

**TOPIKAL EGF UYGULAMASININ DORSOLATERAL
EKSİZYONEL YARALARDA OKSİDAN OLAYLARA ETKİSİ**

Zeynep KALAY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2011
ANKARA**

Zeynep KALAY tarafından hazırlanan “TOPIKAL EGF UYGULAMASININ DORSOLATERAL EKSİZYONEL YARALARDA OKSİDAN OLAYLARA ETKİSİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans 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 Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, A. Ü.

Doç. Dr. Şule Coşkun CEVHER

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Tarih: 11 / 01 / 2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans 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 bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Zeynep KALAY

**TOPIKAL EGF UYGULAMASININ DORSOLATERAL EKSİZYONEL
YARALARDA OKSİDAN OLAYLARA ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Zeynep KALAY

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2011

ÖZET

Yara, yumuşak dokuların normal anatomik yapı ve fonksiyonunun bozulmasıdır. Travma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal olaylar süreci ise yara iyileşmesi olarak adlandırılır. Epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri yara iyileşmesi sürecinde önemli rol oynarlar. Araştırmaların çoğu EGF'nin yara iyileşmesindeki hızlandırıcı etkisini göstermektedir ancak EGF'nin yara iyileşme sürecinde organizmada meydana gelen oksidan olaylar üzerine etkisini gösteren çalışmaların sayısı çok azdır. Bu amaçla çalışmamızda, rat deri dokusunda yara oluşturulmuş ve topikal olarak uygulanan EGF'nin oksidatif olaylar üzerindeki etkisinin 1., 5., 7. ve 14. günlerde araştırılması amaçlanmıştır.

Deneylerde 200–250 g ağırlıkta 54 adet Wistar-Albino tipi erkek rat kullanıldı. Dorsolateral eksizyonel yara yapılan ratlar 2 gruba ayrıldı: 1- Tedavisiz grup 2- Topikal EGF uygulanan grup. Uygulama grubundaki hayvanların yara dokularına her gün birer kez thiloteers içerisinde topikal olarak tek doz (10ng/ml) EGF solüsyonu uygulandı. 1., 5., 7. ve 14. günlerde ratlar anestezi altında kalplerinden kan çekilerek feda edildi. Yara dokuları hemen çıkartıldı, bulaşmayı önleyecek materyale sarılarak –30 °C de saklandı. Değerler

spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. TBARS, GSH, NO_x ve AA sonuçları Anova Varyans Analizi ile SOD ise Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı (p < 0,05).

Sonuç olarak, EGF uygulanan gruplar ile tedavisiz gruplar karşılaştırıldığında; EGF uygulanan grubun 5. gündeki TBARS düzeyi azalırken, NO_x düzeyi artmıştır; ayrıca 14. günde de GSH düzeyi artmıştır. EGF'nin, bir antioksidan gibi, yara dokusunda meydana gelen oksidan ürünlerin temizlenmesine ve yaranın daha erken safhalarda iyileşmesine katkı sağlayarak antioksidan tedaviler için potansiyel özellik taşıdığını göstermektedir.

Bilim Kodu : 203.1.057

Anahtar Kelimeler : EGF, Yara, Deri, Antioksidan, TBARS, GSH, NO_x, AA, SOD

Sayfa Adedi : 82

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

**THE EFFECT OF TOPICAL EGF ADMINISTRATION ON
DORSOLATERAL EXCISIONAL WOUND'S OXIDANT STATUS**

(M.Sc. Thesis)

Zeynep KALAY

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

January 2011

ABSTRACT

Wound is the impairment of soft tissues' anatomic structure and function. Wound healing is the process of the biochemical events that start with trauma and eventuate with new tissue formation. Various growth factors, like Epidemal growth factor (EGF), play an important role in wound healing. Many researches reported EGF's wound healing accelerating effect. However, little is known about the interaction between the growth factors and oxidant-antioxidant events in experimental cutaneous wound healing models. Therefore we planned this study to evaluate the connection between EGF therapy and TBARS, GSH, NO_x, AA levels and SOD activity in skin tissue. All of these parameters of wound tissue were determined after excisional surgery followed by topical EGF administration on days 1, 5, 7 and 14.

In our study, 54 male Wistar-Albino rats (weight: 200-250g) were used. Dorsolateral excisional wounds were made on the rats and they were randomly divided into 2 groups: 1- Untreated group, 2- Topical EGF administered group. EGF solution was prepared in thiloteers (10 ng/ml) and administered as topical single dose on post-operation days. Animals were sacrificed on 1, 5, 7 and 14th days by exsanguination under anesthesia. Wound tissues were removed immediately avoiding contamination and stored at -30 °C. The parameters of

the wound tissue were measured spectrophotometrically. Statistical analysis were performed using Anova Variance Analysis (TBARS, GSH, NOx and AA levels) and Kruskal Wallis test (SOD activity). All data were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical significance was considered as $P < 0.05$.

Our results showed that, TBARS levels were decreased and NOx levels were increased on the 5th day after operation, and GSH levels were increased on the 14th day in EGF administered group, compared to untreated group. As a conclusion, our data showed that EGF may act like an antioxidant and show its beneficial effects by scavenging already formed toxic oxidation products in wound tissue. Also, it may contribute healing of the wound tissue in earlier stages and suggest a potential effective role for antioxidant therapies.

Science Code : 203.1.057
Key Words : EGF, Wound, Derm, Antioxidant, TBARS, GSH, NOx, AA, SOD
Page Number : 82
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışmanım Doç. Dr. Şule COŞKUN CEVHER' e, kıymetli tecrübeleriyle bana yol gösteren Prof. Dr. Turan GÜVEN'e, çalışmamın bir kısmında laboratuvar imkanlarından yararlandığım Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN'a, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI'ya, Emine Gülçeri GÜLEÇ PEKER'e, Filiz Sezen BİRCAN'a ve Arş. Gör. Özge Tuğçe PAŞAOĞLU'na, ayrıca manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve dostlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Yara ve Yara İyileşmesi.....	5
2.1.1. Yara.....	5
2.1.2. Yara çeşitleri	5
2.1.3. Yara iyileşmesinin mekanizması.....	6
2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.....	8
2.1.5. Yara iyileşmesi	9
2.2. Deri	25
2.2.1. Epidermis	26
2.2.2. Dermis.....	28
2.2.3. Hipodermis.....	29
2.2.4. Epidermal oluşumlar.....	29
2.3. Büyüme Faktörleri.....	29
2.3.1. Büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi	30
2.4. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	33
2.4.1. EGF'nin biyokimyasal özellikleri	33
2.4.2. EGF reseptörleri	34
2.4.3. EGF'nin biyolojik özellikleri ve yara iyileşmesindeki rolleri.....	35
2.5. Serbest Radikaller.....	38
2.5.1. Serbest radikal tanımı	38

Sayfa

2.5.2. Serbest radikal kaynakları.....	38
2.5.3. Serbest radikallerin etkileri	41
2.5.4. Serbest oksijen radikalleri ve yara iyileşmesi	46
2.5.5. Antioksidan sistemler	48
2.5.6. Antioksidanların yerleşim bölgelerine göre sınıflandırılması.....	49
3. MATERYAL METOT	54
3.1. Deney Protokolü.....	54
3.2. EGF Solüsyonunun Hazırlanması	54
3.3. Gruplar ve Yara Modelinin Oluşturulması	54
3.4. Yöntemler.....	56
3.4.1. Dokuda TBARS tayin yöntemi	56
3.4.2. Dokuda GSH tayin yöntemi	56
3.4.3. Dokuda NOx tayin yöntemi	56
3.4.4. Dokuda AA tayin yöntemi	57
3.4.5. Dokuda SOD tayin yöntemi	57
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	57
4. BULGULAR	58
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	64
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde ekstrasellüler elementler ve hücrelerin rolleri	8
Çizelge 4.1. Deri yara dokusunda TBARS, GSH, NO _x , AA ve SOD düzeyleri	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları	10
Şekil 2.2. Deri yarasının iyileşme süreci	20
Şekil 2.3. Derinin yapısı	26
Şekil 2.4. Büyüme faktörlerinin hücrel fonksiyon yolları	30
Şekil 2.5. Yara iyileşme sürecinde büyüme faktörleri	31
Şekil 2.6. EGF'nin yapısı	34
Şekil 2.7. EGF'nin sinyalizasyon yolu	35
Şekil 2.8. Lipit peroksidasyonu ve etkileri	45
Şekil 2.9. Solunumsal patlama	47
Şekil 2.10. Hücre içi antioksidanlar	50
Şekil 4.1. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait TBARS düzeylerinin günlere göre değişimi	59
Şekil 4.2. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait GSH düzeylerinin günlere göre değişimi.....	60
Şekil 4.3. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait NOx düzeylerinin günlere göre değişimi.....	61
Şekil 4.4. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait AA düzeylerinin günlere göre değişimi.....	62
Şekil 4.5. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait SOD düzeylerinin günlere göre değişimi.....	63

RESİMLERİN LİSTESİ**Resim****Sayfa**

Resim 3.1. (a) Medulla spinalisin her iki yanında yaklaşık 5 cm uzunluğunda yapılan kesi yarası (b) Yapılan kesi yarasının 4 süturla adapte edilmesi	55
--	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
AA	Askorbit Asit
ACTH	Adenokortikotropik Hormon
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
cm	Santimetre
Cu	Bakır
Da	Dalton
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
Fe	Demir
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
g	Gram
GH	Büyüme Hormonu
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
H₂O₂·	Hidroperoksil Radikali
HOCl	Hipokloröz Asit

Simgeler	Açıklama
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	İnterlökin
L	Doğmamış Yağ Asidi Radikali
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	Yağ Asidi
LO[·]	Alkoksi Radikali
LOO[·]	Peroksi Radikali
LOOH	Lipit Hidroperoksil
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ml	Mililitre
MPO	Miyeloperoksidaz
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
ng	Nanogram
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NO	Nitrik Oksit
O₂[·]	Süperoksit Radikali

Simgeler	Açıklama
OH[·]	Hidroksil Radikali
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PRL	Prolaktin Hormonu
rpm	Devir Hızı
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Türleri
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa
U	Ünite
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Zn	Çinko
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

1. GİRİŞ

Yara, yumuşak dokuların normal anatomik yapı ve fonksiyonunun bozulmasıdır [1]. Travma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal olaylar süreci ise yara iyileşmesi olarak adlandırılır [2]. Operatif veya travmatik olarak dokunun hasar görmesini takiben, her organizmanın öncelikli görevi; kanamayı durdurma, enfeksiyonu önleme, bozulan anatomik bütünlük ile fonksiyonel yapıyı onarmaktır [3-5].

Lokal yaralanmaya karşı organizmanın cevabı ilk olarak inflamasyon süreciyle başlar ve rejenerasyon ve reparasyon ile sonuçlanır [6]. Rejenerasyon ve reparasyon, doku ve hücre bütünlüğünün yeniden tesis edilmesinde iki temel süreçtir. Rejenerasyon, orijinal yapıdan hem yapı, hem de fonksiyon olarak ayırt edilemeyen yeni dokunun meydana gelmesidir. Reparasyon ise, ekstraselüler matriksin yeniden sentezlenip birikmesiyle, yani bağ doku oluşumu ile doku devamlılığının sağlanmasıdır [6-8].

Dermal yara iyileşmesi, hücre çoğalması, hücre göçü ve kollajen sentezi gibi komponentlerden oluşan dinamik bir olaydır. Tam kalınlıktaki dermal yaralar dermis ve epidermisi kapsar. Epidermis damarsız bir yapıya sahiptir ve epitelizasyon ile iyileşir. Dermiste ise iyileşme granülasyon dokusu oluşumu ve kollajen sentezi ile gerçekleşir [8].

Yara iyileşmesinde tüm olaylar iç içe geçmiş ve eş zamanlı olmasına rağmen, daha kolay anlaşılabilmesi amacıyla yara iyileşmesi; inflamasyon, hücre proliferasyonu ve maturasyon olmak üzere üç evreye ayrılabilir [5, 8-12].

Yara iyileşmesinin evreleri kemiriciler, tavşanlar, koyunlar ve diğer tüm memelilerde benzerdir [13, 14]. Bununla birlikte yaranın özelliği ve çevresel faktörler yaranın iyileşmesini etkiler [13, 14]. Yara iyileşmesini etkileyen lokal faktörler: iskem, gerilim, ölü boşluklar, yabancı cisimler ve kontaminasyon, hematoma, lokal travma, kronik doku faktörleri, sütürler, radyasyon, doku tipi ve çevre ısıdır [15-17]. Genel

(iskemik) faktörler ise; büyüme faktörleri, tıbbi durumlar, anemi/kan kaybı, beslenme, yaş ve anestezi şeklindedir [15, 16, 18-20].

Büyüme faktörleri biyolojik olarak aktif doğal polipeptit hormonlardır. Hücrelerin proliferasyonu, kemotaksisi, farklılaşması ve matriks sentezi gibi doku tamirindeki anahtar hücresel olayları, özgün reseptörlerine bağlanarak düzenlenirler [21]. Molekül ağırlıkları 4 000-60 000 Da arasında değişen büyüme faktörlerinin çok az miktarları bile hücresel aktiviteleri etkileyebilir [22].

Büyüme faktörleri, kemotaksis ve hücresel proliferasyonu uyararak, aynı ve farklı tipteki hücreler arası haberleşmeyi sağlayarak, hücre dışı matriks oluşumu ve anjiogenezi kontrol ederek, yara büzülme işlemini düzenleyerek ve doku bütünlüğünü yeniden kurarak, yara onarımı işleminde temel bir rol alır. Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki rolü, deri yaralarında ve gerçek granülasyon dokusunda detaylı biçimde incelenmiştir. Çok sayıdaki büyüme faktörünün bu işlemde yer aldığı gösterilmiştir [23]. Yara iyileşmesinde etkili olduğu kanıtlanmış büyüme faktörleri; PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü), FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü- β), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü), GM-CSF (Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör), IL-1 (İnterlökin-1), IL-2 (İnterlökin-2), TNF- α (Tümör Nekroz Faktör)'dır [24-28].

EGF ilk kez Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibular tükürük bezinden izole edilmiştir [29, 30]. Cohen erkek fare submandibular tükürük bezinde Sinir Büyüme Faktörü'nü (NGF) izole etmeye çalışırken bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken diş sürmesi ve erken gözkapağı açılışına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve bu maddeye epidermin gelişimini hızlandırıcı etkisinden dolayı Epidermal Growth Factor (EGF) adını vermiştir [29, 31-36]. EGF en çok böbrek, tükürük bezleri ve lakrimal bez tarafından üretilir. Bu yüzden idrar, tükürük ve gözyaşında bol miktarda bulunur [29]. Ayrıca duodenum, pankreas, adrenal bez, ovaryum, parotis bezi, karaciğer, özofagus, mide, ince bağırsak, kolon, kalp, böbrek,

prostat, iskelet kası, düz kas, akciğerler, timus bezinde de bulunur. EGF birçok ektodermal ve mezodermal kökenli hücre için mitojenik özelliktedir [29, 36- 38].

EGF, etkili olduğu hücrelerde iyon alınımlarını, glikolizi, DNA ve RNA ile protein yapımını arttırıcı özellik gösterir [37, 38]. EGF'nin korneal endotelyal hücreler, fibroblastlar, sinir sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahip olması [29, 38, 39], gastrik asit sekresyonunu inhibe etmesi [29, 40], serum çinko düzeyini arttırması [41] yanında embriyonun gelişmesi ve yeni kan damarlarının oluşması üzerinde etkili bulunması sonucu yara iyileşmesi üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır ve yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir [42]. Sistemik ya da topikal olarak EGF uygulamasının yara iyileşmesine olumlu katkılarının bulunduğu bilinmektedir [43, 44]. EGF'nin sistemik yoldan uygulanması ile ilgili yapılan çalışmalarda EGF'nin mide asit sekresyonunu azalttığı [45, 46] ve stres ülseri oluşturulmuş ratlarda mide dokusunda lipit peroksidasyonunu yine azalttığı gözlenmiştir [47]. Ayrıca gastrointestinal sistemde oluşan iskemi reperfüzyon hasarında bakteriyel translokasyonu azaltarak etki gösterir [48]. Özofagus mukozasının da onarımı ve korunmasında rolü vardır [49-53]. Koltuksuz ve arkadaşları (2001) alkali yanık oluşturdukları sıçanlara EGF ve CAPE vermişler ve sonuçta EGF'nin özofagusta iyileştirici yönde etkisinin olduğunu görmüşlerdir [54]. Berthet ve arkadaşlarının (1994) sıçanlarda periton içerisine epidermal büyüme faktörü ve interferon γ vererek yaptıkları çalışmada özofagusta yanık oluşturulduktan sonra intraperitoneal epidermal büyüme faktörü ile interferon γ 'nın birlikte verildiği grupta özofagus kalınlıklarında anlamlı bir azalma izlenmiştir [55]. Çelebi ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada EGF içeren poliakrilik asit jel formülasyonu hazırlanmış ve fare sırtında oluşturulan 1 cm uzunluğundaki cilt kesilerinde uygulanmıştır. Poliakrilik asit, mukoza ve dokulara yapışmaması, iritan olmaması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmiştir. 7. ve 15. günlerde yapılan incelemeler sonucunda EGF-poliakrilik asit jel formülasyonunun uygulandığı yaralardaki gerilme kuvvetinin, EGF içeren serum fizyolojik uygulanan yaralara göre daha fazla olduğu görülmüştür [43]. EGF'nin kronik yaralar üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi çeşitli rahatsızlıklara bağlı olarak ortaya çıkan ülser yaralarında topikal olarak EGF içeren

Silvaden uygulanmış ve iyileşme üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir [56]. Farelerde korneal alkali yanıklarının iyileşmesinde EGF'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada EGF'nin çeşitli dozaj formları içinde yara bölgesine uygulanmasıyla kontrol grubuna göre yaralı bölgenin çapında anlamlı bir azalma meydana geldiği ifade edilmiştir [57]. Topikal olarak EGF uygulamasının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği araştırmalarda ise EGF'nin epitelizasyonu uyardığı, yara iyileşmesinin erken safhalarında dermis oluşumunun üzerine kesin etkisinin olduğu ve kronik yaraların iyileşmesini uyardığı bildirilmiştir [29, 58]. Proteinlerin üretimini ve epitel hücrelerin migrasyonunu uyarıcı etkiye sahip olan EGF yara iyileşmesini hızlandırır, fibroblastların büyümesini ve keratinositlerin göçünü arttırarak yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar [18]. EGF'nin yara iyileşmesindeki etkisi, inflamatuvar safha, fibroblastik safha ve remodelling safhası olmak üzere üç süreçten geçmektedir. Mitojenik bir polipeptit olan EGF, yara iyileşmesine inflamasyon fazının bitiminde etki etmeye başlamakta ve fibroblastik oluşumunu indüklediği ve bunun yanı sıra granülasyon dokusunun oluşumu ve epitelizasyonu uyardığı bilinmektedir [59].

Yapılan araştırmaların çoğu EGF'nin yara iyileşmesi üzerindeki hızlandırıcı etkisini göstermektedir ancak EGF'nin yara iyileşme sürecinde organizmada meydana gelen oksidan olaylar üzerine etkisini gösteren çalışmaların sayısı çok azdır. Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda, rat deri dokusunda yara oluşturulmuş ve topikal olarak uygulanan EGF'nin oksidatif olaylar üzerindeki etkisinin 1., 5., 7. ve 14. günlerde araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara ve Yara İyileşmesi

2.1.1. Yara

Yara, canlı dokunun cerrahi, spontan, idiyopatik veya çeşitli hastalıklar sonucu anatomik ve fonksiyonel devamlılığının bozulmasıdır. Yara iyileşmesi ise yaralanmış dokunun anatomik ve fonksiyonel özelliklerinin yeniden oluşturulmasını sağlamak üzere değişik hücre gruplarının ortaklaşa yürüttükleri işlevlerden oluşan bir onarım sürecidir [60, 61]. Yara deyiminin karşılığı olarak erozyon, ülser, fissür deyimleri de kullanılır. Erozyon, dermise geçmeyen fokal (odaksal) epidermis kayıplarını belirleyen bir deyimdir, iz bırakmaz, kronik değildir. Fissür, çatlak şeklindeki dikey yaraları belirleyen doku kayıplarıdır. Epidermisi veya dermisi tutabilir. Ülser ise dermis ve epidermiste doku kayıplarıyla seyreden lokal yaralardır [62]. Yaraların iyileşmesi için kesin süreler verilemez ancak makul sürede iyileşmeyen, yavaş ve az ilerleme gösteren yaralar için kronik deyimini kullanılır [63-65]. Akut yaralar 2-3 haftada iyileşirken, kronik yaraların iyileşmeleri çok yavaş olup, aylar hatta yıllar alabilir [66-70]. Akut ve kronik yara arasındaki fark, yaranın lokalizasyonuna, nedenine, hastanın yaşına ve hastanın fizyolojik durumuna bağlı olarak belirlenmektedir [71]. Kronik yaraların %70'i venöz ülserler ve diyabetik yaralardır [72]. Sonuçta, özellikle kronik yaraların tedavisi hekimler için büyük sorun oluşturabilir [66 - 70].

2.1.2. Yara çeşitleri

Yara çeşitleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır [73]:

1. Mekanik travmalara bağlı yaralar

a) Künt travmatik yaralar

Abrazyon / sıyrık

Kontüzyon / bere

Laserasyon / yırtık

Kemik kırıkları

- b) Kesici alet yaraları
- c) Kesici-Delici alet yaraları
- d) Kesici-Ezici alet yaraları
- e) Delici alet yaraları
- f) Ateşli silah yaraları

2. Fiziksel travmalara bağlı yaralar

- a) Isı yaraları
- b) Işık yaraları
- c) Elektrik yaraları
- d) Barotravma yaraları

3. Kimyasal travmalara bağlı yaralar

- a) Asit
- b) Baz

4. Biyolojik etkilere bağlı yaralar

- a) Hayvan ısırık yaraları
- b) Böcek sokmalarına bağlı yaralar
- c) Toksinler

2.1.3. Yara iyileşmesinin mekanizması

Yara iyileşmesi mekanizmasına göre 3 gruba ayrılır:

Primer iyileşme:

Kesilmiş olan temiz bir yaranın, cerrahi olarak kapatılması ve komplikasyonsuz iyileşmesidir. Birincil yara iyileşmesi ya da primer kapama da denir. Yaranın kapatılması ve yara dudaklarının tam olarak karşı karşıya gelmesi ile onarım süreci başlar. Yarada tüm tabaka yaklaştırılır ve arada kalan sınırlı boşluk fibrin ile dolar.

Fibrinöz yapışma yaklaşık 24 saat alır ve 48. saate gelindiğinde epitel hücreleri altta oluşan skar (yara izi) dokusunu örter. Bu 48 saatlik dönem içerisinde yeni bağ dokusu oluşumu görülmemektedir. Mikroskopisinde yara ve dikiş materyali hattı boyunca dermis içine doğru epitelyal ilerleme olduğu görülür [74, 75].

Sekonder iyileşme:

Açık yaralarda, granülasyon dokusunun oluşması, retraksiyon ve yüzeyin epitelizasyonu ile karakterizedir. Yaralanmadan 4–5 gün sonra yara yeri fibroblastlarca istila edilir. Başlangıçta bu açık yara, pıhtı ve eksuda ile doldurulur, oluşan bu kabuk, yara yüzeyini örterek derindeki dokuların nemli tutulmasını sağlar. Nemli bölgelerde kollajenoliz ve hasarlı dokuların fagositik lökositlerce sindirilmesi olayı gerçekleşir. Özel olarak diferansiye olmuş, aktin ve miyozin içeren fibroblastlar (miyofibroblastlar) yara kontraksiyonu adı verilen iyileşme sürecine yardım ederler. Sırasıyla kollajen tip 1 ve tip 3 oluşur ve bunların arasında çapraz bağlanmalar gelişerek, skarın temel formu oluşur. Epitel yara kenarlarından harekete geçerek bu dokunun üzerini örter. İlerleyen dönemde skardaki kollajen matür hale geçer, tip 1 kollajen kaybolur, skar inceler, damarlar hacim ve sayıca azalarak hiperemik ve damardan zengin skar dokusu sınırlanır. Sekonder iyileşme süreci daha uzun süre alır (30–40 gün) ve büyük skarlar oluşabilir. Enfekte yaraların çoğu ve yanıklar bu şekilde iyileşir [74].

Gecikmiş primer iyileşme:

4–5 gün açık bırakılarak drene edilen bir yaranın primer olarak kapanmasıdır [74].

Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde ekstrasellüler elementler ve hücrelerin rolleri [76].

Yara Elemanları	Yaralanmadan Sonra Görülme Zamanları	Yara İyileşmesinde Major Etkileri
Trombositler	Hemen	Hemostaz, büyüme faktörlerinin (PDGF, TGF- β , EGF ve TGF- α) ve proteolitik enzimlerin salınımı
Nötrofiller	6.saat, 24-48. saatte pik	Yara debridmanı, bakteri ve yabancı cisimlerin temizlenmesi
Makrofajlar	3-5. günde en çok	Yara debridmanı, büyüme faktörlerinin (PDGF, TGF- β , TGF- α , FGF, IL-1, EGF, ve TNF α) salınımı
Fibroblastlar	48-72. saat arası	Kollajen, proteoglikanlar ve elastin sentezi; büyüme faktörlerinin (TGF- β , PDGF, KGF, FGF, IGF-1 ve IFN) salınımı; yara kontraksiyonu; yaranın yeniden yapılanması
Keratinositler	Epidermal migrasyon başlayınca	Mitoz ve migrasyona sekonder epidermal iyileşme; fibronektin sentezi; büyüme faktörlerinin (TGF- β , TGF- α , EGF) üretimi
Endotel hücreleri	48-72. saat arası	Fibronektin sentezi; büyüme faktörlerinin (PDGF, TGF- β , IGF-1) üretimi
Fibronektin	Erken	Hücre migrasyonu için yapısal destek; kollajenin organizasyonu
Kollajen	Tip III: 2 gün sonra Tip I: birkaç hafta sonra	Yapısal destek ve güç; hücreler arası etkileşimi düzenleme
Proteoglikanlar	2. haftada maksimum sentez	Kollajen sentezinin regülasyonu; hücreler arası etkileşimler; matriks komponenti

(EGF, Epidermal büyüme faktörü; FGF, fibroblast büyüme faktörü; IFN, İnterferon; IGF-1, İnsülin benzeri büyüme faktör; IL-1, İnterlökin 1; KGF, Keratinosit büyüme faktörü; PDGF, Platelet kaynaklı büyüme faktörü; TGF, Transforming büyüme faktörü; TNF- α , Tümör nekroz faktör-alfa)

2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Lokal faktörler

1. İskemi
2. Gerilim
3. Ölü boşluklar
4. Yabancı cisimler ve kontaminasyon

5. Çevre sıcaklığı
6. Hematom
7. Lokal travma
8. Sütürler
9. Doku tipi
10. Kronik doku faktörleri
11. Radyasyon [15-17]

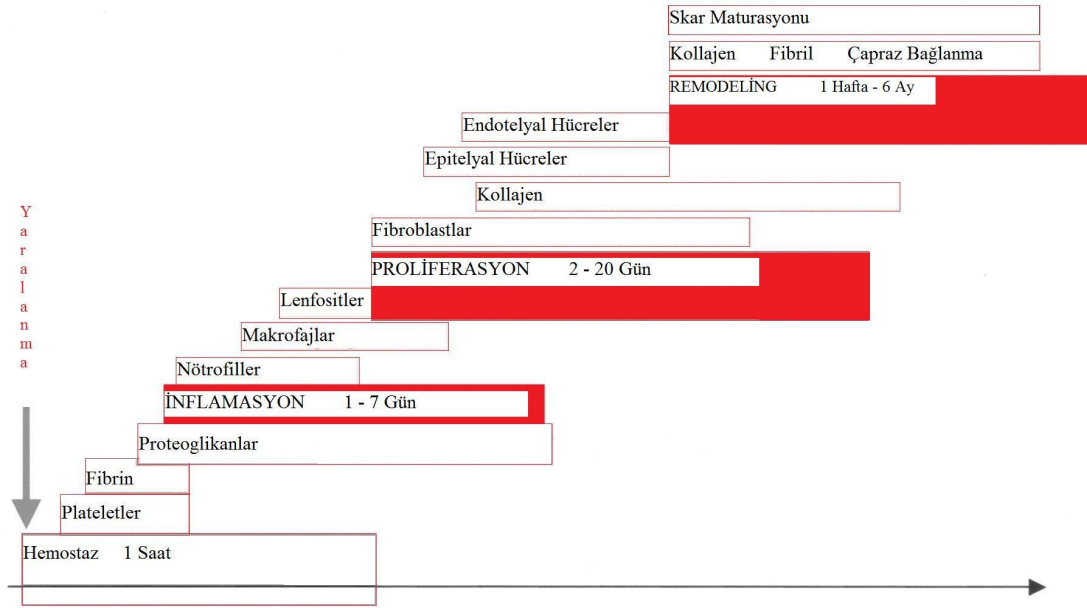
Genel (Sistemik) faktörler

Sistemik faktörlerin immün fonksiyonlar ve kollajen sentezi üzerinde endojen etkileri bulunur. Ayrıca lokal faktörler üzerinde de etkileri bulunur ve yara iyileşmesini geciktirir.

1. Büyüme faktörleri
2. Tıbbi durumlar
3. Anemi/ Kan kaybı
4. Beslenme
5. Yaş
6. Anestezi şekli [15, 16, 18-20]

2.1.5. Yara iyileşmesi

Yara iyileşmesinde tüm olaylar iç içe geçmiş ve eş zamanlı olmasına rağmen, daha kolay anlaşılabilmesi amacıyla yara iyileşmesi; inflamasyon, hücresel proliferasyon ve maturasyon olmak üzere üç evreye ayrılabilir [5, 8-12].



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları [77].

1-İnflamasyon evresi: Cerrahi müdahale veya travma sonucu oluşan doku hasarına karşı organizmanın cevabı, inflamasyonla başlar [4, 78]. İnflamasyon; organizmayı kan kaybına karşı korumak, yabancı maddelerin invazyonunu önlemek ve yarası onarıma hazır hale getirmek için gelişen, organizmanın gösterdiği vasküler, humoral ve hücrel bir reaksiyondur [4, 11, 78]. İnflamasyon vazodilatasyon ve permeabilite artışıyla sonuçlanır [79]. Yaralanma sonrası kan damarlarının bütünlüğü bozularak kanama meydana gelir [4, 79-81]. Kanama ile eş zamanlı başlayan hemostaz ile yara iyileşmesinin ilk aşaması başlamış olur [8, 11, 79, 81]. Yara meydana geldikten sonra hücre membranları tromboksan A₂ ve prostaglandin F_{2α} gibi vasoaktif komponentler salgılayarak, hasar gören damarlarda 5–10 dakikalık geçici bir vazokonstriksiyona neden olurlar [6, 8, 10, 11, 82-85]. Şekillenen vazokonstriksiyon, kan kaybını önlemek için kan akım miktarını azaltarak hemostazın sekilenmesine katkıda bulunur [84, 86-88]. Vazokonstriksiyonla eş zamanlı olarak damardan çıkan trombositlerin endotel altı kollajen ile teması sonucu trombositlerin kümeleşmesi, kümeleşen trombositlerin damarı tıkaması ve hageman faktörün aktivasyonuna yol açmasıyla pıhtılaşma mekanizması harekete geçer [3, 5, 7, 81, 82, 90]. Trombositlerin kollajenle temasında, kollajenin yapısında bulunan prolin ve hidroksiprolin aminoasitleri, trombositleri aktive ederler. Aktive olan trombositler ise

granüllerinde bulunan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), trombosit faktör IV, fibronektin, serotonin, tromboksan A2, fibrinojen, von Willebrand faktör ve trombozpondin gibi faktörler ile, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interlekin-1 (IL-1) gibi sitokinleri salgılatır [13, 74, 81, 82, 84]. Bu salgılanan faktör ve sitokinler yara iyileşmesinin erken ve geç döneminde önemli rol oynarlar. Vazokontraksiyonu takiben yaklaşık 20 dk sonra histamin, serotonin, prostaglandin E1, prostaglandin E2 aracılığı ile şekillenen vazodilatasyon ve permeabilite artışı sonucu, kan hücrelerinin diapedezi, sıvı ve proteinlerin damar dışına çıkışı şekillenir [3, 5, 82, 84, 89]. Fibrinojen, trombin ve diğer pıhtılaşma faktörleri yardımı ile pıhtılaşma meydana gelir ve kanama durur. Oluşan pıhtı; fibrin, fibronektin, trombin, trombosit, vitronektin, von Willebrand faktör ve trombozpondin gibi kan proteinleri ile eritrosit ve lökosit gibi şekilli elementlerden oluşur [4, 6, 78, 85, 89]. Pıhtıyı oluşturan bu faktörler ise inflamatuvar reaksiyonu başlatan sitokin ve büyüme faktörlerini salgırlar. Bu pıhtı ile kontaminasyon ve vücut sıvısı kaybı önlediği gibi yara iyileşmesi için de geçici bir matriks sağlanmış olur [4, 6, 78-81, 85, 89, 90]. Ayrıca fibrin pıhtıları bölgede yaralanan lenfatikleri tıkayarak sıvının yaralanmış bölgeden drene olmasını önler. Böylece inflamasyon bölgesel bir olay olarak kalır [78, 83, 85]. Yangının lokalize olmasıyla bölgede kızarıklık, şişlik, ısı artışı ve yaradan salınan nöropeptitlerden kaynaklanan ağrı şekillenir [78, 91, 92]. Dikiş uygulanan yaralarda ise, oluşan pıhtı yarayı yeterli bir şekilde doldurur ve yara dudaklarını birbirine yapıştırır ve yaraya sınırlı bir direnç kazandırır [78]. Sonraki süreçte pıhtı dehidre olarak yara kabuğuna dönüşür [4, 78, 83, 85, 87, 89]. Yara kabuğu ise yarayı tıpkı pansuman materyali gibi dış kontaminasyondan korur, sekonder kanamaları önler, iç hemostazı sürdürür ve pıhtı yüzeyi altında epitel migrasyonun gelişmesini sağlar [11, 78, 83, 85, 87]. Pıhtılaşma sürecinde aktive olan komponentlerden, mast hücrelerinden, yaralı ve aktive olmuş mezenşimal hücrelerden, fibrinojen ve fibrin yıkımlanma ürünlerinden salgılanan çeşitli vazoaktif medyatörler ve kemoatraktanlar aracılığı ile kan dolaşımından yara bölgesine ilk olarak inflamatuvar lökositler gelirler [4, 8, 11, 74]. Travmayı takiben ilk birkaç saat ile 6 saat içinde yara bölgesine gelen ilk lökositler nötrofillerdir ve kısa sürede sayıları artar [5, 74, 89, 93]. Yarada mikroorganizma varlığında ise yaralanmadan sonraki birkaç dakika içinde nötrofiller bölgeye gelirler

[88]. Yara bölgesinde nötrofillerin sayısı 24–48. saatlerde pik seviyeye ulaşır [5, 7, 11]. Nötrofiller yaralanma boyunca yara bölgesine giren bakterileri, ölü dokuları ve yabancı cisimleri fagosite ederler [4, 5, 7, 11, 74, 80, 84, 90, 91, 93]. Bu mekanizmada proinflatuar sitokinler olarak bilinen IL-1 ve TNF- α da önemli rol oynar [11]. Nötrofiller farklı tiplerde çeşitli proteazlara sahiptirler. Bunlardan serin proteazlar geniş bir özelliğe sahipken, metalloproteinazlar (çinko iyonu içeren) özellikle kollajeni sindirirler. Her iki proteaz da yara bölgesinde önceden var olan ekstraselüler matriksi yıkımlarlar. Ayrıca nötrofiller prostaglandin E ve çeşitli enzimler salgılayarak nekrotik dokunun kolay yıkımlanmasına katkıda bulunurlar [6, 89]. Yara bölgesindeki sağlam dokular matriks proteaz inhibitörlerinden yapılmış bir armor tarafından korunur. Enfeksiyon bulunmadığı takdirde nötrofillerin yaradaki sayısı üçüncü günden sonra hızla azalır. Enfeksiyon varlığında ise nötrofil infiltrasyonu enfeksiyon kontrol altına alınıncaya kadar devam eder, yara bölgesinde kalma süreleri ve sayıları artar [78, 88, 90]. Nötrofiller bilinmeyen bir uyarıcı ile ölürlere ve yerini makrofajlara terk ederler [6]. Yara bölgesinde ölen nötrofillerin lizozomal enzimleri, ölü dokuları yıkımlayarak yangısal reaksiyona katkıda bulunur ve ölü nötrofiller doku makrofajları tarafından fagosite edilir veya eskar ile atılırlar [9, 78, 79]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda enfeksiyon bulunmayan yaralarda, normal yara iyileşmesi süreci için nötrofillerin zorunlu hücreler olmadıkları ileri sürülmektedir [4, 13, 74, 78, 93]. Yara iyileşmesinde yara bölgesine gelen immun hücrelerinden biri de makrofajlardır [5, 74, 93, 94]. Yara bölgesine 48–96. saat içinde ulaşan makrofajlar sistemik dolaşımdaki monositlerden kaynaklanan mononükleer fagositik hücrelerdir [4- 6, 7, 11, 78, 85, 86, 90, 93, 95]. Makrofajların nötrofillerle birlikte yara bölgesine geldikleri de ifade edilmektedir [8, 78]. Ayrıca monositler birleşerek çok çekirdekli epitelioid veya histiosit gibi dev hücrelere dönüşürler [78, 85]. Monositlerin yangılı bölgeye gelmelerinde, fibrin, alginat, hipoksik ortam, artmış laktat konsantrasyonu, matriks yıkımlanma ürünleri, trombin, inflammatuar proteinler, bakteri endotoksinleri, yangısal hücre ürünleri, nötrofil ve trombositlerden salınan birçok kemoatraktan madde aracılık eder [11, 74, 93, 95]. Yara bölgesine gelen makrofajlar özellikle IL-1 ve IL-8 gibi proinflatuar peptitler ve TNF salınımı ile inflamasyonu sürdürürler [92]. Makrofajlar, patolojik organizmaları, doku artıklarını ve foksiyonel olmayan nötrofilleri fagosite ederler [1-

6, 11, 78, 85, 86, 90]. Ayrıca makrofajlar hem nitrik oksit sentezleyerek, hem de serbest oksijen radikalleri vasıtasıyla patojenleri yok ederler [6, 7]. Hasarlı ekstraselüler matriks ise keratinositler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından sentezlenen matriks metalloproteinazları tarafından temizlenir. Bu metalloproteinazlar inflamatuvar debrisini de temizleyerek yara hücrelerinin matrikse doğru hareket etmelerine olanak sağlar [6]. Aktive olan makrofajlar, inflamatuvar evre ile onarım evresi arasında geçiş görevi üstlenirler, ayrıca epitelizasyon, angiogenez, fibroplaziyayı kapsayan mezenşimal hücrelerin aktivasyonunu sağlarlar ve yara iyileşmesi için gerekli TGF- β , TNF- α , IL-1, PDGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi faktörleri sentezleyerek salgırlar [2, 5, 11, 13, 74, 86, 88, 91, 96]. Özetle bu büyüme faktörleri fibroblastlar tarafından ekstraselüler matriksin organizasyonu ve endotel hücreleri ile düz kas hücrelerinin proliferasyonunu düzenlerler [13]. Anti-monosit serumu ve kortizon ile makrofajlar baskılanacak olursa, kollajen sentezi, neovaskülarizasyon ile fibroblastların proliferasyonu ve migrasyonunda belirgin bir gecikme gözlenir. Böylece yara iyileşmesi ciddi anlamda bozulur [11, 93]. Yapılan deneysel çalışmalarda, makrofajların ve yaralara lokal olarak uygulanan TGF- β 'nın yarada kollajen sentezini ve kopma direncini arttırdığı ortaya konmuştur [5]. Makrofajlar yaralanmanın erken döneminde aktive olarak NO sentezlerler. Endotelyal hücreler, fibroblastlar, monosit ve lenfositler de NO sentezini hızlandırırlar. Deneysel çalışmalarda düşük konsantrasyondaki NO'nun hücre proliferasyonunu arttırdığı, yüksek konsantrasyonlarda ise hücre farklılaşmasına neden olduğu belirtilmektedir [88]. Nötrofillerin aksine, makrofajların yaradaki varlığı ve aktivitelerinin normal yara iyileşmesi için hayati öneme sahip olduğu, hem yara debrimenti hem de yara onarımı için zorunlu olduğu bildirilmektedir [5, 87]. Trombosit ve nötrofiller tarafından başlatılan yara onarımı makrofajlar tarafından devam ettirilir [90]. Aşırı kontamine yaralarda makrofajların maksimum stimülasyonu, inflamatuvar fazın uzamasına dolayısıyla iyileşmenin gecikmesine ve daha fazla skar dokusu oluşumuna neden olabilir [95].

2-Hücresele proliferasyon evresi: Bu evre inflamasyonu takiben yaklaşık yaralanmadan sonraki 3–5. günlerde yaradaki kan pıhtısı, nekrotik doku, yabancı cisimler ve enfeksiyon gibi bariyerler kalktıktan sonra başlar [5, 8, 11, 78].

Proliferatif dönem, fibroblastların hakim olmasıyla yaradaki granülasyon dokusunun oluşumu, epitelizasyon ve yara kontraksiyonu ile karakterizedir [8, 13, 78, 96].

Granülasyon dokusunun oluşumu: Normal yara iyileşmesi sürecinde en belirgin gösterge, düzenli biçimde granülasyon dokusu gelişimidir [74]. Granülasyon dokusu oluşumu tüm yaralarda meydana gelmekle birlikte, özellikle açık yara iyileşmesinde daha belirgindir [94] ve yaralanmadan sonraki 3–6. günlerde başlar [11, 80, 85]. Granülasyon dokusu; kollajen, fibronektin ve hiyaluronik asidin hücre dışı matriks içine gömülmesi, yeni kapillar tomurcuklanma ile fibroblast ve inflamasyon hücrelerinin birleşiminden oluşur [5, 8, 11, 74, 86]. Granülasyon deyimi, yara yüzeyindeki dokunun parlak kırmızı granüler görünümünden ileri gelmektedir. Her bir granül yeni bir kapillar tomurcuğu temsil eder [94]. Granülasyon dokusu açık yaraların iyileşmesinde, sistemik bir enfeksiyona karşı bariyer görevi üstlenir [78, 85, 97]. Ayrıca granülasyon dokusu epitel hücrelerinin göç etmesi için bir zemin oluşturur [78, 85]. İnflamatuvar evre sürecinde şekillenen geçici matriks, kapsadığı büyüme faktörleri, sitokinler, hiyaluronan ve fibronektin vasıtasıyla, granülasyon dokusu oluşumunu destekler [11]. Granülasyon dokusunun gelişimi, fibroplazia olarak tanımlanan, fibroblastların aktivasyonu ile yeni damar oluşum süreci olan anjiogenez ile karakterizedir.

Fibroplazia: Yetişkin memelilerde yara iyileşmesi, ekstrasellüler matriks komponentlerinin sentezi ve birikiminde anahtar rol oynayan fibroblastların proliferasyonunu kapsar [11, 97]. Fibroplazia, kollajen üreten fibroblastların yara kenarından köken alarak yaraya göç ederek prolifer olmaları, böylece kollajen üretilmesi ve kollajenin yara bölgesinde birikim süreci olarak tanımlanır ve yara bölgesinde granülasyon dokusunun oluşumu ile başlar [4]. Ekstrasellüler fragmentlerden ve inflamatuvar hücrelerden salınan IL-1, TNF- α , PDGF, EGF, FGF özellikle TGF- β 1 ve TGF- β 2 gibi bir çok kemoatraktanlar, fibroblastların yara bölgesine göç etmesinde ve proliferasyonunda rol oynarlar [78, 85, 89, 94]. Fibroblastlar bağ dokuyu çevreleyen farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden ve perivasküler adventisyadan köken alarak, önceden şekillenen fibrin pıhtısı içindeki lifler ve yeni gelişen kapillarlar boyunca sitoplazmik uzantılar oluşturarak yaranın

içine doğru hareket ederler [78, 83- 85, 89, 94]. Fibroblastlar yaralanmadan sonraki 3–4. günlerde görülürler ve 7. günde pik seviyeye ulaşarak 15–21. güne kadar yarada aktif olarak kalırlar [5, 10, 11, 78, 83, 85, 94]. Fibroblastlar onarım sürecinin esas elementidir ve dokuların yeniden yapılanması sürecinde kullanılan yapısal proteinlerin büyük bir bölümünün üretilmesinden sorumludurlar [5]. Fibroblastlar fibrin pıhtısını geçici matriks olarak kullanırlar. Geçici matriks hızla glikoprotein (fibronektin – laminin), proteoglikan (hiyaluronik asit) ve kollajen (başlangıçta tip III, daha sonra tip I) den oluşan gevşek bir yapıya sahip ekstraselüler matriks ile yer değiştirir [97]. Yara bölgesine ulaşan fibroblastlar, yara olgunlaşmasında önemli olan elastin, fibronektin ve glikozaminoglikan gibi geçici matriksin yerini alacak şekilsiz temel madde komponentleri ile kollajenaz gibi proteazların senteziyle, eş zamanlı olarak yaraya gerilim kuvveti kazandıran glikoprotein yapısında olan kollajen sentezini de yaparlar [4, 78, 80]. Kollajenin yapısı ağırlıklı olarak hidrokspirolin ve hidrokasilizin aminoasitlerinden oluşur. Kollajen oluşumu yara onarım sürecinin 4–5. günlerinde tropokollajen moleküllerinin ekstrasellüler matrikse bırakılmasıyla şekillenmeye başlar. Başlangıçta şekillenen olgunlaşmamış kollajen fibrilleri, birbirleriyle çapraz bağlanarak olgun kollajeni oluştururlar [78, 94]. Kollajen içeriği artarken temel madde miktarı azalır. Yarada erken dönemde gerilim direncinin artması kollajen formasyonuna bağlı iken, sonraki direnç artışı skar dokusunun olgunlaşmasına bağlıdır [78]. İnsizyon yaraların oluşumundan 3–4 gün sonra yara içindeki pıhtının fibrin iplikleri yara yüzeyine dikey olarak yönelirler. Yaklaşık 6 gün sonra ise, insizyonel yara arasındaki kapıllarlar, fibroblastlar ve kollajen lifleri yara yüzeyine paralel bir yapı alarak yara dudaklarını birbirine bağlar [85]. Yara merkezindeki asidik ortam ve düşük oksijen seviyesi, fibroblast proliferasyonunu stimüle eder [81, 95]. Anjiogenez sürecinde şekillenen yeni damar oluşumu, yara merkezinde oksijen seviyesini artırarak fibroblast proliferasyonu azaltır. Fibroblastlar asidik ortam ve düşük oksijen seviyesinde maksimum matriks proteinlerini üretirler. Yara ortamı anoksik koşullarda kollajenlerin çapraz bağlanmasını inhibe eder. Oksijen kollajenlerin çapraz bağlanması için zorunlu bir kofaktördür [74]. Matriksin birikmesi ve fibroblastlarda protein sentezinin sona ermesinden sonra, fibroblastlar fenotipik karakterlerini değiştirerek miyofibroblast formuna dönüştürler [11, 74]. Miyofibroblastlar elektron mikroskobunda yapı olarak, hem düz kas hücrelerinin

hem de fibroblastların özelliklerini gösterirler [74]. Miyofibroblastlar özellikle onarım sürecinin 2. haftasında yara kontraksiyonuna katılırlar [11].

Anjiogenez: Yara bölgesinde var olan endotel hücrelerden yeni kan damarları oluşumunu kapsar, yara iyileşmesinde fibroblastların proliferasyon süreci ile paralel olarak gelişir [4, 5, 8, 11, 74, 84]. Yara onarımında mezenşimal hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve sentez işlemini gerçekleştirebilmeleri için gerekli oksijen ve enerji, yeni oluşan kan damarları ile sağlanır [8, 11, 84]. Endotel hücreleri anjiogenezi oluşturmak üzere göç ederken salgıladıkları kollajenaz, plazminojen aktivatörü ve stromelizin gibi medyatörlerle venül bazal membranı parçalarlar [8, 80, 84]. Bu parçalanmış bazal membran aralıklarından endotel hücreleri psödopodlar oluşturarak perivasküler alana çıkar ve proteolitik enzimler salgılayarak göçlerine devam ederler [8, 80]. Anjiogenezis, serum ve ekstrasellüler ortamdan kaynaklanan birçok faktör tarafından aktive edilir. Yaralanma, dokuda yıkımlanmaya ve hipoksiye yol açarak makrofaj ve trombosit gibi aktive hücrelerden inflamasyon medyatörlerinin salgılanmasına neden olur [11]. Özellikle bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), onarım sürecinin ilk 3 günü aktive olarak, mikrokapillarların bazal membranlarını parçalayıp serbest endotel hücrelerin meydana gelmesini sağlayan proteazların sentezini stimüle ederek, endotel hücrelerinin migrasyonunu destekler [5, 11]. Yara kenarlarındaki keratinositlerden olmak üzere fibroblastlar, makrofajlar, trombositlerden ve diğer endotel hücrelerinden salgılanan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), ekstrasellüler matriks komponentlerinin bağlanmasına aracılık eden birçok yüzey reseptörlerini indükleyerek hücrel migrasyonu kolaylaştırır [6, 11, 81]. Böylece anjiogenik uyarımlara cevap olarak yaralanmadan sonraki ikinci günde kapillarların ucunda bulunan endotel hücreler yara içine doğru hareket eder ve ard arda dizilerek kapillar tomurcuklanmayı ve diğer yönlerden gelen tomurcuklarla birleşip kapillar dallanma oluşturarak kapillar ağı şekillendirirler [8]. Yaradaki lenfatik drenaj iyileşmenin başlangıç sürecinde zayıf olduğu için, lenfatik kanal kan damarlarından yavaş veya eş zamanlı olarak gelişir [83, 85].

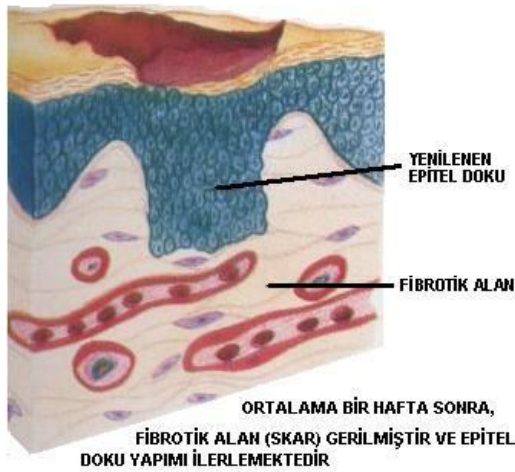
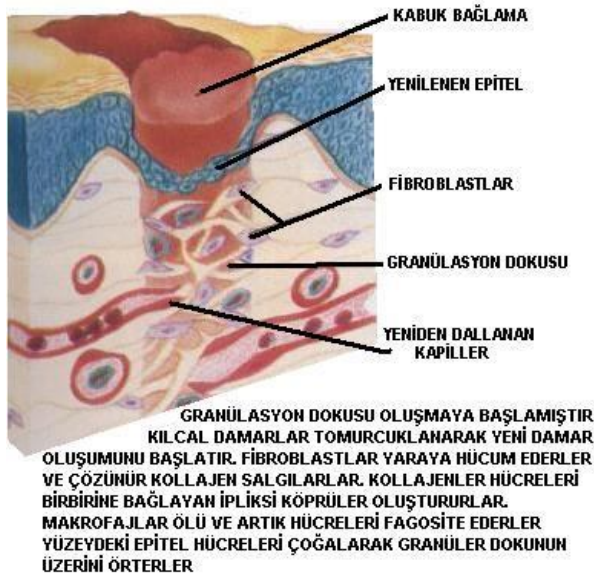
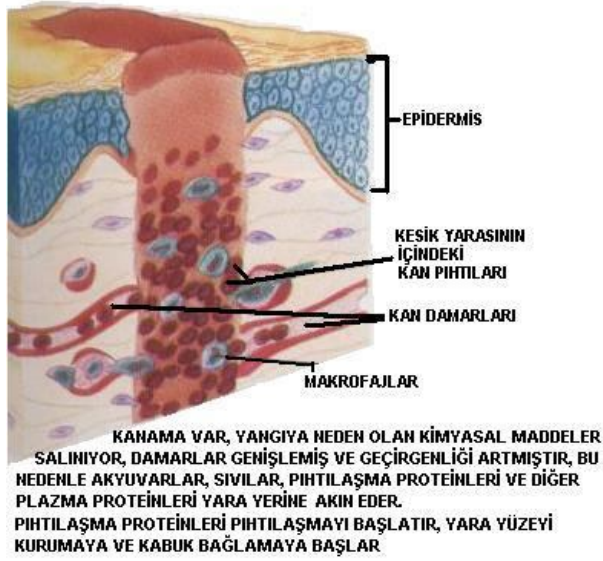
Epitelizasyon: Epidermisin görevi iç ve dış ortam arasında bariyer oluşturmaktır [11, 93]. Dış ortamdan zararlı maddelerin girişini önlerken, iç ortamdan ise elektrolit ve

sıvı kaybına engel olur [93]. Epitelizasyon, yaralanmadan sonra derinin bariyer özelliğinin yeniden kazandırılması amacıyla epitel hücrelerinin ayrılmasını, göç etmesini, çoğalmasını, organize ve keratinize olmasını kapsayan bir süreçtir [8]. Bazal membranın zarar görmediği yüzeysel kısmı kalınlıktaki epidermal yaralarda, epitelizasyon, yara periferinde kalan epitel kalıntıları kıl folikülü ve ter bezi gibi epidermal oluşumlardan meydana gelir [8, 10, 11, 74, 79, 80]. Tam kalınlıktaki açık yaralarda bazal membran hasar görmüştür ve epitelizasyon sadece yara kenarlarındaki sağlam epitel hücrelerinden köken alır [8, 10, 11]. Yaralanmadan sonraki ilk saatler içinde, epitel migrasyonla eş zamanlı olarak, bazal epidermal hücrelerin sitoplazmalarında aktin filamentlerin şekillenmesi, hücre içi tonofilamentlerin kısalması ve psödopod benzeri çıkıntıların şekillenmesi gibi belirgin fenotipik değişime uğrarlar [4, 11, 74, 79, 93]. Bu değişim, epitel hücrelerin birbirleriyle ve bazal membranla olan bağlantılarını kaybetmelerine neden olur [4, 5, 74, 79, 93]. Yaranın meydana gelmesinden sonraki ilk dakikalarda oluşan pıhtı epitelizasyon için geçici bir engel oluşturur [2]. Keratinositler, tip V kollajen, nötral proteazlar, plazminojen aktivatörü, kollajenaz ve fibronektin üreterek epitelizasyon sürecine katkı sağlarlar. Fibronektin, epitelyum hücrelerinin yara tabanına doğru hareket etmelerinde kılavuzluk eder [80]. Kollajenaz ve diğer proteazlar ise; (epitel hücreler yalnızca canlı yüzeyler üzerinde göç ettikleri için) pıhtı ile canlı yüzey arasındaki bağlantıyı ayırarak epitelyum hücrelerine göç edecek zemini oluştururlar [80, 85]. Epitelizasyon, serbest yara kenarları tarafından başlatılıp, epitel hücrelerin ilerlemesi başka bir doğrultudan gelen hücrelerle karşılaşmaya kadar devam eder, bu noktada kontak inhibisyon kurulur ve ilerleme durur [11, 93]. Dikiş ile karşı karşıya getirilen yaralarda epitelizasyon hemen başlar ve 24–48 saat içinde yaranın iki dudağı arasında periferden merkeze tek katlı epitelyal bir köprü oluşur. Bu yaranın dışarıdan gelebilecek tehlikelere karşı oluşturduğu ilk koruma engelidir [5, 83]. Ayrıca, bu yaralarda epitelyal hücreler dikiş ipliğinin doku içinde kalan bölümü boyunca da göç ederler [78]. Ancak açık yaralarda ise, yeterli granülasyon dokusu şekillendikten sonra granülasyon dokusu yüzeyinde 4–5 günlük latent bir periyottan sonra göç etmeye başlarlar [83, 85]. Yara kabuğu varsa, epitelizasyon bu kabuğun altında devam eder [78]. Buraya göç eden epitel hücreleri yassı görünümünü kaybeder ve daha çok sütunumsu bir şekil alırlar ve mitotik aktiviteleri normalin 17

katı artar [5, 7, 11, 80]. Bu tek katlı epitel örtü, göç eden yeni epitel hücreleri ile birbirinin üstüne binecek şekilde ikinci ve üçüncü tabaka oluşur [5, 11]. Epitelin tabakalaşması ile yüzeysel epiteli yavaş yavaş keratinize olur ve sağlamlaşır [5, 7, 78, 93]. Fakat bu oluşum hiçbir zaman normal epitelyum yapısında değildir [5]. Enfeksiyonun ve yara kabuğunun şekillenmediği yaralarda, nemli ortam ve yeterli oksijenasyonun sağlandığı koşullarda epitelyum hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu maksimumdur [4, 8, 93]. Aşırı granülasyon dokusu gelişimi, kronik yangı varlığı ve yara yatağındaki fibrin kalıntıları epitelizasyonun bozulmasına neden olur. Yeni şekillenen epitel deri eklentilerinden yoksun, ince ve kırılgan bir yapıdadır [97].

Yara kontraksiyonu: Defektin kapatılmasını kolaylaştırmak için yarayı çevreleyen tam kalınlıktaki yara dudaklarının merkeze doğru hareketi sonucu gelişen bir küçülmedir [2, 5, 78, 85]. Granülasyon dokusu deri kenarlarını içe doğru çeker ve böylece epitelizasyon ile kapatılacak alan azalır [85]. Kontraksiyon, anormal skar kontraksiyonu ile sonuçlanabilen deformite olarak bilinen kontraktür ile karıştırılmamalıdır [93]. Yaralanmadan hemen sonra derideki normal elastik gerilmenin açığa çıkmasına bağlı olarak yara kenarlarında hafif bir geri çekilme vardır ve bu durum yara alanının artışına neden olur [5]. Bu yaklaşık 72 saat sürer. Ardından doku kontraksiyonu yaranın orijinal çapına döner ve yara kontraksiyonu ile yara büyüklüğü yavaş yavaş azalır. Kontraksiyon yaralanmadan sonra 5–15. günlerde maksimum düzeydedir ve günlük yaklaşık olarak 0,6-0,7 mm ilerler [80, 83]. Köpeklerde göze çarpan yara kontraksiyonu genellikle yaralanmadan sonraki 5–9. günde başlar [85]. Granülasyon dokusundaki fibroblastlar, yapısal ve fonksiyonel olarak farklılaşarak kontraktil yeteneğine sahip miyofibroblast olarak isimlendirilen düz kas hücrelerine benzer bir yapı kazanırlar [4, 7, 11, 93, 97]. Bu hücreler sadece yara dokusunda bulunur, sağlam bağ dokuda ise bulunmazlar ve aktin-miyozin içerdiği sanılmaktadır [83, 85]. Bu hücreler yara yatağında birbirlerine, kas tabakasına ve yara dudaklarındaki dermise bağlanırlar [85]. Böylece bu miyofibroblastların kontraksiyonu yara kenarlarını yara merkezine doğru çekerek, yara alanının küçülmesini sağlar [97]. Yara dudakları birbirleri ile temas sağladıklarında, miyofibroblastların gerilim gücü yarayı çevreleyen derinin

gerilimine eşit olduğunda ve miyofibroblastlarda yapısal bir bozukluk olduğu zaman kontraksiyon durur [78, 85]. Ayrıca granülasyon dokusunun, tam kalınlıktaki greft veya flep ile kapatılması ve açık yaraların mekaniksel olarak hareketsizleştirilmesi yara kontraksiyonunu engeller [78, 93]. Yaraların şekline göre, yara kontraksiyonu ve skar oluşumu da değişir. Üçgen, dikdörtgen ve kare şeklindeki yaralar, köşeleri sabit kalarak kenarlar çevreden merkeze doğru hareket ederek iyileşir. Dairesel yaralar üçgen, dörtgen ve kare şeklindeki yaralardan yaklaşık olarak %30 daha yavaş büzüşerek iyileşir [85].



Şekil 2.2. Deri yarasının iyileşme süreci [98]

3-Maturasyon evresi: Epitelizasyon tamamlandığında yaranın iyileştiği kabul edilir. Ancak daha pek çok olay devam etmektedir. Yara onarım sürecinin son evresi olan maturasyon, granülasyon dokusunun skar dokusuna dönüşmesini ve ekstrasellüler matriksin olgunlaşmasını kapsayan yara iyileşmesinin en uzun evresidir [4, 11, 74, 94]. Maturasyon evresi, yara bölgesindeki fibroblastların sayısının azaldığı, kollajen üretiminin dengeye ulaştığı, epitelizasyonun tamamlandığı yara renginin soluklaştığı, yara gerilim direncinin arttığı, skar dokusunun hacminin azaldığı ve sonuçta iyileşmiş skar dokusunun olduğu evredir [4, 78, 80, 82, 94]. Bu evre sürecinde, fazla miktarda hücresel ve vasküler yapıya sahip granülasyon dokusu yavaş yavaş şekil ve yapı değiştirerek daha az hücre ve damara sahip skar dokusu ile yer değiştirir [7, 74, 93]. Bu hücresel azalma, hücrelerin yara dışına göç etmeleri veya programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozis ile gerçekleşmektedir [74]. Fibroblastlardan sentezlenen kollajen molekülleri, hidroksilasyondan sonra prokollajen olarak isimlendirilir. Prokollajenin yapısından amino ve karboksil terminal peptitler kaldırıldıktan sonra kollajen yapısı şekillenir. Bu ilk kollajen molekülü, yara direncini sağlayan fibriller birbirleri ile çapraz olarak bağlanırlar [80]. Kollajen yara boşluğuna yerleştiği zaman, fibronektin yavaş yavaş kaybolur. Non-sülfat glikozaminoglikanlar ve hiyaluronik asit daha elastik yapıya sahip kondroitin-4-sülfat gibi proteoglikanlar ile yer değiştirir [11, 80]. Daha sonra skar dokusundaki su ve glikozaminoglikanların yavaş yavaş rezorbe olarak, kollajen fiberlerin ve diğer matriks komponentlerinin birbirlerine daha yakınlaşmasını sağlar [74, 80]. Liziloksidaz ise, yara direncinin artmasına neden olan kollajen fibrillerin çapraz bağlanmasına aracılık eder [78, 80]. Kollajen fibrillerin birbirine bağlanmasıyla şekillenen kollajen demetleri gelişerek deri yüzeyine paralel bir şekilde yeniden düzenlenir. Granülasyon dokusundaki tip III kollajen yerini skar dokusunda tip I kollajene bırakır [74, 80, 86]. Bu evrede kollajen sentezi ısrarlı biçimde devam ederse hipertrofik nedbe olarak adlandırılan kabarık ve sert bir doku oluşur [93]. Bu fazın en önemli özelliği, kollajen birikimi ve düzenlenmesidir. Kesintisiz kollajen sentezi en az yaralanmadan sonraki 4-5 haftaya kadar devam eder. Başlangıçta üretilen kollajen sağlam derideki kollajenden daha incedir. Zaman geçtikçe, başlangıçtaki kollajen iplikleri absorbe edilir ve gerilme hattı boyunca daha kalın ve düzenli kollajen birikir. Bu değişiklik ile birlikte yara gerilim kuvveti de

artar. Kollajen fiberlerin kalınlığı ve düzeniyle yara gerilim kuvveti arasında pozitif bir korelasyon vardır. Skar dokusu 1. haftada yaranın en son kazanacağı direncin %3'üne sahiptir. Üçüncü haftada %30, 3. ay ve sonrasında %80 direnç kazanır [10].

Kollajen: Memeli hücrelerinin çoğu dokulara yerleşmiş olup çoğunlukla bağ dokusu adı verilen karmaşık bir hücre dışı yatakla çevrelenmiştir [99]. Bağ doku, hücrelerin aralarını doldurmak suretiyle dokuların şekillenmelerini sağlar. Diğer önemli bir görevi ise organizmadaki doku kayıplarının önlenmesidir. Doku kayıplarının önlenmesinde bağ dokusu hücreleri çoğalıp yeni hücrelerarası madde yaparak, hem bağ dokunun hem de rejenere olamayan dokuların kayıplarını kapatır [100]. Bağ dokusunu oluşturan ekstraselüler makromoleküler ara madde kollajen, retikülün, elastin ve proteoglikanlardan meydana gelir [2]. Kollajen deri, kemik, kıkırdak, tendon ve ligament başta olmak üzere birçok dokuda bulunan, bağ dokunun en önemli yapısal proteindir [101]. Kollajenin ana görevi, dokuları deformasyona karşı dirençli kılmak ve dokuların şekil almasını sağlamaktır [13]. Kollajen fibriller daha büyük fiberleri oluşturmak üzere birleşerek halat gibi bir yapı kazanırlar [102]. Kollajen fiberler mekanik basınç ve çekilmeler etkisiyle uzamazlar ve bu tür etkilere karşı büyük direnç gösterirler. Buna karşılık eğilip bükülebilme özellikleri vardır [100]. Kollajen molekülü (tropokollajen), α - zincir olarak isimlendirilen birbiri etrafına sarılı iplik yapısına benzer üç polipeptitten oluşmuş üçlü heliks yapısındadır [81, 103]. Kollajenin yapısında %35 oranında glisin ve %11 oranında ise alanin bulunmaktadır. Kollajen diğer proteinlerden farklı olarak ayrıca %12 oranında prolin ve %9 oranında ise hidroksiprolin ihtiva etmektedir. Bu aminoasitlere diğer proteinlerde nadir olarak rastlanmaktadır [3, 84, 100]. Özellikle hidroksiprolin, kollajenin üçlü heliks yapısının stabilizasyonunda önemlidir [103]. Kollajenin aminoasit dizilimi genellikle tekrarlayan bir tripeptit birimidir ve glisin-x-prolin veya glisin-x-hidroksiprolin şeklinde dizilim görülür ve arada bulunan x herhangi bir aminoasit olabilir. Kollajenin üçlü heliks yapısındaki α zincirlerinin sıkıca sarılması, kollajene eşit boyuttaki bir çelik telden daha fazla gerilme kuvveti sağlar [104]. Zincirlerin biyokimyasal yapılarına göre birçok kollajen tipi bulunmaktadır [4]. Bunlardan en çok bilinen beş tip kollajen vardır [4, 84]. Ancak yara onarımında tip I ve tip III kollajen rol oynar [7]. Organ ve dokuların bütünlüğü ile dayanıklılığını

sağlayan tip I kollajen, vücuttaki kollajenin %90'ını oluşturur ve başlıca deri, kemik ve tendonda bulunur [8, 84, 101]. Tip III kollajen ise deri, kan damarları ve iç organlarda bulunur ve dokulara esneklik sağlar [84, 105]. Yetişkin memelilerin derisinde %80 tip I ve %20 tip III kollajen bulunur [8, 81, 101]. Yara iyileşme evresinin başlangıç sürecinde tip III kollajen fazlaca bulunur. Kollajen, fibroblastların ribozomlarında üretildikten sonra endoplazmik retikuluma geçerek heliks yapısını alır. Heliks formasyonu hidroksiprolin ve hidroksilizinden arta kalan prolin ve lizinin hidroksilasyonu sonucu oluşur. Hidroksilasyon için oksijen ve askorbik asite ihtiyaç vardır. Heliks yapısını alan bu oluşuma prokollajen adı verilir. Fibroblastlardan hücre dışına verilen prokollajen, prokollajen peptidaz enzimi tarafından, tropokollajen adı verilen yapıya dönüştürülür [4, 7, 101, 103]. Bu tropokollajen molekülleri fibril yapısına polimerize olur [4]. Ardından kollajen fibrilleri birbirleriyle birleşerek kollajen fiberlerini oluştururlar [84, 101]. Yara iyileşmesinin ilk birkaç günlük sürecinde, geçici olarak tip III kollajen artışı vardır. Daha sonraki yara iyileşme sürecinde tip I kollajen baskındır [84, 86]. Normal bir deride tip I ve tip III kollajen oranı 4/1' dir [84]. Kollajen sentezi tam kalınlıktaki yaralarda 5–7. günlerde pik seviyeye ulaşır ve 3–4 hafta artış devam eder. Dört haftadan sonra yavaş yavaş azalır ve sonunda kollajenazın neden olduğu yıkımı dengeleyen bir düzeye iner [8].

Yara gerilim direncinin gelişimi: Cerrahi biyoloji açısından yara iyileşmesinde meydana gelen bütün morfolojik ve kimyasal olayların en önemli sonucu, yara gerilim kuvvetinin normal doku düzeyine gelmesidir. Yara gerilim kuvveti, yara kenarlarında santimetre kare alana kilogram olarak uygulanan kuvvetle (kg/cm^2) ölçülür. Gerilim kuvvetinin sabit olmasına karşın, yara kenarının ayrılmaya direnci aynı uzunlukta deri yaralarında ve vücudun muhtelif bölgelerinde farklıdır [3]. Yara direnci, iyileşme esnasında ekstraselüler ortamda salgılanan hücresel ürünler arasındaki biyokimyasal etkileşim ile kazanılmaktadır [93]. Yara direnci yavaş bir şekilde gelişir ve ilk 5 günde yara önemli bir direnç kazanmaz [8, 85, 93]. Yara iyileşmesinin erken döneminde, gerilim kuvvetine katkıda bulunan en önemli faktörler, fibrin-fibronektin kompleksinin arasındaki kohezyon kuvveti, hücresel migrasyon ve hücresel ürünlerdir. Fakat bu faktörler zayıf bir yara direnci sağlar. Bu

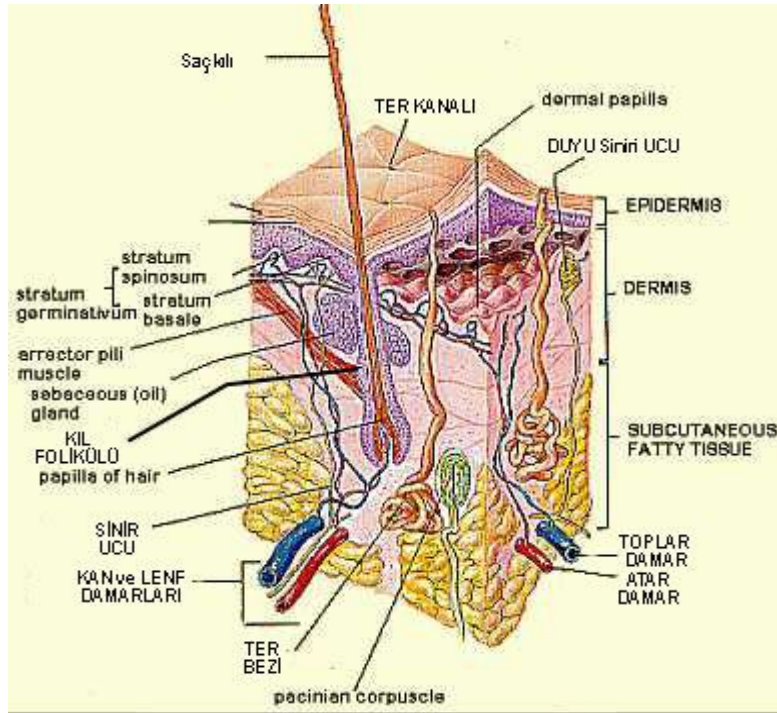
süreçte yara kolayca zarar görebilir ve yara açılması genellikle bu evrede gözlenir [3, 93]. Bunun yanı sıra primer olarak kapatılan yaralarda ilk 24 saat içinde fibrin pıhtısının yardımı ile yara kısmi bir direnç kazanabilir. İlk 5 gün içinde epitelizasyon meydana gelir ve bu epitelyum hücrelerinin yapıştırıcı gücü yara direncinin oluşmasına yardım eder [85]. Yara iyileşmesinin ilk evrelerinde hücrelerden salınan fibronektin ve hiyaluronik asit predominanttır. Bu iki matriks komponenti, hücrelerin migrasyonu için etkili bir ortam oluştururlar [4]. Yara iyileşme sürecinde hyaluronik asit konsantrasyonu azalırken, proteoglikan (kondroitin-4-sülfat, heparin sülfat, dermatan sülfat) konsantrasyonu artar [4, 11]. Ekstraselüler matriks komponentlerindeki bu değişiklik, hücrelerin bağlanmalarını ve sabitleşmelerini sağlar. Hücrelerin hareketsiz kalması, hücrelerin farklılaşarak daha olgun hale gelmelerine neden olur [4]. Fibroblastlar yaraya geldikten sonra, yaranın şekilsiz temel maddesini oluşturan protein, polisakkaritler ve çeşitli glikoproteinler salgılamaya başlarlar. Fibroblastların salgıları 3–5. günde maksimum seviyeye ulaşır ve kollajen birikmesi bu süreçte etkili olur [85]. İlk evrede tropokollajen molekülleri ekstraselüler bölge içine geçerler ve fibroblastların yakınındaki genç kollajen fibriller ile birleşirler [4, 85]. Helikal kollajen makromoleküllerinin fibriller demetleri oluşturmasıyla yaranın kıvamı ve gerilme direnci artar [8]. İlk şekillenen kollajen demetleri küçüktür, fakat daha sonra bu kollajen demetleri gelişerek yara dudaklarını birbirine bağlayan kollajenden zengin skar dokusunu oluşturur. Skar dokusunun yeniden yapılanma sürecinde kollajen üretimi, birikimi, yıkımlanması ve düzenlenmesi devam eder [4, 85]. Yarada ilk 3 hafta içinde hızlı bir şekilde kollajen birikerek stabilize olur. Bu noktada kollajen birikimi ve yıkımı arasında bir denge kurulur. Çeşitli doku kollajenazları fonksiyonel kollajen fiberlerini koruyarak fonksiyonel olmayan kollajen fiberlerini yıkımlar [85]. Kollajen yıkımlanması granülosit, makrofaj, fibroblast ve epitel hücreleri tarafından sentezlenen çeşitli kollajenaz tarafından kontrol edilir [4, 8, 11, 86]. Kollajenaz kollajenin şekil değişiminde kılavuzluk eder. Kollajenin yıkımlanmasında ve sindirilmesinde bakteriyel kollajenaz, lizozomal proteaz ve doku kollajenazı olmak üzere 3 çeşit enzim görev alır. İlk iki grup enzim, önceden sindirilen ve fagosit edilen kollajen fragmentlerine etki eder. Doku kollajenazları ise; 3 önemli metalloproteinaz enziminden oluşur. Metalloproteinaz I (interstitial kollajenaz) tip I, II, III, X ve XIII

kollajeni yıkımlar. Metalloproteinaz II (jelatinaz) doğal kollajen tip IV, V ve denatüre olan tüm kollajen tiplerini parçalar. Metalloproteinaz III (stromelizin) ise; tip III, IV, V, VII ve IX kollajeni yıkımlar [8]. Yara gerilim direnci, kollajenlerin olgunlaşmasına bağlıdır. Kollajenin olgunlaşması yaralanmadan sonraki 15. günde başlar ve 12 ay kadar sürer [93]. Yara direncinin artması, kollajen fiberlerin fiziksel dizilişlerinin değişmesi ve çapraz bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Kollajen yapısındaki her bir polipeptit zinciri intramoleküler çapraz bağlar ile bir arada tutulur. İntermoleküler çapraz bağlar değişik kollajen molekülleri arasında kurulur. Bu fiziksel değişim ve çapraz bağlanma sonucu kollajen fiberlerin yoğunluk ve kalınlıkları artarak kollajen demetleri şeklinde gruplanırlar [85]. Gerilim kuvveti ve ayrılma direncinin artmasında en önemli faktör, yaranın ihtiva ettiği kollajen miktarından ziyade mevcut kollajenin intra moleküler ve inter moleküler kovalent bağlarının artmasıdır [3, 4, 7, 11, 86]. Yaralanmadan sonraki 3. haftada yara %20–25 arasında, bir ay sonra ise %40 oranında bir direnç kazanır [8]. Kollajen olgunlaşma süreci aylarca sürebilir. Fakat skar dokusunun gerilim direnci sağlam derinin gerilim direncinin ancak %70–80'ine ulaşır [4, 8, 82, 85]. Yine de skar dokusunun mekanik ve kozmetik özellikleri asla sağlam derininkine ulaşamaz [8]. Sonuç olarak, yara iyileşmesi kan hücreleri, paraşimal hücreler, ekstraselüler matriks, medyatörler ve sitokinler arasında etkileşimleri kapsayan dinamik bir süreçtir. Yara iyileşmesi biyolojisinin bilinmesi, optimal yara iyileşmesinin sağlanması ve oluşabilecek komplikasyonların önlenmesi açısından önemlidir [106].

2.2. Deri

Vücudu dış ortamdan koruyan, vücudun en geniş, kompleks ve dinamik bir organ sistemi olan deri, organizmanın önemli immünolojik ve endokrinolojik aktivitelerini içine alan sistemik ve fizyolojik bir önem taşımaktadır [107- 109]. Geniş anlamdaki görevi vücudu örtmek olan deri, genellikle keratinleşmiş, geçirgen olmayan epidermis ve kıllarla kaplıdır. Derinin toksik, termik ve mekanik etkileri önleme, ayrıca gaz değişimine katılma, vücut ısı dengesini ayarlama gibi işlevleri de vardır. Ayrıca deri, dermiste bulunan immün sistem hücreleri ile primer savunma sistemine ait bir organdır [107]. Deri embriyolojik bakımdan birbirinden farklı iki orijinden

oluşturmuştur. Bunlardan birincisi, daha ince olup ektodermden köken alan epidermis tabakasıdır. Kalın olan ise mezodermden köken alan dermis (cutis) tabakasıdır ve bağ dokudan meydana gelmiştir (Şekil 2.3) [107- 109].



Şekil 2.3. Derinin yapısı [110].

2.2.1. Epidermis

Derinin dış tabakası olan epidermis çok katlı yassı, keratinize, esnek bir epitelyum örtüsüdür. Keratinosit ve keratinosit olmayan hücrelerden oluşmuştur. Epiderminin kalınlığı bulunduğu yere göre değişir. Kıl örtüsü sık olan deri bölgelerinde epidermis incedir ve düz bir yüzeyle bağdoku üzerine oturur. Buna karşılık kılsız bölgelerde, deri-mukoza geçiş bölgelerinde, fazla mekanik etkiye uğrayan bölgelerde çok kalındır ve buralarda bağdoku, mikroskopik papillalar halinde epidermise sokulur. Epidermis, derin ve yüzlek olmak üzere iki ana katmandan oluşur. Derin katman stratum bazale ve stratum spinozum, yüzlek katman stratum granulozum, stratum lusidum ve stratum korneum katmanlarını içerir [107-109, 111, 112]. Epidermisde keratinosit, melanosit, langerhans hücresi ve merkel hücresi olmak üzere dört farklı

hücre tipi bulunur. Keratin yapma yönünde farklılaşan keratinositler, epidermin temel hücreleridir. Epidermal alt katmanlar, bazal membrandan serbest yüze doğru sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- a) *Stratum bazale (Str. germinativum)*: En derindeki epitel katmandır. Tek sıralı silindirik hücrelerden oluşur. Bu hücre dizisi, bağ dokuya dönük olan sitoplazmik uzantılı yüzeyleriyle bazal membrana sıkıca tutunurlar. Bu hücreler mitoz ya da amitoz bölünmeyle devamlı çoğalırlar. Böylece üst yüzeyde oluşan kayıp bu katman tarafından karşılanır. Stratum bazale hücreleri üst tabakaya dezmazom, alt tabakaya ise hemidezmazom ile bağlanırlar. Bu katmandaki hücrelerin çekirdekleri büyük, oval ve genellikle hücreleri doldurur. Bazal hücreler arasında çok az sayıda melanosit denilen ve derinin renk maddesini (melanin) yapan hücreler bulunur. Bu katmanda bulunan merkel hücreleri, sensorik sinir sonlarıyla ilişki halindedirler [107, 109, 112].
- b) *Stratum spinosum (Str. malpighi)*: Poligonal ve mozaik görünüşlü hücrelerden oluşur. Bu katmandaki hücreler çoğalma yeteneğine sahiptirler. Bu yüzden str. bazale ile str. spinosumla birlikte doğurucu katman adı verilir. Str. Spinosum keratinizasyonun başlamasından sorumludur. Melanosit ve langerhans hücrelerinin uzantıları bu katman içinde bulunur [107, 108, 112].
- c) *Stratum granulosum*: Buradaki hücreler yassı olup üst üste bir kaç sıra oluştururlar. Adını granüllü yapısından alan bu katman hücrelerinde keratin ön maddesi olan keratohiyalin bulunmaktadır [107- 109, 111].
- d) *Stratum lusidum*: Asidofili gösteren, hücreleri öldüğü için homojen bir yapı kazanmış olan kattır. Kimyasal değişikliğe uğrayan keratohiyalin, bu katmanda eleidin olarak adlandırılır. Stratum granulosum ile stratum korneum arasında yarı saydam ve homojen bir hat halinde bulunur. Derinin kıllarla korunmuş ve ince olan bölgelerinde bu katman bulunmaz [107, 109].

e) *Stratum korneum*: İyice yassılaşıp ve birbiri ile hücreler arası mesafe bırakmaksızın bağlanmış hücrelerden oluşmuştur. Bu katmandaki hücrelerin çekirdek ve organelleri yoktur. Ölü hücrelerin tamamen keratine dönüşmesiyle şekillenen bu katmanda pul pul dökülmeler olur. Korneum katmanının kalınlığı, mekanik etkilerin derecesine bağlı olarak artar [107, 109]. Diğer taraftan epidermiste aşağıda sıralanan keratinosit olmayan hücrelerde yer almaktadır.

Melanositler: Embriyonun nöral kabartısından köken alır ve epidermin bazal membranına lokalize olurlar. Sitoplazmalarında melanozom olarak adlandırılan pigment içeren granüller bulunur. Bu pigmentler deri ve kıla renk verir. Derinin kendine özgü rengi karotene bağlı olarak sarıdır [109].

Merkel Hücreleri: Kılı ve kılsız deride epidermin bazal bölgesinde lokalize olmuşlardır. Sensorik sinir uçları ile ilişki halindedirler. Bu hücrelerin miyelinsiz aksonlarla birlikte yaptıkları oluşumların temas duyusu için mekanoreseptör olarak görev yaptığı sanılmaktadır [109].

Langerhans Hücreleri: Bu hücreler deride, dermal lenf damarlarında, lenf nodüllerinde bulunurlar. Lenfositlere antijen sunan bu hücreler derinin immun cevabından sorumludurlar [109].

2.2.2. Dermis

Koryum olarak da adlandırılan bu kat, çok miktarda kollajen ve elastik iplikler taşır. Bağ dokudan oluşan bu kat içerisinde damarlar, sinirler, yağ ve ter bezleri, kıl folikülleri ve kıllara eşlik eden düz kas telleri bulunur [107, 109]. Dermisin alt katmanları, yüzeyden derine doğru şunlardır:

a) *Stratum superfisiyale (Str. papillare)*: Kılıksız deri bölgelerinde epidermisle olan bağlantısında mikroskopik papillalar bulunmaktadır. Bu yüzden str. Papillare olarakta adlandırılır. Hemen epidermin altından başlayan bağ dokunun

oluşturduğu bölümdür. Mikroskopik papillaları oluşturan bağdokuda, ince kollajen iplik demetleri, retikulum iplikleri, elastik iplik ağları, serbest hücreler (histiyositler, mastositler, pigment hücreleri), kapillar yumaklar ve dokunun duyusuna ait sinir sonları bulunur [107-109, 111, 112].

b) Stratum profundum (Str. retikulare): Dermisin derin olan alt katmanıdır. Burada kollajen iplik demetleri daha kalın ve güçlüdür. Serbest hücrelerden ve kapillarlardan fakirdir. Kollajen iplik demetleri ve elastik iplikler mükemmel bir ağ yapısı oluştururlar [107, 109].

2.2.3. Hipodermis

Deriyi altındaki dokulara bağlayan derialtı bağ dokusudur. Bu bölgede bağdoku, daha gevşek bir yapıya sahiptir. Kollajen ve elastik iplikler lameller halindedir. Yağ hücreleri bu lameller arasında az ya da çok miktarda toplanma gösterirler. Yağ hücreli bölümüne stratum adipozum, bunun altında yer alan ve deriyi vücuda bağlayan bölümüne de stratum fibrozum denir [107, 109].

2.2.4. Epidermal oluşumlar

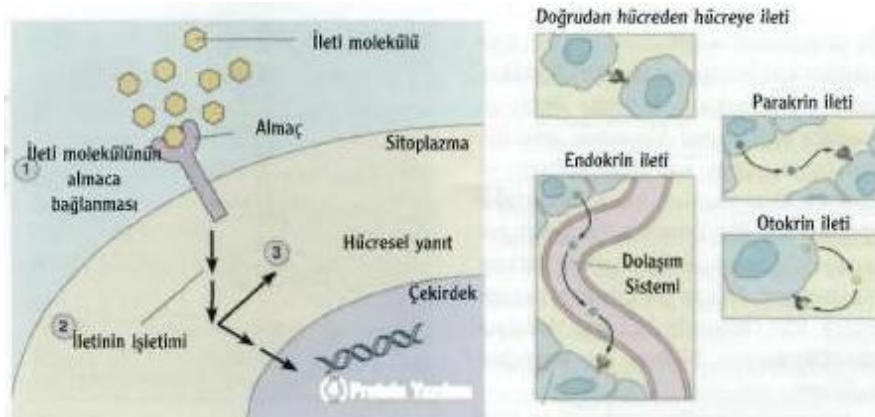
Bu morfolojik yapılar; deri bezleri (yağ, ter ve süt bezleri), kıllar ve boynuzsu oluşumlardır [107- 109, 111, 112].

2.3. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, ağırlıkları 4000-60 000 Da arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktiviteyi etkileyebilen proteinlerdir [112]. Stanley COHEN, 1974 yılında *büyüme faktörü* terimini, çözülebilir olan, T lenfositleri ve makrofajlar tarafından üretilen bir madde için kullanmıştır [114].

Büyüme faktörleri, hücrel fonksiyonları endokrin, parakrin veya otokrin mekanizmalarla sağlarlar. Endokrin yolla etkileyen faktörler hücreye kan yoluyla

giderler ve uzaktaki hücreleri de etkilerler. Parakrin yolla etki eden faktörler salgılandıkları bölgede etkilidirler. Otokrin faktörler; tarafından salgılandıkları hücrenin fonksiyonlarını etkilerler [113, 115].



Şekil 2.4. Büyüme faktörlerinin hücresel fonksiyon yolları [116].

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucunda hücre içinde özgün bir cevaba sebep olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki çoğunlukla, tirozin kinaz uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörleri bulunur [113, 117]. Büyüme faktörleri, kemotaktik ve hücresel proliferasyonu uyararak, aynı ve farklı tipteki hücreler arasındaki sinyalizasyonu sağlamasıyla, ekstraselüler matris oluşumu ve angiogenezi kontrol etmesiyle, konsantrasyon sürecini düzenlemesiyle ve doku bütünlüğünü yeniden kurmasıyla iyileşme sürecinde temel bir rol oynarlar. EGF gibi peptit büyüme faktörleri; fibroblast ve keratinositlerin mitogenezini, keratinositlerin göç etmesini, granülasyon ve doku gelişimini uyarırlar [118].

2.3.1. Büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi

Organizmada hücreler arası iletişimi sağlayan protein yapısındaki sitokinlerin bir alt grubu olan büyüme faktörleri temel olarak hücre proliferasyonunu stimüle ederler. Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini düzenleyici etkileri birkaç mekanizma üzerinden yürümektedir:

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Asidik ve bazik olmak üzere tanımlanan başlıca iki tip FGF'nin ikisi de endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ederek anjiogenezi hızlandırır. Ayrıca bazik FGF fibroblastlar üzerine mitojenik etki göstererek kollajen sentezini artırır [69].

Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (TGF- β)

Özellikle trombosit, lenfosit, nötrofil ve makrofajlardan salınır. Hemen tüm hücrelerin TGF- β 'ya ait reseptörleri vardır. TGF- β yara iyileşmesinin tüm basamaklarını etkileyen bir büyüme faktörüdür. Yara iyileşmesinin erken döneminde inflamatuvar fazın regülasyonunu sağlar. Aynı zamanda kollajen sentezini stimüle eden güçlü bir ajandır ve bu nedenle skar gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Hayvan çalışmalarında yara oluşumunun erken döneminde, yara bölgesine TGF- β 'yı nötralize edici antikorların uygulanmasıyla skar gelişiminin azaltılabileceği gösterilmiştir [69].

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Tüm epitelyal hücrelerin proliferasyon ve migrasyonunu sağlayan bir ajandır. Bu nedenle reepitelizasyon aşamasında oldukça önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda anjiogenezi ve kollajenaz aktivitesini uyarıcı özelliklere de sahiptir. Yapılan çalışmalarda EGF'nin yara bölgesine topikal uygulananının epitelizasyonu hızlandırdığı, ayrıca sistemik uygulanan metilprednizolonun yara iyileşmesini geciktirici etkisini azalttığı gösterilmiştir [69].

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF1-2 veya Somatomedinler)

Büyüme üzerine önemli etkileri olan somatomedinler esas olarak hepatosit ve fibroblastlardan sentezlenirler. Yara iyileşmesinde PDGF veya FGF ile birlikte çalışarak fibroblast proliferasyonunu hızlandırırlar [69].

Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GMCSF)

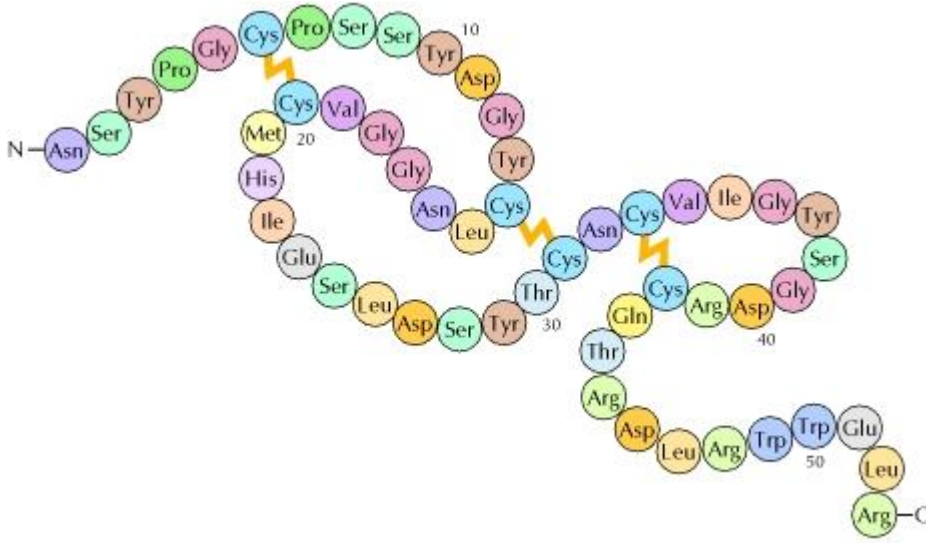
T lenfositler, endotelyal hücreler ve fibroblastlardan kaynaklanmakta olup yara bölgesine nötrofil ve makrofajların kemotaksisini, endotelial hücre proliferasyonunu ve granülasyon dokusu oluşumunu stimüle etmektedir [69].

2.4. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Epidermal büyüme faktörü (EGF), ilk kez 1962 yılında Dr. *Stanley Cohen* tarafından erkek fare çenealtı tükürük bezinden izole edilmiştir [59]. *Cohen*, erkek fare çenealtı tükürük bezinde, sinir büyüme faktörü (NGF) izole etmeye çalışırken, bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken göz kapağı açılışına ve erken diş çıkarmasına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve epidermis gelişimini hızlandırıcı etkisi nedeni ile bu maddeye epidermal büyüme faktörü (EGF) adını vermiştir [59].

2.4.1. EGF'nin biyokimyasal özellikleri

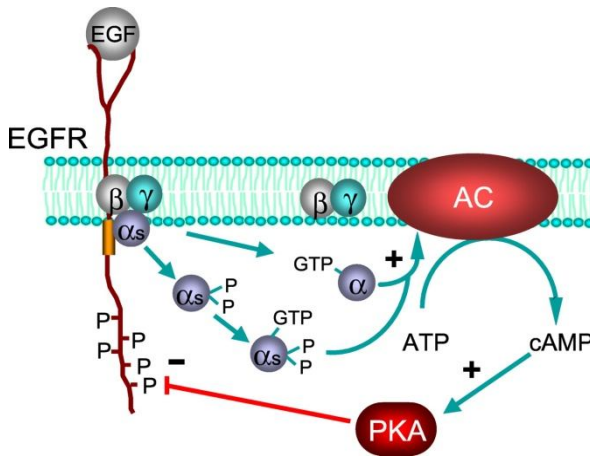
EGF amino asit dizisinde lizin, fenilalanin ve alanin bulundurmayan 53 amino asitten oluşmuş, 6,000 dalton moleküler ağırlığında, tek zincirli bir polipeptittir, izoelektrik noktası ise 4,5'tur. Su içinde çözünürlüğü çok yüksektir. Metanol ve etilen glikol içinde çözünür. Fare EGF'sinin molekül ağırlığı 6041 Da ve izoelektrik noktası ise 4,6'dır. Kaynar su içinde biyolojik aktivitesi stabildir, fakat dilüe asit veya alkali içinde ısıtılırsa biyolojik aktivitesi zarar görür. Kimyasal özellikleri benzer olan insan ve fare EGF'leri aynı biyolojik aktiviteleri gösterirler [18, 59, 120]. Molekülün bir ucu -NH₂ grubu, diğer ucu ise -COOH grubu ile sonlanmaktadır. Polipeptit, altı sistein köküne sahiptir ve üç tane disülfid bağı içerir. Bu disülfid bağları molekülün biyolojik aktivitesi için çok gereklidir. EGF'nin öncül molekülü ise 1217 amino asit içerir. Bu sayılar olgun EGF'den 24 kat daha büyüktür ve prepro EGF olarak adlandırılır [18, 59, 121].



Şekil 2.6. EGF'nin yapısı [122]

2.4.2. EGF reseptörleri

Hücrelerin çoğunda EGF'ye ait reseptörler bulunur. En çok sayıda reseptör epitelium hücrelerinde bulunur, ancak endotel hücreleri, fibroblast ve düz kas hücrelerinde de reseptörler vardır. Angiogenezi ve kollajenaz aktivitesini uyarıcı özelliğe sahiptir. Plazma, süt, idrar, tükürük gibi biyolojik sıvılarda bulunmaktadır. EGF, diğer tüm büyüme faktörleri gibi yüksek eğilimli ve düşük kapasiteli reseptörleri ilgili hücre yüzeyine bağlar. EGF reseptörünün içindeki aktivite, EGF bağlanmasına karşı gerçekleşen tirozin kinaz aktivitesidir. EGF reseptörünün kinaz etki alanı, EGF reseptörünün kendisini fosforile eder. Buna da otofosforilasyon denir. Bu işlem sinyal iletimi basamağındaki diğer proteinler için de geçerlidir. EGF reseptörü ile birleşip agregasyon ve fosforilasyon olayı meydana geldikten sonra EGF reseptörü ile birlikte sitoplazmaya geçerler. Orada lizozomlar ile birleşerek reseptozomları oluştururlar ve parçalanırlar [18, 59].



Şekil 2.7. EGF'nin sinyalizasyon yolu [123]

2.4.3. EGF'nin biyolojik özellikleri ve yara iyileşmesindeki rolleri

EGF, etkili olduğu hücrelerde iyon alınımını, glikolizi, DNA ve RNA ile protein yapımını artırıcı özellik gösterir [37, 38]. EGF'nin korneal endotelyal hücreler, fibroblastlar, sinir sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahip olması [29, 38, 39], gastrik asit sekresyonunu inhibe etmesi [29, 40], serum çinko düzeyini arttırması [41] yanında embriyonun gelişmesi ve yeni kan damarlarının oluşması üzerinde etkili bulunması sonucu yara iyileşmesi üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır ve yara iyileşmesini hızlandığı bildirilmiştir [42]. Sistemik ya da topikal olarak EGF uygulamasının yara iyileşmesine olumlu katkılarının bulunduğu bilinmektedir [43, 44]. EGF'nin sistemik yoldan uygulanması ile ilgili yapılan çalışmalarda EGF'nin mide asit sekresyonunu azalttığı [45, 46] ve stres ülseri oluşturulmuş ratlarda mide dokusunda lipid peroksidasyonunu yine azalttığı gözlenmiştir [47]. Ayrıca gastrointestinal sistemde oluşan iskemi reperfüzyon hasarında bakteriyel translokasyonu azaltarak etki gösterir [48]. Özofagus mukozasının da onarımı ve korunmasında rolü vardır [49-53]. Koltuksuz ve arkadaşları (2001) alkali yanık oluşturdukları sıçanlara EGF ve CAPE vermişler ve sonuçta EGF'nin özofagusta iyileştirici yönde etkisinin olduğunu görmüşlerdir [54]. Berthet ve arkadaşlarının (1994) sıçanlarda periton içerisine epidermal büyüme faktörü ve interferon γ vererek yaptıkları çalışmada özofagusta yanık oluşturulduktan sonra intraperitoneal epidermal büyüme faktörü ile interferon γ 'nın birlikte verildiği grupta özofagus kalınlıklarında anlamlı bir azalma izlenmiştir [55]. Çelebi ve

arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada EGF içeren poliakrilik asit jel formülasyonu hazırlanmış ve fare sırtında oluşturulan 1 cm uzunluğundaki cilt kesilerinde uygulanmıştır. Poliakrilik asit, mukoza ve dokulara yapışmaması, iritan olmaması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmiştir. 7. ve 15. günlerde yapılan incelemeler sonucunda EGF-poliakrilik asit jel formülasyonunun uygulandığı yaralardaki gerilme kuvvetinin, EGF içeren serum fizyolojik uygulanan yaralara göre daha fazla olduğu görülmüştür [43]. EGF'nin kronik yaralar üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi çeşitli rahatsızlıklara bağlı olarak ortaya çıkan ülser yaralarında topikal olarak EGF içeren Silvaden uygulanmış ve iyileşme üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir [56]. Farelerde korneal alkali yanıklarının iyileşmesinde EGF'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada EGF'nin çeşitli dozaj formları içinde yara bölgesine uygulanmasıyla kontrol grubuna göre yaralı bölgenin çapında anlamlı bir azalma meydana geldiği ifade edilmiştir [57]. Topikal olarak EGF uygulamasının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği araştırmalarda ise EGF'nin epitelizasyonu uyardığı, yara iyileşmesinin erken safhalarında dermis oluşumunun üzerine kesin etkisinin olduğu ve kronik yaraların iyileşmesini uyardığı bildirilmiştir [29, 58]. Proteinlerin üretimini ve epitel hücrelerin migrasyonunu uyarıcı etkiye sahip olan EGF yara iyileşmesini hızlandırır, fibroblastların büyümesini ve keratinositlerin göçünü arttırarak yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar [18]. EGF'nin yara iyileşmesindeki etkisi, inflamatuvar safha, fibroblastik safha ve remodelling safhası olmak üzere üç süreçten geçmektedir. Mitojenik bir polipeptit olan EGF, yara iyileşmesine inflamasyon fazının bitiminde etki etmeye başlamakta ve fibroblastik oluşumunu indüklediği ve bunun yanı sıra granülasyon dokusunun oluşumu ve epitelizasyonu uyardığı bilinmektedir [59].

EGF özellikle keratinosit ve fibroblast gibi hem mezodermal hem de ektodermal orijinli hücreler üzerinde proliferatif etkiye sahiptir. EGF granülasyon dokusu, kollajen ve glikozaminoglikan düzeyini arttırır, sonuçta epitelizasyon hızlanır ve yara gerilim kuvveti artar. EGF'nin içinde bol miktarda bulunduğu çene altı tükürük bezi ekstreleri yara iyileşmesini hızlandırıcı etki göstermektedir [18, 49]. Serum çinko düzeyini arttırmaktadır [124].

EGF, pek çok mezodermal ve ektodermal kökenli hücreler için mitojenik özelliktedir. Dolayısıyla, EGF'nin neoplastik büyüme üzerinde etkisi nedeniyle kanser ile ilişkili olduğu söylenmektedir [18, 49]

EGF, etkin olduğu hücrelerde de iyon alımını, glikolizi, DNA ve RNA sentezini arttırıcı özelliğe sahiptir. Çeşitli epitel hücre kültürlerinde EGF büyümeyi, çoğalmayı ve farklılaşmayı arttırmaktadır. EGF gibi peptit büyüme faktörleri keratinositlerin ve fibroblastların mitogenezini, keratinositlerin göçünü ve doku ve granülasyon gelişimini uyarırlar. Domuzlarda epitelyum rejenerasyonu, tavşanlarda da korneal epitelizasyonu hızlandırdığı anlaşılmıştır [18, 59]. EGF, doku diferansiyasyonu ile organogenezi uyarır. Neotanal kemiricilerde diş patlamasına ve göz kapaklarının erken açılmasına neden olur. Fetal sıçanlarda, koyunlarda ve tavşanlarda akciğerin olgunlaşmasını başlatır. Organ kültürlerinde damak gelişimine yardımcı olur, gastrointestinal, karaciğer ve pankreatik olgunlaşmayı stimüle eder. Tiroid ve adrenal bezin gelişimine yardımcı olur. Meme bezi gelişimi ve yara iyileşmesini stimüle eder, gastrik asit sekresyonunu inhibe eder, büyüme hormonu (GH), prolaktin (PRL) ve adrenokortikotropik hormon'u (ACTH) içeren hipofiz hormon sekresyonunu uyarır, plasenta dokusundan plasental laktojen ve koriyonik gonadotropin sekresyonunu stimüle eder. Embriyonik testis gelişiminde rol oynar. Spermatogenezin mayotik fazını uyararak erkekte reproduktif fonksiyonda rol oynarken, sertoli ve leyding hücrelerinin aktivasyonu yoluyla spermatogenez kontrol eder [18, 59]. İnsanda tükürük ve serum EGF konsantrasyonları tiroid hormonuna bağlı değildir. İnsan serum EGF'si hipertiroidizmde değişmezken, farede azalma göstermektedir. İnsanda idrar ile atılan EGF tiroid hormonuna bağlıdır. Hipertiroidide artar, hipotiroidide azalır [125]. Epidermisin proliferasyonunu ve keratinizasyonunu arttırıcı etkidedir. Bu etki tiroid hormonu etkisi ile artar. EGF'nin birden fazla sentez yeri vardır. Tiroid hormonunun EGF sentezini deride lokal olarak arttırdığı sanılmaktadır [126]. Prematüre doğumlarda anne sütündeki EGF miktarı normal doğumdakine oranla yüksek bulunmuştur. Yeni doğanlarda ağızdan alındığında değişikliğe uğramadan kana geçmektedir [127].

2.5. Serbest Radikaller

2.5.1. Serbest radikal tanımı

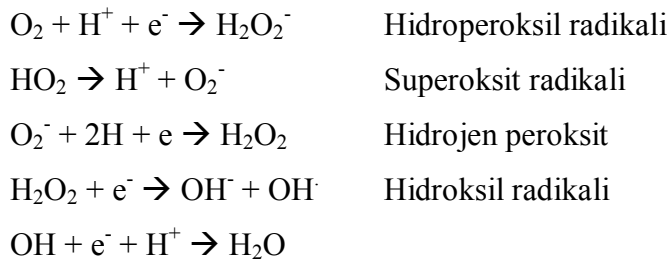
Biyolojik istemlerde serbest radikal reaksiyonları önemli yer tutar. Serbest radikal, bir orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan herhangi bir bileşiktir. Atomun yapısında bulunan elektronlar orbital adı verilen bölgelerde birbirlerine göre zıt yönde hareket ederler ve her orbitalde en fazla iki orbital bulunabilir. Elektronlar spin denilen hareketlerinden dolayı magnetik bir alana sahiptir. Aynı orbitalde birbirine zıt spine sahip bir çift elektronun ise magnetik alanı yoktur. Ancak paylaşılmamış elektrona sahip olan moleküller bir magnetik alan yaratabilirler. Böylece bu moleküller herhangi bir molekül ile etkileşime girerek, elektron alırlar veya verirler [128].

2.5.2. 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 [128].

Oksijen

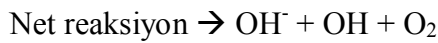
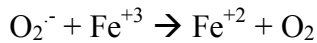
Oksijenin suya indirgenmesi sırasındaki tek elektron aktarmaları sonucunda oluşan reaktif moleküller radikallerin önemli bir grubunu oluşturur. Bu reaksiyonlar sırası ile;



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 [128].

Süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Özellikle hem grupları Fe-S grupları ile ve prostetik grup olarak geçiş metallerini (Fe, Cu gibi) içeren gruplarla etkileşim gösterir. Süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) ile mutasyona uğrayarak hidrojen peroksiti oluşturur[128].

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[128]. Bu reaksiyonlar;



H₂O₂, katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından parçalanır.

Hidroksil radikali bütün oksijen radikalleri içinde en reaktif olanıdır; proteinler, karbonhidrat, lipid ve nükleik asitleri okside etme yetenekleri fazladır [128].

Oksijen kaynaklı diğer radikaller alkoksi radikali ve peroksi radikali olup lipid peroksidasyon reaksiyonları sırasında üretilirler [128].

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, lipid hidroperoksitleri ve hipokloröz asit yer alır [128].

Aktive n6trofiller: Hipoklor6z asit (HOCl)

Aktive n6trofillerden 6retilen g66l6 bir oksidandır. Fagositler membran NADPH oksidan sistemi ile superoksit radikalini oluştururlar. Oluşan radikal hızla dismutasyona uğrar ve hidrojen peroksit meydana gelir. Hidrojen peroksidin ortamda bulunan serbest klor iyonları ile miyeloperoksidaz kataliz6rl6ę6nde etkileşimi sonucunda HOCl oluşur. HOCl, oksidan bir molek6l olup protein oksidasyonuna yol a6abilir veya superoksit radikali veya demir tuzları ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur [128].

Nitrik oksit (NO)

İki ucu keskin bı6ak olan nitrik oksit tek sayılı elektron taşır ancak bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen 6zerinde delokalize olması nedeniyle NO tam bir radikal 6zelliği taşımaz, aynı zamanda antioksidandır. Endojen serbest radikallerle birleşerek peroksit ve hidroksil radikalini oluşturabilir [128].

Mitokondrial elektron transport sistemi

Mitokondri de oksijenin suya indirgenmesi sırasında i6 membranda lokalize elektron transport zincirinde superoksit radikali oluşur [128].

Endoplazmik retikulum

Sitokrom P405 ve sitokrom b5 i6eren bu sistemler doymamış yağ asitlerinin ve ksenobiyotiklerin oksidasyonunda yer alır. Detoksifikasyon sırasında serbest radikaller meydana gelir [128].

Peroksizomlar

Peroksizomlar yüksek düzeyde oksidaz (örneğin, D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, açıl KoA oksidaz) içerdiklerinden dolayı güçlü bir hidrojen peroksit kaynağıdır [128].

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 [128].

2.5.3. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikaller oldukça reaktif moleküllerdir. Biyomoleküllerle reaksiyona girerek oluşturdukları bileşikler çoğu kez toksik özellik taşımaktadır [128].

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 onarılabiliirliğine bağlıdır[128].

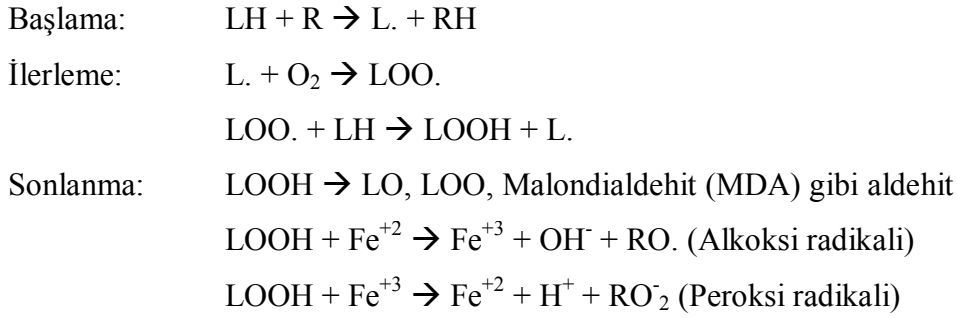
Serbest radikallerin nükleik asitler üzerine olan etkileri

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 [128].

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 [128].

Yağ asidinin (LH) oksidasyon metilen karbonundan hidrojen atomunun çıkarılmasıyla başlar ve yağ asidi radikali (L) oluşur. İlerleme aşamasında yağ asidi radikaline 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 yıkılmasını 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 hücre fonksiyonları için çok önemli sonuçlar doğurabilir. Radikaller, aldehitler ve diğer lipit peroksidasyon ürünleri membran proteinlerinde ciddi hasarlara yol açabilir [128].



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 [128].
- Enzimatik lipit peroksidasyonu; siklooksijenaz ve lipooksijenaz reaksiyonları sonucunda oluşan hidroperoksit ve endoperoksitler, enzimatik reaksiyon ürünleridir [128].

Membranda lipit peroksidasyon hasarını etkileyen faktörler:

- * membranın lipit/protein oranı
- * fosfolipit miktarı
- * yağ asitlerinin bileşimi
- * yağ asitlerinin doymamışlık derecesi
- * membranın akışkanlığıdır [128].

Membran lipit peroksidasyonu sonucunda:

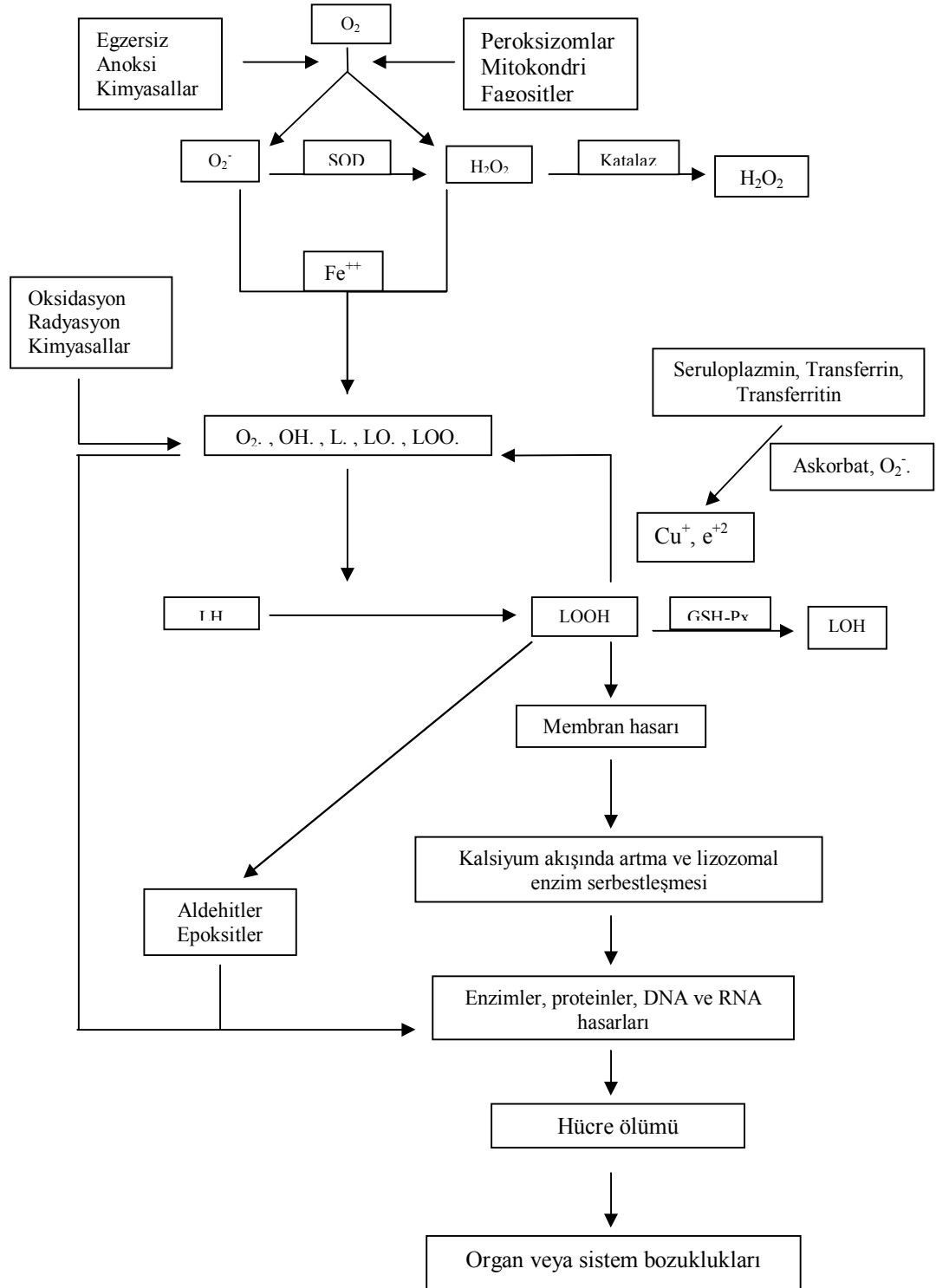
- * membran transport sistemleri bozulur
- * hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur
- * hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur
- * hücre içi organellerde oluşan lipit peroksidasyonu litik enzimlerin salgılanmasına bağlı hasarlar gelişir [128].

Lipit peroksidasyonu ve okside LDL

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 skavenger; çöpçü 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 [128].

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 [128].



(LO.; Alkoksiradikalı, L.; Alkilradikalı, LOOH; lipid hidroperoksit, O₂⁻; Superoksitradikalı, LH; Doymamış yağ asidi, LOO.; Peroksilradikalı)

Şekil 2.8. Lipit peroksidasyonu ve etkileri [128]

2.5.4. 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 [129]. İnflamatuvar 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 [130, 131]. Yara enfeksiyonunun önlenmesinde de oksijenin rolü olduğu bildirilmiştir [132, 133].

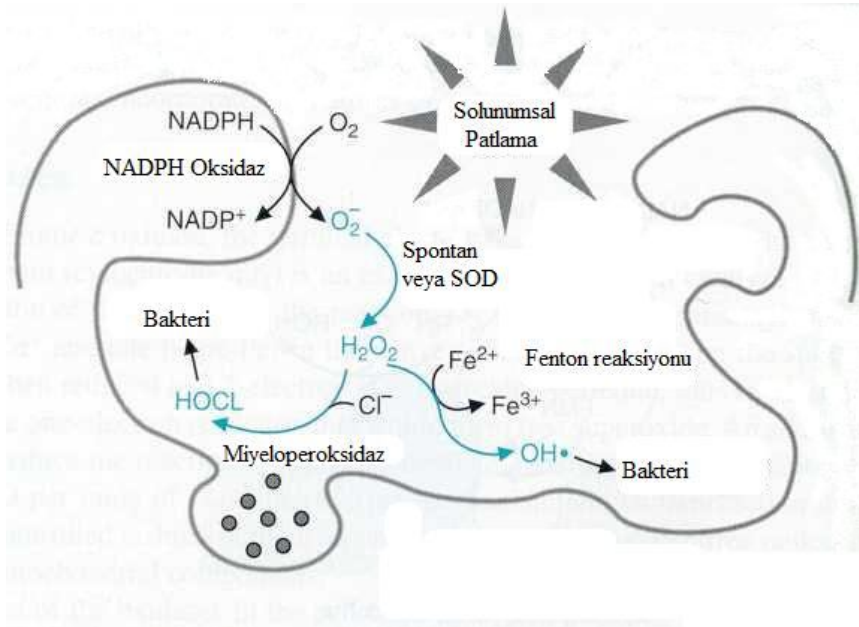
Yara iyileşmesinin geç yangısal fazında, monositler dokuda makrofajlara döndürülür. Bakteri ve endotoksinlerin dolaşıma translokasyonu ile makrofajlar stimüle olur. Bu durumda bakteri etkeniyle karşılaşan makrofajların büyüklük ve aktivasyonu ile birlikte makrofajlarda mitokondri, lizozom sayısı ve süperoksit üretimi artar. Bu artan reaktif oksijen türlerinin metabolikleri 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 endotelial hücreleri etkileyerek yaranın revaskülarizasyonunu geciktirirler [134].

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 [135].

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

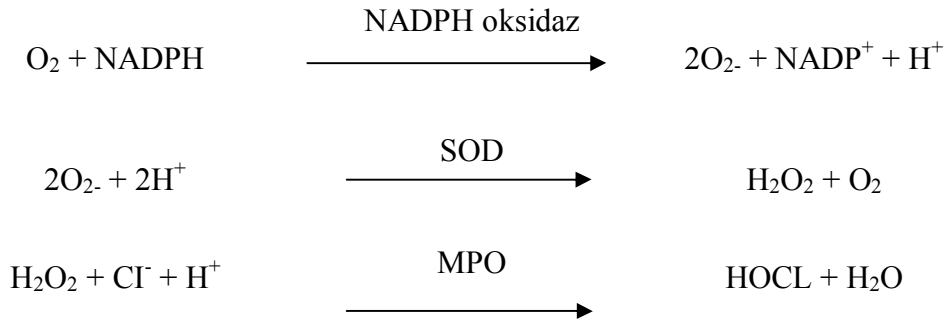
böyle özel antikorlarla kaplanmazlarsa fagosite edilemezler. Sonraki aşamada fagositik hücrelerde psödopodlar oluşur. Psödopodlar, sitoplazmanın, partiküllerin etrafına akışını ifade eder. Psödopodların, partikülün tamamını sarıp içlerine almaları sürecine de fagozom oluşumu adı verilir. Fagozom hücre 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 [136].

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 (Şekil 2.9) ve reaktif oksijen türlerinin üretim ve salınımıyla ilgilidir [137, 138].



Şekil 2.9. Solunumsal patlama [139]

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 miyeloperoksidaz (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 [129].



2.5.5. Antioksidan sistemler

Serbest radikallere karşı vücutta antioksidanlar olarak isimlendirilen savunma sistemleri bulunmaktadır. Antioksidanlar çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedir [128]. Bu mekanizmalar:

- *radikal oluşumunun sınırlandırılması
- *tetiklenen biyokimyasal reaksiyonlarının kırılması
- *radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi
- *oluşan radikallerin detoksifikasyonu
- *hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasıdır [128].

2.5.6. Antioksidanların yerleşim bölgelerine göre sınıflandırılması

Antioksidanlar yerleşim bölgelerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar

*hücre içi antioksidanlar

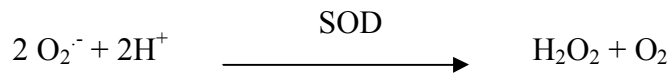
*membranda bulunan antioksidanlar

*hücre dışı antioksidanlar [128].

Hücre içi antioksidanlar:

Süperoksit dismutaz (SOD)

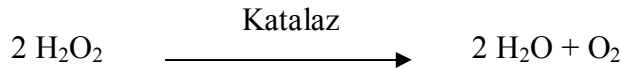
Süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak detoksifiye eder. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD'dur.



SOD'un Cu-Zn ve Mn kapsayan iki ayrı izoenzimi bulunmaktadır. Cu ve Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi ise mitokondride yerleşim gösterir [128].

Katalaz

Yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlar [128].



Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Düşük konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlar.



GSH-Px'in selenyum (Se) bağımlı ve Se-bağımsız iki farklı tipi vardır. Se-bağımlı formu hem H_2O_2 'in hem de lipid hidroperoksitlerinin metabolizmasında yer alırken, Se-bağımsız tipi sadece lipid hidroperoksitlerini metabolize etmektedir [128].

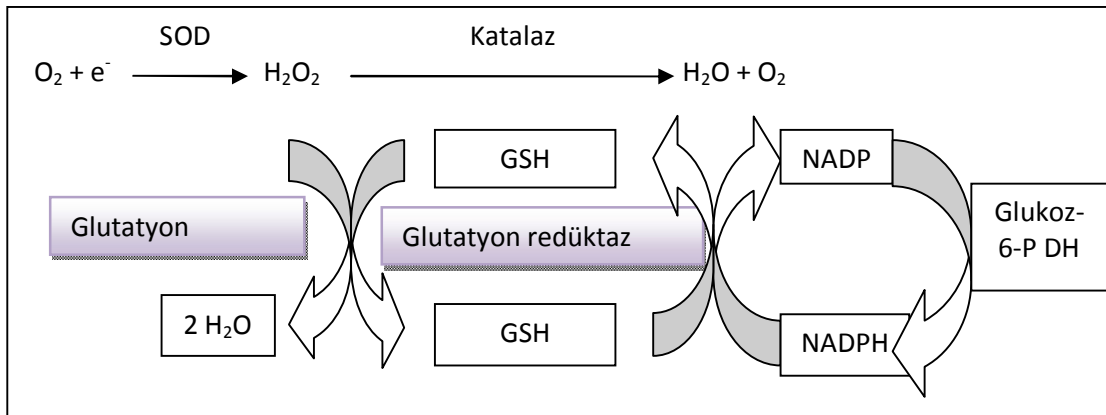
Sitokrom oksidaz

Oksijenin suya indirgenmesi sırasında radikal oluşumunu önler [128].

Glutasyon

Hücre için en önemli antioksidan moleküldür. Tripeptit yapılıdır. Proteinlerin aktif şekilde kalmasını sağlar. Sülfidril grupları açısından oldukça zengindir [128]. GSH-Px'in fonksiyonu için gereklidir. Hidrojen peroksitin detoksifikasyonu sırasında GSH-Px, redükte glutasyon (GSH)'ın tüketimine yol açar. Detoksifikasyonun devamı için meydana gelen okside glutasyonun (GSSG) redükte formuna döndürülmesi gerekir [128].

Glutasyon redüktaz, NADPH bağımlı bir enzim olup GSSG'ın redüksiyonunu sağlar. GSH ayrıca lipid peroksitlerinin ve disüflitlerin, indirgenme reaksiyon sırasında da okside olur [128].

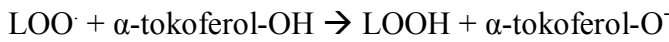


Şekil 2.10. Hücre içi antioksidanlar [128]

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 [128].



A vitamini (β -karoten)

Radikal toplayıcı etkisi bulunmaktadır [128].

Membranın yapısal organizasyonu

Fosfolipit/kolesterol oranı, radikal hasarı derecesi bakımından önemlidir. Doymamışlığın artışı radikal etkisini arttırırken, fosfolipit artışı savunmayı güçlendirir [128].

Hücre dışı antioksidanlar:

Transferrin: Metal katalizli lipit peroksidasyonuna yol açan demir iyonlarını bağlayarak serbest demir oluşumunu önler [128].

Laktoferrin: Demiri bağlamak sureti ile etkili olan bir süt proteinidir [128].

Haptoglobulin ve hemopeksin: Hemoglobulini bağlayarak serbest hemoglobin oluşumunu sınırlar [128].

Seruloplazmin: Bakır iyonlarını bağlamak sureti ile metal katalizli reaksiyonları sınırlar [128].

Ürik asit: Radikal tutucu özelliğinin yanı sıra demir ve bakırı bağlayarak serbest radikal reaksiyonlarını da önler [128].

Askorbik asit: Suda eriyen en güçlü antioksidan moleküldür. Biyolojik ortamlarda askorbat şeklinde bulunur. Radikal tutucu etkisi vardır. E vitamininin rejenerasyonunda rolü vardır [128].

SOD ve GSH-Px: Plazmadaki etkileri oldukça sınırlıdır [128].

Bilirubin

Mukus: İçerdikleri enzimler açısından antioksidan özellik taşımaktadır [128].

Glukoz: Fizyolojik konsantrasyonlarda antioksidan etkilidir. Yüksek konsantrasyonlarda radikal üretici olarak davranır, glukozun otooksidasyonu radikal oluşumuna yol açar [128].

2.5.7. Radikal hasarlarının klinik önemi

Patogenezinde lipit peroksidasyonunun sorumlu tutulduğu çok sayıda klinik tablo bulunmaktadır [128]. Bunlara örnekler;

- *yaşlanma
- *radyasyon
- *karsinojenik etkiler sonucunda oluşan tümör gelişimi
- *iskemi-reperfüzyon hasarı
- *travma
- *uzun süreli metabolik hastalıklar
- *diabetes mellitus

*bazı karaciğer hastalıkları

*yanık

*ateroskleroz [128].

Sonuç olarak; reaktif oksijen molekülleri ve türevleri önemli hücre hasarlarına neden olmaktadır. Bundan dolayı serbest radikal oluşumlarına ait mekanizmaların aydınlatılması doğal antioksidanların tedavi amaçlı kullanımına ve yeni antioksidan ilaçların geliştirilmesinin hedeflenmesine yol açmıştır [128].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Protokolü

Deneylerde 200–250 g ağırlıkta 54 adet Wistar-Albino tipi erkek rat kullanıldı. Ratlar G. Ü. Deney Hayvanları Merkezinde (GÜDAM) bakıldı. Deney öncesi ve deney süresince serbest yem ve su ile beslenen hayvanlar, deney süresince tek tek kafeslerde, gün ışığı döngüsü paralelinde aydınlanan ortamda bakıldılar. Deneylerde kullanılan jel ilaç formu G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizyoloji-Biyokimya araştırma laboratuvarında hazırlandı.

3.2. EGF Solüsyonunun Hazırlanması

Yaralanmayı takiben uygulanacak olan EGF (Sigma E-4127 0,1 mg) thilotears içerisinde 10 ng/ml dozda olacak şekilde hazırlandı.

3.3. Gruplar ve Yara Modelinin Oluşturulması

Sabah saat 10:00 da hayvanların önce standart terazide ağırlıkları saptandı. Daha sonra ketamin (Ketalar 60 mg/kg) ve ksilazin (Rhompun 5mg/kg) intraperitoneal (ip) olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlandı. Hayvanın dorsalinde, medulla spinalisin her iki yanında 5 cm uzunluğunda olacak şekilde, dorsolateral eksizyonel yaralar yapıldı. Eksizyonel yaradan sonra yara dudakları 4 süturla adapte edildi.

Deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi:

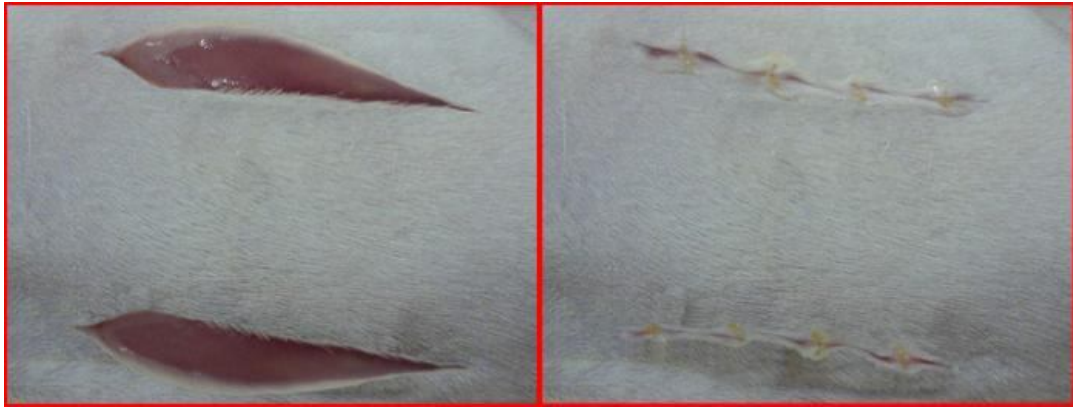
Kontrol: Yara modeli oluşturulmayan ve tedavi uygulanmayan grup (n=6)

Yara Oluşturulan Tedavisiz Gruplar: Bu gruptaki hayvanlara ip olarak enjekte edilen ketamin-ksilazin anestezisi altında, medulla spinalislerinin iki yanında, 5 cm uzunluğunda dorsolateral eksizyonel yaralar oluşturuldu ve herhangi bir tedavi uygulanmadı.

EGF Uygulanan Gruplar: Bu gruptaki hayvanlara 2. grup ile aynı şekilde yara modeli oluşturulduktan sonra, 10 ng/ml dozda hazırlanan EGF solüsyonu, her yara bölgesine 1 ml olacak şekilde ve günde 1 kez topikal olarak uygulandı.

Operasyon sonrası analjezinin sağlanması için farmakolojik ajan olan parasetamol içme suyuna 2 mg/ml olacak şekilde kullanıldı. Ratlar deney süresince serbest yem ve su ile beslendiler. Operasyonun 1, 5, 7 ve 14. gününde hayvanlar sabah saat 10.00 da ağırlıkları tartılarak kalplerinden kan çekilmek suretiyle feda edildiler. Derideki yara iyileşme sürecinde, önemli geçiş basamakları olarak kabul edilen 1, 5, 7 ve 14. günler çalışmamızda özellikle seçilmiştir.

Kontrol grubu hayvanların aynı bölgelerinden alınan dokuları ile diğer gruplardan alınan yara dokuları bulaşmayı önleyecek materyale sarıldıktan sonra sıvı azot içerisine konularak donduruldu ve analizlere kadar -30°C 'de muhafaza edildi.



(a)

(b)

Resim 3.1. (a) Medulla spinalisin her iki yanında yaklaşık 5 cm uzunluğunda yapılan kesi yarası (b) Yapılan kesi yarasının 4 süturla adapte edilmesi

3.4. Yöntemler

3.4.1. Dokuda TBARS tayin yöntemi

Dokudaki TBARS düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı [140]. Doku örnekleri tartıldı. Homojenizatör ile soğuk TCA içinde homojenize edildi. Daha sonra süpernatant alınarak üzerine TBA ve BHT eklendi. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm’de, köre karşı okundu. Dokulardaki TBARS konsantrasyonu nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.4.2. Dokuda GSH tayin yöntemi

Dokuda glutatyon tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı [141]. Doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj edildikten sonra süpernatant, NaH_2PO_4 ve 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 [142, 143]. 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 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 [144]. Doku PCA/EDTA karışımı içinde buz soğukluğunda homojenize edildi. Homojenat 15000g'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 ısı 0 °C'ye getirilip her bir tüpe H₂SO₄ eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Numuneler 515 dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu. Dokulardaki NO_x konsantrasyonu mg/g doku olarak hesaplandı.

3.4.5. Dokuda SOD tayin yöntemi

Dokulardaki SOD aktivitesi, Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre çalışıldı [145]. 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 µM NBT, 400 mM Na₂CO₃, 1g/L BSA) ve 50 µl ksantin oksidaz eklendi. 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra CuCl₂ 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. TBARS, GSH, NO_x ve AA değerleri Anova Varyans Analizi ile değerlendirildi. SOD aktivitesi ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. P < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Kontrol grubu deri dokularına ait TBARS düzeyi, 256,99 nmol/g doku; GSH düzeyi, 2,448 μ mol/g doku; NOx düzeyi, 435,957 μ mol/g doku; AA düzeyi, 0,167 mg/g doku; SOD düzeyi, 969,15 U/g doku olarak tespit edilmiştir. Tedavisiz ve EGF uygulanan yara dokusundaki TBARS, GSH, NOx, AA düzeyleri ve SOD aktivitesine ait sonuçlar ise Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yara dokusunda TBARS, GSH, NOx, AA düzeyleri ve SOD aktivitesi

	TBARS (nmol/g doku)	GSH (μ mol/g doku)	NOx (μ mol/g doku)	AA (mg/g doku)	SOD (U/g doku)
Tedavisiz Grup (n=24)					
1.gün	421.50 $\pm$ 85.84	2.16 $\pm$ 0.39	468.25 $\pm$ 58.80	0.07 $\pm$ 0.01	534.80 $\pm$ 14.37
5.gün	331.93 $\pm$ 59.40	2.22 $\pm$ 0.35	478.74 $\pm$ 41.12	0.12 $\pm$ 0.01 ^a	589.12 $\pm$ 11.83 ^a
7.gün	267.40 $\pm$ 32.85	2.01 $\pm$ 0.22	472.79 $\pm$ 43.02	0.09 $\pm$ 0.01	599.16 $\pm$ 18.18 ^a
14.gün	206.02 $\pm$ 20.79 ^a	2.11 $\pm$ 0.17	349.41 $\pm$ 12.94 ^{a,b,c}	0.12 $\pm$ 0.02 ^a	554.39 $\pm$ 27.07 ^c
EGF Uygulanan Grup (n=24)					
1.gün	421.13 $\pm$ 62.03	2.43 $\pm$ 0.10	470.34 $\pm$ 70.43	0.08 $\pm$ 0.01	525.94 $\pm$ 15.78
5.gün	191.60 $\pm$ 31.75 ^{*e}	2.33 $\pm$ 0.10	603.32 $\pm$ 92.97 ^{*e}	0.13 $\pm$ 0.02 ^e	630.54 $\pm$ 15.05 ^e
7.gün	462.23 $\pm$ 61.27 ^{*f}	2.14 $\pm$ 0.35	418.59 $\pm$ 44.87 ^f	0.08 $\pm$ 0.01 ^f	576.15 $\pm$ 23.60 ^{e,f}
14.gün	259.97 $\pm$ 42.94 ^{e,g}	3.49 $\pm$ 0.43 ^{*e,f,g}	411.68 $\pm$ 51.17 ^f	0.12 $\pm$ 0.02	528.87 $\pm$ 13.67 ^{f,g}

*p< 0,05 EGF uygulanan grubun tedavisiz gruptaki aynı değerleriyle karşılaştırıldığında

^ap< 0,05 1 günlük tedavisiz grubun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^bp< 0,05 5 günlük tedavisiz grubun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^cp< 0,05 7 günlük tedavisiz grubun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

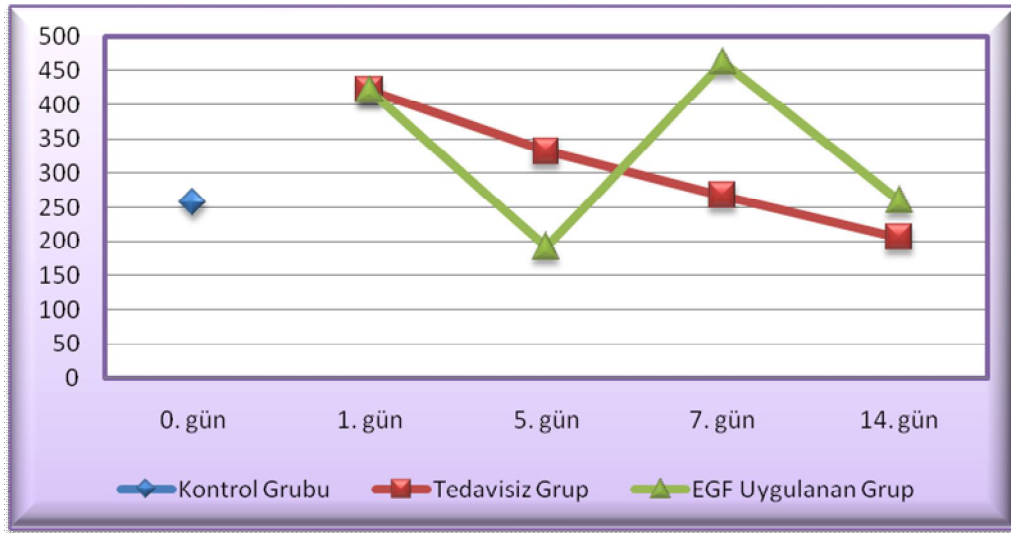
^ep< 0,05 1 günlük topikal EGF uygulanan grubun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^fp< 0,05 5 günlük topikal EGF uygulanan grubun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^gp< 0,05 7 günlük topikal EGF uygulanan grubun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

TBARS Düzeyleri

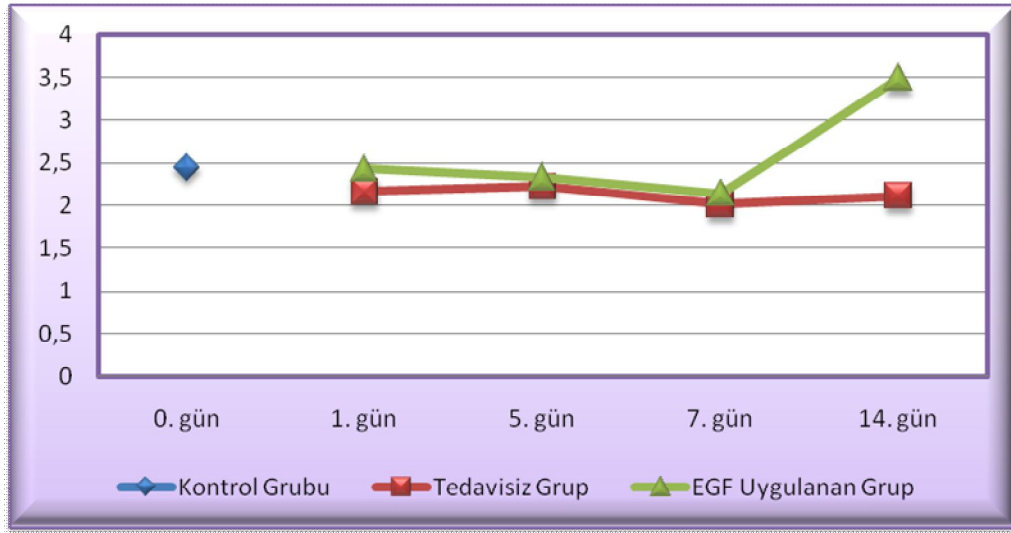
EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun TBARS düzeyleri karşılaştırıldığında, EGF uygulanan grubun 5. gününde anlamlı bir azalma ($P<0.05$), 7. gününde ise anlamlı bir artış görülmüştür. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, TBARS düzeyinin 14. gününde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, TBARS düzeyleri 5. günde 1. güne göre anlamlı bir azalma, 7. günde 5. güne göre anlamlı bir artış ve 14. günde 1. ve 7. güne göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait TBARS düzeylerinin günlere göre değişimi (TBARS düzeyleri nmol/g doku şeklinde verilmiştir.)

GSH Düzeyleri

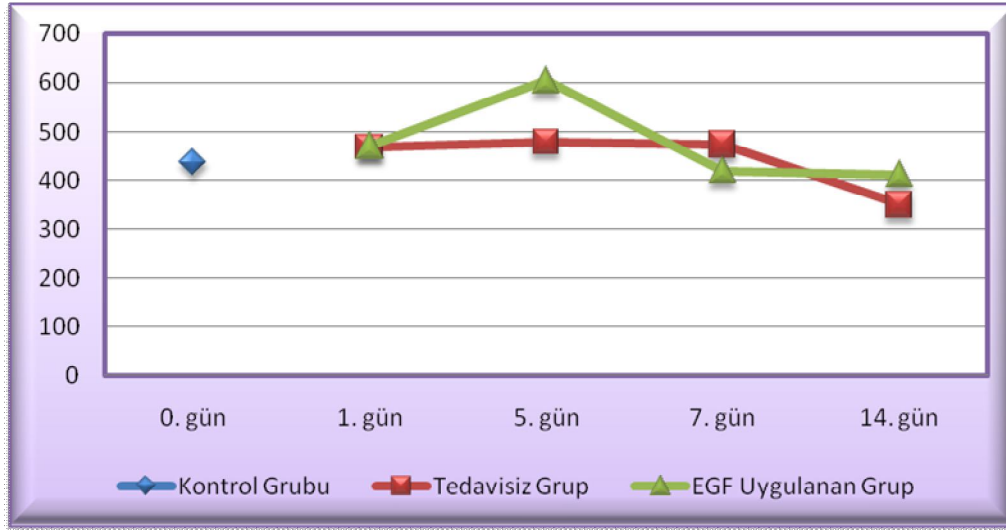
EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, EGF uygulanan grubun 14. gününde önemli bir artış bulunmuştur. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, GSH düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, GSH düzeyinin 14. günde 1., 5. ve 7. güne göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait GSH düzeylerinin günlere göre değişimi (GSH düzeyleri µmol/g doku şeklinde verilmiştir.)

NOx Düzeyleri

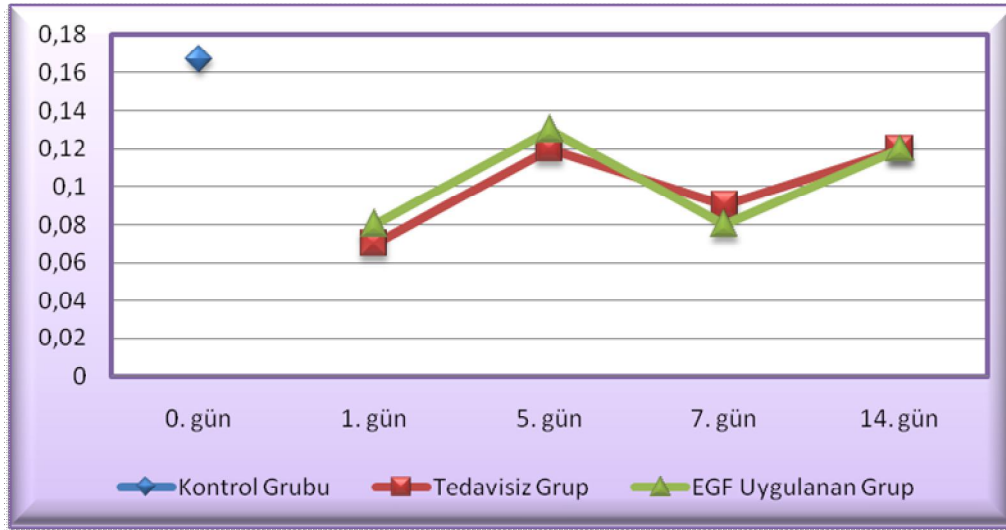
EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun NOx düzeyleri karşılaştırıldığında, EGF uygulanan grubun 5. gününde belirgin bir artış bulunmuştur. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 14. gündeki GSH düzeyinde 1., 5. ve 7. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, NOx düzeylerinin 5. günde 1. güne göre anlamlı bir şekilde artarken 7. ve 14. gündeki NOx düzeyleri 5. güne göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait NOx düzeylerinin günlere göre değişimi (NOx düzeyleri $\mu\text{mol/g}$ doku şeklinde verilmiştir.)

AA Düzeyleri

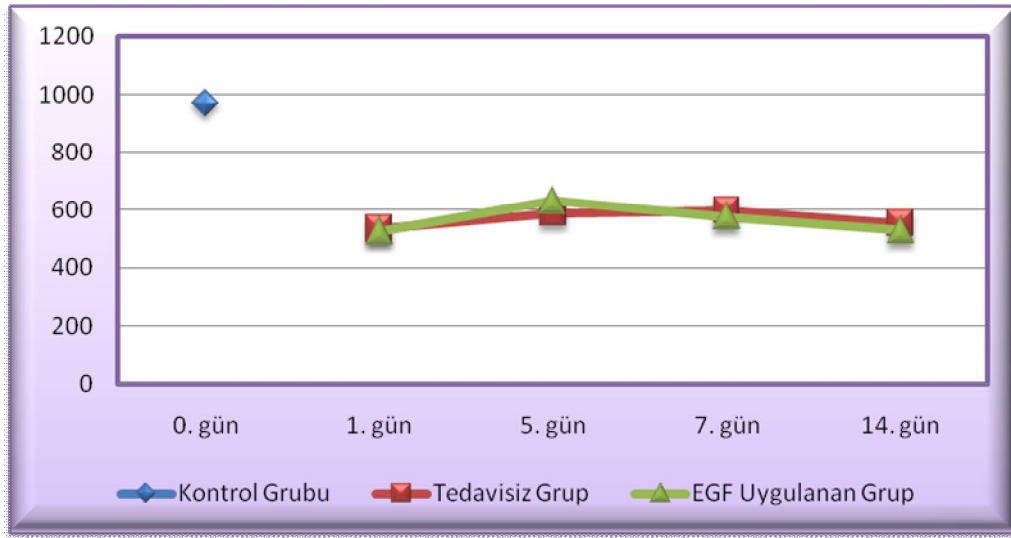
EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun AA düzeyleri kıyaslandığında önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 5. ve 14. gündeki AA düzeyleri 1. güne göre önemli bir şekilde artış göstermiştir. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, AA düzeyleri 5. günde 1. güne göre anlamlı bir artış göstermekte iken 7. gündeki 5. güne göre anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait AA düzeylerinin günlere göre değişimi (AA düzeyleri mg/g doku şeklinde verilmiştir.)

SOD Aktivitesi

EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun SOD aktivitesi kıyaslandığında belirgin bir değişiklik bulunmamıştır. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 5. ve 7. gündeki SOD düzeyleri 1. güne göre önemli olarak artmıştır, 14. gündeki SOD düzeyi ise 7. güne göre anlamlı olarak azalmıştır. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 5. gündeki SOD düzeyi 1. güne göre anlamlı bir şekilde artmış, 7. gündeki SOD düzeyi 5. güne göre anlamlı bir şekilde azalmış, 14. gündeki SOD düzeyi ise 5. ve 7. güne göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Tedavisiz ve EGF uygulanan gruplara ait SOD düzeylerinin günlere göre değişimi (SOD düzeyleri U/g doku şeklinde verilmiştir.)

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

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]. Operatif veya travmatik olarak dokunun hasar görmesini takiben, her organizmanın öncelikli görevi; kanamayı durdurma, enfeksiyonu önleme, bozulan anatomik bütünlük ile fonksiyonel yapıyı onarmaktır [3 – 5]. Dermal doku iyileşmesi, hücre çoğalması, hücre göçü ve kollajen sentezi gibi komponentlerden oluşan dinamik bir olaydır. Tam kalınlıktaki dermal yaralar dermis ve epidermisi kapsar. Epidermis damarsız bir yapıya sahiptir ve epitelizasyon ile iyileşir, dermis ise granülasyon dokusu oluşumu ve kollajen sentezi ile iyileşir [8].

Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki rolü, deri yaralarında ve gerçek granülasyon dokusunda detaylı biçimde incelenmiştir. EGF gibi pekçok sayıdaki büyüme faktörünün bu işlemde yer aldığı gösterilmiştir [23-28]. Yapılan çalışmaların çoğu EGF'nin yara iyileşmesi üzerindeki hızlandırıcı veya onarıcı etkisini göstermektedir ancak EGF'nin yara iyileşme sürecinde organizmada meydana gelen oksidan olaylar üzerine etkisini gösteren çalışmaların sayısı çok azdır [18, 43, 146-148].

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada, fizyolojik yara iyileşme sürecinde ve topikal uygulanan EGF'ye bağlı olarak rat deri dokusunda oluşturulan yarada meydana gelen oksidatif değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla dorsolateral eksizyonel yara yapılan ratlar iki gruba ayrıldı: 1- Tedavi edilmeyen kontrol grubu 2- Topikal EGF uygulanan grup. Uygulama grubundaki hayvanlara her gün birer kez olmak koşuluyla topikal olarak tek doz EGF (10ng/ml) uygulaması yapılmıştır. Operasyonun 1., 5., 7. ve 14. günlerinde ratların deri dokularında TBARS, GSH, NOx, AA düzeyleri ve SOD aktivitesi araştırılmıştır.

Bulgularımızda, EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun TBARS düzeyleri karşılaştırıldığında, EGF uygulanan grubun 5. gününde anlamlı bir azalma ($P<0.05$), 7. gününde ise anlamlı bir artış görülmüştür. Tedavisiz grup kendi içinde

değerlendirildiğinde, TBARS düzeyinin 14. gününde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, TBARS düzeyleri 5. günde 1. güne göre anlamlı bir azalma, 7. günde 5. güne göre anlamlı bir artış ve 14. günde 1. ve 7. güne göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Topikal olarak EGF uygulanan grupta özellikle 5. gündeki TBARS düzeylerinde tedavisiz gruba oranla azalma göstermesi, lipid peroksidasyonundaki azalmaya işaret ettiği için EGF'nin antioksidan etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir.

Literatürde deri dokusundaki yaraya EGF uygulayarak derideki TBARS düzeylerini gösteren bir çalışma mevcut değildir. Ancak, Akbulut ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada EGF'nin stres ülseri oluşturulmuş ratlarda mide dokusunda lipid peroksidasyonunu azalttığı [47], Erkasap ve arkadaşlarının (2005) çalışmasında etanolla mide ülseri oluşturulmuş ratlarda EGF uygulamasının mide dokusu TBARS düzeylerini azalttığı gösterilmiştir [149]. Bu bulgular bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca, yarada EGF'nin kombine antioksidan etkisini araştıran Hussein ve arkadaşlarının (2010) renal iskemi/reperfüzyon yarasına EGF ve eritropoietinin (EPO), yarayı koruyucu etkilerinin kontrollerine kıyasla fazla olduğu bulunmuş ve böylece antioksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir [150]. Bu bilgi doğrultusunda, gelecek çalışmalarda EGF'nin EPO ile kombine etkisi araştırılabilir.

TBARS değerlerimizde görülen 7. gündeki artış beklemediğimiz bir durumdur. Ek olarak çalışmamıza benzer şekilde, EGF'yi oral submukozal implantla uygulanmasının oksidan olaylara etkisinin bakıldığı çalışmada, TBARS düzeyinin EGF uygulanan grubun ilk gününde arttığı tespit edilmiştir [151]. Ancak bu bulgu çalışmamız için yeterli bir açıklama getiremediğinden yara dokusuna EGF uygulamasının inflamasyonun sonuna yakın bir evrede TBARS düzeylerini neden arttırdığını araştıran yeni çalışmalara vesile olabilir.

Bulgularımızda, EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, EGF uygulanan grubun 14. gününde anlamlı bir artış bulunmuştur. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, GSH düzeylerinde

anlamli bir değişiklik bulunmamıştır. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, GSH düzeyinin 14. günde 1., 5. ve 7. güne göre anlamli bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

Literatürde deri dokusundaki yara EGF uygulayarak derideki GSH düzeyini gösteren bir çalışma mevcut değildir. Ancak stres ülseri oluşturulan ratlarda EGF uygulamasının mide dokusu GSH değerlerini değiştirmedini [47], EGF'nin oral submukozal implantla uygulanmasının yara dokusundaki GSH değerlerini 5 gün içinde değiştirmedini [151] gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca bağışıklığı baskılanmış ratlarda deri yara iyileşmesi sürecinde meydana gelen antioksidan olayların 14 gün boyunca incelenmesinde GSH değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir [152]. Çalışmamızdaki GSH değerinin sadece 14. gündeki artışına göre, EGF'nin özellikle yara iyileşme sürecinin geç fazında, bir antioksidan olan GSH üzerine etki ettiği düşünülebilir.

Bulgularımızda, EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun NOx düzeyleri karşılaştırıldığında, EGF uygulanan grubun 5. gününde anlamli bir artış bulunmuştur. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 14. gündeki NOx düzeyinde 1., 5. ve 7. güne göre istatistiksel olarak anlamli bir azalma tespit edilmiştir. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, NOx düzeylerinin 5. günde 1. güne göre anlamli bir şekilde artarken; 7. ve 14. gündeki NOx düzeyleri 5. güne göre anlamli bir şekilde azalmıştır.

NOx düzeyinin 5. günde anlamli bir şekilde artması, EGF'nin tetiklediği makrofaj ve keratinositlerin hasarlı bölgedeki faaliyetleri sonucu meydana gelmiş olabilir. Bu etki yara iyileşme süresine ve toksik oksidan etkinin daha kısa zamanda giderilmesine yardımcı olabilir. Yara iyileşmesi için gerekli olan keratinosit ve makrofajların proliferasyonu sonucu oluşan NOx düzeyinin EGF uygulaması ile artışı, EGF'nin yara iyileşmesi sürecinde oksidan ajanlara karşı savaş verdiğinin göstergesi olabilir. EGF uygulanan grupların 7. ve 14. günündeki NOx düzeylerinin azalışı ise yara iyileşme sürecinde olumlu bir etken olarak düşünülebilir çünkü aşırı dozdaki NO hücre farklılaşmasına neden olmaktadır.

Bulgularımızla uyumlu olarak Heck ve arkadaşları (1992), insan ve fare keratinosit kültüründe EGF uygulamasının yara iyileşmesinin erken evreleri için keratinosit proliferasyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir. Buna karşın yara iyileşmesinin ilerleyen fazlarında ise EGF'nin keratinositlerce üretilen NO ve hidrojen peroksidi baskıladığı belirtilmektedirler [153].

Bulgularımızda, EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun AA düzeyleri kıyaslandığında önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 5. ve 14. gündeki AA düzeyleri 1. güne göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise, AA düzeyleri 5. günde 1. güne göre anlamlı bir artış göstermekte iken 7. gündeki 5. güne göre anlamlı bir azalma görülmektedir.

Yara iyileşmesi süresince kollajen üretimi ve nötrofillerin fagositik etkileri için AA gerekli bir maddedir. Bulgularımızdaki AA düzeylerinde meydana gelen dalgalanma kollajenlerin ve nötrofillerin AA'nın oksidasyonunu tetikleyen reaksiyonlar sonucu olduğu akla gelmektedir. Askorbik asidin oksidasyonu sonucu L-dehidroaskorbik asit ve hidrojen peroksit oluşur. Bunlar ikinci bir askorbik asiti ya da oksidasyona duyarlı başka bileşikler okside edebilir. Askorbik asit enzimatik esmerleşme reaksiyonları sonucu kinonlar ve başka oksidatif ajanlar tarafından da okside edilir. Oksidasyon iki aşamalı bir elektron transferinden meydana gelir. İlk ürün anstabil bir serbest radikal olan semikinona ve daha sonra dehidroaskorbik asite dönüşen monodehidroaskorbik asittir. Anaerobik koşullarda oksidasyon pH 4'te maksimuma ulaşır [154]. EGF uygulanan grup ile kontrol grubundaki değerlerin azalma ve artma miktarları benzerlik göstermektedir, ancak EGF uygulanan grubun 5. günündeki AA düzeyinin artışı 1. güne kıyasla anlamlı artış göstermesi EGF uygulamasının yara iyileşme sürecine erken safhada antioksidan etki gösterebildiğini kanıtlar niteliktedir. Ancak çalışmamızda AA ve SOD aktiviteleri sonucunda oluşan hidrojen peroksidin ortamdan giderilmesini sağlayan Katalaz (CAT) düzeyini incelemek de yararlı olabilirdi.

Literatürde deri dokusundaki yaraya EGF uygulayarak derideki AA düzeyini gösteren bir çalışma mevcut değildir. Ancak, Güleç ve arkadaşlarının (2006) ağız mukozasında oluşturulan yara üzerine ekzojen EGF uygulanması sonucunda, EGF uygulanan grup kontrolleriyle kıyas edildiğinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır [151]. Bu bilgiler sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Bulgularımızda, EGF uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grubun SOD aktiviteleri kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Tedavisiz grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 5. ve 7. gündeki SOD aktiviteleri 1. güne göre anlamlı olarak artmıştır, 14. gündeki SOD aktivitesi ise 7. güne göre anlamlı olarak azalmıştır. EGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde, 5. gündeki SOD aktivitesi 1. güne göre anlamlı bir şekilde artmış, 7. gündeki SOD aktivite 5. güne göre önemli bir şekilde azalmış, 14. gündeki SOD aktivite ise 5. ve 7. güne göre anlamlı bir şekilde azalmıştır.

Bu çalışmada, enzimatik bir antioksidan olan SOD aktivitesinin uygulama grubundaki 5. günde meydana gelen artış, EGF'nin özellikle yara iyileşme sürecinin erken safhalarında SOD aktivitesinin artışı üzerine etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle gelecekteki çalışmalarda EGF dozu arttırılarak tedavi tekrarlanabilir.

Literatürde deri dokusundaki yaraya EGF uygulayarak derideki SOD düzeyini gösteren bir çalışma mevcut değildir. Nishiguchi ve arkadaşlarının (1994), rat derisinden elde ettikleri fibroblast kültürlerinde EGF'nin Cu ve Zn-SOD aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada, EGF'nin SOD aktivitesini yükselttiği gösterilmiştir [155]. Bu bilgi bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca, Gupta ve arkadaşlarının (2002) bağışıklık sistemi baskılanmış ratların deri dokusu üzerindeki çalışmasında, SOD aktivitesinin O₂ konsantrasyonuna bağlı olduğu ve bu şekilde reaktif oksijen türleri ile oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir [152]. Gelecek çalışmalarda EGF'nin SOD aktivitesi üzerine daha verimli olabilmesi için EGF ve oksijen tedavisi birlikte kullanılabilir.

Sonuç olarak, yara oluşturulan rat deri dokusunda meydana gelen oksidatif stresin giderilmesi için topikal olarak uygulanan EGF, yara bölgesinde oluşan toksik oksidan ajanları günlere bağımlı olarak temizleyici nitelik taşımaktadır ve bunu EGF'nin özellikle antioksidan miktarlarını arttırarak ve bir antioksidan gibi davranarak gerçekleştirdiği düşünülebilir. Dolayısıyla derideki oksidan miktarın azalmasına dolaylı ve/veya direkt etki gösteren EGF'nin yara tedavisi için faydalı olduğu söylenebilir ancak daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerekir. Bu sonuçlara göre EGF, yaralanmalarda veya post-operatif durumlarda olumlu etki gösterebilir, antioksidan etkisini daha iyi gösterebilmesi için deriye nüfuz edebilecek materyaller ile desteklendiğinde cilt yaşlanmasına karşı koruyucu etki gösterebilir. Ancak gelecek çalışmalar için EGF'nin farklı dozları denenebilir veya tedavi farklı günlerde bitirilebilir, özellikle 5. günde. Ayrıca EGF ve diğer antioksidan etkisi olduğu düşünülen maddeler ile birlikte tedavi tekrarlanabilir. Böylece, deride meydana gelen yara sonrasında oluşan oksidatif hasarın giderilmesi için EGF'nin etkisi arttırılabilir.

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 In: Temel Cerrahi", Sayek, İ. (ed), *Güneş Kitabevi*, Ankara, 266-277 (2004).
3. Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Rao, C.V., Shirwaikar, A., Mehrotra, S., Pushpangadan, P., "Healing potential of anogeissus latifolia for dermal wounds in rats", *Acta Pharm.*, 54: 331-338 (2004).
4. Rigler D.J., "Inflammation and repair. In Veterinary Pathology", ed. Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W., *Williams & Wilkins*, Pennsylvania, 150-157 (1997).
5. Regan, M.C., Barbul, A. "The cellular biology of wound healing. In: Wound Healing", ed. Schlag, G., Redl, H., *Springer-Verlag*, Germany, 3-17 (1994).
6. Broughton II, G., Janis, J.E., Attinger, C.E. "The basic science of wound healing", *Plast. Reconstr. Surg.*, 117: 12-34 (2006).
7. Brunickardi, F.C, Andersen, D.A., Billiar, T.R., Dunn, D.L., Hunter, J.G., Matthews, J.B., Pollock, R.E., Schwartz, I.S., "Wound healing. In: Schwartz's Principles of Surgery", *The McGraw-Hill Companies*, 310-325 (2005).
8. Calvin, M. "Cutaneous wound healing", *Wounds*, 10(1): 12-32, (1998).
9. Bohling, M.W., Henderson, R.A., Swaim, S.F., Kincaid, S.A., Wright, J.C., "Cutaneous wound healing in the cat: A macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog", *Vet. Surg.*, 33: 579-587 (2004).
10. Broughton II, G., Janis, J.E., Attinger, C.E. "Wound healing: An overview", *Plast. Reconstr. Surg.*, 117: 1-32 (2006).
11. Theoret, C.L., "Update on wound repair", *Clin. Tech. Equine Pract.*, 3: 110-122 (2004).
12. Vindinky, B., Gal, P., Toporcer, T., Langauer, F., Lenhardt, L., Borbov, N., Sabo, J. "Histological study of the first seven day of skin wound healing in rats", *Acta Vet. Brno.*, 75: 197-202 (2006).
13. Beanes, S.R., Dang. C., Soo, C., Ting, K., "Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β ", *Expert Rev. Mol. Med.*, 5(21): 1-11 (2003).

14. Pilny, A.A., Hess, L., "Ferrets; wound healing and therapy", *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.*, 7(1): 105-21 (2004).
15. Erdem, C., "Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi", Çelebi C., R. (ed.) *TDD Yayınları*, Ankara, 1-44 (1996).
16. Engin, A., "Genel cerrahi; tanı ve tedavi ilkeleri", *Atlas Kitapçılık*, Ankara, 131- 144 (2000).
17. Bernstein, E. F., Sullivan, F. J., Mitchel, J.B., "Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing", *Clin. Plast. Surg.*, 20(3): 435-453 (1993).
18. Steed, D.L., "Modifying the wound healing response with exogenous growth factors", *Clin. Plast. Surg.*, 25: 397-405 (1998).
19. Reiser, K. M., "Nonenzymatic glycation and enzymatic crosslinking in a model of wound healing; The effects of aging, diet end modulating agents", *J. Ger. Dermatol.*, 1: 90-99 (1993).
20. David, J.H., Henri, F., "Cellular, biochemical and clinical aspects of wound healing", *Infect. Surg.*, 3: 23-35 (2000).
21. The Committee on Research, Science and Therapy of The American Academy of Periodontology. Position Paper: "The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration", *J. Periodontol.*, 67:545-553 (1996).
22. Gartner, L. P., Hiatt, J. L., "Color Textbook of Histology", *W. B. Saunders Company*, USA, 338-341 (1997).
23. Pimentel, E., "Handbook of Growth Factors", *CRC Press.*, USA, 10-17 (1994).
24. Ciğer S. "Yara iyileşmesi ve büyüme faktörleri: Tüm yönleriyle yara iyileşmesi", ed. Erdem C., Çelebi C., *Ayrıntı Matb. Ltd. Şti.*, Ankara, 20-26 (1996).
25. Schultz, G. S., White, M., Mitchell, R., "Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor alfa and vaccinia growth factor", *Science*, 235: 350-352 (1987).
26. Lynch, S.E., Colvin, R.B., Antoniades, H.N., "Growth factors in wound healing –single and synergistic effects on portial thicness porcine skin wounds", *J. Clin. Invest.*, 640-646 (1989).

27. Greenhalgh, D.G., "The role of growth factors in wound healing". *J. Trauma*, 41: 159-165 (1996).
28. Tsuboi, R., Shi, C.M., Sato, C., "Co administration of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein-1 stimulates wound healing in animal models", *J. Invest. Dermatol.*, 104: 199-203 (1995).
29. Yeler H., Yücetaş Ş., Yılmaz D., Öztürk M., Arıcı S., "Epidermal büyüme faktörünün diş çekim yarası üzerine etkisinin incelenmesi", *C.Ü. Diş Hek. Fak. Der.*, 2(1):25-31 (1999).
30. Ural, M., Koçak, A., Aksoy, A., "Yüz ve çene gelişimine etki eden faktörler", *S.D.Ü. Tıp Fak. Der.*, 14(1): 41-44 (2007).
31. Cohen, S., "Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal", *J. Biol. Chem.*, 237(5): 1555-1563 (1962).
32. Cohen, S., Taylor, J. M., "Part I. epidermal growth factor", Chemical and Biological Characterization Recent Programmes, *Horm. Res.*, 30: 533-550 (1974).
33. Rothe, M., Falanga, V., "Growth factors", *Arch. Dermatol.*, 125: 1390-1398 (1989).
34. Türker , M., Erbaş, D., Yılmaz, D., "SMG ekstresinin submandibular bez ve kan prostaglandin seviyelerine etkileri" , *G. Ü. Tıp Fak. Der.*, 5 (1): 109-115 (1989).
35. Yu, W., Naim, J. O., Lanzafame, R. J., "Expression of growth factors in early wound healing in rat skin", *Lasers Surg. Med.*, 15 (3): 281-289 (1994).
36. Groff, G., "Oncogenes And Growth Factors", *Canada*, 52-85 (1987).
37. Nave, K.A., Probstmeier, R., Schachner. M., " Epidermal growth factor does not cross the blood -brain barrier", *J. Invest. Dermatol.*, 94(5): 624-626 (1985).
38. Pratt, R. M., "Role of epidermal growth factor in embryonic development", ed. Moscona, A. A., Monroy, A., *Academic Press*, New York, 175 (1987).
39. Klegerman, M. E., Plotnikoff. N.P., "Proteins as biological response modifiers in Klegerman" , ed. Groves , M. J., Pharmaceutical Biotechnology, *Interpharm. Press*, USA, 89-102 (1992).

40. Konturek, S. J., Dembinski, A., Vvarzecha, Z., Brzozovvski, T., Gregor, H., "Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduedonal ulcers in rats" , *Gastroenterology*, 94: 1300-1307 (1988).
41. Erbaş D, Oygur T, Anıl A., "Submandibular bez ekstresinin yara iyileşmesine olan etkisi", *G.Ü. Dişhek. Fak. Der.*, 5 (2):139-147 (1988).
42. Laato, M., Niinikoshi, J., Gerdin, B., Lebel, L., "Stimulation of wound healing by epidermal grown factor", *Ann. Surg. J.*, 203 (14): 379-381 (1986).
43. Çelebi, N., Türkyılmaz, A., Gönül, B., Özoğul, C., "Effects of EGF microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats", *J. Controlled Release*, 83 :197–210 (2002).
44. Sayan, H., Gönül, B., Akbulut, K.G., Türkyılmaz, A., Çelebi, N., "Effects of epidermal growth factor formulations on liver malondialdehyde and reduced glutathione levels in stress ulcer model", *FABAD J. Pharm. Sci.*, 26 :61–63 (2001).
45. Bower, J. M., Camble, R., Gregory, H., Gerring, E. L., Villshire, I. R., "The Inhibition of Gastric Acid Secration by Epidermal Growth Factor", *Experientia*, 31 (7): 825-826 (1975).
46. Carpenter, G., "Epidermal Growth Factor Handbook ", *Exp. Pharmacol.* , 57: 89-123 (1981).
47. Akbulut, K.G., Gönül, B., Türkyılmaz, A., Çelebi, N., "The role of epidermal growth factor formulation on stres ulcer healing of the gastric mucosa", *Surg.Today*, 32: 880-883 (2002).
48. Berlanga, J., Prats, P., Remirez, D., Gonzales, R., Lopez-Saura, P., Aguir, J., Ojeda, M., "Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage", *Am. J. Pathol.*, 161(2): 373-379 (2002).
49. Jankowski, J., Coghill, G., Treaskis, B., Hopwood, D., Wormsley K.G., "Epidermal growth factor in the esophagus", *Gut*, 33: 1448 (1992).
50. Marcinkiewicz, M., Grabowska, S.Z., Czyzewska, E., "Role of epidermal growth factor (EGF) in oesophageal mucosal integrity", *Curr. Med. Re.s Opinion*, 4:145-153 (1998).
51. Juhl, C.O., Jensen, V.L., Jensen, S.L., "Systemic treatment with recombinant human epidermal growth factor accelerates healing of sclerotherapy-induced esophageal ulcers, and prevents esophageal stricture formations in pigs", *Dig. Dis. Sci.*, 39:2671-2678 (1994).

52. Qureshi, F.G., Tchorzewski, M.T., Duncan, M.D., Harmon, J.V., “EGF and IGF-I synergistically stimulate proliferation of human esophageal epithelial cells”, *J. Surg. Research*, 69:354-358 (1997).
53. Okuyama, M., Fujiwara, Y., Tanigawa, T., Watababe, K., Shiba, M., Tominaga, K., “Roles of ZO-1 and epidermal growth factor in esophageal epithelial defense against acid”, *Digestion*, 75:135-141 (2007).
54. Koltuksuz, U., Mutus, H.M., Kutlu, R., Özyurt, H., Çetin, S., Karaman, A., Gurbuz, N., Akyol, O., Aydin, N.E., “Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats”, *J. Pediatr. Surg.*, 36(10):1504–1509 (2001).
55. Berthet, B., Di Costanzo, J., Arnaud, C., Choux, R., Assadourian, R., “Influence of epidermal growth factor and interferon gamma on healing of oesophageal corrosive burns in the rat”, *Br. J. Surg.*, 81:395-398 (1994).
56. Brown, G.L., Nanney, L.B., Griffen, J., “Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor”, *N. Engl. J. Med.*, 321:76-79 (1989).
57. Gönül, B., Erdoğan, D., Özogul, C., Koz, C., Babül, A., Çelebi, N., “Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice”, *Burns*, 21(1): 7-10 (1995).
58. Nanney, L. B., “Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair”, *J. Invest. Dermatol.*, 94 (5): 624-629 (1990).
59. Carpenter, G., Cohen, S., “Epidermal growth factor”, *J. Biol. Chem.*, 265:7709 (1990).
60. Peacock, E.E., “Wound Healing. Wound repair”, eds. Peacock, E.E., Winkle, W.V., *W.B. Saunders Co.*, Philadelphia, 1-271 (1984).
61. Turgut, M., Vargeli, İ., Özcan, G., Kaynaroglu, U., Benli, K., Özcan, O.E., Sağlam, S., “Yara İyileşmesi Prosesinin Özellikleri ve Değişik Faktörlerin Bu Süreç Üzerine Olan Etkileri”, *Yeni Tıp Dergisi.*, 12(2): 142-149 (1995).
62. Fabish, W., “What is dermatitis artefacta”, *Int. J. Derm.*, 20: 427-428 (1981).
63. Ausprunk, D.H., “Tumor Angiogenesis”, ed. Houck, J.C., *Chemical Messengers of the Inflammatory Process*, *Amsterdam Elsevier*, North Holland, 317 (1979).
64. Schoefl, G. I., “Studies of inflammation. III: growing capillaries: their structure and permeability”, *Vir-chows Arch. Pathol. Anat.*, 337: 97 (1963).

65. Skalli, O., Gabbiani, G., "The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases", eds. Clark, R. A. F., Henson, P. M., **Plenum Publishing**, New York, 373 (1988).
66. Nwomeh, B.C., Yager, D.R., Cohen, I.K., "Physiology of the chronic wound", **Clin. Plast. Surg.**, 25: 341-356 (1998).
67. Bello, Y.M., Phillips, T.J., "Recent advances in wound healing", **JAMA**, 6: 716-718 (2000).
68. Clark, R.A.F., "Mechanisms of cutaneous wound repair", eds. Freedberg, I.M., Eisen, A.Z., Wolff, K., Austen, K.F., Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Fitzpatrick, T.B., **Dermatology In General Medicine, Mc Graw Hill Inc.**, New York, 326-340, (1999).
69. Ekmekçi, P., Bostancı, S., "Yara iyileşmesi", **T. Klin. Dermatoloji**, 12: 114-120, (2002).
70. Ergenekon, G., Tufan, H., "Kutanöz İnflamasyon", eds. Tüzün, Y., Serdaroğlu, S., Aydemir, E.H., **Dermatolojide Gelişmeler-II, İstanbul:Dizgi Baskı**, 75-91, (1993).
71. Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Kington, D.R., Margolis, D.J., Pecoraro, R.E., Rodeheaver, G., Robson, M.C., "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing", **Arch. Dermatol.**, 130:489-493 (1994).
72. İnternet: "Yara iyileşmesi",
www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/194/Yara_Iyilesmesi.pdf (2010).
73. İnternet: "Yaralar",
http://www.istabip.org.tr/media/upload/klinik_2009_22/05.pdf (2010).
74. Kirsner, R.S., Eaglstein, W.H., "The wound healing process", **Dermatol. Clin.**, 11 (4): 629-640 (1993).
75. Carlson, M.A., "Acute wound healing", **Surg. Clin. North Am.**, 77(3): 607-636 (1997).
76. Karukonda, S.R.K., Flynn, T.C., Boh, E.E., Mcburney, E.I., Russo, G.G., Millikan, L.E., "The effects of drugs on wound healing: part 1", **Int. J. Dermatol.**, 39: 250-257 (2000).
77. İnternet: "Yara iyileşmesinin fazları",
<http://www.worldwidewounds.com/2002/april/Vowden/images/WBP-Figure-8.jpg> (2010).

78. Stashak, T.S., "Principles of wound healing. In: Equine Wound Management", *Lea & Febiger Malvern*, Pennsylvania, 1-15 (1991).
79. Singer, A.J., Clark, R.A.F., "Cutaneous wound healing", *N. Engl. J. Med.*, 341(10):738-746 (1999).
80. Deodhar, A.K., Rana, R.E., "Surgical physiology of wound healing: a review", *Postgrad. Med.*, 43, 2: 52-56 (1997).
81. Li, J., Chen, J., Kirsner, R. "Pathophysiology of acute wound healing", *Clin. Dermatol.*, 25: 9-18 (2007).
82. Erbil, Y., "Yara iyileşmesi In: Genel Cerrahi", ed. Kalaycı, G., *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 51-59 (2002).
83. Hedlund, C. S., "Surgey of the integumentary system. In: Small Animal Surgery", ed. Fossum, T.W., *Mosby*, China 134-137 (2002)..
84. Stadelmann, W. K., Digenis, A. G., Tobin, G. R., "Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds", *Surg.*, 176: 26-38 (1998).
85. Swaim, S.F., Henderson, R.A., "Wound healing. In: Small Animal Wound Management", *Lea & Febiger, Malvern*, Pennsylvania, 1-8 (1990).
86. Mutsaers, S. E., Bishop, J. E., McGrouther, G., Laurent, G. J., "Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29(1): 5-17 (1997).
87. Steven, J.P., "Physiology of wound healing and surgical wound care", *ASAIO*, 46: 2-5 (2000).
88. Strodtbeck, F., "Physiology of wound healing", *Newborn Infant. Nurs. Rev.*, 1(1): 43-52 (2001).
89. Harrari, J. "Wound healing. In: Small Animal Surgery", ed. Harrari, J., *Williams & Wilkins*, USA, 33-37 (1996).
90. Aukhil, I., "Biology of wound healing", *Periodontol.*, 22: 44-50 (2000).
91. Gregory, S.S. "The physiology of wound bed preparation. In: Surgical Wound Healing and Management", eds. Granick, M.S., Gamelli RL, *Informa*, USA, 1-16 (2007).
92. Jones, S.G., Edwards, R., Thomas, D.W., "Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immuno-regulation of wound healing", *Int. J. Low. Extrem. Wounds*, 3(4): 201-208 (2004).

93. Pascoe, J.R., "Wound healing. In: Atlas of Small Animal Surgery", Chapter 1, ed. Gourley, I.M., Gregory, C.R., **Gower Medical**, New York, 2-13 (1991).
94. Heinze, C. D., Clem, M. F., "Wound healing and tissue repair. In: Textbook of Large Animal Surgery", 2nd ed., ed. Oehme, F.W., **Williams & Wilkins**, USA, 141-153 (1988).
95. Anderson, D., "Wound management in small animal practice", **In Pract**, 18: 115-128 (1996).
96. Theoret, C.L. "Wound repair in the horse: Problems and proposed innovative solutions", **Clin. Tech. Equine Pract.**, 3:134-140 (2004).
97. Wilmink, J. M., van Weeren, P. R., "Differences in wound healing between horses and ponies: application of research results to the clinical approach of equine wounds", **Clin. Tech. Equine Pract.**, 3:123-133 (2004).
98. İnternet: "Yaranın onarımı", <http://www.acilveilkuyardim.com/acilbakim/yara2.jpg> (2010).
99. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, W. W., "Hücre dışı yatak In: Harper'ın Biyokimyası", **Nobel Tıp Kitabevi**, İstanbul, 695-700 (2004).
100. Sağlam, M., "Bağ dokusu. In: Genel Histoloji", **Emel Matbacılık Sanayi**, Ankara, 127-151 (1987).
101. Diegelmann, R. F., "Collagen metabolism", **Wounds**, 13(5): 177-182 (2001).
102. Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, R.I., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A. "Connective tissue. In: Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry", **Mc Graw-Hill**, Tokyo, 7: 211-239 (1983).
103. Champe, P. C., Harvey, R. A., "Globular and fibrous proteins. In: Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry", **Lippincott-Raven.**, 2: 25-44 (2005).
104. Nelson, D. L., Cox, M. M., "The three-dimensional structure of protein. In: Principles of Biochemistry", **WH Freeman and Company**, New York, 4: 116-156 (2005).
105. Natori, J., Shimizu, K., Nagahama, M., Tanaka, S., "The influence of hypothyroidism on wound healing", **J. Nippon Med. Sch.**, 66, 3: 176-180 (1999).
106. Karasu, A., Bakır, B., "Yara ve Yara İyileşmesi", **Vet. Cerr. Der.**, 14(1): 36-43 (2008).

107. Tanyolaç, A., “Özel Histoloji”, *A. Ü. Vet. Fak. Yay.*, Ankara (1984).
108. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., “Basic Histology”, 6nd Ed., *Prentice-Hall International Inc.*, (1989).
109. Nancy A., “Integument”, chapter 16, in “Textbook of Veterinary Histoloji”, Editors, HD Dellmann, JA Eurell, 5nd Ed., *Lippincott Williams & Wilkins*, Pennsylvania. (1998).
110. İnternet: “Derinin yapısı”,
http://www.biyolojici.com/Cildimizdeki_Yaralar.html (2010).
111. Aughey, E., Frye, F. L., “Comparative Veterinary Histology”, 3nd Ed., *Lowa State University Press*, USA, (1997).
112. Artan, M. E., “Histoloji”, *İ.Ü. Vet. Fak. Yay.*, İstanbul, (1988).
113. Steenfoss, H. H., “Growth factors and wound healing”, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, 28: 95-105 (1994).
114. Rice, A., Chard, T., “Cytokines in Implantation”, *Cytokine Growth F. R.*, 9(3): 287-296 (1998).
115. 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).
116. İnternet: “Büyüme Faktörlerinin Hücresel Fonksiyon Yolları”,
<http://www.biyolojiegitim.yyu.edu.tr/mk/ht/hc.htm> (2010).
117. Lawrence, W. T., Diegelmann, R. F., “Growth factors on wound healing”, *Clin. Derm.*, 12: 157-169 (1994).
118. Gope. R., “The effect of epidermal growth factor & plateled derived growth factors on wound healing process”, *Indian J. Med. Res.*, 116:201-206 (2002).
119. İnternet: “Yara iyileşmesi sürecinde büyüme faktörleri”,
<http://www.acilveilkuyardim.com/acilbakim/yara1.gif> (2010).
120. Alemdaroglu C, Değim Z, Celebi N, Zor F, Ozturk S, Erdogan D. “An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor”, *Burns*, 32(3): 319-327 (2006).
121. Oakes, D.D., Sherck, J.P., Mark, J.B., “Clinical patterns and therapeutic implications”, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 83: 194-204 (1982).

122. İnternet: “EGF’nin kimyasal yapısı”,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A2199&rendertype=figure&id=A2212> (2010).
123. İnternet: “EGF sinyalizasyon yolu”,
<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/3/371/F2.large.jpg> (2010).
124. Erbaş, D., Güvendik, G., Gönül, B., “Submandibular bez ekstrelerinin serum çinko düzeylerine etkileri”, *Ank. Ecz. Fak. Der.*, 17(1):11-17 (1987).
125. Matilla, A. L., Perheentupa, J., Salmi, J., “Human epidermal growth factor concentrations in urine, but not in saliva and serum depend thyroid state”, *Life Sci.*, 41: 2739-2747 (1987).
126. Thornburn, G. L., Dolling, M., “Epidermal growth factor and fetal development, in; the endocrine physiology of pregnancy and periparturition”, eds. Jaffe, R. B., Dell’Aqua S., *Serono Symposia Publications From Raven Press*, 21: 53-64 (1985).
127. Read, C. L., Geoffry, L., Ballard, J. F., “Milk growth factors: Concentrations in human milk and effect of premature birth, In: The Physiological development of the fetus and newborn”, eds Jones, C. T., Nathainelsz P.W., *Academic Press*, London, 27-31 (1985).
128. Konukoğlu, D., “Serbest Radikal ve Ksenobiotik Metabolizması”, Biyokimya, ed. Kılıç, G., *Tumer*, İstanbul, 2: 267-272 (2004).
129. Ceylan, E., Dülger, H., Uzun, K., “Tüberküloz Plörezilerde Plevra Sıvısı Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Tanısal Değeri”, *Toraks Dergisi*, 4(1):33-37 (2003).
130. Hunt, T. K., Pai, P. M., “Basic principles of wound healing”, *J. Trauma*, 30 (12): 122-128 (1990).
131. Vihersaari, T., Kivisaari, J., Niinikoski, J., “Effect of changes in inspired oxygen tension on wound metabolism”, *Ann. Surg.*, 179: 889-895 (1975).
132. Hunt, T. K., Linsey M., Sonei M., Jawetz E., “Oxygen tension and wound infection”, *Surg. Forum*, 23: 47-49 (1972).
133. 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).
134. Shou, J., Lappin, J., Daly, J. M., “Impairment of pulmonary macrophage function with total parenteral nutrition”, *Ann. Surg.*, 219: 291-297 (1994).

135. MacKay, D., Miller, A.L., "Nutritional support for wound healing", *Altern. Med. Rev.*, 8(4):359-377 (2003).
136. İnternet: "Fagositoz",
<http://www.micro.msb.le.ac.uk/MBChB/bloodmap/Phagocytosis.html> (2004).
137. Babior, B.M., "Phagocytes and oxidative stres", *Am. J. Med.*, 109: 33-44 (2000).
138. Babior, D. M., "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes", *N. Engl. J. Med.*, 298: 659-668 (1978).
139. İnternet: "Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar",
<http://www.mustafaltinisik.org.uk/21-adsem-01.ppt> (2000).
140. 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).
141. 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).
142. 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).
143. 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).
144. 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).
145. Sun, YI., Oberley, L.W., Ying, L., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", *Clin. Chem.*, 34/3, 497-500 (1988).
146. Küçük, F., "Yara iyileşmesinde sistemik egf uygulamasının karaciğer dokusu kollajen ve protein düzeylerine etkisi", Yüksek lisans, *G.Ü. Fen Bilimleri Ens.*, Ankara, 51-54 (2010).
147. Fujisawa, K., Youji, M., Masaru, N., "Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa", *J. Oral Pathol. Med.*, 32: 358-66 (2003).

148. Gönül, B., Akbulut, K.G., Özer, Ç., Yetkin, G., Çelebi N., “The Role of Transforming Growth Factor Alpha Formulation on Aspirin-Induced Ulcer Healing and Oxidant Stress in the Gastric Mucosa”, *Surg. Today*, 34 :1035-1040 (2004).
149. Erkasap, S., Erkasap, N., Aral, E., Köken, T., Kahraman, A., Aydın, Y., Yılmaz, S., Ateş, E., “Mast cell stabilizator and antioxidant effects of epidermal growth factor (EGF) on gastric mucosal injury by ethanol in rats”, *Chin. J. Physiol.*, 48 (1): 1-6 (2005).
150. Hussein, A.E., Shokeir, A.A., Sarhan, M.E., El-Menabawy, F.R., Abd-Elmoneim, H.A., El-Nashar, E.M., Barakat, N.M., "Effects of combined erythropoietin and epidermal growth factor on renal ischaemia/reperfusion injury: a randomized experimental controlled study", *BJU Int.*, 2: 323-328 (2010).
151. Güleç, E. G., “Epidermal büyüme faktörünün oral submukozal implantla uygulanmasının yara dokusu oksidan olaylarına etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *G.Ü. Fen Bilimleri Ens.*, 10 (2006).
152. Gupta, A., Singh, R. L., Raghubir, R., "Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats", *Mol. Cell. Biochem.*, 241: 1–7 (2002).
153. Heck, D.E., Laskin, D.L., Gardner, C.R., Laskin, J.D., “Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing”, *J. Biol. Chem.*, 267: 21277-21280 (1992).
154. İnternet: “Askorbik asidin reaksiyonları”, www.kimyaevi.org (2010).
155. Nishiguchi, K., Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Okumura, K., "Effect of epidermal growth factor on Cu, Zn-superoxide dismutase expression in cultured fibroblasts from rat skin", *Pharm. Res.*, 11(9): 1244-9 (1994).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KALAY, Zeynep
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.02.1985 Sivas
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (505) 8607055
 e-mail : zeynepkalay85@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Öğretmenliği Bölümü	2008
Lise	YDA Batıkent Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce

Bildiriler

- 1- Kalay, Z., Cevher C, Ş., Bircan, F.S., Peker Güleç, E.G., Balabanlı, K.B., “Topikal EGF uygulamasının dorsolateral eksizyonel yaralarda oksidan olaylara etkisi”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, 721-722 (2010).
- 2- Bircan, F.S., Cevher C, Ş., Kalay, Z., Peker G., G., Paşaoğlu, Ö.T., Balabanlı, B.K., “Dermal yara iyileşmesi esnasında serum oksidan ve antioksidan düzeylerinin belirlenmesi”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiriler Kitabı, 720-721 (2010).

Hobiler

Tenis, müzik, keman, kitap, sinema, seyahat