

# Oral Mukozanın İnsizyonel Yara İyileşmesinde Hyaluronik Asit Jel Uygulamasının Etkileri: Deneysel Çalışma

## Effects of Hyaluronic Acid Gel Application on Incisional Oral Mucosal Wound Healing: An Experimental Study

Yener OĞUZ<sup>a</sup>, Nurettin DİKER<sup>b</sup>, Serap GÜLSEVER<sup>c</sup>, Eda YILMAZ AKÇAY<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Serbest Dış Hekimi, Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri

<sup>b</sup>Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi ve Hastanesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD, İstanbul, Türkiye

<sup>c</sup>İstanbul Medipol Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi ve Hastanesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD, İstanbul, Türkiye

<sup>d</sup>Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi, Tıbbi Patoloji ABD, Ankara, Türkiye

**ÖZET Amaç:** Hyaluronik asit (HA), ekstraselüler matrisin biyolojik olarak parçalanabilen, doğal elemanı olan bir polimerdir. Bu çalışmanın amacı, HA jel uygulamasının oral mukozanın insizyonel yara iyileşmesi üzerindeki rejeneratif etkilerinin değerlendirilmesidir. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada 40 adet dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanların sağ ve sol bukkal mukozalarına 10 mm uzunluğunda tam kalınlıkta mukozal kesiler yapılmıştır. Sol mukozal yaralara HA jel uygulanırken, sağ mukozal yaralar kontrol grubu olarak boş bırakılmıştır. Mukozal yaralar rezorbe olabilen suturelerle dikilmiştir. Sıçanlar takip sürelerine göre randomize olarak 4 gruba ayrılmıştır. Operasyonu takip eden 3. gün, 7. gün, 14. gün ve 21. günlerde sıçanlar sakrifiye edilip; reepitelizasyon, inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve anjiyogenez histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Histopatolojik değerlendirme sonucunda, tüm iyileşme periyotlarında kontrol örneklerine kıyasla HA uygulanan örneklerinde daha yüksek fibroblast proliferasyonu ve anjiyogenez olduğu tespit edildi. Öte yandan, HA ile kontrol grubu arasında reepitelizasyon açısından istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilememiştir. **Sonuç:** Histopatolojik incelemeler sonucunda elde edilen verilere göre ticari olarak temin edilebilen HA jelin, iyileşen oral mukoza yarasının bağ dokusu kalitesi ve anjiyogenezi üzerinde olumlu etkileri olduğunu ve farklı mukozal iyileşme senaryolarında faydalı olabileceğini göstermiştir. HA'nın çok sayıda potansiyel uygulama endikasyonu ve çeşitli rejeneratif özellikleri olmasına rağmen amaçlanan klinik kullanım için optimum moleküler ağırlığını, uygulama yolunu ve tedavi zamanlamasını belirlemek için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

**ABSTRACT Objective:** Hyaluronic acid (HA) is a naturally occurring biodegradable polymer of the extracellular matrix. The aim of the present study was to investigate the regenerative effects of HA gel on incisional oral mucosal wound healing. **Material and Methods:** Forty female Sprague-Dawley rats were used in the present study. Ten mm length, full-thickness mucosal incisions were made on the left and right buccal mucosa of the rats. Left mucosal wounds were filled with HA gel and right mucosal wounds were left empty as the control group samples. The mucosal wound was sutured with absorbable sutures. Rats were randomly divided into 4 groups according to healing time. At the end of 3. day, 7. day, 14. day and 21. days healing periods rats were euthanized. Re-epithelialization, inflammation, fibroblast proliferation, collagen deposition, and angiogenesis were investigated based on histopathological findings. **Results:** Histopathological analysis revealed higher fibroblast proliferation and angiogenesis in the HA samples compared with the control samples at all investigated healing periods. On the other hand, differences between re-epithelialization scores of HA samples and control samples did not reach statistical significance. **Conclusion:** The data and the histopathological investigations suggest that commercially available HA gel has beneficial effects of oral mucosa wound healing regarding connective tissue quality, and angiogenesis of the wound. Although HA displays a great number of potential applications and regenerative properties, further studies should be carried out to define the optimum molecular weight, application route, and timing for treatment for intended clinical use.

**Anahtar Kelimeler:** Anjiyogenez; hyaluronik asit; mukoz membran; yara iyileşmesi

**Keywords:** Angiogenesis; hyaluronic acid; mucous membrane; wound healing

Oral mukozal insizyonlar; biyopsiler, yumuşak doku eksizyon veya repozisyonu ve osseöz cerrahiler için maksilla ve mandibulanın ekspoza gibi çeşitli

müdahaleler için kullanılır. Bu nedenle her cerrahi müdahalede kontrollü bir oral mukozal yara oluşturulmaktadır. Yara iyileşmesi, konumsal olarak biribi-

**Correspondence:** Yener OĞUZ

Serbest Dış Hekimi, Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri

E-mail: yeneroguz@gmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences.

Received: 08 Oct 2022

Accepted: 01 Mar 2023

Available online: 07 Mar 2023

2146-8966 / Copyright © 2023 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

rine yakın olsa da farklı fizyolojik süreçlere ihtiyaç duyan yapıların senkronizasyonunu ve rejenerasyonunu gerektirdiğinden bu sürecin koordinasyonu zordur.<sup>1</sup> Ayrıca çığneme kaynaklı travmalar, ağız florasındaki bakteri çeşitliliği ve kötü ağız hijyenine bağlı dental plak birikimi nedeniyle ağız boşluğu, yaraların iyileşmesi için zorlu bir ortam hâline gelir.<sup>2</sup>

Hyaluronik asit (HA); bağ, epitel ve nöral dokuların hücre dışı matrisinde yaygın olarak bulunan ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimeridir. Tekrarlayan glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamininden oluşan sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır ve negatif yükü ve yüksek hidrasyon oranı ile doku hidrasyonunun kontrolünde önemli rol oynar.<sup>3</sup> HA polimer zincir dallanmaları sayesinde hem elastik hem visköz özelliklere sahiptir.<sup>4</sup> Elastik özellikleri şok emici özellik sağlarken, visköz özellikleri lubrikasyon sağlar.<sup>5</sup> HA, yara iyileşmesinin doku olgunlaşması aşamasında önemli bir rol oynar ve bu süreçte yara kenarında ve bağ dokusu matrisinde üretilir.<sup>6</sup> HA ile hidrate ve nonadeziv bir ortamın yaratılması, yara iyileşmesi sırasında hücre göçünü artırır.<sup>7</sup> HA, fizyolojik fonksiyonları ve özellikleri sayesinde, kozmetikte olduğu kadar biyomedikal uygulamalarda da çeşitli kullanım alanları bulmuştur.<sup>8</sup>

Son zamanlarda yara iyileşmesi sürecini hızlandırmak için hücre programlama, doku mühendisliği, büyüme faktörleri ve amniyotik membran gibi farklı rejeneratif tedaviler geliştirilmiştir.<sup>9-12</sup> Ancak bu müdahaleler ilaç dozunun ayarlanmasındaki zorluklar, uygun ilaç uygulama sisteminin olmaması ve hastaya özgü özellikler ve protokol standardizasyonunun olmaması nedeniyle klinik uygulamada geniş kabul görmemiştir.<sup>13</sup>

Bu nedenle uygulanabilir ve verimli alternatiflere hâlâ ihtiyaç duyulmaktadır. HA uygulamalarının bahsedilen rejeneratif özellikleri ile yumuşak doku iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olabilir. Bu çalışmada, HA jelin epitelizasyon, inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, kollajen sentezi ve anjiyogenez üzerindeki histopatolojik etkileri, sıçanlarda oluşturulan oral mukozal yara modeli ile değerlendirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### HAYVANLAR VE CERRAHİ PROSEDÜR

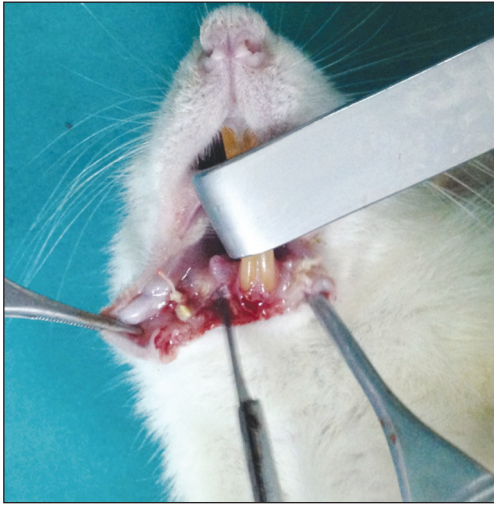
Çalışma, Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (proje no: D-DA 13/08), Başkent Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir. Deneysel hayvanlar, bilimsel amaçlarla kullanılan hayvanların korunmasına ilişkin Avrupa Birliği Yönergesi 2010/63/EU'nun yönergelerine uygun olarak gerçekleştirilmiş ve Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uyularak, hayvanlarda strese ve beslenmeye bağlı olarak oluşabilecek değişiklikler düzenli olarak kontrol edilmiştir. Çalışma, Başkent Üniversitesi deneysel hayvanları laboratuvarından alınan 40 adet, 12 haftalık, dişi, Sprague-Dawley cinsi hayvan üzerinde yapılmıştır. Deneysel hayvanları, 22±1°C sıcaklıkta, bağıl nem oranı %40-60 olan ortamda, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamı sağlayacak şekilde saklanmıştır. Araştırma süresince hayvanların su ve standart laboratuvar yemine sınırsız ulaşımı sağlanmıştır.

Sıçanların anestezisi intramusküler ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (6 mg/kg) kombinasyonları ile sağlanmıştır. Preoperatif enrofloksasin (10 mg/kg, intramusküler) ve fentanil (0,02 mg/kg, subkütan) uygulaması da yapılmıştır. Operasyon bölgesinin hemostazı için lokal anestezi (Articaine, Maxicaine, VEM, İstanbul, Türkiye) uygulaması yapıp, her sıçanın sağ ve sol yanak mukozasına, yaklaşık 10 mm uzunluğunda, tam kalınlıklı vertikal kesiler yapılmıştır (Resim 1). Hayvanlar arası biyolojik farklılıkların çalışma üzerine etkisi split-mouth çalışma dizaynı kullanılarak mümkün olduğunca azaltılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla sol mukozal yaralara yaklaşık 0,2 mL HyA jel (Tissue Support; Naturalize, Kassel, Almanya) uygulaması yapılırken, sağ mukozaya yapılan insizyonlara herhangi bir tedavi uygulaması yapılmamıştır. Oluşturulan mukozal yaralar 5,0 vikril suturlar ile dikilmiştir. Operasyonu takip eden 5 gün boyunca enfeksiyonun önlenmesi ve analjezi sağlanması amacıyla antibiyotik (enrofloksasin, 10 mg/kg, intramusküler, günde 2 kez) ve analjezik (fentanil, 0,02 mg/kg, subkütan, günde 2 kez) uygulaması yapılmıştır.

Kırk adet sıçan iyileşme sürelerine göre 4 gruba randomize olarak dağıtılmıştır. Üçüncü gün (n=10),



**RESİM 1:** Her sıçanın sağ ve sol yanak mukozasına, yaklaşık 10 mm uzunluğunda, tam kalınlıklı vertikal kesiler yapılmıştır.



**RESİM 2:** Sağ ve sol mukozal yaraların tamamını içerecek şekilde çıkartılan doku örnekleri histopatolojik değerlendirme için kullanılmıştır.

7. gün (n=10), 14. gün (n=10) ve 21. gün (n=10) iyileşme periyotlarının sonunda sıçanlar yüksek doz thiopental sodium (150 mg/kg) ile sakrifiye edilmiştir. Sonrasında sağ ve sol mukozal yaraların tamamını içerecek şekilde çıkartılan doku örnekleri histopatolojik değerlendirme için kullanılmıştır (Resim 2).

#### HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Sıçanların doku örnekleri %10'luk fosfat ile tamponlanmış formaldehitte 2 gün fikse edilip, alkol serile-

rinden ve ksilden geçirilerek dehidrate edilip, parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Doku kesitleri insizyon hattına dik olacak şekilde yaranın orta kısmından, standart bir mikrotom yardımıyla 4 µm kalınlıkta olacak şekilde alınmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalar “DAKO Omnis” ve tavşan monoklonal anti-CD34 antikoruna içeren EnVision Flex boyama kiti (CD34, clone EP373Y, Abcam, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Bütün histopatolojik analizler ışık mikroskobu (Model BX53F; Olympus Tokyo, Japonya) altında, değerlendirilen kesitlerin dâhil olduğu çalışma grubundan habersiz bir patolog tarafından, semi-kantitatif parametrelerle değerlendirilmiştir. Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitler üzerinden epitelizasyon, inflamasyon, fibroblast proliferasyonu ve kollajen üretimi parametreleri, immünohistokimyasal boyamalar üzerinden anjiyogenez parametresi değerlendirilmiştir.

Epitelizasyon düzeyi; düzey 0: Epitelizasyon yok veya yara kenarlarında başlamış epitelizasyon, düzey 1: Yaranın yarısından azını örten epitelizasyon, düzey 2: Yaranın yarısından çoğunu örten epitelizasyon şeklinde skorlanmıştır.

İnflamasyon doku kesitinin her bölgesinde 200x büyütme ile incelenmiş ve hafif: Yara yüzeyinin %25'inden azında hücre infiltrasyonu, orta: Yara yüzeyinin %25-50'sinde hücre infiltrasyonu, yoğun: Yara yüzeyinin %50'sinden fazlasında hücre infiltrasyonu şeklinde skorlanmıştır.

Fibroblast proliferasyonu doku kesitinin hücreden en yoğun bölgesi üzerinden 400x büyütmede sayılabilen fibroblast sayısı üzerinden yapılmıştır. 1: <150 fibroblast, 2: 151-300 fibroblast ve 3: >300 fibroblast şeklinde skorlanmıştır.

Kollajen yoğunluğu kesitin her bölgesinde 200x büyütmede değerlendirilmiş ve 1: Yara yüzeyinin %25'inden azında kollajen, 2: Yara yüzeyinin %25-50'sinde kollajen, 3: Yara yüzeyinin %50'sinden fazlasında kollajen şeklinde skorlanmıştır.

Anjiyogenez, CD34 ile boyanan kesitler üzerindeki 3 farklı bölge üzerinden, 400x büyütme altında, lümenli ve lümensiz damarsal yapıların sayılması ve ortalamalarının alınması ile değerlendirilmiştir. 1: <15 vasküler yapı, 2: 16-30 vasküler yapı ve 3: >30 vasküler yapı şeklinde skorlanmıştır.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Örnek sayısı istatistiksel güç analizi ile en az %90 güç ve 0,05 anlamlılık düzeyi sağlanacak şekilde hesaplanmıştır. Sonuç doğrultusunda her gruba 10 hayvan dâhil edilmiştir. İstatistiksel analiz PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası anlamlılığın tespiti için Mann-Whitney U testi kullanılıp  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen bütün sıçanlardan çalışmanın sonuna kadar ölen olmamıştır. Sıçanların hiçbirinde enfeksiyon, alerjik reaksiyon, yara açılması gibi komplikasyonlar gözlenmemiştir. Bütün parametrelerin çalışma gruplarındaki ortalama±SD değerleri ve p değerleri **Tablo 1**'de gösterilmiştir.

### EPİTELİZASYON

Üç günlük ( $p=0,057$ ) ve 7 günlük ( $p=0,146$ ) iyileşme dönemlerinin sonunda, HA grubunda bulunan örnekler kontrol grubuna göre daha yüksek epitelizasyon skorları gösterse de istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Daha geç iyileşme dönemlerinde grupların benzer epitelizasyon skorlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (**Resim 3**).

### İNFLAMASYON

Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda, 7 günlük iyileşme periodunun sonunda HA grubuna ait örneklerde inflamasyon skorları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ( $p=0,028$ ); fakat 3, 14 ve 21 günlük iyileşme dönemlerinde yapılan değerlendirmelerde 2 grup arasında istatis-

tiksel anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

### FİBROBLAST PROLİFERASYONU

HA uygulamasının fibroblast proliferasyonu üzerine pozitif etkileri bütün iyileşme dönemlerinde tespit edilmiştir. Üç günlük iyileşme döneminin sonunda fibroblast konsantrasyonunun HA uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu histopatolojik analizler sonucunda tespit edilmiştir ( $p=0,028$ ). Üç günlük iyileşme periyodunun sonuçlarına benzer olarak 7 günlük ( $p=0,021$ ), 14 günlük ( $p=0,029$ ) ve 21 günlük ( $p=0,012$ ) iyileşme dönemlerinin sonunda HA grubuna ait örneklerde kontrol grubuna ait örneklere göre birim alanda daha fazla fibroblast tespit edilmiştir (**Resim 4**).

### KOLLAJEN SENTEZİ

Histopatolojik analizler iyileşmenin 3 ( $p=0,022$ ) ve 14. ( $p=0,001$ ) günlerinde, kollajen yoğunluğunun HA grubuna ait kesitlerde kontrol grubuna ait kesitlere göre daha fazla olduğunu göstermiştir. Bunun aksine iyileşmenin 7 ( $p=0,067$ ) ve 21. ( $p=0,276$ ) günlerinde yapılan analizler, gruplar arasında kollajen birikimi açısından anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir.

### ANJİYOGENEZ

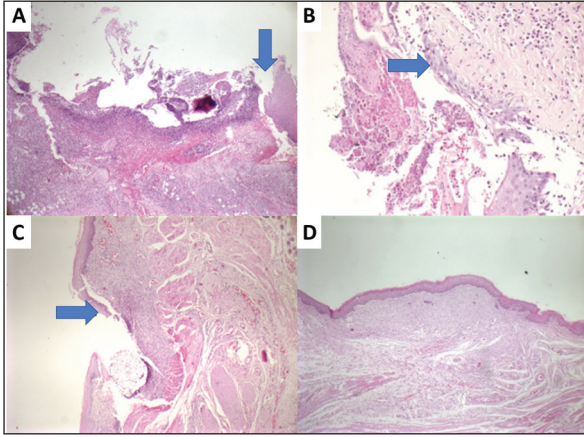
Anjiyogenezin histopatolojik analizi, iyileşmenin 3. gününde HA uygulanan gruptaki damar sayısının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir. Üç günlük iyileşme döneminin sonuçlarıyla uyumlu olarak 7 günlük ( $p=0,012$ ), 14 günlük ( $p=0,002$ ) ve 21 günlük

**TABLO 1:** Bütün parametreler için gruplara göre ortalama±SD değerleri ve Mann-Whitney U test sonuçlarından elde edilen p değerleri.

Histopatolojik veriler	3. gün			7. gün			14. gün			21. gün		
	Kontrol	HA	p değeri	Kontrol	HA	p değeri	Kontrol	HA	p değeri	Kontrol	HA	p değeri
Epitelizasyon	0,1±0,31	0,5±0,52	0,057	0,8±0,42	1±0	0,146	1,4±0,51	1,4±0,51	1	2±0	2±0	1
İnflamasyon	1,7±0,48	1,7±0,48	1	1,3±0,48	1,8±0,42	<b>0,028</b>	1,8±0,42	1,9±0,31	0,542	1,7±0,48	2±0	0,067
Fibroblast proliferasyonu	0,3±0,48	0,8±0,42	<b>0,028</b>	0,9±0,31	1,4±0,51	<b>0,021</b>	1,6±0,51	2±0	<b>0,029</b>	1,5±0,52	2±0	<b>0,012</b>
Kollajen sentezi	0,1±0,31	0,6±0,51	<b>0,022</b>	0,7±0,48	1±0	0,067	1,3±0,48	2±0	<b>0,001</b>	1,7±0,48	1,9±0,31	0,276
Anjiyogenez	0,2±0,42	0,8±0,42	<b>0,009</b>	0,5±0,52	1±0	<b>0,012</b>	1,1±0,31	1,8±0,42	<b>0,002</b>	1,1±0,31	2±0	<b>&lt;0,001</b>

HA: Hyaluronik asit.



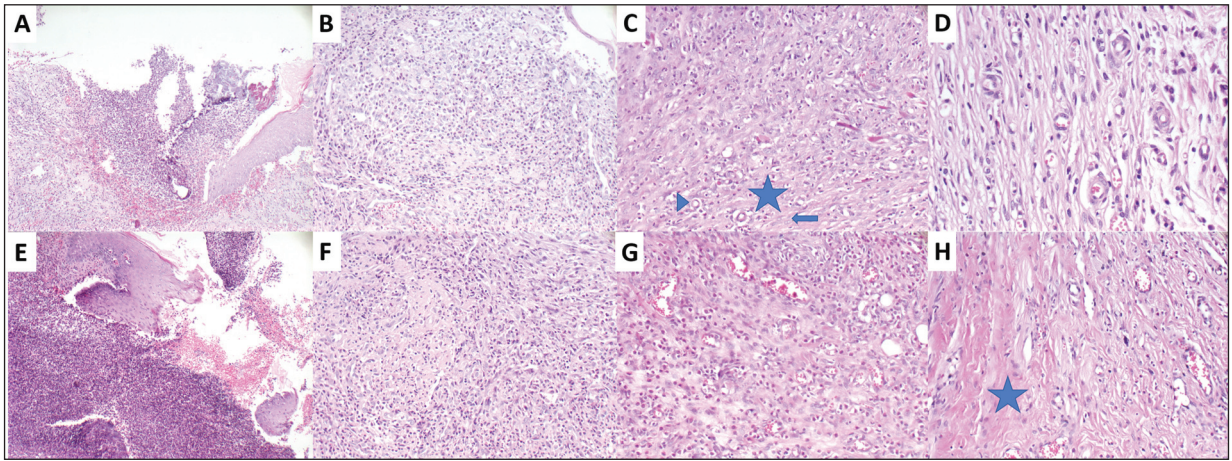


**RESİM 3:** A) 3. günde epitelizasyon gözlenmemekte (Ok: yara kenarı). Okun sol tarafı epitelizasyon olmayan yara yüzeyi, sağ tarafı komşu mukozanın orijinal epitel göstermektedir (H&E x40). B) 7. günde, başlangıç aşamasında epitelizasyon (H&E x40) C) 14. günde yara yüzeyinin %50'sinde gözlenen epitelizasyon (H&E x40) D) 21. günde tamamlanmış epitelizasyon (H&E x40).

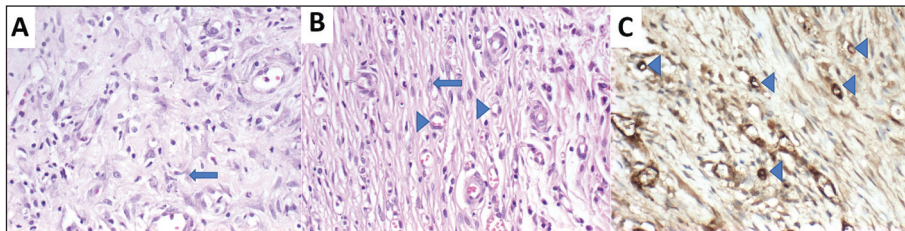
( $p < 0,001$ ) iyileşme dönemlerinde de anjiyogenezin kontrol grubuna göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Resim 5).

## TARTIŞMA

HA içeren ürünlerin önemli biyolojik ve kimyasal özellikleri nedeniyle bu ürünlere gösterilen ilgi her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmada, ticari bir ürün olan düşük molekül ağırlıklı (DMA)-yA'nın yara iyileşmesi üzerine etkileri epitelizasyon, inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, kollajen sentezi ve anjiyogenez parametreleri üzerinden mukozal yara modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonucunda HA uygulamasının, tedavinin erken döneminde kollajen sentezini artırırken, iyileşmenin 21. gününde bile fibroblast proliferasyonu ve



**RESİM 4:** A-D) Sırasıyla 3 (x40), 7 (x200), 14 (x200), 21. (x400) iyileşme günlerinde, kontrol grubuna ait H&E ile boyanmış kesit örnekleri. Üçüncü günde belirgin akut inflamatuvar hücreler ve epitelize olmamış yara yüzeyi. Henüz belirgin fibroblast proliferasyonu ve kollajen üretimi yok. Yedinci günde olgunlaşmamış vasküler yapılar ve ödematöz granülasyon dokusu. On dördü ve 21. günde fibroblast proliferasyonu ve kollajen üretimi daha belirgin. E-H) Sırasıyla 3 (x100), 7 (x200), 14 (x200), 21. (x200) iyileşme günlerinde, HA grubuna ait, H&E ile boyanmış kesit örnekleri. Yedinci günden 21. güne kollajen maturasyonu: Dağınık, ince fibriller kollajenden, kalın uzun ve daha eozinofilik kollajenin hücreler arası boşluğu doldurduğu yapıya değişim. İğsi ve ovoid şekilli fibroblastlar (Yıldız: Lollajenize stroma, ok: Fibroblast, ok başı: Damarsal yapılar.). HA: Hyaluronik asit.



**RESİM 5:** A,B) Anjiyogenez, 14. gün, sırasıyla kontrol ve HA grubuna ait kesit örnekleri (Ok; aktif fibroblast, ok başı; vasküler yapılar) (H&E x400). C) CD 34 boyaması (Ok başı lümenli veya lümensiz damarsal yapılar) (x400).

HA: Hyaluronik asit.

anjyogenezi belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir.

DeneySEL cilt yaralarında, fizyolojik olarak HA konsantrasyonunun çok hızlı arttığı ve keratinosit proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonu süreçlerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>14,15</sup> Bu bulgular göz önüne alındığında, haricen HA uygulamalarının yara iyileşmesinin epitelizasyon süreci için faydalı olabileceği öne sürülmüştür. Wu ve ark.nın farelerde uyguladıkları tam kalınlıklı yara modelinde, çapraz bağlı HA hidrojellerinin etkileri araştırılmış, iyileşmenin 10. gününde tedavi grubunun yara kapanma oranının yaklaşık %95, kontrol grubunda ise bu oranın %78 olduğu belirtilmiştir.<sup>16</sup> Dorsal cilt eksizyonu modeli kullanılan başka bir çalışmada, 2 günlük iyileşme sürecinin sonunda karboksimetil selüloz/DMA-HA kombinasyonu ile kaplı yaradaki epidermis iyileşmesinin sadece karboksimetil selüloz ile kaplı yaraya kıyasla daha iyi olduğu ifade edilse de farklılığın istatistiksel anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.<sup>17</sup> Li ve ark.nın yaptığı çalışmada ise 10 günlük iyileşme sürecinin sonunda 2 cm<sup>2</sup> dorsal cilt yaralarına HA-poloksamer hidrojel uygulanan sıçanların yaralarının neredeyse tamamen iyileştiği, kontrol grubunun yaralarının ise 14 günlük iyileşme periyodundan sonra bile hâlâ görülebilir olduğu bulunmuştur.<sup>18</sup> Benzer bir çalışma tasarımı, HA-jel kombinasyonu uygulanan gruptaki yara iyileşmesi sadece HA uygulanan gruba göre daha iyi bulunmuş, fakat 14 günlük iyileşme döneminin sonunda çalışma gruplarının benzer sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir.<sup>13</sup> Hong ve ark., benzer şekilde, HA-polisakarit jel kombinasyonu ile tedavi edilen hayvanların yara iyileşmesinin 28. günün sonunda kontrol grubundaki hayvanlara göre daha hızlı olduğunu, iyileşmenin devam eden dönemlerinde yara alanındaki değişikliklerin azaldığını ve 56. günün sonunda gruplar arasında farklılık kalmadığını belirtmişlerdir.<sup>19</sup> Çalışmamızda, oral mukozal yara modelinde HA jel uygulamasının epitelizasyona etkisinin olmadığı bulunmuştur. İnsizyonel ağız içi mukozal iyileşmenin sonuçlarını dorsal cilt iyileşmesi ile karşılaştırmak, HA'nın uygulanan doku ve yara tipine bağlı olarak değişen rejeneratif etkileri nedeniyle sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Sonuç olarak HA uygulaması, cilt yara iyileşmesi sı-

rasında yeniden epitelizasyon sürecini hızlandırıyor gibi görünse de iyileşme döneminin sonunda doku özellikleri kontrol grubu ile benzer görünmektedir. HA'nın oral mukozal epitelizasyon üzerindeki etkileri hakkında sonuca varmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Akut yaralarda inflamasyon, vücudu mikroorganizmalara ve diğer potansiyel olarak zararlı maddelere karşı koruyan, fizyolojik bir reaksiyondur. İnflamasyon aşamasının sonunda yara bölgesinde yeni doku oluşuma uygun bir ortam sağlanmış olur. HA'nın hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar etkilerinin rapor edilmiş olması kafa karışıklığına neden olmuştur. HA'nın inflamatuvar özelliklerinin arkasındaki moleküler süreci araştıran çalışmalar, 500 kDa'dan küçük HA fragmanlarının proinflamatuvar sitokinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir.<sup>20</sup> Önceki çalışmaların sonuçları, HA'nın moleküler ağırlığının inflamasyon ve doku onarımı ile ilgili araştırma sonuçlarının yorumlanması sırasında göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermiştir.

Yara iyileşmesinin proliferatif fazında, fibroblastlar granülasyon dokusu oluşturmak üzere çoğalır ve doku defektlerini doldurmak için yara bölgesine göç ederler. Fibroblastlar ayrıca hücre dışı matrisin yanı sıra kollajen üretimine ve büyüme faktörlerinin salınmasına katılırlar.<sup>16</sup> Tolg ve ark., fibroblastlarda HA ile indüklenen motiliteye özgü bir reseptörün yüksek oranda bulunduğunu ve bu reseptörün aktivasyonu ile fibroblast proliferasyonunun arttığını in vitro çizik yara iyileştirme modelinde göstermişlerdir.<sup>21</sup> Bunun yanında, HA'ya özgü reseptör eksikliği olan fibroblastların, migrasyon kapasitesinin ve iyileşme potansiyelinin azaldığı murin yara iyileştirme modeli kullanılarak gösterilmiştir.<sup>22</sup> Başka bir in vivo çalışmada, HA-poloksamer hidrojinin tam kalınlıktaki cilt defektinde fibroblast göçünü desteklediği gösterilmiştir.<sup>18</sup> Önceki çalışmaların sonuçları, yara iyileşmesi sırasında fibroblast proliferasyonu hakkındaki bulgularımızı desteklemektedir. Çalışmamızda yapılan histopatolojik incelemelerde, yara bölgesine yapılan HA jel uygulamasının iyileşme sürecinin tüm aşamalarında fibroblast proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir.

Fibroblastlar tarafından üretilen kollajen, makrofolajlardan salınan güçlü büyüme faktörleri tarafından indüklenen bağ dokusu matrisi üretiminin önemli bir parçasıdır.<sup>23</sup> Gao ve ark., ameliyat sonrası 7, 10 ve 14. günlerde alınan dermis örneklerinde HA-jel ile tedavi edilen gruptan kollajen birikiminin önemli ölçüde arttığını bulmuştur.<sup>13</sup> Çalışmamızın sonuçlarına göre yara bölgesindeki kollajen birikimi, ameliyat sonrası 3 ve 14. günlerde deney grubunda daha yüksek olsa da ameliyat sonrası 28. günde kontrol grubunun tedavi grubu ile benzer düzeye ulaştığı tespit edilmiştir.

Anjiyogenez, yara iyileşmesinin proliferasyon fazının önemli bir parçasıdır. Yaralardaki hücresel mitotik aktivite, migrasyon ve artan metabolik faaliyetler, yeni kan damarları tarafından bölgeye taşınacak oksijen ve besin maddelerine olan talebi artırır. Yeni damar oluşumu, endotel hücreleri ve hücre dışı matris bileşenlerinin karşılıklı etkileşimi ile organize olur.<sup>24</sup> Çok sayıda çalışma, HA sinyalinin esas olarak endotelial hücre davranışını etkileyerek anjiyogenez üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Hem yüksek molekül ağırlıklı (YMA)-HA hem de DMA-HA anjiyogenezi düzenler, ancak endotelial hücre proliferasyonu ve motilitesi üzerinde zıt etkiler gösterirler. DMA-HA'nın vasküler endotelial hücre proliferasyonunu, göçünü ve tübül oluşumunu uyardığı in vitro olarak gösterilmiştir. Bunun yanında, YMA-HA endotelial hücre proliferasyonunu, motilitesini ve dallanmalarını engelleyerek antianjiyojenik özellikler göstermektedir.<sup>25</sup> Gao ve ark., HA-jelin yara onarımında endotel hücre çoğalmasını ve göçünü düzenleyen bir grup molekül olan vasküler endotelial büyüme faktörünün [vascular endothelial growth factor (VEGF)] ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır. Ayrıca postoperatif 7, 10, 14. günlerde CD31'in (anjiyogenez için bir belirteç) artan ekspresyonu, HA'nın yara iyileşmesi sırasında anjiyogenezi artırdığını doğrulamaktadır.<sup>13</sup> Hong ve ark., HA ile yapılan yara örtücülerin tam kalınlıklı cilt defekti üzerindeki etkilerini histokimyasal yöntemlerle değerlendirmişler ve çapraz bağlı polisakkarit bazlı HA hidrojel ile tedavi edilen hayvanlarda 7. günde kontrol grubuna göre daha fazla VEGF tespit ederken, 14. günde kontrol grubuna göre daha az VEGF tespit etmişlerdir. Ek olarak, gerçek zamanlı polime-

raz zincir reaksiyonu ile değerlendirilen VEGF gen transkripsiyonunda da aynı eğilim tespit edilmiştir. Üçüncü günden itibaren artan VEGF gen transkripsiyonu 7. günde en üst seviyelere ulaşır ve daha sonra 56. güne doğru minimum seviyelere düşmektedir.<sup>19</sup> HA-poloksamer hidrojel uygulanan grupta anjiyogenez kontrol grubuna göre artmıştır.<sup>18</sup> Çalışmamızın histopatolojik analiz sonuçlarına göre DMA-HA jel uygulaması, incelenen tüm iyileşme dönemlerinde anjiyogenezi artırmaktadır. Daha önce bahsi geçen çalışmalara ve çalışmamızın sonuçlarına göre DMA-HA tedavisi dermal iyileşmede anjiyojenik özellikler sağlar.

HA uygulamasının mukozal yara iyileşmesi üzerindeki etkileri birkaç klinik çalışmada incelenmiştir. Palaia ve ark., %0,2 klorheksidin gargarasına %0,2 sodyum hiyalüronat eklenmesinin diyet lazer ile eksizyonel biyopsi sonrası cerrahi yara iyileşmesini artırdığını göstermiştir.<sup>26</sup> Çankaya ve ark., HA uygulamasının serbest diş eti grefti (SDG) vaskülaritesi üzerindeki etkisini lazer Doppler flowmetri ile değerlendirmişler ve iyileşmenin ilk haftasında SDG altındaki alıcı yatakta HA'nın iyi damarlanmış bir tabaka oluşumuna izin verdiğini, böylece SDG'nin büzülmesini azalttığını bulmuşlardır.<sup>27</sup> Aynı yazarların başka bir çalışmasında, lazer ile yapılan frenektomi sonrası topikal HA jel uygulamasının ameliyat sonrası 3, 7 ve 14. günlerde yaranın yüzey alanını azalttığı ve hasta memnuniyetini artırdığı ifade edilmiştir.<sup>28</sup> Yıldırım ve ark.'nın yaptığı çalışmada, HA'nın topikal uygulamasının SDG'nin verici sahası üzerine etkileri değerlendirilmiş; postoperatif ağrı ve yanma hissi üzerine olumlu etki gösterdiği, epitelizasyon ve renk uyumu açısından palatal yara iyileşmesini hızlandırdığı bulunmuştur.<sup>29</sup>

HA'nın etkileri moleküler ağırlık, üretim protokolü, etki yeri ve reseptör ekspresyon seviyesi gibi birçok değişkenden etkilenmektedir.<sup>30</sup> Bu nedenle bu faktörlerin farklılık göstermesi farklı araştırma sonuçlarının karşılaştırılmasında zorluklara yol açmaktadır. Çalışmamızda, HA'nın mukozal yara iyileşmesi üzerine etkilerinin histopatolojik düzeyde incelenmiş olması çalışmanın limitasyonu olarak değerlendirilebilir. HA'nın mukozal yaraların rejenerasyonu üzerine etkilerine ilişkin daha kapsamlı



çalışmalar, daha detaylı araştırma yöntemleri ile yapılmalıdır.

## SONUÇ

Çalışmanın limitasyonları dahilinde; ticari olarak temin edilebilen HA jelin ağız mukozasının iyileşmesi üzerine, bağ dokusu kalitesi ve anjiyogeneze katkı sağlayarak yararlı etkileri olduğu sonucuna varılabilir. Daha önceki klinik çalışmaların bulgularını destekleyen çalışmamızın sonucu, HA jel uygulamasının farklı mukozal iyileşme senaryolarında faydalı olabileceğini göstermiştir. HA'nın çok sayıda potansiyel uygulama endikasyonu ve çeşitli rejeneratif özellikleri olmasına rağmen amaçlanan klinik kullanım için optimum moleküler ağırlığını, uygulama yolunu ve tedavi zamanlamasını belirlemek için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

### Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet,

gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

### Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

### Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Yener Oğuz, Nurettin Diker, Serap Gülsever, Eda Yılmaz Akçay; **Tasarım:** Yener Oğuz, Nurettin Diker, Serap Gülsever, Eda Yılmaz Akçay; **Denetleme/Danışmanlık:** Yener Oğuz, Eda Yılmaz Akçay; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Yener Oğuz, Nurettin Diker, Serap Gülsever, Eda Yılmaz Akçay; **Analiz ve/veya Yorum:** Yener Oğuz, Eda Yılmaz Akçay; **Kaynak Taraması:** Yener Oğuz, Nurettin Diker; **Makalenin Yazımı:** Yener Oğuz, Nurettin Diker, Serap Gülsever, Eda Yılmaz Akçay; **Eleştirel İnceleme:** Yener Oğuz, Nurettin Diker, Eda Yılmaz Akçay; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Yener Oğuz, Serap Gülsever; **Malzemeler:** Yener Oğuz, Nurettin Diker, Serap Gülsever, Eda Yılmaz Akçay.

## KAYNAKLAR

- Nauta A, Gurtner G, Longaker MT. Wound healing and regenerative strategies. *Oral Dis.* 2011;17(6):541-9. [Crossref] [PubMed]
- Kozlovsky A, Artzi Z, Hirshberg A, Israeli-Tobias C, Reich L. Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. *J Clin Periodontol.* 2007;34(2):164-71. [Crossref] [PubMed]
- Robert L. Hyaluronan, a truly "youthful" polysaccharide. Its medical applications. *Pathol Biol (Paris).* 2015;63(1):32-4. [Crossref] [PubMed]
- Gribbon P, Heng BC, Hardingham TE. The molecular basis of the solution properties of hyaluronan investigated by confocal fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J.* 1999;77(4):2210-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997;242(1):27-33. [Crossref] [PubMed]
- Pasonen-Seppänen S, Hyttinen JM, Rilla K, Jokela T, Noble PW, Tammi M, et al. Role of CD44 in the organization of keratinocyte pericellular hyaluronan. *Histochem Cell Biol.* 2012;137(1):107-20. [Crossref] [PubMed]
- Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(4):288-95. [Crossref] [PubMed]
- Kogan G, Soltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett.* 2007;29(1):17-25. [Crossref] [PubMed]
- Teng M, Huang Y, Zhang H. Application of stems cells in wound healing--an update. *Wound Repair Regen.* 2014;22(2):151-60. [Crossref] [PubMed]
- Sun BK, Siphshvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science.* 2014;346(6212):941-5. [Crossref] [PubMed]
- Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(5):569-78. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Kesting MR, Wolff KD, Nobis CP, Rohleder NH. Amniotic membrane in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg.* 2014;18(2):153-64. [Crossref] [PubMed]
- Gao Y, Sun Y, Yang H, Qiu P, Cong Z, Zou Y, et al. A low molecular weight hyaluronic acid derivative accelerates excisional wound healing by modulating pro-inflammation, promoting epithelialization and neovascularization, and remodeling collagen. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3722. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Oksala O, Salo T, Tammi R, Häkkinen L, Jalkanen M, Inki P, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 1995;43(2):125-35. [Crossref] [PubMed]
- Kaya G, Rodriguez I, Jorcano JL, Vassalli P, Stamenkovic I. Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev.* 1997;11(8):996-1007. [Crossref] [PubMed]
- Wu S, Deng L, Hsia H, Xu K, He Y, Huang Q, et al. Evaluation of gelatin-hyaluronic acid composite hydrogels for accelerating wound healing. *J Biomater Appl.* 2017;31(10):1380-90. [Crossref] [PubMed]
- Huang YC, Huang KY, Lew WZ, Fan KH, Chang WJ, Huang HM. Gamma-irradiation-prepared low molecular weight hyaluronic acid promotes skin wound healing. *Polymers (Basel).* 2019;11(7):1214. [Crossref] [PubMed] [PMC]



18. Li X, Li A, Feng F, Jiang Q, Sun H, Chai Y, et al. Effect of the hyaluronic acid-polyoxamer hydrogel on skin-wound healing: in vitro and in vivo studies. *Animal Model Exp Med*. 2019;2(2):107-13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
19. Hong L, Shen M, Fang J, Wang Y, Bao Z, Bu S, et al. Hyaluronic acid (HA)-based hydrogels for full-thickness wound repairing and skin regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(9):150. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Muto J, Sayama K, Gallo RL, Kimata K. Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology. *J Dermatol Sci*. 2019;94(1):190-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Tolg C, Hamilton SR, Zalinska E, McCulloch L, Amin R, Akentieva N, et al. A RHAMM mimetic peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds. *Am J Pathol*. 2012;181(4):1250-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
22. Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko KA, Kooshesh F, Walton P, McCarthy JB, et al. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol*. 2006;175(6):1017-28. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
23. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
24. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):40-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):528-39. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
26. Palaia G, Tenore G, Tribolati L, Russo C, Gaimari G, Del Vecchio A, et al. Evaluation of wound healing and postoperative pain after oral mucosa laser biopsy with the aid of compound with chlorhexidine and sodium hyaluronate: a randomized double blind clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2019;23(8):3141-51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Çankaya ZT, Gürbüz S, Bakırarar B, Kurtiş B. Evaluation of the effect of hyaluronic acid application on the vascularization of free gingival graft for both donor and recipient sites with laser doppler flowmetry: a randomized, examiner-blinded, controlled clinical trial. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2020;40(2):233-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Turgut Çankaya Z, Gürbüz S, Bakırarar B, Ünsal B, Kurtiş B. Evaluation of the effect of the application of hyaluronic acid following laser-assisted frenectomy: an examiner-blind, randomized, controlled clinical study. *Quintessence Int*. 2020;51(3):188-201. [[PubMed](#)]
29. Yıldırım S, Özener HÖ, Doğan B, Kuru B. Effect of topically applied hyaluronic acid on pain and palatal epithelial wound healing: An examiner-masked, randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2018;89(1):36-45. [[PubMed](#)]
30. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel)*. 2018;10(7):701. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]