



## Tavşanlarda Hidroflorik Asit ile Oluşturulan Yanık Sonrası, DMSO ve İndometazin Korneal Mast Hücreleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Berna GÜNEY SARUHAN<sup>1</sup>, M. Erdem AKBALIK<sup>1</sup>, Uğur TOPALOĞLU<sup>1</sup>, Hakan SAĞSÖZ<sup>1</sup>, M. Aydın KETANİ<sup>1</sup>, Semih ALTAN<sup>2</sup>, Zeki OĞURTAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

<sup>2</sup>Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

<sup>3</sup>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.10.2017	18.12.2017	25.12.2017

### Öz

Bu çalışmada, tavşanlarda hidroflorik asit ile oluşturulan göz yanıklarının iyileşmesine katkıda bulunan antioksidan ve anti-inflamatuar ajanlar olan dimetil sülfoksit (DMSO ve indometazin'in mast hücreleri üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık. 72 erkek Yeni Zelanda tavşanının sağ gözleri genel anestezi sonrasında, % 2'lik hidroflorik asit damlatılarak 60 saniye süreyle yakıldı. Bununla beraber, gözler 500 cc normal salin ile sulandırıldı. Tavşanlar her bir grupta 18 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Çalışmada, %40 DMSO ve %0,1 indometazin hem tek başlarına hem de kombine olarak kullanıldı. Kontrol grubundaki hayvanların kornealarında bağdokusu içerisinde mast hücresi gözlenmezken, yanık oluşturulmuş grubun korneasında bağdoku içerisinde kan damarlarının etrafına yerleşen mast hücreleri görüldü. Yanık oluşturulduktan sonra indometazin, DMSO ve DMSO+indometazin gruplarında mast hücrelerinin varlığı kornea bağdokusu içerisinde belirlenmiştir. Gruplarda günler arasında önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** DMSO, İndometazin, Kornea, Mast hücresi, Yanık

### Investigation of the Effect of DMSO and Indomethacin on Corneal Mast Cells after Burn with Hydrofluoric Acid in Rabbits

#### Abstract

In this study, we aimed to investigate the effects of indomethacin and dimethyl sulfoxide (DMSO), which are antioxidant and anti-inflammatory agents, on mast cells, which contribute to the healing of eye burns induced by hydrofluoric acid in rabbits. The right eye of 72 male New Zealand rabbits was burned with %2 hydrofluoric acid for 60 seconds after general anesthesia. However, the eyes were washed with 500 cc saline. The rabbits were divided into 4 groups with 18 animals in each group. In the study, 40% DMSO and %0.1 indomethacin were used alone and in combination. In burn-formed group, mast cells were seen in the corneal connective tissue around blood vessels, while mast cells were not observed in the corneal connective tissue of the animals in control group. After burn formation, the presence of mast cells in the indomethacin, DMSO and DMSO+indomethacin groups were determined in the corneal connective tissue. There was no significant difference between the days in the groups.

**Keywords:** Burn, Cornea, DMSO, Indomethacin, Mast cell

### Giriş

Kornea, gözün ön kısmında bulunan, gözün toplam refraktif gücünün üçte ikisinden fazlasını sağlayan

oldukça özel şeffaf bir dokudur. Kornea anterior epitel, santral stroma ve posterior endotelden oluşur

(1). Korneanın bütünlüğü çeşitli hücreler tarafından korunur ve hücreler arasında şekillenen dengesizlikler ciddi göz hastalıklarına neden olabilir. Bu nedenle korneal bütünlüğün muhafaza edilmesine katılan hücreler üzerine yapılan araştırmalar son derece önemlidir (2). 1877'de ilk kez Ehrlich tarafından kaydedilen mast hücreleri, göz de dahil olmak üzere vücut organlarının gevşek bağ dokularında geniş bir dağılıma sahiptir (3). Kemik iliğinden köken alan mast hücreleri alerjik ve immünolojik reaksiyonların yanı sıra inflamatuvar reaksiyonlarda da rol oynayan hücrelerdir ve uzun yıllardan beri bu özellikleriyle bilinmektedirler (4). Kan damarlarının etrafında belirgin bir yoğunlaşma eğilimleri olmasına rağmen yaşam alanlarının önemi halen belirsizdir. Mast hücre popülasyonu, fibroplazi veya kronik inflamasyon sonrasında artış veya akut inflamasyon sonrası azalma gibi çeşitli koşullarla değişebilir. Mast hücrelerinin işlevsel olarak trephocyt hücreler yani besleyici hücreler olduğuna inanılır. Böylelikle diğer hücrelerin kullanımı için gerekli olan maddeleri üretirler veya depolarlar. Mast hücreleri çevrelerinde meydana gelen değişimlere adapte olabilen heterojen bir hücre popülasyonudur. Tehlike altındaki dokuya savunma molekülleri ve antikorları taşıyan plazma eksudatlarının girişini arttırırlar ve bunu da vasküler permeabilityyi arttırarak yaparlar. Aynı zamanda lökositlerin (nötrofil ve eozinofil) bölgeye toplanmasını ve hücrelerin damar duvarından hareketini kolaylaştırırlar (5). Normal bir yetişkin gözünde mast hücreleri uveal, subkonjonktival ve episkleral dokularda görülür. Sıçanlarda, limbal mast hücreleri kornea hasarıyla degranüle olur ve kornea vaskülarizasyonu tamamlandıktan sonra mast hücreleri korneaya girer (3). Mast hücrelerinin sadece allerjik tip reaksiyonlarda değil, aynı zamanda kronik inflamatuvar ve kollajen-vasküler hastalıklarda da önemli rolleri olduğu bilinmektedir (6).

Hidroflorik asit'in (HF) endüstriyel ve evsel alanlarda geniş kullanımı ile asit yanıkları giderek yaygınlaşmaktadır. HF asit diğer asitlere kıyasla oküler dokuda geniş bir hasara neden olur. Yapısında bulunan korozif hidrojen iyonları ve toksik florür iyonları derine nüfuz eder, ve sonrasında sıvılaşma nekrozuna neden olabilir. Bu yaralanmaları kontrol altına almanın ana stratejileri derhal daha fazla hasarı ve inflamasyonu azaltmak ve şifayı arttırmak için iyileşmeyi desteklemektir. Bu adımların her biri için, ciddi oküler HF asit yanıklarında farklı ilaçların etkinliğini değerlendirmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO), anti-inflamatuvar özellikli bir ilaçtır. Analjezik, zayıf bakteriyostatik, antikoagülan ve anti-iskemik etkileri vardır ve serbest radikalleri çıkarma kabiliyetine sahiptir. Aynı zamanda oftalmolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (7).

Non-steroidal anti-inflamatuvar bir bileşik olan topikal indometazin, gözün iltihaplanmasının önlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte alkali göz yanmalarında da kullanılmıştır. Kimyasal göz yanıkları içindeki antioksidanların ve indometazinin kullanımı ile ilgili çalışmalar genelde alkali yanıklara odaklanmıştır (7). Yapılan çalışmalarda daha çok çeşitli laboratuvar hayvanlarında uvea ve göz kapağı dokularında mast hücrelerinin niceliksel dağılımlarına bakılmıştır (3,8). Biz de çalışmamızda deneysel olarak yanık oluşturulmuş ve sonrasında tedavi amacıyla DMSO ve indometazin kullanılmış tavşan modelinde mast hücrelerinin korneadaki dağılımlarına bakmayı planladık.

## **Materyal ve Metot**

### **Hayvanlar**

Çalışmada toplam 72 adet Yeni Zelanda ırkı erkek tavşan (2-2,5 kg ağırlığında) kullanıldı (Selçuk Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Komitesi

tarafından onaylı, 2010/15). Hayvanlar, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda pelet yem ve su ile ad libitum olarak beslendi.

### **Kimyasallar ve ilaçlar**

%2'lik hidroflorik asit (HF) (% 38-40-Merck, USA) kullanılarak asidik yanık oluşturuldu. Çalışmada 40% DMSO (99.9%, Merck, USA) ve 0.1% indometazin (Indocolir 5mL, Abdi-İbrahim, Türkiye) tek başlarına ve kombine ayrıca olası enfeksiyonları önlemek için topikal tobramisin (Tobrased® % 3, 5 ml-Bilim, Turkey) tüm gruplarda kullanıldı. Genel anestezi, 2% xylazine hydrochloride (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Turkey) ve 10% ketamine hydrochlorid (30 mg/kg, Ketazol®, Interhas, Turkey) ile gerçekleştirildi. Postoperatif analjezi için hayvanlara dipyrone 14 mg/kg uygulandı.

### **Korneal neovaskularizasyon**

Tavşanlar her bir grupta 18 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı ve sonrasında her bir grupta kendi içinde, uygulamanın 2., 7. ve 14. günü olacak şekilde üç alt gruba ayrıldı. Hayvanlardaki ağrıyı azaltmak için %0,5'lik proparacaine hidroklorid (Alcon, Forth Worth, Texas, USA) sağ gözün korneal yüzeyi üzerine topikal olarak uygulandı. %2'lik HF asitten 0.05 ml'si direkt sağ gözün korneası üzere 60 sn uygulanarak asit yanık oluşturuldu. Asit yanık sonrasında, gözler 500 ml %0.9 isotonic salin solüsyonu ile yıkandı. Yakma işleminden sonra; 1. grupta (n:18), DMSO (D) her seferinde 4 damla olacak şekilde günde 4 kez uygulandı ve uygulama dozu 175 mg/kg/gün olarak belirlendi (7). 2. grupta (n:18) indometazin (I) her seferinde 4 damla olacak şekilde 6 saat aralıklarla günde 4 kez uygulandı (toplam 16 damla). 3. grupta (n:18), DMSO ve indometazin (DI) günde 6 saat aralıklar ile D ve I gruplarındaki gibi 4 kez eşit doz ve miktarda

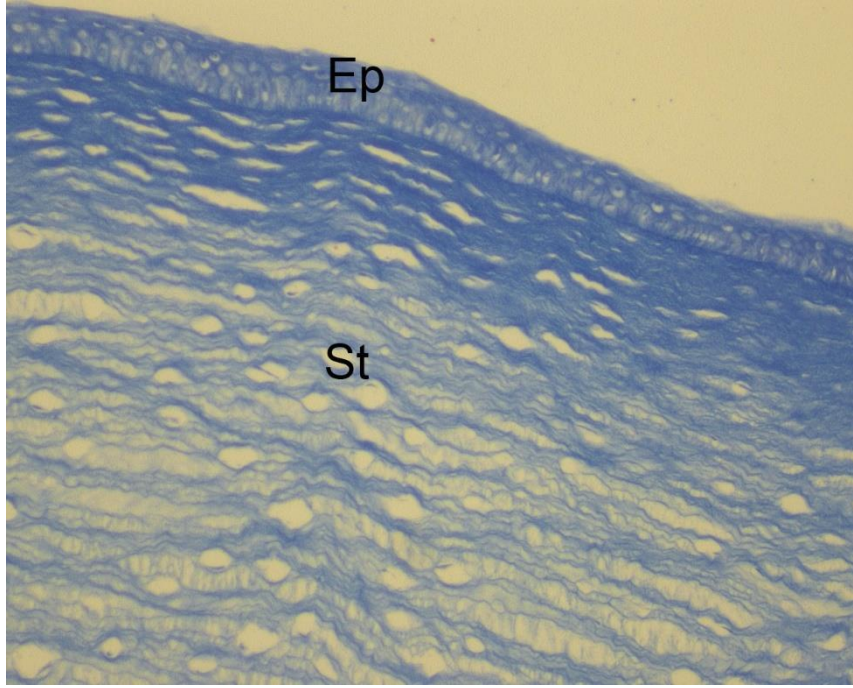
uygulandı. 4. gruba ise kontrol grubu (C) olarak herhangi bir uygulama yapılmadı. Kontrol grubundaki altı hayvanın sol gözleri herhangi bir işlem yapılmayan sağlıklı kontrol olarak kullanıldı.

### **Histopatolojik işlemler**

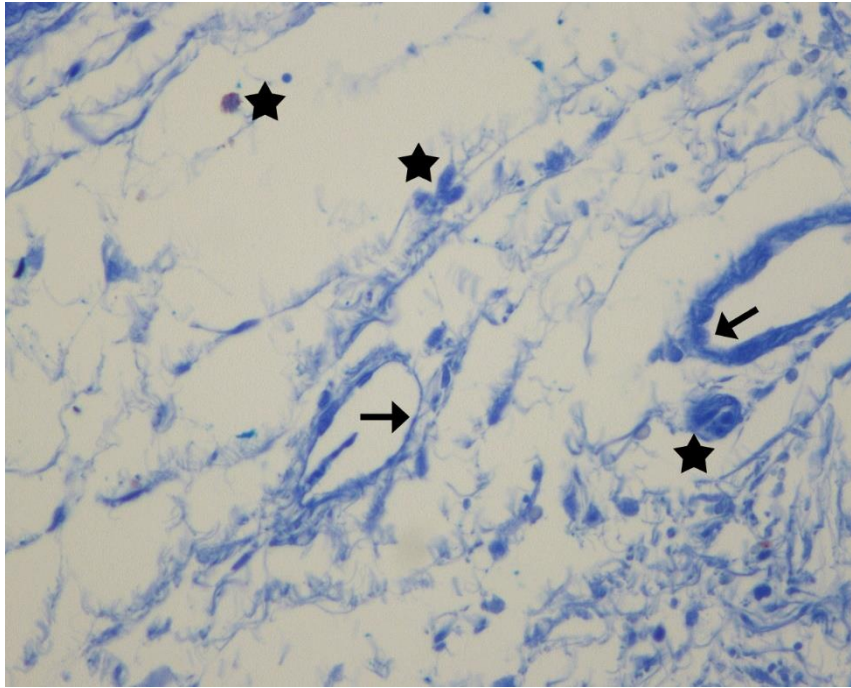
Uygulamaların 2. 7. ve 14. günlerinde yüksek dozda sodyum pentotal ile tavşanlar ötenazi edildi. Uygulama yapılan gözler total olarak çıkarıldıktan sonra kornea dokusu sirküler olarak gözlerden ayrıldı. Elde edilen kornealar hızlı bir şekilde ortadan ikiye bölünerek %10 nötral formol solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Rutin histolojik prosedürleri takiben dokular parafine bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitlere mast hücrelerini göstermek amacıyla Alsiyan mavisi ve Safranin-O boyaması yapıldı.

### **Bulgular**

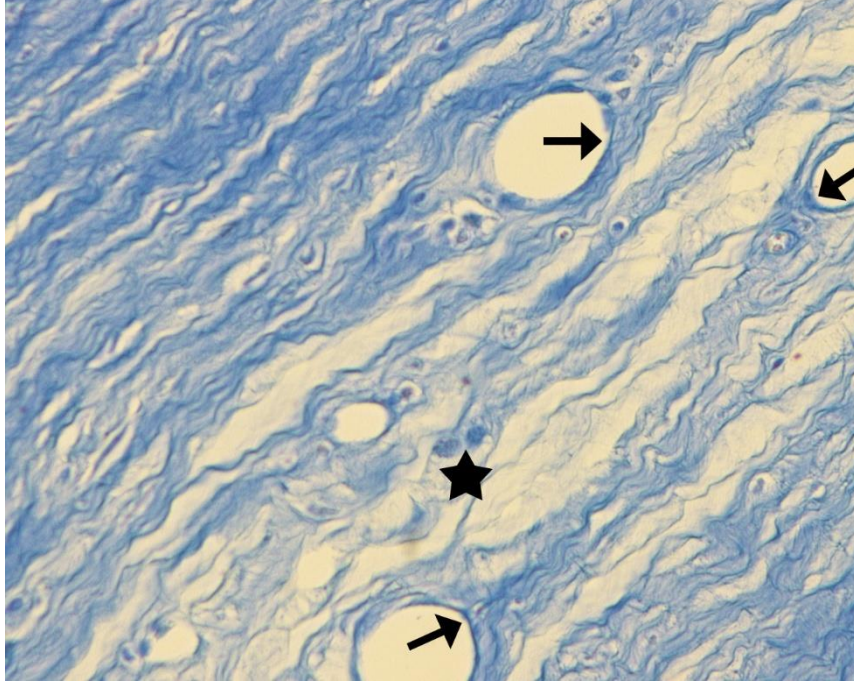
Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubundaki hayvanların kornealarında bağ dokusu içerisinde mast hücresi gözlenmemiştir (Şekil 1). Yanık oluşturulmuş gruptaki tavşanların korneasında bağ doku içerisinde kan damarları şekillenmeye başlamış ve etraflarına mast hücrelerinin yerleştiği gözlenmiştir (Şekil 2). Yanık oluşturulduktan sonra Dimetil sülfoksit (DMSO) verilen grupta damarlaşmanın devam ettiği ve aynı şekilde mast hücrelerinin damarların etrafına yerleştiği, ancak az sayıda olduğu görülmüştür (Şekil 3). Yanık oluşturulduktan sonra indometazin kullanılan grupta ise kan damarı ve mast hücresi sayısında artış olduğu (Şekil 4), benzer şekilde DMSO ve indometazin kullanılan grupta da mast hücre sayısında artış dikkati çekmiştir (Şekil 5). Ayrıca oluşturulan bu gruplarda belirlenen günler açısından önemli bir farklılık gözlenmedi.



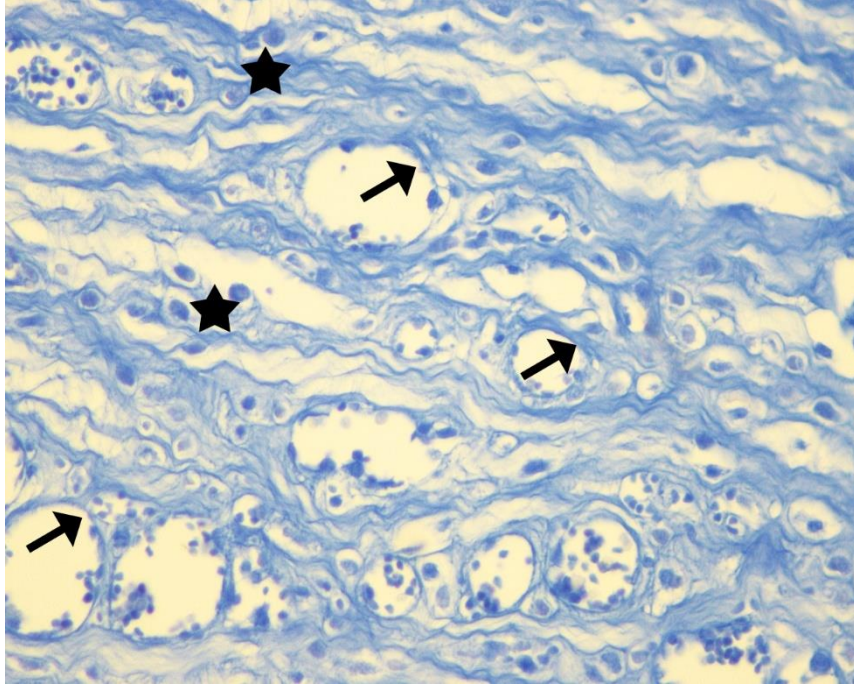
Şekil 1. Kontrol grubu. Ep: Epitel, St: Bağdoku. Alsiyan mavisi / Safranin-O X20.



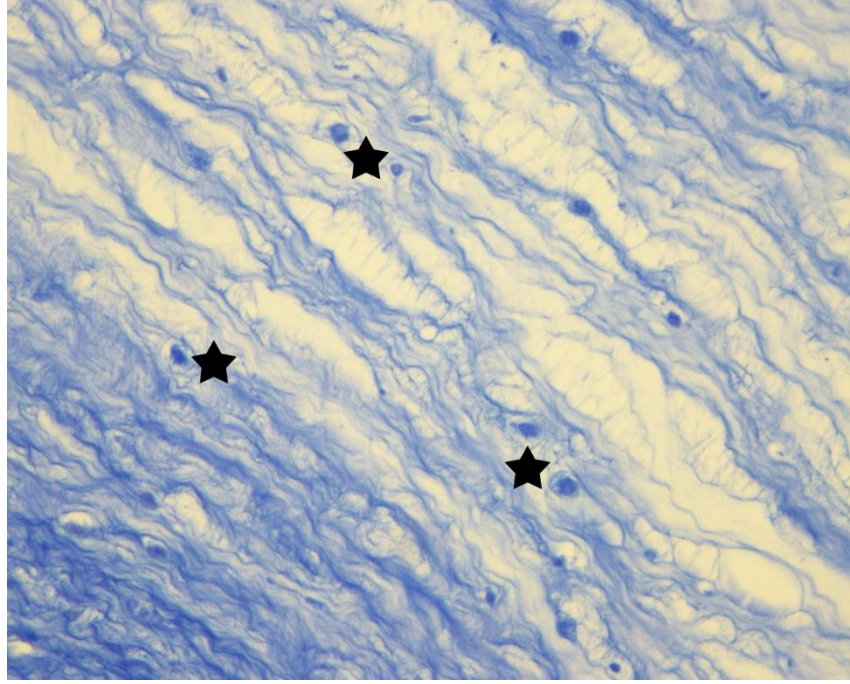
Şekil 2. Yanık oluşturulan grup. →: kan damarları.\*:bağ doku içerisinde mast hücresi. Alsiyan mavisi / Safranin-O X40.



**Şekil 3.** Yanık sonrasında DMSO verilen grup. →: kan damarları.\*:bağ doku içerisinde mast hücresi. Alsiyan mavisi / Safranin-O X40.



**Şekil 4.** Yanık sonrasında indometasin verilen grup. →: kan damarları.\*:bağ doku içerisinde mast hücresi. Alsiyan mavisi / Safranin-O X40.



**Şekil 5.** Yanık sonrasında DMSO+indometazin birlikte verilen grup. \*:bağ doku içerisinde mast hücresi. Alsiyan mavisi / Safranin-O X40.

### Tartışma

Memelilerde mast hücreleri mineralize kemik, kıkırdak ve kornea gibi avasküler dokular hariç tüm vücutta çok yaygın olarak bulunmaktadır (9). Günümüze kadar, alkali ve asit yanık modellerinde mast hücresi hakkında birkaç rapor bulunmakla birlikte, bunların çoğunun klinik çalışmaları olduğu gözlenmiştir (10). Son yıllarda, doğrudan aşırı duyarlılık yanıtlarında mast hücrelerinin klasik rollerinin yanısıra bağışıklık yanıtlarında daha büyük bir rol oynadıkları giderek daha belirgin hale gelmiştir. Mast hücreleri, yara iyileşmesinin farklı aşamaları için önemli olan çeşitli uyarılara yanıt verme becerisine sahiptir (11). Bu veriler, doku onarımında mast hücrelerinin hücrel aktivasyonun düzenlenmesinde üstlendikleri rollerine, hangi tür granül proteazlar eksprese ettiklerine ve bu proteazların ne zaman salındığına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Böylece alerjik-non alerjik veya korneal yüzeyde oluşan yangısal durumlarda mast hücrelerinin oküler yüzey üzerinde etkili bir rol

oynayacağı söylenebilir. Kornea ve konjunktivada bulunan mast hücreleri kornea yüzeyini korumada etkindirler (12). Bu nedenle mevcut çalışmanın bulguları, asidik yanık sonrasında kullanılan anti-inflamatuvar bir bileşik olan topikal indometazin ve DMSO'nun mast hücreleri üzerine etkileri olduğunu göstermeyi amaçlamıştır.

Yapılan çalışmalarda mast hücrelerinin, gözde farklı yoğunlukta dağılım gösterdiği belirtilmiştir. Ratlarda mast hücreleri en fazla göz kapağı, limbus ve orbitada en az konjunktiva, korpus siliare ve sklerada bulunurken kornea, iris ve retinada ise hiç olmadığı görülmüştür (13). Yapılan çalışmalarda limbus korneanın kan damarları, sinirler ve mast hücreleri yönünden zengin olduğu belirtilmiştir (1,14). Laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmada mast hücrelerinin göz kapakları, uvea, subkonjunktiva ve episklerada kan damarları boyunca hizalandığı bildirilmiştir (3). Bu sonuç ile

bizim çalışmamızdaki sonuçlar paralellik göstermektedir.

Esas kornea kısmı stroma, kollagen ve proteoglikanların oluşturduğu ekstraselüler matriksten oluşur (14,15). Çalışmamızda yanık oluşturulan ve ilaç kullanılan gruplarda (DMSO grubu hariç) stromada mast hücre sayısının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar kornea ve limbusdaki mast hücrelerinin proliferasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Allerjik reaksiyonlardan farklı olarak inflamatuvar olaylar süresince mast hücreleri nadiren degranüle olurlar. Bundan dolayı mast hücrelerinin allerjik olmayan durumlarda yer alması mediatörlerini degranülasyon olmadan “farklı” ya da “selektif” olarak salgılamasıyla ilişkili olabilir (4). Mast hücre mediatörlerinin degranülasyon olmadan selektif olarak salınımı inflamatuvar hastalıkların patogenezi anlamamız açısından önemlidir.

Mast hücre yoğunluğu (MHY) o dokudaki anjiogenez veya neovaskülarizasyon (yeni damar oluşumu) ile de yakından ilişkilidir. Anjiogenez fizyolojik olarak yara iyileşmesi, doku onarım bölgeleri vb. patolojik olarak da tümör büyümesi, arterioskleroz gibi durumlarda oluşup bu alanlarda MHY'nun arttığı da iyi bilinmektedir (16). Yapılan çalışmalarda mast hücrelerinin kornea dokusunda da anjiogenez ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (17,18). Mast hücreleri mikrovasküler endotel hücrelerinin çoğalmasını uyarır ve anjiogenez bölgelerinde belirgin birikim gösterir (17). Çalışmamızda anjiogenez şekillenen gruplarda damarların etrafında mast hücrelerinin izlenmesi de bu durumu destekler niteliktedir.

Son yıllarda DMSO ile çalışan bilim insanları onun yanıkları iyileştirmek, ağrı gidermek, yaralanmalardan sonra ödem gidermek gibi olağanüstü özelliklerini keşfettiler (19). Araştırmamızda yanık sonrası DMSO kullanılması

ile bağ doku içerisinde mast hücrelerinin görülmeye devam etmesi, histamin salgılanması ve beraberinde vazoaaktif tetiklenme sayesinde kılcak geçirgenliğinin oluşmaya başlanması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, anti-inflamatuvar ilaçların, yangısal süreçte etkin olan vasküler permeabiliteyi azaltabileceğini, bununla birlikte DMSO+indometazin kullanılan gruplarda mast hücrelerinin sayısının artmasının ise nedensel olmaktan ziyade yaralanmadan kaynaklanabileceği ve oluşan hasarı önlemek adına da kimyasal medyatör salgılayabileceği görüşündeyiz.

### Kaynaklar

1. Liu J, Fu T, Song F et al. (2015). Mast Cells Participate in Corneal Development in Mice. *Sci Rep*. 5: 1-14.
2. Bruze M, Gruvberger B, Fregert S. (2000). Chemical Skin Burns. *Handbook of Occupational Dermatology*. T Menné ve HI Maibach (editörler). Chapter 38. s. 325-332. *Hand Eczema*.
3. Levene RZ. (1962). Mast Cells and Amines in Normal Ocular Tissues. *Invest Ophthalmol*. 1 (4): 531-543.
4. Ercan F, Çetinel Ş. (2008). Mast Hücrelerinin Enflamasyondaki Rolü: İnsan ve Deneysel Hayvan Modelleri Üzerinde Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi.. *21 (2): 179-186*.
5. Özkorkmaz EG. (2008). Mast Hücreleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 2: 77-85.
6. Dilek FH, Öztürk F, Aktepe F, Ermiş S, Mutlu FM. (2007). Primer ve Nüks Pterijiyumlarda Mast Hücreleri ve Anjiyogenezis. *Türk Patoloji Derg*. 23 (3): 132-136.
7. Altan S, Oğurtan Z. (2017). Dimethyl Sulfoxide but not Indomethacin is Efficient for Healing in Hydrofluoric Acid Eye Burns. *Burns* 43 (1): 232-244.

8. Leonardi A, Motterle L, Bortolotti M. (2008). Allergy and the Eye. Clin Exp Immunol. 153 (1): 17-21.
9. Erpek S. (2004). Mast Hücreleri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 11 (2): 109-120.
10. Tajiri K, Sugiyama T, Katsumura K et al. (2016). Suppression of Conjunctival Scarring by Chymase Inhibitor in a Canine Symblypharon Model. Int J Ophthalmol & Eye Sci. 7: 6-12.
11. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L et al. (2014). Development of Mast Cells and Importance of Their Tryptase and Chymase Serine Proteases in Inflammation and Wound Healing. Adv Immunol. 122: 211-252.
12. Akkova YA, Güngör SG. (2012). Bakteriyel Keratit. Klinik Gelişim. 25: 66-71.
13. Allan Smith MR, Baird RS, Kashima et al (1979). Mast Cells in Ocular Tissues of Normal Rats and Rats Infected With *Nippostrongylus Brasiliensis*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 18(8): 863-867.
14. Ribatt D, Crivellato E. (2016). The Role of Mast Cell in Tissue Morphogenesis. Thymus, Duodenum, and Mammary Gland as Examples. Exp Cell Res. 34: 1105-1109.
15. Arslan O. (1998). Allerji ve Göz. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Allerji, s. 67-76, Astım Sempozyumu, İstanbul.
16. Özdemir Ö. (2004). Mast Hücresi ve Kanser: Tümör Dokusunda Mast Hücre Yoğunluğu, Etkileyen Faktörler ve Mast Hücre-Tümör Etkileşimleri. Kocatepe Tıp Dergisi. 5 (2): 1-8.
17. Ermiş SS, Aktepe F, İnan ÜÜ ve ark. (2003). Pterjium ve Mast Hücresi. Türkiye Klinikleri Oftalmoloji. 12: 92-95.
18. Butrus SI, Asraf FA, Laby DM et al. (1995). Increased Number of Mast Cells in Pterygia. Am J Ophthalmol. 119: 236-237.
19. Denizli B. (2009). Radyasyona Bağlı Akut Pulmoner Toksikitede Dimetil Sülfoksit'in Koruyucu Etkisinin <sup>99m</sup>Tc-Dietilentriaminpentaasetik Asit Transalveoler Klirens Sintigrafisi ve Histopatoloji ile Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s. 17-22, Edirne.

**Yazışma Adresi:**

\*Prof. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN  
Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 21280,  
Diyarbakır, Türkiye  
E-posta: [bsaruhan@dicle.edu.tr](mailto:bsaruhan@dicle.edu.tr)  
Tel: 0412 241 10 00