



**İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-1 (IGF-1)'İN YARA
İYİLEŞMESİ SÜRECİNDE OKSİDATİF OLAYLARA ETKİLERİ**

Tuğçe AKSANCAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Tuğçe AKSANCAK tarafından hazırlanan “İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-1 (IGF-1)’İN YARA İYİLEŞMESİ SÜRECİNDE OKSİDATİF OLAYLARA ETKİLERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Nursel GÜL

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Barbaros BALABANLI

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 16/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuğçe AKSANCAK

16/07/2019

İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-1 (IGF-1)'İN YARA İYİLEŞMESİ SÜRECİNDE OKSİDATİF OLAYLARA ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe AKSANCAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması, yara iyileşmesi ise; travma ile başlatılan sistematik, hücresel ve biyokimyasal olayların yeni doku oluşumu ile sonuçlanmasıdır. Yara iyileşmesinde pek çok büyüme faktörü ve sitokin görev alır. İnsülin like growth factor-1 (IGF-1) ile yapılan çalışmalarda yara iyileşme sırasında önemli işlevinin olduğunu gösterilmektedir. Bizim çalışmamızdaki amaç, yara iyileşme sürecinde IGF-1'in oksidan ve antioksidan parametreler üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu saptamaktır. Deneylerde 250-300 gr ağırlıkta 24 adet wistar-albino tipi erkek rat kullanıldı. Ratlarda, anestezi altında dorsalateral eksizyonel yaralar oluşturuldu. Hayvanlar kontrol (n=6), tedavisiz yara (n=6), BSA kontrol (n=6), IGF-1 tedavi (n=6) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Tedavili gruptaki hayvanların yaralarına her gün ve bir kez 1,5 ng/ml BSA içerisinde hazırlanmış IGF-1 uygulandı. Bütün hayvanlar operasyonun 3.gününde anestezi altındayken feda edildi. Yara dokuları hemen çıkartıldı, bulaşmayı önleyecek materyale sarılarak -80 °C de saklandı. Değerler spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Glutasyon (GSH), malondealdehit (MDA), askorbik asit (AA) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri Anova Varyans ile karşılaştırıldı (p<0,05). Sonuç olarak; yaptığımız çalışmada eksojen IGF-1 uygulamasının yara iyileşmesinin inflmatuvar fazında oksidatif stres parametrelerinde ve antioksidan parametreler üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğu gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 20317
Anahtar Kelimeler : IGF-1, yara iyileşmesi, oksidatif stres, antioksidanlar
Sayfa Adedi : 64
Danışman : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

EFFECT OF INSILIN LIKE GROWTH FACTOR-1 (IGF-1) ON OXIDATIVE EVENT
DURING WOUND HEALING

(M. Sc. Thesis)

Tuğçe AKSANCAK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

A wound is that impaired anatomical and functional integrity of living tissue and wound healing is the process of the systemic, cellular and biochemical events start with trauma and eventuate new tissue formation. Most growth factor and cytokin are responsible for wound healing. Important functions is demonstrated during wound healing in studies with insulin like growth factor-1 (IGF-1). Aim of this study is to determine how the oxidant and antioxidant parameters have an effect of IGF-1 in the wound healing process. 250-300 g in weight male wistar-albino rats were used in the experiments. Excisional wounds were made under anesthesia in rats. Animals were divided into 4 groups: Control (n=6), untreated wounds (n=6), BSA control (n=6) and IGF-1 treatment (1,5 ng/ml)(n=6). The wounds of animals in treatment group was performed each day 1.5 ng / ml IGF-1 in BSA once. All animals were sacrificed under anesthesia on the 3rd day. Wound tissues were removed immediately avoiding contamination and stored at -80 °C. Spectrophotometric with way is evaluated values. Statistical analysis were performed using Anova Variance Analysis GSH (glutation), MDA (malondealdehyd), AA (ascorbic acid) and NOx (nitric oxid) levels (p<0,05). In conclusion, we showed that IGF-1 application has compensatory effect oxidative stress and anti-oxidant parameters at the inflammatory phase of wound healing.

Science Code : 20317
Key Words : IGF-1, wound healing, oxidative stress, antioxidants
Page Number : 64
Supervisor : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışmanım Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER' e, laboratuvar çalışmalarım süresince tecrübeleriyle bana destek olan Prof. Dr. K. Barbaros BALABANLI'ya ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma ayrıca manevi destekleriyle yanımda olan aileme teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Derinin Yapısı	3
2.2. Yara Nedir?	7
2.3. Yara İyileşme Süreci	8
2.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	16
2.5. Büyüme Faktörlerinin Yara İyileşmesi ile İlişkisi	17
2.6. IGF Sistemi	19
2.6.1. IGF'lerin moleküler yapısı	20
2.6.2. IGF reseptörleri	21
2.6.3. IGF bağlayıcı proteinler (IGFBPs)	23
2.6.4. IGF-1'in sentezi ve fizyolojik etkileri	25
2.7. Serbest Radikaller	26
2.7.1. Serbest radikal kaynakları	34
2.7.2. Serbest radikallerin olumsuz etkileri	34
2.7.3. Yara iyileşmesinde serbest radikallerin rolü	35
2.8. Antioksidanlar	36

	Sayfa
2.8.1. Enzimatik antioksidanlar	36
2.8.2. Non-enzimatik antioksidanlar	39
3.ARATIRMA BULGULARI	45
3.1.Deney Protokolü	45
3.2. IGF-1 Solüsyonunun Hazırlanması	45
3.3. Gruplar ve Yara Modelinin Oluşturulması	45
3.4. Yöntemler	46
3.4.1. Dokuda MDA tayin yöntemi	46
3.4.2. Dokuda GSH yöntemi	47
3.4.3. Dokuda AA yöntemi	47
3.4.4 Dokuda NO _x tayin yöntemi	47
3.5. İstatiksel Değerlendirme	48
3.6. Bulgular	48
3.6.1. NO _x sonuçları	49
3.6.2. GSH sonuçları	49
3.6.3. MDA sonuçları	50
3.6.4. AA sonuçları	51
4.TARTIŞMA	53
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde görev alan hücreler	16
Çizelge 2.2. Yara iyileşme sürecinde meydana gelen olaylar	16
Çizelge 2.3. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri	30
Çizelge 3.1. MDA, GSH, NO _x ve AA düzeyleri	48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Derinin şekli	3
Şekil 2.2. Epidermisin tabakaları ve hücre tipleri.....	4
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin fazları	8
Şekil 2.4. Hemostazda plateletlerin fonksiyonu	9
Şekil 2.5. IGF-1'in moleküler yapısı	20
Şekil 2.6. İnsülin, IGF-1 ve IGF-2 nin yapısı	21
Şekil 2.7. IGF-1reseptörü ve sinyalizasyon mekanizması	22
Şekil 2.8. İnsülin reseptörü, IGF-1R ve IGF-2R'nin yapısı.....	23
Şekil 2.9.GH/IGF-1 aksının fizyolojik etkileri	25
Şekil 2.10. Mitokondri iç zarında serbest radikal oluşumu	32
Şekil 2.11. Solunum patlaması ve serbest radikal oluşumu.....	33
Şekil 3.1. NO _x düzeyleri.....	49
Şekil 3.2. GSH düzeyleri	50
Şekil 3.3. MDA düzeyleri	51
Şekil 3.4. AA düzeyleri.....	52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. (a) Medulla spinalisin her iki yanında yaklaşık 4 cm uzunluğunda yapılan kesi yarası (b) Yapılan kesi yarasının 4 suture ile adapte edilmesi	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
Cl	Klor
cm	Santimetre
Cu	Bakır
dk	Dakika
Fe	Demir
g	gram
H	Hidrojen
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfirik asit
HOCl	Hipokloröz asit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
$\text{LOO}^{\cdot}$	Peroksi radikali
LOOH	Lipit hidroperoksil
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Manganez
NaNO_2	Sodyum nitrit
Na_2HPO_4	Sodyum fosfat
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
$\text{NO}^{\cdot}$	Nitrik oksit radikali
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen

Simgeler**Açıklamalar**

$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit radikali
$OH^{\cdot}$	Hidroksil radikali
$ONOO^-$	Peroksinitrit anyonunu
$R^{\cdot}$	Karbon merkezli organik radikaller
RCF	Rölatif santrifüj kuvveti
$RCOO^{\cdot}$	Organik peroksitler
$ROO^{\cdot}$	Peroksil radikali
Rpm	Devir hızı
$RS^{\cdot}$	Tiyil radikalleri
VCl_3	Vanadyum klorür
Zn	Çinko
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AA	Askorbik asit
ALS	Asit karasız alt ünite
BHT	Bütilhidroksi toluen
BP	Bağlayıcı protein
BMP	Bone morphogenic proteins
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine serum albumin
CAMs	Hücre adezyon molekülleri
CAR	Karoten
CAT	Katalaz
CSF	Colony stimulating factor
DNA	Deoxy-ribo-nucleic asit
DTNB	Dithiobisnitrobenzoik asit
ECM	Extra cellular matrix
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

EGF	Epidermal growth factor
EGF-R	Epidermal growth factor-reseptörü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FGF	Fibroblast growth factor
FGF-R	Fibroblast growth factor-reseptörü
GAGs	Glikozaminoglikanlar
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GH	Growth hormon
GSH	Glutasyon
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-R	Glutasyon redüktaz
GSSG	Glutasyon disülfid
GST	Glutasyon S transferaz
HB-EGF	Heparin binding-EGF
HIF	Hypoxia-inducible factor
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IGF	Insulin like growth factor
IGF-1R	Insulin like growth factor-1 receptor
IGFBPs	IGF bağlayıcı proteinler
IgG	Immüoglobülin G
IL-1	Interlökin-1
IP	Intraperitoneal
KGF	Keratinosit growth factor
LDL	Low density lipoprotein
M6F	Mannoz-6-fosfat
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MDA	Malondialdehid
MMPs	Matrix metalloproteinazlar
NSIL	Nonsuppressible insulin like activity
PCA	Perkloroasetik asit

Kısaltmalar**Açıklamalar****PDGF**

Platelet derived growth factor

PNL

Polimorfonükleer lökositler

ROS

Reactive oxygen species

SOD

Süperoksid dismutaz

TBARS

Tiyobarbitürik asit reaktif madde

TGF

Transforming growth factor

TIMP

Tissue inhibitors of MMPs

TNF- α Tümör necrosis factor- α **VCAM**

Vascular cell adhesion molecule

VEGF

Vascular endothelial growth factor

VEGF-R

Vascular endothelial growth factor-reseptörü

VLDL

Very low density lipoproteins

1. GİRİŞ

Vücudun en dış parçası olan ve çevreye karşı doğal bir bariyer sağlayan derinin bütünlüğünün bozulmasıyla akut yaralanmalar ya da kronik hasarların her ikisinde de çok basamaklı bir süreç başlatılır ve yaralı dokunun yeniden yapılanması, derinin bariyer fonksiyonun yenilen kurulması meydana gelir [1].

Yara iyileşmesi, farklı tiplerde hücrelerin görüldüğü, pek çok sitokin ve büyüme faktörünün etki ettiği iç içe geçmiş evrelerden oluşan bir süreçtir [2]. Büyüme faktörleri ve sitokinler, yara iyileşmesini hücresel ve moleküler düzeyde etkileyen sinyal proteinlerinin iki farklı grubudur [3]. Bu moleküller otokrin, parakrin, justagrin ya da endokrin mekanizmalarla salgılanıp, hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerine ya da ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerine bağlanarak etkilerini gösterirler [4].

Büyüme faktörleri hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi, gen transkripsiyonunu, doku remodellingi, kollojen ve elastin artışını aktive edebilen proteinlerdir [5]. Platelet derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF), insulin-like growth factor (IGF) [3,5], colony stimulating factors (granulocyte-G-CSF; granulocyte/macrophage- GM-CSF; macrophage-M-CSF) yara iyileşmesinde anahtar rol oynayan büyüme faktörlerindendir [3].

Sitokinler özellikle yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında etkili olan küçük moleküler ağırlıklı mediatörlerdir. Tümör necrosis factor- α (TNF- α), interlakün-1, interlakün-6, interlakün 8, interlakün-4, interlakün-10 ve interferonlar yara iyileşmesinde rol oynayan sitokinlere örnektir [3].

Somatomedin C olarak da adlandırılan IGF-1 pro-insüline yapısal olarak benzeyen bir büyüme faktörüdür [6]. Başlıca karaciğerde büyüme hormonunun etkisiyle üretilir [6,7]. Yara iyileşmesi sürecinde makrofajlar ve monositler tarafından sentezlenir [6]. IGF-1'in hücrelerin büyümesi, farklılaşması, [6,8,9] çoğalması, göçü [8,9] ve hayatta kalmaları üzerinde önemli etkileri vardır [6,9]. IGF'lerin plazmada, diğer sıvılarda ve dokularda tanımlanmış 6 bağlayıcı proteini vardır [8,9]. Bu bağlayıcı proteinler IGF'lerin taşınmasında, turnoverinde, yarı ömrünün düzenlenmesinde görev alırlar [10]. IGF'ler fonksiyonlarını

öncelikli olarak IGF-1R (insülin like growth factor-1 receptor)'e bağlanarak yaparlar. IGF-1R'ye ligand bağlandığında reseptörün otofosforilasyonu sağlanır ve sonra hücre içerisinde bir dizi sinyal kaskadı başlar [10] ve bunun sonucunda hücre çoğalması, farklılaşma, apoptozdan korunma ve göç gibi olaylar gerçekleşir [9].

Yara iyileşme sürecinde farklı büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve hormonların etkisi olduğu gibi ROS (reactive oxygen species)'un da bu sürecin önemli bir regülatörü olduğu gösterilmiştir. ROS, patojenlere karşı savunmada gereklidir. Son çalışmalar, hidrojen peroksidin düşük seviyelerinin yara anjiyogenezinde önemli etkisi olduğu göstermiştir. Fakat ROS'un aşırı miktarı bu radikallerin yüksek reaktivitelerinden dolayı zararlıdır [1].

Pek çok düşük ağırlıklı antioksidanlar, deri yaralarının iyileşmesinde redoks ortamının düzenlenmesinde etkili olduğu ortaya kondu. Yapılan bazı çalışmalarda bozulmuş yara iyileşmesinin antioksidan seviyelerinin düşmesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise vitamin-E ile tedavi edilen diyabetik rat yarasında lipid peroksidasyonunun seviyelerinin azaldığı ve yara iyileşme sürecinin hızlandığı gösterilmiştir [1].

Bütün bu bilgiler göz önüne alındığında IGF-1'in yara iyileşmesi sırasında oksidan ve antioksidanlarla nasıl bir ilişkisi olduğu merak uyandırmaktadır. Yara iyileşmesi üzerinde IGF-1'in etkilerini inceleyen pek çok çalışmaya vardır. Fakat bu süreçte oksidanlar ve antioksidanla ilişkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça azdır. Biz de bu çalışmada IGF-1'in deri dokusu yaralanmalarında oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

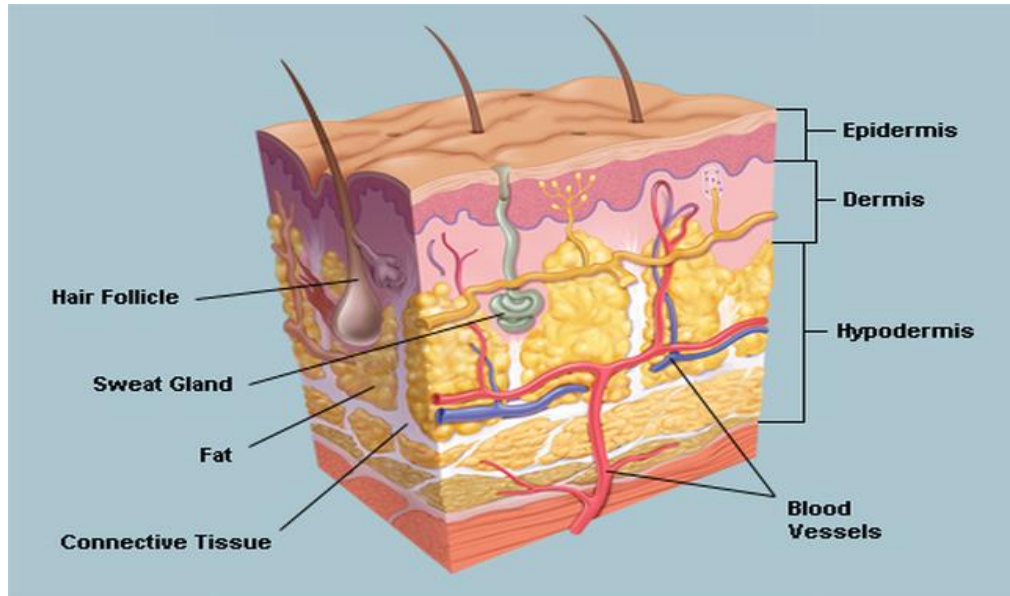
2. GENEL BİLGİLER

2.1.Derinin yapısı

Vücudumuzun tüm yüzeyini örten ve ayrıca pek çok yaşamsal faaliyeti olan organımız deridir. Deri, embriyonal dönemde ektoderm ve mezoderm tabakalarından farklılaşarak meydana gelir. Derinin tabakalarından biri olan epidermisin yapısında temel olarak keratinositler bulunmaktadır. Keratinositler, bazal tabakada bulunan hücrelerin bölünmesi ile oluşurlar ve keratin sentezlerler. Üretilen keratin stratum korneumun, kıl ve tırnakların yapısındaki temel proteini oluşturur [11].

Histolojik açıdan deri incelendiğinde yapısında üç tabaka gözlemlenir:

- 1- Epidermis
- 2- Dermis
- 3- Hipodermis [12].

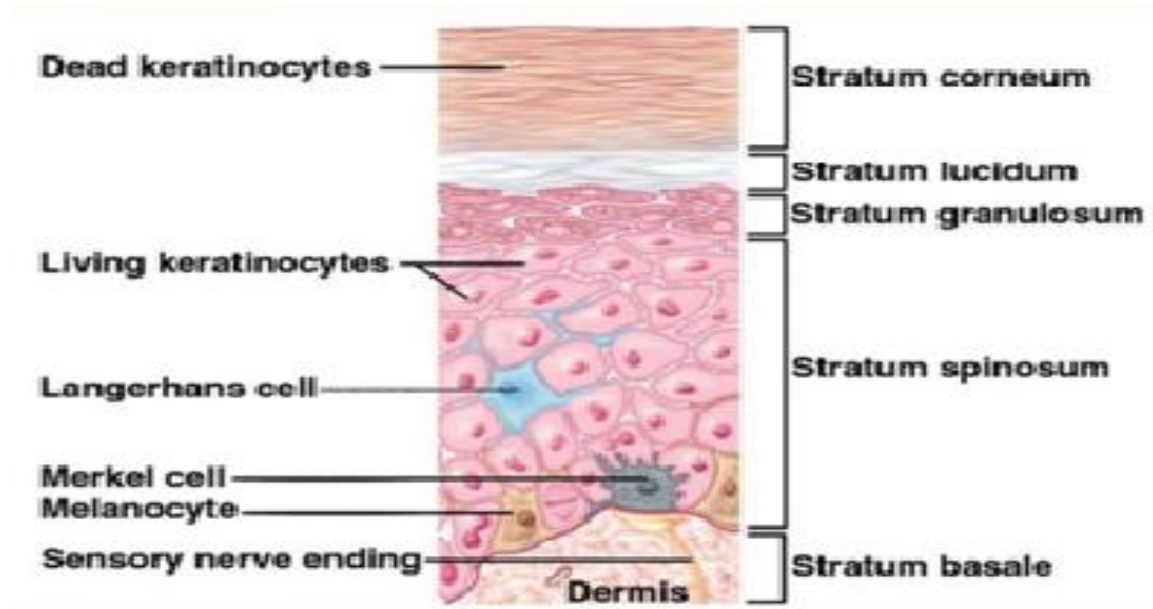


Şekil 2.1. Derinin şekli [38]

Epidermis aşağıdan yukarıya doğru 4 tabakaya ayrılır. Bunlar:

1. Stratum germinativum (Bazal tabaka)
2. Stratum spinosum (Malpighian veya Prickle tabaka)

3. Stratum granulosum (Granüler tabaka)
4. Stratum korneum (Keratinize tabaka, Horny tabaka) [11].



Şekil 2.2.Epidermisin tabakaları ve hücre tipleri [37]

Bazal tabaka, epidermisin en altında bulunur ve tek sıralı üretken hücrelerden oluşmuştur. Mitotik aktivitesinin yüksek olmasından dolayı bu tabakaya stratum germinativum adı verilmiştir [11,12]. Bazal tabakada görülen hücre tipleri; melanositler, keratinositler ve Merkel hücreleridir. Keratinosit adı verilen hücreler, derideki kök hücreleri olarak kabul edilmektedir. Çoğalmaları ve değişikliğe uğramalarıyla üst tabakalar oluşur. Keratin adı verilen fibriler yapıdaki proteinleri üretirler. Bazal membrana hemidezmomlarla, diğer keratinositlere ise dezmozomlarla bağlantı kurarlar [12]. Keratinositler, immün cevap gelişiminde de, bazı sitokin ve inflamatuvar mediatörleri salgılayarak rol alırlar [11,12]. Keratinositler epidermal hücrelerin yaklaşık olarak %90-95'ini oluştururlar [12].

Epidermisin bazal tabakasinda bulunan ve pigment oluşturan hücreler melanositlerdir. Melanozomlar ise melanosit içerisinde üretilen pigment taşıyan granüllerdir [11,12]. Deri rengimizdeki ırksal farklılıklar keratinositler içinde bulunan pigment granüllerinin (melanozomların) büyüklüğü, sayısı, şekli ve dağılımı ile bağlantılıdır. Koyu tenli insanlarda daha fazla melanozom bulunmaktadır ve melanozomları daha büyük olup sitoplazmaya tek tek dağılmış vaziyettedir [11]. Melanositler dendritik hücrelerdir. Dendritik uzantılar epidermis içinde uzun mesafelere uzanarak çok sayıda keratinosit (yaklaşık 36) ile

etkileşime geçer. Keratinositler melanositlerin dendritlerinin uçlarını içlerine alarak melanozomları kendi sitoplazmalarına alırlar [11,12]. Melanozomların nükleus üzerinde bir şemsiye gibi yerleşmesiyle DNA (deoxy-ribo-nucleic asit)'yı UV ışınlarından korurlar [11].

Merkel hücreleri de nöroendokrin ve duyuşal özellikli hücreler olup bazal tabakada bulunurlar [11,12].

Bazal hücrelerin bölünmesi ile oluşan yeni keratinositler spinous isimli tabakayı meydana getirirler. Epidermiste en fazla yer alan tabaka ise stratum spinozum tabakasıdır [11]. Oluşan tabakanın hücreleri arasında desmosomlar bulunmaktadır [11,12]. Dezmozomların zarar görmesiyle keratinositler birbirlerinden ayrılır [11]. Keratin sentezinin bir basamağı olan tonofilament üretimi bu hücrelerde görülmektedir [12]. Bu tabakada immünolojik fonksiyona ve primer fonksiyonları antijenleri tanımak, yakalamak, işlenmek ve duyarlı T lenfositlere sunmak olan Langerhans hücreleri de bulunur ve epidermal hücrelerin yaklaşık %3-5'ini oluştururlar [11,12]. Antijen sunan langerhans hücreleri lenf nodlarına göç ederler[11].

Stratum granulosum tabakası 1-3 sıra halinde dizilmiş yassı hücrelerden oluşur. Hücrelerin çekirdekleri belirli oranda atrofik olup sitoplazmalarında keratohiyalin granülleri bulunmaktadır [12].

Stratum korneum tabakası çekirdeklerini kaybetmiş ve yassılaştırmış ölü keratinositlerden (korneositlerden) oluşmaktadır. Bu yapılar yağ bakımından yoğun bir madde ile bir arada tutulmaktadır. Bazal tabakada bulunan prizmatik hücreler bölünüp yukarıya doğru hareket ettiklerinden dolayı yassılaşır ve çekirdekleri yok olur. Stratum korneumda bu hücreler canlılığını yitirirler ve keratinle dolu bir hal alırlar. Gerçekleşen olay keratinizasyon olarak adlandırılır [11]. Normal şartlarda keratinosit farklılaşması ortalama 2 haftada meydana gelmektedir. Keratinleşmiş ölü hücreler (korneositler) 2 hafta sonra dökülürler. Bu olay epidermal turnover (derinin yenilenme zamanı) olarak isimlendirilir [11,12]. Epiderminin yarı permable stratum korneum tabakası hem kimyasal maddelerin penetrasyon hem de mikroorganizmaların geçişine karşı fizyolojik bir engeldir. Yüzeyde bulunan asidik pH ve epiderminin üst kısmını ince bir film tabakası şeklinde kaplayan lipid tabakasının da koruyucu bir özelliği vardır [11].

Dermis tabakası, epidermin altında bulunan, derinin kıvam ve elastikiyetini sağlayan tabakadır [12]. Kollojen, elastik ve retiküler fibriller olmak üzere başlıca bağ dokusundan meydana gelmiştir. Dermisin papillaları eldiven parmağı şeklinde epidermise doğru uzanarak epidermis ile dermis arasında sıkı bir bağlantı oluşturmaktadır [11,12]. Bu yapı epidermin beslenmesini ve iki tabakanın sıkı bir biçimde birleşmesini sağlar [12]. Temel yapısı fibröz bir protein olan kollojenden meydana gelir. Elastik fibrilleri ve asit mukopolisakkaritlerden oluşan dermisin ekstrasfibriler matriksini fibroblastlar üretir. Kollojenler ile deri direncini sağlanırken, elastik fibriller ile derinin elastikiyeti sağlanmış olur. İnce kollojen fibrillerin gelişigüzel uzandığı dermisin üst bölümü papillar tabaka olarak adlandırılırken, kalın kollojen liflerin deri yüzeyine paralel olarak uzandığı alt bölümüne ise retiküler tabaka adı verilir [11].

Dermiste bulunan hücresel elemanlar; Fibroblastlar, histiyositler, mast hücreleri, polimorfonükleer lökositler (PNL), eozinofiller ve lenfoid hücrelerdir [12]. Histiyositler dolaşan makrofajlardır ve inflamasyon neticesinde gelişen hemosiderin, melanin ve debris gibi yapıları bulundurabilirler. Mast hücreleri ilk olarak kan damarları etrafında yerleşerek histamin ve heparin sentezleyip, salgırlar [11]. PNL'ler iltihabi olaylarda, eozinofiller ise allerjik durumlarda dermiste toplanırlar. Lenfoid hücreler ise, derinin yangısal reaksiyonlarında ve neoplastik hastalıklarında dermiste yoğun bir şekilde bulunurlar [12].

Dermiste deriye ait sinirler ve kan damarları gözüktür. Dokunma ve basınç duyuları Meissner's ve Vater-Pacini korpüskülleri tarafından algılanırken; ağrı, kaşıntı ve sıcaklık papiller dermisteki miyelinsiz sinir sonlanmaları ile algılanır. Histaminin uyardığı kaşıntı ise yavaş iletim sağlayan miyelinsiz C nöronları ile iletilir. Derideki otonomik adrenerjik fibriller kan damarları, erektör pilli kasını ve apokrin glandları uyarırken, kolinerjik otonomik fibriller ise ekrin ter bezlerini uyarır. Epidermiste kan damarı bulunmamaktadır. Bundan dolayı beslenmesini papiller dermisteki damarlardan difüzyonla yapar [11].

Subkutis (pannikulus) olarak bilinen subkutanöz yağ dokusu dermisin alt kısmında bulunur. Fibröz septalarla ayrılmış yağ hücrelerinin oluşturduğu lobüllerden meydana gelir [11,12]. Yağ lobüllerini ise lipositler oluşturur ve tespit işlemi sırasında içinde bulunan yağ eridiğinden köpük şeklinde bir görüntü elde edilir [11]. Subkutis tabakası sinir ve damar bakımından oldukça zengin bir tabakadır [12]. Subkutis dış travmalara karşı iç organları korur. Ayrıca koruma görevi dışında enerji ve bazı hormonlar için depo görevi görür [11].

Kıllar, tırnaklar, yağ bezleri, eklin ter bezleri ve apokrin bezler gibi yapılar ise deri eklerini oluşturur [11,12].

Erişkin bir bireyde ortalama olarak 1,7 m² yüzey alanı ve 4-5 kg ağırlığı ile deri büyük bir organdır. Vücudumuzu dış etkilere koruyucu özelliğindedir. Temel olarak bu koruyucu fonksiyonu epidermis ile sağlanmaktadır. Dermis ise hem destekleyicidir hem de beslenmeden sorumludur [11]. Derinin temel görevleri:

- 1-Koruyucu görevi: Keratin ve lipid tabakası mikroorganizmaların ve zararlı maddelerin vücuda girişini engeller, sıvı kaybını önler ve dermis tabakası mekanik esneklik sağlar ve alttaki dokuları korur. Melanositler UV ışınlarının zararlı etkilerine karşı koruyucu özelliğindedir.
- 2- Terleme ile vücut ısısının düzenlenmesinde görev alır. Ayrıca detoksifikasyon da sağlanmış olur.
- 3- Dokunma, ağrı, basınç, sıcaklık gibi duyları algılar.
- 4- Langerhans hücreleri, mast hücreleri, doku histiyositleri (makrofajlar) ve keratinositler bağışıklıkta cevap oluşturmakta görev alır.
- 5-D vitamini sentezler.
- 6-Tırnaklar parmak uçlarını travmaya karşı korur.
- 7-Deri altı yağ dokusu soğuğa ve travmaya karşı izolasyon görevi görür ve ayrıca yedek kalori kaynağıdır.
- 8- Fiziksel yaralanma sonrası yara bölgesinin tamiri meydana getirilir [11,12].

2.2. Yara Nedir?

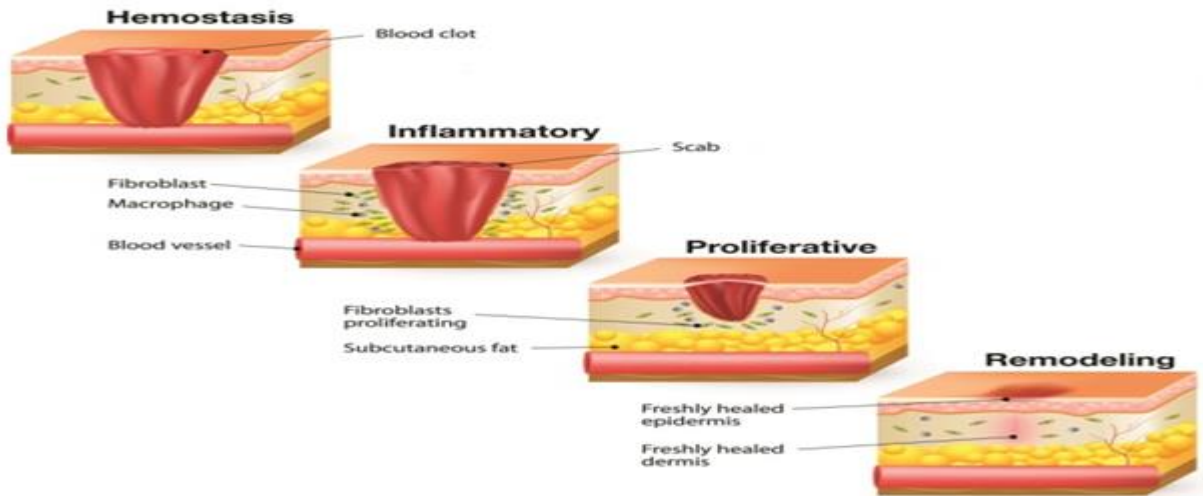
Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır. Yara iyileşmesi travma ile başlatılan sistematik, hücrel ve biyokimyasal olayların yeni doku oluşumu ile sonuçlanmasıdır. Yara iyileşmesinin temel amacı doku harabiyetini en aza indirmek, dokunun yeterli miktarda oksijenlenmesini, ayrıca dokunun düzgün beslenmesini ve nemlenmesini sağlamaktır. Yara sınıflandırması kısmi ve tam kalınlıkta yaralar olarak yapılabileceği gibi akut ve kronik yara, açık ve kapalı yara olarak da sınıflandırılmaktadır [2].

Yara oluşumu farklı sebeplerden dolayı olabilir. Örneğin fiziksel ve kimyasal yanma, basınç, hayvan ısırığı ya da sokması, diyabet hastalığı gibi metabolik hastalıklar, travma, ilaç etkileşimleri ya da beslenme yetersizlikleri gibi nedenler olabilmektedir [2].

2.3. Yara İyileşme Süreci

Vücudun en dış parçası olarak deri, çevreye karşı doğal bir bariyer sağlar. Cildin bütünlüğünün bozulmasıyla akut yaralanmalar ya da kronik hasarların her ikisinde de çok basamaklı bir süreç başlatılır ve yaralı dokunun bir kısmının yeniden yapılanması, derinin bariyer fonksiyonunun yeniden kurulması meydana gelir [1]. Yara iyileşmesi, çeşitli hücre ve ortak bir hedefe doğru sürekli etkileşim gereken matriks bileşenlerini kapsayan bir iş birliği sürecidir [3].

Yara iyileşmesi birbiri içerisine geçmiş hemostaz ve inflamasyon, proliferasyon ve yeniden modellenme (remodelling) fazlarını kapsayan bir süreçtir [2,3,5,13-15].



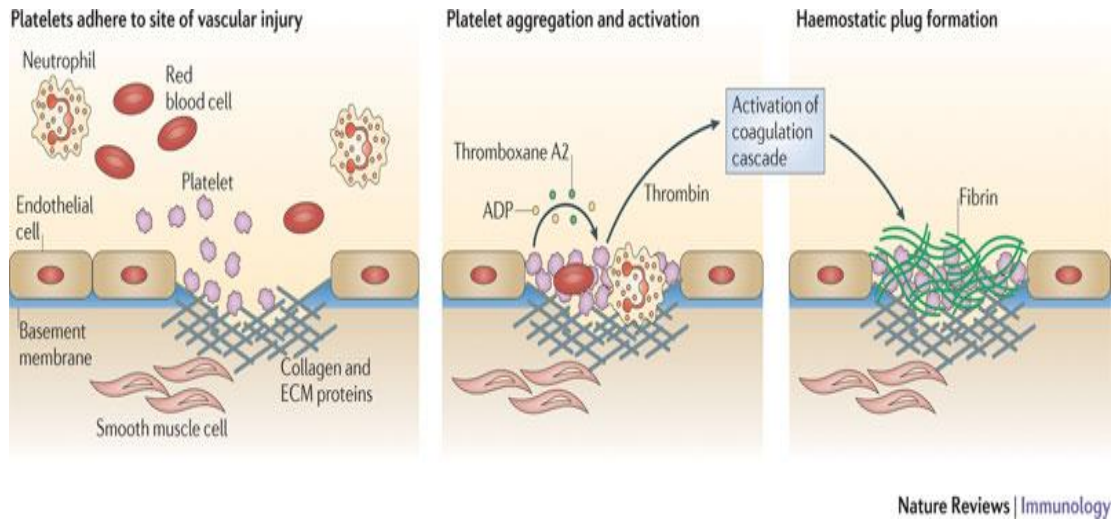
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin fazları [39]

Hemostaz ve inflamasyon fazı:

Hemostaz: Hemostaz yaralanmanın ardından meydana gelir ve kan kaybını engellemek için damarlar darılır [14,15,16]. Yara bölgesinde açığa çıkan subendotelde bulunan mikrofibriller [13] ve kollojen, plateletleri aktive ederek plateletlerin adezyonuna neden olur [13,16]. Birleşen plateletler yara bölgesinde toplanırlar. Kollojenle bir ilişki kurulduğunda plateletler, büyüme faktörü ve cAMP gibi çözülebilir mediatörler ayrıca yapışkan

glikoproteinler salgılar. Plateletlerin bir araya gelmesi devam ederken, yarada fibrin pıhtı oluşumunu sağlayan pıhtılaşma faktörleri salınır. Plateletlerin alfa granüllerinden salgılanan bu maddeler; fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve von willebrand faktörüdür [16]. Oluşan fibrin hızla polimerize olur ve birikmeye başlar. Plazma fibronektini fibrine bağlanır ve onunla fibrinimsi kılıf oluşturmak üzere çapraz bağ yapar, ayrıca bu durum lökosit ve fibroblastların göç etme ve tutunmalarını stimüle eder [2]. Ortamdaki fibrin plak, geçici matriks görevi yapar. Bir araya gelmiş plateletler, fibrin ağına tutunur ve pıhtının esas kısmı meydana gelir [16]. Fibrin plak olgunlaştıkça yaralanan bölge kurumuş pıhtı ile hem daha fazla sıvı ve elektrolit kaybını, hem de çevreden gelebilecek kontaminasyonları engeller [2].

Plateleteler yara iyileşmesinde sadece pıhtı oluşumunda görev almazlar [14], bir de yara bölgesine çeşitli büyüme faktörleri ve sitokin salgırlar [6,14,15]. Örneğin; plateletlerin alfa granüllerinden platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGF- β) [4,15,16], basic fibroblast growth factor (bFGF) [15,16], insulin-like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor alfa (TGF- α) ve vascular endothelial growth factor (VEGF)[16], ve epidermal growth factor (EGF) salgılanır [4,15]. Fibroblastlar aktifleştikten sonra PDGF'lerin etkisiyle toplanırlar, yara bölgesine doğru göç ederler ve ekstraselüler matrikste kollojen, glikozaminoglikan ve protein üretmeye başlarlar [16].



Şekil 2.4.Hemostazda plateletlerin fonksiyonu [40]

İnflamasyon: Hemostazın ardından kısa bir süre sonra düşen kan akımıyla hipoksi ve asidoz meydana gelir. Bu durum nitrik oksit, adenosin ve diğer vazodilatasyon gerçekleştiren moleküllerin üretimini sağlar ve böylece vazodilatasyon gerçekleşir. Eş zamanlı olarak mast hücrelerinden histamin

[14,16] salgılanır, vasodilatasyon ve damar permabilitesi arttırılır, böylelikle yara bölgesine inflamatuvar hücreler gelir [14]. Ayrıca mast hücrelerinden histamin, enzimler ve diğer aktif aminler salgıladıktan sonra yara bölgesinin etrafında kızarıklık, şişlik, sıcaklık [14,16] ve ağrı gibi inflamasyonun işaretleri görülmeye başlar [16].

İnflamatuvar hücreler yara bölgesine göç ettikten sonra inflamasyon fazını başlatırlar [15]. Nötrofiller, makrofajlar inflamatuvar fazda görülen temel hücrelerdir [15,16]. Onlar yaranın enfeksiyonunu ve hücre kalıntılarını temizler, proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 (intrlökin1), IL-6, IL-8, TNF- α ve büyüme faktörleri (PDGF, IGF-1, TGF- α , TGF- β , FGF) salgırlar [16].

İnflamatuvar hücrelerin damar dışına çıkıp yaranın içine gelmesi sürecinde, adezyon molekülleri (selektinler, hücre adezyon molekülleri (CAMs)) ve reseptörler (integrinler) arasında önemli etkileşimler meydana gelir. Lökositler selektin molekülleri vasıtasıyla yavaşlar, endotel hücrelerinin yüzeyinde yuvarlanmaya başlar ve sonunda endotel hücresinin duvarına zayıf bir şekilde yapışırlar. Yuvarlanma devam ederken sitokinler, büyüme faktörleri ve bakteriyel ürünlerle aktive olurlar. Aktive olmuş lökositlerin integrin reseptörleri ile VCAM (vascular cell adhesion molecule) ve ICAM (intercellular adhesion molecule) gibi ligandlarla bağlanması sonucunda endotel hücrelere sıkıca bağlanırlar. Sonra venüllerdeki endotel hücreler arasına sıkışırlar ve yara bölgesine doğru göç ederler, ekstraselüler matris komponentlerine bağlanırlar. İnflamatuvar hücreler elastaz ve kolajenaz salgılayarak bu hücrelerin göçüne yardım ederler [16].

Lökositler yara bölgesine; hasarlanan doku, bakteri ve inflamatuvar ürünlerin oluşturdukları kemotaktik sinyaller çeker [2]. Lenfositler yaralanmadan yaklaşık 72 saat sonra ortaya çıkarlar ve ECM yapı iskelesini üretimi ve kolajen remodellinginde etkilidirler [14]. T-lenfositlerin rolü tam olarak bilinmemektedir. Fakat son çalışmalarda T ve B lenfositlerin eksikliğinde skar doku oluşumunun azaldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak patojenlere karşı savunma, inflamasyonun düzenlenmesi ve doku bütünlüğünün devamlılığı gibi olayların düzenlenmesinde görev alır. Deri gama-delta T hücrelerinin eksikliği ya da yokluğunda yara kapanmasında gecikme ve keratinositlerin proliferasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu hücreler sitokin ve kemokin üretirler [15].

Nötrofiller, plateletler tarafından salınan çözünmüş mediatörlere cevap veren ilk inflamatuvar hücrelerdir [14,16]. Nötrofiller, bakterileri ve debrisini ortamdan uzaklaştırmak için bazı mekanizmalar kullanırlar. Bunlardan biri yabancı parçaları (bakteri ya da ölü doku) fagositoz ile yutmak [14-16], başka bir mekanizma bakterileri öldürecek toksik maddeler salmaktır [14].

Nötrofiller TNF- α ve IL-1 gibi epitelyal hücre ve fibroblastları aktive eden inflamatuvar mediatörleri salgılar [16]. Sonrasında nötrofiller yara içerisine göç ederek fagosit edilmiş bakterileri öldüren serbest oksijen radikalleri üretimi [14-16], yaralanmayla zarar görmüş ekstraselüler matriksin komponentlerini uzaklaştırma ve [15,16], yüksek seviyede proteaz salgılama gibi olayları gerçekleştirirler [15]. Nötrofillerin görevi bittiğinde apoptozise uğrarlar [14] ve makrofajlar onları fagosit ederek apoptotik hücreleri temizlerler [14,15]. Nötrofiller genellikle 2-3 gün sonra yarada azalırlar ve onların yerini doku monositleri alır [16].

Aktive makrofajların yara iyileşmesinin düzenlenmesinde çok önemli rolleri vardır [15,16]. Makrofajlar, monosit olarak dolaşımda bulunur ve yaralanmadan yaklaşık 24 saat sonra yara bölgesine gelirler. Kemokin, sitokin, büyüme faktörleri, kollojen ve fibronektinin proteolitik degradasyonu ile oluşan çözünbilir fragmentlerin etkisiyle doku makrofajlarına farklılaşırlar. Makrofajlar dokudaki bakterileri yutarlar, öldürürler ve salgıladıkları matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve elastaz enzimlerinin faaliyetiyle ölü dokuyu uzaklaştırırlar [16]. Ayrıca makrofajlar lenfositlerin aktivasyonunu sağlayan sitokin salgırlar [15]. Makrofajlar inflamasyon fazından proliferatif faza geçişte aracılık eder [15,16]. Ayrıca PDGF, IGF-1, TGF- β , IL-1[4,6,16], CSF-1[6], FGF, IL-6[4,16] TGF- α salgırlar [16]. Bu çözünbilir mediatörlerden bazıları fibroblastları aktive eder. Yaradaki nötrofillerin eksikliği ve makrofajların sayısındaki azalmayla inflamatuvar fazını bitişini yaklaşıp ve sonrasında proliferatif faz başlar [16].

Proliferatif faz (proliferasyon): Proliferatif fazın anahtar hücreleri fibroblastlardır [16]. Bu fazda;

- Geçici bir fibril matriks oluşumu
- Anjiyogenez ve dolaşımın restore edilmesi
- Granülasyon doku oluşumu

- Epitelizasyon olayları meydana gelir [14,16].

Fibroblast göçü: Fibroblastlar, platelet ve makrofajlardan salınan çözülebilir mediatörlerin etkisiyle (PDGF ve TGF- β gibi) yaraya doğru göç ederler[14,16] ve ekstraselüler matrikste spesifik matriks komponentleriyle etkileşime geçerler. Göç etmeleri ve yara dokusunda toplanmaları için morfolojilerinde değişiklik, yara bölgesinde hareket edebilmeleri için de proteaz sekresyonu yapmaları gerekir[16]. Fibroblastlar yara bölgesinde proliferasyona uğrar ve miyofibroblastlara dönüşürler. Bu durum miyofibroblastların fibronectin ve kollojen gibi proteinlere bağlanarak yaranın daralmasına olanak sağlar [13,14]

Fibroblastlar integrin reseptörleri sayesinde fibronectin, vitronektin ve fibrin gibi matriks komponentlerine bağlanırlar. Fibroblast hareketinin doğrultusu, ECM'deki ve geçici matriksteki fibrillerin yerleşimi, kemotaktik büyüme faktörleri, sitokin ve kemokinlerin gradienti ile sağlanır. Fibroblastlar matriks boyunca onların ileriye olan hareketlerini kolaylaştıran proteolitik enzim salgırlar. Salgılanan bu enzimler, kollojenaz (MMP-1) jelatinaz (MMP-2 ve MMP-9) ve stromelisin (MMP-3)'dir[16]. MMPs endopeptidazların geniş bir aile olup yara iyileşme sürecinde önemli rolleri vardır. Hücre göçünde, anjiyogeneze, yara kontraksiyonunda etkilidirler. MMPs'lerin etkilerini onların doku inhibitörleri olan tissue inhibitors of MMPs (TIMP) dengeler [3].

Kollojen ve ekstraselüler matriks üretimi: Fibroblastlar kollojen, proteoglikan [15,16] fibronectin [14,16] ve diğer komponentleri üretir [16]. PDGF fibroblastların proliferasyonunu, kemotaksisini ve kollojenaz ekspresyonunu stimüle eder. TGF- β kollojen, fibronectin ve proteoglikanın gen transkripsiyonunu uyararak, matriks proteinlerinin üretimini artırır. Aynı zamanda proteazların sekresyonunu baskılar ve metalloproteinazların doku inhibitörlerinin (TIMP) sentezini uyarır [16].

Fibroblastlar matriks içine göç ettikten sonra çoğalmaya başlarlar ve kollojen, elastin ve proteoglikanları içeren granülasyon doku komponentlerini üretirler [16]. İlk başta tip III kollojen yüksek seviyelerde sentezlenir [14,16]. Kollojen mRNA'sının transkripsiyondan sonra yeni kollojen zincirleri üretilen endoplazmik retikulum üzerindeki poliribozamlara gider. Bu süreçte lizin ve prolinin hidroksilasyonu meydana gelir. Üç protein zinciri birleştirilerek fibriller kollojen molekülünün üçlü helikal yapısı oluşturulur ve yeni oluşan zincir modifikasyona uğrar. Hidroksiprolin kollojenin üçlü helikal yapısının stabilizasyonu

için çok önemli bir moleküldür. Tamamı hidroksillenen kollojenin daha yüksek erime sıcaklığı vardır. Hidroksiprolin seviyesinin düşük olduğu durumlarda, örneğin C vitamini yetersiz olduğunda kollojenin üçlü yapısı değişir ve düşük sıcaklıklarda çok hızlı bir şekilde bozulur[16].

Sonuçta prokollojen molekülleri ekstraselüler boşluğa salgılanır ve orada N ve C terminallerinde nonhelikal segmentler proteolitik klavaja uğrarlar. Kollojen molekülleri baştan kuyruğa ve yan yana gelerek kollojen fibrilleri şeklinde düzenlenirler. Ekstraselüler boşlukta önemli bir enzim olan lizil oksidaz enziminin etkisiyle kollojen molekülleri arasında çapraz bağlar kurulur. Kollojen molekülü olgunlaştıkça gitgide artan molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar yerleşir. Oluşan çapraz bağlar ile kollojen kuvvetli ve stabil hale gelir. Kollojen normal dokuda kuvvetlidir buna karşı skar dokuda meydana gelen kollojen çok daha küçüktür ve skar doku daima zayıftır [16].

Anjiyogenez: Anjiyogenez süreci düşük oksijen basıncı, düşük pH seviyesi ve yüksek laktat seviyeleri ile uyarılır. Ayrıca bazı çözülebilir mediatörler epitelyal hücreler için anjiyogenik özelliktedir ve bunların çoğu fibroblastlar, makrofajlar, vasküler endotelyal hücreler ve epitelyal hücreler tarafından sentezlenir. Endotelyal hücreler VEGF ve TGF- α 'nın etkisiyle aktive olurlar ve bFGF ile de anjiyogenez başlatılır [16].

Dokudaki oksijen seviyeleri oksijen duyarlı proteinlerle etkileşerek doğrudan anjiyogenezi düzenler. Örneğin; oksijen bağlayan hypoxia-inducible factor (HIF) transkripsiyon faktörünün hipoksi durumunda aktivasyonu vasıtasıyla kapiller endotelyal hücreler tarafından VEGF sentezi arttırılır. Kapiller endotelyal hücreleri çevreleyen oksijen seviyeleri düştüğünde, hücrelerdeki HIF seviyeleri artar. HIF-1, DNA'nın spesifik sekanslarına bağlanarak VEGF gibi spesifik genlerin transkripsiyonunu stimüle eder. Yara dokusunda oksijen seviyeleri arttığında hücrelerde HIF molekülü yıkılır ve anjiyogenetik faktörlerin sentezi azalır. Anjiyogenezin düzenlenmesinde VEGF gibi stimülan faktörler ve anjiyostatin, endostatin, trombospondin gibi anti-anjiyogenik faktörler rol alır [16].

Anjiyogenik faktörlerin bağlanmasıyla kılcallardaki endotelyal hücreler, yakınlardaki damarlanması bozulmuş olan bölgenin matriksine doğru göç ederler ve sonra orada çoğalıp tomurcuklanırlar. Filizlerin ucu endotel hücrelerden uzanır ve diğer bir filiz ile karşılaşır, gelişirler. Daha sonra gelişen damarların lümeni oluşmaya başlar ve yeni damar hattı

tamamlanmış olur. Bu sürecin devamında kılcal damar sistemi tamir edilir, doku oksijenizasyonu ve metabolik ihtiyaçlar karşılanır [16].

Kan damarlarının yenilenmesine ek olarak, lenfatik damarların restorasyonu ile lenfogenezis de meydana gelir [1].

Granülasyon: Granülasyon dokusu normal derinin yerini alan geçici bir dokudur. Son derece yoğun kapiller kan damar ağı, çok sayıda makrofaj, fibroblast hücresi ve kollojen fibriller ile karakterizedir [16]. Burası pek çok kapillerin granüler görünümünden dolayı granülasyon dokusu adını alır [1]. Normal dermis ile karşılaştırıldığında metabolik hızları yüksektir [16].

Epitelizasyon: Dermal yaralar 3 temel mekanizmayla iyileşir: kontraksiyon, bağlayıcı doku matriks birikimi ve epitelizasyon [16]. EGF, TGF- α ve FGF'nin etkisiyle epitel hücrelerinde çoğalma ve göç meydana gelir, reepitelizasyon başlar [4]. Hücreler ve matriks arasındaki etkileşim ile doku yaranın merkezine doğru hareket eder. Yeni ekstraselüler matriks için kollojen, peptidoglikan ve bağlayıcı proteinler ile matriks birikimi sağlanır. Epitelizasyon olayında, yara kenarındaki epitel hücrelerinin çevresinde ya da saç folikülü ve yağ bezleri gibi rezüdüel deri uzantılarında kontak inhibisyonu kaybedilir ve epiboli süreciyle yara bölgesinin içine doğru göç etmeye başlanır. Göçün devam etme sürecinde bazal tabakadaki hücreler epitel hücrelere katkı sağlamak için çoğalmaya başlar [16].

Epitelizasyon, epitel hücrelerindeki ayrılma, göç, çoğalma ve farklılaşmadan oluşan çok basamaklı bir süreçtir. Bozulmamış olgun epidermis, kübik bazal keratinositlerden değişen epitel hücrelerden farklılaşmış tabakalardan oluşur. Sadece bazal epitel hücreler çoğalabilirler. Bu bazal hücreler komşu hücrelerine dezmozomlarla ve en alttaki membrana hemidezmozomlarla bağlıdır. EGF, KGF (keratinosit growth factor), TGF- α gibi büyüme faktörleri salgılandığında bu faktörler epitel hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak migrasyonu ve proliferasyonu uyarır. Bağlanan büyüme faktörleri dezmozom ve hemidezmozomların çözülmesine neden olur böylelikle hücreler birbirinden ayrılabilir. İntegrin proteinler eksprese edilir ve yassılaştıran kübik bazal epitel hücreler tek tabaka üzerinde yeni yeni oluşan granülasyon dokusunun içerisine göç etmeye başlarlar. Yara kenarına yakın bazal epitel hücrelerin proliferasyonu yeni hücrelerin tek tabakada ilerlemesini sağlar. Tek tabakanın kenarındaki lider epitel hücreler proteolitik enzimler (MMPs) üretir ve sekrete eder. Göç olayı, epitel hücrelerin birleşmiş bir tabaka oluşturmak

için diğer ilerleyen hücrelerle bağlantı kuruncaya kadar devam eder. Bağlantı kurulduğunda tek tabakalı epitelin tümü proliferatif moda girer ve epidermisin tabakaları yeniden kurulur sonra da olgunlaşmaya başlar. TGF- β epidermal tabakanın olgunlaşmasını (farklılaşma ve keratinizasyon) hızlandırıcı özellikte bir büyüme faktörüdür. Hemidezmozom ve dezmozomlar yeniden kurulur [16].

Remodelling fazı (yeniden modellenme): Normal epitel dokunun gelişmesi ve skar dokusunun olgunlaşması ile sonuçlanan son basamak remodelling fazıdır [14]. Bu fazının önemli bir özelliği ECM remodellinginin olmasıdır [15].

Granülasyon dokusunun olgunlaşması kapiller sayısında azalmanın yanında [15,16], glikozaminoglikanların (GAGs) ve glikozaminoglikan, proteoglikan ile ilişkili su miktarında azalma olaylarını içine alır [16]. Granülasyon dokusunda olgunlaşma devam ederken oradaki hücrelerin sayısı (endotelial hücreler, miyofibroblastlar ve inflamatuvar hücreler) apoptozise uğrayarak azalır ve metabolik aktivite de azalır [1,16]. GAGs ve proteoglikanların yardımıyla da kollojen sentezi başlatılır [13]. TGF- β yeni kollojen sentezine aracılık eder iken, PDGF ise eski kollojenlerin yıkımına sebep olur [4]. Ayrıca kollojenin tipinde miktarında ve organizasyonunda değişimler meydana gelir [16]. İlk olarak yüksek seviyede tip 3 kollojen sentezlenir fakat daha sonra tip 1 kollojen onun yerini alır [1,14,16]. Onarılan doku sağlam doku kadar güçlü olmaz. Doku gerim kuvveti, granülasyon süresince kovalent çapraz bağları atılmış ve orada birikmiş olan kollojen fibrillerin re-organizasyonu ile arttırılır. Birkaç ay içinde ya da daha fazla sürede, tamir edilen dokuda yara gerim kuvveti normal yaranın yaklaşık %80'ine ulaşır [16].

En son olarak kollojen remodellingi sürecinde kollojen degradasyonu gözlenir. Fibroblastdaki spesifik kollojenaz enzimleri, nötrofil ve makrofajlar 3 zincirli olan yapıların hepsini belirli bölgelerinden kırar. Bu kollojen fragmentleri diğer proteazlar tarafından da sindirilmeye devam eder [16]. Scar dokusu olgunlaştıkça damarlanma azalır ve kırmızı renkten pembeye sonrada gri renge dönüşür [14].

Çizelge 2.1.Yara iyileşmesinde görev alan hücreler [2]

YARA İYİLEŞME EVRELERİ	YARLANMADAN SONRAKİ GÜNLER	GÖREV ALAN HÜCRELER
HEMOSTAZ	Hemen	Trombositler (Plateletler)
İNFLAMASYON	1- 4 gün	Nötrofiller-makrofajlar
PROLİFERASYON	4-21 gün	Makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar, keratinositler, nörositler
REMODELLİNG	21 gün-2 yıl	Fibrositler

Çizelge 2.2.Yara iyileşme sürecinde meydana gelen olaylar [15]

FAZ	HÜCRESEL VE BİYOFİZYOLOJİK OLAYLAR
HEMOSTAZİ	Damarlarda daralma, platelet agregasyonu ve fibrin formasyonu
İNFLAMASYON	Nötrofil infiltrasyonu, monosit infiltrasyonu ve makrofaja farklılaşma, lenfosit infiltrasyonu
PROLİFERASYON	Re-epitelizasyon, anjiyogenez, kollojen sentezi ve ECM formasyonu
REMODELLİNG	Kollojen remodellingi ve vasküler olgunlaşma

2.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara iyileşmesini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler sistemik ve lokal faktörler olarak sınıflandırılabilir [15]. Kısaca bu faktörler; oksijen, enfeksiyon, yaş [14,15], beslenme, diyabet, [2,14,15], stres, eşey hormonları, obezite, sigara kullanımı, alkol

tüketimi, ilaçlar [15], genetik [2,14] ve bağışıklık sisteminin baskılanması şeklinde özetlenebilir [14].

2.5. Büyüme Faktörlerinin Yara İyileşmesi İle İlişkisi

Büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler yara iyileşmesi süresince pek çok hücre tipinin koordinasyonu için önemlidir ve iyileşmenin sonunda derinin bariyer fonksiyonu tekrar sağlanmış olur [4]. Yara iyileşmesinde görülen büyüme faktörleri şunlardır:

EGF: Yara iyileşmesinde etkili olan büyüme faktörlerinden neredeyse en iyi bilineni EGF ailesidir. Bu ailenin üyelerinden yara iyileşmesinde temel olarak EGF, TGF- α , heparin binding-EGF (HB-EGF) görülür. Bu ligandlar EGF reseptörüne (EGF-R) bağlanırlar ve bu olay sonucu medyana gelen sinyal yolağı hücre göçüne ve çoğalmasına neden olur. EGF-R aktive edilen çalışmalarda keratinositlerin çoğalmasını ve göçünü arttırdığı ve böylece reepitelizasyonda önemli rolü olduğu gösterilmiştir [4].

EGF platelet, makrofaj ve fibroblastlardan salgılanan bir büyüme faktörüdür. İn vitroda EGF up-regüle edilen çalışmalarda akut yaralanmadan sonra re-epitelizasyonun hızlandığı ve yara gerim kuvvetinin arttığı bildirilmiştir. EGF keratin ekspresyonunu da arttırmaktadır [4].

TGF- α : Plateletler, keratinositler, makrofajlar, lenfositler ve fibroblastlar tarafından salgılanır. İn-vitro çalışmalarda keratinosit göçünü ve çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir. in vivo yapılan çalışmalarda ise, kısmi kalınlıkta yaralarda erken stimülasyonda ve yara epitelizasyonunun sürdürülmesinde rolü olduğu bildirilmiştir [4].

FGF: 23 üyeden oluşan FGF familyasının yara iyileşmesinde görülen en önemli üyeleri FGF-2, FGF-7, FGF-10'dur. FGF'ler fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler, kondrositler, mast hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından sentezlenirler. Yüksek affiniteli FGF reseptör (FGF-R) familyasının 4 üyesi vardır ve bu reseptörler tirozin kinaz transmembran proteinidir [4].

FGF-2 ya da bazik FGF, akut yara iyileşmesinde granülasyon dokusunun oluşumu, re-epitelizasyon ve doku remodellinginde görev alır. Yapılan invitro çalışmalarda FGF-2'nin ECM komponentlerinin sentezi ve birikiminin düzenlenmesinde ayrıca re-epitelizasyon sürecinde keratinosit hareketlerinin arttırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir [4].

FGF-7 ve FGF-10'un ise keratinositlerin çoğalmasında ve göçünde önemli rolleri vardır. Ayrıca FGF-7 ve FGF-10 ROS'un detoksifikasyonu kapsayan transkripsiyon faktörlerini artırır. FGF-7 vasküler endotel hücreler için mitojenik özelliktedir ve VEGF'nin upregülasyonuna yardımcıdır, bununla beraber endotel hücreleri ürokinaz tip plazminojen aktivatörü üretmek için stimüle eder [4].

TGF- β : TGF- β ailesi TGF- β 1-3, bone morphogenic proteins (BMP) ve aktivinlerden oluşan bir ailedir. Memelilerde başlıca TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 bulunur ve yara iyileşmesi sürecinde baskın olarak TGF- β 1 görülür. Makrofajlar, fibroblastlar, keratinositler ve plateletler tarafından üretilirler. Serin-trionin kinaz yapısında heteromerik reseptör kompleksine bağlanarak işlev görürler [4].

TGF- β 1 inflamasyonda, anjiyogeneze, reepitelizasyon ve konnektif doku rejenerasyonunda görev alır. Yaralanmanın başlangıcında ekspresyonu artar. Fibronektin, fibronektin reseptörü, kollojen ve proteaz inhibitör gen ekspresyonlarını artırarak granülasyon dokusunun oluşmasına yardımcı olur. Ayrıca VEGF'nin up-regüle olmasında etkilidir. Matriks oluşumu ve remodelling fazında kollojen üretimini sağlar. MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u inhibe edici etkisi vardır ve TIMP-1 sentezinin promotörüdür. Böylelikle kollojen yıkımını inhibe eder [4].

TGF- β 2 anjiyogenezi indükleyerek granülasyon dokusunun oluşumunu stimüle eder. Reepitelizasyonu hızlandırır.

TGF- β 3 keratinosit göçünü kolaylaştırır ve yara bölgesine inflamatuvar hücreleri, fibroblastları toplar. Ayrıca insan keratinositlerinde DNA sentezini durdurucu etkisi bulunmaktadır [4].

PDGF: PDGF'ler plateletler, makrofajlar, vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositler tarafından sentezlenirler. PDGF'ler yara iyileşmesinin her safhasında görev alırlar. Yaralanmadan sonra plateletlerden salgılanır. Bu durum mitozu ve nötrofillerin, makrofajların, fibroblastların yara bölgesine doğru kemotaksisini uyarır. Ayrıca makrofajlardan TGF- β gibi büyüme faktörlerinin sentezini ve salınımını uyarır. PDGF özellikle kan damarının olgunlaşmasında rol oynar. İn-vitro çalışmalarda IGF-1 ve trombospodin-1 sentezini uyararak reepitelizasyonda görev aldığı bildirilmiştir.

Fibroblastların çoğalmasını artırır ve fibroblastların miyofibroblastra dönüşmesine teşvik eder. Doku remodellingi süresince MMPs'i up-regüle ederek eski kollojenlerin yıkımını sağlar [4].

VEGF: VEGF ailesinin üyeleri; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörüdür. VEGF-A endotel hücreler, keratinositler, plateletler, makrofajlar, nötrofiller tarafından sentezlenirler. Bağlanıldığında farklı etkiler oluşan VEGF reseptör-1 (VEGFR-1) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2) olmak üzere iki tirozin kinaz reseptörü vardır. VEGFR-2 endotel hücrelerin kemotaksisinde ve çoğalmasında ve endotel hücrelerin farklılaşmasında önemlidir. VEGFR-1 ise kan damarının organizasyonu için gereklidir. Ayrıca vasküler permabilitede, vasküler düz kas hücrelerinde MMP ekspresyonunda ve antiapoptotik proteinlerin indüklenmesinde görev alabilir [4].

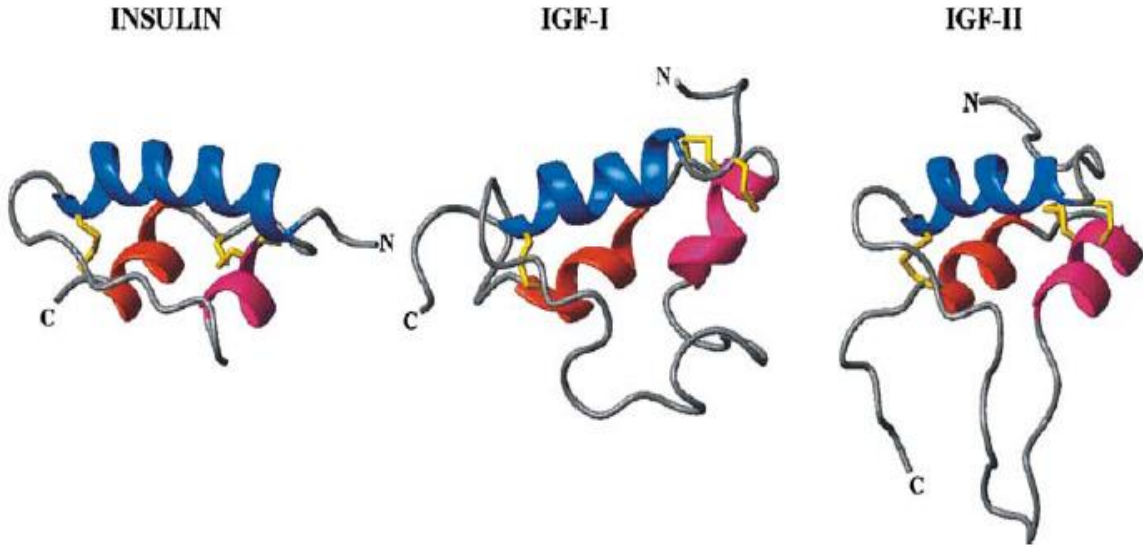
VEGF-A'nın sentezini tetikleyen temel etken hipoksidir. VEGF-A anjiyogenezin başlamasında, endotel hücre göçünde ve çoğalmasında önemlidir. Lenf damarlarının oluşmasında da önemli rolü vardır [4].

VEGF-C ise ilk olarak makrofajlar tarafından salınır, yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında önemlidir ve VEGF-C daha çok VEGF reseptör-3 (VEGFR-3) ile çalışır [4].

GM-CSF: GM-CSF özellikle yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında yara bölgesinde nötrofillerin sayısını fonksiyonunu artırır. İn-vitro çalışmalarda keratinositlerin çoğalmasını teşvik ettiği böylece reepitelizasyonu arttırdığı gösterilmiştir. IL-6'nın indirekt olarak up-regülayonunu sağlar. Ayrıca endotel hücrelerin göçünde ve çoğalmasında da etkilidir [4].

2.6. IGF Sistemi

IGF'ler büyümeyi ve metabolizmayı etkileyen çok yönlü sistemlerin elemanlarından. Growth hormonunun metabolik etkilerine aracılık eden IGF'ler temelde karaciğerde üretilirken, otokrin ve parakrin etkilerini gösterdikleri kas dokusu gibi bazı lokal dokularda da IGF'ler üretilir. İzole edilmiş büyüme hormonuna bağımlı büyüme faktörü, kıkırdakta sülfat bileşimini artırmasından dolayı ilk kez 1957'de Salmon ve Daughaday tarafından sülfasyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, insülin benzeri bir biyolojik aktivitenin serum immunoreaktif insülininden bağımsız olarak meydana geldiği



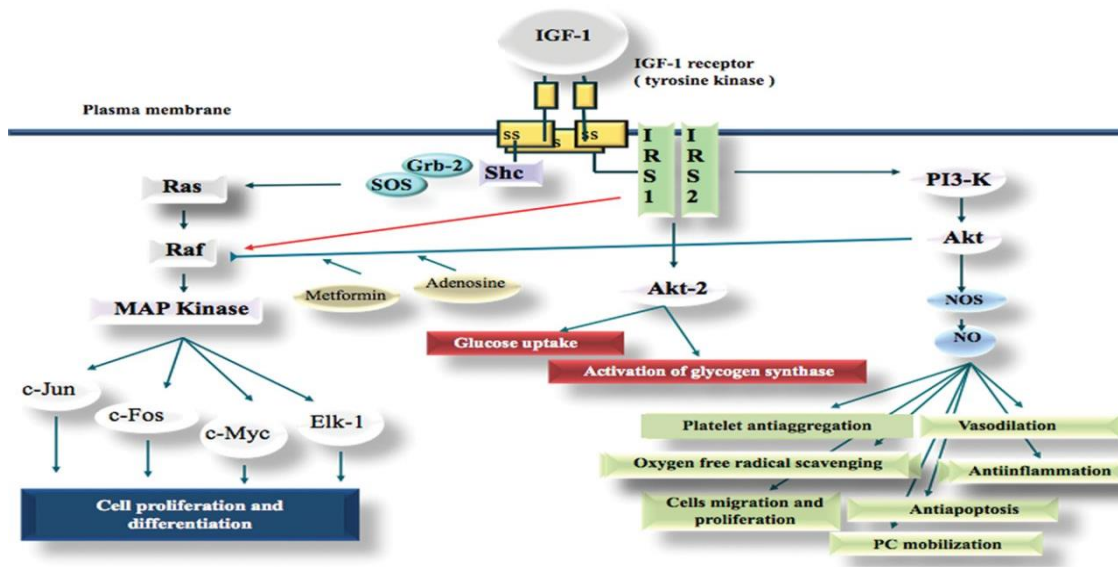
Şekil 2.6. İnsülin, IGF-1 ve IGF-2' nin yapısı [9]

2.6.2. IGF reseptörleri

IGF'ler protein yapıda olduklarından hücre zarını geçememekte ve etkilerini hücre zarındaki reseptörlerine bağlanarak göstermektedirler [17]. Üç farklı tip IGF reseptörü bulunmaktadır: İnsülin reseptörü, Tip I IGF (IGF-1R) reseptörü, Tip II IGF mannoz-6-fosfat (M6F) reseptörü [7]. IGF-1, IGF-2 ve insülin arasındaki yapısal benzerliğin yanı sıra IGF-1 reseptörü ile insülin reseptörü arasında da benzerlik bulunmaktadır [9]. IGF'ler hipoglisemik etkilerini insülin reseptörlerine bağlanarak yaparlar. İnsülin reseptörü insülinin biyolojik fonksiyonlarına aracılık ederken insülin reseptörünün intrauterin dönemde IGF-2'nin mitojenik aktivasyonunun bazılarında sorumlu olduğu gösterilmiştir [7].

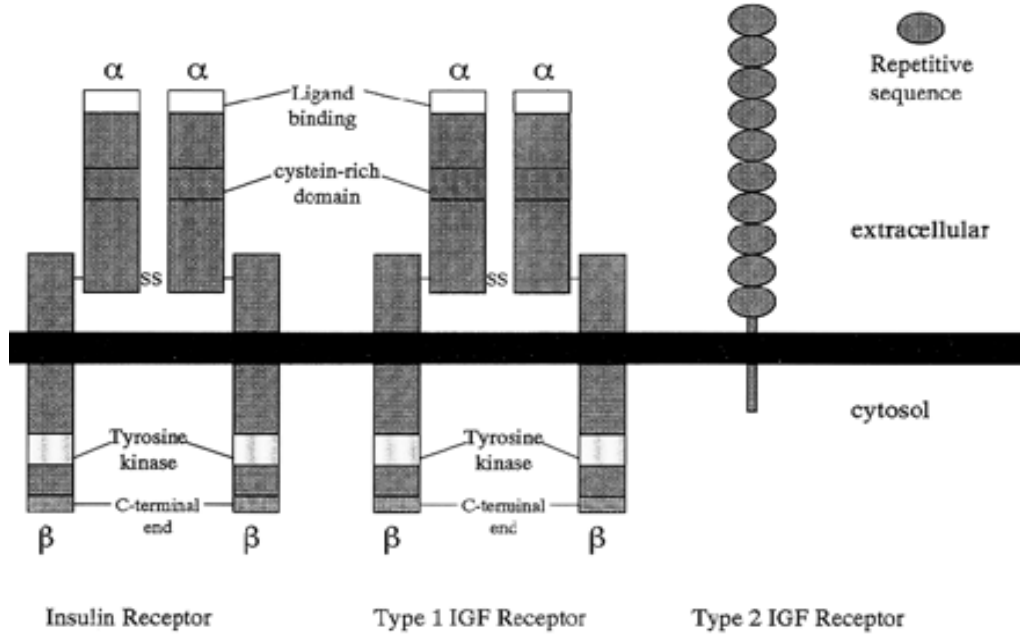
IGF-1R: IGF'ler biyolojik etkilerini meydana getirmek için öncelikle bu reseptörü kullanırlar [10]. IGF-1 reseptörü, hücre dışı iki alfa ünitesi ve iki transmembran beta ünitesi içeren bir glikopeptiddir ve alfa alt ünitelerinin her biri yaklaşık 135 kDA, beta alt ünitesinin her biri ise 95 kDA' dur [7,9,10]. Alfa ve beta alt üniteleri disülfid bağları ile birbirine bağlanmıştır [10,17]. Tip I reseptörü ve insülin reseptörü arasında aminoasit yapıları bakımından yaklaşık % 60 benzerlik bulunmaktadır [7]. Bu reseptörler benzer ligandları spesifik olarak bağlar [17]. Ekstraselüler bölgede bulunan kısma ligandın bağlanmasıyla reseptörde konformasyonel bir değişiklik meydana gelir ve beta bölgesindeki tirozinler fosforlanır [9]. IGF-1, IGF-2 ve insülin tirozin kinaz aktivitesine sahip IGF-1R'e bağlanarak farklı potansiyellerde hücre büyümesi, farklılaşması, hücre göçü gibi çeşitli cevaplar

oluştururlar [7,9]. IGF-1'in tip I reseptörüne affinitesi IGF-2'den 3 kat, insülininden ise 800 kat daha fazladır [7]. IGF-1R'ü nakavt durumunda iken karaciğerin rejenerasyon kapasitesinde azalma, IGF-1R geni bozulmuş farelerde kemik hacminde önemli derecede azalma, IGF-1 reseptörü inhibe olan farelerin beyinde ise bozulmuş re-miyelinizasyon görülmüştür. Ayrıca pankreastaki β hücrelerinde IGF-1R'de meydana gelen bir delesyonun, glikoz uyaranlı insülin sekresyonunda ve glikoz toleransında bozulmalara sebep olduğu gösterilmiştir [10].



Şekil 2.7. IGF-1reseptörü ve sinyalizasyon mekanizması [42]

IGF-2 (Tip II IGF mannoz-6-fosfat (M6F) reseptörü) reseptörü: IGF-1R'ünden yapısal ve fonksiyonel olarak farklıdır [10]. IGF-2'nin bağlanabileceği 300 kDa transmembran proteini içeren tek zincirli bir polipeptiddir ve IGF-2'ye affinitesi yüksek, IGF-1'e affinitesi düşüktür [7,9,10]. IGF-2'nin alım ve yıkımına aracılık eder. Lizozomal enzim trafiğini düzenleyen kation bağımsız mannoz-6-reseptörüyle çok benzer olduğundan IGF-2 moannoz-6-fosfat reseptörü olarak ta bilinir [9,10,17]. IGF-2 M-6-F reseptörünün IGF sinyal üretiminde önemli rolü olmadığı düşünülmesine rağmen, IGF-2 M-6-F reseptörünün intrasellüler kompartmanlar arasındaki lizozomal enzimlerin taşınmasında görev aldığı görülmüştür [7].



Şekil 2.8. İnsülin reseptörü, IGF-1R ve IGF-2R'nin yapısı [43]

2.6.3. IGF bağlayıcı proteinler (IGFBPs)

IGF'ler dolaşımında, diğer biyolojik sıvılarda ve dokularda kendilerine ait bağlayıcı proteinlere (BP) yüksek affiniteyle bağlanırlar ve altı tane IGF bağlayıcı protein (IGFBP1-IGFBP6) bilinmektedir [8,9,18]. IGFBPs dolaşımdaki IGF'lerin taşınmasında, IGF turnoverında ve dolaşımdaki IGF'lerin yarı ömrünün düzenlenmesinde görev alırlar [10]. Yapısal olarak bakıldığında bütün IGFBP'lerde son derece iyi korunmuş N-terminal domeini, C-terminal domeini ve merkezde karasız olan L domeini bulunur [9,10]. N domeini yüksek affiniteyle IGF bağlanma bölgesine sahipken, C domaini bir dereceye kadar bağlanmaya katkı sağlar. C domeini sıklıkla IGF'lerin başka proteinlerle interaksyona aracılık eder. L domaini ise en az korunmuş bölge olup glikozilasyon, fosforilasyon ve proteolizi kapsayan post-translasyonel düzenleme için bölgeler içerir [10]. Bu translasyonel modifikasyonlar IGFBP'nin fonksiyonu ve yapısı için önemlidir [8,10].

BP'lerin IGF'ler üzerinde arttırıcı ve azaltıcı etkilerinin yanı sıra [8-10], IGF'den bağımsız etkileri de bulunmaktadır [8,9]. Bütün BP'ler ve IGF arasında 2'li bir kompleks oluşurken, BP-3 ve BP-5 ile IGF arasında, asit karasız alt ünitelerden (ALS) oluşan 3'lü bir kompleks meydana gelir [8]. Bağlayıcı proteinler IGF'leri proteolitik degradasyondan koruyarak yarılanma ömrünü uzatır. Yüksek affiniteli proteinler olan IGFBP'ler, tüm ekstraselüler sıvılarda ve dokularda bulunmakla beraber, dokular arasında spesifik etkileri bakımından

önemli farklılıklar da bulundurulur. IGF'lerin tipik insülin benzeri etkilerini BP'lerin engellediği, kılcallardan geçişini sınırladığı, hücre zarı reseptörüne bağlanmasını engellediği ve IGF'nin aktif şekline, serum proteazlarının etkisi sonucunda bağlayıcı peptidler ayrıldıktan sonra dönüşerek aktif hale geldiği gösterilmektedir [7].

IGFBP'ler bir protein ailesidir [7,10]. IGFBP'ler özel proteolitik enzimlerle parçalanır. IGF-1, IGF-2, IGFBP ve IGFBP proteazların somatik büyüme ve hücre düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. IGFBP'lere bağlı olmayan serbest IGF'ler, IGF reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler [19]. Farklı doku hücreleri tarafından üretilip salınan BP türleri de farklı olabilmektedir. İnsan fibroblastları BP-3,4,5'i, düz kas hücreleri BP-2,3 ve 4'ü, endometriyum BP-1,2 ve 4'ü, meme epitel hücreleri BP-2,3 ve 4'ü üretilip salgılama yeteneğine sahiptirler [7].

IGFBP-1 29 kDa ağırlığındadır ve çoğu fosforillenmiş olup az bir kısmı non-fosforile durumdadır. Fosforillenmiş IGFBP-1'ler IGF'nin etkisini inhibe ederken, non-fosforile IGFBP-1 IGF'nin etkisini stümüle eder. IGFBP-2 32 kDa ağırlığındadır ve post-translasyonel modifikasyona uğramamış bir proteindir [8]. IGFBP-1 ve IGFBP-2 serumda bulunan düşük molekül ağırlıklı glikozillenmemiş proteinlerdir. IGFBP-1 derişimi serum insülin seviyeleri tarafından da kontrol edilir [7].

IGFBP-3'ün oluşumu sırasında fosforilasyon ve N-glikozilasyon ile post-translasyonel modifikasyon meydana gelir [8]. IGFBP'lerin en önemli olanıdır [17,18]. IGFBP'lerin %75'ini meydana getirir [17]. Serumda bulunan IGFBP-3, 45-54 kDa ağırlığındadır. IGF-1 yarılanma ömrünü uzatan ve biyolojik aktivitesine etki eden IGFBP-3 serumdaki IGF-1'in % 95'ini bağlar ve salgılanması büyüme hormonu tarafından kontrol edilir [7].

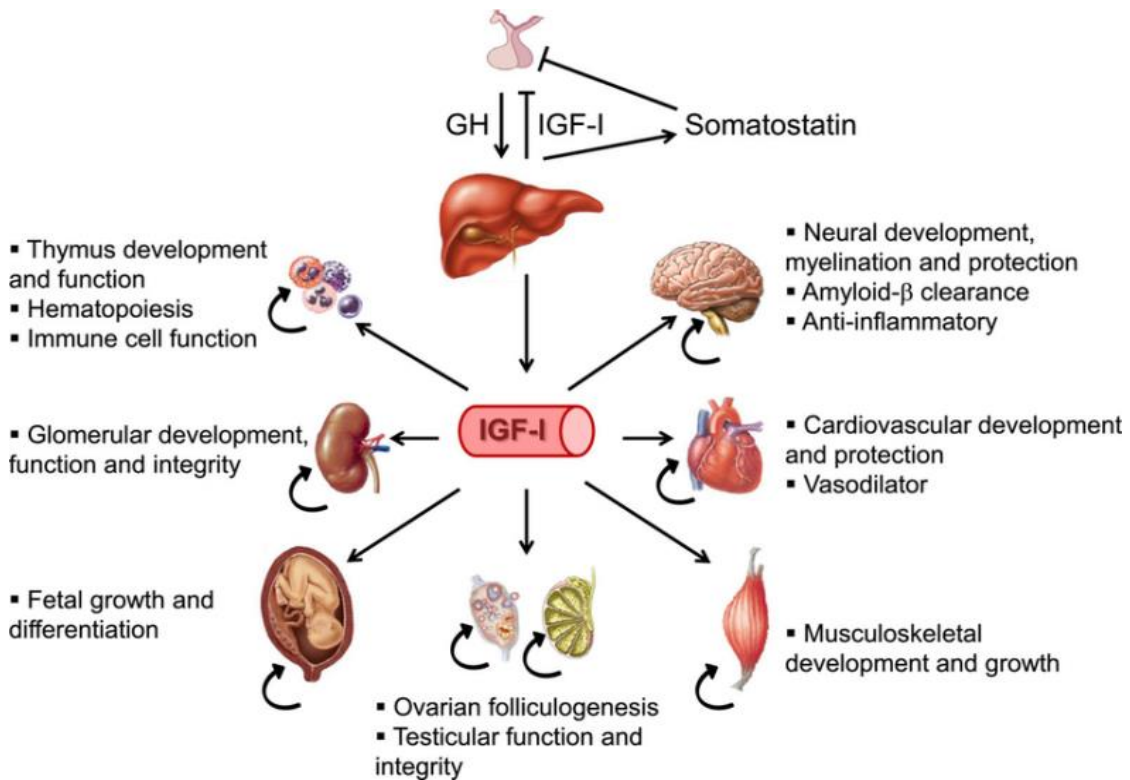
BP-4'ün 24 kDa glikoprotein yapısında glikozillenmiş ve glikozillenmemiş halleri bulunmaktadır. BP-3 ve BP-4'ün en önemli özellikleri, IGF'lerin reseptörlerine bağlanması için yeterli olan IGF-1 ve IGF-2 miktarlarını kontrol etmektir [7].

BP-5 ve BP-6 yeni bulunan ve özellikleri henüz tam olarak açıklanmamış bağlayıcı proteinlerdir. BP-5'in osteoblastların yenilenmesinde önemli bir işlevi olduğu gösterilmiştir [7].

2.6.4. IGF-1'in sentezi ve fizyolojik etkileri

IGF'ler başlıca anterior hipofizden salgılanan büyüme hormonunun (growth hormon(GH)) stümulasyonu ile karaciğerden salgılanır [6,7]. IGF-1'in üretimi sadece büyüme hormonu ile düzenlenmez; östrojen, parathormon, tiroid hormonu, epidermal büyüme faktörü de IGF-1 üretilmesinde görev alır [7]. Endokrin aktivitesinin yanında lokal mikroçevre içerisinde otokrin/parakrin etkisinin olduğu da gösterilmiştir [6]. Genel olarak IGF-1 ve 2 farklılaşma, proliferasyon, morfogenez, apoptozise karşı hayatta kalma, migrasyon, metabolizma fonksiyonlarını kontrol ve karsinogenez dahil olmak üzere çeşitli hücre işlemlerinde yer alırlar [9,20]. Ayrıca etkileri doku formasyonu ve remodellingi, beyin gelişimi ve enerji metabolizmasıyla ilişkilidir [9].

GH, negatif geri bildirim mekanizmasıyla çeşitli organlardan IGF-1'in sentezini uyardığından IGF-1, GH/IGF-1 aksının parçasıdır. IGF-1'in oral ve dental doku ve organların biyolojilerinde rol oynayabilir olduğuna dair göstergeler bulunmaktadır. Özellikle kemirgenlerde, diş gelişimi ve mineralizasyon sırasında IGF-1 ve IGF-2 varlığı gösterilmiştir [20].



Şekil 2.9. GH/IGF-1 aksının fizyolojik etkileri [44]

Büyüme faktörleri yara iyileşme sürecinde etkilidirler ve bunlar arasında bulunan IGF in-vitro koşullarda keratinositlerin proliferasyonunu stimüle eder [6,21] ve keratinosit hareketliliğini artırır [4]. Fibroblastların da çoğalmasında etkili olup ayrıca fibroblastlardan kollojen sentezini sitümüle eder [6]. IGF-1 vasküler biyoloji de önemli rol oynar [6,21]. Lokal olarak üretilmiş IGF-1 birkaç fizyolojik ve patolojik durumda, fetal gelişimde, aterosiklorozis ve doku tamirinde etkilidir. Doku tamirinin içeriğinde bulunan ve iyileşme sürecinin önemli hücresel komponentleri olan plateletler, makrofajlar ve fibroblastlar IGF-1 üretir, bağlayıcı proteinlerle beraber yara mikroçevresinin içine salgılanırlar [22]. IGF'nin kandaki konsantrasyonu 300-600 ng/ml'dir. GH reseptörlerinin aktive olması IGF-1 üretimini ve salgılanmasını arttırır ve IGF-1 düzeyi GH'a bağımlı olduğu için yaş ile değişir. IGF-1 düzeyi bebeklik ve çocukluk döneminde düşük, pubertede yüksektir ve yaşla ilerledikçe azalır. IGF'lerin insülin benzeri metabolik etkileri bulunmaktadır. İskelet ve kas dokusunda proteolizi durdurarak, protein sentezinde ve GH'nun metabolik etkilerinde bir mediatör olarak görev alırlar. IGF'ler miyoblast, osteoblast, oligodentrosit ve adipositler gibi hücrelerin farklılaşmasının kuvvetli uyarıcılarıdır. Lipoliz inhibisyonunu, yağ dokusunda glikoz oksidasyonunu, diyafram ve kalp kasına glikoz ve aminoasit transportunu, kollojen ve proteoglikan üretimini arttırırlar. Kalsiyum, magnezyum ve potasyum homeostazında rol alırlar. Aynı zamanda IGF-1 ve IGF-2'nin lenfosit üretimi ve fonksiyonlarını uyararak bağışıklık sistemi üzerinde etkili rol oynadığı görülmektedir [7].

Pre-osteoblastların hem proliferasyonunu hem de osteositlere farklılaşmasını ve tip I kollojen sentezini stimüle ederler. IGF üreten ve bu faktörlere duyarlı olan kemik hücreleri, inaktif formdaki IGF'ler için bir depodur [18]. IGF'ler, in vitro etkisini ya akut olarak protein ve karbonhidrat metabolizması üzerine anabolik etkisiyle veya uzun dönemde hücre çoğalması ile farklılaşması üzerine yapar. Hücre siklusunda DNA sentez ve hücre replikasyonunu uyarması çok önemli bir etkidir [17]. Ayrıca IGF-1, apoptotik Bcl (B-cell lymphoma) ve Bax (Bcl-2-associated X) proteinlerinin ekspresyonunu değiştirerek (modüle ederek) hücre ölümüne engelleyici yönde etki eder [23].

2.7. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, molekül ağırlığı düşük, yüksek aktiviteli atom veya moleküllerdir [24-26]. Serbest radikaller hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklerde etkili olduğundan

hücre yapı ve fonksiyonu için zararlıdır [24,26,27]. Perokside edici reaksiyonlara karşı hücresel membranlar da çok hassastır [28]. Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünleri ortaya çıkarır [25]. Oluşan bu ürünler ise hücre yırtılmalarına yol açarak membran akışkanlığının ve elastikiyetinin geri dönüşümsüz hasarına neden olur [28].

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan malondialdehid (MDA), üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelir [25,27] ve lipid peroksidasyonunun derecesinin tespiti için en sık başvurulanan test MDA ölçüm testidir [27]. MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanması, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara sebep olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojenik özelliktedir [25].

Serbest radikaller 3 şekilde oluşmaktadır [29]:

- Homolitik bağ kırılmasıyla kovalent bağı oluşturan elektronların her iki atomda da birer tane kalması ile [29]



- Bir moleküle bir elektronun katılımı ile [26,29,30],



- Bir molekülden bir elektronun ayrılması ile [26,29,30]



Serbest radikallerin yaşlanma, kalp-damar rahatsızlıkları, kanser [24,26,29], katarakt [24,26], sepsis (kana mikroorganizma ve toksin karışması), diyabetik retinopati (diyabet hastalarında rastlanan bir retina hastalığı), gastrointestinal organlarda kronik iltihaplar, solunum yolu rahatsızlıkları, damar hasarına bağlı olarak ortaya çıkan iskemi (belli bir bölgenin geçici bir süre kansız kalması) gibi birçok rahatsızlığın sebepleri arasında olduğu belirtilmektedir [24].

Canlı için hayati önemi olan oksijen ve azot, aynı zamanda en önemli serbest radikal kaynaklarıdır. Oksijen(reactive oxygen species, ROS) ve azot (reactive nitrogen species, RNS) içeren serbest radikaller canlıda fizyolojik düzeyde oluşarak yararlı etkiler gösterirken, bu düzeyin patolojik seviyeye yükselmesiyle zararlı etkiler göstermeye başlarlar [26]. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir [25]. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali, lipid peroksit, nitrik oksit en çok bilinen ROS'lardır [29]. Ayrıca, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hipoklorit gibi bazı bileşiklerde kimyasal olarak serbest radikal değildirler fakat onlar gibi yüksek aktiviteye sahiptirler [26].

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Süperoksit radikali oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi ile meydana gelir. İndirgenmiş geçiş metallerinin oto-oksidasyonu da süperoksit radikali oluşabilir. Süperoksit radikali direkt olarak zarar vermez. Bu radikal, hidrojen peroksit kaynağıdır ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. Bu şekilde zararlı etkisini gösterir [27].



Hidrojen peroksit (H_2O_2): Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron almasıyla meydana gelen peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu oluşur [27,30].



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin esas üretimi, $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile meydana gelir. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonu sırasında iki proton alır ve hidrojen peroksit ile moleküler oksijen oluşur. Bu reaksiyon sonucunda, radikal olmayan ürünler olduğundan dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenerek meydana gelir [27].



Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir fakat ROS içerisinde yer alır ve serbest radikal biyokimyasında çok önemli bir yere sahiptir [27]. Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu neticesinde en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$) meydana gelir [27,30].

Fenton reaksiyonu [27,30]:

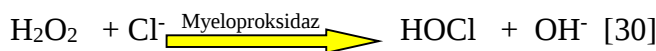


Haber-Weiss reaksiyonu [27,30]:



Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$): $\text{OH}^{\cdot}$ radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten meydana gelmektedir [27]. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla da oluşur [27,30]. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldır ve yarılanma ömrü çok kısa bir moleküldür. Hidroksil radikali ROS'un en güçlülerindendir. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton alarak tiyil radikalleri ($\text{RS}^{\cdot}$), karbon merkezli organik radikaller ($\text{R}^{\cdot}$), organik peroksitler ($\text{RCOO}^{\cdot}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara sebep olur [27].

Hipokloröz asit (HOCl): Fagositik özellikli nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimiyle, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile meydana gelen H_2O_2 'i, klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl 'ye dönüştürürler [30].



Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$): Oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönüne zıt yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesinde meydana gelebileceği gibi [27,30]; süperoksit radikalının nitrik oksit ile tepkimesi ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonuyla da meydana gelebilir [30].

Çizelge 2.3. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri [24]

Reaktif oksijen çeşitleri	
Radikal olanlar	Radikal olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit H_2O_2
Hidroksil, $HO^{\cdot}$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Ozon, O_3
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Singlet oksijen, 1O_2
Hidroperoksil, $HOO^{\cdot}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$

Reaktif nitrojen çeşitleri	
Reaktif olanlar	Reaktif olmayanlar
Nitrik oksit, $NO^{\cdot}$	Nitrosil, NO^+
Nitrojen dioksit, NO_2	Nitroz asit, HNO_2
	Dinitrojen trioksit, N_2O_3
	Dinitrojen tetraoksit, N_2O_4
	Nitronyum iyonu, NO_2^+
	Peroksinitrit, $ONOO^-$
	Alkil peroksinitrit, ROONO

Hücrelerde oluşan ROS'lar, "antioksidan savunma sistemleri" ya da "antioksidanlar" olarak tanımlanan mekanizmalar ile ortadan kaldırılırlar [27,29]. Ancak bazı durumlarda antioksidanlarla ortadan kaldırılardan daha yüksek miktarda ROS meydana gelebilir. Canlıda hücreyel savunma mekanizması aracılığı ile ortadan kaldırılardan daha yüksek miktarda ROS'un oluşmasına oksidatif stres denilir [27].

2.7.1. Serbest radikal kaynakları

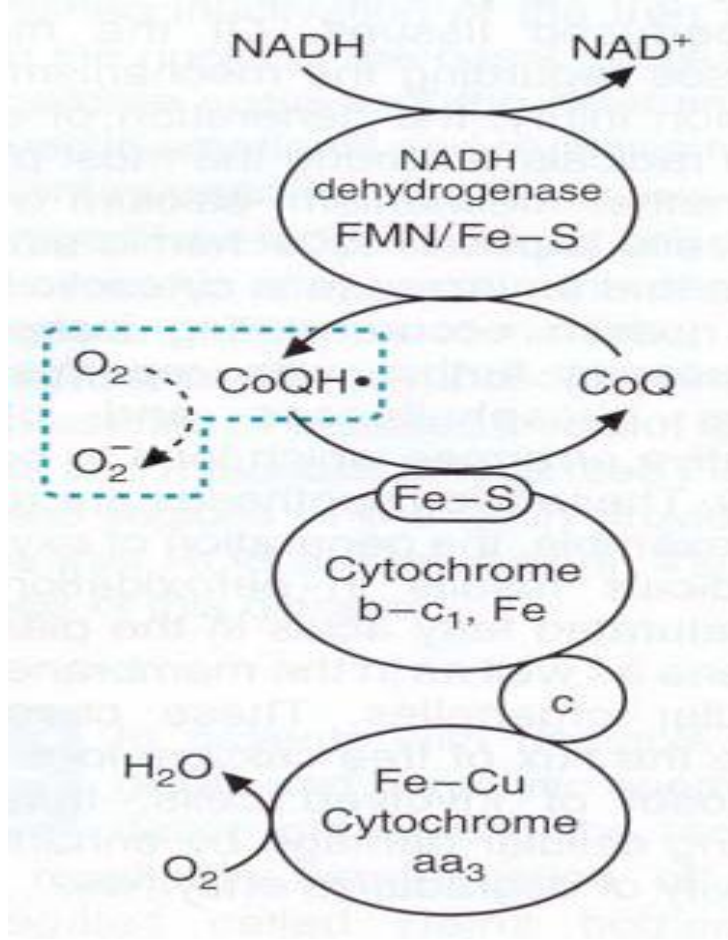
Serbest radikaller hücrede hem endojen hem de ekzojen kaynaklı materyaller tarafından sentezlenebilir [24-26,30]. Serbest radikal yapısına sahip ara ürünler, normal metabolizma sırasında çeşitli basamaklarda meydana gelmekte ve endojen kaynak olarak isimlendirilmektedir [26]. Endojen kaynaklar arasında mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve fagositik hücreler bulunmaktadır. Süperoksit radikallerinin çoğunlukla mitokondriyal veya mikrozomal elektron transferi sırasında meydana geldiği

belirtilmektedir [24]. Serbest radikaller ayrıca araşidonik asit metabolizması, fagositoz [24,30], kadınlarda ovulasyon ve üreme sırasında da meydana gelmektedir. Reaktif oksijen ve nitrojen çeşitleri yalnızca mitokondrilerin solunum mekanizması sırasında değil anaerobik koşullarda da oluşmaktadır [24].

Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) en önemli reaktif nitrojen çeşitleri arasında bulunmaktadır. NO memeli hücrelerindeki endotel (damar iç yüzü), sinir hücresi, makrofaj gibi farklı hücrelerde L-arginin den nitrik oksit sentaz enzimi aktivitesine bağlı olarak meydana gelmektedir. $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretimindeki artış damarlardaki endotel tabakası tarafından $\text{NO}\cdot$ radikalinin sentezlenmesine neden olur. Oluşan $\text{NO}\cdot$ ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalleri son derece reaktif olup, hızlı bir şekilde tepkimeye girerek nitrit, nitrat ve en önemlisi de peroksinitrit anyonunu (ONOO^-) oluşturmaktadır. Oluşan peroksinitrit anyonu fizyolojik pH'da nitrojendioksit ve hidroksil benzeri radikaller oluşturarak lipid peroksidasyonuna ve damar hasarına neden olarak kalp-damar hastalıklarına neden olmaktadır. Beyinde de belirlenen bu bileşenin nörodejeneratif hastalıklara sebep olduğu belirtilmektedir [24].

İyonize radyasyon [24,26,28,30] yanlış hazırlanan gıdaların tüketimi, hava kirliliği, tütün ürünleri, aşırı fiziksel aktivite, ekzojen kaynaklar arasında bulunmaktadır [24,26]. Bunların yanı sıra travma, enfeksiyon [24,26], ilaç tedavisi [24,30], alkol tüketimi, soğuk, toksin ve yetersiz beslenme gibi etkenlerden de kaynaklanabilmektedir [24]. Serbest formadaki demir, bakır ve krom gibi metallerde serbest radikal oluşturan Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının hızlarını arttırabilmektedir [26]. Serbest radikaller hücrelerde şu şekillerde meydana gelebilir:

- Biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunlu olan oksijen, mitokondride aerobik solunum esnasında kullanılmakta ve toplam oksijenin %2-5'i ROS' a dönüştürülmektedir [26]. Hücrelerdeki en önemli serbest oksijen radikali kaynağı mitokondrideki elektron transport zincirindeki sızıntıdır. Mitokondri iç zarındaki oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük ölçekte indirgendiği vakit mitokondriyal süperoksit radikal sentezi fazlaşır [27].

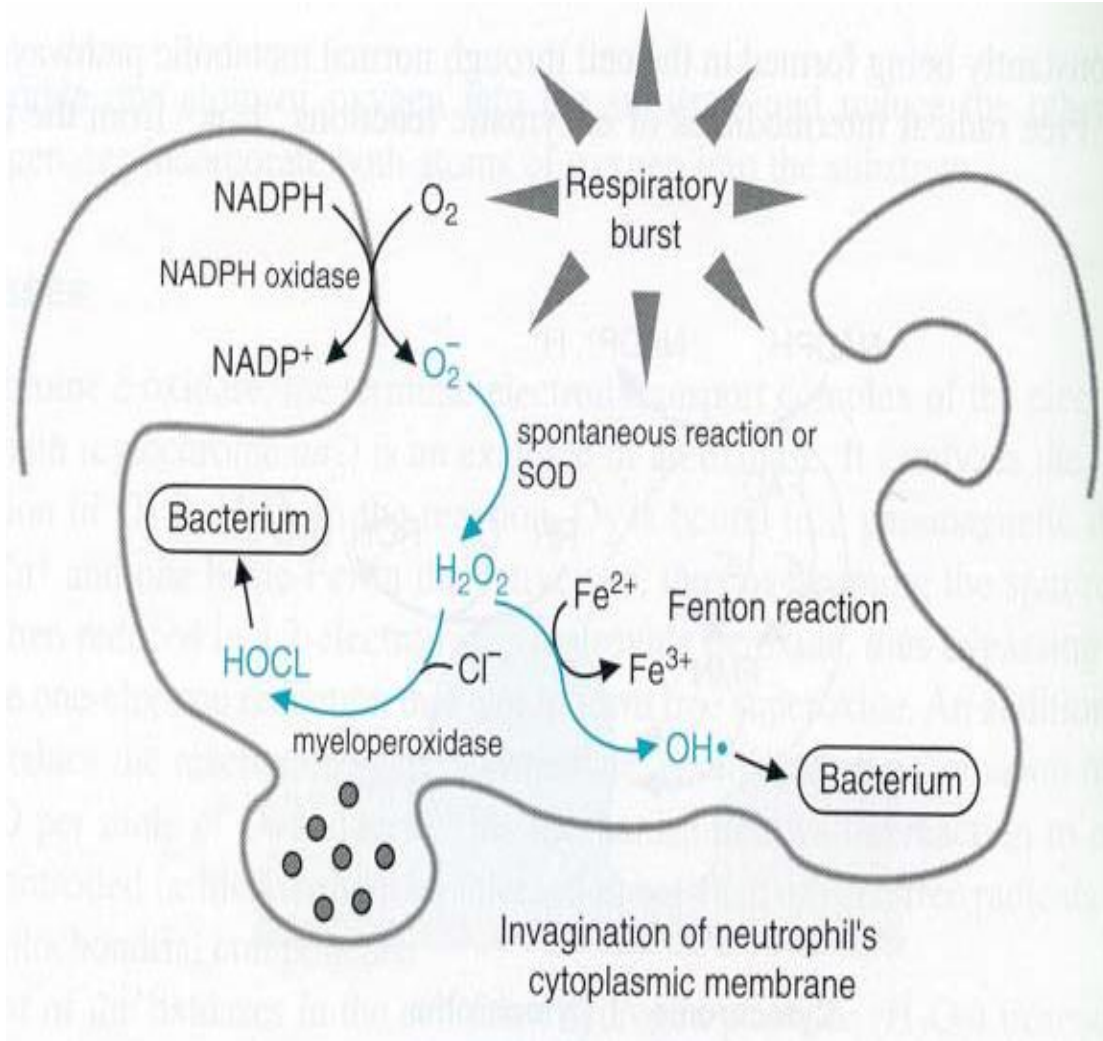


Şekil 2.10. Mitokondri iç zarında serbest radikal oluşumu [27]

- Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal oluşumu, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır [27].
- Hayvan hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı moleküllerin otooksidasyonu da süperoksit radikalının bir başka kaynağıdır [27].
- Reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağı da araşidonik asit metabolizmasıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma zarından araşidonik asidin serbestleşmesine neden olur. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da farklı serbest radikal ara ürünleri oluşur [27].
- Geçiş metalleri (özellikle demir ve bakır), fizyolojik şartlarda elektron alış verişleriyle meydana gelen oksidoredüksiyon tepkimelerinde bulunurlar. Geçiş metalleri bu fonksiyonları sebebiyle serbest radikal tepkimelerini hızlandıran katalizör işlevi görürler. Bakır ve demir, tiyollerden tiyil üretimini, H₂O₂ ve O₂^{•-}den OH[•] üretimini katalizlerler. Metal iyonlarının serbest radikal tepkimelerindeki esas önemi lipid peroksidasyonundaki etkileridir. Geçiş metalleri genel olarak, üretilmiş olan lipid

hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir tepkimelerini katalizlerler. Böylelikle fazla zararlı olmayan radikalleri daha çok zarar verici şekle dönüştürürler [27].

- Aktif hale gelmiş nötrofiller, makrofajlar ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama esnasında da farklı serbest radikaller meydana gelir [27].



Şekil 2.11. Solunum patlaması ve serbest radikal oluşumu [27]

- Bir takım yabancı zehirli maddeler de hücrede serbest radikal oluşumunu artırırlar. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal sentezlerler ya da antioksidan aktiviteyi düşürürler [27].
- Birçok enzimin katalitik döngüsü esnasında da serbest radikaller meydana gelir [27].
- Peroksizomlar hücre içi H₂O₂ kaynaklarından biridir. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi

oksidazlar, süperoksit üretmeden yüksek miktarda H_2O_2 üretimine neden olurlar. Fakat peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir [27].

2.7.2. Serbest radikallerin olumsuz etkileri

- Normal şartlarda sentezlenen reaktif oksijen çeşitlerinin %1 kadarı antioksidanlardan kaçarak peroksidatif zararlanmalara dolayısıyla da bazı sistemik hastalıklara ve yaşlanmaya sebep olmaktadır [24].
- Beyin, oksidatif hasara karşı en duyarlı bölgedir. Serbest radikaller, santral sinir sisteminin patolojik durumlarının pek çoğunda, direkt olarak doku hasarına neden olurlar [25]. Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan bileşenler hücre sıvısının akıcılığını etkileyerek hücre özelliklerini değiştirirler ve zarda yer alan proteinlerin zarar görmesine sebep olurlar. Dopaminin monoaminoksidaz enzimi tarafından etkilenmesinden sonra ortaya çıkan H_2O_2 'in Parkinson hastalığının ortaya çıkmasında bir etken olduğu bildirilmektedir. Oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan radikaller, nöron kaybına bağlı olarak ortaya çıkan Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır [24]. ROS; ekzitotoksisite, metabolik disfonksiyon ve kalsiyumun intraselüler homeostazisinde bozulma gibi çoğul mekanizmalarla dokuya zarar verir [25].
- Reaktif oksijenler deoksiriboz-fosfat omurgasına zarar verirken, pürin ve pirimidin bazları arasında da değişikliğe sebep olur. Böylelikle DNA protein yapısında değişimlere yol açar [24].
- Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi amino asitlere sahip olan proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki neticesinde özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller meydana gelir. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı içeren immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin üçüncül yapıları bozulur ve görevlerini yapamazlar [27].
- İyonize edici radyasyonla meydana gelen serbest radikaller DNA'ya zarar vererek hücrede mutasyona ve ölüme neden olurlar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan

H₂O₂ membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA'nın hasar görmesine, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir [27].

2.7.3. Yara iyileşmesinde serbest radikallerin rolü

ROS, yara iyileşmesine katkı sağlayan etkenlerden biridir ve normal metabolik olaylar sırasında özellikle bir enzim kompleks sistemi olan NADPH oksidaz enzimi vasıtasıyla sentezlenir. Hücrelerde önemli hasarlara yol açabilir. H₂O₂ özellikle demir ve bakır iyonlarının etkisiyle hidroksil radikallerini meydana getirerek şiddetli hücre hasarına sebep olur [13]. ROS normalde yara bölgesinde patojen mikroorganizmalara karşı savunmada gereklidir [1,13]. Nötrofiller ve makrofajlar, oksidasyon sonucu yüksek oranda ROS üretirler ve meydana gelen ROS yabancı mikroorganizmaların parçalanmasında görev alır. Ayrıca, bu fagositik hücrelerden salgılanan ROS aynı zamanda doku hasarına sebep olarak komşu dokularda da yara oluşmasına neden olabilir. Yaralı bölgedeki inflamasyon sonucunda devamlı meydana gelen süperoksit anyonu ve H₂O₂ mikrovasküler kan akışını düzenleyerek yeni damarların oluşumunu stümüle eder ve yara bölgesi için gerekli olan düzenli besin ve oksijeni sağlar. Bunun yanında, düşük konsantrasyonlardaki ROS hücre içi sinyal iletiminde de aracılık yapar. Ancak bu faydalı özelliklerinin yanında yüksek miktarlardaki serbest radikaller ya da oksidanlar, yara bölgesindeki dokuya zarar vererek iyileşme olayını bozabilmektedir. Özellikle, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonu, kollojenin yapısındaki hidroksiprolin ve prolini parçalayarak fibroblastların adezyon, proliferasyon ve canlılığını değiştirebilirler. Aynı zamanda H₂O₂ keratinositlerin göçünü durdururken, başka bir taraftan da EGF sinyal iletişimini keserek fibroblastlarda ciddi bir zarara neden olur. Yüksek miktarlarda meydana gelen ROS, sitotoksititeye neden olarak yara iyileşmesini geciktirmektedir [13].

Birçok hastalığın patogeneğinde ROS miktarları ölçülerek doku hasarının şiddeti belirlenmektedir. Yara iyileşmesinin her fazında oksidanlar rol alırlar fakat, ROS inflamatuvar fazda en yüksek seviyede bulunmaktadır [13].

2.8. Antioksidanlar

ROS'un meydana gelmesini ve bunların oluşturduğu zararı engellemek için pek çok savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri ya da "antioksidanlar" olarak adlandırılırlar [27].

Antioksidanlar vücutta özellikle protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi yapısal ve fonksiyonel moleküllerin oksidasyonunu önleyen ya da geciktirebilen [24,31], düşük konsantrasyonlarda bile oksidantlara karşı etkili olan maddelerdir [24,30].

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler [27,30]:

Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutar ya da daha zayıf yeni bir moleküle çevirirler [27,31].

Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltır ya da inaktif hale getirirler, reaksiyon hızını yavaşlatırlar [27,31].

Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engellerler ve serbest radikal oluşturan reaksiyonları durdurur [27,31].

Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarırlar. Organizmadaki antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların üretimini artırır [27,31].

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere 2 grupta incelenirler [24].

2.8.1. Enzimatik antioksidanlar

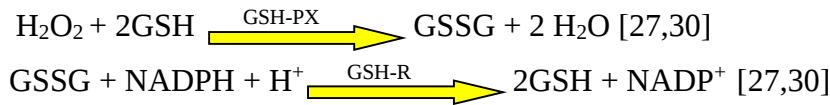
Süperoksid Dismutaz (SOD): Hücrel SOD çeşitli prostetik gruplara sahip metalloenzimlerin bir grubudur[30]. SOD enzimi süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir [13,27,31]. İnsanda bulunan SOD'un iki tipi vardır [27,31]. Bunlar sitoplazmada bulunan Cu-ZnSOD (bakır-çinko SOD) ile mitokondride bulunan MnSOD (manganez SOD) izomerlerdir [13,24,30,31]. Genel

olarak hücrede en bol bulunan SOD, sitozolik Cu-Zn SOD'dur [27]. Cu-ZnSOD, oksidatif savunma sistemin önemli komponentidir ve 32 000 molekül ağırlığındadır. Yara iyileşmesinin farklı aşamalarında ekili olmakla beraber inflamasyon fazının erken dönemlerinde daha etkilidir. MnSOD, 22 000 molekül ağırlığındadır. Deri yaralanmalarında granülasyon dokusu nötrofilleri tarafından yüksek miktarda salgınmaktadır [13]. Mn-SOD anti-tümör aktiviteye sahip en etkili antioksidan enzim olarak da bilinmektedir [24]. SOD enzimi, ROS'lardan süperokside bir elektron vererek H₂O₂'ye indirger [30].



Ayrıca süperoksit ile Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesiyle hidroksil radikalının oluşmasını engeller [30]. Oksijeni metabolize eden hücrelerde süperoksit seviyesini düşük tutar ve lipid peroksidasyonunu durdurur [31]. Fagosit edilmiş bakterilerin hücre içerisinde öldürülmesinde de görev alır [27]. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanılan dokularda fazladır [27,31].

Glutatayon pereoksidaz (GSH-P_x): Hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu olan enzimdir [27,30,31]. GSH-P_x, dört atom selenyum bağladığından dolayı seleno-sistein bileşiği grubunda bulunur ve katalitik aktivitesi bu özelliği ile sağlanır [30]. Sitozolde bulunur [27]. GSH-P_x, glutatyonu okside ederek H₂O₂'yu H₂O'ya indirgeyen bir enzimdir [13,27,30]. Glutatyonun okside halinin (GSSG) tekrar GSH'a indirgenmesi ise glutatyon redüktaz (GSH-R) enzimi ile sağlanır [27,30].

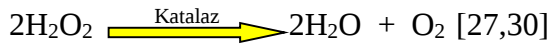


GSH-P_x diğer antioksidanlarla beraber solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engelleyici özelliktedir ve alyuvarlarda oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır [27,31].

GSH-P_x yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında yüksek miktarda bulunmaktadır. Oksidatif stresin fazla olduğu zamanlarda ROS ürünlerine karşı direnç oluşturarak keratonisitlerin çoğalmasını stimüle eder [13].

Glutasyon S Transferaz (GST): Lipid peroksitlerine karşı selenyum bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizmasını meydana getirirler. Katalitik ve katalitik olmayan pek fazla fonksiyonları vardır. Hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcı özelliği olması sebebiyle detoksifikasyon yapar. Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi ile reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizyen enzimdir [27,31].

Katalaz (CAT): Katalaz, yapısında dört tane hem grubu olan bir hemoproteindir [27]. 240 000 molekül ağırlığındadır [13]. Bitkiler, hayvanlar ve aerobik bakterilerde esas olarak peroksizomlarda bulunan bir enzimdir [13,24,27]. Fakat daha az olarak stoplazma ve mikrozomal fraksiyonda da bulunabilir [13,27]. Karaciğer ve alyuvarlarda yüksek miktarda bulunurken; beyin, kalp ve iskelet kaslarında düşük oranlarda görülmektedir [30]. CAT, hidrojen peroksidi su ve oksijene indirgemektedir [24,27,30,31].



CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktiviteleri artmadan SOD'un aktivitesinin artması hidrojen peroksitin birikmesine ve böylelikle hidroksil radikallerinin meydana gelmesine sebep olur [30].

Yara iyileşmesinin proliferasyon fazında, granülasyon dokusundaki CAT enzimi ekspresyonu oldukça yüksektir. Bu enzim yara bölgesinde H_2O_2 radikallerinin oluşumunu engelleyerek detoksifikasyonda önemli rol oynar [13].

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimi olup süperoksidi detoksifiye eder. Bu tepkime fizyolojik koşullarda devamlı gerçekleşen normal bir tepkimedir [27,31].



Bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanmış olur ve yüksek oranda enerji üretilir. Süperoksit üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aştığında diğer antioksidan enzimler devreye girerler ve süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar [27,31].

2.8.2. Non-enzimatik antioksidanlar

Vitamin C (Askorbik asit): Kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan vitamin C, suda çözünebilen zayıf asidik karakterli bir moleküldür [31]. Suda çözünebilen zincir kıran bir antioksidan olmasından dolayı özellikle detoksifikasyon metabolizması sırasında oluşan serbest radikalleri ve ROS'ları etkisiz hale getirir [30]. C vitamini, güçlü bir indirgeyici antioksidandır [27,31]. Süperoksit, hidroksil [27,31], singlet oksijen, hidroperoksil, lipid peroksil radikalleri ile tepkimeye girerler ve onları ortamdaki temizlerler [31].

Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolay bir şekilde tepkimeye girerek bir elektronunu verdiğinde, semidehidroaskorbat (DHA) radikaline çevrilir. Daha sonra DHA vitamin C kaynağı olarak kullanılır [30].



Lipid moleküllerinin oksidasyonu ile oluşan lipid peroksitler; vitamin C'nin antioksidan etkisiyle sulu ortamda çözünürler ve oksidan etkilerini kaybederler [31]. Askorbik asit (AA), serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak da kabul edilebilir. Fakat bu etkinin düşük miktarlarda olduğu, yüksek miktarlarda ise kuvvetli bir antioksidan olarak işlev gördüğü gösterilmiştir [27,31]. Ayrıca vitamin E ile verilen askorbik asit, hem yağ hem de sulu ortamda etkili olduğundan, serbest oksijen radikallerini temizleyici etkisi oldukça fazladır [31]. Askorbik asit, yara iyileşmesinin bütün aşamalarında bulunan bir antioksidandır ve ayrıca birçok enzimatik reaksiyon için de gereklidir. İnflamasyon fazında nötrofillerin apoptoz ve fagositozu için gerekli bir moleküldür. Proliferasyon aşamasında ise kollojenin üretimi, salınımı ve parçalanması olaylarında etkilidir. Özellikle kollojen üretiminin düzgün bir şekilde devam etmesi için vitamin C'nin homeostazisinin sıkı bir biçimde korunması lazımdır. Yaralanmayı takip eden süreçte AA'nın plazma ve dokudaki miktarları hızla düştüğünden AA supplementlerinin verilmesi iyileşmenin hızlanmasında fayda sağlayabilir [13].

İnflamatuvar cevapta meydana gelen radikaller özellikle hücre zarının yapısındaki doymamış yağ asitlerini etkilemektedir. Kuvvetli bir antioksidan olan AA, özellikle yara bölgesindeki nötrofiller tarafından sentezlenen $OH\cdot$, H_2O_2 ve hipoklorik asit radikallerini indirgeyici özelliğindedir [13].

Vitamin E (α - tokoferol): Hücrelerde bulunan yağda çözünen bir antioksidandır [13,30]. Doğada birbirinden farklı α , β , γ , ve δ - tokoferol ile α , β , γ , ve δ - tokotrienol isminde 8 çeşit vitamin E vardır [30]. Plazmada en fazla bulunan ve en kuvvetli antioksidan etkiye sahip olan tipi ise α - tokoferoldür [30,31]. Tokoferoller yağ dokusunda depolanırlar. Özellikle mitokondri, endoplazmik retikulum ve hücre zarındaki fosfolipitler alfa tokoferole afinite gösterdiği için bu kısımlarda yoğunlaşmaktadırlar [30].

Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirgeyici özelliktedir. Vitamin E zincir kırıcı bir antioksidandır. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, vitamin E ile sonlandırılabilir [27]. Vitamin E selenyum metabolizması için de önemlidir. Vitamin E, selenyumun canlıdan kaybını engelleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum gereksinimini düşürür [27,31].

Temel fonksiyonu membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunu ve hücre membranlarının hasar görmesini engellemektir [13,30]. Lipofilik özellikte olması sebebiyle hücre zarının çift tabakalı yapısının içerisine nüfuz edebilmektedir. Tokoferol-OH, bir H atomu ile serbest radikale bir elektron transfer ederek, hücre zarı proteinleri ile tepkimeye girmesini ya da lipid peroksidasyonunu başlatmasını önler. Tokoferol-OH serbest radikal ile etkileştiğinde tokoferol-O $\cdot$ radikali oluşur. Eğer askorbik asit ortamda yeterli miktarda mevcutsa tokoferol-O $\cdot$ ile askorbat tepkimeye girerek tokoferol-OH ve zayıf bir radikal olan semidehidroaskorbat oluşur. Bu şekilde güçlü bir etkiye sahip olan radikal, zayıf bir etkiye sahip radikal (dehidroaskorbat)'e dönüştürülür ve tokoferol-OH tekrar elde edilir [30].



Yapılan çalışmalarda Vitamin E'nin derinin antioksidan seviyesini yükselttiği gösterilmektedir. Vitamin E ve kombinasyonları ışığın deri üzerindeki zararını engellemede, cilt yaşlanmasını geciktirmede önemli derecede etkili olmaktadır [31]. Ayrıca diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada, topikal vitamin E uygulaması ile oksidatif stresin azaldığı ve kollojen miktarının arttığı bildirilmiştir [13].

Beta-karoten (Vitamin A): Karotenoidler; hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri ile reaksiyon vererek bir radikal temizleyicisi olarak görev alırlar. Yapılarındaki çift bağların yerleşik olmayan eşleşmemiş elektronlara bağlanmasıyla antioksidan etkide bulunurlar [31]. Karotenoidler, A vitamini'nin öncülleridir. Ayrıca sebzeye ve meyveye renk verirler. α -karoten, β -karoten, likopen, krosetin, kantaksantin ve fukoksantin en önemlileridir. İki molekül vitamin A'nın (retinol) bir araya gelmesiyle β -karoten meydana gelir. Besinlerle alınan β -karoten ince bağırsaktan emilirken retinole dönüştürülür [30]. β -karotenin singlet oksijeni bastırdığı, süperoksit radikalini ortadan kaldırdığı ve peroksit radikalleriyle doğrudan etkileşerek antioksidan olarak görev aldığı gözlenmiştir [13,27,31].



Akciğerlerdeki oksijen basıncına bağlı olarak β -karoten'nin prooksidan ya da antioksidan etkisi değişmektedir. Yüksek oksijen basıncında antioksidan etkisinin azaldığı, düşük basınçlarda ise kuvvetli bir singlet oksijen yakalayıcısı olarak görev yaptığı saptanmıştır [31]. Bunun yanında β -karoten yüksek miktarlarda bir pro-oksidan olarak davranır ve proteazları uyarır. Düşük oksijen basıncında ise peroksil radikali ile doğrudan tepkimeye girer [30].

Likopen: Kırmızı renge sahip bir karotenoid olup, yapısında yüksek oranda çift bağ bulunması sebebiyle, diğer karotenoidlere göre daha fazla singlet oksijen yakalamaktadır. Bunun yanında hidrojen peroksit ve nitrojen dioksiti de inaktive etme yeteneğindedir. Artıca tiyil ve sülfonil radikallerini yakalar. Nitrojen dioksitin sebep olduğu zar hasarı ve hücre ölümüne karşı lenfositleri koruyucu etkisi vardır [31].

K vitamini: Ispanak, lahana, domates, bezelye, gibi bitkilerde bulunan K vitamini vücutta kemiklerde kalsiyum çökmesinde [31] ve kanın pıhtılaşmasında işlev görür [2,31]. Bunun yanı sıra metabolik ürünleri de zincir kırıcı bir antioksidan özelliği gösterir. K vitaminin metabolitlerinden olan vitamin K-hidroksikinon, devamlı kendini yenileyebildiğinden kuvvetli bir antioksidan etki gösterir [31].

Glutatyon (GSH): Vücutta sistein, glisin ve glutamattan üretilmektedir [30]. Glutatyon karaciğerde sentezlenen [27,30,31] bir tripeptit olup [13,24,27,31], okside olmuş şekli

glutasyon disülfittir (GSSG) [31]. Hücre içerisinde sitoplazma, nükleus ve mitokondride görülmektedir. Oksidatif strese karşı detoksifikasyon görevindeki glutasyon peroksidaz, glutasyon transferaz gibi enzimlerle beraber reaksiyonlara katılır. Glutasyon ve indirgenmiş halinde, oksidatif hasar ve zehirli maddelere karşı hücreyi savunan yüksek oranda tiyol grubu bulunmaktadır [31].

Glutasyonlar hidroksil radikali ile singlet oksijeni doğrudan yakalama [24,30], H_2O_2 ve lipid peroksidazları detoksifiye etme, C ve E vitaminlerini aktif formlarına rejenere etme gibi fonksiyonel özellikleri taşımaları sebebi ile son derece önemli antioksidan mekanizmaları arasında yer almaktadır [24]. Proteinlerdeki sülfhidril gruplarının oksidasyonunu engeller, böylelikle işlevsel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu önler [27]. Eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati önemi vardır [27,31].

Yara iyileşmesinde GSH'nın görevini açıklayan pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, diyabetli hastalarda topikal olarak GSH uygulamasının belirgin yara kontraksiyonu sağladığı ve biyokimyasal parametreleri pozitif olarak etkilediği bildirilmiştir [13].

Melatonin: Epifiz bezinden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve bağışıklık gibi pek çok biyolojik işlevin düzenlenmesinde görev alan bir hormondur. Yapılan çalışmalarda antiproliferatif ve antioksidan özellikte olduğu gösterilmiştir. Bir antioksidan olarak bazı serbest radikalleri etkisiz hale getirdiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini engellediği gösterilmiştir. Melatoninin antioksidan özelliği, yapısındaki pirol halkasından kaynaklanır. Melatonin peroksil radikalini tutarak lipid peroksidasyonunu bitirir [31].

Melatonin hidroksil serbest radikaliyle tepkimeye girerek indolil katyon radikaline dönüşür ve bu şekilde süperoksit radikalini yakalar. Melatoninin lipofilik özellikte bir antioksidandır [27]. Hücrenin neredeyse tüm organallerine ve nükleusuna ulaşabilir [27,31] ve bundan dolayı çok geniş bir yelpazede antioksidan olarak işlev görür [27].

Ürik asit: Bir endojen serbest radikal temizleyicisi olarak işlev gören ürik asit vücut sıvılarında yaklaşık olarak 0,5 mmol/L kadar bulunmaktadır ve pürin metabolizmasının son

ürünüdür. Ürik asit kuvvetli bir singlet oksijen, peroksil radikali ($ROO\cdot$) ve $OH\cdot$ temizleyicisi olarak bilinmektedir [30].

Albumin: Sülfhidril grubu taşımasından dolayı kendi başına serbest radikalleri etkisiz hale getirir ve ekstraselüler antioksidan savunma sisteminin temel elemanıdır. Albumin bakır ve demiri kendine bağlayarak, bağlı metal yüzeyinde kalır [30]. Bu metal Haber- Weiss tepkimelerine katılabilir; ancak meydana gelen $OH\cdot$, albumin vasıtasıyla hemen etkisiz hale getirilir [30,31]. Bakır iyonuna bağlanabilmesinden dolayı bakır kaynaklı lipid peroksidasyonu engeller [31] Ayrıca albümin LOOH ve HOCl toplayıcısıdır [27]. Albuminde bir zararın oluşması çok fazla önemli değildir. Çünkü plazmada albümin yüksek oranda bulunur ve serbest radikaller farklı antioksidanlarla da etkisiz forma dönüştürülebilirler. Plazma proteinlerinden olan serüloplazmin ve transferrin de antioksidan aktiviteye sahiptir [30].

Taurin: Taurin, retina başta olmak üzere birçok dokuda yüksek miktarda bulunan bir moleküldür. Safra asidi konjugasyonu, detoksifikasyon, membran stabilizasyonu, osmoregülatör ve nörotransmitter olarak görev yaptığı gibi, vücuttaki birçok dokuda antioksidan olarak da işlev görür [31].

Ateroskleroz oluşmuş tavşanlarda; taurin uygulanmasıyla plazma, karaciğer, aort, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) ve düşük yoğunluklu protein (LDL) fraksiyonunda yükselmiş olan lipid peroksit seviyelerini azalttığı, karaciğerde vitamin C seviyesini yükselttiği ve azalmış olan GST aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Buna göre, taurinin ateroskleroz oluşturulan tavşanlarda oksidatif stresi düşürmesinde antioksidan aktivitesinin rolü olduğu gösterilmiştir [31].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Deney Protokolü

Deneylerde 250-300 g ağırlıkta her grupta 6 adet olacak şekilde 24 adet wistar-albino tipi erkek rat kullanıldı. Ratlar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinden sağlandı. Deney öncesi ve deney süresince kuru pelet yem ve su ile ad libitum olarak beslenen ratlar, kafeslerinde gün ışığı döngüsünde aydınlanma ortamına bırakıldı. Deneylerde kullanılan ilaç formu Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi fizyoloji-biyokimya araştırma laboratuvarında hazırlandı.

3.2. IGF-1 Solüsyonunun Hazırlanması

Yara oluşumundan sonra uygulanacak olan IGF-1 (sigma 18779-50UG) bovine serum albumin (BSA) içerisinde 1,5 ng/ml dozda olacak şekilde hazırlandı.

3.3. Gruplar ve Yara Modelinin Oluşturulması

İlk önce hayvanların standart bir terazide ağırlık ölçümleri yapıldı. Daha sonra ketamin (Ketalar 60mg/kg) ve ksilazin (Rhompun 5mg/kg) intraperitoneal (IP) olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlandı. Hayvanların dorsalinde anestezi altında medulla spinalislerin iki yanında 2 cm uzunluğunda dorsalateral eksizyonel yaralar oluşturulup, yara dudakları 4 süturla adapte edildi.



(a)



(b)

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

Deney grupları:

Kontrol: Yara oluşturulmayıp tedavi uygulanmayan grup.

Tedavisiz yara: Bu gruptaki hayvanlara IP olarak enjekte edilen ketamin-ksilazin anestezi altında medulla sipinalislerinin iki yanında 2 cm uzunluğunda dorsalateral eksizyonel yara açıldı ve herhangi bir tedavi uygulanmadı.

BSA kontrol: Aynı şekilde yara oluşturulduktan sonra günde 1 kez topikal olarak her yara bölgesine 1 ml olacak şekilde BSA uygulandı.

IGF-1 tedavi: Aynı şekilde yara oluşturulduktan sonra BSA içinde hazırlanan 1,5 ng/ml dozda IGF-1 solüsyonu, her yara bölgesine 1 ml olacak şekilde günde 1 kez topikal olarak uygulandı.

Operasyon sonrası analjezinin sağlanması için farmakolojik ajan olan parasetamol, içme suyuna 2 mg/ml olacak şekilde kullanıldı. Operasyonun 3. gününde hayvanlar sabah saat 10.00'da ağırlıkları tartılarak kalplerinden kan çekilmek suretiyle feda edildiler. Kontrol grubu hayvanların aynı bölgelerinden alınan dokuları ile diğer gruplardan alınan yara dokuları bulaşmayı önleyecek materyale sarıldıktan sonra sıvı azot içerisinde konularak donduruldu ve analizlere kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Dokuda MDA tayin yöntemi

Dokudaki MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) oluşumu yöntemi ile çalışıldı [32]. Doku örnekleri tartılarak soğuk trikloroasetik asit içinde buzlu ortamda homojenizatör ile homojenize edildi. Daha sonra süpernatant alınarak üzerine tiyobarbitürik asit (TBA) ve bütilhidroksi toluen (BHT) eklendi. Vorteksle karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi. Çıkarıldıktan sonra soğutulan numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm'de köre karşı okundu. Dokulardaki MDA düzeyleri nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.4.2. Dokuda GSH yöntemi

Dokuda glutasyon tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı [33]. Doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj edildikten sonra sodyum fosfat (Na_2HPO_4) ve dithiobisnitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Dokulardaki glutasyon konsantrasyonu $\mu\text{mol/g}$ doku olarak hesaplandı.

3.4.3. Dokuda AA yöntemi

Roe ve Kuether'in Berger tarafından modifiye edilmiş yöntemi kullanıldı [34]. Doku perkloroasetik asit/etilendiamin tetra asetik asit (PCA/EDTA) karışımı içinde buz soğukluğunda homojenize edildi. Homojenat 15000 g (RCF)'de 3 dk. 4 °C santrifüj edildi. Bir tüpe standart AA çözeltisi, başka bir tüpe kör için PCA çözeltisi ve örneklerin hazırlanacağı tüplere süpernatant konuldu. Her bir tüpe renk reaktifi eklenip vorteksenerek, 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Numunelerin ısısı 0°C'ye getirilip her bir tüpe sülfürik asit (H_2SO_4) eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Numuneler 515 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu. Dokudaki AA konsantrasyonu mg/g doku olarak hesaplandı.

3.4.4. Dokuda NO_x tayin yöntemi

Dokulardaki NO_x konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışıldı [35,45]. Dokular 0,1M sodyum fosfat tamponu (pH:7) ile (1:9) homojenize edildikten sonra 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. 200 μL süpernatana, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda vanadyum klorür (VCl_3) eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess 1+2 reaktifleri eklendi. 37°C'de 30 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm'de okundu. 6,4 mM'lık stok sodyum nitrit (NaNO_2) standartı günlük olarak dilüe edilerek 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 μM konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Hazırlanan standart eğriden dokulardaki NO_x konsantrasyonu $\mu\text{mol/g}$ doku olarak hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bütün veriler Anova varyans analizi ile karşılaştırıldı ve sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. $P<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.6. Bulgular

Kontrol, tedavisiz yara, BSA kontrol ve IGF-1 tedavi grubuna ait NO_x , GSH, MDA, AA düzeylerine ait sonuçlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubunda NO_x düzeyi $98,09 \pm 8,30 \mu\text{mol/g}$ doku, GSH düzeyi kontrol grubunda $0,67 \pm 0,11 \mu\text{mol/g}$ doku, MDA düzeyi kontrol grubunda $56,82 \pm 4,12 \text{ nmol/g}$ doku, AA düzeyi kontrol grubunda $33,76 \pm 7,77 \mu\text{g/g}$ doku olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. MDA, GSH, NO_x ve AA düzeyleri

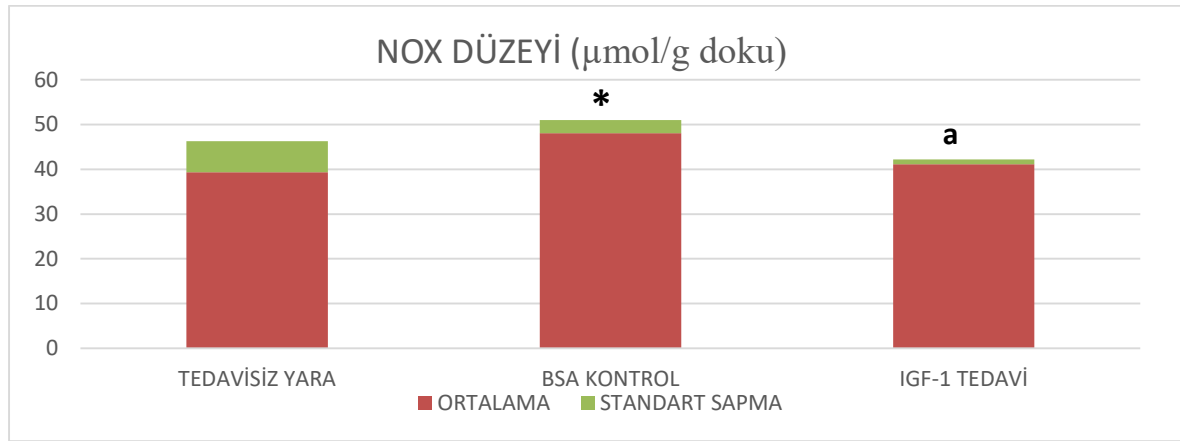
GRUPLAR	Gün	MDA Düzeyi [nmol/g doku]	GSH Düzeyi [$\mu\text{mol/g}$ doku]	NO_x Düzeyi [$\mu\text{mol/g}$ doku]	AA Düzeyi [mg/g doku]
Tedavisiz grup [n=6]	3.Gün	15.51 ± 0.50	0.75 ± 0.09	39.36 ± 6.91	27.22 ± 5.62
BSA Uygulanan [n=6]	3.Gün	$73.62 \pm 3.76^*$	$0.54 \pm 0.08^*$	$48.09 \pm 2.90^*$	$16.14 \pm 1.52^*$
BSA+IGF-1 uygulanan grup [n=6]	3.Gün	$67.43 \pm 6.45^{*,a}$	$0.23 \pm 0.02^{*,a}$	41.14 ± 1.08^a	$40.34 \pm 4.92^{*,a}$

* $p < 0.05$ Tedavisiz grup ile karşılaştırıldığında

^a $p < 0.05$ BSA uygulanan grup ile karşılaştırıldığında

3.6.1. NO_x sonuçları

NO_x düzeyi tedavisiz yara grubunda $39,36 \pm 6,91$ $\mu\text{mol/g}$, BSA kontrol grubunda $48,09 \pm 2,90$ $\mu\text{mol/g}$, IGF-1 tedavili grupta ise $41,14 \pm 10,80$ $\mu\text{mol/g}$ olarak tespit edilmiştir. ($p < 0,05$). BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu NO_x düzeylerini BSA uygulaması yapılan gruba göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. BSA uygulaması tedavisiz grup ile kıyas edildiğinde doku NO_x düzeylerini anlamlı olarak artırmıştır. Eksojen IGF uygulaması ile doku NO_x düzeyleri istatistiksel olarak azalmıştır. Doku MDA ve NO_x düzeylerindeki değişimlerin birbirleriyle de paralel olduğu görülmektedir.



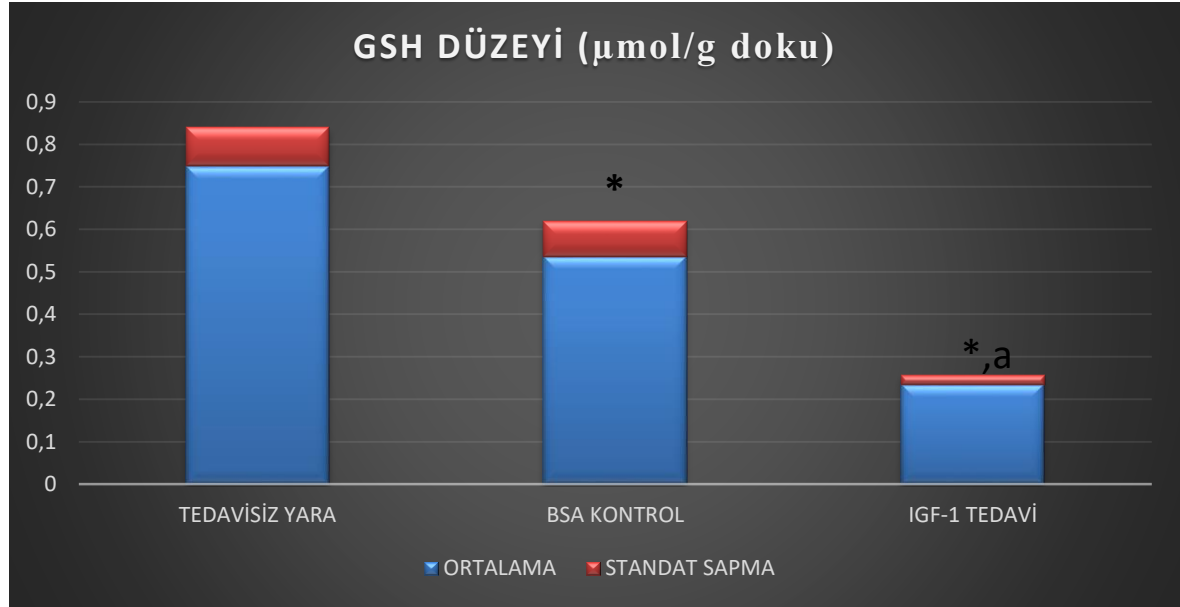
Şekil 3.1. NO_x düzeyleri ($\mu\text{mol/g}$ doku)

^a $p < 0,05$ BSA kontrol ile IGF-1 tedavili grup karşılaştırıldığında

* $p < 0,05$ Tedavisiz yara ile BSA kontrol karşılaştırıldığında

3.6.2. GSH sonuçları

GSH düzeyi tedavisiz yara grubunda $0,75 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g}$, BSA kontrol grubunda $0,54 \pm 0,08$ $\mu\text{mol/g}$, IGF-1 tedavili grupta ise $0,23 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ olarak tespit edilmiştir. BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu GSH düzeylerini BSA uygulaması yapılan gruba göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. Doku GSH düzeylerindeki bu azalmaların artmış lipid peroksidasyonunu ortadan kaldırmak için GSH'un kullanılmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.



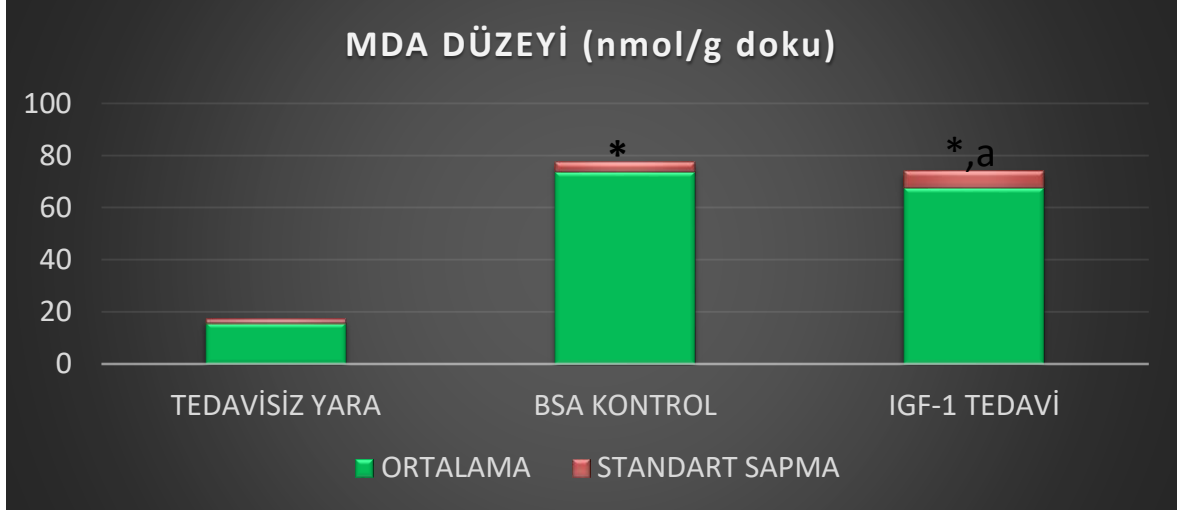
Şekil 3.2. GSH düzeyleri (μmol/g doku)

* $p < 0.05$ Tedavisiz yara ile karşılaştırıldığında

^a $p < 0.05$ BSA kontrol grubu ile IGF-1 tedavili grup karşılaştırıldığında

3.6.3. MDA sonuçları

MDA düzeyleri tedavisiz yara grubunda $15,51 \pm 0,50$ nmol/g, BSA kontrol grubunda $73,62 \pm 3,76$ nmol/g, IGF-1 tedavili grupta ise $67,43 \pm 6,45$ nmol/g olarak tespit edilmiştir. BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu MDA düzeylerini BSA uygulaması yapılan gruba göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. Hem BSA uygulaması hem de BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu MDA düzeylerini yara iyileşmesinin inflamasyon fazında artırmıştır. Doku lipid peroksidasyonu düzeyindeki bu artışların BSA dan kaynaklandığı düşünülmektedir ($p < 0,05$).



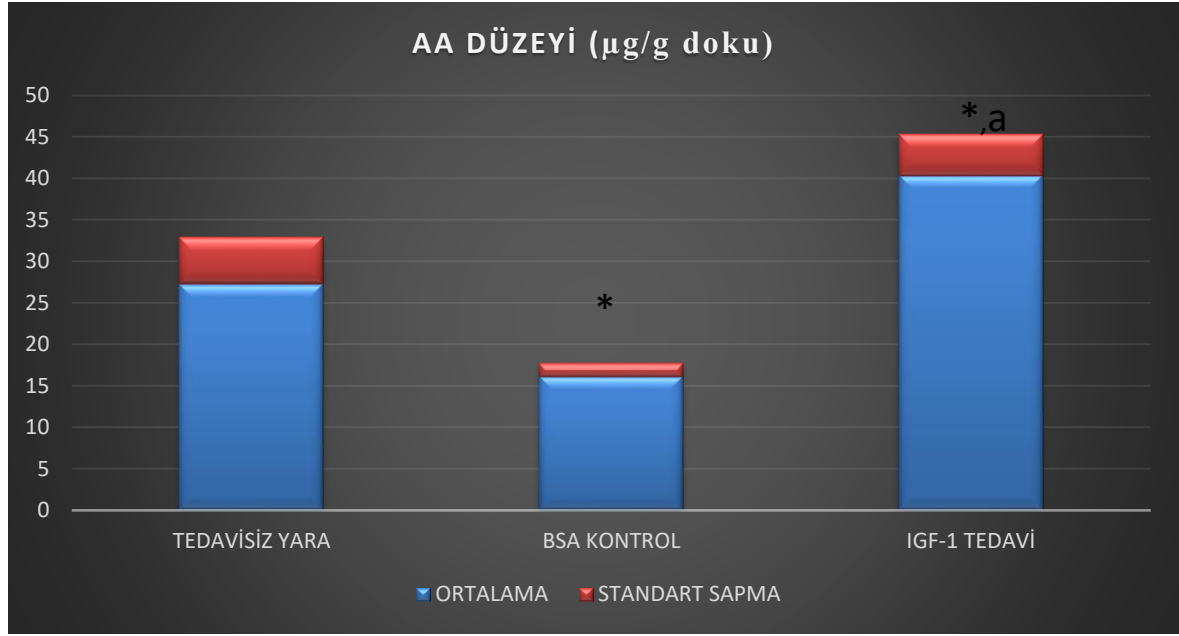
Şekil 3.3. MDA düzeyleri (nmol/g doku)

^ap<0.05 BSA kontrol grubu ile IGF-1 tedavili grup karşılaştırıldığında

*p<0.05 Tedavisiz yara grubu ile karşılaştırıldığında

3.6.4. AA sonuçları

AA düzeyleri tedavisiz yara grubunda $27,22 \pm 5,62$ $\mu\text{g/g}$ doku, BSA kontrol grubunda $16,14 \pm 1,52$ $\mu\text{g/g}$ doku, IGF-1 tedavili grupta ise $40,34 \pm 4,92$ $\mu\text{g/g}$ doku olarak tespit edilmiştir. BSA uygulaması yapılan grup ile tedavisiz grup karşılaştırıldığında doku AA düzeylerinin BSA uygulaması ile istatistiksel olarak azaldığı tespit edilmiştir. IGF-I uygulaması ile hem tedavisiz gruba oranla hem de BSA uygulaması yapılan gruba oranla doku AA düzeyleri istatistiksel olarak artmış bulunmuştur. Eksojen IGF-I uygulaması yara dokusu AA düzeylerini arttırmıştır. Doku GSH düzeyleri üzerine ise azaltıcı bir etki yapmıştır.



Şekil 3.4. AA düzeyleri (µg/g doku)

^ap<0.05 BSA grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında

*p<0.05 Tedavisiz yara grubu ile karşılaştırıldığında

4. TARTIŞMA

Yara iyileşmesi travma ile başlatılan sistematik, hücrel ve biyokimyasal olayların yeni doku oluşumu ile sonuçlanmasıdır [2]. Yara iyileşmesi birbiri içine geçmiş 3 fazdan oluşur: Hemostaz-inflamasyon fazı, proliferasyon fazı ve remodelling (yeniden modellenme) fazı [2,3,5,13-15]. Yara tamir süreci, yaralanmadan hemen sonra çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınmasıyla başlatılır [6].

Yara iyileşme süreci farklı büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar ile düzenlendiği gibi bazı çalışmalarda ROS'un da bu süreçte çok önemli regülatör olduğu gösterilmiştir [1]. Yara iyileşmesinde oksidanlar iyileşmenin her fazında görülmektedir. Fakat ROS miktarının inflamatuvar fazda en yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir [13]. ROS, patojen istilasına karşı savunma için önemlidir. Yapılan bir çalışmada ise, hidrojen peroksitin düşük seviyelerinin yara anjiogenezinde önemli etkisi olduğu gösterilmiştir. Ancak ROS'un aşırı miktarları onların yüksek reaktivitelerinden dolayı zarar verici özelliكتedir [1]. Serbest radikaller yara dokusunda hasara sebep olarak iyileşme olayını geciktirebilmektedirler. Yüksek miktarlarda meydana gelen ROS sitotoksititeye sebep olarak yara iyileşme sürecini uzatır [13].

Büyüme faktörlerinden biri olan IGF-1'in hücrelerin büyümesi, farklılaşması, [6,8,9] çoğalması, göçü [8,9] ve hayatta kalmaları üzerinde önemli etkileri vardır [6,9]. IGF-1 yara bölgesinde eksprese edilerek epidermal ve dermal yara iyileşmesinde önemli bir rol üstlenir. Pek çok çalışmada IGF-1'in eksojen olarak yalnız uygulanması ya da uygun diğer büyüme faktörleriyle beraber kombinasyonun yara iyileşmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir [6]. Yara iyileşme sürecinde keratinosit [6,21] ve fibroblastların proliferasyonunu ayrıca fibroblastlardan kollojen sentezini uyardığı da saptanmıştır [6].

Askorbik asit, yara iyileşmesinin bütün aşamalarında bulunan bir antioksidandır ve ayrıca birçok enzimatik reaksiyon için de gereklidir. İnflamasyon fazında nötrofillerin apoptoz ve fagositozu için gerekli bir moleküldür. Proliferasyon aşamasında ise kollojenin üretimi, salınımı ve parçalanması olaylarında etkilidir. Özellikle kollojen üretiminin düzgün bir şekilde devam etmesi için vitamin C'nin homeostazisinin sıkı bir biçimde korunması lazımdır. Yaralanmayı takip eden süreçte AA'nın plazma ve dokudaki miktarları hızla

düştüğünden AA supplementlerinin verilmesi iyileşmenin hızlanmasında fayda sağlayabilir [13].

Bizim yaptığımız çalışmada IGF-I uygulaması ile hem tedavisiz gruba oranla hem de BSA uygulaması yapılan gruba oranla doku AA düzeylerini istatistiksel olarak arttırdığı gözlenmiştir. Yani eksojen IGF-I uygulaması yara dokusu AA düzeylerini arttırmıştır. IGF-1'in fibroblastları uyarıp kollojen sentezini tetiklediğinden AA düzeyinin artması beklenen bir durumdur. Çünkü kollojen sentezi için AA'e ihtiyaç duyulur.

Vücutta sistein, glisin ve glutamattan üretilmektedir [30]. Glutasyon karaciğerde sentezlenen [27,30,31] bir tripeptit olup [13,24,27,31], okside olmuş şekli glutasyon disülfittir (GSSG) [31].

Yara iyileşmesinde GSH'ın görevini açıklayan pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, diyabetli hastalarda topikal olarak GSH uygulamasının belirgin yara kontraksiyonu sağladığı ve biyokimyasal parametreleri pozitif olarak etkilediği bildirilmiştir [13].Yapılan başka bir çalışmada ise GH ve IGF-1 'in fare aortunda ve insan kroner arteriyel endotel hücrelerinde Mn-SOD, Cu/Zn-SOD ve GSH-Px1 gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir [46].

Bizim çalışmamızda BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu GSH düzeylerini BSA uygulaması yapılan gruba göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. Doku GSH düzeylerindeki bu azalmaların, inflamasyon fazında artış gösteren lipid perosidasyonunu ortadan kaldırmak için GSH kullanımının artışından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

IGF-1'in aort vasküler düz kas hücrelerinde ROS üretimini stimüle ettiği bildirilmiştir [36,46]. Orta düzeyde oksidatif stresin ise vasküler düz kas hücrelerinde IGF-1 ve IGF-1R ekspresyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum IGF-1'in ROS üretimi vasıtasıyla kendi miktarını arttırdığını düşündürmektedir. Ayrıca IGF-1 endotelyumda NO üretiminin düzenlenmesinde görev alarak vazodilatör cevabın oluşmasında önemli bir rol oynar. Vasküler tonusu bozulmuş diyabetli hastalarda yapılan çalışmalarda, IGF-1 eklenmesinden sonra endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesinin artmasıyla vazodilatörlere verilen vasküler cevaplarda iyileşme görülmüştür [46].

Bizim yaptığımız çalışmada BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu NOx düzeylerini BSA uygulaması yapılan gruba göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. BSA uygulaması tedavisiz grup ile kıyas edildiğinde doku NOx düzeylerini anlamlı olarak artırmıştır. Eksojen IGF uygulaması ile doku NOx düzeyleri istatistiksel olarak azalmıştır. Doku MDA ve NOx düzeylerindeki değişimlerin birbirleriyle de paralel olduğu görülmektedir.

Wang C.Y ve arkadaşlarının (2016) diyabetik kardiyomiyopatili ratlarda yaptıkları bir çalışmada, diyabetik ratlara IGF-1 uygulamalarıyla rat kalbinin sol ventriküler dokusunda SOD miktarının anlamlı bir şekilde arttığı ve MDA seviyesinin ise anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir [47]. Fukuoka ve arkadaşlarının (2010) IGF- 1 uygulanan 3T3-L1 adiposit hücreleri ile yaptıkları çalışmada ise IGF-1'in ROS üretimini arttığı; SOD, CAT, GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin ölçümleri yapıldığında tedaviden 3 saat sonra bir değişim gözlenmezken, 6 saat sonra SOD ve CAT ekspresyonlarında artış olduğu gözlemlenmiştir [36].

Bizim yaptığımız çalışmada ise BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu MDA düzeylerini BSA uygulaması yapılan gruba göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. Hem BSA uygulaması hem de BSA içinde IGF-I uygulaması yara dokusu MDA düzeylerini yara iyileşmesinin inflamasyon fazında artırmıştır. Doku lipid peroksidasyonu düzeyindeki bu artışların BSA' dan kaynaklandığı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

IGF-1'in yara iyileşmesinde etkilerini ortaya koyan çalışmalar yapılmasına rağmen, yara iyileşmesi sırasında oksidan ve antioksidan parametreler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu tip çalışmaların yapılması ileride kronikleşmiş yaraların tedavisi için önemli olabilir. Biz de bu nedenle deri yaralanmalarında IGF-1'in oksidan ve antioksidanlar üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu göstermek amacıyla bu çalışmayı yaptık.

IGF-I in yara dokusu antioksidan kapasiteyi AA üzerinden arttırdığı ve doku MDA ve NOx düzeylerini de BSA uygulanan gruba göre istatistiksel olarak azalttığı görülmektedir. IGF-I aynı zamanda yapısı itibariyle de tıpkı EGF gibi sülfidril köprülerine sahip olması nedeniyle antioksidan gibi davranmış olabileceği, yine BSA uygulamasının bu çalışmada IGF-I'in olası pozitif etkisini maskeleymiş olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan dolayı gelecek çalışmalarda IGF-1'in kendi başına farklı yöntemlerle uygulanıp, tüm parametreler yönünden tekrar incelenmesi IGF-1'in asıl etkisinin ortaya çıkarılmasında yardımcı olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Schäfer, M. and Werner, S. (2008). Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*, 58,165-171.
2. Özkorkmaz, E.G. ve Özay, Y. (2009). Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2), 63-67.
3. Kumar, S. and Wong P.F. and Leaper D.J. (2004). What is new in wound healing?. *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 34,147-160.
4. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16,585-601.
5. João De Masi E.C., Campos A.C., João De Masi F.D., Ratti M.A., Ike, I.S. and João De Masi R.D. (2016). The influence of growth factors on skin wound healing in rats. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngol*, 82(5),512-521.
6. Todorović, V., Peško, P., Micev, M., Bjelović, M., Budeč, M., Mičić M., Brašanac, D. and Ilić-Stojanović O. (2008). Insulin-like growth factor-I in wound healing of rat skin. *Regulatory Peptides*,150,7-13.
7. Harbili, S. (2008). İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF): Egzersiz metabolizması ve kas dokusu üzerine etkileri. *Genel Tıp Dergisi*, 18(4),177-184.
8. Nedić, O. and Masnikosa, R. (2009). Separation of the molecular forms of the insulin-like growth factor (IGF)—Binding proteins by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877, 743–746.
9. Denley, A., Cosgrove, L.J, Booker, G.W., Wallace, J.C. and Forbes, B.E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*,16, 421–439.
10. Duan, C., Ren, H. and Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and Comparative Endocrinology*,167,344–351.
11. İnternet: Derinin yapısı ve fonksiyonları. (2013). Web: <http://www.dicle.edu.tr/Contents/5b682db4-a2bf-456e-ad8b-8b8eb31572c6.pdf> adresinden 15 Mayıs 2017 tarihinde alınmıştır.
12. İnternet: Durna, Y.M. Derinin yapısı, görevleri ve histopatolojisi. Web: www.istanbuleah.saglik.gov.tr/.../derinin_yapisi_gorevleri_ve_histopatolojisi_-_yus... adresinden 15 Mayıs 2017’de alınmıştır.
13. Aksoy, H. ve Özakpınar Ö.B. (2014). Yara iyileşmesi ve oksidatif stres. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 18,153-158.

14. Harper, D., Young, A. and McNaught, C.E. (2014). The physiology of wound healing. *Surgery*, 32(9),445-450.
15. Guo, S. and DiPietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3),219-229.
16. Falabella, A.F. and Kirsner R.S. (Editors). (2005). *Wound healing*. Boca Raton : Talyor & Francis, 17- 25.
17. Keleş, M. ve Türkeli, M. (2005). İnsülin benzeri büyüme faktörü sistemi ve kanser. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 3(2),39-43.
18. Akıncı, E., Üçöz Kocaşaban, D. ve Halhallı H.C. (2012). Akut iskemik inmeli hastalarda IGF-1, GH, IBFBP3 düzeyleri ile inme ve komorbid hastalıklarla ilişkisi. *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, 12(1), 3-7.
19. Darcan, Ş. ve Mir, S. (1998). Kronik böbrek yetmezliğinde büyüme hormonu-insülin benzeri büyüme faktörü(IGF) aksı. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3,117-120.
20. Götz, W., Kunert, D., Zhang, D., Kawarizadeh, A., Lossdörfer, S. and Jäger, A. (2006). Insulin like growth factor system components in the periodontium during tooth root resorption and early repair processes in the rat. *European Journal of Oral Sciences*, 114,318-327.
21. Aydın, F., Kaya, A., Karapinar, L., Kumbaraci, M., Imerci, A., Karapinar H., Karakuzu, C. and Incesu, M. (2013). IGF-1 increases with hyperbaric oxygen therapy and promotes wound healing in diabetic foot ulcers. *Journal of Diabetes Research*,1-6
22. Bitar, M.S. (2000). Insulin and glucocorticoid-dependent suppression of the IGF-1 system in diabetic wounds. *Surgery*,127(6),687-695.
23. Yılmaz, Ö., Koruk, İ., Çayır, K., Koruk, M. and Yılmaz, A. (2009). Usefullness of serum insulin-like growth factor(IGF-1) and insulin like growth factor binding protein-3(IGFBP-3) for colorectal cancer diagnosis. *International Journal of Hematology and Oncology*, 19(1), 23-27.
24. Ekici, E. ve Sağdıç, O. (2008). Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. *Gıda*, 33(5), 251-260.
25. Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2), 91-96.
26. Erbaş, M. ve Şekerci, H. (2011). Serbest radikallerin önemi ve gıda işleme sırasında oluşumu. *Gıda*, 36 (6), 349-356.
27. İnternet: Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. (2009). Web: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf> adresinden 15 mayıs 2017 tarihinde alınmıştır.

28. Gürgöze, S.Y., Şahin, T. ve Durak, M.H. (2007). Memelilerde ortalama yaşam süresi ve yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolü. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 33 (1), 43-49.
29. Ögüt, S. ve Atay, E. (2012). Yaşlılık ve oksidatif stres. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(2), 68-74.
30. Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1), 73-83.
31. Kasapçopur Özel, G.S. ve Birdane, Y.O. (2014). Antioksidanlar. *Kocatepe Veterinary Journal* 7(2): 41-52.
32. Casini, A., Ferrali, M. and Pompella, A. (1986). Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice. *The American Journal of Pathology*, 123, 520-531.
33. Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A.S., Koçak-Toker, N., Sivas, A. and Öz, H. (1985). The effect of cronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione tranferase in rats. *Toxicology*, 36(1), 71-76.
34. Berger, J., Shepard, D., Morrow, F. and Taylor, A. (1989). Relationship between dietary intake an tissue levels reduced and total vitamin C in nonscorbutic guinea pig. *The Journal of Nutrition*, 119, 734-740.
35. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982). Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131–138.
36. Fukuoka, H., Iida, K., Nishizawa, H., Imanaka, M., Takeno, R., Iguchi, G., Takahashi, M., Okimura, Y., Kaji, H., Chihara, K. and Takahashi Y. (2010). IGF-I stimulates reactive oxygen species (ROS) production and inhibits insulin-dependent glucose uptake via ROS in 3T3-L1 adipocytes. *Growth Hormone & IGF Research*, 20, 212–219.
37. İnternet: Cells Types and Layers of the Epidermis. (2016). *Melenialskin*. Web: <https://melenialskinblog.com/skin-care-hacks-never-try/> adresinden 8 Mayıs 2017’de alınmıştır.
38. İnternet: Picture of the Skin. (2014). *WebMD*. Web: <http://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin#1> adresinden 8 Mayıs 2017 ‘de alınmıştır.
39. İnternet: The 4 Phases of wound healing. (2017). *Harbor Medteck*. <http://www.harbormedtech.com/architect/> adresinden 8 Mayıs 2017’de alınmıştır.
40. İnternet: Semple, John W., Italiano, Joseph E., and Freedman J. Platelet functions in haemostasis. *Nature Reviews Immunology* 11. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.nature.com%2Fnr%2Fjournal%2Fv11%2Fn4%2Ffig_tab%2Fnri2956_F1.html&date=2017-05-06, Son Erişim Tarihi: 2017-05-06.

41. İnternet: Nishida, T., Inui, M., and Nomizu, M. Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2017-05-13. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2F271856302_fig9_Molecular-structure-of-human-IGF, Son Erişim tarihi 2017-05-13.
42. İnternet: Conti, E., Musumeci, M.B., De Giusti, M., Dito, E., Mastromarino, V., Autore, C., and Volpe, M. (May, 2011). IGF-1 and atherothrombosis: relevance to pathophysiology and therapy. *Clinical Science*, Vol. 120. Web: <http://www.clinsci.org/content/120/9/377> adresinden 13 Mayıs 2017’de alınmıştır.
43. İnternet: Zumkeller, W., and Burdach, S. (1999). The insulin-like growth factor system in normal and malignant hematopoietic cells. *Blood*, Vol. 94. Web: <http://www.bloodjournal.org/content/94/11/3653?sso-checked=true> adresinden 13 Mayıs 2017’de alınmıştır.
44. İnternet: Puche, J.E., Castilla-Cortázar Larrea, I. (November, 2012). Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *Journal of Translational Medicine*, Vol. 10. Web: https://www.researchgate.net/publication/233410494_Human_conditions_of_insulin-like_growth_factor-I_IGF-I_deficiency adresinden 15 Mayıs 2017’de alınmıştır.
45. Miranda, K.M., Espey, M.G. and Wink, D.A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.
46. Higashi, Y., Sukhanov, S., Anwar, A., Shai, S.Y. and Delafontaine, P. (2010). IGF-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(4), 245-254.
47. Wang, C.Y., Li, X.D., Hao, Z.H. and Xu, D. (2016). Insulin-like growth factor-1 improves diabetic cardiomyopathy through antioxidative and anti-inflammatory processes along with modulation of Akt/GSK-3 β signaling in rats. *Korean J Physiol Pharmacol*, 20(6):613-619.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :AKSANCAK, Tuğçe
 Uyruğu :T.C.
 Doğum tarihi ve yeri :12.11.1990, Ankara
 Medeni hali :Evli
 Telefon : 05356558536
 e-posta :tugce.ozmen90@gmail.com



Eğitim

Derecesi

Yüksek lisans

Lisans

Lise

Eğitim Birimi

Gazi Üniversitesi /Biyoloji

Gazi Üniversitesi/ Biyoloji

Selahattin Akbilek Lisesi

Mezuniyet Tarihi

Devam Ediyor

2012

2007

İş Deneyimi

Yıl

2013-2014

2015-2016

2017-2018

2018-Halen

Çalıştığı Yer

Açı derhanesi

Gazi Üniversitesi

Özel Kahramanlar Anadolu
Lisesi

Çözüm Özel Öğretim Kursu

Görev

Biyoloji Öğretmeni

Öğrenci Asistan

Biyoloji öğretmeni

Biyoloji öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Özmen, T. and Coşkun Cevher Ş. (2016). Effect of insulin like growth factor (IGF-1) on oxidative stress during wound healing. *6th World Congress on Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels*, 24-27 May 2016, Isparta, 533-534.
2. Tort, S., Oğuz, E., Özmen, T., Tuğcu Demiröz, F., Coşkun Cevher, Ş, and Acartürk, F. (2016). Effect of doxycycline/collagen coaxial nanofibers on oxidative stress in the wound healing I. malondialdehyde and glutathione levels. *6th World Congress on Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels*, 24-27 May 2016, Isparta, 545.

Hobiler

Kitap okuma, müzik dinleme.



GAZİ GELECEKTİR..