

**TGF-BETA UYGULAMASININ AĞIZ YARA DOKUSU OKSİDATİF
OLAYLARA ETKİSİ**

Emine Gülçeri GÜLEÇ PEKER

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2011
ANKARA**

Emine Gülçeri GÜLEÇ PEKER tarafından hazırlanan TGF-BETA UYGULAMASININ AĞIZ YARA DOKUSU OKSİDATİF OLAYLARA ETKİSİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Şule Coşkun CEVHER

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Zekiye SULUDERE

Üye: Doç. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Üye: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY

Üye: Doç. Dr. Barbaros BALABANLI

Üye: Yrd.Doç. Dr. Suna CEBESoy

Tarih 03/01/2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Emine Gülçeri GÜLEÇ PEKER

TGF-BETA UYGULAMASININ AĞIZ YARA DOKUSU OKSİDATİF OLAYLARA ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Emine Gülçeri GÜLEÇ PEKER

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Şubat 2011

ÖZET

Dönüştürücü büyüme faktörü β (Transforming growth factor β , TGF- β), hemen hemen bütün hücre tiplerinden eksprese edilen önemli bir polipeptittir. TGF- β gibi çeşitli büyüme faktörleri yara iyileşmesi sürecinde önemli rol oynar. Ağız yaralarına uygulanan TGF- β ' nın ağızdaki yara dokusu oksidan olaylarına etkilerinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple ağız mukozasında cerrahi kesi yarasına TGF- β uygulamasının, ağız içi yara dokusu oksidan olayları üzerine etkilerini, zaman bağımlı olarak araştırmayı planladık.

Deneylerde Yeni Zelanda albino tavşanlar (erkek, $n= 42$, $2,5 \pm 0,4$ kg) kullanıldı. Submukozal kesi yapıldıktan sonra tavşanlar iki eşit gruba ayrıldılar: 1- Tedavi edilmeyen yaralar, 2- TGF- β ile tedavi edilmiş yaralar. Yaralanmadan sonraki 1., 3. ve 5. günlerde tavşanlar kulak veninden aşırı dozda sodyum pentobarbital verilerek feda edildiler. Yara dokuları hemen çıkarılarak, lipid peroksidasyonunun belirteci olan malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NOx), önemli antioksidanlar olan glutatyon (GSH), askorbik asit (AA) düzeyleri ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar Anova Varyans Analizi yöntemi ile karşılaştırıldı.

$P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bütün değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi.

Sonuç olarak ekzojen TGF- β uygulamasının yara iyileşmesinin özellikle 3. gününde MDA, SOD, NOx ve AA düzeylerini arttığı tespit edilmiştir.

Bilim Kodu :203.1.057
Anahtar Kelimeler :TGF- β , Yara iyileşmesi, AA, MDA, GSH, NOx, SOD
Sayfa Adedi :65
Tez Yöneticisi :Doç. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

**THE EFFECT OF TGF-Beta ADMINISTRATION ON ORAL WOUND'S
OXIDANT STATUS**

(Ph.D. Thesis)

Emine Gülçeri GÜLEÇ PEKER

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

February 2011

ABSTRACT

Transforming growth factor β (TGF- β) is the important polypeptide which is expressed from all of the cell types. Various growth factors such as TGF- β play significant roles during wound healing process. There are limited numbers of studies about the effect of exogenous TGF- β administration to oral wound tissue's oxidative events. That is why we planned to investigate the effects of oral submucosal implanted TGF- β on the oxidative stress of oral wound tissue.

In this study we used New Zeland albino rabbits (male, $n= 42$, $2,5 \pm 0,4$ kg). After submucosal incisions were made the rabbits were divided into two equal groups: 1- Untreated wounds and 2- TGF- β implanted wounds. The rabbits were sacrificed by excess of sodium penthobarbitale anesthesia on the 1st, 3rd and 5th days of postwounding. Wound strips were excised immediately. The levels of malondialdehit (MDA) which is identifier of lipid peroxidation, nitric oxide (NOx), glutathione (GSH) and ascorbic acid (AA) and superoxide dismutase (SOD) were measured by spectrophotometrically. Results were compared by Anova Variance Analysis test. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant. All data were expressed as the mean $\pm$ SD.

In conclusion, TGF- β administration elevated MDA, NO_x, SOD, AA levels on the 3rd day after wounding.

Science Code :203.1.057

Key Words :TGF- β , wound healing, AA, MDA, GSH, NO_x, SOD

Page Number :65

Adviser :Assoc. Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olduğum yedi yıl boyunca yolumu açan ve ışık tutan; bana çalışmayı ve üretmeyi öğreten; akademik hayatın tüm zorlu süreçlerinde en değerli yardım, ilgi ve desteklerini benden esirgemeyen; sevgili hocam Doç. Dr. Şule COŞKUN CEVHER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda kıymetli tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Barbaros BALABANLI ve Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY hocalarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bana hep inanan; beni yüreklendiren; beni yetiştirip bugünlere getiren; sevgilerini ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim çok sevgili ve çok değerli aileme; hayatımda var oluşu ve tüm fedakârlıkları için sevgili eşime ve destekleriyle beni yalnız bırakmayan eşimin sevgili ailesine de sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1.Yara.....	6
2.2.Yara İyileşmesi	6
2.2.1. Yara iyileşmesinin fazları	7
2.3. Büyüme Faktörleri	12
2.3.1. Büyüme faktörlerinin sınıflandırılması.....	14
2.3.2. Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri	15
2.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (Transforming Growth Factor- Beta /TGF- β)	15
2.4.1. TGF- β ' nın özellikleri	16
2.4.2. TGF- β ' nın etki mekanizması	18
2.4.3. Yara iyileşmesinde TGF- β ' nın rolü	19
2.5. Serbest Radikaller	20
2.5.1. Serbest radikal kaynakları.....	21
2.5.2. Serbest radikallerin etkileri	26

Sayfa

2.5.3. Serbest oksijen radikalleri ve yara iyileşmesi	29
2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	32
2.6.1. Antioksidanların yerleşim bölgelerine göre sınıflandırılması.....	32
3. MATERYAL-METOT	37
3.1. Deney Protokolü	37
3.2. TGF- β Preparatının Hazırlanması.....	37
3.3. Yara Modelinin Oluşturulması ve Gruplar	38
3. 4. Yöntemler	39
3.4.1. Dokuda MDA tayin yöntemi	39
3.4.2. Dokuda GSH tayin yöntemi.....	40
3.4.3. Dokuda NOx tayin yöntemi	40
3.4.4. Dokuda AA tayin yöntemi	40
3.4.5. Dokuda SOD tayin yöntemi.....	41
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. NOx Sonuçları	42
4.3. SOD Sonuçları	45
4.4. GSH Sonuçları	46
4.5. AA Sonuçları	47
5. SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	64

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1.Makrofajların yara iyileşmesindeki rolü ve etki mekanizması.....	9
Çizelge 4.1.Yara dokusundaki MDA, GSH, NOx, AA düzeyleri ve SOD aktivitesi	42

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi	10
Şekil 2.2. (A) Rekombinant insan TGF- β 1' in Nuclear Magnetic Resonance (NMR) yöntemi ile çıkarılan üç boyutlu şeması (B) TGF- β 1' in heteronükleer NMR yöntemi ile homodimer ayna görüntüsünün şematize edilmesi	17
Şekil 2.3. TGF- β ' nın sinyalizasyon yolu	19
Şekil 2.4. Nitrik oksitin sentezi	23
Şekil 2.5. Hücre içi antioksidanlar ve aktiviteleri	34
Şekil 3.1. Kesi yarası yapılan bölgesinin şematizasyonu	39
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait NOx düzeyleri.....	43
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait MDA düzeyleri	44
Şekil 4.3. Tüm gruplara ait SOD düzeyleri.....	45
Şekil 4.4. Tüm gruplara ait GSH düzeyleri.....	46
Şekil 4.5. Tüm gruplara ait AA düzeyleri.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
Ca^{2+}	Kalsiyum iyonu
Cl^-	Klor iyonu
cm	Santimetre
Cu	Bakır
CuCl_2	Bakır klorür
dk	Dakika
e^-	Elektron
Fe^{2+}	Ferri demir
Fe^{3+}	Ferro demir
g	Gram
H^+	Hidrojen iyonu
H_2	Hidrojen atomu
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfirik asit
HO_2^-	Perhidroksil radikali
HOCL	Hipokloröz asit
kb	Kilobaz
kg	Kilogram
$\text{L}^\cdot$	Yağ asiti radikali
LH	Yağ asiti

Simgeler**LOO[·]****M****mg****ml****mmol****Mn****N₂O₃****N₂O₄****Na₂CO₃****Na₂H₂PO₄****NaNO₂****ng****nm****nM****NO****NO₂****NO₂⁻****NOS****O₂^{-·}****OH[·]****pO₂****RO[·]****ROO[·]****S****Se****-SH****U****VaCl₃****Zn****Açıklamalar**

Peroksil radikali

Molar

Miligram

Mililitre

Milimol

Mangan

Diazot trioksit

Diazot tetraoksit

Sodyum karbonat

Sodyum fosfat

Sodyum nitrit

Nanogram

Nanometre

Nanomolar

Nitrik oksit

Azot dioksit

Nitrit

Nitrik oksit sentaz

Süperoksit radikali

Hidroksil radikali

Parsiyel oksijen basıncı

Alkoksil radikali

Peroksil radikali

Kükürt

Selenyum

Sülfidril grubu

Ünite

Vanadyum klorür

Çinko

Kısaltmalar**3-NT****8-OHdG****AA****BHT****BSA****CAT****ddp****DTNB****EDTA****EGF****eNOS****FGF****GPx****GSH****GSSG****IFN****IGF-1****IL- 1****IL-2****iNOS****JAK****LDL****MDA****MIS****MNSF****MPO****NADP****NBT****NGF****Açıklamalar**

3-Nitro tirozin

8-hidroksideoksi guanozin

Askorbik asit

Bütilhidroksi Toluen

Bovine serum albumin

Katalaz

Drosophila decapentoplegic

5,5 ditibios 2-nitrobenzoik asit

Etilen diamim tetra asetik asit

Epidermal Büyüme Faktörü

Endotelial nitrik oksit sentaz

Fibroblast Büyüme Faktörü

Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon

Okside glutasyon

İnterferon

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

İnterlökin-1

İnterlökin-2

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

Janus protein kinaz

Düşük yoğunluklu lipoprotein

Malondialdehit

Kemik morfogenetik proteinleri

Monoklonal nonspesifik süpresör faktör

Miyeloperoksidaz

Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

Nitroblue tetrazolium

Sinir Büyüme Faktörü

Kısaltmalar**nNOS****PAF****PCA****PDGF****PEG****PGE₂****rpm****SOD****STAT****TBA****TCA****TGF- β** **TGF- α** **TNF- α** **VEGF****Vg-1****Açıklamalar**

Nöronal nitrik oksit sentaz

Platelet aktive edici faktör

Perklorasetik asit

Platelet kaynaklı büyüme faktörü

Polietilen Glikol

Prostaglandin E2

Devir hızı

Süperoksit Dismutaz

Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktive ediciler

Tiyobarbitürik asit

Triklorasetik asit

Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta

Dönüştürücü Büyüme Faktörü- alfa

Tümör Nekroz Faktörü-alfa

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Xenopus vegetalizing faktör 1

1. GİRİŞ

Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesini etkileyen faktörler; pratikte kullanımları açısından, bilimsel olarak en çok araştırılan olaylar arasında yer almaktadırlar. Yara iyileşmesinin, birbirini takip eden ve karmaşık olaylar silsilesi şeklinde gerçekleşen fazları; bu esnada doku tamirini etkileyen pek çok faktör ve bunların birbirleriyle etkileşimleri çok geniş bir yelpazeye yayıldığından, bu konuyla ilgili çalışmalar güncelliğini korumakta ve her geçen gün bu konuda yeni araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Yara, yumuşak dokuların normal anatomik yapı ve fonksiyonunun bozulmasıdır [1]. Yara iyileşmesi travma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal olaylar sürecidir [2]. Normal yara iyileşmesi, birçok hücresel aktivitenin düzenli ve ardarda çalışmasıyla gerçekleşir. Bu aktiviteler fagositoz, kemotaksis, mitogenez, kollajen sentezi ve diğer matriks komponentlerinin sentezidir.

Oral mukozadaki yara iyileşmesi dermal iyileşmeden daha hızlı gerçekleşir ve iyileşme sonunda daha az skar dokusu oluşumu gözlenir. Bu hızlı iyileşmenin sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, tükürükte bulunan büyüme faktörlerinin iyileşmeyi hızlandırıyor olabileceği düşünülmektedir [3].

Yara iyileşmesi sürecinde pek çok büyüme faktörü ve sitokin etkili olmaktadır. Çeşitli hücre ve dokulardan salınan ve sistemik dolaşım aracılığıyla hedef dokulara taşınan büyüme faktörleri ve sitokinler; hücrelerin replikasyon ve farklılaşmasını düzenleyen peptit yapıda ajanlardır. Hücrelerdeki metabolik aktiviteler üzerinde etkileri bulunduğu için, büyüme faktörleri hücre metabolizmasının sistemik ve lokal düzenleyicileridir [4].

Peptit büyüme faktörleri doku tamirinin başlatılmasında ve tamir sonrası doku bütünlüğünün sağlanmasında önemli rol oynarlar. Doku hasarı esnasında pıhtılaşma

olayı ve trombosit degranülasyonu uyarılır. Trombosit granüllerinin içinde bulunan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) inflamasyonu ve hücre proliferasyonunu uyarak doku tamirinin başlatılmasında ve sürdürülmesinde görev alırlar [5].

Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) hemen hemen bütün hücre tiplerinden eksprese edilen eşsiz bir polipeptit olup hücresel olayların geniş bir aralığını düzenlediği bilinmektedir. TGF- β yapısal olarak büyüme ve farklılaşma ile ilgili faktörlerin büyük ailesinin bir üyesidir [6]. TGF- β ; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ve TGF- β 5 olarak bilinen en az beş izoformda bulunur. Bunlar; TGF- α ile ilişkili değildir. Bunların amino asit dizilimleri % 70- 80 arasında homoloji gösterir. TGF- β 1 genel formdur ve diğer izoformlar hücre ve dokularda daha sınırlı oranda bulunurken TGF- β 1 hemen hemen hepsinde yaygın olarak bulunur [7, 8]. TGF- β ya küçük ya da büyük latent kompleksler olarak sekrete edilmektedir. Yara iyileşmesi esnasında; TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin miktarının insizyonel yaraların ilk 24 saatinde arttığı, daha sonra TGF- β 1'in azalması ile TGF- β 3'ün yükseldiği gösterilmiştir [9, 10].

TGF- β yara iyileşmesindeki hücre göçü, proliferasyon, ekstraselüler matriks sentezi, kollajen sentezi, anjiyogenez ve yeniden modellenme olaylarının belli bir düzen içerisinde devam etmesini düzenlemektedir. Aynı zamanda TGF- β , iyileşme oranını ve tamir edilen dokunun yara gerim kuvvetini de artırır. TGF- β kısmen diğer büyüme faktörlerinin lokal salınımını başlatarak dermal yaraların kan akım hızını ve anjiyogenezini arttırmaktadır [11].

TGF- β aynı zamanda reepitelizasyon ve granülasyon doku oluşumunu da arttırmaktadır. TGF- β 'nın ratlarda lineer insizyonel yaraların iyileşmesini arttırdığı gösterilmiştir [11]. TGF- β uygulanmasının gastrik yaralanmadan sonraki 7. günde yara gerim kuvvetini arttırdığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [12].

TGF- β , makrofajlar için kemotaktiktir; fibroblast kemotaksisini ve proliferasyonunu uyarır. TGF- β kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinir. Ayrıca kollajenazı aktive eden diğer faktörlerin uyarıcı etkisini azaltır. TGF- β fibroblastlarca fibronektin ve proteoglikan sentezini; keratinositlerce de fibronektin sentezini uyarır. Yara kontraksiyonunda rol oynar. Matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile iyileşmede yeniden şekillenme sürecinde görev yapar [13].

Atomlar ve kimyasal bileşikler, içerdikleri elektronları her orbitalde ikişer adet olmak üzere eşleşmiş şekilde ve zıt yönlü olarak içerirler. Ancak en dıştaki orbitalinde paylaşılmamış elektronu olan, kimyasal reaktivitesi artmış atom ya da moleküller “serbest radikal” olarak adlandırılırlar [14]. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Bunlar “Reaktif Oksijen Türleri” olarak adlandırılırlar [15]. Ayrıca serbest radikal biyokimyasında “Reaktif Azot Türlerinin”de önemli yeri bulunmaktadır [14]. Yaralanma ve bunu takiben iyileşme sürecinde artmış bulunan serbest radikaller, oksidatif stresin oluşmasına neden olurlar [16]. Doku tamiri esnasında endotelial hücreler, makrofajlar, fibroblastlar ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücreler süperoksit radikali üretirler [17]. Yara iyileşmesinin tüm fazları esnasında aktive olmuş nötrofil ve makrofajlar önemli miktarlarda süperoksit ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazın fagositik izoformları aracılığıyla süperoksit türevleri üretirler. Ayrıca yara dokusunda iskemik şartlarda endotelial hücreler yüksek konsantrasyonlarda süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali meydana getirirler [18].

Nitrik oksit (NO), vasküler hücreleri stimule etmek suretiyle, inflamasyonda rol oynayan önemli bir biyoaktif moleküldür. Enzimatik olarak Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enziminden *invivo* olarak L-arginin amino asitinden sentezlenmektedir. NOS’ un üç izoformu bulunmaktadır, bunlar endotelial NOS (eNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve nöronal NOS (nNOS)’ dır. Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından aktive edilen enzimin indüklenebilir formu iNOS, yara iyileşmesi sürecinde önemli bir role sahiptir [19, 20]. iNOS tarafından üretilen NO, fizyolojik sınırların üzerinde olması nedeniyle çeşitli patolojik etkilere sahiptir.

Bunlardan en önemlisi hücresel süperoksit varlığında ileri derecede sitotoksik bir ürün olan peroksinitrit (3-NT) molekülünün oluşmasında rol oynamasıdır [21]. Peroksinitrit aromatik amino asitlerin nitrasyonu ve oksidasyonu ile pek çok yapısal proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna sebep olur [22, 23] Peroksinitritin proteinlerle olan reaksiyonlarından biri, proteine bağlı veya serbest olarak bulunan tirozin amino asitini çeşitli mekanizmalarla orto pozisyonundan nitrolayarak, stabil bir son ürün olan ve oksidatif protein hasarının belirteci olan 3-NT' i oluşturmaktadır. Bu nitrasyon reaksiyonu spontan olarak ilerleyebildiği gibi, geçiş metalleri ve bakır (Cu), çinko-süperoksit dismutaz (Zn-SOD) ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi metalloproteinler tarafından da katalizlenebilir [22, 24, 25]. 3-NT normal bireylerin plazmalarında ve dokularında saptanamayacak kadar düşük seviyelerdeyken; inflamasyon ve dejenerasyon gibi NO üretimin artmış olduğu ve oksidatif stresle ilişkili durumlarda anlamlı miktarda artış göstermektedir [24, 26-28].

Yara iyileşmesi esnasında oluşan oksidanlar, hücre içi sinyal iletimi ve mikroorganizma ataklarına karşı koruyucu etkileriyle önemli roller üstlenmişlerdir [29]. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında rol alan nötrofillerin fagositoz sırasında büyük miktarda oksijen kullanmaları nedeniyle ortaya çıkan serbest radikaller, oksidatif hasarın artışına neden olabilmektedir [30]. Nötrofillerin solunumsal patlaması (respiratory burst) sırasında oluşan süperoksit moleküllerinden, spontan dismutan reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2) ve bunu takiben, nötrofillerin primer granüllerinde bulunan MPO enzimi aracılığıyla H_2O_2 ve klor iyonu (Cl^-) kullanarak hipokloröz asit (HOCl) oluşturulmaktadır [31, 32]. HOCl, lökositlerde üretilen ve mikrobisid etkiye sahip en önemli bir oksidandır. Bununla birlikte HOCl' nin toksisitesi sadece mikroorganizma membranları ile sınırlı değildir ve konak dokuda inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu takiben oluşan oksidatif hasarda önemli bir rol oynamaktadır [33].

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için organizmada birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma

mekanizmaları bulunmaktadır. Yara iyileşmesinin erken fazlarında oluşan oksidanların elimine edilmesinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik ve glutatyon (GSH), E vitamini, C vitamini gibi enzimatik olmayan antioksidanların önemli rol oynadığı bildirilmektedir [34].

Çok önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında, proteinlerdeki sülfidril ($-SH$) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Böylece, fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller [35, 36].

Enzimatik olmayan antioksidanlardan olan askorbik asit (C vitamini, AA), organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kuvvetli indirgen aktivitesinden dolayı, güçlü bir antioksidandır [35]. AA antioksidan etkilerini, redükte GSH veya E vitamini ile etkileşerek ya da tek başına gerçekleştirir [37, 38]. Bu bağlamda AA ve GSH arasında fonksiyonel olarak bir ilişki bulunmaktadır. AA ayrıca; süperoksit radikali (O_2^-), H_2O_2 , hidroksil radikali ($OH^\cdot$), singlet oksijen ve nötrofillerde H_2O_2 ve Cl^- dan MPO aktivitesi sonucu meydana gelen HOCl gibi reaktif oksijen türevlerinin doğal süpürücüsüdür [27, 39].

Ağız yaralarına uygulanan büyüme faktörleri ve bunların iyileşme süreci esnasında meydana gelen oksidatif olaylara ve antioksidanlar üzerine etkilerini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, oral mukozadaki yaraya ekzojen olarak uygulanan TGF- β' nın, yara dokusunda gerçekleşen oksidan olaylara ne gibi etkilerde bulunduğunu göstermek amacıyla, MDA ve NOx, GSH, AA düzeylerini ve SOD enzim aktivitesini zaman bağımlı olarak araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Yara

Yumuşak dokuları oluşturan öğelerin kesici, yaralayıcı veya bunlara benzer araç ve gereçlerle birbirinden ayrılmasına yara denir. Başka bir ifadeyle yara, cilt ve /veya mukozayı oluşturan yapıların farklı nedenlerle bütünlüğünün bozulması ya da kaybı ile varolan fizyolojik özelliklerinin geçici veya tamamen kaybolmasıdır [40,41].

Yara teriminin karşılığı olarak erezyon, ülser ve fissür deyimleri de kullanılır. Erezyon, dermise geçmeyen fekal epidermis kayıplarını belirleyen bir deyimdir. İz bırakmaz, kronik değildir. Fissür, çatlak şeklinde dikey yaraları belirleyen doku kayıplarıdır. Ülser, dermis ve epidermiste doku kayıpları ile seyreden fekal yaralardır [42].

2.2.Yara İyileşmesi

Yaralanma olayı bir şekilde lokal ve sistemik immün cevapları aktive etmektedir. Yara iyileşmesi, büyüme ve rejenerasyon olayları ile ilişkili kompleks ve dinamik bir olaydır. Normal yara iyileşmesi, epitelyal endotelyal ve inflamatuvar hücrelerin, trombosit ve fibroblastların bir araya gelerek normal aktivasyonlarını belli bir sıra ve düzen içinde yapmalarıyla gerçekleşir. Bu aktiviteler fagositoz, kemotaksis, mitogenez, kollajen sentezi ve diğer matriks komponentlerinin sentezidir [43].

Yaralanmayı hemen takiben trombositler hasarlanan dokuya yapışıp pıhtılaşma faktörlerini ve granüller içindeki büyüme faktörlerini salgırlar. Fibrin olgunlaştıkça yaralanan bölge kurumuş pıhtı ile hem daha fazla sıvı ve elektrolit kaybını hem de çevreden gelebilecek kontaminasyonu önler. Trombositler tarafından salınan büyüme faktörleri iyileşme olayını başlatır [44-46].

Kısa bir süre içinde polimorf nükleuslu lökositler çevredeki kan damarlarının endoteline yapışmaya (marjinyasyon) ve damar duvarı içinden geçmeye (diapedez) başlarlar. Polimorf nükleuslu lökositlerin ana görevi yaralanan bölgeden bakteri ve yabancı cisimleri uzaklaştırıp enfeksiyon gelişimini engellemektir. Bu sırada epitelyal hücreler pıhtının altına doğru hareket eder ve çoğalarak epitel yüzeyini yeniden oluşturmaya başlarlar [42,47,48].

Bir sonraki aşama makrofajlar ile karakterizedir. Makrofajlar sadece bakteri ve konağın dejenere hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılmasından sorumlu olmayıp ayrıca zengin bir büyüme faktörü kaynağıdır. Makrofajlar yara iyileşmesi olayında hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve matriks komponentlerinin düzenli bir şekilde davranmalarını sağlar [42,47,48].

Epitelyal köprüler tamamlanınca, epitel hücrelerden enzimler salınır, epitel hücreler çoğalmaya devam edip epitel katmanı oluşturur. Doku tamirinin son aşaması örneklemedir (Remodeling); yaralanma öncesi doku bütünlüğü sağlanıncaya dek yıllar boyunca sürebilir [42,47,48].

2.2.1. Yara iyileşmesinin fazları

Yara iyileşmesi birbiriyle bağlantılı dört farklı faza ayrılır.

- a- İnflamasyon
- b- Angiogenezis (Yeniden damarlanma)
- c- Proliferasyon
- d- Olgunlaşma ve Yeniden Şekillenme (Remodeling)

Bu safhalardan birindeki gecikme veya olumsuzluk, yaranın kapanmaması veya iyileşmenin uzaması ile sonuçlanır [49].

İnflamasyon

İnflamasyon normal bir dokunun travmaya karşı verdiği akut cevaptır. İlk olarak yaralanan damarlardan kanama ile hemostatik süreç başlar ve pıhtı ile kanama durdurulur. Travmada yaralanan damarlardan çıkan trombositlerin endotel altı kollajen ile teması sonucu trombositlerin kümeleşmesi başlar ve pıhtılaşma mekanizması harekete geçer. Trombositlerin kollajenle teması ve önceden ortamda bulunan trombin ve fibrinonektin, trombosit alfa granüllerinden sitokin ve büyüme faktörleri salgılanmasına neden olur [42,47].

Trombositlerden salgılanan faktörler; PDGF, TGF- β , Platelet Aktive Edici Faktör (PAF), fibronektin ve serotoninidir. Sitokinler ise İnterlökin-1 (IL-1) ve Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α)'dır. Yaralanmadan sonra başlayan geçici vazokonstriksiyon 5–10 dakika sürer. Pıhtı oluşumu ile kanama durdurulduktan sonra, endotel hücrelerinden salgılanan histamin, Prostaglandin E2 (PGE2), prostasiklin, endotelyal büyüme faktörü ile hücre geçirgenliği artar ve vazodilatasyon gelişir [47].

İnflamasyon fazında yaralanma bölgesine ilk gelen hücreler nötrofillerdir. İnflamasyonun neden olduğu artmış damar geçirgenliği, kompleman faktörler, IL-1, TNF- α , TNF- β gibi kemotaktik maddeler nötrofil kemotaksisini uyarır. Travmayı takiben 6 saat sonra yarada görülürler, ilk üç gün boyunca hakim olan hücrelerdir. Nötrofiller nonspesifik savunma sisteminin elemanı olarak, yara yüzeyindeki ana görevi yabancı cisim ve bakterilerin fagositozu ve proteaz salınımıyla da travmadan zarar gören hücre kalıntılarının yara bölgesinden temizlenmesidir. Nötrofiller görevlerini yaptıktan sonra makrofajlar tarafından fagosit edilirler. Maksimum sayıya 1–2. günlerde ulaşırlar ve yara temizlendikten sonra 2–3. günlerde sayıları azalır [42,47,48].

Makrofajlar sistemik dolaşımdaki monositlerden veya mevcut dokudaki mononükleer hücrelerden kaynaklanan, fagositoz yapan hücrelerdir. Yaralanmanın

2-3. gününde yara yüzeyinde makrofaj hakimiyeti başlar. Makrofajlar sadece fagositoz yapmakla kalmaz aynı zamanda çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve nitrik oksit sentezlerini gerçekleştirirler. Aktive olan makrofajlar lenfositleri aktive eder, lenfositler de Interferon (IFN), TNF- α , IL-1 gibi lenfokinleri salgılar. İnflamatuvar faz boyunca yara, gerilme kuvvetine dayanıklı değildir [42,47].

Çizelge 2.1.Makrofajların yara iyileşmesindeki rolü ve etki mekanizması

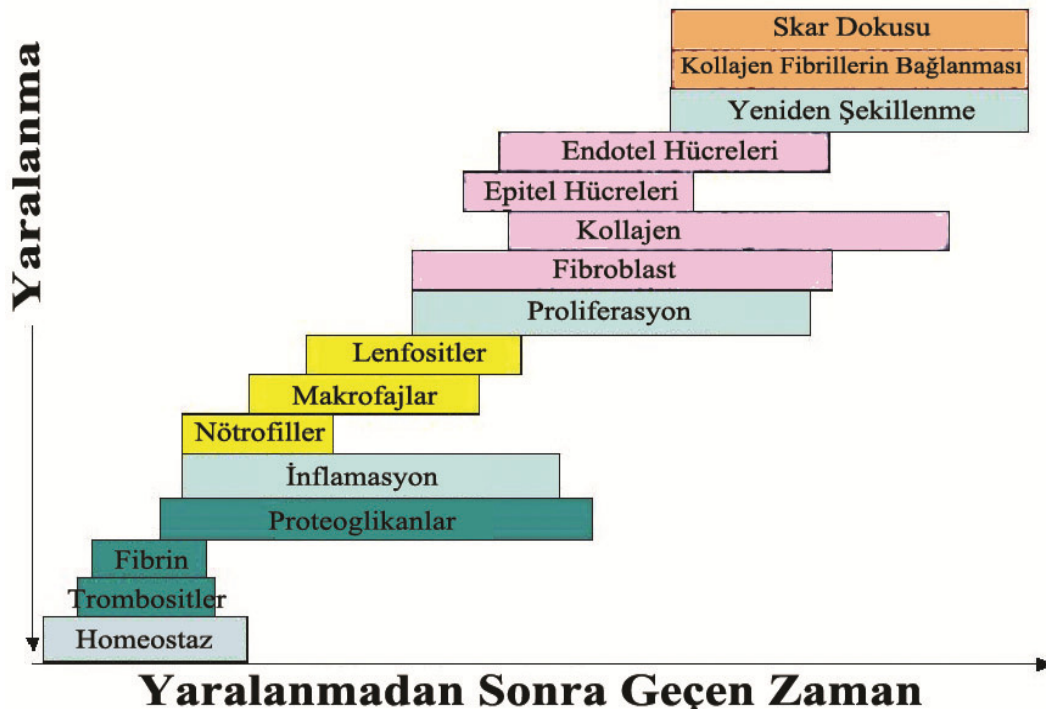
Etki	Mekanizma
Fagositoz ve antimikrobiyal etki	Oksijen radikalleri Nitrik oksit
Yara debridmanı	Fagositoz, Enzimler Kollajenaz, Elastaz
Matris sentezi	Büyüme faktörleri Sitokinler Enzimler, Kollajenaz Arjinaz Prostaglandinler
Hücre aktivasyonu	Büyüme faktörleri Sitokinler, Fibronektin
Angiogenez	Büyüme faktörleri Sitokinler

Anjiogenezis (Yeniden damarlanma)

Anjiogenez yeni damar oluşumdur. Bu fazda baskın hücreler endotel hücreleridir. Trombositlerden salınan PDGF, makrofajlardan salınan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ve TNF- α anjiogenik maddeler olup, çevre dokulardaki endotel hücrelerini uyarırlar [41,48].

Yara dokusunun çevresindeki mevcut venüllerin anjiogenik uyarıya maruz kalmasıyla, bu damarlardaki endotelial hücreler vasküler bazal membranı parçalayıcı enzimler sekrete eder. Bu olaydan 24 saat sonra endotel hücreleri anjiogenik uyarı doğrultusunda göç ederler. Bunlar bölünüp farklılaşarak tübüler bir lümen oluşturur ve böylece vasküler ağın dalları meydana gelir. Yeni meydana gelen bu damarların bir bölümü sonradan geriler ve kaybolur [48].

Yara bölgesi normal koşullarda hipoksik olup, düşük oksijen basıncı da anjiogenezis için bir uyarıdır. Neovaskülarizasyon ilerledikçe yara bölgesi hipoksisi ortadan kalkar, bu da anjiogenik uyarıyı azaltır ve ortadan kaldırır [48].



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi [50]

Proliferasyon

Bu fazda; fibroblastlar, epitel ve endotel hücreleri etkindir. Yara gerilme gücünde belirgin bir artış meydana gelir. Fibroblastlar yara dokusuna çevre dokulardan gelir,

endotelial hücreler ise yara kenarındaki sağlam venüllerden veya anjiogenez sonucu oluşan yeni kapillerlerden ortaya çıkar. Fibroblast ve endotelial hücrelerin proliferasyonundan, trombosit ve aktive makrofajlardan kaynaklanan sitokinler ve büyüme faktörleri sorumludur [42,47].

PDGF ve EGF fibroblastların proliferasyonundan sorumlu başlıca büyüme faktörleridir. Doku kaybı olan yaralarda sıvı kaybını engellemede ve enfeksiyon oluşumuna karşı koymada epitelial hücre artışı önemlidir. Yaralanmadan birkaç gün sonra yara kenarındaki veya sağlam bölgedeki epitel, yara içine doğru proliferasyon olur. Yeni kapillerlerin oluşumu ile yara bölgesi pembe veya kırmızı-mor renkte görülür. Kapiller vaskülarizasyon, fibroblastların yara matrisinde kalıcı destek doku oluşturmaya yardımcı olur. Kalıcı yara matrisindeki temel yapı molekülü kollajendir. Kollajen cilt, kemik ve tüm canlı dokuların başlıca yapı proteindir. Kollajen molekülü hidroksiprolin ve hidroksilizin hidrosilasyonundan meydana gelir. Bu amino asitlerin hidrosilasyonu ve kollajen arası bağların sağlamlaştırılması için C vitamini gereklidir. Kollajen fibrilleri arasındaki moleküller içi ve arası bağlar, yaranın gerilim kuvvetine ve sağlamlığına etki eder. Vücutta sentez edildiği bilinen 19 tip kollajen olmasına karşın yarada en yüksek oranda Tip-1 kollajen bulunur. Skar dokusunda da en çok Tip-1, daha az oranda Tip-4 kollajen bulunur [48].

Olgunlaşma ve Remodeling (Yeniden Şekillenme)

Proliferasyon ve neovaskülarizasyonun sona ermesiyle yeniden şekillenme fazı başlar. Yara iyileşmesinde inflamatuvar ve proliferatif fazların içiçe oluşup geliştiği gibi yeniden şekillenme ve proliferasyon fazında da birçok olay içiçe oluşur. Proliferatif fazdan yeniden şekillenme fazına geçiş kollajenin dengeye ulaştığı süreç olarak tanımlanır. Fibroblast ve makrofajlar kaybolur. Kollajen birikimi yaralanmadan 2-3 hafta sonra en yüksek değere ulaşır. Yeniden şekillenme döneminde kollajen sentezi ve yıkımı devam eder, ama kollajen miktarı değişmez. Kollajen senteziyle birlikte kollajen yıkımı yara matriksinin maturasyonu süresince

devam eder. Kapillerlerin yoğunluğu ve fibroblastların sayısı azalır. Pembe-mor görünümlü yaranın rengi soluklaşır. Gerilme kuvveti kollajen fibrillerinin yerini daha fazla moleküller arası bantlar içeren organize fibrillerin alması ile yavaş yavaş artar. Gerilme kuvveti ile kollajen fibrillerinin kalınlığı arasında doğru orantı vardır fakat epiderm hiçbir zaman eski şeklini alamaz. Skar dokusu gerilme kuvveti yaralanmadan bir haftadan sonra yaralanmamış cildin % 3' üne, üç haftadan sonra % 20' sine, üç ay sonra ise % 80' ine ulaşır ve daha fazla artmaz [42,48].

Yara iyileşmesinde bütün bu safhaların sonucunda yaralarda morfolojik olarak üç ana özellik olan yara kontraksiyonu, epitelizasyon ve bağ dokusu birikimi sağlanarak yara iyileşmesi tamamlanmış olur [47].

2.3. Büyüme Faktörleri

Ağırlıkları 4000- 60000 Dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktiviteleri etkileyebilen proteinlerdir [51].

Büyüme faktörleri hücrelerin replikasyon ve farklılaşmasını regüle ederler. Sistemik dolaşımda bulunurlar ve çeşitli hücre sistemleri ve dokularca salınırlar, bu nedenle de hücre metabolizmasının sistemik ve lokal düzenleyicileridir. Büyüme faktörleri dolaşımda serbest olarak ya da spesifik bağlayıcı proteinlere bağlı olarak bulunurlar yada platelet agregasyonundan sonra salınmak üzere platelet granüllerinde depolanırlar [52].

Büyüme faktörleri hücrel fonksiyonları endokrin, parakrin veya otokrin mekanizmalarla sağlarlar.

- Endokrin yolla etkileyen faktörler hedef hücreye kan yoluyla gider ve uzaktaki hücreleri de etkiler.
- Parakrin yolla etki eden faktörler salgılandıkları bölgede etkilidirler.
- Otokrin faktörler, tarafından salgılandıkları hücrenin fonksiyonlarını etkiler.

- Bazı transforme fibroblastlar, hiç salgılanmamış faktörlere hücrenin kendi içinde, intrakrin mekanizma ile yanıt verirler [51,53].

Geniş araştırmalarda dokuya özgü büyüme faktörü üretimi gösterilememiştir, çoğunlukla aynı faktör çeşitli hücre ve dokularca sentezlenir. Lokal olarak üretilen faktörlerin sentez ve etkileri sistemik hormonlarca reseptör içeren dokularda modifiye edilir. Sistemik hormonlar spesifik dokularda lokal faktörleri düzenleyerek hedef dokuya özgüllük kazandırır. Bu 4 seviyede düzenlenir;

- 1- Sentez
- 2- Aktivasyon
- 3- Reseptöre bağlanma
- 4- Bağlayıcı proteinler [52].

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktörler için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörleri bulunur [51,53].

Sitokin ve koloni uyarıcı faktörlerin reseptörleri diğer faktörlerinkinden farklıdır. Çünkü diğerleri sitoplazmik uzantılarında tirozin kinaz aktivitesi gösteren sitoplazmik bir parça içermezler ya da sitoplazmik uzantıları yoktur, veya çok kısadır. Bununla birlikte sitoplazmada tirozin kinaz aktivitesini başlatırlar. Bazı durumlarda bu bir transmembran proteini olan gp130' a bağlanmakla olur. Bu sitoplazmadaki Janus Tirozin Kinazları (JAKs) aktive eder. Bunlarda sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinleri aktive eder. Fosforillenen STAT' lar homo ve heterodimerler oluşturarak transkripsiyon faktörü olarak etki ettikleri nükleusa giderler. Bu JAK-STAT yolu direkt hücre yüzeyinden nükleusa olan bir diğer yoldur [54].

Büyüme faktörleri; kemotaktik ve hücrel proliferasyonu uyarmasıyla, aynı ve farklı tipteki hücreler arasındaki sinyalizasyonu sağlamasıyla, ekstrasellüler matriks oluşumu ve anjiogenezi kontrol etmesiyle, konsantrasyon sürecini düzenlemesiyle ve doku bütünlüğünü yeniden kurmasıyla iyileşme sürecinde temel bir rol oynarlar [55].

2.3.1. Büyüme faktörlerinin sınıflandırılması

Bilinen çok sayıda büyüme faktörü vardır ve bunların sınıflandırılması birkaç şekilde yapılmaktadır. Birinci sınıflandırma klasik sınıflandırmadır ve buna göre büyüme faktörleri 3 gruba ayrılır. Birinci grup; çeşitli hücrelerin çoğalmasını ve gelişimini sağlayan sinir büyüme faktörü (NGF), IGF-1, aktivin, inhibin ve EGF gibi faktörlerdir. Bu grupta 20' den fazla faktör tanımlanmıştır. Sitokinler ikinci gruptur. Sitokinler; makrofaj ve lenfositlerce üretilir ve immün sistemin düzenlenmesinde önemlidir. Üçüncü grup; kırmızı ve beyaz kürelerin çoğalma ve olgunlaşmasını düzenleyen koloni uyarıcı faktörlerdir [56].

Büyüme faktörlerinin klasik sınıflandırılması

- 1- Çeşitli hücre tiplerinin bölünme ve/veya gelişmesini uyaran büyüme faktörleri
NGF, EGF ve IGF-1
Aktivin ve İnhibinler
- 2- Lenfokin ve sitokinler
- 3- Koloni uyarıcı faktörler

Büyüme faktörleri; vücuttaki doğal metabolizmalar, fizyolojik ve patolojik durumlar üzerine etkilerine dayanarak da aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

- I- Embriyogenez ve gebelikte görevli büyüme faktörleri
- II- Epitel ve hemopoetik hücrelerde görevli büyüme faktörü
- III- Yara iyileşmesi ve inflamasyonda görevli büyüme faktörleri
- IV- Tümör hücreleri ile ilgili olan büyüme faktörleri [56].

2.3.2. Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri

Peptit büyüme faktörleri doku tamirinin başlatılmasında ve idamesinde önemli rol oynarlar. Doku hasarı olduğu zaman pıhtılaşma ve trombosit degranülasyonu uyarılır. Trombosit granüllerinin içinde PDGF, TGF- β , EGF ve IGF-1 bulunur. Trombositlerden salgılanan büyüme faktörleri, iyileşmeye giden yolda bir takım olaylar zincirini başlatırlar ve devam ettirirler. İlk olay, inflamatuvar hücrelerin, fibroblastların, epitel hücrelerinin ve endotel hücrelerinin yara bölgesine çekilmesidir. Trombositlerden salınan büyüme faktörleri hızla yara bölgesine dağılırlar ve proteazlar tarafından parçalanırlar. İyileşmenin olabilmesi için de inflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve epitel hücreleri tarafından büyüme faktörü sentezinin idamesi şarttır [57].

Bütün peptit büyüme faktörleri, etkilerini, hedef hücre zarında bulunan yüksek afiniteli reseptörlere bağlanarak gösterirler. Bu reseptörlerin aktivasyonu, yara iyileşmesine giden yolda bir takım olayları uyarır. Bu büyüme faktörlerinin postreseptör düzeyde hangi mekanizmayla yara iyileşmesini sağladıkları tam bilinmemekle beraber, tirozin rezidülerinden protein fosforilasyonunun temel olay olduğu sanılmaktadır [57].

2.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (Transforming Growth Factor-Beta /TGF- β)

TGF- β ailesi diğer büyüme faktörlerine nazaran daha yakın zamanda tanımlanmıştır. Bu ailenin üyeleri özellikle ektoderm kökenli keratinosit ve lökositlerin büyümesini geçici olarak inhibe ederken, fibroblast gibi mezoderm kökenli hücreler için zayıf da olsa mitojeniktir [6].

Yara iyileşmesi sürecinde inaktif halde bulunan TGF- β muhtemelen düşük pH veya plazminin etkisiyle proteolize uğramakta ve aktif hale geçmektedir. TGF- β 'nın

yara iyileşmesi bağlamında en önemli etkisi inflamatuvar hücre kemotaksisini uyarmak ve ekstraselüler matriks sentezini artırmaktır [11].

2.4.1. TGF- β ' nin özellikleri

Yapı/ fonksiyon özellikleri

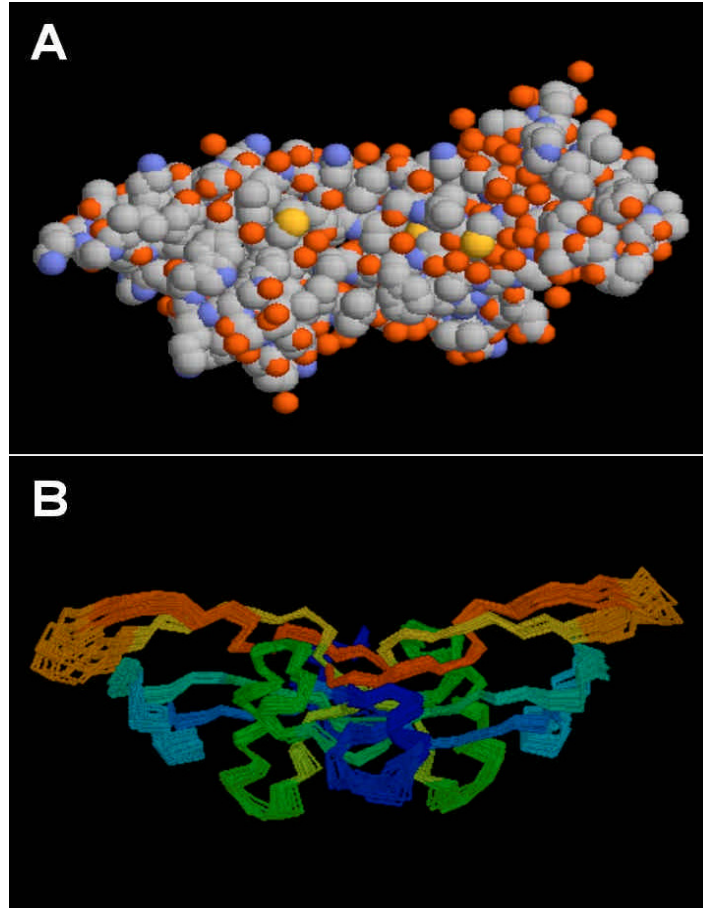
Hücre tipine ve durumuna bağlı olarak; steroidler, retinoitler, EGF, NGF, lenfosit aktivatörleri, vitamin D₃ ve IL-I gibi farklı uyarıcılarla TGF- β sekresyonu uyarılabilir. TGF- β sentezi EGF, Fibroblast büyüme faktörü (FGF), deksametazon, kalsiyum, retinoitler ve folikül stimule edici hormon ile inhibe edilebilir. Aynı zamanda TGF- β kendi gen ifadesini etkiler ve bu durum yara iyileşmesinde önemli olabilir [6].

TGF- β ; betaglikan ve dekorin kompleksi gibi ekstraselüler matriks ile birleşik olarak bulunabilir. Bu durum faktörün biyolojik olarak inaktif formda depo edilmesini sağlar [6].

Protein özellikleri

TGF- β ; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ve TGF- β 5 olarak bilinen en az beş izoformda bulunur. Bunlar; dönüştürücü büyüme faktörü α (TGF- α) ile ilişkili değildir. Bunların amino asit dizilimleri % 70- 80 arasında homoloji gösterir. TGF- β 1 genel formdur ve diğer izoformlar hücre ve dokularda daha sınırlı oranda bulunurken TGF- β 1 hemen hemen hepsinde yaygın olarak bulunur. TGF- β 2, NGF ve PDGF- BB' nin ayrıntılı topolojilerinde benzerlik vardır [6].

Bütün izoformların biyolojik olarak aktif formları disülfid bağlı homodimerlerdir. Bununla birlikte disülfid bağlı heterodimer izoformları da mevcuttur. Monomerik altbirimler 112 amino asit uzunluktadır. TGF- β 4 aminoterminal sonda iki tane ilave amino asit içerir [6].



Şekil 2.2. (A) Rekombinant insan TGF- β 1' in Nuclear Magnetic Resonance (NMR) yöntemi ile çıkarılan üç boyutlu şeması (B) TGF- β 1' in heteronükleer NMR yöntemi ile homodimer ayna görüntüsünün şematize edilmesi [58]

TGF- β izoformları uzun öncülerinin proteolitik bölünmesiyle ortaya çıkar.

TGF- β 1: 390 amino asit

TGF- β 2: 412 amino asit

TGF- β 3: 412 amino asit

TGF- β 4: 304 amino asit

TGF- β 5: 382 amino asit

Bu izoformlar prekürsörlerin karboksitermal ucundan elde edilir [6].

Gen yapısı

TGF- β 'nın farklı izoformları farklı genlerle kodlanır. Bütün genler 100 kb' tan fazla uzunluğa sahiptir ve 7 ekson içerir. Genler değişik kromozomların haritasını oluşturur. TGF- β 1 geni 19q13 insan kromozomunu, TGF- β 2, 1q41, TGF- β 3 de 14q24 nolu insan kromozomlarını haritalandırır. TGF- β 3 geni embriyonik kalp ve akciğer dokusunda çok fazla fakat karaciğer, dalak, böbrek dokularında sınırlı olarak görülür. TGF- β 1 dalak dokusunda çok fazla gösterilmiştir [7].

İlgili faktörler

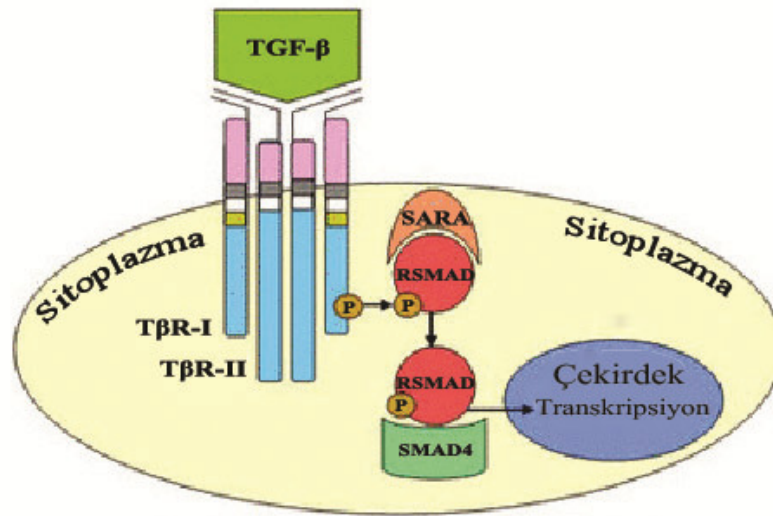
TGF- β ; TGF- β süper ailesi olarak bilinen protein ailesinin ilk örneğidir. Bu aile; inhibinler, Activin A, MIS (bone morphogenetic proteins), dpp (*Drosophila* decapentaplegic) ve Vg-1 (*Xenopus* vegetalising factor-1)' i kapsar. MNSF (monoklonal nonspesifik süpresör faktör) TGF- β 2 ile % 60 dizilim benzerliği gösterir [6].

2.4.2. TGF- β 'nın etki mekanizması

TGF- β , hücrelerin gelişmesini, çoğalmasını ve birçok farklı hücre tipinin gelişiminin bloke edilmesini regüle eder. TGF- β reseptörü Tip I ve Tip II altbirimlerinden oluşur. Bunlar SMAD protein ailesini uyaran, serin tirozin kinazlardır. TGF- β 'nın hücre yüzeyindeki Tip II reseptöre bağlanması Tip I reseptörün fosforlanmasına neden olur. Böylece Tip I reseptör Smad 2 ve 3 proteinini fosforlayacak ve aktive edecek duruma gelir. Aktive olan Smad 2 ve Smad 3, Smad 4 ile heterodimerler oluşturur ve nükleusa giderler. Smad kompleksi, ko-aktivatörler, ko-represörler ve diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte gen ekspresyonunu regüle ederler [59].

Burada üç fonksiyonel sınıf oluşturan 8 farklı Smad proteini vardır. Bu sınıflar; R-Smad (reseptör –kontrol) , Co-Smad (Co-mediator) ve I-Smad (engelleyici) dir. R-

Smadlar (Smad 1, 2, 3, 5 ve 8), Tip I reseptör kinazlarla direkt fosforlanır, aktive olurlar ve homotrimerizasyona uğrarlar ve Co-Smad, Smad 4 ile heteromerik kompleks oluştururlar. Aktif Smad kompleksleri nukleusa girer, diğer nükleer kofaktörlerle birleşerek hedef genlerin transkripsiyonunu regüle eder. I-Smad, Smad 6 ve Smad 7, TGF- β sinyalizasyonunu negatif yönde regüle eder. Bunuda reseptör için R-Smadlarla yarışarak veya Co-Smadlarla etkileşim kurarak yapar, çünkü TGF- β 'nın hücre gelişimi üzerinde negatif etkisi vardır. Bu mekanizmanın inaktive olması tümör oluşumuna neden olur. Tümör oluşturan mutasyonlar hem TGF- β ailesinin reseptörlerinde hemde Smad proteinlerinde gözlenir. TGF- β 'nın Tip II reseptörü birçok insanda gastrointestinal kanser ile mikrosatellit değişkenlikteki mutasyonda ve Smad 4 pankreatik karsinomların yaklaşık yarısında inaktiftir. Diğer birçok somatik ve kalıtsal hastalık TGF- β yolundaki mutasyon veya bozuklukların sonucudur [59].



Şekil 2.3. TGF- β 'nin sinyalizasyon yolu [60]

2.4.3. Yara iyileşmesinde TGF- β 'nin rolü

TGF- β yara iyileşmesi sürecinde hücre proliferasyonunu, hücre bölünmesini ve ekstrasellüler matriks oluşumunu tetikleyen önemli büyüme faktörlerindendir.

Ayrıca monositlerden FGF, PDGF, TNF-alfa ve IL-1 gibi diğer büyüme faktörlerinin sekresyonunu da uyarır; makrofajlar için kemotaktik bir ajandır bununla birlikte kendi salınımını da makrofaj içindeki otokrin bir yolakla düzenler [59].

Normal gelişim süresi 31 gün olan fœtal tavşana, gebeliğin 24. gününde TGF- β içeren subkutan yara implante edilmiş ve 1- 7 gün sonra görülen histolojik cevaplar TGF- β içermeyen fœtal ve yetişkin kontrol implantları ile karşılaştırılmıştır. Yetişkin implantın histolojisi erken akut inflamatuvar cevap ile karakterize ve 7. güne kadar fibroblastlar ve kollajenin baskın olduğu gözlenmiştir. Aksine fœtal tavşandan alınan kontrol implantlarında akut inflamasyon, fibroblastların artışı ve kollajen depolanması olmadığı görülmüştür. TGF- β ihtiva eden fœtal tavşanda 7. günde bol fibrotik reaksiyon gözlenmiş, histolojisinde kollajen depolanması ile belirgin fibroblast artışı görülmüştür. Bu çalışma TGF- β ' nın fœtal yarada fibroblast artışı ve kollajen birikimi ile yetişkin tavşanlardakine benzer iyileşmeye yol açtığını göstermiştir [61]. Yetişkin tavşanlarda yaralara TGF- β ' ya karşı nötralize edici antikorlar enjekte edildiğinde yaralarda daha az sayıda makrofaj, kan damarı ve daha az kollajen ve fibronektin içeriği olduğu ve skarsız iyileşme geliştiği tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol yaralarındakine eşit gerilme direnci ve daha normal deri yapısı gösterdiği de görülmüştür [9].

2.5. Serbest Radikaller

Atomlar ve kimyasal bileşikler, içerdikleri elektronları her orbitalde ikişer adet olmak üzere eşleşmiş şekilde ve zıt yönlü olarak içerirler. Orbitalerin bu şekilde zıt yönlü doyurulması, atom ve moleküllerin stabilitesini artırır, reaktivitesini azaltır. Elektron orbital teriminde, en dıştaki orbitalinde paylaşılmamış elektronu olan atom ya da molekül serbest radikal olarak tanımlanır. Herhangi bir atomun veya molekülün dış orbitalinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini artırır. Bu reaktivite, radikalın stabil

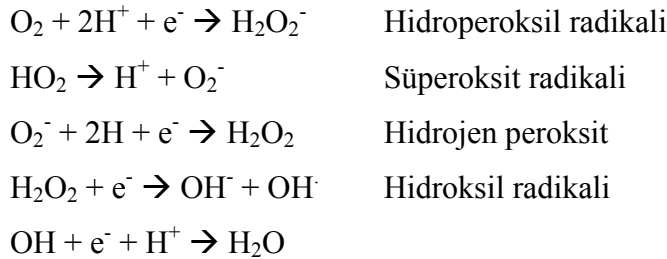
olmayan elektronik konfigürasyonundan kaynaklanır. Serbest radikal reaktivitesinin önemi, çeşitli türlerin son derece kısa olan yarılanma ömürleriyle değerlendirilebilir [14,15].

2.5.1. Serbest radikal kaynakları

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı olanlarıdır. Serbest radikaller metabolizma sırasında sürekli yapılanma içindedir. Aşağıda serbest radikal kaynakları ve oluşan radikaller özetlenmiştir [63].

Oksijen

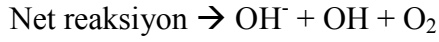
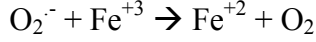
Oksijenin suya indirgenmesi sırasındaki tek elektron aktarmaları sonucunda oluşan reaktif moleküller radikallerin önemli bir grubunu oluşturur. Bu reaksiyonlar sırası ile;



Oksijenin bir elektron alınımı ile indirgenmesinden süperoksit anyonu, iki elektron indirgenmesi ile hidrojen peroksit oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali oluşur. Dördüncü elektron ilavesi ile su meydana gelir [63].

Süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Özellikle hem grupları, demir (Fe) – kükürt (S) grupları ve prostetik grup olarak geçiş metallerini (Fe, Cu gibi) içeren gruplarla etkileşim gösterir. SOD ile mutasyona uğrayarak hidrojen peroksiti oluşturur [63].

H₂O₂, zayıf bir indirgeyici ajandır. Ortamda geçiş metalleri olmadıkça oldukça sabittir. Geçiş metalleri varlığında hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyonlara Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları denir [63]. Bu reaksiyonlar şöyledir:



H₂O₂, katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından parçalanır.

Hidroksil radikali bütün oksijen radikalleri içinde en reaktif olanıdır; proteinler, karbonhidrat, lipit ve nükleik asitleri okside etme yetenekleri fazladır [63].

Oksijen kaynaklı diğer radikaller alkoksi radikali ve peroksi radikali olup lipit peroksidasyon reaksiyonları sırasında üretilirler [63].

Doğrudan radikal özelliği taşımayan, ancak geçiş metalleri varlığında ve aşırı radikal oluşumunda radikallerle birleşerek reaktivite kazanan moleküllere non-radikal oksijen partikülleri denir. Bu grupta H₂O₂, lipit hidroperoksitleri ve hipokloröz asit yer alır [63].

Aktive nötrofiller: Hipokloröz asit (HOCl)

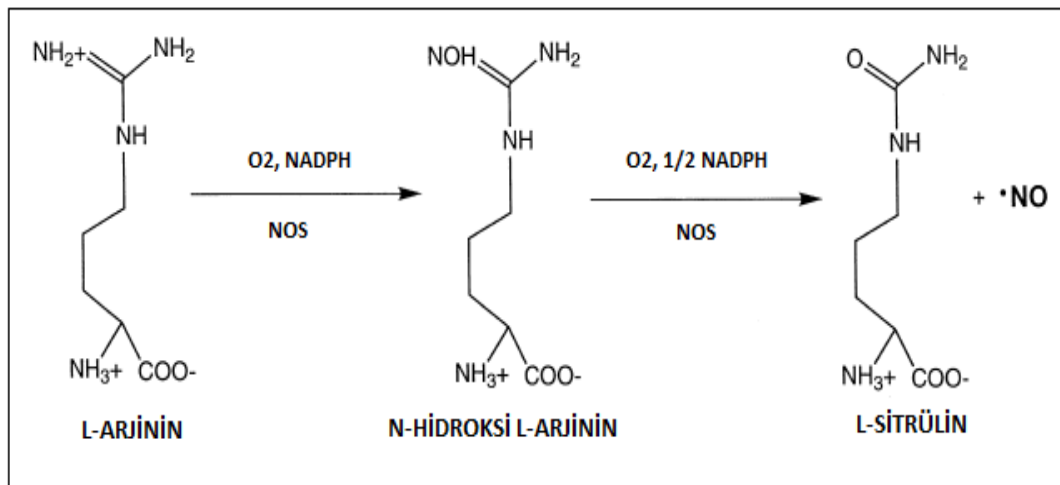
Aktive nötrofillerden üretilen güçlü bir oksidandır. Fagositler membran NADPH oksidan sistemi ile süperoksit radikalini oluştururlar. Oluşan radikal hızla dismutasyona uğrar ve hidrojen peroksit meydana gelir. Hidrojen peroksidin ortamda bulunan serbest klor iyonları ile miyeloperoksidaz katalizörlüğünde etkileşimi sonucunda HOCl oluşur. HOCl, oksidan bir molekül olup protein oksidasyonuna yol açabilir veya süperoksit radikali veya demir tuzları ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur [63].

Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Radikallerin en önemli özelliği, paylaşılmamış elektron içeriği nedeniyle çok reaktif olmalarıdır. Oysa paylaşılmamış elektron içermesine rağmen diğer radikal türlerle kıyaslandığında, NO'nin reaktivitesi son derece düşüktür. Bunun başlıca nedeni, paylaşılmamış elektronun N veya O atomları üzerinde lokalize olmaması, fakat iki atom üzerinde delokalize olmuş bir durumda bulunmasıdır.

NO büyük bir afinite ile organik yapılarıdaki metal merkezlere bağlanır. Nitrik oksitin biyolojik moleküllerle önemli tepkimeleri, kendiliğinden oksidasyonu sırasında oluşan Reaktif Nitrojen Oksit Türleri aracılığı ile gerçekleşir [14].

Nitrik oksitin sentezi için kullanılan öncül biyomolekül arjinin aminoasitidir. Nitrik oksitin sentezi, nitrik oksit sentaz enzimi üzerinde iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında N-Hidroksi Arjinin (N-OH-Arjinin) oluşur. Bu ara ürün oldukça stabildir ve istenirse tepkime ortamından izole edilebilir. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ikinci aşamada sitrulin ve nitrik oksite çevrilir.



Şekil 2.4. Nitrik oksitin sentezi [14]

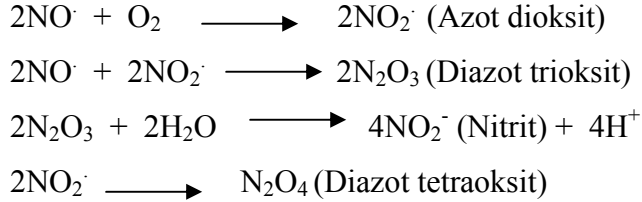
Nitrik oksit sentezini katalizleyen Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimlerinin konstitütif ve indüklenabilir (iNOS) olmak üzere iki temel izoformu bulunur. Konstitütif enzimin ayrıca iki izoformu vardır. Bunlardan biri endotelial NOS (eNOS) olup, ağırlıklı zarsal bir enzimdir ve endotel kaynaklı gevşeme faktörünün sentezinden sorumludur. Konstitütif enziminin ikinci formu ise merkezi sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO'nun üretiminden sorumlu olup, nöronal NOS (nNOS) olarak adlandırılır [14].

Konstitütif enzimlerin aktiviteleri mutlak olarak Ca^{++} / kalmodilin bağımlıdır. Kısa süreli NOS enzimini katalizlerler. Aktiviteleri düşüktür. Enzimlerin aktiviteleri glikokortikoidlerden etkilenmez. Endotelial tipi mast hücreleri, trombositler, pankreasın beta adacıklarında, vasküler düz kas hücrelerinde bulunur. Nöronal tipi sinir sistemi, adrenal bez (medulla ve korteks) ve astrositlerde bulunur. NOS enziminin indüklenebilir olan izoformu (iNOS) ise alt birim olarak kalmodiline ihtiyaç duyar. Aktivitesi için hücre içi kalsiyum derişiminin artması gerekli değildir. iNOS sitoplazmik bir enzimdir. Uzun süreli NO sentezini katalizlerler. Enzim aktivitesi yüksektir. Bu izoform ilk olarak makrofajlardan saflaştırılmıştır. iNOS enziminin sentezini lipopolisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile inflamatuvar sitokinler (interferon gama, IL-1, IL-2, TNF- α gibi) indüklerler. iNOS sadece fagositik lökositlere özgü olmayıp; uygun indüksiyon sağlandığında bütün çekirdekli hücreler bu enzimi sentezleme yeteneğine sahiptir [14].

NO'nun sitotoksik etkileri, yüksek konsantrasyonlarında ($>1\mu M$), O_2 ve O_2^- gibi diğer moleküllerle olan reaksiyonları sonucunda oluşan çok sayıdaki toksik türle ilişkilidir. Genellikle inflamatuvar şartlar gibi iNOS aktivasyonunun meydana geldiği durumlarda milimolar konsantrasyonlara ulaşabilen NO, O_2 varlığında stabilitesini koruyamaz ve oksitlenerek reaktif azot oksit ürünlerini oluşturur [64,65].

NO ve NO'nun oksidasyonu ile oluşan azot dioksit (NO_2), diazot trioksit (N_2O_3) ve diazot tetraoksit (N_2O_4) gibi türler nitrozilasyona sebep olan oldukça güçlü

ajanlardır. Primer ve sekonder aminleri nitrozilleyerek karsinojen nitrozaminleri oluşturabilirler [66,67].



$\text{NO}^\cdot$ ve $\text{NO}_2^\cdot$ 'dan türevlenen bu reaktif türler geçiş metalleri ile olan reaksiyonları sonucu lipid peroksidasyonunu başlatabilirler [66,67].

Mitokondrial elektron transport sistemi

Mitokondri de oksijenin suya indirgenmesi sırasında iç membranda lokalize elektron transport zincirinde superoksit radikali oluşur [63].

Endoplazmik retikulum

Sitokrom P405 ve sitokrom b5 içeren bu sistemler doymamış yağ asitlerinin ve ksenobiyotiklerin oksidasyonunda yer alır. Detoksifikasyon sırasında serbest radikaller meydana gelir [63].

Peroksizomlar

Peroksizomlar yüksek düzeyde oksidaz (örneğin, D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, açıl KoA oksidaz) içerdiklerinden dolayı güçlü bir hidrojen peroksit kaynağıdır [63].

Plazma membranları

Plazma membranında bulunan lipooksijenaz ve siklooksijenaz, radikal üretimine yol açan reaksiyonlardan sorumludur. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda prostoglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler meydana gelir [63].

2.5.2. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikaller oldukça reaktif moleküllerdir. Biyomoleküllerle reaksiyona girerek oluşturdukları bileşikler çoğu kez toksik özellik taşımaktadır [63].

Serbest radikallerin proteinler üzerine olan etkileri

Peptit bağları ile prolin ve lizin gibi aminoasitler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenir. Proteinlerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılığı, aminoasit bileşimine, proteinin aktivasyonundan veya yapısal düzenlenmesinden sorumlu aminoasitlerin yerleşimine ve hasarlı proteinin onarılabiliğine bağlıdır [63].

Serbest radikallerin nükleik asitler üzerine olan etkileri

İyonize radyasyondan kaynaklanan hücre mutasyonları ve ölüm, serbest radikallerin DNA ile olan reaksiyonu ile oluşabilir. Bu olayda özellikler hidroksil radikali rol oynamaktadır. Serbest radikal reaksiyonları sonrasında nükleik asitlerde baz değişimleri, DNA'da zincir kırılmaları meydana gelir. Tamir sistemlerindeki yetersizlik sonucu mutasyonlar gelişir. Oksidatif DNA hasarının göstergesi 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG; 8-oxo-2'-deoksiguanozin)'dir [63].

Serbest radikallerin lipitler üzerinde olan etkileri

Serbest radikallerin en iyi tanımlanmış etkileridir. Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membranda bulunan çoklu doymamış yağ

asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali, lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerdir. Demir iyonlarının lipit peroksidasyonunda önemli bir rolü vardır [63].

Yağ asidinin (LH) oksidasyon metilen karbonundan hidrojen atomunun çıkarılmasıyla başlar ve yağ asidi radikali (L) oluşur. İlerleme aşamasında yağ asidi radikali hızlı bir şekilde oksijen eklenerek peroksil radikalini (LOO) oluşturur. Lipit peroksil radikalleri zincir reaksiyonlarının başlatıcılarıdır, bunlar diğer çoklu doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatırlar. Sonlanma aşamasında lipit hidroperoksitleri yıkılarak daha reaktif radikal türleri oluşturur. Peroksi radikaller ayrıca siklik peroksitleri de oluşturabilmektedir. Ortamda bulunan demir ve bakır tuzları lipit hidroperoksitlerinin yıkılımını hızlandırmakta olup oluşan peroksi ve alkoksi radikalleri lipit peroksidasyonlarını uyarır. Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir (MDA). Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın azotlu bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir. Çoklu doymamış yağ asitleri hücre membranı, endoplazmik retikulum ve mitokontri gibi hayati organeller için gereklidir. Bunların yapısal bozulmaları hücresel fonksiyonlar için çok önemli sonuçlar doğurabilir. Radikaller, aldehytler ve diğer lipit peroksidasyon ürünleri membran proteinlerinde ciddi hasarlara yol açabilir [63].

Lipit peroksidasyon reaksiyonları genel olarak 2 tiptir:

- Non-enzimatik lipit peroksidasyonu; yukarıda anlatılan herhangi bir radikalin çoklu doymamış yağ asidindeki metilen karbonundan hidrojen atomunun uzaklaştırılması reaksiyonlarını kapsar [63].

- Enzimatik lipit peroksidasyonu; siklooksijenaz ve lipooksijenaz reaksiyonları sonucunda oluşan hidroperoksit ve endoperoksitler, enzimatik reaksiyon ürünleridir [63].

Başlama: $\text{LH} + \text{R} \rightarrow \text{L}^\cdot + \text{RH}$

İlerleme: $\text{L}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^\cdot$

$\text{LOO}^\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}^\cdot$

Sonlanma: $\text{LOOH} \rightarrow \text{LO}, \text{LOO}, \text{Malondialdehit (MDA) gibi aldehit}$

$\text{LOOH} + \text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^- + \text{RO}^\cdot$ (Alkoksi radikali)

$\text{LOOH} + \text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2} + \text{H}^+ + \text{RO}_2^\cdot$ (Peroksi radikali)

Membranda lipit peroksidasyon hasarını etkileyen faktörler;

- * membranın lipit/protein oranı
- * fosfolipit miktarı
- * yağ asitlerinin bileşimi
- * yağ asitlerinin doymamışlık derecesi
- * membranın akışkanlığıdır [63].

Membran lipit peroksidasyonu sonucunda;

- * membran transport sistemleri bozulur
- * hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur
- * hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur
- * hücre içi organellerde oluşan lipit peroksidasyonu litik enzimlerin salgılanmasına bağlı hasarlar gelişir [63].

Lipit peroksidasyonu ve okside LDL

Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) yapısındaki lipitlerin oksidasyonu sonucunda LDL yapısındaki modifikasyon ile okside LDL meydana gelir. LDL oksidasyonu ateroskleroz gelişiminde rol oynar. Okside LDL normal LDL'nin kullandığı reseptörlerden ayrı olarak süpürücü; çöpü reseptörler ile hücreye alınır. Bu yolla hücre içine alınan LDL, hücre içinde kolesterol artışına ve köpük hücre oluşumuna yol açar. Okside LDL, makrofajlar tarafından daha hızlı bir şekilde yıkılır, hücre için toksiktir [63].

Okside LDL;

- * endotelde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır
- * endotelde monosit adhezyonunu artırır
- * T hücre aktivasyonunu ve monosit farklılaşmasını indükler
- * makrofaj mobilitesini inhibe eder
- * makrofajlardan interlökin sentezini ve sekresyonunu uyarır
- * okside LDL'nin tüm bu etkileri ateroskleroz oluşunda rol oynamaktadır [63].

2.5.3. Serbest oksijen radikalleri ve yara iyileşmesi

Serbest radikaller, normal metabolizmanın yan ürünü olarak oluşabildiği gibi, enfeksiyon, inflamasyon, karsinogenez, ilaç ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle de oluşabilmektedir. İnflamatuar hastalıklarda ve yara iyileşmesinin inflamasyon fazında aktif nötrofillerce aşırı miktarda üretilen reaktif oksijen türlerinin doku hasarına yol açtığı bilinmektedir. Günümüze kadar yapılmış yara iyileşmesiyle ilgili araştırmaların çoğunda yara iyileşmesinde oksijenin yararlı, hipoksinin ise zararlı etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır [35,68,69]. Yara enfeksiyonunun önlenmesinde de oksijenin rolü olduğu bildirilmiştir [68,69].

Yara iyileşmesinin geç yangısal fazında, monositler dokuda makrofajlara dönüştürülür. Bakteri ve endotoksinlerin dolaşıma karışması ile makrofajlar uraılmış hale geçer. Bu durumda bakteri etkeniyle karşılaşan makrofajların büyüklük ve aktivasyonu ile birlikte makrofajlarda mitokondri, lizozom sayısı ve süperoksit üretimi artar. Bu artan reaktif oksijen türlerinin metabolitleri makrofajların yok etme gücünü ileri derecede arttırır. Ancak makrofajlar tarafından aşırı miktarda üretilen serbest radikaller rejenere olan deri hücreleri için son derece toksiktir. Makrofajlar önce fibroblastlar üzerinde etkili olarak hücresel çoğalmayı geciktirirler, sonra endotelyal hücreleri etkileyerek yarada yeni damar oluşumunu geciktirirler [70].

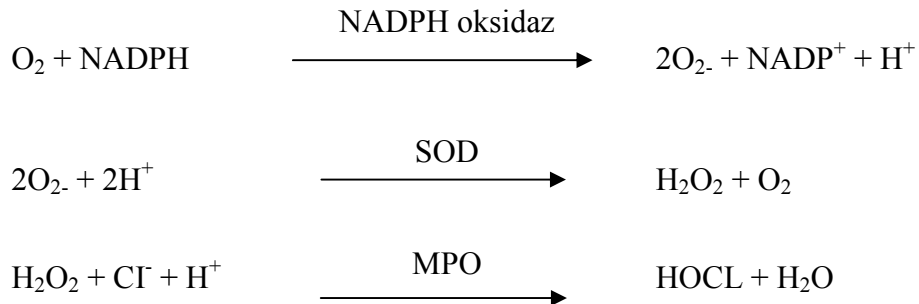
Makrofajlar, sistemik dolaşımdaki monositlerden veya mevcut dokudaki mononükleer hücrelerden kaynaklanan, fagositoz yapan hücrelerdir. Ancak makrofajlar sadece fagositoz yapmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve NO sentezlerini gerçekleştirirler [31].

Fagositoz; yabancı cisimciklerin, mikroorganizmaların, hasarlı ve ölü doku hücreleri ve savunma hücrelerini hücre içine alınması, yıkılması ve ortadan kaldırılması işlemlerini kapsar. Fagositozun ilk aşaması; fagositik hücrenin bakteri ve virüslere yapışmasıdır. Bu süreç kapsülsüz bakteri ve proteinlere karşı duyarsızdır. Kan proteinleri virulent bakterilerin etrafında bir film oluşturarak lökositlerin yapışmalarını sağlar ve onları fagositoza hazırlar. Diğer bakteriler yüzeylerinde böyle özel antikorlarla kaplanmazlarsa fagosome edilemezler. Sonraki aşamada fagositik hücrelerde psödopodlar oluşur. Psödopodlar, sitoplazmanın, partiküllerin etrafına akışını ifade eder. Psödopodların, partikülün tamamını sarıp içlerine almaları sürecine de fagozom oluşumu adı verilir. Fagozom hücre içerisine alındıktan sonra lizozom ile birleşir ve fagolizozom olarak adlandırılır. Bu yapı, hidrojen peroksit, reaktif oksijen türleri (serbest radikaller), peroksidaz, lizozom ve hidrolitik enzimleri ve etkileşimleri içerir. Fagositozun son aşaması, mikropların öldürülmesi ve parçalanmasıdır. Bakteriler ve diğer mikropların öldürülmesi geniş

ölçüde reaktif oksijen tüketiminde ani artış, glikojen katabolizması, glikoz oksidasyonunda artış ve reaktif oksijen türleri ile sağlanır [31].

Fagositozu takiben nötrofiller, monositler ve makrofajlar oksijen tüketiminde ani artış, glukoz oksidasyonunda artış ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile karakterize olan oksidatif bir patlamayı uyarır. Pentoz fosfat yolu aktivasyonun neden olduğu bir glukoz katabolizmasında artış vardır. Bu olay solunumsal patlama (respiratory burst) olarak adlandırılır ve reaktif oksijen türlerinin üretim ve salınımıyla ilgilidir [31,71].

Nötrofillerin mikrobisit aktiviteleri, oksijeni toksik olan süperoksit anyonlarına ve hidrojen perokside dönüştüren enzim sistemleri üzerine oturur. Nötrofillerin hücre membranındaki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, süperoksit oluşturan önemli bir kaynaktır. Bakteri, mitojen, opsonize partiküller, immün kompleksler, lektinler, araşidonik asit metabolizma ürünleri gibi etkenlerle bu enzim aktive olur. Oluşan süperoksit çoğu kez spontan reaksiyon veya süperoksit dismutaz enzimi ile hidrojen perokside dönüşür. Üretilen hidrojen peroksit miktarı genellikle birçok bakteriyi öldürmeye yeterli değildir ve klorür varlığında MPO enzimi hidrojen peroksidi HOCl'ye dönüştürür. HOCl kuvvetli bir oksidan ve antimikrobiyal ajandır. Bakteriyi halojenasyonla veya lipid peroksidasyonu ile öldürür. Oksidatif patlama ile fagolizozomal içerik sindirilir ve bundan sonra ekzositoz ile dışarıya atılır [72].



2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallere karşı vücutta antioksidanlar olarak isimlendirilen savunma sistemleri bulunmaktadır. Antioksidanlar çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedir [63]. Bu mekanizmalar:

- *radikal oluşumunun sınırlandırılması
- *tetiklenen biyokimyasal reaksiyonlarının kırılması
- *radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi
- *oluşan radikallerin detoksifikasyonu
- *hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasıdır [63].

2.6.1. Antioksidanların yerleşim bölgelerine göre sınıflandırılması

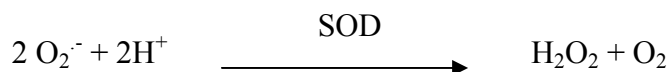
Antioksidanlar yerleşim bölgelerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar

- *hücre içi antioksidanlar
- *membranda bulunan antioksidanlar
- *hücre dışı antioksidanlar [63].

a. Hücre içi antioksidanlar:

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak detoksifiye eder. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD'dur.

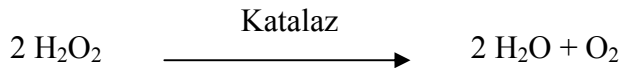


SOD'un çinko-bakır (Cu-Zn) ve mangan (Mn) kapsayan iki ayrı izoenzimi bulunmaktadır. Cu ve Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi ise mitokondride yerleşim gösterir [63]. Her iki SOD' un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD' un hücre dışı aktivitesi ise çok düşüktür [35].

SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır [35].

Katalaz (CAT)

Yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlar [63].



Glutasyon peroksidaz (GPx)

Düşük konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlar.



GPx'in selenyum (Se) bağımlı ve Se-bağımsız iki farklı tipi vardır. Se-bağımlı formu hem H₂O₂'in hem de lipid hidroperoksitlerinin metabolizmasında yer alırken, Se-bağımsız tipi sadece lipid hidroperoksitlerini metabolize etmektedir [63].

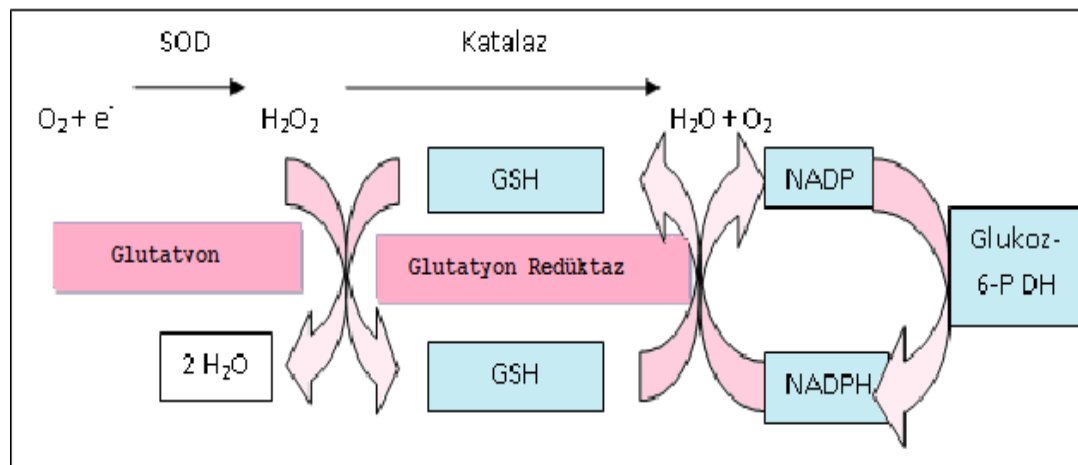
Sitokrom oksidaz

Oksijenin suya indirgenmesi sırasında radikal oluşumunu önler [63].

Glutatyon (GSH)

Karaciğerde, genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptiddir. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiştir. Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında, proteinlerdeki –SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Böylece, fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller [35] GPx'ın fonksiyonu için gereklidir. Hidrojen peroksitin detoksifikasyonu sırasında GPx, redükte GSH'ın tüketimine yol açar. Detoksifikasyonun devamı için meydana gelen okside glutatyonun (GSSG) redükte formuna döndürülmesi gerekir [63].

Glutatyon redüktaz, NADPH bağımlı bir enzim olup GSSG'ın redüksiyonunu sağlar. GSH ayrıca lipit peroksitlerinin ve disülfidlerin, indirgenme reaksiyon sırasında da okside olur [63].

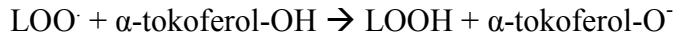


Şekil 2.5. Hücre içi antioksidanlar ve aktiviteleri [63]

b. Membranda bulunan antioksidanlar:

E vitamini (α -tokoferol)

Yağda erir en kuvvetli antioksidan vitamindir. Radikal reaksiyonları sırasında zincirleme giden reaksiyonları bozucu etkisi (zincir kırıcı antioksidan) bulunur. Lipit peroksilleri ile olan radikal sonucunda kendisi de zayıf etkili radikale dönüşür. A-tokoferol redüktaz ile aktif formuna dönüşmesi için GSH ve askorbik aside ihtiyaç gösterir [63].



A vitamini (β -karoten)

Radikal toplayıcı etkisi bulunmaktadır [63].

Membranın yapısal organizasyonu

Fosfolipit/kolesterol oranı, radikal hasarı derecesi bakımından önemlidir. Doymamışlığın artışı radikal etkisini arttırırken, fosfolipit artışı savunmayı güçlendirir [63].

c. Hücre dışı antioksidanlar:

Transferrin: Metal katalizli lipit peroksidasyonuna yol açan demir iyonlarını bağlayarak serbest demir oluşumunu önler [63].

Laktoferrin: Demiri bağlamak sureti ile etkili olan bir süt proteinidir [63].

Haptoglobulin ve hemopeksin: Hemoglobulini bağlayarak serbest hemoglobin oluşumunu sınırlar [63].

Seruloplazmin: Bakır iyonlarını bağlamak sureti ile metal katalizli reaksiyonları sınırlar [63].

Ürik asit: Radikal tutucu özelliğinin yanı sıra demir ve bakırı bağlayarak serbest radikal reaksiyonlarını da önler [63].

Askorbik asit: Suda eriyen en güçlü antioksidan moleküldür. Biyolojik ortamlarda askorbat şeklinde bulunur. Radikal tutucu etkisi vardır. E vitamininin rejenerasyonunda rolü vardır [63].

SOD ve GPx: Plazmadaki etkileri oldukça sınırlıdır [63].

Bilirubin: Süperoksit ve hidroksil radikalinin toplayıcısıdır [63].

Mukus: İçerdikleri enzimler açısından antioksidan özellik taşımaktadır [63].

Glukoz: Fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etkilidir. Yüksek konsantrasyonlarda radikal üretici olarak davranır, glukozun otooksidasyonu radikal oluşumuna yol açar [63].

3. MATERYAL-METOT

3.1. Deney Protokolü

Çalışmada Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden (GÜDAM) temin edilen $2,5 \pm 0,4$ kg ağırlığında, toplam 42 adet erkek Yeni Zellanda türü tavşan kullanılmıştır. Deneylerde 12 saat aydınlık–12 saat karanlık periyoduna uyulmuş, hayvanlar sıcaklığı $22 \pm 2^\circ\text{C}$ olarak ayarlanmış bir ortamda tutulmuştur. Hayvanların tümü deney süresi boyunca standart tavşan yemi ile beslenmiştir.

3.2. TGF- β Preparatının Hazırlanması

Deneylerde kullanılan pelet (boncuk) formu G. Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır. Bunun için inert bir madde olan polietilenglikol (PEG) boncuk kullanılmıştır. Bu nedenle yara iyileşmesinde etkili faktörümüzü PEG içerisinde uyguladık. Laboratuvarımızda yaptığımız ön denemelerde PEG; in vitro koşullarda 37°C ’ de 35 dakikada erimiştir ve in vivo koşullarda da en az bu süre içinde yaraya yavaş yavaş serbestlenmektedir.

TGF- β 1 (Sigma, T- 7039 2 UG) 1 flakon suda çözülüp polietilen glikol (PEG 4000, ort 0,02 g) içinde 20 ng olacak şekilde doze edilerek hazırlanmıştır. Uygulamalarda, TGF- β 1 400 μ l distile suda çözünmüştür. Su hacmi vakum altında yeterli miktara kadar 30°C de steril şartlarda uçurulmuştur. Daha sonra PEG’ den bir damla sonra TGF- β 1 çözeltisinden 20 ng eşdeğer TGF- β 1 çözeltisi hesaplanarak bu miktar damlatılmış ve karıştırılmıştır. Bu şekilde UV lamba altında steril şartlarda hazırlanan PEG+ TGF- β 1 şeklinde formulasyonlar ayrı ayrı flakonlara yerleştirilip ağzı kapatılarak deneylerimizin yapıldığı Fizyoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

3.3. Yara Modelinin Oluşturulması ve Gruplar

Sabah saat 10:00' da hayvanların önce standart terazide ağırlıkları saptanmıştır. Daha sonra ketamin (Ketalar 50mg/kg) ve ksilazin (Rhompun 5mg/kg) intramüsküler olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlanmıştır. Hayvanın ağzı açılıp, yanak ve dil ekarte edildikten sonra kesici dişler ile azı dişler arasındaki diastema bölgesinin en derin iç bükey yeri, merkez olacak şekilde sağ ve sol çenede kretin tepesine 1,5 cm uzunluğunda, yaklaşık 0,5 cm derinliğinde postero-anterior yönde insizyon (kesi), periost kemiğine kadar inecek şekilde tek işlemde gerçekleştirilmiştir. İnsizyondan sonra yara dudakları vestibul ve lingual yönde periost elevatörü ile mukoza üzerinde formülasyonlar yerleşecek kadar cerrahi teknikler kullanılarak ekarte edilmiştir. Tüm tavşanların ağız mukozasında insizyon yarası yapılmıştır [73]. Daha sonra yara dudakları adapte edilip kanama kontrolü yapılarak iki adet sütür atılmıştır.

Kontrol grubundaki tavşanlara hiçbir cerrahi uygulama yapılmamıştır (n=6).

I. Gruptaki tavşanlara sadece kesi yarası yapılmıştır ve bu grup kendi içinde 3' e ayrılmıştır :

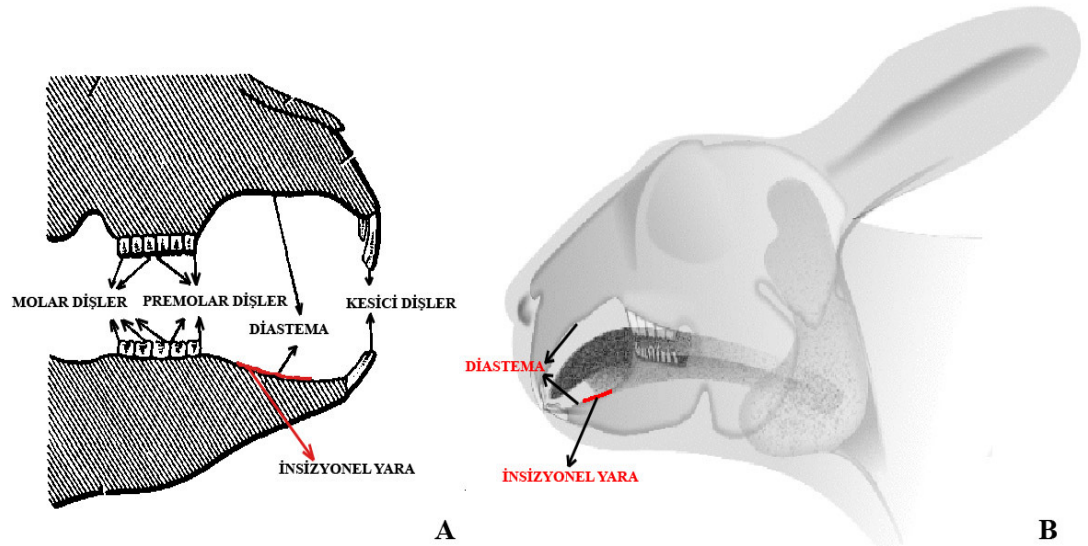
- * 1. Günde feda edilenler (KY 1. gün; n=6)
- * 3. Günde feda edilenler (KY 3. gün; n=6)
- * 5. Günde feda edilenler (KY 5. gün; n=6)

II. Gruptaki tavşanlara PEG+TGF- β ' lı kombinasyonları taşıyan boncuk yerleştirilmiştir ve bu grup kendi içinde 3' e ayrılmıştır :

- * 1. Günde feda edilenler (TGF- β 1. gün ; n=6)
- * 3. Günde feda edilenler (TGF- β 3. gün ; n=6)
- * 5. Günde feda edilenler (TGF- β 5. gün ; n=6)

Daha önce yapılan çalışmalarda PEG' un dokuya uyumlu bir madde olduğu gösterildiği için PEG kontrol grubu oluşturulmasına ihtiyaç duyulmamıştır [74].

Kesi yarası yapılan ve PEG+TGF- β 1 kombinasyonlu boncuk uygulanan tavşanlar; kronobiyolojik sıraya uygun olacak şekilde operasyonu izleyen 1., 3. ve 5. günlerde sabah saat 10:00' da ağırlıkları tartılarak, aşırı doz sodyum barbital, kulak veninden verilerek feda edilmiştir. Ağızdaki yaklaşık 1,5 cm uzunluğunda, 0,5 cm derinliğindeki çene kemiğine kadar inen yara dokusu hemen çıkarılarak, bulaşmayı önleyecek materyale sarıldıktan sonra sıvı azot içerisinde konularak dondurulmuştur.



Şekil 3.1. Kesi yarası yapılan bölgesinin şematizasyonu [75,76]

3. 4. Yöntemler

3.4.1. Dokuda MDA tayin yöntemi

Dokudaki MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı [77]. Doku örnekleri tartıldı. Homojenizatör ile soğuk triklorasetik asit (TCA) içinde homojenize edildi. Daha sonra süpernatant alınarak üzerine tiyobarbitürik asit (TBA) ve bütildihidroksi toluen (BHT) eklendi. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm'de, köre karşı okundu. Dokulardaki MDA konsantrasyonu nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.4.2. Dokuda GSH tayin yöntemi

Dokuda glutatyon tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı [78]. Doku örnekleri MDA yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj edildikten sonra süpernatant, sodyum fosfat (NaH_2PO_4) ve 5,5 dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5- 10 dk inkübe edildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Dokulardaki GSH konsantrasyonu $\mu\text{mol/g}$ doku olarak hesaplandı.

3.4.3. Dokuda NOx tayin yöntemi

Dokulardaki NOx konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışıldı [79,80]. Dokular, 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH:7) ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. 200 μL süpernatana, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda vanadyum klorür (VCl_3) eklendi ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklendi. 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm'de okundu. 6,4 mM'lık stok sodyum nitrit (NaNO_2) standartı günlük olarak dilüe edilerek, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 μM konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Hazırlanan standart eğriden dokulardaki NOx konsantrasyonu $\mu\text{mol/g}$ doku olarak hesaplandı.

3.4.4. Dokuda AA tayin yöntemi

Roe ve Kuether'in Berger tarafından modifiye edilmiş metodu kullanıldı [81]. Doku perklorasetik asit/etilendiamin tetra asetik asit (PCA/EDTA) karışımı içinde buz soğukluğunda homojenize edildi. Homojenat 15000 g'de 3 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Bir tüpe standart AA çözeltisi, başka bir tüpe kör için PCA çözeltisi ve örneklerin hazırlanacağı tüplere süpernatant konuldu. Her bir tüpe renk reaktifi eklenip vortekslenerek 3 saat 37 °C'de inkübe edildi. Numunelerin ısısı 0 °C'ye

getirilip her bir tüpe sülfürik asit (H_2SO_4) eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Numuneler 515 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu. Dokulardaki AA konsantrasyonu mg/g doku olarak hesaplandı.

3.4.5. Dokuda SOD tayin yöntemi

Dokulardaki SOD aktivitesi, Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre çalışıldı [82]. 10 kat serum fizyolojik ile homojenize edilen dokular, 7000 rpm'de 4 °C'de 30 dk santrifüj edildikten sonra, 1 ml süpernatana etanol-kloroform (3:5,v/v) karışımından 1 ml eklendi. Süpernatantlar tekrar 7000 rpm'de 60 dk santrifüj edildikten sonra 0,5 ml süpernatana 2,45 ml reaktif karışımı [3 mM ksantin, 0,6 mM EDTA, 150 μ M nitro blue tetrazolium (NBT), 400 mM sodyum karbonat (Na_2CO_3), 1g/L bovine serum albumin (BSA)] ve 50 μ l ksantin oksidaz eklendi. 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra bakır klorür ($CuCl_2$) ilavesi ile reaksiyon sonlandırılıp numuneler spektrofotometrede 560 nm'de köre karşı okundu. 1 ünite SOD'un NBT'nin indirgenmesini %50 oranında inhibe ettiği kabul edilerek dokulardaki SOD aktivitesi U/g doku olarak hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bütün değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. MDA, GSH, NO_x , AA ve SOD değerleri Anova Varyans Analizi ile değerlendirildi. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Kontrol, Kesi Yarası grubu TGF- β 1 uygulama grubuna ait MDA, GSH, NOx, AA düzeyleri ve SOD aktivitesine ait sonuçlar ise Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1.Yara dokusundaki MDA, GSH, NOx, AA düzeyleri ve SOD aktivitesi

GRUPLAR	NOx ($\mu\text{mol/g doku}$)	MDA (nanomol/g doku)	SOD (U/g doku)	GSH ($\mu\text{mol/g doku}$)	AA (mg/g doku)
Kontrol (n=6)	4.111 $\pm$ 0.823	11.610 $\pm$ 2.320	2.201 $\pm$ 0.413	7.812 $\pm$ 1.725	0.006 $\pm$ 0.001
KY 1.Gün (n=6)	39.123 $\pm$ 4.132*	67.881 $\pm$ 4.769*	10.323 $\pm$ 1.274*	14.068 $\pm$ 2.775*	0.150 $\pm$ 0.023*
KY 3.Gün (n=6)	20.912 $\pm$ 2.885 ^a	45.057 $\pm$ 12.442 ^a	14.322 $\pm$ 1.483 ^a	30.870 $\pm$ 5.438 ^a	0.211 $\pm$ 0.019 ^a
KY 5.Gün (n=6)	14.481 $\pm$ 2.637 ^{a,b}	18.635 $\pm$ 4.919 ^{a,b}	6.635 $\pm$ 0.819 ^{a,b}	26.345 $\pm$ 3.824 ^a	0.307 $\pm$ 0.022 ^{a,b}
TGF- β 1.Gün (n=6)	34.045 $\pm$ 2.982*	72.320 $\pm$ 8.116*	28.234 $\pm$ 1.058 ^a	22.472 $\pm$ 2.402 ^a	0.016 $\pm$ 0.003 ^a
TGF- β 3.Gün (n=6)	104.572 $\pm$ 4.491 ^{a,b,d}	151.680 $\pm$ 24.678 ^{a,b,d}	32.312 $\pm$ 1.483 ^{a,b,d}	25.118 $\pm$ 4.362*	0.277 $\pm$ 0.026 ^{a,b,d}
TGF- β 5.Gün (n=6)	60.283 $\pm$ 4.366 ^{a,c,d,e}	93.307 $\pm$ 5.868 ^{a,c,d,e}	18.014 $\pm$ 1.876 ^{a,c,d,e}	20.377 $\pm$ 2.302*	0.160 $\pm$ 0.028 ^{a,c,d,e}

*p< 0.05 Kontrolle karşılaştırıldığında

^ap< 0.05 KY1'in aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^bp< 0.05 KY3'ün aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^cp< 0.05 KY5'in aynı değeriyle karşılaştırıldığında

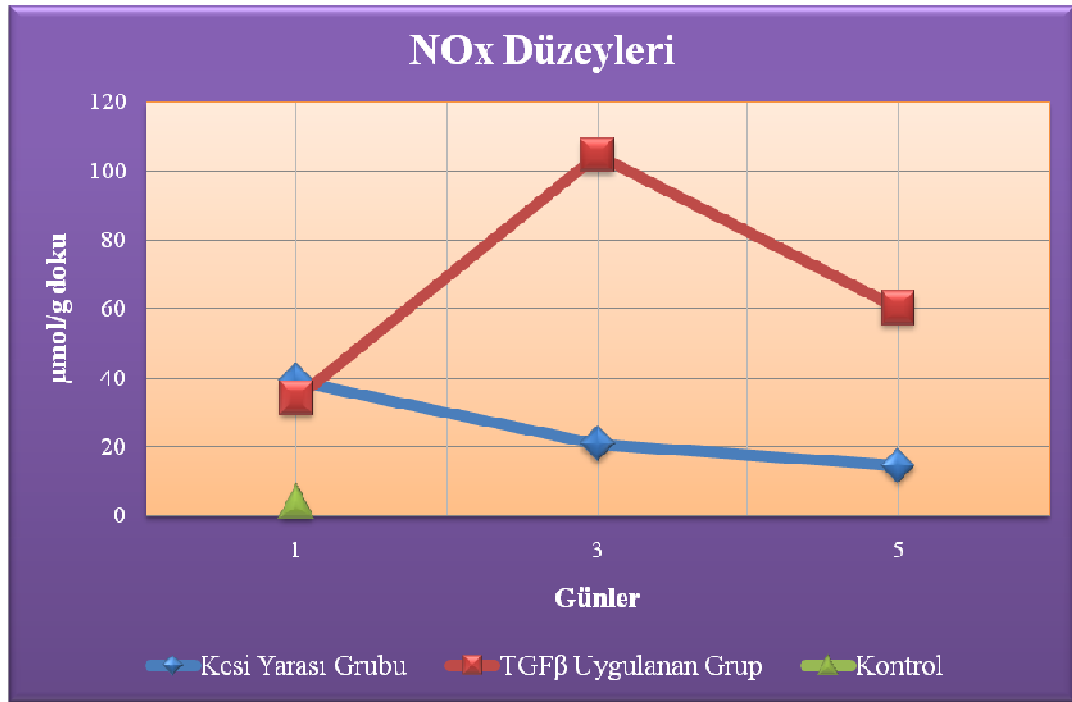
^dp< 0.05 TGFB1'in aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^ep< 0.05 TGFB3'ün aynı değeriyle karşılaştırıldığında

4.1. NOx Sonuçları

Hiçbir uygulama yapılmayan oral mukozada NOx düzeyi 4.111 $\pm$ 0.823 $\mu\text{mol/g doku}$; kesi yarası yapılan gruplarda 1. günde 39.123 $\pm$ 4.132 $\mu\text{mol/g doku}$, 3. günde 20.912 $\pm$ 2.885 $\mu\text{mol/g doku}$, 5. günde 14.481 $\pm$ 2.637 $\mu\text{mol/g doku}$; TGF- β 1 uygulaması yapılan gruplarda 1. günde 34.045 $\pm$ 2.982 $\mu\text{mol/g doku}$, 3. günde 104.572 $\pm$ 4.491 $\mu\text{mol/g doku}$, 5. günde 60.283 $\pm$ 4.366 $\mu\text{mol/g doku}$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

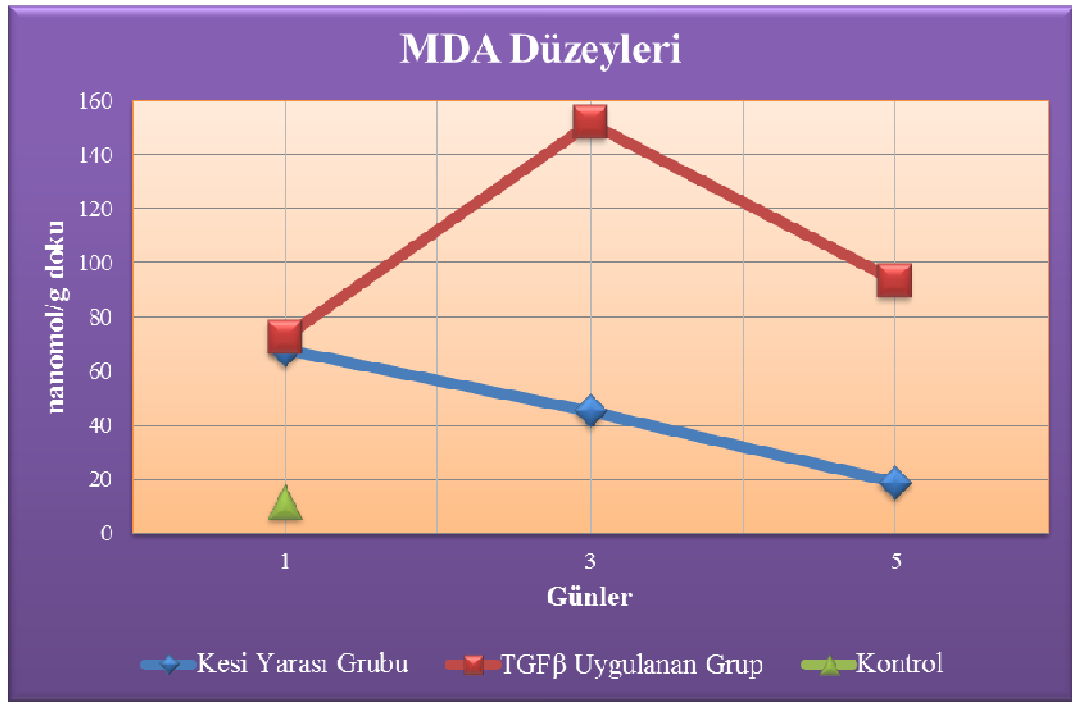
Tüm gruplarda NOx düzeyi kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir ($P<0.05$). Kesi yarası grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 3. günde 1. güne kıyasla, 5. günde ise hem 1. hem de 3. güne kıyasla anlamlı azalmalar tespit edilmiştir ($P<0.05$). TGF- β 1 uygulaması yapılan gruplarda 1. günde kesi yarası grubunun 1. gününe oranla anlamlı bir azalma tespit edilmişse de bu istatistiksel açıdan anlamlı değildir. 3. gününde kesi yarası grubunun 3. gününe göre anlamlı bir artış, 5. gününde de kesi yarası grubunun 5. gününe göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P<0.05$). TGF- β 1 uygulama grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 3. ve 5. günlerde 1. güne kıyasla anlamlı artışlar görülmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Tüm gruplara ait NOx düzeyleri

4.2. MDA Sonuçları

Hiçbir uygulama yapılamayan oral mukozada MDA düzeyi 11.610 ± 2.320 nanomol/g doku; kesi yarası yapılan gruplarda 1. günde 67.881 ± 4.769 nanomol/g doku, 3. günde 45.057 ± 12.442 nanomol/g doku, 5. günde 18.635 ± 4.919 nanomol/g doku; TGF- $\beta 1$ uygulaması yapılan gruplarda 1. günde 72.320 ± 8.116 nanomol/g doku, 3. günde 151.680 ± 24.678 nanomol/g doku, 5. günde 93.307 ± 5.868 nanomol/g doku olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.2).



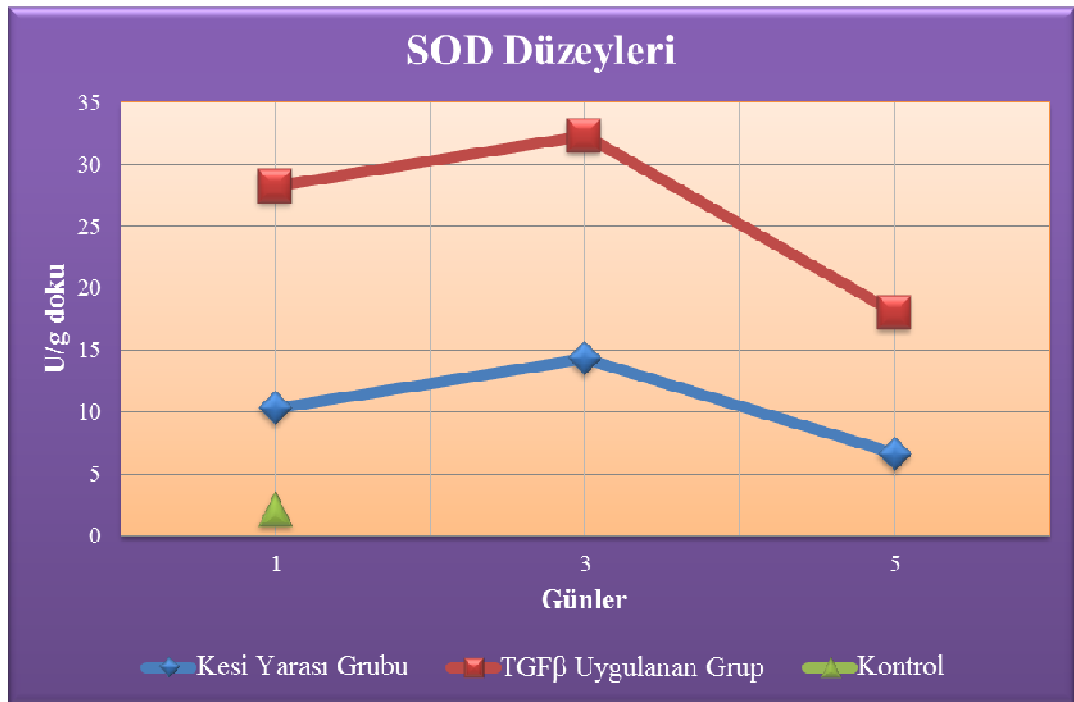
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait MDA düzeyleri

Tüm gruplarda MDA düzeyi kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış bulunmuştur ($P < 0.05$). Kesi yarası grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 3. ve 5. günlerde 1. güne oranla anlamlı ($P < 0.05$) bir azalma tespit edilmiştir. TGF- $\beta 1$ uygulaması yapılan gruplarda 3 ve 5. günlerde kesi yarası grubunun 3. ve 5. günlerine kıyasla anlamlı bir artış kaydedilmiştir ($P < 0.05$). 1. günde ise kesi yarasının 1. günü ile karşılaştırıldığında bir artış bulunmuştur ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. TGF- $\beta 1$ grubu kendi içinde

değerlendirildiğinde 3. günde 1. güne oranla anlamlı bir artış, 5. günde ise 1. güne kıyasla anlamlı bir artış, 3. güne oranla da anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.2).

4.3. SOD Sonuçları

Hiçbir uygulama yapılmayan oral mukozada SOD düzeyi 2.201 ± 0.413 U/g doku, kesi yarası yapılan gruplarda 1. günde 10.323 ± 1.274 U/g doku, 3. günde 14.322 ± 1.483 U/g doku, 5. günde 6.635 ± 0.819 U/g doku; TGF- $\beta 1$ uygulaması yapılan gruplarda 1. günde 28.234 ± 1.058 U/g doku, 3. günde 32.312 ± 1.483 U/g doku, 5. günde 18.014 ± 1.876 U/g doku olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.3).



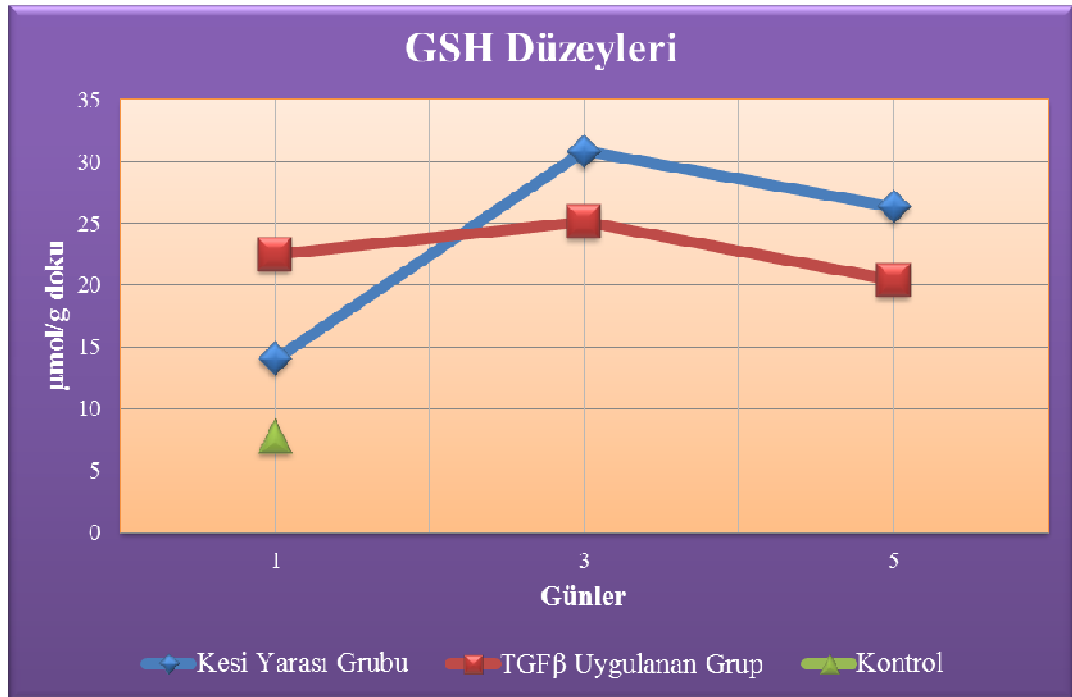
Şekil 4.3. Tüm gruplara ait SOD düzeyleri

Tüm gruplarda SOD düzeyleri kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydetmiştir ($P<0.05$). Kesi yarası grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 3. günde 1. güne kıyasla anlamlı bir artış, 5. günde ise 1. ve 3. güne oranla anlamlı bir azalma

tespit edilmiştir ($P<0.05$). TGF- β 1 uygulaması yapılan gruplarda 1., 3. ve 5. günlerde kesi yarası grubunun 1., 3. ve 5. günlerine kıyasla anlamlı artışlar tespit edilmiştir ($P<0.05$). TGF- β 1 uygulama grupları kendi içinde değerlendirildiğinde 3. günde 1. güne kıyasla anlamlı bir artış, 5. günde ise 3. güne oranla anlamlı bir azalma kaydedilmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.3).

4.4. GSH Sonuçları

Hiçbir uygulama yapılmayan oral mukozada GSH düzeyi 7.812 ± 1.725 $\mu\text{mol/g}$ doku; kesi yarası yapılan gruplarda 1. günde 14.068 ± 2.775 $\mu\text{mol/g}$ doku, 3. günde 30.870 ± 5.438 $\mu\text{mol/g}$ doku, 5. günde 26.345 ± 3.824 $\mu\text{mol/g}$ doku; TGF- β 1 uygulaması yapılan gruplarda 1. günde 22.472 ± 2.402 $\mu\text{mol/g}$ doku, 3. günde 25.118 ± 4.362 $\mu\text{mol/g}$ doku, 5. günde 20.377 ± 2.302 $\mu\text{mol/g}$ doku olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.4).

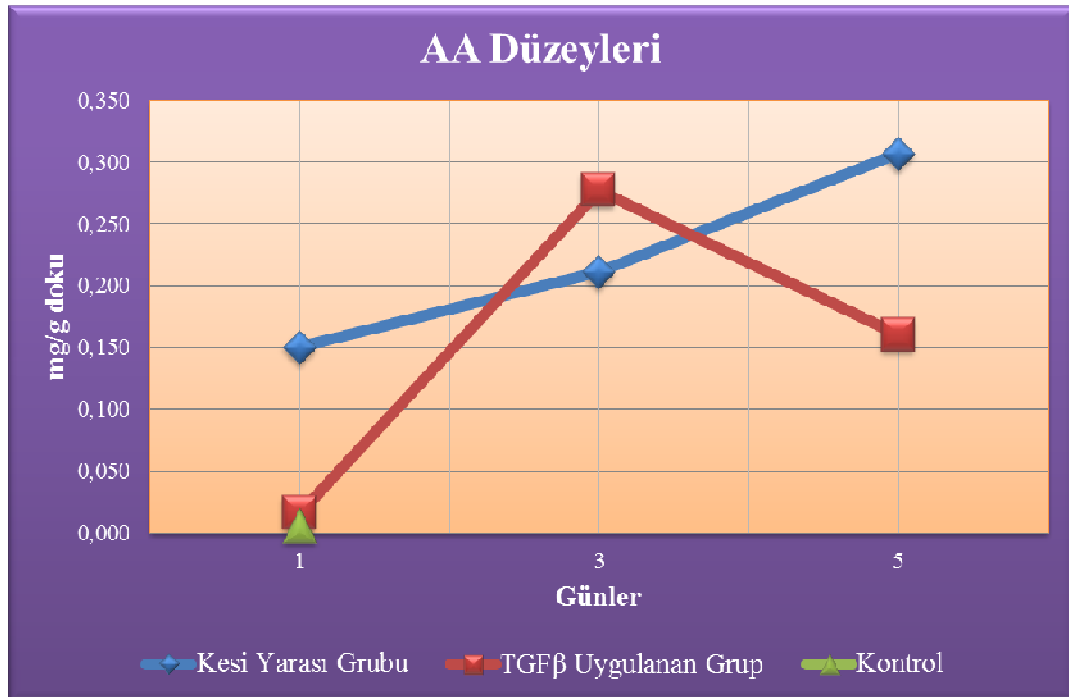


Şekil 4.4. Tüm gruplara ait GSH düzeyleri

Tüm gruplarda GSH seviyesi kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. ($P<0.05$). Kesi yarası grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 3 ve 5. günlerde 1. güne oranla anlamlı bir şekilde artış tespit edilmiştir ($P<0.05$). 5. günde 3. güne kıyasla bir düşüş bulunmuşsa da, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. TGF- β 1 uygulaması yapılan grupta 1. gündeki GSH değeri, kesi yarası grubunun 1. günü ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P<0.05$). 3. ve 5. günlerde kesi yarası grubunun 3. ve 5. günlerine kıyasla bir azalma tespit edilmişse de bu istatistiksel açıdan anlamlı değildir (Çizelge 4.1, Şekil 4.4).

4.5. AA Sonuçları

Hiçbir uygulama yapılmayan oral mukozada AA düzeyi 0.006 ± 0.001 mg/g doku; kesi yarası yapılan gruplarda 1. günde 0.150 ± 0.023 mg/g doku, 3. günde 0.211 ± 0.019 mg/g doku, 5. günde 0.307 ± 0.022 mg/g doku; TGF- β 1 uygulaması yapılan gruplarda 1. günde 0.016 ± 0.003 mg/g doku, 3. günde 0.277 ± 0.026 mg/g doku, 5. günde 0.160 ± 0.028 mg/g doku olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1, Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Tüm gruplara ait AA düzeyleri

Tüm gruplarda kontrole kıyasla AA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). Kesi yarası grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 3. günde ve 5. günde 1. güne oranla anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P<0.05$). TGF- β 1 uygulaması yapılan gruplarda 1. günde kesi yarası grubunun 1. gününe oranla anlamlı bir azalma; 3. günde kesi yarası grubunun 3. gününe kıyasla anlamlı bir artış; 5. günde ise kesi yarası grubunun 5. gününe kıyasla anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($P<0.05$). TGF- β 1 uygulaması yapılan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde 3. günde 1. güne kıyasla anlamlı artış, 5. günde 1. güne kıyasla bir anlamlı artış, 3. güne kıyasla da anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.5).

5. SONUÇ

TGF- β memelilerde yara iyileşmesi sürecinde epitelizasyon, inflamasyon, yeni damar oluşumu ve ekstrasellüler matriks oluşumunda anahtar rol oynayan düzenleyici bir büyüme faktörüdür [83-87]. Büyüme faktörlerinin normal ya da gecikmiş yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Buna karşın büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi esnasında özellikle de oral yara iyileşmesi sürecinde oksidan durumlara etkilerini gösteririr az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple bu tez çalışmasında eksojen olarak uygulanan TGF- β 1' in oral yara iyileşmesinin farklı günlerinde MDA, NOx, GSH, SOD ve AA düzeylerine ekisi araştırılmıştır.

Yara iyileşmesi esnasında iNOS'un makrofajlar, keratinositler ve fibroblastlar tarafından eksprese edildiği bilinmektedir. Literatürde, yaralanmadan 6 ila 24 saat sonra neredeyse tüm makrofajlarda iNOS ekspresyonu olduğu ve inflamasyonlu periodontal dokularda iNOS aktivitesinin ve NO düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır [88,89]. Benzer olarak Kendall ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da sağlıklı bireylerin dişeti dokusuna kıyasla inflamasyonlu insan dişeti dokusunda, iNOS aktivasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir [90]. Bununla birlikte Reichner ve arkadaşları ratlarda yaptıkları çalışmada iNOS pozitif makrofajların, yaralanmadan sonraki 1. günde artmış olduğunu, yaralanmayı takip eden 3. ve 5. günlerde de bu makrofajlardaki iNOS aktivasyonunun azaldığını bildirmektedirler [88]. Bu çalışmaların sonuçlarına uyumlu şekilde, bu çalışmada da uygulama yapılmayan tavşanların oral mukozasındaki yara dokusunda, yaralanmadan sonraki 1. günde NOx seviyelerinin artmış olduğu, bunu takiben 3. ve 5. günlerde de NOx düzeylerinin bir düşüş kaydettiği belirlenmiştir. NOx seviyelerindeki artışa paralel olarak oral mukoza MDA düzeylerinin de yaralanmayı takip eden 1. günde artmış olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, insizyonel cerrahi girişim çeşitli hücre tiplerinin yara yatağına göçünü uyarmış ve bu hücrelerden aşırı miktarda NO üretimi gerçekleşmiş olabilir. NOx miktarındaki artışın da reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türevlerini arttırarak, lipid

peroksidasyonunun oluşumuna katkıda bulunmuş olabileceği bu sonuçlara bakılarak söylenebilir.

TGF- β 1 uygulanan grupta da NOx seviyeleri yaralanmadan sonraki 1. günde, uygulama yapılmayan gruba göre bir artış kaydetmiştir, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yaralanmayı takip eden 3. günde NOx düzeyi uygulama yapılmayan gruba ve diğer gruplara kıyasla beklenmedik şekilde artmış bulunmuştur. Bu ani artışın sebebi, insizyonel yaranın derinliğine ve büyüklüğüne bağlı olarak inflamatuvar yanıtın akut döneminin devam etmesi olabilir. TGF- β 'nın NO üretimi üzerindeki baskılayıcı etkisi yara iyileşmesinin devam eden inflamatuvar süreci tarafından maskelenmiş olabileceği kanısı da akla yatkın görünmektedir. TGF- β 1 uygulama grubunda NOx seviyeleri 5. günde 3. güne oranla bir azalma göstermiştir. Bu sonuçlar NO üretiminin yaralanmadan sonraki 24 saat içinde maksimum düzeye çıktığını işaret etmektedir. Oral mukozal yara iyileşmesinde eksojen TGF- β 1 uygulaması NO ve TGF- β arasındaki etkileşimi tersine yönde değiştirmiş olabilir. TGF- β 1 uygulaması iNOS gen ekspresyonunu artırarak NO üretiminin artmasına sebep olmuş olabilir.

TGF- β 'nın, NOS translasyonu için gereken mRNA' nın stabilitesini azaltarak makrofajlar tarafından üretilen NO' in üretiminin düşüşüne sebep olduğu bildirilmiştir [91-93]. Bauer ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada noninflamatuvar yara modelinde TGF- β uygulamasının NO seviyelerini azalttığını rapor etmişlerdir [94].

Yapılan bir çalışmada TGF- β 'nın maktofajların aktivasyonunu için potansiyel bir engelleyici olduğu gösterilmiştir [99]. Fakat literatürde deneysel modellerde NO' in TGF- β 'nın konsantrasyonunu azalttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [96-98]. TGF- β ve NO üretimi arasında muhtelif etkileşimler olduğu açıktır. Bununla birlikte literatürdeki bilgilerin tersine, bu çalışmada oral mukozal iyileşme esnasında TGF- β 1 uygulamasının NOx üretimini azaltmadığı bulunmuştur. Tam tersine TGF- β 1 implantasyonu oral mukozal yara iyileşmesinin 1,3 ve 5.

günlerinde; uygulama yapılmayan gruplarla karşılaştırıldığında artış kaydetmiştir. Bu çalışmadaki yara modeli inflamatuvar bir yara modeli olduğu için iyileşme süreci, Bauer ve arkadaşlarının noninflamatuvar modelinin iyileşme süreçlerinden farklı bir ilerleme göstermektedir [94]. Ayrıca TGF- β 'nın hücre tipine ve deneysel modele bağlı olarak iNOS ekspresyonunu değişik şekillerde (artış ya da azalış) düzenlediğine literatürdeki bazı kaynaklarda yer verilmiştir [99,100].

Yaralanma gibi inflamatuvar bir ajan tarafından uyarılan pek çok memeli hücre tipinde, iNOS tarafından yüksek konsantrasyonlarda NO üretilmektedir [101]. Nanomolar konsantrasyonlardaki NO hücreyi koruyucu etki gösterirken, mikromolar konsantrasyonlardaki NO sitotoksik etki göstermekte ve hücre hasarlarına sebep olmaktadır. Yüksek seviyelerdeki NO süperoksit radikali ile birleşerek peroksinitriti oluşturmakta ve hücre membranı, DNA ve lipitler gibi biyopolimerler için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Bundan başka yara iyileşmesinin fazları esansında makrofajlar ve nötrofil gibi aktive olmuş hücreler NADPH oksidazın fagositik izoformu aracılığıyla yüksek miktarda süperoksit anyonu üretirler. Yara bölgesindeki endotelial hücreler de iskemik şartlar altında kayda değer miktarda süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üretirler. Bütün bu reaktif oksijen türevleri güçlü birer oksidandırılar ve hücre hasarına sebep olurlar [18]. Artmış olan reaktif oksijen ve azot türevlerinin kümülatif etkisi oral yara iyileşmesinin fazları süresince lipit peroksidasyonuna sebebiyet vermiş olabilir. Bu çalışmada TGF- β 1 uygulaması sonucu lipit peroksidasyonunun 1., 3. ve 5. günlerde arttığı tespit edilmiştir, ancak 1. gündeki artış istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Bu bulgu TGF- β 1 implantasyonunun oral iyileşmeyi hızlı bir biçimde değiştirdiğini, bu değişikliğin de lipit peroksidasyonunu arttırdığına dikkat çekmektedir.

SOD, süperoksit radikalini H_2O_2 'e çeviren çok önemli bir antioksidan enzimdir. Süperoksitin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 serbest radikal yapısında bir molekül olmamasına rağmen Cu ve Fe gibi metallerin rol oynadığı Haber-Weiss ve Fenton tipi reaksiyonlarla toksik hidroksil radikallerine çevrilir. GPx ve CAT ise oluşan

H_2O_2 yi hidroksil radikaline çevirmeden H_2O ve O_2 ye yıkıp hücreyi hidroksil radikalinin toksik etkisinden korurlar.

Tam kat deri yarası yapılan farelerde inflamasyonun erken evrelerinde SOD ve GPx' a ait mRNA translasyonunun arttığı bildirilmiştir [34]. Periodontal yara modeli yapılan köpeklerde, iyileşmenin 3. gününde SOD, CAT ve GPx enzim seviyelerinin de artmış olduğu literatürde yer almaktadır [102]. Bu çalışmadaki SOD' a ait bulgular değerlendirildiğinde uygulama yapılmayan grupta yaralanmadan sonraki 3. günde 1. ve 5. günlere kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Mukozal iyileşmenin 5. gününde ise 1. ve 3. günlere oranla anlamlı bir azalma kaydedilmiştir. Bu bilgiler literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur. SOD düzeylerindeki bu değişiklikler inflamatuvar yanıtın antioksidan durum üzerine bir yansıması olarak değerlendirilebilir.

TGF- β 1 implantasyonu tüm gruplarda, tedavisiz gruplara kıyasla SOD seviyelerini arttırmış görünmektedir. Özellikle yaralanmadan sonraki 3. günde diğer günlere oranla dikkate değer bir artış tespit edilmiştir. TGF- β 1 uygulaması iyileşmenin 3. gününde inflamatuvar yanıtı arttırmış olabilir. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında nötrofiller solunumsal patlamanın gerçekleştirilmesi için yüksek miktarda oksijen kullanırlar ve süperoksit radikali üretirler. Yüksek miktardaki süperoksit üretimine cevaben iyileşmenin 3. gününde SOD seviyesi yükselmiş olabilir.

Oksidatif stres varlığında hücrel redoks potansiyelinin sürdürülebilmesi için GSH gereklidir. GSH çok güçlü bir nükleofil olup, birçok detoksifikasyon reaksiyonuna katılabilir. Bunların arasında u.v. ve kimyasal nedenlerle ortaya çıkan peroksitlerin detoksifikasyonu ve okside ürünlerin redüksüyonu çok önemli bir yer tutar [103].

Bu çalışmada GSH düzeyleri sadece kesi yarası yapılan tavşanlarda 1. güne kıyasla 3. ve 5. günlerde anlamlı bir artış kaydetmiştir. Bu da oral mukozal iyileşmesinin safhaları süresince meydana gelen oksidan sinyallerin, GSH üretimini uyarmış olabileceğini göstermektedir. TGF- β 1 uygulaması ise GSH düzeyini yaralanmadan

sonra 1. günde tedavisiz gruba kıyasla anlamlı bir şekilde arttırmıştır. 3 ve 5. günlerde ise uygulama yapılmayan gruplarla karşılaştırıldığında bir azalma tespit edilse de bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı değildir.

Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asit, semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik asite okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C vitaminin diğer bir özelliği, antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücrel ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur [35].

Bu çalışmada AA düzeyleri, uygulama yapılmayan gruplarda günler içinde anlamlı bir artış kaydetmiştir.

TGF- β 1 uygulaması yapılan grupta yaralanmadan sonraki 3. günde AA düzeyini artmış bulunmuştur. Burada TGF- β 1' in AA seviyesini arttırdığı görülmektedir. 5. gündeki AA düzeyindeki azalma ise oksidatif stresi ortadan kaldırmak için AA' in kullanıldığını göstermektedir.

Literatürde TGF- β 1 uygulamasının oral yara iyileşmesi esnasında oksidan durumlara ve antioksidan parametrelere etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmadığı için bizim araştırmamızın TGF- β 1 ile ilgili yapılacak olan çalışmalarda bu büyüme faktörünün oksidan olaylara etkisinin de göz önüne alınarak devam edilmesi açısından önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Daha ileri aşamada TGF- β ve TGF- β reseptörü arasındaki ilişkilerin immünohistokimyasal ve moleküler yönden araştırılması yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Diegelmann, R. F., Evans, M. C., “Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing”, *Front. Biosci.*, 9: 283-289 (2004).
2. Engin, A., “Yara iyileşmesi: Temel Cerrahi”, Sayek, İ. (ed), *Güneş Kitabevi*, Ankara, 266-277 (2004).
3. Hakkinen L., Uitto, V.J., Larjava H., “Cell biology of gingival wound healing”, *Periodontol.*, 24: 127–152 (2000).
4. Broughton II, G., Janis, J. E., Attinger, C.E., “The basic science of wound healing”, *Plast. Reconstr. Surg.*, 117: 12-34 (2006).
5. Li, J., Chen, J., Kirsner, R., “Pathophysiology of acute wound healing”, *Clin. Dermatol.*, 25: 9-18 (2007).
6. Massague, J., “The transforming growth factor-beta family”, *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 6: 597-641 (1990).
7. Fujii, D., Brissenden, J. E., Derynck, R., Francke, U., “Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7”, *Somat. Cell. Mol. Genet.*, 12: 281-8 (1986).
8. Barton, D. E., Foellmer, B. E., Du, J., Tamm, J., Derynck, R., Francke, U., “Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors beta 2 and beta 3 in man and mouse: dispersion of TGF-beta gene family”, *Oncogene Res.*, 3: 323-31 (1988).
9. Shah, M., Foreman, D. M., Ferguson, M. W., “Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta”, *Lancet.*, 339: 213-4 (1992).
10. Shah, M., Foreman, D. M., Ferguson M. W., “Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents”, *J. Cell Sci.*, 107: 1137-1157 (1994).
11. Amento, E. P., Beck, L. S., “TGF-beta and wound healing”, *Ciba. Found. Symp.*, 157: 115-123; discussion 23-29 (1991).
12. Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B., Deuel, T. F., “Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta”, *Science*, 237: 1333-1336 (1987).
13. Komarcević, A., “The modern approach to wound treatment”, *Med. Pregl.*, 53: 363-368 (2000).

14. Kılınç, A., Kılınç, K., “Nitrik Oksitin Fonksiyonları ve Toksik Etkileri”, *Palme Yayınevi*, Ankara, 1-56 (2003).
15. Yu, B. P., “Cellular defenses against damage from reactive oxygen species”, *Physiol. Rev.*, 74: 139-161 (1994).
16. Davies, K. J., “Oxidative stress: the paradox of aerobic life”, *Biochem. Soc. Symp.*, 1: 1-31 (1995).
17. Soneja, A., Drews, M., Malinski, T., “Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing”, *Pharmacol. Rep.*, 57: 108-19 (2005).
18. Brovkovich, V., Dobrucki, L. W., Brovkovich, S., Dobrucki, I., Do Nascimento, C. A., Burewicz, A., Malinski, T., “Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium”, *J. Physiol. Pharmacol.*, 50 :575-586 (1999).
19. Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C. L., Penman, B. W., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., “DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3030-3034 (1992).
20. Schwentker, A., Vodovotz, Y., Weller, R., Billiar, T. R., “Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?”, *Nitric Oxide*, 7: 1-10 (2002).
21. Garcia, X., Stein, F., “Nitric oxide”, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 17: 55-7 (2006).
22. Herce-Pagliai, C., Kotecha, S., Shuker, D. E., “Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review”, *Nitric Oxide*, 2: 324-36 (1998).
23. Szabo, C., “Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity”, *Toxicol. Lett.*, 140-141:105-12 (2003).
24. Eiserich, J. P., Patel, R. P., O'Donnell, V. B., “Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules”, *Mol. Aspects Med.*, 19 (4-5):221-357 (1998).
25. Yaman, H., Ünlü, A., Karabıçak, U., Çimen, B., Balabanlı, B., Erbil, M. K., Türközkan, N., “Measurement of 3-nitrotyrosine by high performance liquid chromatography”, *T. Klin. J. Med. Res.*, 18:26-30 (2000).
26. Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., Kishimoto, Y., Kitano, M., Itoh, T., “Sensitive determination of nitrotyrosine in humans by high-performance liquid chromatography”, *J. Chromatogr. B*, 685: 343–7 (1996).

27. Halliwell, B., Wasil, M., Grootveld, M., "Biological significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid", *FEBS. Lett.*, 213: 15-18 (1987).
28. Hensley, K., Maitt, M. L., Pye, Q. N., Stewart, C. A., Wack, M., Tabatabaie, T., Floyd, R. A., "Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection", *Anal. Biochem.*, 251 (2): 187-95 (1997).
29. Sen, C. K., "The general case for redox control in wound repair", *Wound Rep. Reg.*, 11: 431-438 (2003).
30. Hohn, D. C., Mackay, R. D., Halliday, B., Hunt, T. K., "Effect of O₂ tension on microbicidal function of leucocytes in wounds and in vitro", *Surg. Forum*, 27: 18-20 (1976).
31. Babior, B. M., "Phagocytes and oxidative stres", *Am. J. Med.*, 109: 33-44 (2000).
32. Thomas, E.L., Bozeman, P. M., Jefferson, M. M., "Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase, Formation of bromamines", *J. Biol. Chem.*, 270: 2906-2913 (1995).
33. Barrette, W. C., Hannum, D. M., Wheeler, W. D., Hurst, J. K., "General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: Abolition of ATP production", *Biochemistry*, 28: 9172-9178 (1989).
34. Steiling, H., Munz, B., Werner, S., Brauchle, M., "Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair", *Exp. Cell. Res.*, 247(2): 484-94 (1999).
35. Akkuş, İ., "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", *Mimoza Yayınevi*, Konya, 1-77 (1995).
36. Halliwell, B., "Biochemistry of oxidative stres", *Biochem. Soc. Trans.*, 35:1147-1150 (2007).
37. Beyer, R. E., "The role of ascorbate in antioxidant protection og biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q", *J. Bioenerg. Biomembranes*, 26: 349-358 (1994).
38. Winkler, B. S., Orselli, S. M., Rex, T. S., "The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective", *Free Radic. Biol. Med.*, 17: 333-349 (1994).

39. Som, S., Raha, C., Chattarjee, I. B., "Ascorbic acid: A scavenger of superoxide radical", *Acta.Vitaminol. Enzimol.*, 5: 243-250 (1983).
40. Arnold, H. L., Odom, R. B., James, W. D., "Andews disease of the skin", Clinical Dermatology; 8th ed. **WB Saunders Company**, Philadelphia, 15 (1990).
41. Marks, R., Dykes, P., Motley, R., "Clinical Sings and Procedures in Dermatology 1st ed.". **Martin Dunitz Ltd.**, London, 35 (1993).
42. Erdem, C.; "Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi", Çelebi C.R. (ed.), **TDD Yayınları**, No 1, Ankara, 1-44 (1996).
43. Dinçer, S., Gönül, B., Dinçer, N., Öz, E., Babül, A., Pınar, L., "Tavşan tam kesi yaralarına lokal olarak uygulanan EGF'nin yara dokusu çinko ve hidroksiprolin düzeylerine etkisi" **SBAD (Sağ. Bil. Arş. Derg.)** , 9 (19): 5-12 (1998).
44. Pohle, T., Brzozowski, T., Becker, J. C., van der Voort, I. R., Markmann, A., Konturek J. W., "Role of reactive oxigen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: Gastroprotection by vitamin C" **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 15: 677-687 (2001).
45. Halliwell, B., "Current status review: free radicals reactive oxygen species and human disease: a critical evaulation with special reference to atherosclerosis", **Br.J.Exp.Path.**, 70: 737-757 (1989).
46. Haris, R. A., Carbb, D. W., "Metabolic Interrelations, Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations", Devlin, T. M. (ed.), , **John Wiley and Sons. Inc., Publication**, New York, Chichester, Brisbane, Toronto; Singapore, 575-606, 1124-1125 (1993).
47. David, J. H., Henri, F., "Cellular, biochemical and clinical aspects of wound healing", **Surg. Infections**, 3: 23-35 (2000).
48. Engin, A., "Genel Cerrahi; Tanı ve Tedavi İlkeleri", **Atlas Kitapçılık**; Ankara, 131-144 (2000).
49. Witte, M. B., Barbul, A., "General principles of wound healing", **Surg. Clin. North. Am.**, 77: 509-528 (1997).
50. İnternet: "Yara iyileşmesinin şematik gösterimi"
<http://www.acilveilkyardim.com/acilbakim/yara1.gif> (2010).
51. Steenfos, H. H., "Growth factors and wound healing", **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.**, 28: 95-105 (1994).

52. Canalis, E., "Growth factors and their potential clinical value", *J. Clin. Endocrinol Metab. Clinical Review*, 75 (1): 1-4 (1992).
53. Fisher, D. A., Lakshmanan J., "Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals", *Endoc. Rev.*, 11 (3): 418-422 (1990).
54. Ganong, W. F., "Growth Factors. The General and Cellular Basis of Medical Physiology", *Review of medical physiology*, Chapter1.18. Edition. P 42-43 (1999).
55. Gope. R., "The effect of epidermal growth factor & platelet derived growth factors on wound healing process", *Indian J. Med. Res.*, 116:201-206 (2002) .
56. Cross, M., Dexter, T. M., "Growth factors in development, transformation and tumorigenesis", *Cell*, 64: 271-280 (1991).
57. Bennett, N. T., Schultz G. S., "Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors", *Am. J. Surg.*, 165: 728-37 (1993).
58. Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., Dooley, S., "Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis", *Frontiers in Bioscience*, 7: 793-807 (2002).
59. Shi, Y., Massague, J., "Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus", *Cell.*, 113: 685-700 (2003).
60. İnternet: "TGF- β ' nin sinyalizasyon yolu"
<http://flipper.diff.org/app/items/info/2983> (2011).
61. Schiller, M., Javelaud, D., Mauviel, A., "TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing", *J. Dermatol. Sci.*, 35: 83-92, (2004).
62. Krummel, T. M., Michna, B. A., Thomas, B. L., Sporn, M. B., Nelson, J. M., Salzberg, A. M., Cohen, I. K., Diegelmann, R. F., "Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces fibrosis in a fetal wound model", *J. Pediatr. Surg.*, 23(7): 647-652 (1988).
63. Konukoğlu, D., "Serbest Radikal ve Ksenobiotik Metabolizması", Biyokimya, Kılıç, G. (ed.), *Tümer*, İstanbul, 2: 267-272 (2004).
64. Wink, D. A., Mitchell, J. B., "Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide", *Free Radic. Biol. Med.*, 25 (4-5):434-56 (1998).

65. Robbins, R. A., Grisham, M. B., "Molecules in focus: nitric oxide", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29 (6):857-60 (1997).
66. Çekmen, M. B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A., Gözükar, E. M., "Nitrik oksit ve nitrik oksit sentazın fizyolojik ve patolojik özellikleri", *T. Klin. J. Pediatr.*, 10:226-236 (2001).
67. Beckman, J. S., Crow, J. P., "Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation", *Biochem. Soc. Trans.*, 21 (2): 330-4 (1993).
68. Hunt, T. K., Linseyi M., Sonei M., Jawetz E., "Oxygen tension and wound infection", *Surg. Forum*, 23: 47-49 (1972).
69. Barrette, W. C., Hannum, D. M., Wheeler, W. D., Hurst, J. K., "General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: Abolition of ATP production", *Biochemistry-us*, 28: 9172-9178 (1989).
70. Shou, J., Lappin, J., Daly, J. M., "Impairment of pulmonary macrophage function with total parenteral nutrition", *Ann. Surg.*, 219: 291-297 (1994).
71. Babior, D. M., "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes", *N. Engl. J. Med.*, 298: 659-668 (1978).
72. Ceylan, E., Dülger, H., Uzun, K., "Tüberküloz Plörezilerde Plevra Sıvısı Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Tanısal Degeri", *Toraks Dergisi*, 4(1):33-37 (2003).
73. Güleç, E. G., "Epidermal büyüme faktörünün oral submukozal implantla uygulanmasının yara dokusu oksidan olaylarına etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2006).
74. Coşkun, Ş., "EGF' nin oral submukozal implantla uygulanmasının tükürük bezi çinko ve bakır düzeyleri ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörüne etkisi", Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2001).
75. İnternet:"Kesi yarası yapılan bölgesinin şematizasyonu"
http://upload.vipulg.com/Zoology/759/chapter%2025%20final%20files_file_s/chapter%2025%20final%20files-7.png, (2011).
76. İnternet:"Kesi yarası yapılan bölgesinin şematizasyonu"
<http://www.rabbit.org/journal/3-9/graphics/mouth.gif> (2011).

77. Casini, A., Ferrali, M., Pompella, A., "Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice", *Am. J. Pathol.*, 123: 520-531 (1986).
78. Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., Sivas, A., Öz, H., "The effect of cronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione tranferase in rats", *Toxicology*. 36(1): 71-76 (1985).
79. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R., "Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids", *Anal. Biochem.*, 126: 131-138 (1982).
80. Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A., "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite". *Nitric Oxide*. 5(1): 62-71 (2001).
81. Berger, J., Shepard, D., Morrow, F., Taylor, A., "Relationship between dietary intake an tissue levels reduced and total vitamin C in nonscorbutic guinea pig", *J. Nutr.*, 119: 734-740 (1989).
82. Sun, Y. I., Oberley, L. W., Ying, L., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", *Clin. Chem.*, 34 (3): 497-500 (1988).
83. Kane, C. J., Hebda, P. A., Mansbridge, J. N., Hanawalt, P. C. "Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing", *J. Cell. Physiol.*, 148:157-173 (1991).
84. Gailit, J., Welch, M. P., Clark, R. A. "TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds", *J. Invest. Dermatol.*, 103: 221-227 (1994).
85. Martin, P. "Wound healing - aiming for perfect skin regeneration", *Science.*, 276: 75-81 (1997).
86. O'Kane, S., Ferguson, M. W., "Transforming growth factor beta s and wound healing", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 63-78 (1997).
87. Letterio, J. J., Roberts, A. B., "Regulation of immune responses by TGF-beta", *Annu. Rev. Immunol.*, 16:137-161 (1998).
88. Reichner, J. S., Meszaros, A. J., Louis, C. A., Henry, W. L. Jr., Mastrofrancesco, B., Martin, B. A., Albina, J. E., "Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds", *Am. J. Pathol.*, 154: 1097-1104 (1999).

89. Lohinai, Z., Burghardt, B., Zelles, T., Varga, G., “Nitric oxide modulates salivary amylase and fluid, but not epidermal growth factor secretion in conscious rats”, *Life Sci.*, 64: 953–963 (1999).
90. Kendall, H. K., Haase, H. R., Li, H., Xiao, Y., Bartold, P. M., “Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts”, *J. Periodontal Res.*, 35: 194–200 (2000).
91. Gilbert, R. S., Herschman, H. R., “Transforming growth factor beta differentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195: 380–384 (1993).
92. Owens, M. W., Milligan, S. A., Grisham, M. B., “Inhibition of rat pleural mesothelial cell nitric oxide synthesis by transforming growth factor-beta 1”, *Inflammation*, 20: 637–646 (1996).
93. Darmani, H., Crossan, J., McLellan, S. D., Meek, D., Adam, C., “Expression of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in crush-injured tendon and synovium”, *Mediators Inflamm.*, 13: 299–305 (2004).
94. Bauer, J. A., Harr, M. E., Smith, D. J. “Diminished nitric oxide production following administration of transforming growth factor-beta1 using a noninflammatory wound repair model”, *Nitric Oxide*, 3: 402–408 (1999).
95. Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., Nathan, C., “Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta”, *Nature*, 334: 260–262 (1988).
96. Studer, R. K., DeRubertis, F. R., Craven, P. A., “Nitric oxide suppresses increases in mesangial cell protein kinase C, transforming growth factor beta, and fibronectin synthesis induced by thromboxane”, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7: 999–1005 (1996).
97. Craven, P. A., Studer, R. K., Felder, J., Phillips, S., DeRubertis, F. R., “Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells”, *Diabetes*, 46: 671 (1997).
98. Rocha, G., Baines, M. G., Deschenes, J., Duclos, A., Anteck, E., Di Silvio, M., “Nitric oxide and transforming growth factor-beta levels during experimental uveitis in the rabbit”, *Can. J. Ophthalmol.*, 32:17–24 (1997).
99. Vodovotz, Y., “Control of nitric oxide production by transforming growth factor-beta1: mechanistic insights and potential relevance to human disease”, *Nitric Oxide*, 1: 3–17 (1997)

100. Hamby, M. E., Hewett, J. A., Hewett, S. J. "TGF-beta1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2", *Glia*, 54: 566–577 (2006).
101. Coşkun, Ş., Güleç, E. G., Balabanlı, B., Acartürk, F., "Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing: a time course study", *Surg. Today*, 37: 570–574 (2007).
102. Sakallioğlu, U., Aliyev, E., Eren, Z., Akşimşek, G., Keskiner, I., Yavuz, U., "Reactive oxygen species scavenging activity during periodontal mucoperiosteal healing: an experimental study in dogs", *Arch. Oral Biol.*, 50 (12): 1040-1046 (2005).
103. Thang, P. T., Patrick, S., Teik, L. S., Yung, C. S., "Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage", *Burns*, 27(4): 319-327 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : GÜLEÇ PEKER, Emine Gülçeri
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 07.12.1981, Kayseri
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (506) 351 48 57
 e-mail : gulcerigulec@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/FBE/Biyoloji ABD	2006
Lisans	Selçuk Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Ankara Eryaman Lisesi	1998

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Coşkun Ş., **Güleç E.G.**, Balabanlı B., Acartürk F. “Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing: a time course study.” Surg Today. 2007;37(7):570-4. Epub 2007 Jun 26
2. **Güleç Peker E.G.**, Coşkun Ş., Özer Ç., Barbaros B.K., Gönül B. “The effect of ascorbic acid supplementation on brain oxidative events in experimental diabetes” Med. Chem. Res. 2010; 19: 364-374, April 05, 2010
3. **Güleç Peker E.G.**, Coşkun Ş., Ebeğil M., Acartürk F. “Effect of exogenous epidermal growth factor (EGF) on nonenzymatic antioxidant capacities and MPO activity of wound tissue” Med. Chem. Res. 2010; 19: 533-540, June 21, 2010

4. Çınar E., Coşkun Ş., **E. G. Güleç Peker** “Ekzojen Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta (TGF-beta) uygulamasının tükürük bezi malondialdehit ve nitrik oksit düzeylerine etkisi „ 34. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 6-10 Ekim 2008. ERZURUM, Bildiri Özetleri P 67.
5. Coşkun Ş., **Güleç E.G.** “Ekzojen EGF uygulamasının yara dokusu nitrit nitrat düzeylerine etkisi” 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası- AYDIN, Bildiri Özetleri, P 54.
6. Canseven A.G., **Güleç E.G.**, Coşkun S., Seyhan N. “ Serum GSH ve C vitamini Düzeyleri ile MPO Aktivitesi Kesikli ya da Sürekli Uygulanan 50Hz, 1.5 mT Manyetik Alandan Etkilenir mi?” XVIII. Ulusal Biyofizik Kongresi, 6-9 Eylül 2006, ANKARA, Bildiri Özetleri, P 70.
7. Coşkun Ş., **Güleç E.G.**, Yılmazoğlu K., Loğoğlu E., Koçkaya E.A., Selamnoğlu G., Kılıç A. “Yeni Bir Antifungal Thiohalobenzen Türevi olan 2,4 Dithiofenoxi 1 Iodo 4-Bromobenzen Molekülünün Sıçan Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisi” VII. Ulusal Kromotografi Kongresi, 13-15 Haziran 2007, KIRIKKALE, Bildiri Özetleri P 67.
8. Coşkun Ş., Özer Ç., **Güleç E.G.**, Yılmazoğlu K., Gönül B. “Diyabetik sıçanlarda Vitamin C Uygulamasının Beyin Oksidan Olaylarına Etkisi” 33. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 15-19 Ekim 2007. Girne- KIBRIS, Bildiri Özetleri P 107.
9. Özer Ç., Coşkun Ş., Yılmazoğlu K., **Güleç E.G.**, Gönül B. “ Diyabetik Sıçanlarda Benflourex Uygulamasının Beyindeki Oksidatif Olaylara Etkisi” 33. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 15-19 Ekim 2007. Girne- KIBRIS, Bildiri Özetleri P 122.
10. Çakıl D., Coşkun Ş., Ayyıldız M., **Güleç E.G.**, Acar M.D., Çakıl B., Yıldırım M., Yılmazoğlu K., Açar E. “Sisplatin ve *Gingko biloba*’ nın Beyin Myeloperoksidaz ve Malondialdehit Düzeylerine Etkisi” 33. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 15-19 Ekim 2007. Girne- KIBRIS, Bildiri Özetleri P 98.