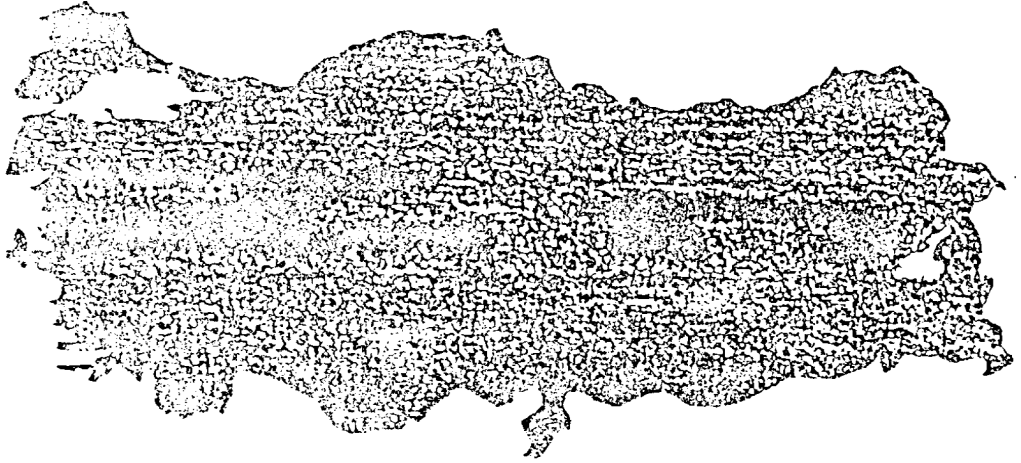


ULUSAL ÇİNKO KONGRESİ
(Tarım ve Sağlık)

12-16 Mayıs 1997
Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
ESKİŞEHİR



ÖZETLER

TAM KESİ DERİ YARALARININ İYİLEŞMESİNDE EGF/Zn İLİŞKİSİ

Sibel DİNÇER¹, Bilge GÖNÜL¹, Nazlı DİNÇER², Eser ÖZ¹,
Aydan BABÜL¹ Lamia PINAR¹

¹⁾ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beşevler-ANKARA

²⁾ Ankara Üniversitesi Araştırma Merkezi Beşevler-ANKARA

ÖZET

Epidermal büyüme faktörü (EGF)'ün bugüne kadar gösterilen etkileri arasında DNA sentezini stimüle etmesi, yara iyileşmesini hızlandırması ve doku kültürlerinde prostaglandin E₂(PGE₂) sentezini artırması da yer almaktadır. PGE₂'nin bağırsaktan Zn absorpsiyonunu arttırdığı bilinmektedir. Bu bilgilerin yanısıra çinkonun da DNA sentezinde rol aldığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını gösteren yayınların olması, EGF ve Zn arasında birçok ortak nokta olduğunu göstermektedir. Yarada yapısal bakımdan en önemli protein kollajendir. Hidroksiprolin deneysel çalışmalarda kollajen göstergesi olarak kullanılmaktadır. Kollajenin yapım ve yıkımında EGF ve Zn'nun etkisi olduğuna dair yayınlar vardır. Bu iki faktörün yara iyileşmesi konusundaki etkileşimlerini inceleyebilmek amacı ile bu araştırma planlanmıştır.

Bu çalışmada sırt derisinde 4 cm. boyunda 1 cm arayla 3 dikişle kapatılmış tam kesi yarası yapılan toplam 22 adet tavşanda, EGF preparatı (%0.3 karbopol içeren ve biyoadhezif bir jel preparatı olan Thilotears içinde 1 mg EGF/1 oranında hazırlandı) 5 gün süreyle topikal olarak sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez uygulanmıştır. Yara dokusundaki Zn düzeyleri; uygulama yapılmamış; sadece jel uygulanmış ve Jel içinde EGF uygulanmış deneklerde ve karşılaştırmalarda kullanılmak üzere normal deride, atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile saptanmıştır. Ayrıca yara hidroksiprolin düzeyleri spektrofotometrik olarak saptanmıştır. İstatistik değerlendirme tek yönlü Anova varyans analizi ile yapılmıştır.

Jel ve jel+EGF uygulanan deneklerde yara Zn düzeyleri normal deri çinko düzeylerinden düşük, tedavi edilmeyen yara çinko düzeyleri ise normal deri çinko düzeylerinden yüksek bulunmuştur. Bu farklar istatistiki açıdan anlamlı bulunmamaktadır. Ancak tedavi görmeyen yara Zn düzeyinin tedavi gören yaraların Zn düzeylerine göre istatistiki açıdan anlam taşıyan bir yükseklik gösterdiği saptanmıştır (0.01 < p < 0.025).

Hidroksiprolin düzeyleri uygulama yapılmayan yaralarda, uygulama yapılanlara oranla yüksek bulunmuştur (0.005 < p < 0.01).

Bu çalışmaya paralel olarak yaptığımız diğer bir çalışmada yara iyileşmesinin göstergesi olan yara gerimleri ölçülerek jel ve jel+EGF uygulanan deneklerdeki değerler tedavi edilmeyen grupların yara gerimlerine göre istatistiki açıdan önemli bir yükseklikte bulunmuştur. Bu yükselme en belirgin EGF ile tedavi edilen yara grubunda görüldüğünden EGF'nin yara iyileşmesini hızlandırdığını kanıtlamaktadır.

Pekçok araştırıcı deneysel yaraları takiben yarada çinko birikimi olduğunu, bunun ilk 2-3 günde en çok görülürken iki hafta sonra normal doku düzeyine indiğini göstermiştir. Yara tipine göre Zn düzeylerinin farklı bulunabileceği de yayınlanmıştır. Travmadaki Zn birikimi protein sentezine bağlı geçici bir durumdur.

Jel ve EGF uygulamalarında değişen yara Zn düzeylerinin, kollajen sentezi, çapraz bağlanma ve yıkımına etki ederek, yara iyileşmesini hızlandırabileceği sonucuna varılmıştır.

TAVŞAN TAM KESİ DERİ YARALARINA LOKAL OLARAK UYGULANAN EGF'NİN YARA DOKUSU ÇİNKO VE HİDROKSİPROLİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Sibel DİNÇER¹, Bilge GÖNÜL¹, Nazlı DİNÇER², Eser ÖZ¹, Aydan BABÜL¹,
Lamia PINAR¹

¹Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²Ankara Üniversitesi, Araştırma Merkezi, Ankara.

ÖZET

Epidermal Growth Factor (EGF) ve çinkonun yara iyileşmesini hızlandırıcı etkileri bilinmektedir. Her ikisi de DNA sentezini ve protein yapımını uyarırlar. Yara iyileşmesinde en önemli protein kollajen olup, EGF ve çinkonun kollajen sentezi ve yıkımındaki etkileri gösterilmiştir. Dokuların kollajen miktarı, başlıca yapıtaşı olan hidroksiprolin düzeyleri ile ifade edilir. Yara iyileşmesinde de hidroksiprolin önemli bir kriterdir. Bu çalışmada EGF-çinko-hidroksiprolin etkileşimi incelenmiştir. Bu amaçla 5 gün süreyle topikal olarak EGF (%0.3 karbopol 940 içeren biyoadheziv bir jel preparatı içinde 1 mg/L olacak şekilde hazırlandı) uygulanan tavşan derisi tam kesî yaraları ile tedavi görmeyen kontrol ve sadece jel tedavisi uygulanan yaraların çinko ve hidroksiprolin düzeyleri ölçülerek sonuçlar tek yönlü ANOVA ve Mann-Whitney U testleri ile karşılaştırılmıştır. EGF ve sadece jel uygulamaları ile 5. günde yara dokusu çinko ve hidroksiprolin düzeylerinin, tedavi görmeyen yaralarinkine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bulgular, EGF'nin içinde hazırlandığı jel preparatının da sonuçları etkileyebildiğini göstermiştir.

THE EFFECT OF LOCALLY ADMINISTERED EGF ON ZINC AND HYDROXYPROLINE LEVELS IN RABBIT FULLTHICKNESS SKIN WOUNDS

ABSTRACT

It is known that Epidermal Growth Factor (EGF) and zinc have accelerating effect on wound healing. Both of them stimulates the DNA and protein synthesis. The important protein in wound healing is collagen and it is known that EGF and zinc affect the collagen synthesis and degradation. The collagen content of tissue is also represented by its rather unique constituent amino acid hydroxyproline and it is also important criterion in wound healing. In this study, we evaluated the EGF-zinc and hydroxyproline interaction. The topical form of EGF (it is prepared as 1 mg/L in bioadhesive preparation that contains the %0.3 carbopol 940) was applied on full-thickness skin wounds of rabbits for 5 days. The levels of zinc and hydroxyproline of EGF-treated, non-treated and gel-treated controls were measured and the results compared statistically with One way ANOVA and Mann-Whitney U tests. On day 5, it was determined the applications of EGF and only gel decreased the zinc and hydroxyproline levels significantly compared with those of untreated wounds. The findings showed that the gel in which EGF prepared, may affect the results.

GİRİŞ

EGF (Epidermal growth factor) ilk kez fare submandibular bezinden elde edilen 53 amino asitli bir polipeptiddir (Cohen, 1962). Epidermin proliferasyonunu ve keratinizasyonunu artırıcı etkisi nedeniyle bu isim verilmiştir. DNA ve RNA sentezini dolayısıyla protein yapımını artırır ve hücre dışı makromoleküllerin sentezini aktive eder (Cohen 1983; Carpenter ve Cohen, 1981). EGF'nin günlük lokal uygulamalarının, rat yaralarında granülasyon dokusu, kollajen ve glikozaminoglikanların sentezini artırdığı gösterilmiştir (Laato ve ark., 1985). Diğer yandan EGF'nin kollajenaz aktivitesi ile de ilgili olduğu ve prokollajenaz enziminin sentezini uyardığı bilinmektedir (Cohen, 1992). Çinko, nükleik asit sentezi ve doku tamirindeki bir çok metalloenzim gibi, kollajenazlar için de önemli bir kofaktördür (Cohen, 1992).

Yaraların aşırı skar dokusu oluşmadan iyileşmesi için kollajen sentezi ve yıkımının dengeli olması gerekir. Ayrıca yara dokusunun sağlamlığı, oluşan kollajen

liflerinin çapraz bağlanmasına bağlıdır (Carrico ve ark., 1984). Çapraz bağlanmada da çinkonun gerekli olduğu bilinmektedir. (Karcioğlu ve ark., 1980).

Deneyssel olarak oluşturulan yaralarda çinko birikimi olur ve bu birikme yaralanmayı izleyen ilk bir kaç günde en fazladır. Daha sonra yavaş yavaş ve yaklaşık 15 günde normale döner. (Karcioğlu ve ark., 1980). Kollajen sentezinin bir göstergesi olan hidrokisprolin düzeylerinin de tam kesi yapılan cilt yaralarında, yaralanmadan sonraki ilk 24 saatte başladığı, 4. günde hızla artmaya başladığı, 5 ve 12. günler arasında en yüksek düzeylerde kaldığı bilinmektedir (Cohen, 1992; Peacock, 1984). İlk günler yara iyileşmesinin inflamatuvar ve proliferatif dönemleriyle uyumludur. EGF'nin kültür ortamında fibroblast proliferasyonunu 5. günde en fazla artırdığı da gösterilmiştir (Gartner ve ark., 1991).

Carbopol 940 (Poliakrilik asit), biyoadheziv bir polimer olup mukoza ve dokulara yapışır. İritan olmayışı, su tutucu özelliği, içerdiği ilacı optimal bir hızla salgılaması gibi nitelikleri nedeniyle lokal uygulamalarda avantaj sağlar (Park ve ark., 1984; Hui ve ark., 1985). Literatürde bu tür preparatların, growth faktörlerin stabilitesini artırdığı (Brown ve ark., 1989; Dijke ve Iwata, 1989) ve yumuşak doku yaralarında lokal uygulama için kullanıldığı bildirilmiştir (Ksander, 1989). Lokal olarak uygulanan EGF jel formlarının da farelerde insizyonel cilt yaralarında yara direncini artırdığı (Brown ve ark., 1988; Çelebi ve ark., 1994) ve korneadaki yanık yaralarında yara çapını küçülttüğü (Gönül ve ark., 1995) bilinmektedir. Yara direnci yaradaki kollajen sentezinin diğer bir göstergesidir. Literatürde EGF'nin lokal uygulamalarının yara dokusunda yara iyileşmesi ile ilgili iki önemli kriter olan çinko ve hidrokisprolin düzeylerini nasıl etkilediğini gösteren bir bulguya rastlanmamıştır. Bununla birlikte basınç yarası olan farelerde EGF'nin periton içine 10 gün süreyle uygulanmasının serum çinko düzeylerini artırdığı bilinmektedir. (Gönül ve ark., 1993).

Bu bilgiler ışığında, planlanan bu çalışmada, biyoadhesiv bir jel preparatı içinde lokal olarak uygulanan EGF'nin, tavşan yara dokusu çinko ve hidrokisprolin düzeylerine etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Deney Hayvanları: Çalışmada 1,5-2,5 kg ağırlığında, her iki cinsten, 22 adet beyaz Yeni Zelanda cinsi tavşan kullanıldı. Tavşanlar laboratuvar şartlarında, standard yem ve yeşillikle beslendi. Yara oluşturulan 21 tavşan yedişer deneklik 3 gruba ayrılırken, 1 tavşan normal deri çinko ve hidrokisprolin ölçümleri için yara yapılmadan ayrıldı. Gruplar Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Gruplara ait çinko ve hidrokisprolin değerleri

Uygulama	Çinko($\mu\text{g/g}$ kuru ağı.)	Hidrokisprolin($\mu\text{g/g}$ yaş ağı.)
Sağlam deri	43.7 \pm 1.72	3721.3 \pm 607.5
Tedavisiz yara	71.0 \pm 16.1	7163.2 \pm 432.8 *
Jel tedavi	39.0 \pm 4.7 *	4415.7 \pm 460.2*
EGF+jel tedavi	41.7 \pm 4.7 *	5086.0 \pm 310.1*,**

Her grup için n: 7

*p<0.05, tedavisiz yara ve tedavi gruplarının karşılaştırılması

**p<0.05, sağlam deri ile diğer grupların karşılaştırılması

Jel tedavi: %0.3 karbopol, 20 μl x 2/gün, 5 gün süreyle, lokal olarak yara üzerine uygulama.

EGF+jel tedavi: 1mikrogram EGF/ml jel (%0.3 karbopol) şeklinde hazırlanarak, 20 μl x 2/gün, 5 gün süreyle, lokal olarak yara üzerine uygulama.

Yara Modeli: Hayvanlar ksilazin (35 mg/kg, i.p.)+ketamin (5 mg/kg, i.p.) anestezi altında iken sırt derileri traşlanıp iyod ile dezenfekte edildi. Omurgaya paralel ve ona eşit uzaklıkta olmak üzere, omurganın her iki tarafında 4'er cm uzunluğunda tam deri kesisi yapıldı. Yaralar daha sonra 3/0 atravmatik ipek iplikle ve birer cm arayla 3 adet dikiş atılarak kapatıldı. Operasyon gününden itibaren gruplardan birine sadece jel (% 0.3'lük karbopol), ikincisine jel içinde çözülmüş EGF preparatı (1 µg EGF/ml jel), dikişler arasına 5'er µl, her bir yaraya 20 µl olmak üzere, günde iki kez ve 5 gün süreyle lokal olarak uygulanmıştır. Üçüncü gruptaki hayvanların yaralarına ise herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Denekler operasyondan sonraki 5. gün tekrar anestezi edilerek, çinko ve hidroksiprolin ölçümleri için yara dokusu örnekleri alınmıştır. Dokular, ölçümler yapılana kadar -30 °C'de saklanmıştır.

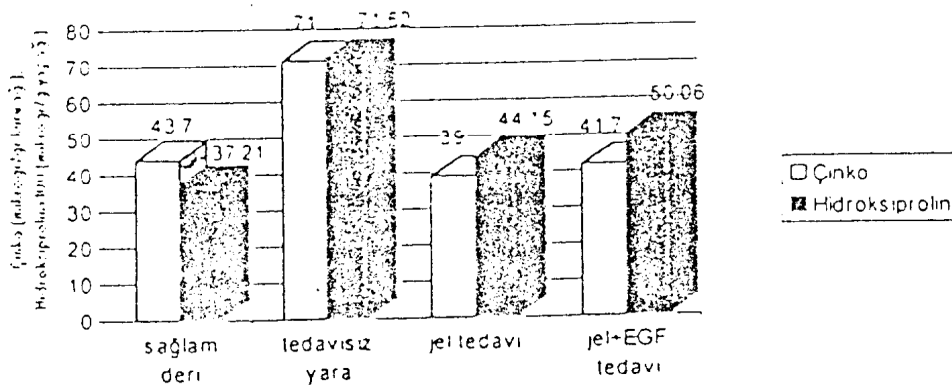
Doku çinko tayini: Yara dokusu örnekleri deiyonize edilmiş cam beherler içinde ve deiyonize su ile hazırlanmış % 0.9'lük NaCl solüsyonu ile bir kaç kez yıkandı. Daha sonra her bir örnek, önceden sabit tartıma getirilmiş porselen krezeler içine konarak 110 °C'de ve en son üç tartımları eşit olana dek kurutuldu. Böylece kuru ağırlıkları saptanan örnekler 500 °C ısıda beyaz kül haline gelene kadar (yaklaşık 12 saat) yakıldı. Örneklerin her biri 5 ml 1N HCl içinde çözülerek, çinko düzeyleri 213.9 nm'de alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçüldü. Bu amaçla Perkin-Elmer 2380 AAS cihazı kullanıldı(Falchuk ve ark,1988).

Doku hidroksiprolin tayini: Yara dokusu örnekleri tartılarak 5 ml 6N HCl içinde ve 3 saat süreyle 130 °C'de hidrolize edildi. Hidrolizatlar daha sonra 2.5N NaOH ile nötrale edildi. Son ayarlamalar pH 6-7 arasında oluncaya kadar dilüe NaOH ve HCl ile yapıldı. Daha sonra her hidrolizattan ikişer ml'lik örnekler alınarak 1 ml chloramine T ilave edildi. 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 1ml 3,15M perklorik asit ve ardından 1 ml Ehrlich solüsyonu eklenerek 60 °C'lik su banyosunda 20 dakika daha bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra örneklerin absorpsansları, Shimadzu UV-1208 spektrofotometre ile 557 nm'de okundu. Hidroksiprolin değerleri standart eğriden hesaplandı (Woessner, 1961).

İstatistik: Bütün değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. Gruplar arası farklılıklar, statview programında, tek yönlü ANOVA ve Mann-Whitney U testleri ile karşılaştırıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

Bütün gruptaki deneklere ait çinko ve hidroksiprolin değerleri, ortalama \pm standart hata olarak Tablo 1'de, bar grafikler halinde ise Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Gruplara ait çinko ve hidroksiprolin değerleri

Tablodan da görüleceği gibi tedavi uygulanan deneklerde yara çinko düzeyleri, tedavi edilmeyen deneklerin çinko değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken ($p<0.05$), tedaviler arasında ve sağlam deri ile tedavi grupları arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmamıştır.

Yara hidrokisprolin değerleri de çinko ile benzer şekilde tedavi gruplarında, tedavi görmeyen grubunkilere göre anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p<0.05$), jel ve EGF+jel tedavileri arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır. Sağlam deri ile yapılan karşılaştırmalarda ise, tedavi yapılmamış ve EGF+jel uygulanmış grupların hidrokisprolin değerleri istatistiksel olarak sağlam derininkilerden fazla bulunmuş ($p<0.05$), jel grubundaki farklılık ise anlamlılık göstermemiştir.

TARTIŞMA

Growth faktörlerin yara iyileşmesindeki olumlu rolleri anlaşıldıktan sonra bu konudaki çalışmalar her geçen gün hızla artmaya başlamıştır. EGF yanı sıra diğer büyüme faktörlerinin de lokal uygulandıklarında yara iyileşmesinde etkili oldukları ve anjiyogenezis, kollajen sentezi ve yara gerimi gibi bir çok parametreyi artırdıkları anlaşılmıştır. Bununla beraber her bir büyüme faktörü için optimal doz ve en uygun taşıyıcının ne olduğu konusu halen araştırılmaktadır. Her faktörün etkili olduğu yara tipi ve uygulama süresi de değişkenlik göstermektedir (Cohen, 1992).

Bu çalışmada EGF, tavşan sırt derisi tam kesi yaraları üzerine bir jel formu içinde, lokal olarak ve 5 gün süreyle uygulanmıştır. Bu süre, tavşanlarda daha önce yaptığımız bir çalışmanın sonuçlarına dayanılarak seçilmiştir. Tavşanlarda sırt derisi tam kesi yaralarının iyileşmesi, operasyondan sonraki 3, 5, 7 ve 15. günlerde ölçülen yara askorbik asit, hidrokisprolin, asit proteinaz düzeyleri ve yara gerimi gibi parametrelerle izlenmiş, 5. gündeki değişimlerin diğer günlere göre hemen bütün parametreler için anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır. Özellikle yara hidrokisprolin düzeyleri ve yara gerimi 5. günde anlamlı derecede artış göstermiştir (Babül ve ark., 1994; Koz ve ark., 1994). Bu sonuçlara ve literatürdeki diğer çalışmalara dayanarak planladığımız çalışmada, EGF uygulamasının yara hidrokisprolin düzeylerini artırması beklenirdi. Buna karşın hem çinko hem de hidrokisprolin düzeyleri kontrol yaradakilere göre azalmıştır. Literatürde TGF- β gibi bazı büyüme faktörleri ile yeni doğan farelerde görülen kollajen artışının, EGF ile görülmediğini ve ayrıca EGF etkisi ile sentezlenen kollajenin daha stabil olduğunu bildiren yayınlar da olmakla birlikte (Hamilton ve Millis, 1990) genelde artış yönündeki bulgular daha fazladır.

Çalışmamızda tedavi grupları arasında fark olmayışı, belki de söz konusu etkilerden sadece EGF'nin değil, jelin de sorumlu olabileceğini akla getirmektedir. Çünkü yalnızca jel uygulanan grupta da benzer bulgular elde edilmiştir. Yaptığımız literatür taramalarında carbopol 940'ın çinko ve hidrokisprolin ile özel bir etkileşim gösterdiğine dair bir bulgu olmamakla birlikte, su tutucu ve doku hidrasyonunu artırıcı özelliği ve spesifik fonksiyonel gruplarının olması nedeniyle yara dokusundaki dinamikleri değiştirebileceği düşünülebilir. Ayrıca pH ve tonisitesinin iyi ayarlanmış olması önem taşımaktadır (Gonul ve ark., 1995). Diğer yandan tavşan derisi içerdiği panniculus carnosus isimli kas tabakası nedeniyle diğer deney hayvanlarının, özellikle farelerin derisinden farklı ve daha kalın bir yapı göstermektedir (Cohen, 1990). Bu nedenle çalışmamızda uygulanan EGF dozu ve jel miktarı literatürde belirtilen doz ve miktarlara göre (Çelebi ve ark., 1994; Gönül ve ark., 1995) daha fazladır. Bulgularımızı etkileyen bir başka faktör de bu farklılık olabilir.

Sonuç olarak bir ön çalışma niteliğindeki bu araştırmanın daha kapsamlı olarak sürdürülmesinin yararlı olacağı ve EGF ve benzeri büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki çeşitli olumlu etkilerine karşın, klinikte rutin uygulamalar için daha fazla araştırma yapılması gerektiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Babül, A., Gönül, B., Dinçer, S., Kaplan, B., Öz, E., 1994. Yara iyileşmesinin takibinde yara dokusu hidroksiprolin ve askorbik asit düzeyindeki değişimler. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 20. Ulusal Kongresi, Özet Kitabı s.49, 25-29 Ekim 1994, İzmir.
- Brown, G.L., Curtsinger, L.J., White, M., Mitchell, R.O., Pietsch, J., Nordquist, R., Fraunhofer, A., Schultz, G.S., 1988. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β . *Ann. Surg.*, 208:788-794.
- Brown, L.G., Nanney, L.B., Griffen, J., Cramer, A.B., Yancey, J.M., Curtsinger, L.J., Holtzin, L., Schultz, G., Jurkiewicz, J., Lyach, B., 1989. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N. Engl. J. Med.*, 321:76-79.
- Carpenter G, Cohen S., 1981. EGF receptor interactions and stimulation of cell growth. *In Receptors and Recognition Series*. pp:43-66. B. Vol:13. (ed. Lefkowitz RJ), Chapman & Hall, London.
- Carrico, T.J., Mehrhof, A.I., Cohen, I.K., 1984. Biology of wound healing. *Surg. Clin. North Am.*, 64:721.
- Cohen, S., 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.*, 237:1555-1562.
- Cohen, S., 1983. The epidermal growth factor. *Cancer*, 51: 1787-1791.
- Cohen, I.K., Diegelman, R.F., Lindblad, W.J., 1992. Wound healing, Biochemical and Clinical Aspects. pp 155-266. W.B. Saunders Comp., Philadelphia, USA.
- Cohen, I.K., Diegelman, R.F., Lindblad, W.J., 1992. Wound healing, Biochemical, and Clinical Aspects. pp 307. W.B. Saunders Comp., USA.
- Cohen, I.K., Mast, B.A., 1990. Models of wound healing. *Adv. Understand Traum. Burn Inj.*, 30: 149.
- Çelebi, N., Erden, N., Gönül, B., Koz, M., 1994. Effects of epidermal growth factor dosage forms on dermal wound strength in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 386-387.
- Dijke, P., Iwata, K.K., 1989. Growth factors for wound healing. *Biotechnology*, 7: 793-798.
- Falchuk, K.H., Hilt, K.L., Vallee, B.L., 1988. Determination of zinc in biological samples by atomic absorption spectrometry. *Methods in Enzimolgy*, 158:422-435.
- Gartner, M.H., Shearer, J.D., Bereiter, D.F., Mills, C.D., Caldwell, M.D., 1991. Wound fluid amino acid concentrations regulate the effect of epidermal growth factor on fibroblast replication. *Surgery*, 110(2):448-455.
- Gönül, B., Koz, M., Ersöz, G., Kaplan, B., 1992. Effect of EGF on the corneal wound healing of alloxan diabetic mice. *Exp. Eye Res.*, 54: 519-524.
- Gönül, B., Söylemezoğlu, T., Yanıçoğlu, L., Güvendik, G., 1993. Effect of EGF on serum zinc and plasma prostaglandin E₂ levels of mice with pressure sores. *Prostaglandins*. 45: 153-157.

- Gönül, B., Erdoğan, D., Özoğul, C., Koz, M., Babül, A., Çelebi, N., 1995. Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice. *Burns*, 21(1): 7-10.
- Hamilton, R.T., Millis, A.J.T., 1990. Developmental roles for growth factor-regulated secreted proteins. *Current Topics Dev. Biol.*, 24: 193-218.
- Hui, H.W., 1985. Ocular delivery of progesteron using a bioadhesive polymer. *Int. J. Pharm.* 26: 203-213.
- Karcioğlu, Z.A., Sarper, R.M., 1980. Zinc and copper in medicine. pp 545. Charles C Thomas Publ. Illinois, USA.
- Karcioğlu, Z.A., Sarper, R.M., 1980. Zinc and copper in medicine. pp 540. Charles C Thomas Publ. Illinois, USA.
- Koz, M., Gönül, B., Kılıç, N., Aldemir, H., 1994. Yara iyileşme sürecinde yara geriminde ve asit proteinaz aktivitesindeki değişimler. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 20. Ulusal Kongresi, Özet Kitabı s.50, 25-29 Ekim 1994, İzmir.
- Ksander, G.A., 1989. Topics in biology: exogenous growth factors in dermal wound healing. *Ann. Rep. Med. Chem.* 24: 223-232.
- Laato M, Ninikoshi J, Lundberg C, Arfors K.E., 1985. Effect of epidermal growth factor (EGF) on experimental granulation tissue. *Eur. Surg. Res.* 17: 90-91.
- Park, H., Robinson J.R., 1984. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery method to study bioadhesion. *Int. J. Pharm.* 19: 107-127.
- Peacock, E.E., 1984. Collagenolysis and the biochemistry of wound healing. *In Wound Repair*. pp 111. W.B. Saunders Comp., Philadelphia, USA.
- Woessner, J.F., 1961. The determination of hidroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 440.