

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**YARA YAŞI TAYİNİNDE APOPTOTİK YOLAKTAKİ İLGİLİ GENLERİN
İFADELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Taner AKAR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Adnan MENEVŞE

ANKARA
Mayıs 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**YARA YAŞI TAYİNİNDE APOPTOTİK YOLAKTAKİ İLGİLİ GENLERİN
İFADELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Taner AKAR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Adnan MENEVŞE

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2010-78 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Mayıs 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 17.05.2013



İmza
Prof.Dr.Adnan MENEVŞE
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza
Prof.Dr.Sevda MENEVŞE
Gazi Üniversitesi



İmza
Prof.Dr.Feride İffet ŞAHİN
Başkent Üniversitesi

İmza
Doç.Dr.Birol DEMİREL
Gazi Üniversitesi



İmza
Doç.Dr.Ece KONAÇ
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Resimler, Grafikler	VI
Tablolar	IX
Semboller, Kısaltmalar	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yaranın Tanımı	3
2.2. Yaranın Muayenesinde Değerlendirilmesi Gereken Özellikler	3
2.2.1. Anatomik lokalizasyonu	3
2.2.2. Uzunluğu	4
2.2.3. Genişliği	4
2.2.4. Derinliği ve trajesi	4
2.2.5. Dudakları	4
2.2.6. Açıları	4
2.2.7. Kuyrukları	4
2.2.8. Yönü	5
2.2.9. Vital özellikleri	5
2.2.10. Yaranın yaşı	5
2.3. Yaranın Sınıflandırılması	5
2.3.1. Künt travmatik yaralar	5
2.3.2. Kesik yaralar	5
2.3.3. Delik yaralar	5
2.3.4. Ateşli silah yaraları	6
2.3.5. Patlayıcı madde yaraları	6
2.3.6. Isı, elektrik, radyasyon gibi etkilerle meydana gelen yaralar	6

2.3.7. Kimyasal maddelerle meydana gelen yaralar	6
2.3.8. İnsan ve hayvan ısırıkları	6
2.4. Yara İyileşmesi	6
2.4.1. Primer Yara İyileşmesi	6
2.4.2. Sekonder Yara İyileşmesi	8
2.4.3. Yara Direnci	9
2.5. Yara Yaşı Tayini	9
2.5.1. Makroskopik Yöntem	9
2.5.2. Mikroskopik Yöntem	10
2.5.2.1. Koagülasyon / İnflamatuar Faz	11
2.5.2.2. Proliferatif Faz-Granülasyon Dokusu Oluşumu	12
2.5.2.3. Matriks Yeniden Şekillenmesi ve Skar Oluşumu	14
2.5.2.4. Yara Oluşumundan Sonra Görülen Kronolojik Histolojik Değişiklikler	16
2.5.2.4.1. Otuz Dakika - 4 Saat	16
2.5.2.4.2. Dört - 12 Saat	16
2.5.2.4.3. On iki - 24 Saat	17
2.5.2.4.4. Yirmi dört - 72 Saat	17
2.5.2.4.5. Üç - 6 Gün	17
2.5.2.4.6. On - 15 Gün	18
2.5.2.4.7. İki Hafta ile Birkaç Ay	18
2.5.3. Histokimyasal Yöntem	18
2.5.4. Biyokimyasal Yöntem	19
2.5.5. İmmün Histokimyasal Yöntem	19
2.6. Yara Yaşı Tayininin Adli Tıptaki Önemi	20
2.7. Apoptoz	22

2.7.1. Apoptozun Mekanizmaları	23
2.7.1.1. Dışsal Yolak	25
2.7.1.2. İçsel Yolak	26
2.7.2. Apoptotik Hücrelerin Özellikleri	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Kullanılan Hayvan, Araç ve Gereçler	29
3.1.1. Deney Hayvanları	29
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	29
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	30
3.1.4. Kullanılan Kitler	32
3.2. Yöntemler	32
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	32
3.2.2. Deney Grupları	33
3.2.2.1. Grup 1	33
3.2.2.2. Grup 2	34
3.2.2.3. Grup 3	34
3.2.2.4. Grup 4	35
3.2.2.5. Grup 5	35
3.2.2.6. Grup 6	35
3.2.3. Rat epidermis dokusundan total RNA saflaştırılması	37
3.2.3.1. Dokudan RNA İzolasyon Protokolü	37
3.2.4. cDNA Sentezi	38
3.2.4.1. Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı	39
3.2.5. Gen ifadenin Real-Time PCR ile Belirlenmesi	40
3.2.5.1. Bax Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	40
3.2.5.2. Bcl-2 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	41

3.2.5.3. Bcl-xL Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	42
3.2.5.4. Casp 3 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	43
3.2.5.5. Casp 8 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	44
3.2.5.6. Casp 9 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	45
3.2.5.7. ACTB Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	46
3.2.5.8. Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB Genleri için Real-Time PCR Tepkime Karışımı	47
3.2.5.9. Light-Cycler (LC) Deney Programı	48
3.2.6. Histopatolojik İnceleme	50
3.2.7. İmmünohistokimyasal İnceleme	50
3.2.8. Mikroskopik İnceleme	51
3.2.9. İstatistiksel Analiz	52
4. BULGULAR	53
4.1. Genetik Bulgular	53
4.1.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	53
4.1.2. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması	58
4.1.2.1. Punch, Bistüri ve Koter ile oluşturulan yaraların iyileşme sürecinde Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL Genlerinin İfade Düzeylerindeki Değişim	58
4.2. Histopatolojik Bulgular	64
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ	85
7. ÖZET	87
8. SUMMARY	89
9. KAYNAKLAR	90
10. EKLER	96
11. ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

Şekil 1: İnflamatuar faz ve proliferatif faz.	12
Şekil 2: Proliferatif Faz.	13
Şekil 3: Yeniden Şekillenme Fazı.	15
Şekil 4: Apoptozun Dışsal ve İçsel Yolakları.	25
Şekil 5: Bax mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000028328 giriş no'lu dizi).	41
Şekil 6: Bcl-2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000003768 giriş no'lu dizi).	42
Şekil 7: Bcl-xL mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000010762 giriş no'lu dizi).	43
Şekil 8: Casp 3 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000014095 giriş no'lu dizi).	44
Şekil 9: Casp 8 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000016613 giriş no'lu dizi).	45
Şekil 10: Casp 9 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000017972 giriş no'lu dizi).	46
Şekil 11: ACTB mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000042459 giriş no'lu dizi).	47
Şekil 12: Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.	54

Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Şekil 13: Bax geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Bax geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. 55

Şekil 14: Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. 56

Şekil 15: GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. 57

Resim 1: Ratın sırt bölgesinde oluşturulan yaralar. 36

Resim 2: Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 24. saatte yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 400 büyütme ile PMNL hakimiyeti. 68

Resim 3: Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 3. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 200 büyütme ile PMNL hakimiyeti. 69

Resim 4: Punch ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 400 büyütme ile mikst tipte inflamasyon. 69

Resim 5: Koter ile yara oluşturulduktan sonraki 17. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 400 büyütme ile IMC hakimiyeti. 70

- Resim 6:** Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 5. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 200 büyütme ile vasküler proliferasyon. 70
- Resim 7:** Punch ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 200 büyütme ile vasküler proliferasyon. 71
- Resim 8:** Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 3. günde yara bölgesinden alınan örneklerde, 400 büyütmede TUNEL ile saptanan apoptotik hücreler. 72
- Resim 9:** Koter ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerde, 400 büyütmede TUNEL ile saptanan apoptotik hücreler. 74
- Resim 10:** Koter ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerde, 400 büyütmede, kaspaz 9 antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyanan PMNL ve IMC'ler. 74
- Grafik 1:** Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. 59
- Grafik 2:** Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Kaspaz-8 mRNA düzeylerindeki değişiklik. 60
- Grafik 3:** Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Kaspaz-9 mRNA düzeylerindeki değişiklik. 61
- Grafik 4:** Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Bax mRNA düzeylerindeki değişiklik. 62
- Grafik 5:** Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Bcl-2 mRNA düzeylerindeki değişiklik. 63
- Grafik 6:** Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Bcl-xL mRNA düzeylerindeki değişiklik. 64

TABLÖLER

Tablo 1: İmmünohistokimyasal yöntemle gösterilen parametreler.	20
Tablo 2: cDNA RT-PCR tepkime karışımı	39
Tablo 3: Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	39
Tablo 4: Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB Real-time PCR tepkime karışımı.	48
Tablo 5: Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.	49
Tablo 6: Punch ile oluşturulan yara bölgesinden alınan kesitlerde, 10 rastgele seçilmiş alanda, 400 büyütme ile mikroskopik olarak saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon, fibrozis elemanları ve toplam apoptotik cisimcik sayıları.	65
Tablo 7: Punch ile oluşturulan yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri.	65
Tablo 8: Bistüri ile oluşturulan yara bölgesinden alınan kesitlerde, 10 rastgele seçilmiş alanda, 400 büyütme ile mikroskopik olarak saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon, fibrozis elemanları ve toplam apoptotik cisimcik sayıları.	66
Tablo 9: Bistüri ile oluşturulan yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri.	66
Tablo 10: Koter ile oluşturulan yara bölgesinden alınan kesitlerde, 10 rastgele seçilmiş alanda, 400 büyütme ile mikroskopik olarak saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon, fibrozis elemanları ve toplam apoptotik cisimcik sayıları.	67

Tablo 11: Koter ile oluşturulan yara bölgesinde saptanan toplam 67 PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri.

SEMBOLLER, KISALTMALAR

μm	: Mikrometre
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μg	: Mikrogram
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
gr	: Gram
N	: Normal
C	: Santigrad
mg/kg	: miligram/kilogram
ACTB	: Beta aktin
AIF	: Apoptozu başlatan faktör
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktivatör faktör 1
ATP	: Adenozin trifosfat
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Bax	: Bcl-2 ilişkili x proteini
Bcl-2	: B hücresi lenfoma geni 2
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
cDNA	: Komplementer DNA
Cp	: Crossing point
cyt	: Sitokrom
DAB	: Diaminobenzidin
DD	: Ölüm domaini
DED	: Ölüm efektör domaini
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DISC	: Ölüm başlatıcı sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dk	: Dakika

ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
endo	: Endonükleaz
EPC	: Endotelyal progenitör hücre
FADD	: Ölüm domaini ile ilişkili Fas proteini
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GADPH	: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GÜDAM	:Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi
IAP	: Apoptotik protein inhibitörleri
ICAM	: İnterselüler adezyon molekülü
IL	: İnterlökin
IMC	: İnflamatuar mononükleer hücreler
i.m.	: İntramuskuler
Kaspaz	: Sistein bağımlı aspartata spesifik proteinaz
KCL	: Potasyum klorür
LC	: Light Cycler
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MMP	: Matriks metallo proteinazları
mRNA	: Messenger RNA
NGF	: Sinir büyüme faktörü
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü
PMNL	: Polimorfonükleer lökositler
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakika başına dönme sayısı
RT-PCR	: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

Smac/Diablo	:Second mitochondria-derived activator of caspases /direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI
sn	: Saniye
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TUNEL	: TdT-dUTP terminal nick end-labeling
UPL	: Universal prob kütüphanesi
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Ateşli silahlara, patlayıcı maddelere, her türlü kesici, kesicidelici, delici, kesici-ezici ve ezici aletlere, trafik kazalarına, düşmelere, darp olaylarına, iş kazalarına, intoksikasyonlara, yanıklara, elektrik çarpmalarına bağlı olarak meydana gelen yaralanma veya ölüm olaylarında, insan vücudunda meydana gelen yaraları, yaptıkları fizik muayene sonucunda saptayan hekimlerin, buna neden olan olayı Türk Ceza Kanunu'nun 280. maddesi ve Ceza Muhakemesi Kanunu'nun 159. maddesi gereğince ihbar yükümlülükleri bulunmaktadır. Hekimin ihbarının ardından adli nitelik kazanan olayla ilgili olarak, yaralanmanın ne zaman meydana geldiği, şahsın yaralandıktan sonra ne kadar süre yaşadığı, yaranın ölümden önce mi yoksa sonra mı oluştuğu gibi, yanıtları adli soruşturma için son derece önemi olan sorular, adli makamlar tarafından hekimlere yöneltilmektedir. Bu aşamada yara yaşı tayini çok önem kazanmaktadır.

Adli uygulamada yara yaşı tayini, ölüm nedeni ve yaralar arasındaki ilgiyi açıklamak için her zaman gereklidir. Ayrıca, işlenmiş bir suçu kanıtlamakta faydalı olabileceği gibi, asılsız olarak suçlanan kişilerin aklanmasında, özellikle cinayetlere intihar süsü verilmeye çalışılan durumlarda ölüm orijininin (kaza, intihar, cinayet) belirlenmesinde, bazı yaralanma olaylarında yeni lezyonlarla beraber, eski lezyonların da bulunduğu ve tümünün aynı olayda meydana geldiğinin iddia edildiği durumlarda, çocuğun fiziksel olarak istismar edildiği olgularda vücudunda saptanan yaraların değerlendirilmesinde büyük faydalar sağlamaktadır.

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan, tüm organizmalarda embriyonik gelişim ve doku homeostazisinde önemli rol oynamanın yanı sıra, yara iyileşmesinin tüm evrelerinde ve skar

dokusu oluşumunda da direkt etki gösteren, hücre ölümünün aktif ve son derece organize bir formudur.

Bu bilgilerden yola çıkılarak bu tez çalışmasında, değişik iyileşme evrelerinde ve farklı mekanizmalarla oluşturulan yara dokularında, apoptozun, apoptozda rol oynayan kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bcl-xL ve Bax mRNA ve protein düzeylerinin saptanması ve yara yaşı tayininde kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaranın Tanımı

Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel devamlılığının bozulması mekanik bir kuvvet uygulanması ile vücudun herhangi bir bölümünde meydana gelen hasar, fiziksel veya kimyasal bir etkenin ciltte, diğer tüm dokularda ve iç organlarda oluşturduğu her türlü hasar olarak tanımlanmaktadır ¹⁻³. Böyle bir hasarın oluşmasına ise “Yaralanma” adı verilir ³.

2.2. Yaranın Muayenesinde Değerlendirilmesi Gereken Özellikler

Yaraların muayenesinde yaranın kısımları tanımlanırken uygun ışıklandırma ortamında, uzunluk-genişlik-derinlik özelliklerini gösterebilecek bir cetvel ile ölçümler ve mutlaka fotoğraflandırma, video kayıt ve insan figür resimleri üzerinde çizimler yapılmalıdır ⁴.

Yara muayenesinde hekim, yaranın aşağıdaki özelliklerini değerlendirerek kaydetmelidir;

2.2.1. Anatomik lokalizasyonu

Yaranın vücut üzerinde bulunduğu bölgedir. Hekim olmayanlar tarafından da anlaşılabilir şekilde tanımlanmalı, sabit ve bilinen anatomik noktalara cm cinsinden uzaklığı belirtilmelidir ^{3,4}.

2.2.2. Uzunluğu

Cildin üzerinde, yaranın bir ucundan diğer ucuna kadar olan mesafedir^{3,4}.

2.2.3. Genişliği

Yaranın iki dudağı arasındaki mesafedir^{3,4}.

2.2.4. Derinliği ve trajesi

Cilt seviyesi ile yaranın en derin kısmı arasındaki mesafedir. Kafaya, göğüse, karına penetre olmuş, derin yaralarda bu özellik, kişi ölmüş ise otopside, yaşıyor ise ameliyatta tanımlanabilir^{3,4}.

2.2.5. Dudakları

İki tarafa doğru ayrılan kenar kısımlarıdır^{3,4}.

2.2.6. Açıları

Başlangıçta ve bitişte iki dudak arasında kalan kısımlardır^{3,4}.

2.2.7. Kuyrukları

Başlangıçta ve bitişte cildin üzerinde çizik şeklinde görülen kısımlardır^{3,4}.

2.2.8. Yönü

Belirli bir yönde seyrediyorsa belirtilmelidir^{3,4}.

2.2.9. Vital özellikleri

Kanama, inflamasyon, iltihap, kabuklanma...^{3,4}.

2.2.10. Yaranın yaşı^{3,4}

2.3. Yaranın Sınıflandırılması

2.3.1. Künt travmatik yaralar

Künt nitelikli cisim veya aletlerle meydana getirilen yaralardır. Bunlar, künt cisim yarası, sıyrık, ekimoz, hematoma, doku ezilmesi, kemik kırıkları, iç organ, damar ve sinir yaralanmalarıdır³.

2.3.2. Kesik yaralar

Kesici nitelikli cisim veya aletlerle meydana getirilen yaralardır. Bunlar, kesici alet yaraları ve kesici-ezici alet yaralarıdır³.

2.3.3. Delik yaralar

Delici nitelikli cisim veya aletlerle meydana getirilen yaralardır. Bunlar, kesici-delici alet yaraları ve delici alet yaralarıdır³.

2.3.4. Ateşli silah yaraları³

2.3.5. Patlayıcı madde yaraları³

2.3.6. Isı, elektrik, radyasyon gibi etkilerle meydana gelen yaralar³

2.3.7. Kimyasal maddelerle meydana gelen yaralar³

2.3.8. İnsan ve hayvan ısırıkları³

2.4. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi sırası ile; zedelenmeye karşı akut iltihabi cevabın uyarılması, parankim hücre rejenerasyonu (olanaklı ise), parankim ve bağ dokusu hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonu, ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezi, doku fonksiyonunu yeniden sağlamak için parankim elemanlarının taslak oluşumu, bağ dokusu taslakta yara direncinin kazanılması olaylarını içerir⁵.

2.4.1. Primer Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesinin en basit örneklerinden biri cerrahi dikişlerle birleştirilmiş, infekte olmayan, temiz insizyonun iyileşmesidir. Bu, primer birleşme veya primer yara iyileşmesi olarak adlandırılır. Bu insizyon, epitelyum bazal membran devamlılığında fokal kesintiye ve nispeten az sayıda epitelyumce bağ dokusu hücre ölümüne neden olur. Sonuç olarak fibrozis üzerinde epitelyum rejenerasyonu olur. Daralan

insizyon alanı kan-fibrin tıkaçı ile hızla dolar. Yüzeyi dehidrasyonla kabuk bağlar ve iyileşen onarım alanını korur ⁵.

Yirmi dört saat içinde yara kenarından nötrofiller fibrin tıkaçı göç ederler. Epidermisin kesit kenarlarındaki bazal hücreleri mitotik aktivite göstermeye başlar. 24-48 saat içinde her iki kenardaki epitelyum hücreleri dermis boyunca depolanan bazal membran komponentleri biriktikçe göç edip çoğalmaya başlar ⁵.

Üçüncü günde nötrofillerin yerini büyük ölçüde insizyon alanına giderek artan oranda dolduran makrofajlar ve granülasyon dokusu alır. İnsizyon kenarlarında kollajen lifler belirgindir fakat vertikal düzenlenmiştir ve insizyon üzerinde köprü oluşturmaz. Epitelyum hücre proliferasyonu devam ederek kalın epidermal tabaka oluşturur ⁵.

Beşinci günde neovaskülarizasyon en üst düzeye ulaşarak insizyon mesafesi granülasyon dokusu ile dolar. Kollajen fibriller daha belirgindir ve insizyon üzerinde köprüleşme başlatılır. Epidermis matür epidermal yapıya yüzey keratinizasyonu ile ulaşarak normal kalınlığını kazanır ⁵.

İkinci hafta boyunca, kollajen birikimi ve fibroblast proliferasyonu devam eder. Lökosit infiltrasyonu, ödem, vaskülarite artışı giderek azalır. Uzun bir olay olan solgunlaşma, insizyon skarında kollajen depolanmasında artış ve vasküler kanallarda gerileme başlar ⁵.

Birinci ayın sonunda skar yüzeyi normal epidermisle örtülü ve büyük ölçüde iltihapsiz hücresel bağ dokusundan oluşur. Fakat insizyon hattında deri ekleri permanant olarak kaybolmuştur. Yara direnci zamanla artar ⁵.

2.4.2. Sekonder Yara İyileşmesi

İnfarktüs, iltihabi ülserasyon, apse oluşumu ya da büyük yara gibi hücre ve doku kaybı daha şiddetli olduğunda onarım olayı fazla karmaşıktır. Bu durumlarda, parankim hücre rejenerasyonu tek başına orijinal yapıyı restore edemez. Sonuç olarak ekstraselüler matriks birikimi, skarlaşma sırasında yara kenarlarından aşırı granülasyon dokusu büyümesi olur. Bu iyileşme biçimi de sekonder yara iyileşmesi olarak adlandırılır ⁵.

Sekonder iyileşme çeşitli yönleri ile primer iyileşmeden farklıdır;

- Büyük doku defektlerinde ortamdan uzaklaştırılması gereken büyük miktarda nekrotik artık, eksuda ve fibrin bulunur. Sonuçta iltihabi reaksiyon daha yoğundur, iltihap-bağımlı sekonder zedelenme potansiyeli yüksektir ⁵.

- Daha fazla miktarda granülasyon dokusu oluşur. Büyük defektlerde üzerinde epitelin yeniden büyüyeceği çatıyı oluşturmak için stromal yapıyı sağlayacak daha büyük granülasyon dokusu boşlukları bulunur. Fazla granülasyon doku volümü genellikle daha fazla skar dokusu oluşumu ile sonuçlanır ⁵.

- Sekonder iyileşmede yara kontraksiyonu oluşur. Örneğin altı hafta içinde büyük deri defektleri kontraksiyonla orijinal boyutun %5-10'u kadar küçülür. Bu olay kasılabilen düz kas hücresi ultrasütrüktürel ve fonksiyonel nitelikleri taşıyan modifiye fibroblast olan miyofibroblastların varlığı ile açıklanır ⁵.

2.4.3. Yara Direnci

Dikkatli dikilen yaralar büyük ölçüde dikişlerin etkisi ile sağlam derinin direncinin %70'ini kazanırlar. Genellikle birinci haftanın sonunda dikişler alındığında yara direnci, sağlam derinin ortalama %10'u kadardır. Fakat bu, sonraki dört haftada hızla artar. Yara direnci düzelmesi ikinci ayda, kollajen sentezindeki parçalanma artışı ve sentezin sonlarına doğru görülen kollajen yapısal modifikasyonu (örneğin çapraz bağlar ve fibril çap artışı) sonucudur. Yara direnci normalde üç ayda ortalama %70-80'e ulaşır. Genellikle bu noktanın ötesine geçemez ⁵.

2.5. Yara Yaşı Tayini

Yara yaşı tayininde makroskopik, mikroskopik (histolojik), histokimyasal, biyokimyasal ve immün histokimyasal yöntemler kullanılabilir ^{3,6-8}.

2.5.1. Makroskopik Yöntem

Yaranın çıplak gözle incelenerek, meydana geliş zamanı hakkında fikir edinilmeye çalışılmasıdır ³. Genelde çıplak gözle incelemeye bir yaranın antemortem veya postmortem olup olmadığını söylemek, kanamanın varlığı ve miktarı göz önüne alınarak mümkündür ^{6,8}. Ancak bir yaranın yaşı, görünümüne bakılarak kesin biçimde belirlenemez ^{3,6,7}. Çünkü lokal iltihabi reaksiyonun şiddeti ve niteliği çok çeşitli koşullara göre değişiklik gösterir ^{3,6}. Yaranın tipi, boyutları, lokalizasyonu, dokunun özelliği, damarlanması, enfeksiyon gelişip gelişmemesi, kişinin yaşı, beslenme ve sağlık durumu başta gelen değişkenlerdir ³.

Ortalama bulgular;

- Yaklaşık 12 saat sonra, yaranın kenarları kırmızımtrak renkli ve şiş olarak görülür³.

- Küçük bir yarada yaklaşık 24 saat sonra kabuk oluşabilir³.

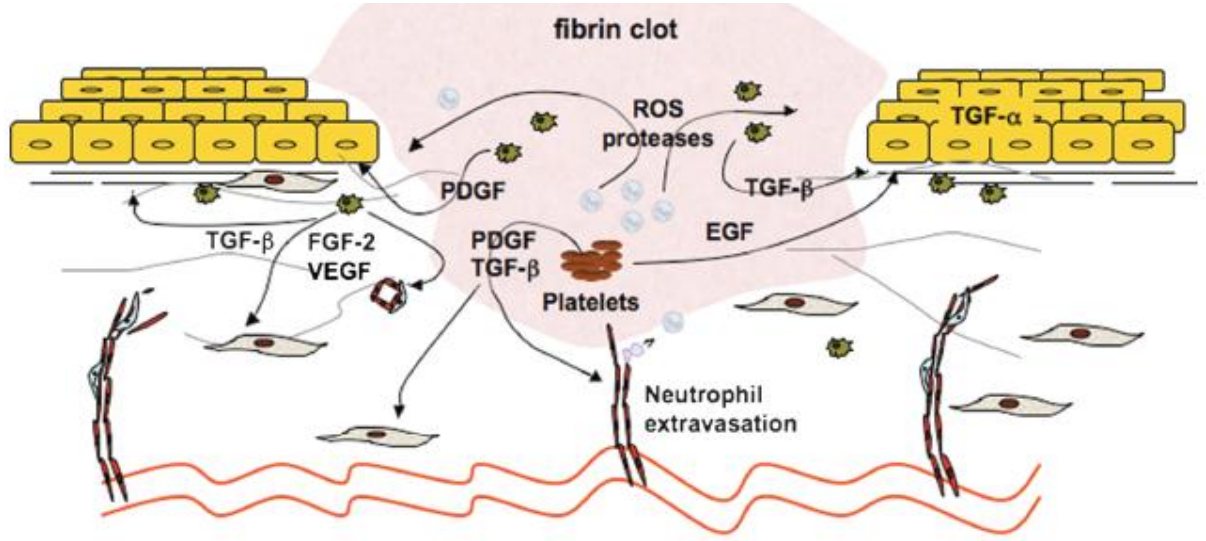
- Ekimozlar yeni oluştuğunda kırmızımtrak renklidir. Daha sonra koyu mavi, mor, yeşil ve sarı olmak üzere renk değiştirirler. Ancak bunlarda da değişkenlik çok fazladır. Sağlıklı ve genç kişilerde yaklaşık bir haftada tamamen iyileşebilen aynı nitelikteki bir ekimoz, yaşlı bir kişide haftalarca kalabilir. Yine aynı kişinin farklı vücut kısımlarında, aynı zamanda meydana gelen, yaklaşık aynı nitelikteki ekimozlar, belli bir süre sonra farklı renkler gösterebilirler. Aynı kişide kırmızı ve mor renkli ekimozlar bir arada görüldüğünde, bunların aynı zamanda oluşmadığı söylenemez. Ama kırmızı ve yeşil-sarı renkli ekimozların bir arada olması halinde, bunların farklı zamanlarda oluştuğu, dolayısıyla farklı olaylara ait oldukları söylenebilir³.

2.5.2. Mikroskopik Yöntem

Yara iyileşmesinin çeşitli dönemlerindeki morfolojik görünüme göre yapılır³. Birbirinin üzerine binen ve kesin sınırlarla birbirinden ayrılamayan dört dönemden oluşur. Koagülasyon fazı, inflamatuvar fazı, proliferatif faz (granülasyon dokusu oluşumu), yeniden şekillenme ya da skar oluşumu fazı⁹.

2.5.2.1. Koagölasyon / İnflamatuar Faz

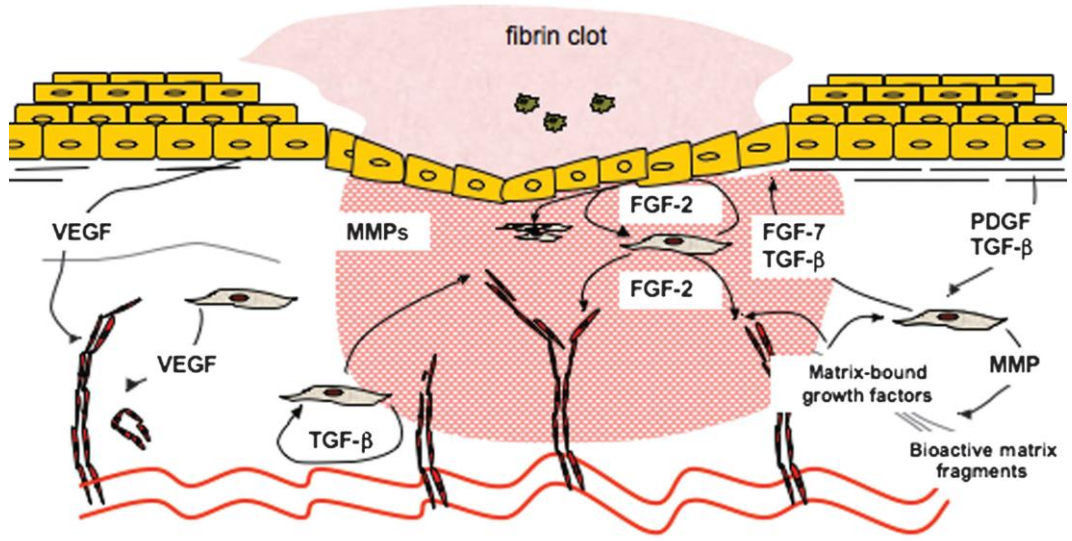
Epidermal bariyerde bozulma meydana geldiğinde, keratinositlerde önceden depolanmış halde bulunan interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörü α (TNF α) salınır. IL-1 ve TNF α , hasarı çevreleyen hücreleri uyarır. Ek olarak doku hasarı sonucu kan damarlarında yaralanma meydana geldiğinde kan elemanları ekstravaze olurlar ¹⁰. Yaralanmadan hemen sonra, plateletler hasarlanmış damar duvarlarına yapışarak salınım reaksiyonunu başlatır ve hemostatik reaksiyon başlar. Pıhtılaşma kaskadı aktive olarak aşırı kanamayı önler ve yaralanmış bölgeyi geçici olarak korur. Plateletler, çok sayıda büyüme faktörü, sitokinler ve apoptozisi indükleyen ajanlar salgırlar ^{9,10}. Plateletlerden salınan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü β 1 ve 2 (TGF- β 1 ve TGF-2), lökositler, nötrofiller ve makrofajlar gibi inflammatuar hücreleri çekerler ^{9,10}. Bunlar antimikrobiyal etkili reaktif oksijen türleri (ROS) ve yarayı yabancı maddelerden ve bakterilerden temizleyen proteazlar salgırlar ⁹. Nötrofiller, bakterileri uzaklaştırır ve daha sonra kabukla birlikte uzaklaştırılırlar ya da makrofajlar tarafından fagosite edilirler ¹⁰. Sonra monositler, makrofajlara diferansiye olarak yaralanma bölgesine giderler. Makrofajlar, inflammatuar cevabı artırmada ve hasarlı ve enfekte dokuların temizlenmesinde önemli rol oynarlar. Makrofajlar, aynı zamanda granölasyon dokusunun gelişimini başlatırlar ve IL-1 ve interlökin 6 (IL-6) gibi proinflammatuar sitokinler, fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), TGF- β ve PDGF gibi growth faktörler salgırlar ¹⁰. İnflamatuar fazın gerilemesi, yaralanmadan sonraki birkaç gün içerisinde yavaş yavaş gerçekleşen, inflammatuar hücrelerin apoptozisi ile eş zamanlıdır. İnflamatuar fazın gerileme mekanizması bilinmemekle birlikte, TGF- β 1 ve IL-1 gibi sitokinler ve siklopentenon prostoglandin, lipoksinler ve resolinler gibi bioaktif lipitler bu süreçte yer almaktadırlar (Şekil 1) ⁹.



Şekil 1: İnflamatuar faz ve proliferatif faz⁹.

2.5.2.2. Proliferatif Faz-Granülasyon Dokusu Oluşumu

İnflamatuar faz yatışınca, tamirin proliferatif fazı başlar (Şekil 2)⁹.



Şekil 2: Proliferatif Faz ⁹.

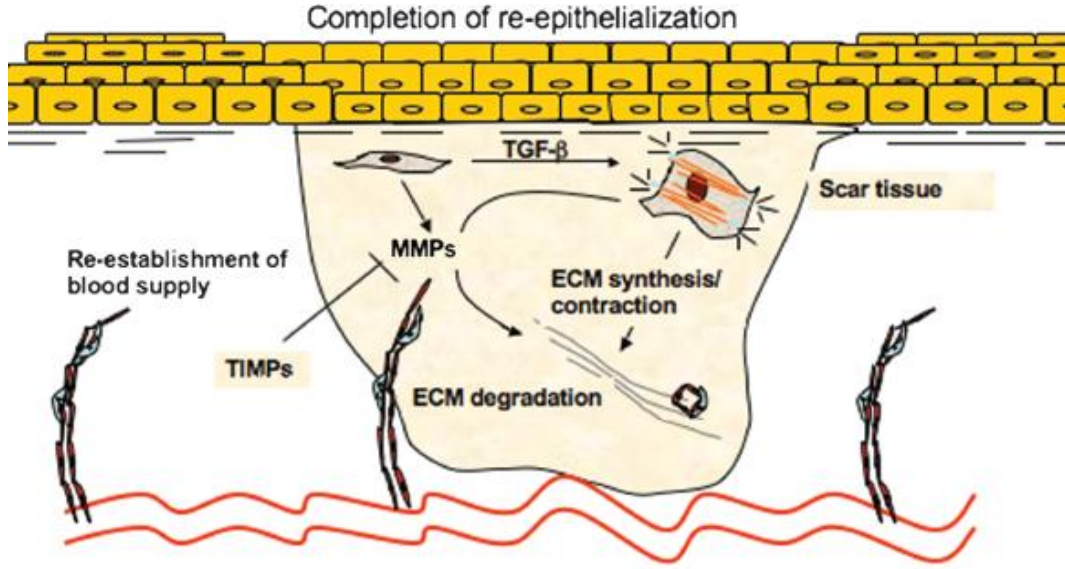
Bu dönemde, geriye kalan inflamatuvar hücrelerden ve göç eden, otokrin, parakrin ve jukstakrin olarak etki eden epidermal ve dermal hücrelerden, hücre migrasyonunu başlatırken, hücre proliferasyonunu sürdüren ve indükleyen growth faktörler üretilir ⁹. Yaralanmadan sonraki saatler içerisinde EGF, TGFα ve FGF'nin salınımı, reepitelizasyonun başlaması ile sonuçlanan epitelyal hücre migrasyonu ve proliferasyonunu stimüle eder ¹⁰. Tüm bu olaylar, granülasyon dokusu oluşumu için de gereklidir. Dermal ve epidermal hücreler, yara bölgesine göç edip proliferasyon olurlarken, besinlerin dağıtımı, gaz ve metabolit değiş tokuşunu sağlayan yeterli kan desteği için de gereklidirler. Bu nedenle, normal yara iyileşme sürecinin gerçekleşmesi için, güçlü anjiyogenik yanıt başlatılmalı ve sürdürülebilmelidir ^{9,10}.

Yaralanmaya bağlı olarak kan damarlarında ortaya çıkan bozulmaya sekonder lokal hipoksi geliştiğinde, yaralanmadan hemen sonra, yara iyileşmesinde anjiyogenezis meydana gelir. Bu durum proanjiyogenik faktörlerin üretimini teşvik eder. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2) ve PDGF, başlangıçta plateletlerden, daha sonra yara içerisinde yerleşmiş olan

hücrelerden salınır ⁹. VEGF, FGF-2 ve PDGF, yaralanmanın indüklediği anjiogenezinin başlamasında ana mediatörlerdir ^{9,10}. Endotelyal hücreler bazal membranı degrade ederler, yara alanına doğru göç ederler, proliferer olurlar, hücre-hücre temasını oluştururlar ve sonuç olarak yeni kan damarlarını oluştururlar. Çok yakın zamanda, normalde kemik iliğinde yerleşik olan, yaralanmaya cevap olarak dolaşıma geçen endotelyal progenitör hücrelerin de (EPC) yara revaskülarizasyonu için gerekli oldukları belirlenmiştir. Yaralanma alanını sınırlayan endotelyal hücrelere bitişik olarak yerleşerek, mikrovask larizasyonun yeniden oluşumunda da rol alırlar. Mobilizasyonlarına, nitrik oksit, VEGF ve matriks metallo proteinazları (MMP)  zellikle de MMP-9 aracılık eder ⁹.

2.5.2.3. Matriks Yeniden şekillenmesi ve Skar Oluşumu

Normal kan akımının yeniden kazanılması, epidermal ve dermal hücre migrasyonu ve proliferasyonu için uygun mikroçevreyi temin eder (şekil 3). Bu, yaranın yeniden epitelizasyonu ve epidermal bütünlüğün restorasyonuna yol açar ⁹.



Şekil 3: Yeniden Şekillenme Fazı⁹.

Yaralanmadan yaklaşık dört gün sonra, yara içerisinde granülasyon dokusu oluşumu başlar¹⁰. Fibroblastlar yara içerisinde proliferer olur ve yeni oluşan kan damarları ile beslenip granülasyon dokusunu oluşturan ekstraselüler matriksi (ECM) sentezler. Eş zamanlı olarak, kollajen III, fibrin, fibronektin ve hyaluronik asitten oluşan geçici matriks, esas olarak kollajen I içeren ekstraselüler matriksle yer değiştirir. Daha sonra yara kontraksiyonu ve matriks yeniden şekillenmesi gerçekleşir (Şekil 3). Kontraksiyon esas olarak farklılaşmış fibroblastlar ya da myofibroblastlar tarafından, TGF- β , doku gerginliği, fibronektin ve tenascin C gibi matriks proteinlerinin varlığına yanıt olarak gerçekleştirilir. Fibroblastların indüklediği kontraktıl kuvvetler daha sonra, sitoskeletonla ilişkili ve ECM reseptör bağımlı fokal adezyon kompleksleri olan integrin reseptörleri yoluyla ECM'e iletilir. Yara kontraksiyonuna yol açan diğer mekanizma, fibroblast motilitesi ve bunu izleyen matriks reorganizasyonudur. Bu dinamik ve çift taraflı süreç, ECM sentez ve degradasyonunun kısa sikluslarını içerir. Burada matriks yeniden şekillenme enzimleri özellikle de MMP'ler, hücre migrasyonu, proliferasyonu ve anjiogenik indüksiyonu içeren, çeşitli iyileşme

yanıtlarının yararına lokal matriks mikroçevresinin yeniden oluşumunda önemli rol oynar. Sonuç olarak, fibroblastik hücrelerde apoptozisin meydana gelmesi, gerilim kuvveti yaralanmamış ciltle kıyaslanabilen, kısmen aselüler skar dokusu oluşumuna yol açar (Şekil 3)⁹.

TGF- β , TNF ve FGF-2, iyileşmenin son fazı boyunca apoptotik hücrelerin sayısında artışa yol açar. Dermal hücrelerin yetersizliği, özellikle de miyofibroblastların apoptozise uğramaları, hipertrofik skar ve keloid oluşumunu içeren yara iyileşmesi patolojileri ile ilişkilidir⁹.

2.5.2.4. Yara Oluşumundan Sonra Görülen Kronolojik Histolojik Değişiklikler

2.5.2.4.1. Otuz Dakika - 4 Saat

Dilate, küçük damarlarda polimorf lökosit marjinasyonu sıklıkla hiç görülmeyen bir özellik olup antemortem yaralanmanın güvenilir bir işareti değildir. Özellikle ciltte ve akciğerlerde aspire edilen materyalin etrafında, ölümden sonra birçok saat lökosit birikebilir. Bu periyodun sonunda eksravasküler göç başlayabilir. Fakat anlamlı sayıda polimorflar çok gecikirler. Subkutanöz yağ dokusunda üst dermal tabakalara göre polimorflar daha erken ortaya çıkarlar. Bazofilik mast hücreleri granüllerini kaybederler. Fibrin, yarada birkaç dakika içerisinde ortaya çıkar. Fakat bu durum, postmortem yaralanmalarda da görülür².

2.5.2.4.2. Dört - 12 Saat

Lökosit infiltrasyonu daha belirgin olup çoğunlukla polimorflardır. Ayrıca bazı mononükleer hücrelerde bulunur. Lenfositten

yetersiz miks populasyonu ve zayıfca ayrılmış monositler, genellikle 12 saat sonra görülür. Doku ödemi ve vasküler endotelde şişme meydana gelir. Ciltteki küçük yaralarda, epitelyal rejenerasyonun başlangıcı, epidermisin bazal tabakası seviyesinde yanlarda görülür².

2.5.2.4.3. On iki - 24 Saat

Lökositler, yara alanının sınırını çevreleyerek etraftan ayrılırlar. Polimorf cevabı azalır ve mononükleer hücre populasyonu artar. Nekroze dokunun ortadan kaldırılması başlar. Makrofajlar belirgindir ve zemin içeriği bazofilik boyanır. Yaklaşık 15. saatte fibroblastlarda mitoz görülür. Epidermis kabuğun yüzeyi boyunca yayılmaya başlar ve yara içerisinde, kesinin kenarlarından aşağı iner².

2.5.2.4.4. Yirmi dört - 72 Saat

Yaklaşık 48 saatte lökosit infiltrasyonu pike ulaşır. Tamir, fibroblastların ortaya çıkışı ile eş zamanlı olarak başlar. Fakat nadiren 72 saatten öncedir. Yeni kapillerler, damarlardan gelişmeye başlar. Vasküler infiltre stroma granülasyon dokusuna dönüşür².

2.5.2.4.5. Üç - 6 Gün

Tamir süratle ilerler. Kollajen oluşmaya başlar.Dev hücreler, nekrotik debris ve yabancı maddelerin etrafında görülebilir.Epidermis, eğer yara yüzeyi de kapsıyor ise aktif olarak büyür.Hayvanlarda laterale doğru yaklaşık 200 µm/gün büyür. Yara içerisinde ekimoz ya da herhangi bir kanama var ise hemosiderin 3. günden itibaren boyanmaya başlar. Bazı otörler birinci ya da ikinci günde ortaya çıkabildiğini söyledikleri halde, 5. güne kadar Perl reaksiyonu ile saptanamaz².

2.5.2.4.6. On - 15 Gün

Hücre reaksiyonu küçük yaralarda yatıştır. Vaskülerite azalır ve özellikle lökositler olmak üzere hücre popülasyonu düşer. Fibroblastlar çok aktiftir, kollajen döşenmeye başlar. Epidermis düz ve incedir. Papillalar haftalar sonra oluşur. Elastik lifler uzun süre nadirdir ve etraftaki hasarsız dokudan daha azdır².

2.5.2.4.7. İki Hafta ile Birkaç Ay

Boyut ve diğer faktörlere bağlı olarak iyileşen dokunun sağlamlaşması devam eder. İnflamatuvar cevap yara enfekte olmadıkça kaybolur. Kollajen ve elastin artar ve vasküler skar gelişir. Dereceli olarak daha yoğun ve avasküler olur. Epitelin şekli değişir ve dermal papilla, yara geniş ve irregüler olmadıkça tekrar ortaya çıkar. Cilt adneksi yara alanında canlı doku adacıkları bulunmadıkça tekrar ortaya çıkmaz².

2.5.3. Histokimyasal Yöntem

Antemortem postmortem yara ayrımında ve antemortem yaraların zamanının tespitinde fosfataz, aminopeptidaz ve esterazlar gibi enzimler kullanılabilir^{2,3}.

Cilt yüzeyindeki yarada, 0.2-0.5 mm genişliğinde santral bir zon vardır. Burası nekrotiktir ve enzim aktivitesi hızlı bir şekilde düşer. Bu, negatif vital reaksiyon olarak isimlendirilir. Bu tabakanın hemen ötesinde 0.1-0.3 mm.lik reaksiyon zonu bulunur. Bu bölgede, tamir sürecinde, enzimlerin konsantrasyonlarında artış görülür. Bu, enzimatik, pozitif vital reaksiyon olarak isimlendirilir. Postmortem yaralarda herhangi bir zon gelişmez².

Yaralanmayı takiben bir saat içerisinde pozitif zonda esterazlar ve Adenozin trifosfat (ATP) artar. Yaklaşık 2 saatte aminopeptidaz, 4 saatte asit fosfataz ve 8 saatte alkali fosfatazların aktivitesinde artış görülür ^{2,3}. Dış zonda pozitif enzimatik reaksiyon, vital reaksiyonun tek sonucudur ².

2.5.4. Biyokimyasal Yöntem

İltihabi dönemde ilk 1,5 saatteki damar reaksiyonu safhası, serotonin ve histamin etkisinin olduğu bir dönemdir ³. Dolayısıyla histamin ve serotonin de yaraların antemortem postmortem ayrımında ve yara yaşı tayininde kullanılmaktadır ². Serotonin yaralanmadan sonra yaklaşık 10 dakikada, histamin ise 20-30 dakikada maksimum konsantrasyona ulaşır ^{2,3}.

Biyokimyasal olarak yara yaşı tayini, aminlerin miktar açısından bireysel ve bölgesel olarak büyük farklar göstermeleri nedeni ile kontrollü olarak yapılmalıdır. Bunun için otopside yaralı kısma ait doku örneği ile birlikte komşu sağlam dokudan da aynı büyüklükte kontrol örneği alınır. Alınan örneklerin deri altı yağ dokusu çıkarılır. Kalan örneklerin her birinin net ağırlığının 2 gr olması gereklidir. Örnekler tespit solüsyonuna konmamalı, hemen laboratuara gönderilmelidir. Histamin, tyrode solüsyonu ile, serotonin ise 0.1 N hidroklorik asit ile ekstrakte edilir ve spektrofometrik olarak ölçüm yapılır ³.

2.5.5. İmmün Histokimyasal Yöntem

Ana prensibi, doku içerisindeki antijenle, uygulanan antikor arasında gerçekleşen immünolojik reaksiyondur ¹¹. Ekstraselüler matrikse

salınan maddeler gösterilir ³. Bu yöntemle gösterilen maddeler Tablo 1’de verilmiştir ¹¹.

Tablo 1: İmmünohistokimyasal yöntemle gösterilen parametreler ¹¹.

Antigen/Marker	En Erken Normal En Geç
	Saptama Saptama ya da Saptama
	Belirgin Reaksiyon
TGF- β 1	Birkaç dakika 30-60 dakika
TGF- α	10 dakika 30-60 dakika
Fibronektin	10-20 dakika > 4 saat Aylar
IL-1 β	15 dakika 30-60 dakika
IL-6	20 dakika 60-90 dakika
TNF- α	15 dakika 60-90 dakika
ICAM-1	50 dakika > 2 saat
VCAM-1	30 dakika > 1,5 saat
E-selectin	30 dakika > 1-1,5 saat
L-selectin	30 dakika > 1,5 saat
Tenascin	2-3 gün 5 gün Aylar
Kollagen III	2-3 gün 6 gün Aylar
Kollagen V	3 gün 6-7 gün Aylar
Kollagen VI	3 gün 6-7 gün Aylar
Kollagen I	4-6 gün 7 gün Aylar

2.6. Yara Yaşı Tayininin Adli Tıptaki Önemi

Adli uygulamada yara yaşının saptanması ölüm nedeni ve yaralar arasındaki ilgiyi açıklamak için her zaman gereklidir ¹².

Yara yaşı tayini işlenmiş bir suçu kanıtlamakta faydalı olabileceği gibi, asılsız olarak suçlanan kişilerin aklanmasında da büyük faydalar sağlar. Bu konuda çok sıklıkla karşılaşılan durumlardan biri, ölümden sonra kişiye araçların çarpması veya üzerinden geçmesidir. Elbette ki bir karayolunda canlı bir kişiye çarpıp ölümüne veya yaralanmasına yol açmak ile karayolunda ölü veya yaralı biçimde yatan bir kişiye çarpmak veya araçla üzerinden geçmek çok farklı durumlardır ³. Ayrıca bir düşmana karşı yapılan asılsız bir suçlamayı desteklemek amacıyla bir ölüde yaralar oluşturulabileceği de akılda tutulmalıdır ⁸. Özellikle birden fazla travmanın ölüme etkili olduğu olgularda, ilk önce isabet eden travmanın belirlenmesi, ölüm öncesi ve sonrası travmatik değişikliklerin ayırt edilebilmesi ve travmadan ölüme kadar geçen zamanın tayini adli olayların çözümünde çok önem kazanmaktadır ^{7,8,13}.

Yara yaşının tayini ölüm orijininin (kaza, intihar, cinayet) belirlenmesinde de büyük faydalar sağlar. Özellikle cinayetlere intihar süsü verilmeye çalışılan durumlarda, yara yaşının tayini çok önemlidir. Başka şekilde öldürüldükten sonra veya bayginken şahsın karayoluna, demiryoluna bırakıldığı veya yüksekte atıldığı durumlarla sıklıkla karşılaşılmaktadır. Böyle durumlarda şahsın vücudunda farklı zamanlarda meydana gelmiş yaraların tespit edilmesi çok önemli yararlar sağlayacaktır ³.

Bazı yaralanma olaylarında yeni lezyonlarla beraber, önceden başka nedenlerle meydana gelmiş lezyonlar da bulunabilir ve tümünün aynı olayda meydana geldiği iddia edilebilir. Yani bir kişi sorumlu olmadığı bir zararı meydana getirmekle suçlanabilir. Burada da hekimden lezyonların meydana geliş zamanı ve tüm lezyonların aynı zamanda meydana gelip gelmediğinin tespiti istenecektir ³. Hekimin bu sorulara cevap verebilmesi ancak yara yaşı tayini ile mümkündür.

Adli Tıpta yaralanmanın ölümden önce mi (antemortem) yoksa sonra mı (postmortem) oluştuğunun ayırt edilmesi son derece önemlidir. Bu ayrımın yapılamadığı veya yanlış yapıldığı olgularda olayın yönlendirilmesi de yanlış olacağından, hatalı ve istenmeyen sonuçlar ortaya çıkabilir. Yara yaşı tayininde kullanılan yöntemler yaranın antemortem veya postmortem olarak oluşturulduğunu göstermede de kullanılmaktadır³.

Hekimlerin sık olarak karşılaştıkları olgulardan olan fiziksel istismar sonucu yaralanan çocukta en sık görülen lezyonlar, yumuşak dokuda oluşan doku içi kanama olan ekimozlardır. Çocuğun vücudunda, yara yaşı tayini ile belirlenebilen farklı iyileşme evrelerinde birçok ekimozun bulunması, çocuğun bu travmaya sürekli olarak maruz kaldığını gösteren en önemli ve tanı koydurucu bulgulardır¹⁴.

2.7. Apoptoz

Apoptoz, eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür¹⁵. Apoptoz terimi ilk kez Kerr tarafından 1972 yılında kullanılmış olup, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleer fragmentasyon ve hücre membranının bozulmasını içeren spesifik morfolojik değişikliklerle sonuçlanan biyokimyasal olaylarla karakterize, hücre ölümünün aktif ve son derece organize bir formudur^{16,17}.

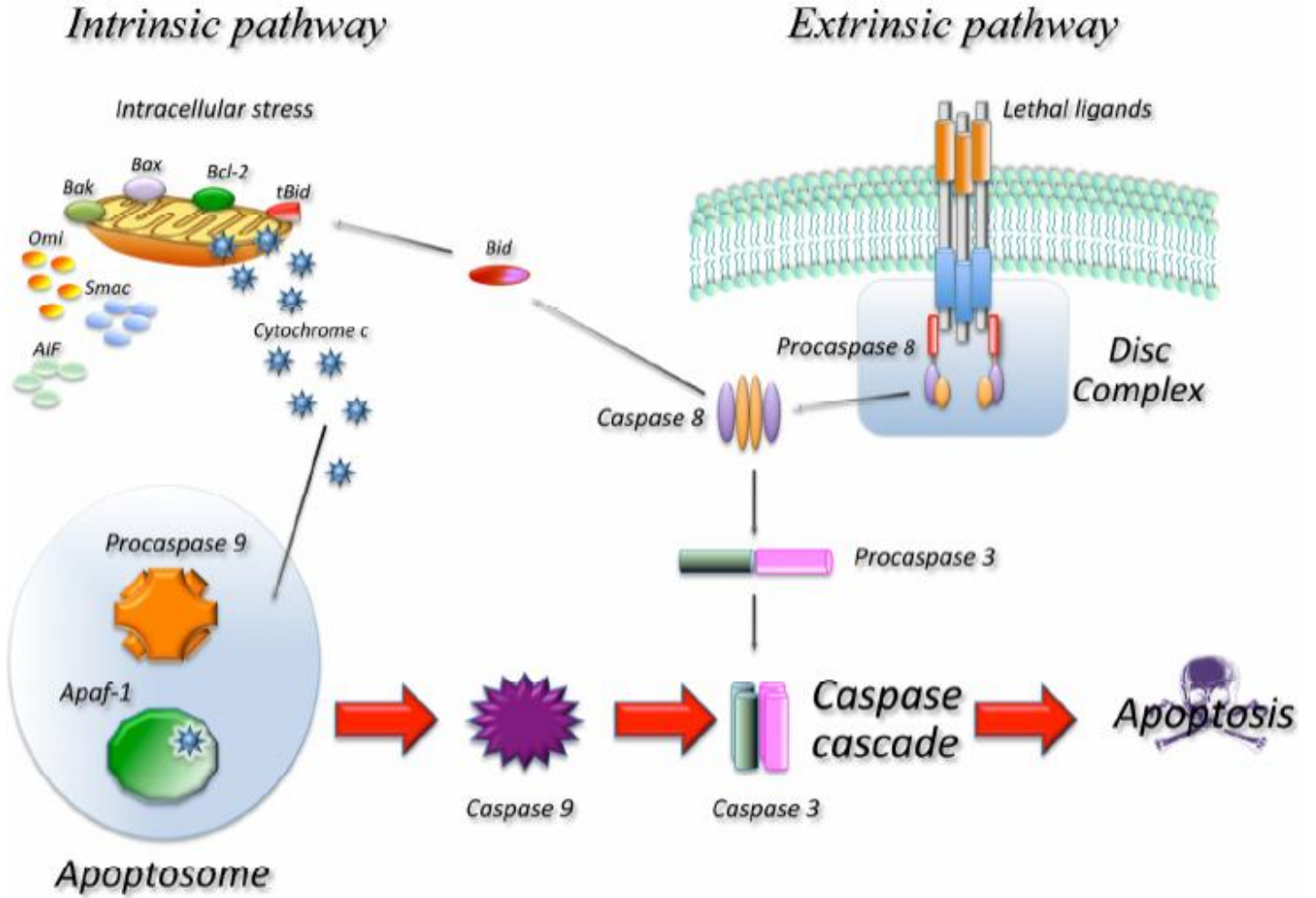
Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü, tüm organizmalarda embriyonik gelişim ve doku homeostazisinde önemli rol oynayan, fizyolojik olarak korunmuş bir mekanizmadır¹⁷⁻²⁰. Akut bir yaralanmadan kaynaklanan hücre ölümünün aksine apoptoz, farklı

morfolojik değişikliklerle karakterize aktif bir işlemdir ^{19,20}. Farklı organizmalarda rejeneratif yanıtları tetiklemektedir ²¹. Çok hücreli organizmaların hücreleri, çok iyi örgütlenmiş bir topluluğun üyeleridir. Bu topluluktaki hücrelerin sayıları sadece hücre bölünme hızının denetlenmesi ile değil aynı zamanda hücre ölüm hızının denetlenmesi yoluyla da kontrol edilmektedir. Erişkin dokularda hücre ölümü, hücre bölünmesini tam olarak dengeler. Eğer bu böyle olmazsa, doku ya büyüyecek ya da küçülecektir ²². Apoptoz erişkinlerde, hücre proliferasyonunun dengelenmesi ve dokularda var olan toplam hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur ^{19,20}. Örneğin kemik iliğindeki sürekli üretimi dengelemek için insanlarda günlük 5×10^{11} kadar kan hücresi apoptozla ortadan kaldırılır ^{19,20,22}. Ek olarak apoptoz, organizmanın bir bütün olarak iyiliği için, hasarlı ve tehlike potansiyeli olan hücrelerin ortadan kaldırılması yoluyla bir savunma mekanizması sağlar ^{19,20}. Gelişim sırasında birçok dokudaki istenmeyen hücrelerin elenmesinde anahtar rol oynar ^{19,20}.

2.7.1. Apoptozun Mekanizmaları

Apoptoz, plazma membranındaki, TNF α gibi ölüm reseptörlerinin uyarılması yoluyla (dışsal yolak) ya da mitokondri kökenli sinyaller yoluyla (içsel yolak) tetiklenir (Şekil 4) ^{17,18}. Her iki yolakda da, özel hedef proteinleri keserek, apoptotik ölümün karakteristik morfolojik özelliklerine yol açan, sistein proteaz ailesinin üyesi olan kaspazlar aktive olur ¹⁷. Kaspazlar yüzden fazla hücresel hedef proteini keserek apoptozu gerçekleştiren temel elemanlardır ²⁰. Fonksiyon bakımından up-stream ve down-stream olarak ikiye ayrılırlar. Çok sayıda enzim molekülü up-stream kaspazların çok yakınlarına gelip aktivasyon komplekslerine bağlandıklarında yapısal değişiklikler meydana gelir, kesilerek aktive olurlar. Down-stream kaspazlar, yalnızca up-stream kaspazlar tarafından prodomainlerinin kesilmesi yoluyla aktive olurlar ¹⁸. Kaspazlar iki ana

moleküler yolla aktive olurlar. Bu nedenle de apoptoz, dışsal ve içsel yollara ayrılır ¹⁸. Kaspazların en önemli hedefleri DNaz inhibitörü proteinlerdir ²⁰. DNazlar aktive olduklarında nükleer DNA'yı parçalarlar. Buna ek olarak kaspazlar, nükleer laminleri keserek nükleusun parçalanmasına ve hücre iskeleti proteoinlerini keserek hücre iskeletinin bozulmasına, membranın parçalanmasına ve sonuçta hücrenin parçalanmasına sebep olurlar ²⁰. Kaspazlar inaktif öncüller olarak sentezlenirler ve genellikle diğerkaspazların katalizlediğı proteolitik kesim ile aspartik asitlerinden kesilerek aktif forma dönüşürler. İlk kaspazın aktivasyonu bir zincir halinde diğerkaspazların aktivasyonunu başlatır ^{18-20,22}. Bundan sonra, etkinleşen kaspazların bazıları hücredeki diğerkilit proteinleri keser. Örneğın bazıları çekirdek laminlerini keserek çekirdek laminasının dönüşümsüz yıkımına neden olur. Bazıları ise DNaz'ı etkisiz konumda tutan bir proteini keserek DNaz'ın serbest kalmasına ve çekirdek içinde DNA'yı kesmesine neden olurlar. Bu yolla hücre kendini hızlı bir şekilde yıkar ve bir başka hücre tarafından hızla alınıp sindirilir ^{19,22}.



Şekil 4: Apoptozisin Dışsal ve İçsel Yolakları ¹⁸.

2.7.1.1. Dışsal Yolak

Dışsal yolak, TNF/NGF ailesinin üyesi olan ve ölüm reseptörü olarak adlandırılan spesifik transmembran reseptörlere, ligandların bağlanmasıyla sonuçlanan, ekstraselüler sinyaller tarafından uyarılır. Tüm ölüm reseptörleri benzer yolla fonksiyon gösterirler. Üzerlerine ligand bağlanan pek çok reseptör molekülü bir araya gelip, yapısal değişikliğe uğrayarak Ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinen ve kaspaz kaskadını aktive eden, geniş, multi protein

kompleksi oluştururlar ¹⁸. FAS/CD95 sinyal kompleksinde, FAS moleküllerinin üzerinde 80 aminoasitlik, üzerlerine ligand bağlanan, ölüm domaini (DD) olarak bilinen, çok iyi korunmuş bir bölge vardır. Adaptör molekülü, Ölüm domaini ile ilişkili Fas proteini (FADD) dir. FADD, ölüm efektör domaini (DED) olarak bilinen, yine iyi korunmuş bir protein etkileşim domaini içerir. DED, kaspaz 8’de bulunan homologuna bağlanarak onu aktive eder. Aktif kaspaz 8, diğer kaspaz 8’lerle birlikte, kaspaz 3 gibi downstream kaspazları da aktive eder ^{17,18}. Downstream sinyaller ve apoptotik sonuç, hücre tipine spesifiktir. Tip I hücrelerde, başlatıcı kaspazlar, hücresel apoptoza yol açan kaspazları direkt olarak keser ve aktive eder. Tip II hücrelerde, aktive edilmiş kaspaz 8 tarafından proapoptotik Bid proteini aktive edilir. Oluşan mitokondriyal apoptotik sinyaller yoluyla apoptoz meydana gelir ^{17,19}.

2.7.1.2. İçsel Yolak

İçsel yolak, pestisitler, kemoterapötik ajanlar gibi kimyasallar, yüksek ozmolarite, ısı ya da pH değışiklikleri gibi fiziksel ajanlar, DNA hasarı, oksidatif stres ve özellikle endoplazmik retikulumda yanlış katlanmış proteinlerin akümüasyonu gibi intraselüler streslerle aktive olur ^{17,18,23}. Bu streslerle intraselüler yollar aktive olur. Mitokondriyal membran permeabilitesinde değışiklikler oluşarak sitokrom c (cyt c), apoptozu başlatan faktör (AIF), second mitochondria-derived activator of caspases /direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI (Smac/Diablo) ve endonükleaz G (endo G), gibi proapoptotik faktörler sitozole salınır ^{17,23}. Bunlar, apoptozun kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız mekanizmalarını başlatır. Kaspaz bağımlı sinyal yolağında, cyt c, apoptotik proteaz aktivatör faktör 1’e (Apaf-1) bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur. Bu kompleks, prokaspaz 9’u aktive eder. Bu da efektör kaspaz 3 ve 7’nin aktivasyonuna yol açar. Çok sayıda, proapoptotik proteinleri içeren, birbiri ile ilişkili intrinsik yollar

bulunmaktadır. Aktif kaspazların fonksiyonu, apoptotik protein inhibitörlerinin (IAP) bağlanması ile bloke olur. Mitokondriden salınan Smac/Diablo, IAP'lere bağlanarak etkilerini inhibe eder. Dolayısıyla indirekt olarak kaspazların aktivasyonunu artırır. Ek olarak AIF ve Endo G nükleusa girerek, kaspaz bağımlı olmayan mekanizmada kromatin yoğunlaşmasını ve DNA fragmantasyonunu indükler^{17,23}.

Hücre içi proteinlerden Bcl-2 ailesi, apoptozun bu tipinin temel düzenleyicisidir. Tümü en az bir Bcl-2 homoloji domaini (BH) içerirler. Fonksiyonel olarak, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 gibi üç ya da dört BH domaini içerenler antiapoptotik ve Bax, Bak, Bcl-xs gibi iki ya da üç ya da Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa, Puma gibi sadece bir BH domaini içerenler proapoptotik işlev görürler. Proapoptotikler, ya direkt olarak por oluşturarak ya da VDAC ya da ANT gibi mitokondriyal kanal proteinlerine bağlanarak membran bütünlüğünü bozup apoptoza neden olurlar. Antiapoptotikler, proapoptotiklerin agregasyonuna engel olarak apoptozu önlerler²³. Bcl-2 ve Bcl-xl, cyt c'nin mitokondriden salıverilmesini en azından kısmen durdurarak apoptozu engeller. Bad, antiapoptotiklere bağlanarak onları etkisizleştirme yönünde çalışırken, Bax ve Bak, mitokondrilerden cyt c salıverilmesini uyarırlar. Bax ve Bak'ı kodlayan genlerin her ikisi de etkisizleştirildiğinde, hücreler dikkate değer bir şekilde apoptozu başlatıcı uyarılara dirençli hale gelirler ki, bu da bu proteinlerin apoptozun başlatılmasındaki can alıcı önemine işaret eder. Bax ve Bak ise, Bcl-2 ailesinin Bid gibi diğer apoptoz başlatıcı üyeleri tarafından etkinleştirilir²².

Hücre içi apoptoz düzenleyicilerinin bir diğer önemli ailesi, IAP (apoptoz engelleyici) ailesidir. Bu proteinlerin bazıları önkaspazlara bağlanarak etkinleşmelerini engellerken, bazıları da kaspazlara bağlanarak etkinliklerini engellerler. Mitokondriler Apaf-1'i etkinleştirmek

için cyt c'yi salarlarken, IAP'leri engelleyen başka bir proteini de salıverirler ve bu yolla ölümün etkinleşme işleminin verimini önemli ölçüde artırır²².

Hücre içi hücre ölüm programı aynı zamanda, apoptozu etkinleştiren veya engelleyen hücre dışı sinyaller tarafından da düzenlenir. Bu sinyal molekülleri başlıca, Bcl-2 ve IAP aileleri üyelerinin düzeylerini veya etkinliklerini düzenleyerek etki ederler²².

2.7.2. Apoptotik Hücrelerin Özellikleri

Apoptoz hücrede belirgin morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Hücreler küçülür, komşu hücrelerle temasını kaybeder. Endoplazmik retikulum genişler, hücre yüzeyinde çöküntüler oluşur. Sitoplazmada vakuoller oluşur. Hücrede kalsiyum miktarı artar. Bu, endonükleazlar, transglutaminazlar ve proteazları aktive eder. Endonükleazlar DNA'yı genellikle nükleozomların arasından keserek 180-200 baz çiftlik parçalara ayırır. Böylelikle DNA fragmente olur. Kromatin yoğunlaşır. Nükleus küçük parçalara ayrılır. Hücre büzülerek parçalanır ve apoptotik cisimleri oluşturur. Bu apoptotik cisimler, ölmekte olan hücrenin içeriğinden herhangi bir sızıntı oluşmadan önce, makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınıp fagositoz ile dokudan uzaklaştırılır. Böylece apoptozla ölen hücreler dokular tarafından etkin bir şekilde yok edilir^{19,20,22,23}. Bu durum, sadece hücre nekrozunun zarar verici sonuçlarını engellemekle kalmaz, aynı zamanda ölen hücrenin organik bileşenlerinin onu sindiren hücre tarafından yeniden kullanılmasını sağlar^{17,22}. Buna karşın akut yaralanma sonucunda ölen hücreler şişer ve patlar, içerikleri dış ortama salınır ve inflamasyona neden olurlar^{19,20,22}.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2010-78 kodlu bu çalışma, 29.04.2010 tarih ve 114-7148 no'lu Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayını almıştır. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilirken, Gazi Üniversitesi Etik Kurulu Yönergesi'nin 13. maddesinde belirtilen “etik kurallara uygunluk esası” kararına uyulmuştur.

3.1. Kullanılan Hayvan, Araç ve Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, GÜDAM'dan sağlanan 250-300 gr ağırlığındaki Wistar cinsi dişi albino ratlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Spin Vorteks (Biosan, Rusya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Rusya)
- Manyetik Karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Soğutmalı santrifuj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, ABD)
- pH metre (WTW 422, Almanya)

- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 100 µL) (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)
- Derin dondurucu (-86⁰C) (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-30⁰C) (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Güvenlik Kabini (VFRS 1206 E, Danimarka)
- Filtreli mikropipet uçları (CLP, ABD)
- Steril Enjektör (2ml) (Ayset, Türkiye)
- Steril Enjektör (5ml) (Medplast-S, Türkiye)
- Steril Enjektör (10ml) (Hayat, Türkiye)
- İnsülin enjektörü (Hayat, Türkiye)
- 0.2-0.5-1.5 µl'lik ependorf tüpler (CLP, ABD)
- Azot tankı (GT212 EINOX Air liquide, Fransa)
- Thermal Cycler (Hybaid PCR-sprint, Thermo electron corp., ABD)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Rusya)
- LightCycler Real-time PCR cihazı (Roche, Almanya)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Alfamin (Ketamin Hidroklorür) (Pfizer, Norveç)
- Xylasin hidroklorid (Bayer, ABD)
- Ketamin hidroklorür (V, ABD)
- Tris-HCL (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- MgCl₂ (Fermantas, ABD)
- CaCl₂ (Merck, Amanyay)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- Sodyum hidroksit peleti (Merck, Amanyay)

- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Steril dH₂O (Eczacıbaşı, Türkiye)
- DEPC'li (Dietilpirokarbonat) su (Biological Industries, İsrail)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- İzopropanol (Amresco, ABD)
- Absolut etanol (Carlo Erba, İtalya)
- Dnaz I recombinant (Roche, Almanya)
- TaqMan Master miks (Roche, Almanya)
- Bölgeye özgü primerler (kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bcl-xl ve Bax ve Beta Aktin) (Tıbbolbiol, Almanya)
- Bölgeye özgü LNA proplar (UPL, Almanya)
- Bölgeye özgü LNA prob (UPL prob 17, Beta aktin için) (UPL, Almanya)
- Kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bcl-xl ve Bax'a özgü ve Rat' a özgü Primer antikor (Santa cruz, ABD)
- Hidrojen peroksit (TA-015-HP, Lab Vision, ABD)
- PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) (Lab Vision, ABD)
- Kaspaz 3 primer antikor [Santa Cruz NGF–rabbit primer antikor (Cat; SC–1754)] (Zymed, ABD)
- Kaspaz 8 primer antikor [Santa Cruz–FGF–2 (147) primer antikor (Cat; SC–1747)] (Zymed, ABD)
- Kaspaz 9 primer antikor [Santa Cruz–FGF–2 (147) primer antikor (Cat; SC–1747)] (Zymed, ABD)
- Bcl-2 primer antikor [Santa Cruz–FGF–2 (147) primer antikor (Cat; SC–1747)] (Zymed, ABD)
- Bcl-xl primer antikor [Santa Cruz–FGF–2 (147) primer antikor (Cat; SC–1747)] (Zymed, ABD)
- Bax primer antikor [Santa Cruz–FGF–2 (147) primer antikor (Cat; SC–1747)] (Zymed, ABD)
- Sekonder antikor (85–9043, Zymed, ABD)

- Streptavidin peroksidaz enzim kompleksi (85–9043, Zymed, ABD)
- Kromojen DAB kit (Cat: 00–2020, Zymed, ABD)
- Hemotoksilen Mayer (0B52Y092, Merck, Almanya)
- Foto - ışık mikroskop (DCM 4000, Leicia, Almanya)

3.1.4. Kullanılan Kitler

- peqGOLD TriFast™ Dokudan RNA İzolasyon kiti (Pepqlab, Erlangen, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)
- TaqMan Master Karışımı (Roche, Almanya)
- DAP kromojen sistem kiti (Santa Cruz, ABD)
- Universal HRP kit (Santa Cruz, ABD)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu çalışma için ratlar, GÜDAM'dan temin edilmiştir. Ağırlıkları yaklaşık 250-300 gr olan 36 adet Wistar albino dişi rat kullanılmış, her birinde altışar rat bulunan altı grup oluşturulmuştur. Ratların serbest diyet ve içme suyu ile beslenmeleri sağlanmış ve oda ısısı 22 ± 2 °C' de sabit tutulmuştur. Ratların, standart şartlar altında, su ve yiyeceğe serbest erişim imkanı (Ad libitum) sağlanmıştır. Bulundukları odanın nisbi nem oranı % 30-45 arasında tutulmuş ve odanın havalandırması filtre edilerek, kontaminasyon riski önlenmiştir. Ratlar polikarbonattan yapılmış kafeslerde, altlarında talaş olacak şekilde barındırılmış, kafesler her gün temizlenerek, kuru altlıklar konulmuştur.

Tüm ratlara, yara oluşturulmasından önce, anestezi için, 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine intramuskuler (i.m) uygulanarak, sırt bölgesi kılları jilet ile epidermis tamamen çıplak kalıncaya kadar tıraş edilmiş, deri batikon ile temizlenmiştir.

Deney 21 günlük bir dönem için planlanmıştır.

Her ratın sırtında, üç ayrı bölgede, üç farklı mekanizma ile yara oluşturulmuştur;

1- Ratın sırtının sağ bölümüne, bistüri ile 1 cm.lik, fasyaya uzanan insizyonla, kesici alet yaralanması modeli.

2- Ratın sırtının sol bölümüne, 4 mm.lik punch biyopsi ile ezici alet yaralanması modeli.

3- Orta hatta, 220 volt, 50 Hz, 8.5 watt'lık, Elektro-Auto-Kauter'in 5 sn süre ile epidermise bastırılması ile yanık modeli (Resim 1).

Bakteriyel enfeksiyondan korumak için ratlar, tek başlarına steril kafeslere konulmuştur.

3.2.2. Deney Grupları

3.2.2.1. Grup 1

Yara oluşturulduktan 24 saat sonra, anestezi için intramuskuler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınarak gerçekleştirilen ölümden hemen sonra yara oluşturulan bölgenin uzağından kontrol biyopsi materyali alınmıştır. Yarayı ve çevresindeki sağlam dokuyu içeren 1.5 cm.lik eksizyonel biyopsi örneği ile kontrol eksizyonel biyopsi örneği moleküler biyolojik incelemeler ve

histopatolojik incelenmeler için ayrılmıştır. Moleküler biyolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na, histopatolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir. (Toplam 6 rat)

3.2.2.2. Grup 2

Yara oluşturulduktan 3 gün sonra, anestezi için intramusküler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınarak gerçekleştirilen ölümden hemen sonra yara oluşturulan bölgenin uzağından kontrol biyopsi materyali alınmıştır. Yarayı ve çevresindeki sağlam dokuyu içeren 1.5 cm.lik eksizyonel biyopsi örneği ile kontrol eksizyonel biyopsi örneği moleküler biyolojik incelemeler ve histopatolojik incelenmeler için ayrılmıştır. Moleküler biyolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na, histopatolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir. (Toplam 6 rat)

3.2.2.3. Grup 3

Yara oluşturulduktan 5 gün sonra, anestezi için intramusküler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınarak gerçekleştirilen ölümden hemen sonra yara oluşturulan bölgenin uzağından kontrol biyopsi materyali alınmıştır. Yarayı ve çevresindeki sağlam dokuyu içeren 1.5 cm.lik eksizyonel biyopsi örneği ile kontrol eksizyonel biyopsi örneği moleküler biyolojik incelemeler ve histopatolojik incelenmeler için ayrılmıştır. Moleküler biyolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na, histopatolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir. (Toplam 6 rat)

3.2.2.4. Grup 4

Yara oluşturulduktan 7 gün sonra, anestezi için intramusküler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınarak gerçekleştirilen ölümden hemen sonra yara oluşturulan bölgenin uzağından kontrol biyopsi materyali alınmıştır. Yarayı ve çevresindeki sağlam dokuyu içeren 1.5 cm.lik eksizyonel biyopsi örneği ile kontrol eksizyonel biyopsi örneği moleküler biyolojik incelemeler ve histopatolojik incelenmeler için ayrılmıştır. Moleküler biyolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na, histopatolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir. (Toplam 6 rat)

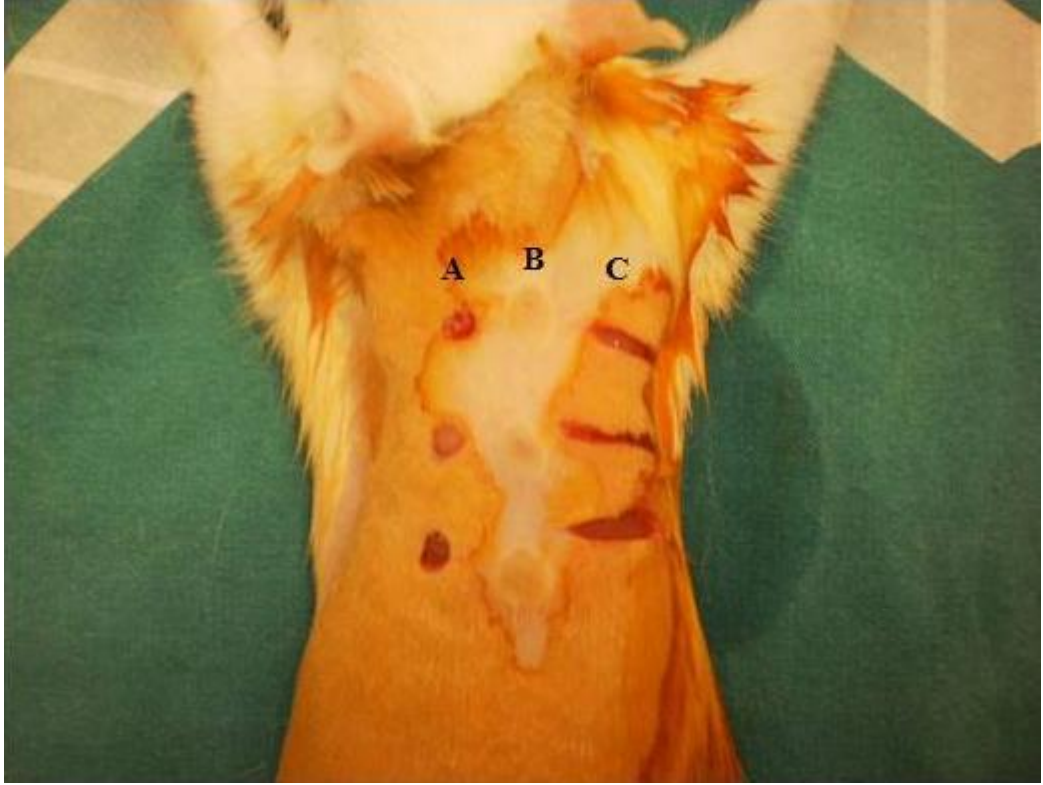
3.2.2.5. Grup 5

Yara oluşturulduktan 17 gün sonra, anestezi için intramusküler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınarak gerçekleştirilen ölümden hemen sonra yara oluşturulan bölgenin uzağından kontrol biyopsi materyali alınmıştır. Yarayı ve çevresindeki sağlam dokuyu içeren 1.5 cm.lik eksizyonel biyopsi örneği ile kontrol eksizyonel biyopsi örneği moleküler biyolojik incelemeler ve histopatolojik incelenmeler için ayrılmıştır. Moleküler biyolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na, histopatolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir. (Toplam 6 rat)

3.2.2.6. Grup 6

Yara oluşturulduktan 21 gün sonra, anestezi için intramusküler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben

intrakardiyak kan alınarak gerçekleştirilen ölümden hemen sonra yara oluşturulan bölgenin uzağından kontrol biyopsi materyali alınmıştır. Yarayı ve çevresindeki sağlam dokuyu içeren 1.5 cm.lik eksizyonel biyopsi örneği ile kontrol eksizyonel biyopsi örneği moleküler biyolojik incelemeler ve histopatolojik incelenmeler için ayrılmıştır. Moleküler biyolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na, histopatolojik incelemeler için ayrılan örnekler Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir. (Toplam 6 rat)



Resim 1: Ratın sırt bölgesinde oluşturulan yaralar. A- Punch ile, B- Koter ile, C- Bistüri ile oluşturulmuştur.

3.2.3. Rat epidermis dokusundan total RNA saflaştırılması

Deney sonunda steril bir şekilde çıkartılan cilt dokuları steril petri kabında, steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, RNA izolasyonuna uygun (50mg- 100mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrılmış, DNaz ve RNaz free 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurulmuştur. Cilt dokuları, analiz gününe kadar -80 °C'de saklanmıştır. Doku örneklerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıda yazılı olan protokol ile total RNA, kontaminasyonu engellemek amacı ile güvenlik kabininin içinde saflaştırılmıştır.

3.2.3.1. Dokudan RNA İzolasyon Protokolü

- 1- 1.5 ml' lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle veya mortar ile homojenize edildi. Örnekler çözünmeye başladığı anda tekrar sıvı azotta donduruldu ve homojenizasyon işlemine devam edildi.
- 2- Homojenizasyon işlemine 1000 ul TriFast ile devam edildi. (Doku büyüklüğü arttığı oranda kullanılan Trifast miktarıda arttırıldı). Örnek hacminin, homojenizasyon sırasında kullanılan TriFast hacminin %10'nu geçmemesine dikkat edildi.
- 3- Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- 4- 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca (tamamen karışincaya kadar) vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu.
- 5- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 6- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.

- 7- Başlangıçta kullanılan TriFast miktarının yarısı kadar izopropanol eklenip vortekslendi.
- 8- Örnekler 1 yada 1.5 saat -20 °C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı.
- 9- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 ul Dnaz (µg başına 5U Dnaz), 300 µl Dnaz Buffer I (200mM Tris-HCL (pH:8.4), 20mM MgCl₂, 500mM KCl) ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dakika 37 °C sıcaklığında bekletildi.
- 10- Örneklerin üzerine 300 µl 25mM EDTA eklendi ve 65 °C'de 10 dak bekletildi.
- 11- 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.
- 12- 1000 ul %75'lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.
- 13- Peletin üzerine tekrar 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.
- 14- Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı.

3.2.4. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de 260 nanometre (nm) dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak Random Hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hekzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Transcriptor Ters	10 ünite	0,5 µl
Transkriptaz		
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

3.2.4.1. Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 3'de belirtilen programa ayarlanarak cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 3: Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer	25 °C	10 dk	1 döngü
Bağlanması			
Ters	50 °C	60 dk	1 döngü
transkripsiyon			
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.5. Gen ifadenmesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8 ve Casp 9 genlerinin mRNA miktarları Real-time PCR yöntemi ile Light Cycler™ (LC) cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu, LightCycler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8 ve Casp 9 gen ifadenme miktarlarını normalize etmek için Beta actin (ACTB) mRNA düzeyi referans olarak alındı. Göreceli gen ifade edilme sonuçları “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı.

3.2.5.1. Bax Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Bax genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 5’de gösterilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 1

Use probe **#69** (cat. no. 04688686001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	479 - 498	59	50	cgagctgatcagaacctca
Right	18	575 - 592	59	61	ggggtcccgaagtaggaa

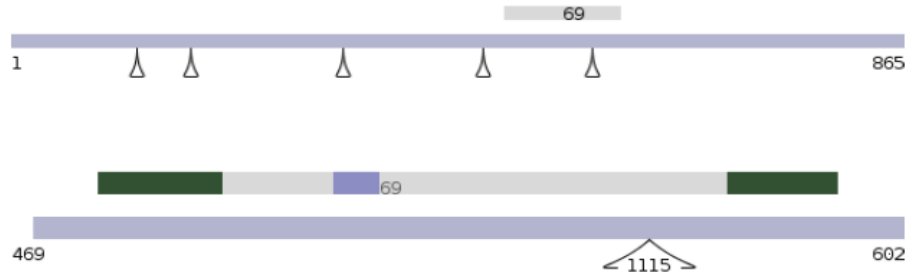
Amplicon (114 nt)

cgagctgatcagaacctcatgggtggacactggacttcctccgggagcgggtgcttgtctggatccaagaccagggtggctgggatg
gctcctttcctacttcgggacccc

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 1115 nt



Şekil 5: Bax mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000028328 giriş no'lu dizi).

3.2.5.2. Bcl-2 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Bcl-2 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 6'da gösterilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 1

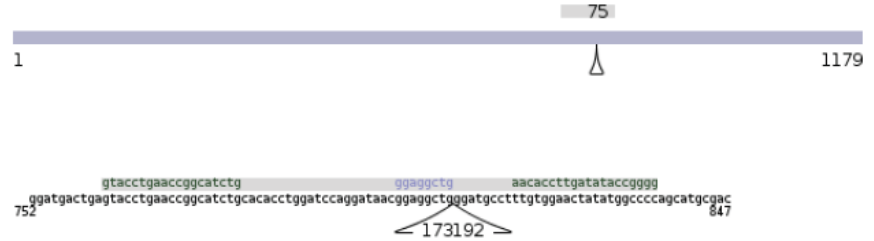
Use probe **#75** (cat. no. 04688988001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	762 - 780	59	58	gtacctgaaccggcatctg
Right	20	818 - 837	59	50	ggggccatatagttccacaa
Amplicon (76 nt)					
gtacctgaaccggcatctgcacacctggatccaggataacggaggctgggatgcctttgtggaactatatggcccc					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 173192 nt



Şekil 6: Bcl-2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000003768 giriş no'lu dizi).

3.2.5.3. Bcl-xl Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Bcl-xl genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 7'de gösterilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:

ENSRNOT00000010762.5|ENSRNOG00000007946.5 B2CL1_RAT Bcl-2-like protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P53563]

Assay rank 1

Use probe #2 (cat. no. 04684982001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	703 - 722	60	55	tgaccacctagagccttgga
Right	21	748 - 768	59	43	ttcccgtagagatccacaaa
Amplicon (66 nt)					
tgaccacctagagccttggaacaggagaacggcgctgggacactttgtggatctctacgggaa					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 47284 nt



Şekil 7: Bcl-xL mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000010762 giriş no'lu dizi).

3.2.5.4. Casp 3 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Casp 3 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 8'de gösterilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
ENSRNOT00000014095.4|ENSRNOG00000010475.4 Casp3 Caspase-3Caspase-3 subunit p17Caspase-3 subunit p12
 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P55213]

Assay rank 1

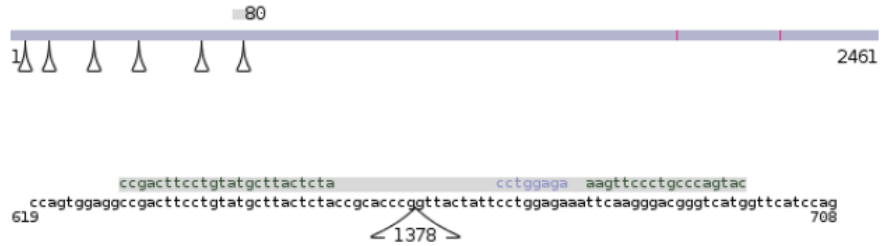
Use probe **#80** (cat. no. 04689038001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	24	629 - 652	59	46	cgcacttcctgtatgcttactcta
Right	18	681 - 698	60	56	catgaccogtcccttgaa
Amplicon (70 nt)					
ccgacttcctgtatgcttactctaaccgacccgggtactattcctggagaaattcaagggacgggtcatg					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 1378 nt



Şekil 8: Casp 3 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000014095 giriş no'lu dizi).

3.2.5.5. Casp 8 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Casp 8 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 9'da gösterilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:

AF279308.1|AF279308:EMBL|ENSRNOESTG00000803350:Ensembl-GO|ENSRNOG00000012331:Ensembl-

Gn|ENSRNOESTT00000803358:Ensembl-TO|ENSRNOT00000016613:Ensembl-Tr Rattus norvegicus caspase-8 (CASP8) mRNA, complete cds.

Assay rank 1

Use probe: #89 (cat. no. 04689143001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	1606 - 1626	59	52	agagcctgagggaaagatgtc
Right	22	1656 - 1677	60	45	tcacatcatagttcacgcagct
Amplicon (72 nt)					
agagcctgagggaaagatgtcctcgaggtgaggatattctcagcatcctgactggcgtgaactatgatgtga					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 1772 nt



Şekil 9: Casp 8 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000016613giriş no'lu dizi).

3.2.5.6. Casp 9 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Casp 9 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 10'da gösterilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 1

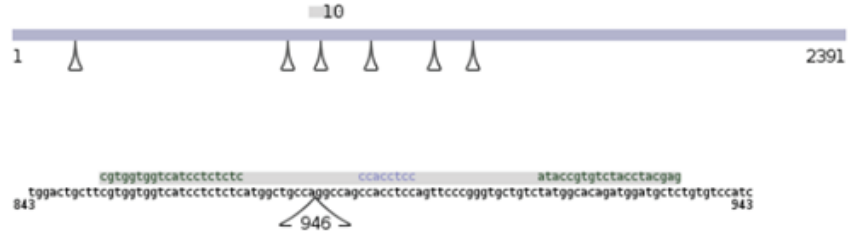
Use probe **#10** (cat. no. 04685091001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	853 - 872	60	60	cgtggtggtcatcctctctc
Right	20	914 - 933	59	50	gagcatccatctgtgccata
Amplicon (81 nt)					
cgtggtggtcatcctctctcatggctgccaggccagccacctccagttccgggtgctgtctatggcacagatggatgctc					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 946 nt



Şekil 10: Casp 9 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000017972 giriş no'lu dizi).

3.2.5.7. ACTB Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

ACTB genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 11'de gösterilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gehe_1

Assay rank 1

Use probe #17 (cat. no. 04686900001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	20 - 38	60	58	cccgcgagtacaaccttct
Right	18	74 - 91	60	56	cgtcatccatggcgaact
Amplicon (72 nt)					
cccgcgagtacaaccttcttgcagctcctcgcgtcgccggtccacacccgcaccagttcgccatggatgaacg					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 938 nt



Şekil 11: ACTB mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSRNOT00000042459 giriş no'lu dizi).

3.2.5.8. Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB

Genleri için Real-Time PCR Tepkime Karışımı

Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB genlerine uygun verilen primer ve probalar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB Real-time PCR tepkime karışımı.

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25 mM)	4mM	1.2µL
Primer F (10 pmol/µl)	2.5pmol	0.25µL
Primer R (10 pmol/µl)	2.5pmol	0.25µL
TaqMan prob (100 pmol/µl)	10pmol	0.1µL
LC TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.2.5.9. Light-Cycler (LC) Deney Programı

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi. Kapiller tüpler 3000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 5'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8 ve Casp 9 gen ifade düzeyleri ACTB ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 5: Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8, Casp 9 ve ACTB genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

Program 2 Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10	20
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0

Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

3.2.6. Histopatolojik İnceleme

Formaldehitte fikse edilen materyal, rutin metodlar kullanılarak parafin içerisinde bloklandı. Bu bloklardan 4-6 µ'luk kesitler hazırlandı. Apoptotik hücreler, TUNEL (TdT-dUTP terminal nick end-labeling) ile saptandı. TUNEL, ApopTag® Plus Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit (S7110, Chemicon International, Inc., Temecula, CA) kullanılarak gerçekleştirildi. Peroksidaz substratı 3,3' Diaminobenzidin (DAB) apoptotik hücreleri boyamak için kullanıldı. Çekirdeği boyamak için % 0.5'lik metil green kullanıldı. TUNEL pozitif hücreler (10 random sahadaki toplam apoptotik cisimcik sayısı) ışık mikroskobu ile saptandı ve aşağıdaki şekilde gruplandırıldı.

0 = Yok

1 = Hafif derecede (5'e kadar)

2 = Orta derecede (5-10 arası)

3 = Belirgin (10'un üzeri)

3.2.7. İmmünohistokimyasal İnceleme

Parafin kesitler deparafinize edildikten sonra, distile su ile rehidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi, % 3'lük Hidrojen Peroksitte 10 dakika bekletilerek bloke edildi ve örnekler distile su ile yıkandı. Antijen retrieval, pH 6,0 Citrate Buffer içerisinde, mikrodalgada yüksek sıcaklıkta 20 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra, slaytlar PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7,6) ile 5 dakika yıkandı. Protein blok damlatılıp 10 dakika bekletildikten sonra, doku kesitleri primer antikorlarda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi (Kaspaz 3, 8, 9, Bcl 2, Bcl XL ve Bax primer antikorları uygulandı. Caspase 3 Ab-4 neomarkers RB CITRAT RTU, Caspase 9 Ab-4

neomarkers RB 1205 citrat 1/50. Caspase 8 abcam ab4052 citrat 1/50. Bax p-19 santa cruze- sc526 citrat 1/100, Bcl-2 C21 santa cruze- sc783 citrat 1/100, Bcl-2-L1 abcam citrat 1/200 caspase 8 ve Bcl-2-L1 de zemin boyama olduğu için protein blok kullanıldı). PBS ile 5 dakika yıkandıktan sonra, doku kesitleri biotinylated sekonder antikorlar içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Sonra PBS ile 5 dakika yıkandı. Slaytlar, streptavidin/peroksidaz kompleksinde 20 dakika inkübe edildi ve PBS ile 5 dakika yıkandı. Kesitlere 3,3' Diaminobenzidin (DAB) kromojen damlatılıp 5 dakika bekletildi ve Hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Alkol ve xylenden geçirildi. Lamlar mounting balzamlı kapatıldı. İmmünboyanmanın kantitatif değerlendirilmesi için, analiz sistemi ataçmanlı fotoşık mikroskopta preparatlar değerlendirildi ve resimlendirildi. Yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri, aşağıdaki şekilde gruplandırıldı.

0 = Yok

1 = Hafif derecede (% 10'a kadar)

2 = Orta derecede (% 10-30 arası)

3 = Belirgin (% 30-50 arası)

3.2.8. Mikroskopik İnceleme

Bu çalışmada, sadece polimorfonükleer lökositler (PMNL), makrofajlar ve fibroblastlar mikroskopik olarak değerlendirildi. PMNL'ler, morfolojik olarak inflamatuvar mononükleer hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilir. Yuvarlak şekilli mononükleer hücreler (olasılıkla makrofajlar) ve fusiform şekilli mononükleer hücreler (olasılıkla fibroblastlar), immün boyama yapılmaksızın morfolojik olarak ayırt edilmeleri çok zor olduğu

için, inflamatuvar mononükleer hücreler (IMC) olarak tek grup altında toplandılar.

İmmun pozitif MNL ve PMNL sayıları, 10 rastgele seçilmiş alanda, yara bölgesinden alınan kesitlerde, 400 büyütme ile mikroskopik olarak saptandı ve aŗağıdaki şekilde gruplandırıldı.

- 0 = Yok
- 1 = Hafif derecede (10'a kadar)
- 2 = Orta derecede (10-50 arası)
- 3 = Belirgin (50'nin  zeri)

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Yara bölgelerinden alınan örneklerde ve kontrol örneklerinde kaspaz 3, 8, 9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA ifadelenmesine ait veriler REST (2005 Beta V1.9.9) ile karŗılaŗtırılmıŗtır. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edilmiŗtir.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluŗumunu takip eden 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde yara bölgesinde saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon, fibrozis elemanları, toplam apoptotik cisimcik sayıları ve kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL protein ifadelenme düzeylerinin karŗılaŗtırılmasında nonparametrik testlerden Friedman testi; gruplar arası karŗılaŗtırmalarda yine nonparametrik testlerden Kruskal Wallis testi kullanılmıŗtır. Elde edilen veriler SPSS for Windows 16.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois) istatistik programı kullanılarak deėerlendirilmiŗtir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edilmiŗtir.

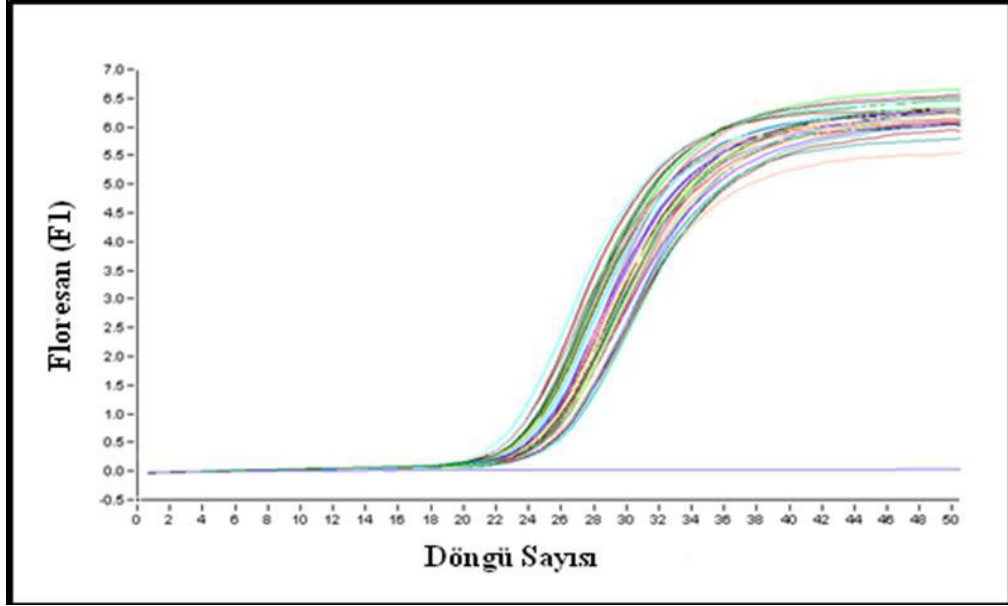
4. BULGULAR

4.1. Genetik Bulgular

4.1.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

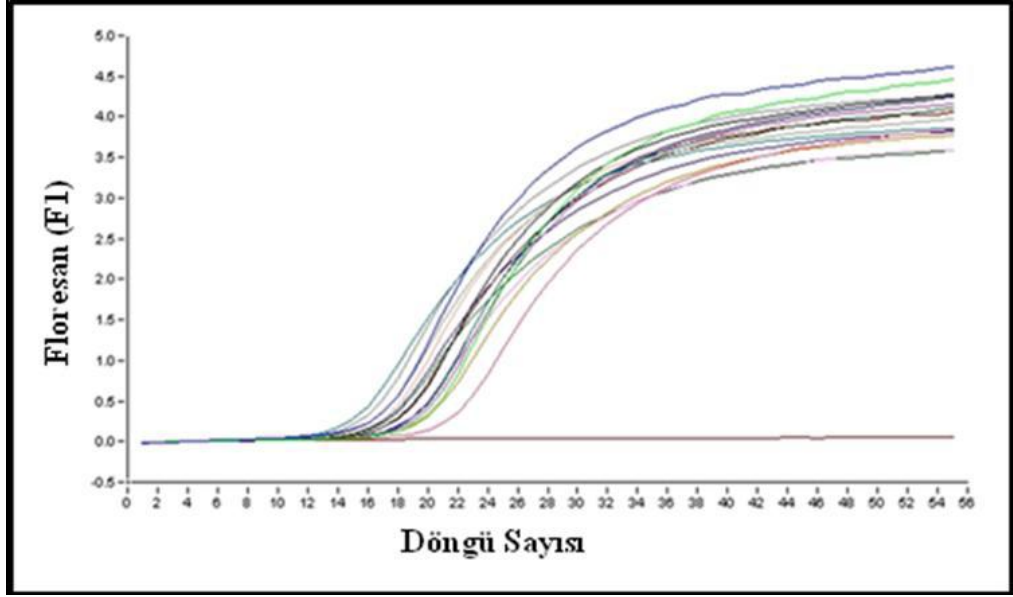
Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler cihazı kullanıldı. Punch, bistüri, koter ve kontrol gruplarına ait her bir cDNA örneğinde Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, Bcl-xL ve bu genlerin normalizasyonu için seçilen GAPDH genine özgül primerler ve UPL LNA probları kullanılarak çalışıldı.

Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 12’de gösterildi.



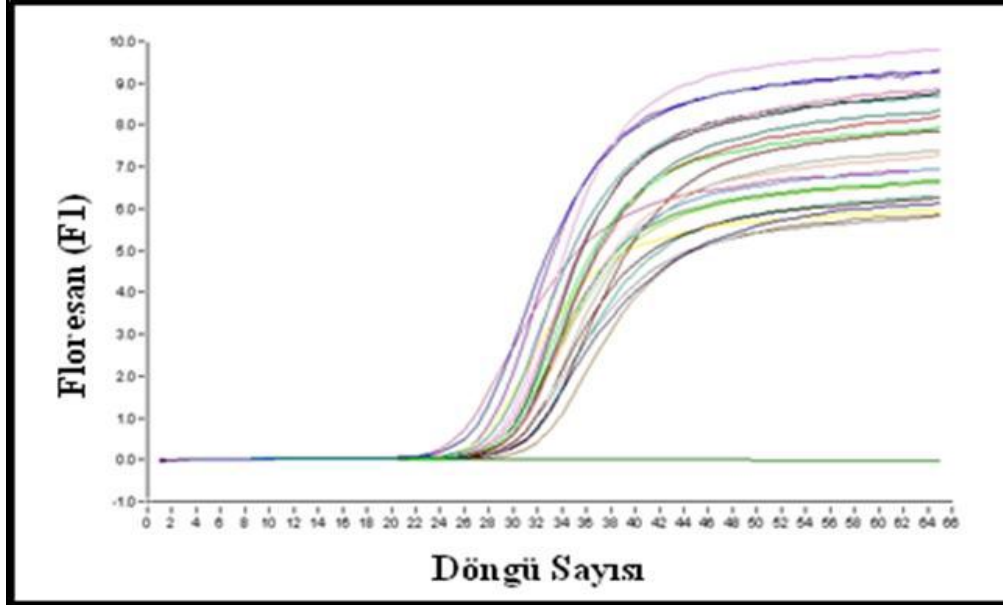
Şekil 12: Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Bax geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 13’de gösterildi.



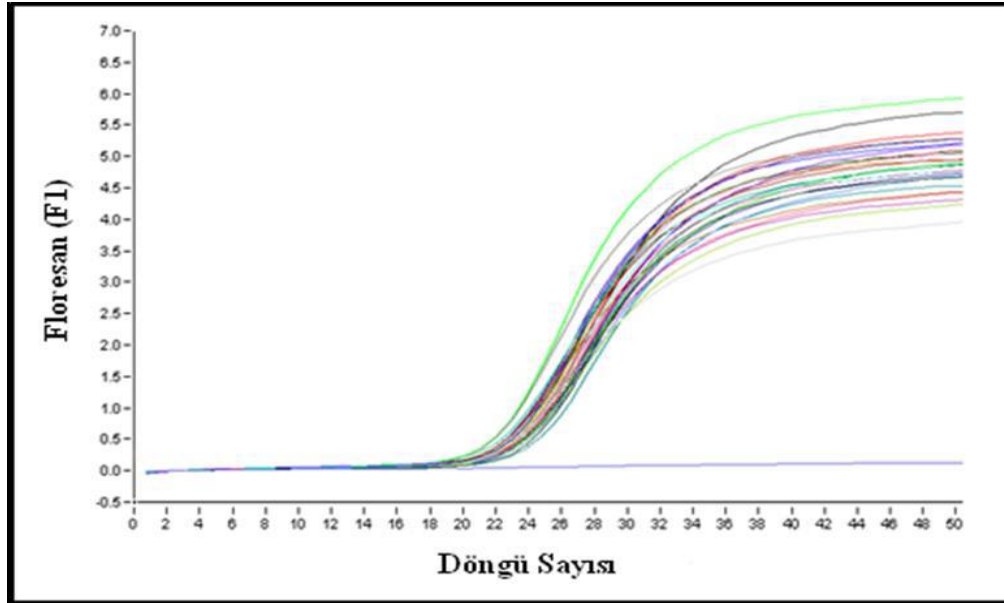
Şekil 13: Bax geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Bax geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 14’de gösterildi.



Şekil 14: Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 15’de gösterildi.



Şekil 15: GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta C_t(\text{kontrol-örnek})}}{E(\text{referans})^{\Delta C_t(\text{kontrol-örnek})}}$$

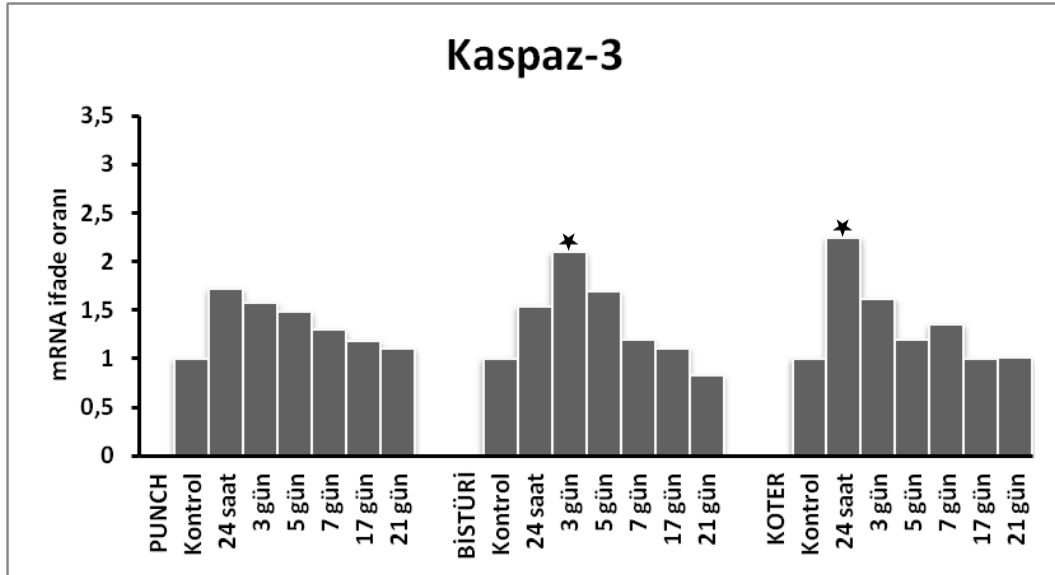
Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔC_t değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

4.1.2. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

4.1.2.1. Punch, bistüri ve koter ile oluşturulan yaraların iyileşme sürecinde Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL Genlerinin İfade Düzeylerindeki Değişim

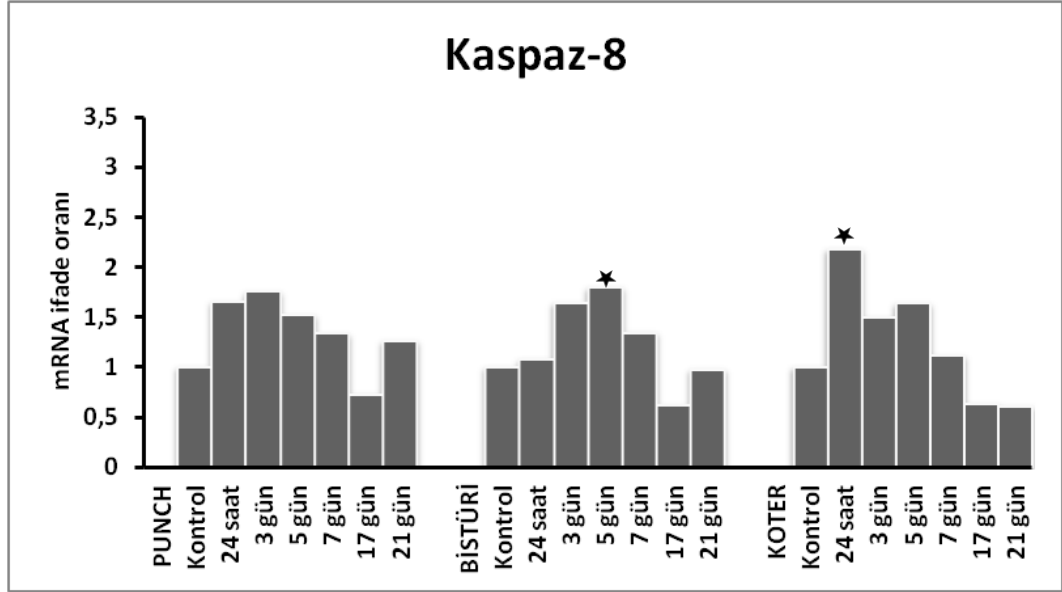
Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumundan sonra Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin ifade düzeylerinin zamana bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmesi yapıldı. Bu genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerdeki Kaspaz-3 mRNA ifade düzeyleri Grafik 1’de verilmiştir. Buna göre punch ile yara oluşumundan sonra apoptotik özellikteki Kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde 24 saatten sonra zamana bağlı olarak azalma görülürken, bu azalışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. günde Kaspaz-3 mRNA ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$). Bunun yanı sıra, yara iyileşmesini takip eden 5, 7, 17 ve 21. günlerde bir azalma görülürken, bu azalışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Koter ile yara oluşumunu sonrasında ise, 24. saatte Kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre anlamlı düzeyde bir artış belirlenirken ($p<0.05$). 24 saat sonrasında yara iyileşmesini takip eden 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde Kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde azalma gözlenirken, kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.



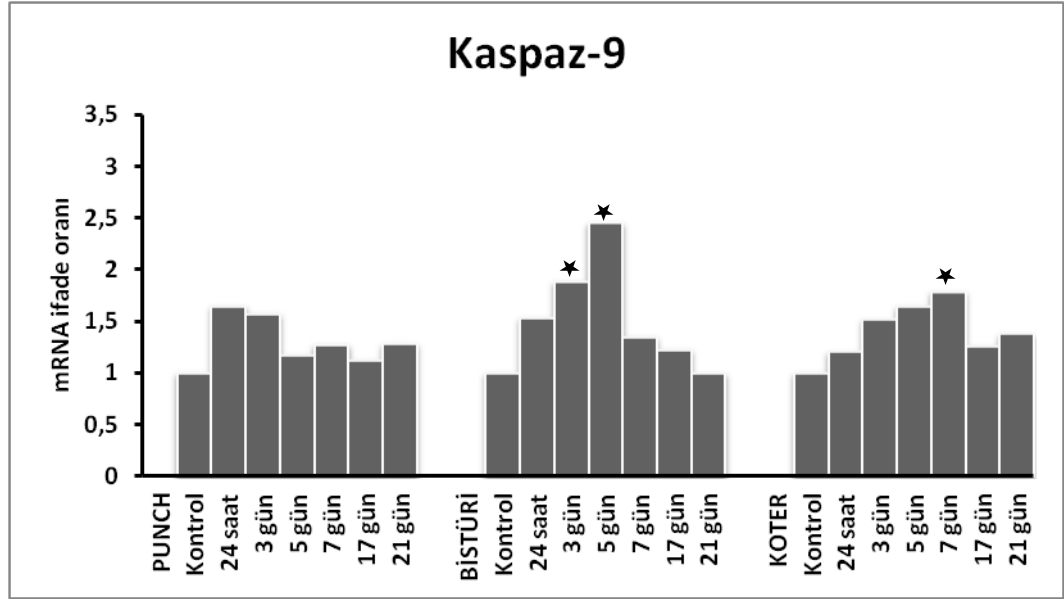
Grafik 1: Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p<0.05$.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerdeki Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyleri Grafik 2’de verilmiştir. Buna göre punch ile yara oluşumundan sonra apoptotik özellikteki Kaspaz-8 mRNA ifade düzeylerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bistüri ile yara oluşumunu takip eden 24. saatte ve 3. günde kontrole göre az da olsa bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Bunun yanı sıra 5. günde Kaspaz-8 mRNA’sı kontrole göre yaklaşık 1,8 kat artarken ($p<0.05$), yara iyileşmesini takip eden 7, 17 ve 21. günlerde görülen artış ve azalmaların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat sonunda Kaspaz-8 mRNA’sı kontrole göre 2.18 kat artarken ($p<0.05$), 24 saat sonrasında yara iyileşmesini takip eden diğer günlerde Kaspaz-8 mRNA ifade düzeylerinde görülen azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).



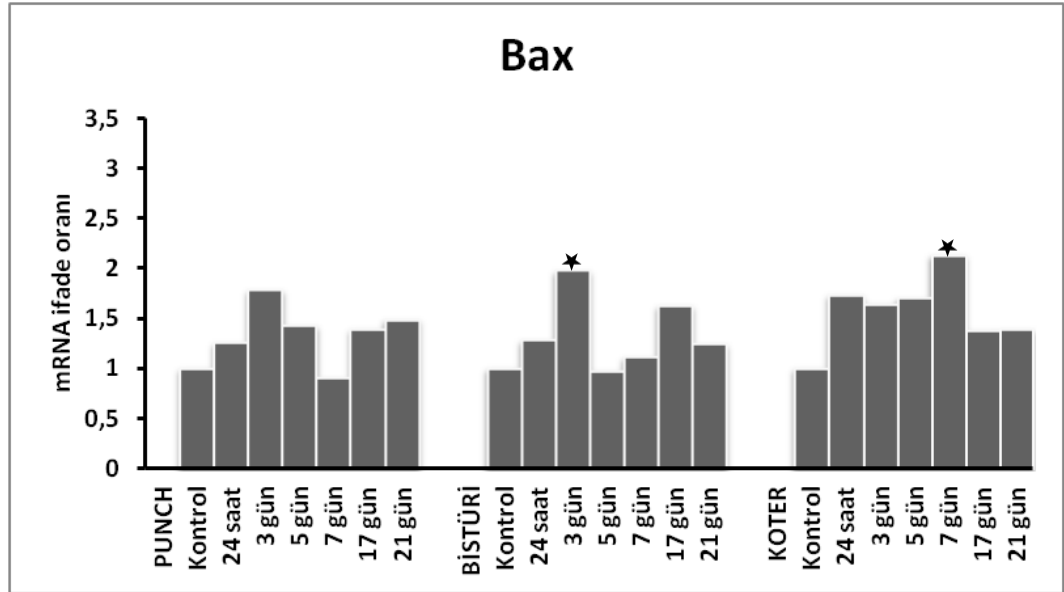
Grafik 2: Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Kaspaz-8 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p<0.05$.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerdeki Kaspaz-9 mRNA ifade düzeyleri Grafik 3'te verilmiştir. Buna göre punch ile yara oluşumundan sonra Kaspaz-9 mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmez iken, bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. ve 5. günlerde Kaspaz-9 mRNA ifade düzeyinde kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0.05$). Bunun yanı sıra yara iyileşmesini takip eden 7, 17 ve 21. günlerde Kaspaz-9 mRNA'sında görülen değişilerin kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 3. ve 5. günlerde Kaspaz-9 mRNA'sında kontrole göre az da olsa bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). koter ile yara oluşumunu takiben 7. gün sonunda ise Kaspaz-9 mRNA'sının kontrole göre 1.78 kat arttığı belirlendi ($p<0,05$).



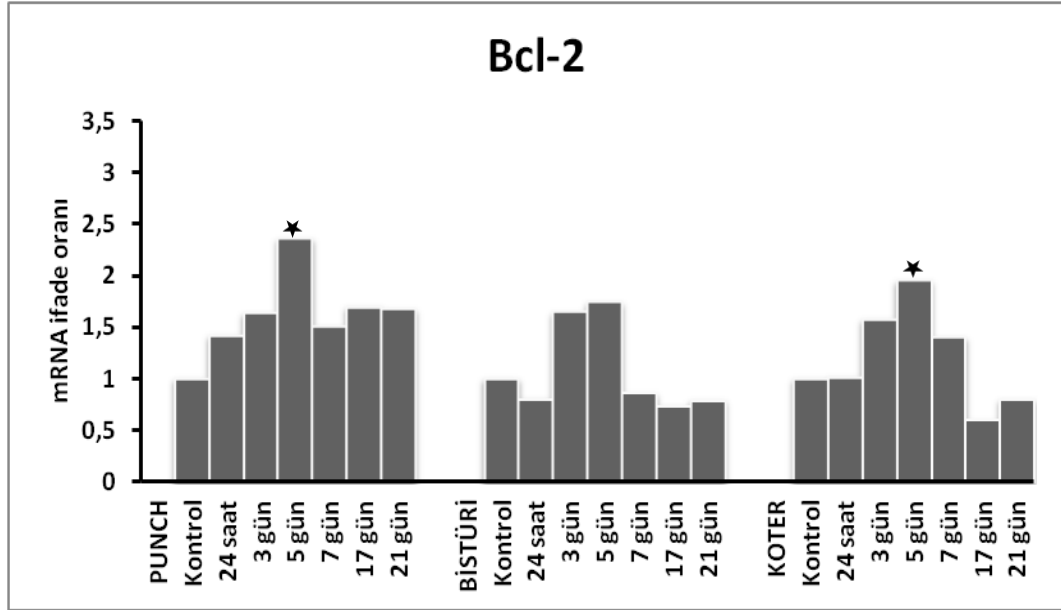
Grafik 3: Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Kaspaz-9 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p<0.05$.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerdeki Bax mRNA ifade düzeyleri Grafik 4’de verilmiştir. Buna göre punch ile yara oluşumundan sonra apoptotik özellikteki Bax mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, zamana bağlı olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. günde Bax mRNA ifade düzeyinde kontrole göre 1.97 kat arttığı gözlenirken ($p<0.05$), Diğer günlerde gözlenen değişimlerin kontrole oranla anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 3. ve 5. günlerin sonunda Bax mRNA ifade düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişiklik gözlenmez iken, 7. gün sonunda Bax mRNA düzeyinin kontrole göre 2.13 kat arttığı bulundu ($p<0.05$).



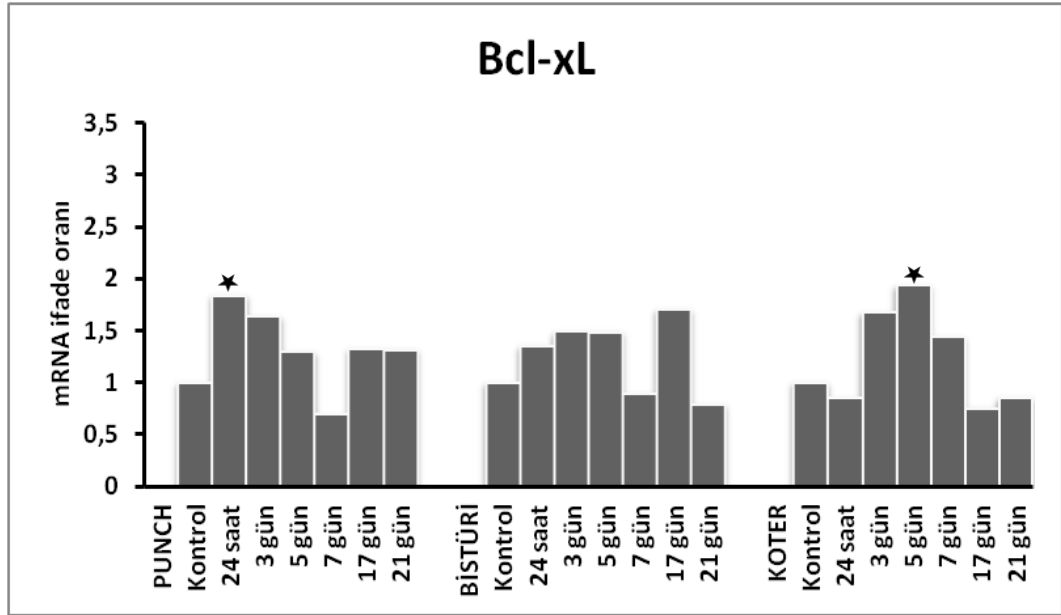
Grafik 4: Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Bax mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p<0.05$.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerdeki Bcl-2 mRNA ifade düzeyleri Grafik 5'te verilmiştir. Buna göre punch ile yara oluşumunu takip eden 24. saatte ve 3. günde kontrole göre az da olsa bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Bunun yanı sıra 5. günde Bcl-2 mRNA'sının kontrole göre 2,35 kat arttığı belirlenirken ($p<0.05$), 7, 17 ve 21. günlerde Bcl-2 mRNA düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. ve 5. günlerde Bcl-2 mRNA ifade düzeyinde kontrole göre görülen artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Yara iyileşmesini takip eden 7, 17 ve 21. günlerde ise Bcl-2 mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Koter ile yara oluşumunu takip eden 5. günde Bcl-2 mRNA ifade düzeyinin kontrole göre 1.94 kat arttığı bulunurken ($p<0.05$), yara iyileşmesini takip eden diğer günlerde Bcl-2 mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.



Grafik 5: Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Bcl-2 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p<0.05$.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerdeki Bcl-xL mRNA ifade düzeyleri Grafik 6'da verilmiştir. Buna göre punch ile yara oluşumunu takip eden 24. saatte anti-apoptotik özellikteki Bcl-xL mRNA'sı kontrole göre 1.84 kat artarken ($p<0.05$), diğer günlerde Bcl-xL mRNA ifade düzeyinde değişimlerin kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Bistüri ile yara oluşumu sonrasında Bcl-xL mRNA düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p>0.05$). Koter ile yara oluşumunu takip eden 3. günde kontrole göre az da olsa bir artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Koter ile yara oluşumunu takip eden 5. günde Bcl-xL mRNA'sının kontrole göre 1.94 kat arttığı gözlenirken ($p<0.05$), yara iyileşmesini takip eden diğer günlerde Bcl-xL mRNA ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p>0.05$).



Grafik 6: Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumu sonrasında Bcl-xL mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p < 0.05$.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızda, punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 24 saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde yara bölgesinde saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon ve fibrozis elemanları ve toplam apoptotik cisimcik sayıları (TUNEL + hücreler) Tablo 6, 8 ve 10'da, punch, bistüri ve koter ile oluşturulan yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri Tablo 7, 9 ve 11'de gösterilmiştir.

Tablo 6: Punch ile oluşturulan yara bölgesinden alınan kesitlerde, 10 rastgele seçilmiş alanda, 400 büyütme ile mikroskopik olarak saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon, fibrozis elemanları ve toplam apoptotik cisimcik sayıları.

PUNCH	PMNL	IMC	VASKÜLER PROLİFERASYON	FİBROZİS	Apoptag
24 saat	10-50 arası	10'a kadar	Yok	Yok	5'e kadar
3 gün	10-50 arası	10-50 arası	10-50 arası	10'a kadar	Yok
5 gün	10-50 arası	10-50 arası	50'nin üzeri	10'a kadar	5-10 arası
7 gün	10'a kadar	10-50 arası	50'nin üzeri	10-50 arası	Yok
17 gün	Yok	10'a kadar	10'a kadar	50'nin üzeri	5'e kadar
21 gün	Yok	10'a kadar	10'a kadar	50'nin üzeri	5'e kadar*

* p<0.05

Tablo 7: Punch ile oluşturulan yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikolları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri.

PUNCH	Bcl-2	Bax	Bcl-xL	Kaspaz 3	Kaspaz 8	Kaspaz 9
24 saat	%10-30 arası	% 10'a kadar	%30-50 arası	%10-30 arası	%10-30 arası	%10-30 arası
3 gün	%10-30 arası	%30-50 arası	%10-30 arası	% 10'a kadar	%10-30 arası	%10-30 arası
5 gün	%30-50 arası	% 10'a kadar	%10-30 arası	%10-30 arası	% 10'a kadar	% 10'a kadar
7 gün	% 10'a kadar	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
17 gün	%10-30 arası	%10-30 arası	% 10'a kadar	% 10'a kadar	Yok	Yok
21 gün	% 10'a kadar	%30-50 arası	%10-30 arası	Yok	%10-30 arası	% 10'a kadar

Tablo 8: Bistüri ile oluşturulan yara bölgesinden alınan kesitlerde, 10 rastgele seçilmiş alanda, 400 büyütme ile mikroskopik olarak saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon, fibrozis elemanları ve toplam apoptotik cisimcik sayıları.

BİSTÜRİ	PMNL	IMC	VASKÜLER PROLİFERASYON	FİBROZİS	Apoptag
24 saat	50'nin üzeri	10'a kadar	10'a kadar	Yok	Yok
3 gün	10-50 arası	10'a kadar	10-50 arası	10'a kadar	5'e kadar *
5 gün	10-50 arası	10-50 arası	50'nin üzeri	10-50 arası	10'un üzeri
7 gün	10'a kadar	10-50 arası	10'a kadar	10-50 arası	5'e kadar
17 gün	Yok	10'a kadar	10'a kadar	10-50 arası	Yok
21 gün	Yok	Yok	10'a kadar	50'nin üzeri	Yok

* p<0,05

Tablo 9: Bistüri ile oluşturulan yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri.

BİSTÜRİ	Bcl-2	Bax	Bcl-xL	Kaspaz 3	Kaspaz 8	Kaspaz 9
24 saat	% 10'a kadar	%10-30 arası	% 10'a kadar	% 10'a kadar	Yok	% 10'a kadar
3 gün	%30-50 arası	%30-50 arası	%30-50 arası	%10-30 arası	% 10'a kadar	%10-30 arası
5 gün	%10-30 arası	%10-30 arası	%10-30 arası	% 10'a kadar	%10-30 arası	%30-50 arası
7 gün	%10-30 arası	% 10'a kadar	% 10'a kadar	Yok	Yok	Yok
17 gün	% 10'a kadar	%10-30 arası	%30-50 arası	% 10'a kadar	Yok	Yok
21 gün	%10-30 arası	%30-50 arası	%10-30 arası	Yok	%10-30 arası	% 10'a kadar

Tablo 10: Koter ile oluşturulan yara bölgesinden alınan kesitlerde, 10 rastgele seçilmiş alanda, 400 büyütme ile mikroskopik olarak saptanan PMNL, IMC, vasküler proliferasyon, fibrozis elemanları ve toplam apoptotik cisimcik sayıları.

KOTER	PMNL	IMC	VASKÜLER PROLİFERASYON	FİBROZİS	Apoptag
24 saat	10-50 arası	10'a kadar	Yok	Yok	5'e kadar
3 gün	10-50 arası	10'a kadar	10'a kadar	Yok	Yok
5 gün	10'a kadar	10-50 arası	10-50 arası	10'a kadar	Yok
7 gün	10-50 arası	10-50 arası	50'nin üzeri	10-50 arası	10'un üzeri*
17 gün	10'a kadar	10-50 arası	50'nin üzeri	50'nin üzeri	Yok
21 gün	Yok	10'a kadar	50'nin üzeri	50'nin üzeri	Yok

* p<0.05

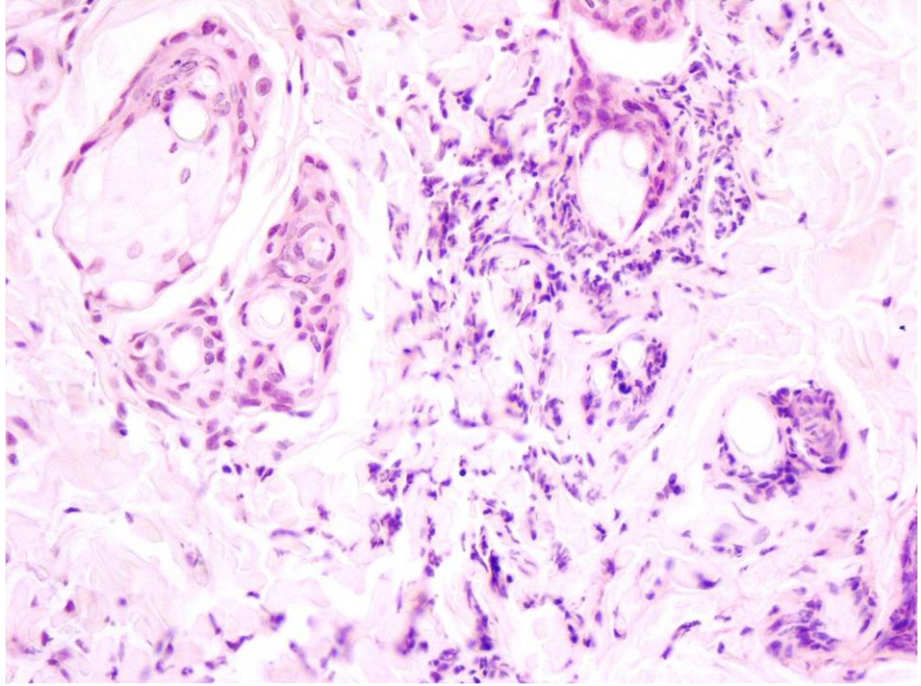
Tablo 11: Koter ile oluşturulan yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspase 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri.

KOTER	Bcl-2	Bax	Bcl-xL	Kaspaz 3	Kaspaz 8	Kaspaz 9
24 saat	% 10'a kadar	%10-30 arası	% 10'a kadar	%10-30 arası	%30-50 arası	% 10'a kadar
3 gün	%10-30 arası	%10-30 arası	%10-30 arası	% 10'a kadar	% 10'a kadar	%10-30 arası
5 gün	%30-50 arası	%10-30 arası	%30-50 arası	Yok	Yok	%10-30 arası
7 gün	%10-30 arası	%30-50 arası*	%10-30 arası*	% 10'a kadar	%10-30 arası	%10-30 arası*
17 gün	%10-30 arası	%10-30 arası	% 10'a kadar	Yok	% 10'a kadar	% 10'a kadar
21 gün	Dökülmüş	Dökülmüş	Dökülmüş	Dökülmüş	Dökülmüş	Dökülmüş

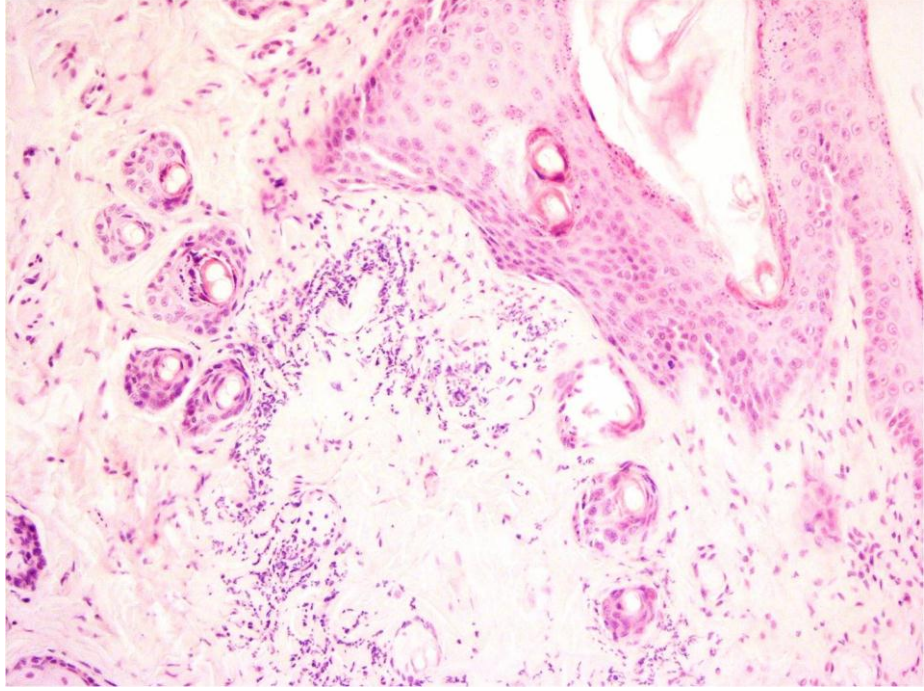
* p<0.05

Çalışmamızda, yaranın punch, bistüri veya koterle oluşturulmasından bağımsız olarak, yara oluşumunu takip eden 3. güne kadar yara bölgesinde PMNL hakimiyeti saptanmış olup, IMC'ler daha az sayıda görülmektedir (Resim 2, Resim 3). Dolayısıyla bu dönemde kaspaz

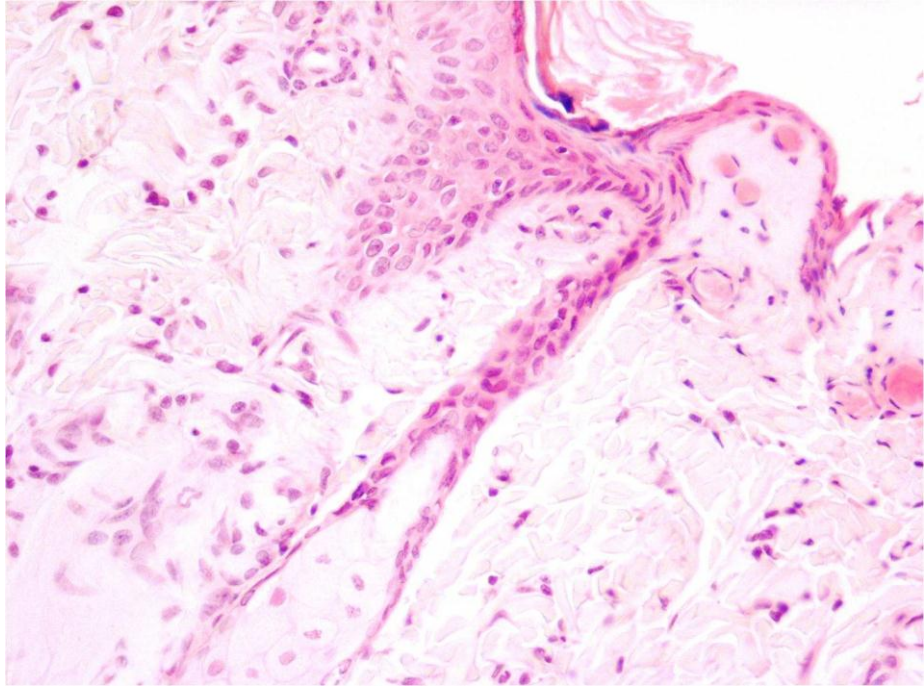
3, 8, 9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL antikorları ile pozitif boyanan hücreler PMNL'lerdir. 5 ve 7. günlerde PMNL ve IMC sayılarının eşitlendiği saptanmış olup (Resim 4), bu dönemde PMNL, makrofajlar ve fibroblastlar, kaspaz 3, 8, 9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL ile pozitif boyanmışlardır. 17 ve 21. günlerde PMNL hakimiyetinin azalarak yerini IMC hakimiyetine bıraktığı saptanmıştır (Resim 5). Bu dönemde ise söz konusu antikorlarla pozitif boyanan hücreler makrofaj ve fibroblastlardır. Vasküler proliferasyonun 5. güne kadar son derece az görüldüğü, 5 ve 7. günlerde maksimuma ulaştığı (Resim 6, Resim 7), 17 ve 21. günlerde giderek azaldığı saptanmıştır.



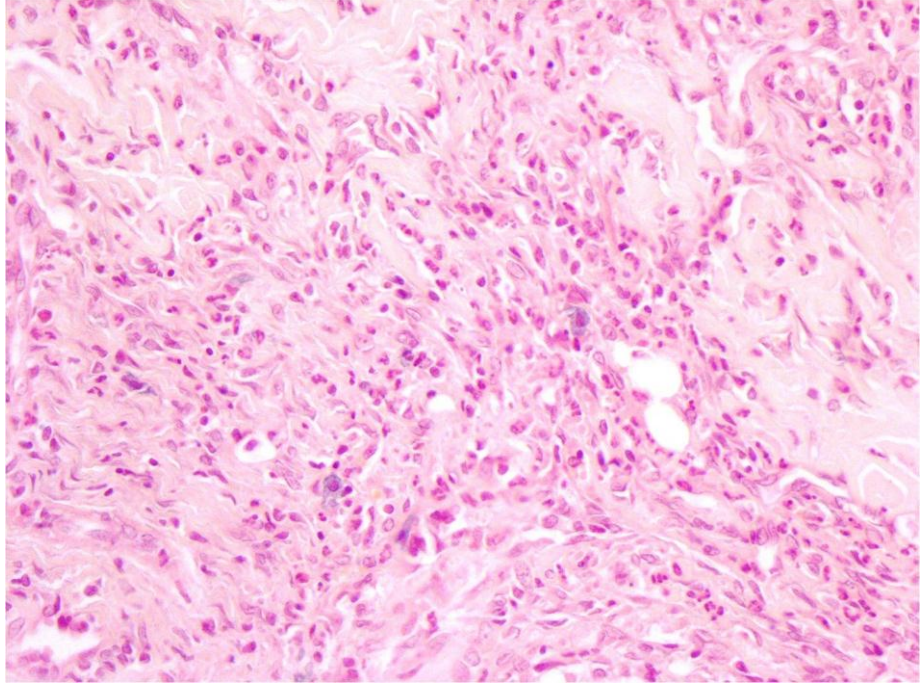
Resim 2: Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 24. saatte yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 400 büyütme ile PMNL hakimiyeti.



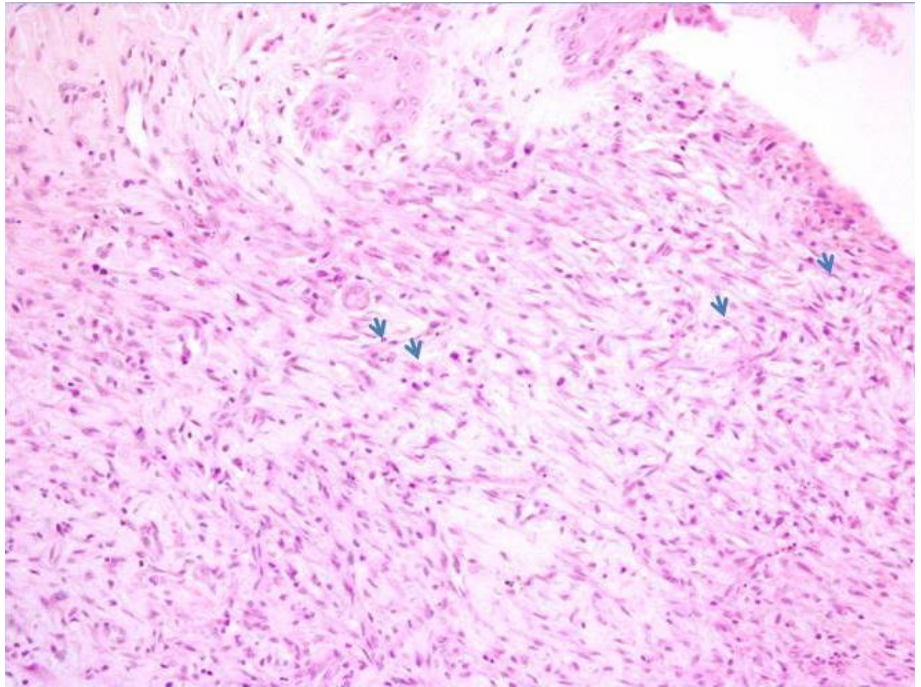
Resim 3: Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 3. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 200 büyütme ile PMNL hakimiyeti.



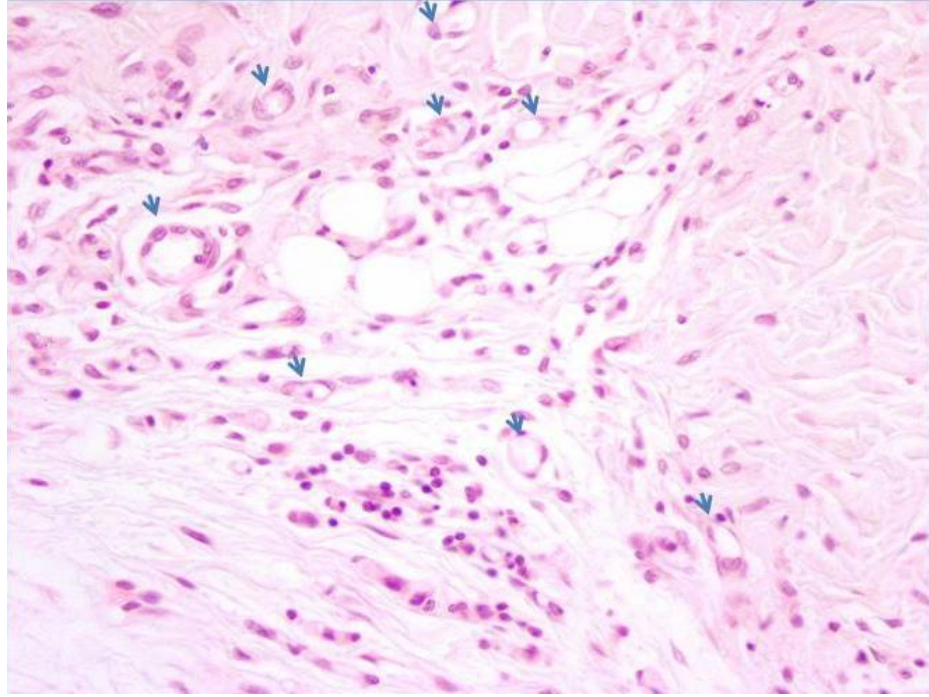
Resim 4: Punch ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 400 büyütme ile karışık tipte inflamasyon.



Resim 5: Koter ile yara oluşturulduktan sonraki 17. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 400 büyütme ile IMC hakimiyeti.



Resim 6: Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 5. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 200 büyütme ile vasküler proliferasyon.

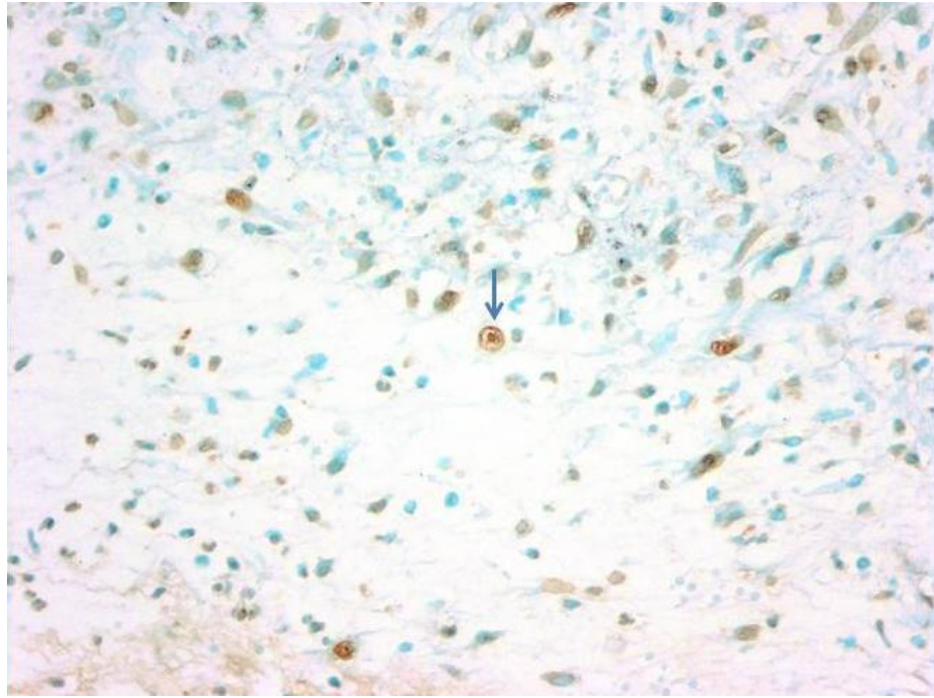


Resim 7: Punch ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitlerinde, 200 büyütme ile vasküler proliferasyon.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saatte, 5. ve 17. günlerde, yara bölgesinde saptanan PMNL, IMC ve apoptag sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 3. günde, yalnızca yara bölgesinde saptanan apoptag sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Bu fark bistüri ile yara oluşturulan gruptan kaynaklanmaktadır. Punch ve koterle oluşturulan yara bölgesinde, 3. günde, TUNEL pozitif hücreye rastlanmazken, bistüri ile oluşturulan yara bölgesinde, hafif derecede (5'e kadar) TUNEL pozitif

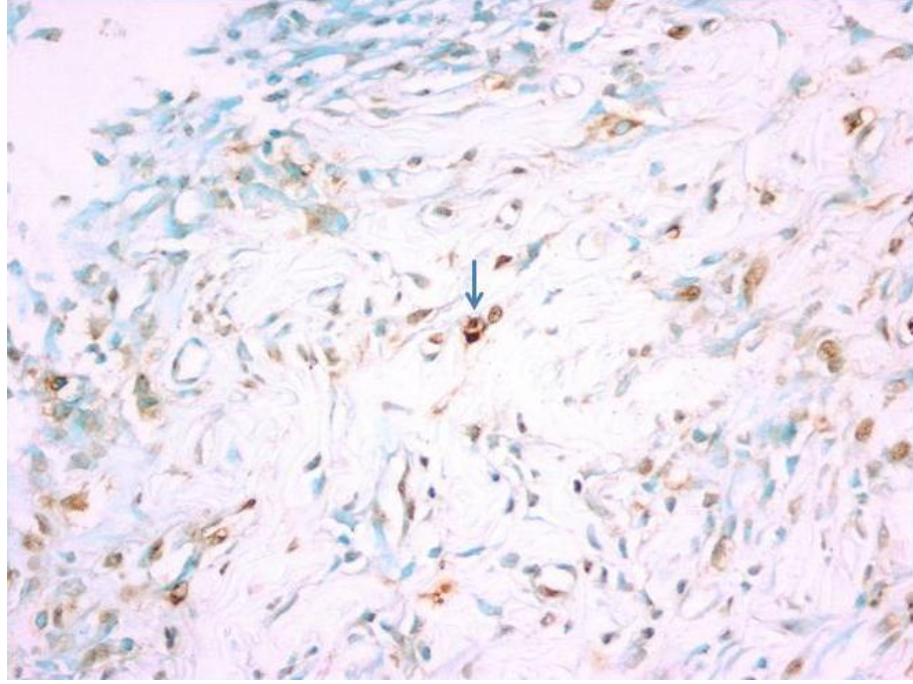
hücre saptanmıştır (Resim 8). Yara bölgesinde saptanan PMNL ve IMC sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikoları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).



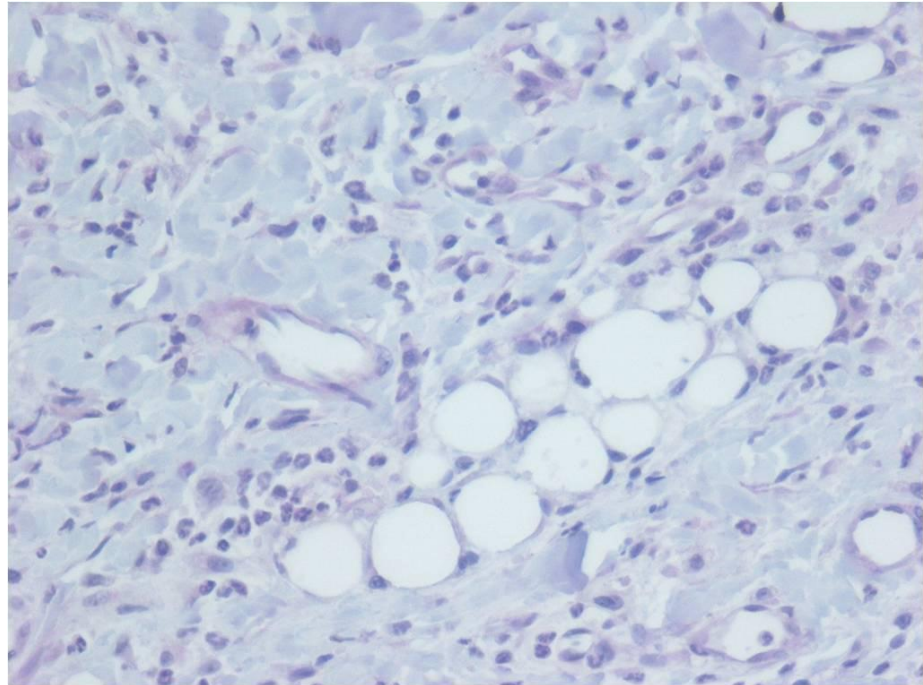
Resim 8: Bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 3. günde yara bölgesinden alınan örneklerde, 400 büyütmede TUNEL ile saptanan apoptotik hücreler.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde, yara bölgesinde saptanan apoptag sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Bu fark koter ile yara oluşturulan gruptan kaynaklanmaktadır. Punch ile oluşturulan yara bölgesinde, 7. günde, TUNEL pozitif hücreye rastlanmazken, bistüri ile oluşturulan yara bölgesinde, hafif derecede (5'e kadar), koter ile oluşturulan yara bölgesinde ise, belirgin derecede (10'un üzeri) TUNEL pozitif hücre saptanmıştır (Resim 9). Yara bölgesinde saptanan PMNL ve IMC sayıları

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspaz 9, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup ($p<0.05$), bu fark koterle yara oluşturulan gruptan kaynaklanmaktadır. Yara oluşturulduktan sonraki 7. günde, punch ve bistüri ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin hiçbirisi kaspaz 9 antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanmazken, koter ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin %10-30'u kaspaz 9 antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanmışlardır (Resim 10). Punch ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin hiçbirisi Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanmazken, bistüri ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin %10'a kadar olan kısmı ve koter ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin %10-30'u Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanmışlardır. Punch ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin hiçbirisi Bax antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanmazken, bistüri ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin %10'a kadar olan kısmı ve koter ile oluşturulan yara bölgelerinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin %30-50'si Bax antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanmışlardır. Kaspaz 3, 8 ve Bcl-2 antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).



Resim 9: Koter ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerde, 400 büyütmede TUNEL ile saptanan apoptotik hücreler.



Resim 10: Koter ile yara oluşturulduktan sonraki 7. günde yara bölgesinden alınan örneklerde, 400 büyütmede, kaspaz 9 antikorları ile immünhistokimyasal olarak boyanan PMNL ve IMC'ler.

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 21. günde, yara bölgesinde saptanan apoptag sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Bu fark punch ile yara oluşturulan gruptan kaynaklanmaktadır. Bistüri ve koterle oluşturulan yara bölgesinde, 21. günde, TUNEL pozitif hücreye rastlanmazken, punch ile oluşturulan yara bölgesinde, hafif derecede (5'e kadar) TUNEL pozitif hücre saptanmıştır. Yara bölgesinde saptanan PMNL ve IMC sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde ve kontrol gruplarında saptanan PMNL ve IMC sayıları arasında ve yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bax ve Bcl-xL antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Punch ve bistüri ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde ve kontrol gruplarında saptanan apoptag sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde ve kontrol gruplarında saptanan apoptag sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Bu fark yara oluşumundan sonraki 7. günden kaynaklanmaktadır. Koter ile yara oluşumundan sonraki 24. saat, 3, 5, 17 ve 21. günlerde yara bölgesinde TUNEL pozitif hücreye rastlanmazken, 7 günde belirgin derecede (10'un üzeri) TUNEL pozitif hücre saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Adli Tıp uygulamalarında hekimlerin sıklıkla karşılaştıkları yara grubu, ezici alet yaraları olup darp olayları da bu grupta değerlendirilmekte ve taş, sopa, tekme, yumruk gibi aletlerle, abrazyon, ekimoz, laserasyon ve hematomlar meydana gelebilmektedir ². Darp olaylarında genellikle bir kesici alet de olaya dahil olduğundan mağdurun vücudunda, yukarıda sözü edilen yaralara ek olarak kesi yaraları da görülebilmektedir. Elektrik çarpması sonucu meydana gelmiş yaralara ise, erişkinlerde özellikle iş yerinde meydana gelen kazalara ve çocuklarda ev kazalarına bağlı olarak sıklıkla rastlanmaktadır ²⁴. Çalışmamızda kullandığımız yara modellerini oluştururken, yaptığımız literatür araştırması sonucunda, hekimlerin pratik uygulamalarında sık olarak karşılaştıkları, ezici alet, kesici alet ve elektrik çarpmaları sonucu oluşan yaraları, hayvan modeline punch, bistüri ve koter kullanarak uyarladık. Böylelikle, ratın sırtında punch ile oluşturduğumuz yara, ezici aletle oluşan laserasyon yarasını, bistüri ile oluşturduğumuz yara kesici alet yarasını ve koter ile oluşturduğumuz yara elektrik çarpması sonucu oluşan yarayı temsil etti ²⁵⁻²⁹.

Normal yara iyileşmesi sürecinde, hiperselüler granülasyon dokusunun selülaritesinde azalmanın sonucu olarak skar dokusu meydana gelir. Apoptoza bağlı olarak meydana gelen selülaritede azalma, granülasyon dokusundan skar dokusuna dönüşüm sürecinde ana rol üstlenir ³⁰. Bax proapoptotik özellikte iken, Bcl-2'nin antiapoptotik özelliği gösterilmiştir ³¹. Bax, Bcl-2'ye bağlanarak Bax/Bcl-2 heterodimerlerini ya da kendine bağlanarak Bax/Bax homodimerlerini oluşturur. Bax'ın aşırı ifadelendiği hücrelerde, apoptotik uyarıya karşı hassasiyet artar ve hücre ölümü uyarılır ³². Moulin ve arkadaşları, hipertrofik skar ve normal yara iyileşmesi alanlarından elde edilen miyofibroblast kültürlerinde yaptıkları çalışmada, Bcl-2 mRNA ifadelenme düzeylerini yüksek oranda

bulmuşlardır ³³. Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada, 20 keloid dokusundan 19'unda, Bcl-2 mRNA düzeylerinde belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir ³⁴. Zorba ve arkadaşlarının, tunica albugenia ve erektil dokularda fibröz plak oluşumuna yol açan, lokalize konnektif doku hastalığı olan Peyronie hastalığına sahip 8 kişide yaptıkları çalışmada, tunica albugeniada meydana gelen plak dokularında Bcl-2 mRNA seviyelerinde artış saptanmıştır ³⁵.

Çalışmamızda, punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde, Bax mRNA ifadenme düzeylerinde düzensiz bir artış saptanmış olup, bu artışın bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. gün ve koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Punch ile yara oluşumunu takip eden günlerde, Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde genel olarak artış saptanmış olmasına rağmen, 5. gündeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0.05$), sonraki günlerde ise giderek düşmüştür. Bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saatte Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde kontrole göre düşüş gözlenirken, 3 ve 5. günlerde artma meydana gelmiş, yara iyileşmesinin ilerleyen günlerinde kontrole göre yeniden düşüş saptanmıştır. Bu değerlerin hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bulgularımızla benzer şekilde, Jiang ve arkadaşları, evre III bası yarası bulunan hastalardan aldıkları örnekler ile kontrol grubunu karşılaştırdıkları çalışmada, yaranın merkezinde ve kenarlarında artan Bax ifadenmesi ile birlikte, Bcl-2 ifade düzeylerinde de düşüş saptamışlardır ³². Watson ve arkadaşları ile Greenhalgh, diyabetik ayak yaraları bulunan hastalardan alınan dokularda yaptıkları analizlerde benzer sonuçlara ulaşmışlardır ^{36,37}. Yine Yang ve arkadaşlarının, subtotal nefrektomi sonrası rat böbrek dokusunda yaptıkları çalışmada, Bax mRNA düzeylerinin postoperatif 7. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığını, bu artışın 60 ve 120. günlerde pik yaptığını, buna karşılık Bcl-2 mRNA düzeylerinin ise

kontrol grubuna göre düşük seyrettiği ve 7. günden itibaren giderek azaldığı saptanmıştır ³⁸. Hattori ve arkadaşları, subtotal nefrektomi sonrası Bax mRNA düzeylerinin zamanla arttığını bildirmişlerdir ³⁹. Chen ve arkadaşlarının, laparotomi sonrası rat süperior mezenterik arterine klempe koyarak incebağırsaklarda iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturdukları çalışmada, iskemi ve reperfüzyon sonrası intestinal villüslerde, Bax mRNA düzeylerinde dikkate değer ve hızlı bir artış belirlenmiş, ve bu artışın reperfüzyondan bir saat sonra en yüksek düzeye ulaştığı, sonrasında giderek azaldığı, Bcl-2 mRNA düzeylerinin ise belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ⁴⁰. Kane ve arkadaşlarının diyabetik farelerde kutanöz yara oluşturarak yaptıkları çalışmada, Bcl-2 mRNA'sının yara oluşturulduktan sonraki 3. güne kadar saptanmadığı, 14. günden sonra en yüksek düzeye ulaştığı ve 21 ile 42. günler arasında yavaş yavaş düşerek hasara uğramamış dokudaki konsantrasyonuna eriştiği bildirilmiştir ⁴¹. Yine yapılan başka bir çalışmada da, ülseratif koliti olan 26 hastada inflamasyona karşı koruyucu rolü olan milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8)'den yoksun intestinal epitelyal hücrelerde, antiapoptotik Bcl-2 mRNA düzeylerinde düşüş, proapoptotik Bax mRNA düzeylerinde ise artış saptanmıştır ⁴². Çalışmamızın ve bu konuda yapılan diğer çalışmaların sonuçları, yara iyileşmesi sürecinde proapoptotik Bax mRNA düzeylerinin artarak apoptozu uyardığı, antiapoptotik Bcl-2 mRNA düzeylerinin ise, yara iyileşmesinin erken ve geç dönemlerinde azalarak apoptozun uyarılmasına dolaylı olarak katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Kaspazlar olarak adlandırılan serin proteazlar, apoptozda hücre ölüm sinyalinin son fazını oluştururlar ve apoptozun baskılanması ve uyarılmasında anahtar rol oynarlar. Kaspaz aktivasyonu apoptozun uyarılması ile ilişkili olup baskılanması ise apoptozun durması ile bağlantılıdır ³⁵. İçsel ve dışsal yolların son basamağını oluşturan kaspaz 3, apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan efektör kaspazdır ⁴³. Kaspaz 3 aktivasyonu içsel ve dışsal yolların birleşme noktasıdır ³⁵. Fas ve TNF

gibi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla başlatılan dışsal yolak, kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazları sırasıyla aktive eden kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar. İçsel yolak ise, mitokondriden salınan ve kaspaz aktive edici protein olan APAF1'e bağlanarak prokaspaz 9'un aktive olmasını sağlayan sitokrom c tarafından uyarılır ⁴⁴.

Çalışmamızda, her üç yara grubunda, yara oluşturulduktan sonraki süreçte kaspaz 3 mRNA ifadenme düzeylerinde düzensiz bir artış görülmekte olup, bistüri ile yara oluşturulan grupta 3. gündeki ve koter ile yara oluşturulan grupta 24. saatteki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Her üç yara grubunda, 7. güne kadar kaspaz 8 mRNA ifadenme düzeylerinde düzensiz bir artış görülmekte olup, bistüri ile yara oluşturulan grupta 5. günde ve koter ile yara oluşturulan grupta 24. saatteki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Her üç grupta da 17. günde kontrole göre düşüş saptanmışken, 21. günde punch ile yara oluşturulan grupta artış, diğer iki grupta kontrole göre düşüş gözlenmiştir. Her üç grupta, yara oluşturulduktan sonraki dönemlerde kaspaz 9 mRNA ifadenme düzeylerinde düzensiz bir artış görülmekte olup, bistüri ile yara oluşturulan grupta 3 ve 5. günlerdeki ve koter ile yara oluşturulan grupta 7. gündeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Literatüre bakıldığında, yara iyileşmesinde meydana gelen bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan klinik bulgulara, genel olarak apoptozun inhibisyonu ve kaspazların ifadenme düzeylerinde düşüş saptandığı bildirilmektedir. Çalışmamızda da, literatürü destekler şekilde, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan apoptozu uyaran kaspazların ifadenme düzeylerinde genel olarak bir artış söz konusudur. Chodon ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, normal ve keloidal fibroblastlarda apoptozun, farmakolojik bir ajanla uyarılmasını takiben, kaspaz 3 aktivasyonu sadece normal fibroblastlarda saptanmıştır ⁴⁵. Zorba ve arkadaşlarının, yukarıda bahsedilen çalışmalarında, tunica albugeniada meydana gelen plak

dokularında, Peyronie hastalarının tunica albugeniasında genel olarak apoptotik inhibisyonun var olduğu izlenimini uyandıracak şekilde, kaspaz 3 mRNA düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir ³⁵. Zorba ve arkadaşları, Peyronie plaklarında kaspaz 8 mRNA düzeylerinde azalma saptamışlardır ³⁵. Glikoprotein üretiminin son ürünleri (AGE), retinal perisitler, korneal endotelial hücreler, nöronal hücreler ve renal mezengial hücrelerde, oksidatif stresi artırarak ya da proapoptotik sitokinlerin ifadenmesini uyarak proapoptotik özellik gösterirler. CML kollagen, asitte çözünen sığır deri kollageninin kimyasal modifikasyonu yolu ile elde edilen en yaygın AGE'dir. Modifiye edilmemiş kollajenden farklı olarak, büyük ölçüde, efektör kaspaz olan ve kaspaz 8'e bağımlı sitoplazmik ve kaspaz 9'a bağımlı mitokondriyal yollarla aktive olan kaspaz 3 ile ilişkili fibroblast apoptozunu, zamana ve doza bağılı olarak artırır. Yaşlanma ve diyabet AGE oluşumu ile karakterize olup her iki grupta da görülen yara iyileşmesinde bozukluk, fibroblast proliferasyonunda ve yaşam süresinde azalmaya bağılı olarak yüksek oranda saptanan fibroblast apoptozu ile ilişkilidir. Fibroblastlar özellikle ciltte yara iyileşmesinde çok önemli roller üstlenirler. Yara bölgesine göç ederler, proliferer olurlar ve yeni matriksi oluştururlar ⁴⁶. Alikhani ve arkadaşları, insan erişkin dermal fibroblast kültürlerinde yaptıkları çalışmada, bu hücrelerdeki apoptozu, sitoplazmalarındaki histon ile bağılı DNA parçalarının miktarını, ELİSA yöntemi ile saptayarak değerlendirmişlerdir. AGE ile indüklenen apoptozun 6 saatten önce saptanmadığı, 6. saatte apoptozda 1.7 kat, 24. saatte 3 kat artış saptandığı ve bu artışların istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu, 200 µg/ml CML kollagen verildiğinde, modifiye edilmemiş kollajene göre apoptozda 3 kat, 400 µg/ml verildiğinde 5 kat artış saptandığını, CML kollajen verilerek apoptozun uyarıldığı grupta, fluorometrik analizlerle kaspaz 3 aktivitesinin 5 kat, kaspaz 8 aktivitesinin 4.3 kat ve kaspaz 9 aktivitesinin 3.2 kat arttığını bildirmişlerdir ⁴⁶. Yamagishi ve arkadaşları ile Honda ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, AGE'lerin, retinal epitelyal hücreler ve perisitlerde Bcl-2 mRNA düzeylerini düşürdükleri

bildirilmiştir ^{47, 48}. Yamagishi ve arkadaşlarının aynı yıl yaptıkları diğer bir çalışmada ise, insan mezengial hücre kültürlerinde, AGE ile uyarılan apoptozda Bax mRNA düzeylerinde artış saptamışlardır ⁴⁹.

Hipertrofik skar dokusunda, yüksek miktarda ifade edilen secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2), fibroblast apoptozunu, kaspaz 3 bağımlı yolak üzerinden baskılar. Diğer taraftan, SFRP2'yi hedefleyen shRNA, kaspaz 3'ü downregüle eder ⁵⁰. Sun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ciddi şekilde yandıktan sonra iyileşen hastaların hipertrofik skar dokularından elde edilen fibroblastlar SFRP2 knockdown hale getirildiklerinde kaspaz 3 aktivitesinde belirgin artış saptanmıştır ⁵⁰.

Bu tez çalışmasında, yara bölgesinden alınan dokularda yapılan seri kesitlere TUNEL yöntemi uygulanarak apoptotik hücre sayıları saptanmıştır. Buna göre; punch, bistüri ve koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 5 ve 17. günlerde, rastgele seçilmiş 10 alandaki TUNEL pozitif hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. gün, koter ile yara oluşumunu takip eden 7. gün ve punch ile yara oluşumunu takip eden 21. günde, TUNEL pozitif hücre sayılarında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Ayrıca, koter ile yara oluşumunu takip eden 24. saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde ve kontrol gruplarında saptanan TUNEL pozitif hücre sayıları karşılaştırıldığında, 7. günde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Çalışmamızın sonuçları, apoptotik hücre sayılarının dolayısı ile apoptozun yüksek olarak izlendiği, bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. günde, apoptozu uyaran Bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mRNA ifadenme düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulunduğunu, antiapoptotik özellikteki Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde ise anlamlı bir artış olmadığını, yine apoptotik hücre sayılarının yüksek olarak izlendiği, koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde, apoptozu uyaran Bax ve kaspaz 9 mRNA ifadenme

düzeylerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığını, antiapoptotik özellikteki Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde ise düşüş saptandığını göstermiştir. Ayrıca koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde, yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, proapoptotik özellikteki kaspaz 9 ve Bax antikolları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Apoptozun yüksek olarak izlendiği, punch ile yara oluşumunu takip eden 21. günde, proapoptotik özellikteki kaspaz 3, 8, 9 ve Bax mRNA ifadenme düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış saptanmıştır. Literatüre baktığımızda; Jiang ve arkadaşları bası yarasının merkezinde ve kenarlarında düşük Bcl-2, güçlü Bax ve TUNEL ifadenmesi gözlemişlerdir ³². Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, reperfüzyonu takip eden bir saate kadar, TUNEL pozitif hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmamış, 12. saatte maksimum artış görülmüştür. İntestinal mukozada reperfüzyon sonrası 12. saatte, hücrelerin apoptoz oranları, kontrol grubuna göre 3.3 kat fazladır ⁴⁰. Zhao ve arkadaşları, ülseratif kolit hastalarının inflame kolon epitelinde, TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreleri yüksek olarak bulmuşlardır ⁴². Alikhani ve arkadaşlarının, proapoptotik özellikteki AGE'lerin in vivo fibroblast apoptozu üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada, CD1 farelerin saçlı derilerine 100 µg CML kollajen ve modifiye edilmemiş kollajen enjekte etmişler ve fibroblast apoptozunu değerlendirmek üzere histolojik kesitleri TUNEL yöntemi ile incelemişlerdir. Modifiye edilmemiş kollajenle karşılaştırıldığında, CML kollajen verilen grupta, apoptotik hücrelerde 4 kat artış saptanmıştır ⁴⁶.

Çalışmamızın immünhistokimyasal sonuçları, yalnızca koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptanan kaspaz 9 ve Bax mRNA ifadenme düzeylerini destekler nitelikte olup, diğer apoptotik proteinlerin mRNA

ifadelenme düzeylerindeki istatistiksel olarak anlamlı bulunan artışları desteklememektedir. Teofoli ve arkadaşlarının, ekstraselüler matriksin aşırı üretimi ve fibroblastların hiperproliferatif aktivitelerinin sonucu olarak yara iyileşmesinin bozulduğu keloid ve hipertrofik skar dokularında yaptıkları immünohistokimyasal çalışmada, Bcl-2 ailesindeki proteinlere özgü, sitozolik nokta şeklinde boyanma paterni izlenmiştir. Bcl-2 ifadelenmesini gösteren bu boyanma paterni, epidermisin proliferatif olmuştur bazal tabakası içinde, dermisde dağılmış şekilde bulunan fibroblast benzeri hücreler içerisinde ve perivasküler alanda lokalize olmuş fusiform şekilli hücreler içerisinde saptanmıştır. Bu durum, apoptozun baskılanmasına bağlı olarak hücre yaşam süresinde uzama ve hücre proliferasyonu ile sonuçlanır⁵¹. Benzer şekilde Ladin ve arkadaşları da keloid lezyonlarının periferindeki hiperselüler alanlarda, immünohistokimyasal yöntemlerle Bcl-2 ifadelenmesini göstermişlerdir³⁴. Zhao ve arkadaşları, farelerin sırtlarının orta kısımlarına bistüri ile fasyaya kadar uzanan insizyon yaptıktan sonraki 1. gün ve 5. günde, immünohistokimyasal yöntemlerle kaspaz 8 pozitif hücreleri, 3. günde ise kaspaz 6, 7 ve 9 pozitif hücreleri en yüksek seviyede saptanmışlardır⁵². Çalışmamızda ise, bistüri ile yara oluşturulduktan sonraki 5. günde kaspaz 8, 3 ve 5. günlerde ise kaspaz 9 mRNA ifadelenme düzeylerindeki yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup immünohistokimya sonuçlarımız anlamlı bulunmamıştır. Chen ve arkadaşları, reperfüzyon sonrası 2-12. saatlerde, Bax protein seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında önemli ölçüde yüksek olarak bulmuşlar, reperfüzyon sonrası 24. saatte, kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik saptamamışlardır. Ayrıca reperfüzyon süresi uzadıkça Bcl-2 protein seviyelerinin düştüğünü belirtmişlerdir⁴⁰. Kane ve arkadaşlarının diyabetik farelerde cilt yarası oluşturarak yaptıkları çalışmada, yaralanmadan sonraki 12. saatte, dermal kenarda ve göç eden epitelyumda, Bcl-2 protein ifadelenmesi saptanmış ve 3. güne kadar sabit olarak kalmış, 5. günde en yüksek seviyeye ulaşmış ve 10. günde düşmüştür⁴¹. Yang ve arkadaşları,

subtotal nefrektomi sonrası 7.günde, geriye kalan böbrek dokusunda, Bax protein seviyelerinin 7. günde en yüksek seviyeye ulaştığını, 120. günde kontrole göre 300 kat daha fazla görüldüğünü, Bcl-2 protein seviyelerinin ise operasyon sonrası 7. günden itibaren, anlamlı derecede düştüğünü belirtmişlerdir ³⁸. Çalışmamızda ise Kane'in ve Yang'ın çalışmalarına benzer şekilde, punch ve koter ile yara oluşturulduktan sonraki 5. günde Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış olup, yara iyileşmesinin ilerleyen günlerinde bu artış yerini düşüğe bırakmıştır. Bax mRNA ifadenme düzeylerinde bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. gün ve koter ile yara oluşumunun takip eden 7. günde anlamlı artış saptanmıştır. Bcl-2 ve Bax protein ifadenme sonuçlarımız anlamlı bulunmamıştır.

6. SONUÇ

Adli uygulamada yara yaşının saptanması, ölüm nedeni ve yaralar arasındaki ilgiyi açıklamak için her zaman gereklidir. Özellikle birden fazla travmanın ölüme etkili olduğu olgularda, ilk önce isabet eden travmanın belirlenmesi, ölüm öncesi ve ölüm sonrası oluşturulan yaraların ayırt edilebilmesi ve travmadan ölüme kadar geçen sürenin tayini, adli olayların çözümünde çok önem kazanmaktadır.

Bu bilgilerden yola çıkılarak, değişik iyileşme evrelerinde ve farklı mekanizmalarla oluşturulan yara dokularında, apoptozun, apoptozda rol oynayan kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bcl-xL ve Bax mRNA ve protein düzeylerinin saptanması ve yara yaşı tayininde kullanılabilirliğinin ortaya konulması amacıyla yaptığımız çalışmamızda, Adli Tıp uygulamalarında sıklıkla karşılaştığımız yara grupları olan ezici alet yaraları, kesici alet yaraları ve elektrik çarpması sonucu meydana gelen yaralar, hayvan modeline punch, bistüri ve koter kullanılarak uyarlanmıştır. Söz konusu yaraların oluşturulduktan sonraki 21 günlük iyileşme süreçlerinde, yara bölgesinden alınan örneklerde, apoptotik hücre sayıları, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA ifadenme ve protein düzeyleri incelenmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında, apoptotik hücre sayılarının dolayısı ile apoptozun yüksek olarak izlendiği, bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. günde, apoptozu uyaran Bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mRNA ifadenme düzeylerinin de istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak bulunduğu belirlenmiştir. Ancak antiapoptotik özellikteki Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde ise anlamlı bir artış bulunmadığı görülmüştür. Bununla birlikte yine apoptotik hücre sayılarının yüksek olarak izlendiği, koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde, apoptozu uyaran Bax ve kaspaz 9 mRNA ifadenme düzeylerinin de

istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Antiapoptotik özellikteki Bcl-2 mRNA ifadelenme düzeylerinde ise düşüş saptanmıştır. Koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde, yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, proapoptotik özellikteki kaspase 9 ve Bax antikorları ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptandığı gösterilmiştir.

Adli ölü muayenesi ve otopside, ceset üzerinde saptanan kesici alet yaraları, ezici alet yaraları ve elektrik çarpması sonucu oluşan yaraların yara yaşı tayininde ve ölümden önce mi yoksa sonra mı meydana getirildiklerinin tespitinde, çelişkiye düşen hekimler, çalışmamızda yaptığımız gibi, otopsi sırasında yaralardan örnekler alarak elde ettikleri apoptotik yolaktaki ilgili genlerin ifadelenme sonuçlarına göre, yara yaşı tayinlerini ve yaranın antemortem-postmortem ayrımlarını doğru olarak yapabilecekler, sonuç olarak adaletin doğru ve hızlı tecellisinde hekimler üzerlerine düşen görevi layıkıyla yerine getirebileceklerdir.

7. ÖZET

Yara Yaşı Tayininde Apoptotik Yolaktaki İlgili Genlerin İfadelemesi

Adli Tıpta yara yaşının saptanması ölüm nedeni ve yaralar arasındaki ilgiyi açıklamak için her zaman gereklidir. Birden fazla travmanın bulunduğu ölüm olgularında, ilk önce isabet eden travmanın belirlenmesi, ölüm öncesi ve sonrası travmatik değişikliklerin ayırt edilebilmesi çok önemlidir. Bu tez çalışmasında, değişik iyileşme evrelerinde ve farklı mekanizmalarla oluşturulan yara dokularında, apoptozun, apoptozda rol oynayan kaspaz 3, 8, 9, Bcl-2, Bcl-xL ve Bax mRNA ve protein düzeylerinin saptanması ve yara yaşı tayininde kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 36 adet Wistar albino dişi ratın sırtında üç ayrı bölgede, bistüri, punch ve koter ile yara oluşturulduktan sonraki 24. saat, 3, 5, 7, 17 ve 21. günlerde yara bölgesinden alınan örneklerde, apoptotik hücre sayıları TUNEL yöntemi ile; Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp 3, Casp 8 ve Casp 9 genlerinin mRNA ifadenme düzeyleri Real-time PCR yöntemi ile, protein düzeyleri ise immünohistokimyasal yöntemler ile saptanmıştır.

Çalışmamızın sonuçları, apoptozun yüksek olarak izlendiği, bistüri ile yara oluşumunu takip eden 3. günde, Bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mRNA ifadenme düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olarak bulunduğunu, Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde ise anlamlı bir artış bulunmadığını, yine apoptozun yüksek olarak izlendiği, koter ile yara oluşumunu takip eden 7. günde, Bax ve kaspaz 9 mRNA ifadenme düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olarak bulunduğunu, Bcl-2 mRNA ifadenme düzeylerinde ise düşüş saptandığını, koter ile yara oluşumunu

takip eden 7. günde, yara bölgesinde saptanan toplam PMNL ve IMC'lerin, proapoptotik özellikteki kaspaz 9 ve Bax antikoru ile immün histokimyasal olarak boyanan yüzdeleri arasında da anlamlı fark saptandığını göstermiştir.

Sonuçlarımız, hekimlerin otopsi sırasında yara bölgelerinden aldıkları örnekleri, apoptotik yolaktaki ilgili genlerin ifadenme sonuçları açısından değerlendirdikleri takdirde, yara yaşı tayinlerini ve yaranın antemortem-postmortem ayrımlarını doğru olarak yapabileceklerini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Yara, Yara yaşı tayini, Apoptoz

8. SUMMARY

Expression of Related Genes at Apoptotic Pathway in Wound Age Estimation

Wound age estimation becomes necessary for the explanation of relationship between the wounds and the cause of death. In the death cases with multiple trauma, determination of the first strike and differentiation of pre and postmortem traumatic changes are very important. The aim of this thesis is to determine the levels of apoptosis, caspase 3, 8, 9, Bax, Bcl-2 and Bcl-xL mRNA and protein and to show the availability of this results for the wound age estimation in the wound tissues that have different mechanisms and at different healing stages.

The results of this study indicate that, at the third day in the wound formed by scalpel, Bax, caspase 3 and 9 mRNA expression levels were found to be significantly high, but Bcl-2 mRNA expression levels were not. At the seventh day in the wound formed by cautery, Bax and caspase 9 mRNA expression levels were found to be significantly high, but Bcl-2 levels decreased. At the same day, Bax and caspase 9 protein levels were significantly high. Our results indicate that, the physicians would take samples from wounds in autopsy for the analysis of genes at the apoptotic pathway. As a consequence of this process, physicians could make a correct decision for wound age estimation and pre and postmortem differentiation of traumatic changes.

Key Words: Wound, Wound age estimation, Apoptosis.

9. KAYNAKLAR

- 1- Engin A. Yara İyileşmesi. İçinde: Sayek İ, editör. Temel Cerrahi. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti; 1996. s. 266-277.
- 2- Saukko P, Knight B. Forensic Pathology. 3rd ed. London: Arnold; 2004.
- 3- Çetin G. Yaralar. İçinde: Adli Tıp Ders Kitabı. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü; 2011. s. 255-281.
- 4- Ekizoğlu O, Arıcan N. Yaralar. İçinde: Koç S, Can M, editörler. Birinci Basamakta Adli Tıp. 1. Baskı. İstanbul: Golden Print; 2010. s. 57-73.
- 5- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic Pathology. Çevikbaş U (Çev), 7. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti; 2003.
- 6- Güler H. Yara Oluşum Zamanının Saptanmasında Tenasin ve Ubikitin'in Yeri. Tıpta Uzmanlık Tezi. İzmir: Ege Üniversitesi; 2008.
- 7- Özdemir Ç, Zeyfeğlu Y, Hancı İH. Yara Yaşı Tayini. İçinde: Hancı İH, editör. Adli Tıp ve Adli Bilimler. 1. Baskı. Ankara: Seçkin Yayıncılık; 2002. s. 551-557.
- 8- Soysal Z, Eke SM, Çağdır AS. Yaralanmaya Bağlı Ölüm Olgularında Postmortem Teknikler. İçinde: Soysal Z, Eke SM, Çağdır AS. Adli Otopsi. Cilt 2. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi; 1999. s. 541-548.
- 9- Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes and Approaches to Care. Adv Skin Wound Care 2012; 25: 304-314.
- 10- Kondo T, Ishida Y. Molecular Pathology of Wound Healing. Forensic Sci Int 2010; 203: 93-98.
- 11- Grellner W, Madea B. Demands on Scientific Studies: Vitality of Wounds and Wound Age Estimation. Forensic Sci Int 2007; 165: 150-154.
- 12- Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Forensic Application of VEGF Expression to Skin Wound Age Determination. Int J Legal Med 2004; 118: 320-325.

- 13-** Çetin G. Yaralar. İçinde: Soysal Z, Çakalır C, editörler. Adli Tıp. Cilt 1. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi; 1999. s. 475-521.
- 14-** Dağlı T, İnanıcı MA, editörler. Hastane Temelli Çocuk Koruma Merkezleri İçin Başvuru Kitabı İhmal ve İstismara Uğrayan Çocuğa Bütüncül Yaklaşım. 1. Baskı. Ankara: Fersa Ofset Matbaacılık; 2011.
- 15-** Öniz H. Apoptosis: The Death Decision. SSK Tepecik Hast Derg 2004; 14: 11-20.
- 16-** Adolph EJ, Hafeman AE, Davidson JM, Nanney LB, Guelcher SA. Injectable polyurethane composite scaffolds delay wound contraction and support cellular infiltration and remodeling in rat excisional wounds. J Biomed Mater Res A 2012 doi: 10.1002/jbm.a.33266. [Epub ahead of print]
- 17-** Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. Biochim Biophys Acta 2012 doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.019. [Epub ahead of print]
- 18-** Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in Disease. Aging (Albany NY) 2012; 4: 330-349.
- 19-** Cooper GM, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım. Sakızlı M, Atabey N (Çev), 3. Basım. İzmir: BRC Ofset Ltd. Şti., 2006.
- 20-** Kasap M, Pazarbaşı A, Alptekin D. Kanser ve Apoptoz. İçinde: Kasap H, editör. Tıbbi Biyoloji ve Genetik. 1. Basım. Adana: Adana Nobel Kitabevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti.; 2010. s. 421-436.
- 21-** King RS, Newmark PA. The Cell Biology of Regeneration. J Cell Biol 2012; 196: 553-562.
- 22-** Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M (Çev), 4. Basım. Ankara: Sistem Ofset Basım Yayın San. Tic. Ltd. Şti., 2008.

- 23-** Clapp C, Portt L, Khoury C, Sheibani S, Eid R, Greenwood M, et al. Untangling the Roles of Anti-Apoptosis in Regulating Programmed Cell Death Using Humanized Yeast Cells. *Front Oncol* 2012 doi: 10.3389/fonc.2012.00059. [Epub ahead of print]
- 24-** DiMaio VJ, DiMaio D. *Forensic Pathology*. 2nd ed. Boca Raton, London, New York, Washington D.C: CRC Press; 2001.
- 25-** Azevedo LH, de Sousa SC, Correa L, de Paula Eduardo C, Dagli ML, Romanos G, et al. Mast cell concentration in the wound healing process of incisions made by different instruments. *Lasers Med Sci*. 2009; 24 (4): 585-590.
- 26-** Christoforidis JB, Wang J, Jiang A, Willard J, Pratt C, Abdel-Rasoul M, et al. The effect of intravitreal bevacizumab and ranibizumab on cutaneous tensile strength during wound healing. *Clin Ophthalmol*. 2013; 7: 185-191.
- 27-** Prestes MA, Ribas CA, Ribas Filho JM, Moreira LB, Boldt AB, Brustolin EV, et al. Wound healing using ionic silver dressing and nonocrystalline silver dressing in rats. *Acta Cir Bras*. 2012; 27 (11):761-767.
- 28-** Brustolin EV, Skare TL, Nassif PA, Biondo-Simões Mde L, Prestes MA, Ozono LM, et al. Wound healing under the effect of iodine cadexomer in rats. *Acta Cir Bras*. 2012; 27 (12): 874-879.
- 29-** Somboonwong J, Kankaisre M, Tantisira B, Tantisira MH. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Jul 20;12:103. doi: 10.1186/1472-6882-12-103.
- 30-** Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995; 146 (1): 56-66.
- 31-** Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol*. 1994 Dec;145(6):1323-36.

- 32-** Jiang L, Zhang E, Yang Y, Zhang C, Fu X, Xiao J. Effectiveness of apoptotic factors expressed on the wounds of patients with stage III pressure ulcers. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2012; 39 (4): 391-396.
- 33-** Moulin V, Larochelle S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Vallé CA, Roy M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inducers. *J Cell Physiol.* 2004; 198 (3): 350-8.
- 34-** Ladin DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, et al. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1998; 6 (1): 28-37.
- 35-** Zorba OU, Sirma S, Ozgon G, Salabas E, Ozbek U, Kadioglu A. Comparison of apoptotic gene expression profiles between Peyronie's disease plaque and tunica albuginea. *Adv Clin Exp Med.* 2012; 21 (5): 607-14.
- 36-** Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Bouchier-Hayes D. Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils. *Shock.* 1996; 5 (1): 47-51.
- 37-** Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30 (9): 1019-30.
- 38-** Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF, Wagner B, Skill NJ, et al. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12 (2): 275-88.
- 39-** Hattori T, Shindo S, Kawamura H. Apoptosis and expression of Bax protein and Fas antigen in glomeruli of a remnant-kidney model. *Nephron.* 1998; 79 (2): 186-91.
- 40-** Chen W, Fu XB, Ge SL, Sun TZ, Zhou G, Han B, et al. Intravenous acid fibroblast growth factor protects intestinal mucosal cells against ischemia-reperfusion injury via regulating Bcl-2/Bax expression. *World J Gastroenterol.* 2005; 11 (22): 3419-25.

- 41-** Kane CD, Greenhalgh DG. Expression and localization of p53 and bcl-2 in healing wounds in diabetic and nondiabetic mice. *Wound Repair Regen.* 2000; 8 (1): 45-58.
- 42-** Zhao QJ, Yu YB, Zuo XL, Dong YY, Li YQ. Milk fat globule-epidermal growth factor 8 is decreased in intestinal epithelium of ulcerative colitis patients and thereby causes increased apoptosis and impaired wound healing. *Mol Med.* 2012; 18: 497-506.
- 43-** Zhu S, Nagashima M, Khan MA, Yasuhara S, Kaneki M, Martyn JA. Lack of caspase-3 attenuates immobilization-induced muscle atrophy and loss of tension generation along with mitigation of apoptosis and inflammation. *Muscle Nerve.* 2012 doi: 10.1002/mus.23642. [Epub ahead of print]
- 44-** Guo XX, Guo Q, Li Y, Lee SK, Wei XN, Jin YH. Ginsenoside rh2 induces human hepatoma cell apoptosis via bax/bak triggered cytochrome C release and caspase-9/caspase-8 activation. *Int J Mol Sci.* 2012; 13 (12): 15523-35.
- 45-** Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, Funayama E, Furukawa H. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. *Am J Pathol.* 2000; 157 (5): 1661-9.
- 46-** Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem.* 2005; 280 (13): 12087-95.
- 47-** Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Okamoto T, Takeuchi M, Makita Z. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal pericytes from advanced glycation end product-induced injury through its antioxidative properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 296 (4): 877-82.

- 48-** Honda S, Farboud B, Hjelmeland LM, Handa JT. Induction of an aging mRNA retinal pigment epithelial cell phenotype by matrix-containing advanced glycation end products in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42 (10): 2419-25.
- 49-** Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J Biol Chem.* 2002; 277 (23): 20309-15.
- 50-** Sun Z, Li S, Cao C, Wu J, Ma B, Tran V. shRNA targeting SFRP2 promotes the apoptosis of hypertrophic scar fibroblast. *Mol Cell Biochem.* 2011; 352 (1-2): 25-33.
- 51-** Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, Campanella A, De Pita' O, Puddu P. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. *J Dermatol Sci.* 1999; 22 (1): 31-7.
- 52-** Zhao R, Guan DW, Zhang W, Du Y, Xiong CY, Zhu BL, et al. Increased expressions and activations of apoptosis-related factors in cell signaling during incised skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation. *Leg Med (Tokyo).* 2009; 11 Suppl 1: 155-60.

10. EKLER

Doktora programına kabul ederek Tıbbi Biyoloji ve Genetik alanında çalışabilmeme olanak sağlayan, tıp eğitimim ve doktora eğitimim boyunca öğrencisi olmaktan onur duyduğum ve hayatımın her alanında örnek aldığım değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye,

Doktora eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle aktaran, desteklerini her zaman hissettiğim çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Sevdâ MENEVŞE, Sayın Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ ve Sayın Doç. Dr. Ece KONAÇ'a,

Doktora tezimin oluşturulmasında ve her aşamasında desteğini her zaman hissettiğim, yapıcı tutumları ve içten yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru ALP, Yrd. Doç. Dr. Pınar UYAR GÖÇÜN ve Sayın Öğretim Görevli Dr. Hacer İlke ÖNEN'e,

Tüm bu süreçte bilgisi, sabrı ve dostluğu ile bana yol gösteren, tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, değerli arkadaşım Uzm. Dr. Atiye Seda YAR'a,

Doktora eğitimim boyunca dostluklarını, tez çalışmalarım sırasında ise yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli bölüm arkadaşlarıma,

Uzun çalışma saatlerim boyunca beni hep anlayışla karşılayan, hep destek olan, sevgisiyle bana güç veren, yanımda olduğu için kendimi her zaman çok şanslı hissettiğim, canımdan çok sevdiğim eşim Hakim Tuğba DEMİNER AKAR'a,

Sonsuz sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim, büyük bir özveri ile her zaman ve her konuda bana destek olan, güvenen ve inanan, büyük emek ve fedakarlıkları ile bugünlere gelmemi sağlayan annem Gülser AKAR, babam Yargıtay Birinci Başkan Vekili ve Hukuk Genel Kurulu Başkanı Zeki AKAR ve ablam Hakim Gülşen AKAR PEHLİVAN'a

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM...

Bu tez çalışması, T.C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 29.04.2010 tarih ve 114/7148 sayılı izni ile yapılmıştır.



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

29.10.2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 114 - 7148
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Adnan MENEVŞE
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

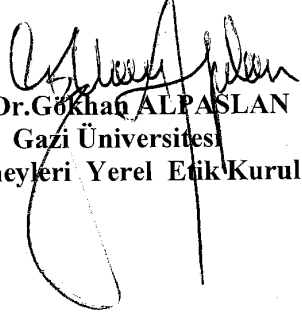
Araştırmacı grubu Prof.Dr.Adnan MENEVŞE, Yrd.Doç.Dr.Taner AKAR, Yrd.Doç.Dr.Ece KONAÇ, Uzman Atiye Seda YAR ve Arş.Gör.Ebru ALP'ten oluşan, G.Ü.ET-10.064 kod numaralı ve **“Yara Yaşı Tayininde Apoptotik Yoldaki İlgili Genlerin İfadelemesi”** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.064 and entitled **“Expression of related genes at the apoptotic pathway in the wound age estimation”** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

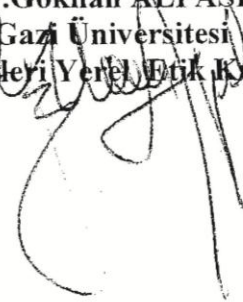
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI
KARARLARI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 21.04.2010

TOPLANTI SAYISI : 06

ADI-SOYADI	
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN	KATILDI
Prof.Dr.Sevim ERCAN	KATILAMADI
Prof.Dr.Nurten TÜRKÖZKAN	KATILDI
Prof.Dr.Tahir HATİPOĞLU	KATILDI
Doç.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	KATILDI
Doç.Dr.Mustafa ARK	KATILDI
Uzman Dr.Şeyda DİKER	KATILDI
Arş.Gör. Esra PER	KATILDI
Dr.Kadir BAŞAR	KATILDI
İlknur ALKAN	KATILAMADI

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı



11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Taner

Soyadı : AKAR

Doğum Yeri ve Tarihi : Niksar, 21.05.1975

Eğitimi :

2012- Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı
Doçent Doktor

2008 - 2012 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı
Yardımcı Doçent Doktor

2007- Halen Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Doktora Öğrencisi

2005 - 2008 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı
Öğretim Görevlisi

2004 - 2005 Diyarbakır Asker Hastanesi Uzman Tabip Asteğmen

2001 - 2004 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi

1993 - 2000 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

1989 - 1992 Eskişehir Fen Lisesi

1987 - 1989 Ankara Namık Kemal Ortaokulu

1983 - 1987 Ankara Öğretmen Hüseyin Hüsnü TEKİŞİK İlkokulu

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Adli Tıp Uzmanları Derneği

Çocuk İstismarını ve İhmalini Önleme Derneği

Türk Tabipleri Birliği

Bilimsel Etkinlikler

1. Boyna Bası Tatbiki Sonucu Ölümelerde Tiroid ve Paratiroid Hormon Düzeylerinin, Triptofan Hidroksilaz ve Serotonin Transporter Gen Polimorfizmleri ile Ölüm Orijini Açısından Karşılaştırılması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Projesi, 01/2003-61, Yardımcı Araştırmacı, 2003. (tamamlandı)

2. Yara Yaşı Tayininde Apoptotik Yolaktaki İlgili Genlerin İfadelenmesi, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Projesi, 01/2010-78, Yardımcı Araştırmacı, 2010. (tamamlandı)