçüde bozmaktadır. Ağrı sebebiyle gıda alınamaması, kilo kaybı ve verim düşüklüklerine sebep olmaktadır. Bu çalışmada ratlarda deneyisel olarak oluşturulan yanak mukozası lezyonları ile şekillenecek stomatitiste *Tarantula cubensis* ekstratının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 250-300 gram ağırlığında Wistar albino ırkı toplam 40 erkek rat kullanıldı ve ratlar 10'ar hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Çalışmanın birinci bölümü 3 günde, ikinci bölümü ise 6 günde tamamlandı. Grup 1 (3 gün kontrol grubu)'de 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu ve kendiliğinden iyileşmeye bırakıldı, 3 gün sonra ötenazi yapılarak lezyonlu bölgeden doku örnekleri toplandı. Grup 2 (6 gün kontrol grubu)'de 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu, kendiliğinden iyileşmeye bırakıldı, 6 gün sonra ötenazi yapılarak lezyonlu bölgeden doku örnekleri toplandı. Grup 3 (3 gün tedavi grubu)'de 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu ve defekt oluşturulduktan sonra aynı gün başlayarak 2 gün 0.2 ml *Tarantula cubensis* ekstaktı subkutan olarak verildi ve 3 gün sonra ötenazi yapılarak doku örnekleri toplandı. Grup 4 (6 gün tedavi grubu)'de 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu ve defekt oluşturulduktan sonra aynı gün başlayarak 5 gün 0.2 ml *Tarantula cubensis* ekstratı verildi, 6 gün sonra ötenazi yapılarak doku örnekleri toplandı. Nekropsi sırasında gerek 3 günlük gerekse 6 günlük gruplardaki lezyonlar kontrol grubu ile kıyaslandığında *Tarantula cubensis* ekstresi verilen grupların belirgin şekilde iyileşmiş oldukları saptandı. Yara bölgelerinden 3. ve 6. günlerde toplanan doku örnekleri histopatolojik olarak bağ doku ve epitel doku iyileşmesi açısından incelendi. Örnekler sitokeratin ve kollagen ekspresyonları açısından immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. *Tarantula cubensis* ekstratının hem epitel hem de bağ dokuda belirgin şekilde ekspresyon artışına sebep olduğu görüldü. Gerek makro ve gerekse mikroskobik bulgulara göre *Tarantula cubensis* ekstratının ağız yaralarında önemli ölçüde iyileştirici etkisi olduğu saptandı.

* Bu çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 0641-YL-20).

Anahtar kelimeler: İyileşme, Patoloji, Rat, Stomatitis, *Tarantula cubensis*.

ABSTRACT

Histopathological and Immunohistochemical Investigation of the Effects of *Tarantula cubensis* Extract on Amelioration in Experimental Stomatitis Model

Oral mucosal lesions are frequently occurred in both humans and animals and significantly impair the quality of life. Inability to eat food due to pain causes weight loss and low productivity. In this study, it was aimed to evaluate the effects of *Tarantula cubensis* extract on wound healing histopathologically and immunohistochemically in stomatitis caused by buccal mucosal lesions created experimentally in rats. In the study, a total of 40 male Wistar albino rats weighing 250-300 grams were used and the rats were divided into 4 groups of 10 animals each. The first part of the study was completed in 3 days and the second part in 6 days. Group 1 (3-day control group) created a mucosal defect with a diameter of 3mm and was allowed to heal spontaneously. After 3 days rats euthanatized and tissue samples were collected from the lesioned areas. Group 2 (6-day control group) a 3mm diameter mucosal defect was created and left to heal spontaneously. After 6 days, rats euthanatized and tissue samples were collected from the lesioned areas. Group 3 (3-day treatment group) a 3mm diameter mucosal defect created and starting on the same day, 0.2 ml of *Tarantula cubensis* extract was given subcutaneously for 2 days and tissue samples were collected by euthanasia after 3 days. Group 4 (6-day treatment group) a 3mm diameter mucosal defect created and starting on the same day, 0.2 ml of *Tarantula cubensis* extract was given for 5 days, 6 days later rats euthanatized and tissue samples were collected. During necropsy, the improvements in both 3-day and 6-day groups were significantly improved in the groups given *Tarantula cubensis* extract compared to the control groups. Tissue samples collected from the wound areas on the 3rd and 6th days were examined histopathologically for connective tissue and epithelial tissue healing. The samples were evaluated immunohistochemically for cytokeratin and collagen expressions. It was observed that *Tarantula cubensis* extract caused a significant increase in expression in both epithelial and connective tissue. According to both gross and microscopic findings, *Tarantula cubensis* extract was found to have a significant healing effect on mouth sores.

*This study was supported by scientific Projects Commission of University of Burdur Mehmet Akif Ersoy (Project number: 0641-YL-20).

Key words: Healing, Pathology, Rat, Stomatitis, *Tarantula cubensis*.

1. GİRİŞ

Ağız mukozası yaraları ve stomatitisler hem insan hem de hayvanlarda çeşitli sebeplerle şekillenebilen ve genellikle ağrılı lezyonlardır. Ağız lezyonlarının en önemli sebebi travmalardır. Bunun dışında mikroorganizmaların oluşturduğu veya bazı özel hastalıkların seyri sırasında gözlenen ağız lezyonları da bulunmaktadır. İnsanlarda rekürren aftöz stomatit (RAS) olarak bilinen ve sık gözlenen ağız mukozasına özel bir hastalık da bulunmaktadır. Bu oldukça ağrılı hastalıkta ağızda tekrarlayan ülserler ile karakterize lezyonlar şekillenir (Akintoye ve Greenberg, 2005). RAS'ın etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte multifaktöriyel olarak şekillendiği düşünülmektedir. Bu hastalığın çevresel, immünolojik, genetik, sistemik, gıdasal ve mikrobiyel faktörler ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Chavan ve ark., 2012). Hayvanlarda ise ağız lezyonları gerek sert gıdalarla beslenmeleri ve gerekse ağız hijyeninin bulunmaması gibi sebeplerle insanlardan daha sık şekillenmekte ancak ciddi problem şekillenene kadar genellikle sinsi bir gelişim göstermektedir. Bu sebeple genellikle komplike vakalarla karşılaşmakta ve tedavileri uzun sürmektedir. Ayrıca tüm hayvanlarda birçok hastalığın seyri sırasında da ağız lezyonları gelişmekte ve bunlarında ayrıca tedavi edilmeleri gerekmektedir (Milli ve Hazıroğlu 2000). Bu nedenle stomatitisler hem beşeri hemde veteriner hekimlikte hekimlerin sık karşılaştıkları ve tedavide zorlandıkları problemlerdir. Bu konu özellikle diş hekimliğinde çok önemlidir - ve hekimler hastalarını bir an önce tedavi edecek, iyileşmeyi hızlandırıcı ilaç ve yöntemler aramaktadırlar.

Theranechron, *Tarantula cubensis* örümceğinden elde edilen bir alkol ekstresidir (Sardari ve ark., 2007). Son zamanlarda veteriner hekimler tarafından kullanılmaya başlanmış ve oldukça başarılı sonuçlar alınmış olan homeopatik bir ilaçtır. Az sayıdaki çalışma ile sığırlarda deri papillomatozisi ve köpeklerde meme adenokarsinomlarının tedavisinde, ayrıca birçok travmatik ve yangısal lezyon ile yaralanmaların tedavisinde önemli ölçüde başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Theranechron'un demarkasyon, rejenarasyon, antiflojistik ve resorbtif etkileri de bulunmaktadır (Gül Satar ve ark., 2017; Gültekin ve ark., 2015; Cam ve ark., 2007; Oryan ve ark., 2012). Theranechron'un değişik hastalıkların tedavisinde başarılı

sonuçları saptanmasına rağmen etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı araştırmacılar bu ilacın anti enflamatuar ve katabolik etkileri inhibe edici özelliği olduğunu bildirmektedirler (Gültiken ve Vural, 2007).

Theranechron birçok yangısal ve tümöral olguda kullanılmıştır. Ağız lezyonlarında kullanımı ile ilgili olarak kısıtlı çalışmalar bulunmaktadır ve genellikle sistemik hastalıkların seyri sırasında ve diğer tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılmış ve iyileştirici etkisi bulunduğu bildirilmiştir. Theranechron'un bu etkilerini nasıl gerçekleştirdiği konusunda ve hücrel etkileri hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma ile gerek insan ve gerekse hayvanlarda sıklıkla şekillenen oral mukoza lezyonlarında bu ekstratın kullanılabilirliği değerlendirilecektir. Çalışma sonuçlarına göre özellikle neonatal dönemden başlayarak özellikle yavru hayvanlarda şekillenen ve yüksek oranda ölüme yol açan stomatitlerde bu maddenin sahada hayvanlarda veya insanlarda stomatitis tedavisinde kullanılabilirliği açısından değerlendirme yapılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağız Mukozası

Kutan mukozalar sindirim sistemi dahil dışa açılan bir çok sisteminin dış ortamla bağlantılı olan kısımlarını oluşturan nemli yapılardır. Oral mukoza, vücudun en sert dokuları olan dişler ile onları çevreleyen yumuşak mukozal epitel dokuları kapsayan ve ağız mikroflorasının sağlığına katkıda bulunan oldukça iyi düzenlenmiş bir dokudur. Ağız boşluğu dinamik bir yapıdır ve özellikle mekanik etkilere, sıcak veya soğuğa, yerel pH değişikliklerine sürekli maruz kalır. Bununla birlikte tat alma veya susuzluk gibi duysal değişiklikleri de algılayabilir. Yutma, öğürme gibi refleksler ve tükürük salgılama gibi işlemler de bu dokunun karmaşıklığına katkıda bulunan fonksiyonlar arasında sayılır (Cruchley ve Bergneier, 2018).

Ağız mukozası deriden dudaklar ile ayrılır ve genellikle daha koyu renklidir. Ağız mukozasının rengi damar konsantrasyonu, hiperemi, bağ doku, epitel kalınlığı, keratinizasyon derecesi ve pigmentasyonu oluşturan melanin miktarına göre değişebilir. Birçok hastalıkta mukoza rengi ve lezyonlar tanısallık öneme sahiptir (Eisen, 2000). Ağız mukozasının deriden diğer farklılıkları arasında nemli mukozal yapı dışında kıl kökleri, ter bezleri ve yağ bezleri gibi yapıların olmaması sayılabilir. Ayrıca bazı bölgelerde ve dilde papillalar da mevcuttur (Cruchley ve Bergneier, 2018).

İlaveten ağız mukozasının korunması için önemli ağrı, dokunma, ağız boşluğuna özgü sıcaklık ve tat alma gibi duysal işlevler bulunmaktadır. Bunlar ağızın farklı bölgelerinde bulunan özel sinir uçları, mekanoreseptör hücreler (Merkel hücreleri) ve tat tomurcukları gibi değişik özelleşmiş yapılar tarafından gerçekleştirilir. İnsan oral mukozasının, derinin aksine, önemli bir termal düzenleyici etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Ancak bu işlev köpekler gibi hayvanlarda çok daha önemlidir ve köpekler dillerini dışarı çıkarıp hızlı solunum yaptıklarında bu fonksiyonu yerine getirirler (Squier ve Brogden, 2011).

Oral mukoza çok katlı yassı epitelle kaplıdır ve ağız ortamı ile derin dokular arasında ana bariyeri oluşturur. Hücreler birbirine sıkıca tutunmuştur ve bazal laminaya oturan bazal tabakadaki hücrelerden başlayarak spinozum, granulozum ve kornifiye tabakaya doğru üst üste sıralanırlar. Oral mukozayı kaplayan çok katlı yassı epitel bazı önemli bölgesel farklılıklar da gösterir (Cruchley ve Bergneier, 2018).

Ağız mukozası kendi kendini yenileyen bilir en derin tabakadaki bazal hücreler (progenitör popülasyon) hızlı mitotik aktiviteye sahiptirler. Bu tabakadaki olgunlaşan hücreler yüzeye göç etmek için terminal farklılaşmaya uğrar ve yüzeyden dökülen hücrelerin yerini alırlar. Çoğalmadan farklılaşmaya geçişi mikroRNA'ların kontrol ettiği düşünülmektedir (Yi ve ark., 2008). Çiğneme mukozasının keratinize epiteli, derinin keratinize epiteline benzer bir yapıya sahiptir ve keratinositlerden köken alır. Bu çekirdeksiz hücreler yoğun şekilde keratin lifleri ile paketlenerek stratum corneum'u oluşturmak için sıkıca birbirine bağlanır. Bu yapı mekanik hareket ve bakteriyel veya kimyasal hasar için önemli bir bariyer oluşturur (Cruchley ve Bergneier, 2018).

2.2. Stomatitiser

Oral mukozanın yapısal ve fonksiyonel özellikleri onun koruma ve savunma görevlerini yerine getirmesine yöneliktir. Oral mukoza tamamen dış çevre ile ilişkilidir ve bu nedenle enfeksiyonlar için bir giriş kapısıdır. Bununla birlikte hem lokal hem de sistemik hastalıkların yansımaları da oral mukozayı etkiler. Bu dinamik epitel, hem savunma hem de normal homeostaz için önemli görevler üstlenir. Oral mukozanın yapısı ve işlevi sağlık ve hastalıkların önemli bir göstergesidir. Dolayısıyla oral mukoza zedelenmeye çok açık bir dokudur. Ağız mukozasının yangısı genel anlamıyla stomatitis olarak tanımlanır (Cruchley ve Bergneier, 2018).

Yunancada yanma, ateşlenme, iltihaplanma anlamlarına gelen bir sözcük olan “aft” terimi ilk defa Hipokrat (M.Ö 460-370) tarafından oral ülserleri tanımlamak için kullanılmıştır (Scully ve ark., 2003; Ship ve ark., 2000). Aft terimi günümüzde hem

insan hem de veteriner hekimliğinde sıklıkla eroziv, ülseratif ve oldukça ağrılı ağız lezyonlarını tanımlamak için kullanılır.

2.3. Yara iyileşmesi

Yara iyileşmesi önemli ve karmaşık bir süreçtir. Eksudatif faz, proliferatif faz ve rejeneratif faz olmak üzere temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Her bir basamak; hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal bir dizi olayın bütünleşmesi sonucu gerçekleşmekte olup, birçok endojen ve eksojen faktör tarafından kontrol edilmektedir. Günümüzde hala ciddi sorunların yaşandığı yara tedavisinde, etkin ve başarılı yaklaşımların yapılabilmesi için yara iyileşmesi patogenezinin iyi bilinmesi gerekmektedir (Ekmekçi ve Bostancı, 2002).

Yaralanma şekillendikten sonra başlayan eksudatif fazda, bu bölgedeki endotel, kollajen ve doku faktörleri başarılı bir hemostaz sağlamak için degranülasyonun gerçekleşmesini ve kemotaktik maddelerin salgılanmasını sağlar. Böylece trombosit agregasyonu aktive edilir, yangısal mediatörlerin (kemokinler) ve büyüme faktörlerinin oluşumu sağlanır (Gauglitz ve ark., 2011). Nötrofiller, yaralanma bölgesindeki kalıntıları ve bakterileri temizleyerek yara iyileşmesi için iyi bir ortam hazırlarlar. Ardından bölgeye gelen makrofajlar hasar dokusundaki bakterilerin fagositozunu artırır ve kolaylaştırır (Berman ve ark., 2017). Hemostaz ve eksudatif faz sıklıkla 72 saat sürer ve tamamlanır.

Proliferatif faz, fibroblast, keratinosit ve endotel hücrelerinin artışı ve bol bağ dokusu oluşumu ile karakterize olur. Yara bölgesinde proteoglikanlar, hyaluronik asit, kollajen ve elastin dahil olmak üzere tüm hücre dışı matriks (ECM), orijinal pıhtı oluşumunun yerini alacak granülasyon dokusu oluşumunu şekillendirir. Bu aşamaya birçok sitokin (özellikle interleükinler), anjiyogenez faktörleri (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve transforme büyüme faktörü ailesi (TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3) katılır. Bu aşama günler veya haftalar sürebilir (Su ve ark. 2010).

Yara iyileşmesinin son aşaması rejeneratif fazdır. Bu devre bölgede bulunan hücrelerin apoptozisi ile yeni hücrelerin üretimi arasında kesin bir denge gerektiren bir dönemdir. Kademeli yıkımlanma ile ECM ve olgunlaşmamış tip III kollajen ile olgun tip I kollajen oluşumu bu aşamada kritiktir. Bu devre birkaç ay ile yıllar arasında sürebilir. Bu aşamada herhangi bir sapma aşırı yara iyileşmesine veya kronikleşmeye neden olabilir (Plikus ve ark. 2017; Tsai ve ark., 2017).

2.4. Theranekron

Tarantula cubensis alkolik ekstratı (TCAE) olan Theranekron veteriner hekimliğinde homeopatik ilaç olarak ruhsatlandırılmış ve satışa sunulmuştur. Üründe hedef türler olarak at, sığır, köpek, kedi, domuz, koyun ve keçi belirtilmektedir. Bu hayvan türlerinde ilacın septik veya toksik hastalıklar, deri yangısı, yangısal tırnak hastalıkları (panarisyum, ayak çürüğü), flegmonlar, ülserler, apse, purulent nekrotik olgularda değişen derecelerde demarkasyon, rejenarasyon, antiflojistik ve resorbtif etki oluşturduğu belirtilmiştir. Bir çalışmada üst dudakta ülser ve dilde erozyon bulunan bir kedide normal tedavi protokolüne ek olarak TCAE kullanıldığında 14 gün sonunda dilde erozyonun tamamen geçtiği, dudak ülserinde de reepitelizasyon gözlemlendiği bildirilmiştir (Coşkun, 2017). Bir başka çalışmada ineklerde postpartum dönemde TCAE'nin rejenerasyon, rezorpsiyon, antiflojistik ve demarkasyon sağlayıcı etkisinden yararlanılarak retentio secundarium, vaginal akıntı ve uterus involusyonuna etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, Theranekronun postpartum dönemde retentio secundariumun engellenmesi, patolojik vaginal akıntılarının azaltılması ve uterus involusyonunun hızlandırılması amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (Kaçar ve ark, 2007).

Yapılan literatür taramasında TCAE'nin ağız yaralarında kullanılabilirliği ile ilgili kısıtlı sayıda ve klinik değerlendirmelere dayanan yayınlar bulunmuş, patolojik olarak stomatitis iyileşmesi ile ilgili deneysel çalışmalara rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı ratlarda deneysel olarak oluşturulacak yanak mukozası defektinin iyileşmesi üzerine TCAE'nin etkilerinin patolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneyisel Prosedür

Çalışmada 4 grupta toplam 40 Wistar albino erkek rat kullanıldı. Bu amaçla 250-300 gram ağırlığındaki ratlar 10'ar hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Birinci bölüm 3 günde ikinci bölüm ise 6 günde tamamlandı. Grup 1 (3 gün kontrol grubu) ratlarda 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu ve kendiliğinden iyileşmeye bırakıldı. Defekt oluşturulduktan 3 gün sonra ötenazi yapılarak lezyonlu bölgeden doku örnekleri toplandı. Grup 2 (6 gün kontrol grubu) ratlarda 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu, kendiliğinden iyileşmeye bırakıldı ve 6 gün sonra ötenazi yapılarak lezyonlu bölgeden doku örnekleri toplandı. Grup 3 (3 gün tedavi grubu) ratlarda 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu ve defekt oluşturulduktan sonra aynı gün başlayarak 2 gün, günde 1 kez 0.2 ml *Tarantula cubensis* ekstresi subkutan olarak verildi ve 3 gün sonra ötenazi yapılarak doku örnekleri toplandı. Grup 4 (6 gün tedavi grubu) ratlarda 3 mm çapında mukozal defekt oluşturuldu ve defekt oluşturulduktan sonra aynı gün başlayarak 5 gün, günde 1 kez 0.2 ml *Tarantula cubensis* ekstresi verildi, 6 gün sonra ötenazi yapılarak doku örnekleri toplandı. Defekt şekillendirmek ve tüm hayvanlarda aynı büyüklükteki lezyonu oluşturmak için 3 mm'lik biyopsi pançları kullanıldı.

Çalışma sonucunda ratlar intraperitoneal (IP) 90 mg/kg ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) ve 10 mg/kg ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV) anestezisi ile ötenazi edilerek lezyonlu bölgeden örnekler toplandı. Oral mukoza örnekleri histopatolojik olarak ve sitokeratin ile kollagen ekspresyonları açısından immunohistokimyasal olarak incelendi.



Şekil 3.1. Theranekron'un subkutan uygulanişı



Şekil 3.2. Sağ yanak içinde defektlerin oluşturulması ve oluşturulmuş defektin görünümü

3.2. Histopatolojik Yöntem

Ötenazi yapılan ratların yara oluşturulan sağ yanak içi bölgeleri nekropsi sırasında makroskobik olarak incelendi ve lezyon oluşturulan bölgelerden %10'luk nötral formalin solüsyonu içinde tespit edilmek üzere doku örnekleri toplandı. Dokuların kıvrılmasını önlemek için formalin solüsyonuna daldırıldıktan sonra düz bir zeminde 5 dakika bekletilerek sertleşmeleri sağlandı. Ertesi gün formalin

solüsyonundaki örnekler trimlenerek takip kasetlerine yerleştirildi. Aynı gün akşam kasetler tam otomatik doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) alınarak rutin doku takip prosedüründen geçirildi. Bu amaçla örnekler gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek dokuda bulunan suların çekilmesi, iki farklı ksilol serisinden geçirilerek dokudaki yağın alınması gerçekleştirildi. Su ve yağın alınmasıyla boşalan alanlara sıcak parafin dolması sağlandı. Ertesi sabah örnekler parafine gömülerek blokajları yapıldı. Elde edilen parafin bloklardan bir gün buzdolabında soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotomda, 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Normal lama alınan kesitler hematoksilin eozin ve bağ doku için Picro Sirius red ile boyandı. İmmunohistokimyasal olarak kollajen ve sitokeratin aktivitesi incelenmesinin belirlenmesi için de polilizinli lamlara iki seri kesit alındı.

Histopatolojik incelemeler için alınan doku kesitleri parafinin uzaklaştırılması için 30'ar dakika süre ile 3 ayrı ksilol serisinde bekletildi. Daha sonra sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkollerden geçirilerek dokuların rehidre edilmeleri sağlandı. Bu işlemlerin ardından hematoksilinle 15 dakika ve eozinle 3 dakika boyanmaları sağlandı. Boyamanın ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilen dokular dehidre edildi. Ksilolde parlatılan kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı ve mikroskop altında incelendi.

3.3. Picro Sirius Red Yöntemi

Bağ doku gelişiminin değerlendirilmesi için normal lamlara alınan kesitler deparafinize ve rehidrete edildikten sonra Picro Sirius Red metodu ile hazır kit kullanılarak (ab150681, Abcam, İngiltere) üretici firma talimatlarına göre boyandı. Bu amaçla deparafinize ve redidrete edilen kesitlerin üzeri tamamen Picro sirius red solüsyonu ile kapatılıp 30 dakike bekletildi Ardından 2 defa asetik asit solüsyonunda yıkandı. Boyama işlemi bitikten sonra kesitler dehidre edilerek, ksilolde parlatıldı ve kesitler üzerine entellan kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

3.4. İmmunohistokimya Yöntemi

İmmunohistokimyasal incelemeler için özel polilizinli lamlara alınarak boyamaya hazır hale getirilen kesitlere deparafinize ve rehidratasyonun ardından streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi uygulandı. İmmunohistokimyasal inceleme için ticari hazır kitler kullanıldı. Kesitler kollagen -4 [collagen 4 polyclonal antibody (bs-4595R), Bioss Antibodies Inc., Massachusetts U.S.A.1/100 dilüsyon] ve sitokeratin-1 [cytokeratin 1 (4D12B3):sc-65999), 1/100 dilüsyon] reaksiyonunun saptanması için immunohistokimyasal olarak boyandı. Bu işlem için kesitler önce ksilol ve ardından dereceli alkollerden geçirilerek kesitlerdeki parafin uzaklaştırıldı. Ardından dokulara su verilerek rehidre edilmesi sağlandı. Bu amaçla kesitler 10 dakika suda yıkandı. Kesitlerdeki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi. Ardından sitrat tampon solüsyonu içinde 2 defa 5 dakika süreyle kaynatıldı. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Ardından nonspesifik boyamaları engellemek için normal serumda 45 dakika süreyle bekletildi. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan primer serumlar uygulandı ve buzdolabında bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı şekil ve süreyle tampon solüsyonunda yıkandı, ardından streptoavidin ile 30 dakika süreyle inkübe edildi ve PBS'te 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemten sonra dokular biotinli serum ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Dokular aynı şekil ve süreyle yıkandı, hazırlanmış olan DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojen ile boyandı. Sekonder kit olarak UltraVision Detection System Anti-Polyvalenti HRP kit (TP-060-HL) (Thermo Shandon Limited, Cheshire, İngiltere) ve kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kullanıldı. Negatif kontroller için primer antikorlar yerine antikor sulandırma sıvıları ile inkübe edildi. Karşıt boyama için Harris hematoksilen ile boyandı ve preparatlar ışık mikroskobunda incelendi.



Şekil 3.3. Histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için kesitlerin alınışı

İmmunohistokimyasal boyanmalar 0-3 arasında skorlandı. 0= boyama yok, 1= hafif boyanma, 2= orta şiddette boyama ve 3= şiddetli boyama olarak değerlendirildi. Elde edilen skorlar istatistik olarak incelendi ve tablollaştırıldı.

3.5 İstatistik Analizler

Çalışmada immunohistokimyasal skorların istatistik analizi One-way ANOVA testi ile SPSS 15.00 paket programda yapıldı. Gruplar arası farklar Duncan testi ile karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Çalışma süresince hiçbir grupta ölüm saptanmadı ve iyileşme komplikasyonuna rastlanmadı. Çalışmaya başlamadan ve bitiminde ratların canlı ağırlık ölçümleri yapıldı. Kontrol gruplarında kilo kaybı saptanırken Theranekron verilen gruplarda hem 3 günlük hemde 6 günlük periyotlarda kilo artışı tespit edildi. Ancak gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemsizdi (Tablo 4.1).

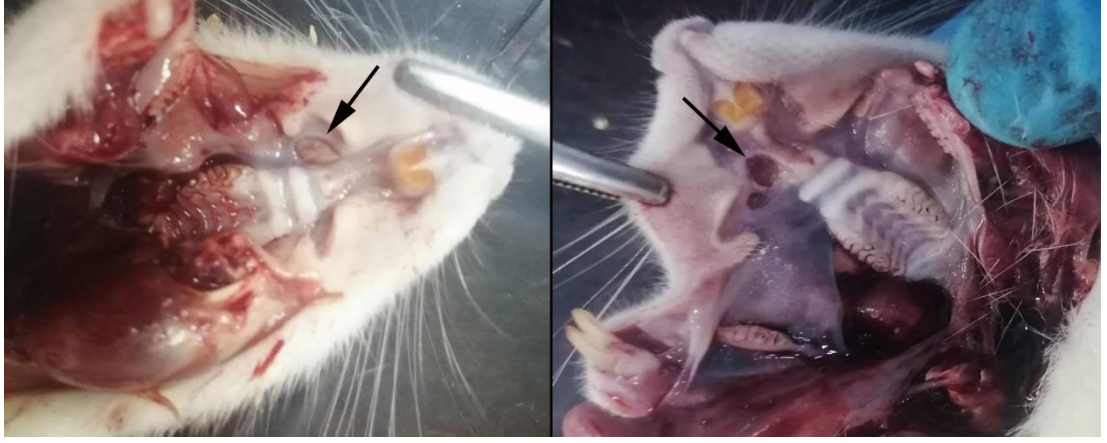
Tablo 4.1: Çalışma başlangıcında ve sonunda ratların ağırlıklarının istatistik analiz sonuçları

Gruplar	Grup 1	Grup 3	Grup 2	Grup 4	P
Başlangıç	302.25±22.16	285.40±28.66	283.40±33.12	284.44±32.36	>0.05
Bitiş	296.65±23.27	282.90±25.64	291.65±37.37	294.77±25.27	>0.05

*:Veriler mean ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

4.2. Makroskopik Bulgular

Nekropsi sırasında ratların defekt oluşturulan sağ yanak içi bölgeleri dikkatlice incelendi. Gerek 3 günlük, gerekse 6 günlük gruplarda kontrol ile Theranekron uygulanan gruplar karşılaştırıldığında her iki periyotta da Theranekron uygulanan gruplarda daha belirgin iyileşme dikkati çekti. Çalışmanın 3 günlük periyodunda Theranekron grubunda birçok ratta epitelizasyon şekillenirken, kontrol grubunda ülser ve nekrotik kitleler belirgin şekilde görülebiliyordu. Çalışmanın 6 günlük döneminde birçok ratta yara kapanmasına rağmen bazılarında defekt bölgesinde tam kapanmayan alanlar gözlemlendi. Theranekron uygulanan gruptaki ratların tümünde makroskopik olarak tamamen iyileşmenin şekillendiği dikkati çekti (Şekil 4.1- 4.4).



Şekil 4.1. Çalışmanın 3. gününde kontrol grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskopik görüntüsü.



Şekil 4.2. Çalışmanın 3. gününde Theranekron grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskopik görüntüsü.



Şekil 4.3. Çalışmanın 6. gününde kontrol grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskopik görüntüsü.

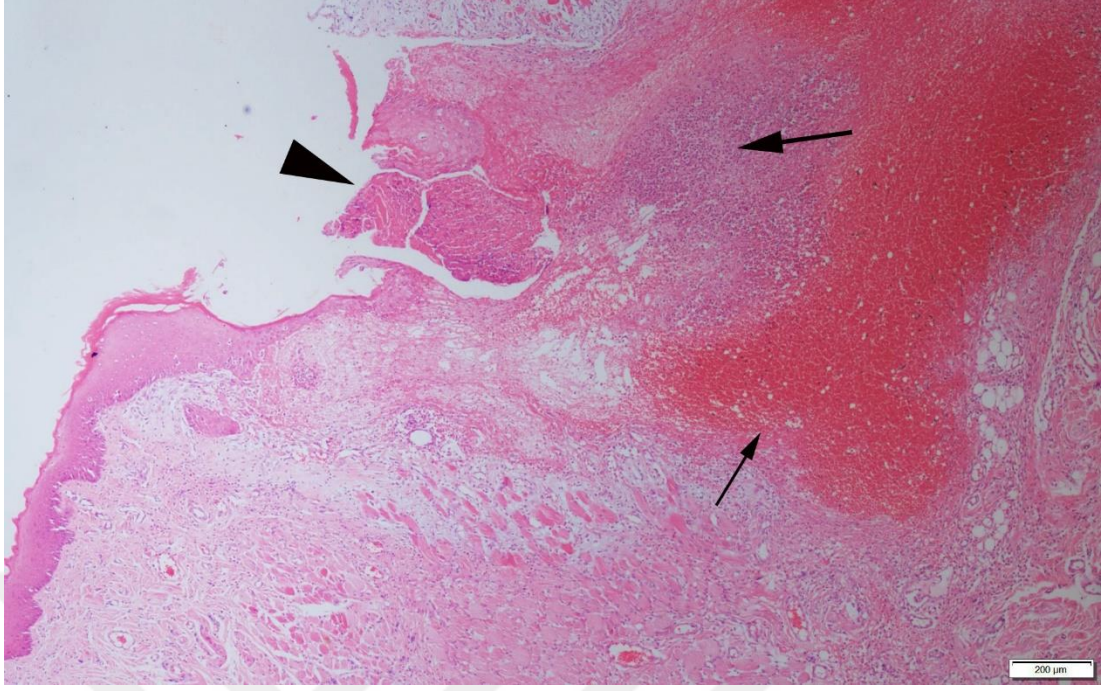


Şekil 4.4. Çalışmanın 6. gününde Theranekron grubunun defekt bölgesinin (oklar) makroskobik görüntüsü.

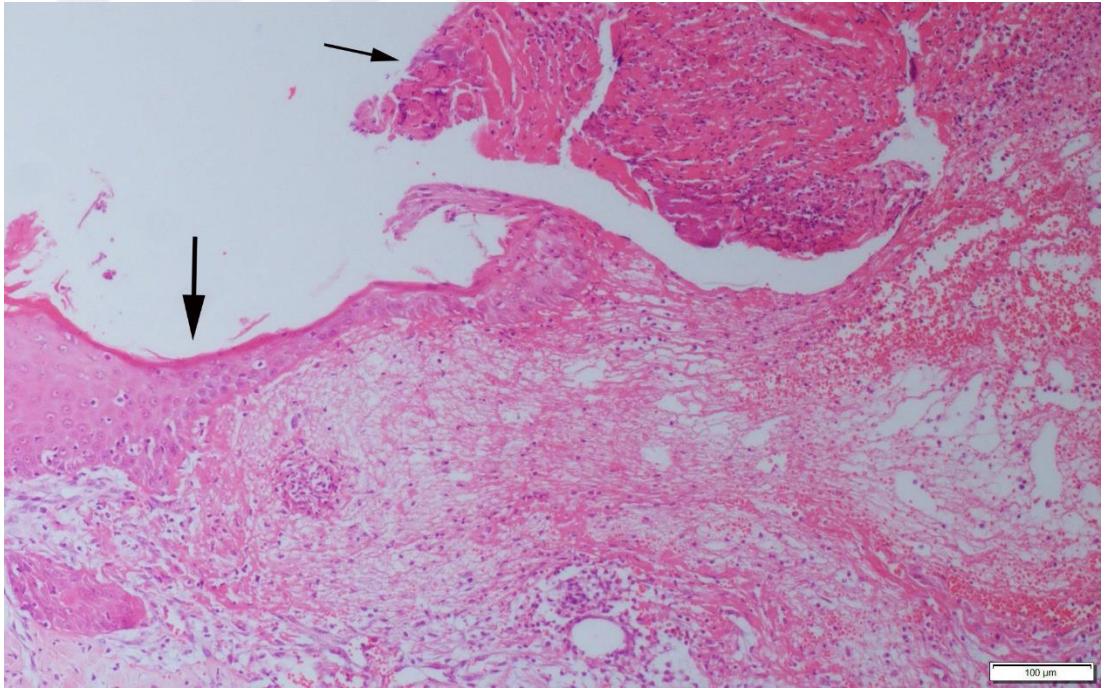
4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Çalışmanın 3 Günlük Periyodunun Histopatolojik Bulguları

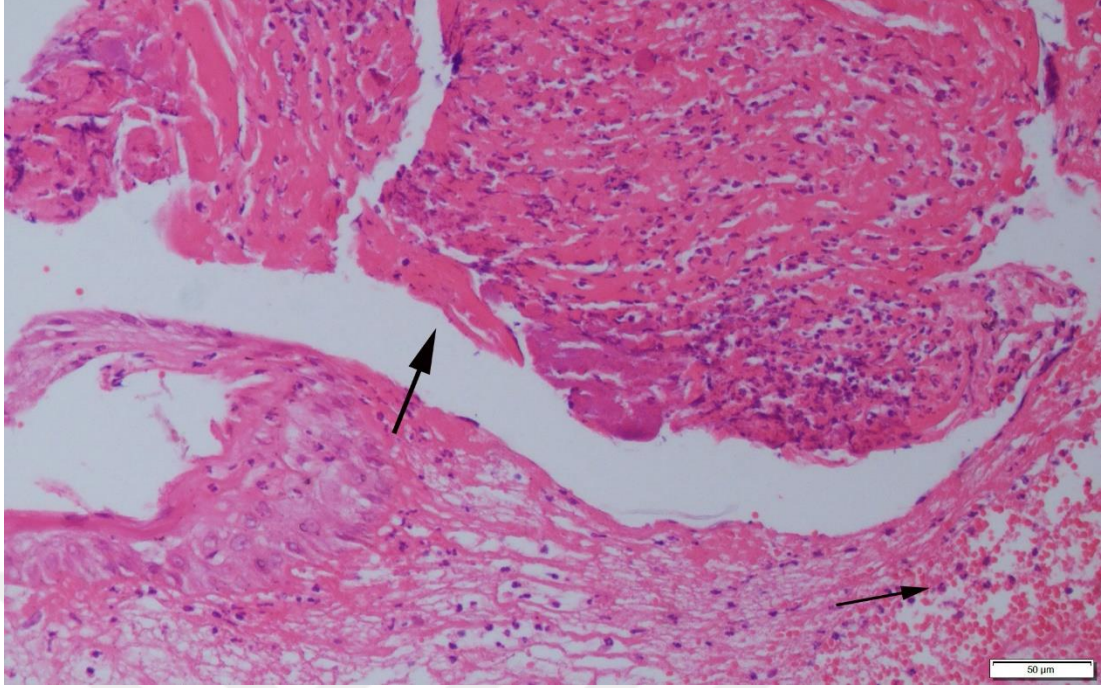
Çalışmanın 3 günlük ilk periyodunda kontrol grubundaki ratların ağız mukozasında oluşturulan defektlerin üst yüzeylerinde kabuk oluşumunun şekillendiği, epitelizasyonun oluşmadığı ve propria mukozada yaygın kanama odakları ile şiddetli yangısal hücre infiltrasyonlarının bulunduğu dikkati çekti (Şekil 4.5 - 4.10). Çalışmanın 3 günlük periyodunda Theranekron verilen grupta defekt bölgesinde epitelizasyonun şekillenmeye başladığı, kanama ve infiltrasyonun kontrol grubuna göre çok daha hafif şiddette olduğu saptandı (Şekil 4.11- 4.16).



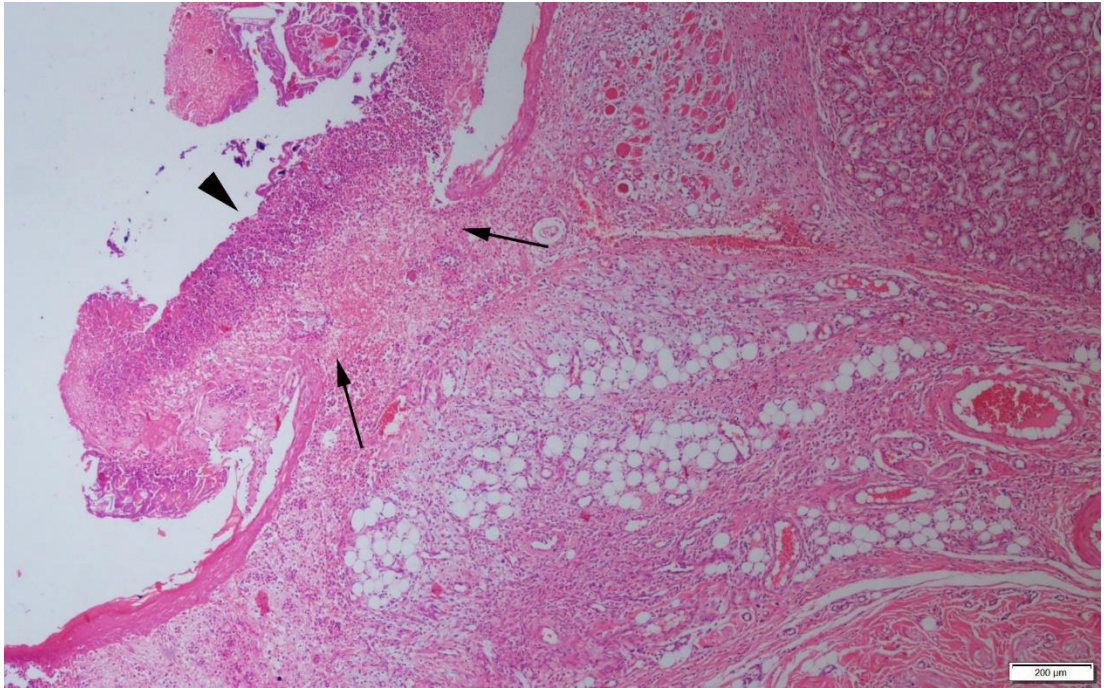
Şekil 4.5. Grup 1'deki bir ratın defekt bölgesinin (ok başı) mikroskopik görünümü, propria mukozada belirgin kanama bölgesi (ince ok) ve şiddetli yangısal hücre infiltrasyonu (kalın ok), HE, Bar=200 µm.



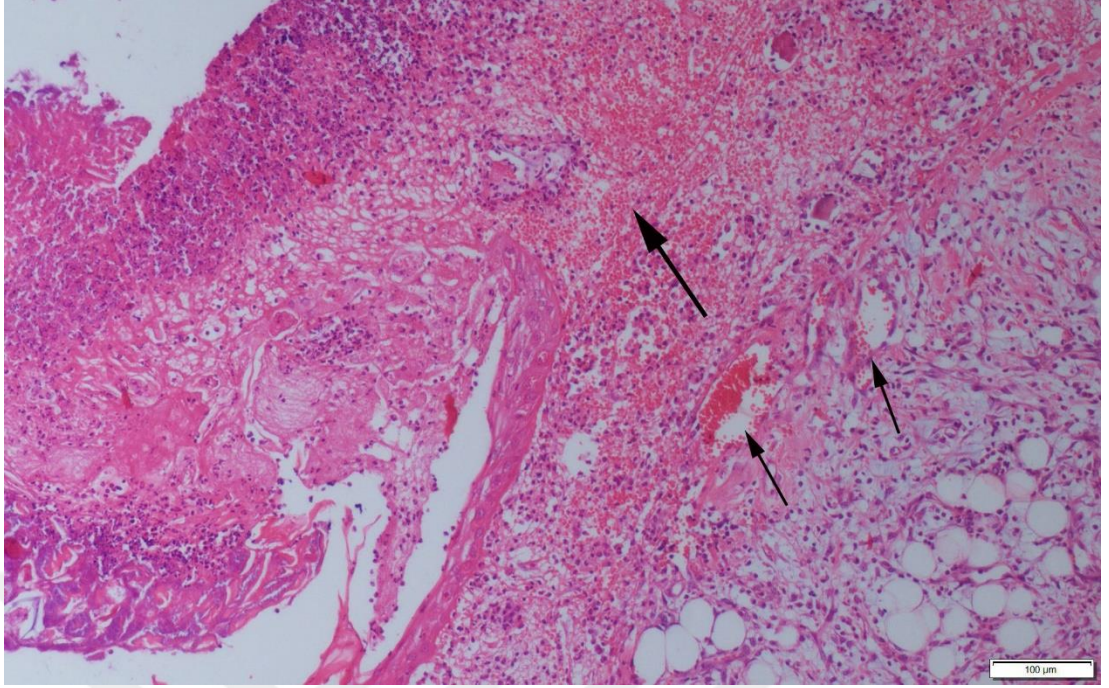
Şekil 4.6. Şekil 4.5'in büyütülmüş görünümü, defekt bölgesine yakın normal epitel tabaka (kalın ok) ve defekt bölgesini kaplayan kabuk oluşumu (ince ok), HE, Bar=100 µm.



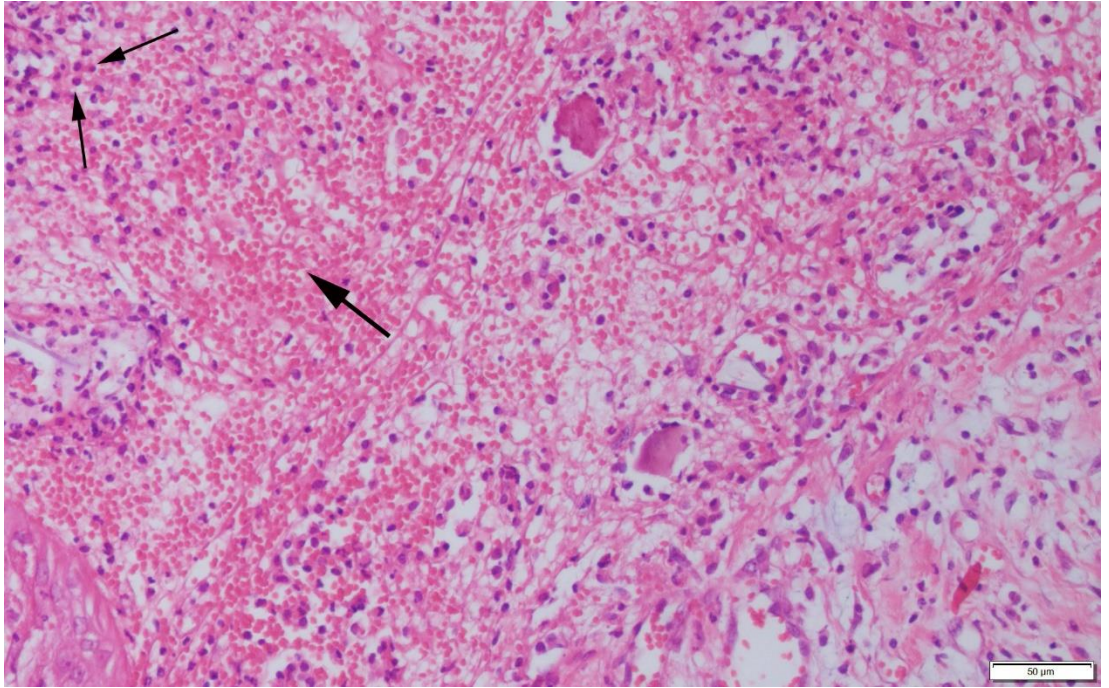
Şekil 4.7. Defekt bölgesinin daha yakından görünümü, defekt bölgesini kaplayan kabuk oluşumu (kalın ok) ve nötrofil lökosit infiltrasyonları (ince ok), HE, Bar=50 µm.



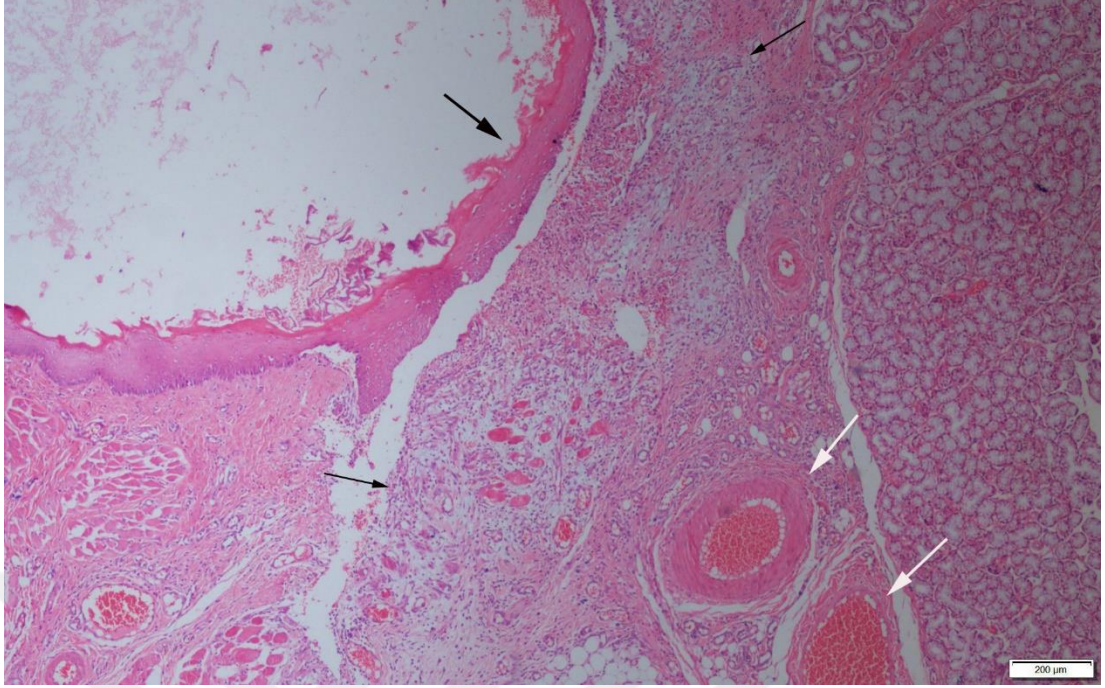
Şekil 4.8. Grup 1'deki bir başka ratın defekt bölgesi (ince oklar) ve defekt bölgesini kaplayan kabuk oluşumu (ok başı), HE, Bar=200 µm.



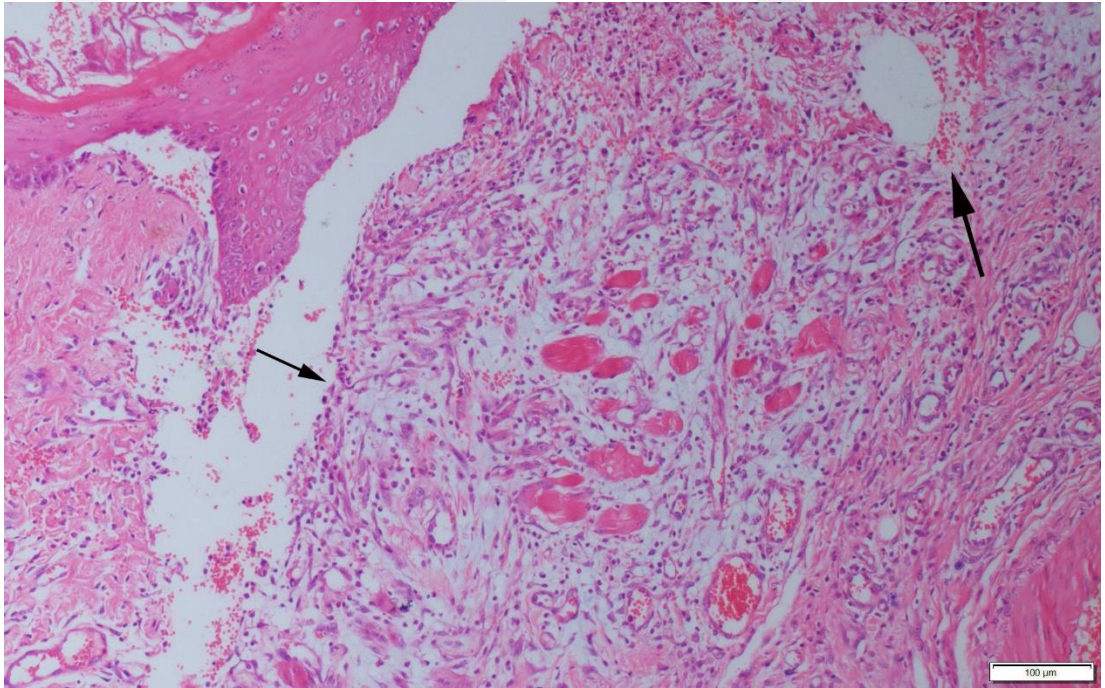
Şekil 4.9. Şekil 4.8'in büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (ince oklar) ve kanama bölgesi (kalın ok), HE, Bar=100 µm.



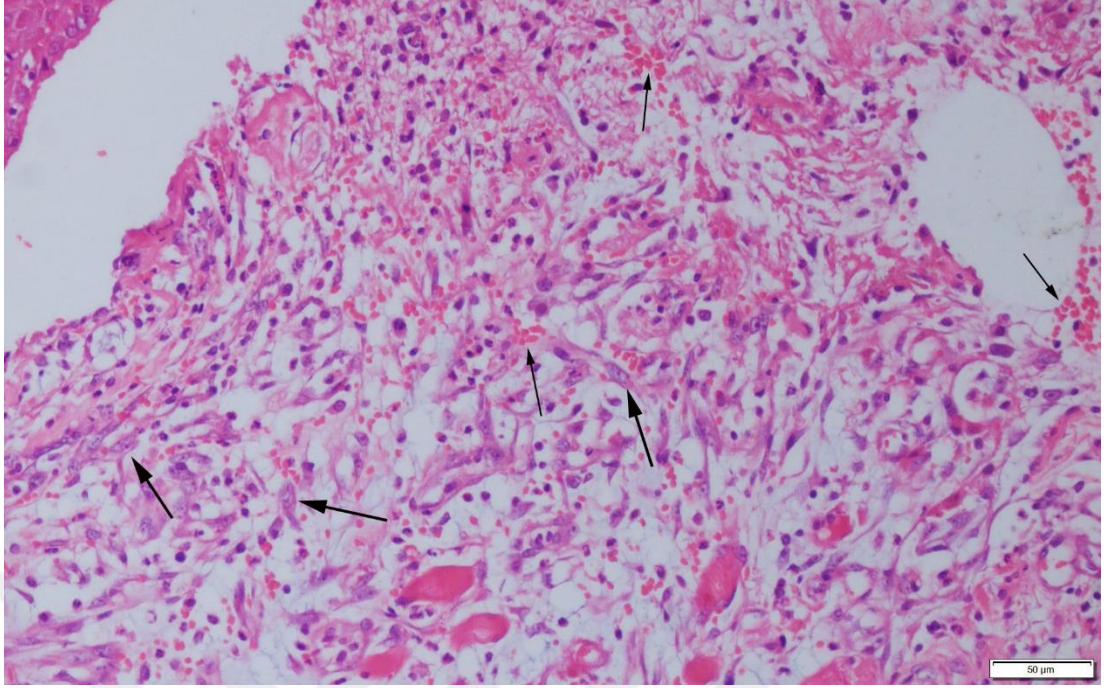
Şekil 4.10. Şekil 4.9'un daha büyük büyütmedeki görünümü, kanama (kalın ok) ve nötrofil lökosit infiltrasyonları (ince oklar), HE, Bar=50 µm.



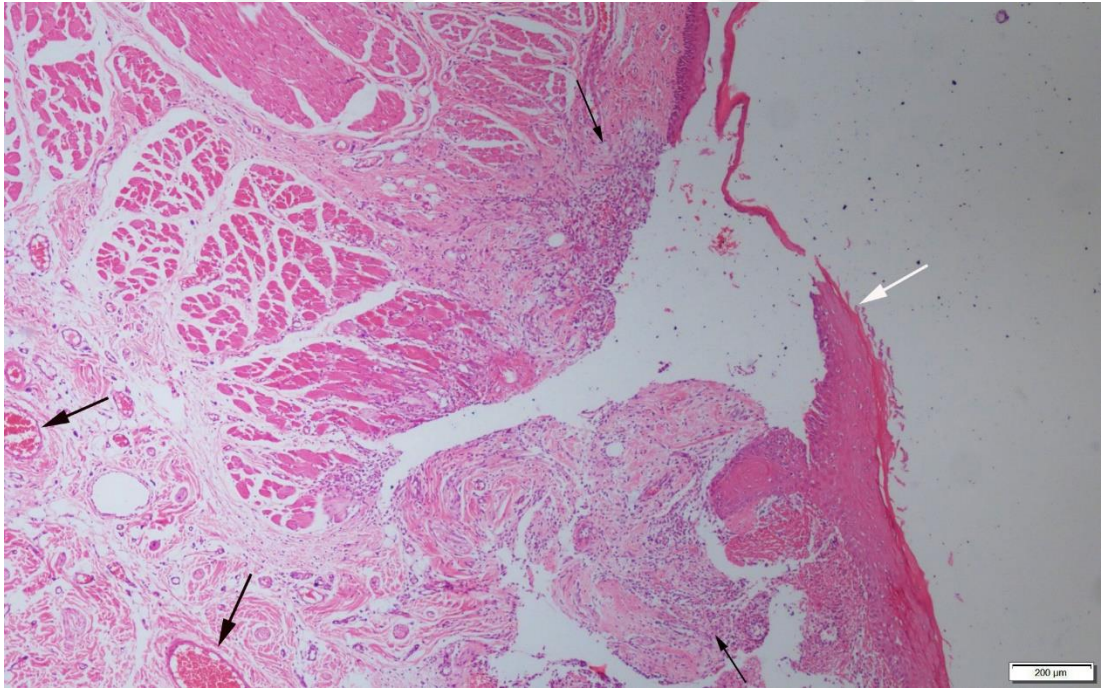
Şekil 4.11. Grup 3'teki bir ratın defekt bölgesinin görünümü (ince oklar), defekt bölgesinin epitel dokusuyla kapanması (kalın ok) ve hiperemik damarlar (beyaz ok), HE, Bar=200 µm.



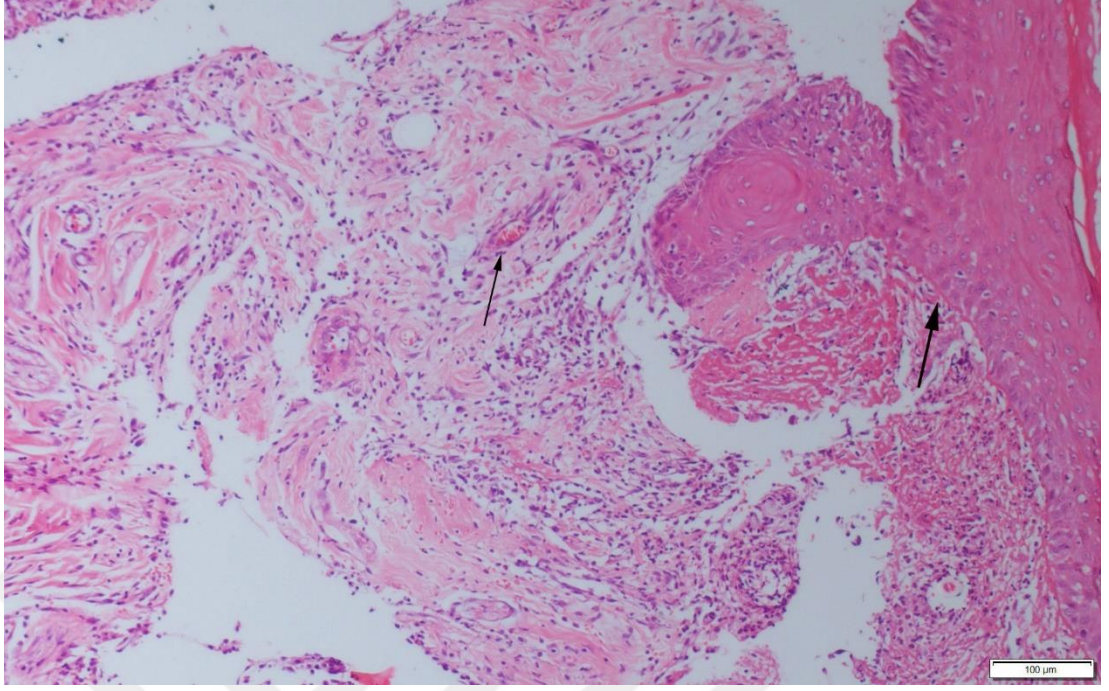
Şekil 4.12. Şekil 4.11'deki defekt alanının büyütülmüş görünümü, defekt alanı (ince ok) ve kanama alanı (kalın ok) HE, Bar=100 µm.



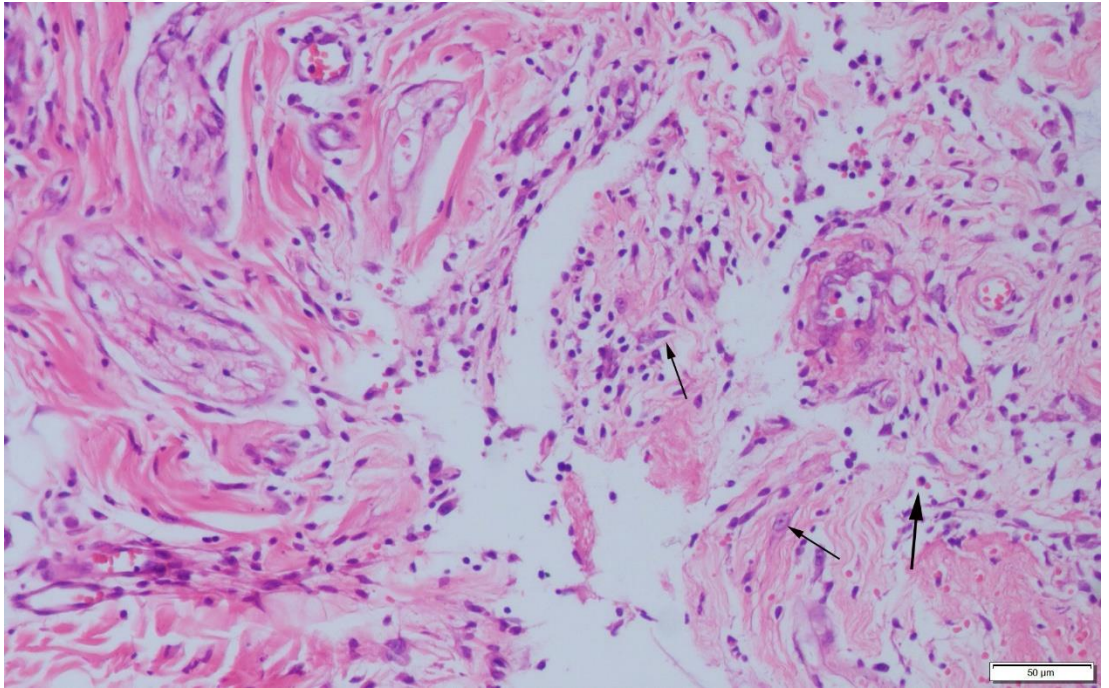
Şekil 4.13. Defekt alanının daha yakından görünümü, azalmış kanama alanları (ince oklar) ve fibroblast proliferasyonları (kalın oklar), HE, Bar=50 µm.



Şekil 4.14. Grup 3'teki bir başka ratın defekt bölgesinin görünümü (ince oklar), defekt bölgesinin epitel dokusuyla kapanması (beyaz ok) ve hiperemik damarlar (kalın ok), HE, Bar=200 µm.



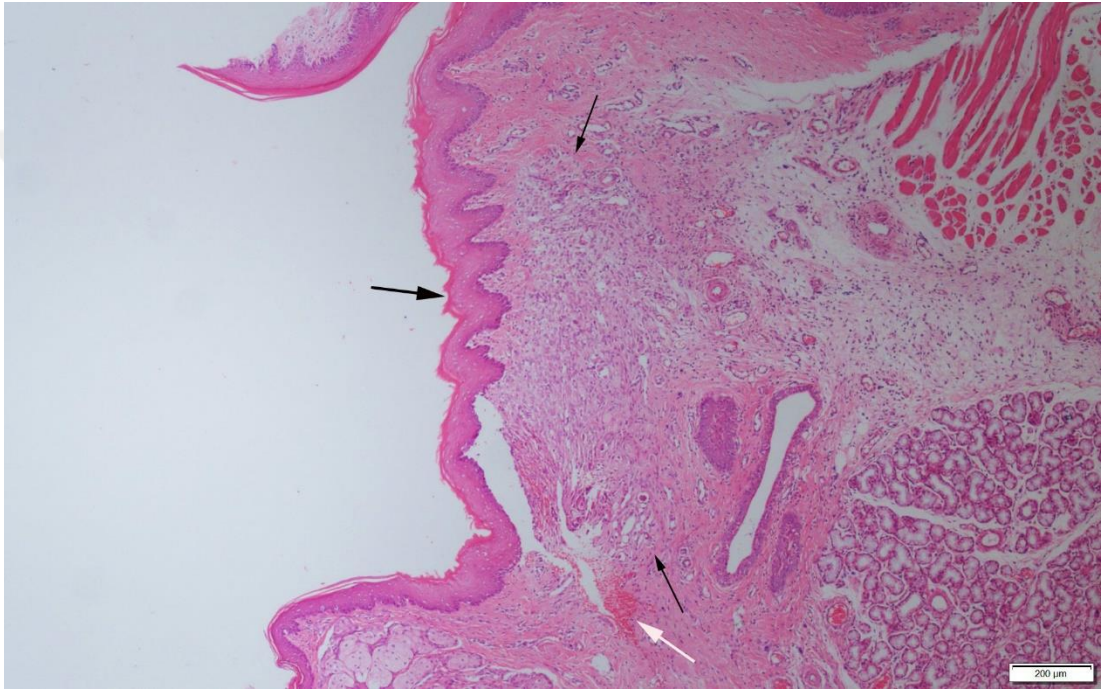
Şekil 4.15. Şekil 4.14'ün büyütülmüş görünümü, damarlarda hiperemi (ince ok), epitel tabakanın rejenerasyonu (kalın ok), HE, Bar=100 µm.



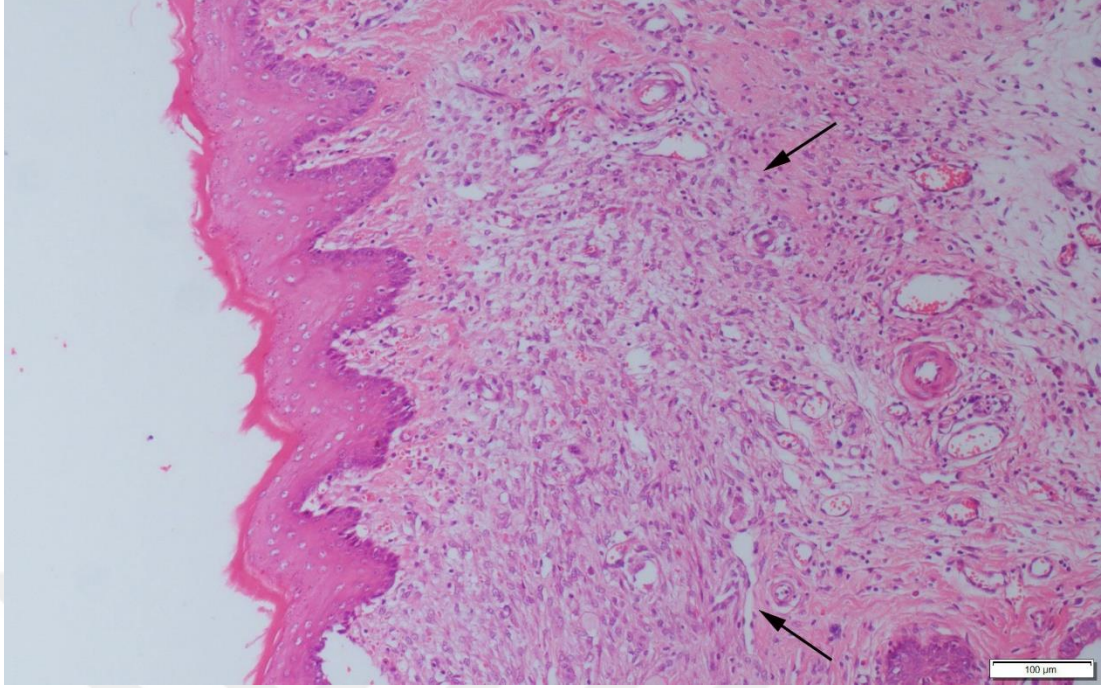
Şekil 4.16. Şekil 4.15'in daha yakından görünümü, fibroblast proliferasyonları (ince oklar) ve azalmış nötrofil lökosit infiltrasyonları (kalın oklar) HE, Bar=20 µm.

4.4.2. Çalışmanın 6 Günlük Periyodunun Histopatolojik Bulguları

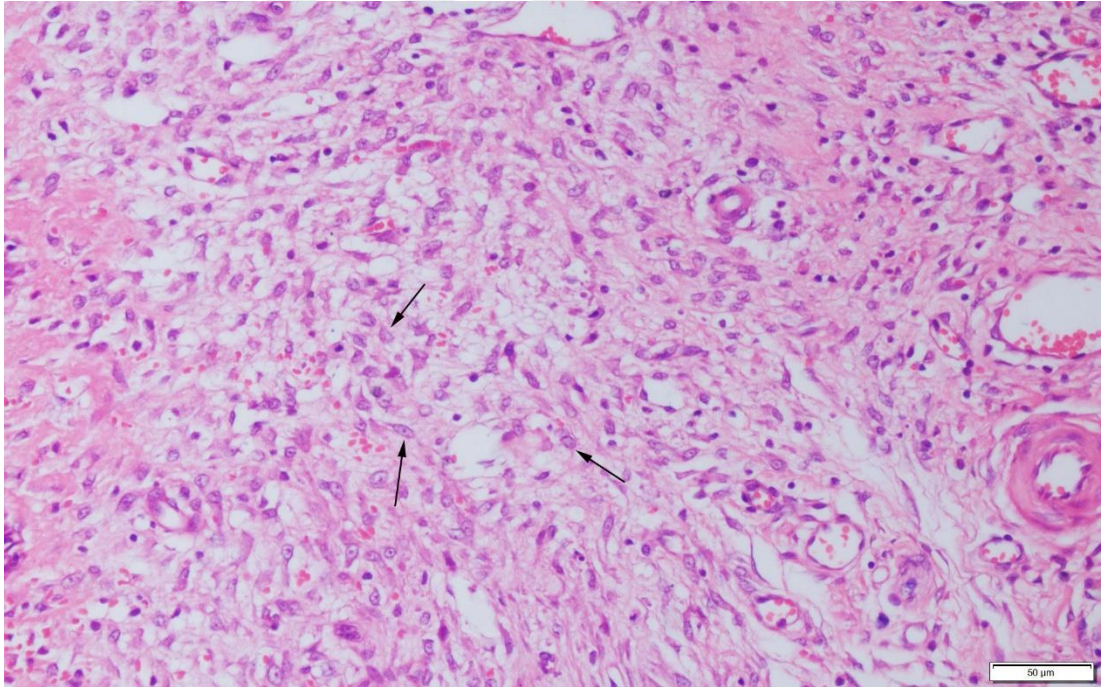
Çalışmanın 6 günlük ikinci periyodunda kontrol grubundaki ratların ağız mukozasında oluşturulan defektlerin oldukça küçüldüğü ve büyük ölçüde kapandığı dikkati çekti (Şekil 4.17 – 4.19). Çalışmanın 6 günlük periyodunda theranekron verilen grupta defekt bölgesinin tamamen kapandığı saptandı (Şekil 4.20 - 4.21).



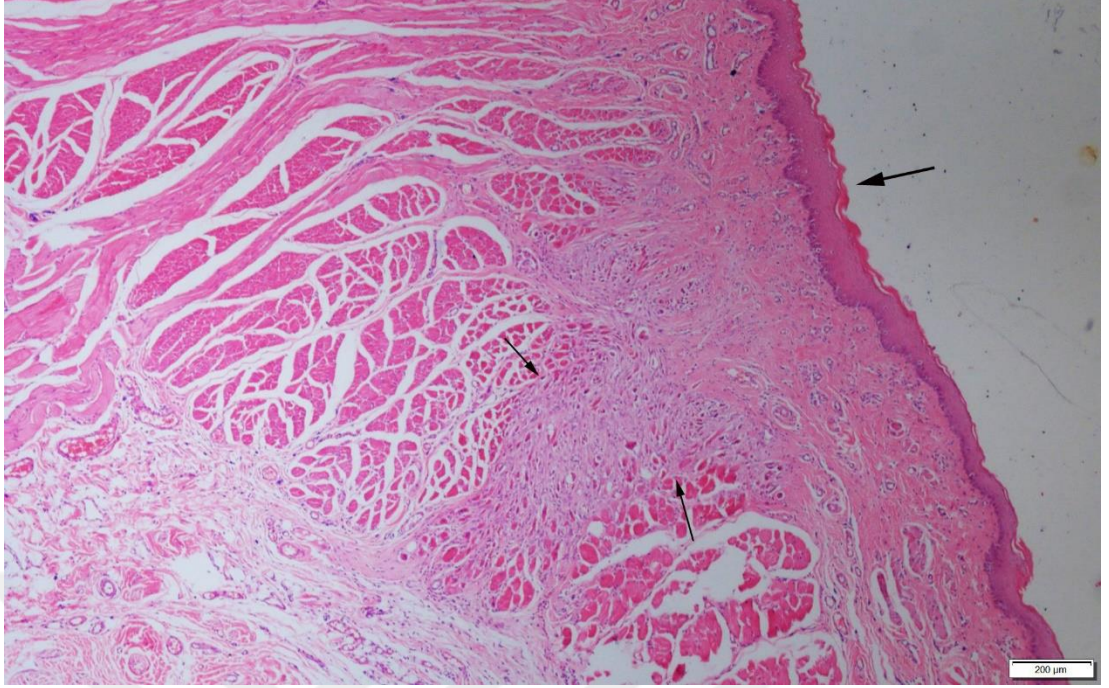
Şekil 4.17. Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinin mikroskopik görünümü (ince ok), epitelizasyon (kalın ok), HE, Bar=200 µm.



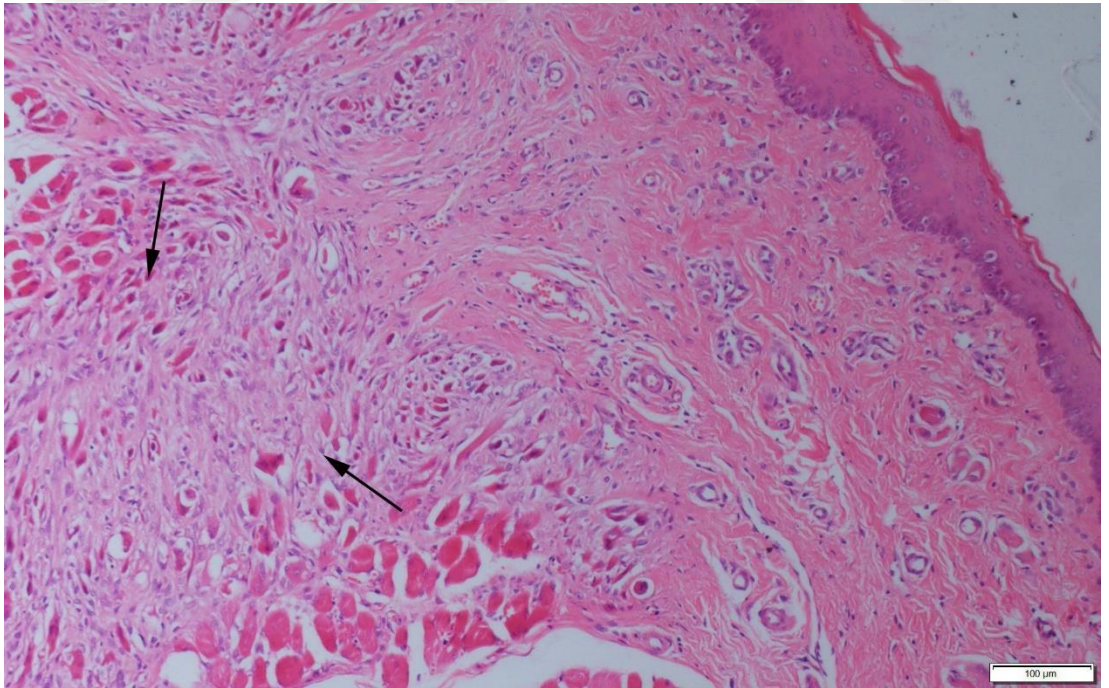
Şekil 4.18. Şekil 4.17'deki defekt bölgesinin büyütülmüş görünümü (ince oklar), HE, Bar=200 µm.



Şekil 4.19. Şekil 4.18'deki defekt bölgesinin büyütülmüş görünümü, fibroblast proliferasyonları (ince oklar), HE, Bar=100 µm.



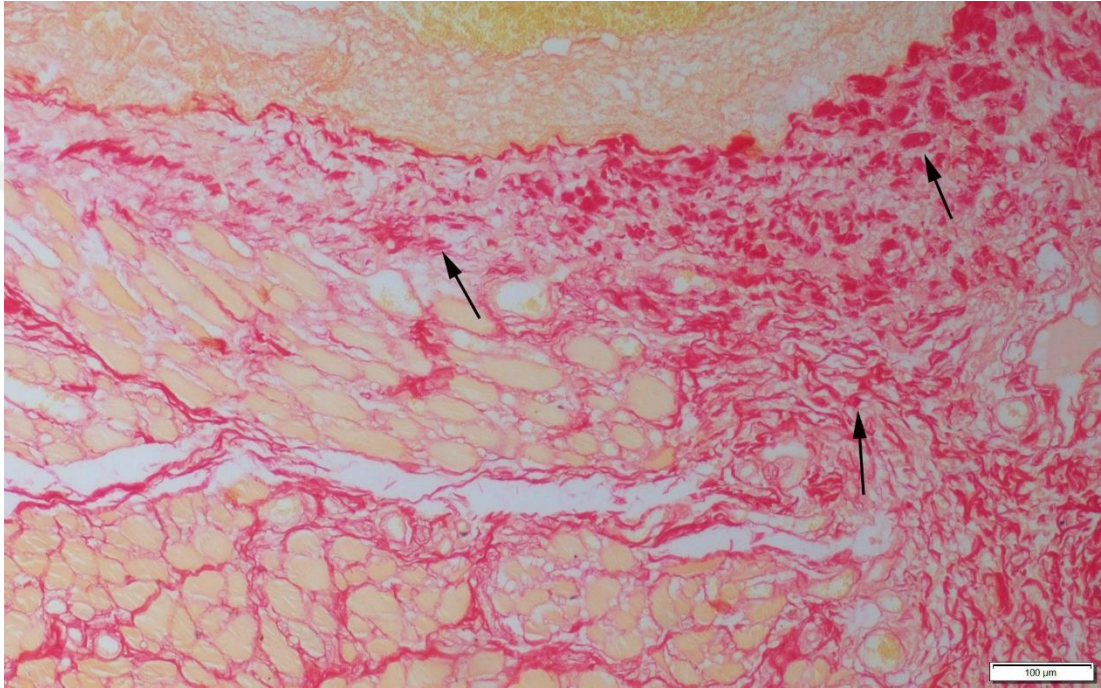
Şekil 4.20. Grup 2'deki bir ratın tamamen epitelizasyonu (kalın ok) ve bağ doku oluşumu şekillenmiş defekt bölgesinin (ince oklar) mikroskopik görünümü, HE, Bar=200 µm.



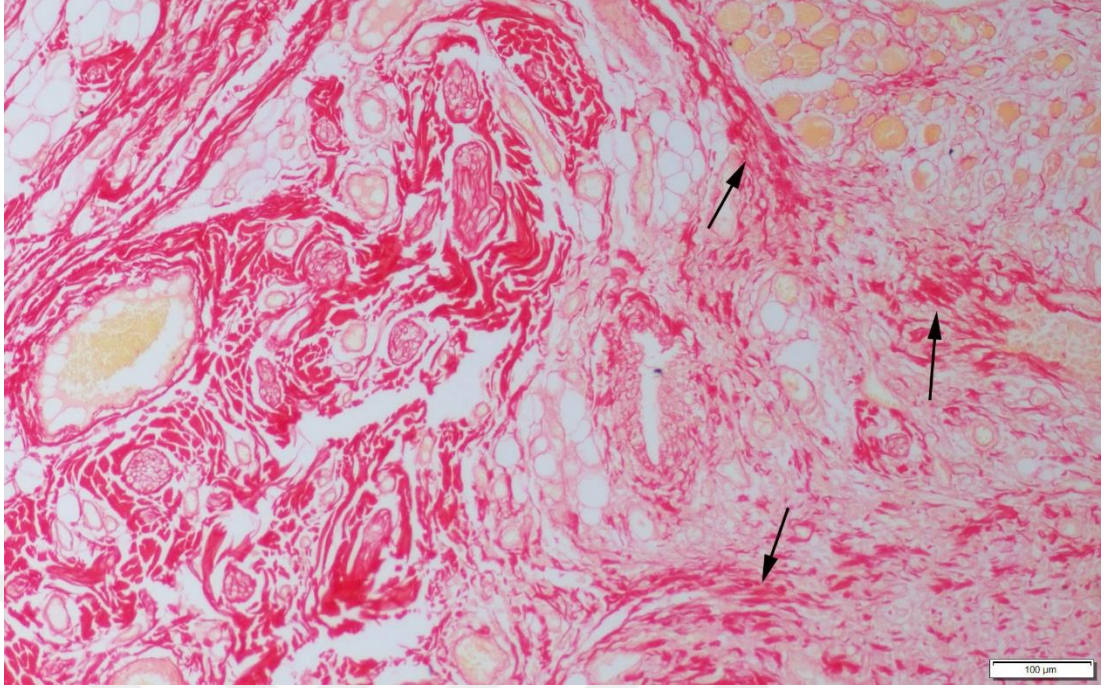
Şekil 4.21. Şekil 4.20'nin oldukça küçülen ve yangısal reaksiyonun bulunmadığı defekt alanının büyütülmüş görünümü (oklar), HE, Bar=20 µm.

4.4. Picro-Sirius Red Bulguları

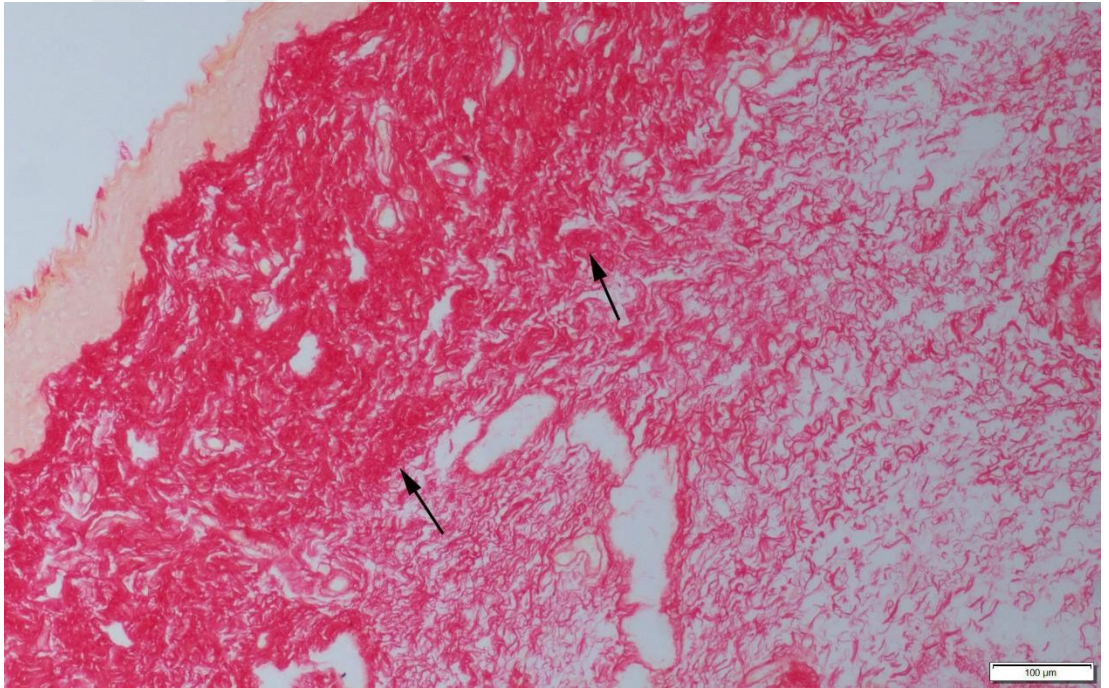
Defekt bölgesinin bağ doku gelişimi açısından Picro Sirius Red boyamasında 3 günlük periyottan itibaren kollagen oluşumları saptandı. En az kollagen reaksiyonu 3 günlük kontrol grubunda saptanırken, 6 günlük threnakron grubunda olgun kollagen miktarının en yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.22 - 4.25).



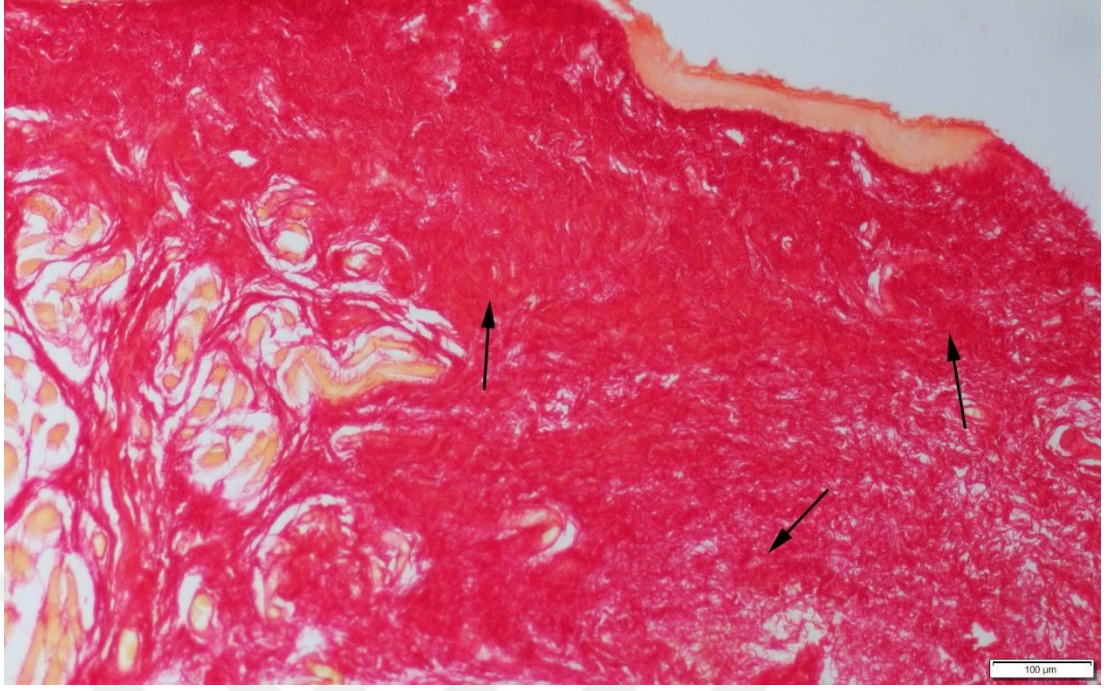
Şekil 4.22. Grup 1'deki bir ratın defekt bölgesinde bağ doku gelişimi (oklar), Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.



Şekil 4.23. Grup 3'deki bir ratın defekt bölgesinde bağ doku artışı (oklar), Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.



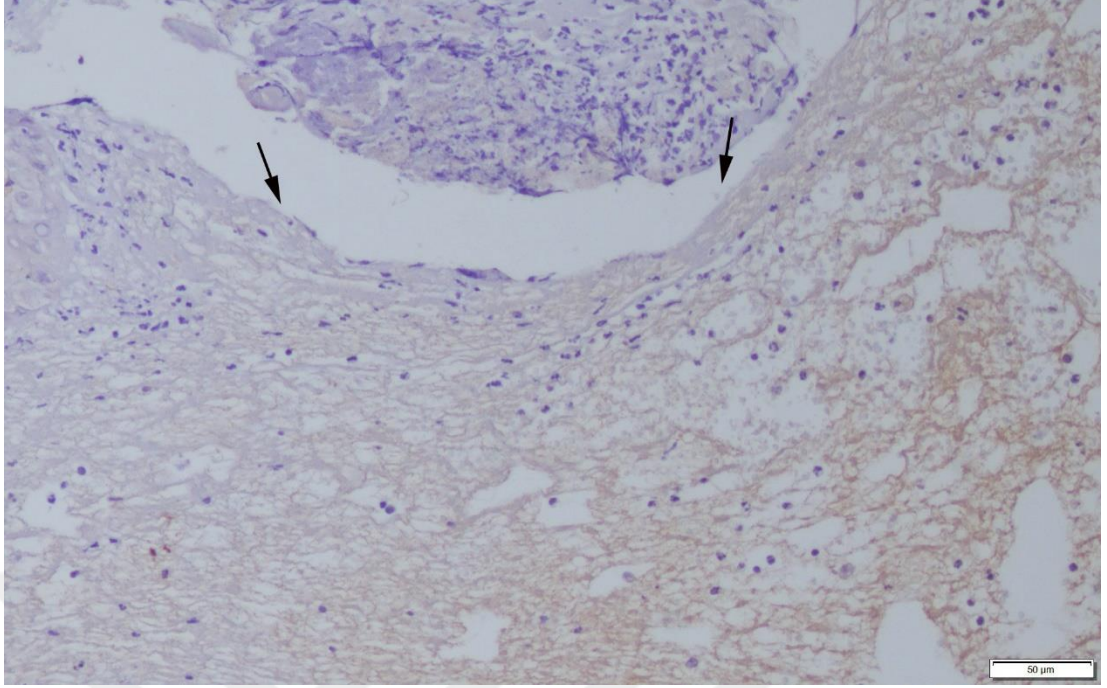
Şekil 4.24. Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinde bağ doku artışı (oklar), Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.



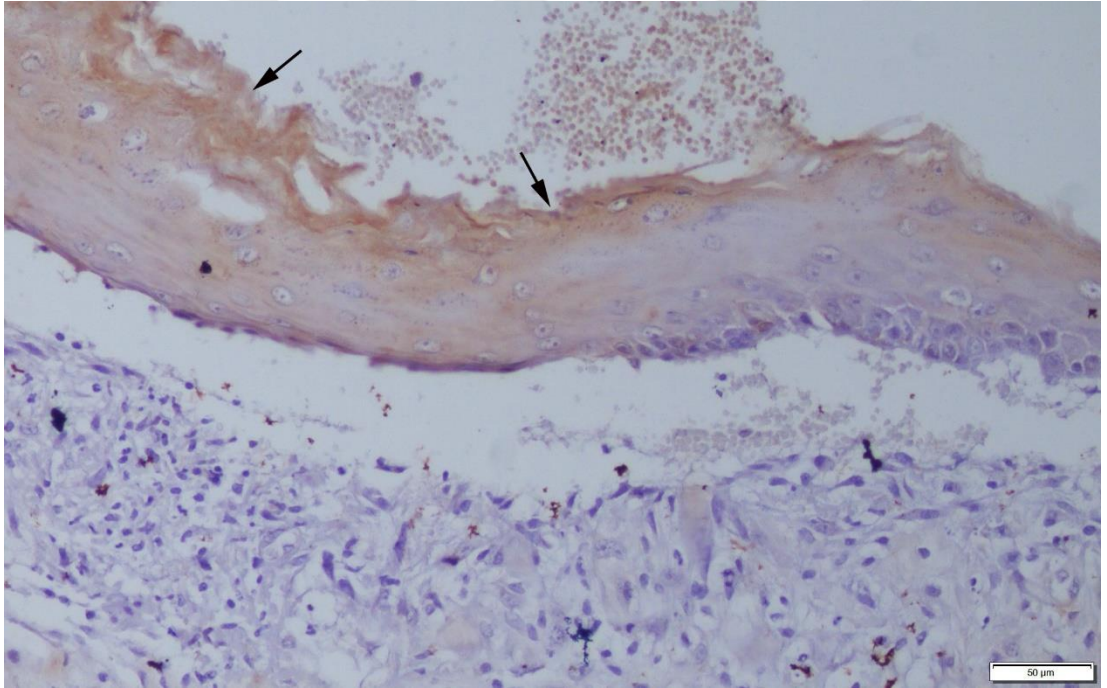
Şekil 4.25. Grup 4'deki bir ratin defekt bölgesinde olgunlaşmış bağ dokunun (oklar) görünümü, Picro sirius red metodu, Bar=100 µm.

4.5. Sitokeratin İmmunohistokimyasal Bulguları

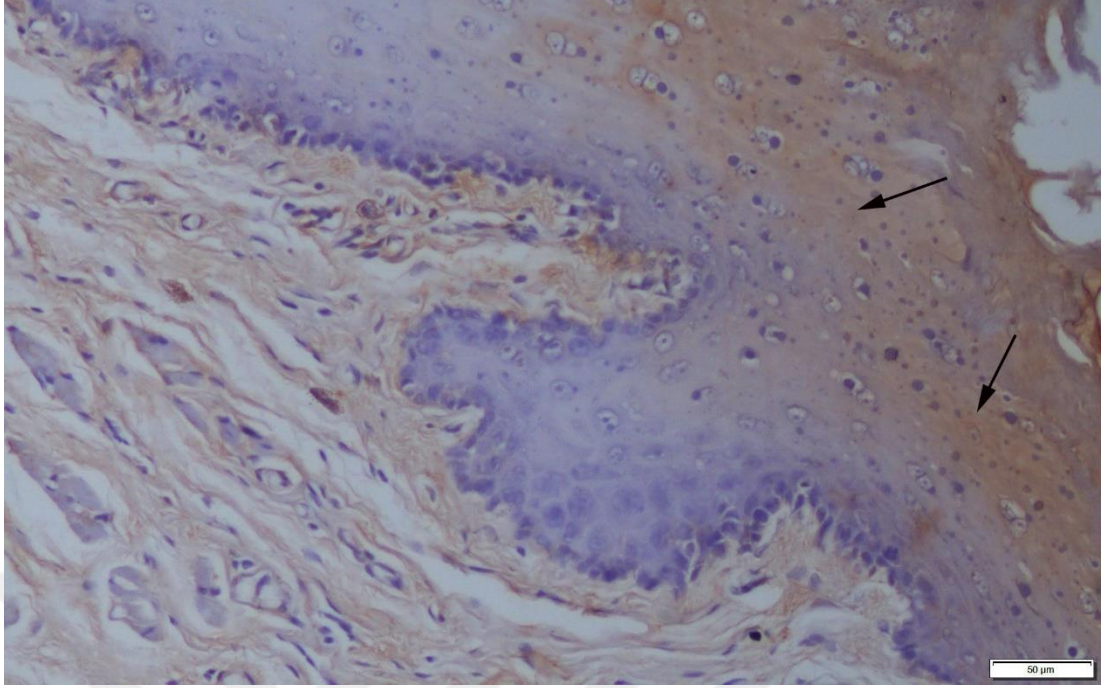
Defekt bölgelerinin sitokeratin immuno reaksiyonlarının incelenmesinde 3 günlük kontrol grubunda epitelizasyon şekillenmediği için ekspresyon gözlenmedi. Çalışmanın 3 günlük Theranekron grubunda hafif, 6 günlük kontrol ve Theranekron grubunda ise belirgin ekspresyonlar dikkati çekti (Şekil 4.26 – 4.29). Sitokeratin immunohistokimyasal skorlarının istatistik analiz sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir.



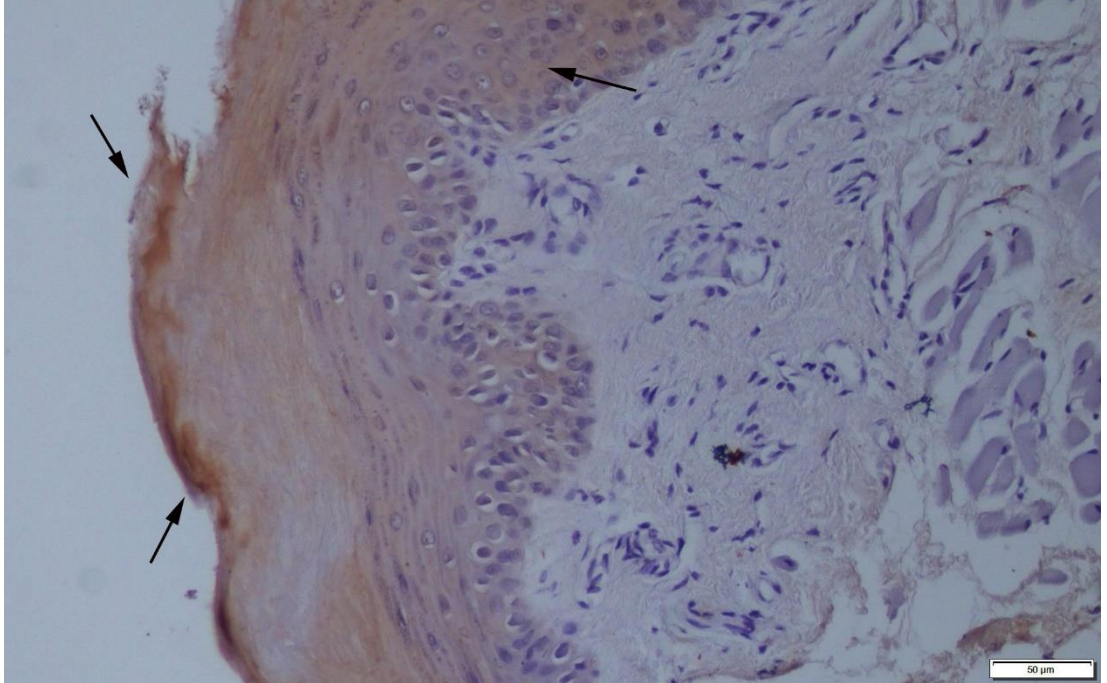
Şekil 4.26. Grup 1'deki bir ratın defekt bölgesinde (oklar) sitokeratin için negatif alanlar, streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



Şekil 4.27. Grup 3'deki bir ratın defekt bölgesinde epitel hücrelerinde pozitif sitokeratin ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



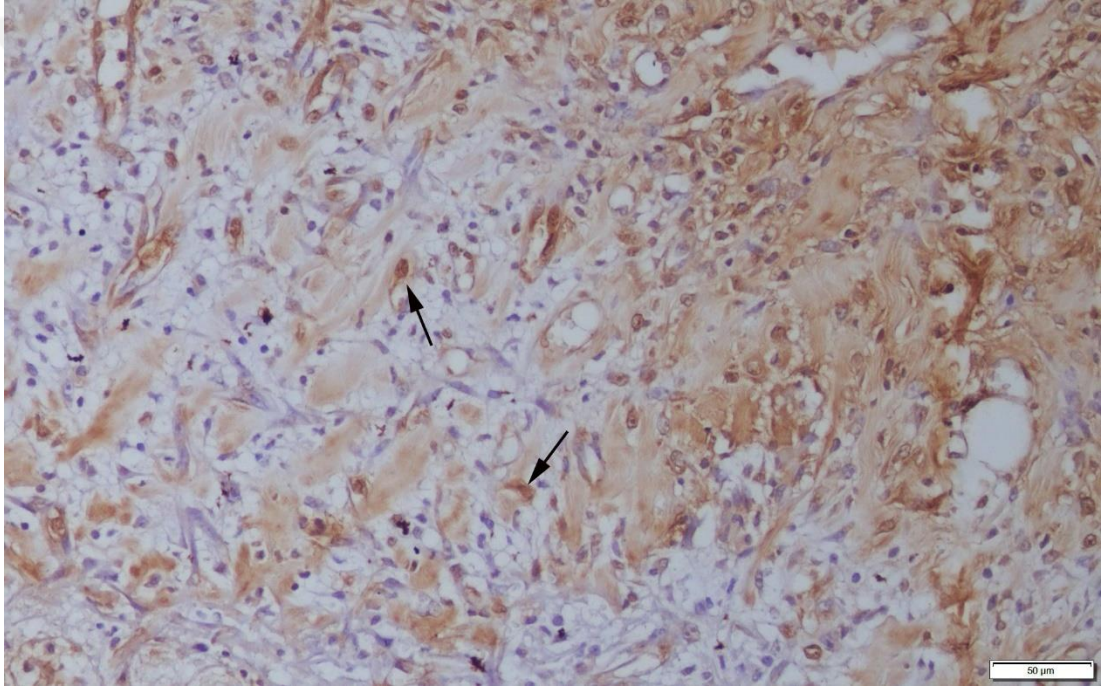
Şekil 4.28. Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinde epitel hücrelerinde pozitif sitokeratin ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



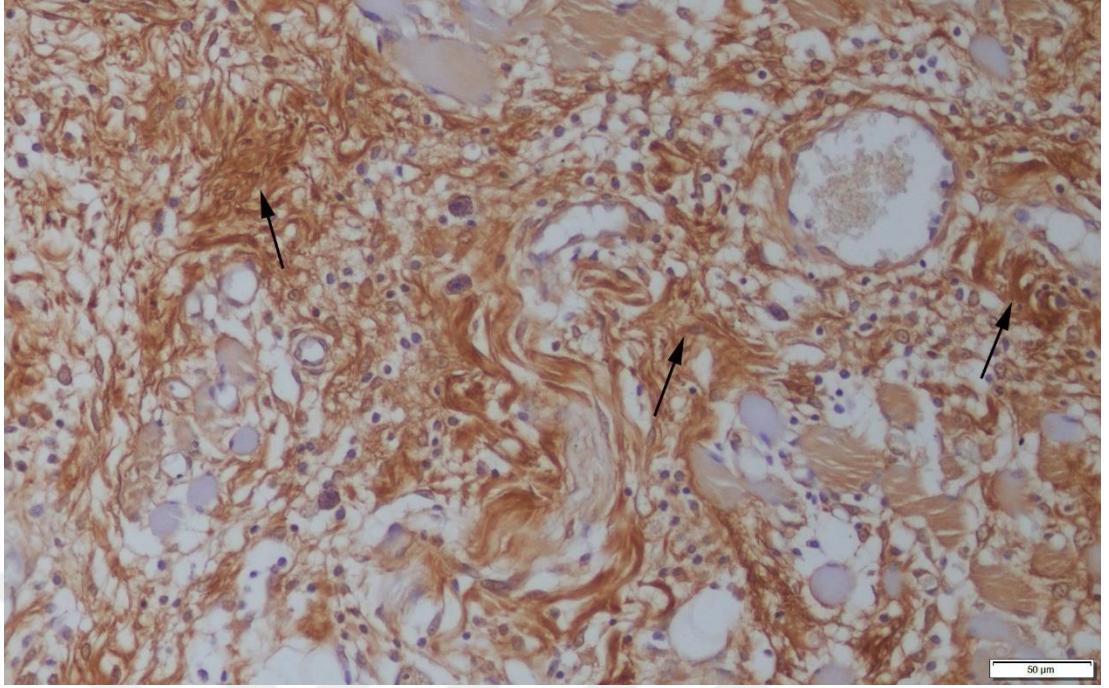
Şekil 4.29. Grup 4'deki bir ratın defekt bölgesinde epitel hücrelerinde pozitif sitokeratin ekspresyonları (oklar), streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.

4.6. Kollagen İmmunohistokimyasal Bulguları

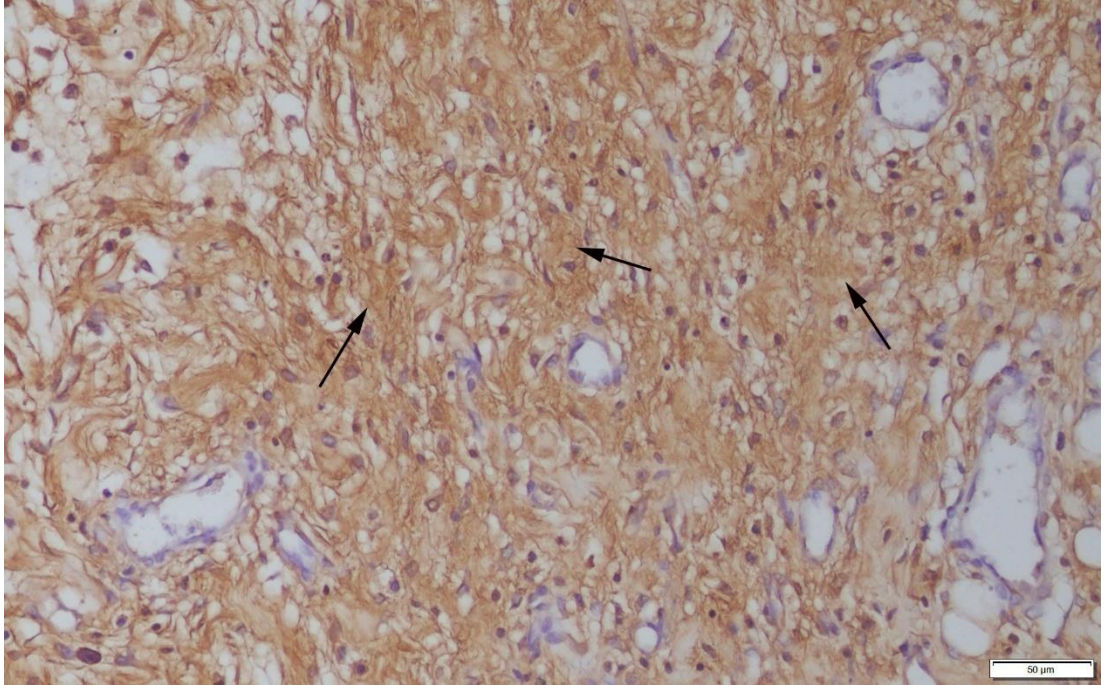
Defekt bölgelerinin kollagen immuno reaksiyonlarının incelenmesinde 3 günlük kontrol grubunda hafif kollagen ekspresyonu gözlenirken Theranekron grubunda daha belirgin ekspresyonlar dikkati çekti. Çalışmanın 6 günlük periyodunda kontrol ve theranekron grubunda ise belirgin ekspresyonlar görüldü (Şekil 4.30 – 4.33). Kollagen immunohistokimyasal skorlarının istatistik analiz sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.



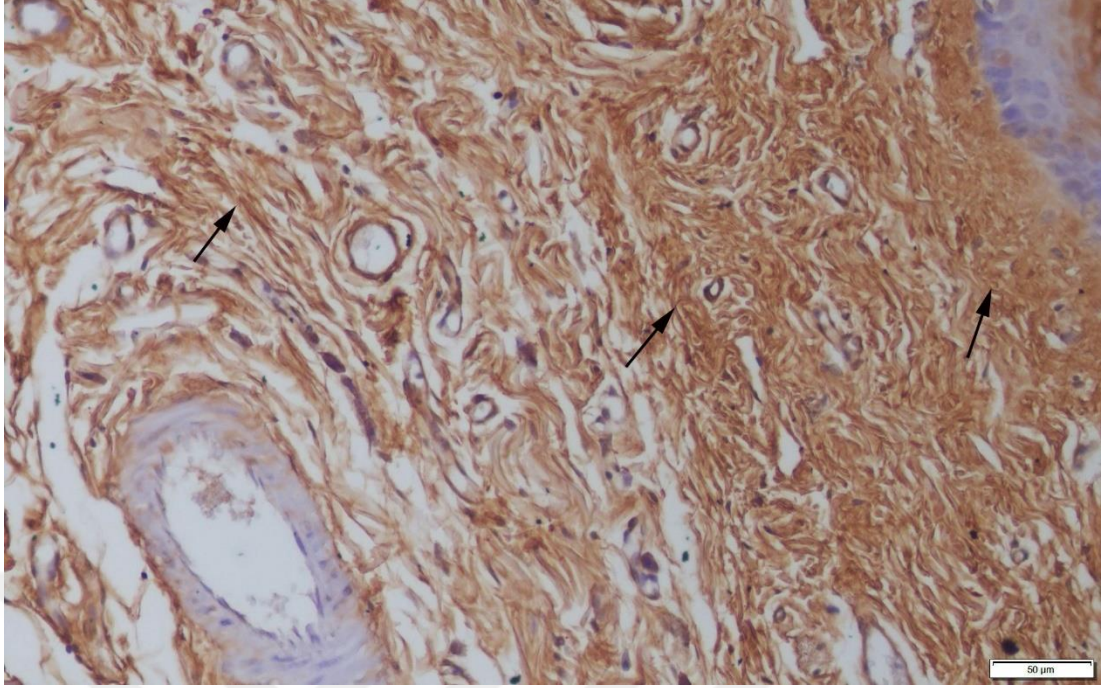
Şekil 4.30. Grup 1’deki bir ratın defekt bölgesinde hafif kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



Şekil 4.31. Grup 3'deki bir ratın defekt bölgesinde belirgin kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



Şekil 4.32. Grup 2'deki bir ratın defekt bölgesinde belirgin kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.



Şekil 4.33. Grup 4'deki bir ratın defekt bölgesinde belirgin kollagen ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=200 µm.

Tablo 4.2: Immunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları

Gruplar	Grup 1	Grup 3	Grup 2	Grup 4	P
Sitokeratin	0.00±0.00 ^a	1.40±0.51 ^b	1.80±0.63 ^b	2.55±0.52 ^c	<0.001
Kollagen	1.70±0.48 ^a	2.60±0.51 ^b	2.40±0.51 ^b	2.88±0.33 ^c	<0.001

*: Veriler mean ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

** : Aynı satırda üst simgeleri aynı olan gruplar istatistik olarak benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistik olarak önemlidir.

Bu çalışmanın sonuçları Theranekronun ağız lezyonlarının iyileştirilmesinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Ağız mukozasında sindirim sisteminin başlangıcı olması ve sürekli zedeleyici etkilere maruz kalması sebebiyle lezyonlar sıklıkla şekillenmektedir. Stomatitiser hem insan hem de hayvanlarda çeşitli sebeplerle şekillenen ve genellikle ağrılı lezyonlardır. Ağız lezyonlarının en sık gözlenen sebepleri arasında travmalar, diğer fiziksel sebepler, gıdalar, mikroorganizmalar ve kimyasal maddeler sayılabilir. Gerek insanlarda ve gerekse hayvanlarda ağız boşluğuna yerleşerek özel lezyonlar oluşturan ve yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren çok sayıda hastalık da bulunmaktadır (Milli ve Hazıroğlu, 2000; Akintoye ve Greenberg, 2005; Chavan ve ark., 2012). Bu lezyonların kısa sürede iyileştirilmesi hayvanlarda ekonomik kayıpları önlemekle kalmayıp, insanlarda ve hayvanlarda hayat kalitesini artırabilecektir. Özellikle insanlarda diş ve diş eti problemlerinin kısa sürede iyileşmesi uzun ve genellikle ağrılı tedavi sürecinin daha kısa zamanda tamamlanmasına sebep olacaktır. Hayvanlarda ise ağız lezyonlarına bağlı olarak şekillenen gıda alımının engellenmesi sonucu gelişen immun supresyon nedeniyle hastalıkların sürü içinde hızla yayılmasını da önlemek mümkün olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları da Theranekronun bu amaçla kullanılacak bir ilaç olduğunu göstermiş, hem epitel hem de submukozada birlikte iyileşme belirtileri saptanmıştır.

Theranekron ticari ismi ile hayvanlarda homeopatik bir ilaç olarak ruhsatlandırılarak sahaya sürülmüş olan *Tarantula cubensis*'in alkolik ekstratının tüm evcil memeli hayvanlarda son yıllarda kullanımı hızla artmaktadır. Bu ilacın birçok enfeksiyöz, toksik ve neoplastik hastalıkta iyileştirici etkisi bulunduğu bildirilmekte ve bu etkisi ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Kaçar ve ark, 2007; Coşkun, 2017; Gul Satar ve ark., 2017; Gultekin ve ark., 2015; Cam ve ark., 2007; Oryan ve ark., 2012). Theranekron'un hayvanlardaki başarılı sonuçları bu ilacın insanlarda da kullanılabilirliğini düşündürmeye başlamıştır. Bu amaçla deney hayvanlarında bu ilaç ile deneysel çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada Theranekronun ratlarda oluşturulan mukozal defektlerde etkisi incelenmiş ve kısa sürede defektin kapanmasını sağladığı saptanmıştır.

Theranechron ile birçok hastalık başarılı olarak iyileştirilmesine rağmen etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. İlacın iyileştirici etkilerinin rejeneratif, rezorptif, antifilojistik, anti enflamatuar, demarkasyonu arttırıcı ve katabolik etkileri inhibe edici özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gultiken ve Vural, 2007; Coşkun, 2017). Theranechronun iyileştirici etkilerinin patolojik yönden incelendiği ve patogenetik mekanizmalarının açıklandığı herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada Theranechronun epitelizasyonu ve bağ doku artışını sağlayarak yaralarda iyileştirici etkisi bulunduğu saptanmıştır.

Birçok hastalık ve lezyonu iyileştirici etkisi olan Theranechron'un stomatitis ve ağız lezyonlarındaki etkileri hakkındaki bilgiler kısıtlıdır. Bir çalışmada üst dudakta ülser ve dilde erozyon bulunan kedide normal tedavi protokolüne ek olarak kullanıldığında 14 gün sonunda dilde erozyonun tamamen geçtiği, dudak ülserinde de reepitelizasyon gözlemlendiği bildirilmiştir (Coşkun, 2017). Bir başka çalışmada ise sıgırlarda mavi dil hastalığında kullanıldığında daha hızlı bir iyileşme sağladığı rapor edilmiştir (Albay ve ark., 2010). Bu ilacın Şap hastalığında iyileştirici etkisi olduğu da bildirilmiştir (Lotfollahzadeh ve ark., 2012; Düz ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda gerek lokal ve gerekse sistemik hastalıklarda hem insan hem de hayvanlarda sıklıkla şekillenen oral mukoza lezyonlarında Theranechron'un etkisi deneysel stomatitis modelinde araştırılmış ve iyileşmeyi hızlandırdığı saptanmıştır. Theranechron'un stomatitislerde hem epitel tabakasının hem de bağ dokunun iyileşmesini önemli derecede hızlandırdığı gözlenmiştir. Bu özelliği ile özellikle gıda alımını zorlaştıran ve kilo kaybından hastalıkların vücuda yayılmasına kadar birçok probleme yol açan ağız lezyonlarının kısa sürede iyileşmesini sağlayarak ekonomik kayıpları önemli ölçüde azaltabileceği düşünülmektedir. Ayrıca hayvanlarda özellikle neonatal dönemde yavrularda ya da çeşitli sebeplerle erişkin hayvanlarda şekillenen ve yüksek oranda ölüme yol açan stomatitislerde veya insanlarda stomatitis tedavisinde kullanılabileceği fikrini destekleyici sonuçlar alınmıştır.

Yaralanmalar tüm canlıların hayatları boyunca sıklıkla karşılaştıkları problemlerdir. Bu sebeple kısa sürede iyileştirilmeleri önem arz etmektedir. Yara iyileşmesi oldukça kompleks bir süreçtir. Genel olarak tüm yaralanmalar ve tamir

aşamaları eksudatif faz, proliferatif faz ve rejeneratif faz olmak üzere temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Tüm bu basamaklarda hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal bir seri olay gerçekleşmekte ve bunların birbirleriyle uyumu ile iyileşme meydana gelmektedir. İyileşme olayı birçok endojen ve eksojen faktör tarafından kontrol edilmektedir. Günümüzde hala ciddi sorunların yaşandığı yara tedavisinde, etkin ve başarılı yaklaşımların yapılabilmesi için yara iyileşmesi patogenezinin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir (Ekmekçi ve Bostancı, 2002). Bu çalışmanın sonuçları Theranekron'un yara iyileşmesinin tüm fazlarında düzenleyici ve hızlandırıcı etkileri olduğunu göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları ayrıca tedavi sürecinde kilo kaybının şekillenmediğini göstermiştir ki bu gerek insan ve gerekse hayvanlarda tedavi sürecinde önemli bir katkı olarak değerlendirilmiştir.

Theranekron ile insan çalışmaları henüz doku kültürü hücreleri üzerinde yapılmaktadır. Tümör hücrelerinde bu ilacın apoptozisi arttırarak tümör hücrelerini yıkımladığı bildirilmiştir (Ghasemi-Dizgah ve ark., 2017). Ayrıca deneysel çalışmalarda da tümör tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Er ve ar., 2019). Buna ilaveten yapılan bir çalışmada Theranekronun atlarda yan etkileri olmadığı da rapor edilmiştir (Sardari ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda da ratlarda herhangi bir toksik etki ile karşılaşılmamış ve hiçbir grupta ölüm şekillenmemiştir.

Bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan stomatitiste *Tarantula cubensis* ekstresinin sağıltımda etkili olduğu görülmüştür. Bunun *Tarantula cubensis* ekstresinin dokularda demarkasyon ve rejenerasyon yeteneğine sahip olması sebebiyle olduğu düşünülmüştür. Bu bağlamda, tedavide oldukça etkili olduğu kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada deneysel stomatitis modelinde *Tarantula cubensis* ekstratının iyileşme üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler, *Tarantula cubensis* ekstratının stomatitislerde tedavi edici olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Stomatitis canlılarda önemli sağlık problemlerinden biridir. Stomatitislerin oluşmasındaki etkenlerin fazlalığı sebebiyle görülme olasılığı yüksektir. Hem insan hem hayvanlarda hayatın her döneminde yaygın olarak rastlanmakta ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir.

Stomatitislerin görülme sıklığı hem insan hem hayvanlarda tedavi edici madde arayışını sıklaştırmıştır. Bu çalışmanın sonuçları *Tarantula cubensis* ekstratının ağız lezyonlarının iyileştirilmesinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermiştir. Sunulan çalışma bu konuda yapılacak diğer çalışmalara öncülük edecektir. Özellikle klinik hekimlerinin stomatitislerde *Tarantula cubensis* ekstratını reçetelerine eklemelerinin yararlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akintoye SO, Greenberg MS, (2005).** Recurrent aphthous stomatitis. *Dent Clin North Am.*, **49**, 31-47.
- Albay MK, Şahinduran Ş, Kale M, Karakurum MÇ, Sezer K, (2010).** Influence of *Tarantula cubensis* extract on the treatment of the oral lesions in cattle with Bluetongue Disease, *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.*, **16**, 593-596
- Berman B, Maderal A, Raphael B, (2017).** Keloids and hypertrophic scars: pathophysiology, classification, and treatment. *Dermatol Surg*; **43**, S3e18.
- Cam Y, Kibar M, Atasever A, Atalay O, Beyaz L, (2007).** Efficacy of levamisole and tarantula cubensis venom for the treatment of bovine cutaneous papillomatosis. *Vet Rec.*, **160**, 486-488.
- Chavan M, Jain H, Diwan N, Khedkar S, Shete A, Durkaret S, (2012).** Recurrent aphthous stomatitis: a review. *J Oral Pathol Med.*, **41**, 577-583.
- Coşkun D, (2017).** Veteriner Destek Tedavi: *Tarantula cubensis* alkolik ekstraktı, inaktif parapoxvirüs ovis ve corynebacterium cutis lizati. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, **10**, 30 – 37.
- Cruchley AT, Bergmeier LA, (2018).** Structure and Functions of the Oral Mucosa. In: Bergmeier L. (eds) Oral Mucosa in Health and Disease. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56065-6_1
- Düz E, İcen H, Arserim NB, Çakmak F, Bakır B, Uysal E, (2012).** Comparison of classic, Theranekron and classic-plus Theranekron Treatment on the Foot and Mouth Disease lesions in cattle in Van, Diyarbakır and Ankara Regions in Turkey. *J Anim Vet Adv.*, **11**, 3258-3261.
- Eisen D, (2000).** Disorders of pigmentation in the oral cavity. *Clin Dermatol.*, **18**, 579-587.
- Ekmekçi P, Bostancı S, (2002).** Yara İyileşmesi, *Türkiye Klinikleri J Dermatol.*, **12**, 114-120.
- Er A, Ozdemir O, Coskun D, Dik B, Bahcivan E, Eser Faki H, Yazar E, (2019).** Effects of *Tarantula cubensis* alcoholic extract and *Nerium oleander* distillate on experimentally induced colon cancer. *Revue Méd. Vét.*, **170**, 15-21.
- Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG, (2011).** Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med.* **17**, 113e25.

Ghasemi-Dizgah A, Nami B, Amirmozafari N (2017). Tarantula cubensis venom (theranekron®) selectively destroys human cancer cells via activating caspase-3-mediated apoptosis. *Acta Med Int.*, **4**,74-80.

Gul Satar NY, Cangul IT, Topal A, Kurt H, Ipek V, Onel GI, (2017). The effects of tarantulacubensis venom on open wound healing in rats. *J Wound Care.*, **26**, 66-71.

Gultekin N, Guvenc T, Kaya D, Agaoglu AR, Ay SS, Kucukaslan I, Emre B, Findik M, Somi-Schafer S, Aslan S, (2015). Tarantula cubensis extract alters the degree of apoptosis and mitosis in canine mammary adenocarcinomas. *J Vet Sci.*, **16**, 213- 219.

Gultiken N, Vural MR, (2007). The effect of tarantula cubensis extract applied in pre and postoperative period of canine mammary tumours. *JIVS.*, **2**, 13-23.

Kacar C, Zonturlu AK, Oral H, Yıldız S, Ari UC, (2007). The effects of Therneron® application on uterus involution and vaginal efluence in cows early puerperal period. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **13**,11-15.

Lotfollahzadeh S, Alizadeh M.R, Mohri M, Mokhber Dezfouli MR, (2012). The therapeutic Effect of Tarentula Cubensis Extract (Theranekron(R)) in footand-mouth disease in cattle: A randomised trial in an endemic setting. *Homeopathy.*, **101**, 159-164.

Milli ÜH, Hazıroğlu R. (2000). *Veteriner Patoloji I. Cilt. 2.*Baskı, Ankara, Medipres, s:1-26.

Oryan A, Moshiri A, Raayat AR, (2012). Novel application of theranekron enhanced the structural and functional performance of the tenotomized tendon in rabbits. *Cells Tissues Organs.*, **196**, 442-455.

Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, Li YR, Dedhia PH, Zheng Y, et al. (2017). Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science.*, **355**, 748e52.

Sardari K, Kakhhi EG, Mohri M, (2007). Evaluation of wound contraction and epithelialization after subcutaneous administration of theranekron in cows. *Comp Clin Pathol.*, **16**, 197-200.

Sardari K, Mohri M, Sabzevari S, Fathi B, (2011). Effects of the Theranekron®”an alcoholic extract of the *Tarantula cubensis*” on hematology and serum biochemical properties in horses. *Iranian J Vet Sci Technol.*, **3**,9-16.

Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F, (2003). The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: a consensus approach. *J Am Dent Assoc.*, **134**, 200-207.

Ship JA, Chavez EM, Doerr PA, Henson BS, Sarmadi M, (2000) Recurrent aphthous stomatitis. *Quintessence Int.*, **3**, 95-112.

Squier C, Brogden K, (2011). *Human oral mucosa: developement, structure and function*. Hoboken: WileyBlackwell.

Su WH, Cheng MH, Lee WL, Tsou TS, Chang WH, Chen CS, Wang PH, (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? *Mediat Inflamm.*, **2010**, 413238.

Tsai HW, Wang PH, Tsui KH, (2017). Mesenchymal stem cell in wound healing and regeneration. *J Chin Med Assoc*, **17**, S1726-4901.

Wang P, Huang B, Horng H, Yeh C, Chen Y, (2018). Wound healing. *J Chin Med Assoc.*, **81**, 94-101.

Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E, (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing ‘stemness. *Nature.*, **452**, 225–229.

