

Deneysel *Staphylococcus aureus* Yumuşak Doku Enfeksiyonlarında İbuprofenin Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması*

Investigation of the Effect of Ibuprofen on Wound Healing in Experimental *Staphylococcus aureus* Soft Tissue Infections

M. Uğur ÇİTİL¹, Ergun METE¹, E. Oğuzhan OĞUZ², Gülçin ABBAN METE², Barbaros ŞAHİN³, İlknur KALELİ¹

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

¹ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

² Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

² Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Denizli, Turkey.

³ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Araştırma Laboratuvarı, Denizli.

³ Pamukkale University Faculty of Medicine, Experimental Research Laboratory, Denizli, Turkey.

*Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (PAUBAP) tarafından desteklenmiş (Proje No: 2013TPF003) ve XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (12-16 Kasım 2014, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 30.12.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.02.2015

ÖZ

Yumuşak doku enfeksiyonları (YDE), normal deri florası ve deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda patojen bakterilerin kolonizasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bakteriyel YDE'nin çoğundan streptokok ve stafilokoklar sorumludur. İbuprofen gibi steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar, analjezik ve anti-proliferatif etkileri nedeniyle YDE'nde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bazı çalışmalarda, bu ilaçların antiproliferatif etkileri nedeniyle yara iyileşmesinin erken döneminde epitelizasyon ve anjiyogenezi geciktirdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada, immünoşüpresif farelerde *Staphylococcus aureus* ile oluşturulan YDE'nde, ibuprofenin yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 120 adet dişi Balb/c faresi kullanılmış; dört deney ve iki kontrol grubu oluşturulmuştur. Deney grupları; B (Bakteri grubu, n= 23), Bİ (Bakteri + İbuprofen grubu, n= 23), BA (Bakteri + Ampisilin grubu, n= 23) ve BİA (Bakteri + İbuprofen + Ampisilin grubu, n= 21) olarak; kontrol grupları ise, S1B2 (sadece immün şüpresyon yapılan grup, n= 15) ve S2B2 (Hiçbir işlem yapılmayan grup, n= 15) olarak belirlenmiştir. Farelerde

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Ergun Mete, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kınıklı, Denizli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 258 296 2455, **E-posta (E-mail):** ergunmete@pau.edu.tr

immün süpresyon siklofosamid uygulaması ile yapılmış; enfeksiyon ise metisiline duyarlı *S.aureus* ATCC 25923 bakterisi süpsansiyonunun (2×10^8 cfu/ml) sağ arka bacadan subkütan yolla verilmesi ile oluşturulmuştur. İbuprofen farelere gastrik gavaj yoluyla (50 mg/kg/gün), ampisilin ise intramusküler yoldan (100 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Hayvanlarda oluşan yara boyutları günlük olarak ölçülmüş ve birinci, üçüncü ve yedinci günlerde doku (epitel tabaka, bağ dokusu, sebace bezleri, ter bezleri) ve serum örnekleri alınmıştır. Alınan doku örnekleri hematoksilen-eozin (HE) boyama yöntemiyle histopatolojik olarak incelenmiş; serum örneklerinde IL-1, IL-6, TNF- α ve VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlenmiş ve ayrıca doku sitokin reaksiyonları immünohistokimyasal olarak (immünoperoksidaz boyama ile) değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, B ve B1 gruplarının yara boyutlarında, ikinci günden çalışmanın sonuna kadar belirgin bir değişim görülmemiştir ($p > 0.05$). BA ve B1A gruplarında ise yara boyutları her gün kademeli olarak küçülmüş ve yüzeysel kalmıştır. TNF- α ve IL-1 ortalama serum düzeyleri tüm gruplarda düşük bulunmuştur. Serum IL-6 ortalama değeri, B grubunda ilk günde diğer gruplara göre daha yüksek saptanmış ve bu fark B1 ve BA grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca üçüncü gün tüm gruplarda düşük bulunan serum VEGF değerleri, yedinci gün belirgin olarak artmıştır. Doku örneklerinin histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları da ELISA sonuçlarını desteklemiş ve serum sitokin paternleri ile benzer reaksiyon vermiştir. Sonuç olarak çalışmamızın verileri, *S.aureus*'un neden olduğu deneysel yumuşak doku enfeksiyonlarında ibuprofenin yara iyileşmesi üzerine hiçbir olumsuz etkisinin bulunmadığını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; yumuşak doku enfeksiyonu; ibuprofen; yara iyileşmesi; hayvan modeli.

ABSTRACT

Soft tissue infections (STIs) occur as a result of the colonization of pathogenic bacteria upon the destruction of normal skin microbial flora and the skin integrity. Streptococci and staphylococci are the most frequent causes of bacterial STIs. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ibuprofen are often used in STIs because of their analgesic and antipyretic effects. However, evidence suggests that these drugs might delay both epithelialization and angiogenesis in the early phases of wound healing because of an antiproliferative effect. The aim of this study was to investigate the effect of ibuprofen on the wound healing in STIs caused by *Staphylococcus aureus* in immunosuppressed mice. A total of 120 female Balb/c mice were used in the study and the mice were assigned to four test groups and two control groups. The test groups were defined as follows; B (Bacteria group, n= 23), B1 (Bacteria + Ibuprofen group, n= 23), BA (Bacteria + Ampicillin group, n= 23), B1A (Bacteria + Ampicillin + Ibuprofen group, n= 21); and the control groups were defined as follows; S1B2 (only immunosuppressed controls, n= 15) and S2B2 (Sham group). Immunosuppression was induced with cyclophosphamide and the experimental infection was generated by subcutaneous inoculation of bacterial suspension (2×10^8 cfu/ml) of methicillin-sensitive *S.aureus* ATCC 25923 to the right hind leg. Ibuprofen was given to the mice by gastric gavage (50 mg/kg/day), and ampicillin (100 mg/kg/day) by intramuscular injection. Wound sizes that appear in the animals were measured on a daily basis. Serum and tissue (epithelial tissue, connective tissue, sebaceous glands, sweat glands) samples were obtained on the first, third and seventh days. The tissue samples were examined histopathologically by hematoxylin-eosin (HE) staining method and IL-1, IL-6, TNF- α and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) levels were determined in serum samples by ELISA method. The tissue cytokine reactions were also evaluated by immunohistochemical (immunoperoxidase staining) method in tissue samples. In our study, no significant change was detected in the wound sizes of B and B1 groups from the second day to the end of study period ($p > 0.05$). On the other hand the wound dimensions of BA and B1A groups gradually decreased and remained superficial. The average serum levels of TNF- α and IL-1 was detected low in all groups. The mean value of serum IL-6 on the first day in group B was determined to be higher compared to other groups, and when this difference was compared to groups B1 and BA, and the control group, it was found statistically significant ($p < 0.05$). In addition, the VEGF levels which were detected low in all groups in the third day of infec-

tion increased significantly at the seventh day. The results of histopathologic and immunohistochemical studies have supported the results of ELISA and yielded similar results with serum cytokine patterns. In conclusion, our data indicated that ibuprofen has no negative effect on the wound healing in soft-tissue infections caused by *S.aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; soft tissue infection; ibuprofen; wound healing; animal model.

GİRİŞ

Normal deri florasının ve deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda patojen bakterilerin kolonizasyonu sonucu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (YDE) ortaya çıkmaktadır¹. Bakteriyel kaynaklı YDE'nin nedeni çoğunlukla gram-pozitif mikroorganizmalar olup, streptokoklar ve stafilokoklar ilk sırayı almaktadır¹. Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; NSAID) ise, analjezik ve antipiretik etkileri nedeniyle YDE'nda sıklıkla kullanılmaktadır^{2,3}. En fazla kullanılan NSAD'dan biri olan ibuprofen, fenilpropionik asit türevi olup siklooksijenaz izoenzimlerinin selektif olmayan inhibitörüdür². Bazı çalışmalarda sistemik ibuprofen kullanımının yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etkisi olduğu belirtilmekte; bu etkinin, ilacın proinflamatuvar sitokin (IL-1 β , TNF- α , vb) ve VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ekspresyonlarını değiştirerek epitelizasyon ve anjiyogenezi geciktirmesinden kaynaklandığı ifade edilmektedir⁴⁻¹⁰. Grup A streptokoklar (GAS)'ın neden olduğu YDE'nda ise, çelişkili veriler olmakla birlikte, NSAID kullanımının, immün sistemi baskılamak suretiyle prognozu kötü yönde etkilediği bildirilmektedir¹¹⁻¹³.

Yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotiğe ilaveten NSAID'ın kullanımı da tartışmalı bir konudur¹⁴⁻¹⁸. Bu konuda özellikle GAS üzerinde yapılmış çalışmalar^{12,13,15,18} mevcut olup, *S.aureus*'un neden olduğu YDE modelinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, immünosüpresif farelerde *S.aureus* ile oluşturulan YDE'nda ibuprofenin yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, farelerde deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonda, oluşan yara boyutları günlük olarak ölçülmüş; birinci, üçüncü ve yedinci günlerde alınan serum örneklerinde IL-1, IL-6, TNF- α ve VEGF düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlenmiş; alınan doku örnekleri ise histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı (12/02/2013-PAUHDEK-2013/03) ile gerçekleştirilen bu çalışmada, 120 adet 18-22 gr dişi Balb/c fareleri kullanıldı. Fareler bir kafeste 6 tane olacak şekilde 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortam sağlanarak, ısıtma ve nemlendirme yapılabilen bir ortamda, standart fare yemi ve su kullanılarak barındırıldı. YDE oluşturmak amacıyla metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) ATCC 25923 suşu kullanıldı. Nutrient buyyon besiyerinde 37°C'de 24 saat çoğaltılan bakterilerden hazırlanan süspansiyon, 0.5 McFarland bulanıklık skalası kullanılarak hücre sayısı 2×10^8 cfu/ml olacak şekilde ayarlandı ve bütün çalışmalarda bu yoğunluk kullanıldı.

Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışma için dört deney ve iki kontrol grubu oluşturuldu ve grup içindeki hayvan sayıları, enfeksiyon oluşumundan sonra 1., 3. ve 7. günde değerlendirilecek şekilde düzenlendi (Tablo I). Tüm deney gruplarına immün sistemin baskılanması için siklofosamid uygulandı ve *S.aureus* ile enfekte edildi. Farelerde immün süpresyon, Dai ve arkadaşlarının¹⁹ tanımladıkları şekilde oluşturuldu. İlk siklofosamid dozu, farelerin enfekte edilmesinden 4 gün önce 150 mg/kg olacak şekilde, 2. doz farelerin enfekte edilmesinden 1 gün önce 100 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi. Enfeksiyon oluşturulacak gruptaki farelerin sağ arka bacağı steril traş bıçağı ile traş edildi. Calame ve arkadaşları²⁰ tarafından tanımlandığı şekilde; 2×10^8 cfu/ml bakteri süspansiyonu 100 µl subkütan yolla verildi. Çalışmaya dahil edilen tüm farelerin günlük fotoğrafları çekildi ve yara yeri "tahmini alan hesaplama yöntemiyle" ölçülerek mm² olarak not edildi.

İbuprofen (Sigma Aldrich, 14883-1G, İstanbul), Reagen-Shaw ve arkadaşları²¹ tarafından tanımlandığı şekilde gastrik gavaj yoluyla 50 mg/kg/gün üç eşit doza bölünerek 8'er saat aralıklarla verildi. Ampisilin, (Sigma Aldrich, A9393-5G, İstanbul) Mal ve arkadaşlarının²² tanımladığı gibi intramusküler (IM) yoldan 100 mg/kg olarak günde tek doz olacak şekilde uygulandı.

Belirlenmiş olan günlerde (1., 3., 7.) uygun anestezi altında intrakardiyak yoldan kan alındı. Alınan kan 2000x rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı ve çalışma anına kadar -20°C'de saklandı.

Serum sitokin düzeylerinin saptanması

Serumda sitokin düzeyleri ticari ELISA kitleri kullanılarak (TNF-α, IL-1 ve IL-6 için Mouse ELISA, AssayPro, ABD; VEGF için Mouse ELISA, Wuhan Eiaab Science Co., Çin) araştırıldı.

Histolojik ve immünohistokimyasal inceleme

Alınan dokular, %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletilerek tespit edildi ve 72 saat sonunda rutin ışık mikroskopunda takibe alındı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM-2125 rotary mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler elde edildi. Kesitlere, hematoksilin eozin (HE) boyama ve TNF-α, IL-1, IL-6 ve VEGF'i belirlemek amacıyla

Tablo I. Farelerin Deney ve Kontrol Gruplarına Göre Dağılımı

Gruplar	Kod	Yapılan uygulama	Toplam sayı	Kan alınma zamanları		
				1. gün	3. gün	7. gün
Deney	B	Bakteri + serum fizyolojik	23	7	8	8
	Bİ	Bakteri + ibuprofen	23	7	8	8
	BA	Bakteri + ampisilin	23	7	8	8
	BİA	Bakteri + ibuprofen + ampisilin	21	7	7	7
Kontrol	S1B2	Sadece immün süpresyon yapıldı	15	5	5	5
	S2B2	Hiçbir işlem yapılmadı (<i>Sham</i> grubu)	15	5	5	5

immünohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. Kesitler daha sonra Olympus BX51 marka ışık mikroskobu (Japonya) ve Olympus DP72 dijital kamera (Japonya) ile görüntüledi. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları; (+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (/+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok, şeklinde değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Grupları kendi aralarında karşılaştırmak için istatistiksel değerlendirme One-Way ANOVA testi ile yapıldı; $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

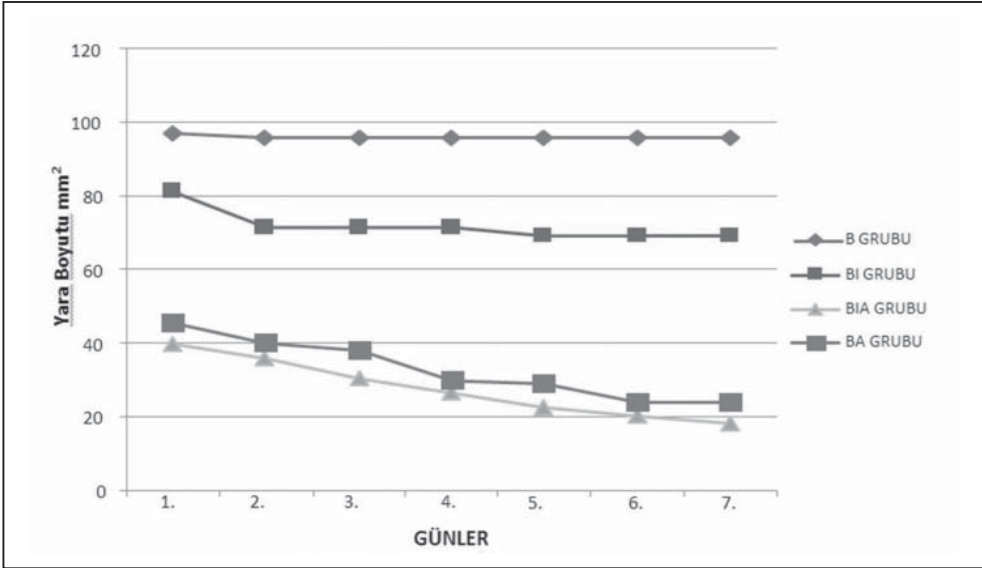
Yara Boyutlarının Değerlendirilmesi

İlk gün için tespit edilen ortalama yara boyutları B grubunda (96 mm^2) en büyük olup, bunu sırasıyla B1 (81 mm^2), B1A (45 mm^2) ve BA (39 mm^2) grupları izlemiştir. B grubunda yara büyüklüğü çalışma sonuna kadar aynı kalırken, yara derinliğinde artış meydana gelmiştir. Üçüncü günde nekroz başlamış; 4. günden itibaren nekroz ilerlemiş ve amputasyona bağlı ekstremitte kaybı ile sonuçlanmıştır. B1 grubunda ikinci gün eksuda drenajı ile ülser oluşmuştur. İkinci günde gerçekleşen bu küçülme, B ve B1A gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış (sırasıyla; $p = 0.12$, $p = 0.07$); ancak BA grubuyla istatistiksel olarak belirgin bir fark tespit edilmiştir ($p = 0.01$). Daha sonraki günlerde yara boyutlarında değişim gözlenmemiştir. B1 grubunda; B grubunda görülen yara derinlik artışı saptanmamıştır. B1 grubunda nekroz oluşumu, B grubuna göre geç olarak 4. günde gerçekleşmiş; hiçbir faredede amputasyona bağlı ekstremitte kaybı olmamıştır.

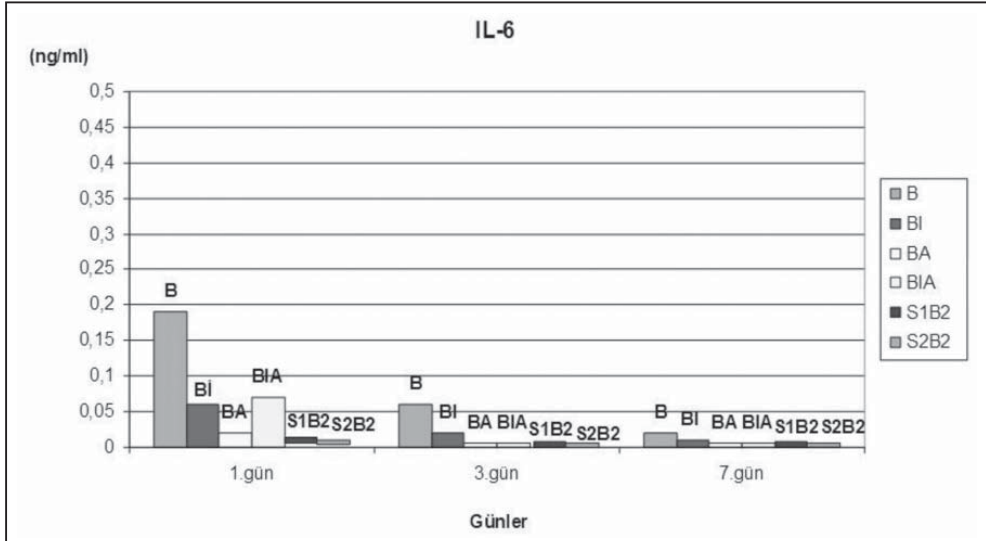
B1A ve BA gruplarında yara boyutlarında genellikle günler içinde küçülme görülürken, B1A grubunda en belirgin küçülme 4. ve 5. günde yaşanmıştır. Her iki grupta da yara derinliği oluşmayarak yüzeysel kalmıştır. B1A ile BA grupları yara boyutları açısından karşılaştırıldığında, hiçbir günde istatistiksel fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Yara boyutlarının günlere ve gruplara göre değişimi Şekil 1'de gösterilmiştir.

Sitokin Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Ortalama TNF- α ve IL-1 düzeylerinde 1., 3. ve 7. günlerde B1 grubuyla diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Serum IL-6 ortalama değeri, 1. günde B grubunda diğer gruplara göre daha yüksek saptanmış; bu fark B1, BA ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Birinci günde oluşan bu fark 2. ve 3. günde ortadan kalkmıştır. Serum IL-6 ortalama değerinde 1., 3. ve 7. günlerde B1 grubuyla diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 2). Tüm gruplarda 3. günde düşük olarak görülen serum VEGF değerleri 7. günde belirgin olarak artmıştır. B1 grubuyla diğer çalışma grupları arasında 3. ve 7. günde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır.



Şekil 1. Yara boyutlarının günlere ve gruplara göre değişim grafiği (B grubu: Bakteri grubu; Bİ grubu: Bakteri + İbuprofen grubu; BA grubu: Bakteri + Ampisilin grubu; BIA grubu: Bakteri + İbuprofen + Ampisilin grubu).



Şekil 2. Tüm grupların 1., 3. ve 7. günde ortalama IL-6 ölçüm değerleri (B grubu: Bakteri grubu; Bİ grubu: Bakteri + İbuprofen grubu; BA grubu: Bakteri+ Ampisilin grubu; BIA grubu: Bakteri+ İbuprofen + Ampisilin grubu; S1B2: Sadece immün süpresyon yapılan kontrol grubu; S2B2: Hiçbir işlem yapılmayan kontrol grubu).

İmmünohistokimyasal (İHK) Değerlendirme Sonuçları

Değerlendirmeler; epitel, bağ dokusu, yağ bezleri ve ter bezlerinde ayrı ayrı yapılmıştır. Yedinci günde B grubunda yapılan İHK boyamada, deri dokusunda dejenerasyon çok arttığı için değerlendirme yapılamamıştır.

TNF- α reaksiyonu; 1. ve 3. gün tüm gruplarda zayıf pozitif veya negatif olarak görülmüştür (Tablo II, III) (Resim 1, 2). Yedinci gün; Bİ, BA ve BİA grubunda bağ dokusu lifleri pozitif bulunmuş, bu üç grubun epitel dokusunda reaksiyon çok zayıf pozitif sonuç vermiştir. BA ve BİA gruplarında yağ bezlerinde reaksiyon pozitif olarak izlenmiştir. Reaksiyonlar sitoplazmik ve yaygın şekilde olup, çekirdek boyanması görülmemiştir (Tablo IV) (Resim 3).

IL-1 reaksiyonu; 1. gün en yüksek olarak B grubunda görülmüş, diğer tüm gruplarda zayıf pozitif veya negatif reaksiyon izlenmiştir (Tablo II) (Resim 1). Üçüncü gün; IL-1 reaksiyonu tüm gruplarda zayıf pozitif ya da negatiftir (Tablo III) (Resim 2). Yedinci gün; Bİ, BA ve BİA gruplarında bağ dokusu liflerinde pozitif reaksiyon gözlenirken tüm grupların epiteli negatif bulunmuştur (Tablo IV) (Resim 3).

IL-6 reaksiyonu; 1. gün epitel dokusunda B grubu dışındaki diğer gruplarda negatif olarak izlenirken, bağ dokusu bütün gruplarda pozitif olarak gözlenmiştir (Tablo II) (Resim 1). Üçüncü gün; epitel dokusu tüm gruplarda zayıf pozitif veya negatif reaksiyon olarak izlenirken bağ dokusunda reaksiyon ise Bİ grubu hariç bütün gruplarda pozitiftir. Ter ve yağ bezlerinde IL-6 reaksiyonu ise BA grubu ve BİA grubunda pozitif bulunmuştur (Tablo III) (Resim 2). Yedinci gün; epitel dokusunda IL-6 reaksiyonu tüm gruplarda negatif olarak görülmüştür. Bağ dokusu liflerinde pozitif reaksiyon ise B grubu hariç diğer tüm gruplarda izlenmiştir (Tablo IV) (Resim 3).

Tablo II. Birinci Günde TNF- α , IL-1, IL-6 ve VEGF'in İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

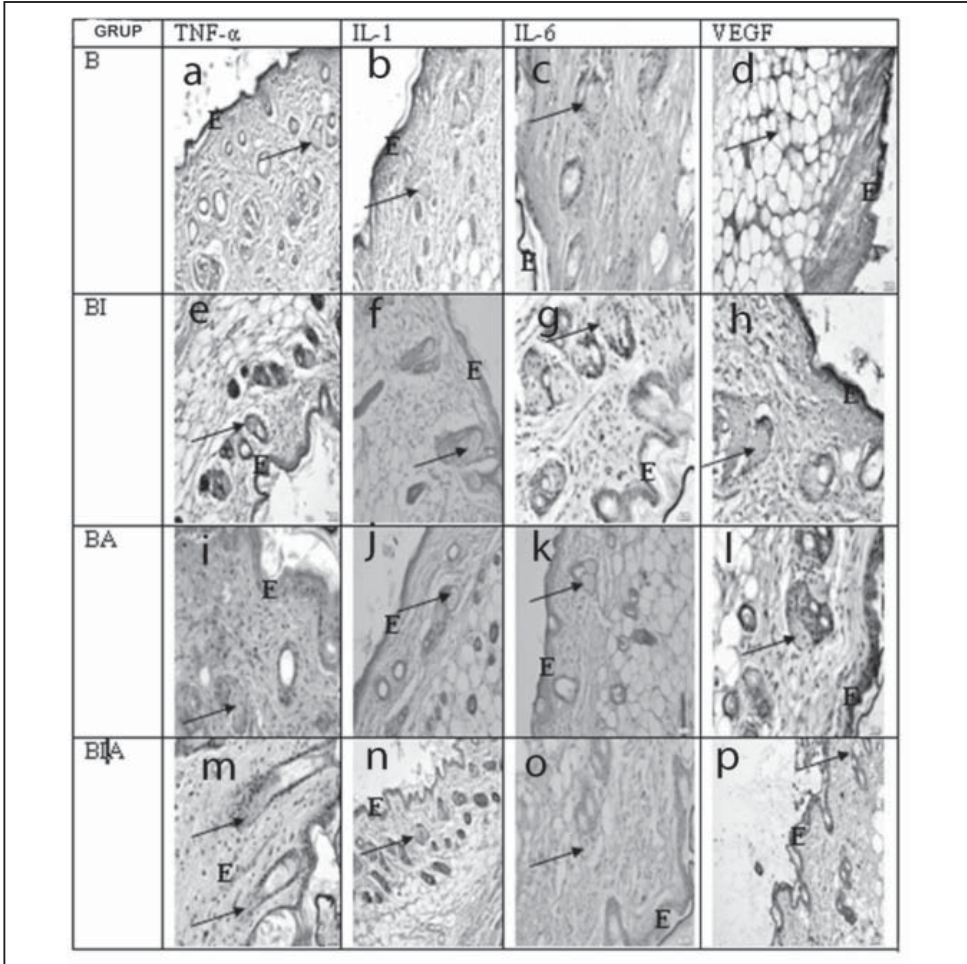
	TNF				IL-1				IL-6				VEGF			
	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA
Epitel tabaka	-	+*	-	-	++	-	-	-	+++	-	-	-	++	++	+++	+++
Bağ dokusu	-	+	+	-	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
Sebase bezleri	-	+	+/-	-	++	+	-	+	+++	-	-	-	+	+	++	+
Ter bezleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++

* Epitel hücrelerinin apikal sitoplazmasında pozitif reaksiyon.

Tablo III. Üçüncü Günde TNF α , IL-1, IL-6 ve VEGF'in İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

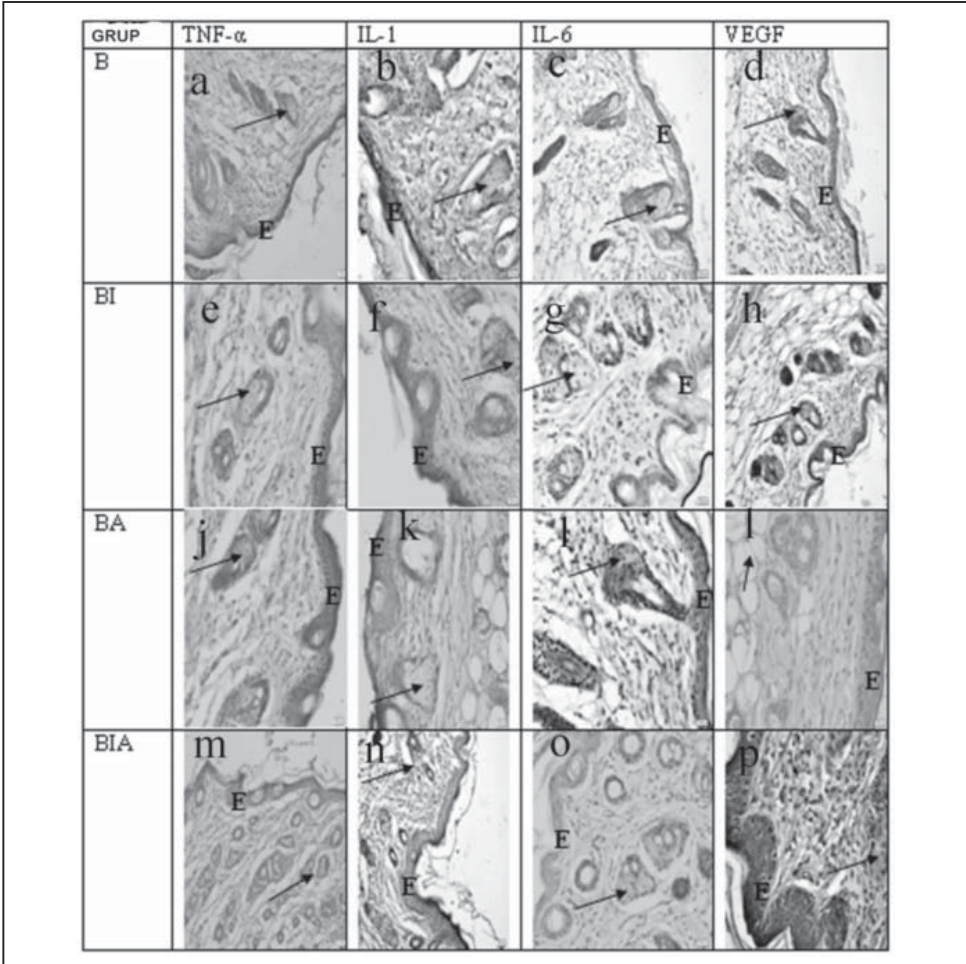
	TNF				IL-1				IL-6				VEGF			
	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA
Epitel tabaka	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	++	-
Bağ dokusu	+	+	+	+/-	+	-	-	-	++*	-	++	++	++	+	++	+
Sebase bezleri	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+++	++	+/-
Ter bezleri	-	-	-	-	++	-	-	-	-	+	+++	-	++	+	-	+/-

* Reaksiyon bazal laminada çok kuvvetli.



Resim 1. Birinci günde deri dokusunda TNF- α , IL-1, IL-6 ve VEGF'in immünohistokimyasal ekspresyonu (E: Epitel; Ok: Yağ bezleri) (Immünoperoksidaz, 200x).

VEGF reaksiyonu; 1. gün tüm gruplarda epitel ve bağ dokusunda kuvvetli olarak gözlemlenmiş, en yoğun boyanma BA ve BİA grubunda izlenmiştir. Bu gruplarda ter ve yağ bezleri de kuvvetli pozitifdir. B ve Bİ gruplarında ise reaksiyon pozitif olmasına karşın, bu pozitiflik diğer gruplardan daha azdır. Boyanma, BA grubu dışında sitoplazmik ve yaygın olarak görülmüş; ancak BA grubunda hem sitoplazmik hem de çekirdek boyanması dikkati çekmiştir (Tablo II), (Resim 1). Üçüncü gün; epitel, bağ dokusu, ter ve yağ bezlerinde VEGF reaksiyonu B, Bİ ve BA gruplarında zayıf veya orta derecede pozitif olarak görülmüştür. BİA grubunda ise epitel reaksiyonu negatif olmasına karşın, bağ dokusu ve yağ bezlerinde reaksiyon pozitifdir (Tablo III) (Resim 2). Yedinci gün epitel dokusunda VEGF reaksiyonu BA ve BİA grubunda kuvvetli pozitif, Bİ grubunda negatif olarak izlenmiş; B grubunda ise epitel görülmemiştir. Bağ dokusu liflerinde VEGF reaksiyonu; Bİ, BA ve BİA

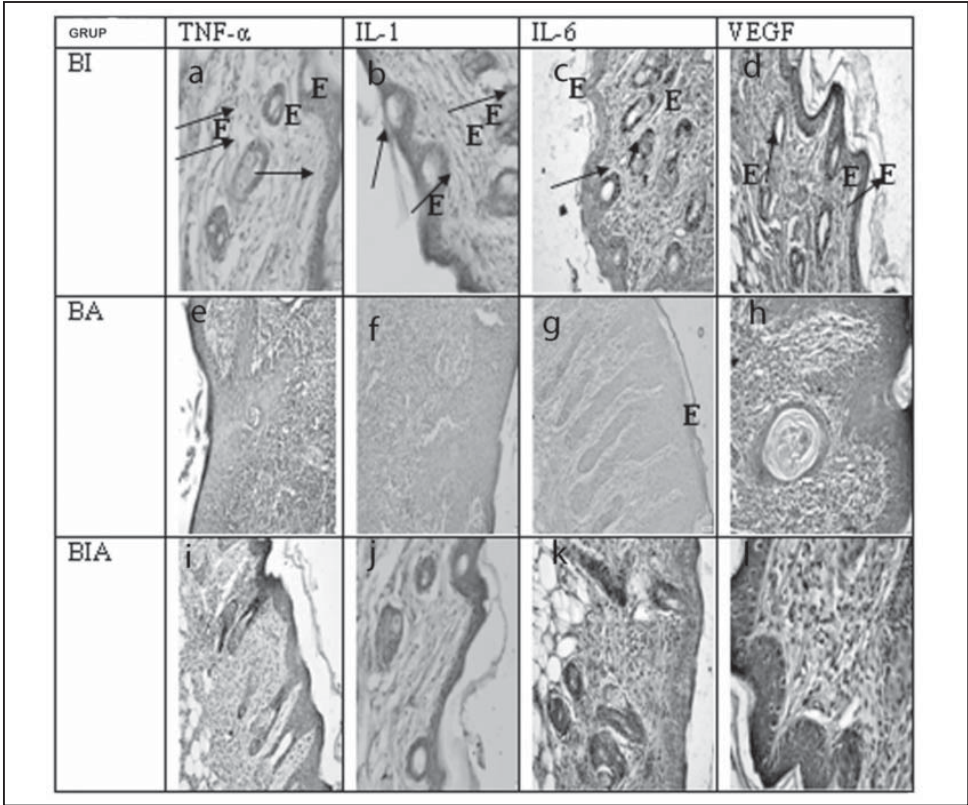


Resim 2. Üçüncü günde deri dokusunda TNF α , IL-1, IL-6 ve VEGF'in immünohistokimyasal ekspresyonu (E: Epitel; Ok: Yağ bezleri) (İmmünoperoksidaz, 200x).

Tablo IV. Yedinci Günde TNF α , IL-1, IL-6 ve VEGF'in İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

	TNF				IL-1				IL-6				VEGF			
	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA	B	BI	BA	BIA
Epitel tabaka	*	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
Bağ dokusu	*	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+
Sebase bezleri	*	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Ter bezleri	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* B grubunda epitel ve epitel altı bağ doku izlenmedi.

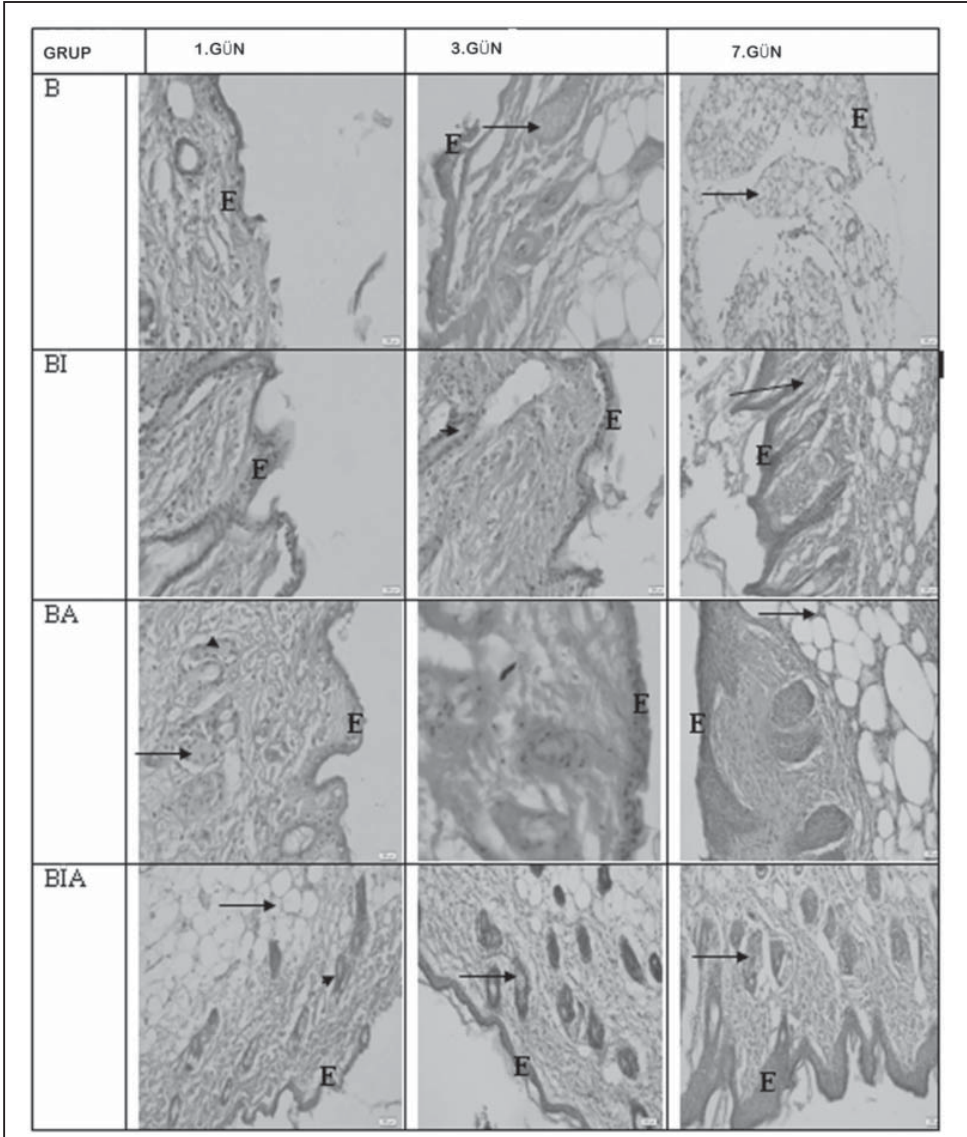


Resim 3. Yedinci günde deri dokusunda TNF α , IL-1, IL-6 ve VEGF'in immünohistokimyasal ekspresyonu (B grubu çalışılmamıştır) (E: Epitel; Ok: Yağ bezleri) (İmmünoperoksidaz, 200x).

gruplarında zayıf pozitif; yağ bezlerinde reaksiyon BA ve BİA grubunda zayıf pozitifdir. Ter bezleri reaksiyonu tüm gruplarda negatif bulunmuştur. Reaksiyonlar sitoplazmik ve yaygın şekilde olup, çekirdek boyanması yoktur (Tablo IV), (Resim 3).

Histolojik Değerlendirme Sonuçları

Birinci günde; B grubunda epitel dokunun yer yer kaybolduğu, dermis varlığının devam ettiği, yağ bezleri, kıl follikülleri ve ter bezlerinin gözleendiği belirlenmiştir. Diğer üç grubun epitelleri süreklidir ve kesintiler yoktur. Ancak bazı alanlarda epitel hücrelerinin oldukça yassı olduğu gözlenmiştir. Dermiste yağ bezleri, ter bezleri ve kıl follikülleri normal yapısında izlenmiştir. Üçüncü günde; B grubunda 1. günde izlenen epitel doku kaybının boyutlarının artarak devam ettiği saptanmış, aynı zamanda bağ dokusu liflerinin birbirlerinden ayrılarak arada boşluklar oluşturdukları dikkati çekmiştir. Yağ bezleri, ter bezleri ve kıl follikülleri normal görünümündedir. Diğer üç grupta epitel doku varlığını devam ettirmekle birlikte; BA ve BİA grubunda epitel dokuda hücre sıralarının arttığı izlenmiştir. Bİ grubunda epitel hücrelerinin boyunun uzadığı dikkati çekmiş; dermiste



Resim 4. Tüm grupların günlere göre histolojik değişimleri (E: Epitel; Ok: Yağ bezleri; Ok başı: Ter bezleri) (Hematoksilen-eozin, 200x).

yağ bezleri, ter bezleri ve kıl follikülleri normal yapısında gözlenmiştir. Yedinci günde; B grubunda epitel ve dermis izlenmezken, diğer üç grupta epitelin çok katlı olduğu ve keratinize olduğu belirlenmiştir. BA ile BİA grubunda epitel kalınlığı Bİ grubuna göre daha fazladır. Dermiste yağ bezleri, ter bezleri ve kıl follikülleri normal yapısında izlenmiştir. Çalışma gruplarının histolojik boyama görüntüleri Resim 4’de verilmiştir.

TARTIŞMA

Dokularda oluşan enfeksiyon veya travmatik hasar sonucu inflamasyon ortaya çıkmakta ve bu süreçte immün sistem hücreleri tarafından çeşitli sitokinler salınmaktadır. IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler, enfeksiyonlarda vücudun immün yanıtını oluşturan önemli mediatörlerdir. IL-1 ve TNF- α , inflamatuvar yanıtta önemli olan prostaglandin ve lökotrien gibi eikozanoidlerin sentezlenmesine sebep olur²³. İbuprofenin sitokinler üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, bazı araştırmacılar^{24,25} ibuprofenin inflamatuvar yanıtta sitokin düzeylerini artırdığını bildirirken, bazıları²⁶ değiştirmedeğini ifade etmektedir. Weng ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında, ibuprofenin farelerde oluşturulan deneysel *S.pyogenes* YDE üzerine etkisi incelenmiş ve enfeksiyonun 1, 3, 5 ve 7. günlerinde serum ve enfekte dokuda IL-6 düzeyi, deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Deney grubunda 3. günde serum IL-6 düzeyi pik yaparken, kontrol grubunda tespit edilemez düzeydedir. Benzer olarak araştırmacılar, enfekte dokuda TNF- α düzeyini, deney grubunda kontrol grubuna göre özellikle 3. günde anlamlı olarak yüksek bulmuş; serum TNF- α düzeyinin ise her iki grup için 1. günde tespit edilemez düzeyde olduğunu bildirmişlerdir¹³. Bu çalışmanın sonucunda; ibuprofenin, proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-6 düzeylerini serum ve dokuda artırarak, yara iyileşmesini geciktirdiği düşünülmüştür¹³. Bizim çalışmamızda, yara enfeksiyonu oluşumunda *S.aureus* kullanılmış; yara iyileşmesinde sadece ibuprofenin değil, ampisilin ve her iki ilacın beraber kullanımının da etkinliği incelenmiştir. Weng ve arkadaşlarının¹³ buldukları sitokin pikini yakalamak için 1., 3. ve 7. günlerde serumdan ELISA çalışması yapılmış; yine aynı günlerde doku değişimlerini görebilmek amacıyla doku örnekleri olarak HE boyama ve immünohistokimyasal (İHK) çalışma ile doku sitokin reaksiyonları değerlendirilmiştir. Çalışmamızda dokuda IL-6 reaksiyonu, tüm gruplarda 1. günde pozitif olarak görülürken, Weng ve arkadaşlarının¹³ çalışmasına göre pik yapması beklenen 3. günde B1 grubunda diğer grupların aksine negatif olarak görülmüştür. Bu veri Weng ve arkadaşlarının¹³ bulmuş oldukları ibuprofen grubundaki kontrol grubuna göre dokudaki yüksek IL-6 sonuçlarıyla çelişmektedir. Yedinci günde ise IL-6 doku reaksiyonları 1. ve 3. güne nispeten zayıf pozitif olarak gözlenmiştir. Diğer taraftan, Weng ve arkadaşlarının¹³ buldukları doku TNF- α değerleri de, bizim çalışmamızda bulunan zayıf veya negatif TNF- α reaksiyonlarıyla çelişmektedir.

Çalışmamızda elde edilen serum sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde; IL-6 düzeyinin B grubunda belirgin olarak yüksek olduğu saptanmış, bu fark B1 ve BA gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.005$). İlk gün görülen bu yükseklik takip eden günlerde azalmıştır. Daha önceki çalışmalar²⁷ ışığında, yüksek IL-6 ve düşük TNF- α düzeylerinin siklofosamid kullanımı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Siklofosamidin sitokinler üzerine etkisi tartışmalı olup, bazı çalışmalarda²⁷ siklofosamidin sitokin düzeylerini artırdığı, bazılarında^{28,29} ise azalttığı rapor edilmiştir. Serum IL-1 düzeylerine bakıldığında ise; B1 grubuyla diğer gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar Sirota ve arkadaşlarının²⁴ bulduğu serum IL-1 sonuçlarına benzemektedir. Aynı şekilde, B1 grubunda 1., 3. ve 7. günlerde doku IL-1 reaksiyonları zayıf pozitif veya negatif olarak görülmüş ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında belirgin bir fark bulunmamıştır.

VEGF, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan çok yönlü trombosit kaynaklı bir büyüme faktörüdür. VEGF'in endotelial anjiogenez, kemotaksis ve endotel hücrelerinde mitojenik etki ile damar gelişimini uyarmasının yanı sıra morfogenezde de önemli etkisi vardır³⁰. Trombositler, nötrofil, makrofaj, düz kas ve endotel hücreleri, fibroblastlar ve diğer birçok hücreden salınan VEGF, endotel yüzeyinde eksprese edilen kendi reseptörlerine bağlanarak anjiogenezi başlatır. Çok yaygın olarak kullanılan siklofosamid, doksorubisin ve paklitaksel gibi anti-kanser ilaçların anti-anjiogenez etkileri bilinmektedir^{31,32}. Beharry ve arkadaşlarının³³ ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, düşük ve yüksek doz ibuprofen uygulanan deney grubunda retinada VEGF düzeylerinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında baskılanmış olduğu gözlenmiş ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak serum VEGF düzeylerinin, her iki grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır³³. Bizim çalışmamızda serum VEGF düzeyleri; tüm gruplarda 3. günde 7. güne göre daha düşük bulunmuş, 7. günde ise anlamlı bir artış görülmüştür. Bu farkın, kullanılan siklofosamid ile ilişkili olabileceği düşünülmüş, 3. ve 7. gün için B1 grubuyla diğer gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Bu sonuç, Beharry ve arkadaşlarının³³ bulmuş oldukları serum VEGF sonuçlarına benzemektedir. Çalışmamızda saptanan doku VEGF reaksiyonları ise B1 grubunda; 1., 3. ve 7. günde diğer gruplara göre daha zayıf olarak görülmüştür. Bu sonuçlar da, Beharry ve arkadaşlarının³³ buldukları, ibuprofen kullanımıyla dokuda oluşan düşük VEGF sonuçlarına benzemektedir.

İbuprofenin bakteriyel enfeksiyonlar üzerine etkisi tartışmalı bir konudur. Bazı araştırmacılar antiinflamatuvar ve analjezik özelliğinin yanında, ibuprofenin antibakteriyel etkisinin de varlığını iddia etmişlerdir^{34,35}. Ancak Groppo ve arkadaşları³⁶ tarafından hayvan modeli ile yapılan bir çalışmada; stafilokok kaynaklı YDE'nde sodyum diklofenakın serum ve dokuda amoksisilin konsantrasyonunu azaltarak yara iyileşmesini geciktirdiği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ibuprofenin antibakteriyel etkisi in vivo ve in vitro olarak değerlendirilmemiştir. Ancak, sadece bakteri verilen B grubunda gözlenen iştah kaybı, canlılık azalması ve tüylerin dökülmesi gibi belirtiler bakteri+ibuprofen verilen B1 grubunda gözlenmemiştir. B1 grubunda nekroz başlangıcının B grubuna göre daha geç gerçekleşmesi, B grubunda görülen yara derinliğindeki artışın B1 grubunda görülmemesi ve B grubunda görülen amputasyona bağlı ekstremitte kaybının B1 grubunda hiçbir faredede olmaması, ibuprofenin antibakteriyel etkisinin varlığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar, yara yerinden yapılacak olan bakteri sayımı gibi in vivo çalışmalara ve özellikle *S.aureus* ile yapılacak in vitro çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

İbuprofen ve ampisilin klinikte beraber kullanımının tedaviye etkisi ile ilgili veriler sınırlı olmakla beraber, daha çok akut otitis media modeli üzerinde yapılan çalışmalar göze çarpmaktadır^{37,38}. Bazı çalışmalar³⁷ enfeksiyonun tedavisinde ibuprofen ve ampisilin beraber kullanımının, tek başına ampisilin kullanımına göre belirgin bir yararının olmadığı yönündeyken, bazı çalışmaların³⁸ sonuçları ise adeta her iki ilacın beraber kullanımını teşvik etmektedir. Bizim çalışmamızda, başlangıç yara boyutu bakteri + ampisilin verilen BA grubunda, bakteri + ampisilin + ibuprofen verilen B1A grubuna göre küçük olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). İlerleyen günlerde de bu iki grup arasında yara boyutlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Benzer olarak serum sitokin düzeylerinde de her iki grup arasında, tüm

günlerde istatistiksel bir fark yoktur ($p > 0.05$). Her iki grupta da yaralar yüzeysel kalırken, 7. günde yara kapanması gerçekleşmemiştir. İHK reaksiyonlar değerlendirildiğinde, her iki grup için benzer reaksiyonlar görülmüştür. Yara boyutları, HE boyama, İHK reaksiyonlar ve serum sitokin düzeyleri dikkate alındığında, prognozda; tek başına ampicilin kullanımının her iki ilacın beraber kullanımına göre çok belirgin bir fark olmasa da daha iyi olduğu yönündedir. Sonuç olarak çalışmamızın verileri, *S.aureus*'un neden olduğu yumuşak doku enfeksiyonlarında, ibuprofenin yara iyileşmesine hiçbir olumsuz etkisinin bulunmadığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Dryden MS. Complicated skin and soft tissue infection. J Antimicrob Chemother 2010; 65(Suppl 3): iii35-44.
2. Bushra R, Aslam N. An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. Oman Med J 2010; 25(3): 155-1661.
3. Williams K. Evidence on NSAID use in soft tissue injuries. Nurs Times 2012; 108(45): 12-4.
4. Divedi S, Tiwari SM, Sharma A. Effect of ibuprofen and diclofenac sodium on experimental wound healing. Indian J Exp Bio 1997; 35(11): 1243-5.
5. Qiu HB, Pan JQ, Zhao YQ, Chen DC. Effects of dexamethasone and ibuprofen on LPS-induced gene expression of TNF alpha, IL-1 beta, and MIP-1 alpha in rat lung. Zhongguo Yao Li Xue Bao 1997; 18(2): 165-8.
6. Tarnawski AS, Jones MK. Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: molecular mechanisms and clinical implications. J Mol Med (Berl) 2003; 81(10): 627-36.
7. Dahners LE, Mullis BH. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone formation and soft-tissue healing. J Am Acad Orthop Surg 2004; 12(3): 139-43.
8. Krischak GD, Augat P, Claes L, Kinzl L, Beck A. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats. J Wound Care 2007; 16(2): 76-8.
9. Shahriari S, Rezaei A, Jalalzadeh SM, Mani K, Zamani A. Effect of Ibuprofen on IL-1 β , TNF- α and PGE2 levels in periapical exudates: a double blinded clinical trial. Iran J Immunol 2011; 8(3): 176-82.
10. Chen MR, Dragoo JL. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2013; 21(3): 540-9.
11. Stevens DL. Could nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) enhance the progression of bacterial infections to toxic shock syndrome? Clin Infect Dis 1995; 21(4): 977-80.
12. Aronoff DM, Bloch KC. Assessing the relationship between the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and necrotizing fasciitis caused by group A streptococcus. Medicine (Baltimore) 2003; 82(4): 225-35.
13. Weng TC, Chen CC, Toh HS, Tang HJ. Ibuprofen worsens *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in mice. J Microbiol Immunol Infect 2011; 44(6): 418-23.
14. Rissing JP, Buxton TB. Effect of ibuprofen on gross pathology, bacterial count and levels of prostaglandin E2 in experimental staphylococcal osteomyelitis. J Infect Dis 1986; 154(4): 627-30.
15. Guibal F, Muffat-Joly M, Terris B, Garry L, Morel P, Carbon C. Effects of diclofenac on experimental streptococcal necrotizing fasciitis (NF) in rabbit. Arch Dermatol Res 1998; 290(11): 628-33.
16. Huang A, Palmer LS, Hom D, Anderson AE, Kushner L, Franco I. Ibuprofen combined with antibiotics suppresses renal scarring due to ascending pyelonephritis in rats. J Urol 1999; 162(4): 1396-8.
17. Souyri C, Olivier P, Grolleau S, Lapeyre-Mestre M; French Network of Pharmacovigilance Centres. Severe necrotizing soft-tissue infections and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clin Exp Dermatol 2008; 33(3): 249-55.
18. Hamilton SM, Bayer CR, Stevens DL, Bryant AE. Effects of selective and nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs on antibiotic efficacy of experimental group A streptococcal myonecrosis. J Infect Dis 2014; 209(9): 1429-35.

19. Dai T, Kharkwal GB, Tanaka M, Huang YY, Bil de Arce VJ, Hamblin MR. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence* 2011; 2(4): 296-315.
20. Calame W, Feitsma HI, Ensing GJ, Goedemans WT, Camps JA, Van Furth R. Detection of a local staphylococcal infection in mice with technetium-99m-labeled polyclonal human immunoglobulin. *J Nucl Med* 1991; 32(3): 468-74.
21. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22(3): 659-61.
22. Mal P, Ghosh D, Bandyopadhyay D, Dutta K, Bishayi B. Ampicillin alone and in combination with riboflavin modulates *Staphylococcus aureus* infection induced septic arthritis in mice. *Indian J Exp Biol* 2012; 50(10): 677-89.
23. Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(3): 701-21.
24. Sirota L, Shacham D, Punsky I, Bessler H. Ibuprofen affects pro- and anti-inflammatory cytokine production by mononuclear cells of preterm newborns. *Biol Neonate* 2001; 79(2): 103-8.
25. Ehsani M, Moghadamnia AA, Zahedpasha S, et al. The role of prophylactic ibuprofen and N-acetylcysteine on the level of cytokines in periapical exudates and the post-treatment pain. *Daru* 2012; 20(1): 30.
26. Sepehri G, Pouranjbar M, Kashanian M, Khachaki AS, Sepehri E. The effect of a prophylactic dose of ibuprofen of plasma level of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha in a 1500 m running practice. *Am J Applied Sci* 2011; 8(1): 50-4.
27. Marcinkiewicz J, Bryniarski K, Ptak W. Cyclophosphamide uncovers two separate macrophage subpopulations with opposite immunogenic potential and different patterns of monokine production. *Cytokine* 1994; 6(5): 472-7.
28. Herodin F, Mestries JC, Janodet D, Martin S, Mathieu J, Gascon MP. Recombinant glycosylated human interleukin-6 accelerates peripheral blood platelet count recovery in radiation-induced bone marrow depression in baboons. *Blood* 1992; 80(3): 688-95.
29. Chen YF, Wu ZM, Xie C, Bai S, Zhao LD. Expression level of IL-6 secreted by bone marrow stromal cells in mice with aplastic anaemia. *ISRN Hematol* 2013; 2013: 986219.
30. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.
31. Eming SA, Smola H, Krieg T. Treatment of chronic wounds: state of the art and future concepts. *Cells Tissues Organs* 2002; 172(2): 105-17.
32. Eming SA, Hubbell JA. Extracellular matrix in angiogenesis: dynamic structures with translational potential. *Exp Dermatol* 2011; 20(7): 605-13.
33. Beharry KD, Modanlou HD, Hasan J, et al. Comparative effects of early postnatal ibuprofen and indomethacin on VEGF, IGF-I, and GH during rat ocular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(7): 3036-43.
34. Kumudhavalli MV, Chandira M, SriPriya D, Jayakar B. Studies on synthesis, method development, characterization and antimicrobial activities of ibuprofen lysinate. *Int J Pharm Bio Sci* 2010; 1(2): 1-25.
35. Mohamed SK, Albayati M, Omara WAM, et al. Functionalization of ibuprofen core structure compound: Part 1. Synthesis of potential chemotherapeutic agents incorporated ibuprofen substructure and their in vitro antimicrobial study. *J Chem Pharm Res* 2012; 4(7): 3505-17.
36. Groppo FC, Simões RP, Ramacciato JC, Rehder V, de Andrade ED, Mattos-Filho TR. Effect of sodium diclofenac on serum and tissue concentration of amoxicillin and on staphylococcal infection. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(1): 52-5.
37. Diven WF, Evans RW, Alper C, Burckart GJ, Jaffe R, Doyle WJ. Treatment of experimental acute otitis media with ibuprofen and ampicillin. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1995; 33(2): 127-39.
38. Delprado G, Martínez MC, Huelves L, et al. Impact of ibuprofen therapy in the outcome of experimental pneumococcal acute otitis media treated with amoxicillin or erythromycin. *Pediatr Res* 2006; 60(5): 555-9.